

PRELIMINAIRES

Le cours de Pharmacologie moléculaire représente un volume de 15 à 17 heures. Le Poly édité par l'amicale est indispensable : il est le support et le complément de ce qui est dit et commenté en cours.

Mme (Melle ?) MARCEL faisant son cours d'une manière "originale", cette ronéo ne se présentera pas de la manière conventionnelle et reposante à laquelle vous êtes habitués... Il vous faudra faire de constants va et vient entre le poly et la ronéo.

Ceci étant dit, avec ce cours il faut surtout essayer de comprendre les mécanismes, comprendre les courbes... l'examen se base sur des exercices. Un peu de réflexion, ça nous changera...

Mme MARCEL a tenu à revenir sur la table des matières :

Le paragraphe A. Devenir du médicament, sa biotransformation, sera vu à la fin.

B. Sites et liaison des médiateurs et des médicaments.

C'est ce paragraphe qui sera traité en premier lieu.

On s'intéresse aux interactions des médicaments sur les récepteurs:

Un site de liaison est une grosse protéine reconnaissant des molécules endogènes. On confond souvent site de liaison et site de récepteurs, c'est presque la même chose mais on n'en saura pas plus. La molécule endogène est la transmettrice d'un message. La molécule cible, elle, traduit le message, transforme sa biochimie, ce qui conduit à la perturbation d'une grande fonction biologique.

Cette transformation correspond à une adaptation à l'environnement.

Donc, ici, on ne raisonne pas sur le plan de la physiologie mais le plan moléculaire.

Quand une fonction est perturbée, on cherche à agir sur les récepteurs.

Par exemple, on recherche la diminution de synthèse d'un récepteur ou d'un neurotransmetteur.

Pour contrebalancer un problème physiologique, on fait agir des médicaments de plus en plus ciblés. Cela implique une parfaite connaissance des mécanismes.

Dans ce paragraphe, on verra 4 grands chapitres.

I. METHODES D'ETUDES

C'est la quantification des interactions molécules/récepteurs.

Il existe une série de tests évaluant les effets des molécules.

Deux types d'expériences : In vitro / In vivo.

Depuis une dizaine d'années, les techniques de biologie moléculaire sont devenues banales. Elles ont permis de découvrir de nombreux récepteurs.

Remarque : Intérêt d'un récepteur : c'est une cible potentielle pour les médicaments.

On continue à rechercher de nouveaux récepteurs car ceux que l'on connaît déjà présentent des effets secondaires.

En effet, un médicament agissant sur la cible voulue, agit aussi sur un récepteur annexe, perturbant plus ou moins une autre fonction (= l'effet secondaire).

II. CANAUX IONIQUES

Il s'agit d'entités protéiques différentes, à l'origine d'un type de communication différent : les canaux \Leftrightarrow transfert par passage d'ions.

Les équilibres ioniques sont très sensibles aux gradients de concentrations.

Ces molécules transportant ces ions sont très diverses.
Il existe des médicaments dirigés spécifiquement contre elles.

III. FAMILLE DES RECEPTEURS DES MEDIATEURS ET LEURS EFFECTEURS

Le classement se fait en fonction de la structure, du fonctionnement et NON du ligand reconnu.

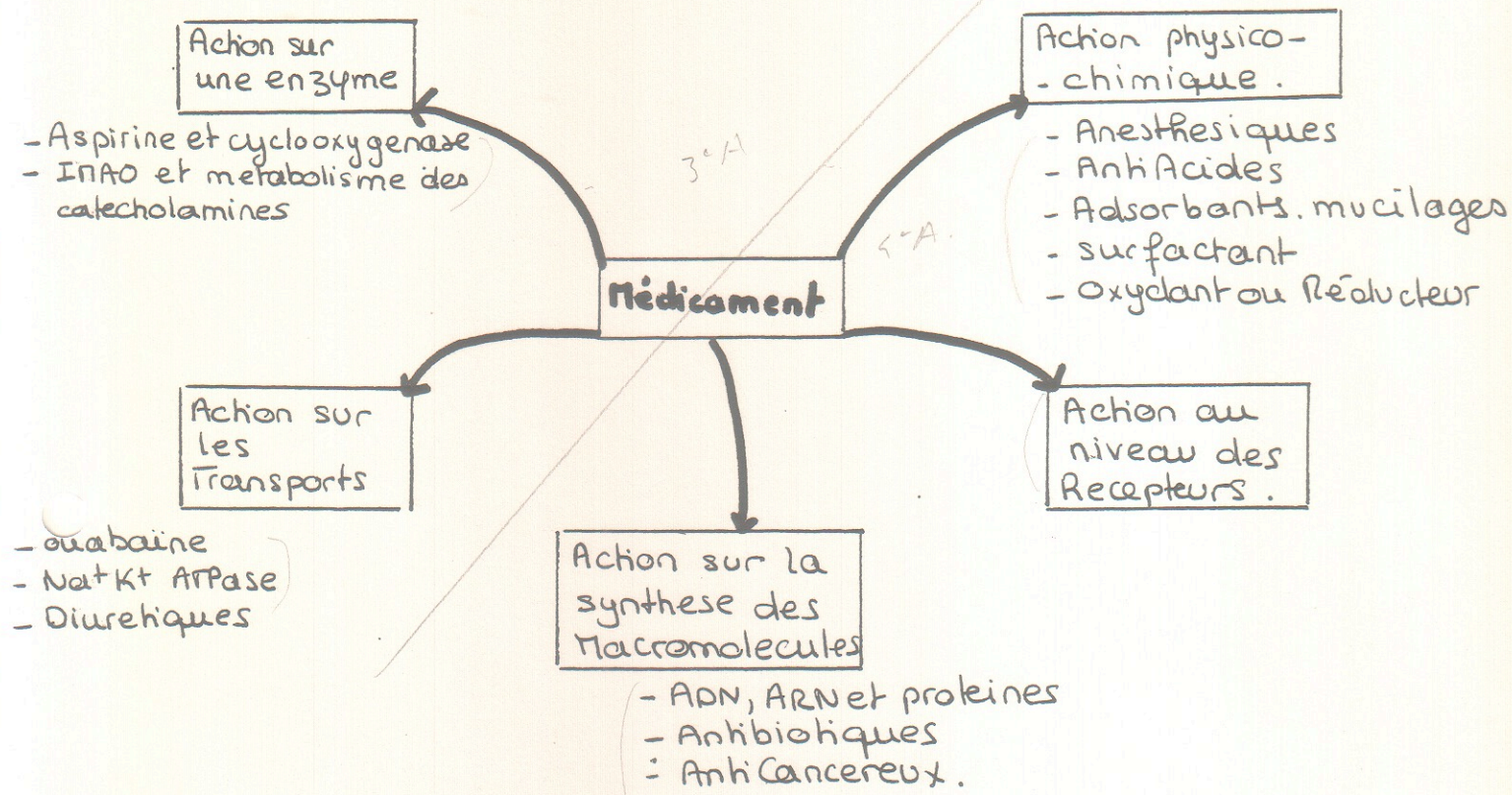
Quand le ligand reconnaît une molécule cible, elle est rarement internalisée et c'est l'effecteur qui fait la transmission de l'information.

IV. REGULATION DES RECEPTEURS

Le récepteur étant une protéine, elle subit toutes les régulations classiques : inhibition, activation de sa synthèse...

MECANISMES D'ACTION DES MEDICAMENTS NOTION DE RECEPTEURS

On distingue 5 principaux modes d'Action des médicaments :



Ce schéma résume les cibles potentielles d'un médicament.

Action physicochimique et sur la synthèse --> Cf 4^{ème} année.

Action enzymatique et sur les transporteurs --> Cf Pharmacologie générale, tous les systèmes de transmission.

L'action au niveau des récepteurs, c'est l'étude des différentes molécules agissant sur ces récepteurs, on le verra en 4^{ème} année.

==> Cette année, on verra comment sont faits les récepteurs.

PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE : GENERALITES

Cf à partir de la page 20 du poly.

Mme MARCEL a insisté sur le fait qu'il fallait commencer à étudier en recherchant des compléments dans les bouquins.

p. 149 : Bibliographie sur laquelle elle-même s'est basée pour son poly. Pour vous, deux bibles : "Bases de pharmacologie moléculaire" publié par J.L. GIES et "Aide mémoire de pharmacologie" publié par J.L. ELGHOZI et D. DUVAL.

Donc, si vous rencontrez des difficultés de compréhension, des points obscurs : pêchez dedans !

La pharmacologie moléculaire est une science qui existe depuis 25 ans. A l'origine : la découverte des premiers récepteurs vers 1950-1960.

Quand les techniques ont pu nous amener jusqu'au niveau moléculaire, on a alors pensé que les Principes Actifs agissaient en prenant la place de molécules endogènes.

De là, la notion de récepteurs.

Les premières études furent grossières, avec le couplage de la biologie moléculaire à l'action physiologique observée.

I. LA CELLULE ET LE MEDICAMENT

La membrane cytoplasmique est le lieu privilégié pour la liaison. On synthétise donc des médicaments capables d'agir au niveau de la membrane du tissu malade.
On rappelle que la membrane est hydrophobe.

Note : J'insiste sur le fait que tout le poly est à connaître : ce n'est pas parce qu'un chapitre ne figure pas dans la ronéo qu'il faut le sauter !

Le cours, et donc la ronéo, soulignent des points importants ou délicats, parfois ce sont des additifs.

II. LES MESSAGERS DES INTERACTIONS CELLULAIRES

Points à relier à la Pharmacologie générale (en fait, les deux cours n'en font qu'un).

Ce sont : . les Neuro Transmetteurs (NT) à action rapide,
. les Hormones, dont l'action est plus lente, (agénériques + locales)
. les facteurs de croissance,
et . les médiateurs du système immunitaire.

III. LES RECEPTEURS DES MESSAGERS

Rappel des différentes familles, et notion importante d'Agoniste et d'Antagoniste.
Les récepteurs de membrane sont des protéines classées en 4 groupes.

1. Récepteurs à 7 domaines
Transformation GDP en GTP, association à l'adénylcyclase ou à la phospholipase A2, C...
2. Récepteurs à Insuline
3. Famille de récepteurs hétérogènes
4. Récepteurs incluant un canal ionique.

IV. LES CANAUX IONIQUES

Il s'agit de protéines faisant passer les ions de part et d'autre de la membrane.
On distingue :

1. Les pompes ATPases membranaires

* Pompes $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$: hydrolyse d'ATP pour lutter contre un gradient de concentration. Cette pompe est localisée en de multiples endroits : cellules cardiaques, nerveuses, musculaires lisses.

* Pompes $\text{H}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ de la cellule gastrique.

Rappel : pH intestinal : environ 3

$[\text{H}^+]$ 10^6 fois plus dans la lumière par rapport à l'extérieur.

Dans l'ulcère, par exemple, on cherchera à inhiber cette pompe.

* Pompes $\text{CA}^{2+} \text{ATPase}$

Le CA^{2+} est un ion essentiel à la contraction. La Calmoduline est une molécule qui reconnaît le CA^{2+} cytoplasmique quand celui-ci atteint une certaine concentration.
 $[\text{CA}^{2+}]$ cytoplasmique augmente car il est libéré par certains sites de stockage comme le Reticulum Endoplasmique.

(Le R.E est fait de membranes closes, dans ces membranes : des pompes qui font entrer le CA^{2+} . De ce fait $[\text{CA}^{2+}]$ dans le RE est 10^4 fois supérieure à la $[\text{CA}^{2+}]$ cytoplasmique) --> le stockage dans le R.E se fait grâce à l'ATPase.

Ex. : Acetylcholine (Ach) --> Récepteurs muscariniques des muscles lisses --> phénomène biochimique* --> Effet physiologique.

(*) = Les modifications de $[\text{CA}^{2+}]$.

•2. Les échangeurs ioniques

Ils assurent la sortie de certains ions mais toujours compensation par une entrée équilibrée d'autres ions.

- * Cotransporteurs Na^+ K^+ Cl^- Ex. : Furosémide
- * Echangeurs Na^+ K^+ (dans une autre portion du néphron)
- * Echangeurs Na^+ Ca^{2+} (au niveau cardiaque).

3. Les canaux ioniques

Ce sont des protéines capables de s'ouvrir ou se fermer, donc qui changent de conformation.

Ce sont des canaux voltages dépendants.

La membrane est excitable : elle fait barrière entre une ddp de part et d'autre de cette membrane.

Cas des cellules neuronales, elles possèdent des canaux spécifiques de certains ions : canaux sodiques.

V. AUTRES RELATIONS MESSAGERS / MEDICAMENTS

Cf plus tard.

Chaque chapitre est illustré par des figures, des courbes, commentées en cours.
Reportez-vous à la page 25.

Fig. n°1 : Mécanisme général d'action des agonistes et antagonistes

. Agoniste

Schéma d'une cellule dont le récepteur est inclus dans la membrane qui reconnaît la molécule endogène ou un agoniste.

Ce récepteur est en contact avec l'effecteur.

Le récepteur est donc un pont entre le milieu intracellulaire (MIC) et le milieu extracellulaire (MEC).

En général, le message reçu est "amplifié", c'est-à-dire qu'à une molécule correspond un récepteur, puis un effecteur, mais plusieurs enzymes.

La réponse physiologique est obtenue après de nombreux événements comme : une synthèse protéique, une inhibition ou une activation enzymatique, l'intervention d'ions, etc...

. Antagoniste

C'est forcément une molécule de synthèse.

Attention ! Elle n'a AUCUN effet physiologique.

L'effecteur ne peut plus rien transmettre, il y a DECOUPLAGE de Récepteur / Effecteur.

Fig. n° 2 : Canaux ioniques et transporteurs de la membrane.

Représentation des différents chargés de communications faisant intervenir des ions.

Le canal ionique voltage dépendant ou associé à un récepteur fait passer les ions selon leur gradient de concentration.

Un canal associé à un récepteur est un canal sensible à la liaison d'un médiateur sur un site de liaison. Or, ce site est porté par le canal lui-même.

Les échangeurs d'ions sont pour leur part localisés sur des cellules bien précises.

Fig. n° 3 : Autres relations messagers - médicaments.

Deux cellules A et B : A envoie l'information, c'est elle qui synthétise le neurotransmetteur (si la cellule est un neurone.)

B est la cellule cible.

A : Précurseur --> NT stocké dans une vésicule --> sécrétion et libération dans le M.E.C. --> cellule cible.

Le NT (ou M pour médiateur) peut agir sur le récepteur de la cellule cible, mais peut aussi être recapté par la cellule A et être, soit réutilisé, soit dégradé. M peut aussi être dégradé dans le M.E.C.

(Ce phénomène explique l'action des IMAO, leur rôle antidépresseur).

Connaissant cette succession de phénomènes, on peut donc imaginer des médicaments agissant sur la synthèse des médiateurs, sur leur stockage, sur la déplétion (non stockage, augmentation du métabolisme) ou sur les autres voies comme la recapture, etc...

Cf le cours de pharmacologie générale.

NOTION IMPORTANTE SUR LA DIVERSITE DES RECEPTEURS PROPREMENT DITS

Les récepteurs appartiennent à différentes familles en fonction, entre autre, de leur constitution, mais jamais en fonction du ligand.

Ex. : L'Ach agit sur des récepteurs muscariniques (inhibés par l'Atropine) et sur les récepteurs nicotiniques (inhibés par les curares), et l'Ach produit des effets différents, donc a une fonction différente selon les récepteurs. ^{on}

Mme MARCEL a fait une parenthèse assez obscure sur la notion de "pharmacologie inverse":

Habituellement, la pharmacologie consiste en la recherche de nouvelles molécules agissant sur des récepteurs déjà connus.

La pharmacologie inverse fait le contraire, c'est la recherche de nouveaux sous types de récepteurs, et de molécules nouvelles actives sur eux.

L'intérêt c'est qu'on a affaire à des médicaments très spécifiques.

La diversité des récepteurs pour une molécule endogène c'est aussi leur diversité de localisation dans certains cas. Donc on se pose le problème de savoir ce qui se passe lors d'un dysfonctionnement local : quand une pathologie implique un NT, si on agit sur lui, on n'agit pas partout, il y a régulation seulement là où il y avait une anomalie (sinon on dérèglerait tout ce qui serait vraiment gênant).

Notion de récepteurs lents / rapides

Les récepteurs lents sont ceux qui font intervenir des enzymes pour l'obtention de l'effet. Les enzymes sont en effet des protéines avec un K_m et un V_m . Leur mise en jeu nécessite quelques ms ou secondes.

Les récepteurs rapides sont ceux qui sont couplés à un effecteur qui est un canal ionique et non plus une enzyme.

Lors de la liaison, il y a changement de conformation et passage des ions dans un temps de l'ordre de la μs . Les mouvements ioniques sont donc beaucoup plus rapides que les événements enzymatiques.

Si on s'adresse à un NT comme l'Ach, certains sous types muscariniques fonctionnent avec des effecteurs enzymatiques, d'autres avec des effecteurs ioniques.

==> Un NT a donc plusieurs récepteurs.

Cela entre dans la Notion plus générale d'ECONOMIE DU VIVANT.

Cf p. 27 - 28

Tableau 1, p. 28. Pluralité des récepteurs muscariniques à l'Ach.

M1 --> M5 : Il y a toujours une grande homologie de structure entre les récepteurs d'une même famille. Il y a donc conservation des récepteurs dans la phylogénèse.

Remarque : PLC = PhosphoLipaseC.

Tableau 2. Même chose avec les récepteurs à NorAdrénaline.

Ces tableaux ne sont pas à connaître par coeur, cependant il est bon de connaître quelques sous types pour illustrer une grande question (sous types dopaminergiques ou muscariniques).

Tableau 1, p. 27. Pluralité des récepteurs dopaminergiques.

Pour un sous type (D2) on a deux isoformes : une forme courte, une longue.
La première agit avec un temps de latence long, la seconde avec un temps de latence court.

Tableau 2. Récepteurs sérotoninergiques. Juste à regarder.

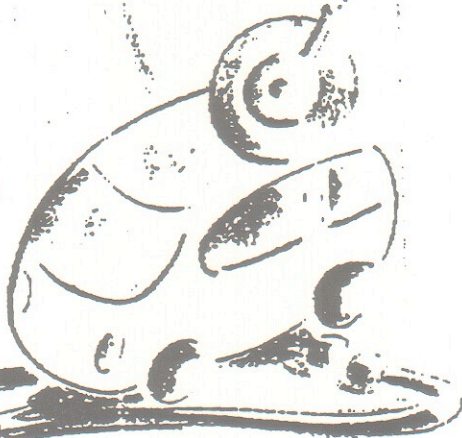
Remarque : Exemple de sujet de synthèse proposé par Mme MARCEL et faisant intervenir cette partie du cours (et donc nécessite l'illustration par quelques exemples) : "Diversité des récepteurs et leur intérêt en Pharmacologie".

Fin du chapitre : Généralités

RENTREE 93 - 94

TARIFS PRIVILEGIÉS POUR LES ÉTUDIANTS EN MÉDECINE

Participez à notre Grand Jeu-National !
du 1^{er} Octobre 1993 au 31 Mars 1994
Gagnez 5 week-ends à Vienne
et une TWINGO par tirage au sort.
LES CONCOURS SANS OBLIGATION : AVEC
RÈGLEMENT COMPLET SUR DEMANDE CHEZ NOTRE
ANAGUEL MUISSEUR À PARIS



nos délégations régionales

MÉDI-ASSURANCES
105, rue Garibaldi
69006 LYON
☎ 78 24 04 87

MÉDI-ASSURANCES
Les Jardins d'Entreprise B3
213, rue de Gerland
69007 LYON
☎ 72 71 08 50

Bons de participation AUX TIRAGES AU SORT À RETOURNER AVANT le 31 MARS 94

Nom : Date de naissance : Tél. Professionnel :
 Prénom : Adresse : Tél. Privé :
 Profession : salarié libéral Code Postal : Ville : Date d'obtention du permis de conduire :

VÉHICULE : Marque et modèle : Usage : Professionnel avec visite de clientèle
 Type (carte grise) : Puissance fiscale : Privé trajet/travail (salarié)
 Date de 1^{re} mise en circulation : Professionnel sans visite de clientèle
 Coefficient Bonus/Malus actuel : Privé uniquement
 Lieu de garage habituel : Parcourez-vous moins de 9000 km/an ? oui non
 Les conducteurs ont-ils déclaré au cours des 16 derniers mois :
 • des accidents responsables (totalement ou partiellement) oui non
 • des vols ou tentatives de vol oui non

V O S A S S U R A N C E S E N B O N N E S A N T É

APPROCHE FONCTIONNELLE DE L'ETUDE DES LIGANDS ET DES RECEPTEURS

Les études peuvent porter sur des expériences In vitro ou In vivo.

On rappelle les trois étapes lorsqu'une molécule reconnaît son récepteur :

- l'étape de la reconnaissance (la liaison),
- l'amplification et ses cascades biochimiques,
- la réponse biologique ou EFFET du ligand.

Il faut distinguer l'effet physiologique du ligand (par exemple, c'est la contraction d'un muscle) et l'action du ligand, qui est la conséquence biologique de la reconnaissance A L'INTERIEUR de la cellule. L'action du ligand est donc son activité intrinsèque (et non comme dans l'effet, ce qu'on observe).

L'approche expérimentale sera menée à différents niveaux : celui de la cellule, de l'organe isolé, de l'animal entier.

I. CARACTERE MULTIFACTORIEL DE LA REPONSE MESUREE

- Quantification des effets.

- Théorie de l'occupation des sites : c'est une notion qui fait penser que plus l'effet physiologique est grand, plus le nombre de récepteurs mis en cause est important.

Mais en fait, même s'il existe une certaine occupation des sites, l'effet n'est pas forcément dépendant du nombre de récepteurs.

L'effet dépend aussi de tout ce qui se passe dans la cellule.

Ex. : V_m et K_m des enzymes ou canaux ioniques impliqués.

Affinité récepteur - ligand.

II. DEFINITION AGONISTE / ANTAGONISTE

1. Agoniste

$A + R \rightleftharpoons AR \rightleftharpoons AR^* \rightarrow$ Effet physiologique
(il y a eu changement de conformation)

* Notion d'agoniste partiel.

C'est un agoniste produisant un effet partiel par rapport à l'effet du ligand naturel. Cela s'explique par des variations biochimiques à l'intérieur de la cellule.

Ex. : V_m , K_m ou affinité plus faible.

* Notion d'agoniste - antagoniste mixte.

Cf le cours de pharmacologie générale avec l'exemple des récepteurs β .

Explication :

Un agoniste entier développe l'effet physiologique total.

Si on administre en même temps un antagoniste :

à dose faible, on aura baisse de l'effet observé,

à dose forte, l'effet sera aboli.

L'action de l'agoniste est donc moindre en présence de l'antagoniste : on a le même résultat qu'avec un agoniste partiel.

Certains β bloquants sont des agonistes partiels.

2. Antagoniste

Exemple du récepteur pour le GABA.

GABA = acide gamma amino butyrique, c'est un neurotransmetteur.

Le récepteur est une grosse protéine qui reconnaît aussi les benzodiazépines, et qui est lié à des canaux ioniques pour Cl^- .

Les benzodiazépines ont un effet anxiolytique; ces molécules reconnaissent un site de liaison sur le récepteur GABA : au niveau moléculaire elles entraînent une transformation du récepteur et le Cl^- passent dans un certain sens.

On a réussi à synthétiser des molécules qui sont également capables de reconnaître le récepteur du GABA, mais lors de la transformation, elles font passer le Cl^- dans le sens inverse (par rapport au sens induit par les benzodiazépines).

Ces molécules de synthèses = β carbolines dont l'effet lors d'une administration est un comportement anxiogène.

COURS du jeudi 3.02
8h → 10h

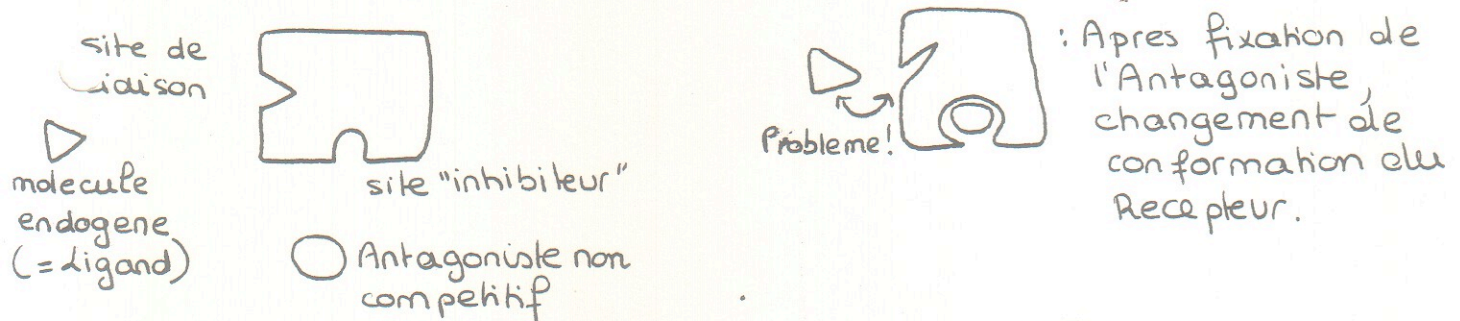
(Antagoniste) suite -

$I + R \rightleftharpoons IR \rightarrow$ Pas de réponse physiologique.

Les antagonistes peuvent être dits :

- Compétitifs : ils rentrent en compétition avec le ligand endogène sur le site de liaison. Moins de sites sont occupés, d'où la diminution de l'effet. C'est donc selon la dose administrée que l'on diminue plus ou moins les effets.

- Non compétitifs : ils limitent la liaison à l'endogène mais en reconnaissant un autre site que le site de liaison. Il y a modification de la conformation du récepteur.



- Fonctionnels. L'antagonisme fonctionnel c'est quand deux agonistes ont des effets antagonistes.

Cf l'agonisme inverse et l'exemple des β carbolines.

- Chimiques.

Attention ! Antagonisme chimique est une expression usuelle. Selon Mme MARCEL, le terme n'est pas approprié.

Conclusion au II : In vivo un système fonctionne avec des molécules endogènes.

On parle d'agoniste et d'antagoniste pour des molécules de synthèse.

Ex. d'antagonistes : antihistaminiques, β bloquants (différent/NorAdrénaline).

III. PRINCIPAUX PARAMETRES DE QUANTIFICATION DES EFFETS

Découlent de la nécessité de pouvoir comparer les molécules synthétisées à des molécules de référence (souvent des molécules endogènes ou de synthèse, mais très bien connues).

1. Les deux types de réponses

Réponse quantale / graduelle

Si on se place in vivo pour l'étude d'une molécule, on administre la molécule et on observe le comportement.

Se pose le problème de la dose pour le premier test. Un ordre de grandeur peut être précisé à partir de la structure (comparaison par rapport à des molécules connues, des structures proches, pour évaluer la posologie).

Quand ce problème est réglé et qu'on administre, deux possibilités :

- Réponse du tout ou rien

tout : réponse d'emblée maximale et ne variant plus, quelle que soit la dose administrée au dessus du seuil;

- Réponse variable en fonction de la dose.

Dans le premier cas : réponse quantale, quantifiée par la Dose Efficace 50 = DE 50, c'est-à-dire la dose efficace sur 50 % des animaux.

Autre paramètre de quantification : la Dose Létale 50 : DL 50.

Dans le second cas : réponse graduelle, mesurée par un DE 50 (in vivo) ou de 1 CE 50 (in vitro).

Dans ce cas, DE 50 = Dose nécessaire pour observer 50 % de l'effet maximum.

Remarque : CE 50 : concentration efficace 50 % de l'effet maximum.

Si on veut mesurer l'effet d'un antagoniste (on rappelle qu'il ne produit aucun effet physiologique) : on administre d'abord un agoniste et on observe un comportement spécifique. Puis, on administre une dose d'antagoniste empêchant l'action de l'agoniste. On définit une concentration inhibitrice de 50 % de l'effet évoqué ==> IC 50.

Attention ! Pour comparer des paramètres il faut s'assurer que les conditions expérimentales soient identiques.

2. Les courbes effet - dose

Ces courbes sont des sigmoïdes : $\log [\text{Agoniste}]^\circ$ en x

Réponse biologique en pourcentage de l'effet maximum en y (% E max).

Le premier point expérimental est tracé pour une concentration en agoniste # 0,1.

Le maximum d'effet est obtenu quand on atteint un plateau (effets égaux malgré une concentration croissante).

Puis les autres points sont tracés en pourcentage en se basant sur le plateau.

Remarque 1 : Si une courbe effet-dose vous est fournie en examen, vérifiez bien qu'elle soit correcte avant de vous lancer dans des calculs ! (En particulier que le plateau soit atteint).

Remarque 2 : Si la dose maximale active est déterminée avec précision, la dose minimale active est plus difficile à déterminer. On choisit comme concentration : 3 à 5 % de la concentration donnant l'effet maximum, plus précisément : la dose submaximale (la première dose donnant l'effet maximal).

- Etude des courbes effets-doses - p. 33.

* Potentialité (Puissance) et Efficacité

A et B arrivent au 100 % d'efficacité, mais la dose pour obtenir les 50 % est plus faible pour A/B.

-> A et B ont la même efficacité, mais la potentialité de A est supérieure à celle de B.

A et C n'ont pas le même 100 %
ont le même 50 %

-> A et C ont des efficacités différentes mais une même puissance.

On peut donc dire que C est un agoniste partiel de A.

* En présence d'un antagoniste compétitif.

Son administration déplace la sigmoïde vers la droite.

L'efficacité demeure constante mais la puissance est diminuée.

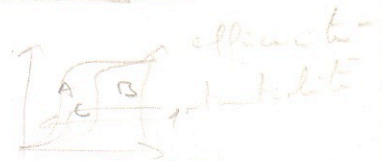
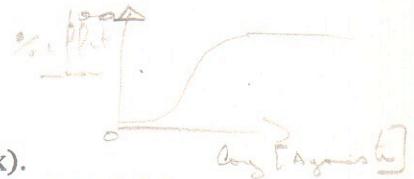
C'est logiquement dû au fait qu'une certaine dose d'antagoniste vient occuper la place de la molécule. Pour observer le même effet il faut donc une plus grande concentration.

* En présence d'un antagoniste Non compétitif.

A seul = courbe contrôle.

Puis on administre l'antagoniste.

L'efficacité n'est pas retrouvée mais la puissance est inchangée.



Même en augmentant les doses, on n'obtient pas le 100 % d'effet : ce sont les sites qui ont été perturbés.

⇒ Ces courbes sont à bien connaître.

Attention ! Retenez qu'un antagoniste **N'A AUCUN EFFET**, donc on ne parle pas de courbe d'un antagoniste mais "d'agoniste en présence d'un antagoniste" **ATTENTION !**

Illustration du chapitre par les figures des pages 35, 36, 37.

Figure n° 1, p. 35

Le signal d'entrée est la liaison Agoniste-Récepteur (A-R), il est suivi par la transduction du message (du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire) et par l'amplification et les cascades biochimiques. Enfin, signal de sortie, c'est-à-dire l'effet physiologique qu'on mesure.

Figure n° 2 : Etudes In vivo, puis In vitro.

Il est plus logique en fait de lire ce tableau de droite à gauche.

- Administration de la molécule à l'animal entier.

On observe un effet physiologique.

= Etude fonctionnelle.

- Travail sur un organe isolé. On observe alors une perturbation de fonction.

Exemple : on isole un morceau d'Iléon, on mesure l'activité contractile spontanée. Quand on administre une molécule à tester, on mesure alors l'organe en longueur.

(L'Ach par exemple est une molécule spasmogène).

- Travail sur des cellules isolées (mise en culture).

- Ou sur des fragments membranaires riches en certains récepteurs.

- Les ligands sont étudiés par la quantification de leur liaison sur des récepteurs purifiés (In vitro).

L'étude à ce niveau est la plus fine possible.

Figure n° 3

Etude comparée de deux sigmoïdes = mesure de l'effet physiologique d'un agoniste entier et d'un agoniste partiel.

L'étude se fait sur des fragments isolés de trachée.

On commence par **contracter** le muscle, puis administration d'un agoniste β adrénergique dont les effets sont inverses aux effets dûs aux récepteurs muscariniques (l'Ach provoque une contraction).

On a là un antagonisme fonctionnel.

<=> Deux effets physiologiques inverses.

Figure n° 4, p. 36

Réalisation d'une réponse graduelle.

(A-) Pour chaque dose, on mesure l'augmentation de contraction (ici due aux doses d'histamine) à chaque fois on mesure une augmentation ET un plateau.

Mais aux fortes concentrations, la contraction n'augmente plus.

(B-) Pour chaque dose on fait correspondre le pourcentage d'effet maximum. C'est ainsi qu'on obtient la sigmoïde B.

Tableau p. 37

Il rend compte de la réponse quantale.

sur

Précisions : Les convulsants chimiques agissent en général sur les récepteurs GABA (qui reconnaissent le NT et les benzodiazépines); leur utilisation permet l'étude des antiépileptiques.
L'administration d'un antagoniste du GABA augmente l'activité électrique des neurones et provoque donc la convulsion.

Ce qu'on a fait expérimentalement :

On prend deux lots de souris, on leur administre une dose fixe afin d'observer une crise convulsive mesurée.

On mesurera la capacité des antiépileptiques à limiter ces crises.

La molécule la plus puissante : Phénobarbital (≠ Valproate), mais attention ! cela ne signifie pas systématiquement que le phénobarbital est la meilleure molécule. Il faut tenir compte d'autres paramètres, regarder la fenêtre thérapeutique.

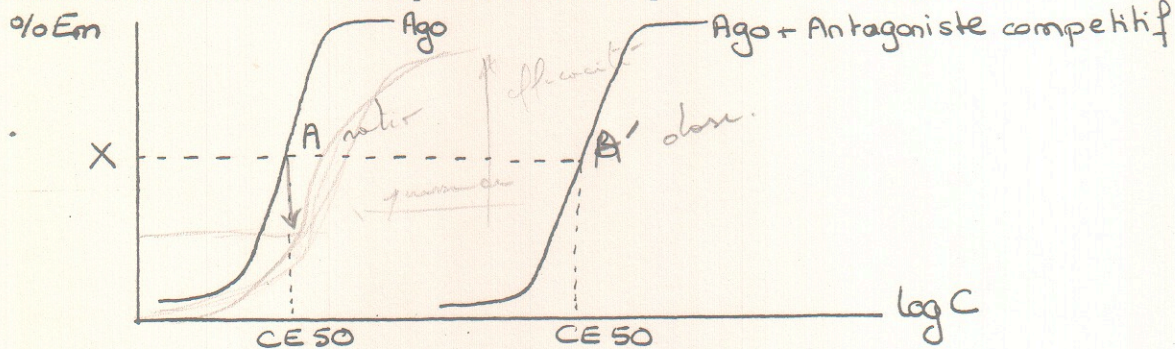
V. CLASSIFICATION DES ANTAGONISTES

Elle ne se limite qu'aux antagonistes compétitifs.

Le paramètre à déterminer = **PA 2**.

On réalise une courbe effet dose d'un agoniste seul puis d'un agoniste et de l'antagoniste, la courbe est alors déplacée.

Plusieurs expériences sont effectuées : avec une concentration fixe d'antagoniste et des concentrations croissantes d'agoniste. Ainsi, l'effet maximum reste équivalent tandis que la CE 50 est augmentée.



Mme MARCEL conseille de souligner l'équation (p. 34) :

$$\frac{A'}{A} = \frac{B}{K_D} + 1 \quad \frac{1}{K_D} = \text{affinité pour le site}$$

B = la concentration d'antagoniste

--> $\text{Log} \left(\frac{\text{dose}}{\text{ratio}} \right) = \text{log B} - \text{Log K}_D$ --> représentation graphique de Schild.

Le paramètre pA2 est défini comme le log négatif de B qui réduit l'effet d'une dose d'agoniste de moitié.

$$PA2 = -\text{log}(B) = \frac{1}{K_D}$$

donc ratio = 2

Cf p. 36 la figure n° 5.

Il faut vérifier que la représentation graphique correspondante est bien une droite, et de pente = 1 (Pour être sûrs qu'on parle bien d'un antagonisme compétitif).

$$pA_2 = -\text{log B} = -\text{log K}_D \approx \text{log } 1/K_D$$

CARACTERISATION DES RECEPTEURS ET DES LIGANDS PAR LIAISON SPECIFIQUE DE RADIOLIGANDS

I. RECEPTEURS ET SITES DE LIAISON

Si utilisation de ligands radioactifs : comptage des rayons gamma et bêta par un compteur à scintillation. (γ) (β)

Les paramètres étudiés définissent à la fois le ligand et le site, donc définissent les interactions entre les deux.

Dans ce chapitre on n'observe pas d'effets physiologiques, on mesure l'interaction Ligand-Récepteur. Il n'y a pas de liaison covalente : l'interaction est une reconnaissance REVERSIBLE. Sa spécificité dépend des conformations. Ainsi, pour deux stéréoisomères, l'un peut être actif, l'autre inactif.

II. LES CINQ CRITERES D'IDENTIFICATION DES LIAISONS

1) Affinité

C'est la mesure de la préférence d'un ligand pour un récepteur $K_A = \frac{1}{K_D}$

Plus l'affinité est élevée, plus le site est spécifique en probabilité.

Les expériences réalisées se font dans deux sens :

- recherche de ligands pour un récepteur,
- ou - recherche de nouveaux récepteurs pour un ligand.

Retenez que l'ordre de grandeur est d'environ la nM (cas d'une hormone sur son récepteur).

Si vous trouvez une affinité de l'ordre du Molaire, c'est qu'il y a un problème !

2) Saturabilité

En relation avec le nombre limité de récepteurs.

Quand [ligand]^o augmente, le nombre de liaisons augmente jusqu'à la saturation.

Mais, il existe des sites non spécifiques, qui sont, eux, en nombre illimité. En général, la reconnaissance croît avec les concentrations de ligands mais pas de saturabilité.

Or, dans les expériences (comme celles de la radioactivité), la fixation se fait aussi sur ces récepteurs non spécifiques qu'il faut donc essayer de limiter.

3) La réversibilité

Dans les expériences de liaison, on travaille à l'équilibre : vitesse d'association = vitesse de dissociation.

4) La stéréospécificité

Pour l'interaction il faut une forme tridimensionnelle précise.

5) La corrélation

Quand un organe produit un effet physiologique c'est qu'il y a eu une reconnaissance.

On établit une droite de corrélation entre effet in vivo (DE 50 ou CE 50) et reconnaissance in vitro (K_A , K_D)

Cf p. 50

Figure n° 5

On travaille sur un homogénat membranaire riche en certains sites.

On administre des ligands radioactifs.

On relève la radioactivité par un compteur à scintillation.

--> Radioactivité totale : liaisons spécifiques et non spécifiques;

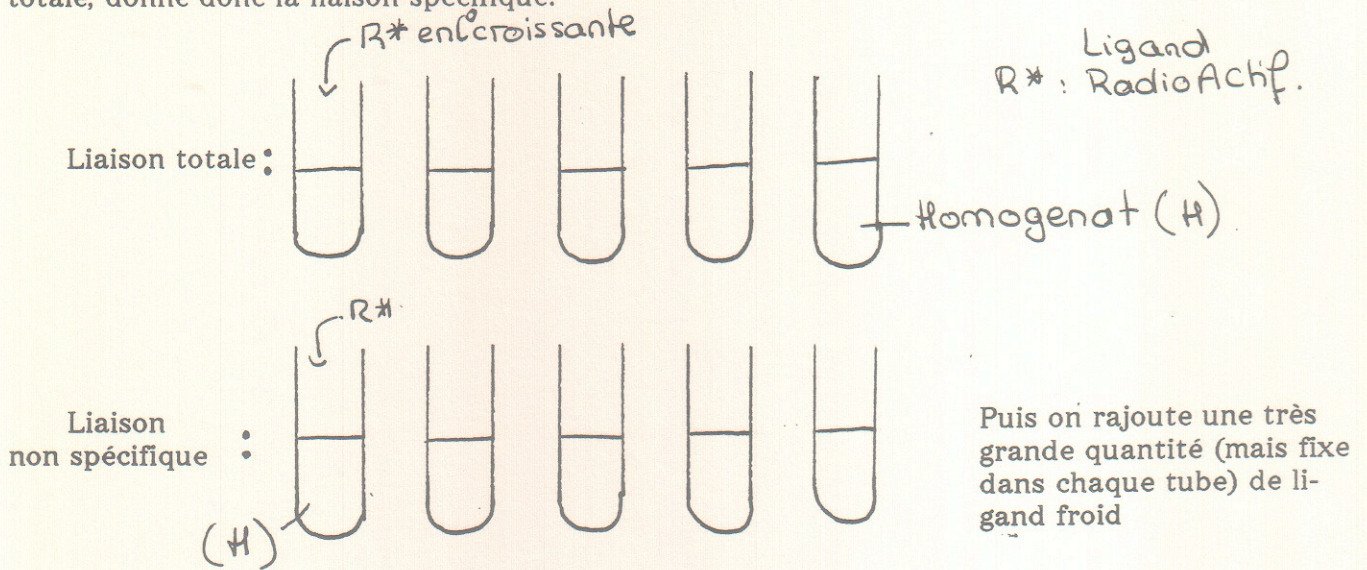
On obtient alors une courbe qui est la résultante d'une droite et d'un hyperbole.

Figure n° 6

Travail sur un homogénat membranaire + ligands radioactifs.

On veut déterminer la liaison spécifique.

Pour cela, on déterminera la liaison non spécifique et par soustraction à partir de la liaison totale, donne donc la liaison spécifique.



Donc le ligand froid \gg ligand radioactif.

Ce ligand froid reconnaît de façon encore plus spécifique la liaison : d'où le déplacement du ligand R^* hors du site spécifique.

Remarque : dpm = désintégration par minute.

Pour chaque concentration de ligand on détermine un point pour chaque expérience.
Notion de rendement du compteur.

A partir de la courbe spécifique, on définit :

- . la constante de dissociation d'un radioligand pour la moitié des sites,
- . la densité maximale des sites.

Figure n° 7 : Représentation de Scatchard.

C'est une représentation linéarisée de la liaison

$$y = \frac{B}{F} \quad \text{B pour Bound F pour Free}$$

$x = \text{ligand lié B}$

\Rightarrow droite dont la pente = $-\frac{1}{K_D}$ (Q)

et l'intersection droite/Ox donne la densité maximale des sites = Bound max (B max en pmol/mg de tissu).

Figure n° 1, p. 48 : Etude d'une corrélation

1ère méthode : Benzodiazépines ont un effet anxiolytique et myorelaxants, mesurée ici en abscisse ED 50.

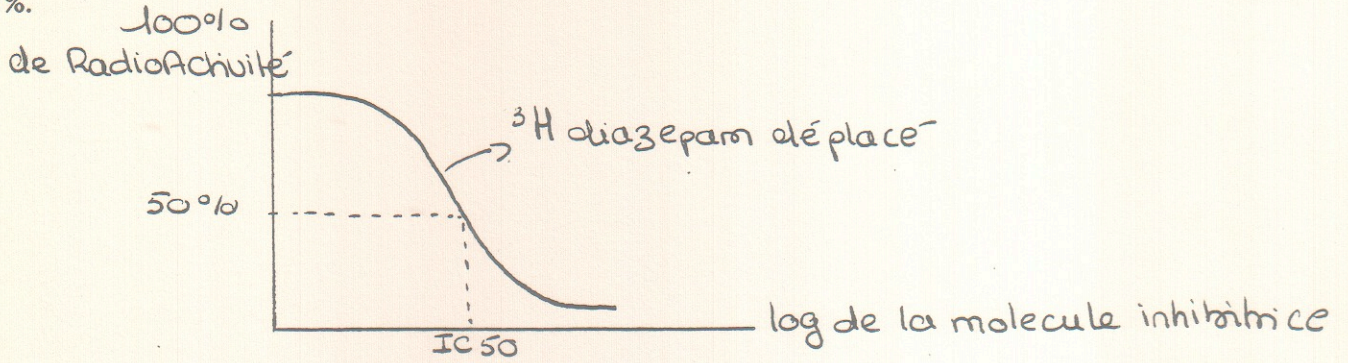
En y, Diazepam R^* (3H) mesure de son affinité sur le site de liaison des benzodiazépines.
Méthode plus simple que celle présentée ici.

Mais là, on mesure le déplacement du diazepam R^* par d'autres molécules.

Le diazepam R^* est la molécule de référence.

Dans cette expérience, on inhibe sa reconnaissance par d'autres molécules, celles qu'on veut étudier (supposées myorelaxantes).

On a pris le K_i = concentration de la molécule froide inhibant la liaison au niveau du site à 50 %.



Cet IC_{50} permet de calculer le K_i = constante d'affinité de la molécule inhibitrice pour la liaison.

Pour toutes les molécules, la corrélation est environ 0,8.

L'idéal est une corrélation égale à 1, mais cela ne se trouve pas.

$r = 0,8$ traduit : Si on a un effet myorelaxant par ces molécules inconnues, c'est que l'effet est médié par le site GABA-benzodiazépines.

==> L'effet physiologique reflète donc ce qui se passe au niveau moléculaire.

Fin du cours qui ne reprendra
que la semaine du 28 Février.

A propos des EDs : Il y en aura 3. Deux séances d'exercices et une 3^{es} au choix : portant soit sur la Tolérance / Dépendance, soit sur une Révision du cours en Amphi. Dans ce cas, il faudrait poser vos questions à D. MARCEL à l'avance.

Suite du chapitre :

**CARACTERISATION DES RECEPTEURS ET DES LIGANDS
PAR LIAISON SPECIFIQUE DE RADIOLIGANDS (p. 38)**

RAPPEL : On a vu que ce chapitre concerne surtout les expériences in vitro où on étudie :
. un radioligand (L*) pour quantifier le nombre de molécules se fixant de façon réversible sur le site de liaison. $L^* + Récepteur (R) = Quantification\ des\ sites\ de\ liaison.$ Cette expérience caractérise donc les deux partenaires de la liaison.

Etude :

- . Soit d'un nouveau ligand qu'on va comparer à un ligand déjà connu. On utilise alors un homogénat riche en un certain type de Récepteurs.
- . Soit étude d'un récepteur, on n'emploie alors que des ligands connus.

A propos des critères d'identification des liaisons : ces critères sont à bien connaître.

Quand on travaille sur des molécules qui fixent un ligand, pour qu'elles soient appelées Récepteurs, il faut qu'elles répondent aux 5 critères.

Deux étapes : l'expérience in vitro,

- . la corrélation in vivo / in vitro : elle permet d'affirmer que ce qu'on observe est le fait de la liaison L - R. Et dans ce cas, les paramètres de caractérisation sont ceux établis in vitro.

Un récepteur ne se limite pas à fixer une molécule (dans ce cas on ne parle que de "site de liaison"), mais il est capable de transférer une information.

III. METHODES D'ETUDE DE LA LIAISON

Elles sont peu nombreuses mais importantes.

Remarque : Trois villes seulement en France possèdent un cyclotron (accélérateur de particules permettant des examens médicaux, neurologiques, cardiologiques). Paris, Caen et Lyon, c'est donc une chance pour nous et D. MARCEL a insisté sur les possibilités de visite du centre où il se trouve (dans l'hôpital neurocardio). Elle propose donc qu'on lui présente une liste de 6 à 8 étudiants avec dates, etc...

1. Liaisons sur des préparations sub-cellulaires

Méthode d'étude in vitro avec des molécules radioactives et un homogénat membranaire riche en récepteurs : préparation sub-cellulaire.

En pratique : Disséquation du tissu qui nous intéresse, placé dans une solution isotonique, traité avec différents tampons, puis centrifugation. On obtient des fragments membranaires non altérés : maintient du récepteur dans sa forme tridimensionnelle.

L'homogénat est mis dans un tube à essai.

Quand on recherche un récepteur, on agit de façon moins précise : on prend différentes préparations et le ligand reconnaissant le Récepteur.

On réalise les expériences sur les homogénats membranaires.
(Cf Les expériences déjà décrites avec la série de tube à essai).

2. Liaisons sur des coupes de tissu

Tissu --> congélation (dans l'azote liquide ou l'isopentane) permet la conservation de la structure du tissu.

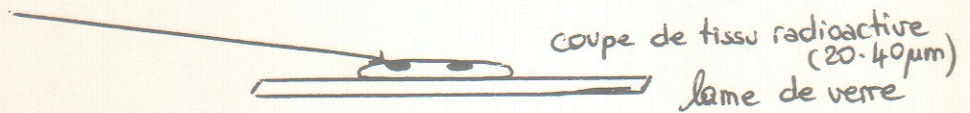
Puis coupes très fines du tissu, réalisées dans une enceinte froide. Les coupes sont placées à incuber avec le ligand Radioactif. (Les coupes sont faites dans des régions riches en R).

La reconnaissance de la liaison se fait à température normale (et non plus à froid).

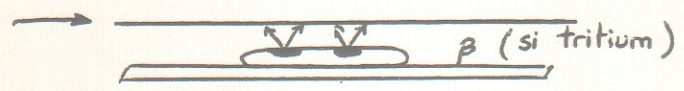
Puis lavage (pour éliminer la liaison non spécifique).

Enfin, on fait une Autoradiographie (basée sur la même technique que la photographie).

Reconnaissance des ligands *



Film recouvert d'une émulsion contenant des grains d'Ag, donc sensible aux rayonnements émis.



Comme avec une pellicule photo, il y a imprégnation, puis le film est mis dans un révélateur --> Images des structures qui émettent le rayonnement.

Intérêt des coupes ^{par rapport aux} homogénats : la Résolution est supérieure, montre dans la structure où se trouvent exactement les récepteurs.

Importance de cette technique, c'est une méthodologie très souvent employée en Industrie pour le screening des molécules.

Point important : la Séparation : généralement, pour être sûr de reconnaître tous les récepteurs, on met du ligand en excès.

Après, il faut laver pour séparer le ligand libre de celui fixé (éviter les interférences sur l'autoradiographie).

Cf poly p. 49 pour exemples d'autoradiogrammes.

3. Etude de la liaison in vivo

Application à l'hôpital à but diagnostic.

On utilise la connaissance de la présence de certains Récepteurs dans certaines structures (coeur, cerveau).

On visualise la liaison d'un ligand avec son récepteur, celle-ci est perturbée lors d'une pathologie.

a) Tomographie par émission de positrons

Bien lire ce paragraphe.

Les "substances" : ce sont les molécules marquées reconnaissant des récepteurs.

Couplage avec la visualisation du métabolisme de l'organe observé (en général, le métabolisme du glucose).

On met en évidence, l'emploi du glucose dans l'organe malade, souvent hypométabolisme.

Dans les expériences faites in vitro, les molécules marquées doivent l'être avec des atomes dont le temps de demi-vie est long (car nécessité du temps de l'expérience, temps d'apposition avec le film); si t 1/2 est trop court, le signal diminue trop.

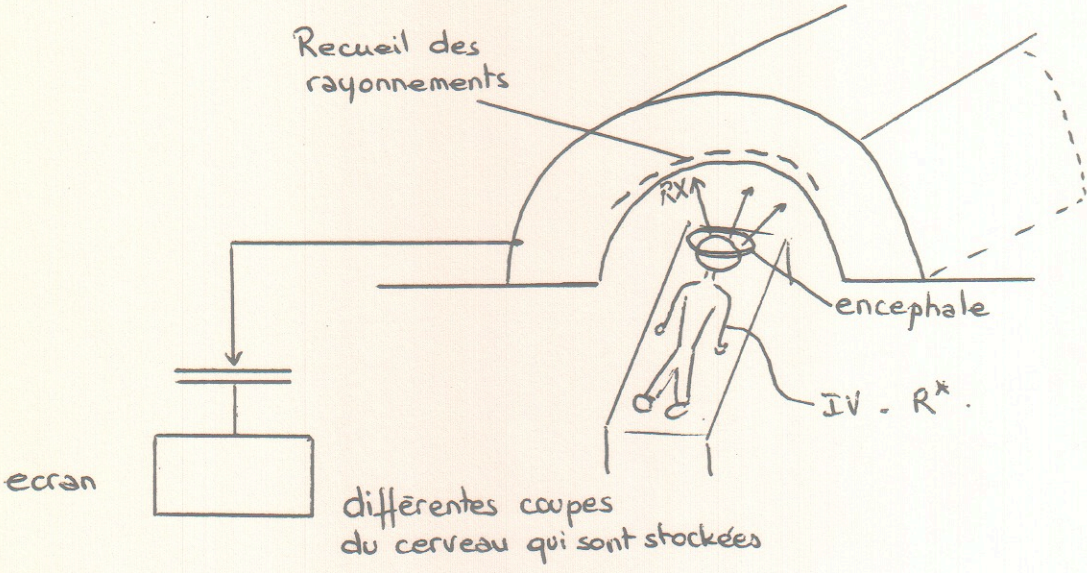
Ex du tritium ³H, ¹⁴C, ¹²⁵I (t 1/2 = 60 j).

Par contre, quand on injecte une molécule RadioActive in vivo, on a intérêt à prendre un atome dont le t 1/2 est de quelques minutes (décroissance radioactive rapide).

Ex ¹¹C, ¹⁸F : les plus classiques.
Cf tableau dans poly sur toutes les molécules utilisées.

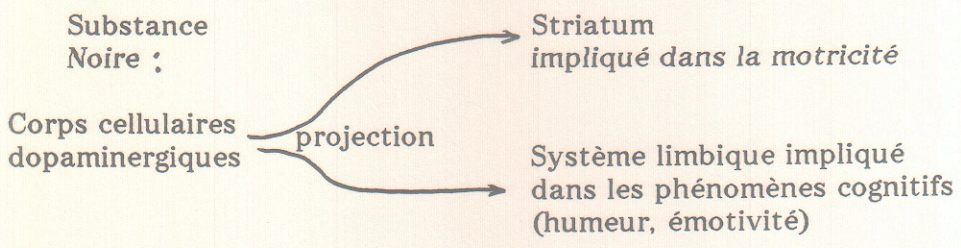
On suit le devenir de la molécule radioactive en détectant les désintégrations.

Schéma d'un cyclotron :



Cette méthodologie est utilisée sur les hommes et les animaux.
Exemple de pathologies explorées par cette méthode:

- / Neurologie :- Iskémie : Anoxie (baisse O2 et nutriments), tendance à la dégénérescence des tissus; on visualise la zone de nécrose.
- Epilepsies. Les neurones présentent normalement des phénomènes électriques.
Dans l'épilepsie, il y a embrasement de ce phénomène.
+ Les foyers épileptiques présentent des modifications de métabolisme.
- Maladie de Parkinson.



Avec cette méthode, évaluation de la dégénérescence de ces fibres dopaminergiques.

- Démence sénile

C'est une dégénérescence de système très spécifique.
Maladie d'Alzheimer : atteinte du système cholinergique.
On met en évidence des récepteurs muscariniques. IIS
Permettent d'étudier l'évolution du degré de la maladie.

- / Cardiologie :- Iskémie. On peut visualiser la zone de nécrose.
- Greffe : applications dans des cas particuliers par exemple, pour voir si les Récepteurs β cardiaques sont en quantité suffisante.

/ Tumeurs : Une grosse tumeur est très vascularisée, donc elle consomme beaucoup d'O₂ et la consommation de glucose est augmentée.

b) Exemples de Récepteurs étudiés in vivo

- Les R. dopaminergiques et la Maladie de Parkinson.

C'est au niveau du striatum qu'on retrouve les R. dopaminergiques en position post-synaptique.

Ex. : R. dopaminergiques D₂.

La dopamine reconnaît 5 sous-types de R : D₁ D₂ D₃ D₄ D₅ dont les pharmacologies sont différentes.

Quand un sujet est atteint de la maladie de Parkinson, on explore les R. D₂ à l'aide de molécules spécifiques comme le raclopride.

La maladie de Parkinson est une dégénérescence des fibres dopaminergiques qu'on traite par un précurseur de synthèse : la L. dopa. Cette substance est donnée à la périphérie de l'organisme et est capable de passer la barrière hémato-encéphalique.

On peut alors voir chez le patient traité des modifications, c'est-à-dire une efficacité de la L. dopa :

La densité des R. chez un sujet non traité est égale à celle d'un sujet normal.

Tandis que chez le sujet traité à la L. dopa, cette densité des R. diminue.

Si le sujet subit un traitement prolongé à la L. dopa, son organisme ressent un surplus de neurotransmetteur et pour compenser, les R. diminuent en nombre.

Il faudra donc ajuster le traitement.

- Les Récepteurs du GABA et Mu des peptides opioïdes dans l'épilepsie.

Les enképhalines ont différents sous-types de Récepteurs.

Le Flumazenil (¹¹C) est un antagoniste du R. du GABA.

Remarque : Le problème d'un antagoniste c'est qu'il n'existe pas in vivo; son emploi est donc un artifice technique qui se justifie car il est en général plus facile à utiliser que l'agoniste.

Dans ce cas (R. du GABA), les agonistes ont des affinités trop faibles pour avoir une liaison qu'on puisse visualiser --> l'emploi de l'antagoniste s'impose.

→ Le Flumazenil (¹¹C) permet d'observer les foyers épileptogènes. (Sa liaison est diminuée à leur niveau).

Le R. du GABA peut reconnaître le GABA qui est ^{un} neurotransmetteur inhibiteur : la cellule post-synaptique est inhibée car le R. du GABA est une grosse protéine qui laisse entrer les Cl⁻ d'où une hyperpolarisation de la cellule.

Or, l'épilepsie est un embrasement des neurones (l'activité électrique est décuplée). Les neurones sont alors constamment dépolarisés, les systèmes de régulation sont perturbés, l'inhibition n'est plus possible.

Dans ces foyers épileptogènes, les récepteurs Mu augmentent. Ces R. Mu sont reconnus spécifiquement par des molécules comme le Carfentamil --> localisation très spécifique.

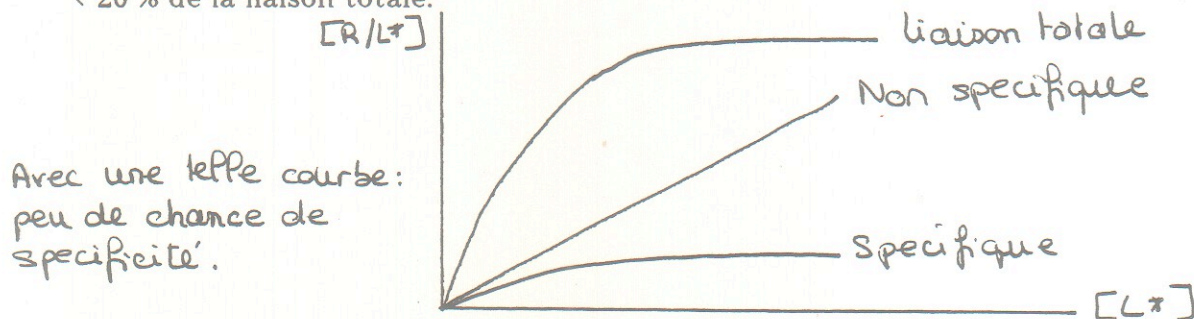
IV. DETERMINATION DE LA LIAISON SPECIFIQUE

Cf l'expérience avec la série de tube (liaison totale/liaison non spécifique à caractère insaturable).

La différence entre les deux donne l'hyperbole caractérisant la liaison spécifique.

Dans cette expérience, on rappelle que l'excès de ligand froid représente 1000 fois le ligand RadioActif.

Et pour que la liaison soit dite spécifique, il faut que la liaison non spécifique soit égale ou < 20 % de la liaison totale.



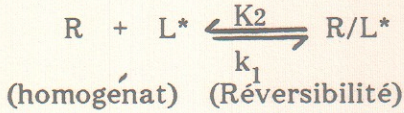
V. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE LA LIAISON D'UN RADIOLIGAND

Scatchard a caractérisé R/L* en linéarisant l'hyperbole.

1. Les caractéristiques de la liaison

* K_D

Il est défini à l'équilibre association/dissociation :

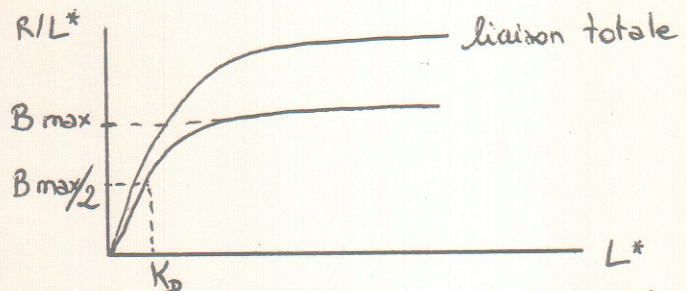


La constante de dissociation K_D est le rapport des vitesses de dissociation / vitesse d'association : $K_D = \frac{[R] \cdot [L]}{[R/L]}$ défini à une certaine température et pendant un certain temps.

⚠ Ce n'est que lorsque l'équilibre association / dissociation est atteint qu'on a le droit d'appliquer la relation de Scatchard.

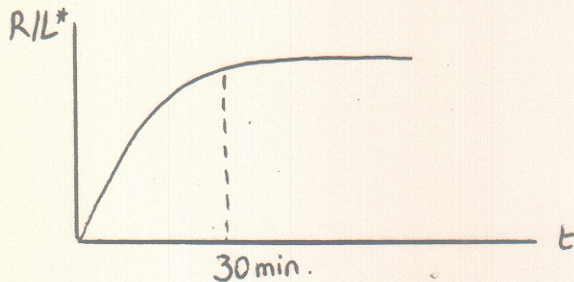
Courbe de saturation correcte :

B max = densité maximale des sites
(quand atteinte d'un plateau)

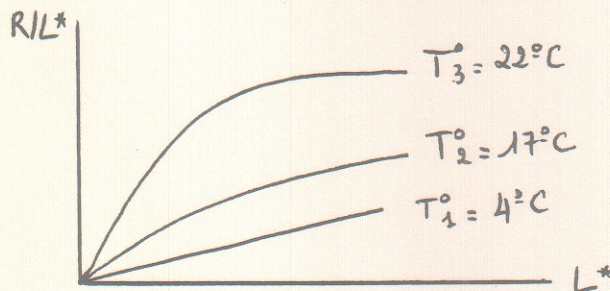


B max et K_D ne se définissent qu'à une certaine température et après un certain temps d'incubation.

Cela suggère donc qu'avant cela, on a dû faire des cinétiques de liaison (= f(t)) et des expériences de température (= f(T°)).



pour $t < 30$ min., tous les récepteurs ne sont pas encore reconnus.



T° appliquée pendant 30 min.

T° 1 : L'Equilibre (plateau) n'est jamais atteint.

T° 2 : On atteindra le plateau mais au bout d'un temps long.

A T° 3 : $R + L^* \rightleftharpoons R/L^*$

→ Dans les conditions expérimentales, il faut savoir quand on a Association / Dissociation, pour avoir le droit d'appliquer la relation de Scatchard.

Remarque : La constante d'association $K_A = \frac{1}{K_D}$.

En général on travaille avec le K_D .

Il existe un tableau comparatif des K_D de différentes molécules. Plus K_D est petit, plus l'affinité est grande.

*** B max**

Dans l'expérience avec les tubes à essai, la densité totale de Récepteur = R reconnu + R. non reconnu (à l'instant t).

2. La représentation de Scatchard

A t, on établit l'équation de l'hyperbole :

Le complexe $[R/L^*]$ = la fraction liée de R = B

$$= \frac{(Rt) \times (L^*)}{K_D + L^*}$$

A partir de ces équations, remaniements jusqu'à la linéarisation de l'hyperbole.

A savoir :

$$\frac{B}{F} = - \left(\frac{1}{K_D} \right) \times B + \frac{B \text{ max}}{K_D}$$

$B = R/L^*$

$F = L^*$ non lié

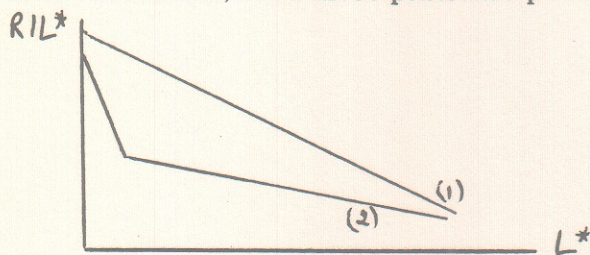
Equation de la forme : $Y = -AX + B$.

La pente $\rightarrow K_D$.

L'intersection droite sur abscisse (= ordonnée à l'origine) $\rightarrow B \text{ max}$.

Ce type de droite correspond au cas le plus simple où il y a une seule classe de site.

Mais si dans une préparation il y a différents R capables de reconnaître le Ligand avec des affinités différentes, on a alors plusieurs pentes.

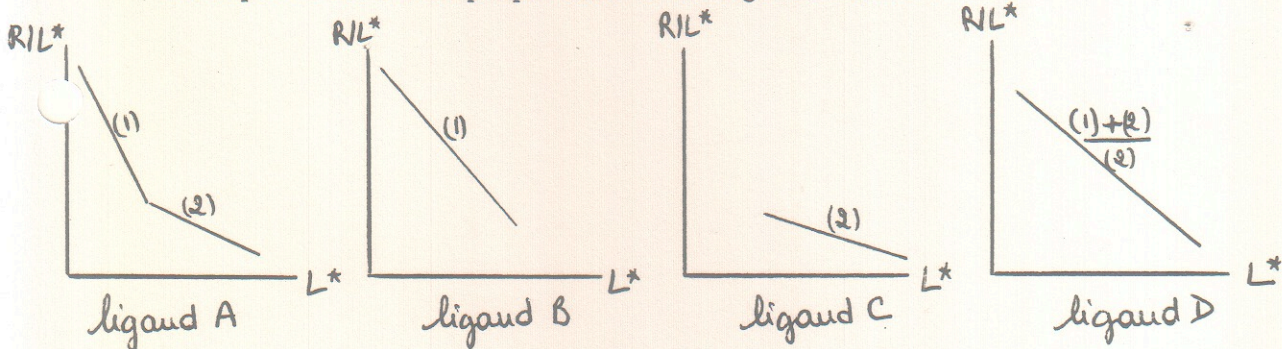


(1) : cas le plus simple où la pente = $- 1/K_D$

(2) : deux pentes. Le ligand est donc capable de reconnaître deux classes de sites, deux affinités différentes.

\rightarrow Intérêt pour la mise en évidence de sous-types de Récepteurs.

Exemple d'une même préparation d'homogénat membranaire.



Il reconnaît les sous-types (1) et (2)

Il ne reconnaît que le sous-type (1)

Il ne reconnaît que le sous-type (2)

Fournit une pente moyenne le ligand D reconnaît les 2 sous-types mais avec la même affinité.

La deuxième heure du cours a consisté à visualiser quelques diapos.

1) Trois niveaux de coupes sagittales du cerveau chez un sujet Normal.

Marquées par le Doprénorphime : tout le cerveau est marqué + le cervelet.

Marquées au Carfentamil : peu de structures marquées excepté le thalamus (qui contient donc beaucoup de R. Mu).

Remarque : Le cortex n'est pas du tout marqué.

Importance donc des molécules spécifiques de certains sous-types de R. pour focaliser des zones d'intérêt.

2) Administration de Carfentamil chez un patient.

On visualise les Récepteurs Mu et en parallèle étude du métabolisme du cerveau.

Il y a augmentation de la densité des R. Mu dans le temporal gauche et réduction de la consommation d'O₂.

3) PET (Positron Emission Tomography)

Etude chez un sujet Normal / Parkinsonien.

Normal : 2 taches noires = Striatum.

Parkinsonien : taches plus réduites, il y a donc ^{eu} altération des structures.

4) Visualisation des Récepteurs D2 dans différentes pathologies

Le marquage est très spécifique (molécule type ¹⁴C).

4 coupes : niveau dorsal → ventral.

Chez le sujet normal : 2 taches représentant le striatum.

Chez le parkinsonien : diminution des récepteurs.

Chorea H : (Maladie ou dégénérescence importante des neurones) très forte diminution des structures portant les R. D2.

à
vérifier { Les pathologies où les R. D2 sont en baisse sont traités par des neuroleptiques : Ce sont des antagonistes dopaminergiques, ils bloquent les D2. Donc dans 1-2^{es} temps disparition de ceux-ci. Puis par effet compensatoire : Réapparition de ces Récepteurs.

5) Récepteurs muscariniques

Ligand = QNB

2 coupes → visualisation des R. muscariniques à deux niveaux.

+ 2 coupes → visualisation du métabolisme du patient.

Essai sur la maladie de Pick : c'est une dégénérescence frontale.

6) Etude pour évaluer les problèmes de dépendance à la Nicotine

Travail chez un fumeur et non fumeur.

On marque les R. Nicotiniques avec de la Nicotine ¹¹C.

3 coupes "Non fumeur" → R. nicotiniques moins fortement marqués que sur les 3 coupes "fumeur". Chez le fumeur, il y a donc augmentation de la densité des Récepteurs Nicotiniques. Lorsqu'il existe une dépendance à la Nicotine, on cherche à limiter cette densité en R.

Un travail a également été fait sur la stéréosélectivité de la Nicotine (Cf la spécificité des R.).

La forme Levogyre (-) est capable de reconnaître les R. de façon plus intense que la forme dextrogyre (+).

7) Visualisation des R. marqués au Flumazenil (antagoniste du R. de GABA) couplée à l'étude de la consommation de Glucose

Recherche du ligand le plus spécifique et marquage avec l'atome dont le rayonnement émet à faible distance (plus la distance est petite, plus la précision est grande).

8) Visualisation des R. D2 avec un antagoniste marqué au ^{14}C chez quelqu'un ayant une tumeur dans l'hypothalamus (atteinte de la sécrétion de prolactine --> hyper prolactinémie).

On est capable de mesurer la liaison totale (Raclopride) juste avant : marquage froid pour protéger les sites non spécifiques (Halopéridol = neuroleptique).

La différence fournit le marquage des D2.

9) L'étude des molécules *in vitro* est suivie des applications *in vivo* : Nécessité d'établir des courbes cinétiques dans le striatum, le cortex et le cervelet.

En général, le temps nécessaire \approx 15 à 30 min.

On travaille sur des personnes volontaires = témoins.

SUITE DU CHAPITRE EN COURS (p. 45)

3. Coopérativité entre les sites

Les Protéines Réceptrices sont de grosses molécules avec un ou plusieurs sites de liaison. Dans le cas où il y a plusieurs sites, possibilité de liaison avec plusieurs molécules de Ligand.

Un phénomène arrive souvent : l'Interaction entre les sites.

Un site reconnaît un ligand, de là, changement de conformation de la protéine réceptrice. Cette variation de la forme tridimensionnelle conduit à une variation de l'affinité des autres sites pour les autres molécules de Ligand.

Cette "Interaction allostérique" définit la coopérativité entre les sites et l'indice de coopérativité (\Leftrightarrow quantification).

Coopérativité positive : l'affinité est augmentée.

Coopérativité négative : l'affinité est diminuée.

On mesure cette coopérativité en mesurant le "nombre de HILL". Il existe une représentation graphique pour déterminer ce coefficient.

$n_H < 1$ coopérativité (-)

$n_H > 1$ coopérativité (+)

Attention ! La représentation graphique est à connaître :

$$\frac{\log(B)}{(B_{max} - B)} = n \log L^* - \log K'_D$$

B_{max} = Densité maximale des sites.

B = Sites reconnus à l'instant t.

K_D = constante de dissociation du Ligand sur le site.

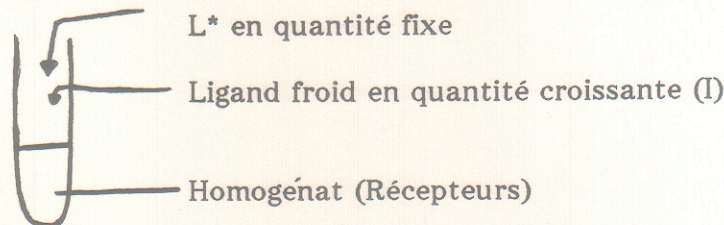
K'_D = Constante de dissociation après la coopérativité.

$R + nL \xrightleftharpoons{K_D} RLn$
avec $RLn = B$
 $R = B_{max} - B$

VI. LES EXPERIENCES DE COMPETITION

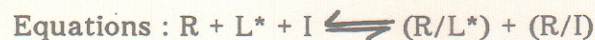
Elles sont très utilisées dans l'industrie pharmaceutique car il n'est pas toujours possible de fixer la radioactivité sur le Ligand de choix.

Etude : on met en compétition le Ligand froid à tester avec un Ligand radioactif connu.



Plus il y a de Ligand froid, plus la compétition est importante, donc la molécule radioactive est de plus en plus déplacée. On observe une diminution de la radioactivité. Le graphe présente une sigmoïde décroissante.

A l'inhibition de la moitié du L^* , correspond l'IC50 (concentration inhibitrice de 50 % de la liaison R- L^*).



K_I = constante d'inhibition de I, caractérise I.

Si on considère qu'on travaille à l'équilibre, connaître l'équation qui détermine le K_I :

$$K_I = \frac{IC_{50}}{(1 + L^*)/K_D}$$

IC 50 : mesure expérimentale sur la courbe.

L^* : concentration de L^* utilisée.

K_D : constante de dissociation du L^* .

$\Rightarrow K_I$ caractérise l'Interaction de la molécule inhibitrice .

Roque : Les expériences de compétition sont encore appelées expériences de déplacement.

Astuce : Si pour l'expérience on choisit $[L^*] = K_D$, alors K_I devient $K_I = \frac{IC_{50}}{2}$

Au prochain cours, ce chapitre sera illustré par l'étude de différents graphes.

Avant de passer aux graphes, retour sur deux notions importantes qui n'avaient pas été très claires :

1) A propos des antagonistes

Une molécule antagoniste est une molécule sans effet physiologique.

Exemple d'un système de neurotransmetteur : le système des Récepteurs opioïdes (NT naturels = enképhalines, endorphines).

Il existe différents sous-types de ces Récepteurs et on recherche à fabriquer de nouvelles molécules qui se comportent comme des Antagonistes ou Agonistes selon les sous-types.

Les Agonistes partiels peuvent être employés comme Antagonistes : leur courbe effet dose n'atteint jamais les 100 %.

Si expérience in vitro et travail sur des organes isolés, la courbe effet dose fournit la CE 50 de l'agoniste entier qui est la même pour l'agoniste partiel.

Si expérience in vivo : deux possibilités :

- administration d'un agoniste, pour palier au déficit de la molécule endogène,
- ou administration d'un antagoniste.

C'est une molécule compétitive : elle prend la place de la molécule endogène (**Attention !** celle-ci existe toujours).

L'effet biologique ressenti est alors l'effet de la molécule endogène (= Agoniste) moins l'antagoniste injecté.

Or, pour diminuer l'effet d'un agoniste entier, on peut aussi administrer l'Agoniste partiel. En effet, celui-ci prend la place de l'Agoniste entier et induit donc un effet moindre.

==> L'effet observé est GLOBALEMENT diminué par rapport au Ligand endogène, donc comme lors de l'administration de l'antagoniste.

(Cette diminution est justement ce qu'on cherche à faire dans une pathologie).

L'intérêt d'employer un Agoniste partiel plutôt qu'un antagoniste dépend de la molécule. En général, c'est une question de marges thérapeutiques. L'Agoniste est préféré pour des raisons de Pharmacocinétique.

Retenir : Il est toujours important de savoir à quel système on s'adresse. S'il s'agit d'un agoniste partiel in vitro, on parle de Courbe Effet Dose.

Si l'expérience est in vivo, on parle de comportement, d'un paramètre physiologique diminué ou augmenté.

Ces notions peuvent être compliquées, elles le sont avec les synthèses de plus en plus fréquentes de molécules de plus en plus spécifiques. Des textes récents font état de la complexité de la Pharmacologie. Ainsi, des molécules peuvent se comporter comme Agoniste ou Antagoniste en fonction de l'état physiologique.

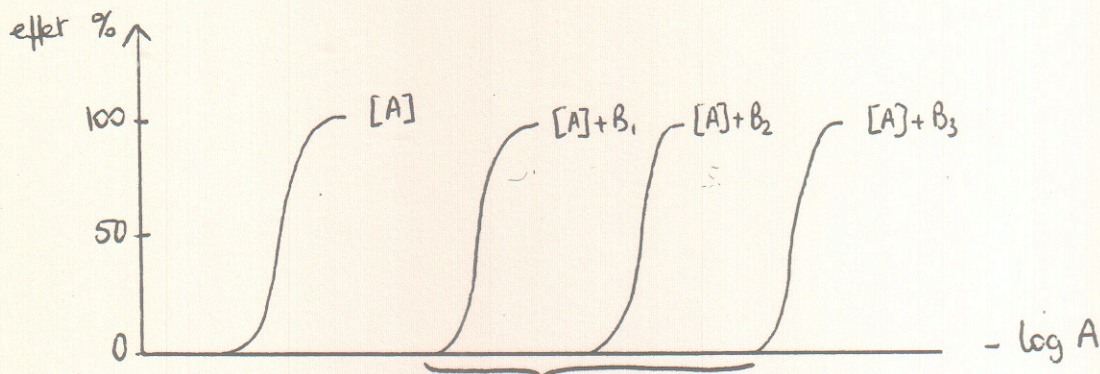
Explication : Les récepteurs sont des protéines, donc sont synthétisés et dégradés. Entre ces deux étapes, le Récepteur est fonctionnel <==> le Récepteur est un système dynamique.

Selon les états physiologiques, une certaine quantité de Récepteur est exprimée, une autre reste à l'intérieur de la cellule, c'est la réserve de Récepteurs qui peuvent être apportés rapidement à la surface pour être fonctionnels.

Nouveaux termes employés en pharmacologie : "Antagonistes silencieux"; ce sont des antagonistes purs, c'est-à-dire que quelle que soit la physiologie, ce ne sont que des Antagonistes.

2) A propos du pA2

"Dose ratio" = Rapport de dose, c'est donc un anglicisme pour exprimer le rapport A'/A .



même courbes mais translatées par l'antagoniste compétitif (pente et effet max. sont conservés).

B = concentration de l'antagoniste.

A = concentration équivalente en absence d'Antagoniste.

A' = concentration d'agoniste nécessaire en présence d'Antagoniste.

K_{DB} = constante de dissociation de l'antagoniste B .

$$\text{Dose ratio} = \frac{(A')}{(A)} = \frac{(B)}{K_{DB}} + 1 \quad \log \left(\frac{A'}{A} - 1 \right) = \log B - \log K_{DB}$$

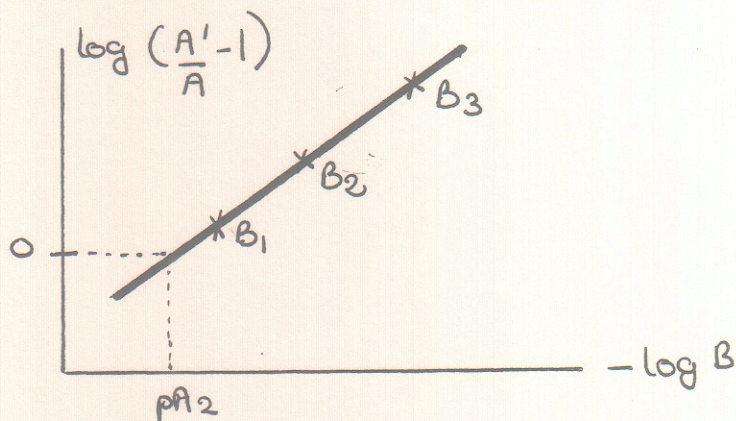
Au vu des courbes :

Pour avoir le même effet physiologique, il faudra augmenter la concentration de A .

On a le droit de classer les Antagonistes compétitifs en établissant un graphique de SHILD.

Le pA2 est un paramètre utilisé en Pharmacologie pour comparer la puissance des antagonistes.

Graphique
de
SHILD



Quand $\frac{A'}{A} = 2$ alors $\log \left(\frac{A'}{A} - 1 \right) = 0$

C'est-à-dire que pour conserver l'effet, on a doublé la dose d'Agoniste en présence d'Antagoniste.

Le pA2 est donc une caractéristique de l'Antagoniste.

Attention ! Tous les paramètres sont définis pour certaines conditions expérimentales; En général, ces conditions sont indépendantes de l'agoniste.

Graphes du chapitre III. p. 48

Figure 1. : corrélation in vitro / in vivo.

La quantification in vitro est faite par K_p , in vivo par la KI 50 on a effectué une droite de corrélation à partir d'une série de molécules.

Là, le coefficient de corrélation $r \neq 0,8$ ce qui est bon (r doit être égal ou $> 0,65$). Cela signifie que les effets observés sont bien médiés par ce qui se passe in vitro.

p. 49 : Figure 3.

Photocopies de Radioautogrammes.

Des coupes de cerveau de rat ont incubés avec un Ligand L^* et on visualise ainsi les Récepteurs dopaminergiques.

- (A) : L^* , D2 + D3
- (B) : ARNm, D2
- (C) : ARNm, D3

Figure 4.

- (a) : RT, BZD1 + BZD2 (BZD = benzodiazépines) $R_T = \text{Recepteurs totaux}$
- (b) : R, BZD2
- (c) : $a - b \implies$ BZD1
- (d) : Liaison non spécifique.

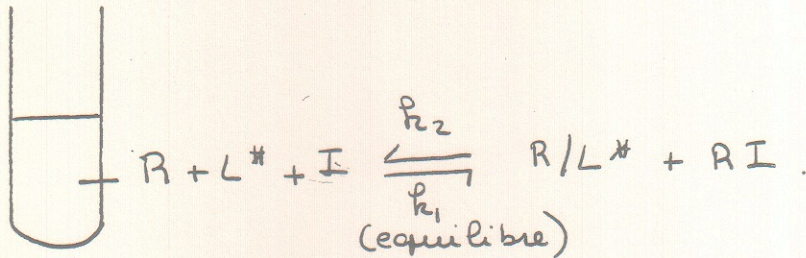
Remarque : Plus on a de sous-types de Récepteur, plus la molécule est impliquée dans les différentes fonctions.

Figures 7/8. - p. 50.

Représentation de Hill $\rightarrow -nH >$ ou < 1 ?

Rappel : la coopérativité est l'interaction de différents sites sur une même molécule réceptrice.

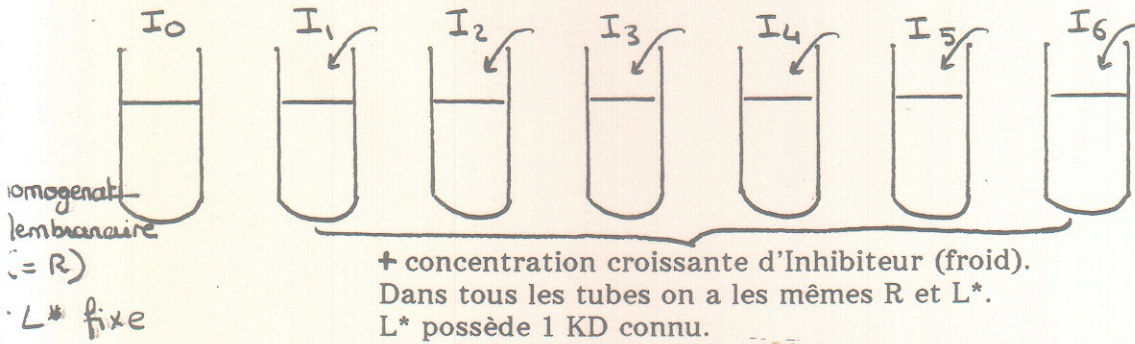
Figures 9/10 - p. 51 : Expériences de compétition.



Il a fallu au préalable déterminer une certaine température et un certain temps d'incubation.

Ce qu'on veut établir, c'est l'interaction de I sur R.

(Rappel : I est froid, différent de L). Pour cela, on réalise une courbe de déplacement :



+ concentration croissante d'Inhibiteur (froid).

Dans tous les tubes on a les mêmes R et L^* .

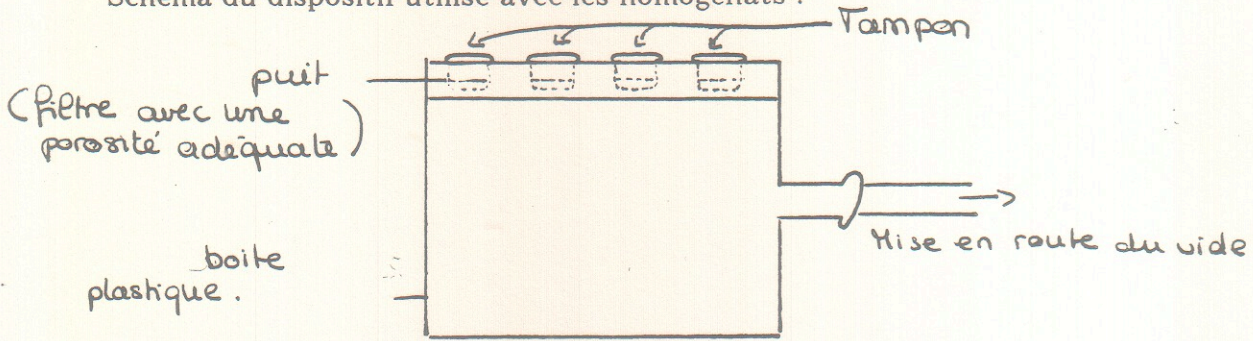
L^* possède 1 KD connu.

Les concentrations de I entrent en compétition croissante avec le L^* sur le récepteur.

La courbe de compétition traduit la diminution de radioactivité.

Remarque : Comment se fait le lavage, c'est-à-dire l'élimination de la radioactivité parasite ?

Schéma du dispositif utilisé avec les homogénats :



La filtration par le vide retient le complexe R/L* et élimine le Ligand L* libre. R/L* se retrouve sur le filtre qui est séché puis passé dans un compteur à scintillation.

En ce qui concerne les coupes, la filtration n'est pas possible : on rince plusieurs fois, tout ce qui est libre passe dans le tampon de rinçage. Puis la coupe est apposée sur le film.

Figure 10. Travail sur les R. muscariniques avec L froid : 3HQNB.

Tracé des sigmoïdes décroissantes des Ligands muscariniques dans une expérience de compétition.

On exprime la liaison en pourcentage.

Les 100 % de liaison correspond au tube sans I (= I₀).

Chaque autre point représente les autres tubes.

Attention ! Pour chaque tube, on établit la liaison totale, la liaison non spécifique et c'est par déduction qu'on détermine la liaison spécifique.

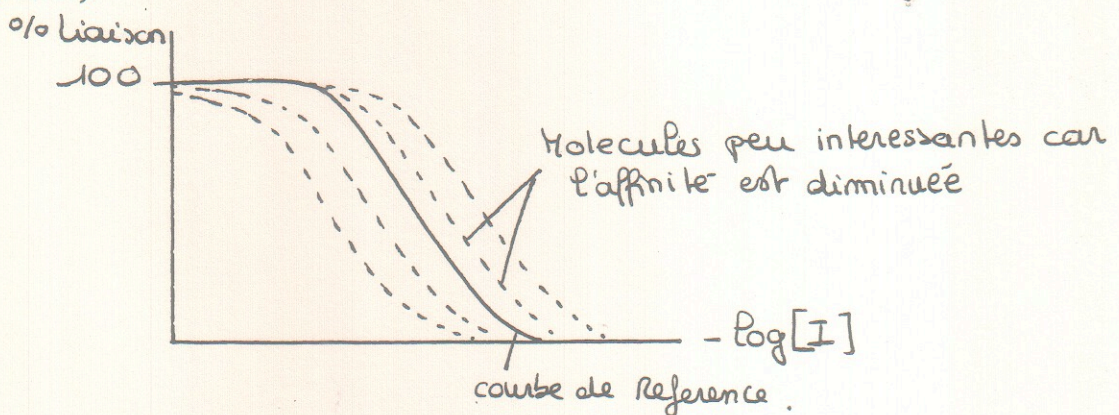
Figure 9. : Une seule courbe.

Au 50 % on définit la CI 50.

Si travail astucieux : on choisit L* = KD, d'où KI = IC 50/2. Or, pour l'inhibiteur I : KI = KD.

Remarque : Attention ! Quand lecture d'un texte, une même molécule peut être I ou L, tout dépend des conditions expérimentales.

Retenir, que plus une molécule est intéressante, plus son KI est petit (c'est-à-dire plus son affinité est grande).



Conclusion du chapitre :

Exemple d'un système de neurotransmission : Le système dopaminergique : Au niveau endogène, la dopamine peut reconnaître 5 sous-types de Récepteurs différents. La dopamine induit une pléiade de fonctions physiologiques telle la motricité (R. dans le néostriatum), la fonction de cognition (= l'humeur, R. dans le système limbique), la fonction endocrinienne (R. dans l'hypothalamus).

Lors d'un dysfonctionnement à un seul niveau, exemple : la schizophrénie (problème de neuropsychiatrie) seuls les phénomènes cognitifs sont impliqués. On recherche donc des médicaments qui n'agissent que sur certains sous-types.

Le problème des médicaments actuels c'est que leur action n'est pas suffisamment ciblée, ils pallient au déficit du système dopaminergique impliqué mais perturbent aussi le système endocrinien et moteur, ils donnent donc lieu à des effets secondaires importants.

==> Importance de la connaissance des sous-types pour la recherche de médicaments spécifiques et sans effets secondaires.

Cf la Référence à Lire de Médecine Science ci-jointe.

Selon D. Marcel, cet article rend inutile la lecture du poly et la ronéo...

m/s

médecine/sciences 1993 ; 9 : 9-11

LA BIOLOGIE MOLÉCULAIRE DES RÉCEPTEURS ET L'ESSOR D'UNE NOUVELLE PHARMACOLOGIE

Jean-Charles Schwartz

RÉFÉRENCES

1. Black JW, Duncan WAM, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons ME. Definition and antagonism of histamine H₂ receptors. *Nature* 1972 ; 236 : 385-90.
2. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Autoinhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature* 1983 ; 302 : 832-7.
3. Arrang JM, Garbarg M, Lancelot JC, et al. Highly potent and selective ligands for histamine H₃ receptors. *Nature* 1987 ; 327 : 117-23.
4. Changeux JP. The acetylcholine receptor : an « allosteric » membrane protein. *Harvey Lect* 1981 ; 75 : 85-254.
5. Lefkowitz RJ, Kobilcka BK, Caron MG. The new biology of drug receptors. *Biochem Pharmacol* 1989 ; 38 : 2941-8.
6. Kuntz ID. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science* 1992 ; 257 : 1078-82.

ADRESSE

J.-C. Schwartz : professeur à l'université René-Descartes et à l'Institut universitaire de France, directeur de l'unité de neurobiologie et pharmacologie. Inserm U. 109, centre Paul-Broca, 2 ter, rue d'Alésia, 75014 Paris, France.

m/s n° 1 vol. 9, janvier 93

Les récepteurs des neurotransmetteurs et hormones sont aussi, potentiellement, des récepteurs de médicaments. Ce truisme souligne comment l'évolution rapide de nos connaissances dans le domaine des récepteurs, dont témoignent plusieurs articles de ce numéro, est de nature à entraîner une évolution corrélative de la pharmacologie, conçue comme l'art de mettre au point des médicaments nouveaux. Dans les deux domaines de recherche, en effet, c'est l'utilisation des moyens et des résultats de la biologie moléculaire qui constitue le moteur de l'évolution.

Pendant longtemps, l'étude des effets de médicaments potentiels a été largement indirecte, l'interaction entre ceux-ci et leur cible moléculaire étant analysée en quantifiant sur animal entier, organe ou tissu isolé soit une réponse, soit, plus récemment, la compétition avec une sonde radioactive plus ou moins spécifique. Dans le meilleur des cas, un « modèle » théorique approximatif du site de reconnaissance du récepteur était déduit des relations progressivement établies entre la structure chimique de nombreux ligands et leur activité biologique. Ces modèles ont, certes, montré leur intérêt opérationnel (notamment en suggérant la synthèse de nouveaux ligands mieux reconnus) mais aussi leurs limites, le processus de mise au point de molécules actives nouvelles n'étant jamais devenu entièrement rationnel comme celui qui pourrait découler de la connais-

sance de la structure réelle des cibles visées.

Or, le clonage moléculaire d'un nombre croissant de récepteurs est en train de modifier cette pharmacologie classique.

La pharmacologie classique : du médicament au récepteur et du récepteur au gène

Depuis Ehrlich jusqu'aux années soixante-dix, le récepteur était demeuré une entité nécessaire mais essentiellement théorique selon l'adage *Corpora non agunt nisi fixata**. Au cours de cette période, la découverte d'un nouveau récepteur reposait sur le choix d'une réponse biologique appropriée et sur la mise au point d'agents chimiques, effecteurs ou antagonistes sélectifs. Ainsi les suggestions de récepteurs multiples de la noradrénaline et de l'histamine, faites par Ahlquist et Schild respectivement, n'ont pu aboutir à l'identification pharmacologique formelle des récepteurs β-adrénergiques et H₂ de l'histamine qu'après plusieurs années. La mise au point d'antagonistes sélectifs, dans les deux cas précédents, par sir James Black et ses collègues, est en effet le résultat d'un patient travail de synthèse et d'essai de plusieurs centaines de molécules [1]. Plus récemment, et pour prendre un exemple de notre laboratoire, il nous fallait encore quatre années d'un travail d'investigation de même type

* Les substances n'agissent que si elles sont fixées.

pour confirmer [2] l'existence, que nous avons précédemment suggérée [3], du troisième récepteur (H₃) de l'histamine.

Ce sont encore des ligands chimiques, sous forme de sondes réversibles ou irréversibles ou encore de réactifs pour chromatographie d'affinité, qui ont été les instruments clés pour l'isolement des premiers récepteurs [4, 5]. De là a découlé la détermination d'une partie de leur séquence ouvrant la voie au clonage de leur gène.

Un tel processus est inévitablement lent car il comporte deux étapes difficiles à franchir : la mise au point de ligands sélectifs et l'isolement de protéines très peu abondantes.

Or le processus de clonage de gènes de récepteurs s'est profondément modifié au cours des dernières années. Cela devrait avoir des conséquences profondes sur la mise au point de nouvelles classes de médicaments [6, 7].

La « pharmacologie inverse » : du gène au récepteur et du récepteur au médicament

Le clonage moléculaire des premiers récepteurs a révélé leur appartenance à de très larges « superfamilles » dont les membres présentent, entre eux, d'utiles homologies de séquences. C'est principalement l'utilisation de ces homologies qui a permis le clonage rapide des gènes de nouveaux récepteurs au moyen des techniques d'hybridation croisée ou d'amplification itérative (PCR). L'expression de ces récepteurs en cellules eucaryotes transfectées a alors révélé que plusieurs d'entre eux étaient « pharmacologiquement inconnus ». Cela est bien illustré par des exemples pris dans les familles de récepteurs adrénergiques dopaminergiques (voir l'article de P. Sokoloff et al., p. 12 de ce numéro) ou sérotoninergiques (voir l'article de M. Hamon et H. Gozlan, p. 21 de ce numéro) qui, tous, appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G [8]. Au sein de cette superfamille, le nombre de membres clonés et identifiés ne cesse de croître, mais nombreux aussi sont, dans plusieurs laboratoires, les « récepteurs orphelins » ou « récepteurs en quête d'une fon-

tion », c'est-à-dire dont le ligand endogène — neurotransmetteur, hormone, ou facteur de croissance — reste à identifier.

Dans la superfamille des récepteurs-canaux qui comprend notamment les récepteurs nicotiniqes et GABAergiques, la multiplicité est non moins fascinante qui, cette fois, résulte de la combinaison de sous-unités variées (voir l'article de N. Le Novère et al., p. 41 de ce numéro).

Dans ces divers cas, la découverte inattendue d'un grand nombre de cibles moléculaires nouvelles constitue à la fois une chance et un défi pour les pharmacochimistes.

• La chance réside dans la possibilité qui leur est offerte de développer de manière rationnelle de nouvelles classes d'agents thérapeutiques, particulièrement dans des domaines tels que ceux de la pharmacologie du système nerveux central ou du tractus gastro-intestinal, où les progrès ont été rares au cours des dernières années. En effet, les nombreux « sous-types » de récepteurs que dévoile la biologie moléculaire diffèrent entre eux non seulement par leur séquence mais aussi par leur pharmacologie, leur(s) système(s) de signalisation intracellulaire et leur expression tissulaire. Dans la plupart des cas, l'arsenal thérapeutique pré-existant ne comporte que des agents ne permettant pas de les différencier complètement. Un bon exemple est fourni par les neuroleptiques, antagonistes de la dopamine, bloquant simultanément plusieurs sous-types de récepteurs, dont un seul pourrait sous-tendre leur efficacité antipsychotique, le blocage des autres étant responsable des nombreux effets secondaires que produisent ces médicaments et qui limitent considérablement leur usage (voir l'article de P. Sokoloff et al., p. 12 de ce numéro). En revanche, on peut raisonnablement attendre d'une mise au point d'agents nouveaux, présentant une sélectivité pharmacologique élevée, un spectre d'activité plus pur, lié à l'expression discrète de chacun des sous-types de récepteurs dans des populations neuronales distinctes. Ainsi, dans de nombreux cas, le rêve, longtemps poursuivi en vain par les pharmacologues, d'agents présentant

une sélectivité tissulaire, voire cellulaire, élevée ne paraît plus hors de portée. Par exemple, l'expression très contrastée des cinq sous-types de récepteurs muscariniques (et de nombreux sous-types de récepteurs nicotiniqes) par des populations cellulaires distinctes dans le cerveau et les tissus périphériques, semble de nature à renouveler le spectre des applications thérapeutiques de ces vieux médicaments que sont les agents cholinergiques ou anticholinergiques : le clonage des récepteurs muscariniques nous a révélé leur manque de sélectivité, qui limite considérablement certains de leurs emplois.

• Le défi lancé aux pharmacochimistes par l'existence de ces cibles multiples — est lui aussi — très clair : développer des ligands susceptibles de différencier des récepteurs parfois très homologues ou pour lesquels la pharmacologie est encore quasi inexistante. Cependant, la biologie moléculaire vient apporter un certain nombre d'atouts pour relever ce défi.

Les récepteurs recombinants : vers une mise au point rationnelle de nouveaux médicaments à partir de leurs cibles

En dépit de revendications, très souvent usurpées, de « mise au point rationnelle » de médicaments, le travail du pharmacochimiste est largement resté celui d'« un tireur d'élite visant, dans l'obscurité, une cible mal délimitée ». En effet, c'est encore le plus souvent au prix d'un patient effort de synthèse de nombreux analogues chimiques, dont les effets biologiques sont alors analysés sur des systèmes plus ou moins complexes, que sont sélectionnées, plus que véritablement conçues, les nouvelles molécules à visée thérapeutique.

Il n'est pas exagéré de dire que la biologie moléculaire est en train de bouleverser ce processus de mise au point d'une manière double : d'une part en facilitant l'essai biologique des médicaments synthétisés et, d'autre part, en dévoilant enfin la structure moléculaire des cibles que ces médicaments sont destinés à atteindre.

En effet, les lignées de cellules aisément cultivables, comme des fibroblastes ou même des bactéries, et

exprimant à leur surface une haute densité d'un sous-type de récepteur, après transfection du gène correspondant sous contrôle d'un promoteur viral, constituent des outils particulièrement performants pour l'essai initial de ligands potentiels. Dans certains cas, celui des récepteurs muscariniques par exemple, ces modèles sont les seuls utilisables, car il est souvent difficile d'isoler un tissu exprimant naturellement un seul sous-type de ces récepteurs. Dans tous les cas, le haut niveau d'expression (généralement dix à cent fois supérieur à celui des tissus les plus riches) constitue un avantage déterminant en termes de précision des résultats. La possibilité d'évaluer de manière simple l'action des médicaments sur un récepteur humain que l'on a fait exprimer par une de ces cellules constitue aussi un avantage déterminant dans les cas où des différences pharmacologiques liées à l'espèce existent, comme cela a été démontré pour le récepteur H₁ de l'histamine [9] ou certains sous-types des récepteurs de la sérotonine (voir l'article de M. Hamon et H. Gozlan, p. 21 de ce numéro).

Ces lignées de cellules ne facilitent pas seulement les essais de candidats médicaments par radiolisation mais aussi ceux qui reposent sur la mesure d'une réponse biologique telle que taux d'un second messager ou flux ionique. La grande amplitude de cette réponse, résultant de la forte densité de récepteurs exprimés, permet d'évaluer avec une précision accrue une propriété essentielle des agonistes, leur « activité intrinsèque », c'est-à-dire leur plus ou moins grande capacité d'induire une transconformation productive du récepteur. Ces modèles cellulaires permettent de n'avoir recours que tardivement à l'essai sur animal entier, lequel porte alors sur des molécules déjà présélectionnées *in vitro*. En outre, le recours à des animaux transgéniques devrait être de nature à améliorer des essais *in vivo*, particulièrement dans la mesure où des anomalies qualitatives ou quantitatives de récepteurs viennent à être identifiées. On peut raisonnablement espérer que de telles approches conduiront enfin à la mise au point de modèles animaux réalis-

tes d'affections neuropsychiatriques humaines, modèles dont le défaut a largement compromis l'essor de la psychopharmacologie au cours des dernières décennies.

Mais plus importante encore pour le développement de nouvelles stratégies de mise au point de médicaments est la connaissance de l'anatomie fonctionnelle de leur cible, la molécule de protéine réceptrice. Ainsi, la seule séquence en acides aminés bientôt complétée par les données de la mutagenèse dirigée et celles du marquage irréversible de la protéine par ses ligands, rapprochées de la séquence de protéines homologues ayant pu être soumises à des analyses physiques de structure (comme cela est le cas pour la bactériorhodopsine) est en train de fournir, avec de plus en plus de détails, une image des sites de reconnaissance des ligands au sein des récepteurs. Cette image, quoique encore largement conjecturale, est affinée par la mise en œuvre de modélisations moléculaires de la protéine, particulièrement celles d'entre elles qui tiennent compte des données de la mutagenèse dirigée (voir l'article de M. Hibert et al., p. 31 de ce numéro).

Une étape déterminante sera franchie lorsque l'interaction des ligands avec les groupes fonctionnels du site de reconnaissance pourra être analysée en trois dimensions et, si possible, en temps réel au moyen de méthodes physiques appropriées telles que microscopie électronique, diffraction des électrons ou des rayons X et résonance magnétique nucléaire (RMN). C'est cette information qui, convenablement exploitée par la modélisation moléculaire, devrait conduire à la mise au point réellement rationnelle de médicaments. Une des conditions préalables, la disponibilité de quantités suffisantes de protéine, est en principe satisfaite par l'utilisation de récepteurs recombinants, synthétisables en quantité illimitée. En revanche, certains problèmes restent non résolus : ils résident dans la cristallisation de ces protéines transmembranaires et dans l'analyse de protéines d'une taille encore supérieure aux limites qu'autorise la RMN à ce jour, en dépit de progrès récents spectaculaires [10].

La mise au point d'une nouvelle classe de médicaments était restée un événement rare. On peut prophétiser sans grand risque que, après un certain délai lié aux phases incompréhensibles d'études toxicologiques et cliniques, les prochaines décennies vont connaître un enrichissement considérable de notre arsenal thérapeutique ■

RÉFÉRENCES

- Schwartz JC. Molecular biology of drug receptors and the advent of reverse pharmacology. In : Wermuth CG, Kofar N, König H, Metcalf W, eds. *Medicinal Chemistry for the XXIst Century*. Oxford : Blackwell Scientific Publications, 1992 : 63-71.
- Savarese TM, Fraser CM. *In vitro* mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors. *Biochem J* 1992 ; 283 : 1-19.
- Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev* 1991 ; 71 : 1-51.
- Clore GM, Gronenborn AM. Structures of larger proteins in solution : three- and four-dimensional heteronuclear NMR spectroscopy. *Science* 1992 ; 292 : 1390-9.

TIRÉS A PART

J.-C. Schwartz.

BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE A L'ETUDE DES RECEPTEURS

Il existe de nos jours deux façons de travailler pour les Pharmacologues :

La pharmacologie classique, c'est ce qui se fait depuis 50 ans, c'est-à-dire depuis qu'on sait que les Récepteurs existent. On imaginait alors de nouvelles molécules à partir de la structure des molécules connues (on établit des changements de groupement), on réalisait les synthèses puis les expériences in vitro et in vivo.

De là, étude de la liaison, du KD , de B max. La reconnaissance des Récepteurs est établie quand KD et B max sont satisfaisants.

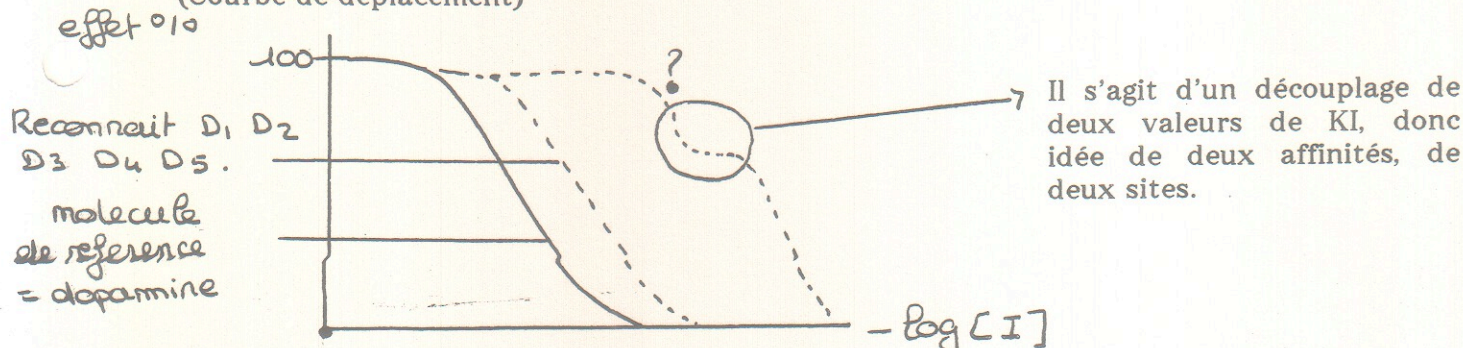
Si le marquage du Ligand n'est pas possible, on réalise des courbes de déplacement.

La molécule choisie parmi les molécules synthétisées sera celle qui présente le moins d'Effets Secondaires.

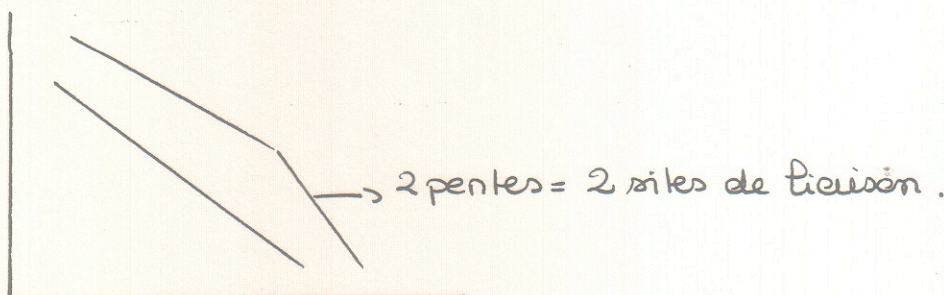
La Pharmacologie inverse, elle, se développe depuis 15 ans en parallèle avec le développement des techniques de biologie moléculaire et la découverte des nouveaux sous-types de Récepteurs.

Exemple de courbes qui ont donné à penser qu'il existait des sous-types :

(Courbe de déplacement)



(Représentation de SCATCHARD) :



L'approche de la Pharmacologie classique n'explique pas ses "anomalies", elle ne suffit donc pas.

Les techniques de Biologie moléculaire ont montré, en étudiant les gènes, qu'il y avait bien des sous-types différents pour un récepteur.

En effet, on a mis en évidence les gènes synthétisant les Récepteurs. Ces gènes sont totalement différents, leur isolement a vraiment mis l'accent sur le fait que les Récepteurs sont des entités différentes capables pourtant de reconnaître une même molécule.

On a été capable de faire s'exprimer ces gènes dans des cellules. (Il existe des modèles de cellules en culture qui sont capables, quand on leur injecte un bout de gène de l'exprimer). Ces cellules expriment alors la protéine réceptrice, fonctionnelle (vérification par des études de liaison). On obtient pour ce récepteur un KD et un B max. Si ces paramètres correspondent à un KD et un B max déjà connus par la Pharmacologie classique, on a identifié le Récepteur.

On parle de "Pêche à la ligne" du génôme.

L'intérêt, c'est de préciser la connaissance des différents sous-types pour synthétiser des molécules plus spécifiques, interagissant avec le minimum d'effets secondaires sur la structure présentant une pathologie.

D. Marcel n'a pas suivi le poly pour ce chapitre, elle a précisé qu'il était important, donc lisez-le et faites le tri dans le commentaire qui a suivi ... :

Précision sur les isoRécepteurs : un même gène, une même séquence d'ADN donnent des ARNm différents (du fait des introns) donc donnent des protéines différentes, des sous-types différents.

p. 55 : Introduction à la notion d'homologie et de famille de Récepteurs :

Au lieu de classer les Récepteurs en fonction de leur Ligand endogène, on classe par FAMILLE.

Si on compare un Récepteur dopaminergique, adrénérgique, muscarinique, sérotoninergique, on observe 80 à 90 % d'homologie, ce qui est énorme.

Cela signifie donc que les 10 % restants sont impliqués dans la spécificité de reconnaissance du Ligand endogène.

Le reste (80/90 %) servent à positionner le récepteur dans la membrane cytoplasmique par 7 hélices, et de la même façon, En plus de cela, tous ces Récepteurs utilisent le même système de transduction (= transfert du message) qui, dans ce cas, est celui de l'adényl cyclase pour second messenger.

Lorsque le positionnement est différent et le système de transduction : un canal ionique, on a affaire à une autre famille.

Hiérarchie :

Famille de Récepteur --> Récepteurs --> sous-type d'un Récepteur.

Les SOUS-TYPES DE RECEPTEUR se différencient par leur localisation, par le fait qu'ils activent ou inhibent le système de transduction (ex.: l'adényl cyclase).

Une fois que les Récepteurs sont identifiés, pour les caractériser on retravaille avec les méthodes de la Pharmacologie classique. On prend un modèle de culture où on fait s'exprimer un sous-type et on fait des expériences de liaison et de compétition.

Les recherches de Pharmacologie inverse se font en deux temps :

- Identification de la structure du Récepteur, étude de la relation structure-activité : pour ça, on joue sur l'acide nucléique pour modifier 1 ou 2 Acides Aminés du site de liaison.
- Expérience de liaison et de compétition.

Une fois que le site de liaison est bien déterminé, on confie le travail au chimiste pour qu'il synthétise une molécule s'imbriquant dans la structure (du Récepteur).

Exemples pour illustrer ce chapitre :

1) Le Récepteur adrénérgique β_3

On connaissait les β_1 , les β_2 , les β_3 ont été découverts il y a trois ans. Ça a commencé par la "pêche à la ligne", le clonage du Récepteur, puis l'étude pharmacologique a mit en évidence un β atypique. Avec la pharmacologie classique et les courbes de déplacement d'aspect :

Si une molécule reconnaît β_1 et β_2 mais avec peu d'affinité, c'est qu'il est question d'un Récepteur β atypique. En fait, c'est une molécule qui est très spécifique du β_3 .



La β_3 a une localisation très précise et typique; au niveau du tissu adipeux blanc et brun (celui qui stocke les graisses), au niveau de la vésicule biliaire.

Quel est le rôle des β_3 dans le stockage des graisses ?

L'intérêt de cette recherche est un espoir de traitement pour les cas d'obésité juvénile.

On a mis en évidence l'implication dans le lipolyse en faisant travailler les β_3 sur des portions de tissu adipeux.

On ne connaît pas encore les fonction du β_3 au niveau du tractus gastro-intestinal.

Les précipités pharmacologiques du β_3 diffèrent de celles des β_1 et β_2 ; la β_3 a une faible affinité pour les récepteurs des β_1 ou β_2

Il a une très faible stéréosélectivité pour les énantiomères quand aux Agonistes agissants sur les β_1 ou β_2 , ils n'ont pas d'effets sur les β_3 .

On s'est aussi rendu compte qu'il y aurait des Antagonistes des β_1 qui sont des Agonistes partiels des β_3 .

==> Par la Pharmacologie inverse, on cherche à synthétiser de nouvelles molécules spécifiques du Récepteur β_3 (c'est toujours le même principe !).

2. Récepteurs dopaminergiques D1 --> D5 (Cf ED)

Cas du D3.

On donnait des neuroleptiques (= Antagonistes dopaminergiques) pour soigner les psychoses, mais ce sont des molécules avec trop d'effets secondaires au niveau moteur et endocrinien.

On a découvert heureusement le sous-type D3 (son existence était supposée depuis longtemps, on parlait de D atypique, son gène a été cloné et le récepteur D3 lui-même isolé).

Cf p. 66 du poly.

Le D3 n'a été localisé qu'au niveau du système limbique (responsable des phénomènes de cognition).

Alors que le D1 est localisé dans le striatum (moteur), les glandes parathyroïdes (fonction endocrine) et l'hypophyse (moteur/endocrine).

Il "suffit" donc maintenant de synthétiser des molécules spécifiques du D3 pour avoir des neuroleptiques très ciblés, débarrassés des effets secondaires.

3. Récepteurs sérotoninergiques

On connaissait les 5HT1, 5HT2 et 5HT3; maintenant on connaît en plus le 5HT4.

Il existe différents isoformes de 5HT1 : A, B, C, D, E et F.

D. MARCEL nous a commenté un tableau, non disponible dans le poly, qui sera - paraît-il - vu dans le cours de Pharmacologie générale.

Ce tableau détaille les caractéristiques des 5HT1 : Ainsi, sur le Récepteur 5HT1 D, peut agir une molécule à action antimigraineuse, encore non commercialisée en France, spécialisée dans le "SUMATRIPTAN". Ce nouveau médicament présente peu d'effets secondaires.

Le tableau fournit les antagonistes du Récepteur, le pA2, les radiligands utilisés, les différents effecteurs utilisés par ces Récepteurs (Inhibition de l'adényl cyclase).

Remarque : Notion sur l'économie du vivant : Pour un neurotransmetteur, il existe une pleiade de Récepteurs, ils sont donc impliqués dans des fonctions très diverses.

+ Notion de conservation du vivant : grande homologie des Récepteurs.

Le même tableau donne les caractéristiques des 5HT2; 5HT3; 5HT4.

Le 5HT1 fonctionne avec l'adényl cyclase - inhibition.

Le 5HT2 fonctionne avec la phospholipase C (--> Ip3 et DAG).

Le 5HT3 fonctionne avec l'adényl cyclase - Activation.

Ces différents sous-types fonctionnent avec le même neurotransmetteur, le même second messenger, mais leur structure est différente.

4. Récepteurs du GABA : anxiolytiques

Les Benzodiazepines (BZD) peuvent avoir des actions Pharmacologiques différentes.

Quand on administre une BZD, l'effet anxiolytique est souvent accompagné d'un effet secondaire sédatif et myorelaxant.

Or, on s'est aperçu que certaines molécules agissent sur différents sous-types sérotoninergiques (5HT3) comme anxiolytique sans induire de dépendance, ni sédation, ni myorelaxation.

==> Au lieu de s'accharner sur lesR. du GABA, on tente la synthèse d'Antagonistes 5HT3; ils sont dénués d'effets secondaires.

5. Les Antidépresseurs

Auparavant, c'était des inhibiteurs de la recapture. (IHAO)

L'augmentation de la neurotransmission est une augmentation dans la synapse. Pour la favoriser, on diminue la capture présynaptique.

Or, ces neurones présynaptiques présentent des sous-types de Récepteurs sérotoninergiques : ce sont des autoRécepteurs capables de réguler la neurotransmission.

==> On recherche de nouvelles molécules pour inhiber cette cible potentielle donc inhiber la neurotransmission.

Si une molécule est un antagoniste de ces autorécepteurs, il y a augmentation de la libération du neurotransmetteur.

Les sous-types sérotoninergiques sont impliqués dans diverses pathologies (boulimie, anorexie) ce qui justifie la recherche faite dans ce domaine.

Fin du chapitre et du cours

LES DIFFERENTES PROTEINES QUI PERMETTENT LE TRANSPORT DES IONS A TRAVERS LA MEMBRANE (P69)

C'est un bref chapitre sur la notion d'autres entités protéiques que les Récepteurs (R) qui ne reconnaissent pas les ligands mais qui sont capables de laisser passer des ions.

C'est le passage ionique qui constitue le message pour la cellule. Exemple : la Régulation de sécrétion d'insuline par les canaux potassiques.

Pour ce chapitre, il faut suivre le plan du poly.

Il existe des cellules qui sont excitables, d'autres non (c'est-à-dire qu'elles sont sensibles ou non au voltage).

Quand on parle de cellules aux propriétés électriques on prend souvent l'exemple des neurones, mais il en existe d'autres (par exemple au niveau des surrénales).

I. PROTEINES JOUANT UN ROLE DANS LE TRANSFERT PASSIF DES IONS

Il s'agit de passage dans le sens d'un gradient de concentration. L'équilibre ionique suit la loi de Nernst. Au contraire, un passage actif s'oppose au gradient, pour cela il nécessite de l'Energie (souvent elle se présente sous la forme de molécule d'ATP).

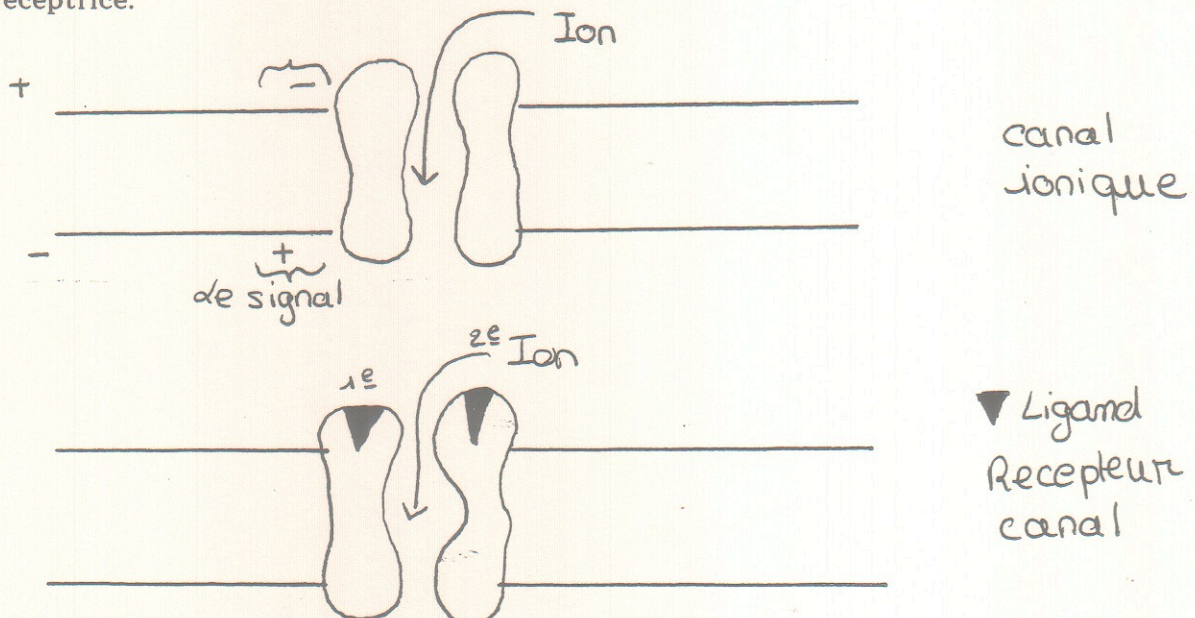
1. Les protéines transmembranaires formant un canal ionique

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires dont des segments sont fortement hydrophobes (ce sont les segments qui permettent l'ancrage dans la bicouche et qui forment un canal sélectif pour certains ions).

Ces canaux sont importants car ils sont la cible de médicaments.

Les protéines subissent un changement de conformation entre l'état ouvert et fermé.

A la fin du paragraphe on lit "Régulé par un changement de potentiel de membrane", c'est-à-dire que les canaux sont sensibles à une variation de potentiel, ce qui diffère des Récepteurs canaux qui sont des molécules réceptrices capables de lier un ligand; et c'est cette reconnaissance qui induit une trans-conformation qui fait s'ouvrir un canal inclu dans la protéine réceptrice.



▲ = L = Ligand endogène ou neurotransmetteur ou agoniste. C'est le premier signal qui induit une transconformation.

Exemple : le Récepteur des benzodiazepines, (BZD)
du glutamate,
5HT3 de la sérotonine.

a) Les canaux ioniques sensibles à une dépolarisation

Ils sont responsables des propriétés d'excitabilité du neurone. D. Marcel conseille de revoir nos notions d'électrophysiologie pour une meilleure compréhension.

Exemples :

- Les canaux Na^+ qui génèrent les potentiels d'action sodiques.
- Les canaux Ca^{2+} . Leur PA est propagé grâce aux canaux Na^+ jusqu'aux terminaisons nerveuses. Là, les canaux Ca^{2+} voltage dépendant, s'ouvrent à la ddp. Le Ca^{2+} intracellulaire augmente, il joue un rôle important dans la libération du neurotransmetteur. Ainsi, le Ca^{2+} a un rôle important dans la contraction du muscle, dans certaines sécrétions. (La sécrétion est un processus biochimique qui ressemble au processus contractile).
- Les canaux K^+ .

Important : Les canaux sont caractérisés par :

- une capacité de transfert ionique élevée
- une sélectivité,
- une cinétique propre (un certain temps d'ouverture et de fermeture). Cette cinétique participe aux temps de libération des neurotransmetteurs pour les canaux Ca^{2+} .
- une sensibilité.

Importante aussi la notion de grande homologie entre les structures primaires des canaux ioniques.

Les Acides Aminés semblables sont responsables de l'insertion de la bicouche.

Les AA différents génèrent la spécificité de l'ion. Il existe aussi une spécificité des AA qui baignent dans le cytoplasme.

b) Les canaux ioniques sensibles à la liaison d'un ligand assurant la transmission synaptique rapide

Les Récepteurs canaux sont des Récepteurs et non des canaux. Il s'agit de récepteurs incluant un canal ionique.

Ces Récepteurs fonctionnent beaucoup plus rapidement que ceux qui emploient une enzyme.

Ces Récepteurs canaux, dit ionotropiques, ont un délai de réponse de l'ordre de la μs .

Remarque : Ionotropique : le mécanisme fait intervenir un ion.

Métabotropique : le mécanisme fait intervenir le métabolisme.

II. PROTÉINES ASSURANT LE TRANSPORT ACTIF DES IONS : POMPES ET TRANSPORTEURS

Le transport actif nécessite l'hydrolyse de l'ATP.

- Bien lire le poly.

1. LES POMPES

a) La pompe à sodium

Différents facteurs ont un rôle dans son activité.

- Les concentrations ioniques.
 - Les lipides membranaires : c'est l'environnement de la pompe. Ainsi, quand un individu présente une pathologie des lipides, on observe un déséquilibre de la pompe.
- Remarque : La bicouche lipidique est une structure dynamique et très fluide.

- Les protéines spécifiques : exemple de la Calmoduline qui est inhibitrice.
 - Comme la pompe est une entité protéique, sa synthèse peut être régulée : par les hormones thyroïdiennes par exemple.
Ces hormones pénètrent dans le noyau et stimulent ou inhibent le génome.
 - Les digitaliques.
Ils inhibent la pompe Na^+/K^+ en augmentant le Na^+ et le Ca^{2+} intracellulaire (chronologie : $\uparrow Na^+ \rightarrow \uparrow Ca^{2+}$).
- Remarque : Recherches en cours sur l'existence de digitaliques endogènes.

Le même raisonnement a été fait pour les Récepteurs opioïdes et son aboutissement a été couronné d'un prix Nobel (1970).
Maintenant, ce raisonnement est aussi tenu pour le Récepteur du GABA (Benzodiazepines endogènes ?).
Le principe est toujours le même : quand, in vivo, un Récepteur reconnaît de façon très spécifique une molécule d'origine exogène, on se demande et on cherche si une molécule similaire n'est pas synthétisée par l'organisme.

b) La pompe $Ca^{2+}/ATPase$

Elle est localisée dans le Reticulum Sarcoplasmique (RS) des muscles striés. (Attention ! ne pas confondre avec Reticulum Endosplasmique).
Lorsque le Ca^{2+} intracellulaire augmente il agit sur les molécules d'Actine et de Myosine responsables de la contraction.
Le Ca^{2+} est libéré de ses sites de stockage (dont le R.S).
Il existe donc une grande différence de concentration entre le Ca^{2+} stocké et libre (de l'ordre de 10^{-4}).
Pour que le Ca^{2+} n'augmente pas dans la cellule (l'existence du gradient de concentration suggère qu'il y a tendance au rééquilibre des concentrations). Le RS a donc besoin de ces pompes $Ca^{2+} ATPase$. Ce sont elles qui maintiennent le déséquilibre.

==> Notion d'homéostasie du calcium.

Définition : Homéostasie = tout ce qui contribue à maintenir les cellules dans un état basal correct avec une bonne capacité à réagir.
Le Ca^{2+} est un ion important dans toutes les régulations et il doit exister en permanence un équilibre entre les différents stocks de Ca^{2+} : Ca^{2+} intracellulaire / libre / stocké dans les cellules.

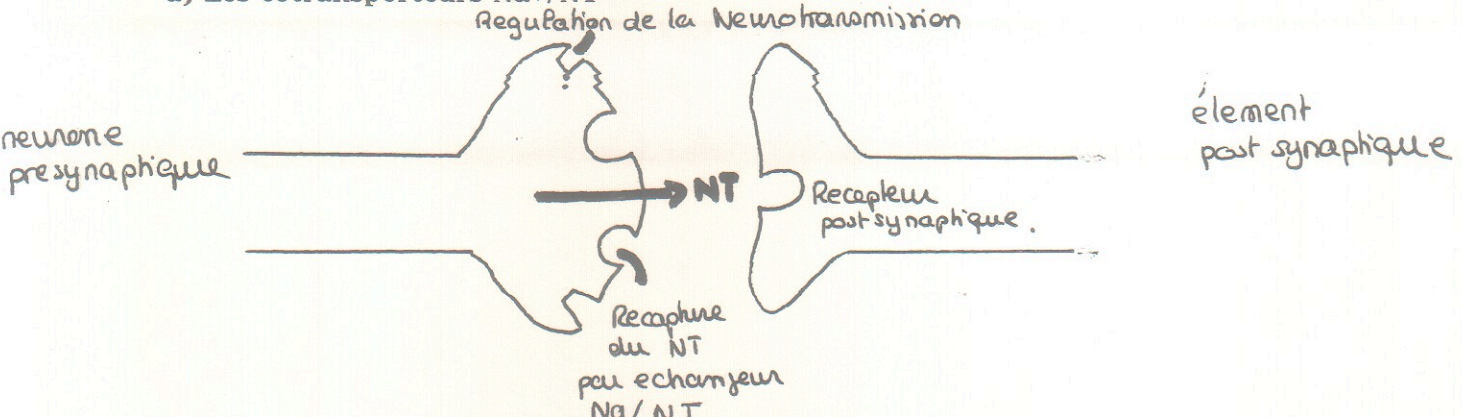
c) Pompe $H^+ / K^+ / ATPase$ dans la cellule gastrique

C'est un monomère. Localisation dans l'estomac.
Elle régule la production d' HCl : Cette pompe échange les ions K^+ de la lumière contre des H^+ , elle contribue donc à l'acidification stomacale.
Comme on connaît bien la structure, la fonction et la régulation de cette pompe, on a pu synthétiser le MOPRAL^R (DCI : oméprazole).

2. LES TRANSPORTEURS OU "ECHANGEURS"

Ce sont des protéines qui assurent le transport actif d'ions ou molécules par cotransport ou symport et non par hydrolyse de l'ATP.
Ils sont impliqués dans une activité électrique ou sécrétrice.

a) Les cotransporteurs Na^+/NT



On entend parler de UP TAKE = c'est la recapture du NT par l'élément presynaptique.

b) Echangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$

Régulation lente.

Régulation rapide : souvent une protéine inactive est activée par phosphorylation. Les enzymes qui interviennent dans ce processus sont importantes : ce sont les protéines kinases.

→ Cf p. 23 du poly.

ILLUSTRATIONS :

p. 74 - Figure 1.

A. Les ions passent selon le Gradient de concentration; il s'agit donc d'un transport passif.

B. Sur l'organisation de la protéine :

Elle est constituée d'un enchaînement d'Acides Aminés formant un monomère. Les extrémités COOH et NH₂ terminales sont intracytoplasmique.

Ce sont les domaines intracytoplasmiques qui sont responsables de l'ancrage dans la bicouche lipidique.

Figure 2.

Organisation des récepteurs canaux.

Le signal n'est plus la variation de potentiel mais l'arrivée ^{du ligand.} Le passage reste passif.

p. 75 - Figure 3.

Cette figure n'a en fait rien à faire dans ce chapitre, mais comme elle présente un intérêt, autant la regarder.

Il s'agit d'un Récepteur lié à une protéine G.

A. La protéine G est le relai entre Récepteur et Effecteur.

B. Le Récepteur le mieux identifié est la Rhodopsine.

Cf plus loin.

Figure 4. Sur la pompe Na^+ / K^+ ATPase.

Elle est formée de deux sous-unités, et c'est la sous-unité α ^{qui} fixe 2 Na^+ au niveau intracellulaire.

Cette pompe est ATP mais aussi Mg^{2+} dépendante.

p. 76 - Tableau 1.

C'est un tableau qui résume les différents canaux sensibles au voltage : Na^+ , K^+ , Ca^{2+} - les récepteurs canaux - les Récepteurs liés aux protéines G.

Fin du chapitre.

PHARMACOLOGIE DES CANAUX VOLTAGE DEPENDANTS (p. 77)

Ce chapitre est à bien connaître.

Il faut savoir que la pharmacologie est en perpétuel développement.

I. LA PHARMACOLOGIE DU CANAL Na⁺

Il existe une série de toxines agissant au niveau de ce canal :

- Dont la tétrodotoxine : TTX et la saxitoxine.

On a fait des études de liaison et on a vu qu'il existait des sites très spécifiques de ces toxines. Or, celles-ci existent dans la nature, dans le vivant, mais on ne les a toujours pas isolées à partir de l'homme. Stade Recherche.

- Dont l'aconitine et la vératridine.

Leur toxicité est due au fait que les canaux restent 1000 fois plus longtemps ouverts que la normale.

L'intérêt de ce canal sodique c'est qu'il est la cible de certains médicaments comme les anesthésiques locaux. (L'effet anesthésique est dû à une baisse du transfert de la propagation dans la membrane).

II. LA PHARMACOLOGIE DU CANAL K⁺

Le Tétraethyl ammonium (TEA) est une molécule courante pour étudier l'activité de certains neurones : le TEA appliqué de façon intracellulaire, bloque les canaux K⁺ lorsque ceux-ci sont ouverts.

Il existe de nouvelles molécules qui hyperpolarisent la cellule : cromakalin, pinacidil, nicorandil.

Le canal K⁺ est inhibé par certains antiarythmiques.

Cf p. 79 - Figure 2.

Les cellules β sécrétant l'insuline sont des cellules dont la membrane est excitable. Le facteur les faisant réagir est donc la variation de potentiel.

Ces cellules sont sensibles à la concentration extracellulaire de glucose. Il pénètre de façon spécifique, la concentration de glucose augmente dans la cellule et la réponse de la cellule est une sécrétion d'Insuline :

Captation du glucose par la cellule β (dans le pancreas)

↓

Métabolisation en ATP

↓

Inhibition spécifique des canaux K⁺

↓

Perturbation de l'équilibre ionique de la cellule

↓

Dépolarisation de la membrane

↓

Stimulation des canaux Ca²⁺ voltage dépendant
(localisés dans la membrane)

↓



Pénétration du Ca^{2+} et augmentation de sa concentration dans la cellule



Sécrétion d'insuline par divers systèmes effecteurs

Des médicaments inhibent de façon spécifique ce canal (même rôle que l'ATP), c'est le cas des sulfamides hypoglycémiantes (Sécrétion d'insuline augmente).

III. PHARMACOLOGIE DU CANAL Ca^{2+}

Il existe différents canaux Ca^{2+} voltage dépendant : de type L, T et N.

On insiste sur le mécanisme compensatoire déjà vu et qui s'applique aux canaux Ca^{2+} .

Il existe des interactions entre les différents canaux .

=> Les ions Ca^{2+} sont des ions très importants car ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques.

Note : Comme ce fût le cas pour ce paragraphe, D. Marcel a fait peu de commentaires et s'est contentée en cours de nous en faire la lecture.

Je rappelle donc que je note dans la Ronéo que ce qui est dit en plus du texte du poly, mais que celui-ci, lu en cours ou sauté par la prof., n'est pas à négliger.

Illustrations du cours

Cf p. 80 - Tableau 1.

A voir pour essayer de retenir quelques éléments (en vue de l'an prochain).

Tableau 2.

A Regarder juste à titre indicatif pour "saisir la complexité du problème".

p. 81 - Tableau 3.

Choisir au moins trois fonctions (Use) et les retenir.

Tableau 4.

A regarder à titre indicatif. Sera développé l'an prochain.

Fin de la première heure de cours.

A l'intercours, quelques malins ont posé des questions et D. Marcel est partie sur quelques "explications" (du coup, pas de pose !).

(Cf p. 91)

A propos des Récepteurs : un récepteur n'est pas classé en fonction de sa famille, mais en fonction de l'effecteur avec lequel il interagit, entre les deux : se trouve une protéine de couplage (souvent c'est une protéine G qui lie le GTP, l'hydrolyse en $\text{GDP} + (\text{P})$). Cette protéine est formée de 3 sous-unités : α, β, γ .

Les différents effecteurs : (inclus dans la membrane) :

- Adenyl cyclase: ATP --> AMPc
- Phospholipase C --> DAG + IP3.
- Phospholipase A2 --> plus compliqué (écosanosides).

Les produits induits par les effecteurs sont des molécules capables de diffuser dans la cellule et capables de reconnaître toute la machinerie cellulaire.

Ainsi l'AMPc --> activation des protéines kinases --> phosphorylation pour l'activation de certaines protéines --> Effet Biologique .

Sur la figure 1. : Retenez quelques exemples, comme Adenosine, Nor Adrenaline, leucotrienes (ont des Récepteurs qui leur sont spécifiques).

D. Marcel rappelle (pour la Nème fois) qu'il y a une grande homoplogie entre tous ces Récepteurs et que la spécificité ne concerne que quelques AA.

Figure 2. : Elle représente la "cascade" caractérisant l'amplification du message. Pour un premier messenger (NT) il y a synthèse de nombreux seconds messagers.

$$\text{X } 10.000$$
 Pour une molécule initiale -----> grand nombre de II^{d} Messenger
 (Enzyme-hormone-médicament)

==> Economie d'Energie.

LES RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMATIQUE A 7 HELICES TRANSMEMBRANAIRES COUPLES A UNE PROTEINE G (P.82)

Ce chapitre sera étudié à travers des figures.

Cf p. 92 - Figure 3.

- Le système de la Rhodopsine (sensible à la lumière), fonctionne avec une phosphodiesterase. Le Récepteur de la Rhodopsine a 7 domaines transmembranaires hydrophobes d'ancrage.

- D'autres récepteurs fonctionnent avec l'adényl cyclase (80 à 90 % d'homologie avec les Récepteurs de la Rhodopsine).

Le Récepteur est couplé à une protéine G : Gs ou Gi.

Gs : stimule) l'adényl cyclase qui est une enzyme effectrice fonctionnant avec $1 \mu\text{M}$ et $1 \mu\text{M}$.

Gi : inhibe)

La stimulation est l'hydrolyse de l'ATP en AMPc.

L'inhibition est une diminution de la formation d'AMPc.

Attention ! L'inhibition n'est jamais totale : les mécanismes sont modulables.

==> Diversité de la fonction.

- La phospholipase C.

C'est aussi un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine Gp. La PLC transforme PIP2 en IP3 + DAG.

Action spécifique de IP3 : Mobilisation du Ca²⁺.

En fait IP3 possède des Récepteurs spécifiques localisés sur le Reticulum Sarcoplasmique.

C'est par l'intermédiaire de ces Récepteurs que l'IP3 libère le Ca²⁺ de ses sites de stockage.

L'action du DAG : Il est moins mobile dans la cellule, il reste plus ancré dans la membrane.

Le DAG active des protéines kinases C qui vont phosphoryler certaines substances de manière spécifique.

- Autre effecteur : les canaux ioniques.

Il ne s'agit pas d'un canal voltage dépendant ni d'un Récepteur canal.

Il est couplé à une protéine G_K qui stimule certains canaux (ici le canal K⁺).

p. 93 - Figure 5.

La cascade biochimique est régulée, elle doit, elle peut s'arrêter.

A. Etat de repos

Récepteur à 7 domaines transmembranaires, couplé à une protéine G avec GDP (reconnu par α , β , γ) qui agit sur l'effecteur E.

B. Arrivée de la molécule agoniste. Reconnaissance et transconformation du Récepteur, il attire la protéine G.

Le passage de l'information inclut l'échange de GDP contre la fixation de GTP (au niveau de la sous-unité α). De là, dissociation des sous-unités et seule la sous-unité α pourra reconnaître E.

C. Le Récepteur libère l'agoniste et repasse à l'état de repos.

Parallèlement, la protéine G stimule E --> cascades biochimiques.

La protéine G hydrolyse le GTP en GDP, dissociation de l'effecteur et réassociation aux sous-unités β , γ .

--> Retour à l'état basal.

==> On a là des phénomènes très dynamiques fonctionnant avec des constantes de temps.

Des études sont faites sur la cinétique des médicaments agissant sur ces récepteurs, voir comment ils induisent le retour à l'état initial.

Remarque : Le médicament n'agit pas sur le Récepteur de la même façon que le Ligand endogène.

Si antagoniste : jamais de couplage, juste blocage du site.

Si agoniste partiel : il induit moins d'effet physiologique car :

- . il reconnaît moins de Récepteurs,

- . il reconnaît autant de Récepteurs mais avec moins d'affinité,

- . il reconnaît autant de Récepteurs, avec la même affinité que le Ligand, mais de par sa structure : il y a un changement de conformation du Récepteur différente, ce qui entraîne la stimulation d'une quantité moindre de protéine G, donc d'effecteur.

→ Ces molécules perturbent moins les mécanismes biochimiques de la cellule.

p. 94 - Figure 6.

La toxine cholérique est sécrétée par le vibrion du choléra.

La toxine pertussique entraîne de nombreuses toux et la coqueluche.

Le mécanisme moléculaire de ces toxines est une action au niveau des protéines G (+ cf p. 95).

La toxine pertussique fixe une molécule d'ADP ribosyl sur la sous-unité α de la protéine G une fois que celle-ci a fixé le GTP. La toxine agit sur la protéine G_i → Activation permanente de la protéine G : inhibition de l'inhibition, donc Activation permanente de l'adenyl cyclase.

(La protéine G_i inhibe l'adenyl cyclase, sur le schéma, les deux éléments sont dissociés mais il existe quand même une interaction. La Ribosylation perturbe G_i).

La toxine cholérique agit sur G_s (G_s stimule l'adenyl cyclase : AMPc augmente).

La toxine ADP ribosyle la G_s , donc elle la bloque dans un état où il n'y a jamais de retour à l'état basal. Il y a activation permanente de l'effecteur avec production permanente d'AMPc.

Dans les 2 cas, il y a perturbation de l'homéostasie des cellules pariétales de l'estomac, d'où les vomissements observés.

⚠ L'ADP ribosylation n'inhibe au sens strict ni G_i ni G_s mais **BLOQUE** La protéine dans un ETAT donné.

fin du cours.

Pour tout ce qui concerne les récepteurs à 7 domaines transmembranaires : se reporter au poly.

Ces récepteurs font partie de la grande famille de récepteurs à 7 Hélices α : Domaines très hydrophobes avec :

. une extrémité N terminale extracytoplasmique : elle possède des sites de glycosylation interférant avec la régulation du Récepteur,

et . une extrémité C terminale cytoplasmique : cette extrémité peut subir des sites de phosphorylation (avec variation de conformation), elle présente, en plus, des boucles qui interviennent aussi dans la régulation du Récepteur.

Ces récepteurs fonctionnent avec un effecteur qui travaille avec une protéine G.

Bien relire ce chapitre.

LES EFFECTEURS MIS EN JEU EN REPONSE AU COUPLAGE R/PROTEINE G (p. 96)

On va d'abord étudier trois effecteurs enzymatiques.
Mais il ne faut pas oublier qu'un effecteur peut aussi être un canal ionique.

I. LA VOIE DE L'ADENYLATE CYCLASE (AC)

Cf Figure 1 - p. 105

L'AC synthétise l'AMPc à partir d'ATP. Quand [AMPc] augmente dans la cellule il faut bien que ce message s'arrête : l'AMPc est dégradé en AMP 5' par une phosphodiesterase. Celle-ci peut être activée (Ca²⁺) ou inhibée (Papavérine, Méthyl Xanthine).

L'AC peut avoir une activité plus ou moins grande, MAIS elle n'est jamais ni totalement activée, ni totalement inhibée.

(p. 96) 1. AC et contrôle de son activité

Cf le poly et retenir quelques molécules pour exemple.

Remarque à propos de l'examen :

Quand dans le cours, on a comme ici une liste de molécules, elle n'est pas spécialement à apprendre pour l'exam de Juin, car ce sont des éléments qui se retrouvent.

Par contre, pour la cession de septembre, ces listes sont à connaître par coeur. (Un conseil : évitez à tout prix la pharmaco en Septembre car l'examen est alors beaucoup plus **compliqué et** D. MARCEL beaucoup moins sympa).

2. AMPc et activation des protéines kinases A

Quand [AMPc] augmente, rôle important pour l'activation de la protéine **kinase de type A**. celle-ci phosphorylera différentes protéines.

Exemple : la tyrosine hydroxylase est régulée par la phosphorylation / **déphosphorylation**. Ce phénomène est très rapide contrairement à la synthèse protéique qui est une **forme lente de** régulation.

Cf p. 106 - Figure 2 : Le fonctionnement des protéines kinases (4 sous-unités au repos.)

Quand [AMPc] augmente, reconnu par les sous-unités régulatrices, le tétramère se défait. Les sous-unités catalytiques peuvent alors phosphoryler le substrat. Cette phosphorylation se fait sur des Acides Aminés particuliers : Sérine, Thréonine.

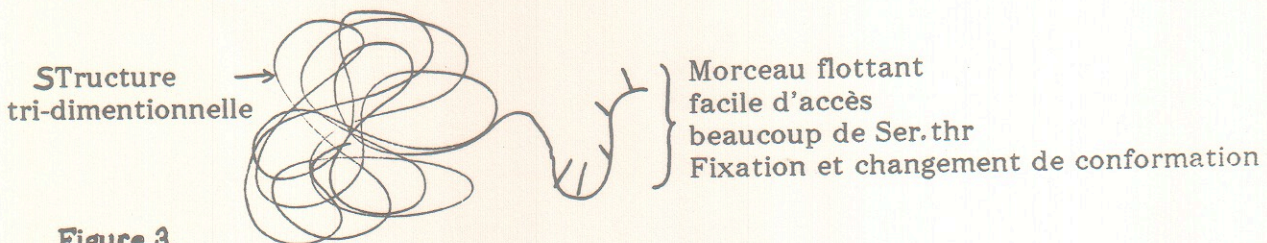


Figure 3.

Récapitulatif du couplage des Récepteur avec l'effecteur (Rs = Gs / Ri = Gi).
L'Ac transforme l'ATP, son activité est stimulée ou inhibée par Gr ou Gi.

„Bien regarder ce schéma qui résume les points importants.“

(p. 97) II. LA VOIE DE LA PHOSPHOLIPASE C

Cette enzyme est capable de générer deux second messagers : IP3 et DAG. C'est une enzyme amplificatrice.

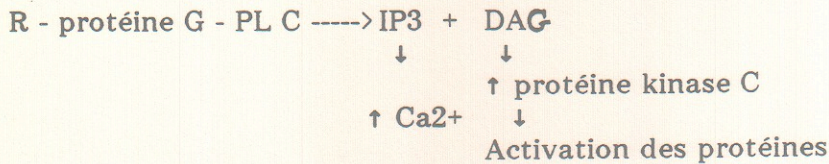
Cf p. 107 - Figure 4.

Rappel du Mécanisme d'action de la PLC avec les formules à connaître et les principaux événements.

La PLC comme l'adenyl cyclase n'est pas incluse dans la membrane mais portée par elle.

Le DAG est un constituant membranaire qui s'inclut dans la membrane tandis que l'IP3 circule dans la cellule. L'IP3 retourne dans le cycle des phosphoinositides.

Cf Figure 5 : Récapitulatif



En cours : Lecture sans d'autres commentaires ;

- (p. 97)
1. Les phosphatidyl inositols
 2. La phospholipase et contrôle de son activité
 3. Les deux seconds messagers de la voie du phosphatidyl inositol.
 - a. IP3
 - b. DAG

III. LA PHOSPHOLIPASE A2

La PL A2 est la 3ème molécule effectrice enzymatique, elle n'est connue que depuis une dizaine d'année.

C'est une molécule importante qui aboutit à l'acide Arachidonique.

La PL A2 est une enzyme de la membrane cytoplasmique, **Ca²⁺ dépendante**. Elle intervient dans la Régulation des phospholipides et du taux intracellulaire de l'acide arachidonique. Elle génère en plus une autre molécule mais dont on ne parle pas.

Cf p. 108 - Figure 6

La PL A2 agit au niveau de la fonction ester et elle libère l'Acide Arachidonique.

Figure 7

Rappel des différentes voies de synthèse de l'acide Arachidonique dont une (celle dont on parle) faisant intervenir la PL A2.

p. 109 - Figure 8

Les différentes voies du Métabolisme de l'Acide Arachidonique.

Les figures 7 et 8 ne sont pas à connaître pour ce cours.

(p. 99) 1. La PL A2 et les cascades eicosanoïdes

L'Acide arachidonique est considéré comme le **second** messager intracellulaire.

Sa dégradation peut aboutir aux epoxydes, aux prostaglandines qui, libérés par la **cellule peut** avoir un rôle modérateur sur le second messager (rétroaction).

2. Régulation de l'activité de la PL A2

La Lipocortine est une protéine membranaire, localisée il y a peu de temps. Sa mise en évidence s'est faite en étudiant le mécanisme des AINS.

46

3. PL A2 et système de transduction

a) Activité de la PL A2 et taux d'AMPc

Liste des tissus dans lesquels le taux d'AMPc est régulé par les prostaglandines.

b) Activité de la PL A2, PLC et PKC

Rôle intermédiaire du Ca^{2+} .

Comment communiquent entre elles les différentes enzymes d'une même cellule.

4. Importance physiopathologique des eicosanoïdes

L'importance de la molécule d'Acide Arachidonique est illustrée par les trois exemples :
Action au niveau du muscle lisse, des plaquettes et la réaction inflammatoire.

IV. PROLONGEMENT DE L'ACTION DES SECONDS MESSAGERS PAR LES PROTEINES KINASES

On retrouve là encore l'importance du Ca^{2+} .

1. Action des protéines kinases sur les protéines en relation avec la libération des médiateurs

a partir du moment où des protéines sont impliquées dans la libération d'un neurotransmetteur, on observe une contraction et une libération du NT par les vésicules.



Les vésicules libèrent les NT après regroupement à la terminaison et fusion de la membrane de la vésicule avec la membrane cytoplasmique. Ces phénomènes nécessitent une capacité de mouvements, de contractions, assurée par les protéines du cytosquelette.

2. Action des protéines kinases sur les canaux membranaires

- Lecture -

V. Le signal Ca^{2+}

Importance du stockage du Ca^{2+} , du taux intracytoplasmique.

Importance de l'IP3 qui libère le Ca^{2+} de ses sites de stockage.

- Bien lire -

1. Fluctuation du Calcium cytosolique

Listage de protéines reconnaissant le Ca^{2+} à l'intérieur du cytoplasme. La reconnaissance induit la fonction biologique, il s'en suit le mécanisme moléculaire de la contraction de la cellule (par exemple).

2. Protéines intracellulaires liant le calcium

VI Canaux ioniques effecteurs pour les protéines G.

Ex. : Récepteurs muscariniques du tissu cardiaque.

VII Les phosphodiésterases des nucléotides cycliques.

Il existe 5 familles de phosphodiésterases avec différents isoformes.

Cf p. 111 - Tableau 1.

Il indique les différents substrats, les différents systèmes modulateurs, les inhibiteurs, les localisations spécifiques. (Intérêt : cibler certains tissus).

Ne pas tout retenir, mais choisir deux exemples pour être capable de les citer.

VIII. Les seconds messagers & la désensibilisation des Récepteurs

Il existe un dialogue entre les Récepteurs d'une même cellule. Pour certains Récepteurs, phosphorylation et déphosphorylation peuvent être un mécanisme de régulation.

CONCLUSION

Il existe une similitude de fonctionnement malgré la grande variété.
Importance de ces systèmes effecteurs avec l'amplification des messagers.

Remarque : Cf p. 110 - Fig. 9

Fig. 10 : erreur, la légende est inappropriée, **raier cette figure**

FIN DU CHAPITRE

RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A ACTIVITE TYROSINE KINASE (p. 112)

Ce sont d'autres récepteurs intracytoplasmiques qui fonctionnent avec des effecteurs différents de ceux des récepteurs à 7 domaines transmembranaires.

Dans ce cas, c'est le récepteur lui même qui renferme son propre effecteur \Leftrightarrow Autophosphorylation.

C'est-à-dire qu'après liaison du ligand, la première réponse est l'autophosphorylation du récepteur, au niveau du cytoplasme, sur une partie riche en tyrosine.

Exemple de récepteurs : R. de l'insuline,

R. à certains facteurs de croissance.

Cf schéma n° 1

La molécule de croissance : EGF, fonctionne avec des Récepteurs très **spécifiques**.

Après reconnaissance du Récepteur, activité tyrosine kinase, le R. reconnaît **alors une PLC** (qui produit IP3 et DAG).

Le DAG active des protéines kinases C.

L'IP3 agit sur des Récepteurs localisés sur les organites stockants le Ca^{2+} .

Le Ca^{2+} augmente : . Par libération à partir de ses sites de stockage.

. Par des canaux calciques voltage dépendant.

En parallèle : Activation de canaux potassiques, sortie de K^+ , d'où **hyperpolarisation de la membrane**.

Cf p. 115 - Figure 1 : Prototype du Récepteur à Insuline.

La molécule est un enchaînement de 4 chaînes d'Acides Aminés : **2 chaîne α et deux β** .

L'extrémité C terminale des chaînes β à une localisation intracytoplasmique **et l'activité tyrosine kinase va se faire à ce niveau.**

Cf schéma n° 2

Le FGF est un autre facteur de croissance à voir. Il intervient dans la croissance des muscles et a un rôle important dans l'embryogénèse.

Le FGF peut être reconnu par deux types de Récepteurs : R à haute et à basse affinité (ce second cas ne nous intéresse pas).

Quand la tyrosine kinase est activée : deux actions :

- transfert du message,
- effet sur certaines protéines.

Une des protéines activées après l'autophosphorylation est la Lipocortine (elle activera la PL A2, donc stimulera l'acide arachidonique).

Intérêt : Ces Récepteurs sont utilisés par certains virus pour entrer dans la cellule. "Stratégie du coucou".

(Vous savez, cet oiseau qui pond dans le nid des autres)!

Cette stratégie est employée par le HIV, le Rhinovirus, le virus de la rage (emprunte le récepteur cholinergique), le Rhénovirus (Récepteur β adrénergique).

L'application de ces connaissances est la synthèse d'Antagonistes compétitifs **qui empêchent** la pénétration du virus dans la cellule.

Remarque : Les Interleukines fonctionnent aussi avec des Récepteurs **spécifiques** qui possèdent une activité tyrosine kinase.

I. Médiateurs concernés : Insuline et Facteurs de croissance.

II. Structure des Récepteurs à Activité tyrosine kinase

1. Structure générale

(Pharmacologie moléculaire)

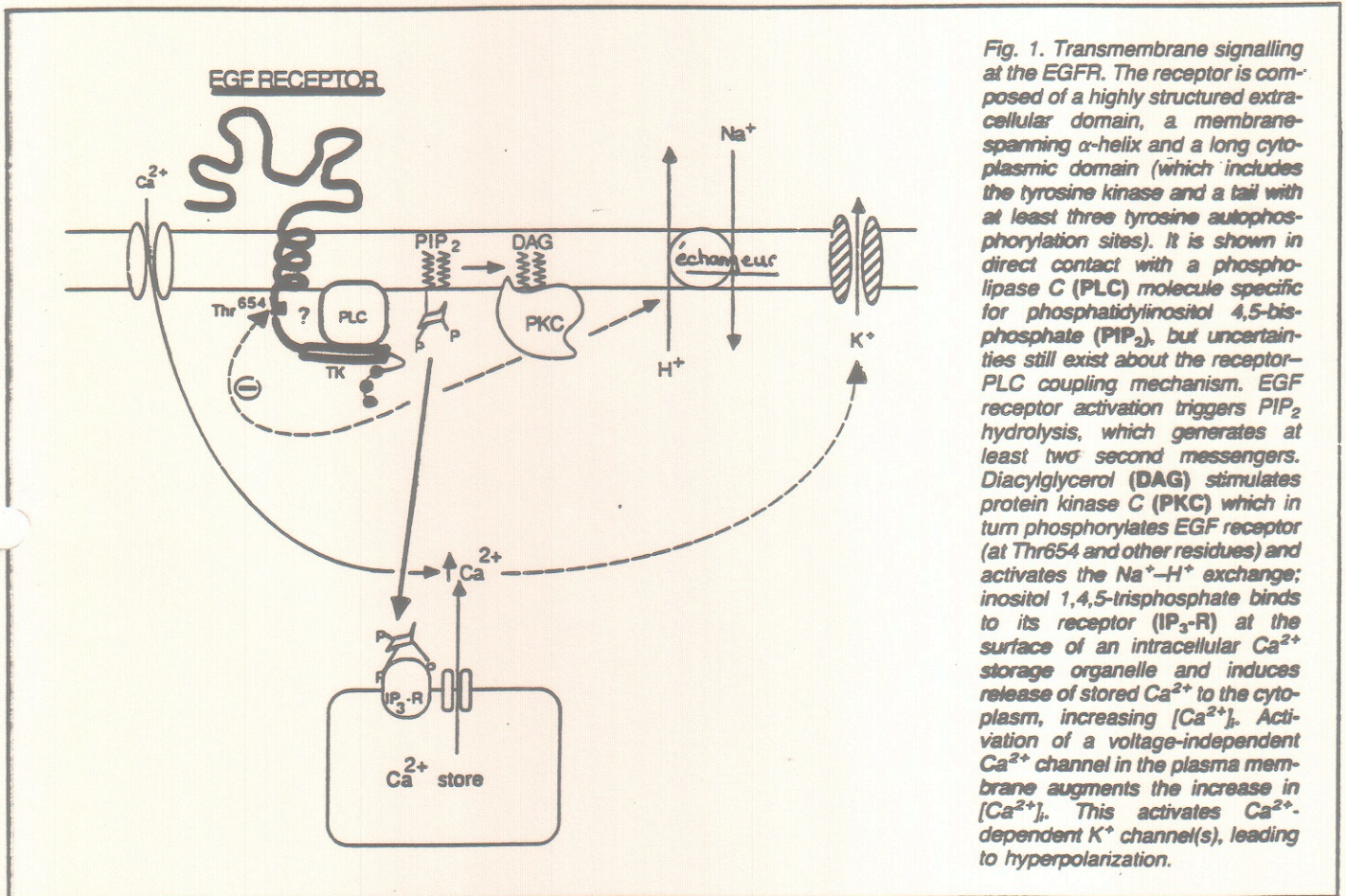
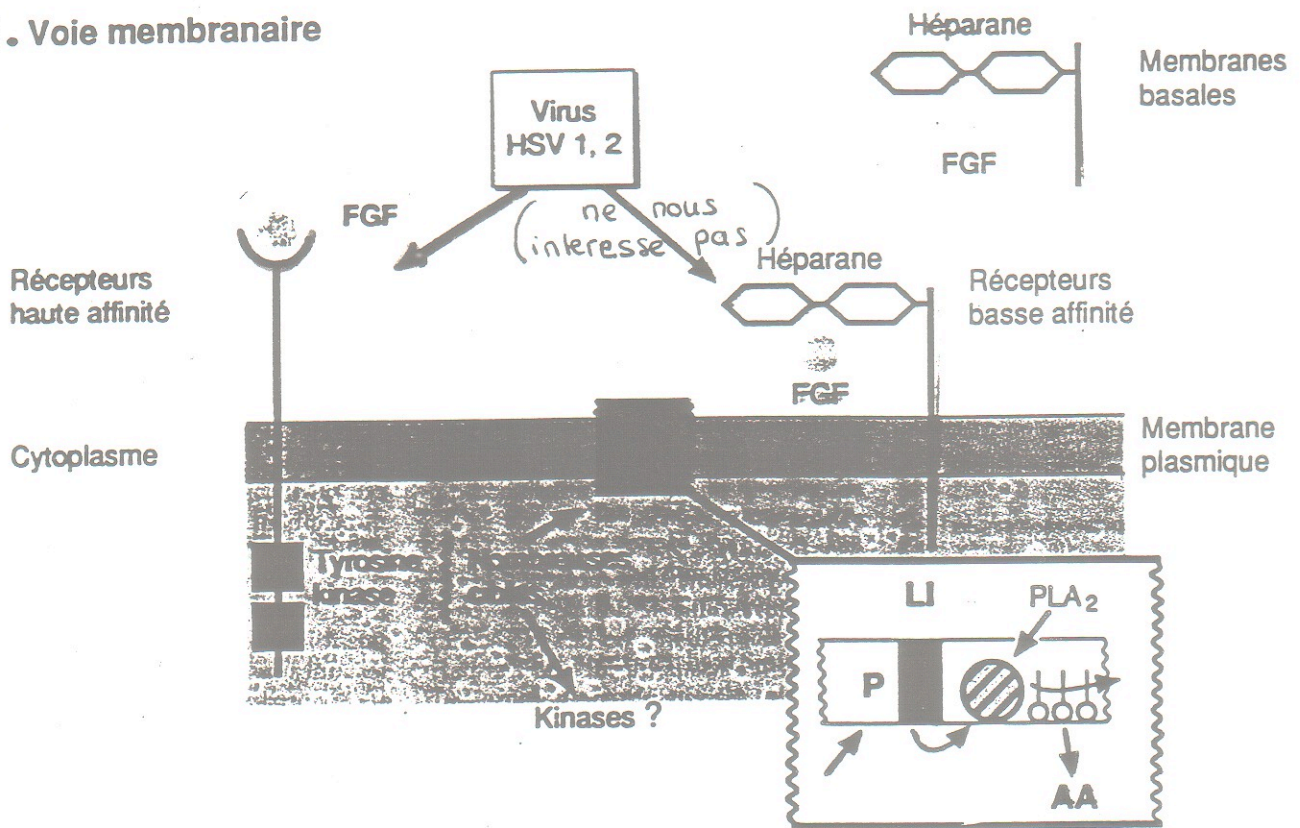
Schema n°1

Fig. 1. Transmembrane signalling at the EGFR. The receptor is composed of a highly structured extracellular domain, a membrane-spanning α -helix and a long cytoplasmic domain (which includes the tyrosine kinase and a tail with at least three tyrosine autophosphorylation sites). It is shown in direct contact with a phospholipase C (PLC) molecule specific for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP_2), but uncertainties still exist about the receptor-PLC coupling mechanism. EGF receptor activation triggers PIP_2 hydrolysis, which generates at least two second messengers. Diacylglycerol (DAG) stimulates protein kinase C (PKC) which in turn phosphorylates EGF receptor (at Thr654 and other residues) and activates the Na^+ - H^+ exchange; inositol 1,4,5-trisphosphate binds to its receptor (IP_3 -R) at the surface of an intracellular Ca^{2+} storage organelle and induces release of stored Ca^{2+} to the cytoplasm, increasing $[Ca^{2+}]_i$. Activation of a voltage-independent Ca^{2+} channel in the plasma membrane augments the increase in $[Ca^{2+}]_i$. This activates Ca^{2+} -dependent K^+ channel(s), leading to hyperpolarization.

1. Voie membranaire



2. Endocytose



3. Localisation nucléaire (nucléolaire)

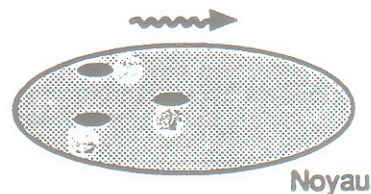


schéma n° 2

Figure 3. **Mécanisme d'action des facteurs de croissance des fibroblastes sur une cellule.** Le FGF (○) se fixe soit sur le récepteur à haute affinité, soit sur un récepteur de basse affinité. Dans le premier cas, il déclenche une activité tyrosine kinase, se phosphorylant lui-même et phosphorylant d'autres cibles. Parmi celle-ci la lipocortine (LI), une protéine membranaire qui active la phospholipase A₂ (PLA₂) provoquant la formation d'acide arachidonique (AA). Le récepteur subit alors une endocytose avec le ligand et ce dernier est dégradé. Par un mécanisme encore inconnu dans certains cas [14], le bFGF est retrouvé dans le noyau au niveau des nucléoles. Il active alors la transcription de l'ARN ribosomal. Le bFGF a aussi la possibilité de se fixer sur un protéoglycane transmembranaire, le récepteur de basse affinité, probablement sur les chaînes héparane-sulfate. On ne sait pas si ce mode de fixation transduit un message à la cellule par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire. Le protéo-héparane sulfate pourrait aussi stocker le FGF jusque dans les membranes basales, le protégeant ainsi de la dégradation par des enzymes protéolytiques. Le virus de l'Herpès (HSV-1-HSV-2) utiliserait le récepteur de haute affinité pour pénétrer dans la cellule mais pourrait aussi être stocké par les récepteurs de basse affinité que ce soit par une interaction directe ou par l'intermédiaire d'un complexe avec le FGF.

- 2. Site de liaison
- 3. Site tyrosine kinase.

III. Mécanisme de transduction

1. Rôle de l'activité tyrosine kinase

En général, il existe un mécanisme de recyclage des Récepteurs. Tandis que les R. à 7 domaines transmembranaires n'internalisent jamais l'agoniste, les Récepteurs à l'Insuline et à certains facteurs de croissance utilisent l'internalisation de l'ensemble R-L comme mode de régulation.

2. Activation d'une PLC sélective

- Lecture -

L'activité de la tyrosine kinase est suivie par celle de la PLC.

Remarque : Les protéines sont activées en général par une phosphorylation, mais on découvre de plus en plus de cas où l'activation est le fait d'une déphosphorylation.

- Lecture -

3. Effets du G IP.

4. Rôle du DAG dans les effets de l'insuline.

IV. Importance du Récepteur dans certaines pathologies

Cf p. 116. Le tableau des insulino-résistances majeures juste à titre indicatif.

Les problèmes des Récepteurs à insuline ont des origines très variées : défaut pré-récepteuriel, post-récepteuriel, défaut du Récepteur, du transfert...

Souvent, il s'agit d'anomalies d'ordre génétique.

fin du chapitre.

**RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A UNE HELICE TRANSMEMBRANAIRE
DEPOURVUS D'ACTIVITE TYROSINE KINASE
(p. 117)**

L'illustration de ces Récepteurs va se faire avec des cas particuliers.
Ces R. fonctionnent avec des systèmes de couplage encore mal connus.
Quelles que soient les espèces, ils présentent 80 % d'homologie.

I. SUPERFAMILLE DES Ig

Tous les récepteurs cités peuvent être la cible de médicaments.

II. SUPERFAMILLE DES LECTINES

Ce sont des protéines qui ont différents effets par l'intermédiaire de Récepteurs **spécifiques**.

III. RECEPTEURS MEMBRANAIRES DIVERS

1. Récepteur du NGF

Le NGF est un des facteurs de croissance du système nerveux central.

2. Récepteurs de LDL

Cf p. 120 - Figure 3.

* Pas de médicament : état normal.

Les LDL circulent dans le plasma. Les cellules hépatiques dégradent le cholestérol en acide biliaire après internalisation des LDL.

Il y a une autre voie de synthèse intra-hépatique du cholestérol : Les acides biliaires passent dans l'intestin mais reviennent au foie (cycle entérohépatique).

* Résines séquestrantes : Il existe des médicaments capables d'inhiber le cycle entérohépatique d'où une fuite des Acides biliaires dans l'intestin.

La cellule compense : elle régule sa capture de cholestérol à partir du plasma. Pour ça, elle augmente la capture des LDL par augmentation du nombre de Récepteurs synthétisés.

==> Régulation hépatique des R. des LDL par des effecteurs médicamenteux (les Résines séquestrantes ou inhibiteurs de l'HMG réductase).

Ce schéma est aussi à placer dans le chapitre : Régulation des Récepteurs.

Cf p. 121 - Fig. 2 pour illustration

On note l'importance des domaines extracellulaires.

Le site du ligand est chargé (-) (car le ligand est (+)).

(Retour p. 118)

3. Récepteur du ANP

Ce Récepteur a une structure homologue au R. des LDL.

L'ANP a un rôle au niveau du rythme cardiaque, et un rôle sur la pression artérielle.

4. Récepteur de la GH

GH : hormone de croissance.

5. Récepteur de la prolactine

Cf p. 123 - Tableau 2 résumant la localisation de ces récepteurs.

Cf p. 122 - Figure 4 : elle a peu d'intérêt. Comme dans la Figure 2 (p. 121).

On observe un petit domaine intracytoplasmique et un grand domaine extracytoplasmique.

Remarque : Les régions homologues : les bandes noires.

A souligner : Certains cancers sont hormonaux dépendants et le dosage des Récepteurs de la Prolactine dans ces cellules cancéreuses donne une indication sur l'avancée de la maladie. On réalise alors des expériences sur la densité des Récepteurs de prolactine par des protéines marquées.

FIN DU CHAPITRE

RECEPTEURS POLYMERIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE INCLUANT UN CANAL IONIQUE

Ces Récepteurs sont de grosses entités protéiques dont la structure tridimensionnelle favorise la formation d'un canal ionique.

Exemple du Récepteur du GABA qui est un Récepteur contenant le site de liaison des Benzodiazépines (BZD) :

- du Récepteur 5 HT 3
- du Récepteur nicotinique (Ach).

On commence le chapitre en regardant les figures.

Cf p. 129 - Figure 1.

Les Récepteurs sont souvent constitués de plusieurs peptides.

Le Récepteur nicotinique fonctionne avec canal ionique contrairement au R. muscarinique. Il est fait de différentes chaînes : α , β , γ , δ .

La chaîne α est responsable de l'ancrage dans la membrane.

Les domaines intracellulaires ont des propriétés particulières dans la régulation du Récepteur.

Les domaines extracellulaires sont chargés négativement.

Cette coupe transversale montre que ce Récepteur est un pentamère fait de deux chaînes α , 1 β , 1 γ , 1 δ qui sont regroupés en rosette.

Des segments sont spécifiques du canal ionique laissant passer les Na^+ .

Les différentes sous-unités de ce Récepteur ont été clonées.

Comme la Rhodopsine est le chef de file des Récepteurs à 7 domaines transmembranaires, le Récepteur nicotinique est celui des Récepteurs canaux.

p. 130 - Figure 3.

Le site de liaison de l'Ach est localisé au niveau des chaîne α .

Les antagonistes non compétitifs se lient à l'intérieur de la poche au niveau du site à haute affinité (mais il existe aussi un site à basse affinité).

Figure 4 : à supprimer.

p. 131 - Figure 6.

Le R. GABA A est constitué de deux chaîne α et deux chaînes β .

Il est formé en rosette.

Le canal laisse passer les Cl^- .

Il existe une homologie entre les domaines M qui constituent le canal.

Figure 5.

Pour une chaîne d'AA : l'extrémité NH_2 terminale est extracytoplasmique ainsi que l'extrémité COOH .

Les domaines hydrophobes sont inclus dans la membrane.

Quand aux boucles intracytoplasmiques, elles ont un rôle important dans la régulation.

Le R. du GABA peut lier les BZD qui présentent différentes propriétés pharmacologiques : Anxiolytique, Myorelaxante, anticonvulsivante, sédatrice.

On suggère maintenant que la grande diversité s'explique par la diversité des localisations. Ainsi, certains types de R. sont localisés dans les régions impliquées dans la myorelaxation l'éveil, etc.

Ces localisations peuvent être déterminées par AutoRadiographie et la Biologie moléculaire permet de préciser les différents sous-types, correspondant à des localisations différentes, et caractérisés par des sous-unités α différentes.

-> Quelques AA varient dans la structure des α d'où les variations d'effets (spécificité).

On sait donc que la diversité de localisation est responsable de la diversité pharmacologique.

- Fonctionnement du R. du GABA -

Le Récepteur est une grosse protéine avec une sous-unité reconnaissant le GABA et une sous-unité reconnaissant les BZD.

Les BZD reconnues sur le R. en modifient la conformation, d'où une variation d'affinité du R. pour le GABA (dans le sens d'une augmentation). Il s'en suit une ouverture du canal et passage des Cl⁻.

Il y a hyperpolarisation de la cellule, donc une diminution de son activité électrique.

On rappelle que le GABA est un NT inhibiteur qui voit son effet potentialisé par les BZD.

On a là un exemple d'inhibition allostérique.

Précision : Les BZD augmentent la fréquence d'ouverture du canal Cl⁻.

Remarque : Actuellement, on a reconnu 6 chaînes α , 4 β , 1 δ , et 3 ϵ . Des arrangements sont possibles, cela donne une idée de la grande diversité des Récepteurs.

Jusqu'à présent, les BZD ont été données pour leurs propriétés anxiolytiques et anticonvulsivantes. Mais les effets secondaires sont encore importants, d'où la recherche d'activité plus ciblée.

Ce qu'on a réussi à faire, c'est à synthétiser un Agoniste dont l'activité pharmacologique recherchée est à 100 % et dont les autres activités sont moindres (= Agoniste partiel).

Remarque : Attention ! Les BZD sont des molécules exogènes (ni NT, ni ligand endogène) on recherche toujours quelle molécule endogène fonctionne comme les BZD.

Cf cours poly p. 124

"L'Allostérie" est le dialogue entre les différentes sous-unités pour un changement de configuration.

Les Récepteurs canaux n'emploient pas de second messenger.

Dans les exemples de Récepteurs (ligne 15) rayer le récepteur de la glycine.

On peut établir une analogie entre l'Aspartate glutamate - le GABA : NT endogène et glycine - BZD dont la fonction est de favoriser l'action du NT.

I. LE RECEPTEUR NICOTINIQUE DE Ach

1. Morphologie du Récepteur

Cf figure

2. Canal sodique

Retenir la Chlopromazine

3. Sites de liaison de l'Ach

"Non équivalents" signifie qu'il y a allostérie.

Une molécule d'Ach se fixant induit un changement de conformation, donc l'autre Ach va se fixer différemment.

4. Sites de liaison des Antagonistes non compétitifs

5. Hétérogénéité des Récepteurs nicotiques

Cette notion est à retenir.

Les Récepteurs musculaires sont bloqués par les curares.

Les Récepteurs neuronaux, sont non inhibés par les curares.

Il s'agit donc de sous-types différents.

II. RECEPTEURS DES AA EXCITATEURS

Il existe 4 R. Ionotropiques et un R. Métabolique.

(Il appartient à la famille des R. à 7 domaines transmembranaires qui fonctionne avec la PLC).

Exemple : Le récepteur NMDA qui inclut un canal laissant passer Na^+ , K^+ , Ca^{2+} .


(Les autres Récepteurs sont constitués de la même façon : protéines tétramériques).

Le paragraphe est complété par des données récentes :

- Schéma 1 -

• Le site pour le Mg^{2+} : Mg^{2+} reconnaît un domaine dans le canal qui bloque l'entrée de Na^+ et Ca^{2+} .

Mg^{2+} est un Antagoniste non compétitif de l'aspartate et du glutamate.

Le site pour le Zn () : Zn bloque aussi le canal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

Comme Zn empêche l'ouverture du canal, c'est donc un Antagoniste.

• La glycine : c'est un Agoniste qui a son site propre.

La glycine potentialise la réponse du NMDA en augmentant la fréquence d'ouverture du canal.

→ La pharmacologie des AA excitateurs :

Leur Récepteurs sont impliqués dans divers comportements, dont l'apprentissage et la mémoire (structure du système limbique).

Ils sont fortement affectés dans certaines maladies dégénératives du SN comme l'Alzheimer, la maladie d'Huntington, les ischémies cérébrales. Ils sont aussi impliqués dans l'augmentation d'excitabilité des neurones : Rôle dans les foyers épileptiques ? (D'où la recherche d'Antagonistes contre l'épilepsie).

Par contre, on recherche des Agonistes pour favoriser l'apprentissage et la mémoire.

Exemple : DIZALCIPINE ou MK 801.

Essai pour le traitement de l'ischémie cérébrale.

III. RECEPTEURS DU GABA A.

La picrotoxine est un Antagoniste qui reconnaît le canal Cl^- .

La bicuculline est un Antagoniste qui reconnaît le site du GABA.

Cf p. 132 - Tableau 1.

Remarque : On observe que l'action du GABA B passe par le GTP.

1. GABA B.

2. GABA A : Structure des Récepteurs.

Les pharmacologues travaillent sur la structure des canaux, ils font de la construction moléculaire en faisant des regroupements de chaînes.

Puis ils réalisent des expériences afin de voir ce que donnent les différents combinaisons.

3. GABA A. : Hétérogénéité des Récepteurs.

4. Interaction avec les BZD

Les β carbolines ont aussi des sites spécifiques sur les Récepteurs du GABA.

5. Interaction avec les barbituriques et les stéroïdes

Les barbituriques potentialisent les effets du GABA.

Les stéroïdes ont des propriétés sédatives.

6. GABA C : Sa découverte est récente. Il serait différent des deux autres.

CONCLUSION : La notion d'Isoforme est valable pour tous les Récepteurs, elle explique les différences.

- Développement des Agonistes partiels pour une meilleure thérapeutique.

- Mais plus on découvre de sous-types, plus on se rend compte qu'il ne faut pas s'acharner sur une voie de recherche (Cf BZD et Récepteurs) sérotoninergiques par une action anxiolytique).

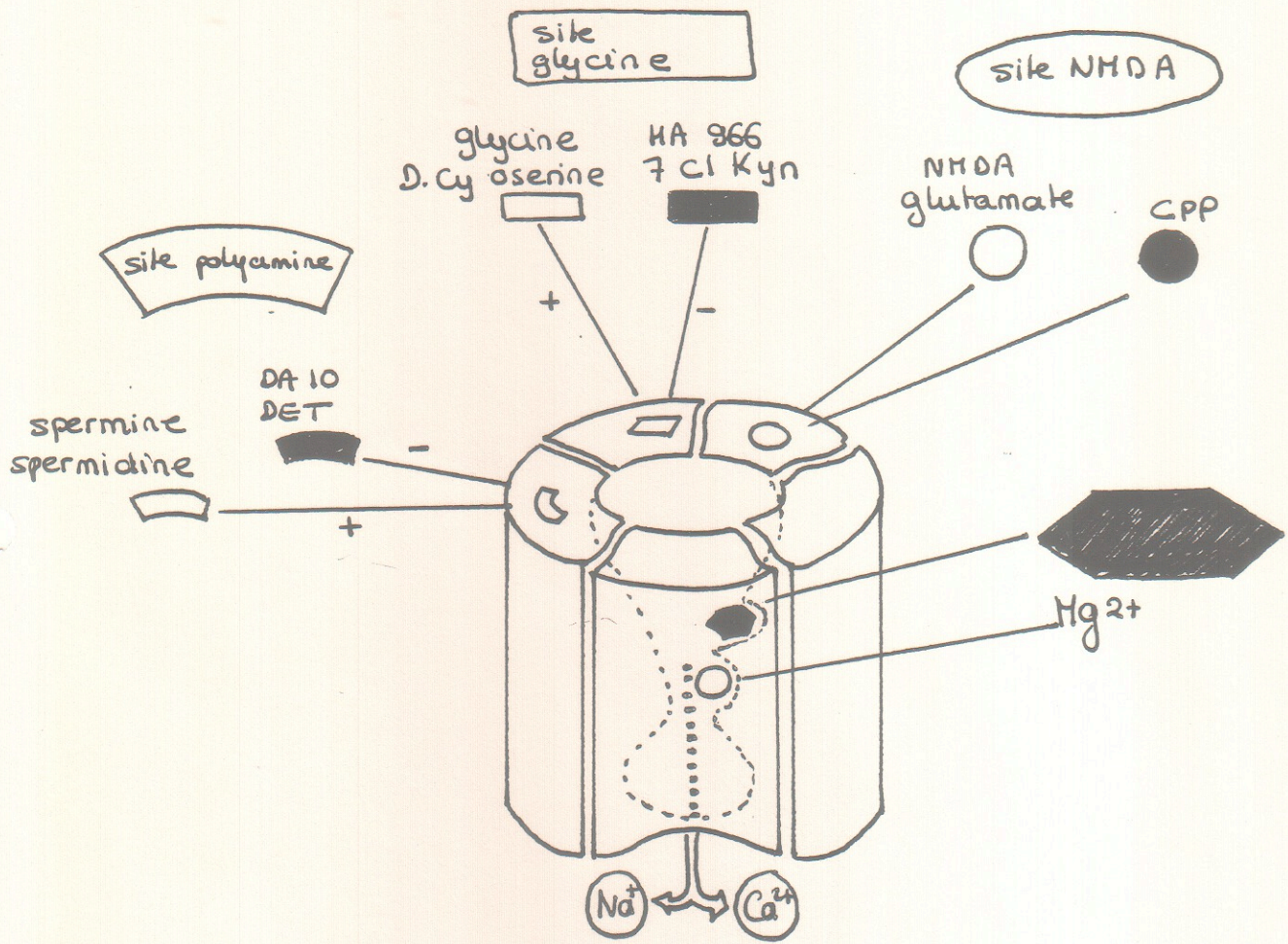


Figure 7. Récepteur au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et ses sites de régulation. Le site phencyclidine est localisé à l'intérieur du canal ionique. Le CPP [3-(+)-2-carboxypipérazine-4-yl]-propyl-1-phosphonate] est un antagoniste du site NMDA. Le HA 966 [3-amino-1-hydroxy-pyrrolidin-2-one] et la 7-chloro-kyrurénine sont des antagonistes du site glycine. Le DA10 (1-10 diaminodécane) et le DET (diéthylène triamine) sont des antagonistes du site polyamine. La glycine, d'une part, et les polyamines, d'autre part, modulent positivement le complexe récepteur NMDA.

Schema 1

RECEPTEURS DES HORMONES STEROIDES (p. 133)

Il s'agit de Récepteurs différents de ceux qu'on a vu jusqu'à présent car il s'agit de R. CYTOPLASMIQUES.

Ces Récepteurs, après reconnaissance du ligand, vont agir sur le gène lui-même pour induire un effet biologique.

Ces R. font partie de la famille de Récepteurs qui induisent une transcription.
Les hormones stéroïdes sont des facteurs de transcription nucléaire.

I. STRUCTURE DES RECEPTEURS

Ces Récepteurs existent dans le cytoplasme sous forme inactive. Lorsqu'ils lient le ligand, ils traversent alors la membrane nucléaire et vont agir sur l'ADN.

Cf p. 137 - Figure 1.

Il s'agit d'une représentation très schématique.

La structure en doigt est un enchaînement d'AA sous forme tridimensionnelle, en-dessous de laquelle on observe une poche. Celle-ci peut reconnaître du Zn.
C'est cette structure qui est en liaison avec l'ADN et qui est responsable de la synthèse protéique.

Il existe aussi un site spécifique des ligands endogènes de ce R. L'intérêt, c'est qu'on peut synthétiser des anticorps dirigés contre ce site.

(Application : dosage des R. en immunologie).

Il existe des sites de transcription : T1 et T2. Ils sont responsables de l'activation de la transcription. Ils fonctionnent en synergie avec la structure en doigt qui, elle, reconnaît les sites de transcription sur l'ADN.

A noter aussi les sites NL : NL1 et NL2, qui transfèrent le Récepteur du cytoplasme au noyau.

Figure 2

S = stéroïde = le ligand.

S traverse la membrane cellulaire pour aller reconnaître le Récepteur. (S. lipophile).

Remarque : Le R. des glucocorticoïdes serait cytoplasmique et nucléaire. Pour les autres stéroïdes il ne serait que nucléaire.

Une fois dans la cellule, S se complexe au Récepteur, le complexe va reconnaître une séquence d'ADN (c'est l'ensemble R-S qui est actif) à la fin du travail, le Récepteur libère son ligand qui peut alors quitter le noyau et la cellule.

Le récepteur libre repasse dans le cytoplasme et est inactif si c'est un Récepteur de Glucocorticoïde.

Le Récepteur libre reste sous forme nucléaire sinon.

L'activation du site de transcription a déclenché la fabrication d'1 ARNm puis la synthèse de protéines.

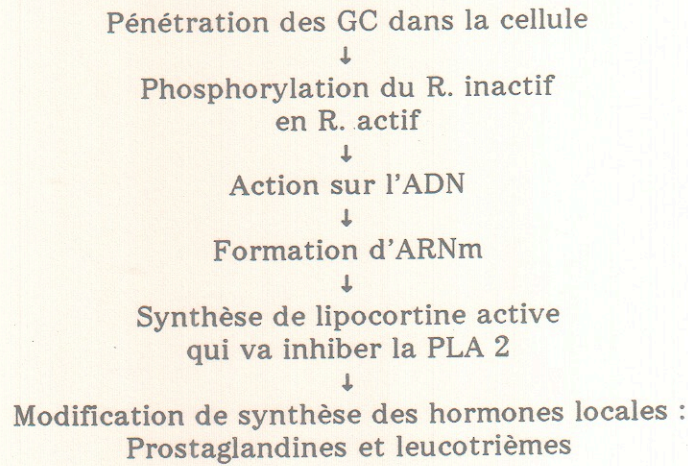
(p. 134)

ecture :

- II. Activation / transformation des Récepteurs
- III. Localisation intracellulaire des Récepteurs
- IV. Sites accepteurs nucléaires
- V. Effets génomiques.

(p. 135) La pro. opiomélanocortine est un précurseur de l'ACTH.

Glucocorticoïdes / Lipocortine : Cf p. 138, la figure 3 sur la modulation de l'activation de la PLA2 par les glucocorticoïdes (GC).



VI. EFFETS NON GENOMIQUES

Notion qui prend de plus en plus d'importance.

Les effets génomiques sont des effets à long terme tandis que les effets non génomiques sont beaucoup plus courts à apparaître : de l'ordre de la seconde.

Ces effets s'expliquent par la lipophilie des hormones : sachant qu'il existe une activité électrique dans une cellule, celle-ci est modifiée lors du passage, d'où une modification de la membrane, donc des protéines transmembranaires et des canaux, d'où une modification des échanges.

VII. IMPLICATION DES RECEPTEURS STEROIDES EN PATHOLOGIE

Lorsqu'une pathologie reste insensible aux traitements hormonaux, c'est qu'il y a un problème au niveau de la reconnaissance de ces hormones, donc au niveau de leur Récepteur.

Cas des cancers hormonaux dépendants : le traitement est à base d'Anti-hormones.

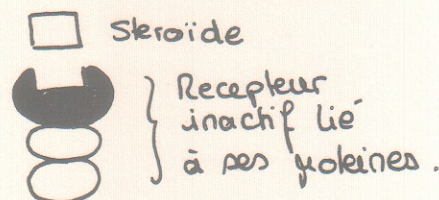
CONCLUSION

- Tous ces Récepteurs ont des effets multiples.

- Les hormones stéroïdes subissent un rétrocontrôle négatif par l'arc hypothalamo-hypophysaire (Cf Physio !), donc la modification d'un pan du système met en jeu un système hormonal beaucoup plus vaste que celui qu'on cherche à modifier, d'où la complexité des traitements.

A titre d'illustration, D. Marcel nous a présenté 4 transparents : 4 figures qui sont typiques de ce qu'elle peut donner à l'examen pour nous demander d'y mettre la légende appropriée. Elle n'a consenti à m'en fournir que deux, les deux autres étant "trop compliqués".

Transparent n° 1



La liaison stable avec le ligand induit sa transformation physicochimique.

Après dimérisation (cas général) reconnaissance d'une séquence spécifique sur l'ADN : HRE.

Ex. de L : L'insuline

Sa liaison à la tyrosine kinase induit la transconformation et l'autophosphorylation de ce Récepteur puis déphosphorylation de différentes protéines --> cascades biochimiques --> des protéines vont agir au niveau du gène pour induire une réponse cellulaire.

lieu
tra
cellulaire

lieu
tra
cellulaire:

Noyau

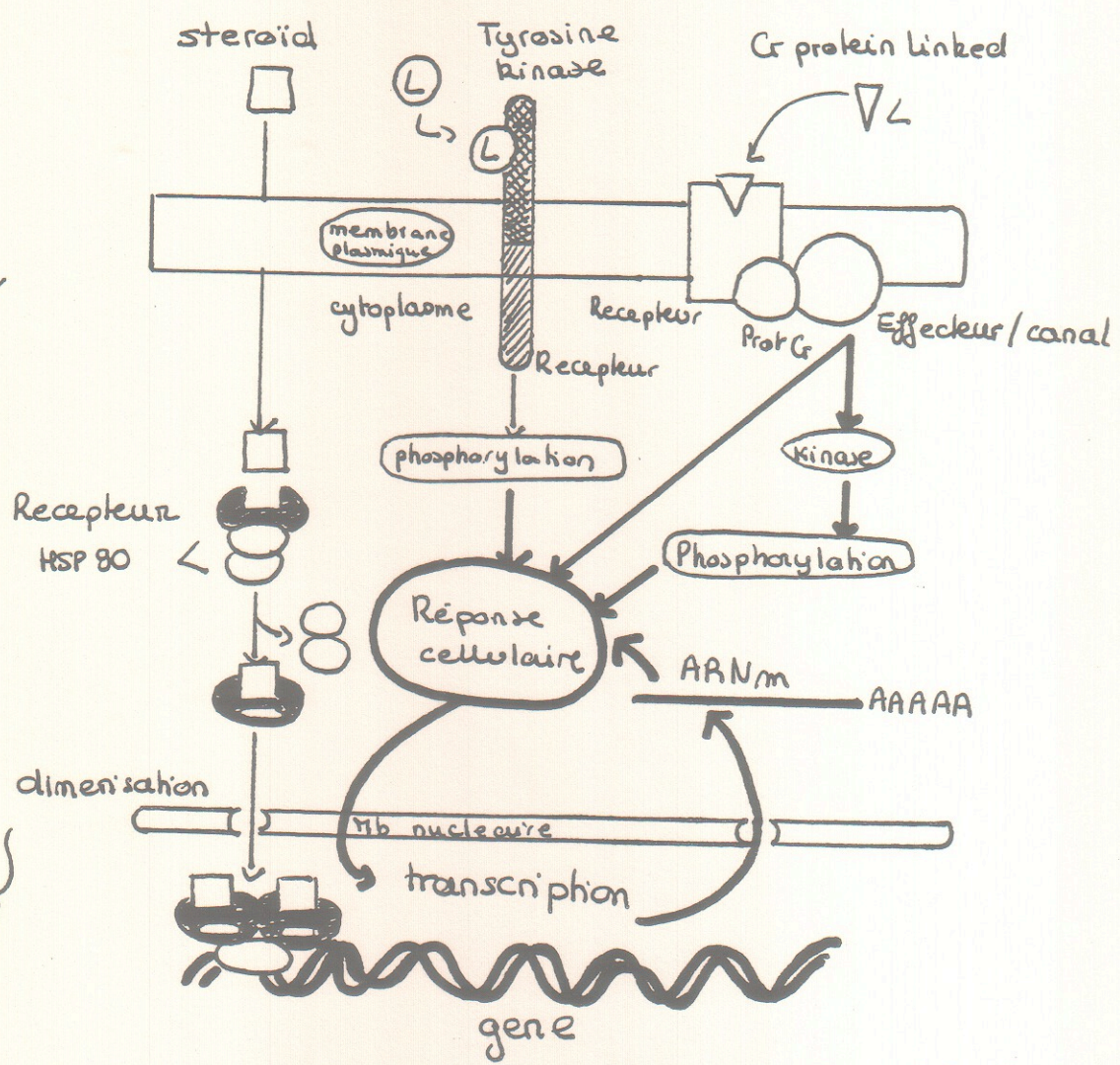


Fig. 1. Agonist activation of steroid, tyrosine kinase and G protein-linked receptors. Steroid receptors, operating as trans-acting factors, undergo dimerization after hormonal activation. The scheme shows the first steps in the pathways that mediate the actions of the three classes of receptors. Localization of non-activated steroid receptors has been reported to be in both the cytoplasm and the nucleus. Activation by hormones, therefore, might promote a translocation from the cytoplasm to the nucleus or the receptor might already be localized in the nucleus prior to activation. Stimulation of tyrosine kinase receptors and G protein-linked receptors alters protein kinase activity within the cell in a series of cascade events. In addition, G protein-linked receptors can also activate ion channels. Abbreviations: HRE, hormone-responsive element; HSP 90, heat shock protein 90.

Transparent mod

Le transparent n° 2 portait sur le fonctionnement des R. à 7 domaines transmembranaires.

Le transparent n° 3 sur les oestrogènes, dont le temps de transcription est de 3 heures. Mais avec des possibilités de répression en moins d'une heure. Là encore, ces hormones interviennent au niveau du gène ---> synthèse protéique.

Transparent n° 4

Schéma similaire à ce qui a été déjà vu qui implique les Récepteurs à 7 domaines transmembranaires.

Adenyl cyclase $\xrightarrow{\text{---}}$ protéine kinase A \rightleftharpoons unités catalytiques (C)
 ATP $\xrightarrow{\text{---}}$ AMPc

(C) Active le génome + réalise une autophosphorylation

(Le récepteur peut aussi être régulé par l'intermédiaire du R. β adrénergique).
 En fonction de la demande de la cellule, la régulation du Récepteur agit sur la synthèse de nouveaux R.

Notion "d'Agonist incluse down Régulation"

Lors d'une désensibilisation, phénomène de compensation par synthèse.

FIN DU CHAPITRE

Transparent no 4.

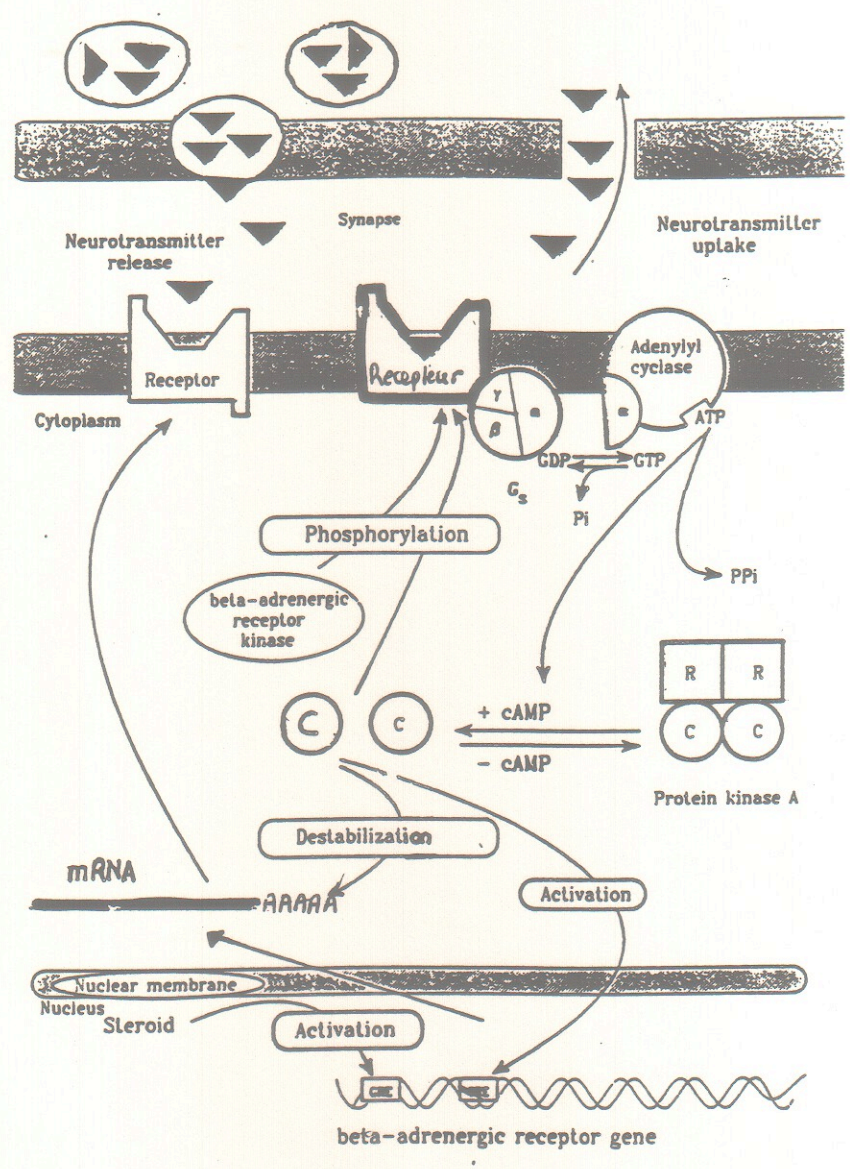


Fig. 4. Agonist regulation of G protein-linked receptor mRNA: transcriptional, post-transcriptional and post-translational controls. Agonist regulation of β -adrenergic receptors is divided into two distinct phases. In the early phase (up to four hours of stimulation), uptake of the neurotransmitter and phosphorylation of the receptor play central roles in attenuating the response to catecholamines. An early, transient, agonist-induced increase in the transcription rate (after one hour of stimulation) of the β_2 -adrenergic receptor gene increases receptor mRNA levels. In the late phase of agonist regulation (more than four hours of stimulation), the rate of transcription of the receptor gene is unaffected by the agonist. Agonist-induced down regulation of receptor reflects down regulation of receptor mRNA levels by the destabilization of the mRNA. Abbreviations: CRE, cAMP-responsive element; GRE, glucocorticoid-responsive element; G_s , the stimulatory G-protein coupled to adenylyl cyclase; P_i and P_i , inorganic phosphate; R and C, regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, respectively.

REGULATION DES RECEPTEURS (p. 141)

(En fait : fin du dernier quart d'heure du cours précédent).

Pour ce chapitre, bien connaître le vocabulaire.

Apprendre mot pour mot, car selon D. Marcel, trop souvent on change un mot pour un autre et on crée un contre sens.

Bien connaître les définitions :

Désensibilisation
Hypersensibilité
Phénomène homologue
Phénomène hétérologue.

A propos :

. de la Désensibilisation :

Elle s'explique lors de l'envahissement par un message, la cellule répond en s'adaptant donc en se désensibilisant à ce message.

. de l'hypersensibilité :

Lors d'une pathologie où il y a déficience en un NT ou lors d'une administration trop longue par un médicament antagoniste, la cellule n'est plus stimulée et elle réagit en augmentant sa réactivité cellulaire.

. des phénomènes homologues :

Lorsqu'un facteur induit une réaction compensatoire, la cellule répond uniquement à ce facteur.

. des phénomènes hétérologues.

C'est lorsque la réponse de la cellule perturbe d'autres systèmes que celui qui l'a affecté.

I. MECANISMES DE MODULATION DES RECEPTEURS

1. Séquestration des Récepteurs

Une certaine quantité de Récepteurs est intérieure à la cellule, intérieure à la membrane; certains Récepteurs auront une "bonne" forme tridimensionnelle, seront fonctionnels. Beaucoup d'autres auront une forme qui est incapable de reconnaître les Agonistes. Mais il leur suffira d'être activés pour devenir fonctionnels (ex. : par une déphosphorylation).

Il existe aussi une possibilité dans le sens forme active --> inactive. La forme inactive étant incluse dans la membrane : les Récepteurs sont séquestrés, sont là, mais sans fonction.

Ils représentent donc un potentiel.

==> C'est une forme de Régulation du Récepteur qui est très rapide.

2. Modification d'origine génétique

- Lecture -

3. Modification induite du nombre de Récepteurs.

C'est un mécanisme un peu plus long que la séquestration.

Il y a une action sur la synthèse et la dégradation.

Notion de UP régulation (toujours phénomène compensatoire à une baisse du message) et de Down régulation.

4. Modification de la fonction des Récepteurs

Par phosphorylation / déphosphorylation.

Récepteur type = R. β adrénergique.

Remarque : des Récepteurs peuvent subir tous les types de régulation (phosphorylation, séquestration...).

5. Modification distale de la fonction des Récepteurs

- Lecture -

II. MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES DES RECEPTEURS

1. Modification en fonction de l'âge

Rayer "mécanisme inconnu" à la fin du paragraphe.

Un sujet est considéré comme âgé au-delà de 60 ans. Car à partir de là, tout le métabolisme commence à s'adapter à un état différent.

2 Modification induites par une fonction endocrine

Interaction hétérologue quand administration de stéroïdes et d'agoniste β adrénergiques.

Cf p. 144 : Autorégulation homologue : Prolactine et Hormone de croissance.

Selon la dose : effets contraires.

--> Type de régulation assez compliqué.

III. MODIFICATIONS DES RECEPTEURS DANS DIFFERENTES PATHOLOGIES

Exemples de pathologies classiques :

* Asthme

Modification des Récepteurs β adrénergiques.

Rôle du pharmacien pour la vulgarisation de cette maladie en forte augmentation comme beaucoup de maladies allergiques.

* Chorée de Huntigton

C'est un dysfonctionnement des systèmes dopaminergiques, des systèmes de transmission du GABA et une augmentation des transmissions de Dopamine et NorAdrénaline.

* Maladies cardiovasculaires.

(Cours du 16 Mars 1994 proprement dit)

IV. MODIFICATIONS DES RECEPTEURS PROVOQUEES PAR UN TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE

Le plan n'a pas vraiment été suivi.

Après des traitements pharmacologiques de **longue durée**, on observe des modifications qui sont dues à la perturbation de la cellule des Récepteurs qui reconnaissent le médicament.

Tous ces phénomènes dépendent du médicament, de l'état ^{et} mais aussi de la psychologie du patient.

1. Phénomènes de tolérance

C'est la perte d'intensité de l'agent pharmacologique.

Pour une même dose administrée, avec le temps il y a diminution de la réponse physiologique :

Le malade réclame alors des doses plus fortes ou plus répétées car sinon il retrouve quelques symptômes de sa maladie.

L'idéal est d'essayer - selon l'environnement du malade - de prévoir quand la tolérance va arriver et prévoir les doses à administrer <=> Adapter la dose, avant que le malade lui-même ne la réclame.

(Dans ce cas, son angoisse lui fait réclamer des doses trop fortes)

Importance de l'équilibre entre la dose nécessaire à l'effet pharmacologique et la dose qui évite les effets secondaires.

Si le patient n'est pas hospitalisé, le pharmacien d'officine a son rôle à jouer : connaître ses clients, surveiller, etc..

Exemple de médicaments entraînant la tolérance (Cf p. 145).

Remarque : La tolérance s'accompagne ou non de Dépendance.

Les pharmacologues ont différencié plusieurs types de tolérance.

→ La tolérance pharmacocinétique.

Cf 1er chapitre du poly sur le métabolisme des médicaments : certains médicaments administrés sous forme inactive subissent l'intervention d'enzymes qui, elles, peuvent subir une tolérance (= habitude) et voir leur cinétique perturbée.

==> Il y a Adaptation des mécanismes de transformation métabolique et des mécanismes d'élimination, ce qui entraîne donc une variation de la biodisponibilité de ces médicaments.

→ La tolérance cellulaire.

C'est une adaptation de la cellule qui comporte les mécanismes moléculaires cibles de l'action du médicament.

Ce phénomène de tolérance dépend de la voie d'administration du produit, de sa posologie, de sa fréquence d'administration.

Ces tolérances sont souvent **dose dépendante**.

Point important : Quant on administre un médicament quelconque, on arrive à avoir une tolérance de l'organisme pour les effets majeurs du médicament mais pas pour les effets secondaires.

Il faut donc un compromis entre la thérapeutique et les effets indésirables.

La tolérance cellulaire est parfois appelée "Tolérance fonctionnelle chronique".

"Chronique" car développée par une administration répétée.

Cette Tolérance peut avoir différentes cinétiques d'apparition en fonction des drogues administrées.

Ainsi, les cinétiques d'apparition pour les Barbituriques ou les Benzodiazépines (BZD) sont très différentes en fonction des molécules.

On distingue les barbituriques à action courte : Tolérance installée en quelques jours.

Barbituriques à action longue : Tolérance en quelques semaines.

Les BZD, eux, développent une Tolérance en quelques mois.

Remarque : Il existe une escalade des posologies que le Pharmacien doit être capable de détecter chez ses clients réguliers.

Le plus souvent, on cite les BZD (anxiolytiques, myorelaxants, sédatifs, anticonvulsivants).

L'effet de Tolérance est beaucoup plus souvent observé pour l'effet anticonvulsivant et antiépileptique que pour l'effet anxiolytique.

Quand on administre des BZD, la tolérance observée au bout de quelques mois sera suivie d'un effet de dépendance.

Les effets hypnotiques ou sédatifs présentent ici une tolérance.

Depuis 1992, il existe de nouvelles règles pour déterminer les posologies de ces molécules : les posos sont plus restrictives. En général, au bout de 4 semaines de traitement, le médecin doit commencer à diminuer les doses.

En effet, lorsqu'il y a dépendance, on observe un phénomène de sevrage ou "Rebond".

Avec ce type de molécules, on ne peut pas arrêter brutalement le traitement.

Les doses doivent être diminuées progressivement.

Les BZD ont un site de reconnaissance sur le R. de GABA; Les BZD n'ont pas d'effet en tant que tel, mais il induisent une variation allostérique et une variation d'affinité du GABA pour son Récepteur.

Mais, avec le temps, cette augmentation d'affinité diminue le passage des Cl^- est donc perturbé, ainsi que la physiologie des cellules cibles.

==> "Tolérance fonctionnelle au niveau du Récepteur GABA-BZD"

Autre exemple : celui des antidépresseurs qui inhibent la recapture des monoamines par le neurone présynaptique, donc le NT agit plus sur le neurone post synaptique.

Or ces monoamines diminuent l'activité des neurones β adrénergiques.

Il y a un phénomène de Down Régulation de ces neurones post-synaptiques.

Pour le même effet, on devra augmenter les doses.

Comme ce n'était pas clair, j'ai voulu demander une explication qui m'a été refusée car "ce n'est pas important", faites en donc ce que vous voulez...

Les phénomènes de tolérance peuvent se développer avec tous les Morphiniques.

Ces molécules normalement ne sont admises qu'en milieu hospitalier pour pallier des douleurs importantes.

Là aussi, il faut faire attention aux posologies.

La tolérance des morphiniques dans le cas des douleurs chroniques est un problème délicat.

Ces douleurs sont différentes en fonction des individus. Ce qui est recherché c'est une concentration active minimale plasmatique pour maintenir un seuil de douleur moindre, supporté par le patient.

Si ce seuil diminue, il entraîne une douleur supportable mais une angoisse intense et le malade réclame alors des doses beaucoup plus fortes que nécessaire.

Ce qui est fait actuellement pour éviter les prises répétées de Morphiniques, c'est leur remplacement progressif par la Méthadone et le Moscontin^R.

Remarque : Auparavant, la Morphine était administrée, sachant que sa durée d'action est de 4 heures, cela entraînait un comportement de prise régulé de la part du malade qui, ainsi, s'entretenait un stress.

Il paraît que c'est le contexte culturel français qui a retardé l'emploi de la méthadone et du Moscontin en France, par rapport aux autres pays européens (là, les médecins n'opposent pas un refus à ce qui évite la douleur, même si ça crée une dépendance).

La Méthadone : sa durée d'action est de 55 H.

Son inconvénient est une élimination un peu plus difficile avec des risques d'accumulation et de stockage.

Il faut donc veiller à éviter la toxicité.

Le Moscontin = Chlorhydrate de Morphine est donné en milieu hospitalier seulement en deux prises/ 24 H.

2. Phénomène de Dépendance

Il faut faire la différence entre la dépendance physique et la dépendance psychique.

Cf définition de la dépendance physique, p. 145.

La dépendance psychique est, elle, "une envie irrésistible de prendre le médicament."
Ce phénomène existe car il existe une adaptation de l'organisme après des prises répétées.
L'arrêt brusque entraîne un syndrome de sevrage ou d'abstinence ou phénomène de rebond.

En général, les effets sont alors opposés à ceux de la drogue et il y a retour à la pathologie initiale.

3. Le syndrome de sevrage

Il existe vis à vis des Barbituriques, des BZD, des β bloquants et des Morphiniques.

Exemple du Propranolol qui est un B bloquant : son arrêt brusque entraîne une tachycardie et peut aller jusqu'au stade extrême qui est l'infarctus du myocarde.

Cela s'explique par une hypersensibilité du coeur aux catécholamines.

Lorsqu'on administre un β bloquant, la cellule réagit par UP Régulation (c'est un phénomène compensatoire). Ce phénomène se développe pendant le traitement et surtout, il persiste malgré son arrêt. (Dure encore 1 à 2 semaines).

C'est pourquoi on diminue progressivement la posologie pour revenir à un nombre normal de Récepteur et éviter l'hyperactivité.

On parle de "syndrome des parasympho-mimétiques" quand le nombre de Récepteurs persiste alors que le taux de Propranolol disparaît assez vite.

Intérêt : On a recherché quelle molécule utiliser pour éviter ces phénomènes de dépendance. On a alors pensé à administrer un agoniste partiel plutôt que l'antagoniste. De plus en plus on utilise donc le **Pendolol** plutôt que le Propranolol; avec ce produit, il n'y a presque pas de phénomène de sevrage.

Exemple des Récepteurs opioïdes.

Les morphiniques entraînent une dépendance physique et psychique après le phénomène de tolérance.

Tolérance élevée pour :

- l'action émétisante, antidiurétique,
- la dépression respiratoire,
- l'analgésie,
- l'hypothermie, l'hypotension.

Tolérance moyenne pour :

- bradycardie.

Tolérance faible pour :

- la motricité de l'appareil digestif,
- la mydriase.

Deux exemples de dose :

Une personne non tolérante aux morphiniques peut mourir (d'une dépression respiratoire) avec 60 mg/j de morphine.

Une personne tolérance nécessite pour ça 4 g/j.

C'est donc la mise en évidence de la complexité du traitement selon que c'est une personne présentant un cancer et nécessitant des morphiniques comme analgésiques ou une personne atteinte de SIDA et dont on veut traiter les douleurs par ces mêmes morphiniques.

Remarque : Existence de tolérances croisées.

Ce sont des tolérances développées à cause de la Morphine à l'égard des autres molécules appartenants à la famille des peptide opioïdes.

C'est un problème qui se développe de plus en plus avec le traitement des toxicomanes en milieu hospitalier.

Le phénomène de syndrome précipité est à éviter :

C'est un syndrome de sevrage qu'on observe avec l'administration d'Antagonistes.

Quand il y a développement d'une tolérance à certains médicaments + un phénomène de dépendance, et que pour le contrer, on administre un antagoniste (ex. d'antagoniste morphinique = Analoxane).

La personne peut alors décéder très vite ($t < 3$ h) des effets opposés aux effets des morphiniques.

C'est-à-dire : anxiété, insomnie, tachycardie, hypertension, anorexie, diarrhée...

! Attention donc à ne pas administrer d'Antagonistes mais des Agonistes à durée de vie plus longue (Méthadone).

Compréhension de tous ces phénomènes ?

En fait, au niveau cellulaire, il y a diminution du second messenger. Au fur et à mesure que l'Adényl cyclase diminue, le taux d'AMPc dans la cellule fait de même.

Les phénomènes de tolérance et dépendance s'expliquent par ce dysfonctionnement cellulaire qui est la diminution de l'AMPc.

Il existe d'autres voies de recherche :

- L'inhibition des phosphodiésterases pour augmenter le taux d'AMPc.

Ainsi, on pense à administrer de tels inhibiteurs en association avec la morphine pour éviter la dépendance qu'elle induit.

Autre exemple : La dépendance aux neuroleptiques.

Les neuroleptiques sont des Antagonistes Dopaminergiques. Ils traitent l'hyper-réactivité de la cellule.

Ils créent un état d'hypersensibilité et un syndrome de sevrage si arrêt brusque du traitement.

Comme leur nombre a augmenté, les Récepteurs sont capables de recevoir plus d'information par l'intermédiaire de leur ligand naturel (la Dopamine). D'où des troubles endocriniens, psychiatriques et neurologiques.

On voit alors le sujet développer des mouvements anormaux de la face et des membres "DISKINIE tardive". Cela peut persister jusqu'à 2 ans après l'arrêt du traitement.

Parfois, on note des comportements irréversibles.

==> Importance de la posologie de ces antagonistes.

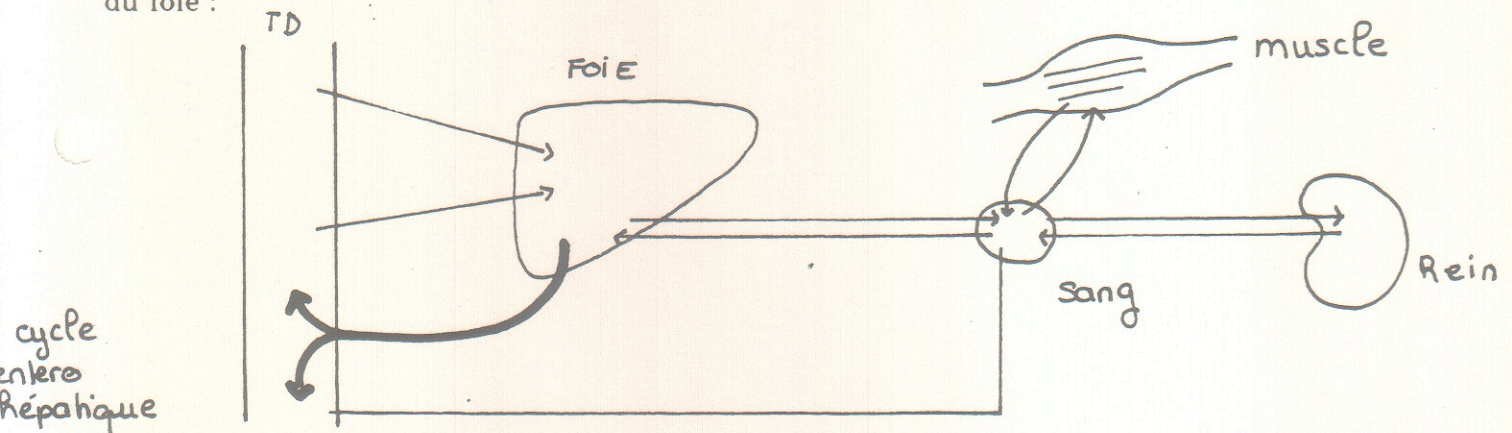
Importance de l'adaptation de ces posos aux enfants, personnes âgées, toxicomanes.

FIN DU CHAPITRE

DEVENIR DU MEDICAMENT : SA BIOTRANSFORMATION (Cf p. 5)

Pendant cette dernière heure de cours D. MARCEL ne nous a rien révélé de nouveau. Ce chapitre fait juste le tour de quelques notions de pharmacocinétique déjà vue avec Mr BRAZIER.

Présentation d'un schéma qui résume l'importance du passage des médicaments au niveau du foie :



Le foie réalise la métabolisation des médicaments.

Le schéma montre une double flèche entre le sang et les différents tissus, c'est un point important qui signifie qu'il n'y a pas d'accumulation du médicament, donc pas d'intoxication.

On note que quelle que soit la voie, le médicament transite forcément par le foie qui est le principal organe de métabolisation.

Quelle est l'importance de cette métabolisation ?

--> Le médicament est une substance exogène qui doit être éliminée de l'organisme. Pour cela, elle doit être la plus polaire possible. Or, c'est la métabolisation qui permet d'accroître la polarité des molécules pour favoriser leur élimination rénale. (Cette polarité est donc surtout acquise par des réactions au niveau des cellules hépatiques).

La Pharmacocinétique joue entre les différents paramètres qui régulent le temps de 1/2 vie d'un médicament :

- vitesse d'absorption } paramètres pharmacocinétiques
- vitesse d'élimination }
- clearance,
- biotransformation (métabolisation).

Le $t_{1/2}$, c'est-à-dire le temps de passage du médicament dans l'organisme est donc aussi régulé par la métabolisation.

Les réactions de métabolisation font partie de deux groupes.

Dans le groupe I, on a des réactions très simples : réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse où intervient une hémoenzyme : le cytochrome P450 dont il existe de nombreuses isoformes au niveau hépatique.

Ces réactions peuvent aboutir à trois métabolites de fonctions différentes.

Attention ! La métabolisation n'induit pas forcément une forme inactive. Au contraire, on peut administrer une molécule inactive et c'est sa biotransformation qui en fait une molécule active.

Dans le groupe II, on a des réactions plus compliquées où interviennent des enzymes plus spécifiques. On a des réactions de conjugaison = transfert d'un groupement sur une molécule. Ces réactions de phase II aboutissent toujours à des métabolites inactifs.

Récapitulatif



* C'est-à-dire que le métabolite est actif, mais d'une façon différente par rapport à la molécule mère.

Exemple : Molécule mère active sur le récepteur D1.
Son métabolite est actif sur D2.

— A la suite de cette Introduction, D. Marcel a essentiellement fait la lecture du poly.—

Cf p. 5.

Le métabolisme est la transformation biologique d'une substance par un ou des systèmes enzymatiques.

Noter qu'on peut avoir des réactions de Phase I puis de Phase II ou de Phase II ou de Phase II seulement.

Les métabolites sont considérés comme toxiques lorsqu'ils sont stockés trop longtemps, c'est-à-dire lorsque leur temps de présence est important et pas forcément parce qu'ils sont en trop grande concentration.

Remarque : Un xénobiotique est un produit exogène sans action physiologique. Certains, classent les médicaments dans les xenobiotiques.
- A discuter -

I. COMPARTIMENTS OÙ S'EFFECTUENT LES BIOTRANSFORMATIONS

De nombreux tissus sont capables de réaliser des biotransformations: Ils possèdent pour cela des enzymes plus ou moins spécifiques des réactions de Phases I et II. Le cyt P450 est localisé dans le réticulum endoplasmique lisse.

1. Niveau hépatique

90 % des biotransformations on lieu dans le foie.

2. Niveau sanguin

Les érythrocytes renferment aussi le cyt P450.

3. Niveau biliaire

4. Niveau des tissus et organes

Noter qu'il existe une localisation préférentielle de certains médicaments pour le placenta.

II. MECANISMES DE BIOTRANSFORMATION

Un système enzymatique fonctionne avec 1 Km et 1 Vm, c'est donc quelque chose de spécifique et de régulé, donc c'est un système saturable.

De nombreux produits interviennent sur l'Induction du gène du cyt P 450 :

Exemple d'un médicament (A), son administration induit la transcription du cyt P450.

Donc, le nombre d'enzymes et les capacités de métabolisation augmentent.

Si la métabolisation se fait sur (A) \Leftrightarrow Autorégulation.

Si elle se fait sur (B) et non sur (A) \Rightarrow il y a interaction médicamenteuse au niveau de la biotransformation.

Dans le groupe des réaction de Phase I, on note l'importance des réactions d'oxydation.

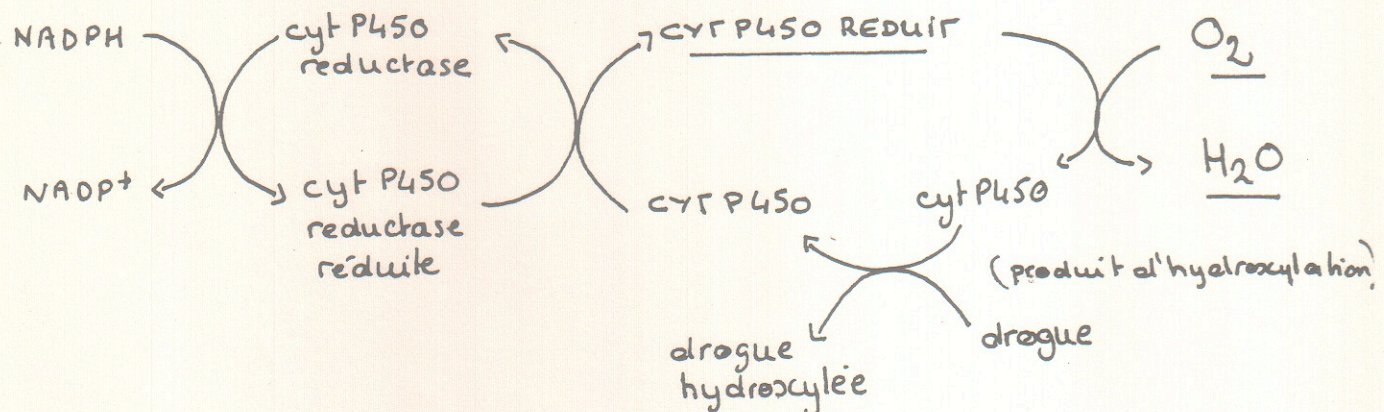
Quelques exemples sont à connaître (Cf p. 8 et p. 9) :

- l'hydroxylation d'une chaîne aliphatique,
- l'hydroxylation aromatique,
- la N-déalkylation,
- La o-déalkylation,
- la désamination oxydative,
- la formation de sulfoxyde,
- la N-oxydation.

(Retour p. 7) Les réactions d'oxydation sont gouvernées par le cyt P 450.

C'est une hémoprotéine dont on ne connaît pas encore toutes les isoformes (> 30).

Cf p. 14, figure 3 : le système du P 450.



Le cyt P 450 travaille aussi à la métabolisation de nombreuses substances endogènes : Prostaglandines, Acides gras, Stéroïdes (plus: dans la métabolisation des insecticides). Il existe donc pour tous ces produits des possibilités de saturabilité.

Lorsqu'un individu est malade, il y a une possibilité de dysfonctionnement des réactions de biotransformation. Cela nécessite des adaptations de posologie.

C'est avec ce genre d'application qu'on comprend l'importance de la Pharmacocinétique.

L'INDUCTION DU CYT P 450

Il est important de connaître les quelques molécules inductrices citées.

1. Les phénobarbital

Il augmente la métabolisation des anticoagulants oraux (ACg oraux).

Il faudra donc augmenter la dose de ces ACg oraux.

Mais à l'arrêt du phénobarbital, il y a donc un risque hémorragique.

2. La Rifampicine

Elle augmente la métabolisation de tous les contraceptifs oraux.
==> D'où des grossesses malgré la pilule.

3. Alcool

4. Hydrocarbures

5. Glucocorticoïdes

Pour tous ceux qui travaillent en officine, bien regarder le Tableau 3, p. 17. Pour les autres, connaître 2 ou 3 exemples.

Cf p. 10. La conjugaison

- Lecture -

Noter les deux exceptions : Méthylation et acétylation.

La faible liaison aux protéines plasmatiques : seules les formes véhiculées par le plasma sous forme libre passent dans les tissus.

L'intérêt de cette fixation aux protéines plasmatiques c'est le transport des molécules jusqu'aux tissus cibles, mais à leur niveau il faut que la liaison soit réversible sous peine d'intoxication.

La fixation faible est également nécessaire pour permettre la filtration glomérulaire au niveau du rein.

Important : A connaître : la liste "Nature de la réaction" "Réactif impliqué" (c'est-à-dire le réactif additionné sur le xénobiotique) et "les enzymes de conjugaison".

Les enzymes concernées sont des transférases : elles coupent un groupement et le transfère sur une autre molécule.

D. Marcel nous a présenté une fiche avec deux exemples :

Exemple n° 1 : Ac. UDP α glucuronique.

Action de la glucuronyl transférase.

L'Ac glucuronique est sous forme activée, lié à l'UDP (Uridine di P).

La glucuronyl transférase transfère l'ac. glucuronique de ce complexe à la molécule réceptrice.

Exemple n° 2 : 3'P adénosine 5' Phosphosulfate

Action d'une sulfotransférase.

Cf p. 11, ce qu'il faut pour qu'une réaction de conjugaison se produise.

II 5. - Autres mécanismes }
II.6. - Réactions non enzymatiques } lecture

III. METHODES D'EXPLORATION

Intérêt : Connaître les facteurs individuels.

But : Adapter la posologie.

IV. COMPLEXITE ET VARIABILITE DES PHENOMENES METABOLIQUES

1. Complexité

Lecture. Bien comprendre.

Exemple de l'acide salicylique fig. n° 1 p. 14 à regarder, mais pas à connaître.

2. Variabilité

Se reporter aux tableaux 2 et 3.

Cf p. 13 : autres causes de variabilité.

- Age
- Facteur alimentaire
- Pathologie

Importance de l'état circulatoire puisque c'est le sang qui véhicule les médicaments.

Noter que lorsque la marge thérapeutique du médicament est étroite : l'adaptation de la posologie est plus problématique.

CONCLUSION

- Les processus régulés dans l'organisme peuvent subir de grandes variations en fonction de l'individu.
- L'adaptation des posologies est quelque chose de difficile.

D. Marcel conseille vivement pour la compréhension de ce cours l'"Aide mémoire de Pharmacologie" d'ELGHOZI et DUVAL.

FIN DU COURS DE PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE

ça n'était pas évident...