

## Préparation au concours de l'Internat II

Épreuve de PHARMACOLOGIE MOLÉCULAIRE : Révision 2020-2021

**DUREE DE L'ÉPREUVE : 30 min (/ 40 points)**

Les figures suivantes présentent les résultats d'expériences mises en œuvre afin de caractériser les propriétés pharmacologiques de l'UPS2020, un médicament indiqué dans l'insuffisance cardiaque.

La figure 1 présente les effets pharmacodynamiques d'une dose submaximale d'isoprénaline (1 µg/kg), un agoniste des récepteurs β-adrénériques, sur la fréquence cardiaque mesurée par électrocardiogramme chez le lapin. Cette injection survient après l'injection d'une dose d'UPS2020 choisie parmi une large gamme de concentrations d'UPS2020 (1 µg/kg – 10 mg/kg). Les effets des différentes concentrations d'UPS2020 sont reportés dans la figure 1. Tous les produits ont été administrés par voie intraveineuse (i.v.).

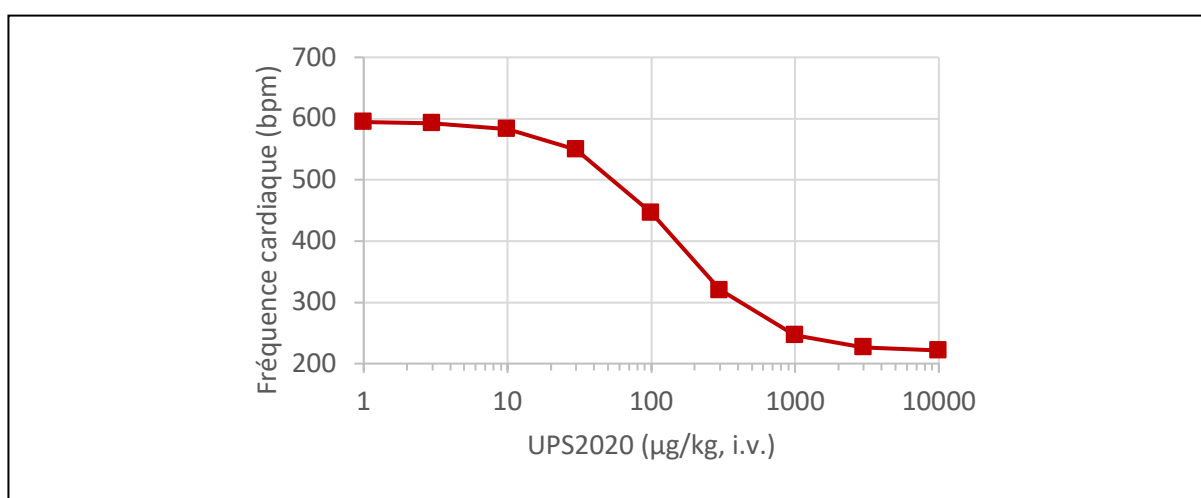


Figure 1 : Effet de l'injection i.v. d'UPS2020 à plusieurs doses sur la fréquence cardiaque de lapin ayant reçu de l'isoprénaline, un agoniste des récepteurs β-adrénériques.

**Question 1 : Décrivez la réponse observée lors de l'administration de l'UPS2020. Proposez une valeur qui traduirait la puissance de cet effet. (7 pt)**

Il s'agit ici d'une expérience fonctionnelle effectuée in vivo. L'étude de l'UPS sur une gamme de concentrations permet de définir une relation effet-dose (1pt).

L'UPS2020 inhibe la FC d'une manière dépendante de la dose administrée (1pt). L'effet maximal obtenu est une bradycardie atteignant 220 bpm, soit une amplitude d'effet de ≈380 bpm (2pt). 50% de l'Emax correspond à une FC de  $(600 - (380/2)) = 410$  bpm. La courbe atteint cette valeur pour une dose comprise entre 100 et 200 µg/kg (≈ 140 µg/kg) (2 pt). On peut définir cette valeur comme une dose efficace à 50% (DE50), ou dose inhibitrice à 50% (DI50), qui traduit la puissance de l'effet (0.5pt).

Cette expérience ne nous permet pas de déterminer la nature du ligand. On peut imaginer que ce soit un agoniste partiel ou un antagoniste du R. de l'isoprénaline, ou le modulateur d'un autre mécanisme de contrôle de la FC. (0.5pt)

Rq : cette figure ne permet pas non plus de savoir l'amplitude de la réponse tachycardisante provoquée par l'isoprénaline.

Des expériences sur cardiomyocytes adultes isolés de rats sont ensuite effectuées pour confirmer le mécanisme d'action de la molécule. La figure 2 présente les mesures d'AMPC intracellulaire suite à divers traitements pharmacologiques pendant 5 minutes.

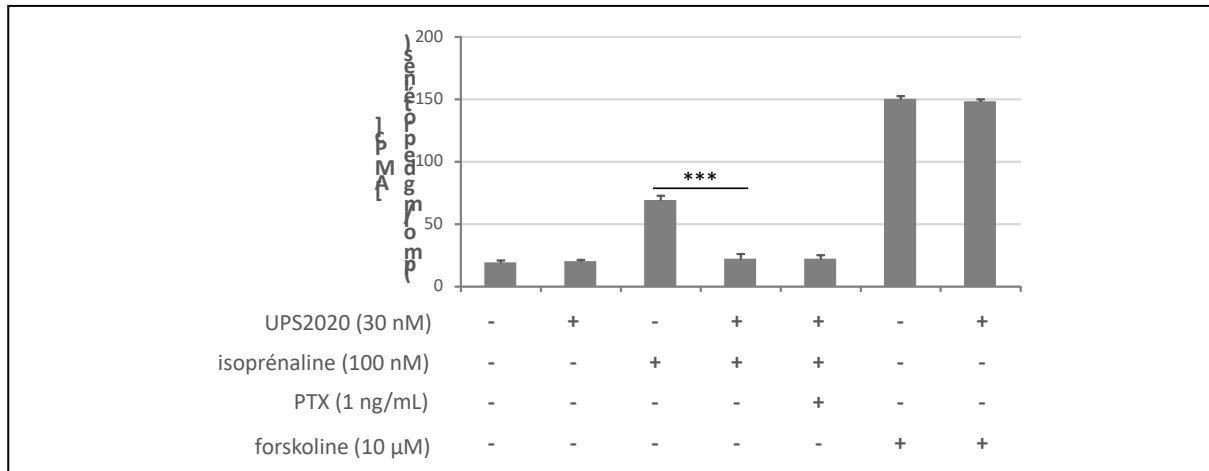


Figure 2 : Mesure de la concentration d'AMPC dans des myocytes ventriculaires de rat en présence (+) ou en l'absence (-) de divers agents pharmacologiques. PTX : toxine pertussique ; \*\*\*:  $P < 0,001$  après comparaison statistique.

**Question 2 : Commentez la figure 2. Quelle est l'intérêt de l'utilisation de la PTX et la forskoline? Concluez sur le mécanisme d'action possible de l'UPS2020. (7 pt)**

Il s'agit d'une expérience fonctionnelle, où l'activité de l'adénylate cyclase est mesurée via la concentration d'AMPC, un second messager impliqué dans la signalisation de certains RCPG (1pt).

L'UPS2020 seul ne produit pas de modification des niveaux d'AMPC. Ce n'est donc probablement pas l'agoniste de récepteurs couplés à cette voie (1pt). Par contre l'isoprénaline stimule la production d'AMPC ; c'est donc l'agoniste (produit un effet) des R.  $\beta$ -adr. (car il est mentionné que c'est un ligand de ces R.) (1pt), qui sont couplés à une protéine  $G\alpha(s)$  (0.5pt).

L'UPS2020 bloque cette stimulation par l'isoprénaline (0.5pt); de plus cet effet inhibiteur n'est pas modifié par la PTX, elle n'implique donc pas de RCPG couplé à  $G\alpha i$  (la PTX bloque sélectivement la transmission  $G\alpha i$ ). Ceci confirme que l'UPS n'est donc pas l'agoniste d'un RCPG couplé à  $G\alpha i$  (1pt).

Enfin l'UPS n'a pas d'effet sur la stimulation provoquée par la forskoline, un stimulateur direct de l'adénylate cyclase (0.5pt). Ceci permet de confirmer que l'UPS n'est pas un inhibiteur de l'adénylate cyclase, ce qui aurait été une hypothèse plausible au vu de la figure 1 (0.5pt). On peut donc évoquer l'hypothèse que l'UPS2020 soit un antagoniste des R.  $\beta$ -adrénergiques responsables de l'augmentation des concentrations d'AMPC (et de la tachycardie) induite par l'isoprénaline (1pt).

Deux autres types d'expériences ont ensuite été conduites :

1) la liaison spécifique du [<sup>125</sup>I]cyanopindolol (50 pM), un ligand non sélectif des récepteurs β-adrénergiques, sur des cellules CHO sur-exprimant les sous-types β1 ou β2 des récepteurs adrénérurgiques a été mesurée en présence de l'UPS2020 ou d'autres médicaments.

2) la capacité de l'UPS2020 et d'autres médicaments à modifier la réponse induite par l'isoprénaline sur la fréquence de battement de l'oreillette droite isolée de cobaye a aussi été évaluée.

Les résultats sont reportés dans la table 1.

Table 1 : Valeurs de Ki (nM) et de pA2 de plusieurs molécules. Les valeurs de Ki ont été déterminées vis-à-vis des récepteurs β1-adrénergiques (R. β1 adr) ou β2-adrénergiques (R. β2 adr). Les valeurs de pA2 ont été déterminées vis-à-vis de l'effet sur la fréquence de battement (FB) de l'oreillette droite de cobaye stimulée par l'isoprénaline.

	Ki (nM)		pA2
	R. β1 adr.	R. β2 adr	oreillette isolée de cobaye stimulée à l'isoprénaline (FB)
UPS2020	1,7	1,1	8,2
bisoprolol	22,4	1150	7,4
propranolol	1,8	0,8	7,7
pindolol	2,8	4,8	6,2

**Question 3 : Quelles sont les informations apportées par les paramètres Ki et pA2 ? Rappelez brièvement comment ils ont été déterminés. Quelles propriétés intéressantes de ces médicaments ces données permettent –elles de mettre en évidence ? (7 pt)**

Le Ki traduit l'affinité d'un ligand pour un site de liaison spécifique (0.5pt). Il est déterminé grâce à la capacité du ligand à rentrer en compétition avec un radioligand (ici le [<sup>125</sup>I]cyanopindolol, [<sup>125</sup>I]CYP), pour la liaison spécifique sur un même site (ou à inhiber sa liaison). Ceci se traduira par un effet inhibiteur de la liaison spécifique du [<sup>125</sup>I]CYP (0.5pt), permettant de définir une concentration inhibitrice à 50% (CI50). Le Ki est déterminé suivant la relation :  $Ki = CI50 / (1 + [radioligand] / Kd(radioligand))$ , en M (équation de Cheng-Prusoff) (0.5pt). Plus le Ki est faible plus l'affinité est grande (0.5pt). : ici toutes les molécules testées ont une excellente affinité pour les deux sous-types, sauf le bisoprolol pour le R. β1-adr. (affinité moyenne) (0.5pt). On a donc par ordre d'affinité :

β1 : UPS ≈ (ou >) propranolol > pindolol > bisoprolol ;

β2 : propranolol ≈ (ou >) UPS > pindolol >> bisoprolol. (0.5pt)

La comparaison des Ki pour les deux sous-types de R. β renseigne sur la sélectivité des ligands : si le ratio est >30 ou 100, alors le ligand est considéré comme sélectif d'un R. (1pt). Ici seul le bisoprolol est clairement sélectif pour le sous-type β1 (ratio >50) ; les autres ligands ne sont pas sélectifs (1pt).

La pA2 renseigne sur la puissance d'un antagonisme compétitif réversible (0.5pt); et est obtenu par l'étude de la réponse concentration-effet à un agoniste (tachycardie) en présence de plusieurs concentrations d'antagoniste surmontable (0.5pt). Possédant une valeur de pA2, ces molécules se comportent donc toutes comme un antagoniste compétitif –réversible (0.5pt). La pA2 est définie par  $-\log[\text{antagoniste}]$  nécessaire pour avoir à un doubleur concentration l'agoniste pour obtenir le même effet que sans antagoniste (dose-ratio =2) (0.5pt). Ainsi, plus la pA2 est grande, plus l'antagoniste est puissant (0.5pt). Ici on a donc par ordre de puissance : UPS>propranolol>bisoprolol>pindolol. (0.5pt)

Des expériences sont ensuite conduites sur des rats, où les variations de la fréquence cardiaque sont mesurées 60 min après administration de différentes molécules par voie intrapéritonéale (i.p.). Les résultats sont présentés dans la figure 3.

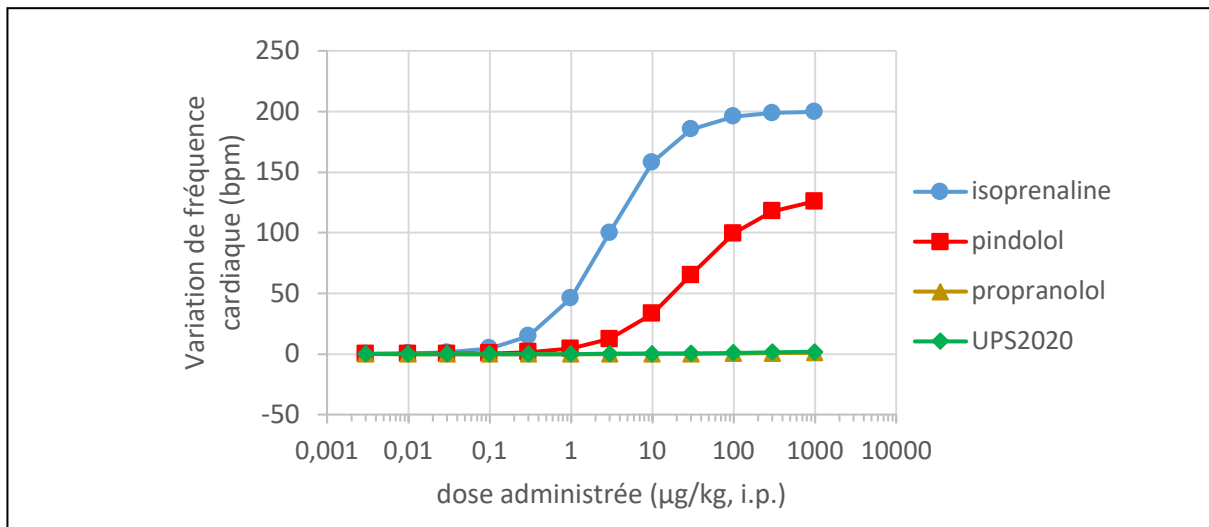


Figure 3 : Effet de l'injection i.p. de plusieurs composés sur la fréquence cardiaque de rats.

**Question 4 : Analysez la figure et concluez sur la nature de chacune des molécules testées. Comment interprétez-vous les résultats obtenus avec le pindolol au regard des données présentées dans le tableau 1 ? (5 pt)**

Il s'agit de nouveau d'expériences dose-réponse à des produits cette fois administrés chez le rat par voie i.p. L'isoprénaline et le pindolol produisent une élévation dose-dépendante de la FC, ce sont des agonistes de R. associés à un effet tachycardisant (0.5pt). L'isoprénaline ( $E_{max} = 200$  bpm) (0.5pt) est un agoniste des R.  $\beta$ -adr. (vu plus haut). Il faudrait comparer sa réponse avec celle du médiateur endogène pour le définir comme agoniste entier. Le propranolol et l'UPS2020 ne produisent pas d'effet (activité intrinsèque=0), ce qui confirme leur nature de simple antagoniste des R.  $\beta$ -adr. (1 pt)

Le pindolol présente un  $E_{max} = 125$  bpm ; c'est donc un agoniste partiel (1pt). On a vu qu'il a de l'affinité avec les R.  $\beta$  adr. ; il s'agit donc d'un agoniste partiel de ces R. (ou au moins du/des sous-type(s) exprimé(s) dans le cœur. Si on considère l'isoprénaline comme un agoniste entier (activité intrinsèque  $\alpha=1$ ), alors l'a.i. du pindolol est de  $125/200 = 0,62 = \alpha$ .

L'isoprénaline présente une puissance définie par une  $DE_{50} = 3$  µg/kg, le pindolol par une  $DE_{50} \approx 33$  µg/kg ; c'est un agoniste moins puissant. Pas de  $DE_{50}$  pour les 2 autres molécules, puisque ce ne sont pas des agonistes. (1pt)

Dans l'expérience relatée dans la table 1, le pindolol a été utilisé en présence de l'agoniste isoprénaline ; agoniste partiel, il se comporte alors comme un antagoniste compétitif vis-à-vis des récepteurs cibles de l'isoprénaline. (1pt)

Des expérimentations *in vivo* indiquent par ailleurs que l'UPS2020 présenterait des propriétés vasodilatatrices. Pour en expliquer le mécanisme pharmacologique, des expériences de réactivité vasculaire ont été conduites sur de l'aorte de rat isolée. Les résultats sont présentés dans la figure 4. L'effet de l'UPS2020 sur la vasoconstriction induite par la noradrénaline est ainsi mesuré.

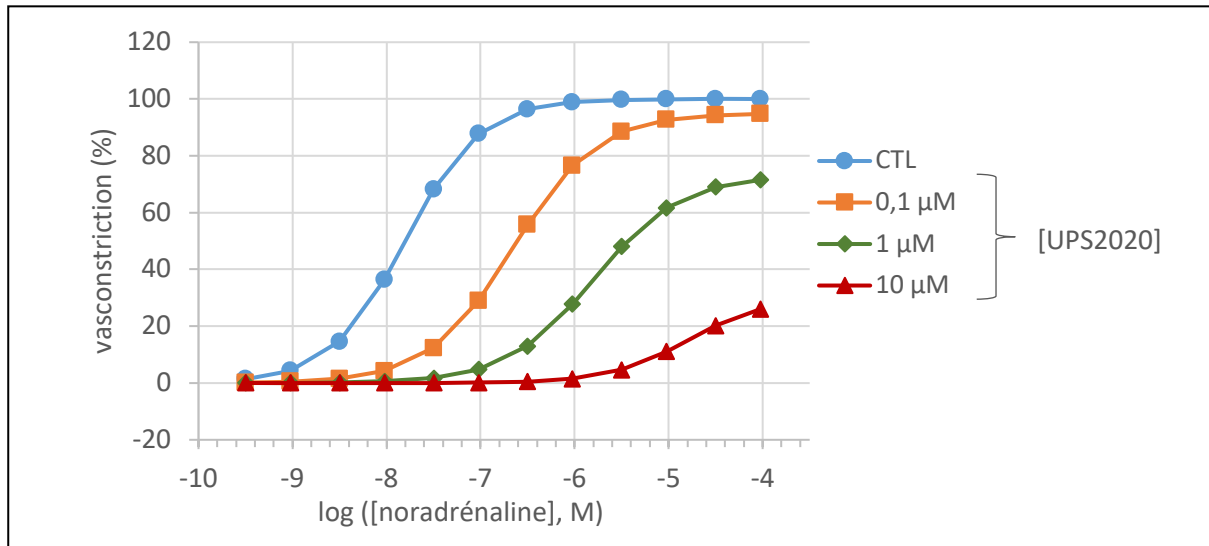


Figure 4 : Réponse contractile à la noradrénaline de l'aorte de rat isolée, en l'absence (contrôle, CTL) ou en présence de l'UPS2020 testé à 3 concentrations.

**Question 5 : Analysez la figure 4. Formulez une hypothèse quant aux propriétés de la noradrénaline et de l'UPS2020 ainsi mises en évidence. (4 pt)**

Il s'agit d'expériences fonctionnelles *ex vivo*, sur organe isolé (0.5pt). La NA produit une vasoconstriction dépendante de la concentration ajoutée. C'est donc l'agoniste d'un R. couplé à la contraction de cellules musculaires lisses dans ce tissu. (0.5pt) L'effet de la NA est mesuré en absence ou en présence du produit ; ce protocole permet de mettre en évidence l'effet antagoniste de l'UPS (0.5pt) : ce dernier s'oppose (ou inhibe) la réponse à la NA de façon dépendante de la concentration (0.5pt), avec diminution de l' $E_{max}$  (CTL : 100%, 95%, 70% et 25% environ pour respectivement les 3 concentrations testées (0.5pt). La puissance de la NA est aussi diminuée :  $-\log(CE_{50})=pD_2=7.8$  (CTL) et 6.7, 5.8 et  $<5$ , respectivement (0.5pt). L'UPS se comporte donc comme un antagoniste insurmontable, il s'agit d'un antagonisme fonctionnel : le mécanisme est une liaison non compétitive (site allostérique) sur le R. ou une liaison irréversible (1pt), ou une action sur une autre cible limitant la signalisation en aval (calcium, action sur le myofilament...).

Afin de préciser les propriétés vasculaires de l'UPS2020, la liaison spécifique de la [<sup>3</sup>H]prazosine, un ligand sélectif des récepteurs α<sub>1</sub>-adrénergiques, a été déterminée sur des extraits membranaires d'aorte de rat (figure 5). La [<sup>3</sup>H]prazosine a été utilisée soit seule (figure 5A), soit en présence d'UPS2020 ou de noradrénaline (NA)(figure 5B).

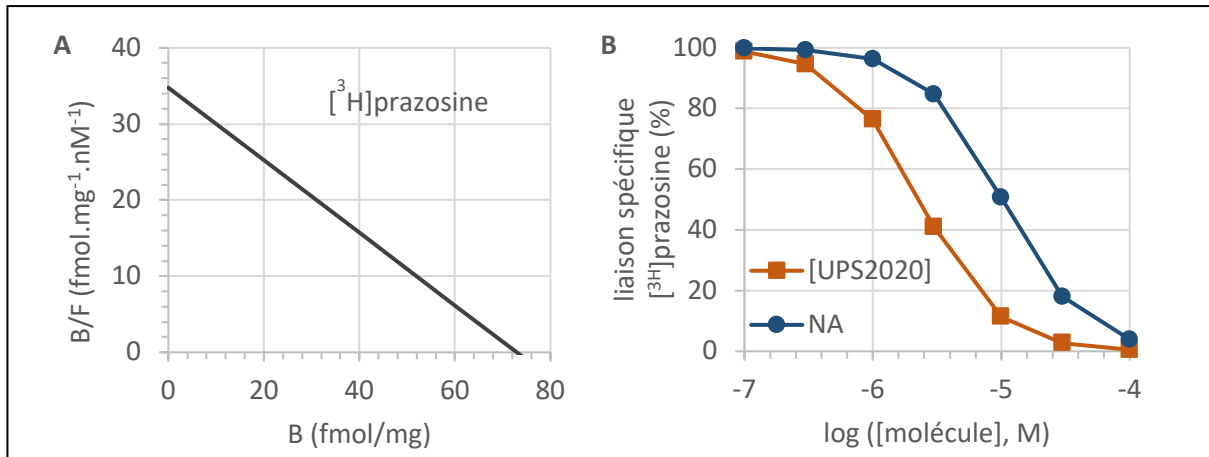


Figure 5 : Liaison spécifique de la [<sup>3</sup>H]prazosine sur des extraits membranaires d'aorte de rat. **A** : représentation de Scatchard. **B** : Liaison spécifique obtenue avec 4 nM de [<sup>3</sup>H]prazosine, en présence de gammes de concentrations d'UPS2020 ou de noradrénaline (NA).

**Question 6 : Rappelez le principe des dosages effectués et exploitez-les en déterminant les valeurs des paramètres pertinents. Précisez ainsi les hypothèses émises à la question 5. (10 pt)**

A gauche, la représentation de Scatchard présente la linéarisation des résultats d'une expérience de saturation (**0,5pt**) (incubation d'une gamme de concentrations de radioligand (L\*) avec une préparation de R., avec ou sans excès de ligand froid pour mesurer respectivement la liaison totale et la liaison non-spécifique (**0,5pt**). La liaison sur les sites spécifique est obtenue par soustraction : liaison totale - non spécifique), et donne « B », en fmol/mg. (**0,5pt**). La prazosine étant décrite comme un ligand sélectif du R α<sub>1</sub>-adr., on postule que ce récepteur est responsable de la liaison spécifique du L\* dans les extraits d'aorte (**0,5pt**).

Le graphe présente B/F en fonction de B, avec F : fraction libre de L\* (nM) (**0,5pt**). L'équation de la droite est  $B/F = -1/K_d \times B + B_{max}/K_d$  (**0,5pt**), avec B<sub>max</sub> : densité des récepteurs/sites spécifiques dans cette préparation (**0,5pt**); et K<sub>d</sub> = constante de dissociation traduisant l'affinité du L\* pour le R. (**0,5pt**). On lit B<sub>max</sub> à l'intersection avec l'axe des abscisses (B<sub>max</sub> ≈ 72 fmol/mg) (**0,5pt**) et K<sub>d</sub> = 72/35 ≈ 2,1 nM (**0,5pt**). Cette valeur sera utilisée ci-après pour calculer le K<sub>i</sub> de l'UPS et de la NA.

A droite sont présentés les résultats d'une expérience de compétition-déplacement (**0,5pt**). Le L\* est utilisé à une concentration fixe (4 nM, Cf légende de la figure) et occupe donc une certaine proportion « initiale » de R., à laquelle on attribue la valeur 100%. La faculté des molécules ajoutées (compétiteurs froids) à diminuer la liaison L\*-R. de façon concentration-dépendante traduit un déplacement du L\* par la liaison de ces compétiteurs au R. (**0,5pt**). Il peut être défini une concentration de compétiteur qui diminue la liaison du L\* de 50% : la CI<sub>50</sub> (**0,5pt**), ici 10<sup>-5</sup> M et 2,5.10<sup>-6</sup> M respectivement pour la NA et l'UPS2020 (**1pt**). Les K<sub>i</sub> sont définis par la relation :  $K_i = CI_{50} / (1 + [L^*] / K_d(L^*))$  (équation de Cheng-Prusoff) (**0,5pt**), en M, avec [L\*] = 4.10<sup>-9</sup> M et K<sub>d</sub> = 2,1.10<sup>-9</sup> M ; soit des K<sub>i</sub> respectivement de 3,4.10<sup>-6</sup> M et 8,6.10<sup>-7</sup> M. (**1pt**). La NA et l'UPS sont bien des ligands du R. α<sub>1</sub>-adr., respectivement agoniste et antagoniste (Fig 4) (**1pt**).