

université
PARIS-SACLAY

FACULTÉ DE
PHARMACIE

Pharmacologie moléculaire

Rappels et exercices

06 et 13 septembre 2021, *Pr Denis DAVID, Dr Laurent Tritschler*

Pharmacologie moléculaire

Rappels et exercices

1. Introduction
2. Liaison ligand/récepteur
3. Etude Fonctionnelle
4. Cascade de Transduction/signalisation cellulaire
5. Conclusions

Pharmacologie moléculaire

Rappels et exercices

1. Introduction

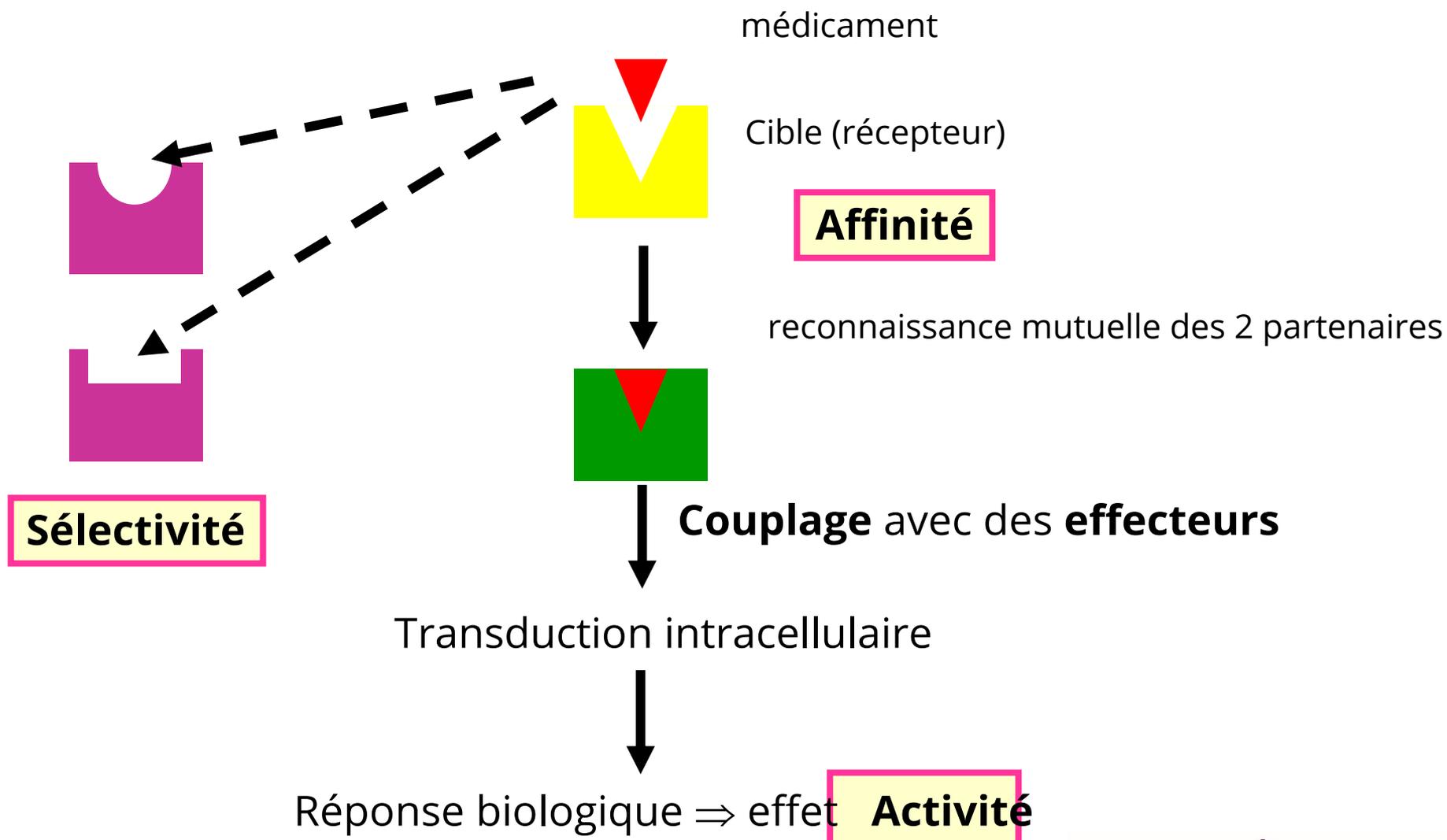
2. Liaison ligand/récepteur

3. Etude Fonctionnelle

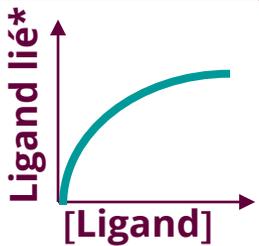
4. Cascade de
Transduction/signalisation cellulaire

5. Conclusions

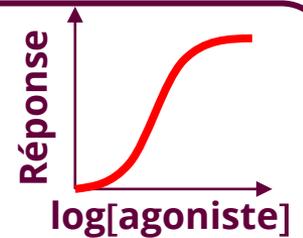
Les 3 propriétés importantes



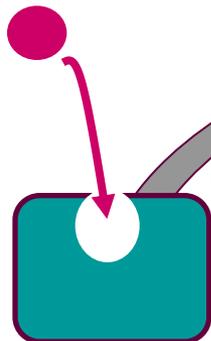
**études
de liaison**



**études
fonctionnelles**



médiateur



récepteur



effecteur



couplage stimulation / réponse

réponse
cellulaire

**cascade de transduction -
signalisation intracellulaire**

Etude des ligands : 2 approches

1) Approches par liaison spécifique à haute affinité

⇒ **affinité**, activité

2) Approches fonctionnelles

⇒ **activité**, affinité

Objectif global :

évaluation de l'activité, et de l'affinité du médicament pour le récepteur responsable de l'effet primaire et les récepteurs responsables des effets secondaires

⇒ **notion de sélectivité** d'un agoniste ou d'un antagoniste

Pharmacologie moléculaire

Rappels et exercices

1. Introduction

2. Liaison ligand/récepteur

3. Etude Fonctionnelle

4. Cascade de
Transduction/signalisation cellulaire

5. Conclusions

Liaison { ligand – récepteur }

- *Pourquoi étudier les paramètres de la liaison Ligand-Récepteur?*
- Pharmacologie : Etude des médicaments et de leur mode d'action
- Ligand (L) = entité chimique capable d'établir une liaison avec une macromolécule (= Récepteur, R.) sur un site spécifique
 - => complémentarité des deux sites d'interaction (clé-serrure)
- Affinité = propension d'un ligand à lier un récepteur
- Un médicament agit sur une (ou plusieurs) cibles thérapeutiques
 - => La compréhension de cette action aide à en maîtriser son utilisation

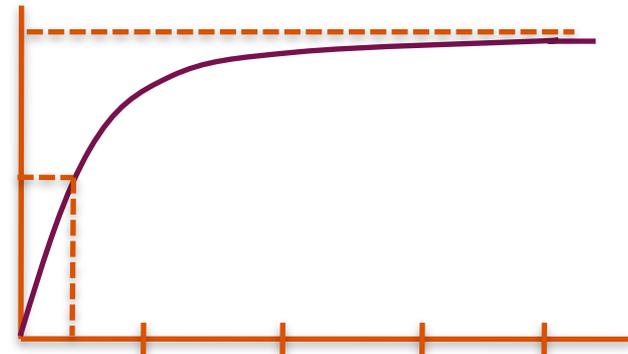
Les 2 méthodes :

Dans les 2 cas :
mesure de la liaison d'un radioligand L^* sur un site spécifique (R) : $\{L^*R\}$

Dosage par saturation :

- $\{L^*R\}$ est mesuré à plusieurs $[L^*]$ croissantes jusqu'à saturation des sites spécifiques
- Détermination de K_d de $[L^*]$ et B_{max}
- Utilisation d'un ligand froid en excès : L

[Ligand* lié] COURBE DE SATURATION



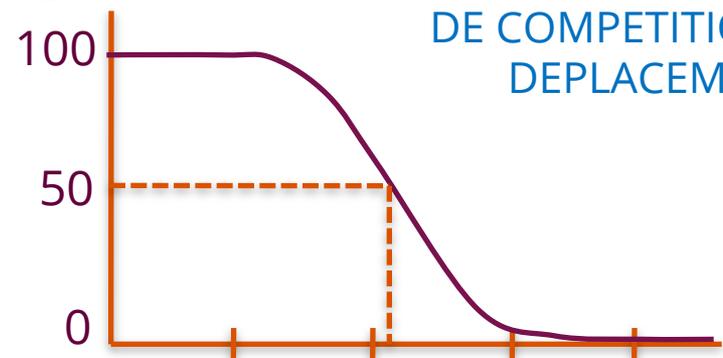
[Ligand*], M

Dosage par compétition - déplacement:

- Etude d'un ligand « froid : C (compétiteur), à concentrations croissantes
- Ligand Froid (C) \neq L^*
- On mesure la capacité de C à inhiber la liaison $\{L^*R\}$
- Détermination de CI_{50} , K_i de C

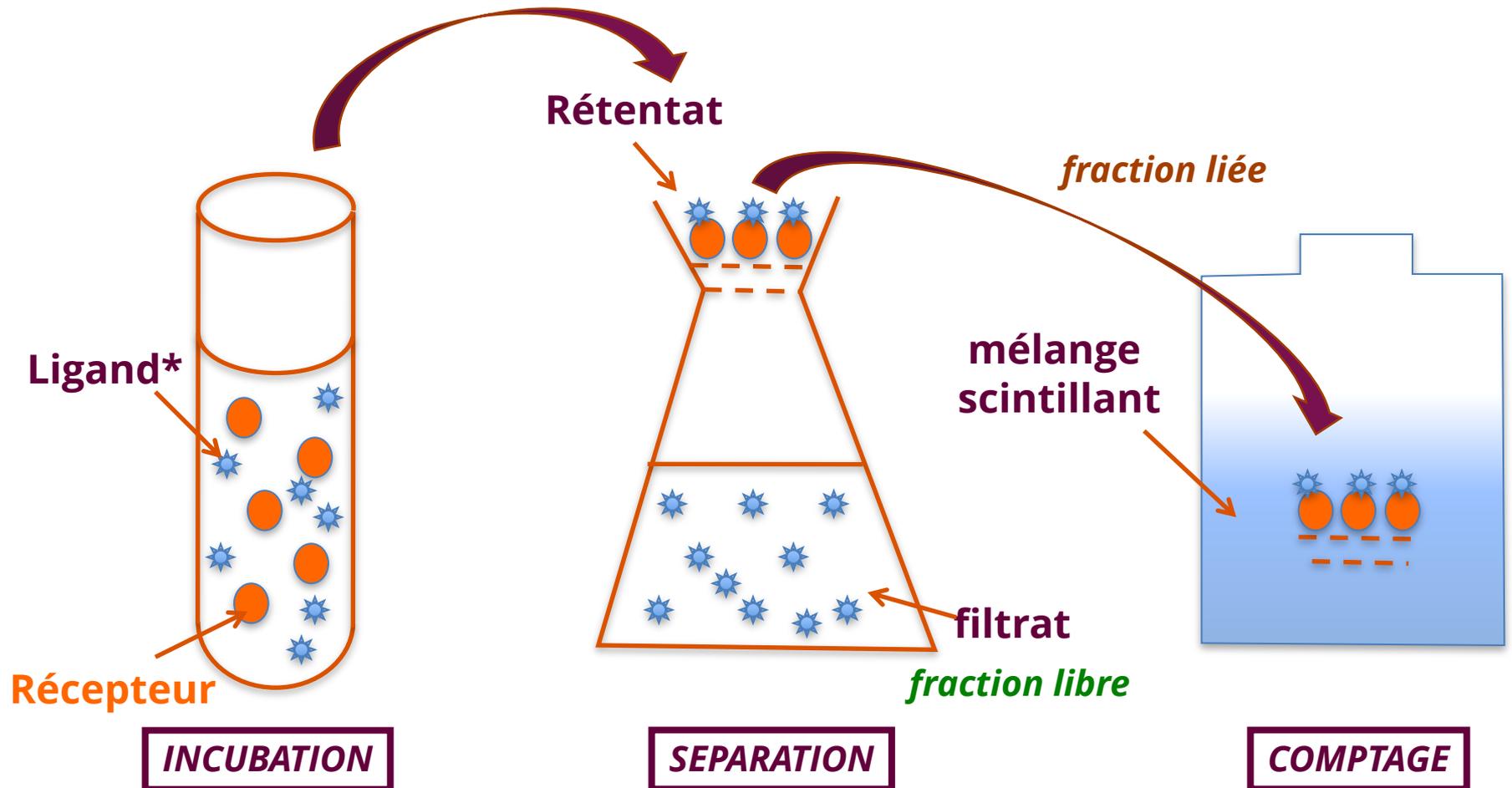
[Ligand* lié] (%)

COURBE DE COMPETITION - DEPLACEMENT



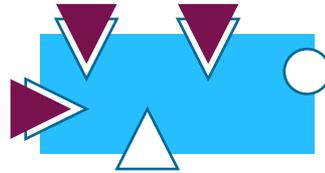
[Ligand Froid]

Principe expérimental



Liaison spécifique / non spécifique

LIAISON SPECIFIQUE



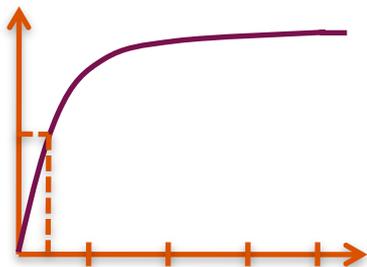
1. L'**affinité** du ligand pour son site de liaison est **élevée** ❤️
2. Le nombre de sites de liaison est limité, donc **SATURABLE**:

LIAISON NON-SPECIFIQUE



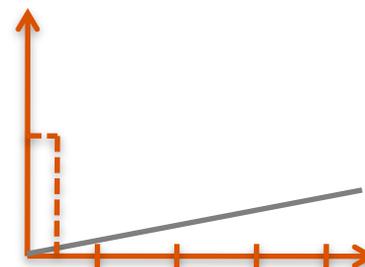
1. L'**affinité** du ligand pour son site de liaison est faible 😞
2. Le nombre de sites de liaison est infini donc **INSATURABLE** :

Ligand* Lié



[Ligand*], M

[Ligand* Lié]

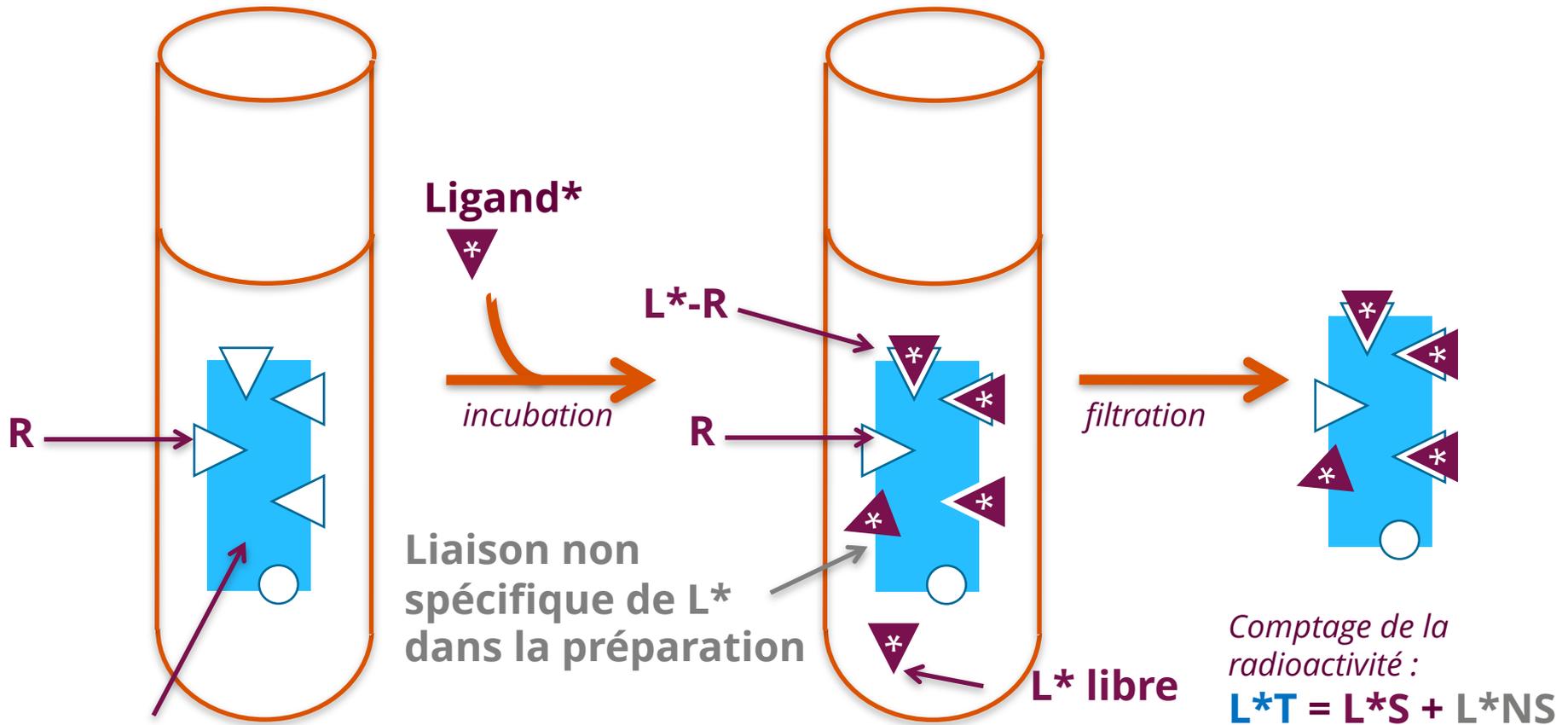


[Ligand*], M

Détermination expérimentale de la **liaison totale** :

liaison totale (LT) = liaison spécifique (LS) + liaison non spécifique (LNS)

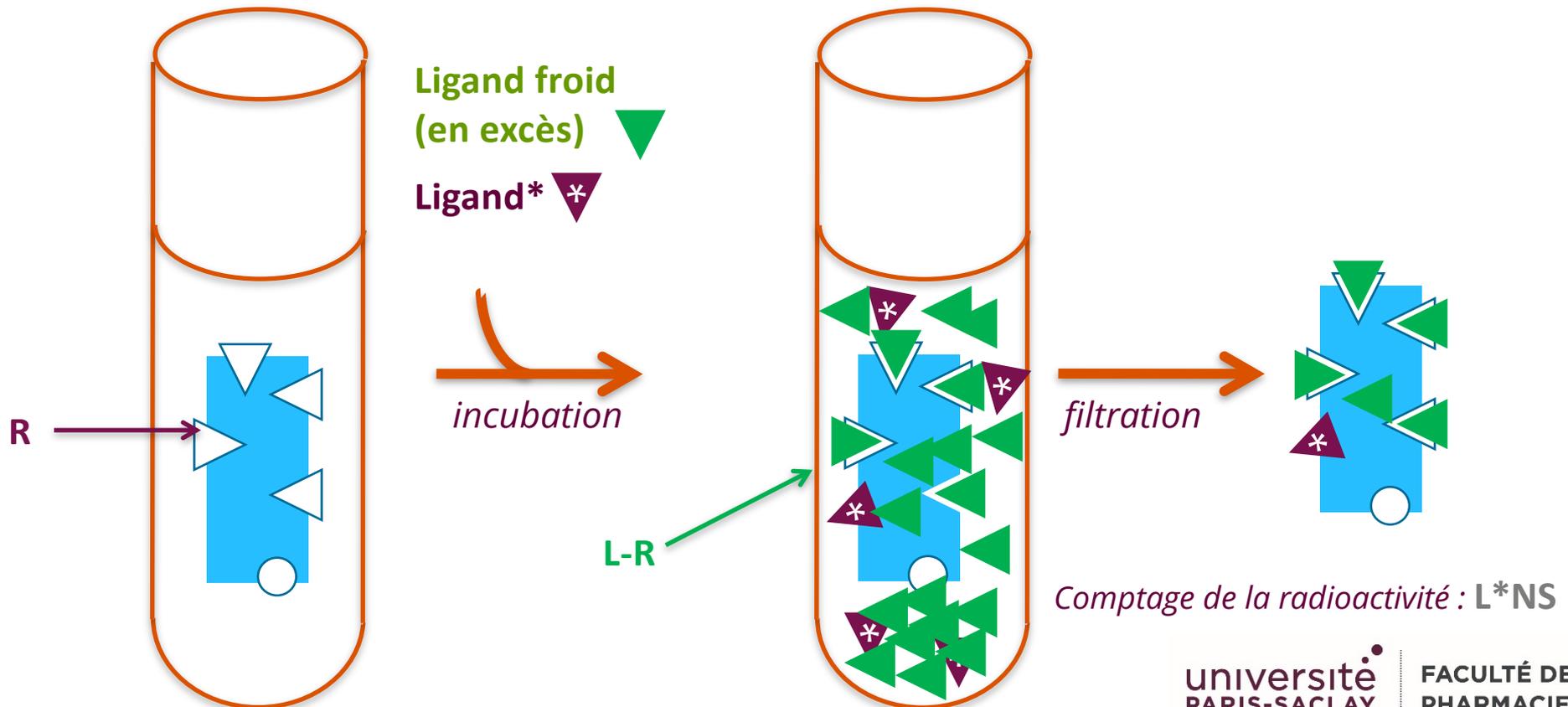
- L^* est incubé avec la préparation de R :
 - A l'équilibre, L^* occupe une certaine proportion de R : **liaison spécifique**.
 - L^* se lie aussi de manière **non spécifique** sur d'autres constituants de la préparation.
 - Une fraction de L^* reste libre, et sera éliminée au lavage.



Détermination expérimentale de la **liaison totale** :

liaison totale (LT) = liaison spécifique (LS) + liaison non spécifique (LNS)

- L'expérience est ici réalisée en présence de **concentration saturante (en excès)** de ligand non-radiomarqué (« froid ») **L**.
 - Le ligand froid occupe alors tous les sites spécifiques car $[L] \gg \gg [L^*]$
 - ne laissant de possibilité pour L^* que celle d'établir des liaisons non spécifiques.



Détermination expérimentale de la liaison spécifique :

liaison spécifique = **liaison totale** - liaison non spécifique

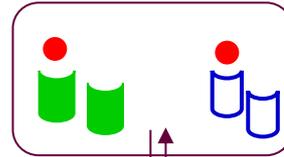
Liaison totale du radioligand L*



Détermination expérimentale de la **liaison totale** : **liaison totale (LT)** = **liaison spécifique (LS)** + **liaison non spécifique (LNS)**

L* = **ligand radiomarqué**
Préparations membranaires

R = **récepteur**
= **site de liaison spécifique**
de haute affinité



NS = **sites de liaison non spécifique**
de basse affinité

à l'équilibre

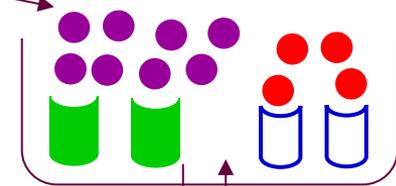


Filtration



Liaison TOTALE

Comptage radioactif

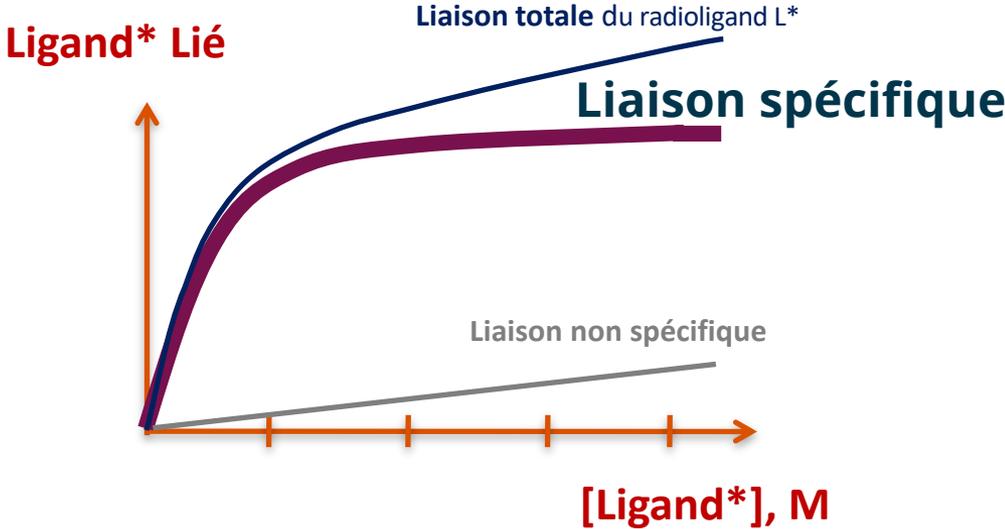
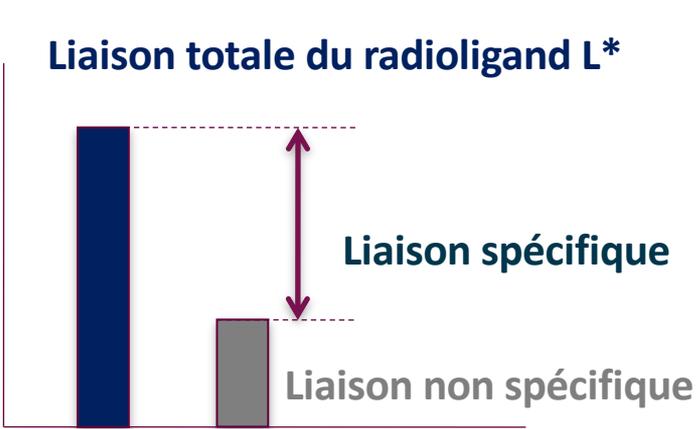


**Liaison
NON SPECIFIQUE**

⇒ **LIAISON SPECIFIQUE = L*R**

Dosage par saturation : principe

Déterminer les valeurs $\{L^*R\}$ obtenues en testant plusieurs concentrations $[L^*]$:



Liaison spécifique = f ([L*]) : courbe de saturation

Dosage par saturation : protocole

1^{ère} série de tubes

L* en concentration croissante

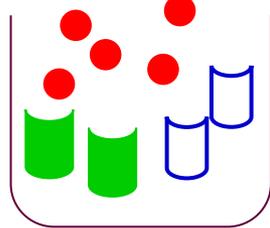
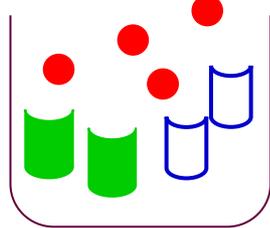
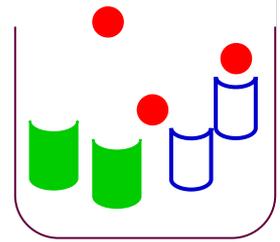
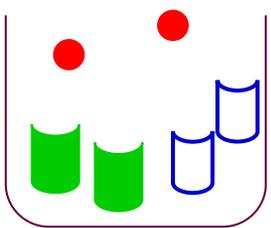
$0,5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$

$1 \cdot 10^{-10} \text{ M}$

$1,5 \cdot 10^{-10} \text{ M}$

$3 \cdot 10^{-10} \text{ M}$

...



...

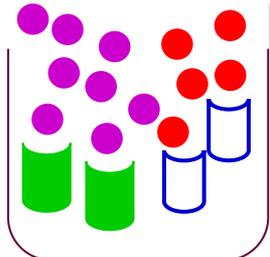
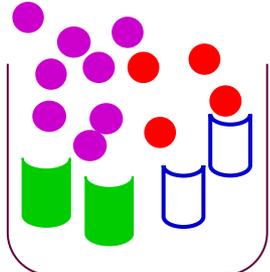
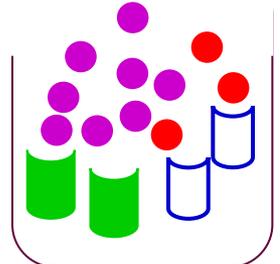
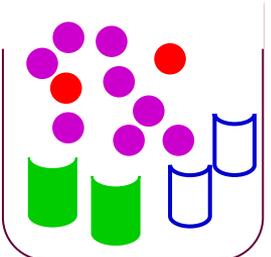
+ préparations membranaires en quantité identique



liaison totale

2^{ème} série de tubes

idem + excès de ligand froid

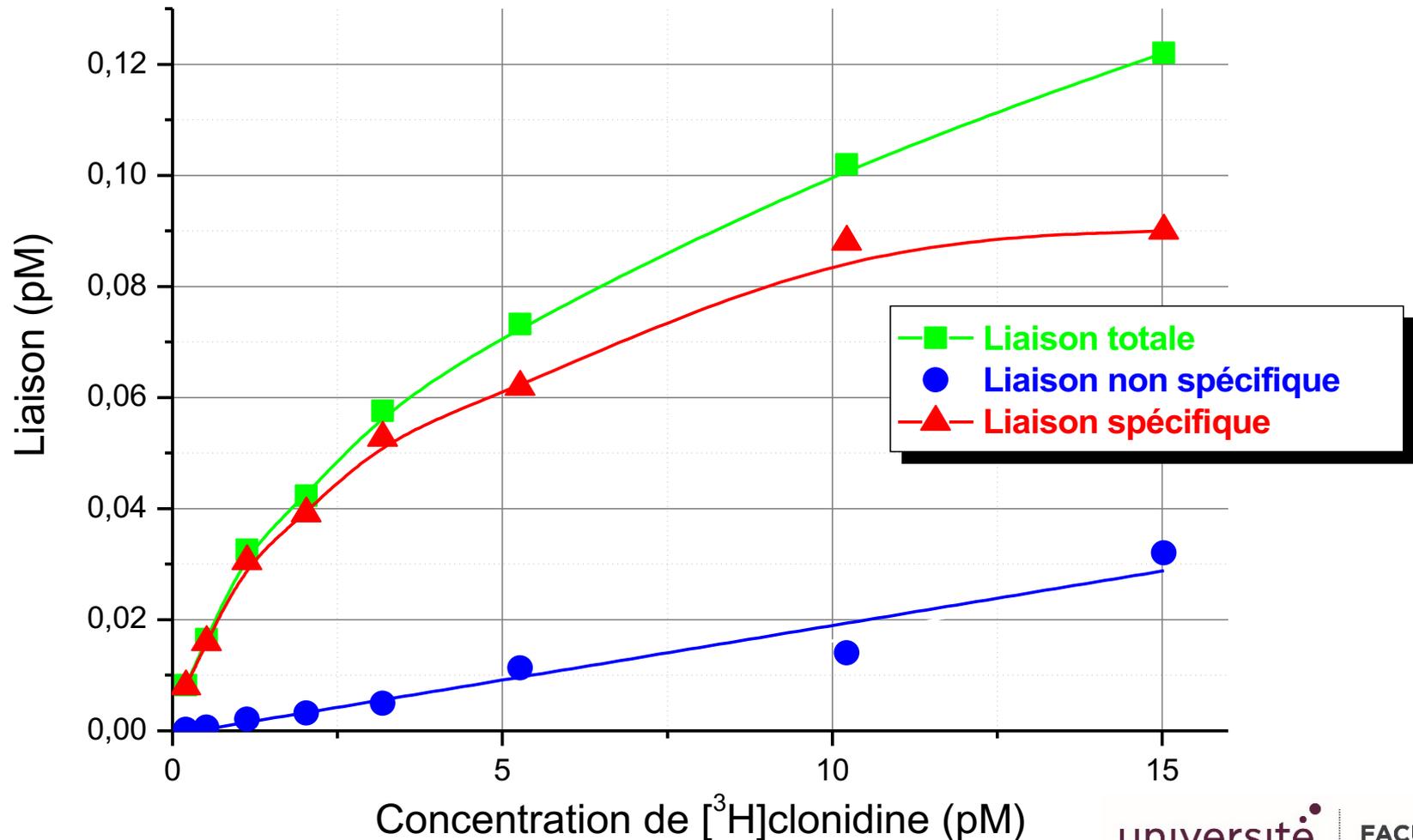


...



liaison non spécifique

Exemple : courbes de liaison par protocole de saturation avec la [3H]-clonidine



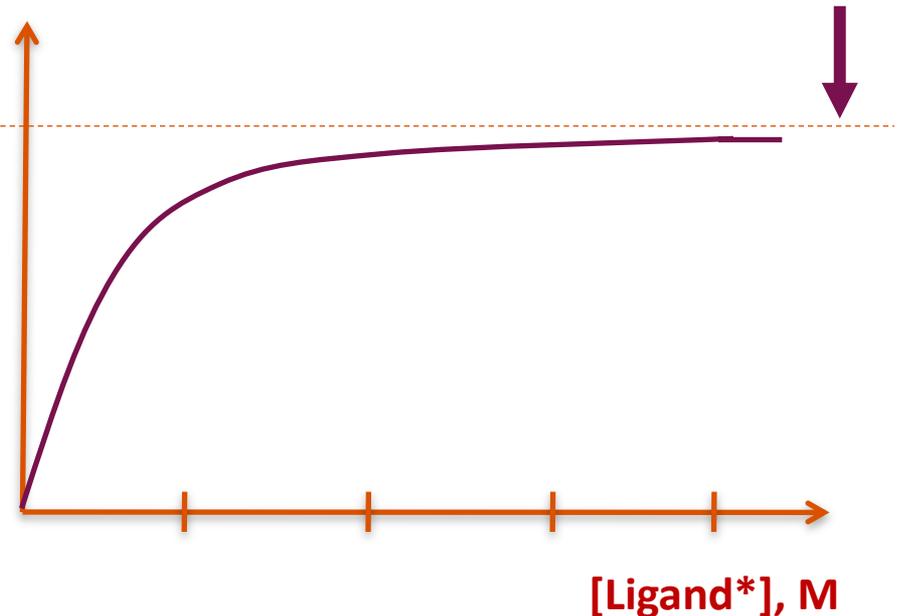
Dosage par saturation : analyse

La courbe tend vers une valeur « plateau », correspondant à l'occupation complète des sites spécifiques (R) par le ligand*
= **saturation des sites spécifiques.**

[Ligand* Lié]
= liaison spécifique L*R
= **B**

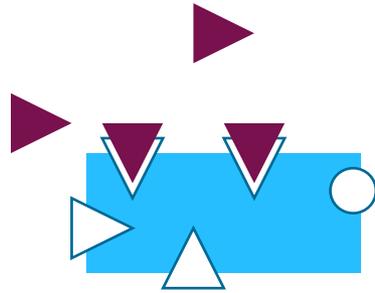
Bmax (fmol/mg de protéines)

Nombre de liaisons spécifiques à saturation
= indique la quantité des récepteurs présents dans la préparation

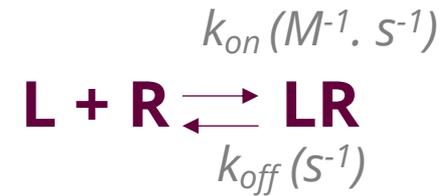


Bmax = densité des sites spécifiques dans la préparation utilisée

Analyse des résultats d'une expérience de saturation



A l'équilibre, la constitution du complexe est équivalente à sa dissociation



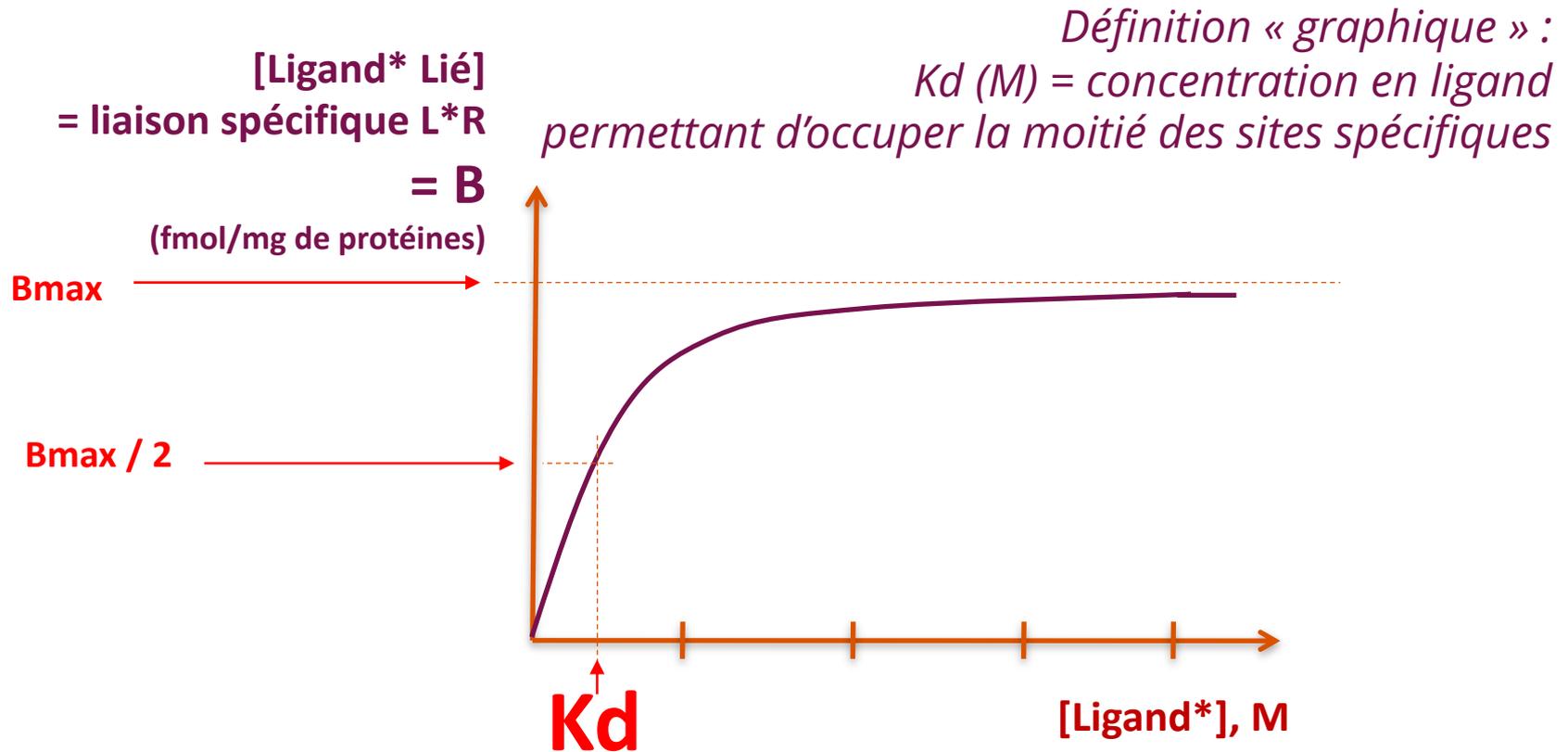
$$K_d = \frac{[\text{L}] \cdot [\text{R}]}{[\text{LR}]} = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}} \quad (1)$$

K_d (M) = constante de dissociation à l'équilibre
traduit l'affinité du ligand pour le récepteur

Rq : avec $[\text{Rt}]$: concentration totale de R, on a $[\text{Rt}] = [\text{R}] + [\text{RL}]$.

Pour $[\text{RL}] = 50\% [\text{Rt}]$, on a $[\text{R}] = [\text{RL}]$, et alors **$[\text{L}] = K_d$** => **détermination graphique**

Dosage par saturation : analyse



K_d (M) = constante de dissociation à l'équilibre
traduit l'affinité du ligand pour le récepteur

Représentation de Scatchard

$$K_d = \frac{[L] \cdot [R]}{[LR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad (1)$$

En définissant :

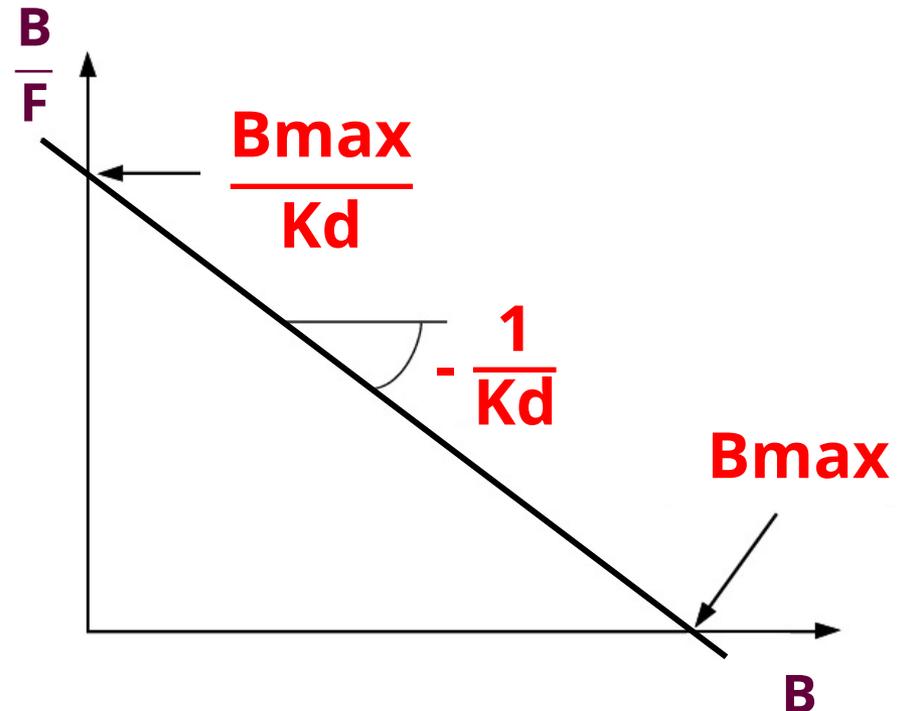
$B = [LR]$, fraction de R. liée à L

$F =$ fraction de ligand libre (L ajouté - L lié)

avec (1) on trouve : $B = \frac{F \cdot B_{max}}{K_d + F}$

En développant et recombinaut il est obtenu la linéarisation suivante :

$$\frac{B}{F} = -\frac{1}{K_d} B + \frac{B_{max}}{K_d}$$



Intérêt :

- *le B_{max} peut être évalué sans atteindre la saturation absolue des sites spécifiques*
- *B_{max} et K_d déterminés plus précisément*

Résumé : expérience de saturation

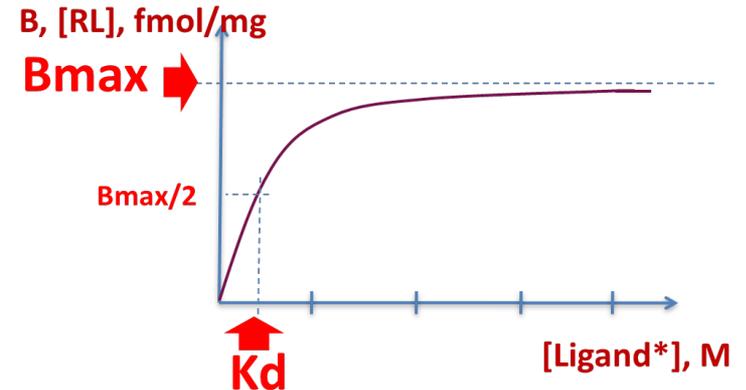
Dosage par saturation :

- $[L^*R]$ est mesuré à plusieurs $[L^*]$ croissantes jusqu'à saturation des sites spécifiques
- Mesure en 2 séries :
 - (1) L^* + préparation avec R
=> L° totale = $LR + L^\circ$ non-spé.
 - (2) L^* + L en excès + préparation avec R
=> L° non-spé.
- Liaison spécifique = $[L^*R] = B$

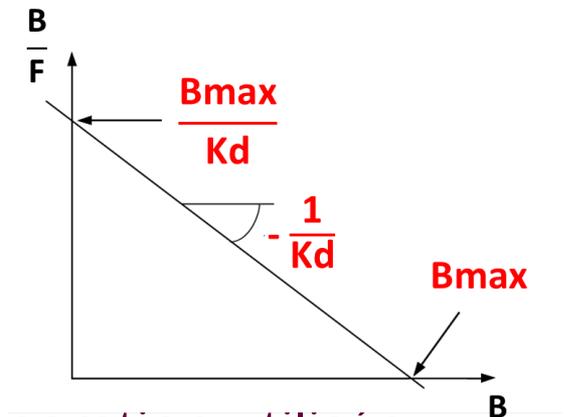
$K_d = \frac{L^\circ \text{ totale}}{L^*} - L^\circ \text{ non spé}$
 $K_d =$ constante de dissociation à l'équilibre
traduit l'affinité du ligand pour le récepteur

$B_{max} =$ densité des sites spécifiques dans la préparation utilisée

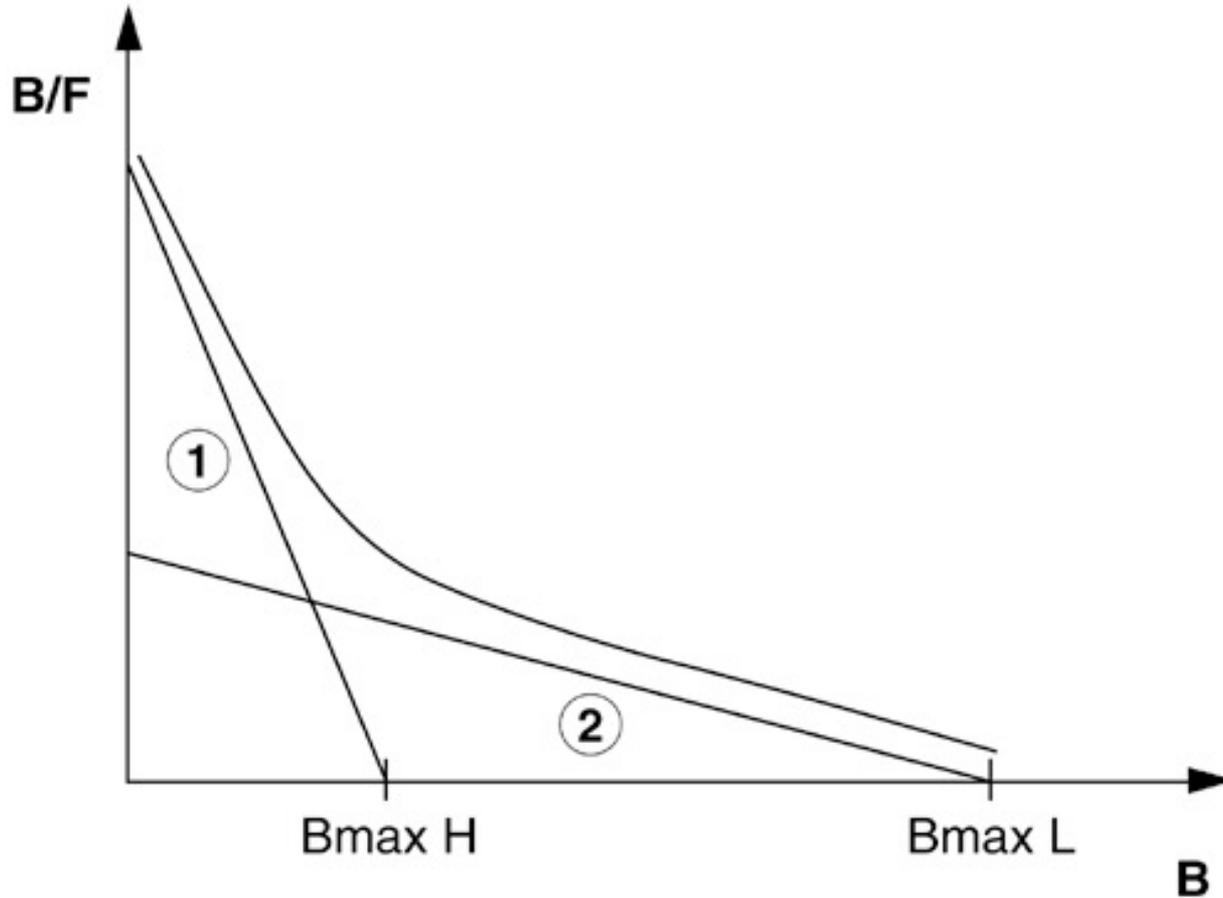
Courbe de saturation



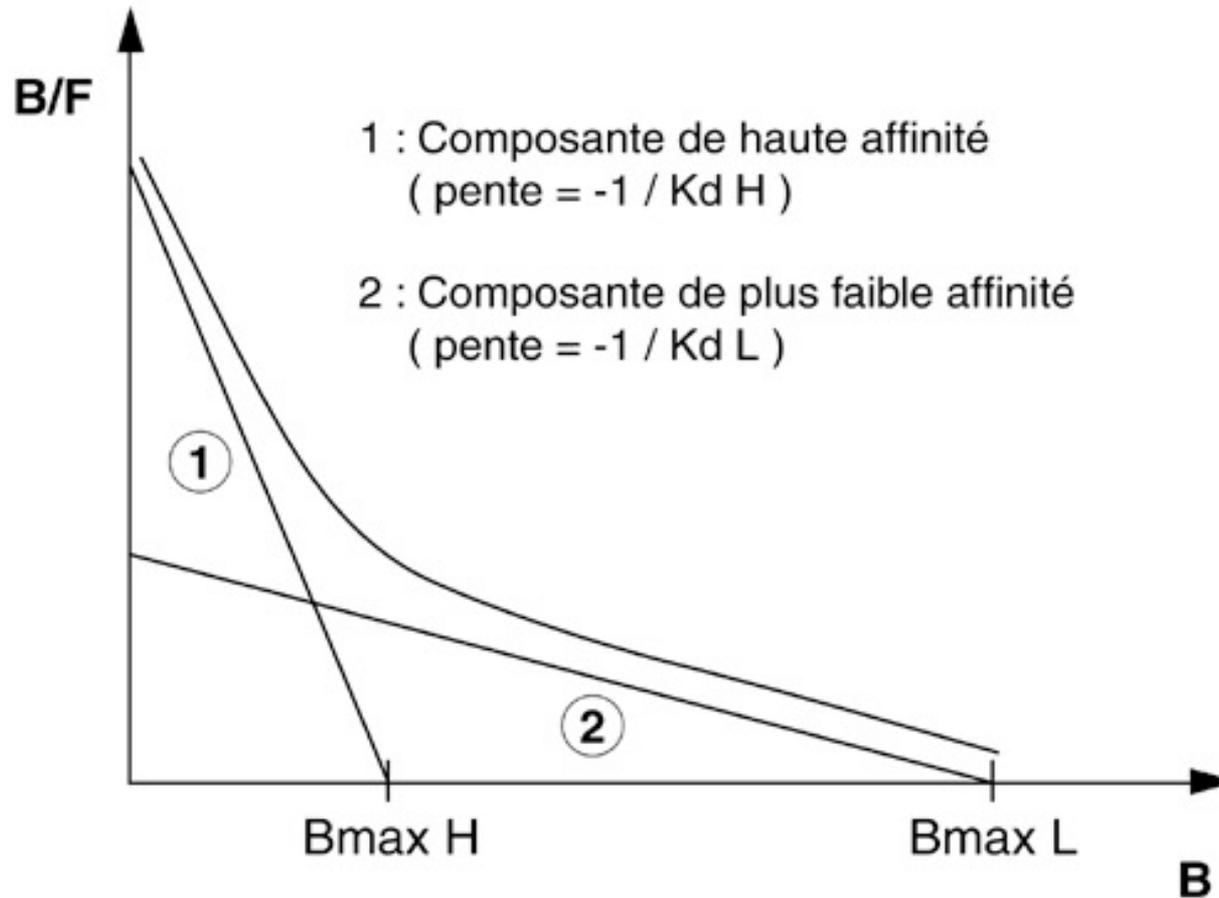
Représentation de Scatchard



Représentation de Scatchard non linéaire



Représentation de Scatchard non linéaire



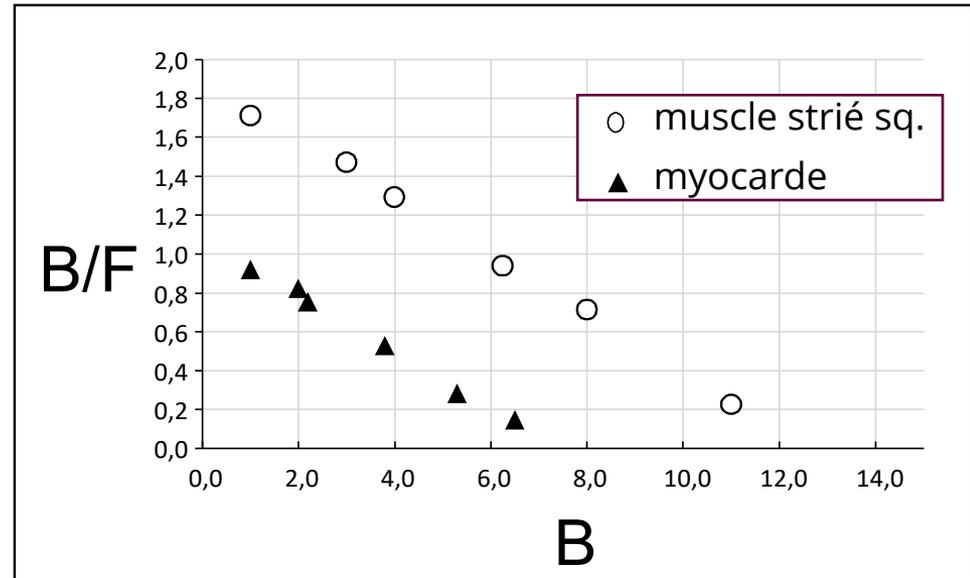
EXERCICES

On entreprend d'étudier la quantité d'un récepteur hormonal dans deux tissus, le muscle strié squelettique ou le myocarde gauche de rats. Des expériences sont réalisées et les résultats sont présentés sous la forme d'une représentation de Scatchard, reproduite ci-dessous. B est exprimé en fmol/mg de tissu. F est exprimé en nM.

1 Présentez brièvement

- le nom de la méthode utilisée,
- le matériel biologique / chimique nécessaires.

2 Définissez B et F et rappelez comment ils sont déterminés.



4 Quelles informations apportent ces données ?

3 Définissez des paramètres pouvant être déterminés et donnez leur valeurs.

EXERCICES

On entreprend d'étudier la quantité d'un récepteur hormonal dans deux tissus, le muscle strié squelettique ou le myocarde gauche de rats. Des expériences sont réalisées et les résultats sont présentés sous la forme d'une représentation de Scatchard, reproduite ci-dessous. B est exprimé en fmol/mg de tissu. F est exprimé en nM.

1 Présentez brièvement

- le nom de la méthode utilisée,

Etude de liaison par saturation (des sites spécifiques)

- le matériel biologique / chimique nécessaires.

Préparation tissulaire (MSS et VG) contenant le R. hormonal
Un ligand sélectif du R, radioactif (isotope radioactif) incorporé et le ligand froid correspondant.

2 Définissez B et F et rappelez comment ils sont déterminés.

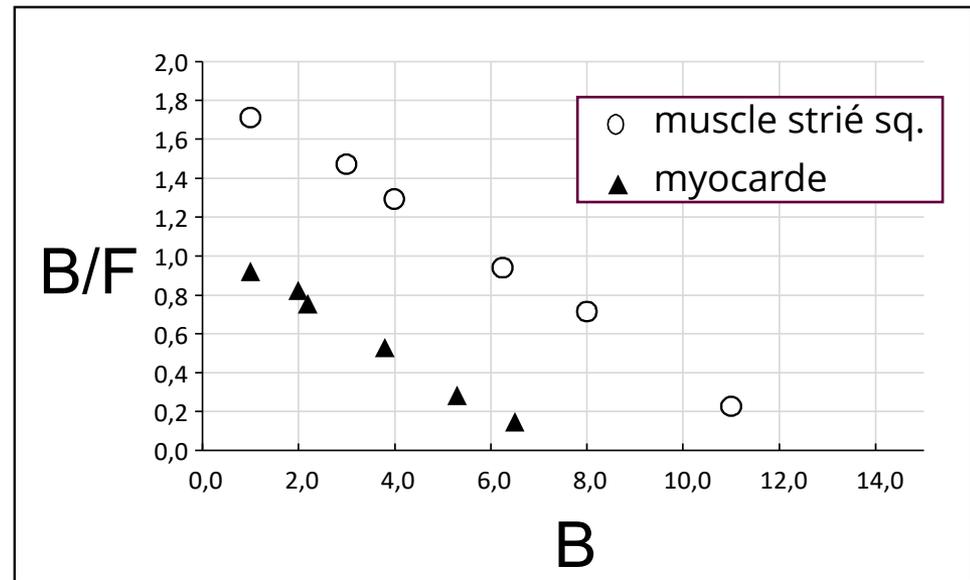
B : liaison du radioligand L* sur les sites spécifiques, i.e. récepteur(s) : obtenu pour chaque concentration testée en retranchant la liaison non spécifique (mesurée) de la liaison totale (mesurée)

F : fraction libre de L* à l'équilibre : obtenu pour chaque concentration testée en retranchant la liaison totale (mesurée, convertie en pM) de la concentration de L* ajoutée (connue).

3 Définissez des paramètres pouvant être déterminés et donnez leur valeurs.

Bmax = densité des sites spécifiques dans chacun des tissus

Kd = constante de dissociation du L* vis-à-vis du R.
Représente l'affinité du L* pour R.



Bmax (MSS) \approx 12,3 fmol/mg ; Kd (MSS) \approx 6,5 nM

Bmax (MSS) \approx 6,7 fmol/mg ; Kd (MSS) \approx 6,1 nM

4 Quelles informations apportent ces données ?

Le Kd est relativement proche entre les deux tissus, suggérant que le R. est le même dans les deux tissus.

Bmax traduit quantité des R. dans chacun des tissus ; Le R. est donc plus abondant dans le MSS que le VG (environ 2x plus riche).

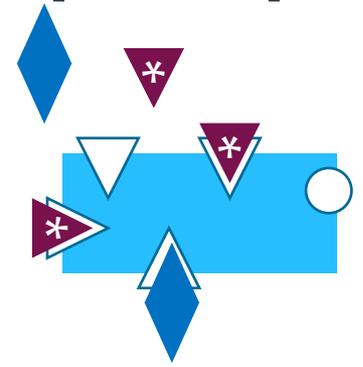
Dosage par compétition/déplacement : principe notions de CI_{50} et K_i

Principe :

- l'incubation d'une concentration fixe de $[L^*]$
- en présence d'une concentration fixe de $[R]$
- permet d'obtenir un niveau de liaison spécifique mesurable (L^*R).
- Un compétiteur $[C]$ non radiomarké (« froid ») est ajouté à concentrations croissantes:
 - si il y a compétition entre L^* et C pour un site spécifique, L^* est « déplacé »
=> le niveau de L^*R diminue...
... d'autant plus que $[C]$ est élevée, et que son affinité est forte

Paramètres déterminés:

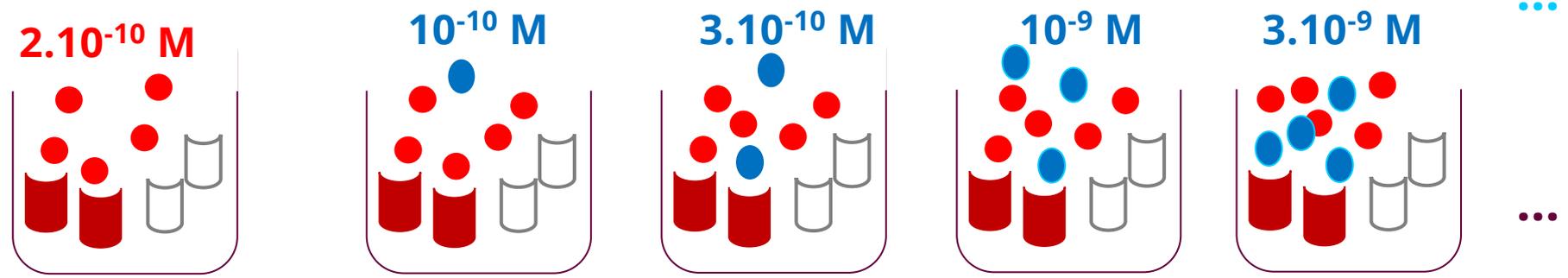
- CI_{50} (M) : concentration en compétiteur froid qui inhibe 50 % de la liaison spécifique du ligand radiomarké (L^*R).
- K_i (M) : traduit l'affinité du compétiteur froid pour le récepteur.



Dosage par de compétition/déplacement : protocole

concentration fixe de L^*

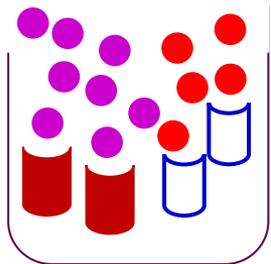
+ concentrations croissantes de ligand C



+ préparations membranaires en quantité identique



idem + excès ligand froid L



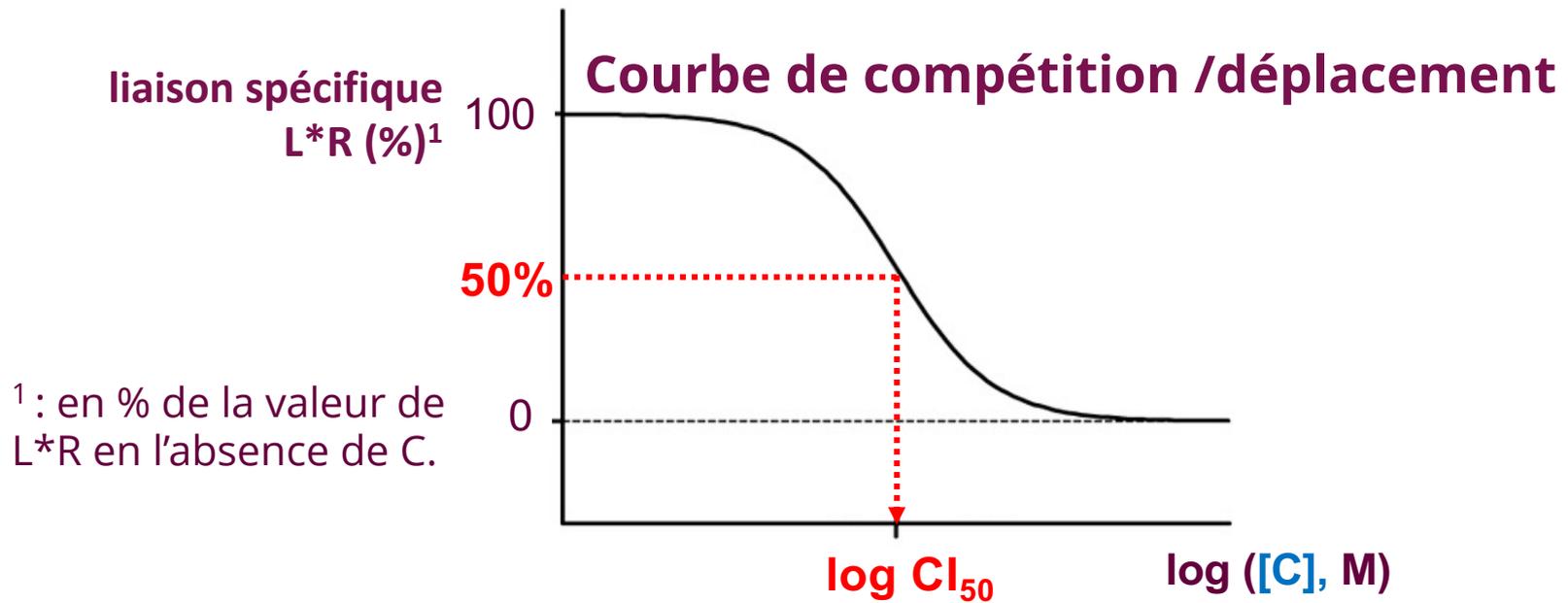
= liaison spécifique

pour chaque [C] testée

$$\Rightarrow [L^*R] = f^{\circ} ([C])$$

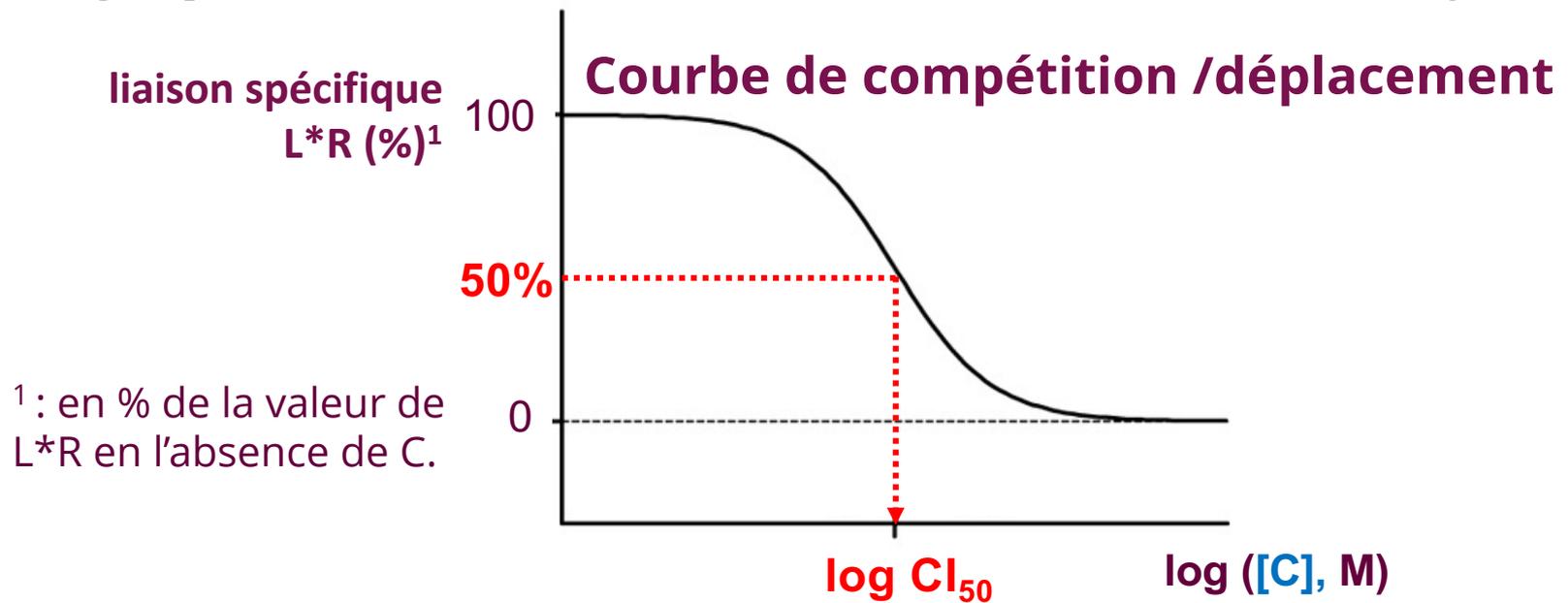
liaison non spécifique

Dosage par de compétition/déplacement : analyse



CI_{50} : concentration de compétiteur nécessaire pour inhiber 50% de la liaison L^*R mesurée en l'absence de C.

Dosage par de compétition/déplacement : analyse



Le Ki (M) est déterminé suivant l'équation de **Cheng - Prusoff** :

$$K_i = \frac{CI_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_D}}$$

Avec - [L*] = concentration de radioligand
- K_D = constante de dissociation de L*

CI₅₀ : concentration de compétiteur nécessaire pour inhiber 50% de la liaison L*R mesurée en l'absence de C.

Le Ki est calculé d'après une normalisation de la CI₅₀ :
ne dépend pas des caractéristiques du radioligand utilisé ([L*], K_D).

Résumé : expérience de compétition/d^t

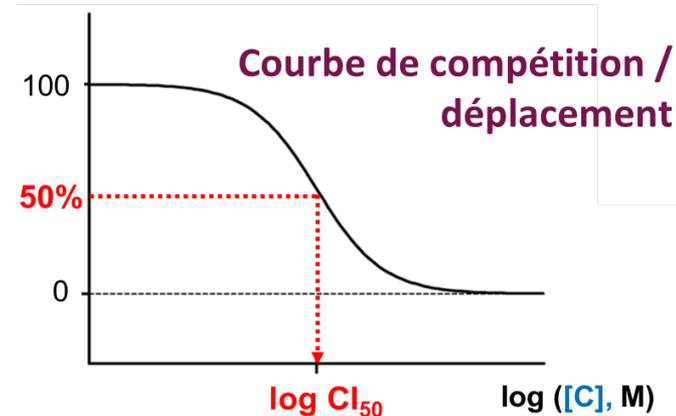
Dosage par compétition - déplacement:

- Etude d'un ligand « froid » : C (compétiteur, ≠ L)
- Une concentration de [L*] est choisie pour occuper une proportion significative de R.
- { L*R } est mesuré en présence de [C], testé sur une gamme de concentrations
- On mesure la capacité de C à inhiber la liaison {L*R}

Détermination de CI₅₀, Ki de C

- CI₅₀ (M) : concentration en compétiteur froid qui inhibe 50 % de la liaison spécifique du ligand radiomarqué (L*R).
- Ki (M) : traduit l'affinité du compétiteur froid pour le récepteur.
- Intérêt : En utilisant un radioligand universel, un grand nombre de compétiteurs peuvent être caractérisés (criblés) sans nécessité d'y incorporer un isotope radioactif

liaison spécifique
L*R (%)



équation de Cheng - Prusoff

$$K_i = \frac{CI_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_D}}$$

Sélectivité

Qu'est ce que la sélectivité d'un médicament/ligand

Ligand « sélectif » d'un récepteur = son affinité pour d'autres récepteurs est négligeable

- **médicament sélectif** : à dose thérapeutique, le médicament agira sur la cible d'intérêt thérapeutique
- **médicament non-sélectif** : le médicament agira potentiellement sur d'autres cibles :
 - effets secondaires bénéfiques
 - et /ou effets secondaires non désirés

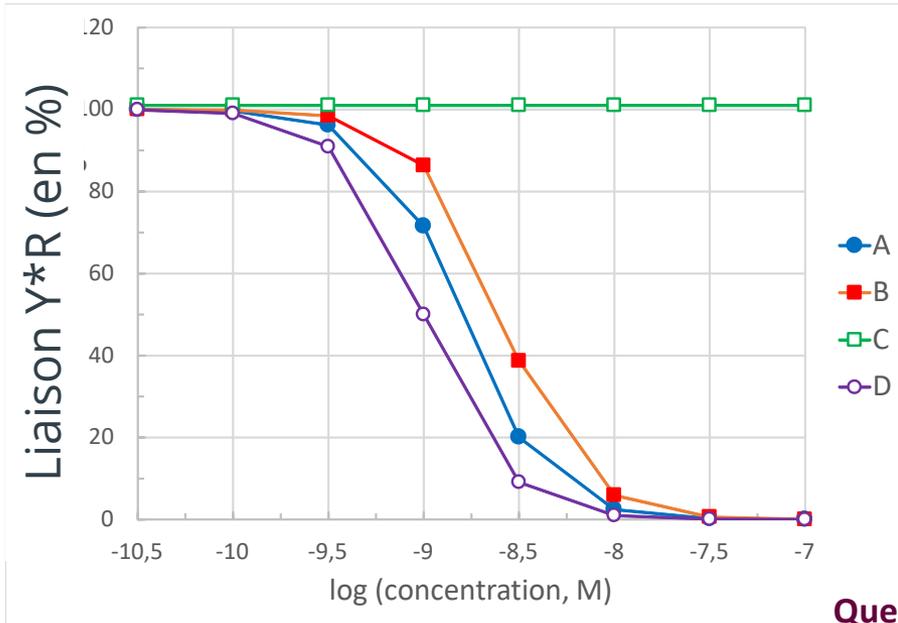
Comment évaluer la sélectivité d'un ligand?

Comparer l'affinité du ligand L pour 2 récepteurs (A et B) ou plus : effectuer le ratio des Ki

- Si $K_i(A) \ll K_i(B)$ (c'est-à-dire si $\frac{K_i(B)}{K_i(A)} > 100$), alors on peut dire que L est un ligand sélectif du R. A vis-à-vis du R. B.

EXERCICES

La figure suivante représente les conséquences produites par quatre nouveaux composés (A, B, C et D) sur le pourcentage de liaison spécifique d'un ligand de référence radiomarqué Y^* à un récepteur R ($Y^* - R$), sachant que les caractéristiques de Y^* sont les suivantes : $K_d=10^{-8}$ M ; concentration initiale utilisée : 10^{-7} M.



Question 1 : Il s'agit d'une expérience :

- a- fonctionnelle
- b- de saturation
- c- de compétition-déplacement
- d- aucune des 3 autres propositions

Question 2 : On peut affirmer que :

- a- les composés A, B et D sont des antagonistes de R
- b- les composés A, B et D sont des agonistes inverses de R
- c- les composés A, B et D sont affins pour le récepteur R
- d- le composé C est un antagoniste du récepteur R
- e- le composé C n'a pas d'affinité pour le récepteur R
- f- le composé C pourrait être un agoniste de R
- g- Le composé C produit un effet maximal dès la concentration de 10^{-10} M
- h- la puissance de D vis-à-vis du R est la plus grande

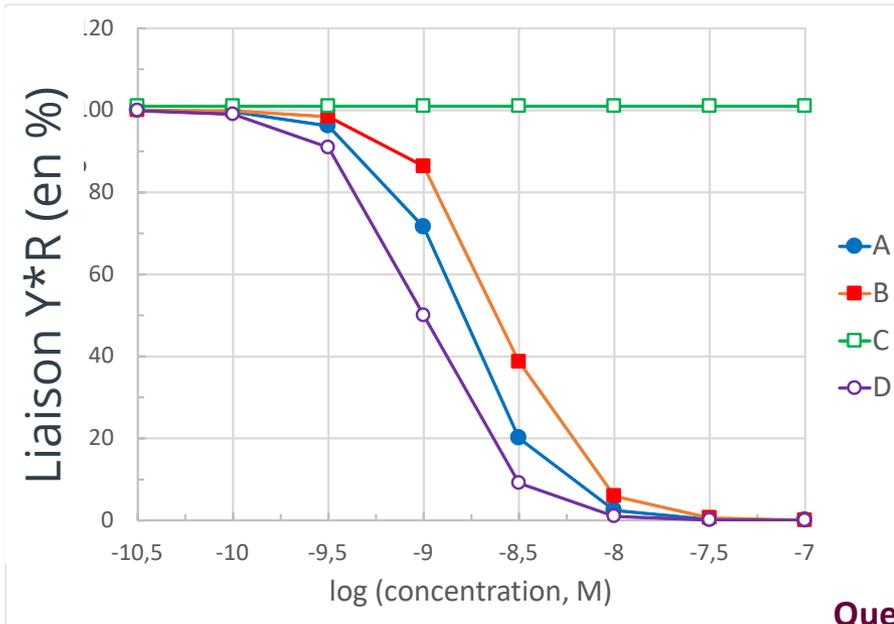
Question 3 : Un paramètre issu de l'analyse de cette expérience est indépendant de certaines conditions expérimentales.

Calculer le pour le composé D : sa valeur est de

- a- 10^{-9} M
- b- 10^{-8} M
- c- $9,1 \cdot 10^{-11}$ M
- d- $7,3 \cdot 10^{-7}$ M
- e- $9,1 \cdot 10^{-10}$ M

EXERCICES

La figure suivante représente les conséquences produites par quatre nouveaux composés (A, B, C et D) sur le pourcentage de liaison spécifique d'un ligand de référence radiomarqué Y^* à un récepteur R ($Y^* - R$), sachant que les caractéristiques de Y^* sont les suivantes : $K_d=10^{-8}$ M ; concentration initiale utilisée : 10^{-7} M.



Question 1 : Il s'agit d'une expérience :

- a- fonctionnelle
- b- de saturation
- c- de compétition-déplacement**
- d- aucune des 3 autres propositions

Question 2 : On peut affirmer que :

- a- les composés A, B et D sont des antagonistes de R
- b- les composés A, B et D sont des agonistes inverses de R
- c- les composés A, B et D sont affins pour le récepteur R**
- d- le composé C est un antagoniste du récepteur R
- e- le composé C n'a pas d'affinité pour le récepteur R**
- f- le composé C pourrait être un agoniste de R
- g- Le composé C produit un effet maximal dès la concentration de 10^{-10} M
- h- la puissance de D vis-à-vis du R est la plus grande

Question 3 : Un paramètre issu de l'analyse de cette expérience est indépendant de certaines conditions expérimentales.

Calculer le pour le composé D : sa valeur est de

- a- 10^{-9} M
- b- 10^{-8} M
- c- $9,1 \cdot 10^{-11}$ M**
- d- $7,3 \cdot 10^{-7}$ M
- e- $9,1 \cdot 10^{-10}$ M

EXERCICES

Les valeurs du tableau sur des propriétés de composés A, B, C et D ont été obtenues en utilisant de la [3H]histamine.

		A	B	C	D
Ki (nM)	R. H1	10	2	$>10^4$	10
	R. H2	15	1	5	300

1. Analysez les propriétés des molécules A, B, C et D vis-à-vis du R. H1, puis du R. H2.

2. Pour chacune des molécules, quelle information la comparaison des valeurs obtenues pour le R. H1 et le R. H2 apporte-t-elle?

Une autre série d'expériences est menée en utilisant la [3H]mépyramine, un ligand présentant une bonne affinité pour le R. H1 mais négligeable pour le R. H2.

3. Concernant les valeurs de Ki obtenues avec cette seconde étude, peut-on s'attendre à des résultats différents de la première étude ? Justifiez votre réponse

EXERCICES

Les valeurs du tableau sur des propriétés de composés A, B, C et D ont été obtenues en utilisant de la [3H]histamine.

		A	B	C	D
Ki (nM)	R. H1	10	2	$>10^4$	10
	R. H2	15	1	5	300

1. Analysez les propriétés des molécules A, B, C et D vis-à-vis du R. H1, puis du R. H2.

Ki représente l'affinité des molécules A, B, C, D envers les R. H1 ou H2.

Affinité croissante pour R. H1 : $B > A = D \gg C$; ligands de R. H1 sauf C

Affinité croissante pour R. H2 : $B > C > A > D$; tous ligands de R. H2

2. Pour chacune des molécules, quelle information la comparaison des valeurs obtenues pour le R. H1 et le R. H2 apporte-t-elle?

On compare les Ki respectifs de chaque molécule pour les 2 récepteurs.

Ratios $[Ki(H1) / Ki(H2)]$: A: 2/3; B: 2; C: $>2 \cdot 10^5$; D: 1/30 ; C est très sélectif pour H2, D assez sélectif pour H1; A et B non-sel.

Une autre série d'expériences est menée en utilisant la [3H]mépyramine, un ligand présentant une bonne affinité pour le R. H1 mais négligeable pour le R. H2.

3. Concernant les valeurs de Ki obtenues avec cette seconde étude, peut-on s'attendre à des résultats différents de la première étude ? Justifiez votre réponse

Concernant l'expérience avec R. H1, les Cl_{50} seront probablement différentes. Cependant les valeurs de Ki devraient être similaires, car c'est un paramètre normalisé prenant en compte le Kd du radioligand et sa concentration (Equation de Cheng-Prusoff) :

$$Ki = IC_{50} / (1 + [L^*]/Kd).$$

Concernant le R. H2, au vu de l'absence d'affinité de la mépyramine pour le R H2, aucune Cl_{50} ni Ki ne pourraient être déterminés.

Pharmacologie moléculaire

Rappels et exercices

1. Introduction

2. Liaison ligand/récepteur

3. Etude Fonctionnelle

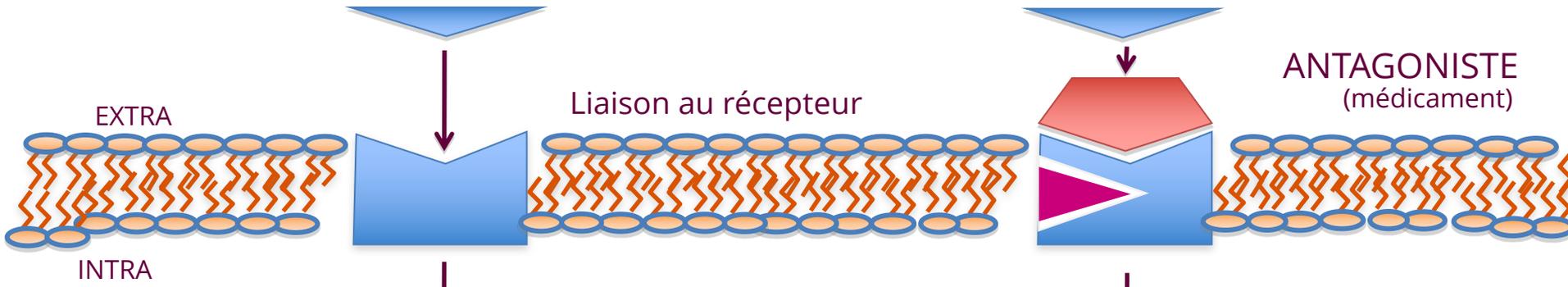
4. Cascade de
Transduction/signalisation cellulaire

5. Conclusions

AGONISTE
(médiateur ou médicament)

AGONISTE
(médiateur)

ANTAGONISTE
(médicament)



Enzyme ou canal ionique

Messagers intracellulaires
« seconds messagers »

- Ions
- Nucléotides cycliques
- Médiateurs lipidiques

Cascades enzymatiques

- Phosphorylations
- Déphosphorylations

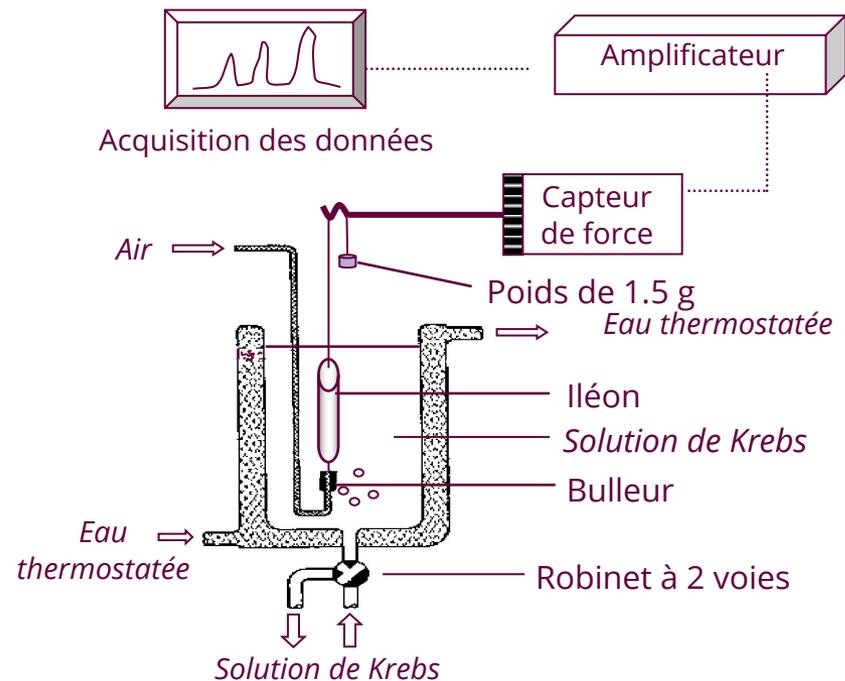
REPONSES CELLULAIRES

- Modifications métaboliques
- Modifications de l'état contractile
- Modifications de l'état sécrétoire
- Croissance et division

**ABSENCE DE
SIGNAL INTRACELLULAIRE**

**ABSENCE DE
REPONSES CELLULAIRES**

Système d'étude in vitro : organes isolés

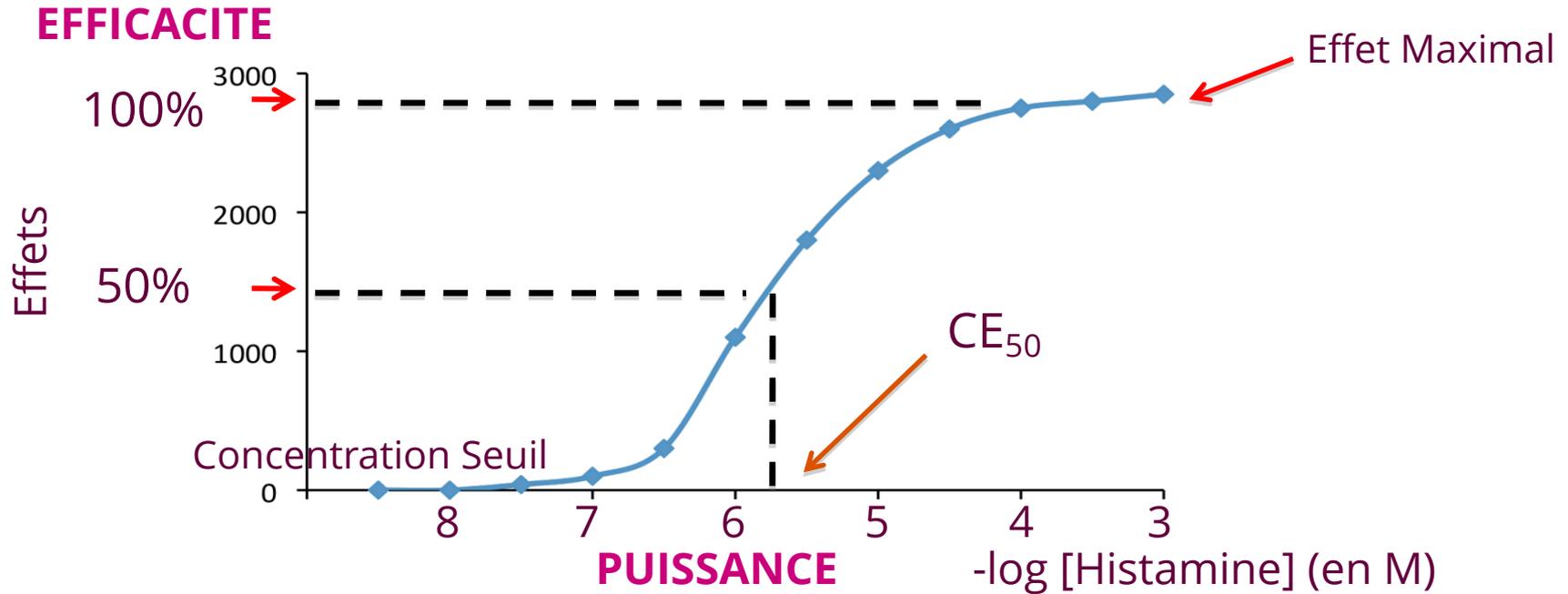


- Ajouter l'agoniste à des concentrations croissantes
- Enregistrement des contractions de l'organe :
 - ⇒ Mesure expérimentale : mm d'étirement
- Tracer la courbe effet-concentration de l'agoniste (papier semi-log)

Détermination de la concentration efficace 50 %

Systeme d'étude in vitro: organes isolés

Exemple : résultats de l'étude des effets contractants de l'histamine sur l'intestin isolé de cobaye



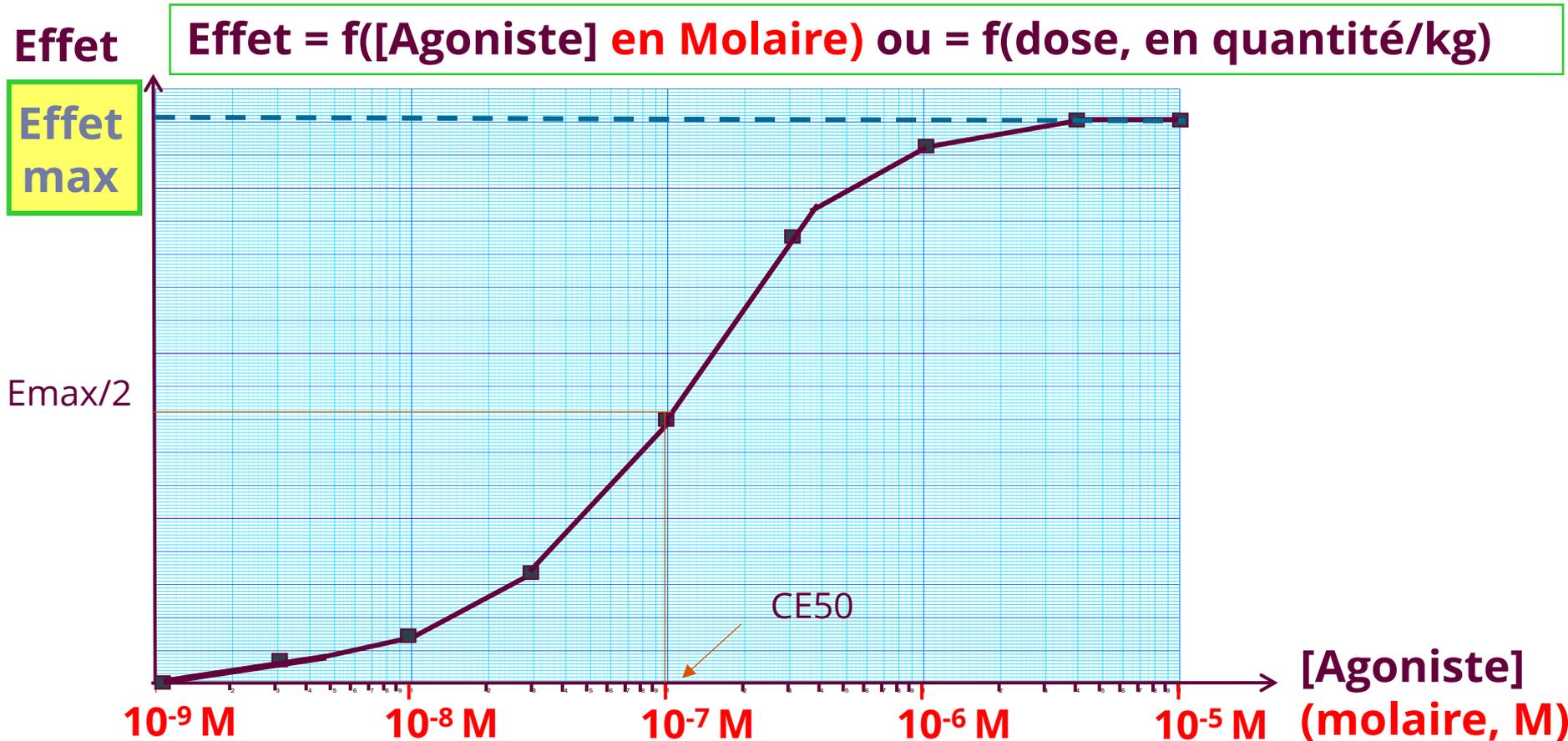
On peut ainsi définir :

- la concentration seuil
- l'effet maximal = efficacité ou activité intrinsèque
- la puissance (CE_{50})

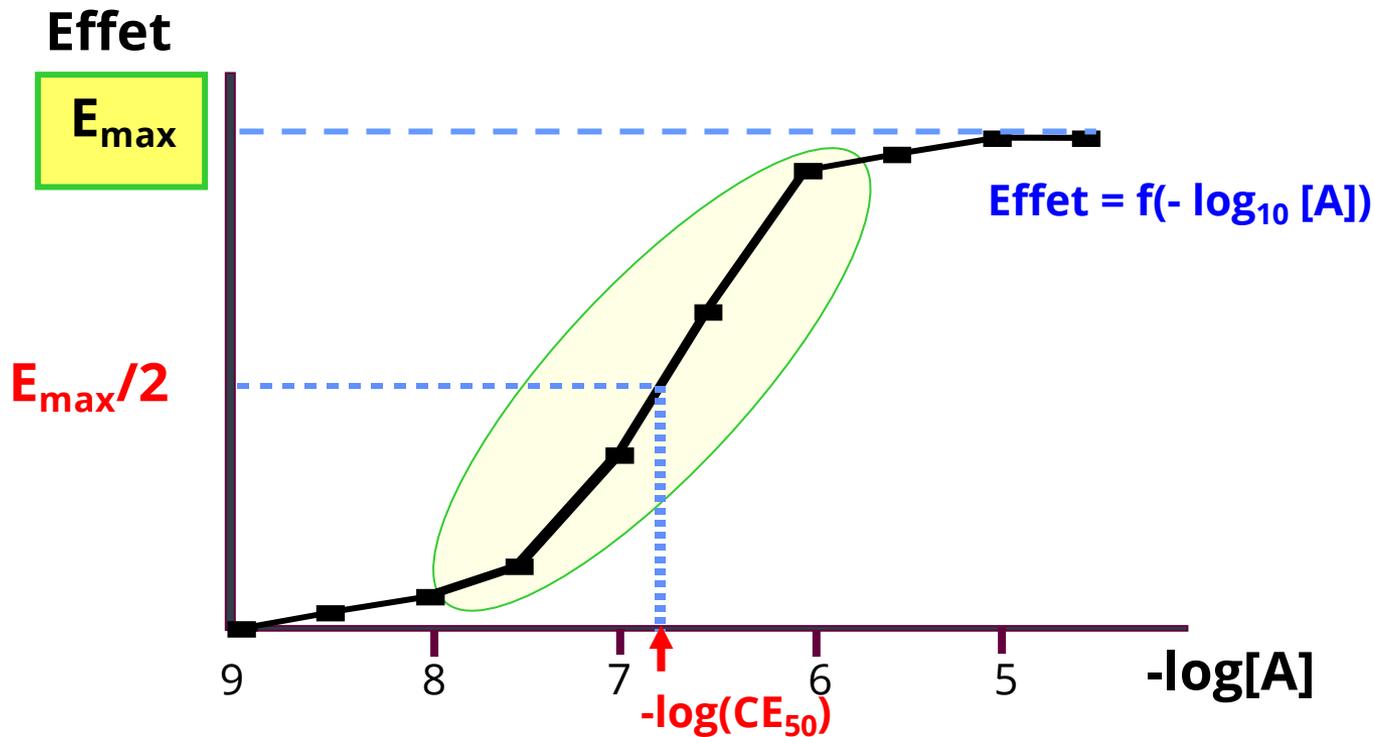
Approches fonctionnelles: Etude des agonistes

Transformation en courbe sigmoïde

↪ *sur papier semi-logarithmique :*



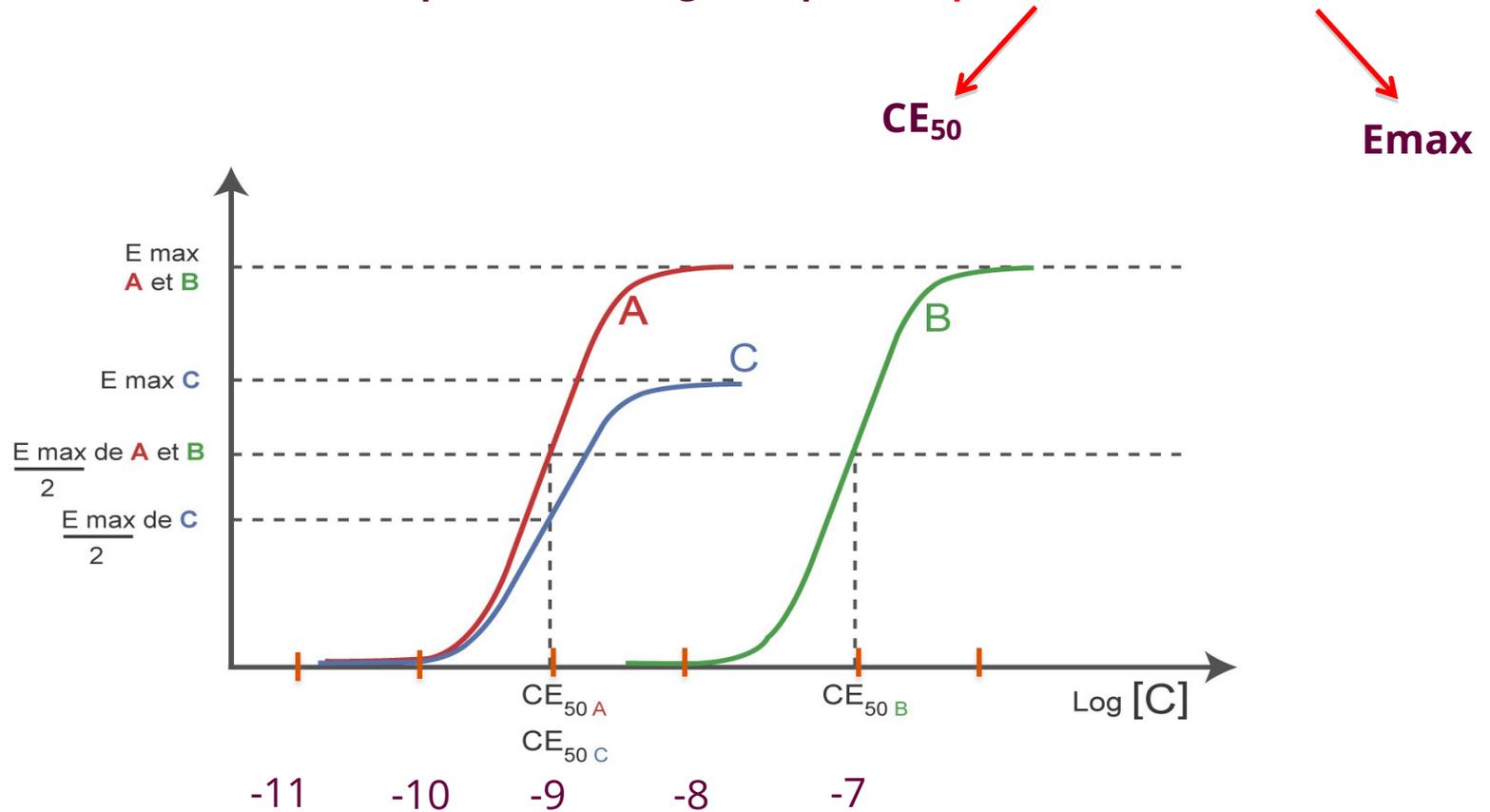
Approches fonctionnelles: Etude des agonistes



CE_{50} : concentration d'agoniste produisant 50% de l'effet maximal
 DE_{50} : dose d'agoniste produisant 50% de l'effet maximal
 $pD_2 = -\log_{10} (CE_{50})$ (traduit l'affinité, mais pas valeur d'affinité absolue) : **plus pD_2 élevé plus la puissance forte**

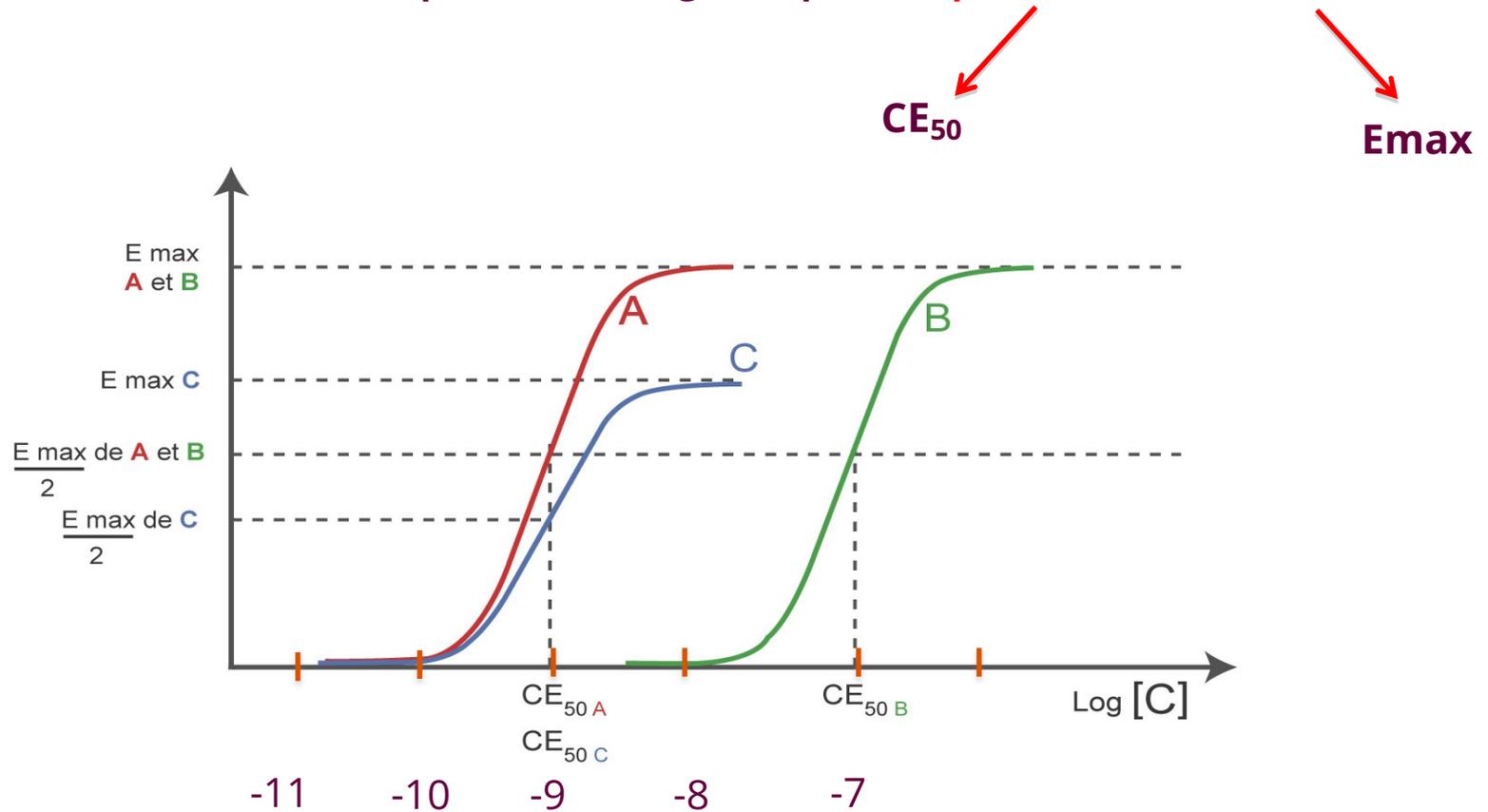
Comparaison des agonistes

⇒ Les agonistes d'un même récepteur se distinguent par leur **puissance** et leur **efficacité**.



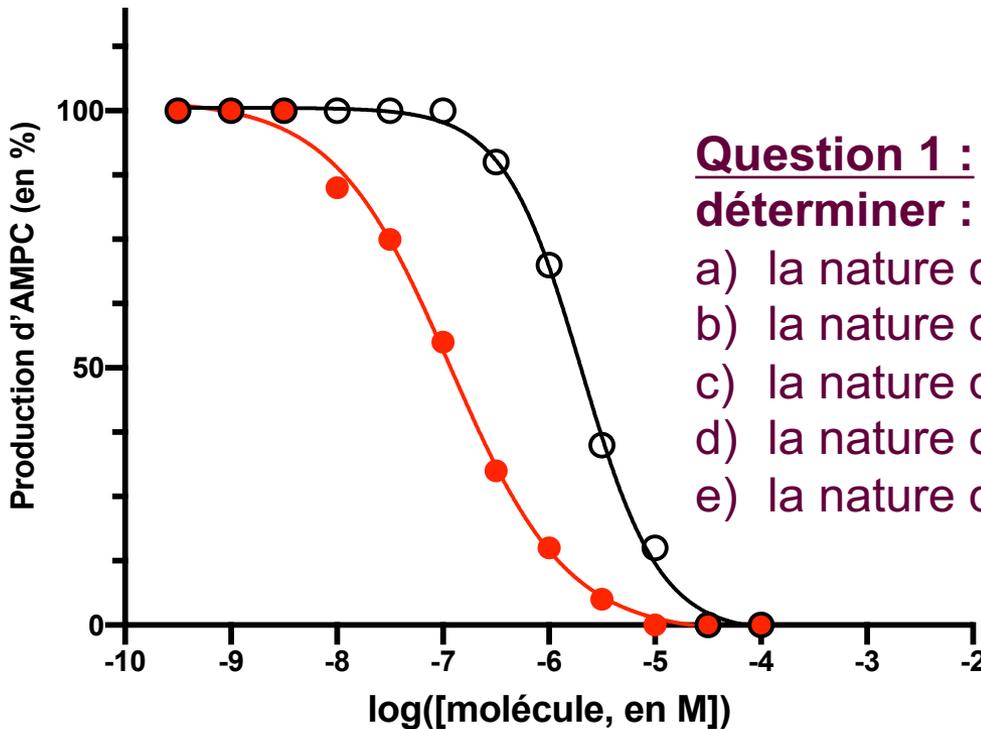
Comparaison des agonistes

⇒ Les agonistes d'un même récepteur se distinguent par leur **puissance** et leur **efficacité**.



- A et C sont **plus puissants** que B.
- A et B ont la même **efficacité**; C est moins efficace que A et B (E_{\max} plus faible)
- A et B sont des **agonistes entiers**, C est un **agoniste partiel**.

Une nouvelle molécule, l'UMRS1178 vient d'être synthétisée, une expérience visant à étudier les conséquences d'une administration croissante de la molécule, sur la production d'AMPC a été réalisée. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec de la sérotonine, le neurotransmetteur endogène.

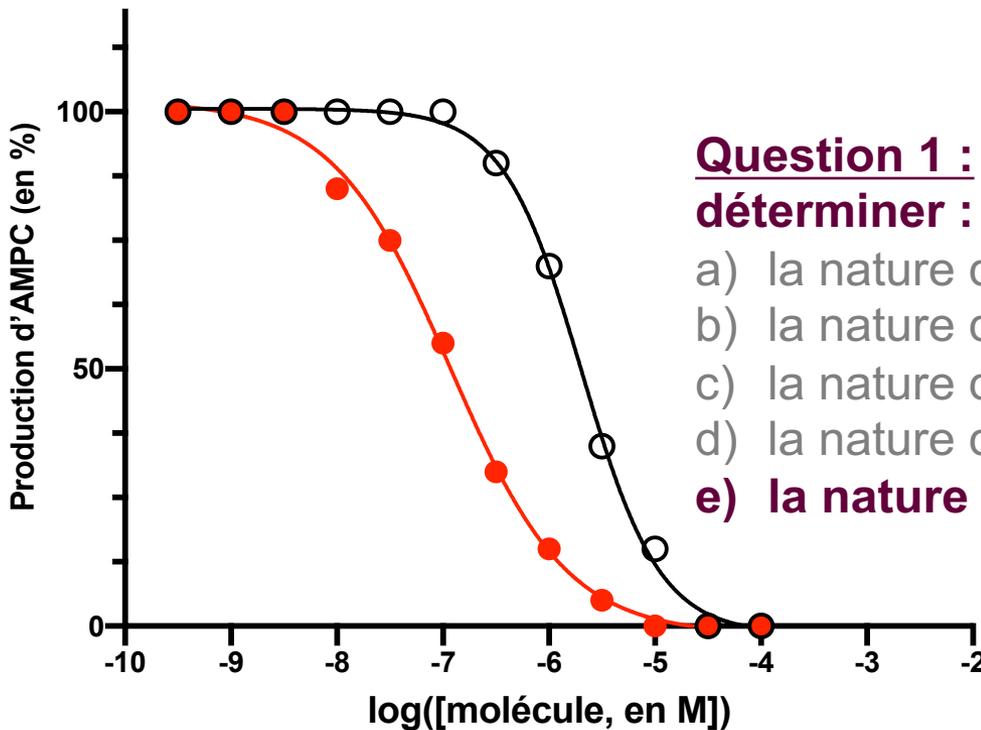


Question 1 : Cette figure permet de déterminer :

- a) la nature des ligands, le KI, le Bmax.
- b) la nature des ligands, le KI, l'EC50.
- c) la nature des ligands, l'EC50, la pA2.
- d) la nature des ligands, alpha, l'EC50, la pA2.
- e) la nature des ligands, alpha, l'EC50, la pD2.

⊖ Sérotonine ● UMRS1178

Une nouvelle molécule, l'UMRS1178 vient d'être synthétisée, une expérience visant à étudier les conséquences d'une administration croissante de la molécule, sur la production d'AMPC a été réalisée. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec de la sérotonine, le neurotransmetteur endogène.

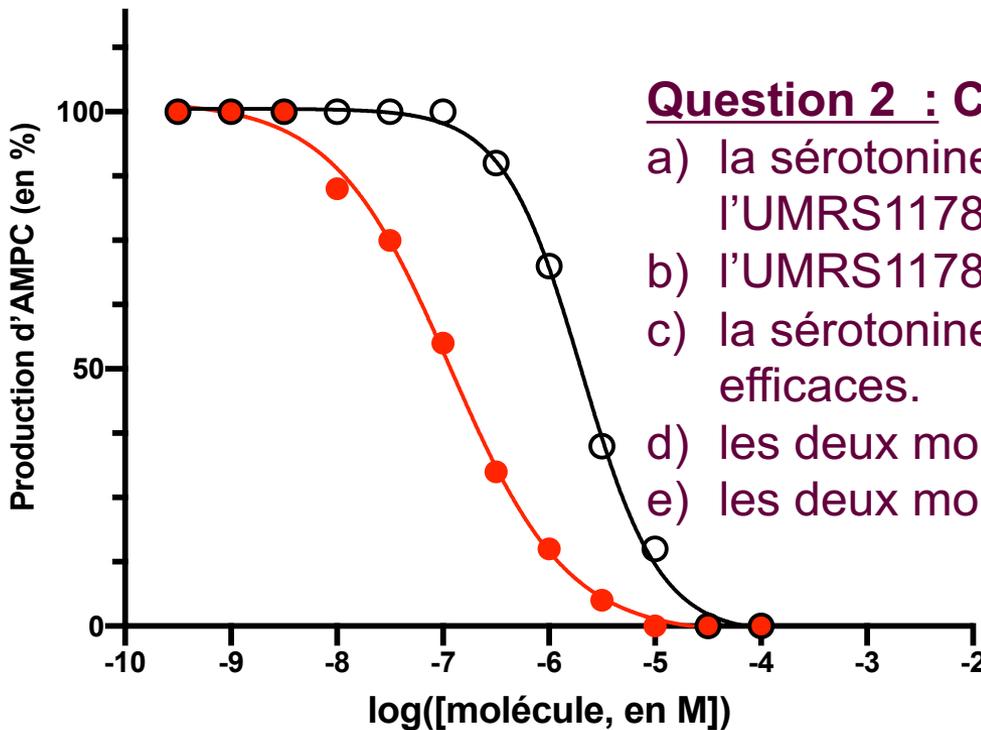


Question 1 : Cette figure permet de déterminer :

- a) la nature des ligands, le KI, le Bmax.
- b) la nature des ligands, le KI, l'EC50.
- c) la nature des ligands, l'EC50, la pA2.
- d) la nature des ligands, alpha, l'EC50, la pA2.
- e) la nature des ligands, alpha, l'EC50, la pD2.**

⊖ Sérotonine ● UMRS1178

Une nouvelle molécule, l'UMRS1178 vient d'être synthétisée, une expérience visant à étudier les conséquences d'une administration croissante de la molécule, sur la production d'AMPC a été réalisée. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec de la sérotonine, le neurotransmetteur endogène.



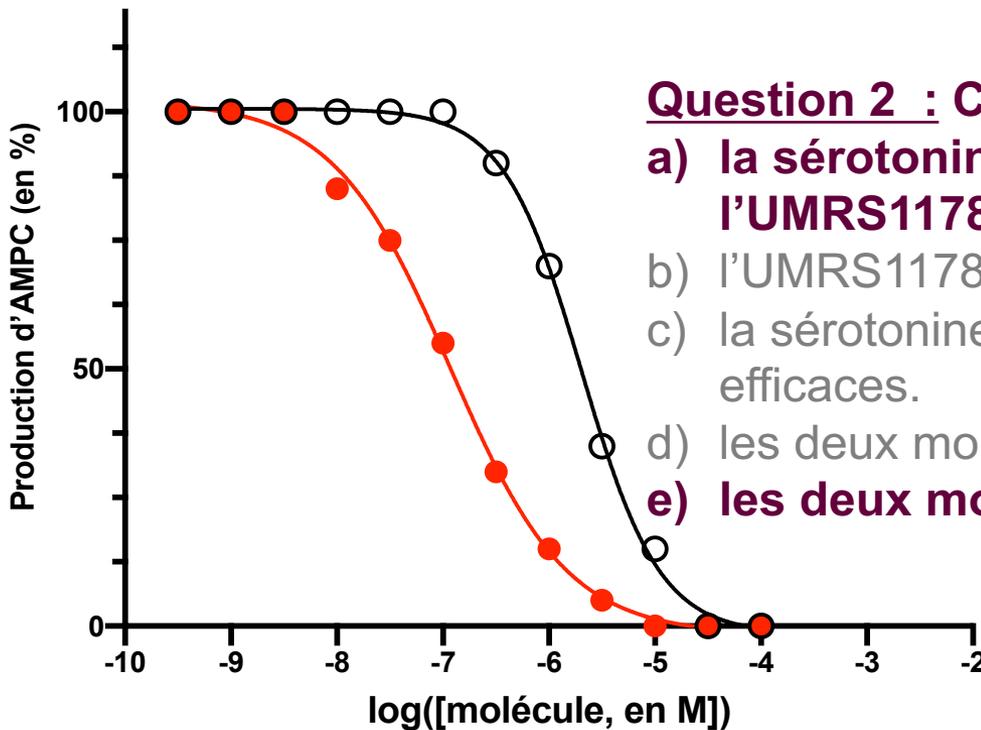
Question 2 : Cette figure permet de conclure :

- a) la sérotonine est moins puissante que l'UMRS1178.
- b) l'UMRS1178 est plus efficace que la sérotonine.
- c) la sérotonine et l'UMRS1178 sont aussi efficaces.
- d) les deux molécules sont des antagonistes
- e) les deux molécules sont des agonistes

⊖ Sérotonine

● UMRS1178

Une nouvelle molécule, l'UMRS1178 vient d'être synthétisée, une expérience visant à étudier les conséquences d'une administration croissante de la molécule, sur la production d'AMPC a été réalisée. Les résultats sont comparés à ceux obtenus avec de la sérotonine, le neurotransmetteur endogène.



Question 2 : Cette figure permet de conclure :

- a) la sérotonine est moins puissante que l'UMRS1178.
- b) l'UMRS1178 est plus efficace que la sérotonine.
- c) la sérotonine et l'UMRS1178 sont aussi efficaces.
- d) les deux molécules sont des antagonistes
- e) les deux molécules sont des agonistes

⊖ Sérotonine ● UMRS1178

Exemple:

L'effet de deux molécules différentes A et B a été étudié sur le tonus contractile d'un iléon isolé de cobaye. On mesure ainsi pour chaque molécule, l'amplitude de la contraction de l'iléon en présence de concentrations croissantes de la molécule. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) :

Concentrations (nM)	1	3	10	30	100	300	1000
A	4	12	42	71	109	132	134
B	22	64	102	116	128	134	134

Tableau 1: Variation de la contraction (en mm) d'un iléon isolé de cobaye induite par A ou B.

1- Quel type de réponse est obtenu ? Justifier votre réponse.

Exemple:

L'effet de deux molécules différentes A et B a été étudié sur le tonus contractile d'un iléon isolé de cobaye. On mesure ainsi pour chaque molécule, l'amplitude de la contraction de l'iléon en présence de concentrations croissantes de la molécule. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau ci-dessous (Tableau 1) :

Concentrations (nM)	1	3	10	30	100	300	1000
A	4	12	42	71	109	132	134
B	22	64	102	116	128	134	134

Tableau 1: Variation de la contraction (en mm) d'un iléon isolé de cobaye induite par A ou B.

1- Quel type de réponse est obtenu ? Justifier votre réponse.

Réponse Graduelle (l'effet augmente graduellement avec l'augmentation des concentrations)

2- Déterminer les CE_{50} de A et de B. Que peut-on conclure à l'aide de ce paramètre ?

Exemple:

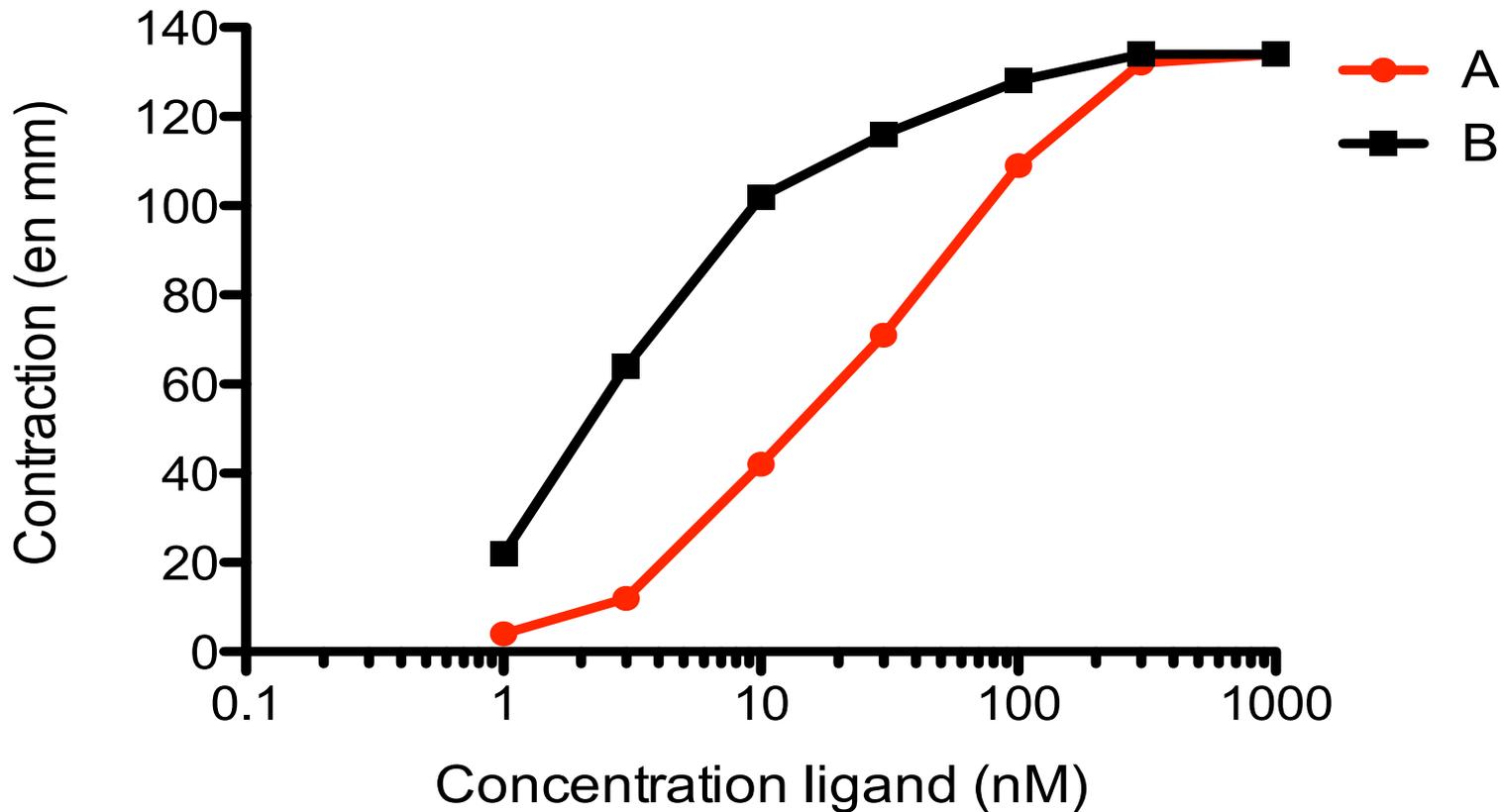
2- Déterminer les CE_{50} de A et de B. Que peut-on conclure à l'aide de ce paramètre ?

Concentrations (nM)	1	3	10	30	100	300	1000
A	4	12	42	71	109	132	134
B	22	64	102	116	128	134	134

Tableau 1: Variation de la contraction (en mm) d'un iléon isolé de cobaye induite par A ou B.

Variation de la contraction (en mm) d'un iléon isolé de cobaye induite par A ou B.

1- Construire la courbe effet-concentration ou effet-dose : $\text{Effet} = f(\log[\text{agoniste}]_M)$



↑ 10^{-9} ↑ 10^{-8} ↑ 10^{-7} ↑ 10^{-6}

CE₅₀ : concentration d'agoniste nécessaire pour obtenir la moitié (50 %) de la réponse maximale

2- Déterminer l'effet maximal (E_{max}):

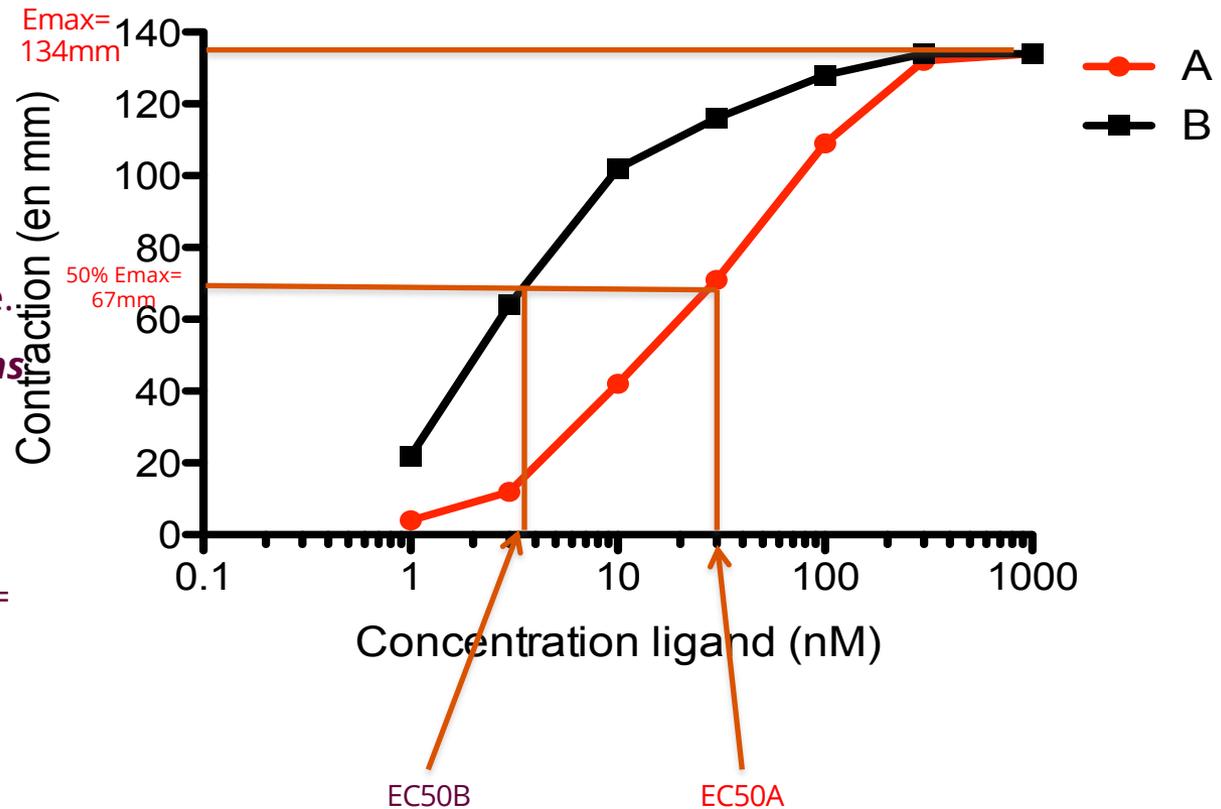
Ici, effet maximal de A = effet maximal de B = 134 mm

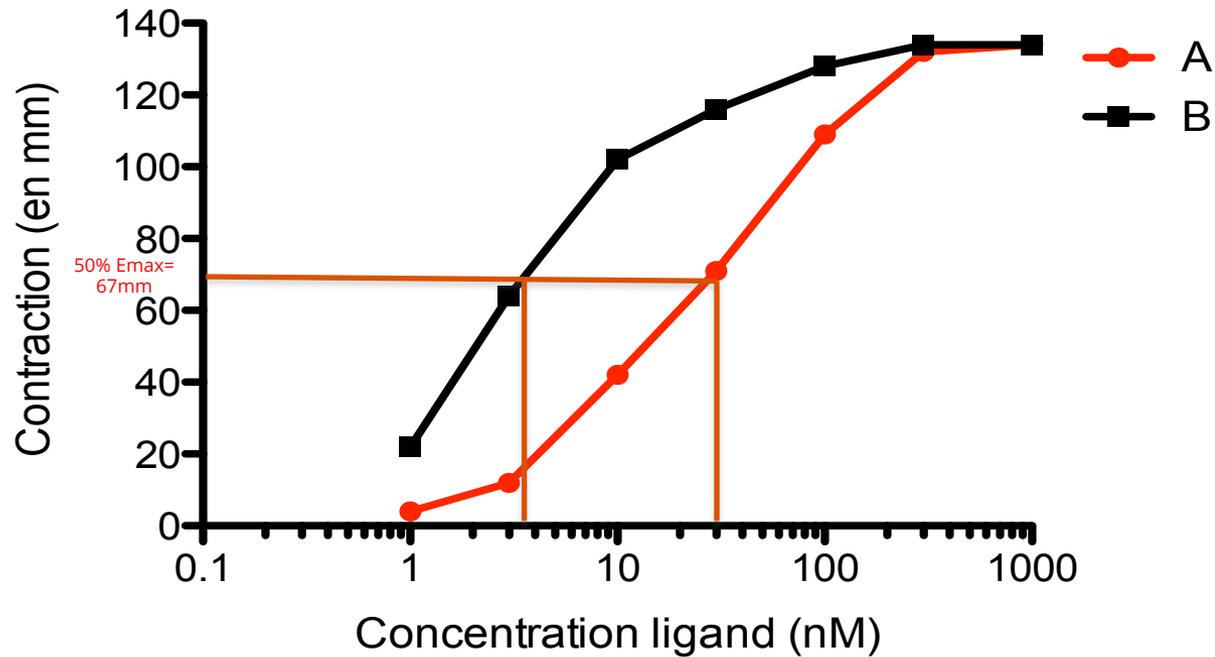
⇒ Ce paramètre traduit l'**efficacité** d'un agoniste.

Plus E_{max} est faible, moins l'agoniste est efficace.

3- Calculer la moitié de E_{max}:

Ici, 50% de la réponse maximale = 134/2 = 67 mm





4- Reporter cette valeur sur la courbe concentration-réponse et déterminer la CE₅₀:

⇒ Ce paramètre traduit la **puissance** d'un agoniste:

CE₅₀ (A) = 2,7.10⁻⁸ M et CE₅₀ (B) = 3,3.10⁻⁹ M

Plus la CE₅₀ d'un agoniste est faible, plus l'agoniste est puissant.

⇒ **B est plus puissante que A** pour induire la contraction de l'iléon de cobaye.

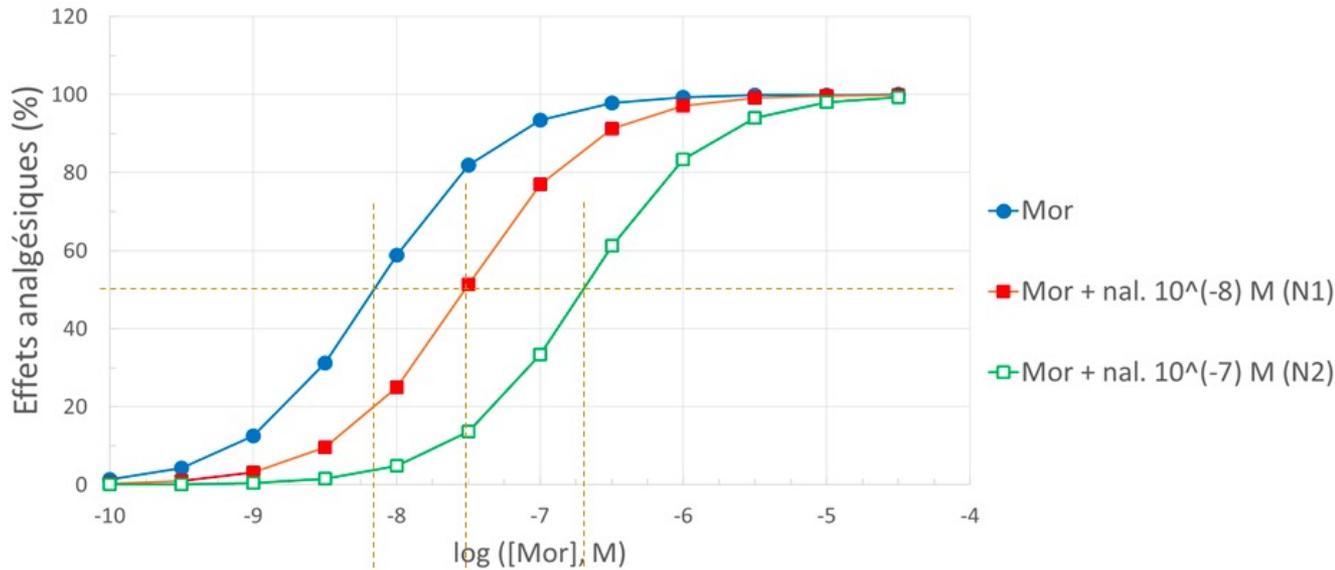
On compare les pD2 des ligands A (pD2=9), B (pD2=7) et C (pD2=5) pour un même récepteur:

- Veuillez choisir au moins une réponse :
 - a. la substance C est la plus efficace
 - b. la substance A est la plus puissante
 - c. la CE50 de la substance B est 10^{-7} M
 - d. la CE50 de la substance A est 10^{-9} M
 - e. la substance A est la moins puissante

On compare les pD2 des ligands A (pD2=9), B (pD2=7) et C (pD2=5) pour un même récepteur:

- Veuillez choisir au moins une réponse :
 - a. la substance C est la plus efficace
 - **b. la substance A est la plus puissante**
 - **c. la CE50 de la substance B est 10^{-7} M**
 - **d. la CE50 de la substance A est 10^{-9} M**
 - e. la substance A est la moins puissante

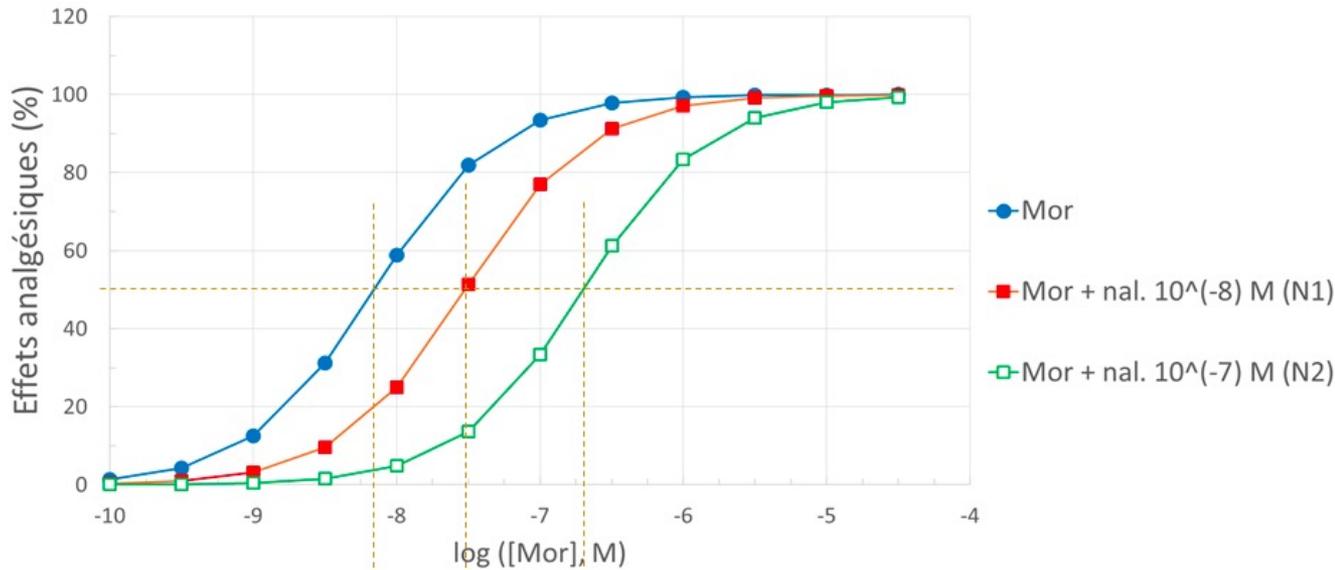
La figure suivante représente la mesure des effets analgésiques de la morphine. La morphine (Mor) est administrée seule ou en présence de naloxone (nal.), utilisée à deux concentrations : 10^{-8} M (N1) et 10^{-7} M (N2).



$C_0 = 7,0 \cdot 10^{-9}$ M
 $C_1 = 3,0 \cdot 10^{-8}$ M
 $C_2 = 2,0 \cdot 10^{-7}$ M

- Veuillez choisir au moins une réponse :
 - a. la valeur C_0 représente la CE_{50} de la morphine administrée seule
 - b. la morphine est un agoniste d'un récepteur
 - c. il s'agit d'une expérience fonctionnelle
 - d. la naloxone est un antagoniste compétitif réversible

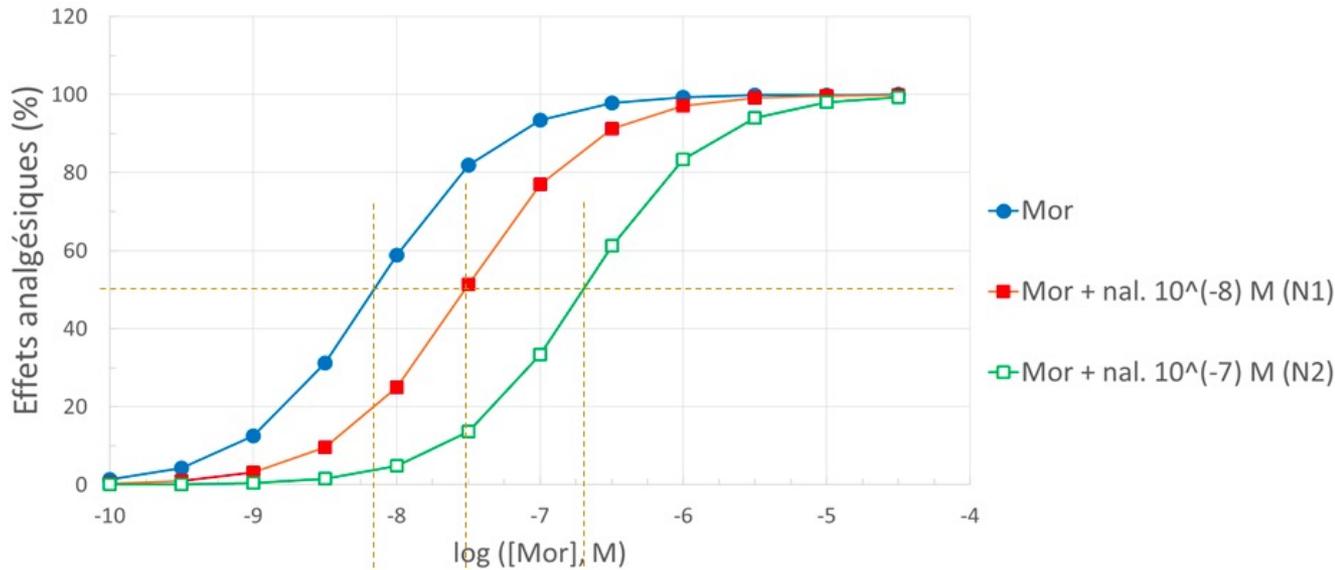
La figure suivante représente la mesure des effets analgésiques de la morphine. La morphine (Mor) est administrée seule ou en présence de naloxone (nal.), utilisée à deux concentrations : 10^{-8} M (N1) et 10^{-7} M (N2).



$C_0 = 7,0 \cdot 10^{-9}$ M
 $C_1 = 3,0 \cdot 10^{-8}$ M
 $C_2 = 2,0 \cdot 10^{-7}$ M

- Veuillez choisir au moins une réponse :
 - a. la valeur C_0 représente la CE_{50} de la morphine administrée seule
 - b. la morphine est un agoniste d'un récepteur
 - c. il s'agit d'une expérience fonctionnelle
 - d. la naloxone est un antagoniste compétitif réversible

La figure suivante représente la mesure des effets analgésiques de la morphine. La morphine (Mor) est administrée seule ou en présence de naloxone (nal.), utilisée à deux concentrations : 10^{-8} M (N1) et 10^{-7} M (N2).



$$C_0 = 7,0 \cdot 10^{-9} \text{ M}$$

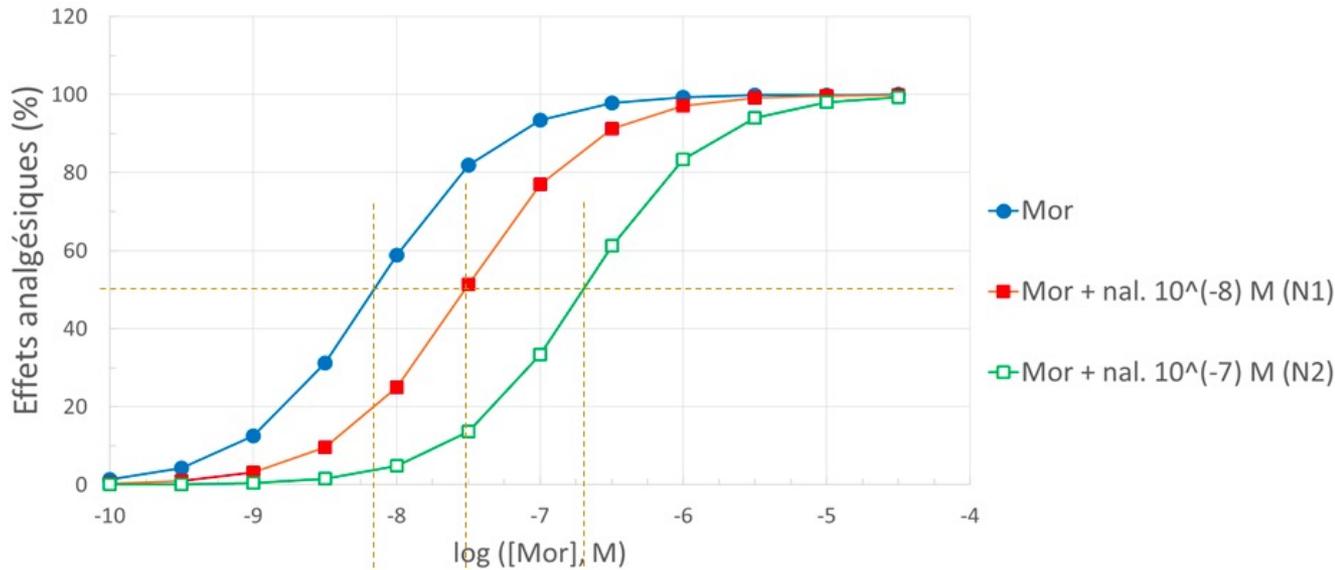
$$C_1 = 3,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$C_2 = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

• Veuillez choisir au moins une réponse :

- a. la puissance de la naloxone
- b. "-log" de la concentration en naloxone pour laquelle il est nécessaire de doubler la concentration de morphine pour obtenir le même effet antalgique qu'en absence de naloxone
- c. l'affinité de la naloxone pour la morphine
- d. "-log" de la concentration en morphine pour laquelle il est nécessaire de doubler la concentration de naloxone pour obtenir le même effet antalgique qu'en absence de morphine

La figure suivante représente la mesure des effets analgésiques de la morphine. La morphine (Mor) est administrée seule ou en présence de naloxone (nal.), utilisée à deux concentrations : 10^{-8} M (N1) et 10^{-7} M (N2).



$$C_0 = 7,0 \cdot 10^{-9} \text{ M}$$

$$C_1 = 3,0 \cdot 10^{-8} \text{ M}$$

$$C_2 = 2,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$$

• Veuillez choisir au moins une réponse :

- a. la puissance de la naloxone
- b. "-log" de la concentration en naloxone pour laquelle il est nécessaire de doubler la concentration de morphine pour obtenir le même effet antalgique qu'en absence de naloxone
- c. l'affinité de la naloxone pour la morphine
- d. "-log" de la concentration en morphine pour laquelle il est nécessaire de doubler la concentration de naloxone pour obtenir le même effet antalgique qu'en absence de morphine

Approches fonctionnelles : Etude des antagonistes

Différents types d'antagonisme :

Antagonisme compétitif : liaison de l'antagoniste sur le site de liaison de l'agoniste

Antagonisme non compétitif : liaison de l'antagoniste sur un site de liaison du récepteur distinct du site de liaison de l'agoniste

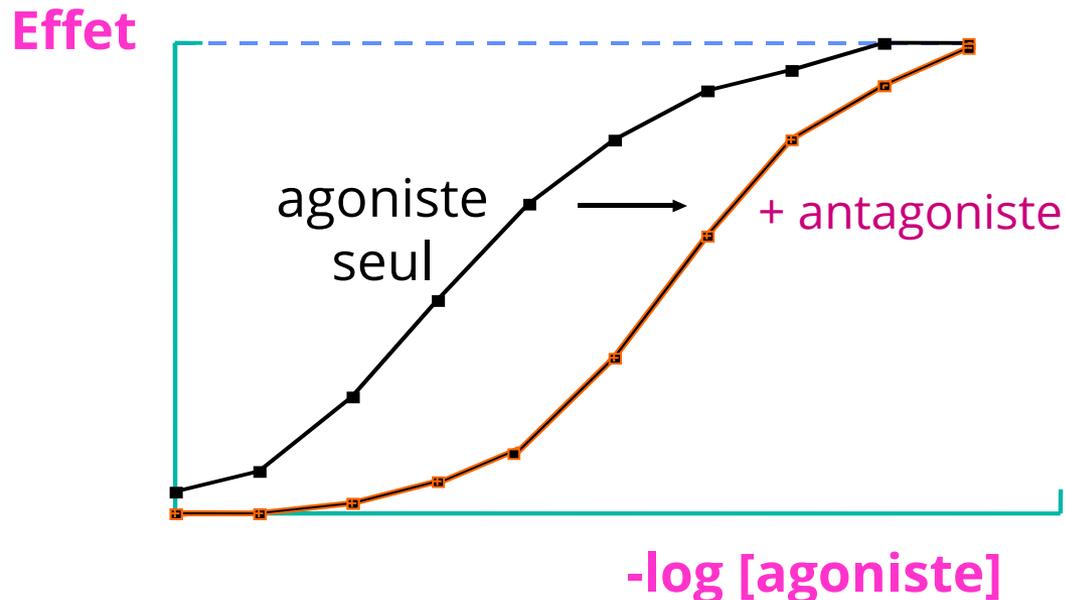
↪ pas d'effets propres ⇒ étude par observation de la **modification de l'effet de l'agoniste correspondant**

Approches fonctionnelles : Etude des antagonistes

Antagonisme surmontable :

- ⇒ déplacement courbe vers la droite
- ⇒ sans diminution effet maximum
- ⇒ pentes des courbes avec et sans antagoniste = parallèles

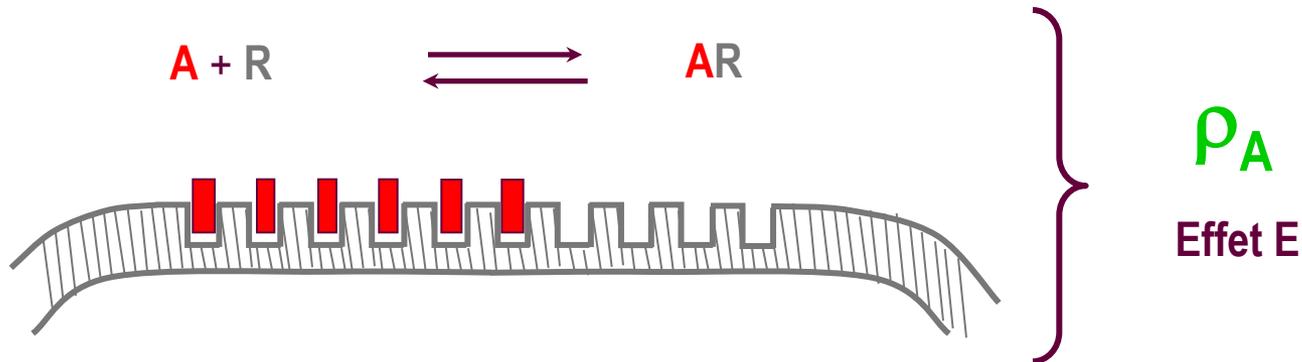
Ex : cas des antagonistes *compétitifs* réversibles



Approches fonctionnelles : Etude des antagonistes

En absence d'antagoniste :

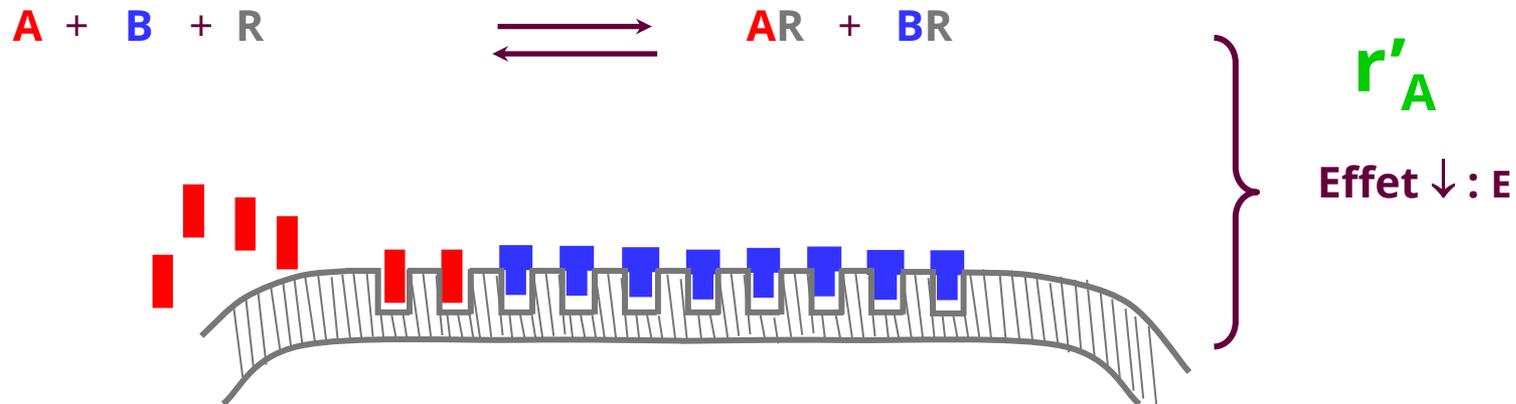
Pour une concentration **A** d'agoniste, une fraction des récepteurs r_A est occupée avec pour résultat un **effet E**



Approches fonctionnelles : Etude des antagonistes

En présence d'antagoniste :

en présence d'antagoniste B et de la même concentration A d'agoniste:

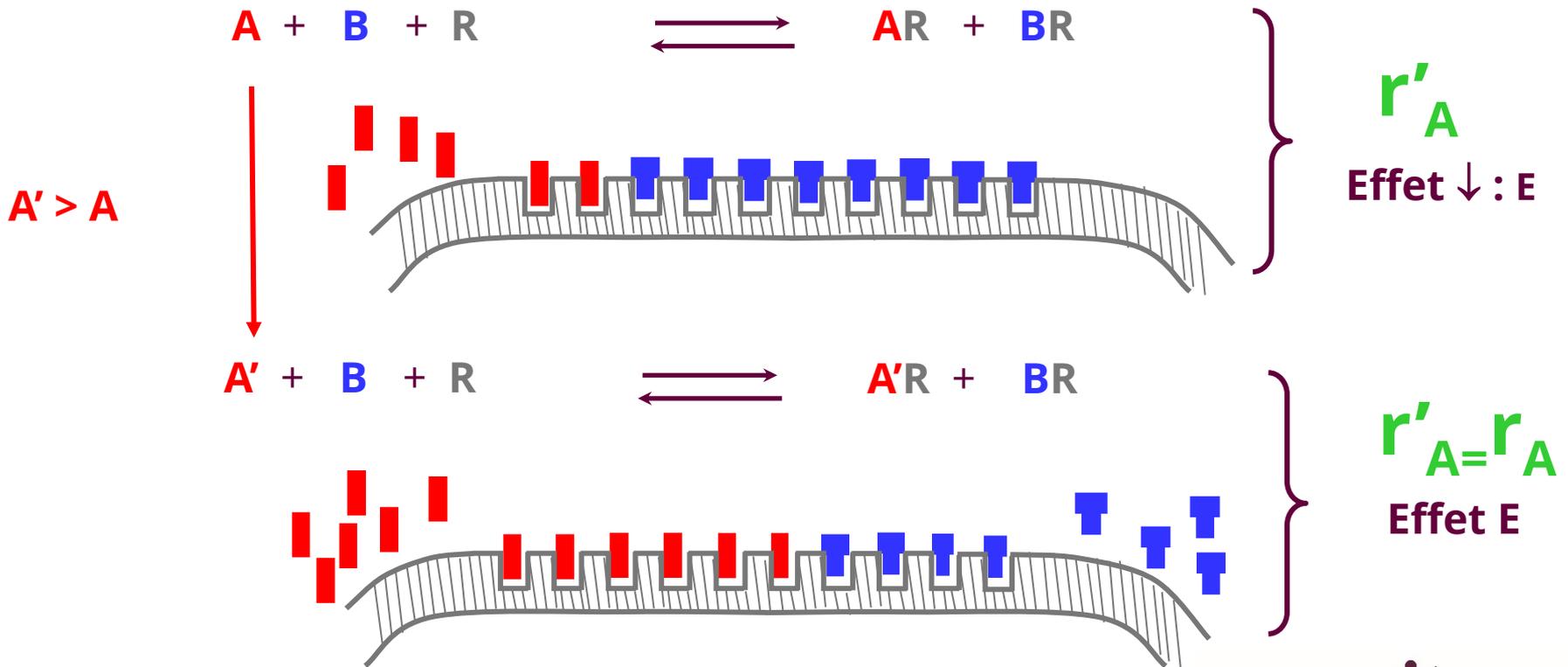


- Compétition entre A et B pour se lier à R
- Fonction des concentrations des ligands
- ↓ fraction des récepteurs occupés par la concentration **A** d'agoniste: r'_A

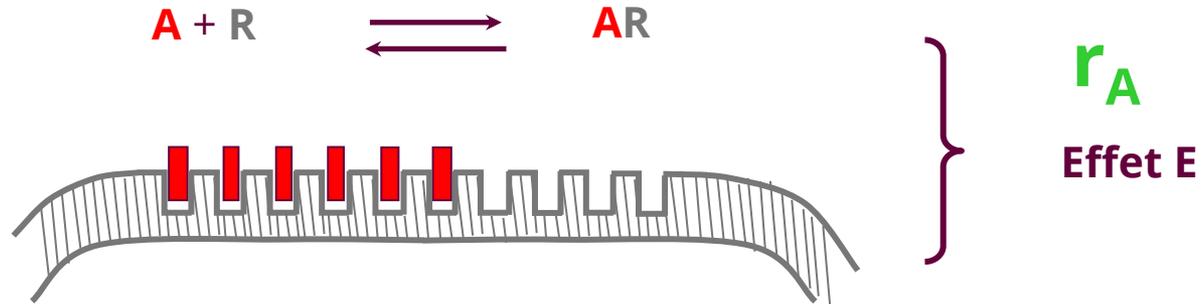
↪ ↓ **effet** pour la même concentration **A** d'agoniste

Approches fonctionnelles : Etude des antagonistes

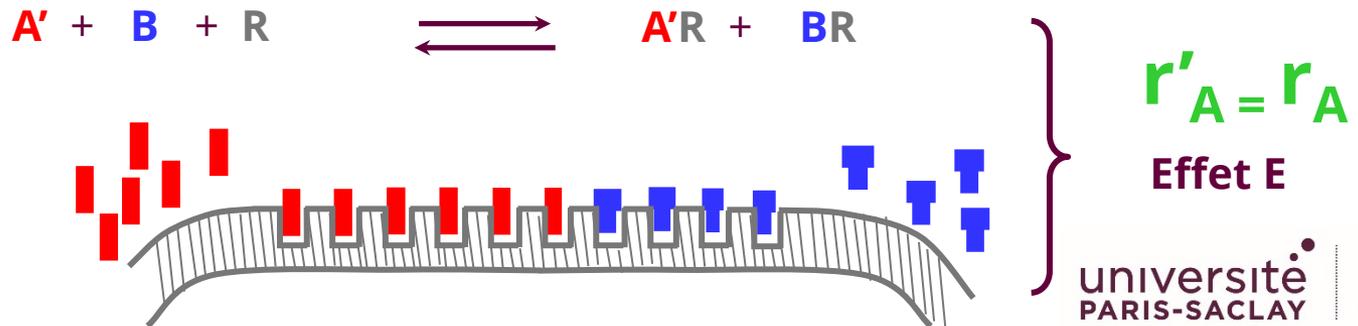
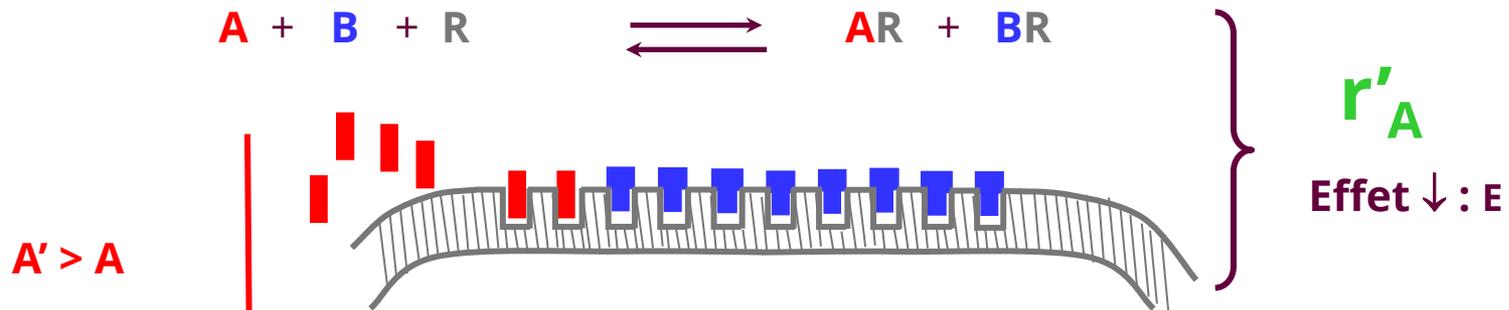
Pour occuper même fraction de récepteurs et obtenir même effet, il faut augmenter la concentration d'agoniste A' telle que $A' > A$ et $r_A = r_{A'}$



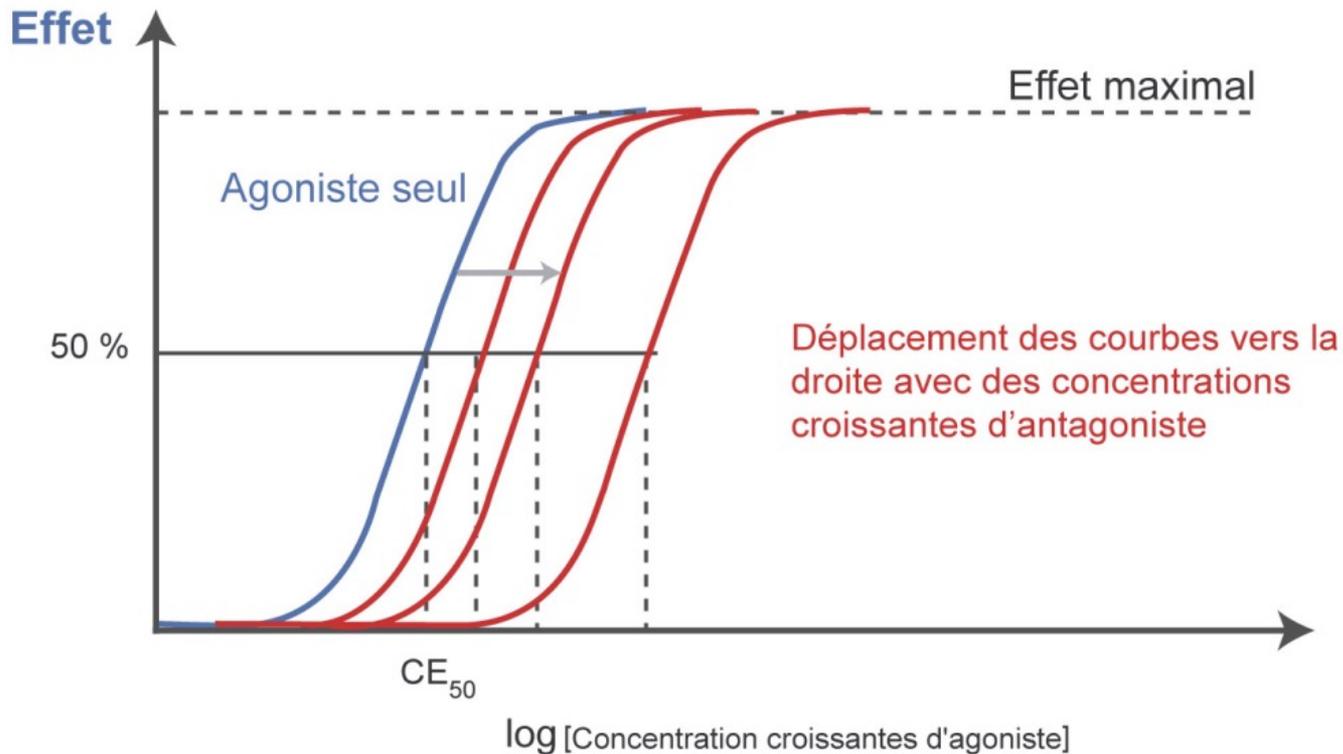
En absence d'antagoniste :



En présence d'antagoniste :



Quantification de l'effet d'un antagoniste



⇒ définition graphique du pA_2

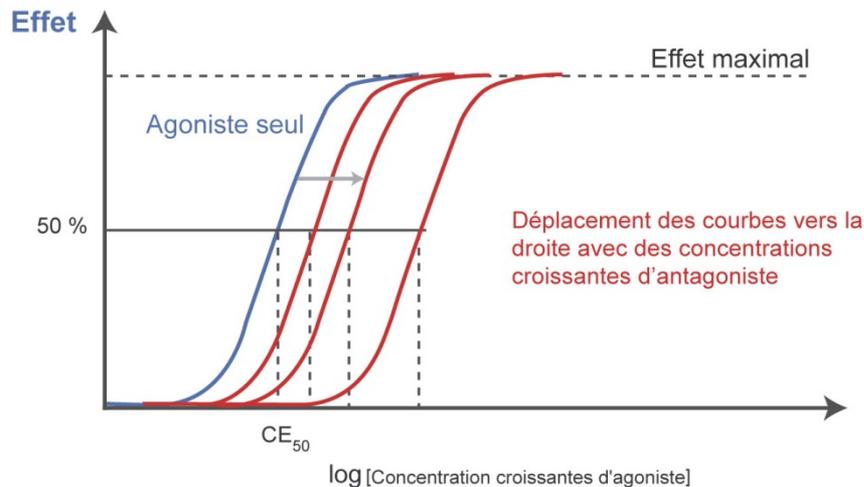
Comparaison des antagonistes

⇒ Déplacement vers la droite de la courbe dose-réponse de l'agoniste

- L'effet max est-il conservé ?
- la pente est-elle conservée ?

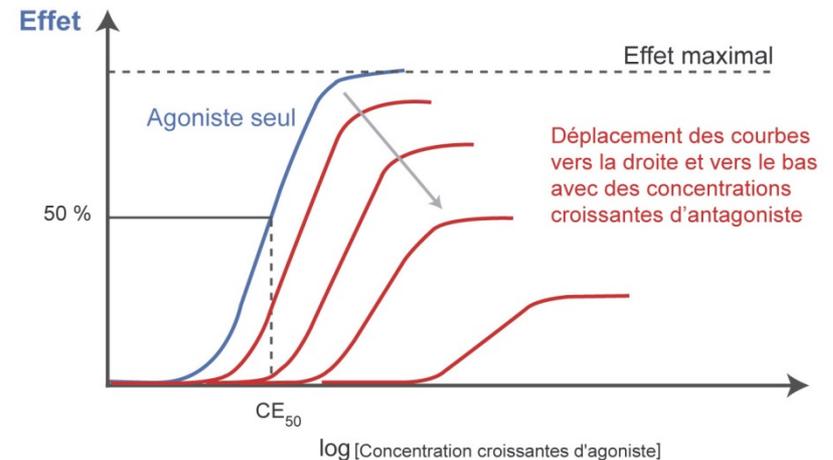
OUI

Antagonisme « surmontable »
Antagoniste compétitif réversible



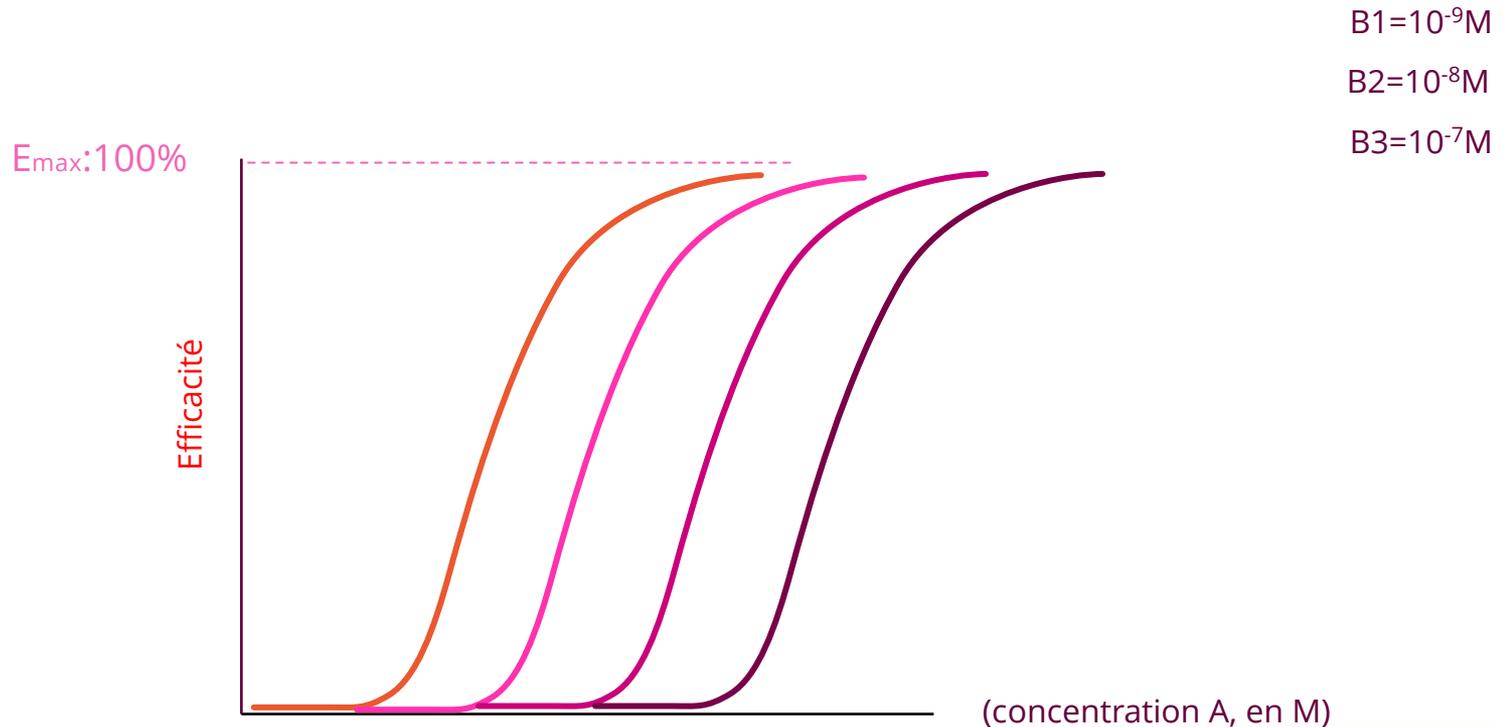
NON

Antagonisme « insurmontable »
Antagoniste non compétitif
(irréversible ou réversible)



pA2

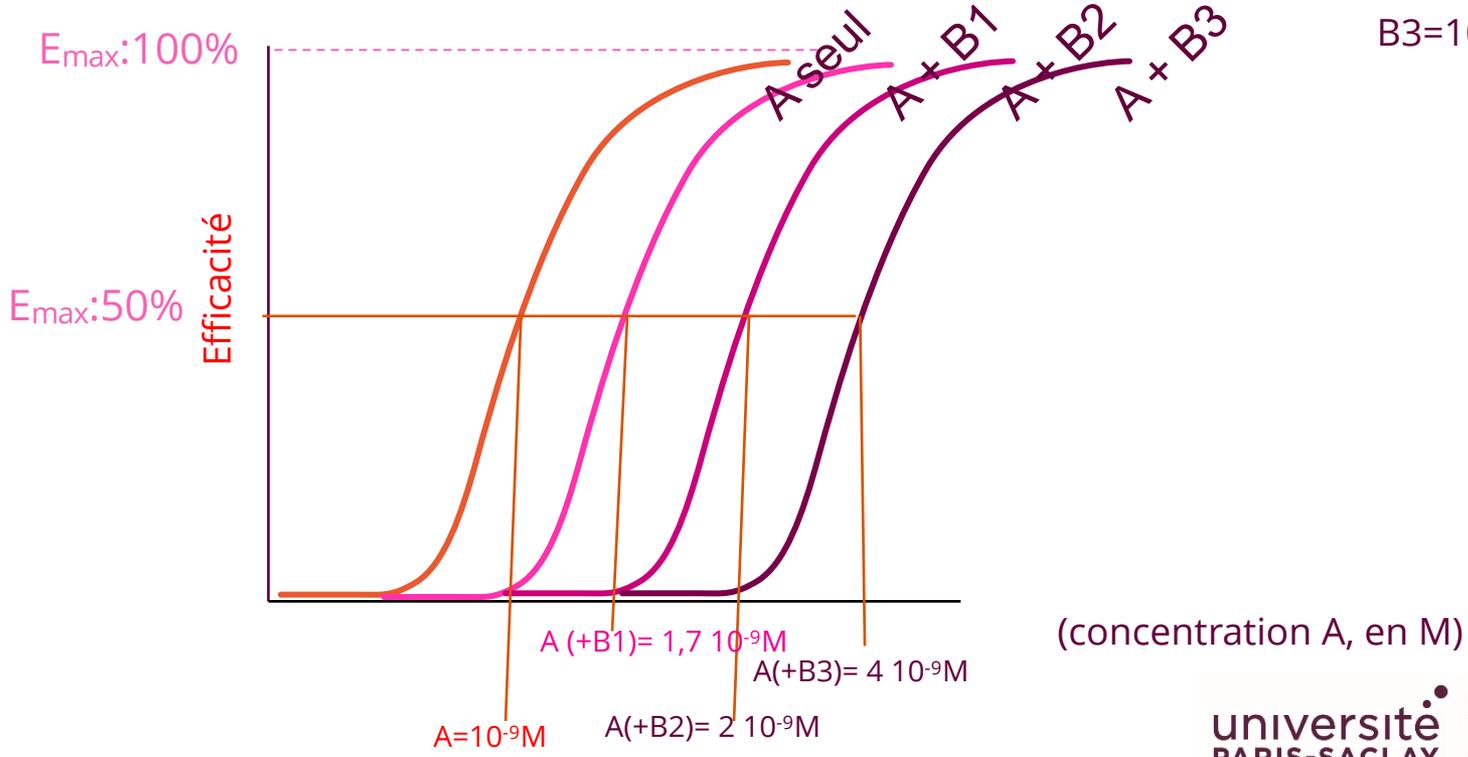
pA2 = le log. changé de signe de la concentration molaire d'un **antagoniste B**, en présence de laquelle, la concentration d'*agoniste A* requise pour engendrer le même effet qu'en l'absence d'antagoniste, est multipliée par "2".



pA2

pA2 = le log. changé de signe de la concentration molaire d'un **antagoniste B**, en présence de laquelle, la concentration d'agoniste A requise pour engendrer le même effet qu'en l'absence d'antagoniste, est multipliée par "2".

B1=10⁻⁹M
B2=10⁻⁸M
B3=10⁻⁷M



Approches fonctionnelles : Etude des antagonistes

Calcul du rapport des concentrations équi-actives (ou rapport des doses équi-actives = « dose-ratio ») et représentation graphique de Schild

↔ **rapport de concentrations de l'agoniste** occupant la même fraction de récepteurs et donnant le même effet en absence et en présence d'une concentration d'antagoniste

= A'/A = rapport des concentrations équi-actives

Représentation graphique : représentation de Schild = droite

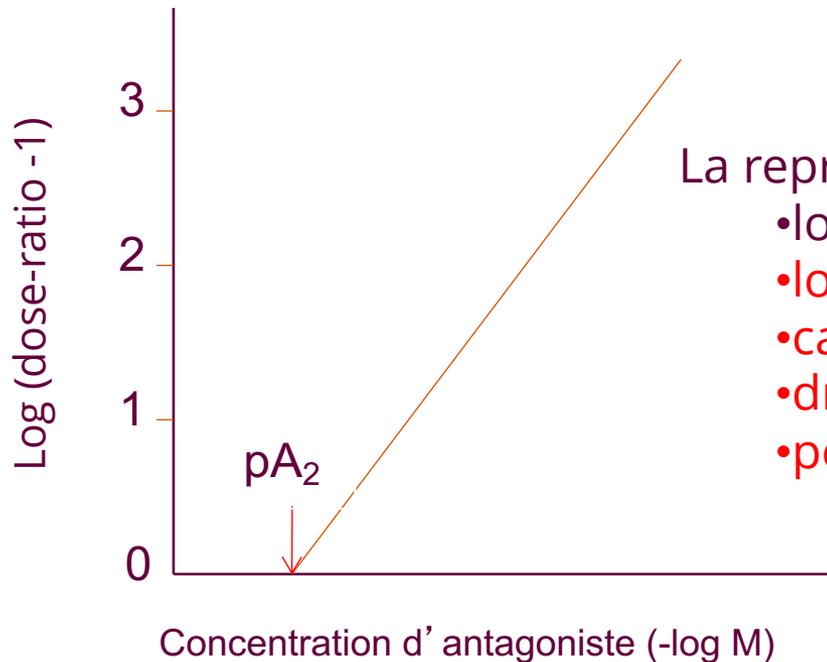
◆ pA_2 = - log de [antagoniste] (molaire) qui oblige à doubler la concentration 'agoniste pour obtenir le même effet qu'en absence d'antagoniste

lorsque $\log ((A'/A) - 1) = 0 \Rightarrow A'/A = 2$

◆ Intersection de la droite de Schild avec axe des abscisses $\Rightarrow pA_2$

◆ Plus le pA_2 est \uparrow , plus l'affinité de l'antagoniste pour le récepteur \uparrow

Définition graphique de la pA2



La représentation graphique :

- $\log(\text{dose-ratio} - 1) = \log([B]) - \log(K_{DB})$
- $\log(\text{dose-ratio} - 1) = f\{\log([B])\}$
- calcul du pA₂
- droite de Schild linéaire
- pente de cette droite non différente de 1

- Construire la droite de Schild: $\log(\text{dose-ratio} - 1) = f\{\log([\text{Antagoniste}])\}$

Déterminer graphiquement la valeur de pA₂ sur la droite de Schild.

Au pA₂, dose-ratio = 2

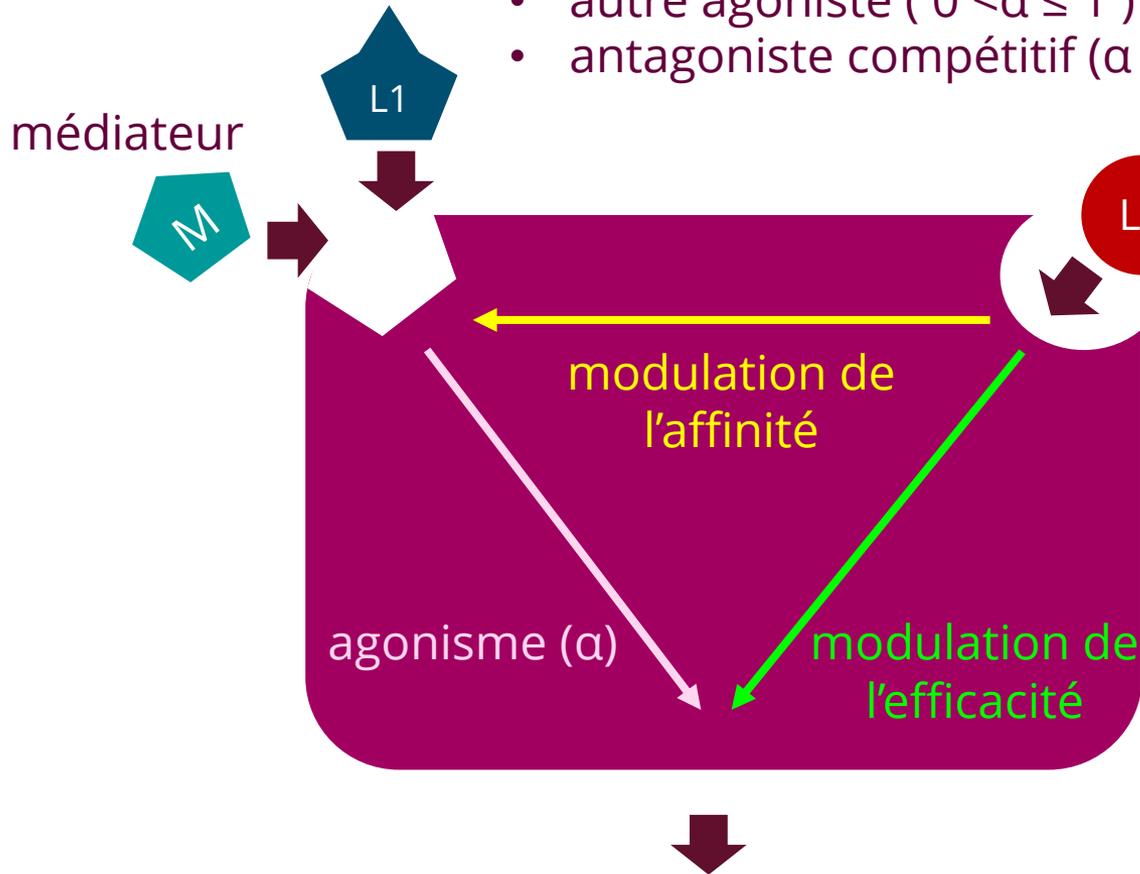
⇒ dose ratio -1 = 1 et $\log(1) = 0$

⇒ pA₂ = $\log[\text{Antagoniste}]$ pour laquelle $\log(\text{dose-ratio} - 1) = 0$

Site de liaison d'un ligand à un récepteur

L1 : Ligand compétitif : site orthostérique

- autre agoniste ($0 < \alpha \leq 1$)
- antagoniste compétitif ($\alpha = 0$)



L2 : Ligand non-compétitif :

- si (+) => modulateur allostérique positif, facilitateur, potentialisateur
- si (-) => modulateur allostérique négatif (antagoniste non compétitif)

REPONSE

Pour caractériser deux antagonistes compétitifs réversibles. Veuillez choisir au moins une réponse :

- a. on compare leurs valeurs de pA_2
- b. on compare leurs CI_{50}
- c. on mesure leurs pD_2
- d. il faut savoir que plus la pA_2 est grande, plus ces antagonistes sont puissants
- e. on a besoin de connaître la pD_2 d'un agoniste de référence

Pour caractériser deux antagonistes compétitifs réversibles. Veuillez choisir au moins une réponse :

- a. on compare leurs valeurs de pA_2**
- b. on compare leurs CI_{50}
- c. on mesure leurs pD_2
- d. il faut savoir que plus la pA_2 est grande, plus ces antagonistes sont puissants**
- e. on a besoin de connaître la pD_2 d'un agoniste de référence

Pour caractériser deux antagonistes compétitifs réversibles. Veuillez choisir au moins une réponse :

- a. aucune des autres proposition n'est correcte
- b. on mesure leurs pD_2
- c. on compare leurs CI_{50}
- d. il faut savoir que plus la pD_2 est grande, plus ces antagonistes sont puissants
- e. on compare leurs valeurs de K_i

Pour caractériser deux antagonistes compétitifs réversibles. Veuillez choisir au moins une réponse :

- a. aucune des autres proposition n'est correcte**
- b. on mesure leurs pD_2
- c. on compare leurs CI_{50}
- d. il faut savoir que plus la pD_2 est grande, plus ces antagonistes sont puissants
- e. on compare leurs valeurs de K_i

Exemple: Les effets de la molécule X ont été évalués en présence de la molécule Y, un antagoniste compétitif réversible, à 3 doses différentes (10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M). Les valeurs de CE_{50} de la molécule X obtenues lors de ces expériences sont reportées dans le tableau ci-dessous.

	CE_{50} (M)	Dose ratio = $X_{(1, 2 \text{ ou } 3)}/X$
Molécule X (Mol X)	$5,2 \cdot 10^{-8}$	
Mol X + Y1 à 10^{-6} M (X1)	$12 \cdot 10^{-8}$	2,3
Mol X + Y2 à 10^{-5} M (X2)	$2,8 \cdot 10^{-7}$	5,4
Mol X + Y2 à 10^{-4} M (X3)	$6,4 \cdot 10^{-7}$	12,3

QUESTION: justifier si la pA_2 Y est supérieure ou inférieure à la valeur 6

Exemple: Les effets de la molécule X ont été évalués en présence de la molécule Y, un antagoniste compétitif réversible, à 3 doses différentes (10^{-6} , 10^{-5} et 10^{-4} M). Les valeurs de CE_{50} de la molécule X obtenues lors de ces expériences sont reportées dans le tableau ci-dessous.

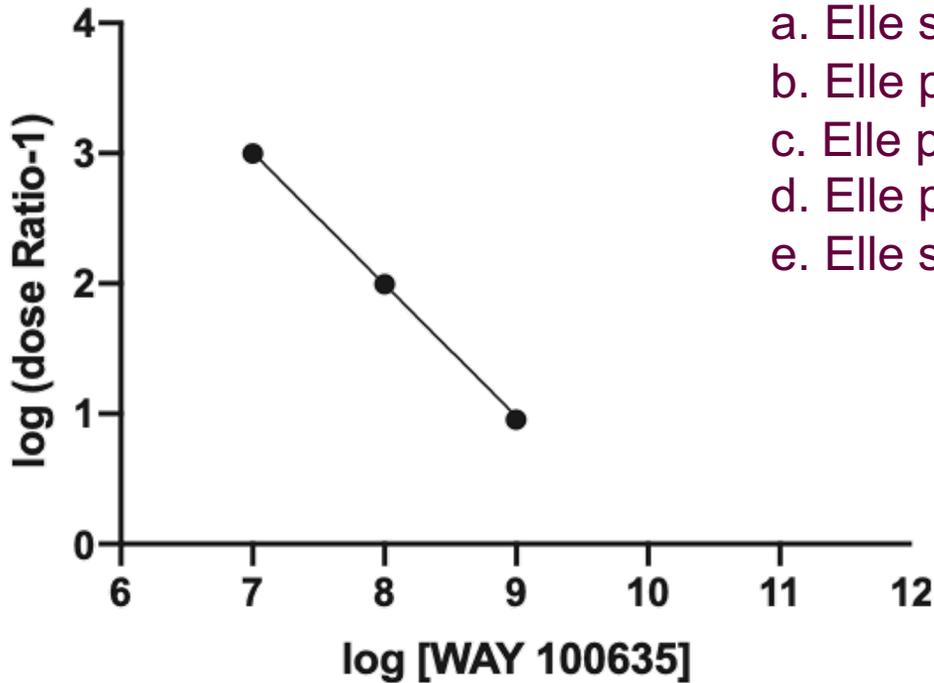
	CE_{50} (M)	Dose ratio = $X_{(1, 2 \text{ ou } 3)}/X$
Molécule X (Mol X)	$5,2 \cdot 10^{-8}$	
Mol X + Y1 à 10^{-6} M (X1)	$12 \cdot 10^{-8}$	2,3
Mol X + Y2 à 10^{-5} M (X2)	$2,8 \cdot 10^{-7}$	5,4
Mol X + Y2 à 10^{-4} M (X3)	$6,4 \cdot 10^{-7}$	12,3

pA_2 Y est supérieure à la valeur 6

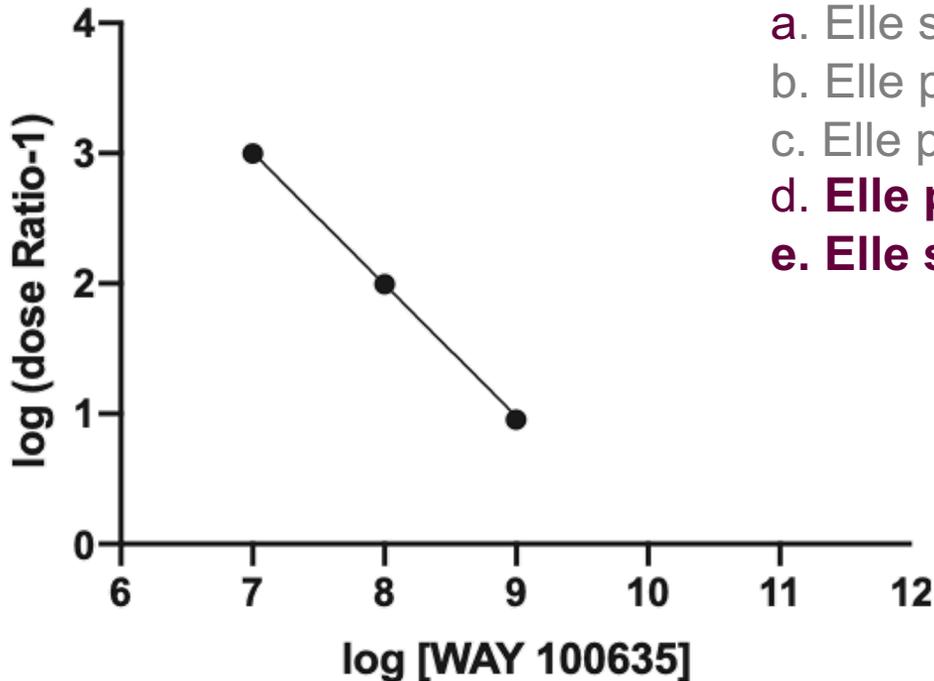
Dans cette représentation, le paramètre d'intérêt :

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. Elle se nomme la représentation de Hill.
- b. Elle permet de calculer le K_i .
- c. Elle permet de calculer la pD_2 .
- d. Elle permet de calculer la pA_2 .
- e. Elle se nomme la représentation de Schild.



Dans cette représentation, le paramètre d'intérêt :



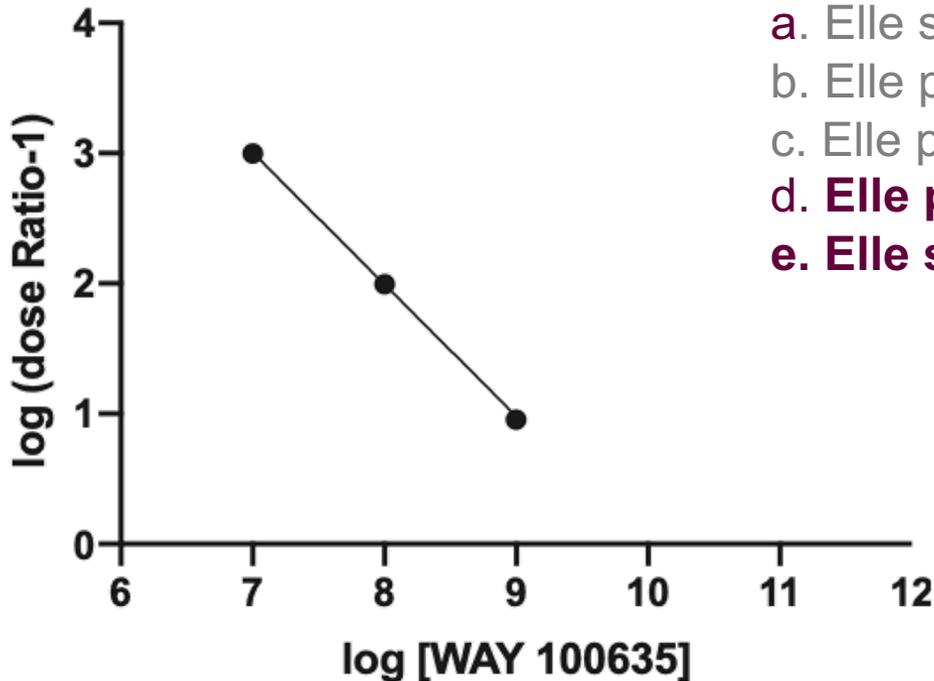
Veillez choisir au moins une réponse :

- a. Elle se nomme la représentation de Hill.
- b. Elle permet de calculer le K_i .
- c. Elle permet de calculer la pD_2 .
- d. **Elle permet de calculer la pA_2 .**
- e. **Elle se nomme la représentation de Schild.**

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. =10
- b. est déterminé par la pente
- c. =1
- d. =4
- e. est déterminé par l'ordonnée à l'origine

Dans cette représentation, le paramètre d'intérêt :



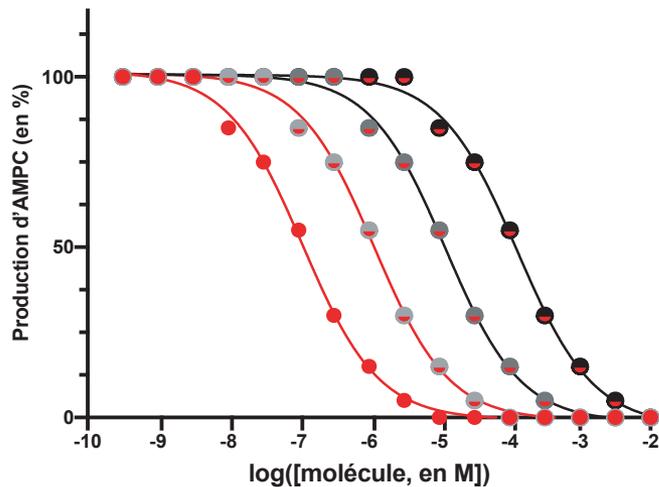
Veillez choisir au moins une réponse :

- a. Elle se nomme la représentation de Hill.
- b. Elle permet de calculer le K_i .
- c. Elle permet de calculer la pD_2 .
- d. Elle permet de calculer la pA_2 .**
- e. Elle se nomme la représentation de Schild.**

Veillez choisir au moins une réponse :

- a. =10**
- b. est déterminé par la pente
- c. =1
- d. =4
- e. est déterminé par l'ordonnée à l'origine**

Dans une nouvelle série d'expérience, les effets de concentrations croissantes de l'UMRS1178 sur la production d'AMPC sont mises en présence avec 3 concentrations fixes de WAY-100635



- UMRS1178
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁹M)
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁸M)
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁷M)

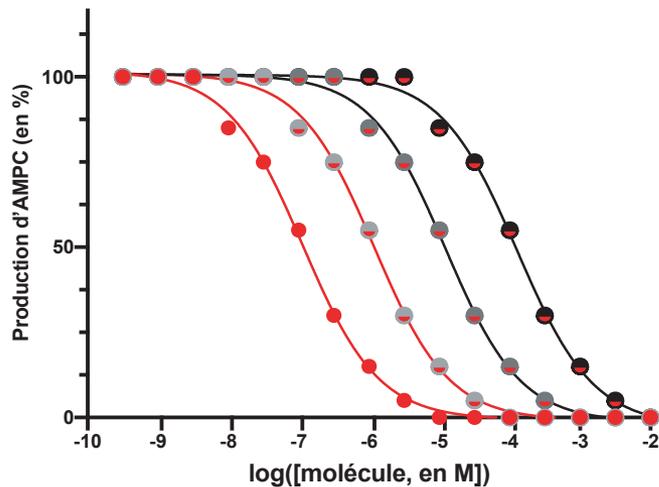
Question 1 : Cette figure permet de conclure :

- a) l'UMRS1178 est un antagoniste compétitif réversible et le WAY100635 un agoniste.
- b) l'UMRS1178 est agoniste et le WAY100635 un antagoniste compétitif réversible.
- c) l'UMRS1178 est agoniste entier et le WAY100635 un antagoniste.
- d) l'UMRS1178 est agoniste entier et le WAY100635 un antagoniste compétitif.
- e) l'UMRS1178 est agoniste et le WAY100635 un antagoniste réversible.

Question 2 : Connaissant la nature du WAY100635, :

- a) sa puissance pourra être déterminée.
- b) Sa pD2 pourra être déterminée.
- c) Sa pA2 pourra être déterminée.
- d) Son Ki pourra être déterminée.
- e) Son efficacité pourra être déterminée.

Dans une nouvelle série d'expérience, les effets de concentrations croissantes de l'UMRS1178 sur la production d'AMPC sont mises en présence avec 3 concentrations fixes de WAY-100635



- UMRS1178
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁹M)
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁸M)
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁷M)

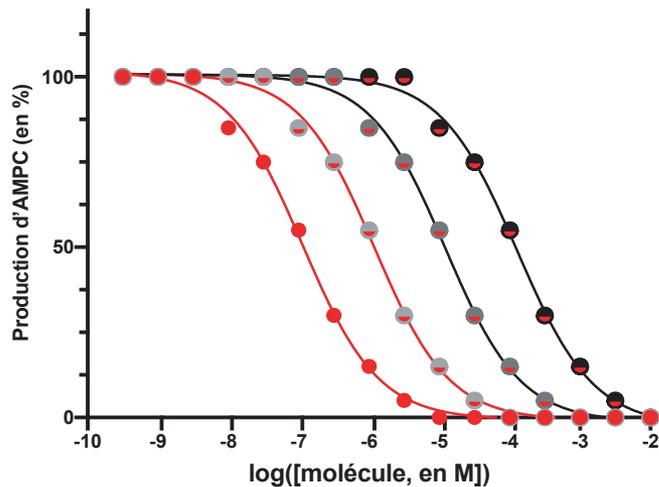
Question 1 : Cette figure permet de conclure :

- a) l'UMRS1178 est un antagoniste compétitif réversible et le WAY100635 un agoniste.
- b) l'UMRS1178 est agoniste et le WAY100635 un antagoniste compétitif réversible.**
- c) l'UMRS1178 est agoniste entier et le WAY100635 un antagoniste.**
- d) l'UMRS1178 est agoniste entier et le WAY100635 un antagoniste compétitif.**
- e) l'UMRS1178 est agoniste et le WAY100635 un antagoniste réversible.**

Question 2 : Connaissant la nature du WAY100635, :

- a) sa puissance pourra être déterminée.
- b) Sa pD₂ pourra être déterminée.
- c) Sa pA₂ pourra être déterminée.
- d) Son K_i pourra être déterminée.
- e) Son efficacité pourra être déterminée.

Dans une nouvelle série d'expérience, les effets de concentrations croissantes de l'UMRS1178 sur la production d'AMPC sont mises en présence avec 3 concentrations fixes de WAY-100635



- UMRS1178
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁹M)
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁸M)
- UMRS1178 + WAY 100635 (10⁻⁷M)

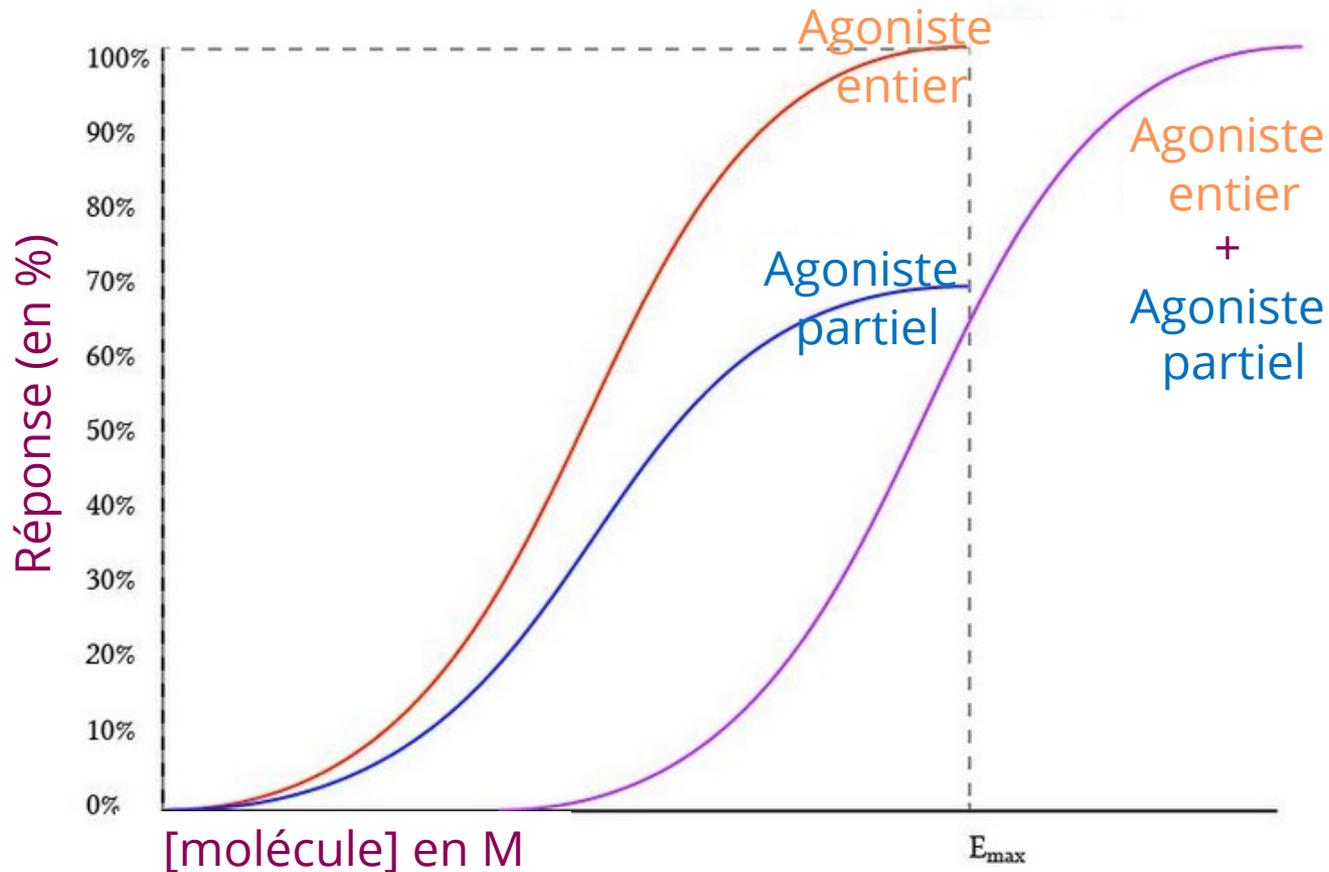
Question 1 : Cette figure permet de conclure :

- a) l'UMRS1178 est un antagoniste compétitif réversible et le WAY100635 un agoniste.
- b) l'UMRS1178 est agoniste et le WAY100635 un antagoniste compétitif réversible.
- c) l'UMRS1178 est agoniste entier et le WAY100635 un antagoniste.
- d) l'UMRS1178 est agoniste entier et le WAY100635 un antagoniste compétitif.
- e) l'UMRS1178 est agoniste et le WAY100635 un antagoniste réversible.

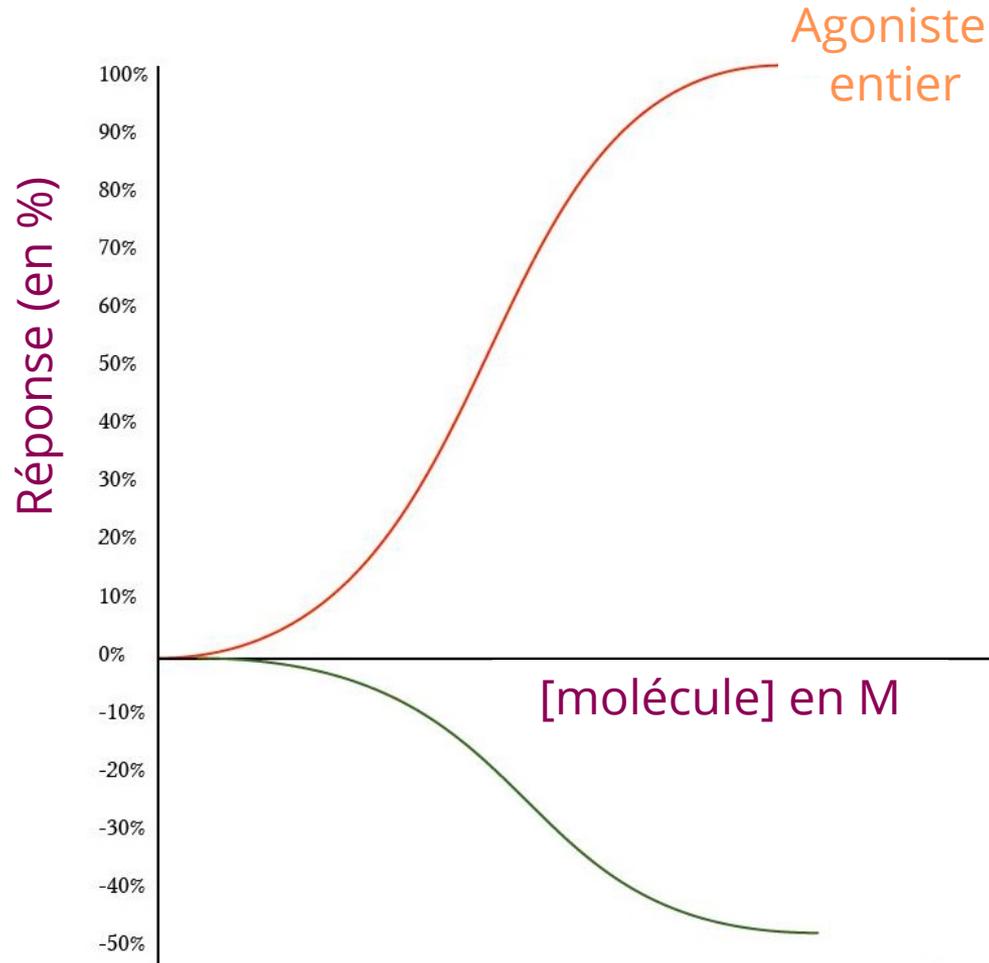
Question 2 : Connaissant la nature du WAY100635, :

- a) sa puissance pourra être déterminée.
- b) Sa pD2 pourra être déterminée.
- c) Sa pA2 pourra être déterminée.
- d) Son Ki pourra être déterminée.
- e) Son efficacité pourra être déterminée.

Autres notions: agoniste entier en présence d'un agoniste partiel



Autres notions: agoniste inverse



Conclusions

	Paramètres	Particularités
Etudes fonctionnelles	alpha	Compris entre 0 et 1
	CE50/DE50/pD2	CE ₅₀ / DE ₅₀ : unité
	pA2 (antagoniste compétitif réversible)	
Etudes de liaison à haute affinité	Cl ₅₀	Pas comparable
	Ki	
	Kd / Bmax	

Pharmacologie moléculaire

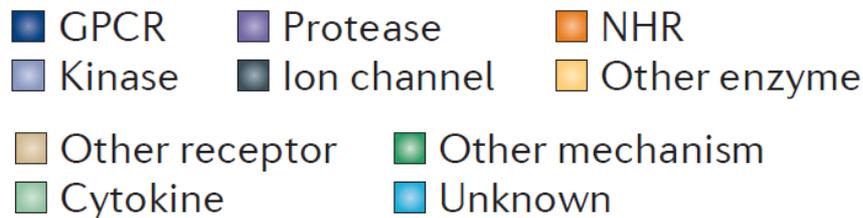
Rappels et exercices

1. Introduction
2. Liaison ligand/récepteur
3. Etude Fonctionnelle
- 4. Cascade de
Transduction/signalisation cellulaire**
5. Conclusions

Cibles moléculaires de médicaments

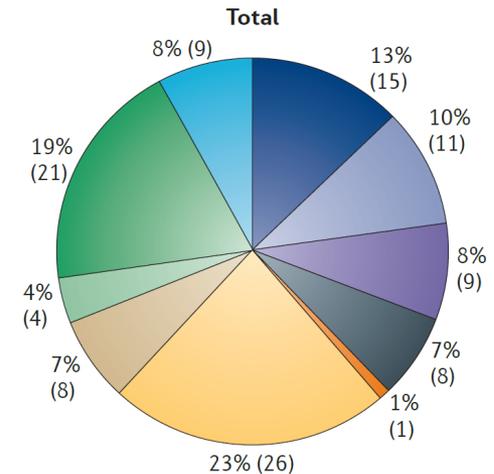
- Cible de médicament = entité moléculaire (protéine, acide nucléique) avec laquelle un médicament
 - interagit (*Corpora non agunt nisi fixata*, P. Ehrlich)
 - et voit son activité modifiée par celui-ci
 - => l'activité cellulaire est modifiée
 - => la fonction au sein de l'organisme est modifiée

- Nature des cibles de médicaments : (AMM FDA 1999-2013),



GPCR : G protein -coupled receptor (RCPG)

NHR : nuclear hormone receptor



Récepteurs : cibles moléculaires de médicaments (I)

- Macromolécules localisées à la surface ou dans la cellule, avec lesquelles les médicaments, les neurotransmetteurs ou les hormones interagissent pour moduler le fonctionnement de la cellule.

Type de récepteur	RCPG	Récepteur canal ionique
Localisation	membranaire	membranaire
Structure	7 DTM ; boucles intra-cellulaires : site de régulation et d'interaction avec d'autres protéines.	assemblage monomérique ou multimérique de domaines (ex : 'boucle pore'); nombre de domaines TM variable suivant les familles (souvent 6)
Type de médiateur	hormones (amines biogènes), neurotransmetteurs, peptides...	Neurotransmetteurs rapides (glutamate, acétylcholine, GABA, 5-HT...); ions intracellulaires (Ca^{2+}), nucléotides (ADP; ATP)...
Couplage	protéine G hétérotrimérique; kinases, canaux ioniques, phospholipase A2, PI3 Kinase...	Variation du potentiel de membrane => excitabilité membranaire, $[Ca^{2+}]_i$...

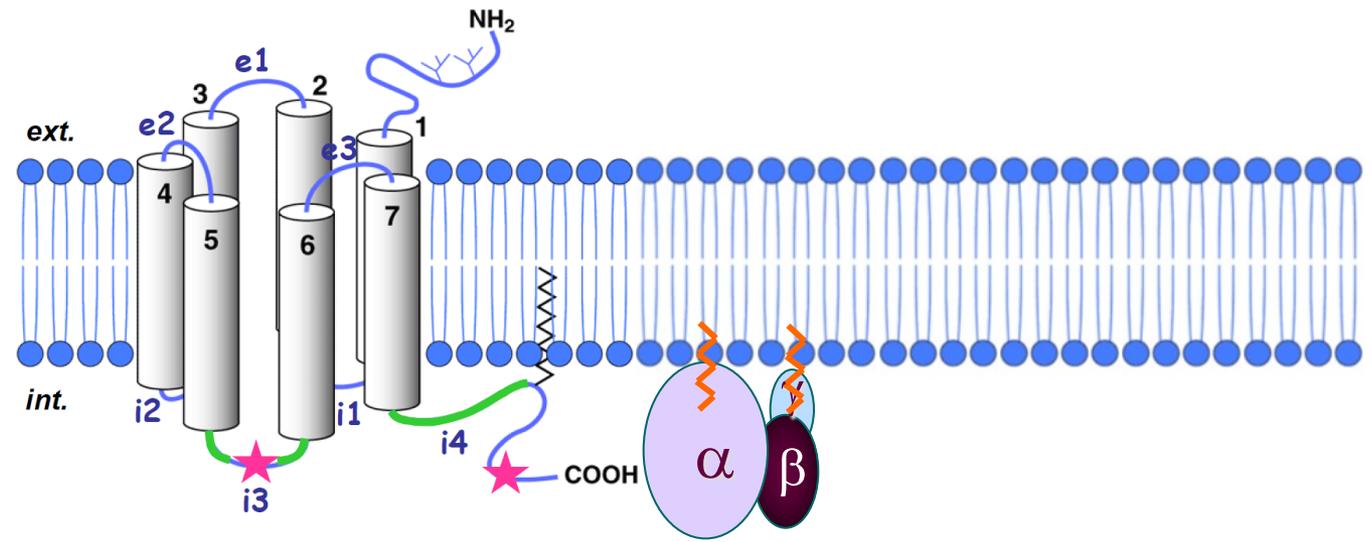
Récepteurs : cibles moléculaires de médicaments (II)

- Macromolécules localisées à la surface ou dans la cellule, avec lesquelles les médicaments, les neurotransmetteurs ou les hormones interagissent pour moduler le fonctionnement de la cellule.

Type de récepteur	Récepteur nucléaire	Récepteur à activité enzymatique
Localisation	cytosolique, nucléaire	membranaire
Structure	homo/hétéro dimères, domaine à « doigt de Zn ²⁺ »	1 DTM, domaines extracellulaire (liaison médiateur) ; TK : dom. Intrac. contenant un site tyrosine-kinase et des substrats tyrosine.
Type de médiateur	hormones stéroïdiennes, lipides, hormones thyroïdiennes, vitamine A...	R. tyr. Kinase :facteurs de croissance (FC) : insuline; cytokines ; R. guanylate cyclase (GC) : peptides
Couplage	modification de la transcription de gènes par liaison sur leurs promoteurs	FC, GC : dimérisation, activation de petite protéine G => cascade de réaction kinase Cyt : voies Jak/Stat

RCPG - Structure

agoniste



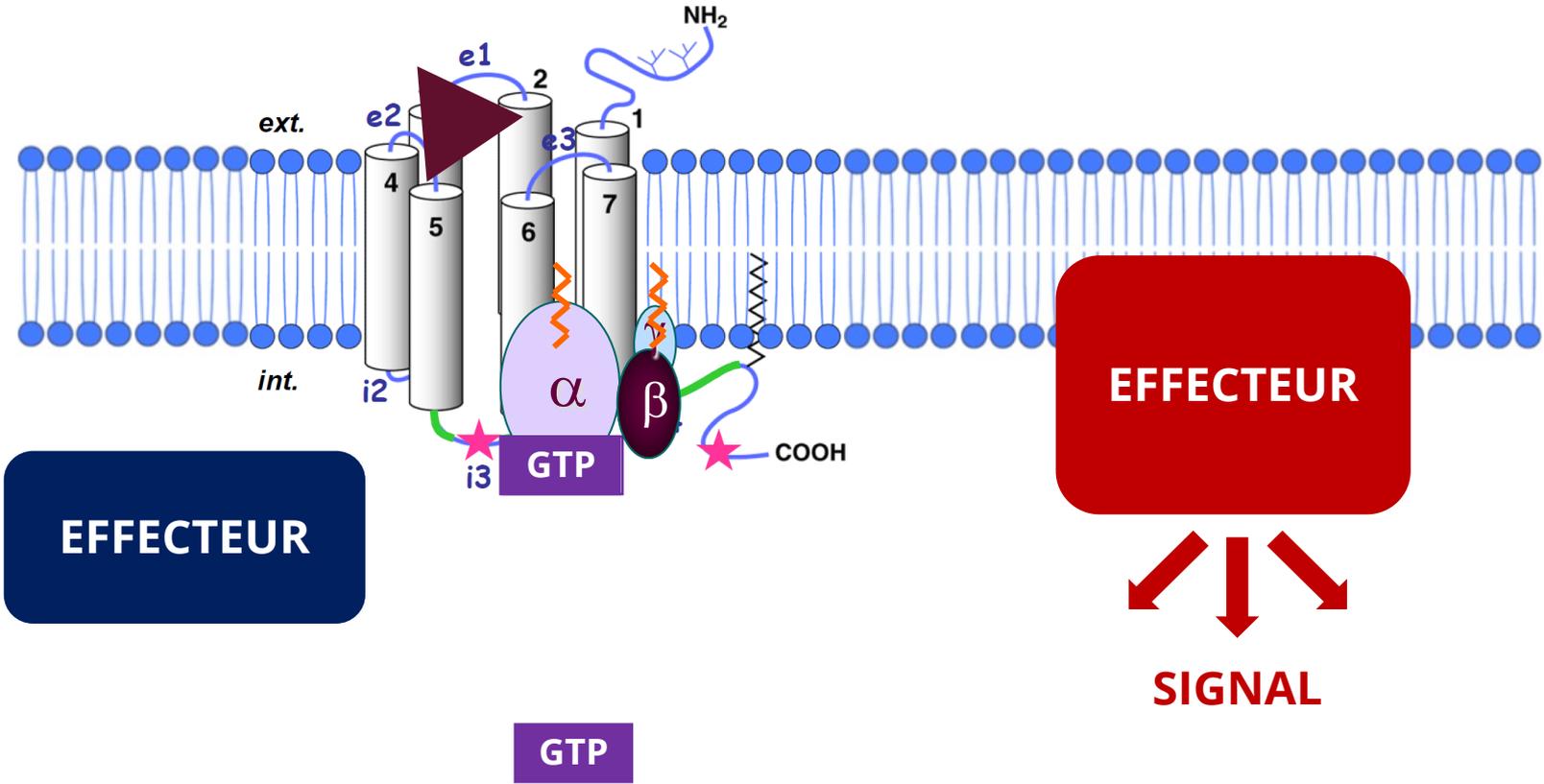
Sites d'interaction avec la protéine G

Sites de phosphorylation

D'après Spiegel, 1996 ; Bockaert, 1995.

RCPG - couplage

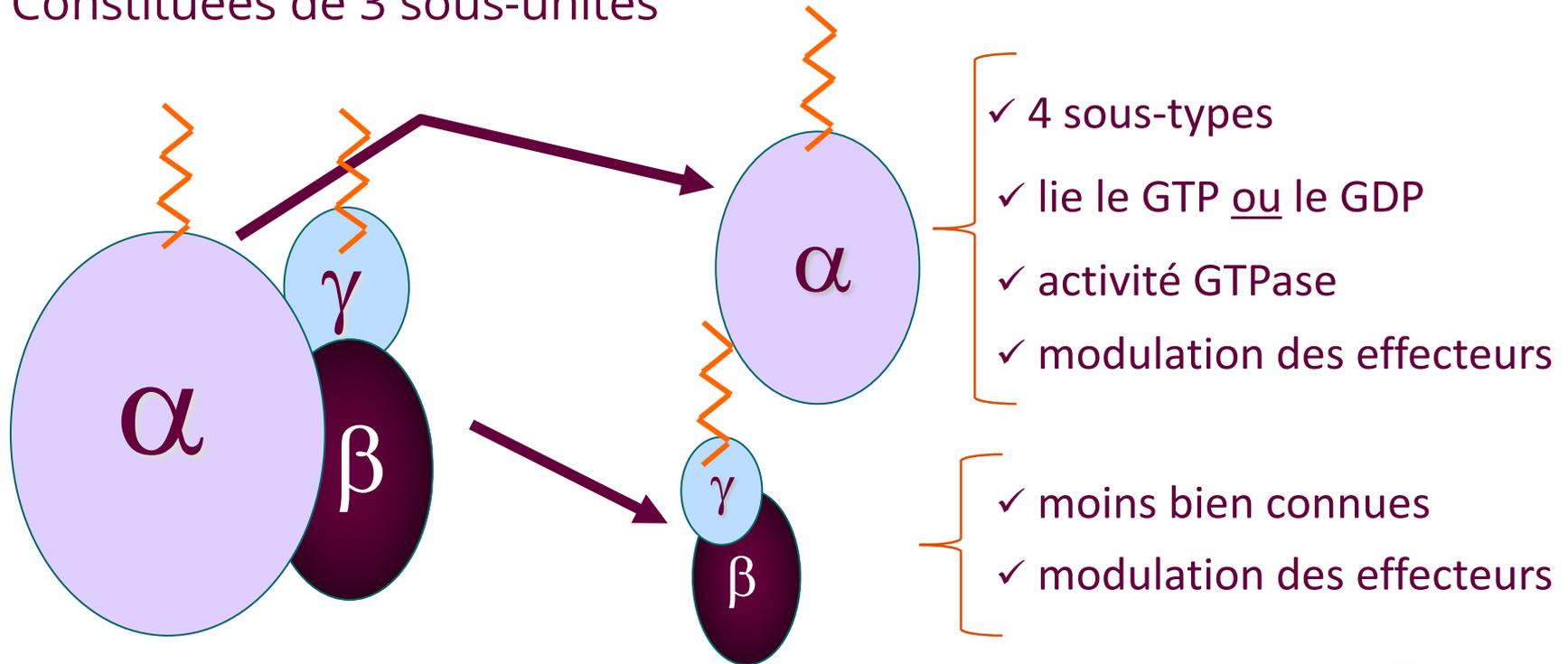
agoniste



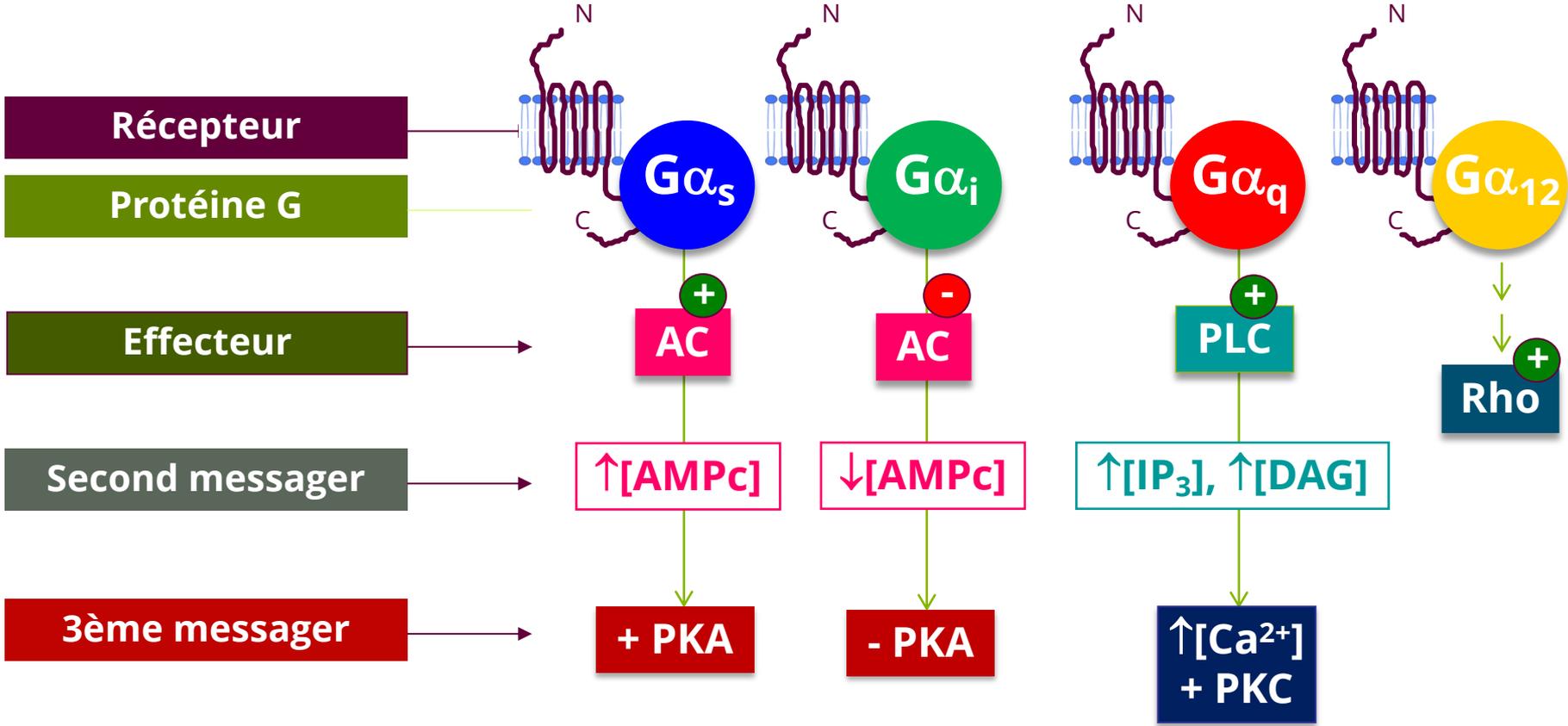
D'après Spiegel, 1996 ; Bockaert, 1995.

Protéines G hétérotrimériques

- protéines cytosoliques hétérotrimériques
- attachées à la membrane plasmique par des groupes acyl (myristoylation, α), isoprenyl (γ) ou peptidiques
- Constituées de 3 sous-unités



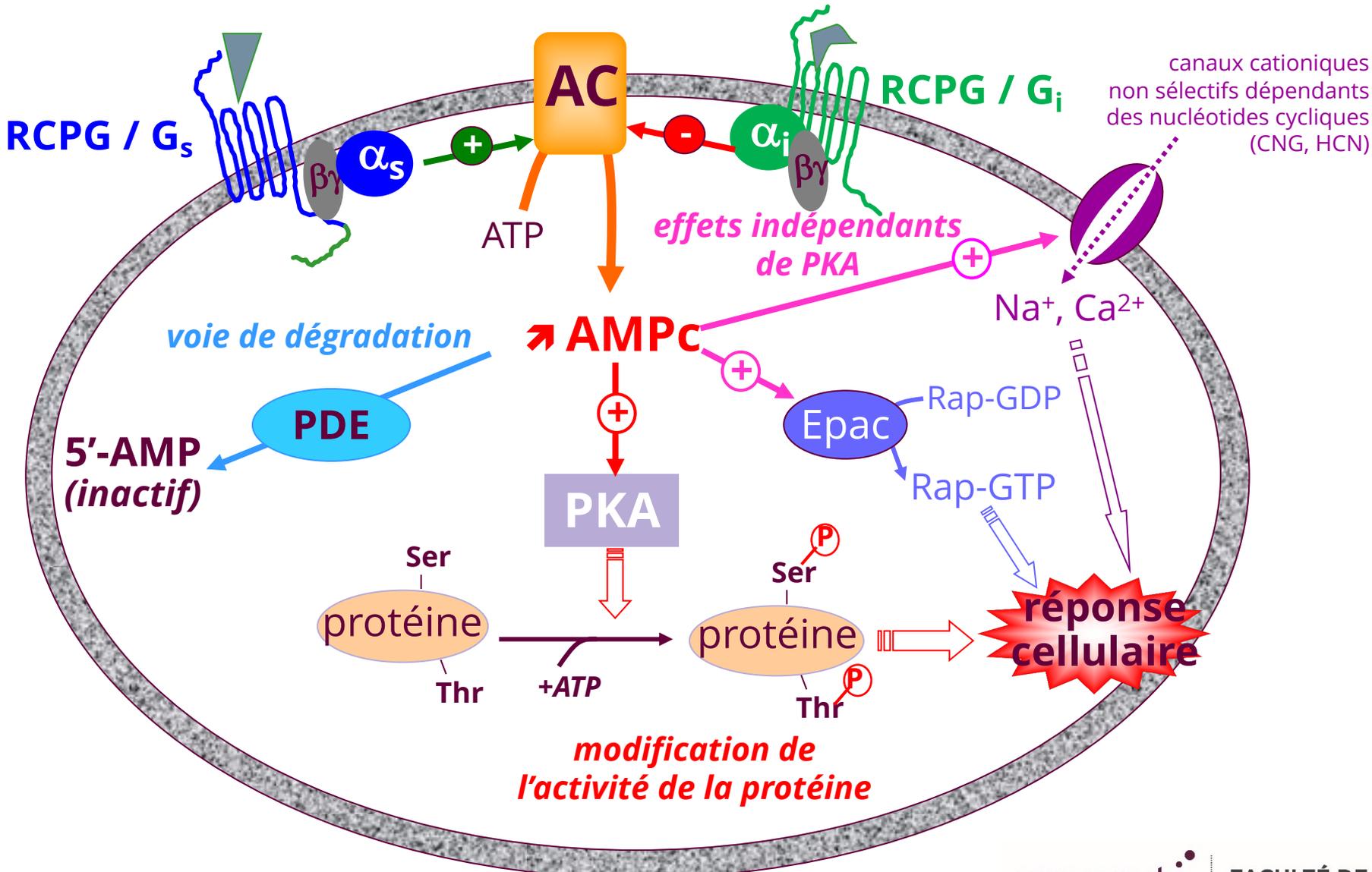
Principales voies de signalisations des protéines G(α)



AC : adénylate cyclase
 AMPC : Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
 PKA : protéine kinase A

PLC : Phospholipase C
 IP₃ : Inositol 1,4,5-triphosphate
 DAG : diacylglycérol
 PKC : protéine kinase C

Voie de l'AMPC

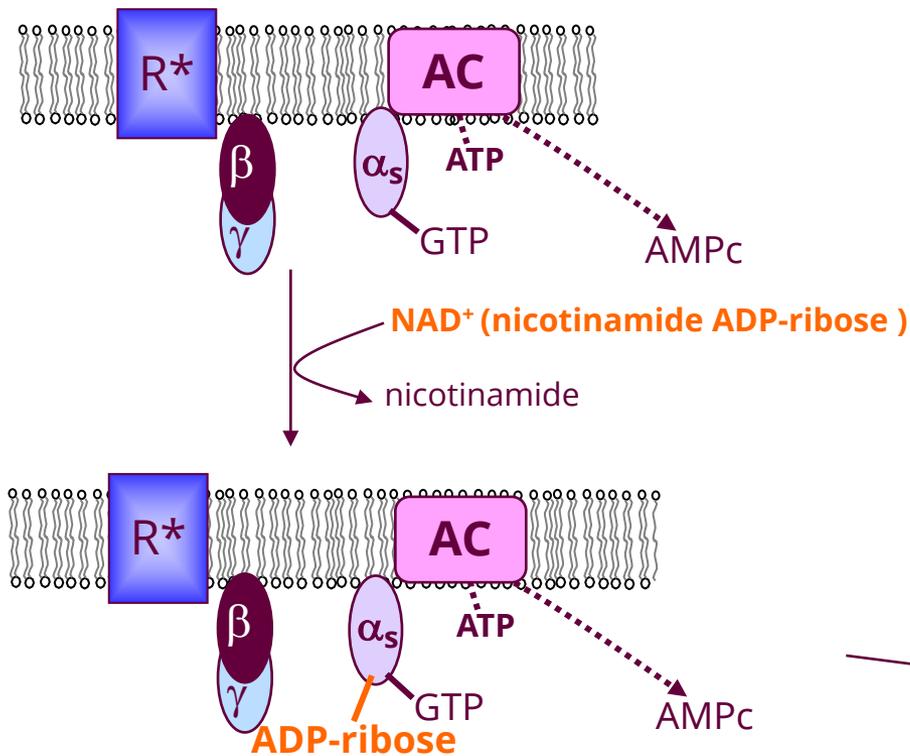


PDE : phosphodiesterase

Toxines bactériennes agissant sur les protéines G

Toxine Cholérique :
"stimulation G_s "

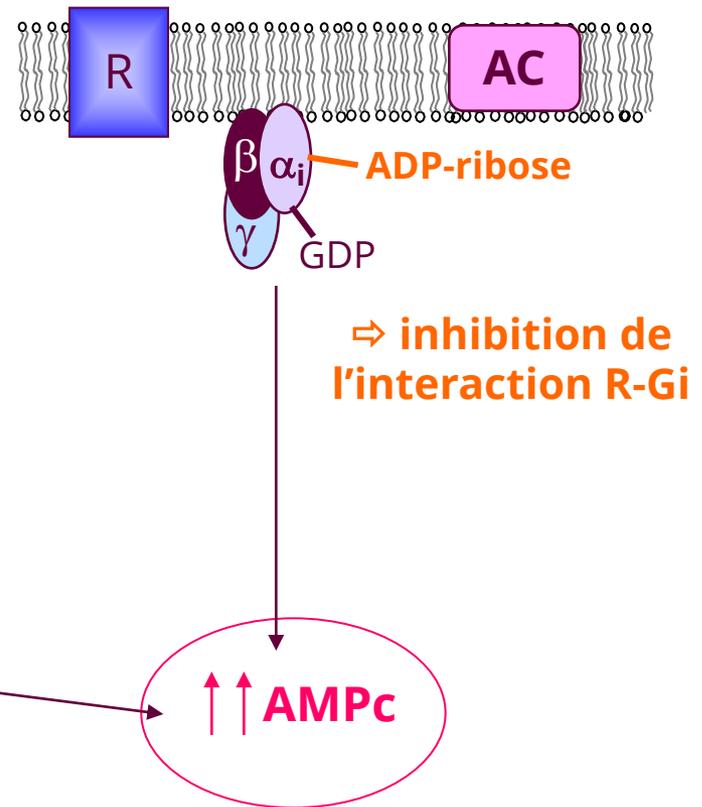
ADP-ribosylation de $G\alpha_s$



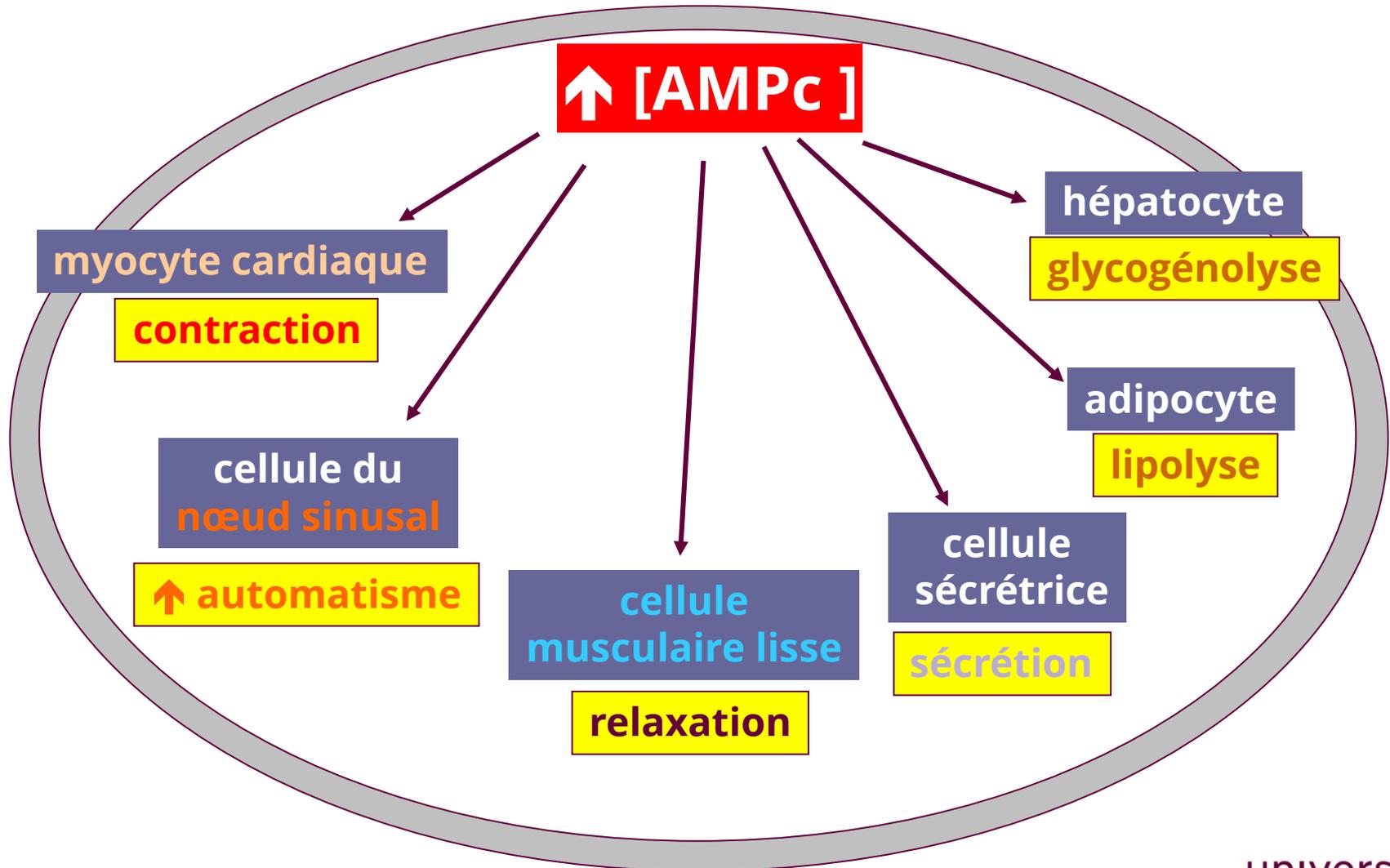
⇒ activation permanente de l'adénylate cyclase

Toxine Pertussique :
"inhibition G_i "

ADP-ribosylation de $G\alpha_i$



Fonctions cellulaires régulées par l'AMPc



Voie de l'AMPc : exemples de cibles de médicaments

RCPGs :

- R. β -adrénergiques : ago. /antago. (BB)
- R. H₂ de l'histamine : antago.
- R. 5HT-4 : agoniste (cisapride)

! : + autres médicaments agissant indirectement sur les voies des médiateurs :
synthèse, dégradation,
recapture....

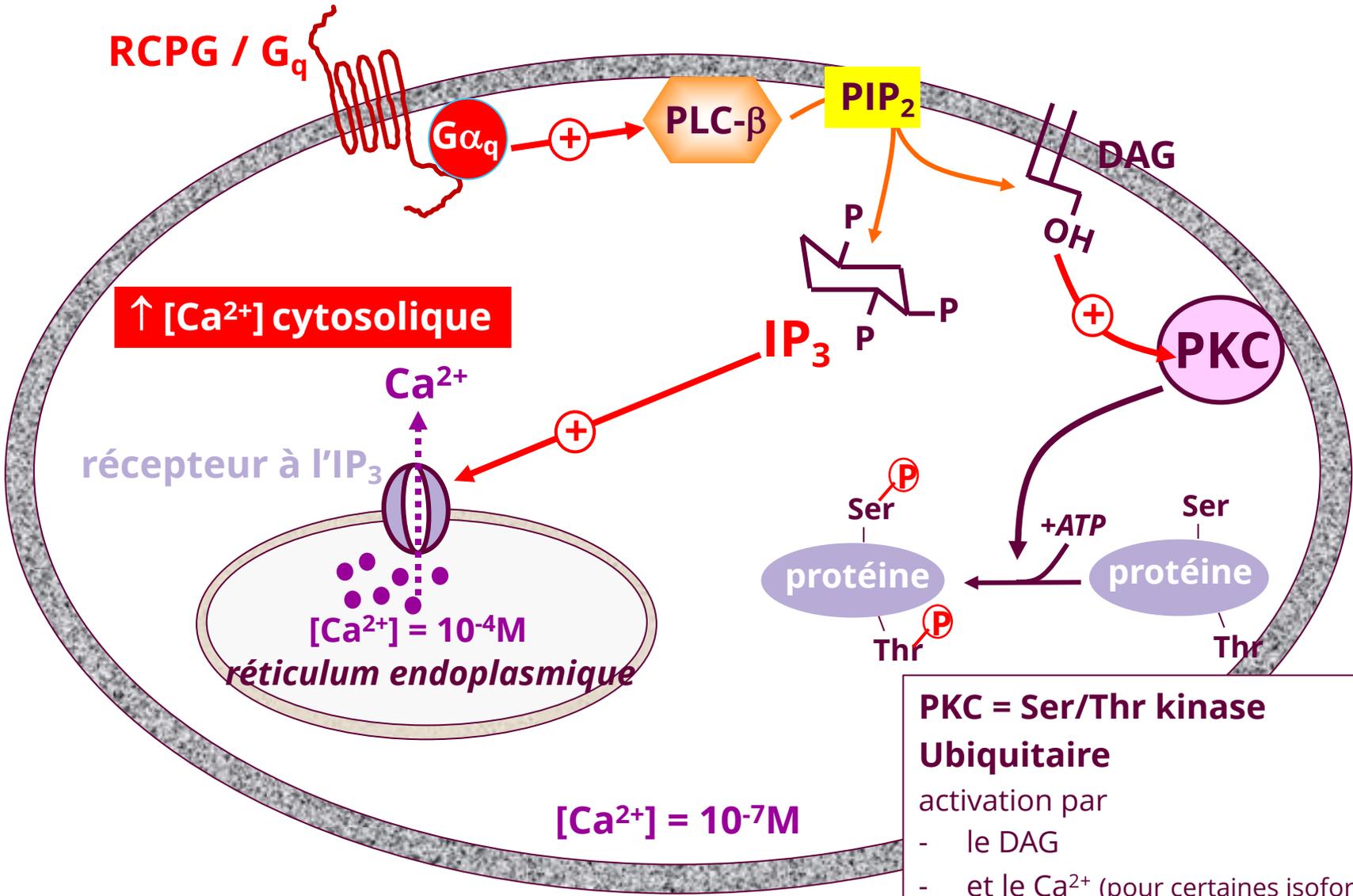
RCPGi :

- R. opioïdes μ ... : agonistes
- R. D₂ de la dopamine (pré- et post- synaptiques) : ago/antago (neuroleptiques)
- R. α -adrénergiques : agoniste (clonidine)
- R. purinergique P₂Y₁₂ : antagoniste (antiagrégant plaquettaire)

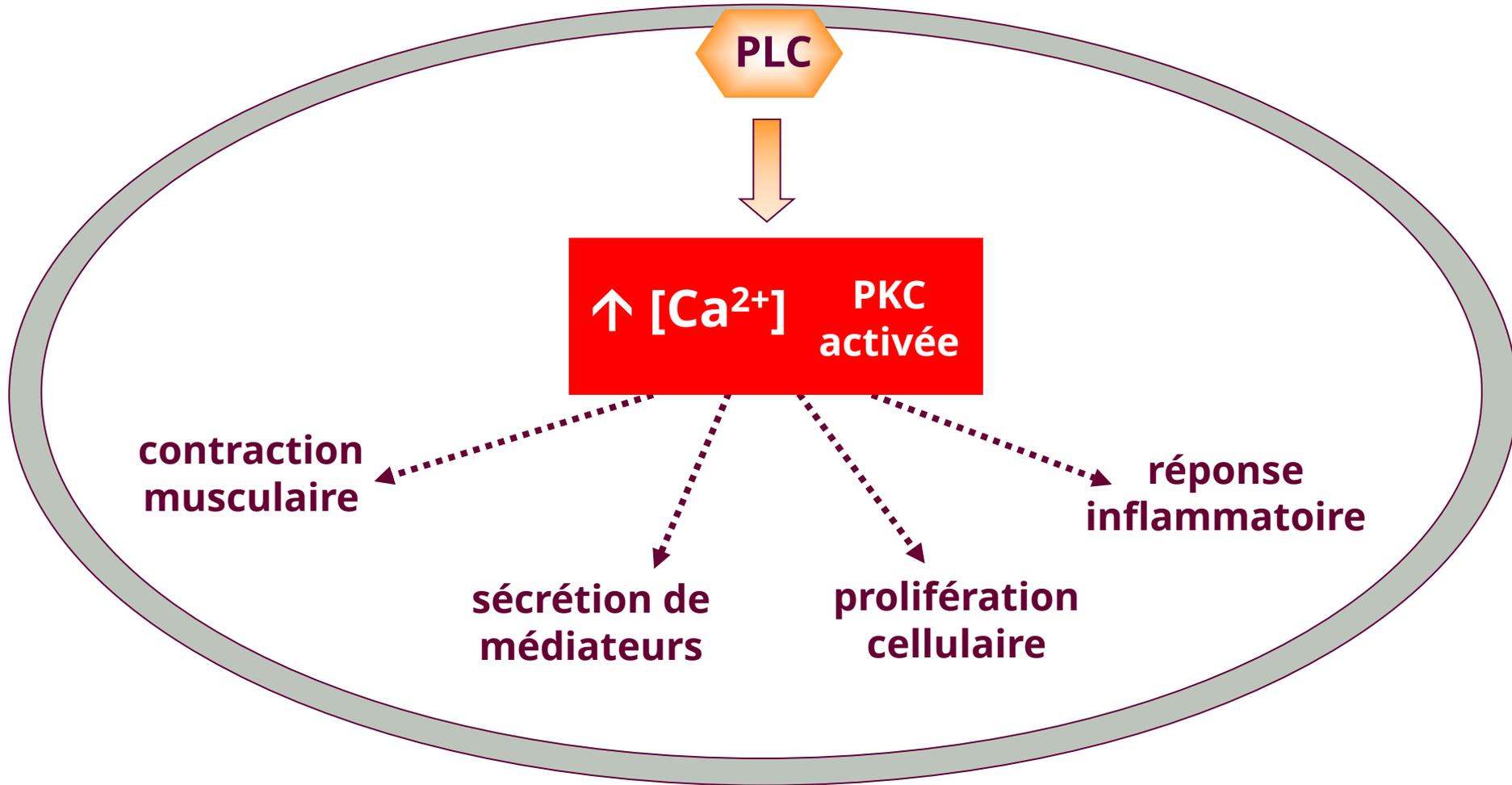
Enzymes : phosphodiésterases :

- aprémilast (inh. PDE4), cilostazol (inh. PDE3)

Seconds messagers de la voie de la PLC-β : voies de l'IP₃ et du DAG



Fonctions cellulaires régulées par la PLC- β



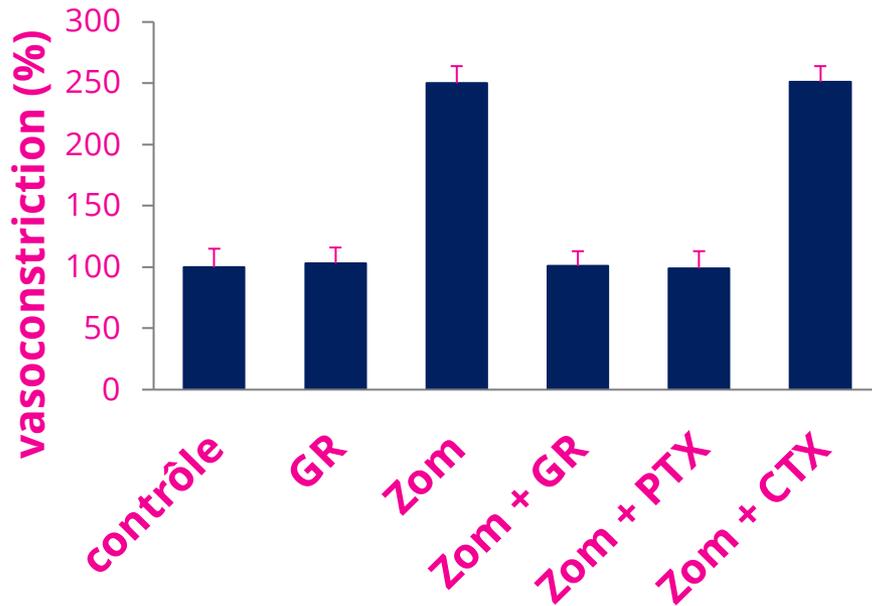
Voie de la PLC- β : exemples de cibles de médicaments

RCPGq :

- R. α 1-adrénergiques : ago / antago.
- R. H1 de l'histamine : antago.
- R. 5HT2 : antago. (neuroleptiques 2^e g^o)
- R. AT1 de l'Ang.II : antago
- R muscariniques types 1 & 3 : ago / antago (asthme, troubles mictionnels)

! : \dagger autres médicaments agissant indirectement sur les voies des médiateurs :
Synthèse, dégradation, recapture....

EXERCICES



La figure ci-contre représente les résultats d'expériences conduites pour comprendre les effets vasoconstricteurs cérébraux du zolmitriptan (**Zom**, 10^{-7} M). L'état de vasoconstriction d'artères est mesuré, en l'absence de tout traitement (contrôle), ou à la suite de l'application de Zom ou d'autres agents pharmacologiques. Le GR 127935 (**GR**, 50 nM) est un antagoniste sélectif des récepteurs la sérotonine de type 1 (5-HT₁).

Les effets du Zom sont aussi étudiés en présence de la toxine pertussique (**PTX**) ou de la toxine cholérique (**CTX**).

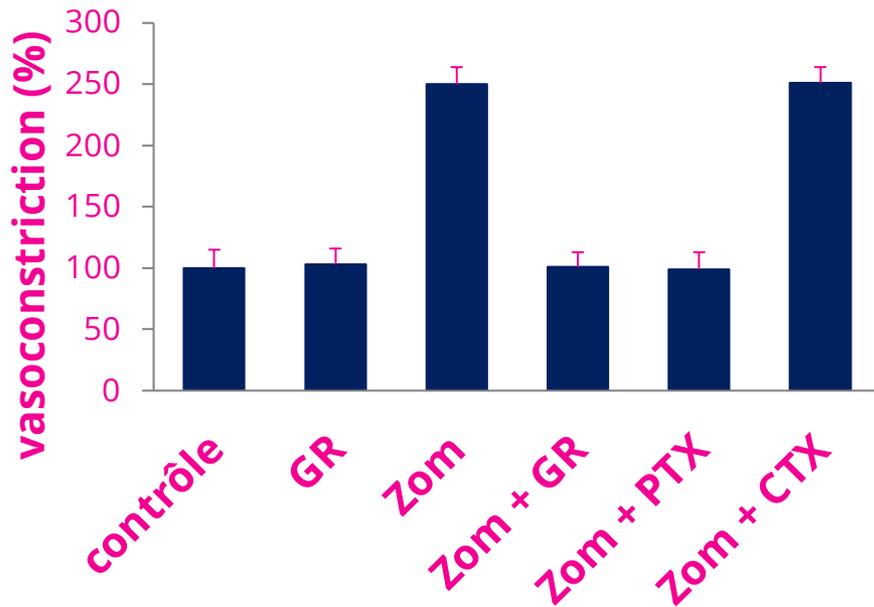
Question 1 : Quelle(s) affirmation est (sont) correcte(s) ?

- la toxine pertussique (PTX) sert à mettre évidence l'implication de la protéine Gq
- la toxine pertussique (PTX) sert à mettre évidence l'implication de la protéine Gi
- la toxine cholérique (CTX) sert à mettre évidence l'implication de la protéine Gs
- le GR est utilisé ici pour mettre évidence l'implication du récepteur 5-HT₁

Question 2 : Dans cette expérience si on administrait de la forskoline alors :

- le taux intracellulaire d'AMPc augmenterait
- le taux intracellulaire d'AMPc diminuerait
- le tonus contractile diminuerait
- le tonus contractile augmenterait

EXERCICES



La figure ci-contre représente les résultats d'expériences conduites pour comprendre les effets vasoconstricteurs cérébraux du zolmitriptan (**Zom**, 10^{-7} M). L'état de vasoconstriction d'artères est mesuré, en l'absence de tout traitement (contrôle), ou à la suite de l'application de Zom ou d'autres agents pharmacologiques. Le GR 127935 (**GR**, 50 nM) est un antagoniste sélectif des récepteurs la sérotonine de type 1 (5-HT₁).

Les effets du Zom sont aussi étudiés en présence de la toxine pertussique (**PTX**) ou de la toxine cholérique (**CTX**).

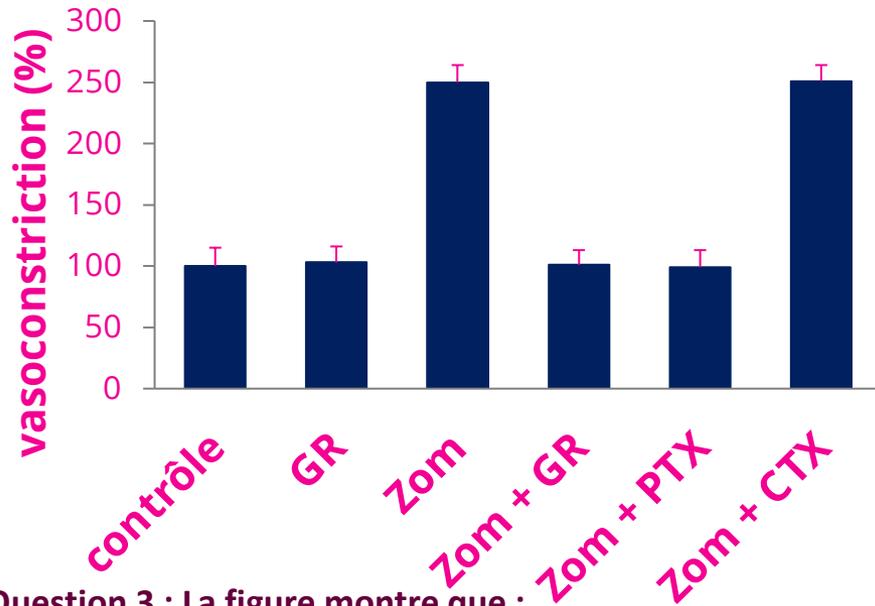
Question 1 : Quelle(s) affirmation est (sont) correcte(s) ?

- la toxine pertussique (PTX) sert à mettre évidence l'implication de la protéine Gq
- la toxine pertussique (PTX) sert à mettre évidence l'implication de la protéine Gi
- la toxine cholérique (CTX) sert à mettre évidence l'implication de la protéine Gs
- le GR est utilisé ici pour mettre évidence l'implication du récepteur 5-HT₁

Question 2 : Dans cette expérience si on administrait de la forskoline alors :

- le taux intracellulaire d'AMPc augmenterait
- le taux intracellulaire d'AMPc diminuerait
- le tonus contractile diminuerait
- le tonus contractile augmenterait

EXERCICES



La figure ci-contre représente les résultats d'expériences conduites pour comprendre les effets vasoconstricteurs cérébraux du zolmitriptan (**Zom**, 10^{-7} M). L'état de vasoconstriction d'artères est mesuré, en l'absence de tout traitement (contrôle), ou à la suite de l'application de Zom ou d'autres agents pharmacologiques. Le GR 127935 (**GR**, 50 nM) est un antagoniste sélectif des récepteurs la sérotonine de type 1 (5-HT₁). Les effets du Zom sont aussi étudiés en présence de la toxine pertussique (**PTX**) ou de la toxine cholérique (**CTX**).

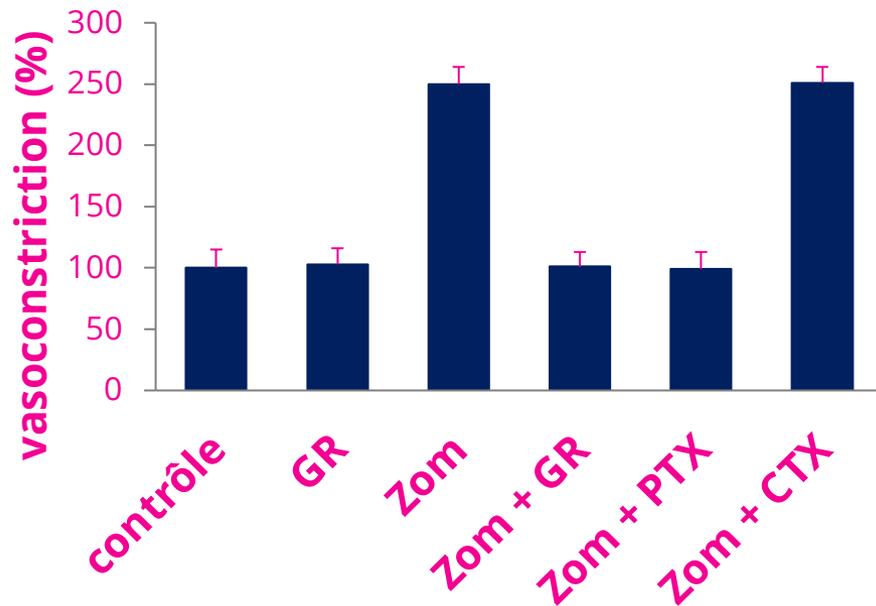
Question 3 : La figure montre que :

- le Zom est sans effet en présence de PTX
- L'effet du Zom est potentialisé en présence de CTX
- Appliqué seul, le GR possède un effet vasodilatateur
- La stimulation du récepteur 5HT₁ provoque une vasoconstriction

Question 4 : On peut déduire de la figure que le Zom est

- un agoniste du récepteur 5HT₁ couplé à une protéine Gi
- un agoniste du récepteur 5HT₁ couplé à une protéine Gs
- un antagoniste du récepteur 5HT₁ couplé à une protéine Gi
- est tout au plus un ligand du récepteur 5HT₁, mais sa nature fonctionnelle reste indéterminée

EXERCICES



La figure ci-contre représente les résultats d'expériences conduites pour comprendre les effets vasoconstricteurs cérébraux du zolmitriptan (**Zom**, 10^{-7} M). L'état de vasoconstriction d'artères est mesuré, en l'absence de tout traitement (contrôle), ou à la suite de l'application de Zom ou d'autres agents pharmacologiques. Le GR 127935 (**GR**, 50 nM) est un antagoniste sélectif des récepteurs la sérotonine de type 1 (5-HT₁).

Les effets du Zom sont aussi étudiés en présence de la toxine pertussique (**PTX**) ou de la toxine cholérique (**CTX**).

Question 3 : La figure montre que :

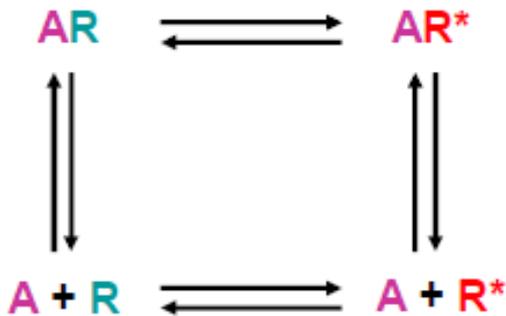
- le Zom est sans effet en présence de PTX
- L'effet du Zom est potentialisé en présence de CTX
- appliqué seul, le GR possède un effet vasodilatateur
- la stimulation du récepteur 5HT₁ provoque une vasoconstriction

Question 4 : On peut déduire de la figure que le Zom est

- un agoniste du récepteur 5HT₁ couplé à une protéine Gi
- un agoniste du récepteur 5HT₁ couplé à une protéine Gs
- un antagoniste du récepteur 5HT₁ couplé à une protéine Gi
- est tout au plus un ligand du récepteur 5HT₁, mais sa nature fonctionnelle reste indéterminée

Modèles d'interaction allostérique des RCPG

Interaction selon la loi
d'action de masse



Modèle à 2 états conformationnels



Modèle ternaire simplifié

Pathologies associées à une mutation de gène codant pour un RCPG

➤ Récepteur constitutivement actif

- en l'absence d'agoniste, conformation **R***
- ex. de pathologies associées à une mutation "activatrice" de RCPG :
 - rétinite pigmentaire, cécité nocturne congénitale et **rhodopsine**
 - hyperthyroïdie et **récepteur de la TSH** (thyroïd stimulating hormone)
 - puberté mâle précoce et **récepteur de la LH** (luteinizing hormone)
- perspective thérapeutique :



➤ Diminution ou perte d'activité du récepteur

- par défaut de localisation membranaire du RCPG ou altération de sa fonction
- ex. de pathologies associées à une mutation "inhibitrice" de RCPG
 - rétinite pigmentaire et **rhodopsine**
 - diabète insipide néphrogénique lié à l'X et **récepteur de l'hormone antidiurétique**

Pharmacologie moléculaire

Rappels et exercices

1. Introduction
2. Liaison ligand/récepteur
3. Etude Fonctionnelle
4. Cascade de Transduction/signalisation cellulaire
- 5. Conclusions**

Conclusions

- Que choisir pour bien comparer 2 ligands ?
- Comparer affinité de divers ligands
 - comparer les $K_d / K_i \Rightarrow$ méthode de liaison spécifique à haute affinité
- Comparer efficacité de divers agonistes
 - CE_{50} / pD_2