

Pharmacologie générale

BLG121

Correction

Etude des récepteurs par la méthode de liaison et compétition

TD du 15 Octobre 2009

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.

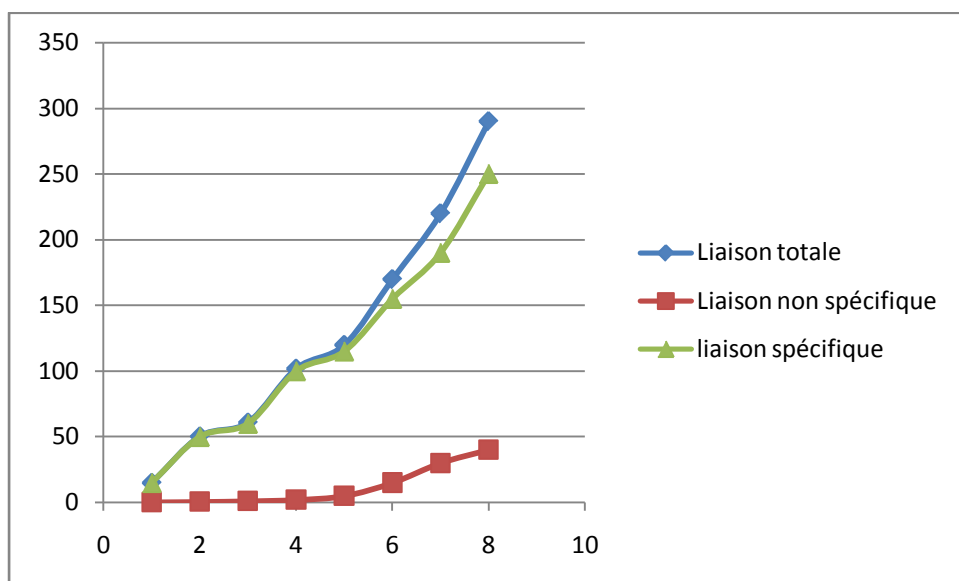
La première étape consiste à mettre en présence une matrice (noyau + cytosol ou membrane plasmique) avec des concentrations croissantes du ligand radioactif. Chaque tube est filtré et ce dernier est déposé dans un compteur de radioactivité. Ceci permet de déterminer la liaison totale. Pour obtenir la liaison spécifique, il est nécessaire de quantifier la liaison non spécifique. Pour se faire, on refait la même expérience que précédemment en ajoutant dans chaque tube une concentration de ligand froid 1000x supérieure à celle du ligand chaud. Cette expérience a pour objectif de déplacer la liaison spécifique et de ne conserver que la liaison non spécifique.

- 2) Déterminer le Kd, le Bmax ainsi que l'affinité de chacune des substances.

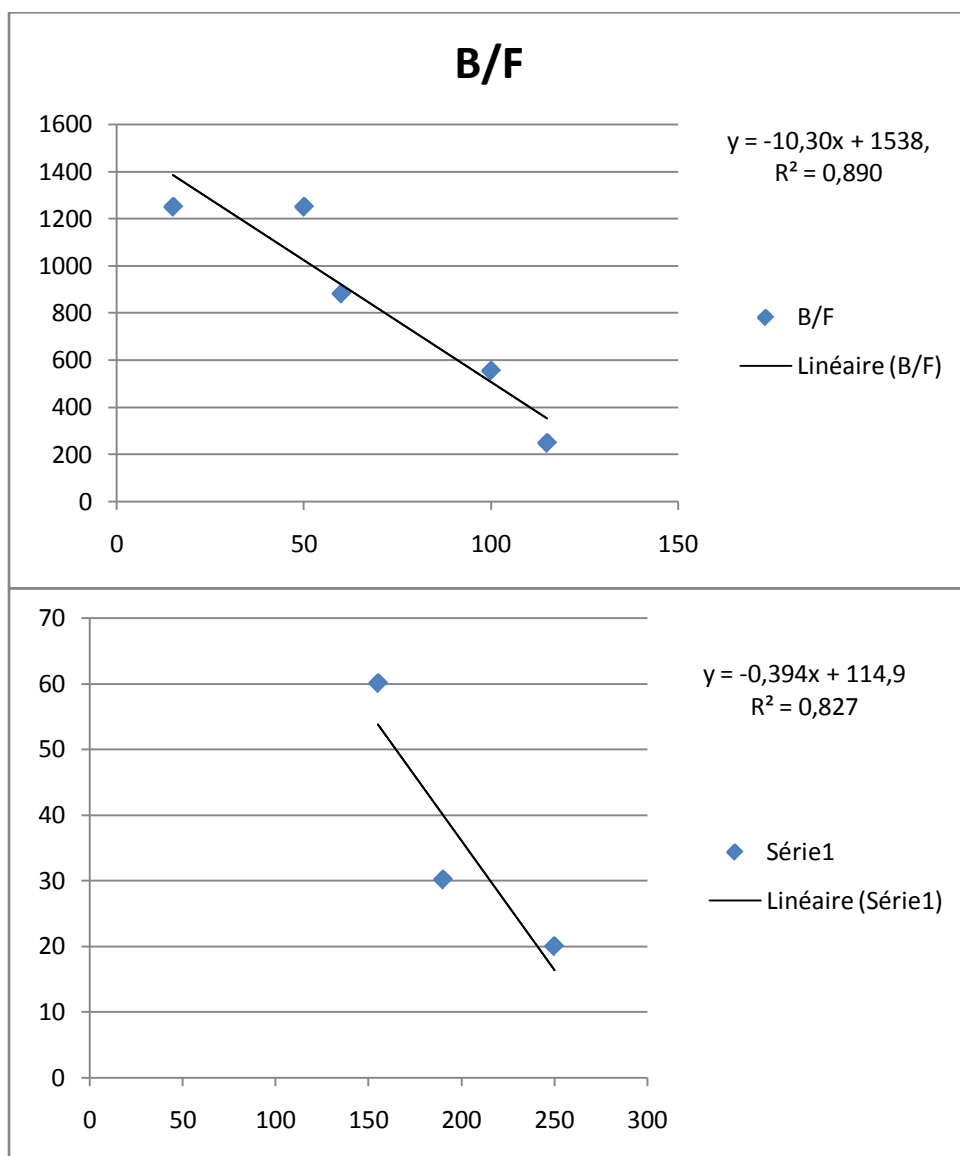
Deux possibilités pour déterminer ces paramètres

Pour la diprénorphine

- La courbe de saturation (pas efficace car la courbe ne sature pas)



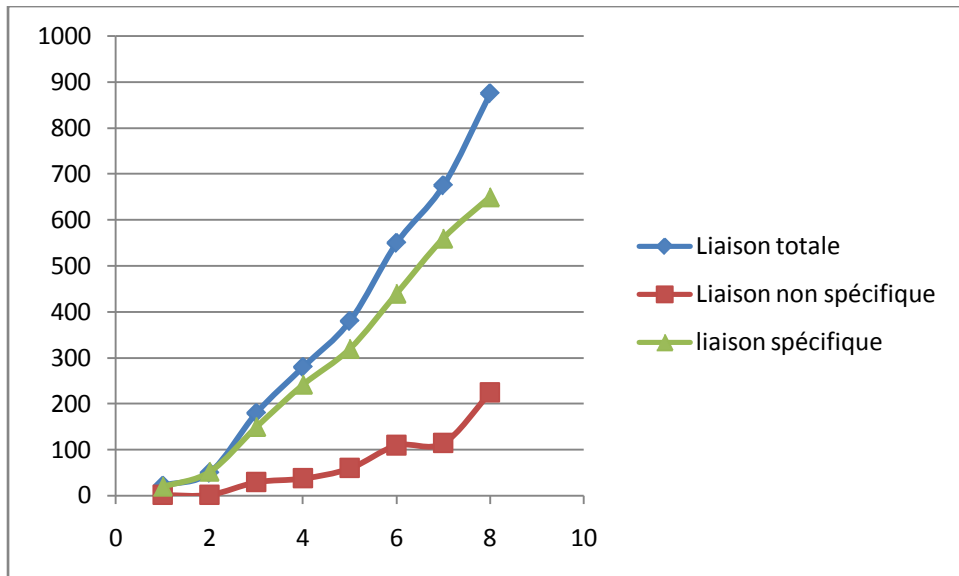
- La représentation de Scatchard (vous avez le ligand libre donc faites immédiatement cette représentation)



Cette représentation (2 droites au lieu d'une) met en évidence que la brémazocine présente deux affinités différentes et deux Bmax différents probablement pour 2 sous-types de récepteurs.

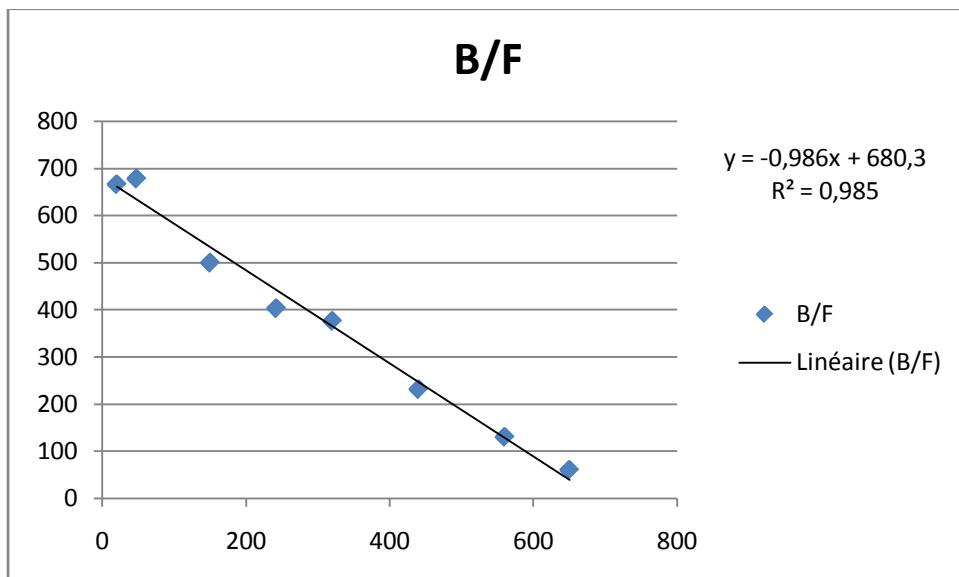
Pour la brémazocine

- Courbe de saturation



Idem que précédemment, pas de saturation donc pas de possibilité d'établir le K_d ni le B_{max} .

- Représentation de Scatchard



Pour la brémazocine, il n'y a qu'une pente donc une seule affinité et un seul B_{max}

diprénorphine	Fmole/mg de prot		
Concentration substance	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	Ligand libre
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

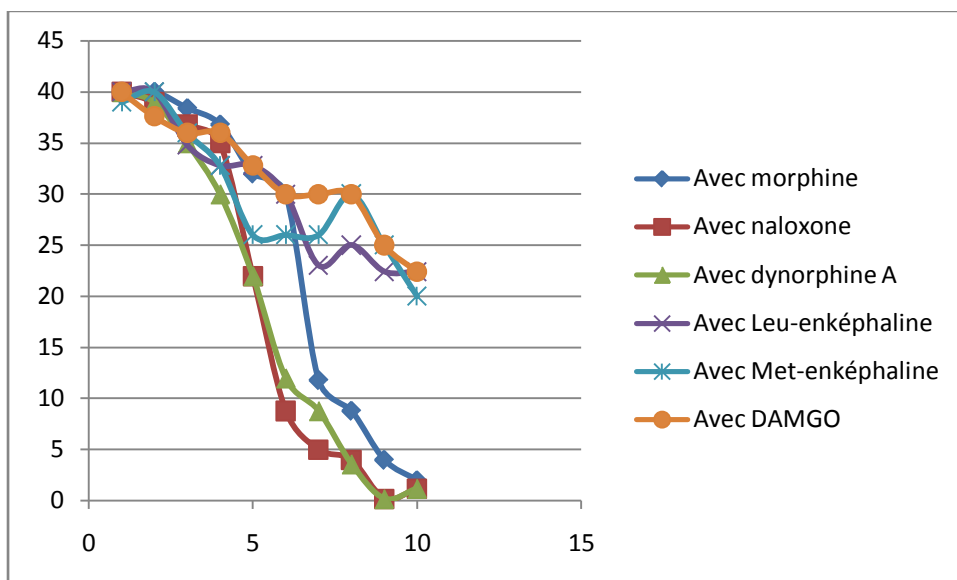
Les auteurs ont choisi d'utiliser comme concentration de diprénorphine le Kd. Expérimentalement, cette concentration représente le 100% de liaison spécifique de la diprénorphine.

1) Rappeler le principe des expériences de compétition

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.

2) Etablir les courbes de compétition et les décrire



3) Que peut-on conclure sur les deux groupes ?

Les deux groupes ont à peu près les mêmes IC50 mais les molécules ne déplacent pas la diprénorphine de la même façon.

4) Que pouvez-vous conclure sur la diprénorphine à partir de ces deux expériences ?

Ces résultats montrent que clairement que la diprénorphine se fixe sur deux sous types de récepteurs des opioïdes.

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

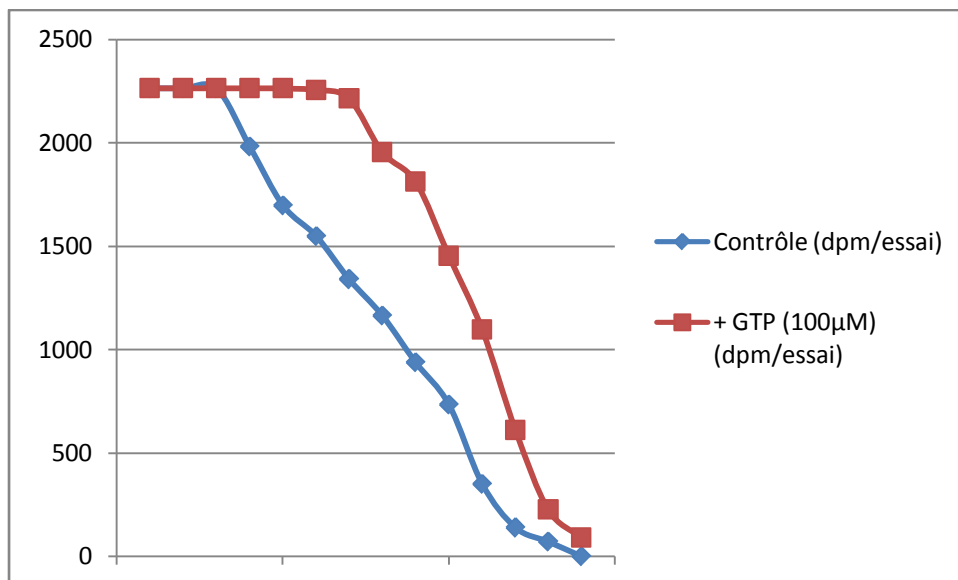
Concentration (M)	Liaison spécifique (fmole/mg de prot)		
	Avec Leu-enképhaline	Avec Met-enképhaline	Avec DAMGO
$3 \cdot 10^{-10}$	40	39	40
10^{-9}	40	40	37,6
$3 \cdot 10^{-9}$	34,8	36	36
10^{-8}	32,8	32,8	36
$3 \cdot 10^{-8}$	32,8	26	32,8
10^{-7}	30	26	30
$3 \cdot 10^{-7}$	23	26	30
10^{-6}	25	30	30
$3 \cdot 10^{-6}$	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
(voir exercice au dessus)

2) Représentez graphiquement les deux courbes de compétition et discutez l'intérêt des diverses représentations utilisées.



(Décrit lors du cours sur les RCPGs)

3) Calculez le K_i de X pour les deux conditions expérimentales.

Voir la formule dans le cours

4) Discutez la nature du ligand X
(Décrit lors du cours sur les RCPGs)

Ligand X (M)	Liaison totale	
	Contrôle (dpm/essai)	+ GTP (100µM) (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