

MISE AU POINT DE QUELQUES TECHNIQUES PHARMACOLOGIQUES AU CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES PHARMACEUTIQUES

A.M. RATSIMBASON, R. ANDRIANTSIFERANA

Les effets biologiques des plantes médicinales sur les animaux de laboratoire sont évalués par rapport à des produits de référence. Ces produits de référence, d'utilisation internationale, sont néanmoins utilisés sur des animaux élevés, produits par le Centre National de Recherches Pharmaceutiques et qui sont soumis aux variations de facteurs écologiques locaux.

Les animaleries européennes sont dotées de conditions optimales, avec une température constante toute l'année, une photopériode invariable et un régime alimentaire fixe. Si certaines salles d'expérimentation du C.N.R.P. disposent de climatiseur, l'éclairage naturel varie avec la photopériode saisonnière, et le régime alimentaire suit les fluctuations des productions agricoles.

Les animaux importés dont on dispose sont donc soumis à ces variations de facteurs écologiques qui ont sûrement des répercussions sur leur réactivité (7) et donc sur leur réponse aux produits de référence.

Nous présentons dans cette note, la mise au point de quelques techniques pharmacologiques avec des produits de référence communément utilisés, sur le Rat, la Souris et le Cobaye tricolore adaptés aux conditions d'élevage du C.N.R.P. Il s'agit de :

— L'action de l'acide acétyl-salicylique sur l'hyperthermie provoquée par la levure de bière chez le Rat.

— L'action du phénylbutazone sur l'inflammation provoquée par l'injection d'une suspension de poudre de levure de bière sous l'aponévrose plantaire chez le Rat.

— L'action antalgique de la codéine, de l'acide acétyl-salicylique et du phénylbutazone par la technique de KOSTER chez la Souris.

— La création d'un état d'hypersensibilité chez le Cobaye au moyen de l'ovalbumine.

I - ACTION DE L'ACIDE ACÉTYL-SALICYLIQUE SUR L'HYPER- THERMIE PROVOQUÉE PAR LA LEVURE DE BIÈRE CHEZ LE RAT (2, 4) :

1. Principe :

Une hyperthermie provoquée par la levure de bière injectée par voie sous-cutanée chez le Rat est diminuée par l'acide acétyl salicylique.

2. Mise au point de la méthode :

Le problème est d'obtenir des animaux homogènes au point de vue température aussi bien à un instant donné qu'au cours de la journée.

Nous avons choisi des Rats mâles de trois à quatre mois pesant 150-250 g, que nous introduisons dans une salle où la température est maintenue à $21^{\circ} \text{C} \pm 1$. Leur température rectale est mesurée à 09 H, 10 H et 12 H à l'aide d'une thermosonde. Au bout de 10 jours, la température rectale des animaux devient dans la majorité homogène.

Après avoir écarté les animaux dont les variations de température sont trop importantes, nous arrivons à constituer un ensemble où l'erreur standard de la moyenne de trois mesures quotidiennes de la température ne dépasse pas $0,2^{\circ} \text{C}$.

La veille du test, les animaux sont répartis au hasard en quatre groupes de 6 animaux. La nourriture est enlevée. 18 H avant le test, une suspension de poudre de levure de bière à 15 p. 100 dans de l'eau distillée est injectée s. c., à raison de 1 ml/100 g de poids. Cette injection entraîne au bout de ce temps, une hyperthermie de 2°C et qui persiste au-delà de 24 H.

3. Application à l'étude de l'action anti-pyrétique de l'acide acétyl salicylique :

Le jour de l'expérience, l'hyperthermie des animaux est vérifiée. L'acide acétyl salicylique est mis en suspension dans de l'eau gommeuse à 1 p. 1000 : trois concentrations en progression géométrique sont préparées. Il sera administré à raison de 1 ml/100 g de poids. Le groupe témoin reçoit le véhicule.

Les températures sont ensuite relevées 1 H, 2 H et 4 H après l'administration du produit.

4. Résultats :

La réduction de l'hyperthermie est appréciée en comparant les lots traités au témoin. Elle est exprimée en pourcentage par la formule

$$y = 100 \left(1 - \frac{T_p}{T} \right)$$

où T_p est la température des animaux traités par le produit, T , la température des animaux témoins.

La figure 1 montre que l'acide acétyl salicylique à 200 mg/kg, non seulement annule l'hyperthermie, mais provoque même une hypothermie. La figure 2 représente l'effet des trois doses d'acide acétyl-salicylique 4 H après leur administration. On obtient une droite qui permet de calculer la DE_{50} , qui est de 74 mg/kg.

Par une technique similaire M. Colot (2) donne comme DE_{50} de l'acide acétyl salicylique la valeur de 150 mg/kg. Il semblerait que nos animaux soient plus sensibles à l'action de l'acide acétyl salicylique. L.O. Randall (5) rapporte une donnée de Kadatz qui, chez des rats rendus hyperthermiques par un extrait d'*E. coli*, trouve la valeur de 165 mg/kg pour diminuer la température de $2,5^{\circ} C$. Ce qui se rapproche de nos résultats où 200 mg/kg diminue l'hyperthermie de plus de $2^{\circ} C$.

II - ACTION DU PHENYLBUTAZONE SUR L'INFLAMMATION PROVOQUEE CHEZ LE RAT PAR LA METHODE DE RANDALL ET SELITTO (5) :

1. Principe :

L'inflammation de la patte induite par une suspension de levure de bière peut être réduite par des anti-inflammatoires.

2. Mise au point de la méthode :

Le problème que nous avons rencontré dans l'étude de l'inflammation expérimentale est la reproductibilité des résultats. Nous l'avons résolu en travaillant dans une enceinte à température constante sur des animaux préalablement hydratés.

2.1. Hydratation :

Des rats des deux sexes, de 140-190 g sont mis à jeûn de nourriture la veille du test. Le jour de l'expérience, les animaux reçoivent p.o. aux temps T_0 , 2,5 ml d'eau distillée par 100 g de poids. Ils sont ensuite introduits dans des cages à métabolisme. L'urine recueillie au temps $T_0 + 2 H$ est mesurée. Seuls sont retenus pour le test d'inflammation, les animaux qui ont éliminé au moins 30 p. 100 du volume d'eau administrée.

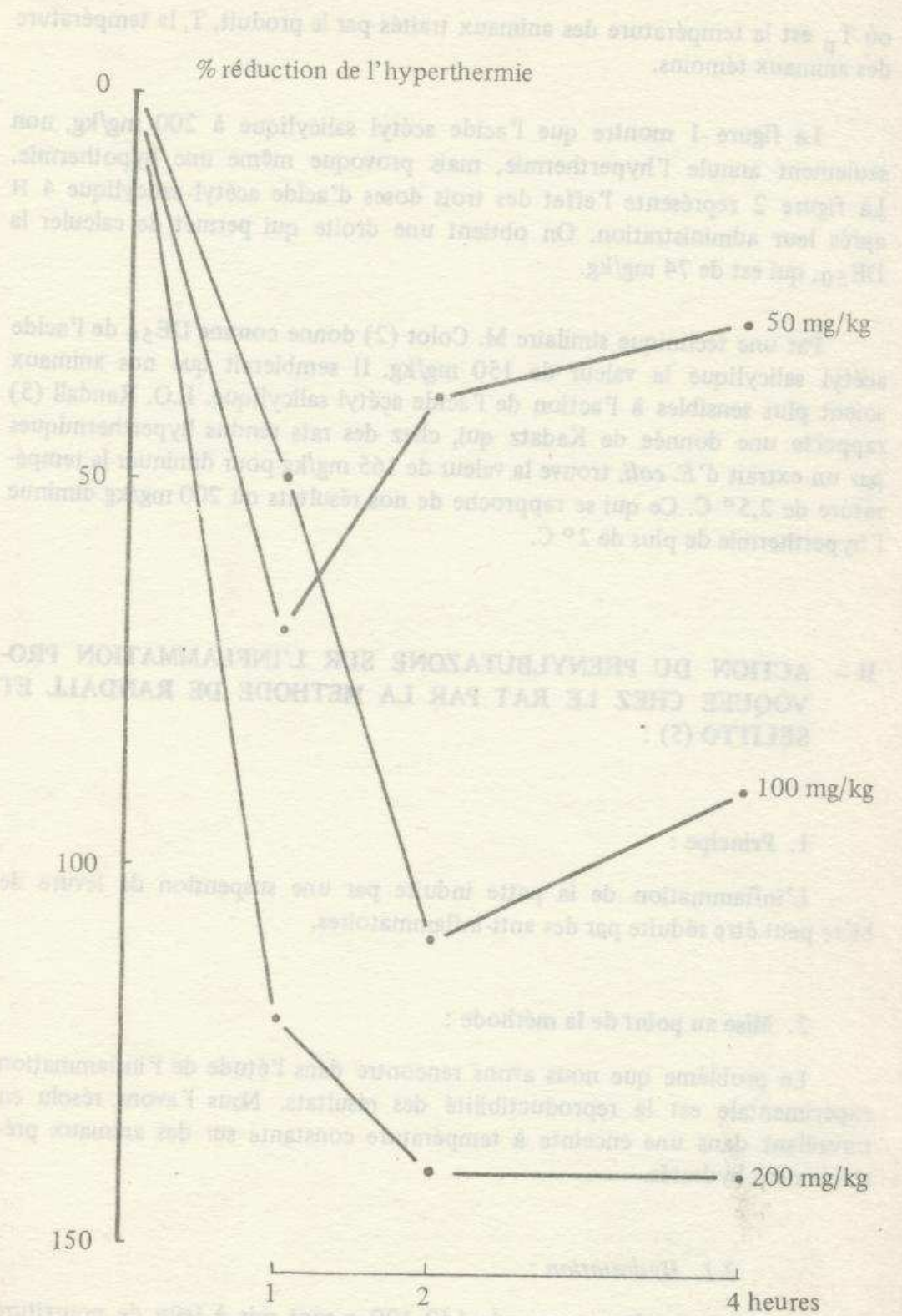


Figure 1: Action en fonction du temps de l'acide acétyl salicylique sur l'hyperthermie provoquée chez le Rat.

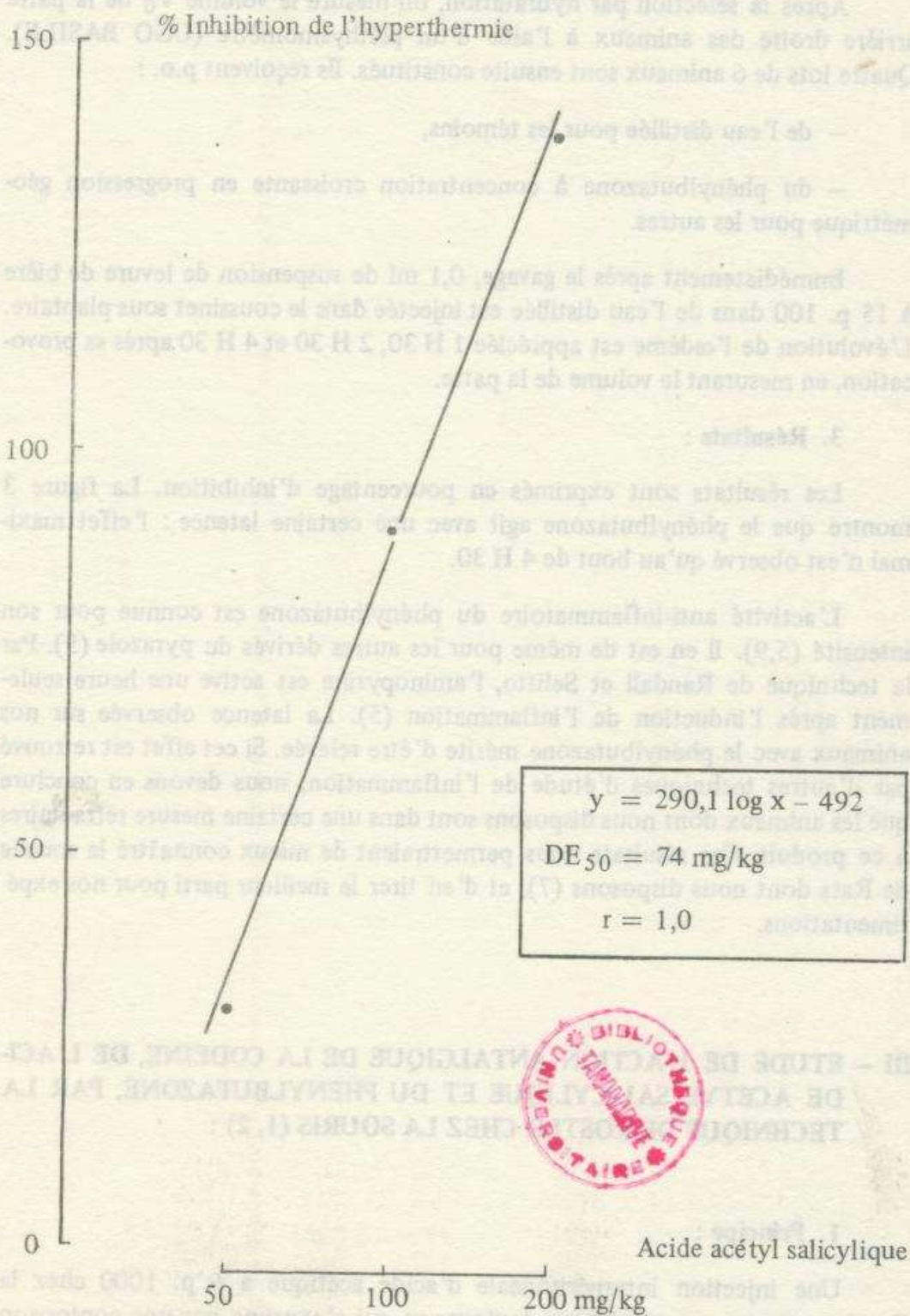


Figure 2 : Droite effet/dose de l'inhibition de l'hyperthermie par l'acide acétyl salicylique chez le Rat, 4 heures après son administration P.O.

2.2. Mesure pléthysmométrique :

Après la sélection par hydratation, on mesure le volume V_0 de la patte arrière droite des animaux à l'aide d'un pléthysmomètre (UGO BASILE). Quatre lots de 6 animaux sont ensuite constitués. Ils reçoivent p.o. :

- de l'eau distillée pour les témoins,
- du phénylbutazone à concentration croissante en progression géométrique pour les autres.

Immédiatement après le gavage, 0,1 ml de suspension de levure de bière à 15 p. 100 dans de l'eau distillée est injectée dans le coussinet sous plantaire. L'évolution de l'œdème est appréciée 1 H 30, 2 H 30 et 4 H 30 après sa provocation, en mesurant le volume de la patte.

3. Résultats :

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition. La figure 3 montre que le phénylbutazone agit avec une certaine latence : l'effet maximal n'est observé qu'au bout de 4 H 30.

L'activité anti-inflammatoire du phénylbutazone est connue pour son intensité (5,9). Il en est de même pour les autres dérivés du pyrazole (5). Par la technique de Randall et Selitto, l'aminopyrine est active une heure seulement après l'induction de l'inflammation (5). La latence observée sur nos animaux avec le phénylbutazone mérite d'être relevée. Si cet effet est retrouvé par d'autres techniques d'étude de l'inflammation, nous devons en conclure que les animaux dont nous disposons sont dans une certaine mesure réfractaires à ce produit. Ces résultats nous permettraient de mieux connaître la souche de Rats dont nous disposons (7), et d'en tirer le meilleur parti pour nos expérimentations.

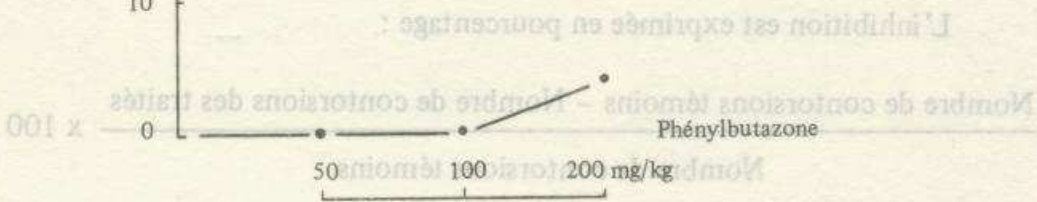
III — ETUDE DE L'ACTION ANTALGIQUE DE LA CODEINE, DE L'ACIDE ACETYL SALICYLIQUE ET DU PHENYL BUTAZONE, PAR LA TECHNIQUE DE KOSTER CHEZ LA SOURIS (1, 2) :

1. Principe :

Une injection intrapéritonéale d'acide acétique à 6 p. 1000 chez la Souris provoque un syndrome douloureux qui s'exprime par une contorsion abdominale. L'animal étire son corps, traînant le ventre par terre. L'étirement est accompagné d'une contorsion latérale du tronc, avec extension des pattes arrières. Les antalgiques réduisent ou suppriment ces contorsions abdominales.

2. Méthode :

Au temps T₀, les produits à tester sont administrés par voie orale à des souris adultes mâles ou femelles. Au temps T₀ + 30 minutes, l'acide acétique à 6 p. 1000 (dans de l'eau gommée à 1 p. 1000) est injecté par voie intrapéritonéale, à raison de 0,25 ml par souris. On compte alors le nombre de contorsions abdominales qui apparaissent dans les dix premières minutes, puis de la 10^e à la 20^e minute. Le nombre de contorsions par souris est alors comptabilisé pour chacune des deux périodes.



3. Résultats :

Le but de ce travail est d'obtenir la droite de référence de chacun des 3 produits testés. Les résultats sont représentés sur les figures 1, 2 et 3. Pour les trois substances étudiées, l'inhibition de l'inflammation est bien démontrée. Les DE₅₀ déterminées graphiquement sont :

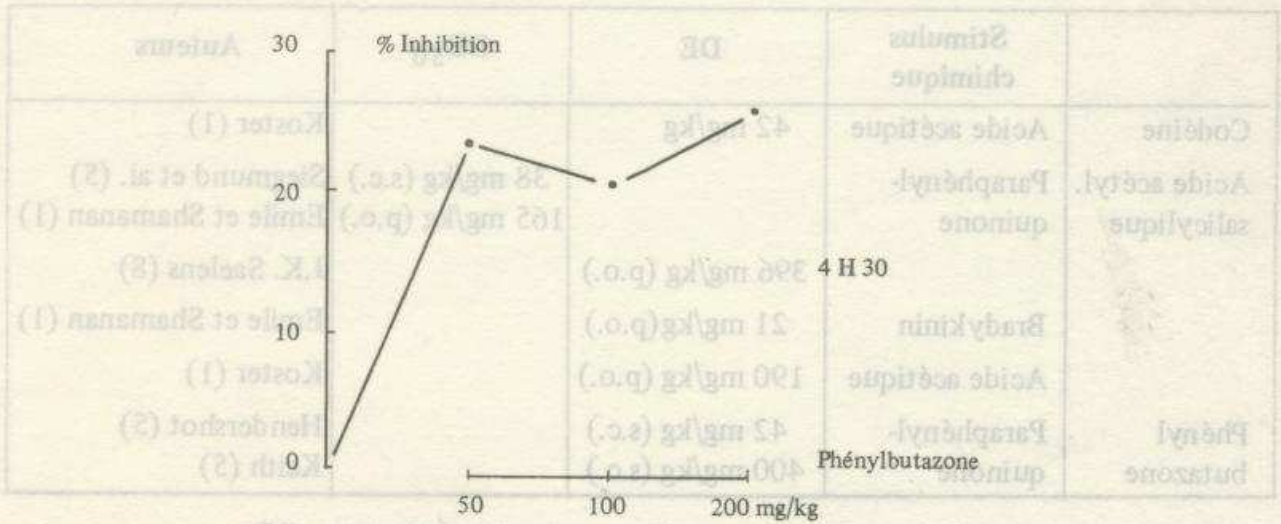
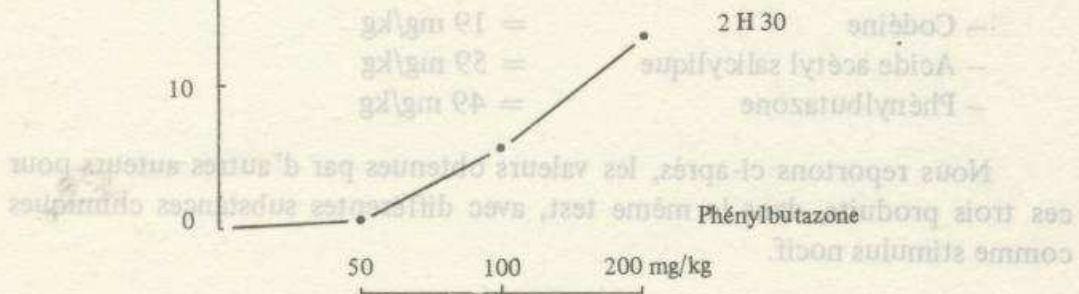


Figure 3 : Action du phénylbutazone sur l'inflammation de la patte de Rat.

s.c. : sous-cutané
p.o. : par voie orale

2. Méthode :

Au temps T_0 , les produits à tester sont administrés par voie orale à des souris adultes mâles ou femelles. Au temps $T_0 + 30$ minutes, l'acide acétique à 6 p. 1000 (dans de l'eau gommeuse à 1 p. 1000) est injecté par voie intrapéritonéale, à raison de 0,25 ml par souris. On compte alors le nombre de contorsions abdominales qui apparaissent dans les dix premières minutes, puis de la 10^e à la 20^e minute. Le nombre de contorsions par souris est alors comptabilisé pour chacune des deux périodes.

L'inhibition est exprimée en pourcentage :

$$\frac{\text{Nombre de contorsions témoins} - \text{Nombre de contorsions des traités}}{\text{Nombre de contorsions témoins}} \times 100$$

3. Résultats :

Le but de ce travail est d'obtenir la droite de référence de chacun des 3 produits testés. Les résultats sont représentés sur les figures 4, 5 et 6. Pour les trois substances étudiées, l'inhibition de l'analgésie est bien dose-dépendante. Les DE_{50} déterminées graphiquement sont :

- Codéine = 19 mg/kg
- Acide acétyl salicylique = 59 mg/kg
- Phénylbutazone = 49 mg/kg

Nous reportons ci-après, les valeurs obtenues par d'autres auteurs pour ces trois produits, dans le même test, avec différentes substances chimiques comme stimulus nocif.

	Stimulus chimique	DE	DE ₅₀	Auteurs
Codéine	Acide acétique	42 mg/kg		Koster (1)
Acide acétyl-salicylique	Paraphényl-quinone		38 mg/kg (s.c.)	Siegmund et al. (5)
			165 mg/kg (p.o.)	Emile et Shamanan (1)
	Bradykinin	396 mg/kg (p.o.)		J.K. Saelens (8)
	Acide acétique	21 mg/kg (p.o.)		Emile et Shamanan (1)
	Acide acétique	190 mg/kg (p.o.)		Koster (1)
Phénylbutazone	Paraphényl-quinone	42 mg/kg (s.c.)		Hendershot (5)
		400 mg/kg (s.c.)		Keith (5)

voie d'administration :

dose effective : DE

s.c. : sous cutané

p.o. : par voie orale

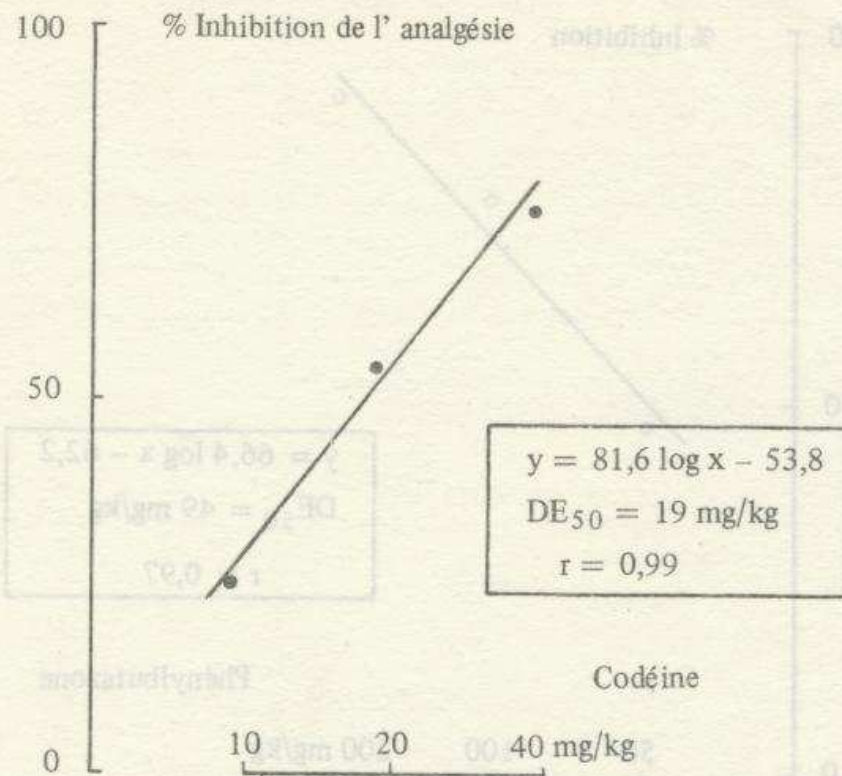


Figure 4 : Analgésie. Technique de KOSTER.
Droite effet/dose de la codéine.

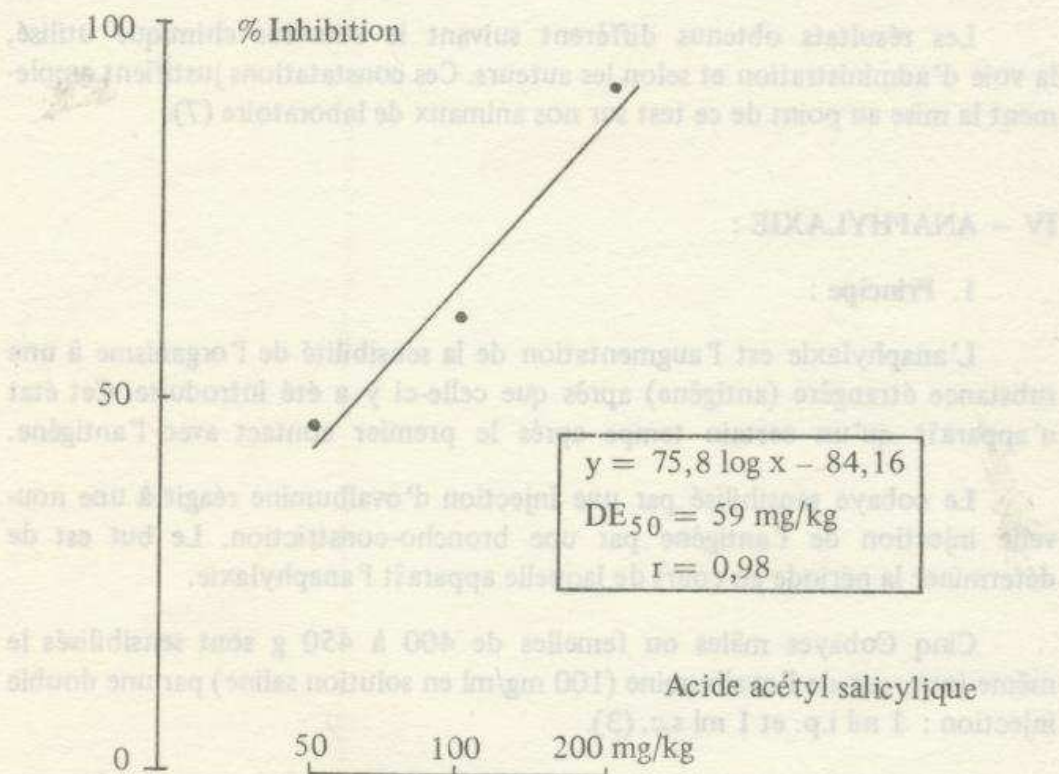


Figure 5 : Analgésie. Technique de KOSTER.
Droite effet/dose de l' acide acétyl salicylique.

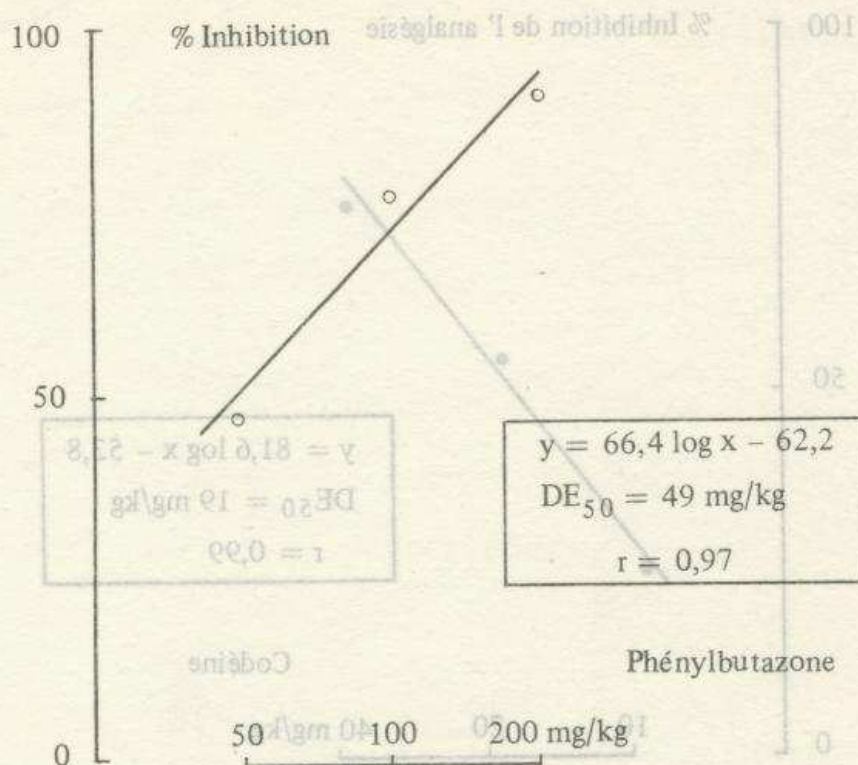


Figure 6 : Analgésie. Technique de KOSTER.
Droite effet/dose du phénylbutazone.

Les résultats obtenus diffèrent suivant le stimulus chimique utilisé, la voie d'administration et selon les auteurs. Ces constatations justifient amplement la mise au point de ce test sur nos animaux de laboratoire (7).

IV – ANAPHYLAXIE :

1. Principe :

L'anaphylaxie est l'augmentation de la sensibilité de l'organisme à une substance étrangère (antigène) après que celle-ci y a été introduite. Cet état n'apparaît qu'un certain temps après le premier contact avec l'antigène.

Le cobaye sensibilisé par une injection d'ovalbumine réagit à une nouvelle injection de l'antigène par une broncho-constriction. Le but est de déterminer la période au cours de laquelle apparaît l'anaphylaxie.

Cinq Cobayes mâles ou femelles de 400 à 450 g sont sensibilisés le même jour, par de l'ovalbumine (100 mg/ml en solution saline) par une double injection : 1 ml i.p. et 1 ml s.c. (3).

L'appareil à bronchospasme (Konzett et Rossler) permet de détecter l'apparition de la broncho-constriction (6) en fonction du temps, après une nouvelle administration d'ovalbumine (25 mg/ml) par voie intraveineuse.

2. Résultats :

Les figures 7, 8 et 9 montrent les bronchospasmes enregistrés aux jours 21 (3), 30 et 35 après la sensibilisation des Cobayes.

- Au 21^e jour, le choc anaphylactique est intense et mortel.
- Au 30^e jour, la broncho-constriction, bien qu'intense, n'est que passagère. Elle dure 25 minutes et disparaît d'elle-même.
- Au 35^e jour, la réponse anaphylactique est encore de plus faible intensité et de plus courte durée : 15 minutes.

Il est à noter que les intensités et durées observées pour les jours 30 et 35 sont des résultats globaux. Dans nos essais avec des animaux sensibilisés depuis 30 jours, l'anaphylaxie est parfois mortelle et avec ceux sensibilisés depuis 35 jours, la réponse est quelquefois plus importante.

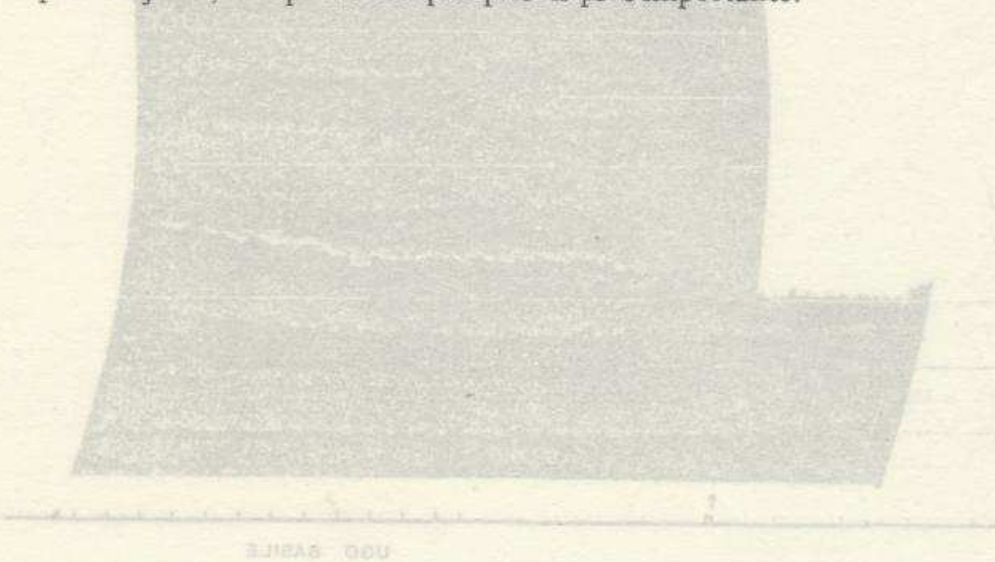


Figure 7 : Méthode de Konzett-Rössler. Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le Cobaye, 21 jours après la sensibilisation à l'ovalbumine. Elle aboutit à la mort de l'animal. La flèche indique le moment d'introduction de l'ovalbumine par la veine jugulaire.

Les figures 7, 8 et 9 montrent les bronchogrammes enregistrés aux jours 7, 8 et 9 après la sensibilisation des Cobayes.

— Au 21^e jour, le choc anaphylactique est intense et mortel.

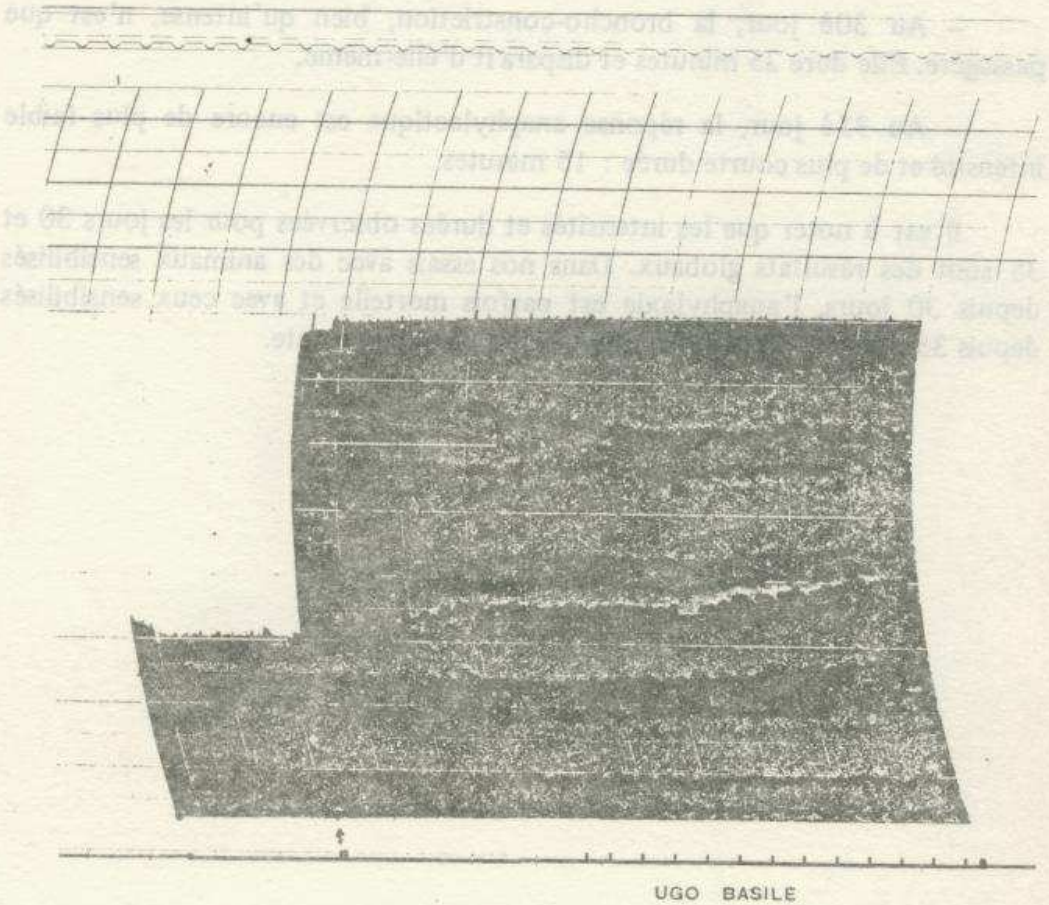
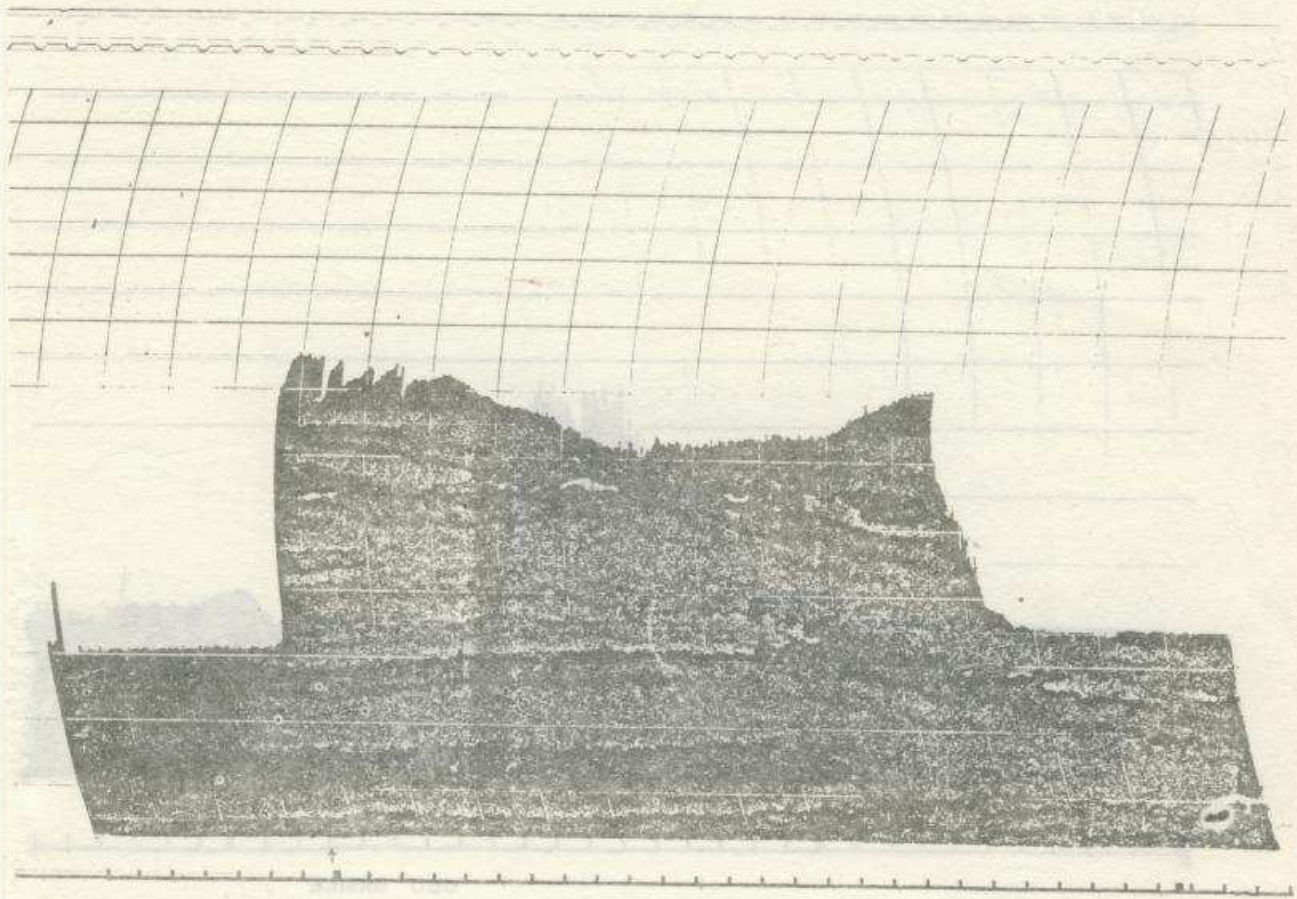


Figure 7 : Méthode de Konzett-Rössler. Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le Cobaye, 21 jours après la sensibilisation à l'ovalbumine. Elle aboutit à la mort de l'animal. La flèche indique le moment d'introduction de l'ovalbumine par la veine jugulaire.



UGO BASILE

Figure 8 : Méthode de Konzett-Rössler. Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le Cobaye, 30 jours après la sensibilisation à l'ovalbumine. On assiste à un retour à la normale de l'état pulmonaire.

La flèche indique le moment d'introduction de l'ovalbumine par la veine jugulaire.

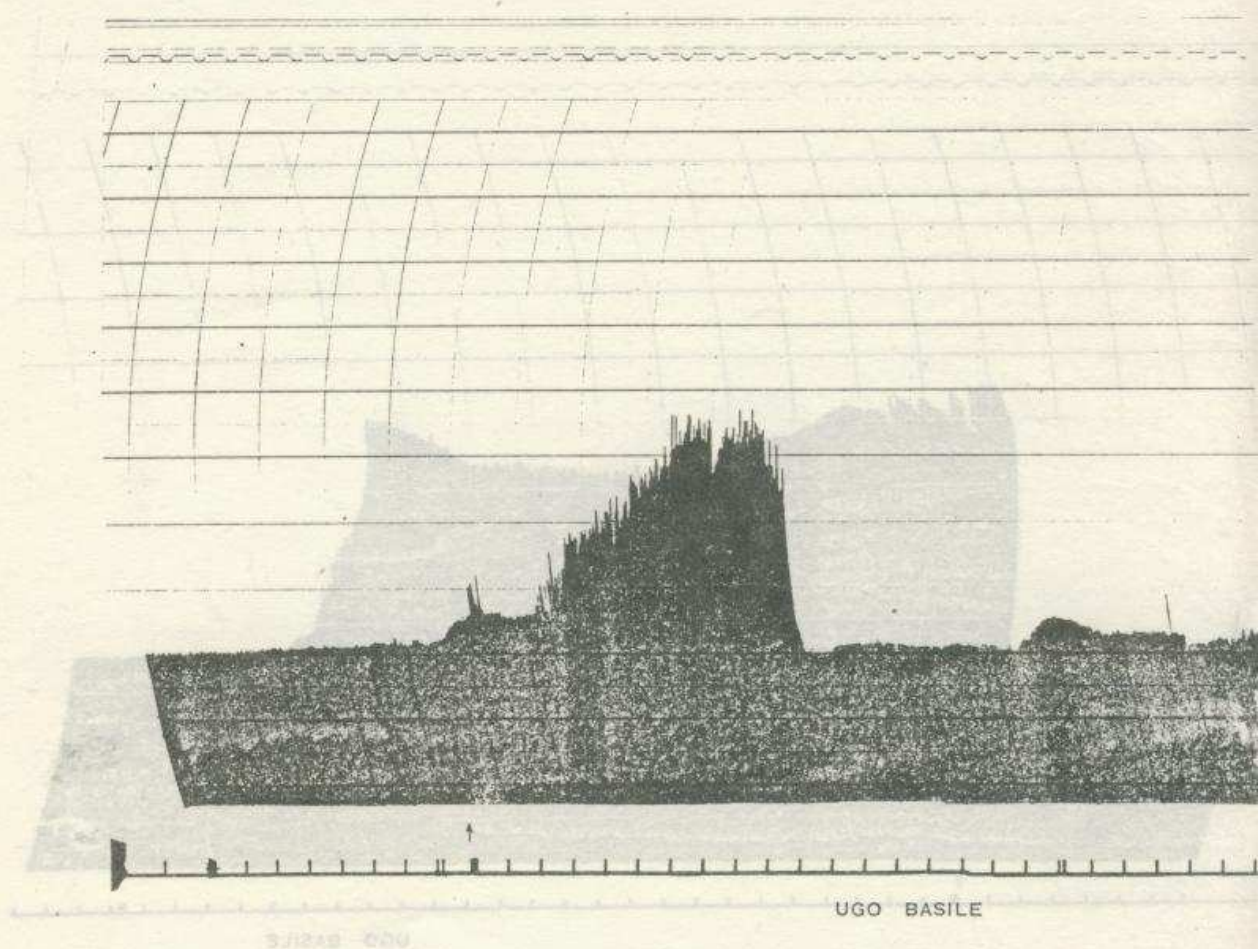


Figure 9 : Méthode de Konzett-Rössler. Enregistrement de la réaction anaphylactique chez le Cobaye, 35 jours après la sensibilisation à l'ovalbumine. La réaction est de courte durée. La flèche indique le moment d'introduction de l'ovalbumine par la veine jugulaire.

3. Discussion et conclusion :

Il est indispensable de connaître la période où la concentration en anticorps est suffisante pour induire une réponse anaphylactique d'intensité moyenne, avant de pouvoir tester des produits supposés actifs contre les phénomènes allergiques.

D'après cette étude, les tests devraient se faire entre 21 et 30 jours après la sensibilisation.

V - CONCLUSIONS GENERALES :

Les mises au point que nous avons faites nous ont donné des résultats numériques différents de ceux de la littérature que nous avons pu consulter. Ainsi :

- La DE_{50} de l'aspirine dans la réduction de l'hyperthermie est la moitié de celle que donne COLOT (2).
- L'activité anti-inflammatoire du phénylbutazone se manifeste avec un temps de latence assez important sur nos animaux.
- Dans l'étude de l'effet antalgique, pour le même stimulus chimique, les doses actives d'une même substance diffèrent selon les auteurs.

Ces quelques exemples montrent l'intérêt et la nécessité de la mise au point sur place des tests pharmacodynamiques classiques, sur nos propres animaux. Nous devons disposer de méthodes précises, de conditions expérimentales et de mesures de référence bien définies pour pouvoir tester nos extraits de plantes.

BIBLIOGRAPHIE

1. COLLIER H.O.J.
8. Analgesics in Evaluation of Drug activities. Pharmacometrics. Vol. 1.
Edited by D.R. Laurence and A. L. Bacharach.
Academic Press, London and New York, 1964, 183-203.
2. COLOT M.
Notions techniques de pharmacologie générale.
Masson ed., Paris, 1972, 137 p.
3. DEPARTMENT OF PHARMACOLOGY
UNIVERSITY OF EDINBURGH.
Pharmacological experiments on isolated preparations.
Churchill Livingstone, 2nd ed., London and New York, 1970 (1974),
76-77.
4. MIYA T.S., HOLCK H.G.O., YIM G.K.W., MENNEAR J.H., SPRATTO
G.R. – Laboratory guide in Pharmacology.
Burgess Publishing Company, 4th ed., Minneapolis, Minnesota, 136 p.
5. RANDALL L.O.
2. Non-Narcotic Analgesics. In : Physiological Pharmacology. Vol. I.
Edited by Root Hofmann.
Academic Press, London and New York, 1963, 313-416.
6. RATSIMBASON A.M., ANDRIANTSIMBA J.A.
Mise en marche de l'ensemble à Bronchospasme.
Arch. C.N.R.P., Madagascar, 1982, 1, 68-75.
7. RATSIMBASON A.M., ANDRIANTSIMBA J.A., RAJAOMARIA M.,
RAHARIMANANA, ANDRIANTSIFERANA R.
De l'importance des constantes biologiques des animaux de laboratoire :
A propos des observations de l'élevage du Centre National de Recherches
Pharmaceutiques.
Archives C.N.R.P., Madagascar, 1984, 3, 55-64.
8. SAELENS J.K., GRANAT E.R.
9 Analgesics. In : New Drugs and Development. Vol. 5. Edited by
Alan A. Rubin.
Marcel Decker, Inc, New York, 1978, 263-282.
9. SCHILD H.O.
Analgesics drugs. In : Applied pharmacology.
Churchill Livingstone, 12th ed., 1980, 278-294.