

<p><b>Typeurs :</b> Fievet - Mouysset NGUYEN - PREVOT</p> <p><b>Correcteurs :</b> Ruelen - Rohmer</p>	<p><b>Pharmacologie générale :</b></p> <p><b>Liaison aux protéines plasmatiques</b></p>	<p>Date : 27/03/2019</p> <p>Heure : H3-4</p> <p>Prof : A. BOUSQUET-MELOU</p>
---	---	--

## TABLE DES MATIÈRES

I - Introduction des concepts .....	2
1) Importance de la liaison aux protéines plasmatiques .....	2
2) Importance de la forme libre d'un principe actif .....	2
3) La liaison aux protéines plasmatiques .....	3
II - Quels sont les facteurs déterminants de la fraction libre ? .....	6
1) La fraction libre .....	6
2) Variations de la fraction libre .....	7
3) Quelle importance clinique pour les phénomènes de compétition au niveau des protéines plasmatiques ? .....	8
III - Relations entre fu, Clibre et Ctot : la situation in vitro et in vivo .....	9
IV. Arbre de décision pour déterminer l'importance clinique des interactions potentielles par déplacement de la liaison aux protéines plasmatiques. ....	11
V. Retour sur l'interaction warfarine-phénylbutazone .....	11
CONCLUSION : importance de la liaison aux protéines plasmatiques .....	12

## I - INTRODUCTION DES CONCEPTS

### 1) IMPORTANCE DE LA LIAISON AUX PROTÉINES PLASMATIQUES

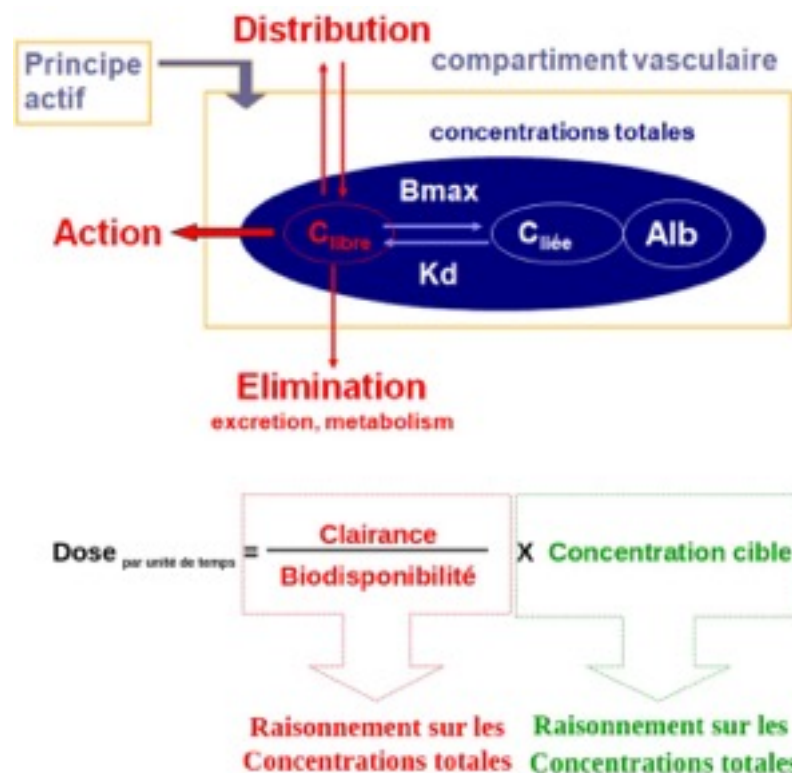
Les protéines plasmatiques sont des macromolécules circulant dans le secteur vasculaire. Elles sont donc obligatoirement rencontrées par les médicaments absorbés. Les médicaments ont des affinités variées aux différentes protéines, bien que les mécanismes précis puissent être complexes, ce paramètre est important à prendre en compte pour comprendre et prévoir leurs actions.

En revanche seule la forme libre (=non liée à des protéines autres que des protéines d'action) d'une molécule peut avoir une action biologique : elle subit les processus pharmacocinétique (PK) et est responsable des actions pharmacodynamiques (PD). C'est également sous sa forme libre que le médicament peut-être éliminé. Rigoureusement, c'est donc la concentration libre du médicament qui est responsable de l'action biologique, or on s'intéresse systématiquement à la concentration totale.

### 2) IMPORTANCE DE LA FORME LIBRE D'UN PRINCIPE ACTIF

Dans le compartiment vasculaire, le médicament ( $C_{tot}$ ) est réparti en deux fractions : une liée et une libre. Un équilibre s'établit dans le sang entre ces deux formes selon l'affinité de la molécule pour le site de liaison ( $K_d$ ) et les capacités de liaison ( $B_{max}$  : représente le nombre de sites de liaison adaptés). Les méthodes de dosage nous conduisent habituellement à mesurer la concentration totale, cependant seule la libre a une action biologique (absorbée, métabolisée, filtrée, fixation au récepteur...). Il est important de garder cette nuance en tête. À l'inverse, les molécules liées aux protéines plasmatiques ne peuvent pas sortir du sang car les protéines sont trop grosses : non filtrées par le rein par exemple. En pratique, lorsque l'on parle d'une concentration cible pour avoir un effet thérapeutique, on se réfère à la concentration totale. C'est également cette notion de concentration totale qui est impliquée dans les calculs de dose à administrer par unité de temps.

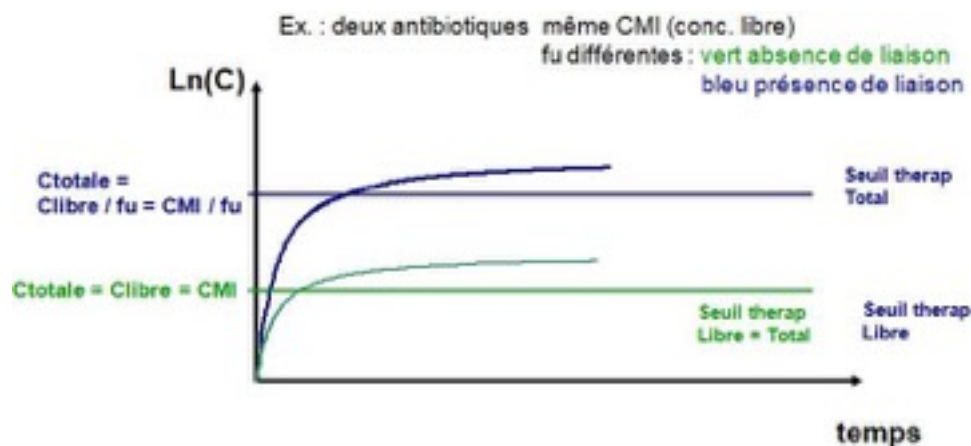
On définit la fraction libre ( $f_u$ ) comme étant le rapport entre la concentration libre et la concentration liée.



### 3) LA LIAISON AUX PROTÉINES PLASMATIQUES

La connaissance de la proportion de molécules liées aux protéines plasmatiques est fondamentale puisque l'on maîtrise seulement la dose et donc la concentration totale or c'est la concentration libre qui constitue la concentration efficace.

Par exemple, si on considère deux antibiotiques de même Concentration Minimale Inhibitrice (CMI : plus petite concentration qui inhibe la croissance bactérienne, mesurée in vitro, donc en absence de protéines de liaisons), ils nécessitent donc une même concentration libre dans le milieu pour limiter la croissance bactérienne. Si l'un d'eux ne se lie pas aux protéines plasmatiques ( $f_u=1$ , à 100% libre), la concentration totale ( $C_{tot}$ ) à atteindre est égale à la CMI. En revanche, si le second a une fraction libre de 50 % ( $f_u=0,5$ ), il faudra que la la concentration totale ( $C_{tot}$ ) à atteindre soit deux fois plus importante pour atteindre la concentration libre efficace recherchée ( $C_{libre}= CMI$ ) : dans la formule de calcul de la dose, on utilise donc  $2 \times CMI$  et non CMI seule.



Ici, on a comparé deux antibiotiques différents. On aurait des courbes similaires en comparant le même antibiotique chez deux espèces différentes : on peut avoir des fractions libres différentes entre les 2 espèces et donc des seuils thérapeutiques différents.

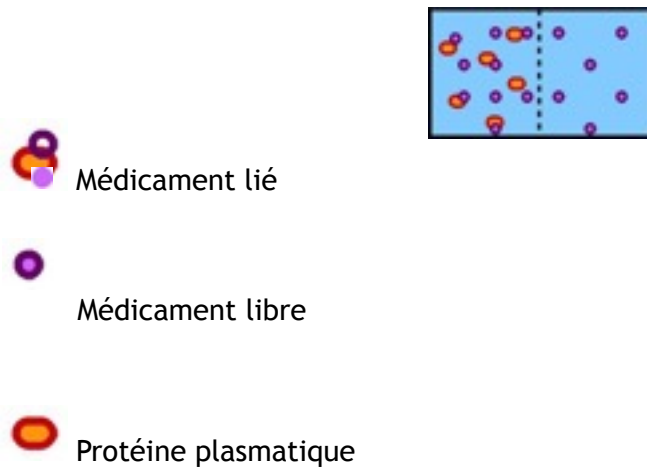
Remarque : lorsque l'on réalise un antibiogramme (cf TP de bactériologie), le diamètre de la zone ne présentant pas de croissance bactérienne reflète la concentration en principe actif du milieu. La distance entre la pastille, et la limite de cette zone permet donc d'accéder à la CMI.

La connaissance du taux de liaison aux protéines plasmatiques permet le passage des concentrations libres efficaces mesurées in vitro aux concentrations totales cibles correspondantes in vivo. De plus, cela permet de comparer des gammes de concentrations totales cibles selon les espèces, car une molécule efficace à la même concentration libre dans les deux espèces aura des concentrations totales efficaces différentes si les  $f_u$  sont différentes et cela se répercutera sur le calcul de la dose.

Pour déterminer expérimentalement une fraction libre ( $f_u$ ), on mesure les concentrations libre et liée grâce à différentes techniques de séparation :

- **Ultracentrifugation**

- **Dialyse à l'équilibre** : on place une membrane semi-perméable dans un récipient, le premier compartiment contient des protéines de liaisons mais pas le second. Après ajout d'un médicament dans le milieu et lorsque l'équilibre est établi, on peut prélever des échantillons des deux côtés de la membrane et effectuer un dosage. On obtient une valeur de concentration totale dans le premier compartiment et de concentration libre dans le second, par différence on retrouve la partie liée aux protéines.



### Schéma de fonctionnement de la dialyse à l'équilibre

#### Les protéines impliquées :

Parmi les protéines plasmatiques impliquées dans la fixation des médicaments, on retrouve principalement l'albumine et l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide, mais aussi des lipoprotéines (LDL, HDL, VLDL).

Chez l'homme, les valeurs de protéines totales dans le sang sont comprises entre 60 et 80 g/L dont environ 40g/L d'albumine. L'albumine est présente en concentration constante contrairement à l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide, qui est induite notamment lors de processus inflammatoires. Sa concentration basale est faible, mais peut donc être largement démultipliée, c'est elle qui est responsable de l'essentiel des variations de la concentration sanguine en protéines totales.

Les lipoprotéines permettent le transport de médicaments très lipophiles. Dans certains cas, les substances actives présentent des formes très proches de celles d'hormones de l'organisme. Elles peuvent alors se fixer sur leurs protéines de transport (ex : les corticoïdes et les protéines CBG (CorticosteroïdBindingProtein)

#### Concentrations plasmatiques normales en protéine chez l'homme :

	concentration moyenne		concentrations limites
	g.l <sup>-1</sup>	$\mu$ mol. l <sup>-1</sup>	
• albumine	40	600	35-45
• $\alpha$ 1-glycoprotéine acide	0.6	15	0.5-1.4
• lipoprotéines			
LDL	4.2	1.4	2.2-7.4
HDL	3.6	12	2.9-7.7
VLDL	1.2	0.15	0.8-1.6

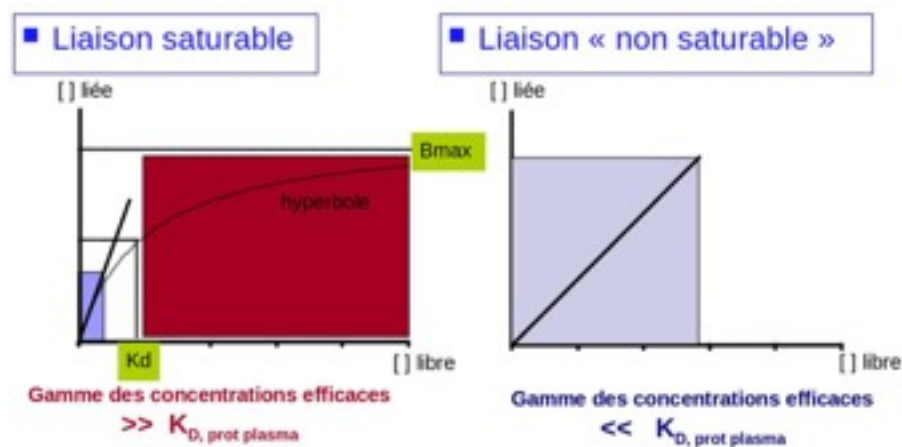
**Les modalités de fixation :**

La qualification de la fixation aux protéines plasmatiques est une notion relative. On définit ainsi deux types de fixation :

- **Saturable** : avec une capacité de liaison limitée (nombre fini de sites de liaison, petit nombre face à la concentration du médicament), une possibilité de compétition et/ou d'inhibition (plusieurs molécules sont capables de se fixer sur une même molécule, elles peuvent donc se déloger entre elles) et plusieurs familles de sites de fixation d'affinités différentes pour le médicament. Une liaison peut être saturée selon un aspect quantitatif ou compétitif.

- **Non-saturable** : capacité de liaison illimitée (c'est-à-dire, grand nombre de site de liaison par rapport à la concentration du médicament : il y a de la place pour tout le monde), absence de compétition et d'inhibition, maximum une famille de site de fixation (on ne peut pas définir de différence d'affinité entre les sites de fixation)

Selon la nature de la liaison (saturable ou non) on obtient différents profils d'évolution de la Cléé en fonction de la Clibre. Ainsi, la liaison est dite saturable si la concentration efficace (définie par la pharmacodynamie) est supérieure au  $K_d$ . Lorsque la concentration plasmatique en médicament dépasse le  $K_d$ , la concentration liée augmente moins vite puis stagne si on augmente la concentration libre (donc augmentation de la concentration totale). À l'inverse, la liaison est dite non saturable si la concentration efficace est inférieure au  $K_d$ . C'est-à-dire que le médicament agit à très faible concentration (Ex : amplification importante du signal après fixation du médicament à son récepteur). On a alors une relation linéaire entre Cléé et Clibre. En réalité, cela correspond à la partie gauche de la courbe d'une liaison saturable. Dans l'absolu, toute liaison est saturable, tout dépend de la position des concentrations efficaces et donc utilisées par rapport au  $K_d$  de la liaison aux protéines plasmatiques.



De plus, la saturabilité des liaisons aux protéines plasmatiques dépend des caractéristiques de la molécule.

L'albumine est généralement saturable par des acides faibles (avec une forte affinité et 1 à 4 types de sites) mais pas pour des bases faibles ou des molécules neutres.

En revanche, l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide est saturable par des bases faibles (avec une forte affinité mais 1 seul type de site) et ne fixe pas d'autres types de molécules.

TYPE DE LIAISON	PROTEINES	
	albumine	$\alpha$ 1-glycoprotéine
saturable	ACIDES FAIBLES 1 à 4 sites forte affinité	BASES FAIBLES 1 site forte affinité
non-saturable	BASES FAIBLES NEUTRES	-

## II - QUELS SONT LES FACTEURS DÉTERMINANTS DE LA FRACTION LIBRE ?

### 1) LA FRACTION LIBRE

On appelle fraction libre ( $f_u$ ), le rapport entre  $C_{\text{libre}}$  et  $C_{\text{totale}}$  mesurées au même moment. La notation  $f_u$  fait référence à « unbound » pour la fraction non liée, on trouve parfois également « f » pour « free ».

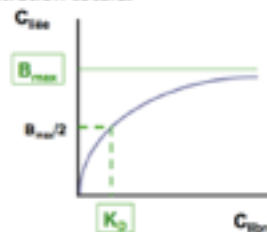
En réécrivant la fraction libre on obtient :

$$f_u = \frac{\text{concentration libre}}{\text{concentration totale}} = \frac{C_{\text{libre}}}{C_{\text{tot}}} = \frac{C_{\text{libre}}}{C_{\text{libre}} + C_{\text{liée}}}$$

Or on sait relier la concentration liée à la concentration totale.

• La concentration liée

$$C_{\text{liée}} = \frac{B_{\text{max}} \times C_{\text{libre}}}{K_D + C_{\text{libre}}}$$



- $B_{\text{max}}$  : - concentration maximale de sites  
- proportionnelle à la concentration de protéines de liaison
- $K_D$  : - concentration liant la moitié des sites de liaison  
- inversement proportionnel à l'affinité pour la protéine

$$f_u = \frac{C_{\text{libre}}}{C_{\text{libre}} + C_{\text{liée}}} \quad \longrightarrow \quad f_u = \frac{K_D + C_{\text{libre}}}{B_{\text{max}} + K_D + C_{\text{libre}}}$$

La concentration liée augmente jusqu'à atteindre une asymptote correspondant à  $B_{\text{max}}$  = la concentration maximale de sites, proportionnelle à la concentration de protéines de liaison. La  $C_{\text{liée}}$  dépend de la  $C_{\text{libre}}$ , et des paramètres de liaison :  $B_{\text{max}}$  et  $K_D$  (=concentration liant la moitié des sites de liaison, inversement proportionnel à l'affinité pour la protéine : grand  $K_D$ =petite affinité)

(Clibre << Kd), on obtient donc une expression indépendante de Clibre :

$$f_u = \frac{K_D}{B_{max} + K_D}$$

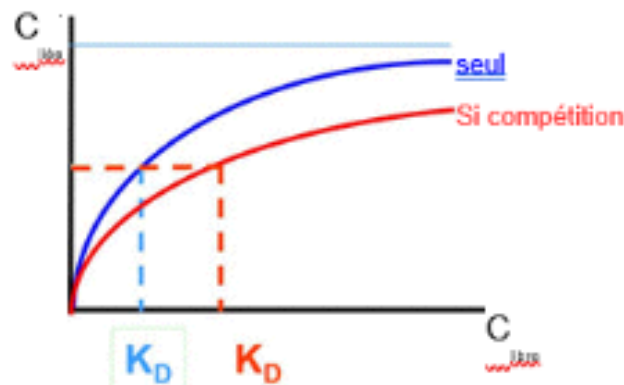
Dans certains cas, la notice d'un médicament peut contenir des valeurs de fraction libre pour différentes espèces, cela signifie qu'il existe une valeur constante pour  $f_u$  et donc qu'il s'agit d'une liaison non saturable. Par exemple : tous les médicaments qui agissent par la stimulation d'un récepteur membranaire, avec amplification du signal.

Si la concentration en protéines plasmatiques diminue (baisse de  $B_{max}$ ), la fraction libre augmente et inversement.

Dans le cas d'un phénomène de compétition, la relation Clibre/Clivée est décalée à droite, le  $K_d$  apparent (« apparent » signifie/est utilisé à la place de «  $K_d$  » en présence d'un compétiteur) et donc la  $f_u$  augmentent. La concentration libre nécessaire pour occuper la moitié des sites de liaison augmente.

## 2) VARIATIONS DE LA FRACTION LIBRE

La fraction libre ( $f_u$ ) dépend essentiellement de deux paramètres :



### - Nombre de sites de liaison : variation de $B_{max}$

Le nombre de site de liaison dépend de la concentration en protéines. Celle-ci peut être constante, comme dans le cas de l'albumine, et varie donc si l'équilibre entre production hépatique et élimination rénale est altéré. De plus, les fœtus et nouveaux-nés possèdent initialement une albumine fœtale, qui est progressivement remplacée durant les premiers jours de vie ; c'est pourquoi chez les nouveau-nés il est important de faire attention aux doses prescrites car la fraction libre est différente (risque de surdosage). Elle peut aussi varier selon les stimulus comme pour l' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide induite en cas d'inflammation, et hyper-produite durant la gestation (phénomène pouvant s'apparenter à une inflammation chronique durant laquelle la physiologie de gestation permet de limiter le processus pseudo-inflammatoire développé en présence de ce corps étranger).

Ex : Variation des concentrations protéiques et des concentrations libres de différents médicaments chez des chiens sains ou porteur d'un processus inflammatoire.

On remarque que les concentrations en albumine sont peu affectées contrairement à celles d' $\alpha_1$ -glycoprotéine acide. Les concentrations libres des différents médicaments sont affectées différemment selon les protéines plasmatiques qui les prennent en charge : ceux

fixés à l' $\alpha$ 1-glycoprotéine acide ont une fraction libre diminuée lors d'un processus inflammatoire.

- **Affinité de la liaison : variation de Kd**

**Table 3.5** Erythrocyte sedimentation rate (ESR), drug-binding protein concentrations and percentage free drug in serum of 21 healthy dogs and 21 dogs with inflammatory diseases. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM (Data from Belpaire *et al.* (1987).

Substance measured	Healthy dogs	Dogs with inflammation	Level of significance*
ESR (mm/h)	0.21 $\pm$ 0.09	23.3 $\pm$ 4.4	<i>P</i> < 0.001
Total protein (g/L)	71.6 $\pm$ 0.9	72.3 $\pm$ 2.4	NS
Albumin (g/L)	31.3 $\pm$ 0.5	27.6 $\pm$ 1.0	<i>P</i> < 0.001
$\alpha$ -Acid glycoprotein (mg/L)	374 $\pm$ 37	1632 $\pm$ 266	<i>P</i> < 0.001
Percentage free (unbound) drug in serum			
Lidocaine	43.5 $\pm$ 2.4	11.7 $\pm$ 1.8	<i>P</i> < 0.01
Oxprenolol	27.8 $\pm$ 2.0	9.3 $\pm$ 1.4	<i>P</i> < 0.01
Propranolol	11.0 $\pm$ 0.7	4.8 $\pm$ 0.6	<i>P</i> < 0.01
Phenytoin	18.1 $\pm$ 0.3	17.6 $\pm$ 0.6	NS
Digitoxin	15.5 $\pm$ 0.5	18.9 $\pm$ 0.6	<i>P</i> < 0.01
Diazepam	1.57 $\pm$ 0.06	2.78 $\pm$ 0.34	<i>P</i> < 0.05

\* Mann-Whitney U-test.

L'affinité des médicaments pour leurs protéines de transports peut varier selon les phénomènes de compétition dûs à des produits endogènes ou non. Si deux molécules sont en compétition pour une même protéine de transport, leur fraction libre respective est augmentée, et l'intensité de leurs effets aussi. Par exemple : l'augmentation de l'urémie éventuellement pathologique, l'augmentation de la concentration en acides gras soit physiologique suite à une prise alimentaire, soit pathologique. L'exemple de l'albumine fœtale illustre également une variation du Kd selon la version de la protéine de transport.

La fraction libre peut varier selon plusieurs paramètres mais cela n'entraîne pas forcément une variation de la concentration libre !

### 3) QUELLE IMPORTANCE CLINIQUE POUR LES PHÉNOMÈNES DE COMPÉTITION AU NIVEAU DES PROTÉINES PLASMATIQUES ?

**Le texte qui suit (en italique et souligné) est extrait d'un livre de pharmacologie. Il contient des informations EXACTES et d'autres FAUSSES**

Sur le plan pharmacologique, ce type d'interférences se traduit par l'augmentation de la fraction libre plasmatique de l'un, ou des deux médicaments présents. Il en résulte une augmentation des intensités des effets observés par rapport à ceux escomptés.

L'interaction la plus classique est celle de la warfarine (anticoagulant) associée à la phénylbutazone (O'Reilly et Aggeler, 1970). Chez un sujet traité par l'anti-vitamine K à dose efficace, l'administration de phénylbutazone provoque sa dé-fixation partielle, majorant l'effet anticoagulant. Aux concentrations thérapeutiques de ces deux substances, le pourcentage de forme libre plasmatique de warfarine passe de 10 à 30 %... Il en résulte une augmentation importante des concentrations tissulaires de warfarine, celles-ci étant sensiblement trois fois plus élevées. Au niveau du foie, où se trouvent les récepteurs de la warfarine, l'effet anticoagulant est multiplié par trois ce qui, compte tenu du mauvais coefficient chimio-thérapeutique de cette substance, se traduit par un surdosage générateur d'hémorragies.

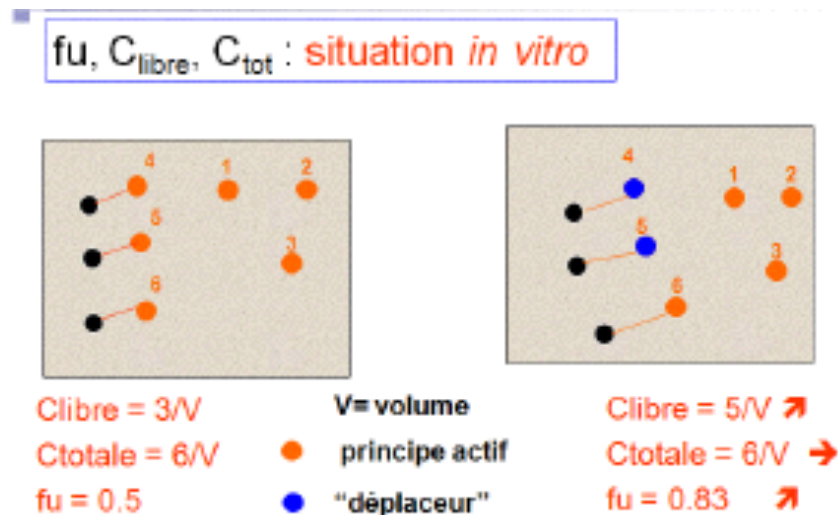
Il existe des phénomènes de compétition au niveau des protéines plasmatiques très souvent évoqués comme cause d'interactions médicamenteuses. Le "déplaceur" va augmenter la fraction libre du "déplacé ».



Lorsqu'un déplacement existe, la concentration libre de la molécule déplacée n'est généralement pas affectée, avec une absence de conséquence sur l'exposition de la cible (récepteur, pathogène ...) et sur les effets associés.

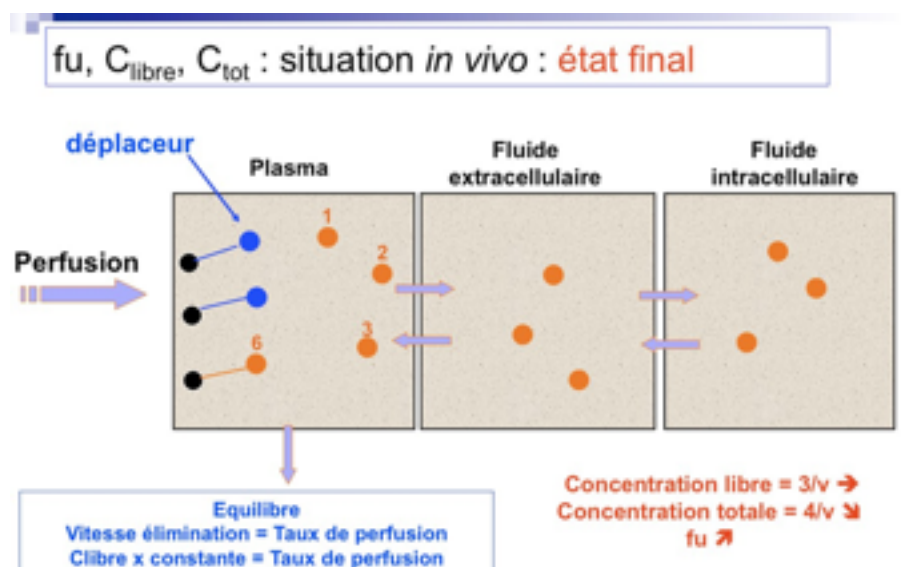
### III - RELATIONS ENTRE $f_u$ , $C_{\text{libre}}$ ET $C_{\text{tot}}$ : LA SITUATION IN VITRO ET IN VIVO

Si un déplaceur entre en compétition avec le déplacé, il déplace les molécules liées qui vont devenir libres, augmentant ainsi  $C_{\text{libre}}$ . Dans un système *in vitro* (donc système clos) à concentration constante et à fraction libre = 50, si on ajoute un déplaceur, une partie du lié devient libre.



Après la situation *in vitro* (cours précédent), regardons la situation *in vivo* : Cette dernière est différente car c'est un système ouvert (avec système d'entrée et de sortie). Elle dépend donc de la clairance (c'est-à-dire la capacité de l'organisme à éliminer).

L'élimination est proportionnelle à la concentration libre. Ce qui diminue c'est la concentration totale car il y a de l'élimination en plus pendant un certain temps.



Rajouter un **déplaceur** augmente la fraction libre en éliminant davantage sans modifier la concentration libre.

Si on perfuse à vitesse constante, on atteint rapidement un **équilibre** lorsque la vitesse d'élimination est égale à la vitesse d'entrée (taux de perfusion). La concentration libre de

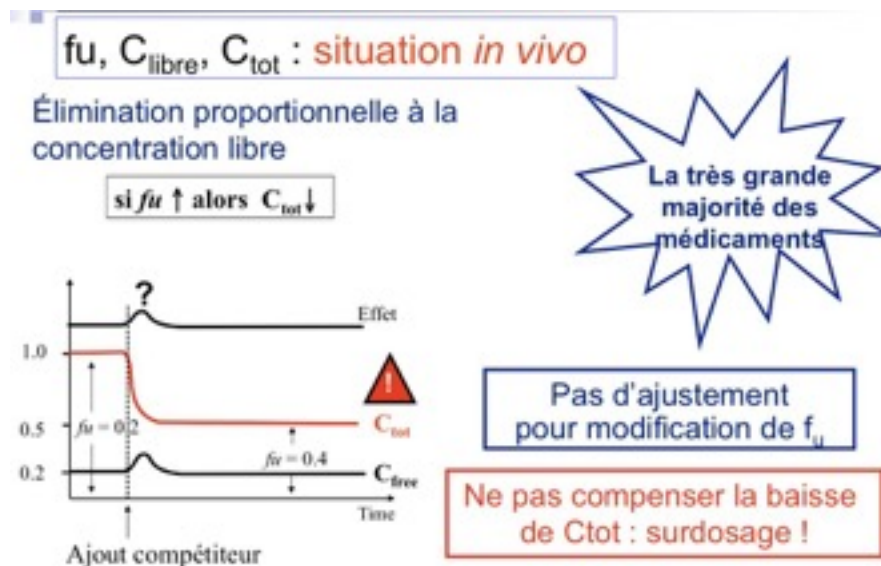
$x$  est constante et est proportionnelle au taux de perfusion à l'équilibre. La concentration qui va diffuser dans les différents tissus est la forme libre. On parle de concentration libre car c'est elle qui subit le processus d'élimination. Le taux de perfusion est toujours le même.

Après administration du déplaceur on aura une élimination et une distribution qui vont augmenter transitoirement. Si une interaction médicamenteuse se produit, le déplaceur va augmenter les effets du déplacé mais ce n'est pas dû au déplacement des protéines plasmatiques, ceci est dû à autre chose.

La vitesse d'élimination est proportionnelle à la concentration libre, si  $f_u$  augmente alors  $C_{tot}$  diminue, c'est le cas de la très grande majorité des médicaments.

### En résumé :

- ⇒ **Attention : ne pas compenser la baisse de concentration totale, cela provoque un surdosage !** Si l'on a un déplaceur, les concentrations totales du médicament diminuent lors de monitoring thérapeutiques, il ne faut pas surdoser.
- ⇒ **Les effets sont liés à la fraction libre et ne changent pas !**



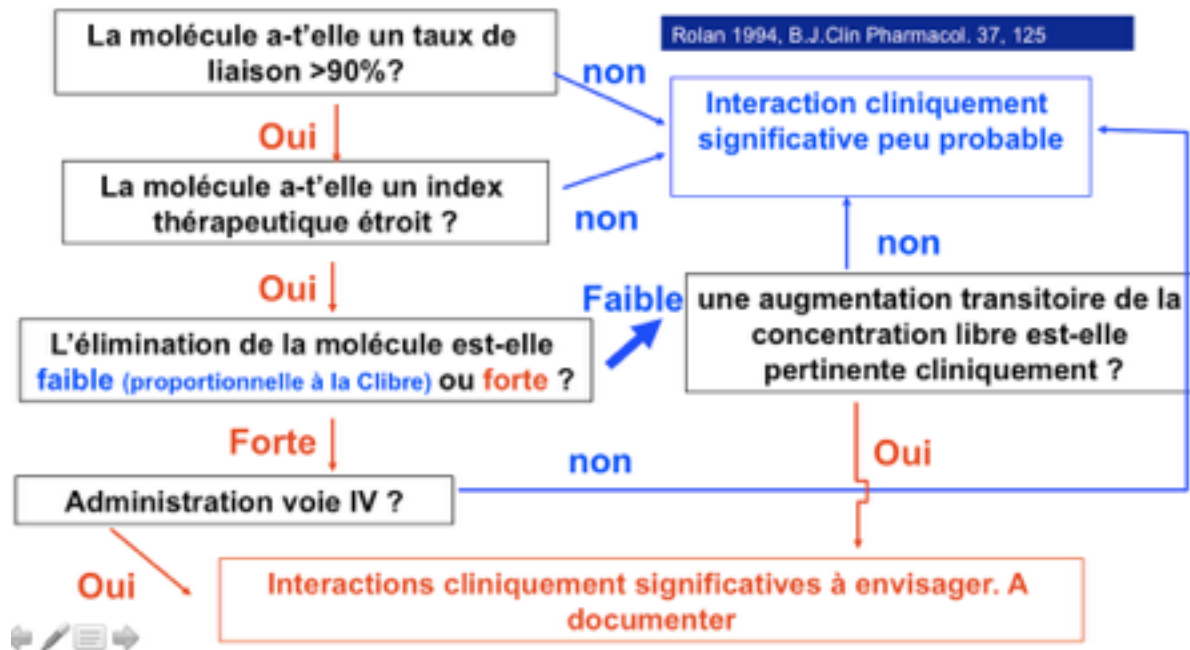
Pour qu'un déplaceur ait un effet, il faut que la liaison soit très forte (90%).

La capacité d'élimination n'est pas puissante, donc les épurateurs ne prennent que les molécules libres :

- **Élimination faible** dans la quasi totalité des médicaments.
- **Élimination forte** : cas particulier médecine humaine
  - Certaines enzymes fonctionnent vite donc le « libre » est vite éliminé et tout est arraché (le libre et le lié)
  - le lié n'est plus protégé.

Le déplaceur doit être administré par IV pour avoir une interaction significative.

#### IV. ARBRE DE DÉCISION POUR DÉTERMINER L'IMPORTANCE CLINIQUE DES INTERACTIONS POTENTIELLES PAR DÉPLACEMENT DE LA LIAISON AUX PROTÉINES PLASMATIQUES.



**NB** : Quand il y a beaucoup de lié, un déplacement entraîne une grosse augmentation de la concentration libre mais ce n'est pas le cas si le taux lié est < 90%, d'où une interaction cliniquement significative peu probable.

#### V. RETOUR SUR L'INTERACTION WARFARINE-PHÉNYLBUTAZONE

- ✂ L'augmentation des concentrations libres est réelle !
- ✂ Le déplacement de la warfarine est réel : la fraction libre augmente !
- ✂ Mais la warfarine a une **élimination faible** (faible clairance)

Le déplacement de la liaison en présence de PBZ augmente la fraction libre **MAIS N'EST PAS** responsable de l'augmentation des concentrations libres à l'équilibre.

##### Le mécanisme responsable de l'interaction :

- La PBZ **inhibe** de manière stéréosélective le métabolisme de la S-warfarine :  
elle a une **action directe sur l'élimination** : la clairance diminue et donc les concentrations libres augmentent

La PBZ agit à la fois en déplaçant la warfarine des protéines plasmatiques (fu augmente) et en inhibant les enzymes qui métabolisent la warfarine. Le déplacement seul n'a pas d'effet sur les concentrations libres de warfarine, c'est l'inhibition enzymatique qui en est responsable.

## CONCLUSION : IMPORTANCE DE LA LIAISON AUX PROTÉINES PLASMATIQUES

- Le rôle de la liaison aux protéines plasmatiques est **surestimée** comme cause d'interactions médicamenteuses.
- Il ne faut pas interpréter des variations de **fu** comme causes de variations de la **concentration libre**. Il n'y a pas d'exemple d'adaptations de posologies lorsque fu varie. En particulier, il ne faut pas mal interpréter une diminution de Ctotale.
- L'importance de la liaison aux protéines plasmatiques est **réelle** pour extrapoler des concentrations efficaces **de l'*in vitro* vers l'*in vivo*** : ex. CMI pour les antibiotiques.
- Elle est également **réelle** pour comparer les concentrations totales efficaces **entre espèces** et pour évaluer l'étendue de la **distribution** du principe actif.



Du temps avant une soirée,  
une voiture, une copine et  
j'apprends que ça part en  
couille...

Quel Beau « Combeaud » !

Domage qu'il n'y ait pas eu  
de photo comme preuve à  
l'appui...

Je n'en dirais pas plus, xoxo à  
la personne concernée !