

# ENSEIGNEMENT DIRIGE DE PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE

## ED n°2: ETUDE PHARMACOLOGIQUE DES RECEPTEURS DOPAMINERGIQUES ET RECHERCHE DE NOUVELLES MOLECULES

La dopamine est un important neuromédiateur cérébral impliqué dans les contrôles des fonctions motrices, émotionnelles et cognitives. L'altération du fonctionnement des systèmes dopaminergiques (DA) est à l'origine d'affections neurologiques et psychiatriques telles que la maladie de Parkinson et la Schizophrénie.

La connaissance des systèmes dopaminergiques (DA) et de leurs récepteurs, ainsi que leur pharmacologie sont actuellement la base de la découverte des principaux médicaments utilisés en neurologie et en psychiatrie.

Cinq sous-types de récepteurs DA sont aujourd'hui décrits.

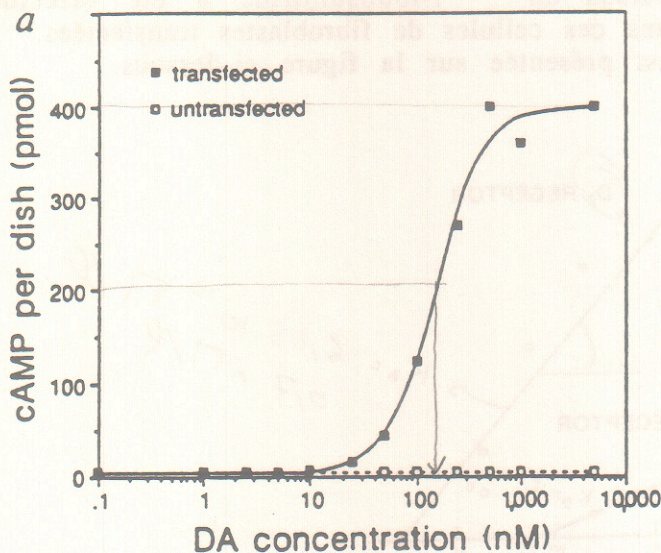
Aucun de ces récepteurs ne représente à lui seul le site unique d'action de tous les neuroleptiques. Ces molécules sont des antagonistes DA qui constituent la base du traitement chimiothérapeutique des psychoses mais ils produisent des effets indésirables neurologiques, neurovégétatifs et endocriniens.

Quelques résultats expérimentaux présentés dans l'exercice ont contribué à la caractérisation de ces sous-types.

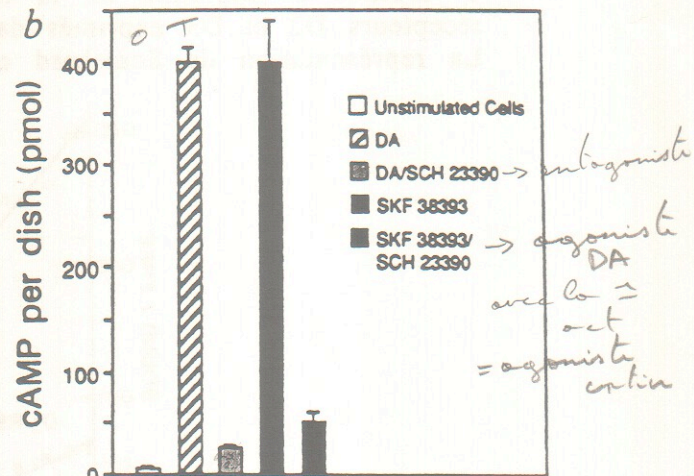
A- Les sous-types D1 et D2, connus depuis une dizaine d'années, ont été au départ différenciés par leur effets sur l'AMPc.

Depuis, le récepteur humain D1 a été cloné; des cellules embryonnaires de reins humains ont été transfectées afin d'exprimer le récepteur en vue d'une étude pharmacologique de caractérisation. Les accumulations d'AMPc à l'intérieur de ces cellules, induites par la dopamine ou le SCH 38393 ajoutés au milieu, ont été mesurées.

Les résultats obtenus sont représentés sur les figures ci-dessous.



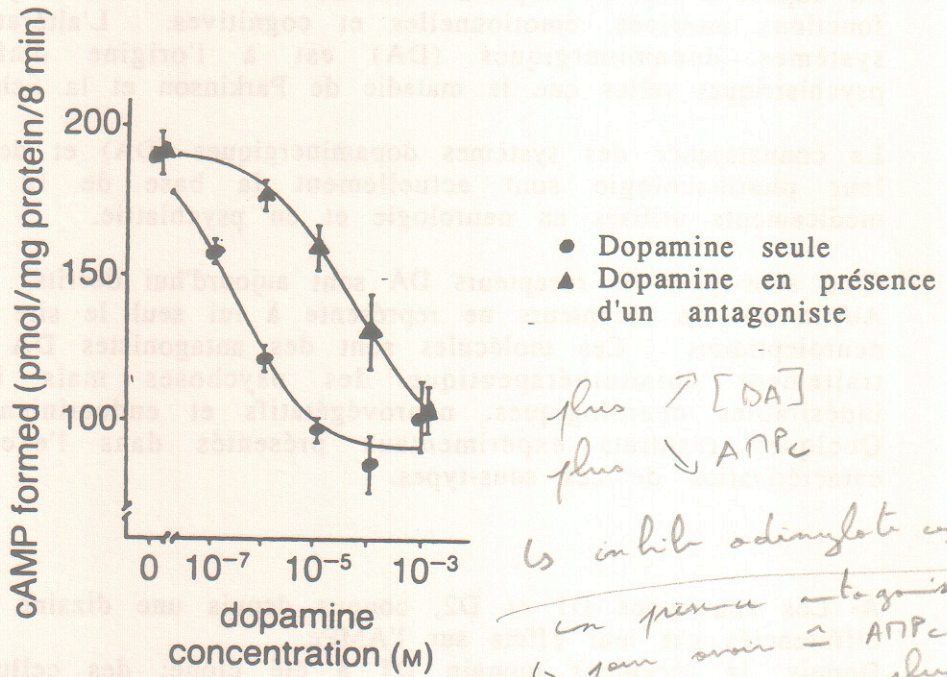
→ conc AMPc qui est d'induire par DA.



antagoniste  
agoniste DA  
avec la =  
act  
= agoniste continu

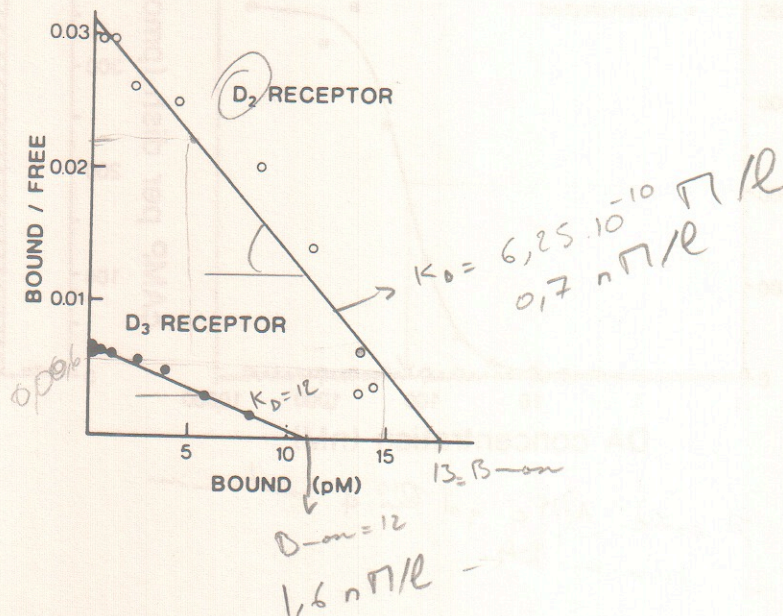
dish = cellule

- 1- Que pouvez-vous en conclure quant au système de transduction utilisé par le récepteur D1?  
 → active  $\theta$  de l'adénylate cyclase (il peut y avoir inhib)
- 2- A votre avis, comment agit le SCH 23 390?  
 → antagoniste sur le type D<sub>1</sub> (pas agoniste partiel)
- 3- Comparez ce système à celui utilisé par le récepteur D2 illustré par la figure ci-dessous où le taux d'AMPc formé a été mesuré après activation des récepteurs D2 exprimés par des cellules lactotrophes.
- 4- Quel est l'effet de l'antagoniste sur le taux d'AMPc formé?



B- Le sous-type D3 se distingue des sous-types D1 et D2 par sa pharmacologie et sa localisation.

1- L'étude à saturation de la liaison du  $^{125}$ I-iodosulpiride a été effectuée sur les récepteurs D2 et D3 exprimés dans des cellules de fibroblastes transfectées. La représentation de Scatchard est présentée sur la figure ci-dessous.



Comparez les caractéristiques de liaison ( $K_D$  et  $B_{max}$ ) de cet antagoniste au niveau de ces 2 sous-types.

2- L'inhibition de la liaison du  $^{125}I$ -iodosulpiride par des concentrations croissantes de différentes molécules a été étudiée au niveau des récepteurs D2 et D3.

Le pourcentage de la liaison spécifique, en absence ou en présence de ces molécules, a été calculé.

Les résultats sont présentés sur le tableau ci-dessous:

concentration (M)	HALOPERIDOL $9,5 \cdot 10^{-8}$		PIMOZIDE $2 \cdot 10^{-8}$		UH 232 $10^{-8}$	
	D2	D3	D2	D3	D2	D3
0	100	100	100			100
$5 \cdot 10^{-10}$	70	90	95	100	100	95
$10^{-9}$	45	75	90	95	95	90
$5 \cdot 10^{-9}$	25	50	70	90	90	80
$10^{-8}$	10	30	60	55	80	60
$5 \cdot 10^{-8}$	5	15	25	25	60	15
$10^{-7}$	1	5	5	10	45	5
$5 \cdot 10^{-7}$		0	1	2	15	1
$10^{-6}$					5	
$5 \cdot 10^{-6}$					0	

*long conc.*

*% liaison spécifique (calculé)*

1- Représentez les courbes de déplacement de cette liaison (% liaison spécifique = f (concentration)) par les 3 molécules: halopéridol, pimozide et UH 232 au niveau des récepteurs D2 et D3.

En déduire les IC50 pour chacune d'elles.

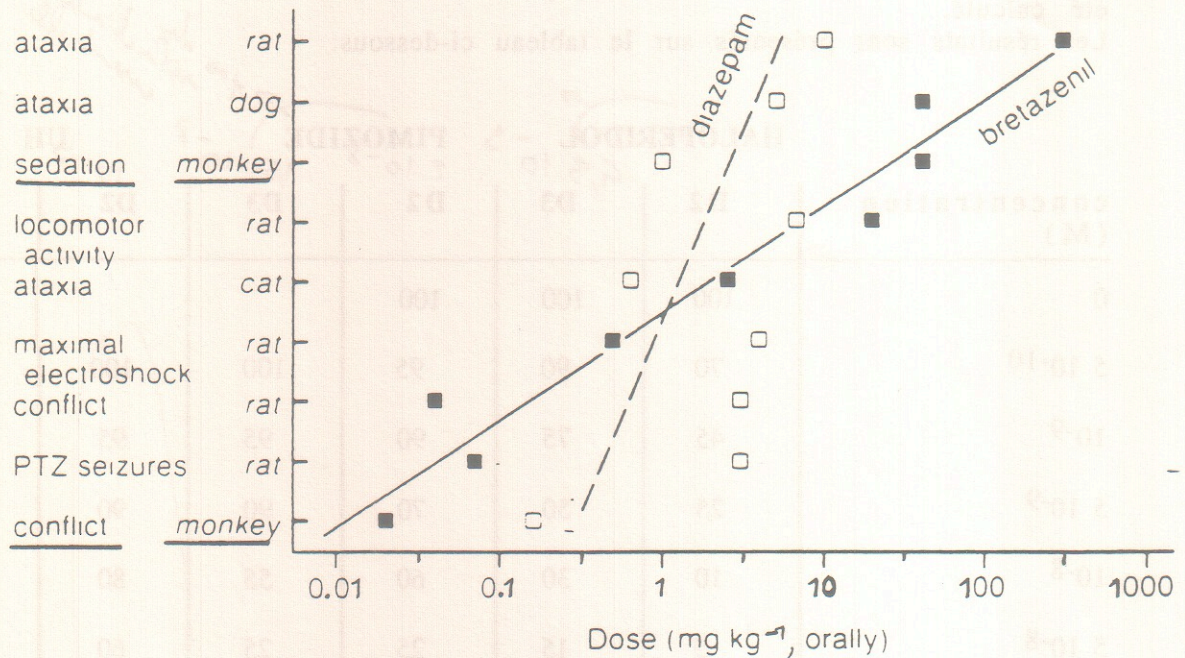
$K_I = P(IC_{50}) \approx K_D$   
 $IC_{50}$  petit  $\rightarrow$  aff. grad.

2- Que pouvez-vous en conclure quant à leur spécificité?

C- En 1991, le clonage des gènes de 2 nouveaux récepteurs DA, D4 et D5 ont porté à 5 le nombre de récepteurs DA.

Leur pharmacologie est résumée sur le tableau ci-dessous.

C- Le profil des activités pharmacologiques d'une nouvelle molécule, le brétazénil, a été étudié et comparé à celui du diazépam. Différents effets pharmacologiques ont été testés et les DE<sub>50</sub> obtenues sont représentées sur la figure ci-dessous.



1- Définissez la DE 50 d'une réponse pharmacologique

2- En considérant les résultats obtenus, en particulier chez le singe, le brétazénil vous paraît-il être une molécule intéressante et pourquoi?

*K<sub>D</sub> et K<sub>S</sub>*  
**AFFINITÉS (nM) DES AGONISTES ET ANTAGONISTES,  
 SUR LES RÉCEPTEURS DOPAMINERGIQUES HUMAINS CLONÉS**

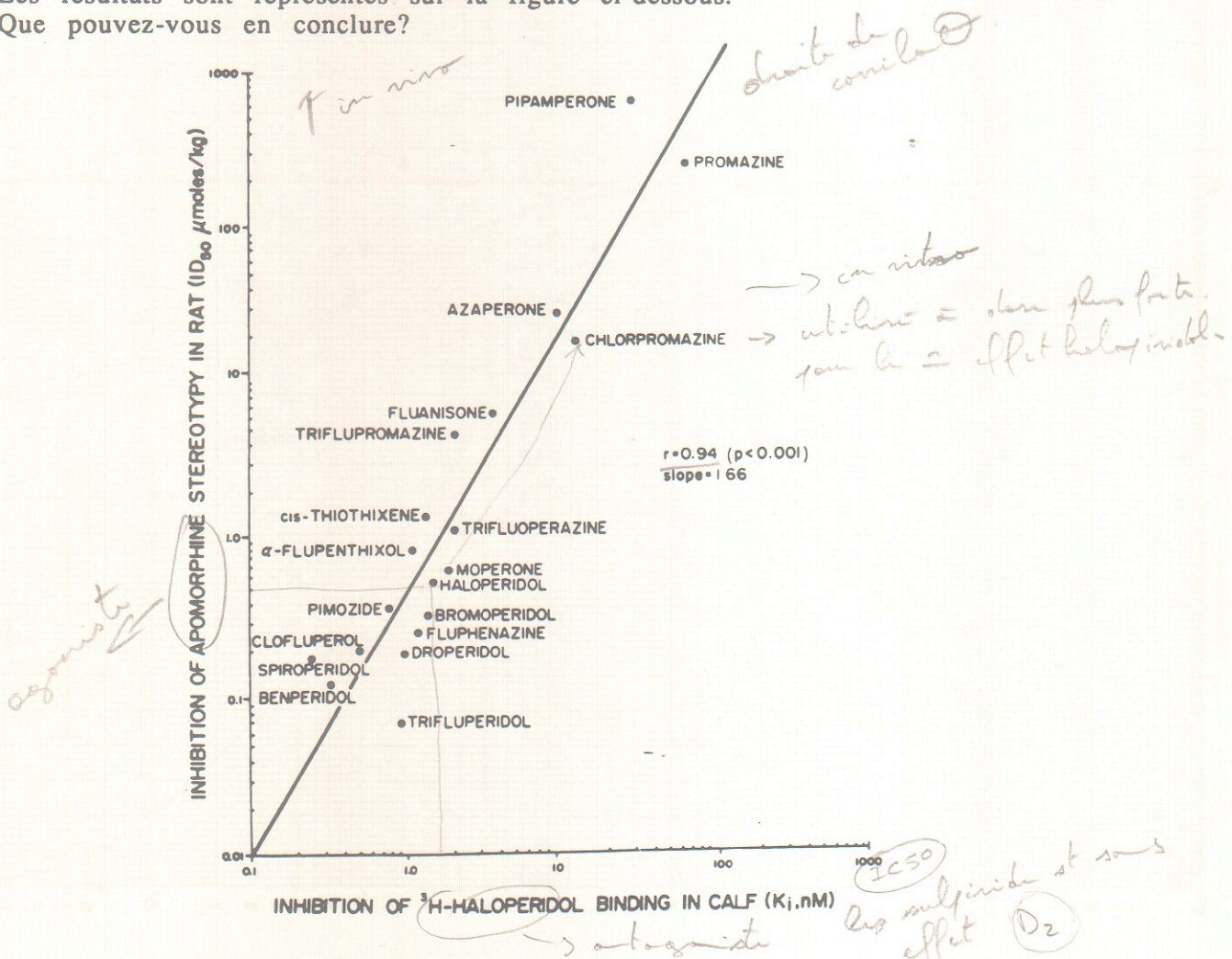
	D <sub>1</sub>	D <sub>5</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
<b>Agonistes</b>					
Dopamine + GppNHp	2 340	230	2 000	34	450
Bromocriptine <i>partiel</i>	672	454	5,3	7,4	340
Quinpirole	> 20 000	> 20 000	1 400	39	46
SKF 38393	150	100	> 5 000	> 5 000	1 800
<b>Antagonistes</b>					
Halopéridol <i>recombinant H</i>	27	48	0,6	2,9	5,1
Chlorpromazine <i>diem</i>	73	133	2,3	5,9	37
(-)Sulpiride	36 000	77 270	10	20	52
Pimozide	-	-	9,8	11	43
Clozapine	141	250	69	479	9
SCH 23390	0,3	0,3	720	780	3 560

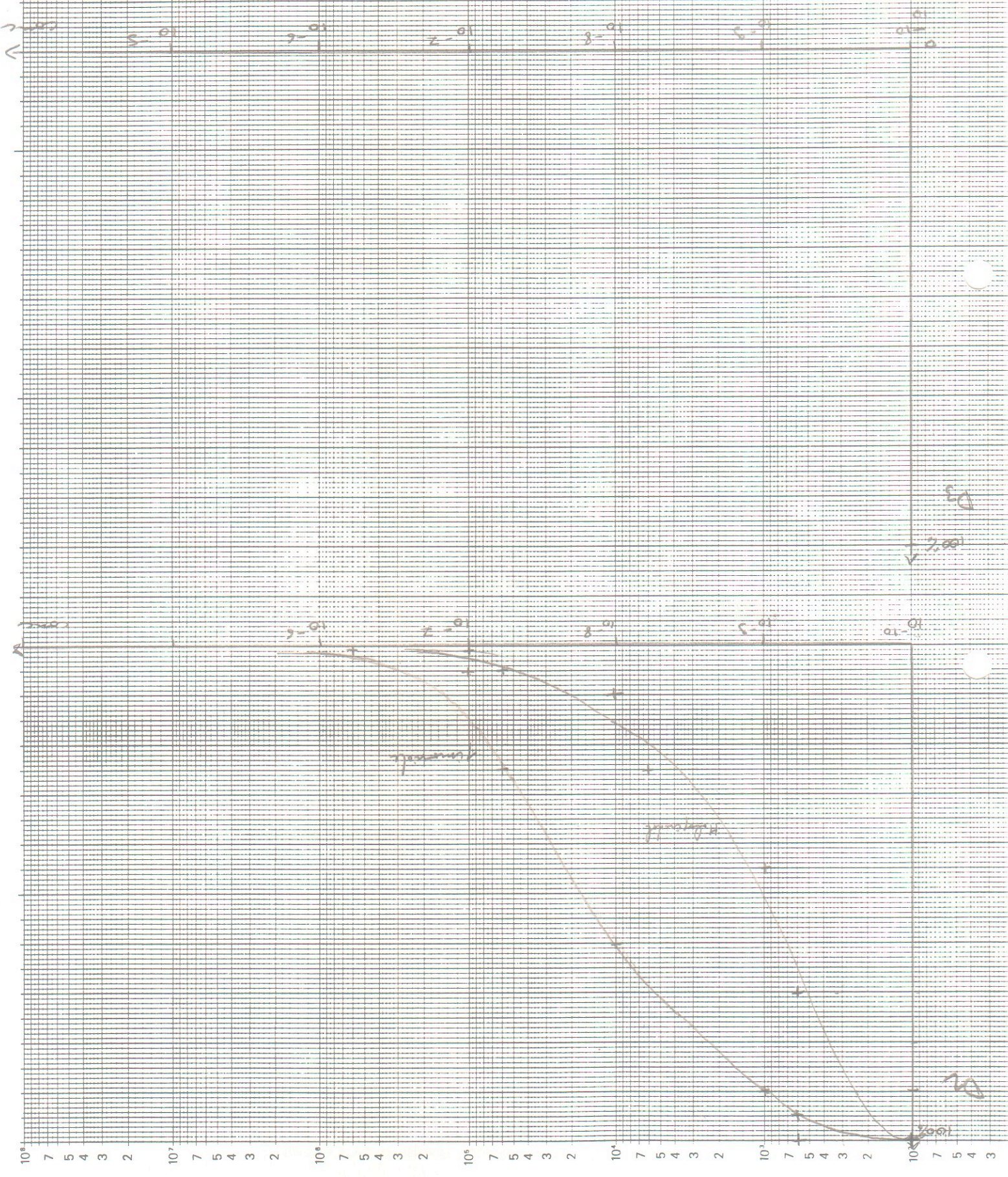
- 1- Quels sont les sites de liaison préférentiels de ces molécules?
- 2- Que pouvez-vous en conclure quant à leur spécificité?

D- L'antagonisme de la stéréotypie provoquée chez l'animal par l'administration d'apomorphine est un test utilisé pour détecter des molécules susceptibles d'être des neuroleptiques.

Un test de corrélation est effectué entre l'affinité de neuroleptiques pour le site de liaison marqué avec de l'halopéridol tritié et la puissance de ces molécules à antagoniser la stéréotypie induite.

Les résultats sont représentés sur la figure ci-dessous.  
 Que pouvez-vous en conclure?





# ENSEIGNEMENT DIRIGE DE PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE

## ED n°1: ETUDE DE L'INTERACTION LIGAND/RECEPTEUR PAR LA METHODE DU BINDING

### I- Principe de la méthode

Cette méthode consiste à mettre en contact les sites de liaison que l'on veut étudier et un ligand radioactif susceptible de s'y fixer. Cette opération est réalisée par une incubation de durée suffisante et à la température adéquate pour atteindre l'équilibre. La radioactivité fixée est séparée de la radioactivité libre par filtration.

La liaison du ligand ne se fait pas seulement sur des sites spécifiques; en effet, la liaison spécifique (BS) est contaminée par une liaison non spécifique (NS) du même ligand.

En pratique, on détermine en parallèle:

-la liaison totale (spécifique + non spécifique) du ligand en mettant en présence un homogénat tissulaire contenant les sites à étudier et un ligand radioactif en concentrations croissantes;

-la liaison non spécifique en mettant en présence l'homogénat tissulaire, le même ligand en concentrations croissantes et un autre ligand non radioactif, en grand excès, capable de se fixer également sur les mêmes sites de liaison. Ce ligand va déplacer le ligand radioactif des sites spécifiques.

### II- Application pratique à l'étude des sites de liaison aux récepteurs GABA/BENZODIAZEPINE au niveau du système nerveux central.

A- Des cerveaux de rats sont prélevés et homogénéisés dans une solution de tampon approprié (TRIS-HCL 50 mM; 0,32 M de sucrose; pH 7,4). L' homogénat est d'abord centrifugé à faible vitesse (2000 g), puis le culot représentant la fraction membranaire est repris et centrifugé à plus grande vitesse (30 000 g pendant 10 min.). Le culot alors obtenu (P2) est remis en suspension dans la même solution tampon et utilisé pour l'expérience.

L'étude de la liaison totale s'effectue sur un volume fixe de suspension tissulaire (500  $\mu$ l; ce qui correspond à 10 mg de tissu) auquel on ajoute du diazépam tritié (N-méthyl-3H-diazépam; 25  $\mu$ l; activité spécifique: 15 Ci/mmoles;  $^3$ H-DZ) en concentrations croissantes (concentrations finales: 0,2 à 70 nM).

L'étude de la liaison non-spécifique s'effectue sur une préparation identique à laquelle on ajoute en plus une concentration fixe de diazépam froid (3  $\mu$ M).

Après une incubation à 37°C pendant 15 min., les échantillons sont rincés et filtrés. Les radioactivités totale et liée sont mesurées à l'aide d'un compteur à scintillation en milieu liquide. Le rendement du compteur est de 80 %.

$$1 \text{ Ci} = 2,22 \cdot 10^{12} \text{ dpm}$$

Les résultats sont présentés sur le tableau ci-dessous:

$K_D = 0,20$

<b><sup>3</sup>H-DZ libre</b> (nM)	0,24	0,51	1,10	1,37	2,20	3,9	6,2	8,4	11	27	54	72
<b>liaison T:</b> <b><sup>3</sup>H-DZ lié</b> (cpm/essai*10 <sup>3</sup> )	0,6	1	1,5	2	3,2	3,7	4,3	4,9	6,2	7,4	9,7	10,5
<b>liaison NS:</b> <b><sup>3</sup>H-DZ lié</b> (cpm/essai*10 <sup>3</sup> )	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,5	0,6	1,5	1,9	3,9	4,3

compte par min  
dpm : disintegration. plus 10 dpm → 8 cpm.

1-Tracer les courbes  $B = f(F)$  pour les liaison totale et non spécifique. En déduire la courbe correspondant à la fixation spécifique ainsi que la liaison à demi-saturation.

2-Tracer la représentation de Scatchard. En déduire:

- la densité maximale des sites de liaison ( $B_{max}$ ) exprimée en cpm/essai et en pmole/gt.
- la constante de dissociation et la constante d'association.

B- L'effet du GABA sur la liaison de différentes molécules, le flunitrazépam froid: FLU; une triazolopyridazine: CL218, 872 (agoniste partiel); une béta-carboline: PCC (agoniste inverse) ainsi que le RO15-1788 (antagoniste), se liant sur le complexe récepteur (localisé au niveau du cortex cérébral) a été étudié à l'aide d'expériences de compétition. La liaison du flunitrazépam tritié (<sup>3</sup>H-FLU) a été déplacée par ces molécules en absence (control) ou en présence de GABA à la concentration de  $10^{-5}M$ . Les résultats sont présentés sur le tableau ci-dessous:

	IC <sub>50</sub> (nM)	
	CONTROL	+ GABA
FLU	13,5	7,1*
CL218, 872	630	320*
PCC	9,8	8,7
RO15-1788	5,6	6,3

$$\frac{PL}{L} = -\frac{1}{K_D} - \frac{PL}{K_D}$$

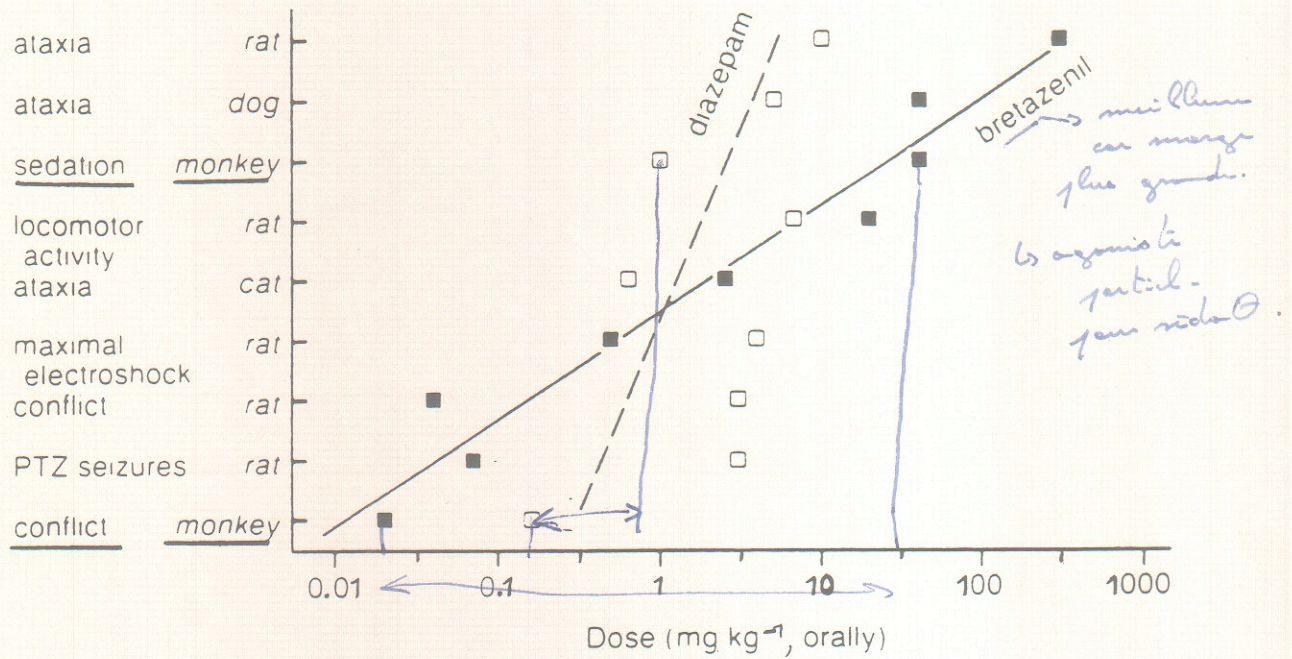
L'IC<sub>50</sub> représente la concentration du ligand froid capable d'inhiber la liaison spécifique du <sup>3</sup>H-FLU.

L' étoile (\*) indique une expérience ayant un résultat significatif.

Que pouvez-vous conclure à partir de ces résultats?



C- Le profil des activités pharmacologiques d'une nouvelle molécule, le brétazénil, a été étudié et comparé à celui du diazépam. Différents effets pharmacologiques ont été testés et les DE<sub>50</sub> obtenues sont représentées sur la figure ci-dessous.



1- Définissez la DE 50 d'une réponse pharmacologique

2- En considérant les résultats obtenus, en particulier chez le singe, le brétazénil vous paraît-il être une molécule intéressante et pourquoi?

ED 1 physis. mol

liaison non spécifique.

insaturable  $\rightarrow$  obte sur le graph, sont en nb illimités.

sub: quasi tube, homogénéité continue et autres sites.

homogénéité  $\rightarrow$  extraction de mb, reste la couche lipidique, avec conformation des R conservée.

structure glycosylée  $\rightarrow$  accrochent ligand  
idem pour solubles.

L non spécifique  $L^*$  non déplacé après excis L.

L a préférence meilleure pour R que  $L^*$ .

sites non spécifiques: reconnaissance non sélective

l'excis L se fixe sur les sites non spécifiques en plus  
de  $L^*$ .

$K_D$  se différencie au dessus de  $\times 10$ .

1 site de récepteur.

$$\text{Biomass} = 6200 \text{ g/m}^2 / \text{essai}$$

$$= 6200 \cdot \frac{100}{80} \text{ dgm} / \text{essai}$$

$$= 7750 \text{ dgm} / \text{essai}$$

$$= 3,5 \cdot 10^{-3} \text{ Ci} / \text{essai}$$

$$= 2,3 \cdot 10^{-10} \text{ mmole} / \text{essai}$$

$$= 0,00000000023$$

$$\frac{7500}{8,22}$$

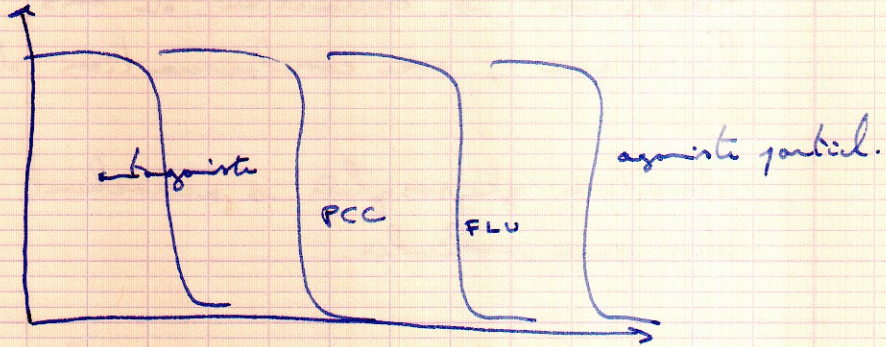
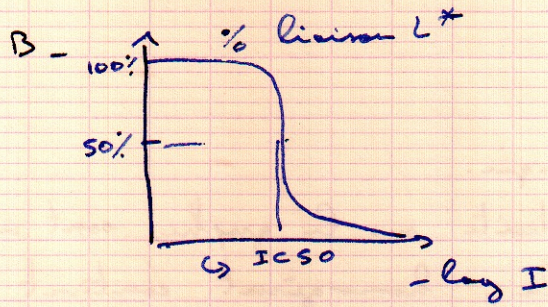
$$912$$

$$\hookrightarrow 3378 \cdot 10^{-12} \text{ Ci}$$

$$\hookrightarrow /15$$

$$= 224 \cdot 10^{-12} \text{ mole} / 10 \text{ mg}$$

$$= 224 \text{ pmol/gt.}$$



↳ le GABA influence la courbe déplacement du FLU. + agoniste partiel.  
 influence pas les 2 derniers agonistes.

$$K_I = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_D}} \rightarrow \text{plus petit}$$

plus  $K_I$  petit.  
 plus affinité grand.

C.

ED 2. quel mol.

NT  $\rightarrow$  nb x fonction, -b x structures  $\rightarrow$  -b x fonction et R.

Parkinson : dégénérescence des fibres nigrostriées.



subst. noire

striatum  $\rightarrow$  striati.

si  $\downarrow$  DA : tremblements, akinésie  
voies tonus musculaire, absence de motricité  
volontaire.

- leur dose agit dopaminergique  $\rightarrow$  forme précurseur  
L. DOPA. qui peut passer la BHE.

mais H les R = DA reconnaît.

$\hookrightarrow$  effets II digestifs, cardiovasculaire, psychique  
(confusion mentale, dépression, hallucination).

manque spécificité.

striatum : riche en  $D_1$  et  $D_2$ .

schizophrénie = psychosis chronique : syndrome  
dissociation, ambivalence, hallucinations, idées  
déliées.

hyperfonctionnement syst DA.

$\hookrightarrow$  antagonistes dopaminergiques : les neuroleptiques.  
effets atypiques.

effets II : interaction avec les autres récepteurs.

halopéridol : reconnaît R  $D_2$  neuroleptique.

oléfamide : neuroleptique atypique.

symptômes  $\odot$  schizoïdes : autisme.

linéaire effet *in vitro* / *in vivo*.

test ap-ogline : barreau de Gage.

sans dose, en contacte avec barreau.

↳ stéréotypie comportementale.

