

BLG121

Pharmacologie

Etude des récepteurs par la méthode de liaison et compétition

Exercice 1

L'objectif de cette étude est de déterminer si oui ou non deux substances pharmacologiques se lient de façon spécifique aux récepteurs des opioïdes. Ces substances sont la diprénorphine et la bremazocine. Les auteurs ont donc fait des études de «binding» en utilisant les dérivés tritiés de la diprénorphine et de la bremazocine. Pour étudier la liaison non spécifique, ils ont utilisés la naloxone (10 μ M).

- 1) Expliquer brièvement les différentes étapes expérimentales qui ont conduit à ces résultats.
- 2) Déterminer le Kd, le Bmax ainsi que l'affinité de chacune des substances.
- 3) Que pouvez vous déduire de ces résultats ?

diprénorphine	Fmole/mg de prot		
	Liaison totale	Liaison non spécifique	Ligand libre
0,05nM	15,2	0,2	0,012
0,10nM	50,5	0,5	0,04
0,15nM	61	1	0,068
0,30nM	102	2	0,18
0,60nM	120	5	0,46
1,60nM	170	15	2,58
6,25nM	220	30	6,3
14nM	290	40	12,5

brémazocine	Fmole/mg de prot		
	Concentration substance	Liaison totale	Liaison non spécifique
0,05nM	22	2	0,03
0,10nM	50	2,5	0,07
0,3nM	180	30	0,3
0,75nM	280	38	0,6
1nM	380	60	0,85
1,75nM	550	110	1,9
4nM	675	115	4,3
12,5nM	875	225	10,8

Dans le but de s'assurer que les deux substances peuvent se lier aux récepteurs, les auteurs ont parallèlement réalisé une étude de compétition avec 6 molécules séparées en deux groupes :

- naloxone, morphine et dynorphine A
- Met-enképhaline, Leu-enképhaline et DAMGO

Les auteurs ont choisi d'utiliser comme concentration de diprénorphine le K_d . Expérimentalement, cette concentration représente le 100% de liaison spécifique de la diprénorphine.

- 1) Rappeler le principe des expériences de compétition
- 2) Etablir les courbes de compétition et les décrire
- 3) Que peut-on conclure sur les deux groupes ?
- 4) Que pouvez-vous conclure sur la diprénorphine à partir de ces deux expériences ?
- 5) Si vous deviez écrire un article scientifique, quel titre pourriez-vous lui donner ?

Concentration (M)	Liaison spécifique (fmole/mg de prot)		
	Avec morphine	Avec naloxone	Avec dynorphine A
3.10^{-10}	40	40	40
10^{-9}	40	39	39
3.10^{-9}	38,4	36,8	35
10^{-8}	36,8	35	30
3.10^{-8}	32	22	22
10^{-7}	30	8,8	12
3.10^{-7}	11,8	5	8,8
10^{-6}	8,8	4	3,6
3.10^{-6}	4	0,2	0,2
10^{-5}	2	1,2	1,2

Concentration (M)	Liaison spécifique (fmole/mg de prot)		
	Avec Leu-enképhaline	Avec Met-enképhaline	Avec DAMGO
3.10^{-10}	40	39	40
10^{-9}	40	40	37,6
3.10^{-9}	34,8	36	36
10^{-8}	32,8	32,8	36
3.10^{-8}	32,8	26	32,8
10^{-7}	30	26	30
3.10^{-7}	23	26	30
10^{-6}	25	30	30
3.10^{-6}	22,4	25	25
10^{-5}	22,4	20	22,4

Exercice 2

Des expériences de compétition sont réalisées entre un ligand radioactif (la scopolamine, antagoniste sélectif des récepteurs muscariniques de l'acétylcholine) et un ligand X non marqué, en absence et en présence de GTP (10^{-4} M), permettant de découpler le complexe récepteur-protéine G. La concentration de scopolamine est de 0,3 nM. Le volume d'incubation est de 1 mL. Les résultats sont reportés dans le tableau ci-dessous.

- 1) Expliquez les conditions expérimentales
- 2) Représentez graphiquement les deux courbes de compétition et discutez l'intérêt des diverses représentations utilisées.
- 3) Calculez le K_i de X pour les deux conditions expérimentales.
- 4) Discutez la nature du ligand X

Ligand X (M)	Liaison totale	
	Contrôle (dpm/essai)	+ GTP (100 μ M) (dpm/essai)
0	2487	2487
10^{-8}	2487	2487
3.10^{-8}	2487	2487
10^{-7}	2207	2487
3.10^{-7}	1922	2487
10^{-6}	1772	2480
3.10^{-6}	1564	2438
10^{-5}	1390	2179
3.10^{-5}	1163	2035
10^{-4}	960	1677
3.10^{-4}	576	1321
10^{-3}	363	835
3.10^{-3}	295	451
10^{-2}	224	315
Liaison non spécifique	224	224