

**université**  
**PARIS-SACLAY**

**FACULTÉ DE**  
**PHARMACIE**

# **Colle Pharmacologie**

Pr Denis DAVID, Dr Jean-Philippe Guilloux

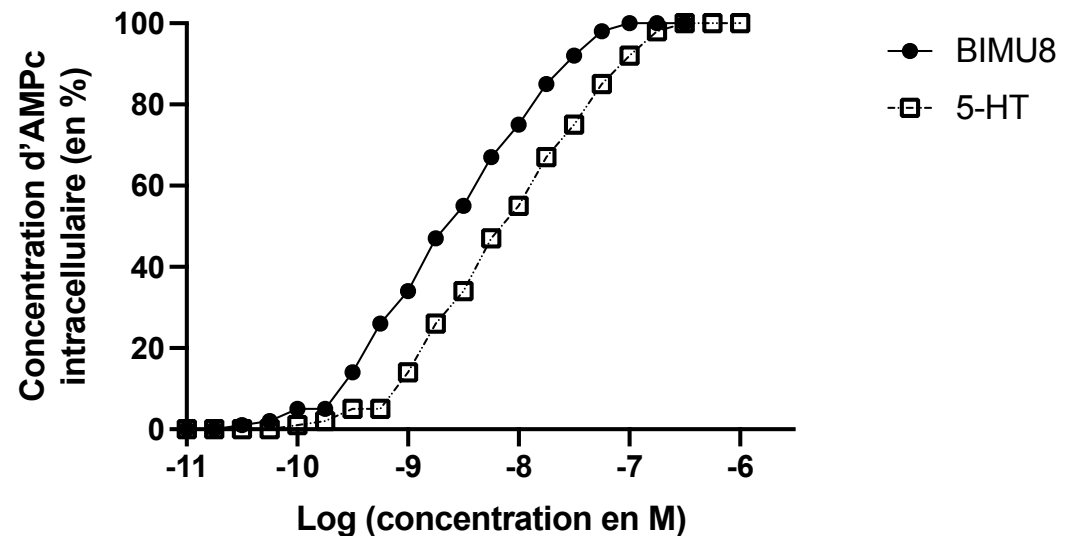
Date à définir 2022

---

Des cellules d'ovaires de hamster de chine (CHO) qui expriment la forme humaine du sous type de récepteur 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine (5-HT) sont mises en culture. Sur ces cultures, les concentrations intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) sont mesurées après un traitement soit avec de la sérotonine soit avec un autre ligand, le BIMU8. Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) des concentrations en AMPC obtenues (figure 1).

## Figure 1 :

Figure 1 : Effets de différents ligands du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sur les concentrations d'AMPC intracellulaire



**Question 1** : Définissez puis donnez les valeurs des paramètres pharmacologiques qui permettent de caractériser ces ligands. Comparer les ligands. Précisez la nature des ligands sérotonine et BIMU8 vis-à-vis du sous type de récepteur 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine. **(6 points)**

### \*Paramètres :

-Efficacité maximale ( $E_{max}$ ), renseignée par l'activité intrinsèque  $\alpha$  (**1 point**)

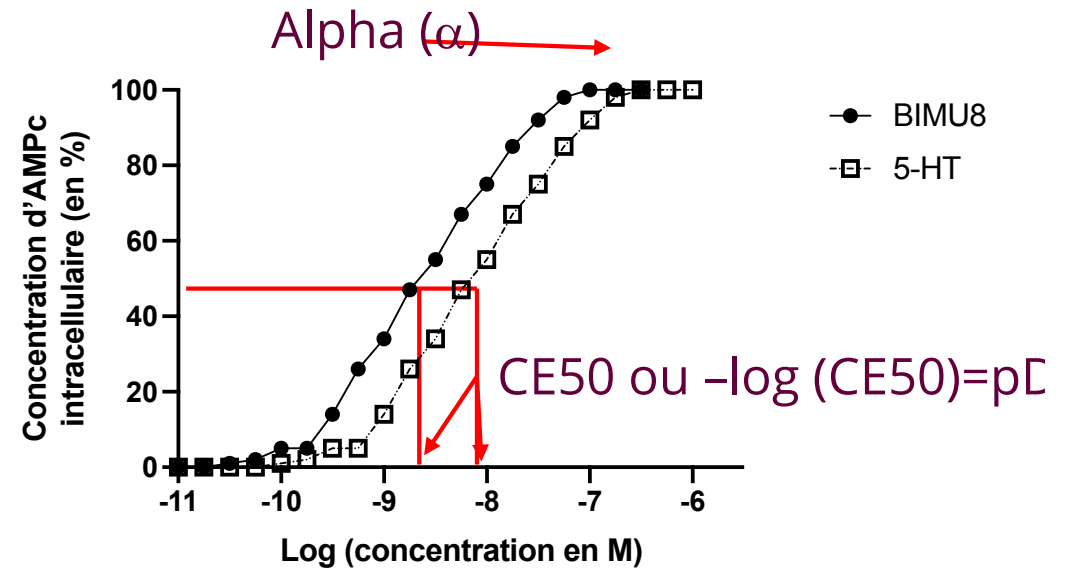
-Puissance : concentration en ligand qui induit 50% de l'effet maximum ( $CE_{50}$ ) ou  $-\log CE_{50} = pD_2$  (**1 point**). Plus la  $CE_{50}$  est petite plus la molécule est puissante ou plus la  $pD_2$  est grande plus la molécule est puissante  $-\log CE_{50} = pD_2$  (**1 point**).

### \*Sérotonine et BIMU8:

-Induisent un effet en augmentant les concentrations en cAMP, ce sont donc des agonistes (**1 point**).  $\alpha = 1$ , ce sont donc des agonistes entiers (**1 point**).

La puissance, calculée à partir de la  $CE_{50}$  est d'environ  $2,3 \cdot 10^{-9}$  M pour Bimu8 et  $7,2 \cdot 10^{-9}$  M pour la 5-HT soit une  $pD_2$  de 8,6 et 8,1 respectivement (**1 point**).

Figure 1 : Effets de différents ligands du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sur les concentrations d'AMPC intracellulaire

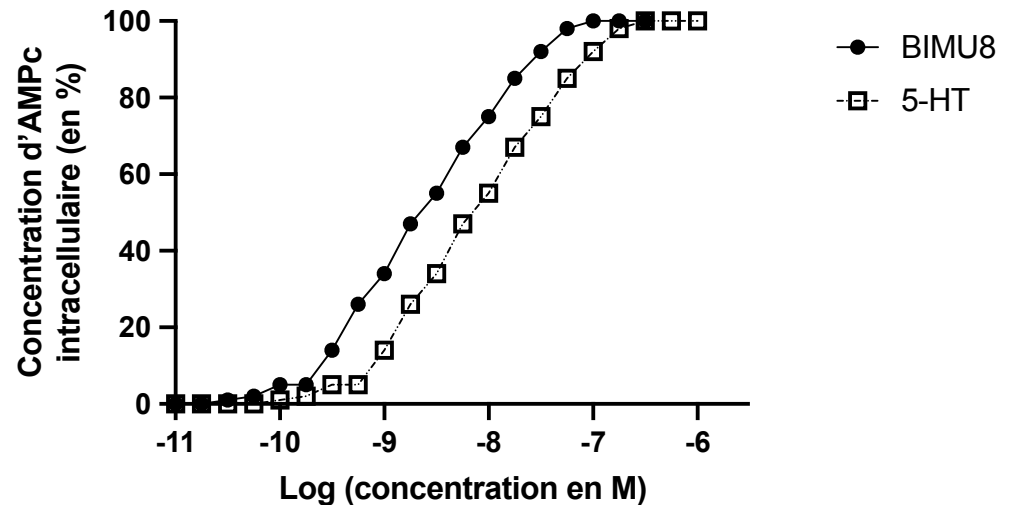


Remarques : les paramètres  $\alpha$  et  $pD_2$  n'ont pas d'unité (0 point à la question si unité indiquée). Les paramètres  $CE_{50}$  a obligatoirement une unité (0 point à la question si unité omise).

**Question 2 :** Que pouvez-vous en déduire quant au couplage du récepteur 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine et de la voie de signalisation recrutée ? **(5 points)**

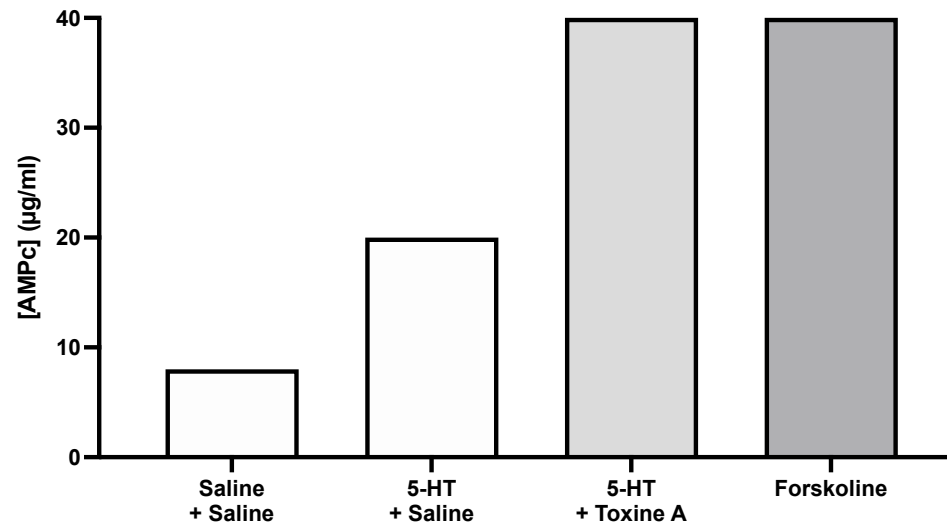
Comme la sérotonine et le BIMU8 sont des agonistes et puisque leur effet est d'augmenter le taux d'AMPC **(1 point)** donc le récepteur 5-HT<sub>4</sub> doit être un RCPG **(1 point)** couplé à une protéine Gs **(1 point)**: stimulation de l'Adénylate Cyclase **(1 point)** qui engendre une augmentation du taux d'AMPC intracellulaire, qui stimule ensuite la PKA **(1 point)**.

**Figure 1 :** Effets de différents ligands du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sur les concentrations d'AMPC intracellulaire



Afin de confirmer le couplage du récepteur 5-HT<sub>4</sub> de la sérotonine, une expérience reprenant des conditions expérimentales similaires à celles ayant permis d'obtenir la Figure 1 a été réalisée. La variation de la concentration intracellulaire d'AMPC dans les cellules CHO a été mesurée après l'application de différentes conditions dont notamment l'utilisation d'une toxine A en présence de sérotonine (5-HT). Les effets de la forskoline administrée seule sont aussi étudiés (Figure 2).

**Figure 2 :** Effets de la sérotonine seule ou en présence de différents agents pharmacologiques sur la production d'AMPC

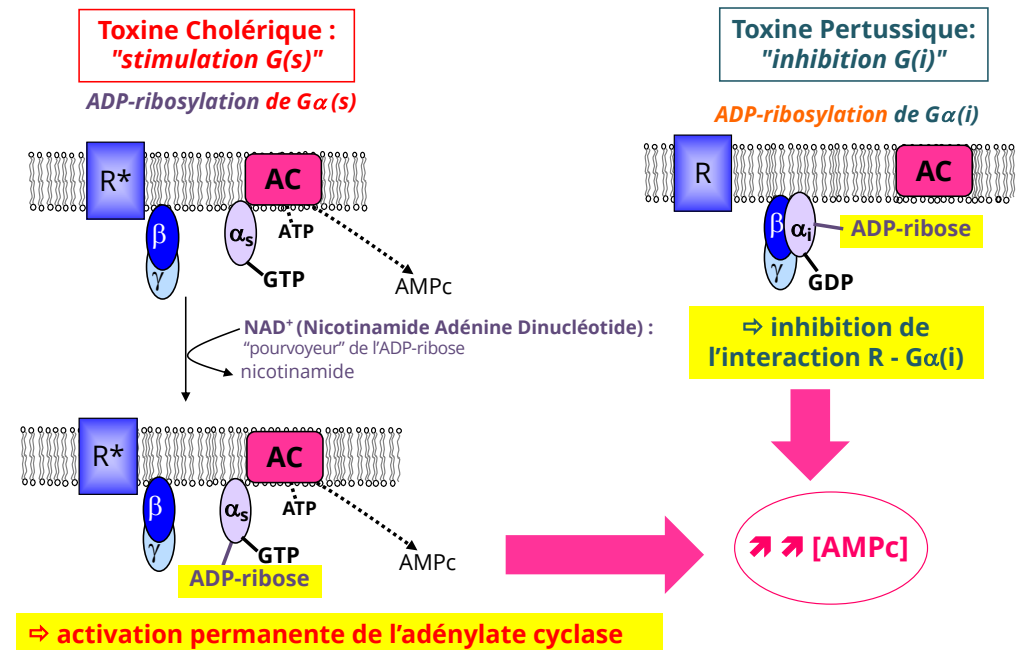
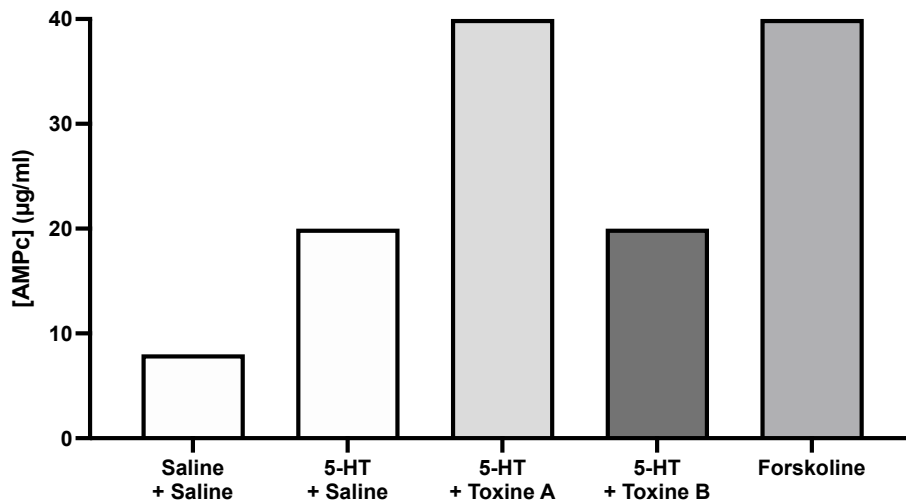


**Question 3 :** Quel est l'effet de la toxine A ? Quel est son mécanisme d'action ? Que permet cette toxine? **(5 points)**

**Question 3 :** Quel est l'effet de la toxine A ? Quel est son mécanisme d'action ? Que permet cette toxine? **(5 points)**

**Toxine A : Toxine Cholérique (1 point):** Cette toxine induit une ADP-ribosylation de la sous unité  $G\alpha_s$  **(1 point)**, qui bloque l'activité GTP-asiue **(1 point)**. Cette sous unité  $G\alpha_s$  restera ainsi dans son état activé et va stimuler l'adénylate cyclase **(1 point)**. Elle permet de caractériser le couplage du récepteur **(1 point)**.

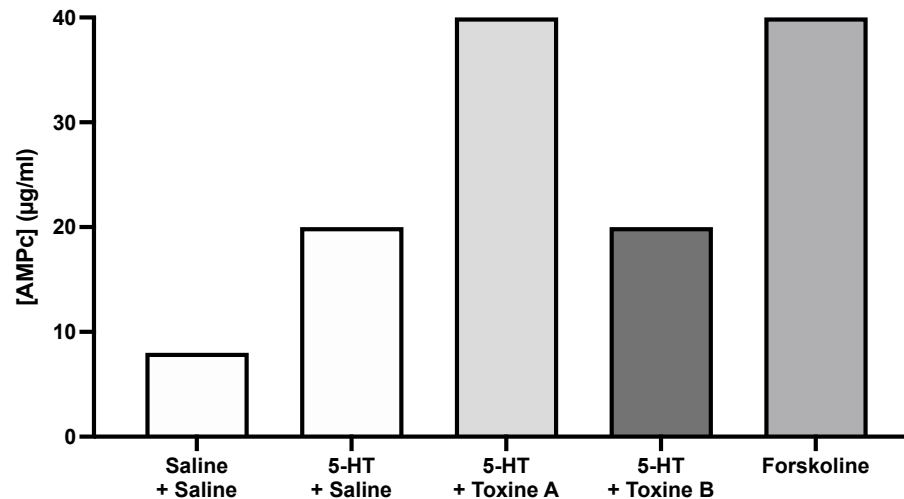
**Figure 2 :** Effets de la sérotonine seule ou en présence de différents agents pharmacologiques sur la production d'AMPc



#### Question 4 : Quel est le mécanisme d'action de la forskoline ? (3 points)

C'est un activateur enzymatique (1 point), qui stimule l'adenylate cyclase (1 point) et induit la production d'AMPc (1 point)

Figure 2 : Effets de la sérotonine seule ou en présence de différents agents pharmacologiques sur la production d'AMPc



Dans la même étude, deux nouvelles expériences sont réalisées permettant de déterminer le Kd de la sérotonine (5-HT) et du ML10302 pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> et 5-HT<sub>4</sub>. Les valeurs sont consignées dans le tableau de valeurs suivant :

	5-HT <sub>1A</sub> (Kd en M)	5-HT <sub>4</sub> (Kd en M)
5-HT	1.10 <sup>-9</sup> M	3.10 <sup>-9</sup> M
ML10302	5.10 <sup>-6</sup> M	2.10 <sup>-9</sup> M

**Question 5 :** Définissez le Kd ? Comment est il obtenu? Que pouvez-vous en conclure au sujet de la 5-HT et du ML10302 ? **(6 points)**

Le K<sub>D</sub> est la constante de dissociation à l'équilibre, lorsque 50% des sites spécifiques sont occupés **(1 point)**. Il évalue l'affinité du ligand pour son récepteur **(1 point)**. Plus le Kd est faible, plus l'affinité est forte **(1 point)**.

Il est obtenu grâce aux expérience de saturation **(1 point)**.

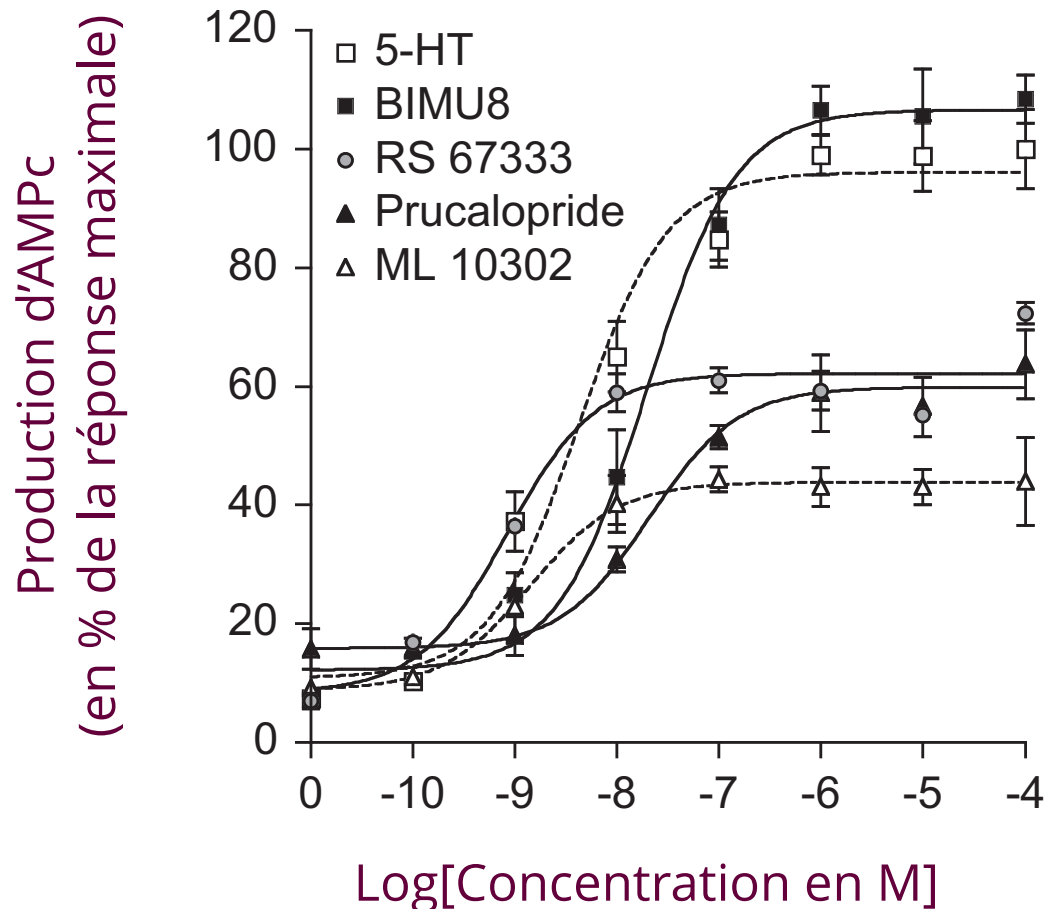
La 5-HT est la plus affine pour les récepteurs 5-HT<sub>1A</sub> alors que le ML10302 présente une affinité plus forte pour les récepteurs 5-HT<sub>4</sub> **(1 point)**.

La 5-HT n'est pas sélective des récepteurs 5-HT (Ratio 1/3), alors le ML10302 est sélectif des récepteurs 5-HT<sub>4</sub> (Kd5-HT<sub>1A</sub>/Kd5-HT<sub>4</sub> >>> 100, donc molécule sélective) **(1 point)**



Les effets du RS6733 et d'autres ligands du récepteur 5-HT<sub>4</sub> sur les concentrations d'AMPC ont été étudiés dans des cellules en culture. Les résultats sont présentés dans la figure 5 suivante :

**Figure 5 : Effets de différents ligands du 5-HT<sub>4</sub> sur les concentrations d'AMPC intracellulaire**



**Question 6 :** Comment appelle t'on ce type de représentation? Classez et caractérisez les molécules selon les paramètres pharmacologiques obtenus sur la figure 3. **(6 points)**

Le graphique représente une relation effet/dose. **(1point)**

BIMU8 : molécule la plus efficace **(1 point)** ML10302/RS67333 : molécules les plus puissantes **(1 point)**

	Emax (1 pt)	Agoniste (1 pt)	CE50 (1 pt) ou...	...pD2
5-HT	100%	Entier	$10^{-8.5}$	8.5
BIMU8	110%	Entier	$10^{-8}$	8
RS67333	60%	Partiel	$10^{-9.2}$	9.2
Prucalopride	60%	Partiel	$10^{-8}$	8
ML10302	42%	Partiel	$10^{-9.2}$	9.2

**Question 7 :** Rappelez la définition de la pA2 et ce que ce paramètre caractérise. (4 points)

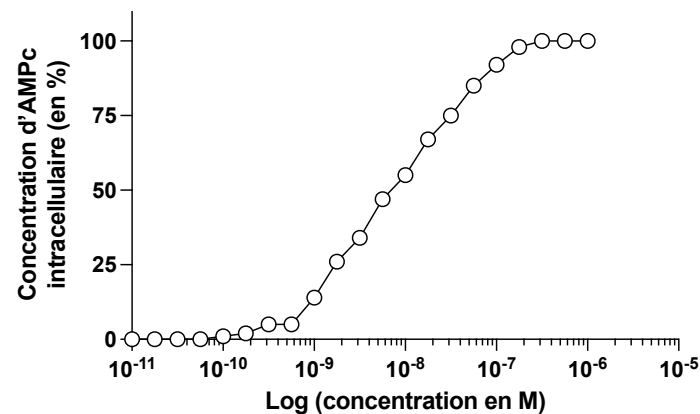
La pA2 caractérise la puissance d'un antagoniste (1 point) compétitif réversible (1 point). C'est le  $-\log[\text{antagoniste}]$  en présence de laquelle il faut 2 fois plus d'agoniste pour obtenir le même effet que l'agoniste seul (1 point).

Plus la pA2 est élevée, plus cette concentration d'antagoniste est faible et donc plus l'antagoniste est puissant (1 point).

**Question 8 :** Dessinez « à main levée » et légendez la courbe qui pourrait être obtenue en répétant la stimulation par des concentrations croissantes de sérotonine (5-HT):

- l'une en présence de  $10^{-7}\text{M}$  de GR113808 (qui a une pA2 de 9.5)

**Figure 7 :** Effets de la 5-HT sur les concentrations d'AMPc intracellulaire

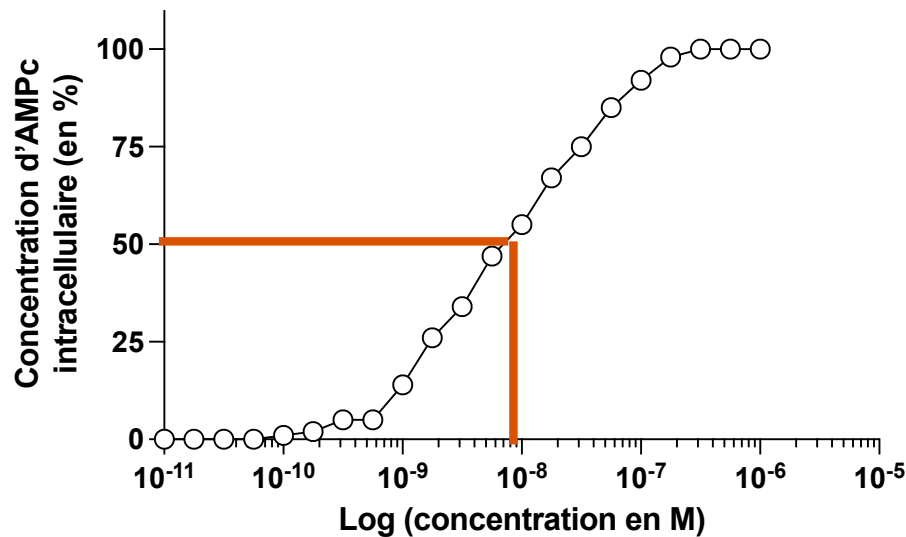


**Question 8 :** Dessinez « à main levée » et légendez la courbe qui pourrait être obtenue en répétant la stimulation par des concentrations croissantes de sérotonine :

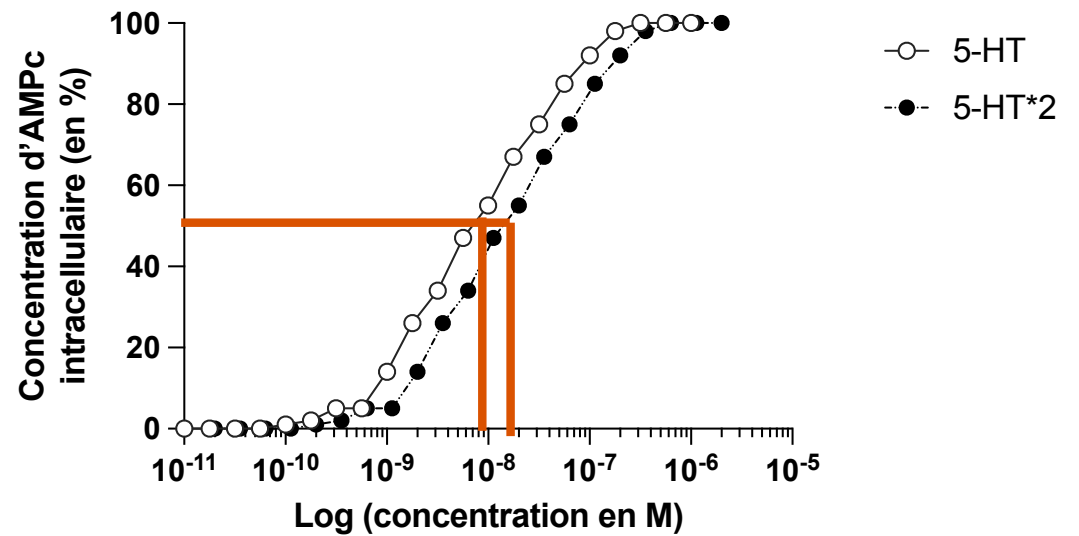
- l'une en présence de  $10^{-7}M$  de SB204070 (qui a une  $PA_2$  de 6.1).

**(5 points)**

**Figure 7 :** Effets de la 5-HT sur les concentrations d'AMPC intracellulaire

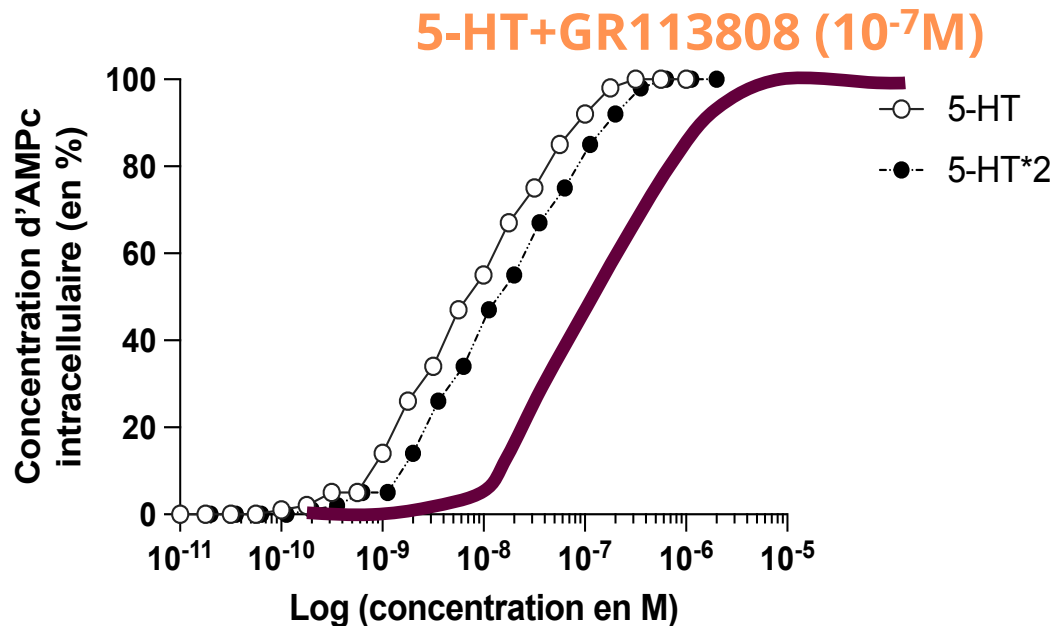


CE50:  $10^{-8}M$



2XCE50:  $2.10^{-8}M$

- Tracé en présence de  $10^{-7}M$  de GR113808 (qui a une PA2 de 9.5)



Tracé correct (1 point)

Il faut tout d'abord tracer une courbe théorique, celle obtenue si on multiplie par 2 la concentration de l'agoniste (la sérotonine) (1 point)

En présence de  $10^{-7}M$  de GR113808, on est à une concentration d'antagoniste inférieure à celle de la PA2, i.e. de la concentration pour laquelle il faut doubler la concentration de sérotonine pour obtenir le même effet. La courbe du GR113808 se trouve entre la courbe noire et la courbe blanche. (3 points)