

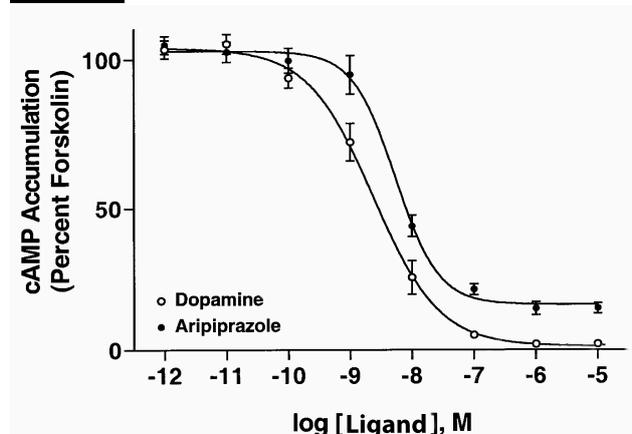
## Préparation au concours de l'Internat

Épreuve de PHARMACOLOGIE MOLÉCULAIRE : Révision 2021-2022

DUREE DE L'ÉPREUVE : 20 min (/ 40 points)

Des cellules d'ovaires de hamster de chine (CHO) qui expriment la forme humaine du sous type de récepteur D2 de la dopamine sont mises en culture. Sur ces cultures, les concentrations intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) sont mesurées après un traitement soit avec de la dopamine soit avec une nouvelle molécule, l'aripiprazole. Les résultats sont exprimés en fonction des concentrations en AMPc obtenu lorsque ces cellules sont stimulées avec de la forskoline (figure 1).

**Figure 1 :**



**Question 1 : Donner les valeurs des paramètres pharmacologiques qui permettent de caractériser ces ligands. Comparer les ligands. Préciser la nature des ligands dopamine et aripiprazole vis-à-vis du sous type de récepteur D2 de la dopamine. (6 points)**

**\*Paramètres :**

-Efficacité maximale (Emax) (0,5 points), renseignée par l'activité intrinsèque  $\alpha$  (0,5 points)  
-Puissance (0,5 points) : concentration en ligand qui induit 50% de l'effet maximum (CE50) (0,5 points). Plus la CE50 est petite plus la molécule est puissante (0,25 points) ou  $-\log CE50 = pD2$  (0,5 points), Plus la pD2 est grande plus la molécule est puissante (0,25 points).

**\*Dopamine :**

-Induit un effet en diminuant les concentrations en cAMP, c'est donc un agoniste (0,5 points).  
 $\alpha = 1$  (0,25 points), c'est donc un agoniste entier (0,25 points).  
La puissance, calculée à partir de la CE 50 est d'environ  $5 \cdot 10^{-9} M$  (0,25 points) soit une pD2 de 8,3 (0,25 points).

**\*Aripiprazole :**

-Induit un effet en diminuant les concentrations en cAMP, c'est donc un agoniste (0,5 points).  
 $\alpha = 0,9$  (0,25 points), c'est donc un agoniste partiel (0,25 points).  
L'efficacité CE 50 est environ  $8 \cdot 10^{-9} M$  (0,25 points) soit une pD2 de 8,1 (0,25 points).

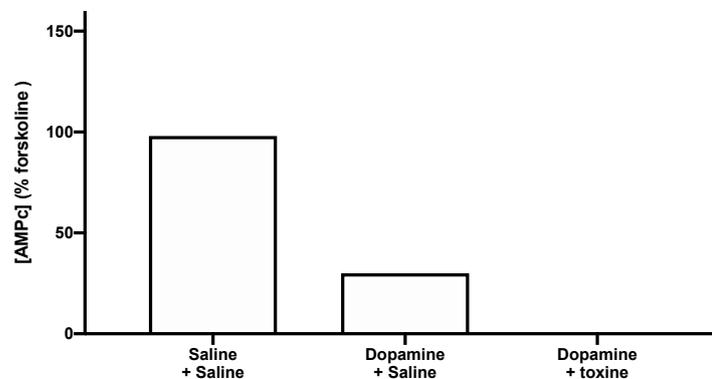
**Remarques :** les paramètres  $\alpha$  et pD2 n'ont pas d'unité (0 point à la question si unité indiquée). Le paramètre CE50 a obligatoirement une unité (0 point à la question si unité omise).

**Question 2 : Que pouvez-vous en déduire quant au couplage du récepteur D2 de la dopamine et de la voie de signalisation recrutée ? (2 points)**

Comme la dopamine et l'aripiprazole sont des agonistes et puisque leur effet est de diminuer le taux d'AMPc (0,5 points) donc le récepteur D2 doit être un RCPG (0,5 points) couplé à une protéine Gi (0,5 points): inhibition de l'AC (0,25 points) qui engendre une diminution du taux d'AMPc intracellulaire et une diminution de l'activité de la PKA (0,25 points).

Afin de confirmer le couplage du récepteur D2 de la dopamine, 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 en présence de dopamine (Figure 2).

Figure 2 :

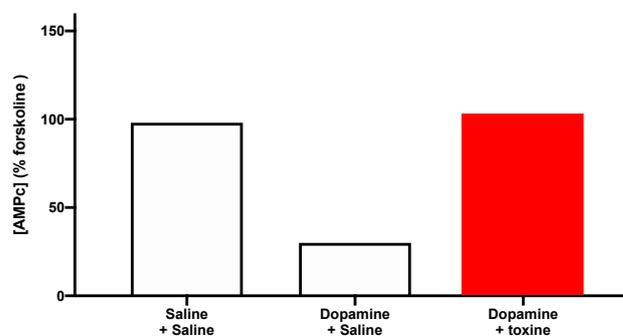


**Question 3 : Quelle toxine utiliseriez-vous pour confirmer l'hypothèse que vous avez émise quant au couplage du récepteur D2 de la dopamine ? (1 point)**

Utilisation de la toxine Botulique (1 point).

**Question 4 : Détailler son mécanisme d'action et représenter sur la figure 2 la conséquence de sa co-administration avec de la dopamine (3 points)**

Cette toxine induit une ADP-ribosylation de la sous unité G $\alpha$  i (1 point) lorsque celle-ci est dans son état inactivé (donc liée au GDP) (0,5 points). Cette sous unité  $\alpha$  i restera ainsi dans son état inactivé même si un ligand vient activer la voie Gi (0,5 points).



Barre d'histogramme au même niveau que la condition saline + saline puisque la dopamine ne pourra plus activer la voie Gi via le récepteur D2. (1 point pour le tracé)

Dans la même étude, une nouvelle expérience est réalisée permettant de déterminer le  $K_i$  de la dopamine, de l'halopéridol, de l'aripiprazole pour le récepteur D2 de la dopamine en utilisant du [ $^{125}$ I]-7-OH-PIPAT. Les données sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 :

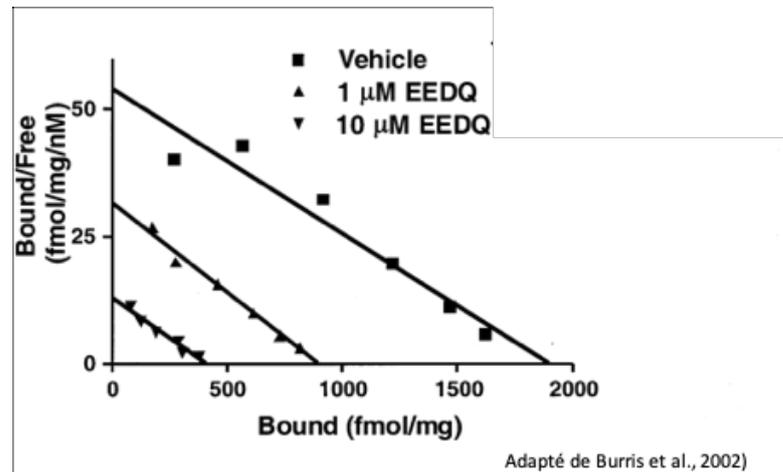
	$K_i$ (nM)
dopamine	$17 \pm 1,0$
halopéridol	$0,3 \pm 0,06$
aripiprazole	$0,34 \pm 0,02$

**Question 5 : A partir du tableau 1, et en comparant les  $K_i$  des 3 molécules, qu'en concluez-vous ? (3 points)**

Le  $K_i$  représente donc l'affinité des trois ligands froids pour le récepteur D2 de la dopamine (0,5 points). Il est calculé par l'équation de Cheng et Prusoff (0,5 points) grâce à la concentration Inhibitrice 50 (CI50) (0,5 points). Plus le  $K_i$  est faible plus l'affinité est élevée (0,5 points) donc l'halopéridol et l'aripiprazole ont la même affinité pour le récepteur D2 (0,5 point). Ces deux molécules même sont plus affines pour le récepteur D2 de la dopamine que le ligand endogène, la dopamine (0,5 points).

La figure 3 représente « Bound/Free » en fonction de « Bound » pour l'aripiprazole dans le même modèle de culture cellulaire. Dans ces cultures cellulaires, à l'aripiprazole, du véhicule ou un traitement avec du N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ, 1 $\mu$ M ou 10 $\mu$ M) est appliqué.

Figure 3 :



**Question 6 : Quelle est le nom de cette représentation ? A partir de quel type d'expérience obtient a-t-elle été obtenue ? Détaillez les grandes étapes du protocole qui ont permis d'établir cette représentation. (6 points)**

Il s'agit de la représentation de Scatchard (1 point).

On l'obtient à partir d'une expérience de liaison ligand/récepteur (0,5 points) appelée saturation (0,5 points).

Dans une première série de tube, des cellules CHO exprimant le récepteur D2 de la dopamine sont mise en présence de concentrations croissantes d'aripiprazole marqué (chaud, radioactif) (0,5 points). Après incubation, puis filtration, la radioactivité (0,5 points), reflet de la liaison d'aripiprazole marqué sur des sites spécifiques et non spécifiques (0,5 points) est mesurée. La liaison totale est alors déterminée (0,5 points).

Dans une deuxième série de tube, à des cellules CHO exprimant le récepteur D2 de la dopamine et mise en présence de concentrations croissantes d'aripiprazole marqué (0,25 points), un excès d'aripiprazole non marquée (froid, non radioactif) est appliquée (0,25 points). La liaison non spécifique est ainsi déterminée (0,25 points).

La différence de liaison totale (1<sup>ère</sup> série) – liaison non spécifique (2<sup>ème</sup> série) (0,25 points) permet alors de déterminer la liaison spécifique (paramètre « Bound ») (0,25 points).

Le paramètre « free », qui lui aussi est calculé (0,25 points), correspond à la concentration d'aripiprazole marqué qui ne peut pas se lier aux cellule. (0,25 points). Il est déterminé en soustrayant à la concentration initiale d'aripiprazole, la liaison totale (1<sup>ère</sup> série de tube) (0,25 points).

**Question 7 : Définissez puis déterminer les différents paramètres pharmacologiques issus de la figure 3 pour chacun des 3 groupes. (3,5 points)**

Les paramètres qui peuvent être obtenues sont  $K_D$  (0,5 points) et  $B_{max}$  (0,5 points).

$K_D$  évalue l'affinité du ligand pour son récepteur (0,5 points).

$B_{max}$  évalue la densité des sites de liaison spécifique dans la préparation (0,5 points).

Groupe véhicule :  $B_{max}$  = 1800 fmol/mg (0,25 points),  $K_D$  = entre 20 et 30 nM (0,25 points)

Groupe  $1\mu\text{M}$  :  $B_{\text{max}} = 800 \text{ fmol/mg}$  (0,25 points),  $K_D =$  entre 20 et 30 nM (0,25 points)  
Groupe  $1\mu\text{M}$  :  $B_{\text{max}} = 400 \text{ fmol/mg}$  (0,25 points),  $K_D =$  entre 20 et 30 nM (0,25 points)

**Remarque :  $K_D$  et  $B_{\text{max}}$  ont une unité (0 point si oubliée).**

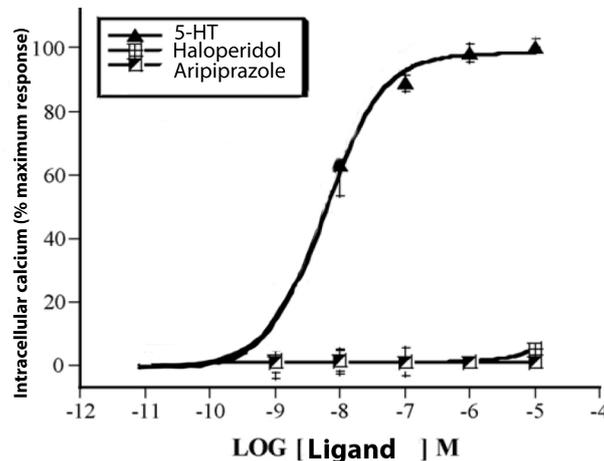
**Question 8 : Quelle est la conséquence de l'EEDQ sur ces cellules ? (2 points)**

EEDQ ne modifie pas l'affinité de l'aripiprazole pour le récepteur D2 (0,5 points) car le  $K_D$  est inchangé (inchangé) (0,5 points).

EEDQ modifie  $B_{\text{max}}$  donc diminue nombre de site de liaison spécifique (0,5 points). Le  $B_{\text{max}}$  diminuant, la densité des récepteurs D2 est aussi diminuée (0,5 points).

Dans une nouvelle étude (Zhang et al., 2006) des cellules CHO qui expriment le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> sont utilisées. La concentration intracellulaire de calcium (en % de réponse) est alors représentée en fonction de traitements de ces cellules avec des concentrations croissantes de sérotonine (5-HT), d'haloperidol ou d'aripiprazole (Figure 4).

Figure 4 (Adapté de Zhang et al., 2006):



**Question 9 : Donner les valeurs des paramètres pharmacologiques qui permettent de caractériser les 3 ligands. Comparer les ligands. (3,5 points)**

Les paramètres pharmacologiques sont l'efficacité maximale (activité intrinsèque) (0,25 points), caractérisée par le paramètre  $\alpha$  (0,25 points) ainsi que la concentration en 5-HT, Halopéridol et Aripiprazole qui induisent 50% de l'effet maximal (0,25 points) (CE50 et la pD2) (0,25 points)

\*Pour la 5-HT

$\alpha = 1$  (0,5 points)

-CE50 est d'environ  $10^{-8}\text{M}$  (0,5 points) et donc une pD2 de 8 (0,5 points).

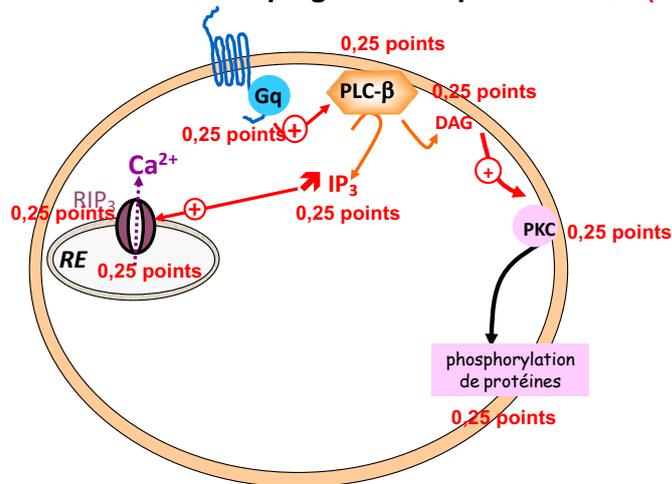
\*Pour l'haloperidol et l'aripiprazole,

$\alpha = 0$  (0,5 points).

il n'y a pas de CE50 calculable ni de pD2 (0,5 points).

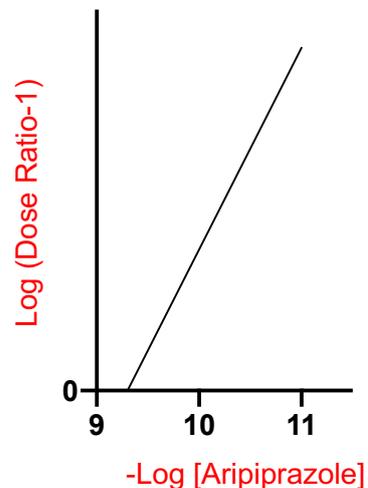
**Remarques : les paramètres  $\alpha$  et pD2 n'ont pas d'unité (0 point à la question si unité indiquée). Les paramètres CE50 a obligatoirement une unité (0 point à la question si unité omise).**

**Question 10 : Le récepteur 5-HT<sub>2A</sub> est un récepteur couplé à une protéine G : représenter sur un schéma la structure et le couplage du récepteur 5-HT<sub>2A</sub>. (2 points)**



Suite à cette expérience une nouvelle expérience est réalisée pour l'aripiprazole où la droite de la figure 4 est tracée.

Figure 4 :



**Question 11 : préciser le type de représentation qui a permis d'obtenir la figure 4. Définissez chacun des axes. (3 points)**

Il s'agit de la droite de Schild (1 point).

Abscisses :  $-\text{Log} [\text{Aripiprazole}]$  (1 point).

Ordonnées :  $\text{Log} (\text{DR}-1)$  (1 point), où DR correspond au dose ratio de la dose équi-active. Pour un effet donné, ce DR correspond au rapport entre la concentration d'agoniste qui engendre cet effet lorsqu'il est appliqué en présence d'une concentration fixe antagoniste vis-à-vis de l'effet de l'agoniste appliqué seul.

**Question 12 : A partir de la figure 4, quel paramètre pharmacologique peut être déterminé ? Définissez le et donnez en un valeur. (5 points)**

Il s'agit de la pA2 (1 point). Elle renseigne sur la puissance d'un antagoniste (1 point). Elle est défini comme suit : -Log de la concentration de l'antagoniste qui nécessite le doublement de la concentration de l'agoniste pour obtenir le même effet qu'en absence d'antagoniste (1 point).

Plus la pA2 est grande meilleur est l'antagoniste (1 point). La pA2 issu de la Figure 4 a une valeur d'environ 9,2 (1 point)