

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

PHARMACOLOGIE
MOLECULAIRE

3e année

Dominique MARCEL

Maître de conférences

1993-1994

Laboratoire de Neuropharmacologie

Professeurs: Bernard RENAUD et Geneviève CHAMBA

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I
FACULTE DE PHARMACIE
INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

PHARMACOLOGIE
MOLECULAIRE

3e année

Dominique MARCEL

Maître de conférences

1993-1994

Laboratoire de Neuropharmacologie

Professeurs: Bernard RENAUD et Geneviève CHAMBA

TABLE DES MATIERES

A- DEVENIR DU MEDICAMENT :

SA BIOTRANSFORMATION 4

B- SITES DE LIAISON DES MEDiateURS ET DES MEDICAMENTS

I- METHODES D'ETUDE

-PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE: GENERALITES 20

-APPROCHE FONCTIONNELLE DE L'ETUDE DES LIGANDS ET DES RECEPTEURS 29

-CARACTERISATION DES RECEPTEURS ET DES LIGANDS PAR LIAISON
SPECIFIQUE DE RADIOLIGANDS 38

-APPROCHE DE LA STRUCTURE DES RECEPTEURS PAR LES TECHNIQUES
DE BIOLOGIE MOLECULAIRE 54

II- LES CANAUX IONIQUES

-DIFFERENTES PROTEINES PERMETTANT LE TRANSPORT DES IONS
A TRAVERS LA MEMBRANE 69

-PHARMACOLOGIE DES CANAUX VOLTAGE DEPENDANTS 77

III- FAMILLE DES RECEPTEURS DES MEDiateURS ET LEURS EFFECTEURS

-RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A 7 HELICES
TRANSMEMBRANAIRES COUPLES A UNE PROTEINE G 83

-EFFECTEURS MIS EN JEU EN REPOSE AU COUPLAGE R/PROTEINE G 96

-RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A ACTIVITE TYROSINE KINASE 112

-RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A UNE HELICE
TRANSMEMBRANAIRE DEPOURVUE D'ACTIVITE TYROSINE KINASE 117

-RECEPTEURS POLYMERIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE
INCLUANT UN CANAL IONIQUE 124

-RECEPTEURS DES HORMONES STEROIDES 133

IV- REGULATION DES RECEPTEURS 141

A- DEVENIR DU MEDICAMENT: SA BIOTRANSFORMATION

L'effet d'un médicament est déterminé par son activité intrinsèque et sa durée d'action. Celle-ci dépend principalement de son métabolisme.

Le métabolisme est la transformation biologique d'une substance par un ou des systèmes enzymatiques.

Les réactions conduisent à des métabolites **plus facilement éliminés (car plus polaires)** de l'organisme que la molécule mère (les métabolites peuvent être nombreux, ex: la nicotine en a une trentaine).

Les métabolites peuvent être actifs, inactifs ou toxiques.

I COMPARTIMENTS OU S'EFFECTUENT LES BIOTRANSFORMATIONS

Les réactions du métabolisme se déroulent principalement dans le foie, mais aussi dans d'autres tissus (reins, poumons, muqueuse intestinale, tissu nerveux et plasma).

Au niveau sub-cellulaire, ces réactions ont lieu principalement dans le réticulum, mais aussi au niveau des mitochondries et du cytoplasme.

I-1 Niveau hépatique

-Le foie est l'organe essentiel où s'effectuent des biotransformations (90%).

-Les enzymes responsables sont localisées dans le réticulum endoplasmique lisse.

-Le cytochrome P 450, localisé dans les hépatocytes, est le système enzymatique responsable en majorité des oxydations.

-D'autres organes contiennent une activité de monooxygénase: voir tableau 1

I-2 Niveau sanguin

-Le cytochrome P450 est également localisé dans les érythrocytes.

-La voie d'administration, la posologie, la fréquence d'administration, l'état nutritionnel, les propriétés physiques du médicament ainsi que l'espèce sont des facteurs influençant la valeur du taux sanguin.

-Il existe une corrélation entre le taux sanguin et l'activité pharmacologique d'un médicament.

I-3 Niveau biliaire

-C'est la deuxième voie importante d'excrétion.

-Le trajet suivi par les médicaments est le suivant: le sang contenant les substances exogènes absorbées par le tractus gastro-intestinal, entre dans le foie par la veine porte, passe à travers les

sinusoïdes hépatiques, et se retrouve dans la circulation systémique par la veine hépatique. Ces substances exogènes, absorbées par le sang des sinusoïdes hépatiques dans les cellules parenchymateuses, sont alors transférées comme métabolites ou conjuguées dans la bile et retournent dans le sang des sinusoïdes pour être excrétées finalement par le rein. Ce parenchyme très poreux permet le passage des petites molécules et des ions.

-La sécrétion biliaire peut être dépendante de la liaison des médicaments aux protéines de la cellule hépatique.

I-4 Niveau des tissus et organes

-Il existe une localisation préférentielle de certains médicaments pour certains tissus: reins, muqueuse intestinale, poumon, placenta, peau, tissu nerveux, gonades, placenta. Ils seront métabolisés au niveau de ces organes.

II MECANISMES DE BIOTRANSFORMATION

-Ils sont régis par des systèmes enzymatiques (existence d'un phénomène de saturation, d'activation, d'inhibition, possibilité d'induction au niveau des gènes) qui tendent à transformer en dérivés hydrosolubles faciles à excréter toutes molécules étrangères sans valeur alimentaire ou métabolique.

-Ce sont des enzymes peu spécifiques d'un substrat qui assurent un métabolisme de transformation.

-Il existe plusieurs destinées pour une molécule qui peut être oxydée ou/et conjuguée: exemple de l'acide acétylsalicylique, voir fig.1.

-réactions de phase I: création ou transformation de groupements fonctionnels (peut être l'étape préalable à la conjugaison). Ce sont des réactions de:

oxydation (apport d'oxygène ou retrait d'hydrogène),

réduction,

hydrolyse, déshydratation.

-réactions de phase II: réactions de **conjugaison** = liaison d'un substituant hydrosoluble, de grosse taille pour former des métabolites inactifs et rapidement excrétés.

Exemples de réactions de phase I et II: voir fig 2.

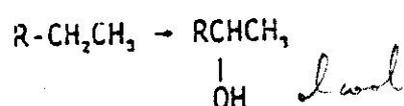
oraux). Ces phénomènes jouent un rôle considérable dans les phénomènes d'interaction médicamenteuses.

-Exemples de quelques molécules inductrices: alcool, phénobarbital, hydrocarbures, rifampicine, glucocorticoïdes.

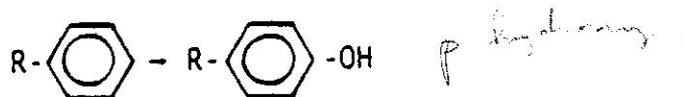
-L'inhibition du cytochrome P450: certaines substances inhibent les oxydations microsomiales et vont donc, en ralentissant le métabolisme d'autres médicaments, potentialiser leur action.

-Quelques exemples d'oxydation:

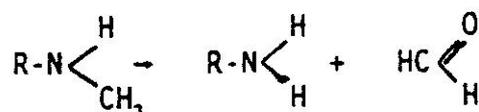
hydroxylation d'une chaîne aliphatique: (ex: pentobarbital)



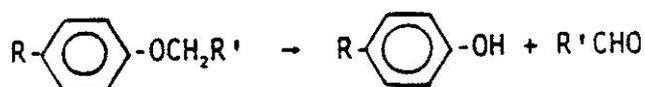
hydroxylation aromatique: (ex: hormones stéroïdes, acétanilide)



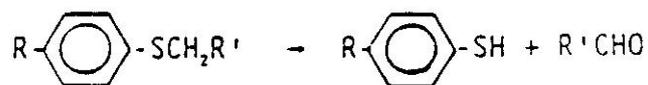
N-déalkylation: (ex: aminopyrine)



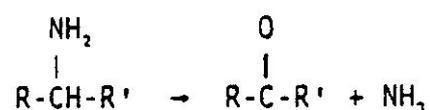
O-déalkylation: (ex: codéine)



S-déalkylation: (ex: 6-méthylthiopurine)



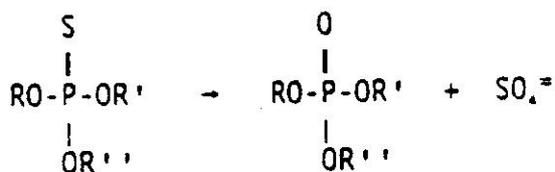
désamination oxydative: (ex: amphétamine)



formation de sulfoxyde: (ex: chlorpromazine)



désulfuration: (ex: parathion)



N-oxydation:



-D' autres enzymes sont responsables des réactions d'oxydation: monoamine oxydase, alcool et aldéhyde déshydrogénases, monooxygénase à flavine.

II-2 Réduction

-Les réactions : voir fig 2.

-C'est une voie de biotransformation non prépondérante dans les tissus de mammifères.

II-3 Hydrolyse

-Les réactions sont: hydrolyse des fonctions esters, amides, hydrazides, glycosides (voir fig 2).

-La transformation d'un ester en alcool et acide par addition d'une molécule d'eau est importante en pharmacocinétique, essentiellement au niveau de la barrière gastro-intestinale et dans le sang. Elle est catalysée par des estérases localisées dans l'intestin, le foie, le plasma, les érythrocytes, les reins et de nombreux autres tissus.

II-4 Conjugaison

-Contrairement aux 3 précédentes, les réactions de conjugaison impliquent une **synthèse par l'addition d'une molécule** telle que l'acide glucuronique ou sulfurique à un médicament ou à l'un de ses métabolites; ou addition d'un groupement conjugué (ex: acétylation = greffe d'une molécule activée).

-Les produits obtenus sont souvent inactifs et **plus facilement éliminés** par les reins grâce à leur forte polarité (sauf pour la méthylation et l'acétylation) et leur faible liaison aux protéines plasmatiques.

*plus hydrophile
↳ doivent être
éliminés par
une voie rénale*

*↳ ne font
↳ pas*

<u>nature de la réaction</u>	<u>réactif impliqué</u>
glucuronidation	UDPglucuronate
glucosidation	UDPglucose
méthylation	S-adénosyl méthionine
acétylation	acétyl-coenzyme A
sulfatation	phosphoadénosyl phosphosulfate
synthèse des acides mercapturiques	glutathion <i>↳ sur 3'</i>
conjugaison par la glycine et la glutamine	glycine et glutamine

(UDP: uridine diphosphate)

-Exemples d'enzymes de conjugaison (localisées dans le cytosol ou la membrane plasmique)

- glucuronyltransférase
- méthyltransférase
- N-acétyltransférase
- sulfotransférase
- acylase
- formation d'esters lipophiles
- glutathion-S-transférase et formation de thioéthers.

-Pour qu'il y ait réaction de conjugaison, il faut:

- une fonction polaire sur la molécule à conjuguer;
- une molécule du métabolisme intermédiaire dans un état activé (ex: l'acide glucuronique sous forme activée est lié à l'UDP);

-une enzyme spécifique du type de conjugaison (ex: la glucuronyltransférase transfère l'acide glucuronique du complexe acide UDP-glucuronique à la molécule qui doit être métabolisée).

-Exemples de réactions de conjugaison: voir fig 2.

II-5 Autres mécanismes

-Des estérases non spécifiques, présentes dans le plasma humain, hydrolysent des médicaments comme la procaine.

-La transméthylation existe également au niveau du rein, des poumons.

II-6 Réactions non enzymatiques

Ce sont des biotransformations abiotiques:

- réactions avec des nucléophiles endogènes (le glutathion),
- avec des électrophiles endogènes (acide pyruvique),
- réactions d'hydrolyse.

III METHODE D'EXPLORATION

Elle s'effectue par:

- la mesure d'une grandeur biologique endogène;
- la mesure in vitro de la quantité ou de l'activité des enzymes à partir de biopsies hépatiques;

-la mesure in vivo des grandeurs cinétiques d'un médicament traceur (présentant une résorption digestive complète et rapide, et une fixation protéique faible ou nulle) après administration d'une dose unique.

IV COMPLEXITE ET VARIABILITE DES PHENOMENES METABOLIQUES

IV-1 Complexité

Il est fréquent qu'une même substance puisse être métabolisée et excrétée sous des formes distinctes. L'importance respective de chacune des voies métaboliques peut varier de façon considérable d'un individu à l'autre en fonction de la dose administrée, de l'interaction éventuelle avec d'autres médicaments (inducteurs ou inhibiteurs), et de l'état des fonctions hépatique et rénale.

Exemple: métabolisme de l'aspirine

- à faible dose (<0,3g), le métabolite principal est l'acide salicylurique;
- au fur et à mesure de l'augmentation des doses, la forme glucuronide et éventuellement l'acide salicylique lui-même apparaissent dans les urines (voir fig 1).

IV-2 Variabilité

-Augmentation de la biotransformation

Trois cas peuvent se produire:

- il y a augmentation de la formation des métabolites inactifs. Elle se traduit par une augmentation de la clearance et une diminution de la demi-vie donc par un effet thérapeutique raccourci (exemple: phénobarbital et anticoagulants oraux où on augmente les doses d'anticoagulants mais où on risque l'hémorragie à l'arrêt du phénobarbital);

- il y a augmentation de métabolites actifs et l'effet thérapeutique est accru;

- il y a augmentation de la formation de métabolites toxiques et le risque toxique est accru (ex: la rifampicine favorise la formation d'un métabolite hépatotoxique de l'isoniazide).

-Diminution de la biotransformation

Elle se traduit par une diminution de la clearance et une augmentation de la demi-vie.

Un médicament peut inhiber la dégradation d'un second médicament, et le risque toxique du second est accru.

Exemples de médicaments inducteurs et inhibiteurs des enzymes: voir tableaux 2 et 3.

-Autres causes de la variation de la biotransformation des médicaments:

Age: le nouveau-né possède une carence en mono-oxygénase (ne métabolise pas le chloramphénicol mais métabolise plus vite que l'adulte la théophylline). Chez le vieillard et chez le nouveau né, la capacité d'induction est diminuée.

Facteurs alimentaires: un régime riche en protéines et pauvre en glucides entraîne une augmentation de la clearance de l'antipyrine et de la théophylline.

Pathologie: les modifications dépendent du médicament, du type de la maladie et de son stade évolutif (ex: insuffisance rénale et cirrhose), de l'état circulatoire local, des médicaments associés.

-Variabilité interindividuelle (pharmacogénétique):

C'est la relation entre le statut génétique des individus et leur capacité de biotransformer. L'exploration phénotypique des malades doit permettre la prévision des M et des sujets à risque. La variabilité intra et inter-individuelle des biotransformations implique, en cas d'index thérapeutique faible, une surveillance particulière de chaque malade.

En conclusion, les variabilités des capacités de dégradation et d'élimination des médicaments devront être systématiquement prises en compte au cours d'un traitement.

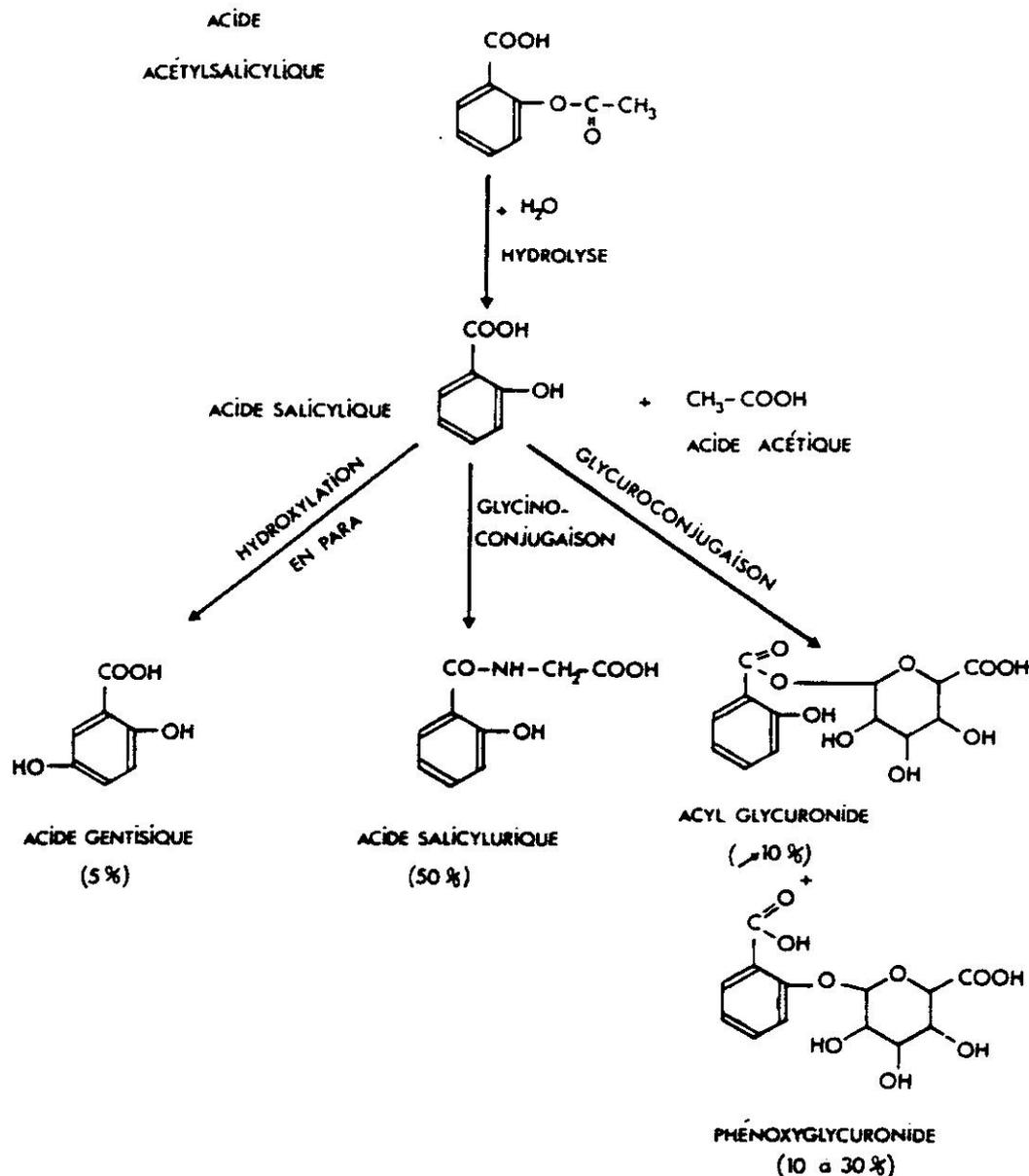


Figure 1 : Biotransformations de l'acide acétylsalicylique

Le foie possède un système de microsomes très actif métabolisant un grand nombre de médicaments par hydrolyse, oxydation, désamination, déalkoylation, etc. La fraction soluble contient, en outre, du NADP⁺ qui accroît l'activité des microsomes.

La chaîne de transport des électrons dans le système des microsomes hépatiques comprend un cytochrome spécial appelé P 450, car il présente une bande d'absorption à 450 mμ après réaction avec l'oxyde de carbone. La chaîne comprend la nicotinamide adénine dinucléotide-phosphate (NADP⁺), la cytochrome P 450 réductase et le cytochrome P 450. Celui-ci réagit avec deux atomes d'oxygène formant l'eau et un produit d'hydroxylation.

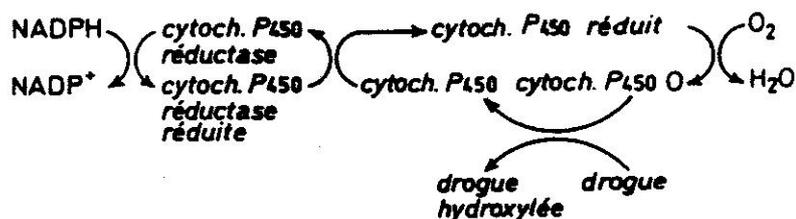
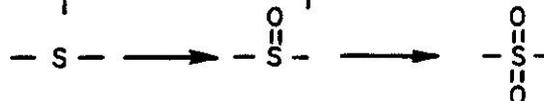
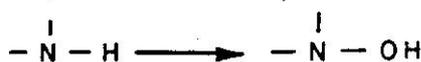
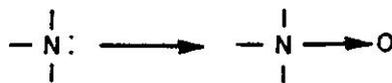
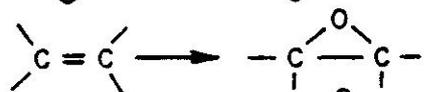


Figure 3 : Système du P450

Réactions de fonctionnalisation (phase I)

• Monooxygénases (1A)



• Déshydrogénases (1B)



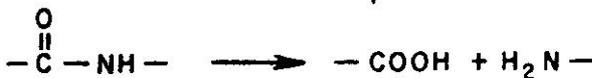
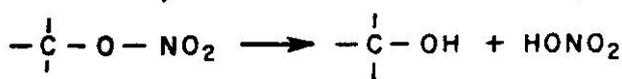
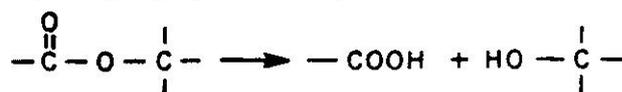
• Réductases (1B)



Figure 2 : Principales réactions chimiques dans le métabolisme des xénobiotiques.

Ces réactions sont classées d'après les grands groupes d'enzymes qui les catalysent : monooxygénases (1A), déshydrogénases et réductases (1B), estérases, hydrolases et amidases (1C), et les diverses transférases (1D et 1E).

• Estérases, hydrolases, amidases (1C)



Réactions de conjugaison (phase II)

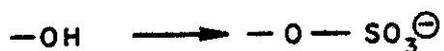
• Méthyl-transférases (1D)



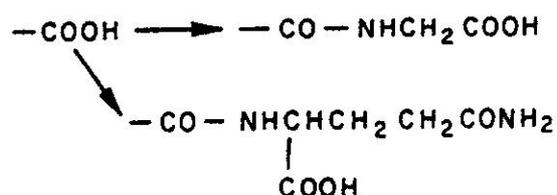
• N - Acétyl - transférases



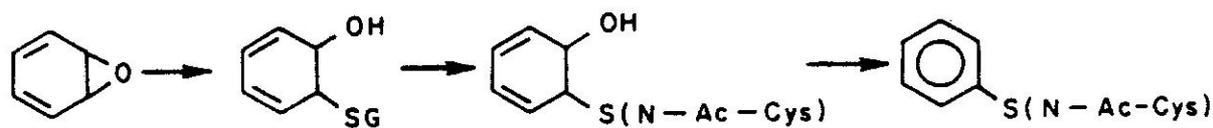
• Sulfotransférases



• Acylases



• Glutathion - transférases (1E)



GSH = Glutathion

• UDP - glucuronyl - transférases (1E)

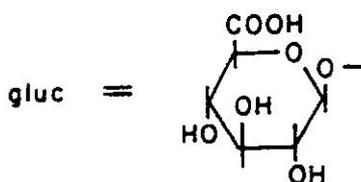
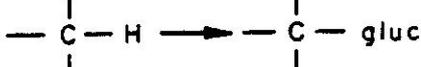
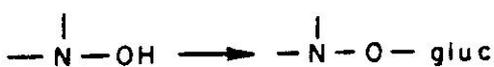
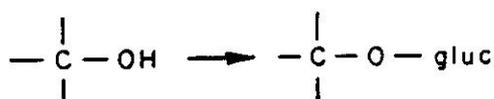


Figure 2 : (suite). Diverses transférases

Tableau 1 : Organes et tissus de l'humain et du rat dans lesquels une activité monooxygénase a été mise en évidence

	<i>Humain</i>	<i>Rat</i>
Aorte	+	+
Cerveau	+	+
Endomètre	+	
Épithélium nasal		+
Érythrocytes	+	
Foie	+	+
Gencives	+	+
Glande mammaire	+	+
Glandes salivaires		+
Glande surrénale	+	+
Lymphocytes	+	
Moelle osseuse	+	+
Œil	+	
Œsophage	+	
Ovaire	+	+
Pancréas	+	+
Peau (divers tissus)	+	+
Placenta	+	+
Poumon (divers tissus)	+	+
Prostate	+	+
Rate	+	+
Rein (divers tissus)	+	+
Testicule	+	+
Tractus gastro-intestinal (divers tissus)	+	+
Vessie	+	

Cette liste alphabétique et purement qualitative n'est pas exhaustive. Les blancs ne signifient pas forcément absence d'activité, mais plutôt absence de données connues des auteurs.

Tableau 2 : Médicaments induisant la biotransformation d'autres médicaments

<i>Médicament inducteur</i>	<i>Métabolisme induit</i>
<u>Barbituriques</u>	warfarine, bishydroxycoumarine, acénocoumarine, coumarine, quinidine, aminopyrine, digitoxine, chlorpromazine, diphenylhydantoïne, doxycycline, alprérolol, phenprocoumone, antipyrine
<u>Glutéthimide</u>	carbamazépine, warfarine, éthyl-biscoumate
<u>Carbamazépine</u>	carbamazépine, clonazépam, antipyrine, warfarine
<u>Chlorpromazine</u>	chlorpromazine, antipyrine
<u>Diphénylhydantoïne</u>	dicoumarol, cortisol, digitoxine, antipyrine
<u>Spirolactone</u>	antipyrine
<u>Phénylbutazone</u>	digitoxine
<u>Rifampicine</u>	rifampicine, antipyrine, warfarine, tolbutamide, acénocoumarol, contraceptifs oraux
<u>Testostérone</u>	antipyrine

Tableau 3 : Médicaments inhibant la biotransformation d'autres médicaments. Conséquences pharmacodynamiques

<i>Médicament inhibiteur</i>	<i>Médicament inhibé</i>	<i>Conséquences pharmacodynamiques</i>
Alcool	antipyrine	—
Allopurinol	antipyrine	—
Aminopyrine	antipyrine	—
Bishydroxycoumarine	chlorpropamide tolbutamide phénytoïne	hypoglycémie hypoglycémie ataxie, nystagmus
Chloramphénicol	chlorpropamide phénytoïne warfarine diazépam théophylline	saignements
Clofibrate	antipyrine bishydroxycoumarine tolbutamide phénytoïne	
Contraceptifs oraux	antipyrine phénylbutazone	
Dipropylacétate	phénobarbital	somnolence
Disulfirame	antipyrine phénytoïne	ataxie, nystagmus
Isoniazide	hexobarbital phénytoïne	ataxie, nystagmus
Nortriptyline	antipyrine	
Oxyphenbutazone	bishydroxycoumarine phénytoïne tolbutamide hexobarbital	
Phenprocoumone	phénytoïne phénytoïne tolbutamide chlorpropamide	vertiges, nystagmus hypoglycémies hypoglycémies
Phényramidol	bishydroxycoumarine phénytoïne tolbutamide	hypoglycémie
Sulfadiazine	phénytoïne tolbutamide	
Sulfaméthiazole	phénytoïne tolbutamide warfarine	vertiges, nystagmus
Sulfaméthoxazole	chlorpropamide tolbutamide	hypoglycémie
Sulfthiamine	phénytoïne phénytoïne	

B- SITES DE LIAISON DES MEDIATEURS ET DES MEDICAMENTS

I- METHODES D'ETUDE

PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE: GENERALITES

La pharmacologie: c'est l'étude des modifications des fonctions de l'organisme, ces modifications étant induites par des substances exogènes ou endogènes.

Exemples de substances exogènes: médicaments, toxines.

Exemples de substances endogènes: neuromédiateurs, hormones.

-A la fin du XIX siècle, les moyens technologiques sont restreints. La pharmacologie est limitée à la description, chez l'animal entier ou sur des préparations isolées, des effets de substances endogènes (adrénaline) ou exogènes (atropine, curare): c'est la **pharmacologie fonctionnelle**. Elle utilise la réponse d'un organe. La variation d'un paramètre biologique chez l'animal est utilisée pour préciser les effets d'une substance.

-Le concept selon lequel une drogue ou une hormone produit son effet biologique par l'intermédiaire d'une entité est introduit par Langley (1905). Plus tard, la **notion de récepteur**, avec la présence de différents types et sous-types, sera précisée par Hill, Gaddum et Clark (1950).

-A partir de 1970, la **méthode de liaisons spécifiques** est employée afin de caractériser les récepteurs.

La première étape de l'action d'une substance sur l'organisme correspond très souvent à sa liaison à une macromolécule biologique réceptrice.

Dans les années qui suivent, de nouveaux sites récepteurs sont mis en évidence et quantifiés.

-Le développement de la **biologie moléculaire** (1980) permet la définition précise des entités moléculaires correspondantes dont la structure chimique est de mieux en mieux définie.

La **pharmacologie moléculaire** définit les mécanismes d'action de substances endogènes ou exogènes, sur l'organisme, en considérant en premier lieu la molécule cible du ligand, c'est à dire son **RECEPTEUR**, puis les modifications biochimiques induites par cette liaison.

I LA CELLULE ET LE MEDICAMENT

-Les fonctions de l'organisme sont assurées par un ensemble d'organes constitués de tissus dont l'unité est la cellule.

-La membrane cytoplasmique:

-limite la cellule,

- assure les échanges entre milieux extra et intra cellulaires,
- est un niveau privilégié pour la liaison de la majorité des médiateurs de l'organisme et de nombreux médicaments.
- L'activité du médicament définit les modifications d'une fonction (motrice, sensitive, cardiovasculaire, respiratoire, psychique) de l'organisme auquel il est administré.

II LES MESSAGERS DES INTERACTIONS CELLULAIRES

Ce sont:

- les neurotransmetteurs (5-HT, NA, DA, Histamine),
- les hormones (testostérone, 17-béta oestradiol, thyroxine),
- les hormones locales (PAF acéther, prostaglandines E2),
- les facteurs de croissance (epidermal growth factor (EGF), nerve growth factor (NGF), insuline),
- les messagers du système immunitaire (histamine, interleukines).

Ces messagers ou médiateurs, qui assurent les mécanismes d'interaction cellulaire, ont pour point commun essentiel **d'agir sur une cellule cible en se liant à un récepteur spécifique.**

III LES RECEPTEURS DES MESSAGERS

La fonction de ces récepteurs membranaires est de convertir un signal extracellulaire en une cascade d'évènements intracellulaires. Globalement, un signal extracellulaire aura été sélectivement transmis par le récepteur, amplifié au cours des diverses étapes du processus et enfin traduit en une réponse cellulaire. Des mécanismes de contrôle et de régulation de ces processus (phosphorylation, internalisation) existent.

- De nombreux médicaments interagissent avec les récepteurs de ces messagers physiologiques: ils peuvent avoir:
 - un effet semblable à celui du messager physiologique, c'est un **agoniste**,
 - pas d'effet, c'est un **antagoniste**.
- Le terme de **ligand** regroupe les agonistes et les antagonistes et tout autre composé capable de se lier au récepteur (fig.1).
- Les **récepteurs des messagers physiologiques** sont:
 - de nature protéique ou glycoprotéique,
 - localisés dans la membrane cytoplasmique ou dans le cytosol (récepteurs des stéroïdes).

Les récepteurs de la membrane cytoplasmique sont des protéines transmembranaires classées en 4 groupes:

1- récepteur monomérique (ex: récepteurs de la noradrénaline, de la dopamine, de la sérotonine):

- peptides à 7 domaines transmembranaires,
- associés à une protéine G à fonction GTPasique,
- elle-même associée à un effecteur enzymatique (adénylate-cyclase ou phospholipases C, A2), ou à un canal ionique (calcique ou potassique);

2- récepteur à activité tyrosine-kinase (ex: récepteur de l'insuline)

- 1 ou plusieurs sous-unités protéiques transmembranaires,
- présence d'une seule hélice alpha transmembranaire,
- extrémités protéiques intracellulaires caractérisées par un site enzymatique à fonction tyrosine-kinase;

3- groupe hétérogène de récepteurs membranaires

- 1 seule hélice alpha transmembranaire
- mécanisme de transduction peu connu
- récepteurs des interleukines
- récepteurs des antigènes au niveau des lymphocytes et des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité; récepteurs des lectines (ex: récepteur assurant l'endocytose des glycoprotéines), récepteurs du NGF, de la GH, récepteurs assurant l'endocytose des lipoprotéines.

4- récepteurs polymériques incluant un canal ionique (récepteurs de l'acétylcholine, du glutamate, de la glycine)

- plusieurs peptides associés,
- plusieurs domaines transmembranaires.

-Pluralité des récepteurs des neurotransmetteurs: voir tableau I

IV LES CANAUX IONIQUES

Les canaux ioniques et les transporteurs localisés dans la membrane plasmique: voir fig 2

IV-1 Les ATPases membranaires

Elles maintiennent un gradient transmembranaire des ions grâce à l'activité d'une pompe qui utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie.

Ce sont:

- les Na^+/K^+ ATPases,
- les H^+/K^+ ATPases de la cellule gastrique,
- les $\text{Ca}^{++}/$ ATPases.

IV-2 Les échangeurs ioniques

-cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$

- assure la majeure partie de la résorption tubulaire du sodium,
- possède un site de fixation d'une classe particulière de diurétiques: les diurétiques de l'anse de Henlé (ex: le furosémide) qui sont utilisés dans les traitements de l'hypertension artérielle, de l'insuffisance cardiaque et des oedèmes.

-échangeur Na^+/H^+

- assure le pH intracellulaire
- la concentration intracellulaire en ions H^+ régule son activité,
- il est inhibé par un diurétique: l'amiloride qui entre en compétition avec l'ion Na^+ .

-échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$

- sa fonction principale est d'assurer la sortie du calcium de la cellule.
- c'est un cotransporteur particulièrement actif dans les membranes des cellules excitables.
- il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques de ce co-transporteur.

-échangeur Na^+/Cl^-

- présent au niveau de la cellule intestinale

-échangeur Na^+/I^-

- présent au niveau de la cellule thyroïdienne

IV-3 Les canaux ioniques voltage dépendants.

Ce sont des canaux dépendants du potentiel de membrane. Ce sont:

- les canaux sodiques,
- les canaux calciques,
- les canaux potassiques.

Ces canaux ioniques peuvent être la cible de médicaments qui sont capables de les activer ou de les inhiber.

V AUTRES RELATIONS MESSAGERS/MEDICAMENTS

Il peut se produire une modification du message véhiculé par le neurotransmetteur par une action autre que la liaison sur un récepteur spécifique.

Il peut y avoir:

-diminution du message par:

-inhibition de la synthèse du messenger, le médicament est un inhibiteur enzymatique,

-inhibition de la secrétion du messenger, le médicament interfère avec le mécanisme de stockage ou d'exocytose,

-inhibition des phénomènes de couplage récepteur-effecteur;

-augmentation du message par:

-inhibition de la dégradation endogène du messenger,

-inhibition de la recapture du messenger par la cellule qui l'a secreté ou une autre cellule,

-augmentation de la synthèse du messenger.

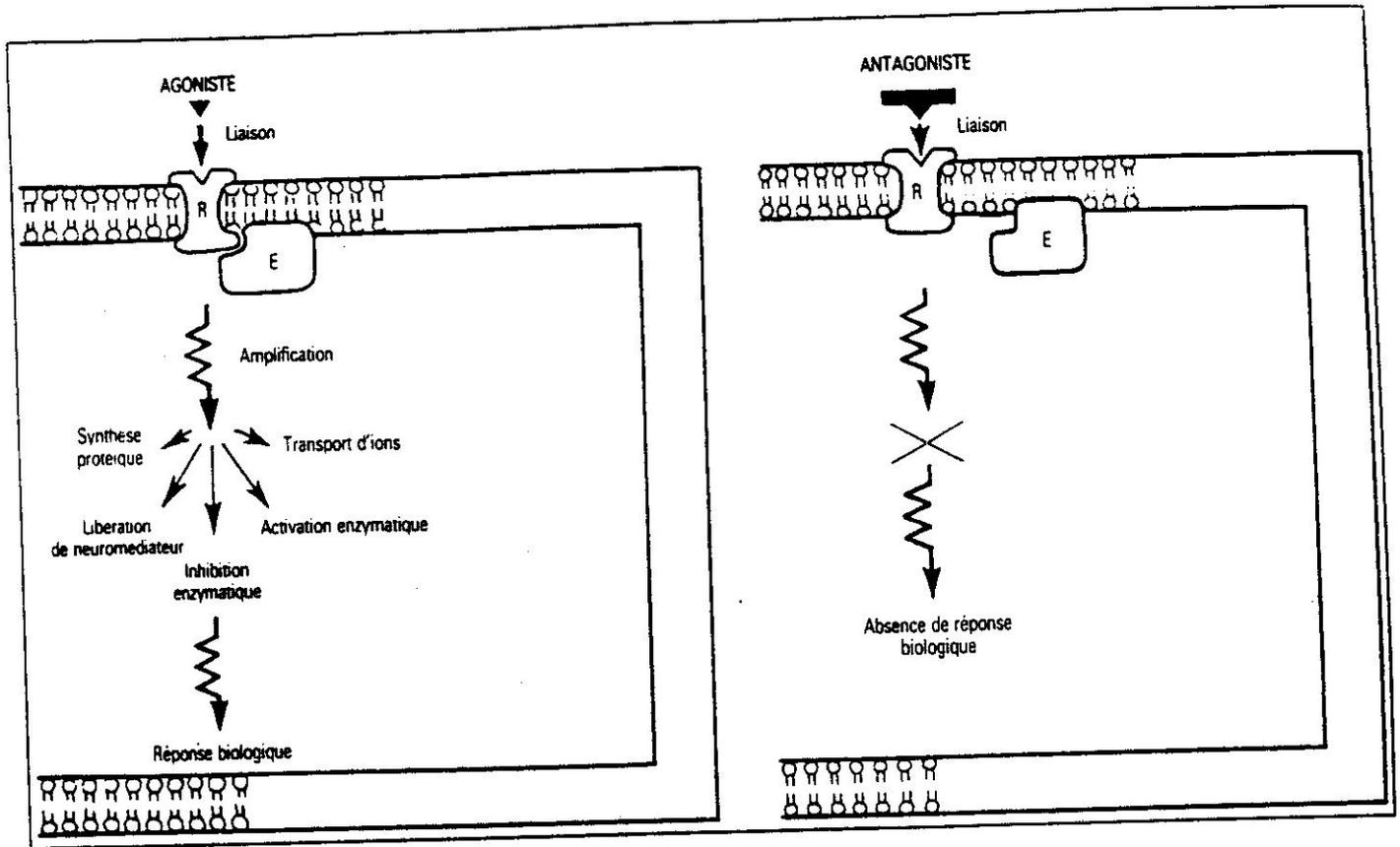


Figure 1 : Mécanisme général d'action des agonistes et des antagonistes

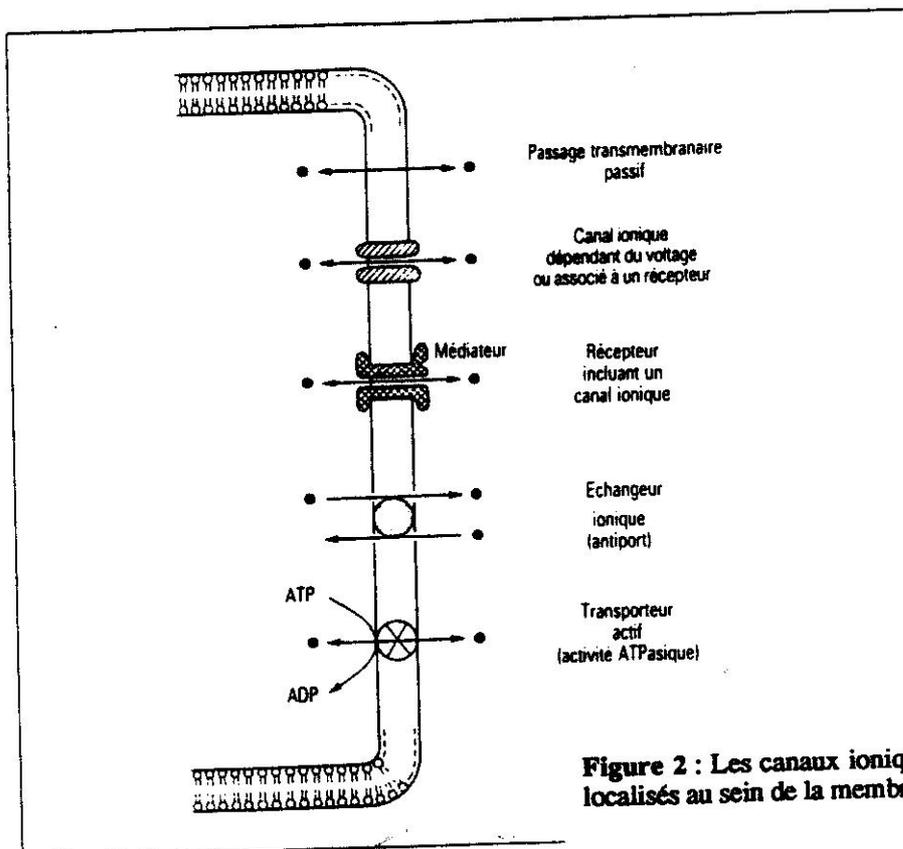


Figure 2 : Les canaux ioniques et les transporteurs localisés au sein de la membrane plasmique

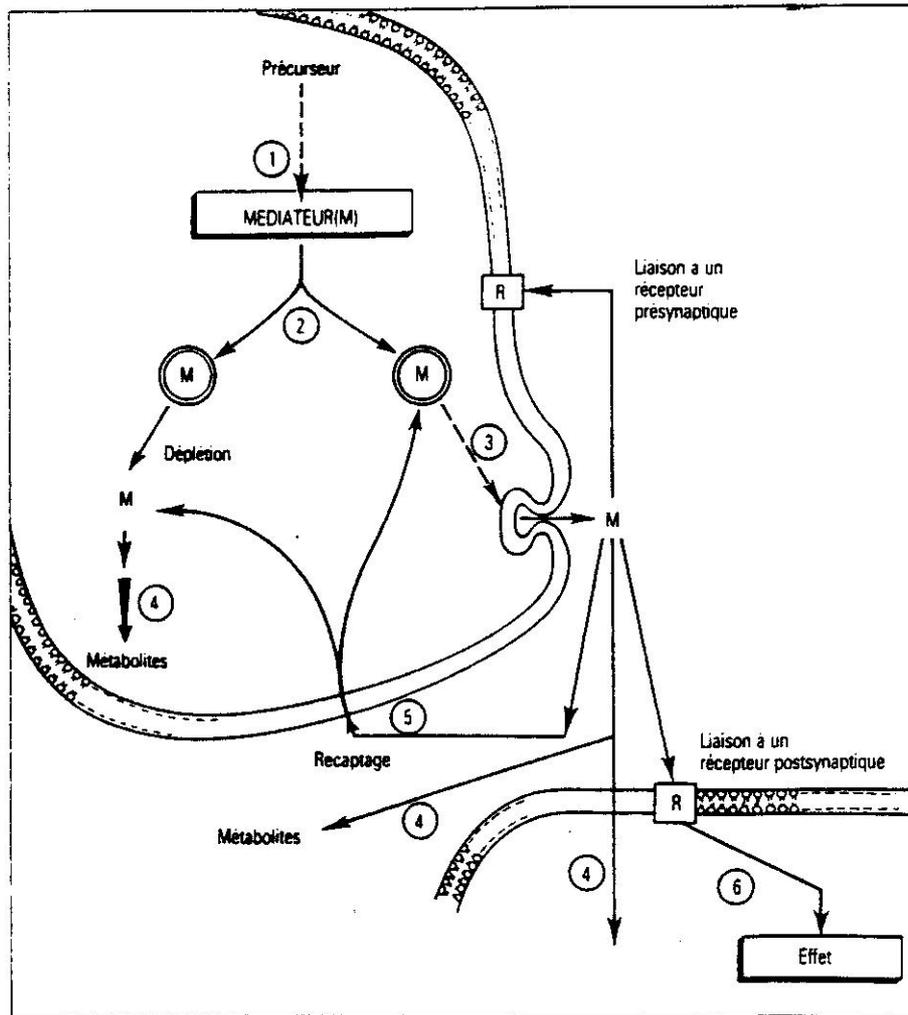


Figure 3 : Les autres relations messagers-médicaments :

1. Inhibition de la synthèse
2. Inhibition du stockage
3. Inhibition de la sécrétion
4. Inhibition de la dégradation
5. Inhibition du recaptage
6. Inhibition des mécanismes de couplage

Tableau 1 : Pluralité des récepteurs

<p>D₁</p> <p>(D_{1A}) 446 aa (homme) 446 aa (rat) ↑ AMPc agoniste: SKF 38393 antagoniste: SCH 23390</p>	<p><i>Quint</i></p> <p>(D_{2A-S}) 414 aa (homme) 415 aa (rat) ↓ AMPc agoniste: RU 24926 antagoniste: halopéridol</p>	<p><i>multitude</i></p> <p>(D_{2A-L}) 443 aa (homme) 444 aa (rat) ↑ canal K⁺, ↓ canal Ca⁺⁺ agoniste: RU 24926 antagoniste: halopéridol</p>
<p>D₃</p> <p>(D_{2B}) 400 aa (homme) 446 aa (rat) ? agoniste: quinprione (LY 171555)</p>	<p>D₄</p> <p>(D_{2C}) 387 aa (homme) ? antagoniste: clozapine</p>	<p>D₅</p> <p>(D_{1B}) 477 aa (homme) 475 aa (rat) ↑ AMPc agoniste: ADTN</p>

Pluralité des récepteurs dopaminergiques.

<p>5 HT_{1A}</p> <p>7 s.t. 421 aa (homme) ↓ AMPc, ↑ K⁺ agonistes: ipsapirone 8 OH-DPAT</p>	<p>5 HT_{1B}</p> <p>analogue chez les rongeurs du récepteur 5 HT_{1Dβ} antagoniste: cyanopindolol</p>	<p>5 HT_{1C}</p> <p>7 s.t. 460 aa (rat) ↑ PLC antagonistes: ritansérine pizotifène</p>
<p>5 HT_{1D}</p> <p>7 s.t. 5 HT_{1Da}, homme (377 aa) 5 HT_{1Dβ}, homme (385 aa) ↓ AMPc agoniste: sumatriptan</p>	<p>5 HT₂</p> <p>7 s.t. 471 aa (homme) ↑ PLC agoniste: α - méthyl - 5 HT</p>	<p>5 HT₃</p> <p>Canal (cations) 4 s.t. 487 aa (souris) agoniste: 2 - méthyl - 5 HT antagoniste: ondansétron</p>
	<p>5 HT₄</p> <p>7 s.t. ↑ AMPc agoniste: 5 - méthoxytryptamine antagoniste: SDZ 205557</p>	

s.t. : segments transmembranaires

Pluralité des récepteurs sérotonergiques (5 HT).

Tableau 1 : (suite)

M₁	M₂	M₃
460 aa (homme) 460 aa (rat) ↑ PLC antagoniste: pirenzépine	466 aa (homme) 466 aa (rat) ↓ AMPc, ↑ canal K ⁺ antagoniste: méthocramine	590 aa (homme) 589 aa (rat) ↑ PLC antagoniste: HH SiD
M₄	M₅	
479 aa (homme) 478 aa (rat) ↓ AMPc antagoniste : —	532 aa (homme) 531 aa (rat) ↑ PLC antagoniste : —	

Pluralité des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine.

α_{1A}	α_{1B}	α_{1C}
560 aa ↑ PLC antagoniste: WB4101	515 aa ↑ PLC antagoniste: chloroéthylclonidine	466 aa ↑ PLC antagoniste: WB4101
α_{2A}	α_{2B}	α_{2C}
450 aa ↓ AMPc ↑ canal K ⁺ , ↓ canal Ca ⁺⁺ agoniste partiel: oxymétazoline	450 aa ↓ AMPc ↓ canal Ca ⁺⁺ antagoniste: prazosine	461 aa ↓ AMPc antagoniste: prazosine
β₁	β₂	β₃
477 aa ↑ AMPc antagoniste: bétaxolol agoniste: xamotérol	413 aa ↑ AMPc antagoniste: α-méthylpropranolol agoniste: procatérol	402 aa ↑ AMPc agoniste: BRL 37344

Pluralité des récepteurs adrénergiques.

APPROCHE FONCTIONNELLE DE L'ETUDE DES LIGANDS ET DES RECEPTEURS

Pour qu'une substance exerce un effet spécifique après une interaction sur un récepteur, il faut qu'elle puisse non seulement s'y fixer (avec une certaine affinité) mais également posséder la capacité d'agir sur ce récepteur et de déclencher le changement d'une fonction cellulaire (c'est son activité intrinsèque).

Trois étapes peuvent être distinguées dans la séquence des événements intervenant dans un mécanisme d'action d'une molécule (fig 1):

- 1- liaison du ligand à son récepteur,
- 2- amplification des effets de la liaison par des cascades biochimiques diverses,
- 3- réponses biologiques ou "effet" du ligand.

L'action (ou activité intrinsèque), conséquence biologique de la fixation préalable de la molécule sur un récepteur, est à différencier de l'effet physiologique (effet thérapeutique pour les médicaments).

L'action pharmacologique dépend de principes pharmacocinétiques. Elle relève parfois d'une simple propriété chimique.

Les approches expérimentales "fonctionnelles" visent à caractériser cette action.

Parallèlement, la nature des récepteurs présents dans le tissu peut être déterminée par utilisation de ligands de propriétés connues (expériences de "binding").

L'approche expérimentale est menée à différents niveaux: cellulaire, organe isolé, animal entier (schémas des méthodes expérimentales utilisées: voir fig 2).

I CARACTERE MULTIFACTORIEL DE LA REPONSE MESUREE

Les études fonctionnelles des ligands et des récepteurs sont basées sur la **quantification des effets**.

La théorie de l'occupation des sites, fondée sur la loi de l'action de masse, proposait une proportionnalité entre le nombre de récepteurs occupés et l'intensité de l'effet. En fait, les réponses mesurées sont la résultante d'un grand nombre de facteurs physiologiques dans des conditions expérimentales précises.

Ces facteurs sont par exemple: au niveau cellulaire, des phénomènes de rétrocontrôle; au niveau de l'organe, son hétérogénéité; au niveau de l'animal, un ensemble de régulations.

II DEFINITION D'UN AGONISTE ET D'UN ANTAGONISTE

II-1 Un agoniste

Un agoniste est une substance qui se fixe sur des récepteurs qui lui sont spécifiques pour produire une réponse physiologique.



R est le récepteur et R* est le récepteur activé.

-L'**activité intrinsèque** est la capacité du ligand à induire un effet après la liaison; elle permet d'expliquer les différences d'effet maximal observées pour plusieurs agonistes d'un même récepteur et d'introduire la notion d'agoniste partiel (fig 3).

-L'**agoniste partiel** n'entraîne pas la réponse biologique optimale.

-Les différences d'effet maximal suggèrent que la liaison au récepteur n'induit pas ou différemment de mécanismes de couplage intracellulaire; ou que ces mécanismes ne sont que partiellement suscités (cas des agonistes partiels).

-Un **agoniste entier** induit la réponse maximale par occupation d'une partie des récepteurs. La réponse n'est pas proportionnelle au nombre de récepteurs occupés.

-Une haute affinité pour un agoniste ne suffit pas pour prédire sa puissance dans l'organisme. Son efficacité doit être bonne.

-La détermination de l'**affinité** d'un nouveau ligand et la **quantification de ses effets** sont nécessaires à la définition de sa **sélectivité**, ainsi que la comparaison de ses propriétés biochimiques et pharmacologiques à celles des molécules anciennes.

-Un certain nombre de médicaments (ergots de seigle, certains opiacés synthétiques, certains antagonistes bêta adrénergiques) sont des agonistes ou des antagonistes suivant les conditions pharmacologiques. On les appelle des **agonistes/antagonistes mixtes**.

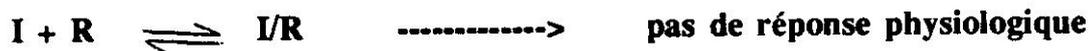
-Certains dérivés des bêta-carbolines ont une activité dite **agoniste inverse**: leur activité intrinsèque est inverse de celle provoquée par les agonistes du même récepteur. Ces effets sont opposés à ceux des benzodiazépines (angoisse, convulsivant).

II-2 Un antagoniste

Les antagonistes s'opposent à la réponse de la cellule ou du tissu, à l'agoniste considéré.

Ce sont généralement des molécules de synthèse.

L'antagoniste seul n'a aucun effet physiologique.



-Un **antagoniste compétitif** est une substance qui se fixe sur les mêmes sites récepteurs que l'agoniste mais qui ne produit pas de réponse physiologique. L'antagoniste compétitif empêche alors l'agoniste de s'y fixer et bloque ainsi la réponse des cellules à l'agoniste. L'effet d'un antagoniste compétitif réversible peut être réversé par de fortes doses d'agoniste.

-Un **antagoniste non compétitif** est une substance qui n'entre pas en compétition avec l'agoniste pour occuper le même site récepteur que lui. L'antagoniste non compétitif s'oppose à l'effet de l'agoniste en se fixant sur un autre site que celui de l'agoniste.

-Un **antagonisme fonctionnel** correspond à deux agonistes qui ont des effets antagonistes.

-Un **antagonisme chimique** correspond à l'interaction chimique de l'antagoniste avec l'agoniste indépendamment de toute interaction avec le récepteur.

-Exemples de l'importance pharmacologique des antagonistes:

-les anti-histaminergiques: ils s'opposent aux effets pathogènes de l'histamine, ce sont des médicaments utiles pour traiter les allergies et certains ulcères d'estomac;

-les bêta-bloquants: ils empêchent la noradrénaline de stimuler les cellules cibles, ils sont utiles pour préserver des affections cardiovasculaires dont l'hypertension ou l'infarctus du myocarde.

III PRINCIPAUX PARAMETRES DE QUANTIFICATION DES EFFETS

III-1 Deux types de réponses à une drogue sont classiquement distingués:

-Les réponses quantales

-Ce sont des réponses régies par le principe du tout ou rien, observées chez l'animal entier.

Exemple: suppression par un médicament de la réponse convulsive de la souris: voir tableau 1.

-Ces réponses sont quantifiées par le paramètre **DE50** (dose efficace 50) qui est la dose nécessaire pour produire un effet chez 50% des animaux.

La **DL50** est la dose létale pour quantifier les effets toxiques des nouvelles drogues, c'est la dose létale pour 50% des animaux.

-Les réponses graduelles

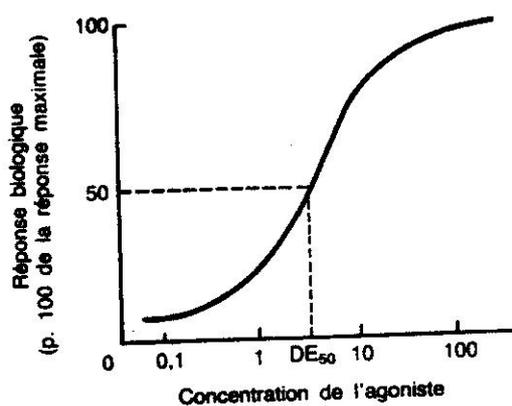
-Elles augmentent en fonction de la dose administrée: voir fig 4.

-La réponse est quantifiée par la mesure de la **DE50** ou **DA50** qui est la dose nécessaire pour observer 50% de l'effet maximum (DE pour les expériences in vivo et CE pour les expériences in vitro).

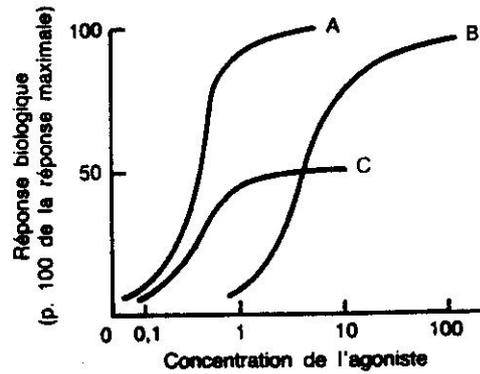
-Lorsque la drogue étudiée présente un effet inhibiteur de la réponse induite par une autre substance (exemple de l'antagoniste d'un récepteur), le paramètre **IC50** représente la concentration nécessaire de la drogue pour inhiber 50% de l'effet évoqué, dans les conditions expérimentales bien déterminées.

III-2 Courbes effet/dose typiques:

-**La courbe effet/dose:** c'est une sigmoïde à partir de laquelle on peut déduire les paramètres suivants: la DE 50, la dose minimale active (la plus petite dose qui donne un effet) et la dose submaximale (la première dose qui donne 100% de l'effet).



-Puissance et efficacité:



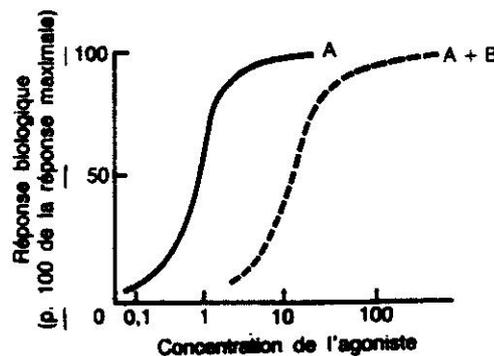
A et B sont 2 agonistes complets qui provoquent tous deux un effet maximum.

A est plus puissant que B: la DE 50 est obtenue avec une dose plus faible.

C est aussi puissant que A (même DE 50) mais est moins efficace (son activité intrinsèque est inférieure à celle de A ou de B). C peut également être un agoniste partiel.

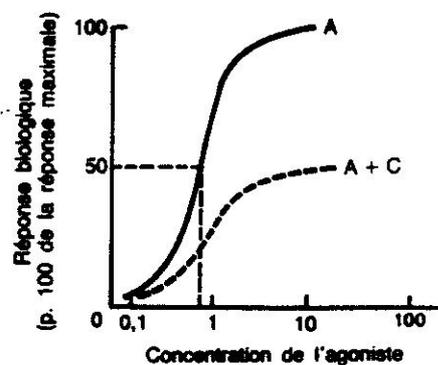
-En présence d'un antagoniste compétitif:

L'antagoniste se lie au récepteur de façon réversible.



L'efficacité de l'agoniste est inchangée (on obtient toujours 100% de l'effet), mais sa puissance est modifiée: la DE 50 est supérieure à celle obtenue avec l'agoniste seul.

-En présence d'un antagoniste non compétitif:



En présence d'un antagoniste non compétitif, l'efficacité de l'agoniste sera réduite et sa puissance inchangée.

V CLASSIFICATION DES ANTAGONISTES

Une méthode de quantification des antagonistes compétitifs permet la détermination d'un paramètre: le pA₂.

La détermination se fait à partir d'expériences dans lesquelles une concentration fixe d'antagoniste est utilisée en présence de concentrations croissantes d'agonistes.

Quand la concentration d'antagoniste augmente, la courbe est déplacée vers la droite, sans changement de pente et de E_{max}.

le rapport "dose/ratio" est égal à

$$(A')/(A) = (B)/K_{DB} + 1$$

(A') : concentration d'agoniste nécessaire en présence d'antagoniste

(A) : concentration équivalente en absence d'antagoniste

K_{DB} : constante de dissociation de l'antagoniste

l'équation peut s'écrire: $\log (\text{dose/ratio} - 1) = \log (B) - \log K_{DB}$

la représentation graphique est appelée graphique de Schild.

Le pA₂ d'un antagoniste compétitif a été défini comme le Logarithme négatif de la concentration molaire de l'antagoniste qui réduit l'effet d'une dose d'agoniste de moitié. C'est en quelque sorte une mesure de la force d'un antagoniste compétitif, en relation avec la constante de dissociation antagoniste/récepteur.

Effets de différentes concentrations d'antagoniste sur les réponses obtenues avec un agoniste: fig 5 A
Graphique de Schild permettant la mesure du pA₂:fig 5 B

$$pA_2 = -\text{Log} (\text{antagoniste}) = 1/K_D$$

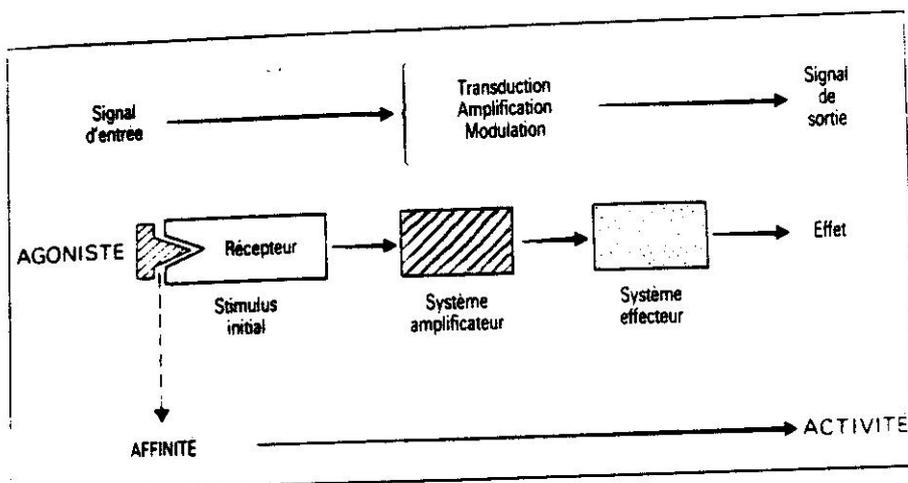


Figure 1 : Représentation schématique de l'interaction agoniste-récepteur et des événements induits successivement

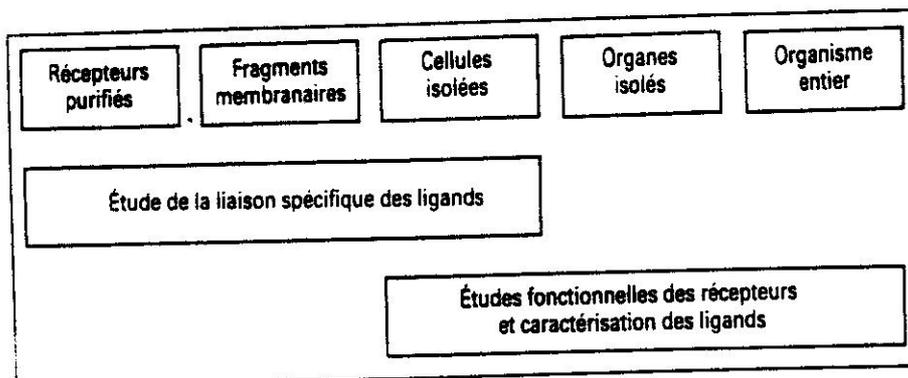


Figure 2 : Schéma des méthodes expérimentales utilisées en fonction de l'information recherchée sur le ligand ou le récepteur.

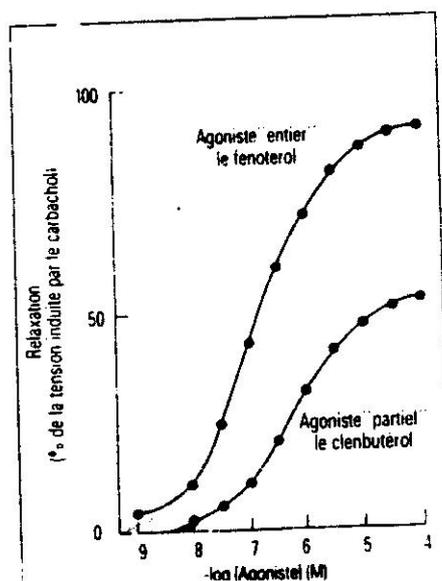


Figure 3 : Exemple d'un agoniste "entier" et d'un agoniste "partiel". L'effet relaxant du fénotérol et du clenbutérol a été étudié sur des fragments isolés de trachée de rat préalablement contractés par $4 \cdot 10^{-7} M$ de carbachol (agoniste cholinergique). Ces deux agonistes β -adrénergiques n'ont pas la même activité intrinsèque. Seul le fénotérol entraîne une réponse optimale du tissu.

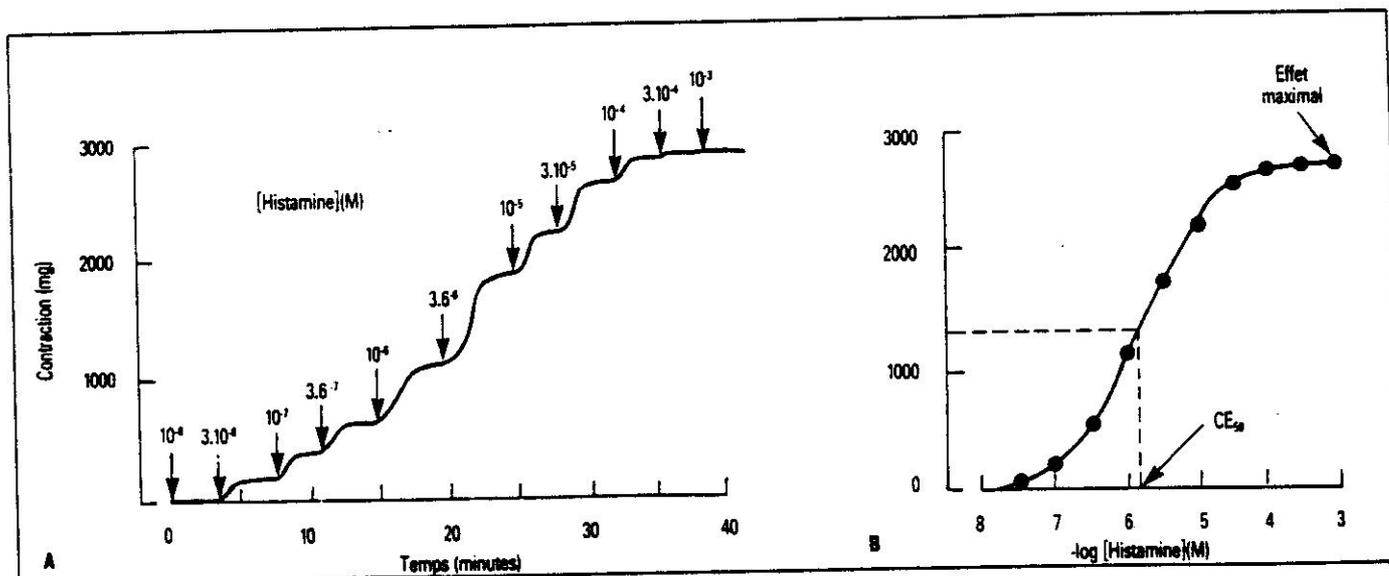


Figure 4 : Exemple d'étude d'une réponse graduelle :

A. Des concentrations croissantes d'histamine ont été mises en contact avec un fragment de trachée de cobaye provoquant sa contraction (exprimée en milligrammes). Chaque dose est ajoutée quand l'effet provoqué par la concentration d'histamine précédente a atteint un plateau de contraction. On s'aperçoit qu'aux fortes concentrations d'histamine la contraction n'augmente plus, l'effet maximal est atteint.

B. Courbe concentration-effet correspondant à l'expérience (A). L'effet est exprimé en milligrammes, mais ce sont les logarithmes décimaux des différentes concentrations molaires d'histamine qui ont été reportés en abscisse donnant une courbe sigmoïde. A partir de cette courbe peuvent être déterminés les paramètres principaux : l'effet maximum et la CE_{50} .

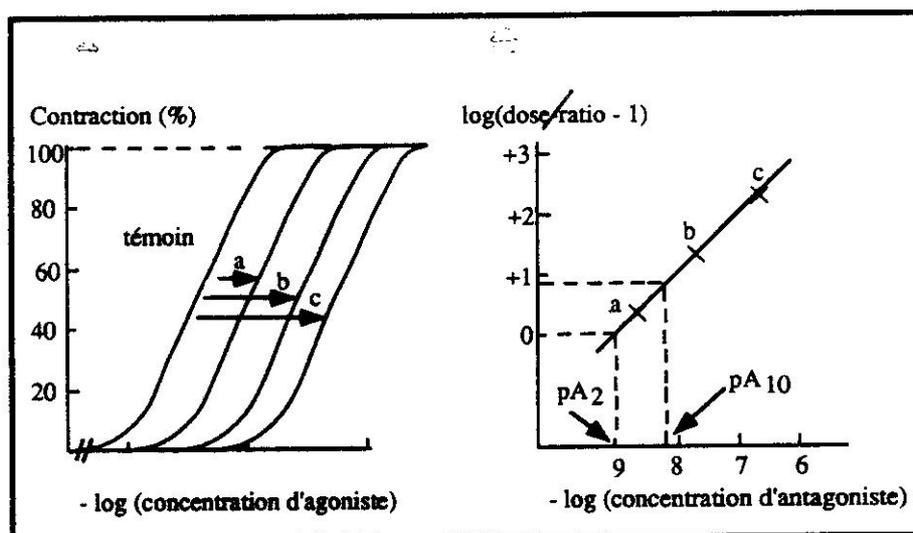


Figure 5 : Courbe effet-concentration en absence ou en présence d'antagoniste. Les déplacements (a, b, c) des courbes en fonction des doses croissantes d'antagonistes sont représentés. A droite : représentation graphique de Schild pour les trois doses d'antagonistes utilisés. Le pA_{2} est de 9.

Antiépileptiques	Convulsivant chimique	
	Pentétrazone	Bicuculline
	DE ₅₀ (mg/kg p.o)	
Phénobarbital	7 (5-11)	6 (4-7)
Diphénylhydantoïne	7 (5-10)	9 (8-11)
Carbamazépine	21 (16-28)	29 (18-45)
Valproate	201 (166-244)	274 (170-341)
Ethosuximide	198 (179-219)	inactif

Tableau 1 : Exemple d'étude utilisant des réponses "quantaes" :

antagonisme par différents antiépileptiques classiques des crises convulsives toniques induites par des agents chimiques (pentétrazone et bicuculline) chez la souris. Le pentétrazone (pentylénetétrazol) est une substance dont le mécanisme d'action est encore mal connu. La bicuculline est un antagoniste des récepteurs GABA-A. Les résultats sont exprimés sous forme de DE₅₀ (dose qui protège 50 % des animaux). Les chiffres entre parenthèses indiquent les intervalles de confiance (la DE₅₀ a 95 % de chance d'être comprise entre les 2 chiffres entre parenthèses).

CARACTERISATION DES RECEPTEURS ET DES LIGANDS PAR LIAISON SPECIFIQUE DE RADIOLIGANDS

I RECEPTEURS ET SITES DE LIAISON

I-1 Principes généraux

Les ligands radiomarqués sont utilisés pour l'étude des récepteurs ou la recherche de nouvelles molécules (liste de quelques uns: voir tableau 1).

L'étude de la liaison est la mise en présence de récepteurs et de ligands dans des conditions expérimentales précises afin de déterminer les caractéristiques de cette liaison.

Associées aux études fonctionnelles, ces méthodologies ont permis de caractériser les différents récepteurs des médiateurs physiologiques par leurs paramètres d'interaction avec leurs agonistes endogènes et leurs analogues de synthèse.

Ces techniques de liaison (appelées "**binding**" en anglais) sont utiles pour caractériser l'affinité d'une nouvelle molécule; **l'effet engendré n'est pas apprécié.**

Sites de liaison: la préparation biologique n'étant que rarement parfaitement connue, on doit parler de sites de liaison et non pas de récepteurs.

I-2 Comment les molécules pharmacologiquement actives se fixent-elles sur les récepteurs qui leur sont spécifiques?

Les agonistes et les antagonistes compétitifs se fixent sur une région particulière de la protéine réceptrice appelée site de liaison ou site récepteur.

L'interaction entre ces substances et le site récepteur est de nature non covalente et par conséquent réversible (comme par exemple liaisons ionique, dipôle-dipôle, hydrogène, Van der Waals). La spécificité entre la molécule et le site dépend de la forme tridimensionnelle de chacun. Ainsi, deux stéréoisomères peuvent être l'un actif (agoniste ou antagoniste qui se lie avec une bonne affinité) et l'autre inactif (incapable de se fixer sur le site).

- ↳ étude nouveau ligand : comparé avec un ligand
- ↳ ou caractériser nouveaux récepteurs avec ligands connus

II CRITERES ^{→ bien connaître} D'IDENTIFICATION DE LA LIAISON SPECIFIQUE AUX SITES

Différents critères doivent être vérifiés pour qualifier de spécifique une interaction ligand/site de liaison. En d'autres termes, différents critères doivent être remplis pour qu'une protéine soit appelée un site récepteur. (s) → *in vitro* + *conçue* ⊕ *in vivo / in vitro*.

II-1 L'affinité

Plus l'affinité du ligand pour son site est élevée, plus il y a de chances qu'il s'agisse d'un site spécifique.

Cependant, il faut tenir compte de la concentration des médiateurs physiologiques au niveau de leurs récepteurs:

- le médiateur est de nature hormonale, il est dilué dans l'organisme (sa concentration est faible: de l'ordre de la nM); une grande affinité est nécessaire pour atteindre sa cible;

- le neuromédiateur, son site est proche (sa concentration est plus grande: de l'ordre de la mM); son affinité peut être plus faible.

ex: concentration de l'acétylcholine (Ach) au niveau de la jonction neuromusculaire: 10^{-4} M; de l'insuline dans le sang: 10^{-10} M. L'affinité de l'insuline pour son site est 20 000 fois plus élevée que celle de l'Ach pour le sien.

II-2 La saturabilité

Le nombre de sites spécifiques est limité: on dit que la liaison est saturable.

Le nombre de sites non spécifiques est illimité: on dit que la liaison est non saturable.

Avec suffisamment de ligand, l'ensemble des sites spécifiques est marqué tandis que le nombre de sites non spécifiques croît de façon linéaire.

II-3 La réversibilité

Les médiateurs physiologiques et la plupart des médicaments agissent de manière réversible.

La nature des forces de liaison engagées est faible.

Le ligand libéré est identique au ligand d'origine (différent de la réaction enzyme/substrat).

Les liaisons covalentes s'opposent à la réversibilité.

II-4 La stéréospécificité

Un isomère optique est actif, l'autre pas ou très peu.

II-5 La corrélation

Entre l'affinité du ligand pour le site, déterminée *in vitro*, et les effets physiologiques observés et quantifiés *in vivo*, il doit exister une bonne corrélation. La représentation graphique de l'effet pharmacologique observé (mesure de l'EC₅₀ par exemple) en fonction de la liaison (la valeur de l'IC₅₀ par exemple) doit être une droite dont le coefficient de corrélation est proche de 1. Cela permet d'affirmer que les effets observés ont été engendrés par l'interaction du ligand sur le site. Les effets physiologiques observés seraient médiés via le récepteur étudié.

Exemples: effet myorelaxant des benzodiazépines (voir fig 1) et effet antipsychotique des neuroleptiques (voir fig 2).

III METHODES D'ETUDE DE LA LIAISON

Elles peuvent être effectuées:

-*in vitro*: sur des préparations sub-cellulaire, sur des coupes de tissu;

-*in vivo*: chez l'homme, chez l'animal. On étudiera par exemple la répartition d'une nouvelle molécule.

III-1 Liaison sur des préparations sub-cellulaires

Il s'agit de mettre en présence une préparation sub-cellulaire riche en un certain type de récepteur et le ligand radioactif (**binding sur homogénat**). Les conditions expérimentales sont déterminées au préalable: temps et température de l'incubation, concentration du ligand, quantité de préparation.

Les différentes étapes sont:

homogénéisation du tissu,

centrifugation du tissu afin de séparer les organites et recueillir une préparation riche en fragments membranaires,

incubation du tissu avec le radioligand,

→ séparation du ligand libre d'avec le ligand lié au site par un rinçage et une filtration,

détermination de la quantité de ligand lié par comptage de la radioactivité (à l'aide d'un compteur à scintillation),

détermination des paramètres de la liaison (représentation graphique appropriée).

III-2 Liaison sur des coupes de tissu

Le principe est le même que précédemment. Les sites ne sont plus présents dans un homogénat de tissu mais sur une coupe de tissu.

Les différentes étapes sont:

congélation puis coupe du tissu,

incubation,

rinçage et séparation,

comptage de la radioactivité et/ou radioautographie: mise en apposition des coupes alors radioactives (car contenant le ligand radioactif lié) et d'un film sensible aux rayons émis par la radioactivité. C'est le principe de la photographie, le film est imprégné par les rayons, révélé et fixé. On obtient une image de la localisation des sites sur la coupe (la résolution est donc meilleure qu'avec une liaison sur homogénat); de plus la quantité de radioactivité peut être mesurée à l'aide d'un analyseur d'image,

détermination des paramètres de la liaison.

Exemples de radioautogrammes: récepteurs dopaminergiques (voir fig 3) et récepteurs des benzodiazépines (voir fig 4).

III-3 Etude de la liaison in vivo

III-3-1 La tomographie par émission de positrons: la méthodologie et son intérêt

La tomographie par émission de positrons (PET) est une méthodologie qui permet de visualiser et de quantifier dans l'organisme des substances chimiques possédant une activité biologique désirée et marquées par des isotopes radioactifs.

L'objectif recherché est la localisation in vivo et l'identification de l'activité biochimique anormale liée à une pathologie donnée et d'observer directement cette anomalie.

Cette technique consiste à administrer une substance marquée radioactivement et à suivre son devenir dans le corps avec un appareil qui détecte les désintégrations (il y a alors émission d'un positron ou électron positif). L'ordinateur reconstruit rapidement la répartition spatiale de la radioactivité à l'intérieur du sujet, dans un plan choisi. Les images obtenues sont enregistrées et leur bonne observation peut fournir une évaluation locale de nombreux processus biochimiques essentiels au bon fonctionnement de l'organe observé.

C'est une méthodologie utilisée sur des animaux et sur des humains qui a maintenant une importance fondamentale en matière de diagnostic. Les domaines d'exploration sont variés.

Exemples de quelques pathologies explorées:

-neurologie: ischémie, épilepsie, maladie de Parkinson, démences séniles (Alzheimer et Huntington);

- cardiologie: ischémie, greffes, myocardiopathies, récepteurs du système sympathique, récepteurs muscariniques;
- psychiatrie: schizophrénie, troubles de l'humeur;
- tumeurs: vascularisation, synthèse protéique, récepteurs à la progestérone.

Exemples de quelques substances biologiquement actives émettrices de positrons et synthétisées pour les études de PET: voir tableau 2.

III-3-2 Exemples de récepteurs étudiés in vivo

-Les récepteurs dopaminergiques et la maladie de Parkinson

Les récepteurs dopaminergiques D2 (explorés à l'aide du ^{11}C -N-méthylspipérone ou du ^{11}C -raclopride) ont été explorés au niveau du striatum, du caudé et du putamen de patients traités ou non à la L-DOPA (précurseur de la dopamine). La densité des récepteurs chez les patients non traités est similaire à celle des sujets normaux; celle observée chez les patients traités est diminuée (phénomène de down-regulation).

Dans ce cas, les modifications observées peuvent conduire à des attitudes thérapeutiques nouvelles.

-Les récepteurs du GABA_A et les récepteurs Mu des peptides opioïdes dans l'épilepsie

Une diminution de la liaison d'un antagoniste (^{11}C -flumazénil) du récepteur des benzodiazépines a été observée au niveau du foyer épileptogène; tandis qu'une augmentation de la liaison d'un agoniste sélectif des récepteurs Mu (^{11}C -carfentanil) a été mesurée dans la région temporale du cortex où est localisé le foyer.

Dans cette pathologie, le principal apport du PET est de localiser le foyer épileptogène.

IV DETERMINATION DE LA LIAISON SPECIFIQUE

Le terme de liaison non spécifique (NS) évoque la liaison à des sites qui n'ont pas la qualité de récepteur, avec généralement une affinité faible et un caractère non saturable.

En considérant la haute affinité du ligand (10^{-9}M), un excès de ligand froid (10^{-6}M) dans le milieu d'incubation pourra déplacer la liaison spécifique sans affecter la liaison aux sites non spécifiques (figs 5 et 6).

La liaison NS ne doit pas dépasser environ 20% de la liaison totale pour considérer que la liaison est spécifique.

Liaison totale = liaison spécifique + liaison non spécifique

V ETUDE DES CARACTERISTIQUES DE LA LIAISON D'UN RADIOLIGAND PAR EXPERIENCES DE LIAISON A SATURATION DE LIGAND

Il s'agit de définir les paramètres qui caractérisent cette liaison. Ce sont: la constante de dissociation du ligand et la densité maximale des sites dans la préparation. C'est une étude qui s'effectue in vitro.

V-1 Les caractéristiques de la liaison

-La constante de dissociation (K_D)

Elle est définie à l'équilibre de la formation du complexe RECEPTEUR/LIGAND (R/L) et pour une température expérimentale donnée.

Elle traduit l'affinité du ligand pour le récepteur.

Elle a la grandeur d'une concentration.

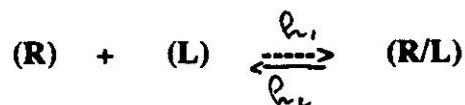
-La densité maximale de sites (B_{max}) dans la préparation

Elle représente la quantité de sites récepteurs dans la préparation.

Elle est exprimée souvent en femtomoles de ligands par mg de la préparation biologique.

V-2 La représentation de Scatchard-Démonstration de la formule

L'interaction entre le ligand et le récepteur est régi par la loi d'action de masse:



C'est l'équation (1) : la réaction est réversible et à l'équilibre

La concentration du radioligand doit être très largement supérieure à celle des sites de liaison.

k_1 est la constante de vitesse d'association

k_2 est la constante de vitesse de dissociation

$$K_D = k_2/k_1 = ((R)*(L)) / (R/L)$$

C'est l'équation (2) : K_D est la constante de dissociation à l'équilibre.

(L) est la concentration de ligand libre.

(R) est la concentration de récepteur libre.

(R/L) est la concentration de récepteur occupé.

K_A est la constante d'association, $K_A = 1 / K_D$

K_A représente l'affinité du ligand pour le récepteur.

$$(R_t) = (R/L) + (R)$$

C'est l'équation (3) où (R_t) est la concentration totale des R.

Des équations (2) et (3), on peut déduire:

$$K_D \cdot (R/L) = (R) \cdot (L)$$

$$K_D \cdot (R/L) = (R_t - (R/L)) \cdot (L)$$

$$K_D \cdot (R/L) = (R_t) \cdot (L) - (R/L) \cdot (L)$$

$$(R/L) = ((R_t) \cdot (L)) / K_D - ((R/L) \cdot (L)) / K_D$$

$$(R/L) + ((R/L) \cdot (L)) / K_D = ((R_t) \cdot (L)) / K_D$$

$$(R/L) (1 + (L) / K_D) = ((R_t) \cdot (L)) / K_D$$

$$(R/L) = ((R_t) \cdot (L)) / K_D + (L) / K_D$$

$$(R/L) = ((R_t) \cdot (L)) / K_D + (L)$$

C'est l'équation (5), elle représente une hyperbole sur laquelle on peut estimer le K_D et le B_{max} (fig 2).

Quand $(R/L) / R_t = 1/2$; $(L) = K_D$

donc le K_D est égal à la concentration du ligand qui occupe la moitié de la totalité des sites récepteurs.

$$(L_t) = (L) + (R/L)$$

Cependant, comme dans la plupart des études de saturation, moins de 10% du ligand L_t est lié à R, il est admis d'assimiler (L) à (L_t).

$$(R/L) / (R_t) = r$$

r est la fraction des récepteurs occupés.

Représentation de Scatchard

L'équation (5) est transformée pour aboutir à une relation linéaire.

Ce graphique a été proposé par SCATCHARD (1949) et est analogue à celui développé par EADIE (1942) puis par HOFSTEE (1952) pour la cinétique enzymatique.

les équations (2) et (3) sont transformées pour aboutir à l'équation (9)

$$KD = (R)*(L)/(R/L) \quad \text{et} \quad Rt = (R/L)+(R)$$

$$(R/L) = (R)*(L)/KD$$

$$(R) = (Rt)-(R/L)$$

$$(R/L)/(L) = (R)/KD$$

$$(R/L)/(L) = ((Rt)-(R/L))/KD$$

$$(R/L)/(L) = - (R/L)/KD + (Rt)/KD$$

C'est l'équation (9)

si $(R/L) = B$

"Bound" (B) est la concentration de ligand lié au récepteur

$$(L) = F$$

"Free" (F) est la concentration de ligand non lié

$$(Rt) = B_{\max}$$

"Binding maximal" (B_{\max}) représente le nombre maximal de sites de liaison donc Rt

l'équation (9) devient:

$$B/F = - (1/KD)*B + B_{\max}/KD$$

C'est l'équation (10): **équation de SCATCHARD** (représentation: voir fig 7)

Cette représentation (qui est une droite) permet donc l'estimation du KD et du B_{\max} avec plus de précision.

Le type de relation décrit et exprimé par l'équation (10) correspond aux cas les plus simples, à savoir une seule classe de sites qui ne s'influencent pas mutuellement présents dans la préparation et reconnus par le ligand radioactif.

Dans les cas plus compliqués, la représentation de SCATCHARD n'est plus linéaire.

V-3 Coopérativité entre les sites

Si la liaison d'une molécule de ligand empêche ou facilite la liaison de la molécule suivante sur une même protéine récepteur, le phénomène est une **coopérativité négative ou positive**.

Dans ces situations, le graphique de HILL permet de déterminer le **coefficient de HILL** (ou nombre de HILL: n_H) lorsque la pente est linéaire: il indique de quelle coopérativité il s'agit.

$n_H < 1$: coopérativité négative

$n_H > 1$: coopérativité positive

Si $n_H = 1$, la loi d'action de masse est respectée.

La transformation logarithmique de l'équation (5) donne :

$$\text{Log} \left[\frac{B}{(B_{\text{max}} - B)} \right] = n \text{Log}(L) - \text{Log} K'D$$

n est le nombre théorique de sites de liaison par molécule de récepteur

$K'D$ est une constante composite comprenant la constante intrinsèque de dissociation (K_D) et des facteurs d'interaction qui déterminent le degré d'altération de K_D

Représentation de Hill: voir fig 8.

VI EXPERIENCE DE COMPETITION

L'objectif est de déterminer si une molécule à tester (non radioactive) est capable d'inhiber, d'empêcher la liaison du ligand radioactif de référence à son récepteur spécifique. Si oui, plusieurs concentrations de la molécule à tester seront utilisées pour déterminer la concentration nécessaire pour inhiber de 50% de la liaison. C'est la détermination du paramètre spécifique IC_{50} .

Dans les expériences de compétition, une molécule inhibitrice non marquée (I) est introduite.

L'équation (1) devient:

$$(R) + (L) + (I) \text{ ----> } (R/L) + (R/I)$$

(I) est la concentration de ligand froid de propriété inconnue

Ce ligand est symbolisé par I car il est susceptible de déplacer de façon compétitive le ligand radiomarqué (L) de son site de liaison, indépendamment de sa nature agoniste ou antagoniste.

$$(R_t) = (R) + (L/R) + (R/I)$$

Estimation du degré de compétitivité de la molécule I par le calcul de K_I :

K_I est la constante d'inhibition de la molécule I

Des équations (5) et (10), on détermine

$$B = (B_{\text{max}} * (L)) / (K_D + (L))$$

équation (12) qui se transforme, si (I) intervient

$$(L/R) = ((L) * (R_t)) / K_D (1 + I/K_I) + (L)$$

Si la liaison spécifique de L est inhibée à 50%, IC_{50} est la concentration de I responsable de cette inhibition.

$$(L/R)_{50} = ((L) * (R_t)) / K_D (1 + IC_{50}/K_I) + (L)$$

Cette équation est transformée pour donner:

$$K_I = IC_{50} / (1 + (L)/K_D)$$

$$\text{si } K_I = ((R) \cdot (I)) / (R/I)$$

K_I est la constante de dissociation de I sur le site, et $1 / K_I$ est l'affinité de I pour le site.

$$\text{si } (L) = K_D$$

$$K_I = IC_{50} / 2$$

Etude des caractéristiques (K_I , IC_{50}) de la liaison d'un ligand froid par déplacement d'un radioligand (figs 9 et 10).

VII CONCLUSION

Les techniques dites de "binding" ne distinguent pas un agoniste d'un antagoniste. Les tests *in vivo* sont nécessaires à cette détermination. Ils seront effectués sur des préparations d'organes isolés ou sur l'animal entier afin de tester l'activité du ligand et une courbe effet/dose sera tracée.

L'identification d'une nouvelle molécule chimique, sur le plan pharmacologique, utilise les techniques de liaison complétées par les études *in vivo*. Cette stratégie, couplée aux études de structure/activité, a pour but la découverte de nouvelles molécules aux activités pharmacologiques plus ciblées.

L'identification d'une nouvelle molécule peut également servir à la recherche de nouveaux sites de liaison ou de nouveaux sous-types de récepteurs.

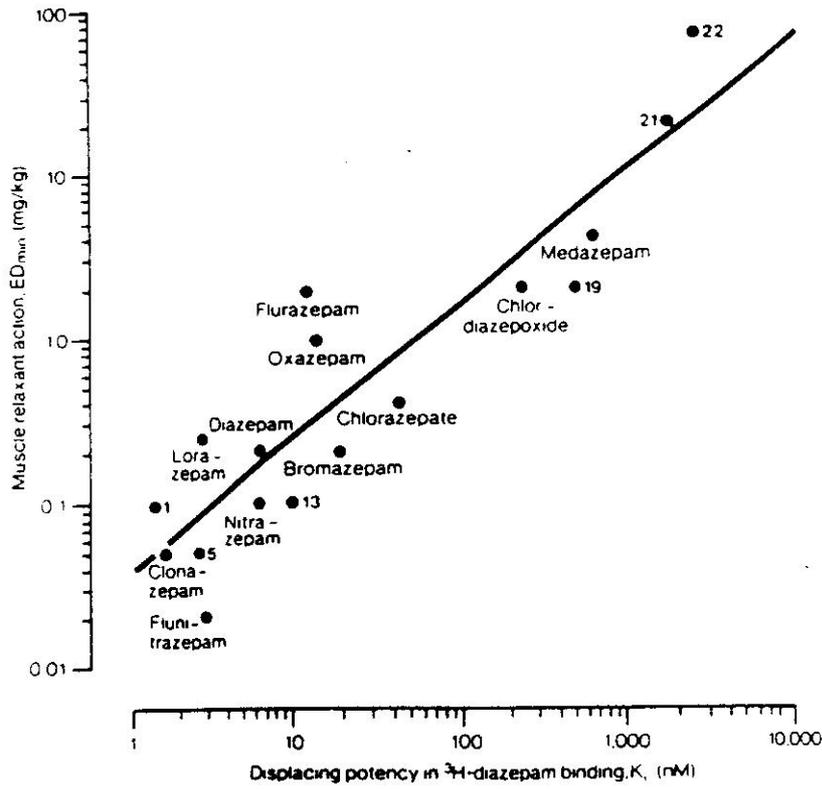


Figure 1 : Corrélation entre l'effet myorelaxant et l'affinité du 3 H-diazépam pour ses sites de liaison.

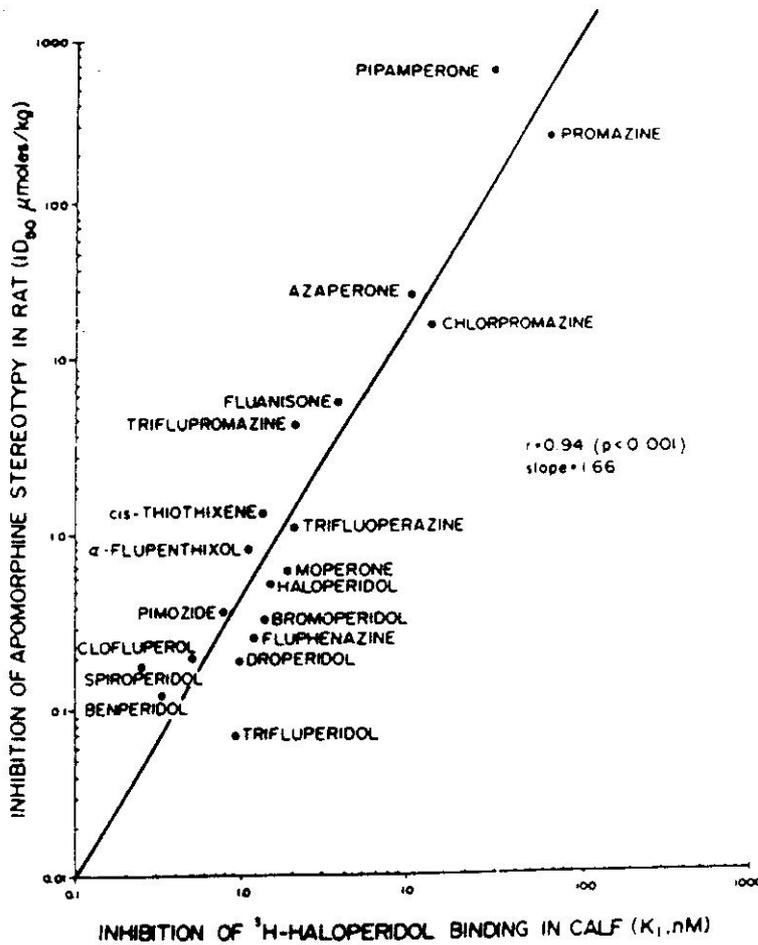


Figure 2 : Corrélation entre l'affinité du 3 H-halopéridol, molécule aux propriétés neuroleptiques, et l'inhibition de la stéréotypie provoquée par l'apomorphine chez le rat.

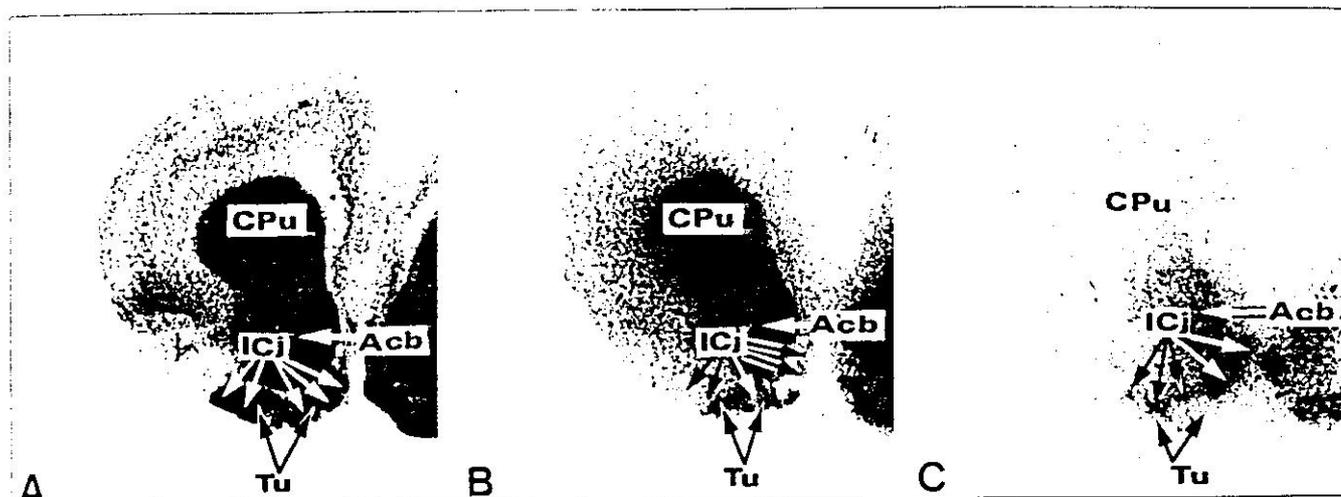


Figure 3 : Localisation autoradiographique des sites de liaisons et des ARN messagers des récepteurs D_2 et D_3 sur une coupe frontale de cerveau de rat. La distribution des ARNm du récepteur D_2 (B) est parallèle à celle des sites de liaison dopaminergiques ($D_2 + D_3$) marqués par un ligand radioactif (A) avec de fortes densités dans l'ensemble du striatum (CPu). La distribution des ARNm du récepteur D_3 (C) est restreinte à un territoire appartenant au système limbique constitué des parties ventromédianes du striatum et du noyau accumbens (Acb), et du tubercule olfactif (Tu), particulièrement des îlots de Calleja (ICj).

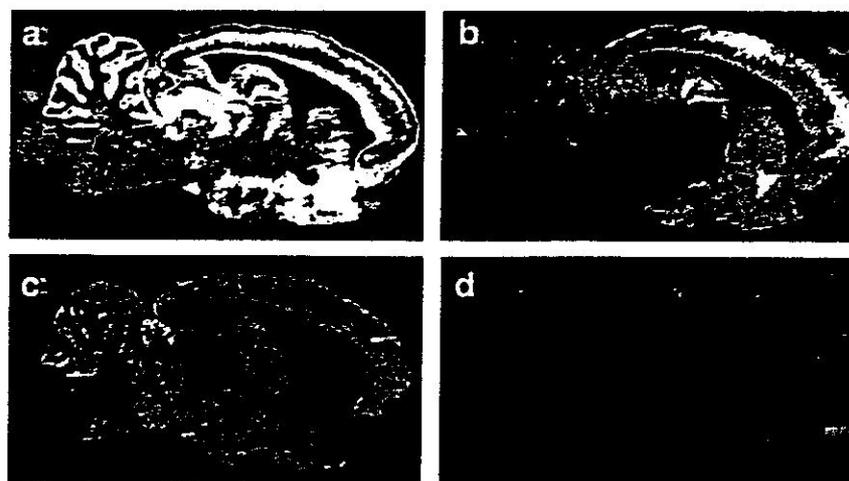


Figure 4 : Distribution des récepteurs BZ_1 et BZ_2 déterminée par radioautographie.
 a) liaison totale du 3H-suriclone sur des coupes sagittales de cerveau de rat.
 b) liaison en présence d'alpidem (300 nM) pour visualiser les récepteurs BZ_2 .
 c) (a) - (b) visualise les récepteurs BZ_1 .
 d) liaison non spécifique en présence de flumazénil (1 μ M).

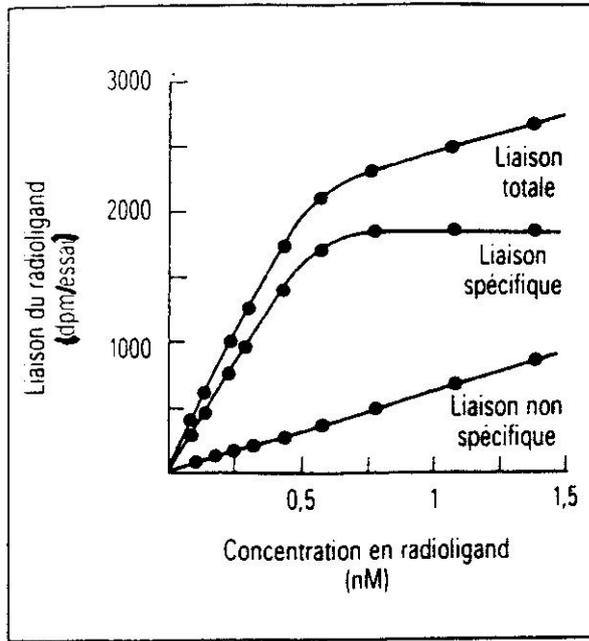


Figure 5 : Courbe de saturation d'un radioligand au niveau d'une population homogène de récepteurs.

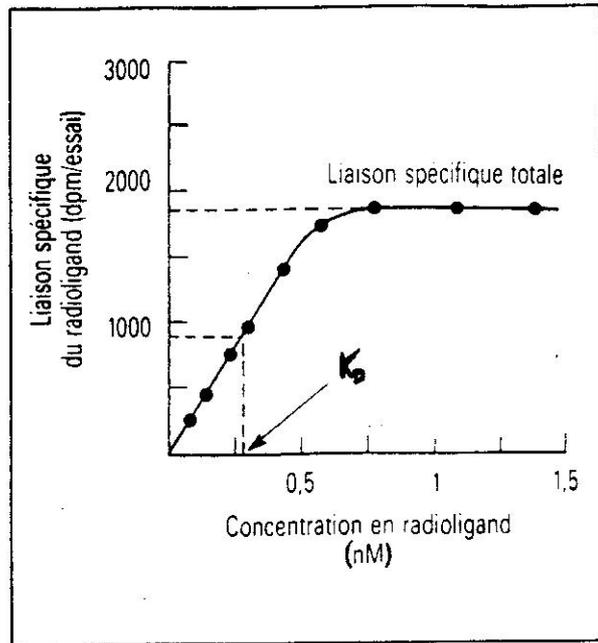


Figure 6 : Détermination du K_D pour le radioligand à partir d'une courbe de saturation.

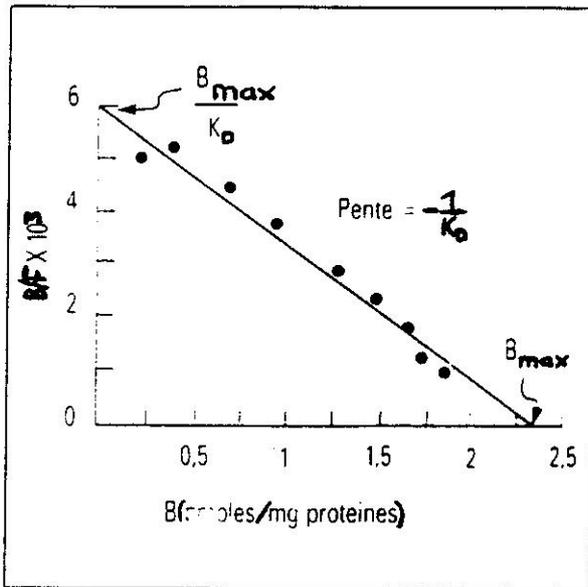


Figure 7 : Représentation de Scatchard.

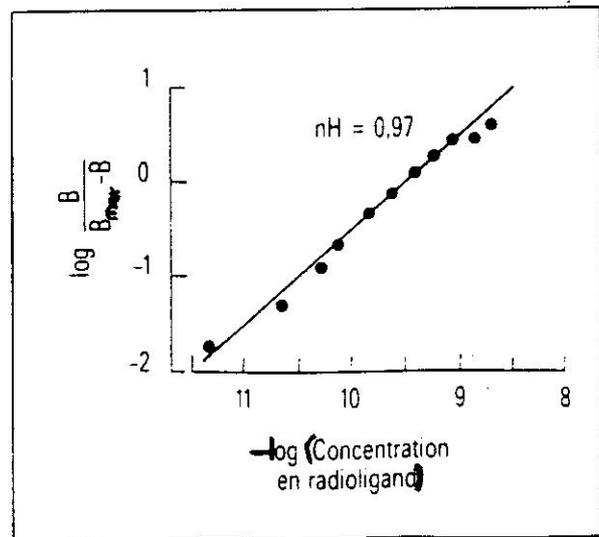


Figure 8 : Représentation de Hill à partir d'une expérience de saturation.

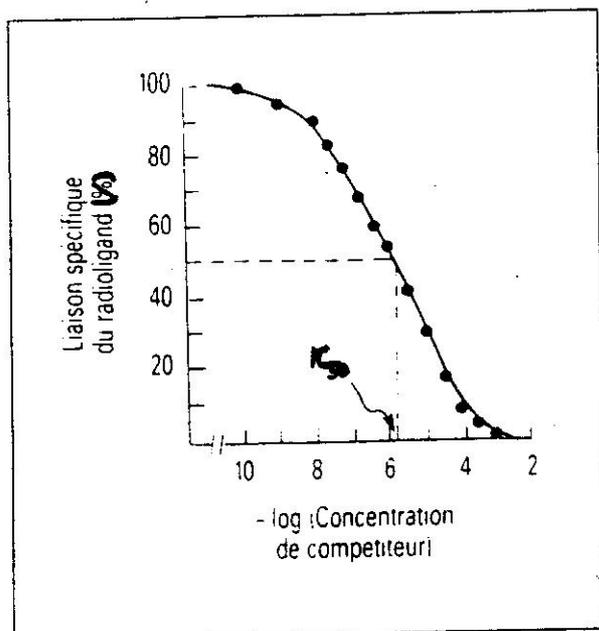


Figure 9 : Courbe de compétition obtenue en déplaçant un radioligand par un compétiteur et détermination de l'IC₅₀.

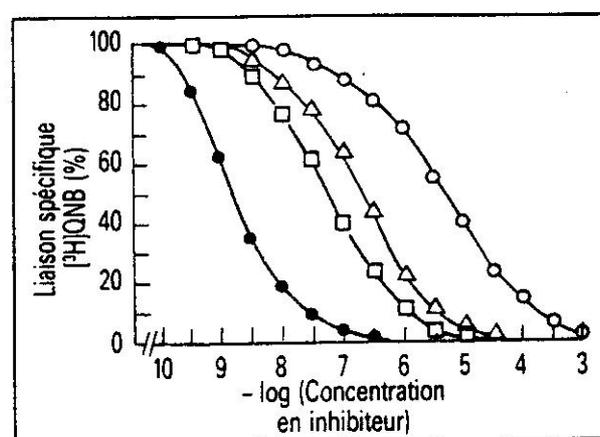


Figure 10 : Déplacement de la liaison d'un antagoniste muscarinique tritié (³H)quinuclidinyl benzylate) par des ligands muscariniques. Les K_I sont : atropine (●) 0,195 nM, pirenzepine (□) 26,3 nM, oxotremorine (Δ) 81 nM et carbachol (○) 2823 nM.

Récepteurs muscariniques de l'acétylcholine	
AF-DX116, [pipéridinyl- ³ H-]	Antagoniste M2
Pirenzepine, [méthyl- ³ H-]	Antagoniste M1
QNB*, L-[benzique- ³ H-]	Antagoniste
Oxotrémorine – M, [méthyl- ³ H-]	Agoniste
Récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine	
α – Bungarotoxine, [¹²⁵ I]	Antagoniste
Nicotine, [méthyl- ³ H-]	Agoniste
Récepteurs adrénergiques alpha	
Prazosine, [7-méthoxy- ³ H-]	Antagoniste α ₁
Rauwolscine, [méthyl- ³ H-]	Antagoniste α ₂
Clonidine, [benzène- ³ H-]	Agoniste α ₂
Récepteurs adrénergiques bêta	
Dihydroalprénolol [propyl- ³ H-]	Antagoniste
Iodocyanopindolol, [¹²⁵ I]	Antagoniste
Récepteurs dopaminergiques	
Flupenthixol, cis [benzène- ³ H]	Antagoniste D ₁
Domperidone, [benzène- ³ H]	Antagoniste D ₂
Propylnorapomorphine, [propyl- ³ H]	Agoniste
Récepteurs sérotonergiques	
Kétansérine, [éthylène- ³ H-]	Antagoniste 5HT ₂
Récepteurs histaminergiques	
Pyrilamine, [pyridinyl 5- ³ H-] (Mepyramine)	Antagoniste H ₁
Tiotidine [méthyl- ³ H-]	Antagoniste H ₂
Histamine, [³ H]	Agoniste
Récepteurs GABA-ergiques A et B	
Bicuculline, (-)-[méthyl- ³ H-]	Antagoniste GABA-A
Baclofène, (-)-[butyl-4- ³ H]	Agoniste GABA-B

Tableau 1 : Exemple de molécules marquées utilisées dans l'étude des récepteurs des neuromédiateurs.

MARQUEUR	DEMI-VIE	SUBSTANCE MARQUÉE	UTILISATION
OXYGÈNE 15	2 MINUTES	OXYGÈNE EAU MONOXYDE DE CARBONE DIOXYDE DE CARBONE	MÉTABOLISME DÉBIT SANGUIN VOLUME SANGUIN DÉBIT SANGUIN
AZOTE 13	10 MINUTES	AMMONIAC DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS OXYDE NITREUX 1,3 BIS (2-CHLOROÉTHYL) 1-NITROSOURÉE (BCNU)	PERFUSION D'ORGANE MÉTABOLISME MÉTABOLISME PERMÉABILITÉ (CERVEAU) DÉBIT SANGUIN CONCENTRATION INTRA TUMORALE DES MÉDICAMENTS
CARBONE 11	20 MINUTES	MONOXYDE DE CARBONE DIOXYDE DE CARBONE DIFFÉRENTS ALCOOLS DIFFÉRENTS ÉTHERS ACÉTATE PALMITATE MÉTHYLALBUMINE OCTYLAMINE GLUCOSE 2-DÉSOXY-D-GLUCOSE PHÉNYTOINE THYMIDINE DOPAMINE NORADRÉNALINE FLUNITRAZÉPAM ÉTORPHINE PIMOZIDE	VOLUME SANGUIN pH TISSULAIRE PERMÉABILITÉ (CERVEAU) DÉBIT SANGUIN DÉBIT SANGUIN CONTENU TISSULAIRE EN LIPIDES MÉTABOLISME (CŒUR) MÉTABOLISME (CŒUR) HÉMATOCRITE TISSULAIRE (RAPPORT CELLULES/PLASMA) CARTE DES RÉCEPTEURS DE LA MONOAMINE OXYDASE (POUMONS) MÉTABOLISME MÉTABOLISME CONCENTRATIONS TISSULAIRES DES MÉDICAMENTS (ÉPILEPSIE) MÉTABOLISME (TUMEURS) NEUROTRANSMETTEURS (CERVEAU) NEUROTRANSMETTEURS (CERVEAU)
FLUOR 18	110 MINUTES	2-DÉSOXY-D-GLUCOSE 3-DÉSOXY-D-GLUCOSE HALOPÉRIDOL SPIROPÉRIDOL	MÉTABOLISME MÉTABOLISME NEUROTRANSMETTEURS (CERVEAU)

Tableau 2 : LES SUBSTANCES EMETTRICES DE POSITRONS, synthétisées pour les études PET, permettent d'étudier un grand nombre de mécanismes biologiques. Les isotopes à courtes périodes, oxygène, l'azote et le carbone, sont particulièrement utiles pour suivre le métabolisme de leurs analogues structuraux, mais on peut aussi les incorporer dans les molécules d'intérêt pharmacologique. Dans le cas des analogues des métabolites habituels et dans les médicaments, on utilise le ^{18}F , à la place de l'oxygène 15 en raison de sa période beaucoup plus longue.

BIOLOGIE MOLECULAIRE APPLIQUEE A L'ETUDE DES RECEPTEURS

La pharmacologie moléculaire est de plus en plus influencée par la biologie moléculaire qui contribue à la compréhension de la structure, de la fonction et de la pharmacologie des récepteurs.

Les techniques de biologie moléculaire qui permettent d'isoler et de séquencer des gènes, de synthétiser des ADNc et donc des protéines, ont amené les pharmacologues à redéfinir la notion de récepteur et de sous-types de récepteur.

Des sous-types de récepteur: ce sont des protéines réceptrices codées par des gènes différents et capables de lier un même agoniste endogène (ex: les différents récepteurs adrénergiques alpha 1 et 2, et bêta 1, 2 et 3 reconnaissent tous l'adrénaline et les 5 sous-types des récepteurs dopaminergiques reconnaissent tous la dopamine).

Des isorécepteurs sont des récepteurs issus d'un même gène, liant le même agoniste endogène, mais dont les ARNm ont subis des arrangements différents. La traduction a donné des protéines de formes tridimensionnelles différentes (isoformes); (ex: 2 isoformes des sous-types D2 des récepteurs dopaminergiques, D2s et D2l reconnaissent tous les deux la dopamine).

Le clonage des gènes et leur expression codant pour les récepteurs permettent d'explorer expérimentalement les relations entre structure et activité et de proposer des modèles bidimensionnels voir tridimensionnels du complexe R/L.

I PLURALITE DES RECEPTEURS A UN MEME MEDIATEUR

La pluralité des R à un même médiateur a pour but d'accroître la finesse et la complexité des systèmes de communication entre cellules et organismes.

I-1 Généralités

La pluralité des récepteurs à un même médiateur est un concept associé à l'évolution de la connaissance du mécanisme d'action des médicaments.

L'approche fonctionnelle des effets de l'acétylcholine a permis d'émettre l'idée de l'existence de deux sous-types de récepteurs:

- les effets nicotiniques inhibés par le curare (la réponse des muscles squelettiques à la stimulation du nerf vague est inhibée);

-les effets muscariniques inhibés par l'atropine (les effets cardiaques de la stimulation du nerf vague sont bloqués).

Il pouvait donc exister une pluralité des réponses pharmacologiques donc une pluralité des récepteurs pour un même médiateur.

La vérification de cette pluralité, démontrée par des études de pharmacologie fonctionnelle puis biochimique, nécessite la détermination par la biologie moléculaire des structures de chaque sous-type de récepteur.

Un récepteur peut être considéré comme un site de reconnaissance d'un médiateur associé à un domaine de transmission du message. Deux récepteurs distincts peuvent posséder des sites de reconnaissance semblables et être activés par un même médiateur, avec des affinités plus ou moins semblables. Les effets physiologiques engendrés dépendront alors:

- du domaine de transmission,
- des effecteurs,
- de la séquence biochimique aboutissant à la réponse globale de la cellule.

Les récepteurs d'un même médiateur peuvent avoir:

-une structure très proche (ils appartiennent à la **même famille**; ex: la famille des 7 domaines transmembranaires pour les récepteurs adrénergiques et les récepteurs de la dopamine), et le degré d'**homologie** est alors estimé;

-une structure très différente (ils appartiennent à des familles différentes; ex: le récepteur nicotinique inclut un canal ionique tandis que le récepteur muscarinique est couplé à une protéine G, exemple voir tableau 1).

I-2 Conséquences de la pluralité des récepteurs à un même médiateur: la pharmacologie doit rechercher de nouvelles molécules avec la connaissance des sous-types de récepteurs

-élaborer la synthèse de ligands très sélectifs (agonistes ou antagonistes) de ces différents sous-types;

-cibler certains sous-types de récepteurs avec des molécules très spécifiques;

-considérer la localisation précise, la présence de différents sous-types à l'intérieur d'un même tissu (exemple des récepteurs adrénergiques bêta 1 et bêta 2 localisés au niveau cardiaque mais dont seuls les bêta 1 sont impliqués dans l'effet inotrope);

-rechercher des effets thérapeutiques de plus en plus précis;

-diminuer les effets secondaires.

II TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE: DE LA PROTEINE AU GENE ET DU GENE A LA PROTEINE

Les techniques utilisées permettent d'identifier un ARNm particulier et de l'utiliser pour isoler la protéine qu'il code; ou bien de purifier une protéine et d'utiliser une partie de sa séquence protéique pour isoler le gène qui lui correspond (voir fig 1).

II-1 Stratégie générale et méthodologie

Les différentes étapes sont:

1 Isolement et purification de la protéine récepteur

-solubilisation de la membrane plasmique, cela s'effectue en présence de détergent et d'inhibiteurs de protéases (il ne faut pas perdre l'activité de la liaison);

-isolement du récepteur et purification, cela s'effectue par chromatographie d'affinité (avec un ligand, une lectine, un anticorps), puis HPLC ou électrophorèse en gel de polyacrylamide.

2 Détermination de la séquence primaire

-dégradation partielle de la protéine (rupture de liaisons peptidiques à l'aide d'enzymes),

-séquençage (avec un séquenceur automatique).

3 Clonage et séquençage de l'ADN codant pour le récepteur

-synthèse d'oligonucléotides codant pour la protéine et devant servir de sondes (synthèse effectuée sur la base de la séquence en acides aminés);

-identification de l'ADN codant pour le récepteur ou de l'ADNc

-radiomarquage des oligonucléotides: ce sont des "sondes" pour identifier le ou les clones contenant un ADN codant pour le récepteur (ou l'ADNc).

Un clone génomique est formé par une colonie de bactéries contenant un fragment de l'ADN génomique. L'ADN choisi est lié à un vecteur, soit un bactériophage, soit un plasmide. Il est possible de préparer une librairie contenant l'ensemble complet des clones d'ADN génomique ou d'ADNc. Le matériel de départ servant à préparer une librairie d'ADN génomique est l'ADN total d'organisme ou d'une cellule; alors que pour la librairie d'ADNc ce sont les ADN complémentaires représentant tous les ARNm de la cellule.

Exemples de récepteurs clonés à partir de milieux différents: récepteur H2 cloné à partir de cellules pariétales gastriques du chien; récepteur H1 à partir de cellules de la médullosurrénale du boeuf; 5-HT1c à partir d'une librairie d'ADNc contenu dans les plexus choroïdes du rat; 5-HT1a à partir de

cellules de reins de singe; β 3-AD à partir d'une librairie du génome humain, D1 à partir d'une librairie du génome humain contenu dans des cellules de rétine.

-séquençage de l'ADN identifié.

Il ne reste plus qu'à démontrer que la protéine correspondant à la séquence nucléotidique détectée est bien le récepteur.

4 expression de l'ADN correspondant à cette protéine

-systèmes d'expression:

-injection d'ADN ou d'ARNm correspondant dans les oocytes de xénopes;

-transfection dans des cellules eucaryotes ou procaryotes (ex: la protéine issue du gène cloné et sélectionné comme étant un récepteur β 3 hypothétique devait être caractérisée: ceci a été effectué après transfection de cellules d'ovaire de hamster avec ce gène, les récepteurs 5-HT1d et 5-HT2 ont été exprimés dans des cellules non humaines et non neuronales: des cellules de fibroblastes de souris: avantage, elles n'expriment pas de récepteur des monoamines par elles-mêmes.)

-caractérisation pharmacologique et fonctionnelle habituelle du récepteur synthétisé dans ces systèmes.

5 Anticorps anti-récepteur

-synthèse de peptides du récepteur,

-immunisation d'animaux avec ces peptides (lapins, souris),

-obtention d'anticorps spécifiques de ces peptides,

-vérification de la réaction avec le récepteur naturel (inhibition de l'activité biologique).

II-2 Intérêt en pharmacologie de la connaissance des différents sous-types de récepteurs

II-2-1 Exemple des récepteurs β adrénergiques

-Classification des récepteurs adrénergiques: tableaux 2 et 3

-Le gène du récepteur adrénergique humain β 1 a été isolé à partir d'une librairie d'ADNc de placenta. Il code pour une protéine formée de 477 acides aminés dont le poids moléculaire est de 51 200.

-Le gène du récepteur β 2 a été isolé à partir d'une librairie d'ADNc de cerveau et de placenta humain. Il code pour une protéine de 413 acides aminés dont le poids moléculaire est de 46 480.

-Il existe 54% d'homologie entre les β 1 et les β 2.

-Récemment, un gène humain codant pour un nouveau récepteur bêta a été isolé (bêta3).

Ils présentent 46% d'homologie avec les bêta 1 et 2.

Les nouveaux agonistes bêta3 ont les propriétés pharmacologiques suivantes sur des modèles animaux: augmentent la thermogénèse, sont antidiabétiques et antiobésité.

-Une proposition de la topologie du récepteur bêta est présentée fig 2.

-Les principaux effets pharmacologiques observés: voir tableau 4.

II-2-2 Exemples des récepteurs dopaminergiques

-La dopamine contrôle des fonctions motrices, émotionnelles et endocrines. Les observations comportementales et pharmacologiques laissent supposer une multiplicité des sites d'action dopaminergiques.

-A l'heure actuelle, 5 sous-types de récepteurs dopaminergiques ont été clonés.

-Leur localisation, leur pharmacologie et les effets physiologiques qu'ils engendrent sont représentés sur les tableaux 5 à 8 et sur la fig 3 p40 -

-Ils appartiennent tous les cinq à la famille des 7 domaines transmembranaires, une proposition de la topographie du récepteur D2 est représenté sur la fig 3 et celle de D3 sur la fig 4.

-D5 présente 50% homologie avec D1 et 30% avec D3.

-Aucun des 5 sous-types des récepteurs dopaminergiques ne constitue à lui seul le site d'action unique de tous les neuroleptiques.

Les **antagonistes des récepteurs D2** (sous-type de récepteur dopaminergique couplé négativement à l'adénylate-cyclase et localisé au niveau du système limbique et du cortex) sont utilisés comme **neuroleptiques** (les phénothiazines comme la chlorpromazine et les butyrophénones comme l'halopéridol).

Les effets secondaires observés sont multiples: désordres neurologiques moteurs importants dûs à leur liaison, même faible sur les récepteurs D2 au niveau des ganglions de la base. Les techniques de biologie moléculaire ont permis d'isoler le gène du récepteur D1 et celui de D2.

Les neuroleptiques atypiques ayant des effets secondaires plus discrets, la recherche d'un nouveau récepteur D3 a été entreprise afin d'élucider ces effets pharmacologiques indésirables. Sa caractérisation est en cours: sa localisation (principalement au niveau du système limbique) et sa pharmacologie (il reconnaît beaucoup moins bien l'halopéridol) sont différentes; son blocage serait responsable des effets antipsychotiques. La mise au point d'un test d'activité anti-D3 devrait permettre, dans les années à venir, de proposer à la psychiatrie des composés nouveaux dérivés d'effets secondaires et/ou à indications thérapeutiques plus adaptées.

Le profil pharmacologique de D5 est très semblable à celui de D1; à l'exception de la dopamine qui le reconnaît dix fois mieux que les autres.

En ce qui concerne le sous-type D4, la clozapine, neuroleptique particulier pratiquement jamais utilisé en première intention, a une mauvaise affinité pour les D2 et les D3 mais possède une bonne affinité pour le D4 ce qui pourrait expliquer ses effets antipsychotiques.

III- PERSPECTIVES

III-1 Quand la biologie moléculaire devance la pharmacologie

Cet exemple montre que la cible du médicament étant caractérisée en premier, elle va permettre de développer, par des études de relation structure-activité, de nouvelles molécules (c'est la pharmacologie inverse).

Il en est de même avec les récepteurs muscariniques: le clonage de différents gènes (5) codant pour différents récepteurs muscariniques (M1, M2, M3, M4, M5) a été réalisé.

Des études sont en cours pour rechercher des agonistes et des antagonistes sélectifs de chacun d'entre eux afin de pouvoir ensuite préciser leurs fonctions. On se heurte à une insuffisance d'outils pharmacologiques sélectifs pour corréler les données obtenues à partir de la biologie moléculaire et les fonctions physiologiques contrôlées par ces sous-types de récepteurs.

III-2 Certaines questions restent encore à résoudre pour comprendre les mécanismes de fonctionnement

- la localisation des divers domaines fonctionnels et leur rôle respectif dans la fonction du récepteur (les techniques de clonage sont également utilisées pour explorer le site fonctionnel d'une protéine biologiquement active, des mutagenèses dirigées de résidus d'acides aminés sont effectuées);
- l'interaction entre le récepteur et les protéines de son environnement (cytosquelette);
- les mécanismes intimes de régulation .

DU GÈNE À LA PROTÉINE

Choisir des cellules d'un tissu donné (ex. : foie ou cerveau)

↓
Isoler l'ARNm ;
produire l'ADNc

↓
Sélectionner et séquencer des clones isolés spécifiques de ce tissu

↓
Dédire la séquence de la protéine à partir de celle de l'ADN

↓
Fabriquer des peptides d'après cette séquence ; les injecter à un animal pour produire des anticorps

↓
Isoler la protéine cellulaire reconnue par cet anticorps

DE LA PROTÉINE AU GÈNE

isoler une protéine (une enzyme ou une autre protéine biologiquement active ; ex. : une hormone)

↓
Déchiffrer une partie de sa séquence

↓
Fabriquer un oligonucléotide pouvant coder pour cette séquence

↓
Utiliser cet oligonucléotide marqué pour sélectionner un clone d'ADNc

↓
Séquencer et caractériser le gène sélectionné

Figure 1 : Les techniques modernes permettent d'identifier un ARNm particulier, par exemple un ARNm spécifique du tissu nerveux, et de l'utiliser pour isoler la protéine qu'il code, sans connaître au départ la fonction de cette protéine. De même, il est possible de purifier des quantités minimales d'une protéine de fonction déterminée, par exemple une enzyme ou un facteur de croissance, et d'utiliser une partie de la séquence protéique pour isoler le gène correspondant.

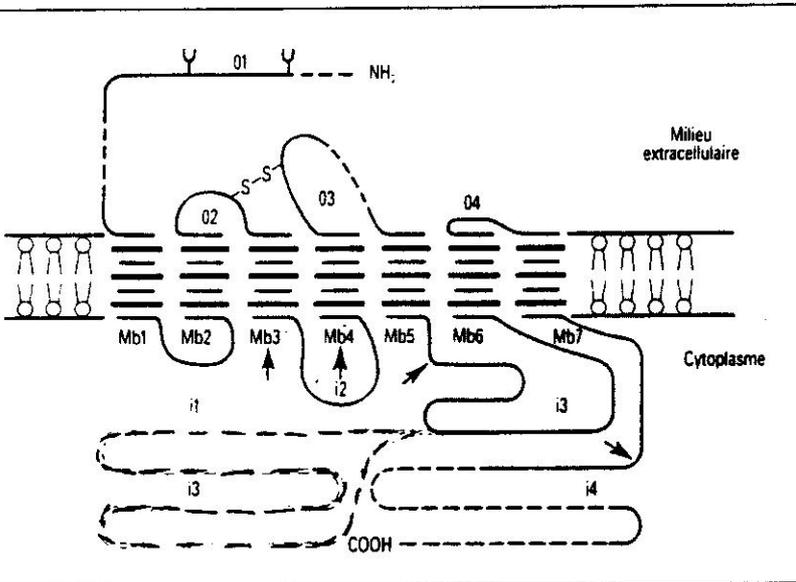
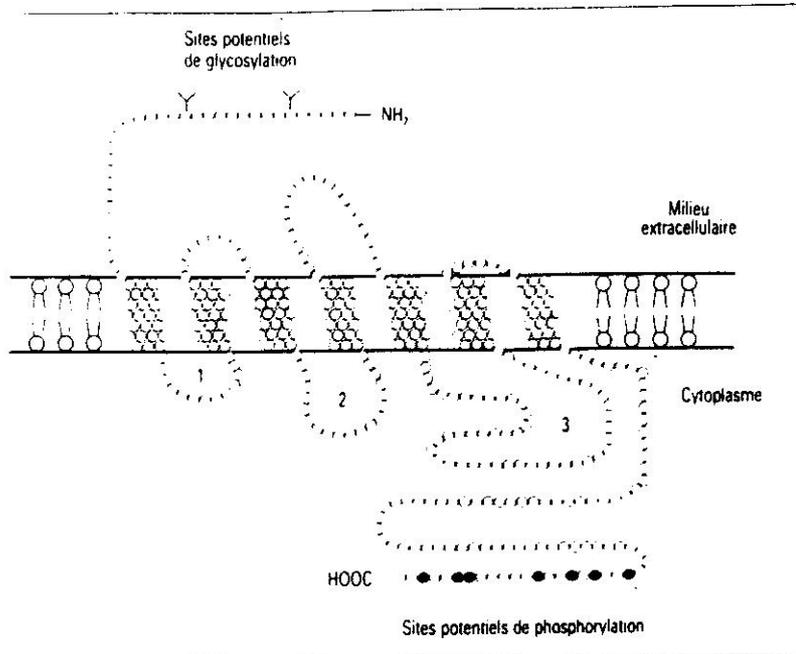


Figure 2 :

A. Proposition de topologie du récepteur β -adrénergique dans la membrane plasmique en double couche. Les domaines transmembranaires ont été choisis d'après des profils d'hydropathie et de manière à minimiser l'inclusion de résidus hydrophiles. Ce modèle a été réalisé par analogie avec l'orientation déjà connue de la bactériorhodopsine.

B. La structure des récepteurs β -adrénergiques de mammifères est montrée ici avec les insertions de séquences observées dans les récepteurs muscariniques et β -adrénergiques aviaires.

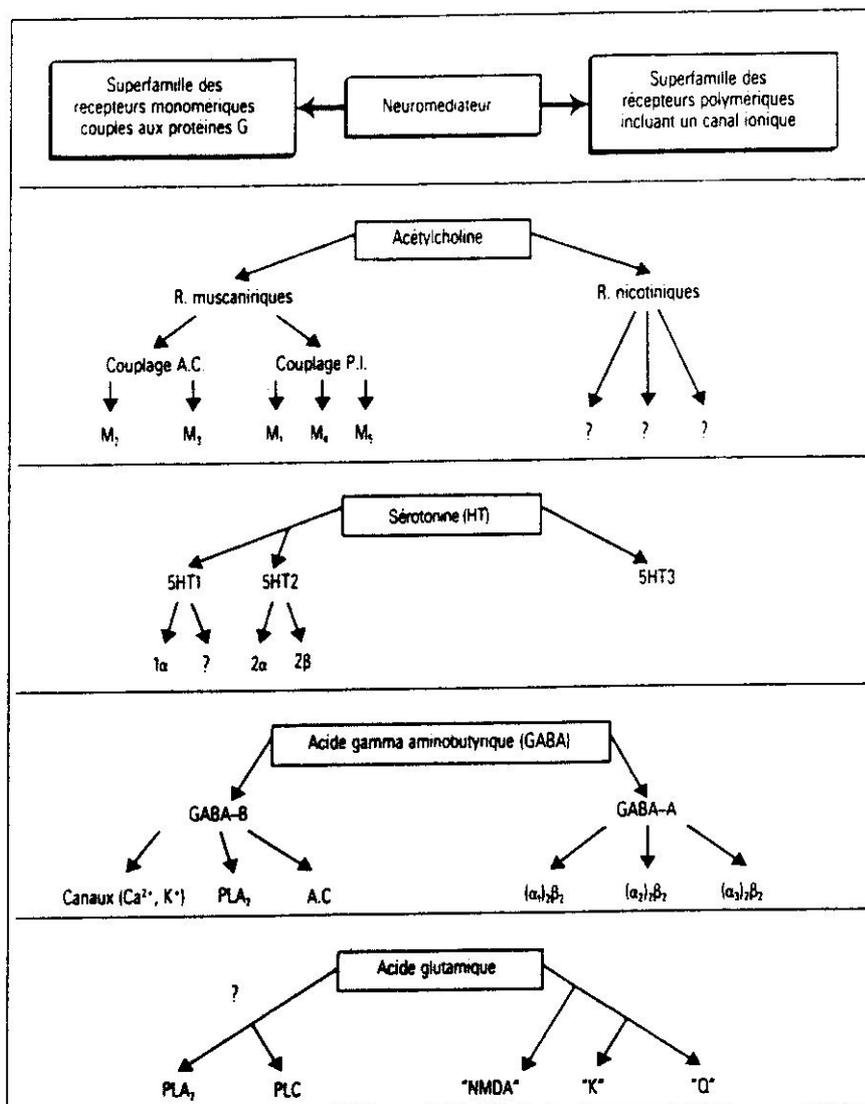


Tableau 1 : Classification de récepteurs en fonction de leur appartenance à une super-famille structurale.

Récepteurs	α_1	α_2	β_1	β_2	
Efficacité ⁽¹⁾	Adr > Nor > Iso	Adr > Nor > Iso	Iso > Nor \geq Adr	Iso > Adr > Nor	
Agonistes	methoxamine	clonidine	isoprenaline	salbutamol	
Antagonistes	prazosin	yohimbine	practolol	butoxamine	
Protéine G ²	G _p	G _i	G _s	G _s	
Effecteur	phospholipase C	adénylate-cyclase	adénylate-cyclase	adénylate-cyclase	
2 ^e messenger	Ca ²⁺ ↑	AMPc ↓	AMPc ↑	AMPc ↑	(1) Adr : Adrenaline ; Nor : Noradrénaline ; Iso : Isoprenaline
Tissus	foie	plaquettes sanguines	cœur ³	poumons	
Effet biologique	glycogénolyse ⁽²⁾	aggrégation	contraction ⁽⁴⁾	bronchodilatation	

Tableau 2 : Classification des récepteurs adrénergiques : quelques exemples d'agonistes et d'antagonistes spécifiques, de répartition tissulaire et d'effets biologiques.

Groupe de récepteurs	Protéine G	Sous-groupe de récepteurs
β	G _s	β_1 β_2 β_3
α_2	G _i	α_2 A (α_2 - C ₁₀) α_2 B α_2 C
α_1	G _s	α_1 A α_1 B

Tableau 3 : Classification des récepteurs adrénergiques (d'après Bylund, 1988, modifié).

Organes	Récepteurs prédominants	Réponses
Cœur (oreillettes, nœud sinusal ventricules, nœud auriculo- ventriculaire)	β_1	Augmentation du rythme de la contractilité et de la vitesse de conduction
Bronches	β_2	Bronchodilatation, diminution de la résistance bronchique
Veines	α_1 / β_2	Constriction / dilatation
Artères		
cutanées	α_1	Constriction
muscles squelettiques	β_2 / α_1	Dilatation / constriction
rénale	α_1 β_1	Constriction Sécrétion de rénine (<i>Macula densa</i>)
Œil		
(muscle radial de l'iris)	α_1	Mydriase (constriction)
Tissus adipeux	β_1	Lipolyse
Foie	β_2	Glycogénolyse
Terminaisons sympathiques	α_1	Inhibition de la sécrétion de noradrénaline

Tableau 4 : Principaux effets observés en réponse à la stimulation des récepteurs adrénergiques par leurs agonistes.

Classical subtype	Anatomical location	Pharmacology		Transmembrane signalling
		agonists	antagonists	
D ₁	striatum, frontal cortex, nucleus accumbens	SKF75670 > SKF77434 > SKF38393 >> 5,6-ADTN = 6,7-ADTN > dopamine	NO112 = NO756 > fluperlapine = clozapine = SCH23390 = cis-flupentixol > bulbocapnine >> sulpiride	↑ adenylyl cyclase
	amygdala, striatum, frontal cortex, nucleus accumbens	SKF75670 > SKF38393 = SKF77434 >> dopamine = 6,7-ADTN > 5,6-ADTN	SCH23390 = NO112 = NO756 = cis-flupentixol >> clozapine > fluperlapine > bulbocapnine >>> sulpiride	? ↑ polyphospho-inositide hydrolysis
Peripheral D ₁	mesenteric bed	fenoldopam > dopamine > SKF38393	SCH23390 > butaclamol = bulbocapnine > sulpiride >> haloperidol	↑ adenylyl cyclase
	splenic artery, renal cortex	dopamine >> SKF38393 = fenoldopam	SCH23390 > butaclamol > bulbocapnine > haloperidol >> sulpiride	↑ adenylyl cyclase
	renal cortex	no conclusive data	SCH23390 = sulpiride	? ↑ phospholipase C
D ₂	striatum, limbic areas, retina	no conclusive data	spiperone > haloperidol > sulpiride = clozapine	↓ adenylyl cyclase open K ⁺ channels ? ↓ phospholipase C ? ↓ Ca ²⁺ channels ? ↓ polyphospho-inositide hydrolysis
	stnatum, pituitary, retina	no conclusive data	spiperone > haloperidol >> sulpiride = clozapine	
Peripheral D ₂	heart	DP-5,6-ADTN > DP-6,7-ADTN > dopamine >> SKF38393 = fenoldopam	haloperidol > cis-flupentixol > sulpiride >> SCH23390	↓ adenylyl cyclase
	mesenteric artery	DP-5,6-ADTN > dopamine = DP-6,7-ADTN > fenoldopam >> SKF38393	haloperidol = sulpiride >> cis-flupentixol = SCH23390	no data

Tableau 5 : Propriétés de certains sous-types de récepteurs dopaminergiques.

	D ₁	D ₂	D ₃
Représentation cérébrale maximale	Néostriatum (caudé)	Néostriatum (caudé)	Paléostriatum (accumbens)
Hypophyse	Non	Oui	Non
Cellules de la substance noire	Non	Oui	Oui
Régulation par le GTP	Oui	Oui	?
Adénylate cyclase	Stimulation	Inhibition	Pas d'effet
Affinité pour la dopamine	Micromolaire	Nanomolaire (haute)	Nanomolaire (basse)
Puissance des butyrophénones	Micromolaire	Subnanomolaire	Nanomolaire
Puissance des phénothiazines	Nanomolaire	Nanomolaire	Nanomolaire
Exemple d'agoniste	SKF 38 393	Cabergoline Bromocriptine Lisuride	Pergolide Quinpirole
Exemple d'antagoniste	SCH 39 166	Benzamide Clozapine	UH 232, AJ 76

Tableau 6 : Les sous-types de récepteurs dopaminergiques.

	Récepteur D ₁	Récepteur D ₂	Récepteur D ₃
Localisation	Striatum Glande parathyroïde	Striatum Hypophyse	Système limbique
Rôles	Sécrétion de l'hormone parathyroïde	Motricité Sécrétions hypophysaires	Émotions Processus cognitifs
Neuroleptiques les mieux reconnus	Flupentixol	Neuroleptiques typiques (forts effets secondaires moteurs) Ex. : halopéridol	Neuroleptiques atypiques (moins d'effets secondaires moteurs, plus désinhibiteurs) Ex. : sulpiride
Identité moléculaire*	Protéines de 446 acides aminés	Protéines de 444 acides aminés	Protéines de 446 acides aminés 50 % d'homologie avec D ₂)
Messageur intra-cellulaire	gène sans intron AMP cyclique PKA	au moins 6 introns AMP cyclique PKA	au moins 5 introns Inconnu (distinct de l'AMP cyclique)

* Les trois récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs liés aux G-protéines et possédant 7 fragments transmembranaires.

Tableau 7 :

FICHE D'IDENTITE DES TROIS RECEPTEURS DOPAMINERGIQUES.

	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Agonistes					
Dopamine + GppNHp	2 340	230	2 000	34	450
Bromocriptine	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
Antagonistes					
Halopéridol	27	48	0,6	2,9	5,1
Chlorpromazine	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

Tableau 8 :

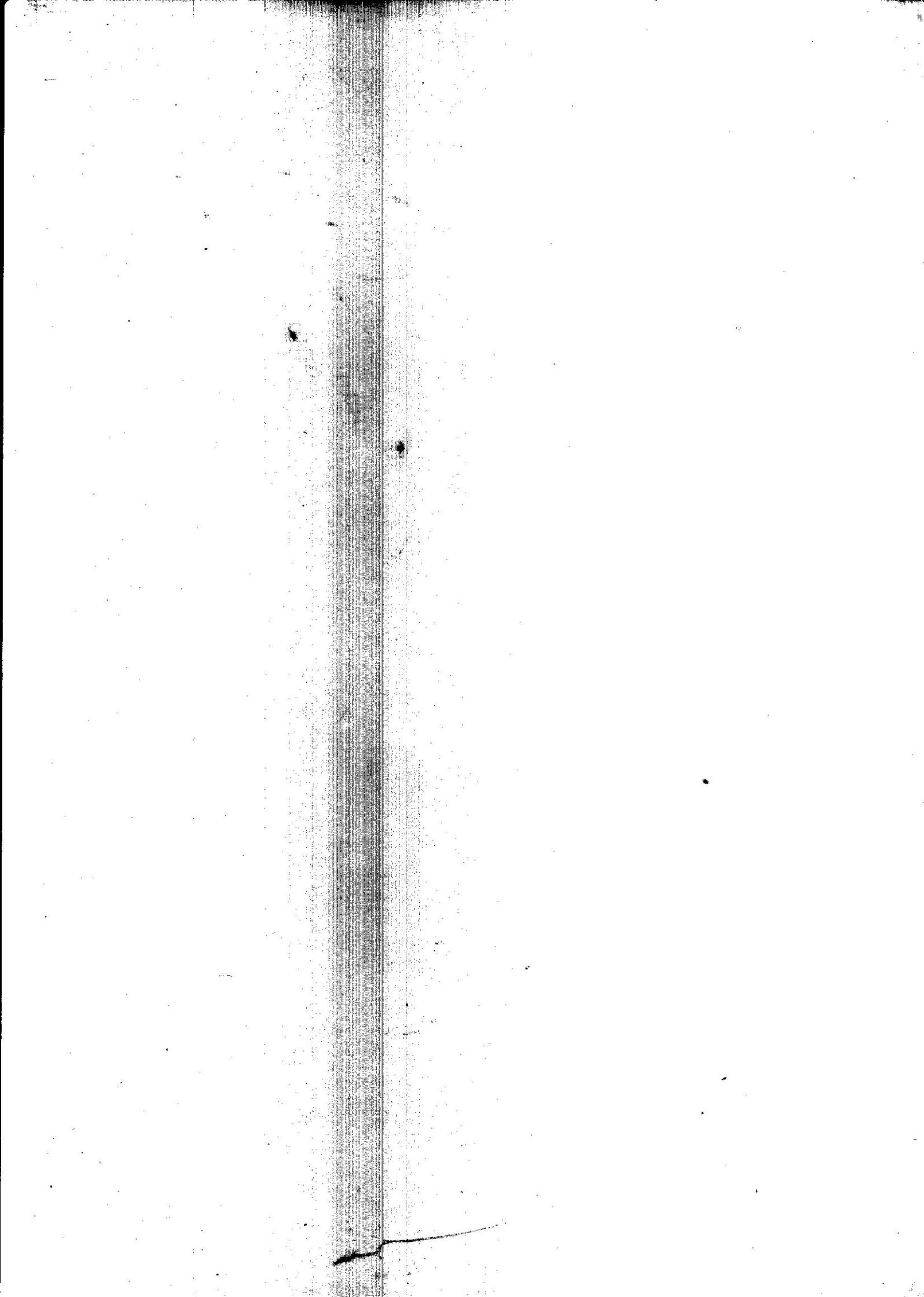
AFFINITES (nM) DES AGONISTES ET ANTAGONISTES, SUR LES RECEPTEURS DOPAMINERGIQUES HUMAINS CLONES.

	D ₁	D ₅	D ₂	D ₃	D ₄
Localisation chromosomique	5q31-34	ND	11q23-24	3q13.3	11p
Introns	0	0	6	5	4
Isoformes	ND	ND	D ₂₁ D _{2s}	D ₃ D ₃ (O2-del) D ₃ (TM3-del)	ND
Longueur (a.a.)	446	477	443	400	387
Formation d'AMPc					?

Tableau 9 :

CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES CINQ RECEPTEURS DOPAMINERGIQUES HUMAINS

II- LES CANAUX IONIQUES



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

La distribution asymétrique des ions de part et d'autre de la membrane plasmique contribue à la genèse et au maintien d'une différence de potentiel, ainsi qu'à la formation de courants ioniques. Cela permet aux ions eux-mêmes d'agir comme des messagers de la cellule.

I PROTEINES JOUANT UN ROLE DANS LE TRANSPORT PASSIF DES IONS

Ces protéines sont responsables des propriétés électriques du neurone.

Il en existe de différents types: voir tableau 1.

I-1 Les protéines transmembranaires formant un canal ionique

Elles assurent directement le transport passif des ions, elles sont appelées canaux ioniques.

Elles possèdent une structure tridimensionnelle qui limite un pore aqueux au travers duquel passent sélectivement certains ions.

Elles assurent elles-mêmes le passage des ions à travers la membrane.

Elles existent dans un état où le pore est ouvert (les ions passent à travers le pore) et dans un état où il est fermé (les ions ne peuvent pas passer).

Le passage de l'état ouvert à l'état fermé (changement de conformation) est régulé par un changement de potentiel de membrane (canaux sensibles au voltage; ex: canal Na^+), par la fixation d'un ligand (ce sont les récepteurs canaux, ex: le récepteur GABA A).

I-1-1 Les canaux ioniques sensibles à une dépolarisation

Il sont responsables des propriétés d'excitabilité du neurone. Le pore de ces canaux sensibles au voltage est essentiellement perméable à un seul type d'ions.

Ce sont par exemple:

-les canaux Na^+ sensibles au voltage dont le rôle est de générer et propager les potentiels d'action sodiques. Ils sont localisés en forte densité au niveau du segment initial de l'axone, au niveau des noeuds de Ranvier (dans le cas des axones myélinisés) ou tout le long de l'axone (dans le cas des axones non myélinisés), également au niveau des soma. On les trouve également dans le tissu myocardique.

-les canaux Ca^{++} sensibles au voltage dont le rôle est de faire entrer dans le milieu intracellulaire les ions calcium. Ils sont localisés en forte densité au niveau des éléments pré-synaptiques.

-les canaux K^+ sensibles au voltage sont très variés et de ce fait ont des rôles très différents.

Leur répartition est très diverse.

Ces canaux sont caractérisés par:

- une capacité de transfert ionique élevée,
- une sélectivité pour un ion donné,
- une cinétique de fonctionnement spécifique,
- une sensibilité à des toxines et des molécules spécifiques.

Leurs structures ont été élucidées et une grande homologie entre leur structure primaire a été démontrée. Ces canaux sont formés d'une seule sous-unité protéique qui renferme 4 domaines homologues (notés I à IV) d'environ 300 acides aminés chacun. Ces domaines sont séparés les uns des autres par des régions non homologues de longueur variable. Les domaines homologues seraient organisés en rosette autour du pore aqueux central perméable sélectivement aux ions (voir fig 1).

I-1-2 Les canaux ioniques sensibles à la liaison d'un ligand assurant la transmission synaptique rapide.

Ces récepteurs-canaux sont ouverts par la liaison d'un ligand, par exemple un neurotransmetteur. Ils provoquent une augmentation rapide de perméabilité ionique en réponse à cette liaison.

Les sites récepteurs du neurotransmetteur et le canal ionique qu'ils contrôlent font partie de la même et unique protéine.

Certains canaux sont perméables aux cations:

- le récepteur nicotinique de l'acétylcholine est perméable au sodium,
- les récepteurs au glutamate sont perméables au potassium ou au calcium.

D'autres canaux sont perméables aux chlorures:

- le récepteur du GABA A,
- le récepteur de la glycine.

Ces récepteurs canaux sont formés de plusieurs sous-unités. Les structures primaires des récepteurs nicotiniques et du récepteur du GABA A présentent une grande homologie de séquence. La paroi du canal ionique serait formée par certaines hélices alpha transmembranaires (voir fig 2). Leur étude sera reprise dans le chapitre "RECEPTEURS POLYMERIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE INCLUANT UN CANAL IONIQUE".

II PROTEINES ASSURANT LE TRANSPORT ACTIF DES IONS: POMPES ET TRANSPORTEURS

Ces protéines ont besoin d'énergie pour fonctionner.

Les pompes utilisent l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

Les transporteurs utilisent l'énergie d'un gradient ionique comme le gradient de sodium par exemple.

II-1 LES POMPES

II-1-1 La pompe Na/K/ATPase ou pompe à sodium

C'est un complexe protéique composé de 2 hétérodimères comprenant chacun une chaîne alpha et une chaîne bêta.

Elles sont localisées au niveau de la membrane plasmique des cellules cardiaques, nerveuses, musculaires, pancréatiques et des hépatocytes.

Elle rétablit l'inégalité de répartition des ions sodium et potassium de part et d'autre de la membrane. Les ions sodium et potassium passent à travers la membrane au niveau des différents canaux qui leur sont perméables (canaux sensibles au voltage et récepteurs canaux). La pompe fonctionne continuellement à un rythme plus ou moins rapide, s'adaptant à l'activité électrique du neurone. Elle transporte activement 3 ions Na^+ vers le milieu extérieur contre 2 ions K^+ vers le milieu intracellulaire (voir fig 3). L'inégalité de répartition des ions constitue une réserve d'énergie pour toute cellule. Le neurone convertit cette énergie en signaux électriques et l'utilise pour accomplir le transport actif d'autres molécules.

Différents facteurs ont un rôle dans l'activité de la pompe

-Les concentrations ioniques: toute augmentation de sodium intracellulaire et toute augmentation de potassium extracellulaire augmentent son activité; une diminution des concentrations intracellulaires en ATP diminue son activité.

-Les lipides membranaires

-Des protéines spécifiques : par exemple la calmoduline inhibe la pompe.

-Des hormones (ex: thyroïdiennes et la corticostérone) et des facteurs de croissance (EGF, insuline) peuvent stimuler l'expression de son gène ou augmenter son activité par phosphorylation.

-Les digitaliques (hétérosides cardiotoniques) ont une activité inotrope positive en inhibant la pompe. Ils sont utilisés en thérapeutique contre l'insuffisance cardiaque. Ils inhibent la pompe Na/K induisant un accroissement de Na intracellulaire, défavorable à l'échange Na/Ca (sortie de Ca et

entrée de Na) ce qui provoque une augmentation intracellulaire de Ca. (rôle de digitaliques endogènes dans l'hypertension essentielle ?).

-Le vanadate et l'oligomycine inhibent la pompe..

-L'ouabaine est un bloquant spécifique de cette pompe. C'est un glycoside cardiaque qui agit directement sur le transporteur des ions Na^+ (c'est un hétéroside cardiotonique).

-Des facteurs "ouabaine-like" (ou digitaliques endogènes) sont en concentrations importantes dans l'urine de sujets hypertendus; ces facteurs inhibent la pompe.

II-1-2 La pompe Ca/ATPase

La pompe Ca/ATPase est une lipoprotéine formée d'une seule sous-unité. Elle présente une grande homologie de séquence avec la pompe Na/K/ATPase, la plupart des régions homologues étant situées dans le domaine cytoplasmique impliqué dans la reconnaissance et l'hydrolyse de l'ATP.

Elle est localisée dans le réticulum sarcoplasmique des muscles striés, lisses et cardiaques.

La pompe également localisée dans la membrane plasmique participe au maintien de la concentration intracellulaire en ions calcium à une valeur très faible. Celle-ci est dix mille fois plus faible que la concentration extracellulaire malgré l'entrée des ions à travers les canaux sensibles au voltage et les récepteurs canaux; et malgré la libération intracellulaire par le réticulum endoplasmique lisse (où est localisée une pompe aux caractéristiques légèrement différentes). Le maintien de cette inégalité de répartition est dû en partie au fonctionnement de cette pompe qui expulse les ions calcium par transport actif. Le maintien de la concentration intracellulaire en ion calcium a une grande importance car elle contrôle de nombreuses réactions intracellulaires.

L'extrémité COOH-terminale comporte un site de liaison pour la calmoduline qui représente un domaine autoinhibiteur de l'enzyme.

II-1-3 La pompe $\text{H}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ de la cellule gastrique

C'est un monomère formé d'une seule sous-unité.

Dans l'estomac, la production d'acide chlorhydrique a lieu au niveau des cellules bordantes pariétales. Cette pompe, localisée dans la membrane tubulo-vésiculaire de ces cellules, échange les ions K^+ de la lumière gastrique contre des protons, elle est donc à l'origine de l'acidification stomacale.

L'oméprazole (MOPRAL) inhibe spécifiquement cette pompe, il en résulte une diminution de la sécrétion d'acide gastrique créant une situation favorable à la guérison des lésions ulcéreuses.

II-2 LES TRANSPORTEURS

Ce sont des protéines qui assurent le transport actif d'ions ou de molécules en utilisant l'énergie fournie par le transport passif des ions Na^+ ou K^+ .

Les transporteurs effectuent un symport lorsque les ions sodium ou potassium et l'ion ou la molécule transportés vont dans le même sens. Lorsqu'ils vont en sens contraire, on parle d'antiport.

Les transporteurs impliqués dans l'activité électrique ou sécrétrice du neurone sont: les co-transporteurs Na/neurotransmetteur et l'échangeur Na/Ca.

II-2-1 Les co-transporteurs Na/neurotransmetteur

Ils ont pour rôle de transporter les molécules de neurotransmetteur présentes dans la fente synaptique vers le cytoplasme de l'élément pré-synaptique ou celui des cellules gliales: c'est la recapture du neurotransmetteur. Certains précurseurs de synthèse sont aussi captés suivant ce processus (ex: la choline).

II-2-2 L'échangeur Na/Ca

Ils transportent activement les ions calcium vers le milieu extra-cellulaire. Ce transporteur est localisé dans la membrane plasmique neuronale et dans celle du myocyte cardiaque. Elle agit en synergie avec la pompe Ca/ATPase et les mécanismes de transport localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique lisse pour maintenir très bas la concentration intracellulaire d'ions Ca^{++} .

Son activité est régulée par phosphorylation et déphosphorylation.

Il n'existe pas d'inhibiteurs spécifiques pharmacologiques.

II-2-3 L'échangeur Na/H

voir page 23 du poly.

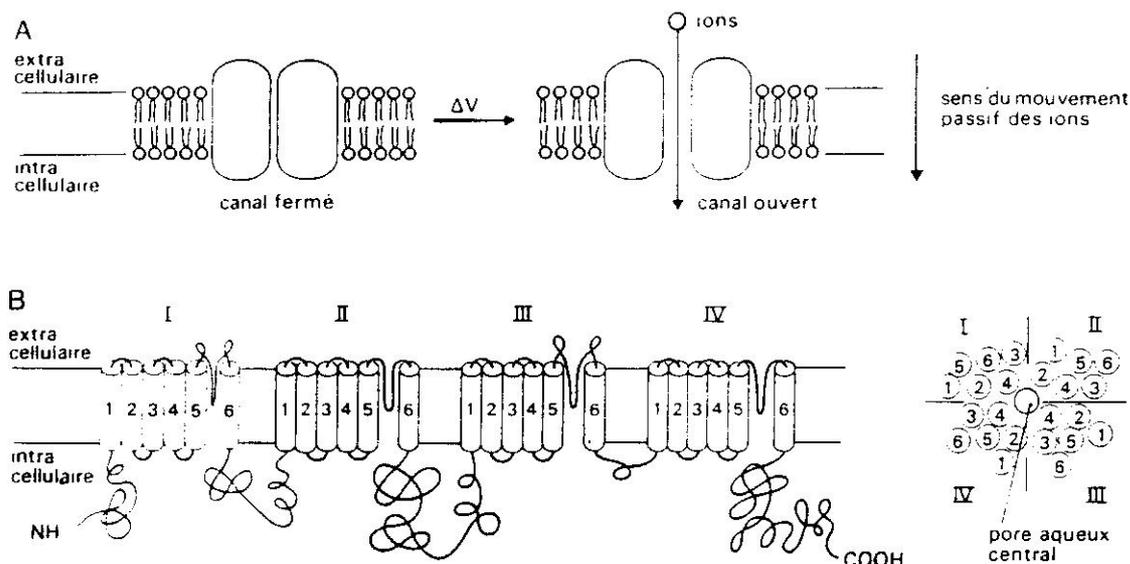


Figure 1 : Les canaux ouverts par des changements de potentiel transmembranaire ou canaux sensibles au voltage.

A. Ces canaux s'ouvrent pour des changements de potentiel transmembranaire (ΔV).

B. Modèles de l'organisation transmembranaire de canal Na⁺ ouvert par la dépolarisation. Ce modèle a été établi à partir du profil d'hydropathie de la protéine. Le canal est formé d'une seule sous-unité. *A gauche*, cette sous-unité est représentée linéairement dans la bicouche lipidique ; *à droite*, elle est représentée en vue supérieure telle qu'elle serait dans la membrane. On distingue 4 domaines homologues (notés I à IV), chacun de ces domaines renfermant 6 α -hélices transmembranaires (notées 1 à 6). Le modèle prévoit que les quatre domaines seraient arrangés symétriquement autour du pore aqueux central.

D'après Salkoff L., Butter A., Wei A., et al. Molecular biology of the voltage-gated sodium channel. TINS 1987 ; 10 : 522-7.

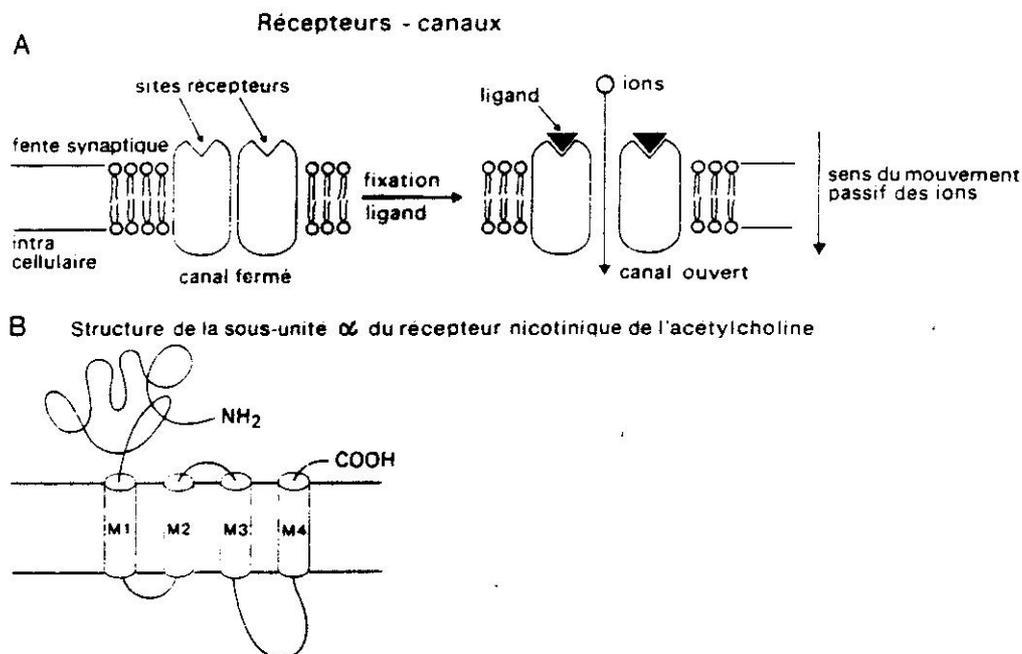


Figure 2 : Les récepteurs-canaux.

A. Les canaux ligand-dépendants s'ouvrent lorsqu'un ligand est fixé sur le ou les sites récepteurs présents dans le domaine extracellulaire de la protéine. Le ligand est, par exemple, un neurotransmetteur.

B. Modèle de l'organisation transmembranaire des récepteurs-canaux : exemple du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR). Ce récepteur est formé de deux sous-unités α , une sous-unité β , une sous-unité γ et une sous-unité δ qui représentent entre elles des homologues de séquence et une organisation transmembranaire similaire. La sous-unité α est ici représentée linéairement dans la membrane. Ce modèle a été établi à partir des profils d'hydropathie des sous-unité de la protéine. Les deux sites récepteurs de l'acétylcholine sont situés dans le domaine extracellulaire de chaque sous-unité α . Les cinq sous-unités sont assemblées en un pentamère $\alpha_2\beta\gamma\delta$ qui forme une rosette et délimite le pore aqueux.

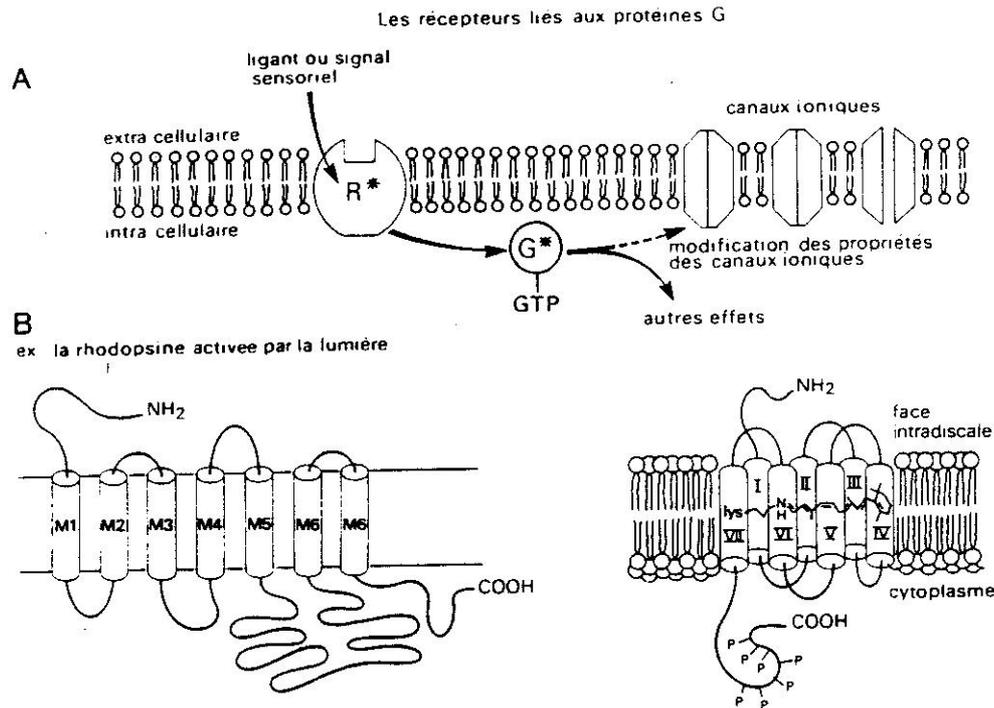


Figure 3 : Récepteurs liés aux protéines G (récepteurs des neurotransmetteurs et récepteurs des stimuli sensoriels).

A. Lorsqu'un ligand ou un signal sensoriel active le récepteur (R^*), celui-ci active à son tour plusieurs protéines G (G^*) qui vont modifier directement ou indirectement (\dashrightarrow) les propriétés de canaux ioniques.

B. Modèle de l'organisation transmembranaire de ces récepteurs : exemple de la rhodopsine.

D'après les études effectuées sur la rhodopsine, le site récepteur du ligand serait situé dans la partie centrale de la protéine.

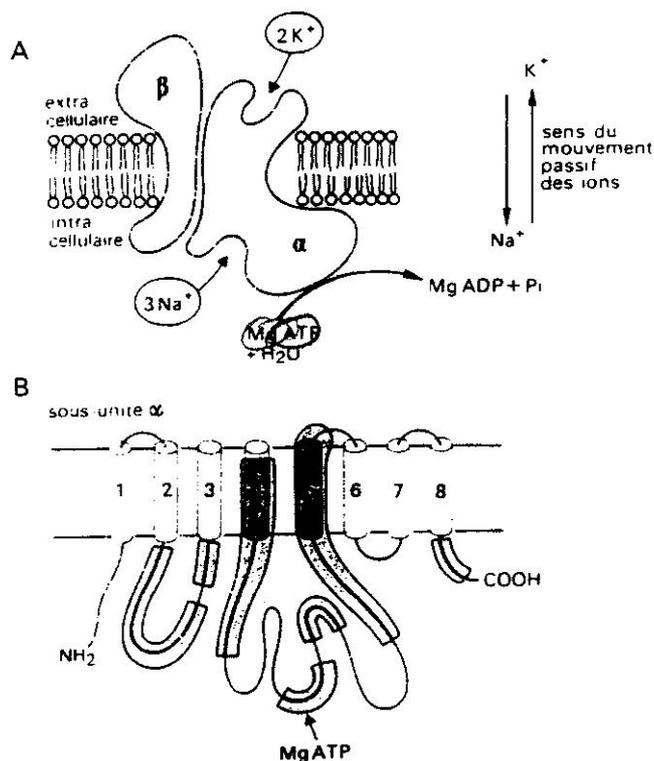


Figure 4 : La pompe Na/K/ATPase.

A. Cette pompe, formée de deux sous-unités assemblées en un hétérodimère $\alpha\beta$, transporte les ions Na^+ et K^+ dans le sens inverse de leur gradient électrochimique grâce à l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP.

B. Modèle de l'organisation transmembranaire de la sous-unité α : elle représente un large domaine cytoplasmique (dans lequel est situé le site d'hydrolyse de l'ATP) et plusieurs α -hélices transmembranaires. La position des sites de liaison des ions Na^+ et K^+ est encore hypothétique. La sous-unité α de la pompe Ca/ATPase présente une organisation similaire et les zones encadrées représentent les régions homologues entre les sous-unités α de ces deux pompes.

<i>Type de protéine</i>	<i>Signal d'activation ou de modulation des canaux</i>	<i>Canal activé ou récepteur activé</i>	<i>Ions transportés</i>
Canaux sensibles au voltage	Dépolarisation de la membrane	Canal Na ⁺ Canal K ⁺ Canal Ca ²⁺	Na ⁺ K ⁺ Ca ²⁺
Récepteurs-canaux	Neurotransmetteur	Canal nAChR Canal Glu Canal GABA _A Canal Gly	Cations Cations Cl ⁻ Cl ⁻
Récepteurs liés aux protéines G	Neurotransmetteur	mAChR Glu (IP ₃) GABA _B α et βAd	
Récepteur liés aux protéines G	Stimulus sensoriel	Rhodopsine	Cations

Tableau 1 : Protéines contrôlant le transport passif des ions (quelques exemples).

PHARMACOLOGIE DES CANAUX VOLTAGE DEPENDANTS

Une classification des canaux ioniques suivant leur pharmacologie est présentée tableau 1.

I PHARMACOLOGIE DU CANAL Na⁺

De nombreuses toxines (guanidiniques, liposolubles et polypeptidiques) et d'autres drogues (pronase et anesthésiques locaux) ont des effets très complexes sur la perméation des ions sodium. Les différentes toxines agissant sur ces canaux Na sont résumées sur le tableau 1.

La tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine sont des toxines guanidiniques qui se comportent comme des cations. La TTX bloque, à des concentrations de l'ordre de la nanomole, l'ouverture des canaux Na (à faible dose, l'intensité du courant Na enregistré au niveau d'une cellule entière est diminuée). La toxine ne traverse pas la membrane et agit sur la face extra-cellulaire. Elle se lie avec une haute affinité à un seul type de site récepteur de façon irréversible ou très lentement réversible. Des expériences de liaison ont été réalisées sur des cellules musculaires cardiaques (voir fig 1). Le K_D obtenu est de l'ordre de 1 nmole/L.

Les toxines liposolubles (ex: aconitine, vératridine) sont des alcaloïdes de différentes espèces d'Aconitum ou Veratrum. Ce sont des toxines qui ont de nombreux effets complexes. Par exemple, elles ralentissent l'inactivation des canaux (l'ouverture dure au moins 1000 fois plus que normalement).

Le canal sodique représente une cible pour des médicaments: anesthésiques locaux (ils bloquent la conductance nerveuse), antiarythmiques (ex: la quinidine; ils diminuent le courant sodique).

II PHARMACOLOGIE DU CANAL K⁺

Il existerait 4 types différents possédant des caractéristiques cinétiques, une pharmacologie et des fonctions différentes: voir tableau 2.

Le type IV, sensible à l'ATP, est localisé sur les cellules béta du pancréas, les neurones et les cellules cardiaques.

Il n'existe pas de toxine qui bloque de façon spécifique ces canaux. Le tétraéthylammonium (TEA) appliqué intracellulairement, bloque les canaux K quand ils sont ouverts.

Ils seraient tous activés par le cromakalin, le pinacidil et le nicorandil. Ces molécules hyperpolarisent la membrane du muscle lisse vasculaire, ce qui empêche l'activation des canaux Ca et produit une myorelaxation. Des applications thérapeutiques sont en cours d'étude.

Ils seraient tous activés par le cromakalin, le pinacidil et le nicorandil. Ces molécules hyperpolarisent la membrane du muscle lisse vasculaire, ce qui empêche l'activation des canaux Ca et produit une myorelaxation. Des applications thérapeutiques sont en cours d'étude.

Ils seraient inhibés par certains antiarythmiques (brétylium, amiodarone); et des sulfamides hypoglycémiants (les sulfonylurées, ex: le chlorpropamide).

III PHARMACOLOGIE DU CANAL Ca^{++}

Il existe différents types de canaux calciques voltage dépendants possédant des caractéristiques électrophysiologiques et pharmacologiques différentes et localisés différemment (voir tableau 3). Les canaux de types L et T sont localisés dans les membranes des myocytes squelettiques, cardiaques, celles du muscle lisse et celles des neurones. Les canaux N sont uniquement neuronaux.

La pharmacologie des canaux de type L a particulièrement été développée, il existe différentes familles de composés bloquant ces canaux et présentant un intérêt thérapeutique certain. Ils sont inhibés par les dihydropyridines (ex: la nifédipine), les arylalkylamines (ex: le vérapamil), les benzothiazépines (ex: le diltiazem) et les pipérazines (ex: la cinnarizine). Ils sont principalement et largement utilisés dans la thérapeutique cardiovasculaire (voir tableau 4).

Le canal sensible aux dihydropyridines a particulièrement bien été caractérisé au point de vue pharmacologique et biochimique. Il a été isolé à partir du muscle squelettique et du muscle cardiaque, et cloné.

Il présente une pharmacologie similaire à celle d'un récepteur. Le site de liaison possède une discrimination stéréochimique remarquable puisqu'un énantiomère est un antagoniste tandis que l'autre est un activateur. Bien plus que les canaux Na et K, ils sont sujets à des régulations et modulations par divers facteurs physiologiques et pharmacologiques. Ils peuvent subir une désensibilisation ou une hypersensibilisation après un traitement prolongé.

Ces canaux sont impliqués dans de nombreuses fonctions. Ils jouent un rôle dans l'excitabilité et le couplage excitation/contraction; l'entrée des ions Ca^{++} entraîne une augmentation de ces ions dans le cytoplasme de la cellule ce qui est à l'origine de signaux électriques et chimiques: inactivation des canaux eux-mêmes, libération des neuromédiateurs et des hormones, activation d'enzymes, expression génétique, croissance et prolifération cellulaire.

Pour ces raisons, les propriétés de ces canaux et leur pharmacologie sont actuellement très étudiées.

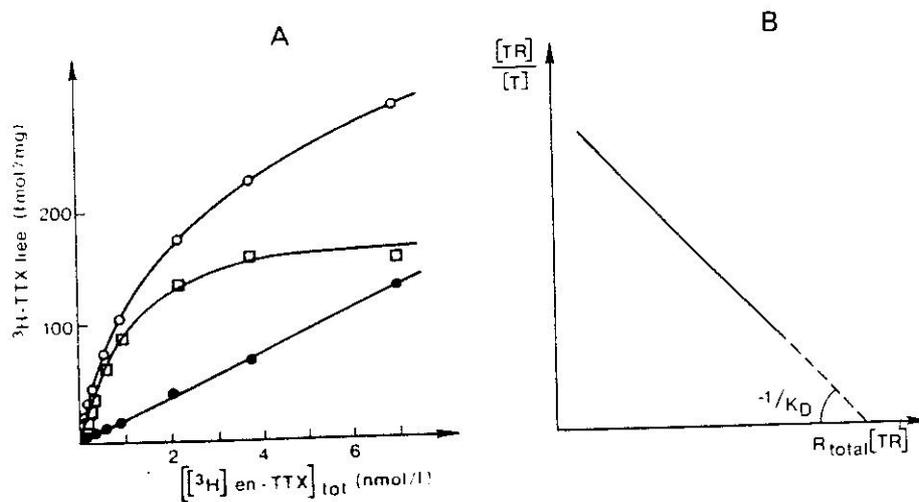


Figure 1 : Expériences de liaison réalisées avec de la tétrodotoxine tritiée sur des cellules musculaires cardiaques de rat in vitro.

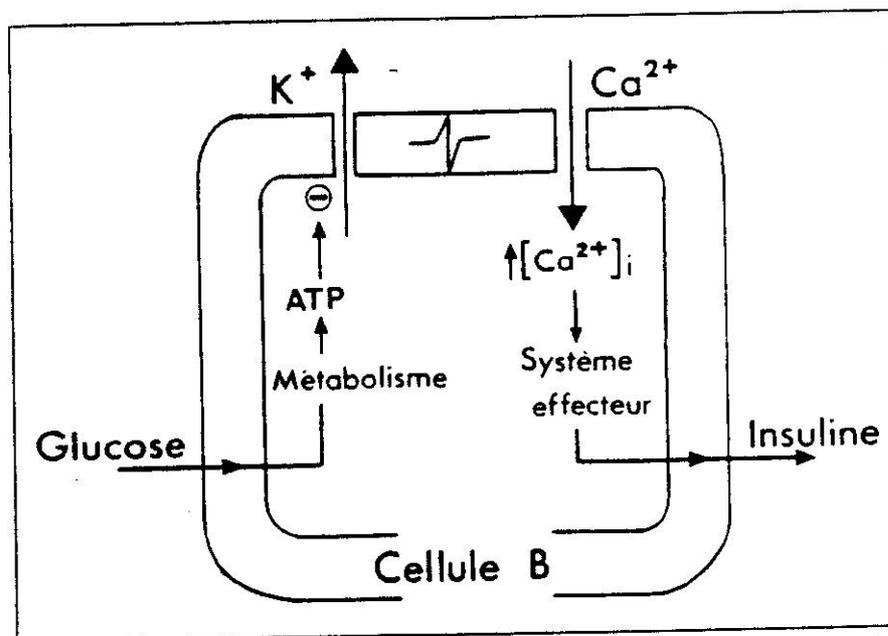


Figure 2 : Illustration schématique du mécanisme de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et impliquant les canaux potassiques.

Channel type	Pharmacologic agent
Na ⁺	Tetrodotoxin; saxitoxin and other toxins; local anesthetics
Ca ²⁺	Phenylalkylamines (verapamil); benzothiazepines (diltiazem); 1,4-dihydropyridines (nifedipine); ω -conotoxin, divalent cations
K ⁺	Quaternary ammonium ions; aminopyridines, quinine, toxins (apamin, dendrotoxin, charybdotoxin); sulfonylureas

Tableau 1 : Classification pharmacologique des canaux ioniques.

Channel type	Characteristics	Pharmacology	Function
I. Voltage-dependent: Delayed rectifier (outward)	Rapidly activated by depolarization; slowly inactivating	Blocked by TEA, Cs ⁺ , Ba ²⁺ , quinine tetracaine, amino pyridines (weak)	Repolarization and action potential duration
Transient outward	Fast, transient activated by depolarization from a hyperpolarizing step	Aminopyridines (potent); TEA (weak)	Regulation of firing rate
II. Ca ²⁺ -activated: regulation of Ca ²⁺	Several different conductances. Main types small and large	Blocked by apamin (small); TEA and charybdotoxin (large)	Entry: after hyperpolarization; regulation of firing rate
III. Receptor-regulated: M current	Activated by AcCh above -60 mV	TEA (weak)	Facilitate APs; initiate EPSPs
IV. ATP regulated	ATP reduces channel opening	Tolbutamide and sulfonylureas; diazoxide (activates)	Control membrane potential; insulin release

Tableau 2 : Classification actuelle des canaux potassiques.

Use	Antagonist		
	Verapamil (I)†	Nifedipine (II)	Diltiazem (III)
Angina			
exertional	+ + + ‡	+ + +	+ + +
Prinzmetal's	+ + +	+ + +	+ + +
variant	+ + +	+ +	+ + +
Paroxysmal			
supraventricular			
tachyarrhythmias	+ + +	-	+
Atrial			
fibrillation and			
flutter	+ +	-	+
Hypertension	+ +	+ + +	+
Hypertrophic			
cardiomyopathy	+	-	-
Raynaud's			
phenomenon	+ +	+ +	+ +
Cardioplegia	+	+	+
Cerebral			
vasospasm	-	+	-
(post hemorrhage)			

Tableau 3 : Propriétés des canaux calciques.

	Channel class		
	L	T	N
Activation range, mV	- 10 mV	- 70 mV	- 30 mV
Inactivation range, mV	- 60 to - 10 mV	- 100 to - 60 mV	- 120 to - 30 mV
Inactivation rate	Very slow	Rapid	Moderate
Conductance	25 pS	8 pS	13 pS
Kinetics	Little	Brief burst,	Long burst
Permeation	activation	inactivation	
	Ba ²⁺ > Ca ²⁺	Ba ²⁺ = Ca ²⁺	Ba ²⁺ > Ca ²⁺
Cd ⁺⁺ sensitivity	Sensitive	Insensitive	Sensitive
1,4-DHP sensitivity	Sensitive	Insensitive	Sensitive
ω-Conotoxin	Sensitive?	Insensitive	Sensitive
sensitivity	(neurons)		
	Insensitive		
	(muscle)		

Tableau 4 : Utilisation thérapeutique des antagonistes des canaux calciques.

III LES FAMILLES DE RECEPTEURS DES MEDIATEURS ET LEURS EFFECTEURS

LES RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A 7 HELICES TRANSMEMBRANAIRES COUPLES A UNE PROTEINE G

Dans cette famille de récepteurs, ce sont des molécules distinctes qui portent la fonction de reconnaissance et la fonction de transduction. De plus, il intervient une troisième protéine dont la fonction est de réaliser le couplage entre le récepteur et l'effecteur: ce sont les protéines G, appelées ainsi car elles portent toutes un site de reconnaissance pour le guanosine triphosphate (GTP).

Plus de 60 récepteurs appartenant à cette famille ont été actuellement clonés et séquencés.

I ORGANISATION GENERALE ET FONCTIONNEMENT DES RECEPTEURS COUPLES A DES PROTEINES G

I-1 Diversité des récepteurs

Il existe une très grande diversité des sites de liaison couplés à une même protéine G donc des agonistes capables d'activer ces récepteurs:

-neuromédiateurs: acétylcholine, amines biogènes, nucléotides puriques, neuropeptides (tableau 1);

-dérivés lipidiques;

-kinines;

-hormones (sauf les hormones stéroïdes).

I-2 Récepteur-protéine G-effecteur

-Exemple de triades récepteurs/protéineG/effeteur: voir tableau 1

-Schéma représentant la triade et quelques exemples de médiateurs utilisant ce système: voir fig .1

I-2-1 Récepteur

-Le segment N terminal porte des sites de glycosylation.

-7 hélices alpha transmembranaires avec:

-1 ou des sites de reconnaissance pour les agonistes

-1 zone de liaison avec les éléments de couplage

-des sites de régulation

- Sites de phosphorylation au niveau de la partie C terminale
- Homologies structurales remarquables des récepteurs étudiés (même type d'architecture moléculaire pour interagir avec diverses protéines G intracellulaires).

I-2-2 Protéine G = Élément de couplage entre récepteur et effecteur

- Localisée sur la face cytosolique de la membrane
 - Constituée de 3 sous-unités: 1 alpha, 1 bêta, 1 gamma
 - bêta et gamma: peu spécifiques; fonction d'ancrage dans la mbne
 - alpha: caractérise les différentes protéines G en terme de spécificité de relation avec une famille de récepteurs et un effecteur
- Cependant, il existe 80% d'homologie entre elles (codées par le même gène).
- Au repos, une molécule de guanosine diphosphate (GDP) est fixée à la sous-unité alpha. Quand le récepteur est activé par un agoniste, il y a transfert d'énergie et possibilité d'échange rapide du GDP avec du GTP.
 - Sert de relai entre le récepteur et l'effecteur, système de signalisation intracellulaire.

I-2-3 Effecteur

Il peut-être:

- un canal ionique (calcium ou potassium);
- une sous-unité catalytique de phosphodiesterase transformant du GMPc en 5'GMP;
- une sous-unité catalytique d'une enzyme qui assure la formation du second messenger:
 - l'adénylate cyclase fournit l'AMPC
 - la phospholipase C fournit l'inositol triphosphate 1,4,5 (IP3), ou le diacylglycérol (DAG);
 - la phospholipase A2 qui libère l'acide arachidonique dont les métabolites peuvent intervenir comme seconds messagers.

Tous ces seconds messagers sont à l'origine de l'activation de protéines kinases qui agiront en phosphorylant divers substrats.

Le fonctionnement de l'ensemble fait aussi intervenir des sites intracellulaires de phosphorylation à fonction régulatrice et des mécanismes d'arrêt.

I-3 Activation du récepteur et amplification du message (fig 2)

Au niveau de la réponse, ce système de couplage R/Prot.G/Ef permet:

- une amplification du message en cascades;

- une diversification de la réponse;
- une extension de la réponse dans la cellule;
- un découplage temporel entraînant un allongement de la période de réponse.

II STRUCTURE DES RECEPTEURS

II-1 Structure générale- Stratégie d'étude

- Méthodes de séparation, purification, séquençage
- Structure primaire (analogie ?)
- Association à la protéine G
- Comparaison avec les structures connues
- Analyse des gènes

II-2 Disposition transmembranaire des récepteurs

Cette description est limitée aux éléments communs et à l'organisation générale de ces récepteurs:

- récepteurs: glycoprotéines transmembranaires de 400 à 500 Aa;
- extrémité Ct: côté cytoplasmique;
- extrémité Nt: côté extracellulaire;

-7 séquences de 20 à 28 acides aminés singularisées par une homologie de composition et un caractère hydrophobe permettant l'insertion transmembranaire (= les 7 hélices alpha).

II-3 Site de liaison du médiateur

-La localisation serait intramembranaire.

ex: localisation du site de liaison des agonistes adrénergiques serait au niveau de la 7e hélice alpha transmembranaire

-La comparaison des homologies de séquence en acides aminés au niveau des segments transmembranaires apporte une information sur le caractère sélectif de la poche d'insertion de l'agoniste

ex: les homologies sont plus grandes entre les récepteurs adrénergiques alpha 1, bêta 1 et bêta 2 qu'entre alpha 1 et muscariniques M1 et M2

-Les résidus cystéyls sont impliqués dans la stabilisation de la structure des segments et dans le processus d'activation des sites.

II-4 Sites d'interaction avec les protéines G

-Les séquences intervenant dans la fixation de parties non spécifiques de protéines G sont localisées dans les 2 premières boucles cytoplasmiques.

-La 3e boucle cytoplasmique et des 2 hélices alpha adjacentes sont importantes dans l'association du récepteur aux protéines

ex: R Ad bêta: associé à Gs: la 3e boucle est courte et la chaîne terminale est longue

R alpha 2: associé à Gi: la disposition est inverse

III STRUCTURE DES PROTEINES G

III-1 Définition de la protéine G

- Famille de protéine qui lie le GTP
- Constituée de 3 sous-unité
- Interagit directement avec le récepteu
- Tansmet les signaux extra-cellulaires

III-2 Différentes protéines G

-Exemples de récepteurs couplés à différentes protéines G et à des effecteurs différents: fig 3

Gt ou transducine: assure l'activation de la GMPC phosphodiesterase après stimulation de la rhodopsine, conséquence de l'absorption d'un photon par le rétinal

Gs (s=stimulante): active l'adénylate-cyclase

Gi (i=inhibitrice): inhibe l'adénylate cyclase

Gp (p=phospholipase): active la phospholipase

Go (o=others): purifiée à partir de cerveaux, ses récepteurs et effecteurs ne sont pas identifiés

Gk: assure le couplage de récepteurs membranaires avec un canal potassique au niveau du coeur (noeud sinusal)

Remarques: d'autres systèmes biologiques utilisent une médiation par protéines sensibles au GTP (ex: polymérisation de la tubuline); ces protéines sont différentes de celles associées aux récepteurs de la membrane plasmique.

III-3 Les sous-unités des protéines G

-Définition: voir tableau 2

-Les structures sont identifiées par clonage et détermination des séquences en acides aminés

- Comparaison des homologues
- Chaque sous-unité pourrait exister sous plusieurs formes moléculaires distinctes: 4 formes de alpha semblent provenir de l'épissage différentiel d'un même ARNm précurseur.
- 3 formes alpha i; 2 formes bêta; 3 formes gamma

IV RELATION RECEPTEUR/PROTEINE G

IV-1 Spécificité de l'association R/Protéine G

Diverses possibilités de couplage assurant la production de réponses différentes à la mise en jeu d'un agoniste donné: voir fig 4

IV-2 Conséquences pour la protéine G de la stimulation du récepteur par un agoniste

- La liaison d'un agoniste sur son site entraîne une série de modifications de la protéine G qui lui est associée:

- remplacement du GDP par le GTP
- dissociation de alpha activée de bêta/gamma
- activation d'une GTPase (intrinsèque à la sous-unité alpha). Le retour du GDP correspond au mécanisme d'arrêt du signal.
- dissociation du complexe R/G entraînant une diminution de l'affinité du R pour son agoniste: mécanisme d'arrêt et relargage de l'agoniste
- Succession des étapes : voir fig 5

IV-3 Perturbation de ces mécanismes:

- Au niveau des protéines G, par:

- le fluorure d'aluminium AlF_4^-
structures comparables à PO_4^{3-}
formation du complexe GDP/ALF₄ à la place du GTP, résistant à l'action de la GTPase

- GTP gamma S, GppNHp
analogues non hydrolysables du GTP

- Au niveau des Gt et Gs, par:

- la toxine cholérique inhibe l'activité GTPasique de la sous-unité alpha s ce qui empêche le retour à l'état basal; la cellule continue alors à produire de l'AMPc car l'ADc est activée en continu (fig 6); (agit sur Gs et Gt) (voir protéine G et pathologie -chapitre XV)

-la toxine pertussique empêche la fixation du GTP et supprime donc les inhibitions de l'ADc (agit sur Gi/Go/Gt) (fig 6) (voir protéine G et pathologie- chapitre XV)

V RELATIONS PROTEINE G/EFFECTEUR

Elles sont établies pour:

Gt-phosphodiesterase du GMPc

Gs-adénylate cyclase

V-1 Gt

-L'activation d'une molécule de rhodopsine (protéine associée au rétinol et constituant le complexe photosensible des cellules visuelles), résultant de l'absorption d'un photon par le rétinol, stimule l'échange GDP/GTP au niveau de la sous-unité alpha de Gt. Cette activation porte sur 500 protéines Gt qui s'associent successivement à 1 même molécule de rhodopsine (premier niveau d'amplification)
 -Alpha activée de la rhodopsine libère la phosphodiesterase de l'emprise d'une inhibition tonique, entraînant une augmentation de la vitesse de renouvellement du GMPc (les molécules activées passent de 45 à 800-3700 par sec.)

V-2 Gs

-Alpha activée, avec le GTP, stimule l'adénylate cyclase ce qui entraîne la formation de plusieurs molécules d'AMPc.
 -La transformation du GTP en GDP provoque la dissociation de alpha s-GTP/sous-unité catalytique de l'enzyme avec retour à son activité de base.
 -Cette hydrolyse s'effectue suffisamment lentement pour permettre la formation de plusieurs centaines de molécules d'AMPc.

V-3 Gi

-Des incertitudes subsistent quant à son mécanisme d'action.
 -Son effecteur est l'adénylate cyclase.

V-4 Rôle du dimère bêta/gamma dans la stimulation des effecteurs

-Manque de sélectivité d'un contrôle par ce dimère

-Interviendrait de manière non spécifique comme modérateur de l'activité des divers effecteurs sous contrôle de protéines G en s'opposant aux conséquences de l'activation spontanée de sous-unités alpha en présence d'un taux cytoplasmique suffisant de GTP.

VI LES PROTEINES G: CIBLES PHARMACOLOGIQUES POTENTIELLES

L'interface R/protG peut être la cible pour de nouveaux médicaments.

Un nouveau type d'antagoniste qui inhibe l'interaction des R avec les protéines G vient d'être testé.

V-1 Activation directe lipidergique des protéines G

-L'acide arachidonique et ses métabolites (ex: les leucotriènes) peuvent être considérés comme des médiateurs, et des messagers intracellulaires:

-secrétés, ils vont agir sur des R d'autres cellules

-à l'intérieur de la cellule, ils ont une action sur certaines formes de protéines kinases C (interaction directe entre les leucotriènes et Gk, avec stimulation de l'échange GDP/GTP)

V-2 Protéines G et pathologie

-Exemples de maladies expliquées par des anomalies de protéines G:

-pseudohypoparathyroïdisme dû à un déficit en Gs (50%): diminution de réponse aux hormones stimulant l'adénylate-cyclase en particulier l'hormone parathyroïdienne impliquée dans la régulation de la calcémie. Conséquences: calcémie faible, nanisme, retards mentaux

-tumeurs somatotropes de l'antéhypophyse: surproduction d'AMPc due à une activité très élevée de Gs. Responsabilité dans l'induction tumorale ? (AMPc induit une division des cellules hypophysaires)

-insuffisance cardiaque: diminution des récepteurs bêta adrénérgiques expliquée par une diminution de l'activité des protéines Gs au niveau des ventricules

-diarrhées associées aux infections par le *Vibrio Cholerae*

-coqueluche déclenchée par *Bordella Pertussis*

VI ONCOGENES ET TRANSDUCTION

Des produits d'oncogènes semblent agir en désorganisant la régulation de la croissance à différents niveaux de ces mécanismes de transduction.

ex: oncogène *ras* ressemble à une protéine G; oncogène *erb B* code pour une protéine qui ressemble au R de l'EGF mais activité non régulable; oncogène *src* pourrait jouer un rôle dans la phosphorylation du phosphatidylinositol qui conduit au phosphatidylinositol 4,5 biphosphate.

VII CONCLUSION

Le rôle de ces protéines dépasse leur simple implication dans les mécanismes de transduction des messages portés par les neuromédiateurs et les hormones. Dans l'avenir, il devrait être possible de mieux définir les fonctions contrôlées par les diverses protéines G et d'approcher l'intérêt potentiel de leur modulation sélective par des agents pharmacologiques; ceci afin d'envisager la mise au point d'agents thérapeutiques de plus en plus efficaces pour traiter des affections aussi diverses que les maladies endocriniennes, cardiaques, mentales et des cancers.

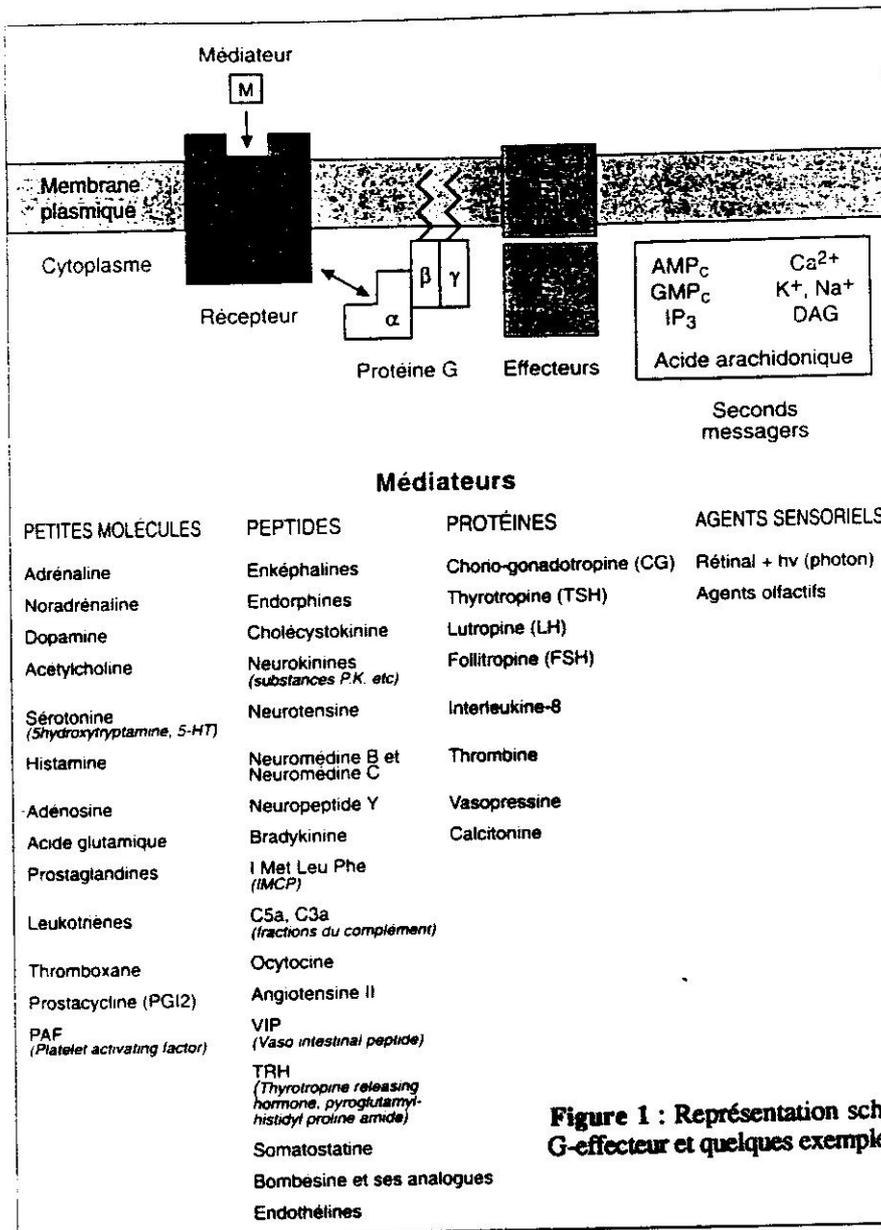
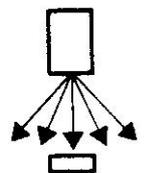


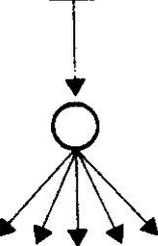
Figure 1 : Représentation schématique du système médiateur-récepteur-proteïne G-effeteur et quelques exemples de médiateurs.

1 : Récepteur membranaire



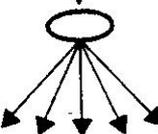
Premier étage d'amplification : un récepteur active plusieurs protéines G

2 : Protéines G



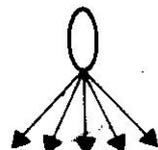
Deuxième étage d'amplification : une enzyme assure la formation de nombreuses molécules de seconds messagers

4 : Protéine-kinases



Troisième étage d'amplification : chaque protéine-kinase active un grand nombre d'enzymes

5 : Enzymes activées par phosphorylation



Quatrième étage d'amplification : une enzyme transforme de nombreuses molécules de substrat

Amplification du message.

Figure 2 :

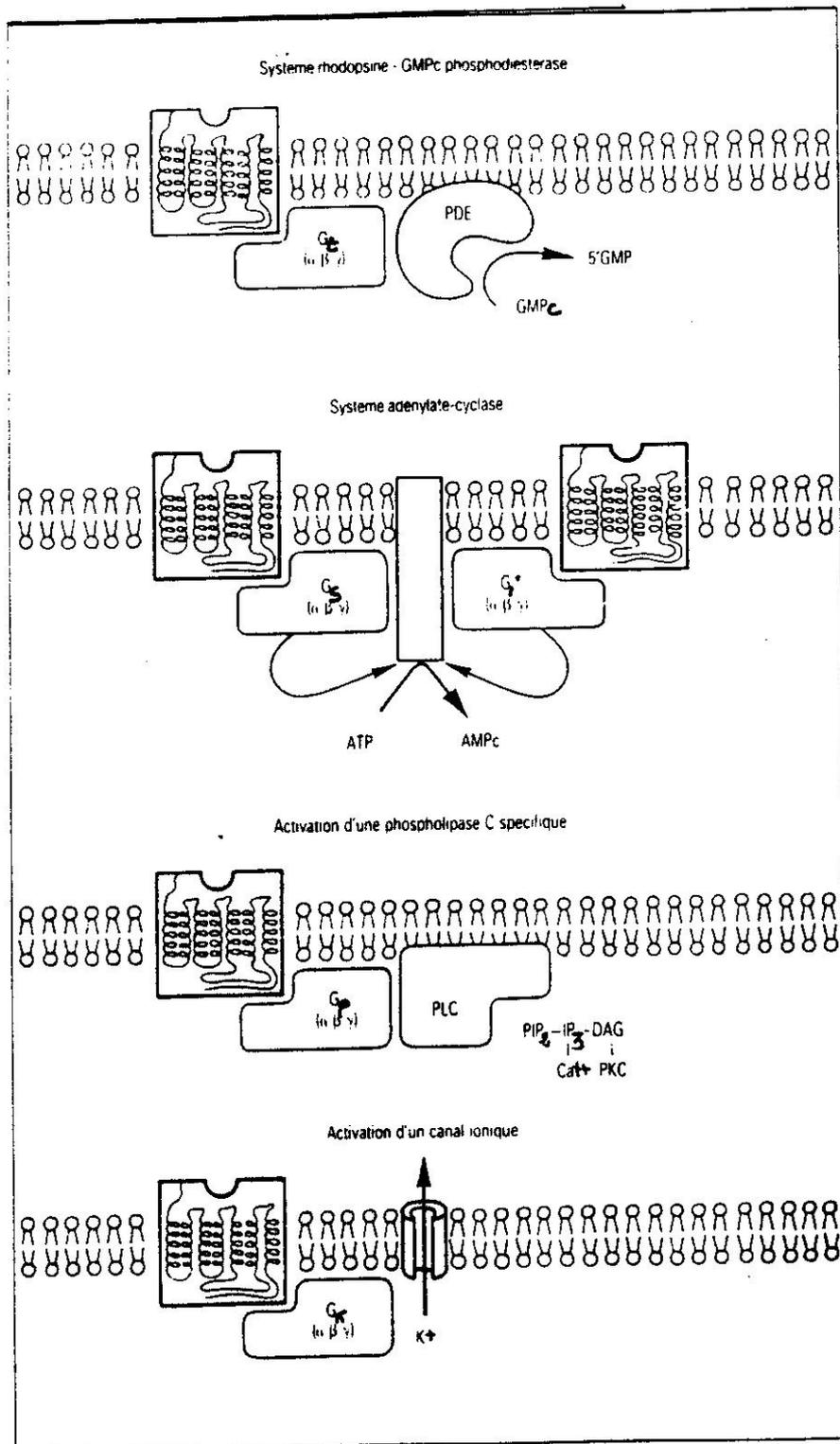


Figure 3 : Exemples de récepteurs monomériques couplés par des protéines G à des effecteurs enzymatiques ou à un canal ionique. Les protéines G formées de trois sous-unités ($\alpha\beta\gamma$) sont impliquées dans la transduction du signal entre la rhodopsine et la GMPc phosphodiesterase, dans la modulation du système adénylate cyclase, dans l'activation d'une phospholipase C spécifique des phosphoinositides ainsi que dans la modulation de l'ouverture de canaux ioniques.

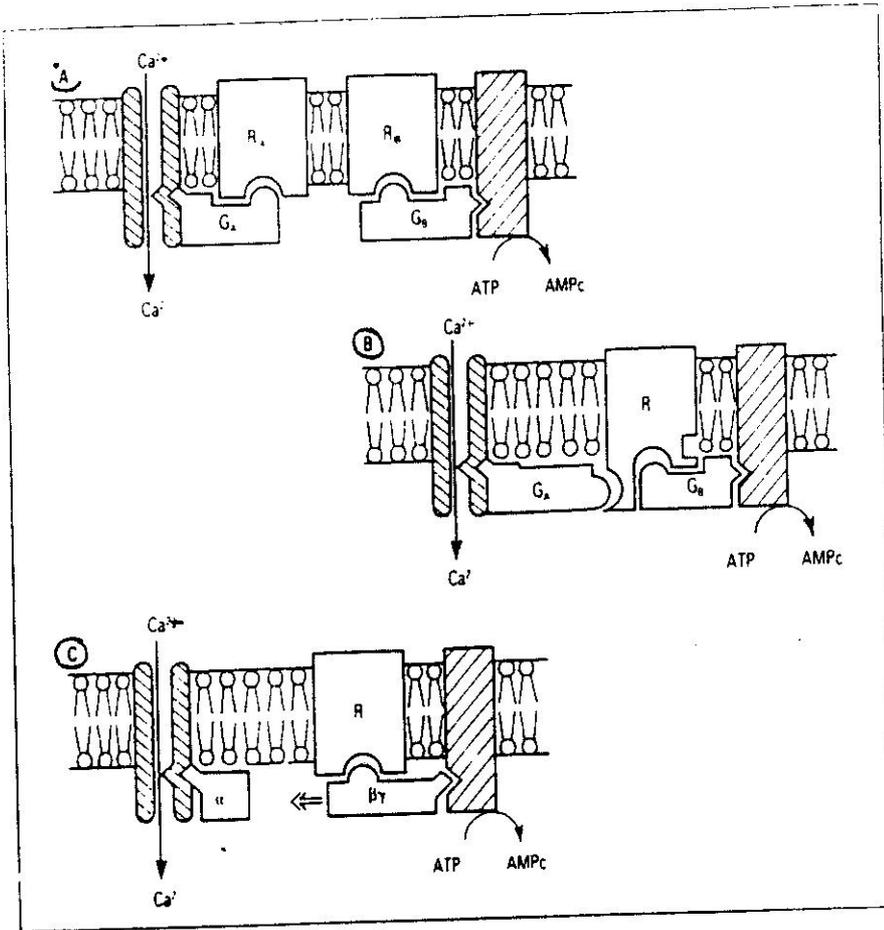


Figure 4 : Diverses possibilités de couplages assurant la production de réponses différentes à la mise en jeu d'un agoniste donné :

A. Plusieurs sous-types de récepteurs sont associés à des protéines G différentes.

B. Le récepteur est couplé à des protéines G différentes. Dans ces deux cas chaque protéine G agit sur un effecteur.

C. Le récepteur n'est couplé qu'à une seule protéine G dont les sous-unités alpha et bêta-gamma agissent sur des effecteurs différents (d'après Fredholm et Dunwiddle, 1988, modifié).

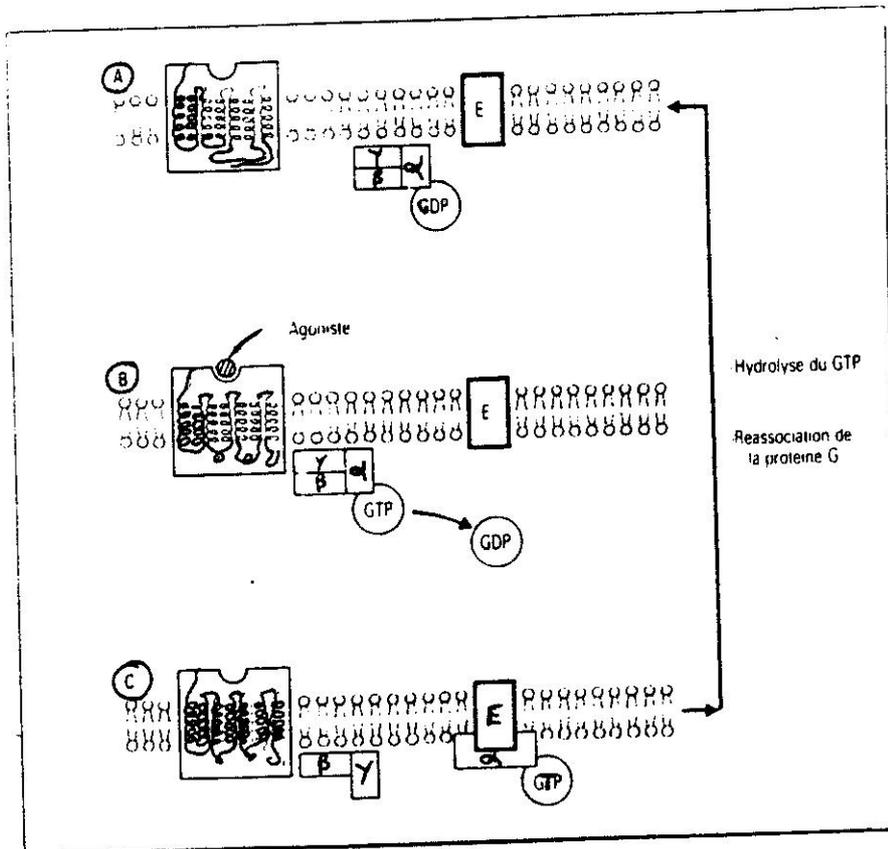


Figure 5 : Relation récepteur-protéine G.
A. Configuration inactive. Une molécule de GDP est liée sur la sous-unité α de la protéine G.

B. La liaison d'un agoniste sur le récepteur active le complexe. La protéine G s'associe au récepteur favorisant ainsi l'échange GDP/GTP.

C. Dissociation de la protéine G et association de GTP α avec un effecteur. Retour à "l'activation basale" grâce à une GTPase.

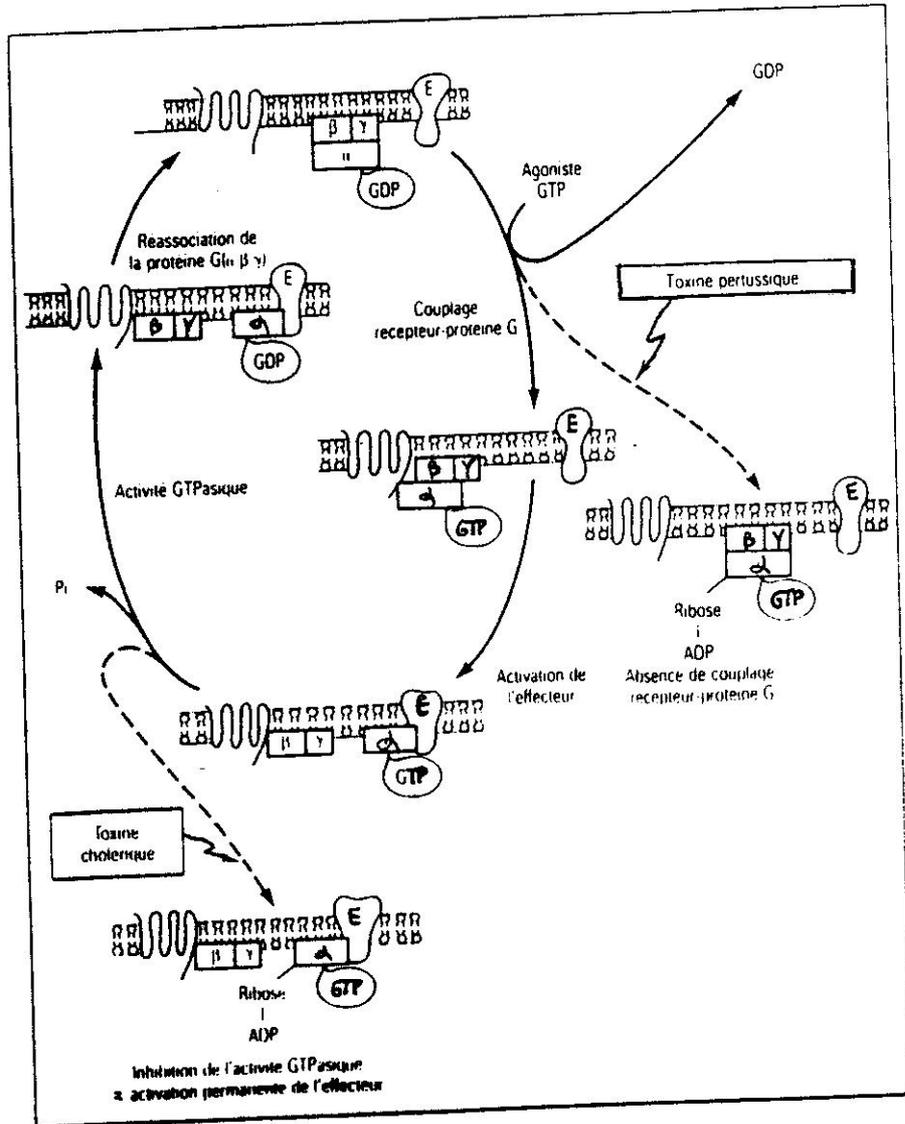


Figure 6 : Mécanismes d'action de la toxine cholérique et de la toxine pertussique.

Protéine G	Effecteur	Récepteur	Méiateur
G _t (transducine)	Phosphodiesterase du GMPcyclique	Rhodopsine (opsine + rétinol)	h v
G _s	Adénylate-cyclase (activation)	Adrénargique β_1 et β_2 Dopaminergique D ₁ Histaminergique H ₂ Purinergique A ₂ R. du glucagon	Noradrénaline-adrénaline Dopamine Histamine Adénosine et analogues Glucagon
G _i	Adénylate-cyclase (inhibition)	Adrénargique α_2 Dopaminergique D ₂ Muscarinique M ₂ Sérotoninergique 5HT ₁ Purinergique A ₁	Noradrénaline-adrénaline Dopamine Acétylcholine Sérotonine Adénosine et analogues
G _p	Phospholipase C (activation)	Adrénargique α_{1B} Muscarinique M ₁ Sérotoninergique 5HT ₂ Histaminergique H ₁	Noradrénaline-adrénaline Acétylcholine Sérotonine Histamine
G _k	Canal potassique (ouverture)	Muscarinique M ₂ Dopaminergique D ₂ Morphinique μ GABA-B	Acétylcholine Dopamine β -endorphine, metenképhaline Acide γ amino-butérique

Tableau 1 : Exemples de triades récepteur-protéine G-effecteur.

Sous-unites	Nombre probable	Masse moléculaire (kDa)	Fonction	Sensibilité aux toxines
β	2	37,4	· β_1 nécessaires à l'interaction avec le récepteur · Désactivation de G _o · Interaction directe avec certains effecteurs ?	Activées par la toxine cholérique. Inhibées par la toxine pertussique
γ	3	8-10		
G _q G ₁₂		40 40,5	Activation de la phosphodiesterase du GMPc	
G ₁₃	4	44,5-46	Activation de l'adénylate-cyclase	Activée par la toxine cholérique
G ₁₄	3	40,4-40,5	Inhibition de l'adénylate-cyclase	Inhibée par la toxine pertussique
G ₁₆		39,9		Inhibée par la toxine pertussique

Tableau 2 : Les sous-unités des protéines G. Chaque protéine G (G_t, G_s, G_i, G_o) est un hétérotrimère $\alpha\beta\gamma$. Les sous-unités β et γ seraient semblables d'une protéine à l'autre. Les sous-unités α de chaque protéine G leur confèrent donc leur spécificité.

LES EFFECTEURS MIS EN JEU EN REPONSE AU COUPLAGE R/PROTEINE G

I LA VOIE DE L'ADENYLATE CYCLASE

- Formation et dégradation de l'AMPc: voir fig. 1
- Enzyme de synthèse: adénylate-cyclase (ADc); enzyme de dégradation: phosphodiesterase (PDE)
- Substrat: ATP
- Produit: AMPc, soluble, diffuse bien dans le cytoplasme
- L'AMPc active une famille de protéine-kinases AMPc dépendantes, les protéines kinases A (mécanisme général).

l'AMPc agit aussi directement sur le mécanisme de transcription du génome des eucaryotes, non traité dans ce cours.

I-1 ADc et contrôle de son activité

- Molécules activatrices de l'enzyme:
 - la sous-unité alpha s GTP
 - les prostaglandines PGE1, PGD2
 - la forskoline (purifiée à partir d'une racine de plante indienne)
 - un acide gras insaturé (9-OHDE)
- Molécules inhibitrices de l'enzyme:
 - la protéine Gi
 - l'adénosine

I-2 AMPc et activation des protéines kinases A

- Mécanisme d'activation de la protéine kinase A: voir fig 2
 - Protéines kinases A = le tétramère R2C2
 - sous-unité C: identique dans les diverses protéines kinases A
- sur chaque sous unité, présence d'un site de liaison pour:
- Mg²⁺+ATP
 - substrat
 - site de catalyse (transfert du groupement P)

-sous-unité R: possède les sites de liaison de l'AMPc et sites d'interaction pour former le tétramère

-La nature des récepteurs détermine les différences structurales et fonctionnelles des diverses protéines kinases A et les spécificités tissulaires

-Activation: dissociation des sous-unités

l'hydrolyse des molécules d'AMPc en 5'AMP par une phosphodiesterase entraîne la reconstitution de l'ensemble et l'inactivation de la kinase. La théophylline et la papavérine inhibent la phosphodiesterase entraînant une production continue d'AMPc.

-L'AMPc a des effets sur les métabolismes glucidique et lipidique et sur les cellules musculaires.

-couplage des récepteurs membranaires à l'ADC: schéma récapitulatif voir fig 3

II LA VOIE DE LA PHOSPHOLIPASE C

-La protéine G assure le couplage du récepteur avec une enzyme amplificatrice: la phospholipase C.

-Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 diphosphate en IP3 (inositol triphosphate) et en DAG (diacylglycérol); voir fig 4, ces deux produits peuvent agir indépendamment ou en synergisme.

II-1 Les phosphatidylinositols

-Ils sont formés à partir du myoinositol (isomère de l'inositol).

-Le substrat usuel de la phospholipase C est le phosphatidylinositol 4-5-diphosphate (PIP2).

-La localisation est membranaire (un de ses constituants).

II-2 Phospholipase C et contrôle de son activité

-Son activation nécessite le calcium.

-L'inhibition par des phosphorylations est réalisée par l'intermédiaire de la protéine kinase C (rétrocontrôle négatif).

II-3 Les deux seconds messagers de la voie du phosphatidylinositol

IP3 et DAG sont rapidement métabolisés: recyclage ou formation de molécules qui seront de nouveaux signaux.

II-3-1 IP3

-Son mécanisme d'action est calcium dépendant:

- diffuse dans le cytoplasme;
- provoque la libération du calcium séquestré dans des réserves intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries, cytosol). Il reconnaît un récepteur qui lui est spécifique et qui possède un canal calcique.
- Mécanisme d'action sans signal calcium sur certains types cellulaires (ex: lymphocytes T humains)
- Rôles fonctionnels de IP4, IP5, IP6 formés à partir de IP3:
 - IP4: mobilisation du calcium intra-cellulaire, en coopération avec l'action d'IP3
 - IP5 et IP6: spécificité régionale dans le SNC, rôle de médiateurs ?

II-3-2 DAG

- Il reste dans la membrane.
- Son action de second messenger se traduit par l'activation d'une protéine kinase C (qui phosphoryle des protéines spécifiques), est réalisée en coopération avec la réponse produite par l'IP3 (coactivation avec le calcium).
- La protéine kinase C présente un taux élevé dans le SNC, les plaquettes sanguines et la rate; et un taux faible dans les muscles striés, le tissu cardiaque et les tissus adipeux.
- Le couplage des récepteurs membranaires à la phospholipase: voir fig 5
- Chacune des voies peut être reproduite pharmacologiquement:
 - mobilisation du calcium par des ionophores calciques (A 23187 ou ionomycine);
 - activation de la kinase C par les esters de phorbols.

III LA PHOSPHOLIPASE A2 (PLA2)

- Certains récepteurs sont couplés à la PLA2 par l'intermédiaire d'une protéine G
- C'est une enzyme de la membrane cytoplasmique, Ca⁺⁺ dépendante
- Elle hydrolyse la fonction ester pour libérer l'acide arachidonique et la lyso-phosphatidylcholine (fig 6)
- Elle intervient dans la régulation du taux intracytoplasmique de l'acide arachidonique
- Elle contrôle ainsi la formation d'un grand nombre de molécules endogènes telles que les eicosanoïdes
- Elle peut interférer avec différents systèmes de transduction
- L'acide arachidonique peut être le produit de diverses voies (fig 7)

III-1 PLA2 et cascades des eicosanoïdes

- L'acide arachidonique est considéré comme messenger intracellulaire, il est alors second messenger
- Il active une forme de protéine kinase C
- La dégradation intracellulaire de l'acide arachidonique emprunte diverses voies (fig 8) et les produits de ces voies métaboliques (ex: leucotriènes, prostaglandines et tromboxane, époxydes) peuvent être libérés par la cellule et jouer alors le rôle de médiateurs en rétroagissant sur les cellules d'origine ou les cellules cibles
- Certains des dérivés intermédiaires sont susceptibles de jouer également un rôle de messenger intracellulaire, les époxydes par exemple peuvent activer la guanylyl-cyclase cytosolique

III-2 Régulation de l'activité de la PLA2

- La régulation et le rôle de la PLA2 sont complexes et encore peu connus
- L'influence de la concentration cytosolique en Ca^{++} et Na^{+} : leur augmentation provoque une activation de l'enzyme
- Certaines protéines sont capables d'inhiber la PLA2, la principale est la lipocortine qui est induite par les glucocorticoïdes (AINS) AIS
- in vitro, la PLA2 peut être inhibée par le bromophénacyle et la mécacrine

III-3 PLA2 et système de transduction

III-3-1 Activité de la PLA2 et taux d'AMPc

- Les prostaglandines sont capables de modifier les taux d'AMPc, augmenter ou diminuer suivant les systèmes: dans les hépatocytes, les lymphocytes, les fibroblastes, les plaquettes, les cellules thyroïdiennes, surrénales, utérines, rénales et le corps jaune, les prostaglandines stimulent l'ADc.
- La PLA2 peut modifier les taux d'AMPc et de GMPc sans l'intermédiaire des prostaglandines

III-3-2 Activité de la PLA2, PLC et PKC

- L'activation de la PLC entraîne la production d'IP3 et donc la libération de calcium (de nombreux récepteurs sont couplés à la PLC: alpha 1-adrénergique, muscariniques M1, histaminergiques H1, ceux de l'angiotensine)
- Certains PKC sont directement activables par l'AA

III-4 Importance physiopathologique des eicosanoïdes

III-4-1 Au niveau du muscle lisse

-Des prostaglandines entraînent

- la relaxation des muscles bronchiques et vasculaires
- la contraction de la musculature utérine et du tube digestif

-Des leucotriènes

- entraînent la contraction de la musculature lisse bronchique, du parenchyme pulmonaire
- ralentissent la microcirculation impliquée dans les troubles bronchopulmonaires de la maladie

asthmatique

III-4-2 Au niveau des plaquettes

-Le tromboxane A₂ induit l'aggrégation plaquettaire

-La prostacycline inhibe l'aggrégation plaquettaire

III-4-3 La réaction inflammatoire

Des prostaglandines favorisent l'érythème par leur action vasodilatatrice, contribuent à l'augmentation de la perméabilité vasculaire

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

-La phosphorylation et la déphosphorylation des protéines enzymatiques constituent une régulation majeure de leur activité.

-Protéine-kinases A et C, et protéines kinases calcium/calmoduline dépendantes forment un groupe de kinases qui phosphorylent leurs substrats au niveau d'une sérine ou d'une thréonine.

IV-1 Action des protéine-kinases sur les protéines en relation avec la libération des médiateurs

Trois protéines associées à la membrane vésiculaire peuvent être phosphorylées:

- la synaptophysine: intégrée dans la membrane, intervient dans l'exocytose;
- la synapsine I: extrambne, solidarise les petites vésicules avec le cytosquelette;

-le VAMP I: découverte plus récente.

IV-2 Action des protéine-kinases sur les canaux membranaires

-Après l'action de la protéine kinase A ou C, les changements de conductance des canaux résultent principalement de la modification du nombre et de la probabilité d'ouverture.

-La protéine kinase A modifie l'activité de plusieurs types de canaux:

canal potassium

canal potassium/calcium dépendant

canal calcium voltage dépendant

canal chlore

-La protéine kinase C modifie l'activité de :

canal potassium

canal calcium

V LE SIGNAL CALCIUM

Les variations du taux de calcium cytosolique représentent l'un des plus importants modes de signalisation intracellulaire.

concentration extracellulaire: $10^{-3}M$

concentration cytosolique : $10^{-7}M$

concentration dans les organites de réserve: $10^{-3}M$

V-1 Fluctuation du calcium cytosolique

L'accroissement du taux de calcium intracellulaire est dose dépendante.

Son accroissement peut être continu ou s'effectuer avec des oscillations régulières.

Comment l'activation de la phospholipase C peut-elle être à l'origine des variations rythmiques du taux de calcium?

-changement rapide d'activité de l'ensemble R/effecteur

-mécanisme indépendant de l'état d'activité du récepteur

V-2 Protéines intracellulaires liant le calcium (ou calcioprotéine)

-Le signal calcium produit par l'IP3 ou celui qui résulte de l'ouverture de canaux membranaires modifie le fonctionnement de la cellule par l'intermédiaire de protéines cytosoliques qui lient le calcium avec une grande affinité

-Ces protéines ont 2 à 4 cations divalents (magnésium); ce sont:

la parvalbumine, la calrétinine, la calbindine

la troponine C

la calmoduline (Cam)

la recoverine

la sous-unité alpha de la glycogène phosphorylase-kinase

une protéine intestinale stéroïde dépendante

un groupe de protéines (les annexines) récemment découvertes à fonction non définie

-En liant le calcium, ces protéines assurent la reconnaissance spécifique de l'élément qui sera activé par ce signal.

VI CANAUX IONIQUES EFFECTEURS POUR LES PROTEINES G

-Le couplage direct entre protéines G et canaux membranaires (fig 9): la protéine G régule directement l'activité des canaux ioniques.

ex1: récepteur muscarinique du tissu auriculaire cardiaque (Gk)

Son activation entraîne un ralentissement du rythme dû à une hyperpolarisation de la membrane par ouverture d'un type de canal potassium et un ralentissement de l'activité du pace-maker.

VII LES PHOSPHODIESTERASES DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES

Les nucléotides cycliques (AMPc et GMPc) sont des messagers intracellulaires impliqués dans la régulation de toutes les principales fonctions biologiques (métaboliques, contractiles et sécrétoires). Une élévation de l'AMPc stimule la lipolyse et la glycogénolyse; augmente la force de contraction et la fréquence cardiaque; relâche les muscles lisses; module la libération de divers neurotransmetteurs et hormones.

Le GMPc est essentiel dans la transduction du stimuli visuel et la relaxation du muscle lisse.

L'effet des nucléotides cycliques se termine par leur hydrolyse par les phosphodiesterases (PDE).

Les PDE de mammifères ont été classés en cinq familles sur la base de leurs caractéristiques structurales et cinétiques, de leur modulation par divers effecteurs physiologiques et pharmacologiques. (voir tableau 1)

Les inhibiteurs des PDE présentent un intérêt en tant qu'outils pharmacologiques pour augmenter le taux intracellulaire en AMPc ou en GMPc, et, représentent donc une nouvelle classe d'agents thérapeutiques potentiels dans le traitement de diverses maladies:

- la dépression: le rolipram inhibe la PDE IV et son efficacité est comparable à celle des antidépresseurs tricycliques

- l'insuffisance cardiaque: des inhibiteurs de la PDE III ont un effet vasorelaxant et augmentent la force de contraction cardiaque sans provoquer d'importantes augmentations du rythme

- l'asthme: les inhibiteurs de la PDE IV sont étudiés comme agents anti-inflammatoires, ils diminuent la libération des médiateurs inflammatoires.

Le développement d'inhibiteurs de plus en plus sélectifs d'une enzyme et d'un type cellulaire donné est actuellement à l'étude.

VIII LES SECONDS MESSAGERS ET LA DESENSIBILISATION DES RECEPTEURS

Les seconds messagers peuvent altérer le récepteur d'autres transmetteurs (ionotropiques ou métabotropiques).

La désensibilisation des R se fait essentiellement par phosphorylation.

IX CONCLUSION

- Les récepteurs dont le couplage avec les effecteurs passe par les protéines G seraient caractérisés par une grande similitude de leurs dispositions structurales.

- Ceci contraste avec:

- la grande variété des agonistes qui les stimulent,

- la diversité des réponses produites par les différentes catégories d'effecteurs avec lesquels ils sont couplés.

Ces nombreuses possibilités de couplage permettent de comprendre comment un petit nombre de mécanismes peuvent rendre compte de régulations précises et variées observées sur l'ensemble des cellules d'un organisme.

La possibilité qu'un récepteur donné soit couplé à plus d'un mécanisme de transduction existe également:

exemple les récepteurs D2 des cellules lactotropes hypophysaires couplés négativement à l'ADc et négativement à la phospholipase C ainsi qu'à des canaux ioniques potassiques et/ou calciques. Protéines G communes ou distinctes ? (voir fig 10).

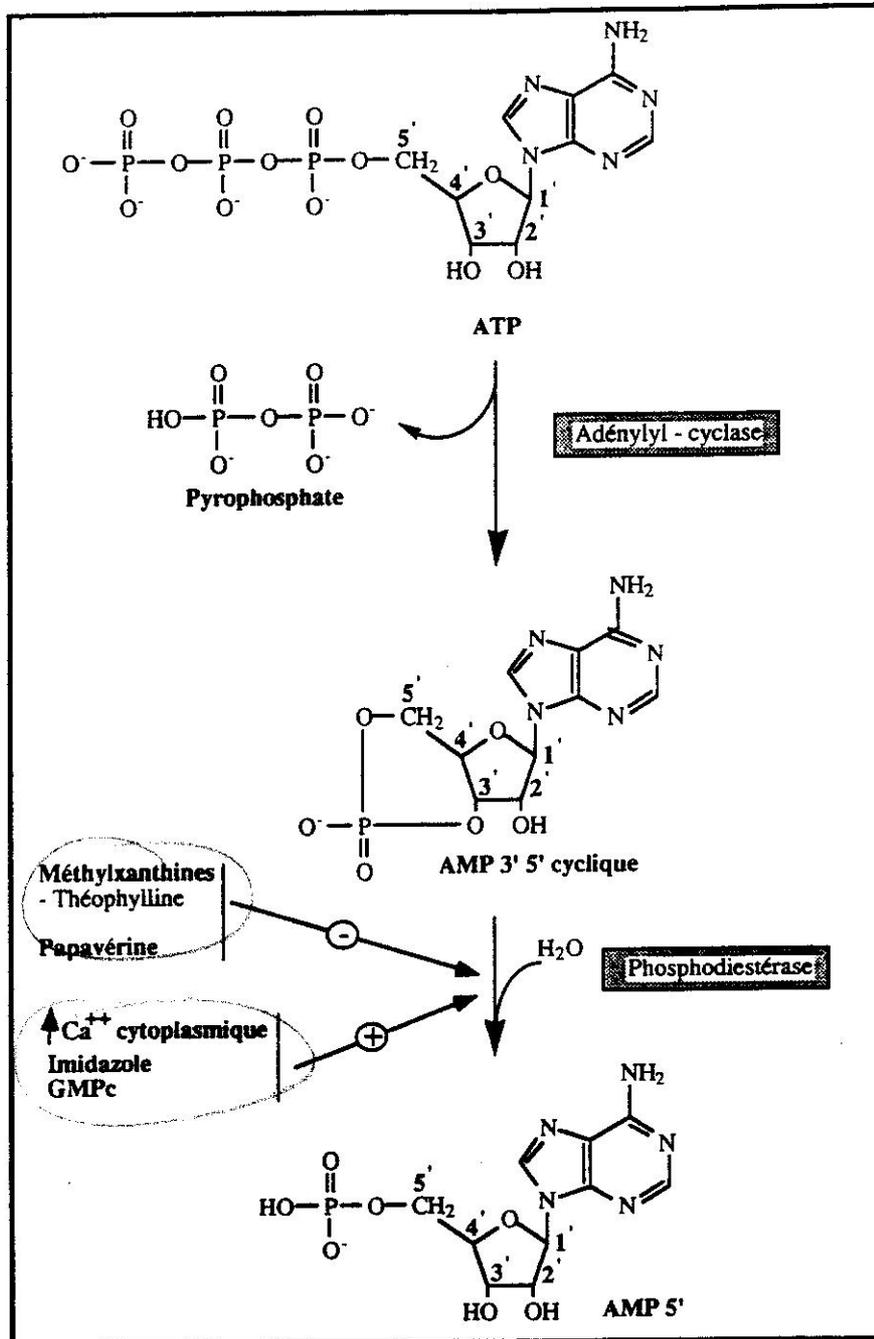


Figure 1 : Synthèse de l'AMPc et du 5' AMP par respectivement l'adénylyl-cyclase et la phosphodiesterase.

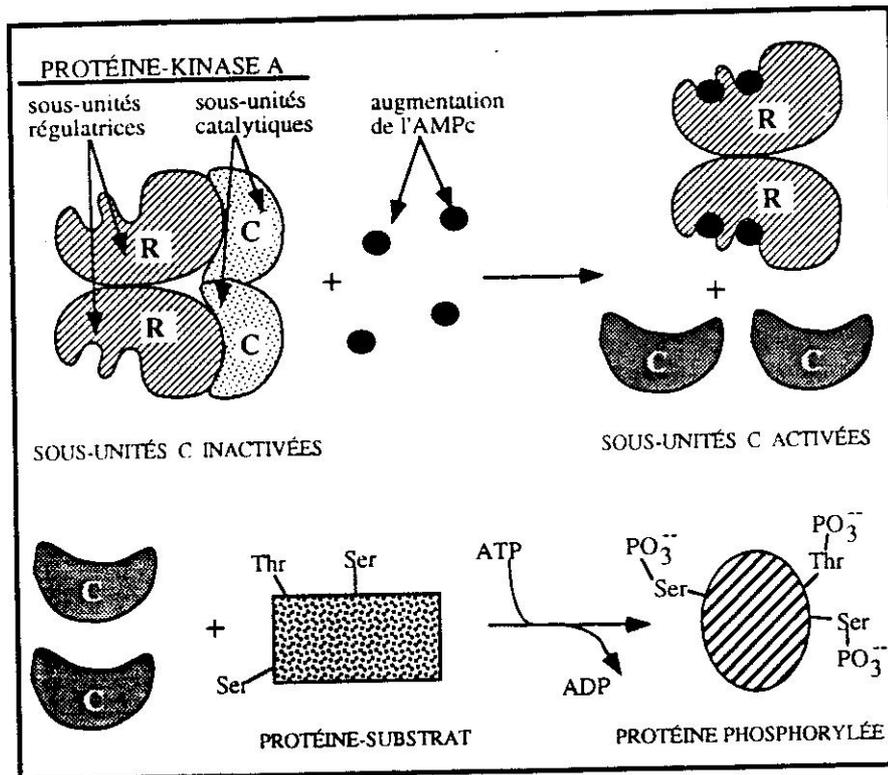


Figure 2 : Activation de la protéine-kinase A (dépendante de l'AMPc).

Une augmentation de l'AMPc provoque la dissociation des sous-unités régulatrices et catalytiques de la protéine-kinase A. Les sous-unités catalytiques libres sont actives. Chaque sous-unité régulatrice est capable de fixer 2 molécules d'AMPc. Une élévation (ou une diminution) du taux d'AMPc dans le cytoplasme, contrôle l'activité de la PKA et des phénomènes de phosphorylation ou de déphosphorylation de protéine-substrats.

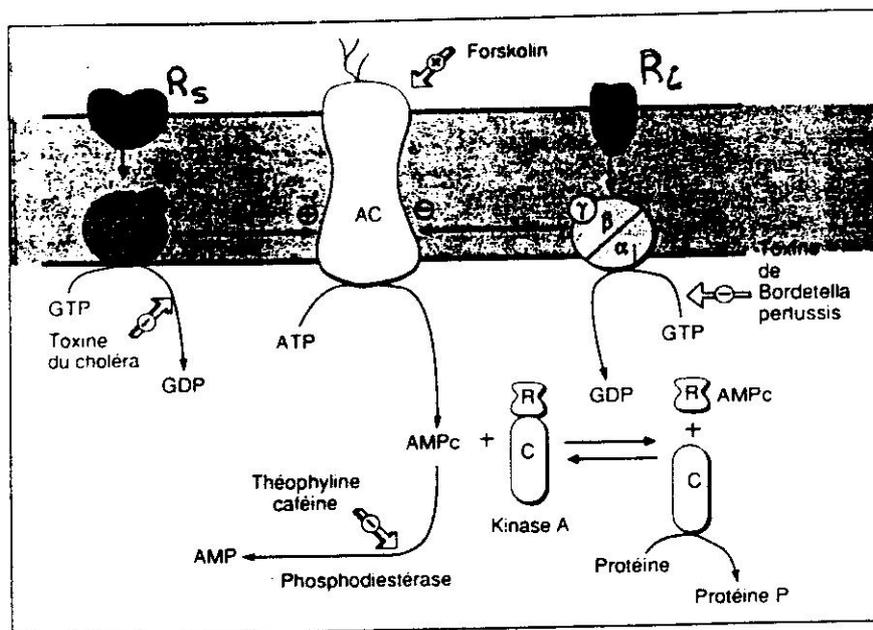


Figure 3 : Couplage de récepteurs membranaires à l'adénylate cyclase.

Des récepteurs sont positivement (R_s) ou négativement (R_i) couplés à l'adénylate cyclase (AC) par l'intermédiaire de protéines de couplages G_s ($\alpha_s, \beta\gamma$) et G_i ($\alpha_i, \beta\gamma$) respectivement. L'AMP cyclique active une protéine kinase A en dissociant la sous-unité régulatrice (R) de la sous-unité catalytique (C).

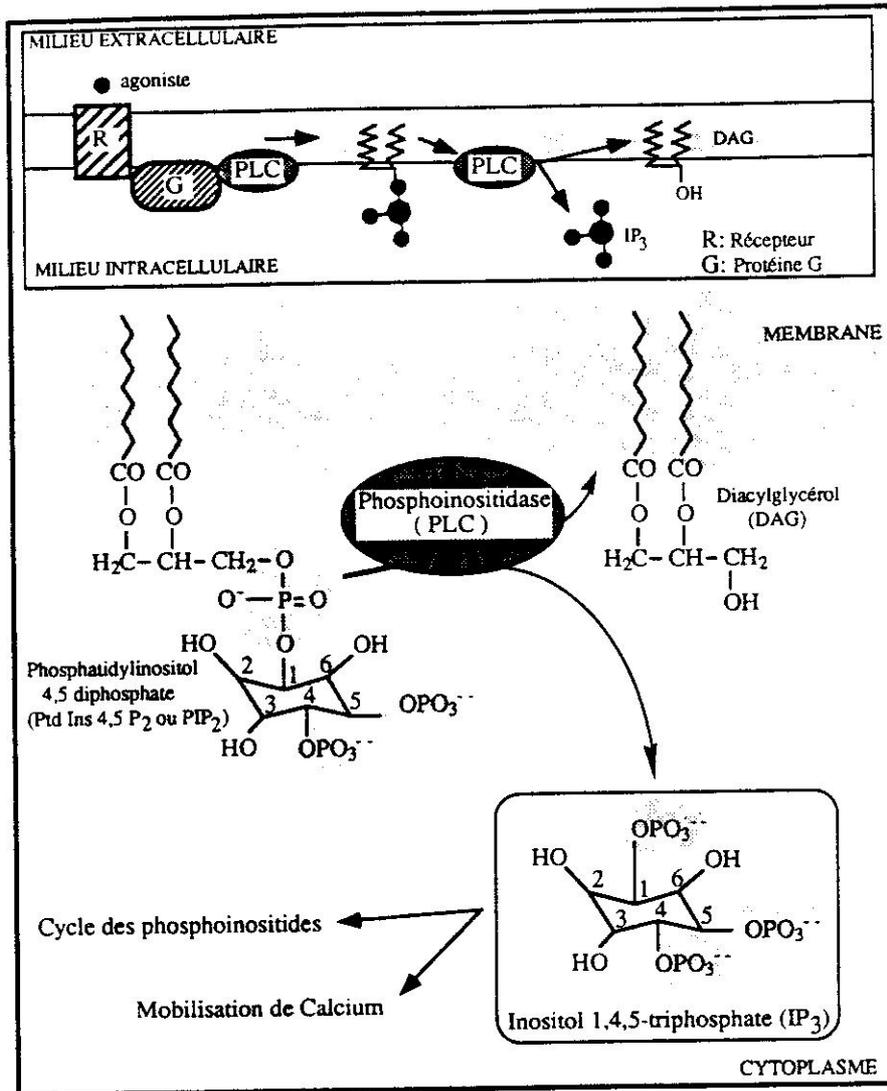


Figure 4 : Mécanisme d'action de la phosphoinositidase (phospholipase C).
 Cette enzyme génère deux seconds messagers, le 1,2-diacylglycérol (DAG) et l'inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP₃). La PLC peut cliver les 3 phosphoinositides en DAG et inositols phosphates, seule l'hydrolyse du PIP₂ est indiquée sur cette figure.

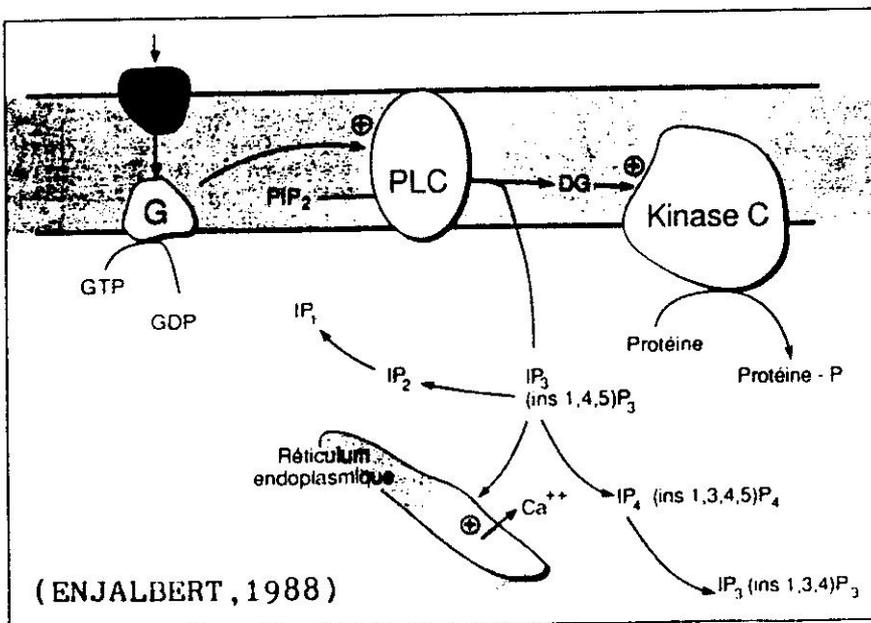


Figure 5 : Couplage de récepteurs membranaires à la phospholipase C.

Des récepteurs (R) sont couplés à la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire d'une protéine G non encore caractérisée. La phospholipase C hydrolyse le phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DG) et inositol triphosphate (IP₃). Le diacylglycérol reste dans la membrane et va activer la protéine kinase C. L'inositol triphosphate va provoquer la libération, dans le cytoplasme, de calcium du réticulum endoplasmique. L'inositol triphosphate est métabolisé par déphosphorylations successives. Il peut être aussi phosphorylé en inositol tétraphosphate qui pourrait jouer un rôle dans l'entrée de calcium dans la cellule.

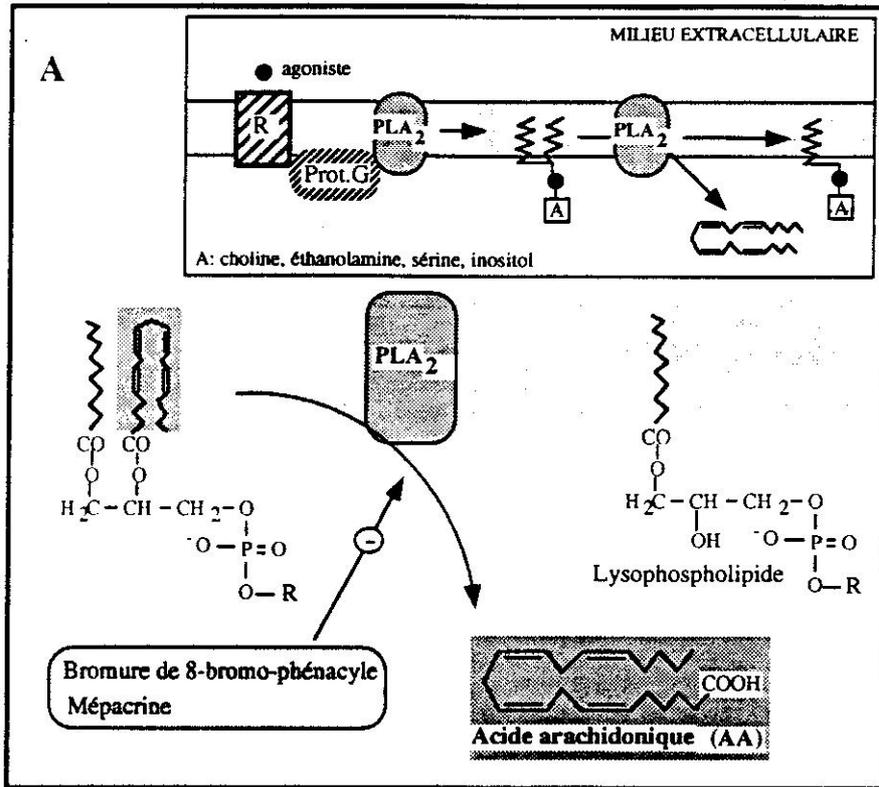


Figure 6 : Synthèse de l'acide arachidonique par la PLA₂.
Le bromure de bromophénylacyl et la mépacrine inhibent la phospholipase PLA₂.

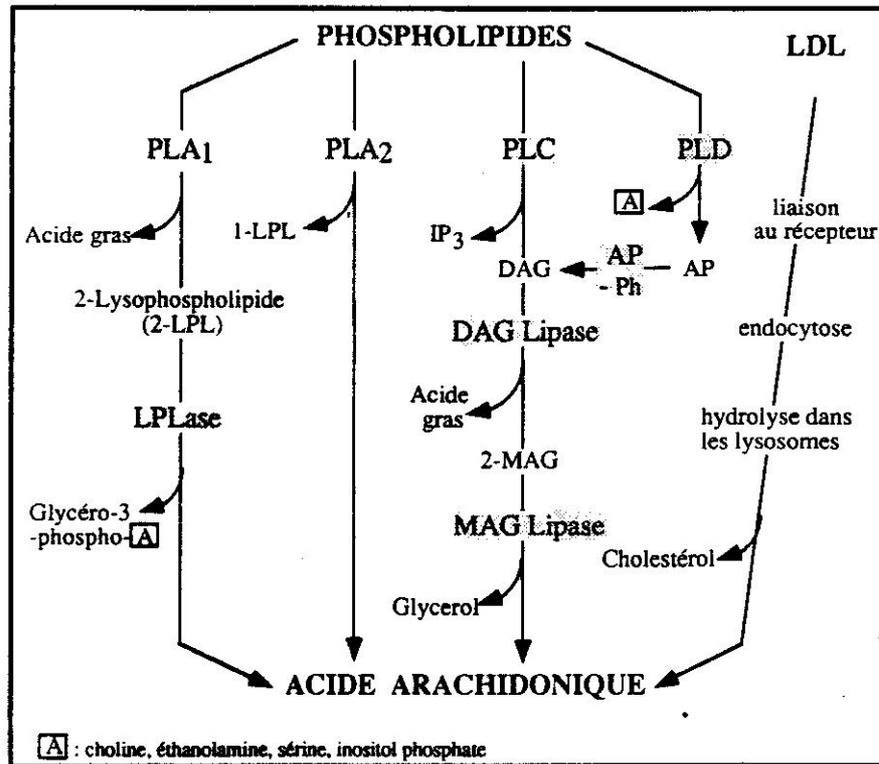


Figure 7 : Différentes voies de synthèse de l'acide arachidonique (AA).
L'acide arachidonique peut être formé par dégradation des phospholipides par des différentes phospholipases ou par internalisation puis dégradation des lipoprotéines à faible densité (LDL).
DAG : diacylglycérol ; IP₃ : inositol (1, 4, 5) triphosphate ; 2-MAG : 2 monoacylglycérol ; LPL : lysophospholipide ; LPLase : lysophospholipase ; AP : acide phosphatidique ; AP-Ph : acide phosphatidique phosphohydrolase.

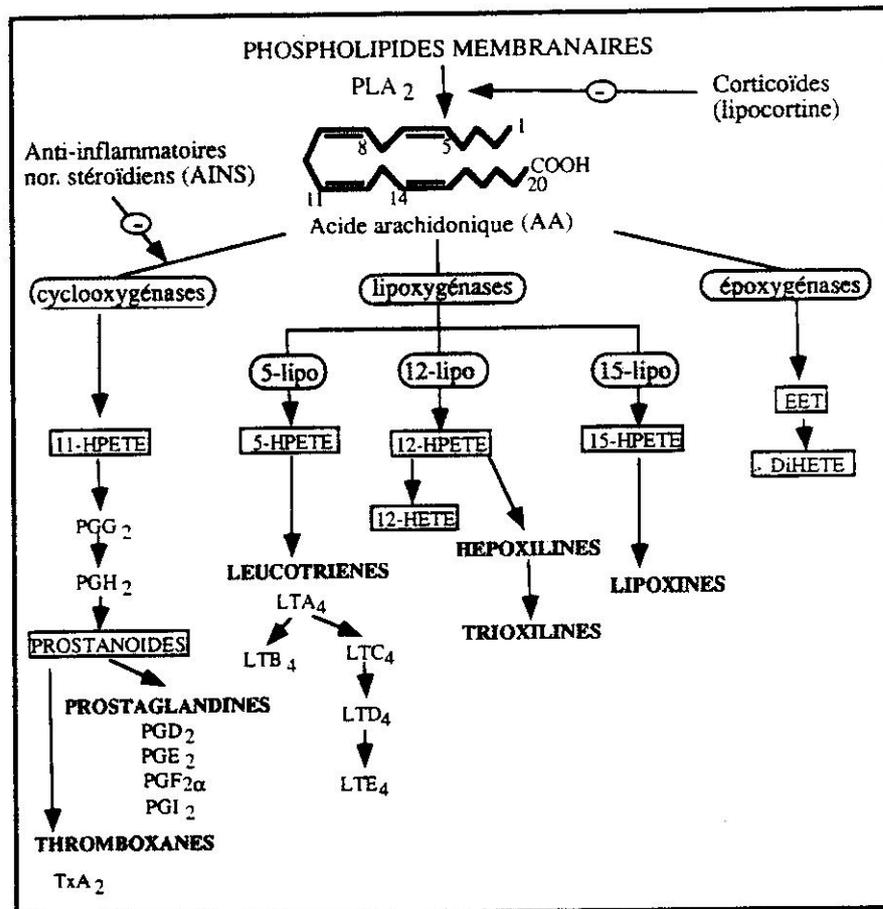


Figure 8 : Métabolisme de l'acide arachidonique.

PG : prostaglandine ; LT : leucotriène ; HPETE : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque ; HETE : acide hydroxyeicosatétraénoïque ; EET : acide époxyeicosatétraénoïque.

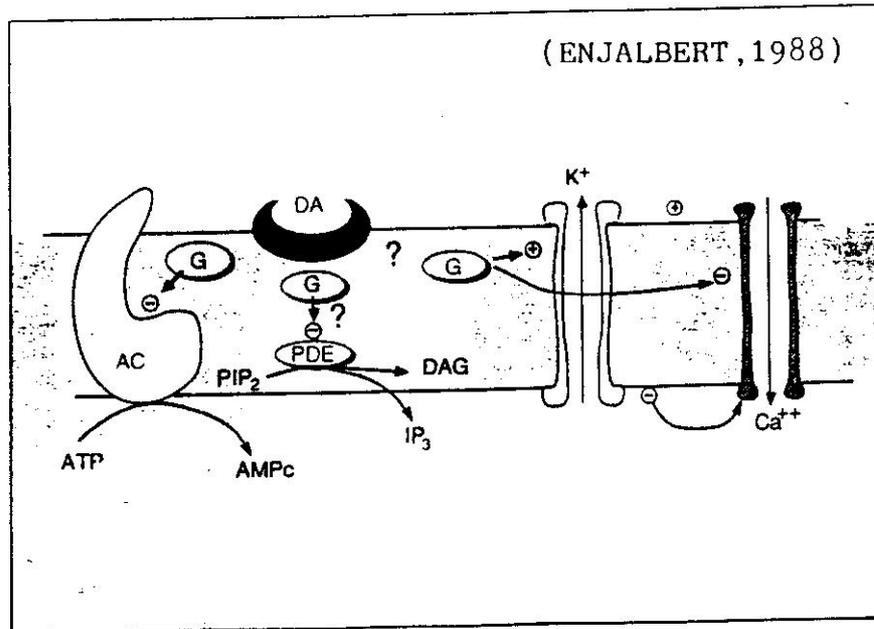


Figure 9 : Couplage de récepteurs membranaires à des canaux ioniques.
 Certains récepteurs seraient couplés à des canaux ioniques (potassium ou calcium) par l'intermédiaire de protéines G sensibles à la toxine de *Bordetella pertussis*.

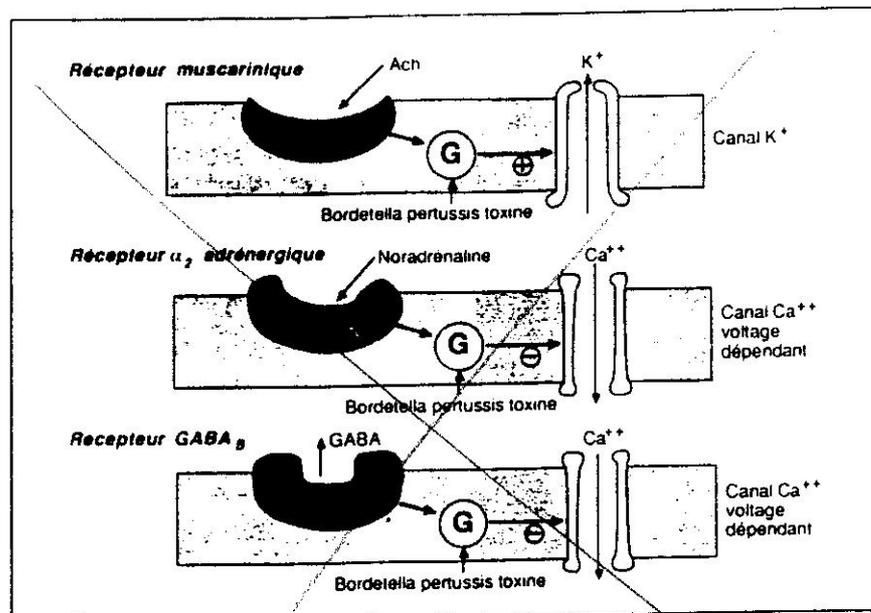


Figure 10 : Couplage d'un récepteur / mécanismes de transduction.

Le récepteur D2 dopaminergique des cellules lactotropes de l'hypophyse antérieure apparaît négativement couplé à l'adénylate cyclase. Il pourrait aussi être négativement couplé à la phospholipase C. Il est aussi probablement couplé directement à des canaux ioniques membranaires, canal calcium voltage dépendant ou/et canal potassium. Dans tous les cas, ces mécanismes de couplage impliquent des protéines G sensibles à la toxine de *Bordetella pertussis*. Une même protéine G pourrait être responsable de l'ensemble des couplages mais il est également possible qu'ils impliquent des protéines G différentes.

Tableau 1 :

DIFFERENTS TYPES DE PHOSPHODIESTERASES DES NUCLEOTIDES CYCLIQUES.

	PDE I	PDE II	PDE III	PDE IV	PDE V
Substrat(s)	AMPc et GMPC	AMPc et GMPC	AMPc et GMPC	AMPc et GMPC	AMPc et GMPC
Modulateur	Ca ²⁺ / CaM+	GMPC+	GMPC-		
Inhibiteurs	IBMX nimodipine vinpocétine	IBMX	IBMX milrinone indolidan	IBMX rolipram denbufylline	IBMX Zaprinast
Localisations principales	Système nerveux central, coeur, muscles lisses	Cortex surrénalien	Coeur, plaquettes, adipocytes	Localisation variée	Rétine, muscles lisses
CaM : calmoduline ; IBMX : isobutylindéthylxanthine ; + : activation ; - : inhibition.					

RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A ACTIVITE TYROSINE-KINASE

Deux grandes familles de récepteurs traduisent eux-même le signal extra-cellulaire: les R-enzymes et les R-canaux ioniques.

Les R-enzymes sont appelés ainsi parce qu'ils portent dans leur partie intra-cellulaire une activité tyrosine-kinase.

La première des cascades de réactions induites après la liaison du ligand à son R est une autophosphorylation du récepteur lui-même.

I MEDiateURS CONCERNES: INSULINE ET FACTEURS DE CROISSANCE

-L'insuline agit sur les métabolismes glucidique et lipidique (mécanismes complexes et multiples; action au niveau des gènes; les seconds messagers sont inconnus).

-Les facteurs de croissance (petites protéines)

-exemples: epidermal growth factor (EGF), platelet derived growth factor (PDGF), insuline-like growth factor, tumor growth factor

-action: stimule ou inhibe la prolifération cellulaire

plus certaines propriétés indépendantes de cette prolifération: par exemple, ils contrôlent de multiples étapes du développement embryonnaire, de la différenciation des tissus; de la mise en place de leur fonctionnement normal et même de leur sénescence.

-Les interleukines (IL4)

II STRUCTURE DES RECEPTEURS A ACTIVITE TYROSINE-KINASE

II-1 Structure générale

Le récepteur de l'insuline est un tétramère: voir fig 1

2 sous-unités alpha extra-cellulaires portent le site de liaison des agonistes;

2 sous-unités bêta transmembranaire dont l'extrémité Ct porte le site enzymatique tyrosine-kinase.

Les récepteurs de l'EGF et du PDGF ont une structure plus simple (1 seule chaîne polypeptidique).

Une grande homologie de séquence du domaine possédant l'activité enzymatique entre les différents récepteurs est estimée.

II-2 Site de liaison des agonistes

- Situé sur le domaine extra-cellulaire
- Régulation de l'affinité du récepteur pour son ligand par phosphorylation (par la protéine-kinase C) de résidus situés sur la face interne de la membrane
- Site de liaison de l'insuline: chaque chaîne alpha peut lier une molécule d'insuline

II-3 Site tyrosine-kinase

- Séquence intracellulaire
- Grande homologie parmi les récepteurs de l'insuline et des facteurs de croissance

III MECANISME DE TRANSDUCTION

Le mécanisme par lequel le domaine extra-cellulaire transmet le signal au domaine intra-cellulaire n'est pas connu.

III-1 Rôle de l'activité tyrosine-kinase

- La liaison de l'insuline entraîne une modification de la conformation de la chaîne alpha, répercutée au niveau de la bêta suivie de 2 conséquences:
 - activation de la fonction tyrosine kinase (la source de phosphate est l'ATP, il y aurait transfert de phosphates de l'ATP vers un ensemble de résidus tyrosyls). La sous-unité bêta requiert la phosphorylation d'au moins 3 résidus tyrosyls pour exercer au maximum son activité tyrosine kinase et permettre la phosphorylation de substrats endogènes.
 - mise en jeu d'une phospholipase C sélective du glycosyl-phosphatidylinositol
- Mécanisme de recyclage
 - cette activité n'est pas nécessaire à l'internalisation et à la dégradation du ligand fixé
 - cette activité est indispensable à la dégradation du récepteur après endocytose

III-2 Activation d'une phospholipase C sélective du glycosyl-phosphatidylinositol: nouvelle voie de couplage R/Effet

- Le couplage R/phospholipase C est assuré par une protéine G car les effets sont inhibés par la toxine pertussique.

-La phospholipase C est spécifique de 2 substrats:

-le glycosyl-phosphatidylinositol (G-PI) qui est hydrolysé en glycosyl-inositol phosphate (G-IP) et en DAG

-et le glycosyl-phosphatidylinositol associé par un maillon externe éthanolamine à diverses protéines extrinsèques

-Le calcium est le principal activateur de la PLC

-La PLC peut être inhibée par rétrocontrôle: phosphorylation dépendante de la PKC

III-3 Effets du G-IP

Il régule l'activité de plusieurs systèmes enzymatiques (ex: activation de la phosphodiesterase sélective de l'AMPC, taux d'AMPC dans les adipocytes corrélé à la glycogénèse).

III-4 Rôle du DAG dans les effets de l'insuline

Il possède des propriétés différentes en fonction de la nature des acides gras (transport du glucose, synthèse du glycogène, synthèse d'ADN).

IV IMPORTANCE DU RECEPTEUR DANS CERTAINES PATHOLOGIES

-Gène du récepteur à l'insuline localisé sur le chromosome 19

-Maladies associées à une insulino-résistance de niveau "R" sont définies par une anomalie de liaison à l'insuline à son récepteur (anticorps anti-récepteurs circulants), anomalies quantitative et qualitative

-Maladies insulino-résistantes "post-R": anomalies de transduction intracellulaire (la tyrosine kinase du récepteur ou les voies effectrices sont affectées)

-Caractères préliminaires des résultats pouvant conduire à la réalité d'anomalies génétiques du récepteur

-Syndromes d'insulino-résistance liés à des anomalies du récepteur: voir tableau 1

-Ces récepteurs pourraient être impliqués dans le processus de transformation ou de cancérisation.

-Certains virus se fixeraient sur ces récepteurs afin d'être internalisés par endocytose ("stratégie du coucou"). La fixation du virus entraînerait la phosphorylation du récepteur et mimerait donc la stimulation par le facteur de croissance: explication de certains des effets mitogènes des virus Herpès?

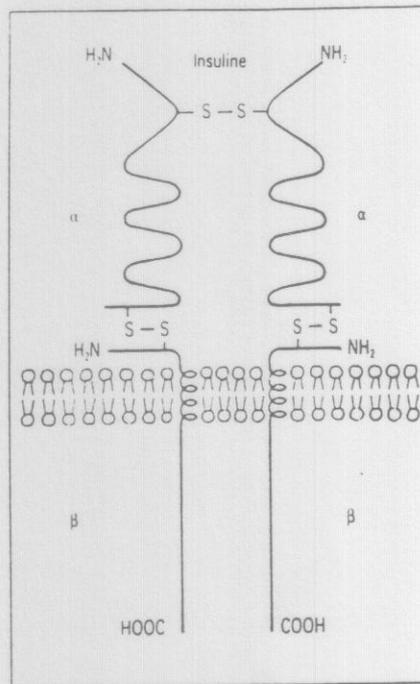


Figure 1 : Structure du récepteur de l'insuline.

	Insulinorésistance de type A	Diabète lipoatrophique	Lepréchaunisme
Clinique			
Découverte	Adolescence	Variable	Naissance
Développement	Avance staturo-pondérale <i>Acanthosis nigricans</i> *	Avance staturo-pondérale <i>Acanthosis nigricans</i> *	Retard staturo-pondéral
Signes cliniques	Hyperandrogénie	Hyperandrogénie Lipoatrophie Hypertrophie musculaire Hépatomégalie	Atrophie sous-cutanée Dysmorphie
Biologie	Hyperglycémie Hyperinsulinémie	Hyperglycémie Hyperinsulinémie Hypertriglycémie	Hyperinsulinémie
Anomalies du récepteur			
Structure	—	—	1 cas
Liaison	Normale ou diminuée	Normale	Diminuée en général
Tyrosine kinase	Normale	Diminuée	Normale en général
Gène du récepteur anormal	1 cas	Non	1 cas

Tableau 1 :

**SYNDROMES D'INSULINO-RESISTANCE MAJEURE
ANOMALIES GENETIQUES POSSIBLES DU RECEPTEUR DE L'INSULINE**

RECEPTEURS DE LA MEMBRANE PLASMIQUE A UNE HELICE TRANSMEMBRANAIRE, DEPOURVUS D'ACTIVITE TYROSINE-KINASE

Famille de récepteurs possédant une seule hélice alpha transmembranaire.

Les mécanismes de couplage et les fonctions desservies par ces récepteurs sont mal connus.

Classement de ces récepteurs en fonction d'analogie de structure.

I SUPERFAMILLE DES IMMUNOGLOBULINES

Le fragment Fc des Ig (extrémité Ct des chaînes lourdes) assure leur liaison aux récepteurs "Fc" de la membrane plasmique des cellules du système immunitaire.

Cette famille de protéines membranaires comprend également d'autres récepteurs:

-récepteur de L'IL1 (IL1: hormone polypeptidique produite par les macrophages, elle stimule la croissance et la prolifération de nombreuses cellules du système immunitaire, des hépatocytes, des adipocytes, des ostéoclastes. Elle a un effet pyrogène et interviendrait dans les pathologies inflammatoires chroniques). Ce récepteur serait couplé à l'ADc.

-récepteur de L'IL6

-récepteur à haute affinité pour les IgE (localisés sur les mastocytes et les polynucléaires basophiles. Pour obtenir une réponse, il faut le récepteur, l'IgE et l'antigène)

-récepteur des IgG des mastocytes

-récepteur pour le transport transépithélial des IgA et des IgM

II SUPERFAMILLE DES LECTINES

Les lectines sont des protéines capables de reconnaître des glycoprotéines et des glucides, possédant donc une propriété de récepteur:

-récepteurs des glycoprotéines

ex: permettent au niveau hépatique l'endocytose des glycoprotéines circulantes

-récepteurs à faible affinité pour les IgE:

localisés sur les macrophages, les monocytes, les éosinophiles, les plaquettes, les lymphocytes B et T

-mécanisme de couplage mal connu

III RECEPTEURS MEMBRANAIRES DIVERS

III-1 Récepteur du NGF

-Le nerve growth factor (NGF) est le premier facteur de croissance décrit nécessaire au développement des fibres sympathiques et d'autres neurones. Il est sécrété par des cellules neuronales.

-Le NGF se lie aux récepteurs post-synaptiques et est internalisé par un mécanisme d'endocytose.

-C'est un récepteur constitué d'une seule chaîne peptidique présentant des homologies avec d'autres récepteurs (celui de l'EGF).

III-2 Récepteur des LDL

-Les LDL (low density lipoprotéine) assurent le transport du cholestérol sanguin et sa fourniture aux cellules.

-Mécanisme d'action: voir fig 1.

-Structure du récepteur humain des LDL: présence de 5 régions (voir fig 2)

-Mis en évidence sur des fibroblastes en culture, présence de ces récepteurs au niveau du foie (très riche), des lymphocytes et des membranes d'autres tissus (cortex surrénal, corps jaune ovarien)

-Différentes mutations intervenant sur le gène codant pour le récepteur sont responsables de modifications de sa synthèse ou de son fonctionnement (hypercholestérolémie; voir tableau 1 pour les anomalies des récepteurs des LDL).

-Régulation des récepteurs: la concentration intracellulaire de cholestérol est le principal régulateur de la biosynthèse des récepteurs des LDL. Si elle diminue, la biosynthèse du récepteur augmente; si elle augmente, la transcription du gène est réprimée. Les effecteurs physiologiques sont essentiellement alimentaires ou hormonaux.

-Les résines séquestrantes et les inhibiteurs de l'HMGCoA réductase agissent essentiellement en diminuant le pool intrahépatique de cholestérol. Les résines accélèrent le catabolisme du cholestérol en acides biliaires en freinant le cycle entérohépatique de ces derniers. Les inhibiteurs de l'HMGCoA réductase diminuent la synthèse de cholestérol intracellulaire (fig. 3).

III-3 Récepteur du ANP (peptide natriurétique auriculaire)

-Le récepteur synthétise lui-même le second messager en réponse à la liaison du ligand (possède une activité guanylate cyclase, production de GMPc)

-ANP: hormone polypeptidique, sécrétée par les cellules auriculaires cardiaques

-Augmente la diurèse et provoque une dilatation des vaisseaux sanguins par relaxation du muscle lisse vasculaire.

III-4 Récepteur de la GH

- L'hormone de croissance est sécrétée par l'hypophyse.
- 84% d'homologie entre le récepteur humain et celui de lapin
- Le nanisme de type Laron est une maladie génétique caractérisée par une résistance à la GH. Cette maladie serait due à des mutations ponctuelles dans le gène du R de la GH.

III-5 Récepteur de la PRL

- La prolactine est sécrétée par l'hypophyse antérieure et possède plus de 85 actions biologiques décrites actuellement. Son mécanisme d'action cellulaire est peu connu.
- Schéma de la structure du récepteur de la PRL : voir fig 4
- Son récepteur présente de grandes homologies structurales avec celui de la GH: voir fig 5. (ainsi que ceux de l'IL2, IL4 et l'érythropoïétine). Leurs gènes sont localisés sur le même chromosome humain (N°5)
- Homologie de séquence entre R PRL et R GH: voir fig 5; et distribution de ces deux R: voir tableau 2.
- Les récepteurs de la PRL sont présents dans la majorité des biopsies tumorales et dans les lignées cellulaires dérivées de ces tumeurs. Toutefois, leur rôle dans le cancer du sein reste controversé.

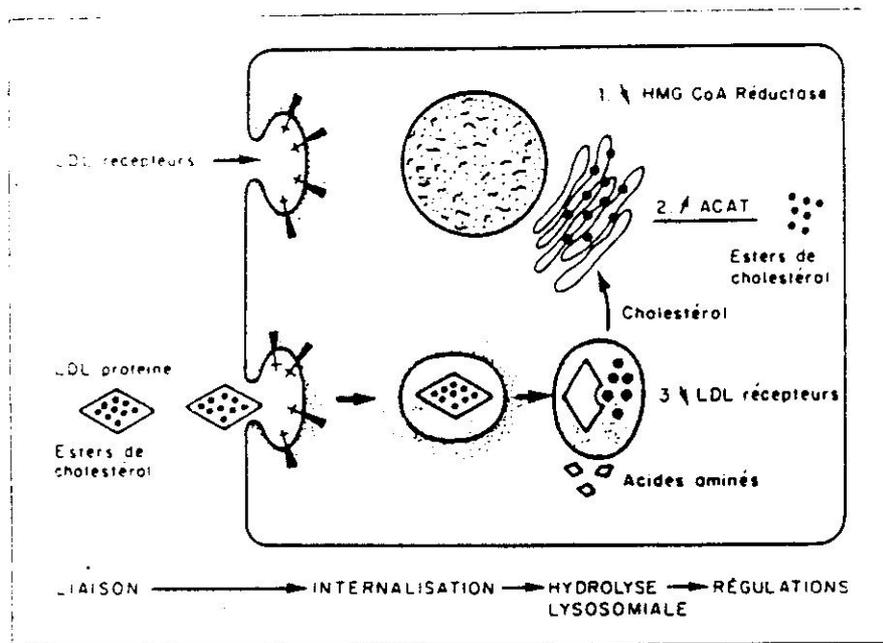


Figure 1 : Les récepteurs des LDL : mécanisme d'action.

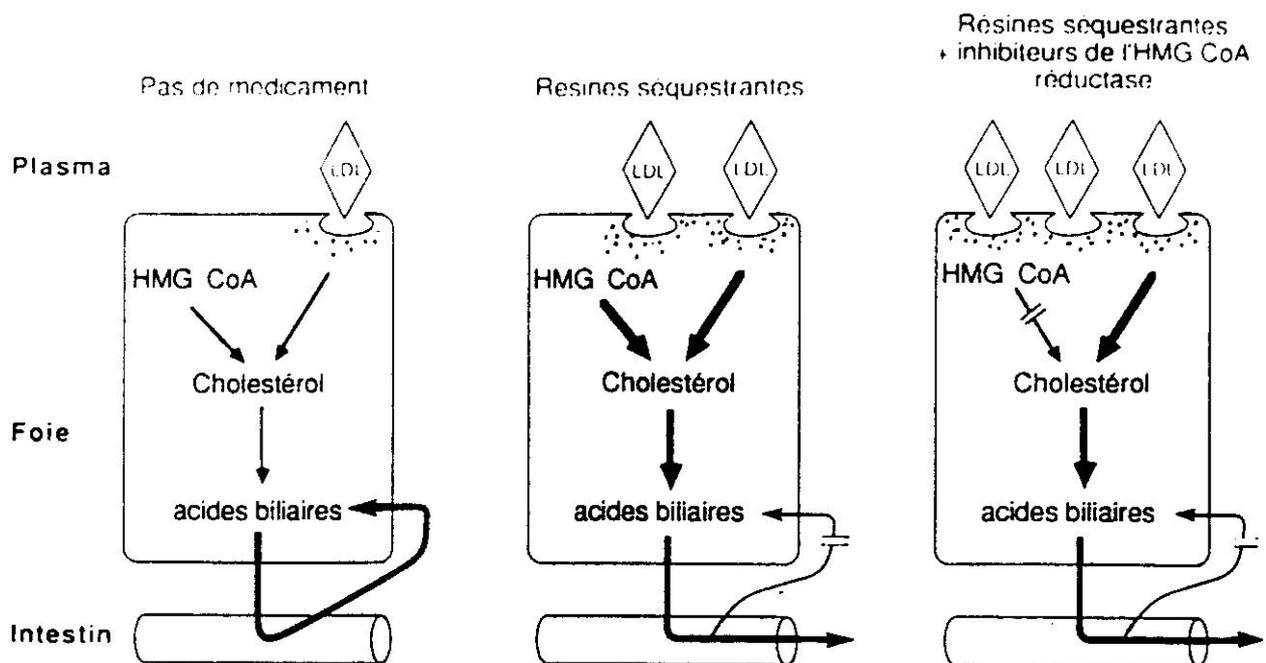


Figure 3 : Régulation hépatique des récepteurs des LDL par des effecteurs médicamenteux.

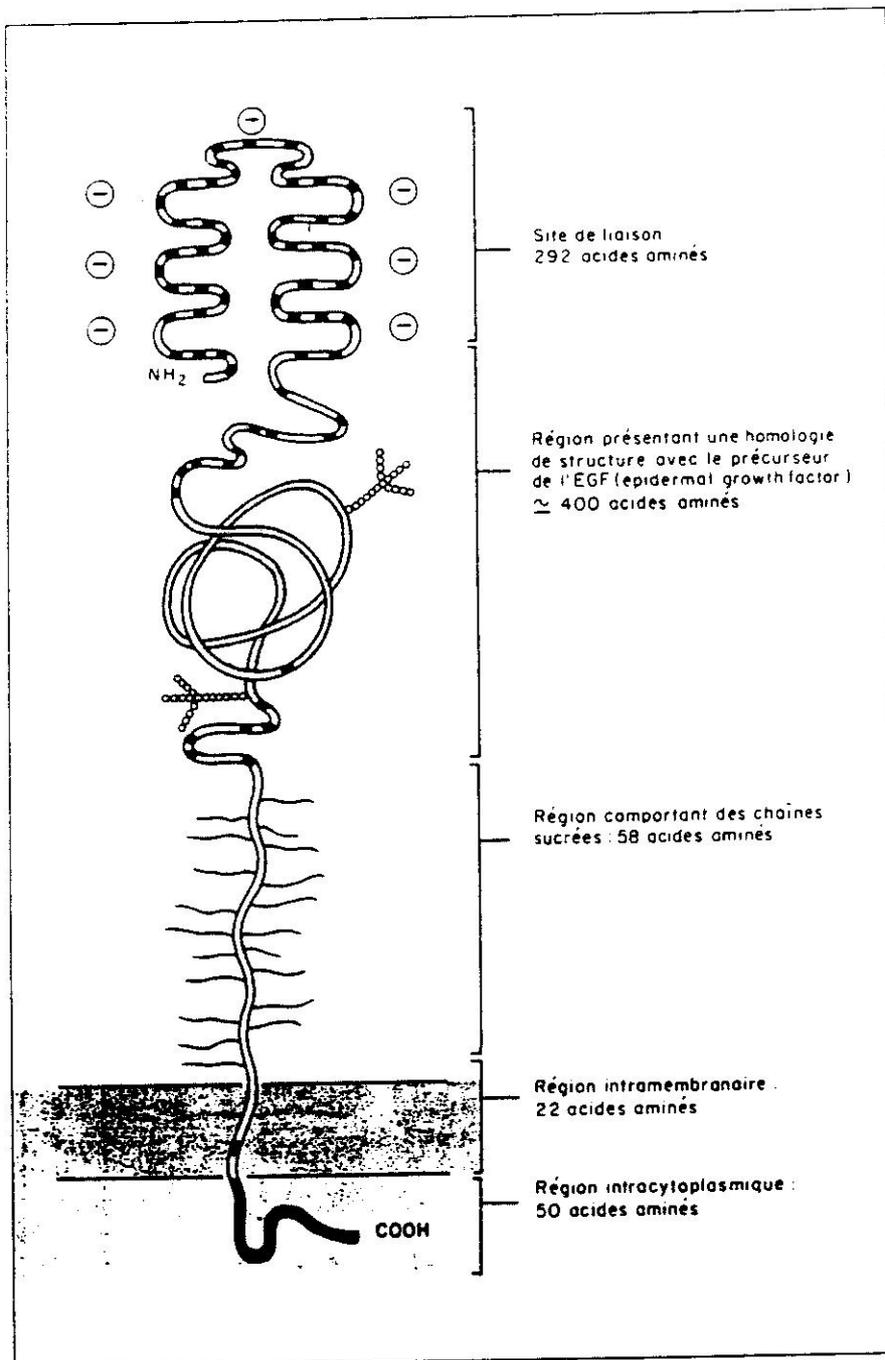


Figure 2 : Structure du récepteur des LDL.

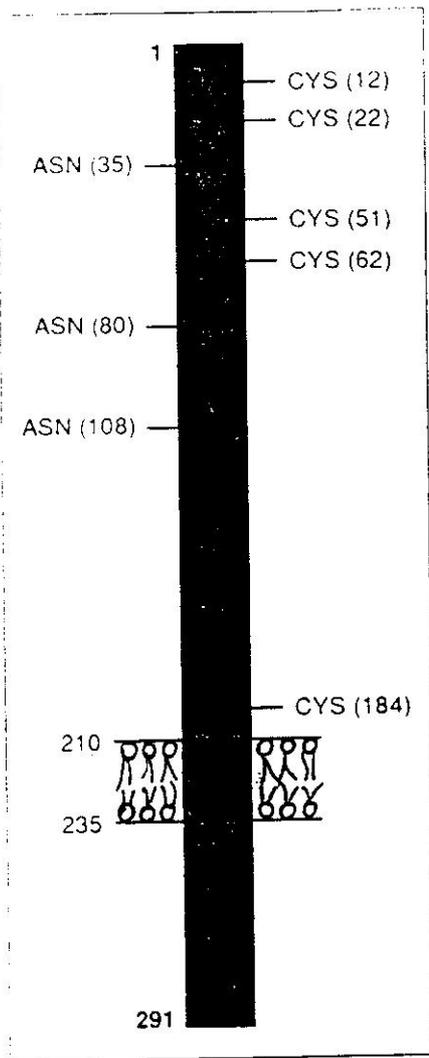


Figure 4 : Schéma de la structure du récepteur de la prolactine.

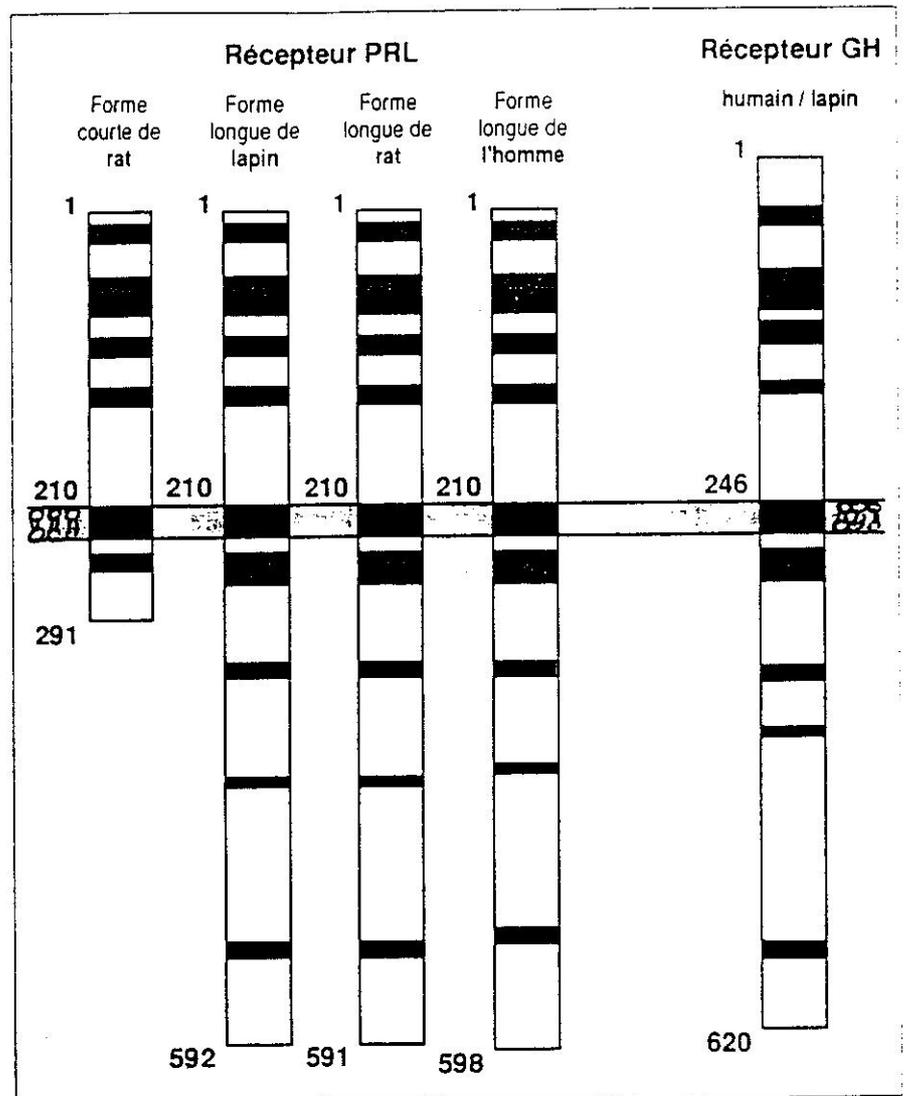


Figure 5 : Structure comparée des récepteurs de la prolactine de forme courte de rat, de forme longue de lapin, de rat et d'homme avec les récepteurs de l'hormone de croissance de foie de lapin et d'homme, clonés par le groupe de Genentech. Les chiffres représentent le premier acide aminé de la protéine mature, le dernier acide aminé de la région extracellulaire et le dernier acide aminé du récepteur. Les régions de haute homologie et d'homologie modérée sont indiquées.

Tableau 1 :

ANOMALIES DES RECEPTEURS DES LDL

Classes de mutation	Dénomination (1) de l'allèle	Masse apparente du récepteur sur gel SDS (kDa)		Localisation du récepteur				Liaison des LDL aux cellules intactes	Fréquence chez les patients atteints d'hypercholestérolémie familiale
		Précuseur	Récepteur mature	intra-cellulaire	membrane plasmique		extra-cellulaire		
					puits tapissés	région non tapissée			
Classe 1 Pas de précurseur détectable	RO	absent	absent					absente	fréquente
Classe 2 Anomalies de maturation du récepteur	R100 R120 R135	100 120 135	100 120 135	+ + +				absente absente absente	rare (libanais) fréquente rare
Classe 2 variante Maturation lente, faible liaison récepteur LDL	slow R120 ↓ 160b	120	160	+	(+)(2)			réduite	rare (Afrikaners, lapins WHHL)
Classe 3 Maturation normale. Anomalies de liaison récepteur-ligand	R140b- R160b- R210b-	100 120 170	140 160 210		+ + +			réduite réduite réduite	rare fréquente rare
Classe 4 Maturation normale. Liaison normale. Défaut de fixation des récepteurs au niveau des puits tapissés	R150i- Sec R160i- R155i-	110 120 115	150 160 155				(+) + +	+ liaison normale défaut d'internalisation	rare rare rare

Tableau 2 :

DISTRIBUTION DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE

Tableau 2	
DISTRIBUTION DES RECEPTEURS DE LA PROLACTINE ET DE L'HORMONE DE CROISSANCE	
Prolactine	Hormone de croissance
Glande mammaire normale Tumeur mammaire Foie Pancréas Rein Surrénale Placenta Ovaire : cellules de granulosa et corps jaune Testicule : cellules de Leydig Epididyme Vésicule séminale Prostate Lymphocytes Thymocytes Plexus choroïde Hypothalamus	Foie Tissu adipeux Lymphocytes Thymocytes Ovaire Corps jaune

RECEPTEURS POLYMERIQUES DE LA MEMBRANE PLASMIQUE INCLUANT UN CANAL IONIQUE

- Ces récepteurs, appelés récepteurs-canaux, sont constitués de plusieurs chaînes polypeptidiques étroitement associées, généralement 5, dont la conformation tridimensionnelle forme un canal ionique: ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs ionotropiques.

- Chaque chaîne présente plusieurs domaines transmembranaires.

- La liaison de l'agoniste entraîne une modification conformationnelle de l'ensemble, ce qui permet le passage des ions, dans le sens de leur gradient transmembranaire, par le canal (l'aspect électrophysiologique ne sera pas traité).

- Ces récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs constituant des canaux ioniques activés directement par un médiateur et dont l'activité est très rapide (1 micro-sec depuis la liaison de l'agoniste au passage complet des ions). Ils n'utilisent pas de seconds messagers.

Exemples de récepteurs appartenant à cette famille:

- récepteur nicotinique de l'Ach → Na⁺
- récepteur du GABA-A → Cl⁻
- récepteur 5-HT₃ de la sérotonine
- récepteur de la glycine (antagoniste sélectif: la strychnine)
- récepteur des acides aminés excitateurs: glutamate, aspartate

- Les sous-unités du récepteur nicotinique, du récepteur GABA-A et une sous-unité du récepteur de la glycine ont été clonées: une homologie de séquence, surtout importante au niveau des domaines transmembranaires et extracellulaires est présente (implication d'un gène ancestral ?).

- Deux classes peuvent être distingués:

- les R des médiateurs excitateurs, leur stimulation provoque une dépolarisation de la cellule (ex: R nicotinique, des acides aminés excitateurs)

- les R des médiateurs inhibiteurs, leur stimulation provoque une hyperpolarisation de la cellule (ex: R du GABA-A)

I LE RECEPTEUR NICOTINIQUE DE L'ACETYLCHOLINE

- Deux groupes d'effets de l'acétylcholine:

- effets de la nicotine: inhibés par le curare (récepteur nicotinique: inclut un canal ionique), réponses rapides (1ms) de courte durée;

- effets de la muscarine: inhibés par l'atropine (récepteur muscarinique: monomérique, métabotropique, associé aux protéines G), réponses lentes, de longue durée.
- Le récepteur nicotinique est localisé au niveau: du SNC, des ganglions du système nerveux autonome, des muscles squelettiques, des organes électriques du poisson torpille (à partir desquels sa purification a été effectuée).

I-1 Morphologie du récepteur

- Représentation schématique du récepteur nicotinique: voir fig 1
- Structure primaire des 4 sous-unités élucidée grâce aux techniques de biologie moléculaire

I-2 Canal sodique

- Vue schématique du canal: voir fig 2
- Importance du segment M2 de chaque sous-unité pour la formation du canal, par où entrent les ions sodium
- Les antagonistes non compétitifs (chlorpromazine) bloquent la conductance ionique en interagissant avec le récepteur dans la conformation où le canal est ouvert.

I-3 Sites de liaison de l'ACh

- 2 sites de liaison, non équivalents, situés sur les 2 sous-unités alpha du récepteur
- Quand l'ACh est liée, changement de conformation allostérique et canal ouvert pendant 1 msec avec passage d'environ 10 000 ions sodium.

I-4 Sites de liaison des antagonistes non compétitifs

- Sites d'interaction: voir fig3
- A haute affinité: situé dans le canal
- A basse affinité: situé à l'interface lipide/récepteur

I-5 Hétérogénéité des récepteurs nicotiniques

- Récepteurs musculaires: bloqués par l'alpha-bungarotoxine, de structure pentamérique $\alpha_2 \beta \gamma \delta$
- Récepteurs neuronaux: bloqués par la surugatoxine, de structure $\alpha_3 \beta_2$, localisés au niveau des ganglions et du système parasympatique, possède une perméabilité importante au calcium (entrée), sont régulés par l'AMPC,

-Différence entre les sous-unités alpha de différentes cellules

II RECEPTEURS DES ACIDES AMINES EXCITATEURS

-Classification de ces récepteurs en fonction de l'agoniste sélectif qui les reconnaît: R NMDA, R AMPA, R du Kaïnate, R L-AP4 et R métabotrope (voir cours de pharmacologie générale).

-Récepteur métabotrope stimule le métabolisme du phosphoinositol et n'appartient donc pas à la famille des récepteurs ionotropiques. Il serait formé d'une seule chaîne polypeptidique incluant 7 domaines transmembranaires.

-Récepteur NMDA (inclut un canal $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Ca}^{++}$), récepteur AMPA et récepteur du Kaïnate (incluent un canal Na^+/K^+) sont des protéines tétramériques, chaque sous-unité possède 4 domaines transmembranaires (voir fig 4). Leur conformation ressemble fortement à celle des récepteurs nicotiques mais leur structure primaire présente très peu d'homologie avec lui.

-La glycine est nécessaire à l'activation du récepteur NMDA elle possède un site de reconnaissance (insensible à la strychnine) et régule de façon allostérique la fonction du récepteur par facilitation des transitions induites par les agonistes vers l'état ouvert du canal

-70% d'homologie entre les récepteurs non-NMDA et le récepteur NMDA

-Importance de ces récepteurs qui induisent une modification de la concentration intracellulaire en Ca^{++} (R métabotrope favorise la libération de l'ion de ses sites de stockage via l'IP3 et R NMDA activé favorise l'entrée des ions du milieu extra-cellulaire vers le milieu intra-cellulaire).

III RECEPTEUR DU GABA-A

-Le GABA est le principal neuromédiateur inhibiteur du SNC. Il augmente la conductance au chlore de la membrane post-synaptique et entraîne une hyperpolarisation membranaire.

-Ses effets sont inhibés par la bicuculline, antagoniste compétitif du GABA.

-Il exerce ses effets biologiques par l'intermédiaire de plusieurs types de récepteurs dont les mieux caractérisés sont les récepteurs GABA-A et GABA-B. Le premier est directement associé à un canal chlore alors que le second est indirectement couplé à un canal cationique par l'intermédiaire d'un système de messagers différents. Leur distribution dans le SNC est différente mais ces différentes sous-classes conduisent toutes à l'inhibition neuronale. Ils induisent donc le même effet avec le même ligand. Qu'est-ce qui les différencie: voir tableau 1.

III-1 Récepteur GABA-B

-De structure monomérique

- Associé aux protéines G donc R métabotropique
- Leur activation entraîne l'activation de la phospholipase A2 ce qui provoque l'ouverture de canaux potassiques ou l'inhibition de canaux calciques.
- Localisés dans le SNC et le SNP

III-2 Structure des récepteurs GABA-A

- Structure pentamérique: $\alpha_2 \beta_2 \gamma_1$ ou δ_1 , représente la forme active
- Modèle topologique de la structure du récepteur GABA-A: fig 5
- Site de liaison du GABA sur l'extrémité extracellulaire des sous-unités bêta
- Site de liaison des benzodiazépines sur la séquence extracellulaire des sous-unités alpha
- Une séquence cytosolique longue avec un site potentiel de phosphorylation pour la protéine kinase A sur les peptides β
- Le canal chlore (fig.6) possède le site de liaison de la picrotoxine (antagoniste sélectif du canal chlore) situé à l'intérieur du canal.
- Il semblerait que la chaîne gamma soit nécessaire à l'action des BZD.

III-3 Hétérogénéité des récepteurs GABA-A

Il existe différentes sous-unités alpha, bêta, gamma, combinées de façon différente. Ces différents récepteurs GABA-A formés ont des localisations différentes au sein du SNC et présentent donc des différences au niveau de leur pharmacologie (sensibilités au GABA différentes et effets de potentialisations par les BZD différents). Actuellement, 13 gènes codant pour les différentes sous-unités du récepteur GABA ont été clonés.

III-4 Interaction avec les benzodiazépines

- Liaison aux sous-unités alpha des récepteurs GABA-A
- Augmentation de la liaison du GABA aux sous-unités bêta par allostérie
- Augmentation de l'entrée des ions chlorures dans la cellule par augmentation de la fréquence d'ouverture du canal
- Pas d'effet en l'absence du GABA
- Agonistes inverses: les bêta-carbolines (propriétés pharmacologiques inverses de celles des agonistes). Ils entraînent une diminution de l'entrée des ions chlorures induites par le GABA.
- Agonistes partiels (effet maximal inférieur à l'effet des agonistes)
- ligand endogène ?

III-5 Interaction avec les barbituriques et les stéroïdes

-Barbituriques: sédatifs et anticonvulsivants,
ils augmentent les effets inhibiteurs du GABA,
leur site précis d'action est mal défini.

-Les stéroïdes: progestérone et désoxycorticostérone sont sédatifs.
Leur site d'action précis est non défini.
Divers glucocorticoïdes sont antagonistes.

Le R est le site d'action de nombreuses autres molécules: des anesthésiques (ex: propofol), des anthelminthiques, des insecticides.

III-6 Récepteur GABA-C

Il existerait une 3e classe de récepteur GABA qui est stimulé par le GABA mais est insensible à la bicuculline et au baclofène!

III-7 Conclusion

La multiplicité des isoformes du récepteur GABA permet d'expliquer la diversité des effets biologiques de ce neurotransmetteur en différentes zones du cerveau.

Le développement d'agonistes partiels qui exploitent les différences de localisations régionales permet d'espérer une meilleure thérapeutique avec moins d'effets secondaires.

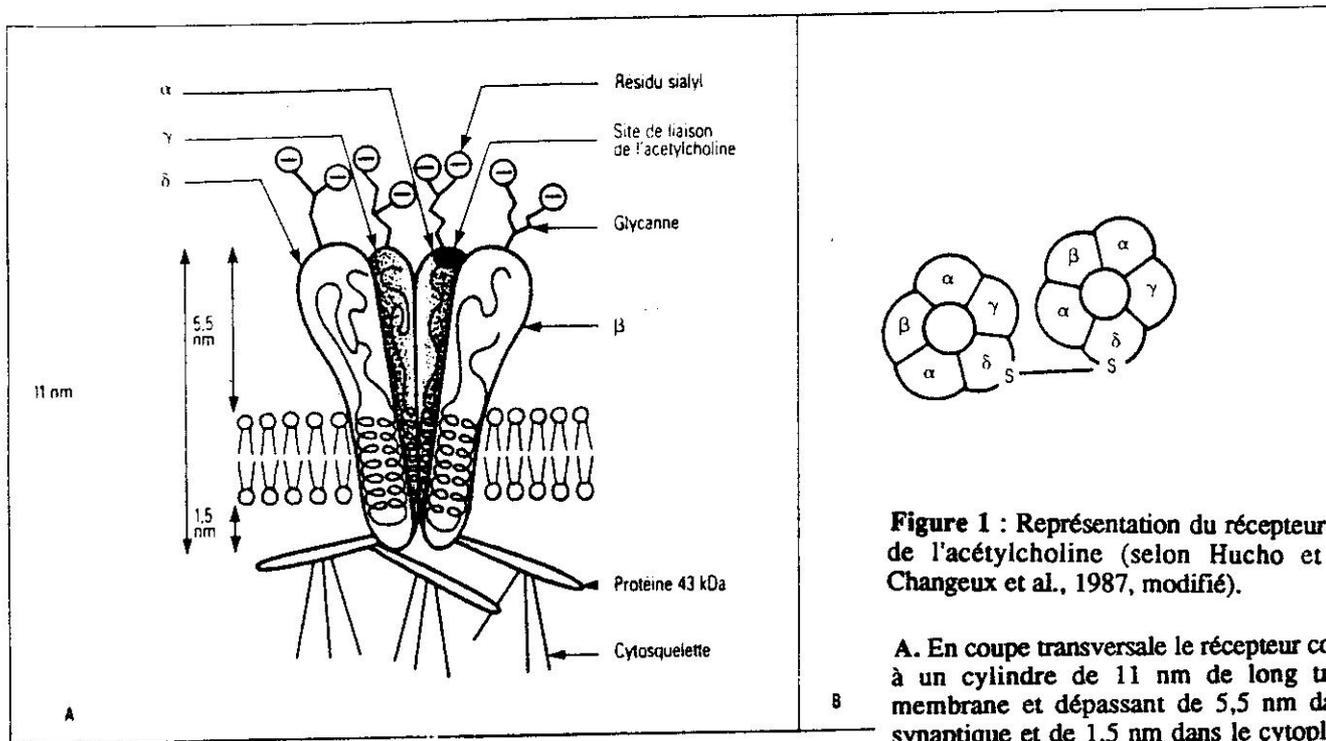


Figure 1 : Représentation du récepteur nicotinique de l'acétylcholine (selon Hucho et al., 1986, Changeux et al., 1987, modifié).

A. En coupe transversale le récepteur correspondant à un cylindre de 11 nm de long traversant la membrane et dépassant de 5,5 nm dans la fente synaptique et de 1,5 nm dans le cytoplasme. Les 5 sous-unités du récepteur ($\alpha_2, \beta, \gamma, \delta$) contiennent chacune 4 ou 5 segments transmembranaires). Des chaînes glucidiques greffées sur chaque sous-unité de côté N-terminal contiennent à leur extrémité (côté extracellulaire) des résidus d'acide sialique. Le canal ionique est central. Il est formé par un segment de chaque chaîne polypeptidique.

B. La microscopie électronique révèle des paires de rosettes de 8 nm de diamètre associées entre elles par les sous-unités δ par l'intermédiaire d'un pont disulfure.

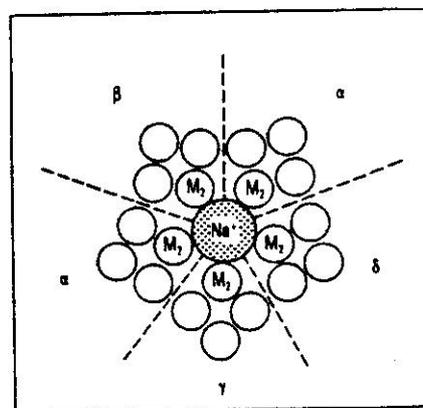


Figure 2 : Vue schématique du canal formé par le segment M_2 de chaque sous-unité polypeptidique ($\alpha_2, \beta, \gamma, \delta$) du récepteur nicotinique (selon Hucho et al., 1986).

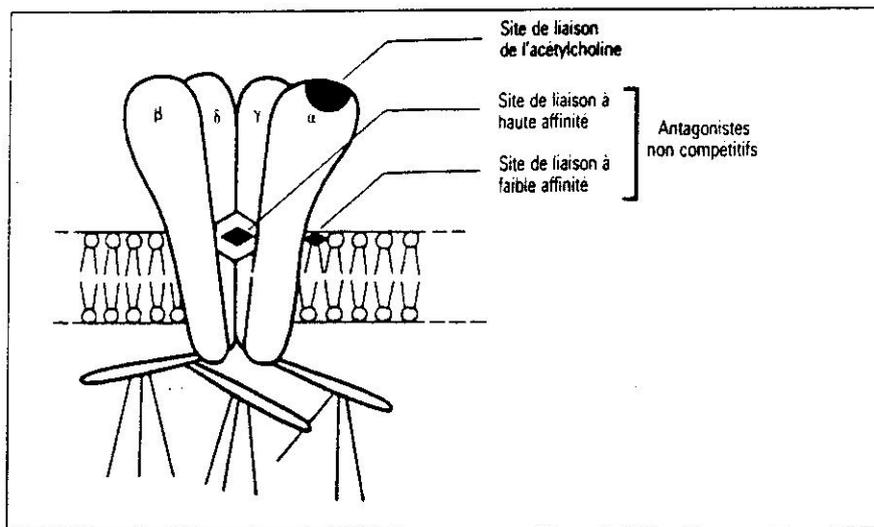


Figure 3 : Sites d'interaction de l'acétylcholine et des antagonistes non compétitifs. L'acétylcholine se lie à son site de liaison situé sur la sous-unité α . Les antagonistes non compétitifs se lient à un site à haute affinité situé préférentiellement dans le canal ionique et à un site à basse affinité situé à l'interface lipide-protéine (selon Hucho et al., 1986).

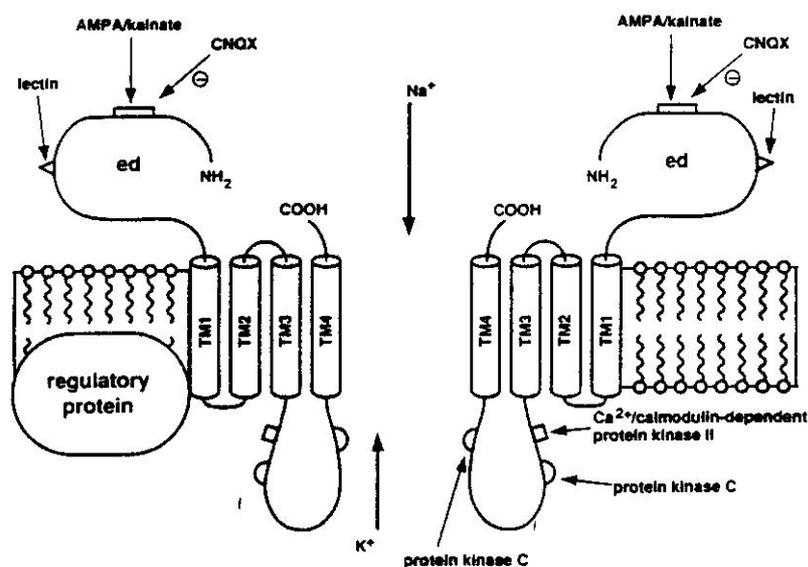


Figure 4 : Un modèle proposé pour un récepteur des acides aminés excitateurs avec 2 sous-unités α et β . Il est formé de 5 sous-unités, en analogie avec le récepteur nicotinique.

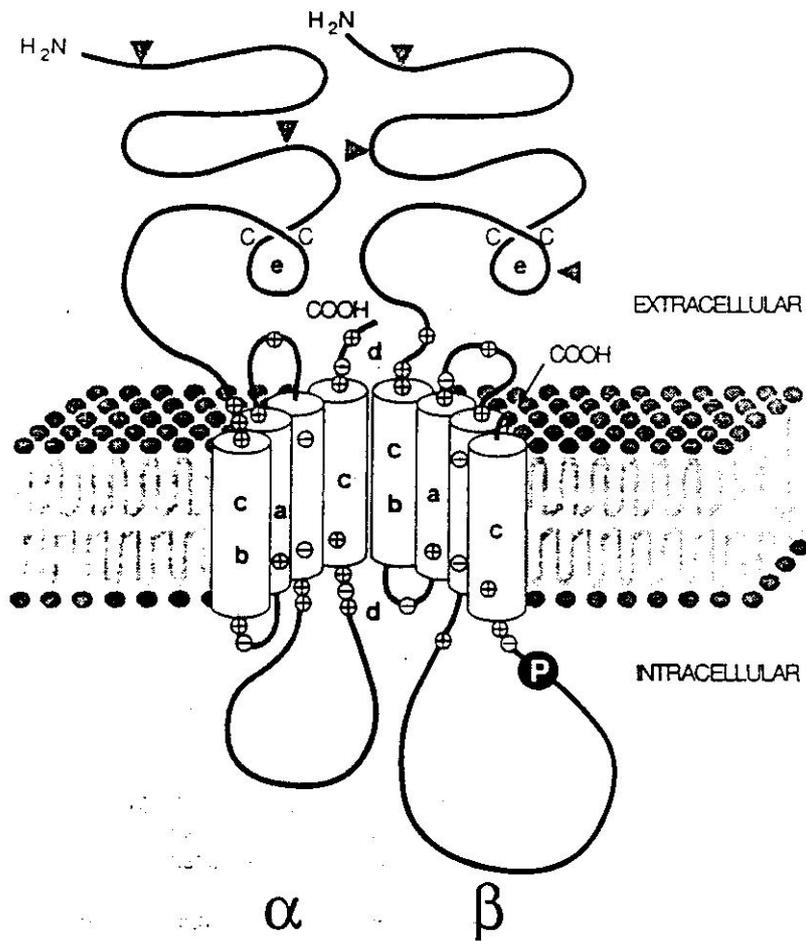


Figure 5 : Représentation schématique du récepteur GABA-A.
- Topologie transmembranaire.

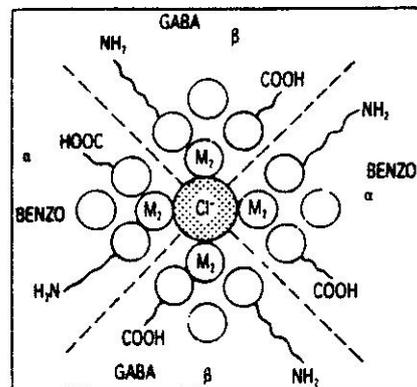


Figure 6 : Vue schématique du canal chlorure formé par les sous-unités α et β du récepteur GABA-A.

Tableau 1 :

PROPRIÉTÉS DES SYSTÈMES RÉCEPTEURS GABA_A ET GABA_B

Tableau I		
PROPRIÉTÉS DES SYSTÈMES RÉCEPTEURS GABA _A ET GABA _B		
	GABA _A	GABA _B
Agonistes	GABA muscimol 3-APS	GABA (-)-baclofène 3-APA
Antagonistes	bicuculline	phaclofène
Modulation de la liaison spécifique		
Dépendance vis-à-vis des ions		Ca ⁺⁺ et/ou Mg ⁺⁺
Effet du GTP		Diminution
Type de conductance modulée		
	Cl ⁻ (positivement)	Ca ⁺⁺ (négativement) K ⁺ (positivement)

3-APS : acide 3-aminopropyl sulfonique 3-APA : acide 3-aminopropyl phosphorique

RECEPTEURS DES HORMONES STEROIDES

- Les récepteurs des hormones stéroïdes (sexuelles: androgènes, progestatifs et "métaboliques", minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes); des vitamines A et D, et ses dérivés; et des hormones thyroïdiennes sont localisés à l'intérieur de la cellule cible.
- Ils forment une famille de récepteurs capables d'induire la transcription après avoir lié leur ligand.
- Les hormones stéroïdes et thyroïdiennes constituent une famille de ligands qui sont des facteurs de transcription nucléaire.
- Il existe une similitude de structure entre ces récepteurs (grande homologie dans la séquence primaire du site de liaison à l'ADN).

I STRUCTURE DES RECEPTEURS

- Tableau synoptique de ces récepteurs: voir tableau 1
- Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs des hormones stéroïdes: voir tableau 2
- Analogie de structure entre les différents récepteurs stéroïdiens dont la séquence est connue
- Ce sont des protéines oligomères constituées de :
 - sous-unités identiques: récepteurs des glucocorticoïdes (R G), R des androgènes (R A), R des oestrogènes (R E)
 - sous-unités différentes: récepteur de la progestérone (R P)
- Ils existent sous une forme non active associée à des protéines hsp, et sous une forme transformée activée capable de se lier à l'ADN.
- Structure complexe à plusieurs domaines fonctionnels (fig 1)
 - ex: le récepteur humain des glucocorticoïdes (G) comporte au moins trois domaines:
 - une région liant les glucocorticoïdes (partie Ct)
 - une région (partie Nt) sans fonction bien définie; des Ac spécifiques de ce domaine ont été synthétisés pour chaque type de récepteur et sont utilisés pour caractériser la présence d'un récepteur donné (intérêt immunologique)
 - une région centrale responsable de la liaison sur l'ADN (avec une structure en doigt contenant 2 atomes de zinc).
 - Le site de liaison à l'ADN est déterminant dans l'expression du complexe R/H, la capacité de ce site à se lier à l'ADN peut être modulée par les autres domaines du récepteur.
 - Les homologies de séquences dans chacune de ces deux régions pour des récepteurs d'une même classe provenant de différentes espèces sont considérables (80 à 100 %).

II ACTIVATION / TRANSFORMATION DES RECEPTEURS

Les R des stéroïdes, dans leur état inactif sont associés à des protéines de type "hsp" qui jouent un rôle inhibiteur.

La liaison de l'hormone entraîne une modification physico-chimique (dont une hyperphosphorylation) du R qui provoque la dissociation de cette protéine et qui se traduit par une augmentation de l'affinité pour le site de liaison à l'ADN nucléaire.

Ce processus d'activation n'est pas totalement élucidé.

Les R des hormones thyroïdiennes ne sont pas associés à une protéine inhibitrice. Ils sont présents dans le noyau sous une forme à haute affinité pour l'ADN. En absence de ligand, ces R auraient un rôle répresseur. Quand le ligand est fixé, l'effet répresseur est levé.

III LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES RECEPTEURS

-Des études de la localisation du récepteur des oestrogènes sur des cellules hypophysaires tumorales ont permis de montrer que le récepteur non activé est présent en grande majorité dans les nucléoplastes (exception: le récepteur des glucocorticoïdes coexiste dans le cytoplasme et le noyau).

IV SITES ACCEPTEURS NUCLEAIRES

-Les stéroïdes diffusent librement à travers la membrane dans les cellules en fonction du gradient de concentration dans les tissus.

-Le récepteur est phosphorylé après la liaison de l'hormone (par des kinases à activité hormonodépendante).

-Pour exprimer son effet au niveau génomique, le complexe R/H activé doit se fixer à un accepteur nucléaire.

V EFFETS GENOMIQUES

-Ce sont des effets à long terme qui apparaissent plusieurs heures ou jours après la stimulation.

-Modèle du mode d'action des récepteurs: fig 2

-Activations de gènes spécifiques entraînant une accumulation d'ARNm

-Synthèse de protéines responsables de l'effet observé au niveau cellulaire

-Une inhibition de synthèse protéique est également possible (ex: glucocorticoïdes qui induisent la répression du gène de la pro-opiomélanocortine).

-Un complexe R/H peut à la fois réprimer et activer certains gènes.

-la **vitamine D**, métabolisée en hormone stéroïde, se combine à son récepteur et produit des effets multiples à divers niveaux:

intervention dans le transport intestinal du calcium, le métabolisme minéral des os: stimulation de la transcription du gène de la CaBP (calcium binding protein) intestinale et de la BGP (bone gamma-carboxyglutamic acid protein) des ostéoblastes

réprime certains gènes dont ceux codant pour l'hormone parathyroïde, l'interleukine 2, le collagène

-l'oestrogène augmente le nombre de récepteur 5-HT1 et GABA-A ainsi que les ARNm de l'enképhaline dans le noyau ventromédian de l'hypothalamus

-les glucocorticoïdes induisent la synthèse de nombreuses protéines (glutamine synthétase, somatotropine, lipocortine).

Ils régulent négativement l'activité de la phospholipase A2 par l'intermédiaire de la synthèse de la lipocortine (fig 3)

VI EFFETS NON-GENOMIQUES

-Ce sont des effets à court terme de l'ordre de la seconde.

-Certains effets des hormones pourraient s'expliquer par des effets non génomiques.

-Ces propriétés sont dues à leur caractère lipophile et affectent principalement les membranes des cellules (ex voir tableau 3)

-Ex: les oestrogènes sont susceptibles de stimuler l'activité électrique de neurones du noyau pré-optique du cerveau ou de cellules hypophysaires, avec un temps de latence court incompatible avec une médiation génique et une néo-synthèse de protéines.

VII IMPLICATION DES RECEPTEURS DES HORMONES STEROIDES EN PATHOLOGIE

Plusieurs types de situations peuvent être envisagées:

-un récepteur normal, présent dans une cellule dérégulée, peut être à l'origine d'effets hormonaux favorables ou néfastes;

-un récepteur présentant des anomalies quantitatives ou qualitatives peut être à l'origine d'une hypersensibilité ou d'une résistance à l'action hormonale.

Les androgènes et les oestrogènes sont mitogènes dans certains tissus cibles et pourront donc avoir des effets néfastes dans des tumeurs affectant ces tissus cibles. Des traitements à base d'anti-hormone sont utilisés avec succès pour inhiber ces effets. En revanche, les glucocorticoïdes qui ont une action lytique sur certains tissus lymphoïdes sont utilisés dans le traitement des tumeurs affectant ces tissus.

VII I CONCLUSIONS

Il n'est pas possible avec les H et les anti-H stéroïdiennes d'obtenir une action sélective de certains tissus cibles ou au niveau de certains mécanismes moléculaires bien précis sans perturber le système endocrinien tout entier.

Certains progestatifs sont utilisés comme contraceptifs; ce sont des dérivés de synthèse ayant une bonne affinité pour les récepteurs de la Pg mais aussi pour d'autres R des stéroïdes, ils possèdent donc des effets indésirables. On recherche actuellement un progestatif ayant une forte affinité pour le R de la Pg uniquement.

Les anti-H sont utilisés pour l'instant pour contrer les effets des hormones dans les troubles liés à un excès d'hormone circulante ou à une exacerbation de la réponse hormonale (ex: anti-glucocorticoïdes dans le syndrome de Cushing; anti-estrogènes dans les hyper-estrogénies); ou au contraire à interférer ponctuellement avec un système hormonal parfaitement régulé comme le système reproductif pour le contrôle de la fertilité (anti-Pg).

Un troisième type d'indication thérapeutique des anti-hormones est le traitement des cancers hormonodépendants, l'anti-hormone venant inhiber la croissance de cellules tumorales contenant du récepteur.

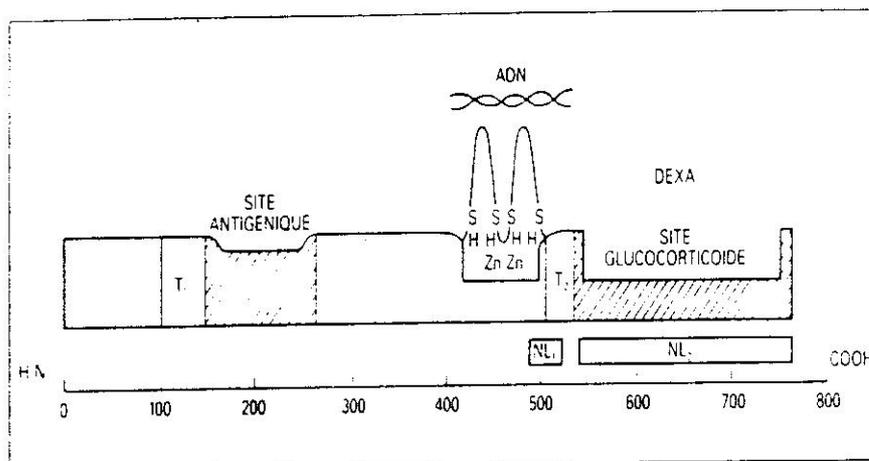


Figure 1 : Représentation schématique de la structure du récepteur des glucocorticoïdes humain. Différents domaines sont représentés : liaison des glucocorticoïdes (dexaméthasone ; DEXA) dans la partie C-terminale ; liaison à l'ADN avec sa structure en boucles ; domaine immunogénique, vers la partie N-terminale. Sont également représentés, des sites activateurs de transcription (T_1 et T_2) et des sites de localisation nucléaire, intervenant dans le transfert du récepteur cytoplasmique vers le noyau (NL_1 ; NL_2). A noter que NL_2 , contrairement à NL_1 , fait partie du domaine de liaison de la DEXA. L'échelle chiffrée correspond à la séquence des acides aminés.

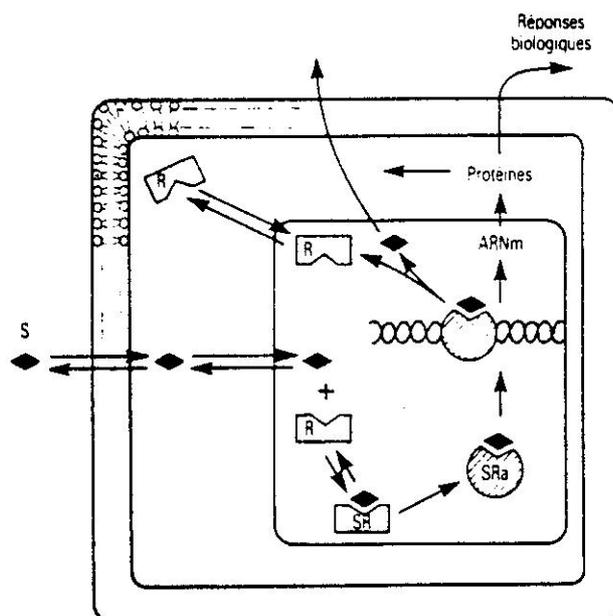


Figure 2 : Modèle "nucléaire" du mécanisme d'action sub-cellulaire des stéroïdes. Après liaison du stéroïde (S) au récepteur (R), le complexe SR est activé (SRa). Ce dernier se fixe à l'accepteur nucléaire et module l'activité de sites régulateurs de gènes, en induisant ou en réprimant la synthèse de l'ARN messager spécifique. Les protéines dont la synthèse est inhibée ou stimulée peuvent avoir des effets intra- et/ou extra-cellulaires. SR se dissocie et R peut être ensuite dégradé ou recyclé. A noter la nécessité d'une néosynthèse du récepteur au niveau du cytoplasme et de son "transfert" vers le noyau.

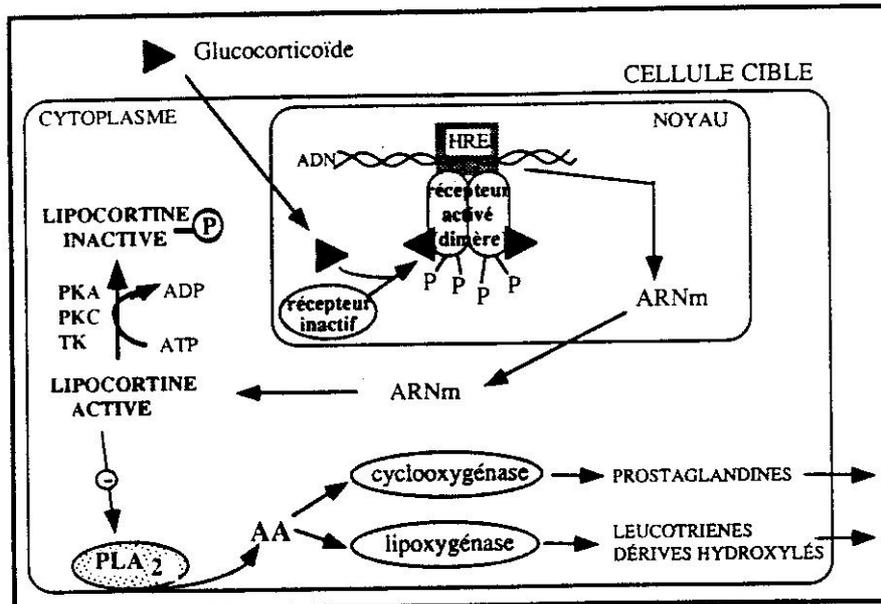


Figure 3 : Modulation de l'activation de la PLA₂ par les glucocorticoïdes.

Tableau 1

Récepteur	MW constante sédimentation	Localisation	Molécules associées	Kd	gène cloné	Anticorps	Effets biologiques	Interactions avec le DNA
Androgènes	3.3S → 3S 60-70 K 86 K 38 K	Nucléaire	Zinc protéine 56 K inhibiteur stable	0,1-0,5 nM	--	anticorps polyclonaux	transcription	Transfections consensus
Gluco-corticoïdes	94 K 4 S	Nucléaire et Cytoplasmique	tRNA inhibiteur stable	10 nM	oui	monoclonaux polyclonaux	transcription post- transcription	Footprints DNase transfections consensus
Oestrogènes	55-65 K 4-5 S	Nucléaire	kinase inhibiteur stable	0,1-0,5 nM	oui	monoclonaux polyclonaux	mutagène transcription post- transcription	Exonucléase protection transfections consensus
Progestérone	110 K 4 S	Nucléaire	90 Kd heat shock protéine kinase inhibiteur stable	2-4 nM	oui	monoclonaux polyclonaux	transcription post- transcription	Footprints DNase transfections consensus
Minéralocorticoïdes		Nucléaire		2-4 nM		non	transcription	
Vitamine D	96 K 55 K - 60 K 3,5 S	Nucléaire	Zinc	2-4 nM	en cours	monoclonaux	transcription	
Écystérols	130 Kd 9 S	Nucléaire		0,7-3 nM		non	transcription Balbani R/lings	Photocross- linking transfections

Tableau 2 : Principaux agonistes et antagonistes des récepteurs des hormones stéroïdes.

Groupe	Agonistes	Antagonistes
Glucocorticoïdes	cortisol cortisone corticostérone dexaméthasone RU 26988	RU 38486 cortexolone progestérone
Minéralocorticoïdes	aldostérone désoxycorticostérone	spiro lactone RU 26752 RU 28318
Androgènes	testostérone dihydrotestostérone	acétate de cyprotérone RU 38882
Progestagènes	progestérone RU 5020	RU 38486 RU 2323
Œstrogènes	œstradiol-17 β diéthylstilbestrol RU 2858	tamoxifène nafoxidine LY 117018

REGULATION DES RECEPTEURS

Les récepteurs membranaires jouent un rôle déterminant dans le contrôle des activités cellulaires. Leur régulation est un phénomène d'adaptation rapide et appropriée en réponse à des changements environnementaux.

La régulation des récepteurs par différents facteurs est capable de moduler leur réponse physiologique aux agonistes endogènes aussi bien que celle aux médicaments spécifiques.

Définition du vocabulaire utilisé pour caractériser les phénomènes de régulation:

-Désensibilisation: diminution de la réactivité cellulaire à un médiateur ou à un médicament après stimulation prolongée de la cellule par cet agent ou par un agoniste agissant sur le même récepteur

-Hypersensibilité: augmentation de la réactivité de la cellule après une période prolongée de blocage ou de non stimulation du récepteur ou des mécanismes intracellulaires de transduction

-Phénomène homologue: modification de la réactivité cellulaire uniquement au facteur l'ayant induit

-Phénomène hétérologue: modification de la réactivité cellulaire à d'autres facteurs que celui responsable du phénomène

I MECANISMES DE MODULATION DES RECEPTEURS

Ces mécanismes peuvent correspondre à une modification structurale du récepteur, à une modification du nombre des récepteurs; à une modification des mécanismes de transduction du message.

I-1 Séquestration des récepteurs

Ce sont des mécanismes de désensibilisation rapides et transitoires faisant intervenir la phosphorylation de résidus situés du côté cytoplasmique de la cellule.

I-2 Modification d'origine génétique

Il en existe différents:

-défauts pré-réceptoriels tels que:

- altération de la structure moléculaire de l'hormone (affinité et/ou activité diminuée);
- présence d'anticorps anti-récepteur;
- formation d'anticorps anti-hormone;
- défauts réceptoriels tels que:
 - absence du récepteur;
 - diminution du nombre de récepteur;
 - diminution de l'affinité des ligands pour le récepteur.
- Exemples de défauts génétiques: voir tableau 1

I-3 Modification induite du nombre des récepteurs

C'est une régulation dynamique liée à une modification cinétique des mécanismes de synthèse et/ou de dégradation des récepteurs (fig 1): on observe une augmentation du nombre de récepteurs quand il y a un déficit fonctionnel de la transmission (ce phénomène est appelé "up-regulation"), ou une diminution de ce nombre quand il y a un excès fonctionnel (c'est alors une "down-regulation"). Ces phénomènes peuvent être considérés comme compensatoires.

I-4 Modification de la fonction des récepteurs par phosphorylation / déphosphorylation

La phosphorylation des récepteurs entraîne une modification de leur fonction ou de leur distribution.

Désensibilisation homologue: diminution de l'efficacité d'un agoniste sans modification du nombre de récepteur

Un deuxième type de protéine-kinase phosphorylerait le récepteur ayant lié l'agoniste provoquant une diminution de l'affinité pour cet agoniste, donc une diminution de la réponse fonctionnelle qui suit sa stimulation.

Désensibilisation hétérologue: le premier récepteur, activé par une hormone ou un neurotransmetteur, peut provoquer la phosphorylation de récepteurs d'autres médiateurs.

Les récepteurs couplés à la phospholipase C, à la tyrosine-kinase, le récepteur GABA A sont régulés par des mécanismes de phosphorylation.

Il en est de même pour la plupart des récepteurs couplés à la protéine G.

I-5 Modification distale de la fonction des récepteurs

Ce sont des modifications intéressant les événements biochimiques intracellulaires les plus en aval de l'activation des récepteurs par leurs agonistes par exemple: augmentation du Ca^{++} intracellulaire, activation de protéines kinases, phosphorylation de divers substrats.

II MODIFICATIONS PHYSIOLOGIQUES DES RECEPTEURS

II-1 Modifications en fonction de l'âge

On peut observer:

- une élévation du nombre pendant le développement de l'organisme (ex: le récepteur bêta adrénergique pulmonaire chez le fœtus au début du fonctionnement pulmonaire) ↑ RSP
- après la naissance, une diminution de la réactivité cardiaque des récepteurs bêta-adrénergiques expliquée par un ralentissement du renouvellement des récepteurs, couplé à une augmentation des récepteurs alpha-adrénergiques ↓ RPA
- l'âge est associé à un abaissement global de la réponse post-réceptorielle à différents agonistes.
ex: effets bronchodilatateur et vasodilatateur de l'isoprénaline; effet vasoconstricteur de l'histamine, de la sérotonine, de la noradrénaline
- au contraire, effet antihypertenseur de la kétansérine (antagoniste 5-HT₂) plus prononcé chez les sujets âgés (mécanisme inconnu)

II-2 Modifications induites par une fonction endocrine

Les fonctions endocrines agissent souvent de façon permissive.

Exemples:

- les glucocorticoïdes potentialisent les effets des catécholamines, l'administration de cortisone, d'hydrocortisone ou de dexaméthasone induit chez l'animal une élévation du nombre de sites bêta-adrénergiques (mécanisme: inhibition de la recapture, augmentation du nombre de récepteur, de l'affinité, potentialisation du système de couplage ?);
- les estrogènes augmentent la contractilité utérine induite par les agonistes alpha-adrénergiques, la progestérone induit l'effet inverse (diminution des récepteurs bêta, effets lents, mécanisme au niveau de la synthèse des récepteurs ?);
- les hormones thyroïdiennes augmentent sélectivement les réponses; phénomène dépendant des récepteurs bêta₁-adrénergiques avec une spécificité tissulaire (l'hyperthyroïdisme est accompagné d'une augmentation du nombre de sites ce qui est expliqué par une sensibilisation des sites

internalisés préexistants suivie d'une synthèse de novo); dans l'hypothyroïdisme l'effet inverse est observé;

-la prolactine et l'hormone de croissance exercent un contrôle négatif (down-régulation) sur leurs propres récepteurs. Cette régulation négative s'exerce soit à des concentrations, soit à des durées d'exposition à l'hormone plus élevées que pour la régulation positive.

III MODIFICATIONS DES RECEPTEURS DANS DIFFERENTES PATHOLOGIES

Exemples

-L'asthme

On observe une hyperactivité bronchique provenant de:

-une libération anormalement importante de médiateurs de l'inflammation (histamine, leucotriènes, PAF-acéther),

-et un dysfonctionnement du système nerveux autonome (hypertonie du système parasympathique) d'où un pouvoir bronchodilatateur amoindri du système bêta adrénergique (baisse du nombre et de l'affinité?, production d'anticorps anti-récepteurs?);

Les indicateurs de l'asthme peuvent être les lymphocytes qui possèdent des récepteurs bêta adrénergiques.

-La chorée de Huntington

On observe des mouvements anormaux et une démence progressive.

Dans le striatum, une diminution du nombre des récepteurs muscariniques, une diminution de la transmission GABA et une augmentation des transmissions DA et NA sont mesurées.

-Le diabète hyperinsulinémique avec une résistance au traitement prolongé par l'insuline

Une faible densité des récepteurs à l'insuline est mesurée.

-Les maladies cardio-vasculaires

Dans certains modèles d'insuffisance cardiaque, on observe une diminution initiale des récepteurs bêta (cause primaire?), puis une augmentation de leur nombre (mécanisme compensatoire).

IV MODIFICATIONS DES RECEPTEURS PROVOQUEES PAR UN TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE

L'usage répété de certains agents pharmacologiques met en évidence des propriétés qui sont à l'origine des phénomènes de tolérance et de dépendance.

IV-1 Désensibilisation par un traitement de longue durée

La tolérance est la perte d'intensité de la réponse pharmacologique à l'administration d'une drogue à la suite d'une administration préalable généralement répétée.

L'obtention du même effet thérapeutique nécessite une augmentation des doses administrées.

Exemples de traitements entraînant un tel phénomène:

les antidépresseurs tricycliques

Ils diminuent la recapture des monoamines donc augmentent leur taux dans l'espace synaptique; ceci entraînant la diminution de la réactivité des récepteurs bêta 1 adrénergiques après un long traitement.

-les benzodiazépines

Elles augmentent l'affinité du GABA pour son site. Cette augmentation sera diminuée après un long traitement, de même que les effets électrophysiologiques correspondants.

IV-2 Syndromes de sevrage

La dépendance est l'état dans lequel la drogue est requise pour maintenir les fonctions physiologiques normales, ou l'effet thérapeutique. L'arrêt brutal de l'administration de la drogue entraîne des troubles dits de sevrage ou d'abstinence. Les troubles sont en général opposés aux effets de la drogue.

Exemples de traitements provoquant ce syndrome:

les antagonistes bêta-adrénergiques

L'infarctus du myocarde observé après un long traitement au propranolol (utilisé dans l'angine de poitrine, dilate les coronaires sans augmenter le travail cardiaque) est expliqué par une hypersensibilité aux catécholamines, elle-même due à une augmentation du nombre (50%) des récepteurs bêta-adrénergiques qui s'est développée pendant le traitement et qui persiste plusieurs jours après l'arrêt de ce traitement. Cet arrêt doit s'effectuer sur 1 à 2 semaines.

-les antagonistes DA ou neuroleptiques

Après un long traitement (environ 6 mois, et le sujet présente une diskénie tardive souvent irréversible), les récepteurs sont dans un état d'hypersensibilité (c'est un phénomène de compensation au blocage permanent). A l'arrêt brusque du traitement, on observe une réactivité accrue aux molécules se traduisant par des troubles endocriniens, psychiatriques et neurologiques.

-Les morphiniques

Les morphiniques sont utilisés dans le traitement des douleurs chroniques.

La tolérance à la morphine disparaît rapidement au cours de la période qui suit l'arrêt de l'administration chronique et coïncide avec son élimination.

Les antagonistes sont utilisés en chronique quand le sevrage est terminé pour prévenir les rechutes

Le syndrome de sevrage se manifeste par une hyperventilation, hyperthermie, diarrhée, vomissement, anxiété.

IV-3 Importance thérapeutique

-l'arrêt progressif d'un traitement est impératif pour éviter le syndrome de sevrage

-l'adaptation du traitement pour les enfants et les sujets âgés

-les leucocytes et les plaquettes sanguines utilisés comme témoins de l'état des récepteurs (en particulier :es R NA α et sérotoninergiques.

V CONCLUSION

Concept "dynamique" du récepteur tenu en considération pour la compréhension des mécanismes thérapeutiques des médicaments.

Défauts pré-receptoriels

(« défauts secondaires »)

Modification de la structure moléculaire de l'hormone (parathormone, thyrotrophine, insuline)

Anticorps antihormones : insuline

Anticorps antirecepteurs : récepteur de l'insuline, récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine, récepteurs β_2 adrenergiques...

Défauts réceptoriels (« défauts primaires »)

Absence de récepteur :

récepteur intracellulaire : féminisation testiculaire complète

récepteur membranaire : résistance à l'insuline de type D

Diminution du nombre de récepteurs :

récepteur intracellulaire : syndrome de Reifenstein (= pseudohermaphrodisme incomplet chez le sujet mâle)

récepteur membranaire : résistance à l'insuline de type A

Diminution de l'affinité des récepteurs :

récepteur intracellulaire : résistance au cortisol

récepteur membranaire : diabète insipide néphrogénique

Défauts post-receptoriels

Modification des mécanismes de couplage

Tableau 1 : Quelques exemples de défauts génétiques des transmissions neurohumorales.

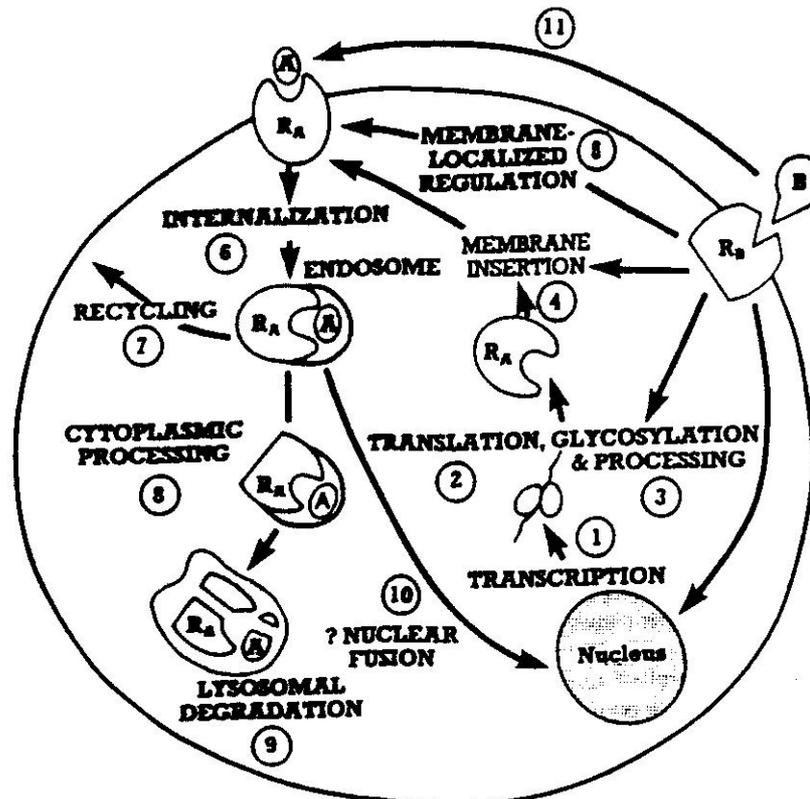


Figure 1 : Niveaux de contrôle de la régulation des récepteurs.

Bibliographie:

- "PHARMACOLOGIE - DES CONCEPTS FONDAMENTAUX AUX APPLICATIONS THERAPEUTIQUES", publié par M. SCHORDERET et collaborateurs (SLATKINE-1988).

- "PHARMACOLOGIE CLINIQUE - BASES DE LA THERAPEUTIQUE", publié par J.P. GIROUD, G. MATHE, G. MEYNIEL. (EXPANSION SCIENTIFIQUE FRANCAISE-1988).

- "PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE - MECANISME D'ACTION DES MEDIEATEURS ET DES MEDICAMENTS", publié par Y. LANDRY ET J.P. GIES (MEDSL/McGRAW-HILL).

- "BASES DE PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE", publié par J.P. GIES (ELLIPSES)

- "AIDE MEMOIRE DE PHARMACOLOGIE", publié par J.L. ELGHOZI et D. DUVAL (FLAMMARION)

- "ATLAS DE POCHE DE PHARMACOLOGIE", publié par H. LÜLLMAN, K. MOHR ET A. ZIEGLER (FLAMMARION-MEDECINE/SCIENCES)

- "MEDECINE / SCIENCES", vol 9 : 12-20, 1993

EVALUATION DU COURS DE PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE

Ce questionnaire anonyme me permettra de mieux comprendre la façon dont est perçu le cours et d'apporter des modifications en vue d'une amélioration. Merci de consacrer quelques minutes pour répondre aux questions et de me faire parvenir cette feuille soit en fin de cours soit au laboratoire de neuropharmacologie.

Ce cours

est intéressant	oui	non
est clair	oui	non
est bien illustré	oui	non
établit des liens avec les autres disciplines	oui	non
atteste d'un effort de pédagogie	oui	non

Le polycopié est

complet et de bonne qualité	oui	non
indispensable	oui	non

Les ED sont

efficaces pour la compréhension du cours	oui	non
pas assez nombreux	oui	non

Suggestions d'amélioration à apporter pour les prochaines années: