

**ETUDE DU MECANISME D'ACTION D'UNE MOLECULE
NOTIONS AGONISTES/ ANTAGONISTES**

22 et 24 Octobre 2009

Exercice 1

Les peptides opioïdes endogènes interviennent, via la fixation sur des récepteurs membranaires couplés aux protéines G, dans la modulation de la sensation de la douleur, dans la motilité gastro-intestinale, dans la production et la sécrétion d'hormones neuroendocriniennes et dans les réponses immunitaires.

Les auteurs ont en leur possession plusieurs peptides qui de part leur structure comparable à des peptides opioïdes endogènes connus représentent des ligands potentiels des récepteurs aux opioïdes.

Question 1 : Quels est le mode de fonctionnement d'un RCPGs ?

Voir le cours sur les RCPGs (diapo n°6)

Le tableau ci-dessous donne les résultats d'une étude de déplacement d'équilibre (compétition) de la [³H] naloxone (ligand des récepteurs μ) par différents peptides. **(le DAMGO est une molécule de référence)**

No.	Peptide	IC ₅₀ (nM)
1	DAMGO	1.22 ± 0.12
2	Endomorphine-1	0.97 ± 0.22
3	Endomorphine-2	3.90 ± 0.20
4	Morphiceptine	79.4 ± 3.4
5	[D-1-Nal ³]Endomorphine-2	89.1 ± 3.8
6	[D-1-Nal ⁴]Endomorphine-2	14.0 ± 1.25
7	[D-2-Nal ⁴]Endomorphine-2	19.5 ± 2.10
8	[D-1-Nal ³]Morphiceptine	1.90 ± 0.20
9	[D-2-Nal ³]Morphiceptine	158 ± 11
10	[Dmt ¹ , D-1-Nal ³]Morphiceptine	0.33 ± 0.02

Question 2: Rappeler le principe de l'expérience de compétition et ce qu'est une IC50.

L'expérience de compétition sert à identifier un ou une famille de récepteurs sur lequel la molécule d'intérêt pourrait se lier. Elle consiste à mettre en compétition une concentration (en général le Kd) d'un ligand radioactif connu pour se fixer sur tel ou tel

récepteur et des concentrations croissantes de la molécule d'intérêt non radioactive. Si cette dernière est spécifique de ce récepteur, elle déplacera l'équilibre.

L'IC50 est la concentration de la molécule d'intérêt qui permet d'obtenir 50% d'inhibition.

Question 3 : Déterminer les molécules représentant un intérêt pour les auteurs. Justifiez votre réponse par des critères pharmacologiques.

Nous devons choisir parmi les molécules qui présentent les IC50 les plus faibles, donc une « bonne » affinité. De ce fait, nous gardons les molécules 1,2,3,8 et 10.

Les auteurs ont réalisés d'autres expériences afin de mieux caractériser ces peptides. Ils ont donc réalisé des études doses-réponses selon différents protocoles (Figures 1 et 2)

Question 4 : Analyser la figure 1 et 2. Que pouvez-vous conclure quant à la nature agoniste ou antagoniste de ces molécules ? Justifiez votre réponse.

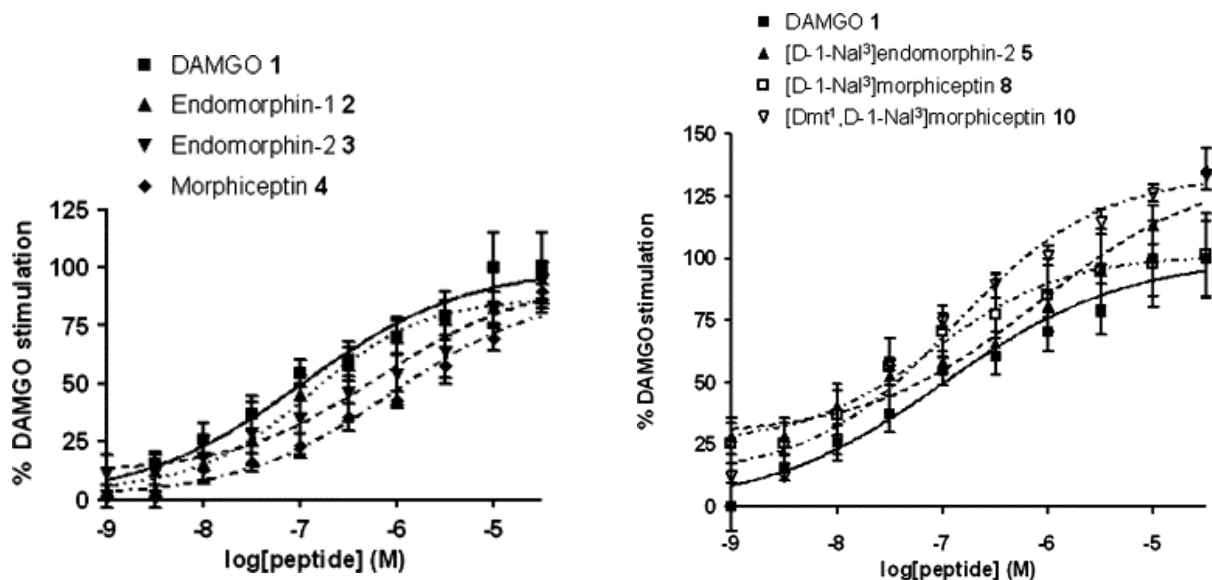


Figure 1 : Relation effet-dose de la liaison du GTP gamma S après stimulation des récepteurs μ opioïdes par différents ligands. Les résultats sont à comparer avec la courbe produite par le DAMGO.

La figure 1 représente la relation dose réponse de la liaison du GTP gamma S après stimulation des récepteurs μ opioïdes par différents ligands. Nous remarquons que toutes les molécules entraînent la liaison du GTP gamma S et ont donc un effet propre. Ce sont donc des agonistes. Afin de déterminer il s'agit d'agonistes entiers ou partiels, il est nécessaire de comparer les effets dose-réponse des molécules d'intérêt à la courbe dose réponse du DAMGO (référence). Dans le cas de la figure 1A, il s'agit d'agonistes entiers puisque l'on observe le même effet max (efficacité). Dans le cas de la figure 1B, pour deux d'entre elles, il s'agit de super-agonistes puisque les effets max sont supérieurs à ceux de la référence.

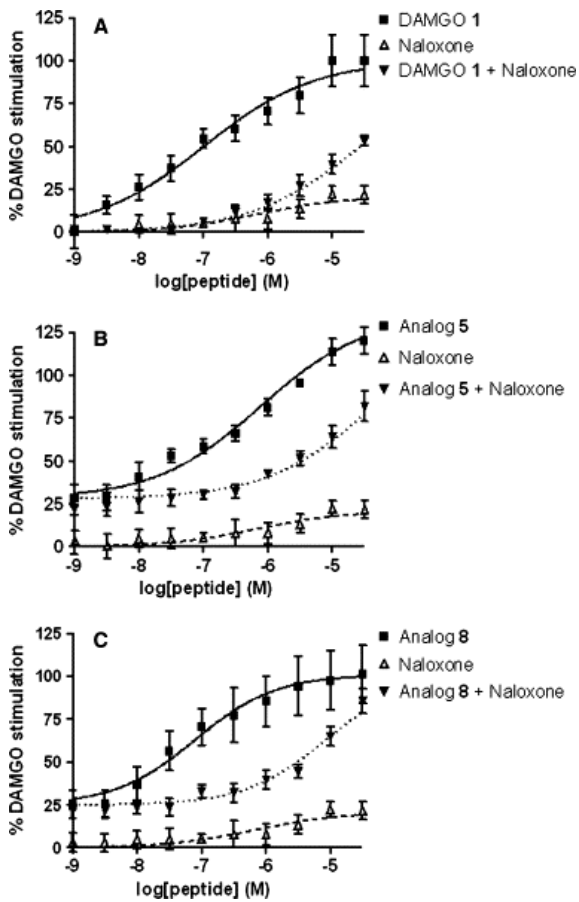


Figure 2 : Relation effet-dose de la liaison du GTP gamma S stimulé par le DAMGO, l'endomorphine-2 et la morphiceptine en absence ou en présence de naloxone (antagoniste des récepteurs μ)

Cette figure montre bien le caractère super-agoniste de l'analogue 5 et 8, puisque même en présence d'un antagoniste, elles stimulent de façon plus importante la liaison du GTP gamma S par rapport à la référence (DAMGO+naloxone). En effet, l'Emax est plus important (75% pour les analogues au lieu de 50% pour le DAMGO).

Question 5 : Analyser la figure 3. Que pouvez vous conclure quant à la nature agoniste ou antagoniste de ces molécules ? Justifiez votre réponse.

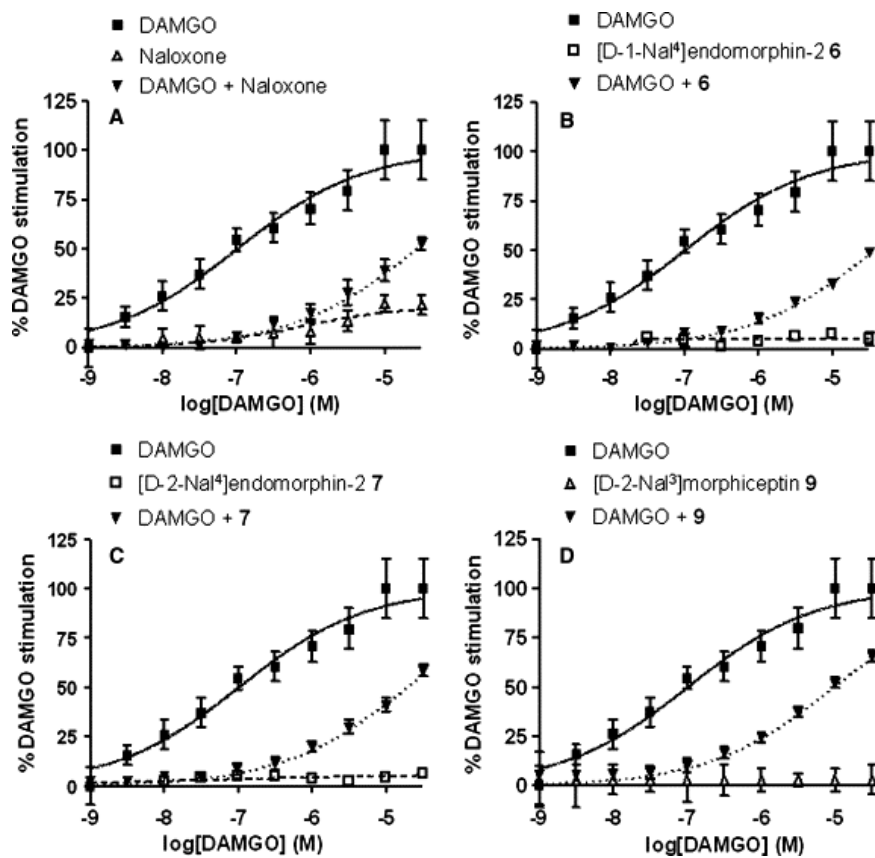


Figure 3 : Relation effet-dose de la liaison du GTP gamma S après stimulation des récepteurs μ opioïdes par différents ligands. A : en absence ou en présence de naloxone.

Cette figure comme les précédentes représente la Relation effet-dose de la liaison du GTP gamma S après stimulation des récepteurs μ opioïdes par différents ligands. Immédiatement, nous constatons que les molécules d'intérêt n'ont pas d'effet propre sur la stimulation de la liaison du GTP gamma S, ce qui signifie que ces molécules sont des antagonistes. Preuve en est que lorsqu'on ajoute ces molécules au DAMGO, on observe une diminution de l'EC50 et surtout une diminution de l'Emax. Les molécules 6,7 et 9 sont donc des antagonistes non compétitifs (irréversibles).

Exercice 2

L'effet de plusieurs concentrations d'un antagoniste muscarinique B est étudié sur la trachée de cobaye contractée à l'aide de doses cumulatives de carbachol, un agoniste cholinergique stable. La concentration est enregistrée et exprimée en mg de tension induite (tableau) :

Carbachol	Tension induite (mg)			
	Antagoniste B			
	0	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}
10^{-7}	156	0	0	0
3×10^{-7}	358	36	4	0
10^{-6}	584	120	20	0
3×10^{-6}	758	258	52	4
10^{-5}	935	528	160	20
3×10^{-5}	1040	764	332	48
10^{-4}	1114	968	580	140
3×10^{-4}	1154	1126	844	308
10^{-3}	1154	1154	1060	548
3×10^{-3}	1154	1154	1154	808
10^{-2}	1154	1154	1154	1154

- 1) Tout de suite sans établir de représentation graphique, pouvez vous dire de quel type d'antagonisme il est question ? Pourquoi ?

Il s'agit d'un antagonisme compétitif parce que l'on observe la même efficacité (le même Emax soit 1154)

- 2) Représenter graphiquement les résultats obtenus en fonction des concentrations de carbachol.

- 2) Définir graphiquement les EC50 du carbachol dans les quatre conditions expérimentales.

Pour le carbachol seul : environ $10^{-6}M$

Carbachol + 10^{-8} antagoniste : environ $10^{-5}M$

Carbachol + 10^{-7} antagoniste : environ $3 \cdot 10^{-4}M$

Carbachol + 10^{-6} antagoniste : environ $10^{-3}M$

- 4) Déterminer le pA2 de l'antagoniste.

Environ 6 soit en log : $10^{-6}M$

Exercice 3 (correction pendant la neuropharmaco)

Agmatine is an endogenous polyamine derived from enzymatic decarboxylation of L-arginine ([Tabor and Tabor, 1984](#)). In the past decade, accumulating evidence indicated agmatine's several levels of pharmacological and physiological importance. Agmatine is present in the brain and other tissues of mammals ([Lortie et al., 1996](#) and [Li et al., 1994](#)). In neuronal tissues, agmatine is present in axon terminals associated with synaptic vesicles ([Reis](#)

et al., 1998) and can be taken up into synaptosomes via a Na⁺-independent system (Sastre et al., 1997). Agmatine has been reported to act as a ligand of the imidazoline receptor (Li et al., 1994). It inhibits all isoforms of nitric oxide synthase (NOS; Galea et al., 1996) and blocks nicotinic receptor (Loring, 1990), voltage-gated Ca²⁺ channels and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels (Yang and Reis, 1999). All these functional characteristics suggest that agmatine may play a role as a neurotransmitter or neuromodulator in the brain.

Agmatine has previously been shown to exert its neuroprotective action by reducing the size of ischemic infarctions or the loss of cerebellar neurons after focal or global ischemia in vivo (Gilad et al., 1996 and Kim et al., 2004). Its neuroprotective effects also include attenuating the extent of neuronal loss following excitotoxic spinal cord injury (Fairbanks et al., 2000) and preventing neurotoxicity produced by glutamate in cultured cerebellar granule cells (Olmos et al., 1999). Our previous study demonstrated that agmatine can protect the cultured rat cortex neurons and PC12 cells from cell death after exposing to NMDA and glutamate (Zhu et al., 2003). However, more compelling evidence is needed for elucidating its neuroprotective role on different brain neurons.

1) Quelles sont les informations importantes concernant l'agmatine?

2) Analyser les graphiques suivants en sachant que le MK-801 est un bloqueur du canal calcique des récepteurs NMDA

Figure 1

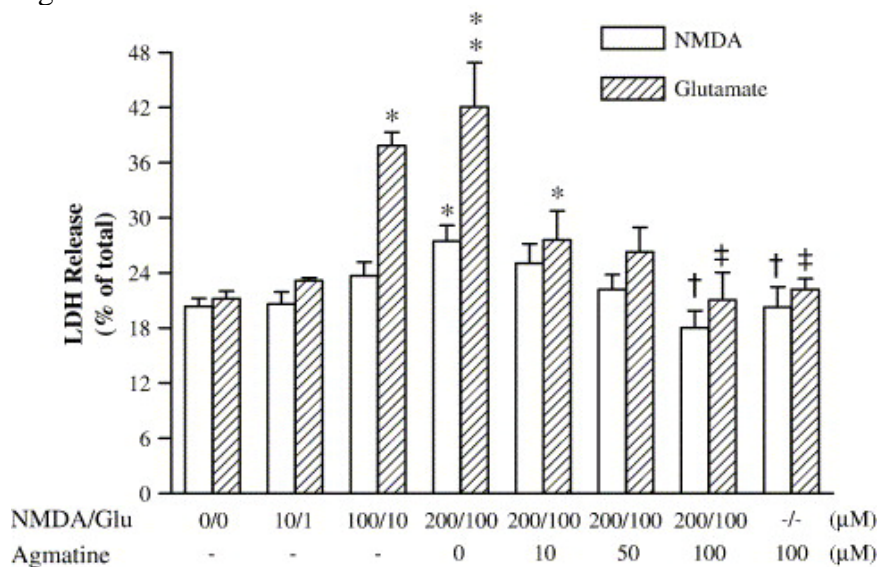


Fig. 1. The release of LDH activity in primary culture of rat hippocampal neurons illustrating the neurotoxic effects of NMDA or glutamate and neuroprotective effects of agmatine. Data are shown as mean ± SEM of 6–10 measurements. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, compared to controls (0). †*P* < 0.05, compared to the group treated with 200 μM NMDA. ‡*P* < 0.01, compared to the group treated with 100 μM glutamate (Glu).

Figure 2

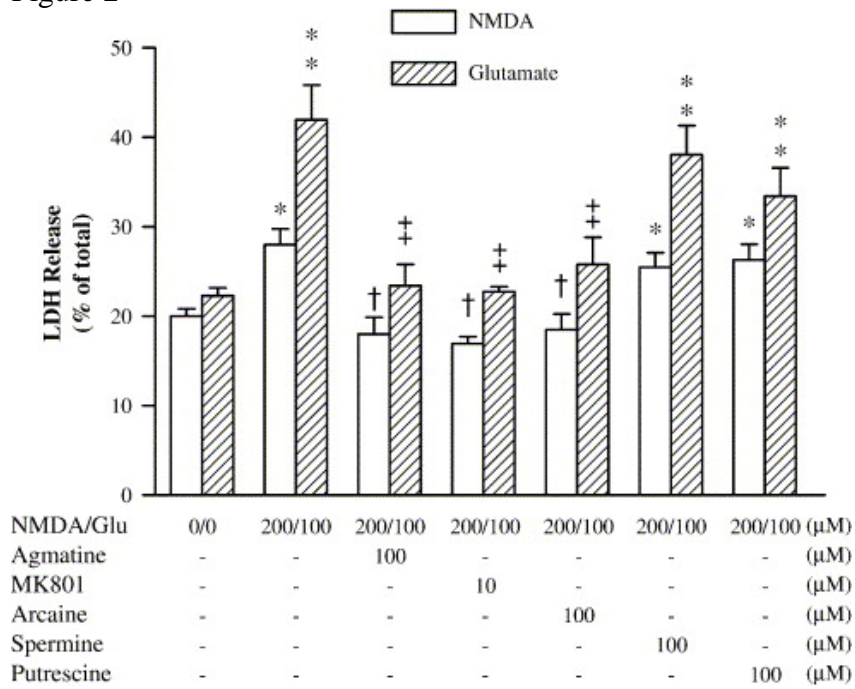


Fig. 2. The comparative neuroprotective effects of agmatine, MK801, arcaine, spermine, and putrescine against cell damage caused by NMDA or glutamate. Data are shown as mean \pm SEM of 6 measurements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to the controls (0). † $P < 0.05$, compared to the group treated with 200 μ M NMDA; ‡ $P < 0.01$, compared to the group treated with 100 μ M glutamate (Glu).

Figure 3

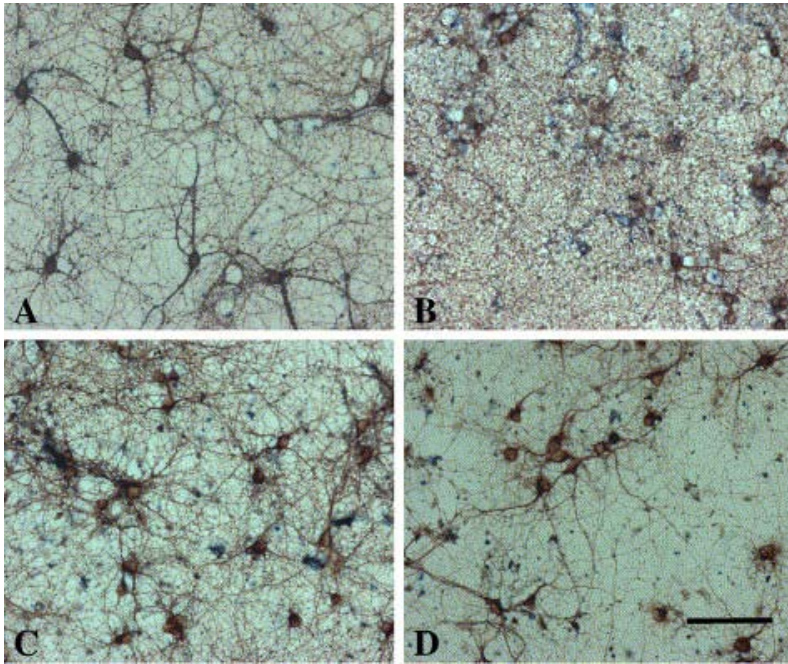
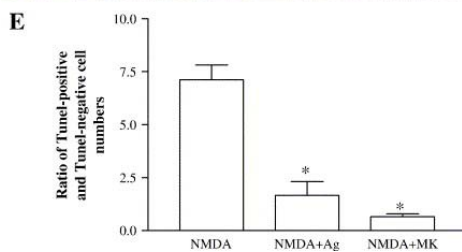
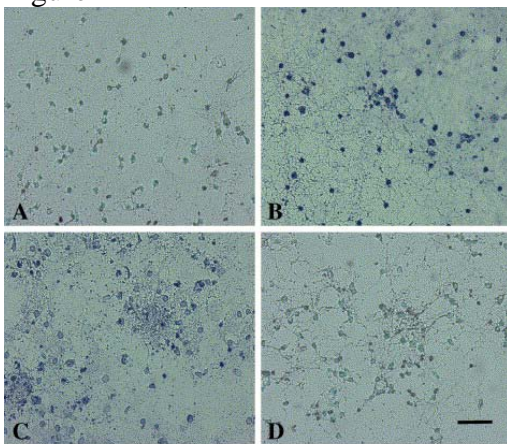


Fig. 3. Agmatine reduces cell death in NMDA-treated rat hippocampal cultures. Hippocampal neurons (12 days) were exposed to vehicle (A), 200 μ M NMDA either alone (B) or in combination with 100 μ M agmatine (C), or 10 μ M MK801 (D) for 1 h. The neuronal cultures were immunocytochemically stained with antibody to β -tubulin III. Calibration bar: 100 μ m for all figures.

Figure 4



3) Quelles sont vos conclusions et donner un titre à cette publication.