

Préparation au concours de l'Internat
Épreuve de PHARMACOLOGIE MOLÉCULAIRE : Révision 2018-2019

DUREE DE L'ÉPREUVE : 30 Min

Un laboratoire pharmaceutique a pour projet de développer de nouveaux médicaments normoglycémisants en agissant notamment sur le métabolisme de l'insuline. Trois composés ont été synthétisés par le pôle chimie d'un laboratoire pharmaceutique et leurs propriétés pharmacologiques vis-à-vis du récepteur 5-HT_{1A} sont présentées dans le tableau 1 suivant. Ce tableau récapitule les valeurs de K_i de la sérotonine et des 3 nouvelles molécules, vis-à-vis du récepteur (Réc.) 5-HT_{1A}.

Tableau 1

	Sérotonine	NORV-1	NORV-2	NORV-3
K_i (vis-à-vis du Réc. 5-HT_{1A})	3.10^{-10} M	5.10^{-8} M	1.10^{-10} M	5.10^{-9} M

Question 1 : Décrivez brièvement le principe du protocole expérimental ayant permis d'obtenir ce paramètre K_i . **6 points**

Le K_i se mesure à partir d'une expérience de déplacement-compétition (1 point) et reflète l'affinité du ligand vis-à-vis du récepteur testé (1 point)

Une expérience de déplacement-compétition se réalise en plusieurs étapes (1 point) :

- 1) Occuper les récepteurs testés avec un ligand chaud radiomarqué
- 2) Ajouter des concentrations croissantes de ligand froid non marqué (compétiteur) et suivre pour chaque concentration le niveau de radioactivité

Différents cas peuvent se produire (1 point) :

- 1) Si le niveau de radioactivité reste inchangé quelque-soit la concentration du compétiteur alors se dernier ne se lie pas au récepteur testé
- 2) Si la radioactivité diminue alors le compétiteur se lie au récepteur testé avec une affinité particulière qui se calcule à l'aide de la formule suivante (2 points) :
 $K_i = IC_{50} / (1 + L/K_d)$ où l' IC_{50} représente : la concentration pour laquelle le ligand froid diminue de 50% de la radioactivité, L : la concentration du ligand chaud et K_d : l'affinité du ligand chaud pour le récepteur testé

Question 2 : Analysez les valeurs du tableau 1. Que pouvez-vous conclure sur les propriétés pharmacologiques des différentes molécules étudiées ? **6 points**

Dans une expérience de compétition, plus la IC_{50} (et donc le K_i) est petit, plus l'affinité du ligand pour le récepteur testé est grande (2 points)

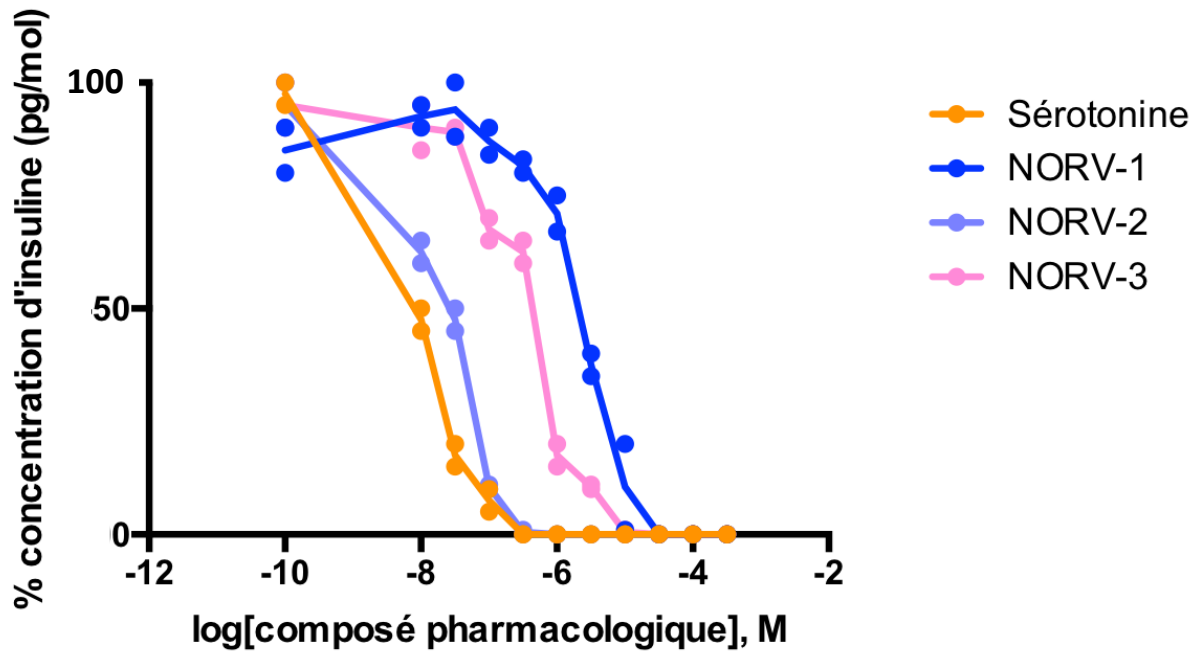
Toutes les molécules se lient au récepteurs 5-HT_{1A} mais avec des affinités différentes (2 points)

- NORV-2 est la molécule la plus affine
- NORV-1 est la molécule la moins affine

Concernant NORV-2 on s'aperçoit qu'elle est 3 fois plus affine que le ligand endogène c'est-à-dire que la sérotonine : $K_i(\text{Norv-2}) / K_i(\text{Séro}) = 3$ (1 point)

Ces données ne nous renseignent pas sur la nature agoniste/antagoniste des différentes molécules (1 point)

Une deuxième expérience a été réalisée *in vitro*, sur des cellules bêta-pancréatiques, connues pour synthétiser et libérer l'insuline. Dans un premier temps, ces cellules sont incubées en présence de Glicazide, un sécrétagogue de l'insuline appartenant à la classe des sulfonylurées, pendant 15 minutes pour stimuler l'exocytose d'insuline. Puis, des concentrations croissantes (de 10^{-10} à 10^{-4} M) de sérotonine, de NORV-1, de NORV-2 ou de NORV-3 sont appliquées sur ces cellules. Le paramètre mesuré est la concentration d'insuline dans le milieu extracellulaire. La figure 1 représente les effets des 4 molécules étudiées sur les taux d'insuline exprimée en pourcentage de la concentration mesurée en présence de Glicazide avant l'ajout de ces molécules.



Question 3 : Déterminez les valeurs des paramètres pharmacologiques pour les 4 molécules étudiées. Que pouvez-vous conclure sur la nature pharmacologique des 3 analogues structuraux de la sérotonine (NORV-1 à NORV-3) ? **10 points**

A la lecture de la figure ci-dessus, on s'aperçoit que toutes les molécules diminuent la concentration d'insuline. Elles ont des effets pharmacologiques donc peuvent être considérées comme des agonistes (2 points).

A partir de cette représentation, il est possible de déterminer différents paramètres :

- 1- L'efficacité ou Effet max. Ici toutes les molécules ont un effet de 100% puisqu'elles diminuent complètement la concentration d'insuline. Il s'agit donc d'agonistes entiers (2 points).
- 2- La puissance représentée par l'EC50 c'est à dire la concentration de chaque ligand pour laquelle on obtient 50% de l'effet max. Plus la CE50 est faible plus la molécule est puissante (2 points)

Valeurs des CE50 (0.5 points/bonne valeur) :

CE50 sérotonine = 1.10^{-8} M

CE50 NORV-1 = 1.10^{-5} M

CE50 NORV-2 = $1.10^{-7.5}$ M

CE50 NORV-3 = 1.10^{-6} M

Conclusion : La sérotonine est la plus puissante et NORV-1 la moins puissante (2 points)

Dans une troisième expérience réalisée sur ces mêmes cellules bêta-pancréatiques préalablement incubées avec de la sérotonine, l'effet de différents antagonistes compétitifs réversibles du récepteur 5-HT1A a été testé sur la concentration d'insuline dans le milieu extracellulaire. Le tableau 2 présente la concentration de sérotonine qui induit 50% de l'effet maximal dans les 3 conditions expérimentales.

Tableau 2

	5-HT seule	5-HT en présence de NORV-4 à 10^{-9} M	5-HT en présence de NORV-5 à 10^{-8} M	5-HT en présence de NORV-6 à 10^{-9} M
[5-HT] permettant d'obtenir 50% de l'effet maximal	1.10^{-8} M	2.10^{-8} M	2.10^{-8} M	4.10^{-7} M

Question 4 : Définissez le terme qui permet de quantifier la puissance d'un antagoniste compétitif réversible. A l'aide du tableau ci-dessous, estimez la valeur de ce paramètre pour chaque antagoniste NORV-4, NORV-5 et NORV-6. **10 points**

Le paramètre qui permet de comparer la puissance des antagonistes compétitifs est la PA2 (1 point). Elle correspond au $-\log$ de la concentration d'antagoniste qui nécessite qu'on double la concentration d'agoniste pour avoir le même effet que l'agoniste seul (2 points).

Ici il est possible de mesurer des dose ratio (DR) = $EC50_{NORV} / EC50_{5-HT}$

Pour NORV-4 : DR = 2. On peut donc calculer sa PA2 = $-\log 10^{-9} = 9$ (1 point)

Pour NORV-5 : DR = 2. On peut donc calculer sa PA2 = $-\log 10^{-8} = 8$ (1 point)

Plus la PA2 est grande plus l'antagoniste est puissant : NORV-4 est plus puissant que NORV-5 (1 point)

Pour NORV-6 : DR = 40. On est donc déjà au-delà de la valeur qui permet de calculer la PA2 (1 point). On peut juste dire que la PA2 de NORV-6 sera >9 et donc que parmi les 3 composés, NORV-6 le plus puissant (3 points).

Question 5 : En tant que responsable de projet, quelle(s) molécule(s), parmi les 6 composés (NORV-1 à NORV-6), choisiriez-vous pour poursuivre les études en vue du développement d'un médicament antidiabétique ? Justifiez votre réponse. **8 points**

Le diabète de type 2 se traduit par une insulino-résistance qu'il est possible de traiter à l'aide d'agents capables d'augmenter la production/libération d'insuline et/ou de sensibiliser les récepteurs à l'insuline (2 points).

Or ici, on s'aperçoit que NORV-1,2,3 sont des analogues de la 5-HT qui diminuent, par leur action agoniste, la production/libération d'insuline (2 points).

Il est donc nécessaire de développer des antagonistes qui vont s'opposer à cette diminution d'insuline. Parmi les antagonistes testés, le plus intéressant est de choisir le plus puissant c'est-à-dire celui qui produira l'effet recherché à la plus faible concentration (2 points). (minimise le risque d'effets indésirables) (2 points).