

EPREUVES EN TEMPS LIMITE – PHBMR

Du 15 SEPTEMBRE 2022

Cotation 200 points - durée 2 h - 5 exercices

Exercices

EXERCICE N °1 - chimie analytique /40 points

Le 1,2 diaminoéthane ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ ou $\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$) couramment appelé éthylène diamine est couramment utilisé en grande quantité pour la synthèse de nombreux médicaments.

Les pKa de cette molécule sont de 6,8 pour le couple $\text{NH}_3^+\text{-R-NH}_3^+ / \text{NH}_2\text{-R-NH}_3^+$ (pKa_1) et de 10,8 pour le couple $\text{NH}_2\text{-R-NH}_3^+ / \text{NH}_2\text{-R-NH}_2$ (pKa_2).

- **Question 1** : Indiquez les formes prédominantes de l'éthylène diamine pour les pH suivants:

- pH = 4,6
- pH = 8,8
- pH = 10,8

On mélange 10 mL d'une solution d'éthylène diamine sous la forme $\text{NH}_2\text{-R-NH}_2$ à 0,1M (solution A) avec 3 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,25M pour obtenir la solution B. A la solution B, on ajoute 3 mL d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 0,25M pour obtenir la solution C.

- **Question 2** : Calculez le pH de la solution A.
- **Question 3** : Calculez les concentrations des formes prédominantes de l'éthylène diamine dans la solution B et en déduire le pH de la solution B.
- **Question 4** : Calculez les concentrations des formes prédominantes de l'éthylène diamine dans la solution C et en déduire le pH de la solution C.
- **Question 5** : Parmi les solutions A, B et C, laquelle répond ou lesquelles répondent au domaine de définition d'une solution tampon.

EXERCICE N °2 - radioactivité /40 points

On compare les caractéristiques de la molécule d'estradiol marquée soit au tritium (${}^3_1\text{H}$ de période $T = 12,3$ ans), soit à l'aide d'un isotope radioactif de l'iode (${}^{125}_{53}\text{I}$ de période $T = 60$ jours) en vue de son utilisation dans un radioimmunos dosage d'estradiol.

- **Question 1** : Calculer l'activité d'une mole de ${}^3_1\text{H}$. On donne le nombre d'Avogadro : $N_A = 6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$.
- **Question 2** : Calculer l'activité d'une mole de ${}^{125}_{53}\text{I}$.
- **Question 3** : Sachant qu'il est possible de fixer six atomes ${}^3_1\text{H}$ ou un atome ${}^{125}_{53}\text{I}$ par molécule d'estradiol, en déduire l'activité molaire maximale de l'estradiol marqué à ${}^3_1\text{H}$ et l'activité molaire maximale de l'estradiol marqué à ${}^{125}_{53}\text{I}$.
- **Question 4** : On effectue un marquage à l'aide de ${}^3_1\text{H}$ et un marquage à l'aide de ${}^{125}_{53}\text{I}$. Sachant que les préparations (d'activité molaire maximale) obtenues à l'issue de l'un ou de l'autre des deux marquages ont une concentration radioactive de 37 MBq/mL , calculer la concentration molaire de chacune des deux solutions d'estradiol marqué à ${}^3_1\text{H}$ ou à ${}^{125}_{53}\text{I}$.
- **Question 5** : Au cours du radioimmunos dosage d'estradiol, on introduit dans chaque tube 18000 ipm (impulsions par minute) d'estradiol marqué (d'activité molaire maximale). Quelles sont les masses (en μg) des produits marqués à ${}^3_1\text{H}$ ou à ${}^{125}_{53}\text{I}$ qui correspondent à cette activité ?

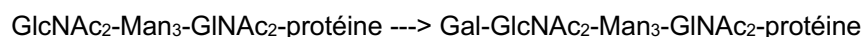
On suppose que l'efficacité de comptage est la même pour ${}^3_1\text{H}$ ou ${}^{125}_{53}\text{I}$: $E = 0,60$.

On donne la masse molaire de l'estradiol marqué à ${}^3_1\text{H}$: $M_A = 284 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ et la masse molaire de l'estradiol marqué à $M_A = 396 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

- **Question 6** : En supposant que le marquage ne modifie pas l'immunoréactivité de l'estradiol, quelle molécule marquée (à ${}^3_1\text{H}$ ou à ${}^{125}_{53}\text{I}$) est-il préférable d'utiliser dans le radioimmunos dosage ? Pourquoi ?

EXERCICE N °3 - enzymologie /40 points

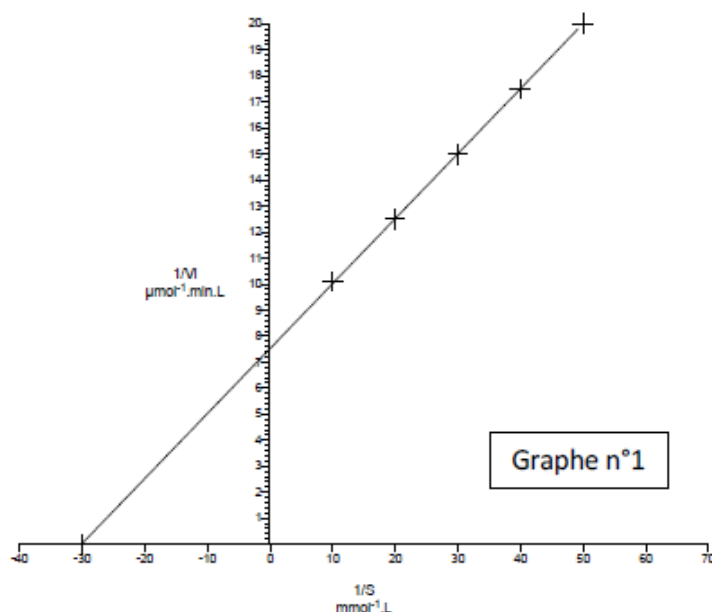
La galactosyltransférase est une enzyme membranaire golgienne catalysant la réaction suivante :



- *GlcNAc* = *N*-Acétyl glucosamine ; - *Man* = mannose ; - *Gal* = galactose

Une étude enzymatique est réalisée sur une solution purifiée de galactosyltransférase. Plus précisément, 1 mL d'une même solution d'enzyme est incubé à 37 °C avec 2 ml de différentes solutions tamponnées (pH = 7,0) de substrat et les vitesses initiales (V_i) correspondantes sont déterminées.

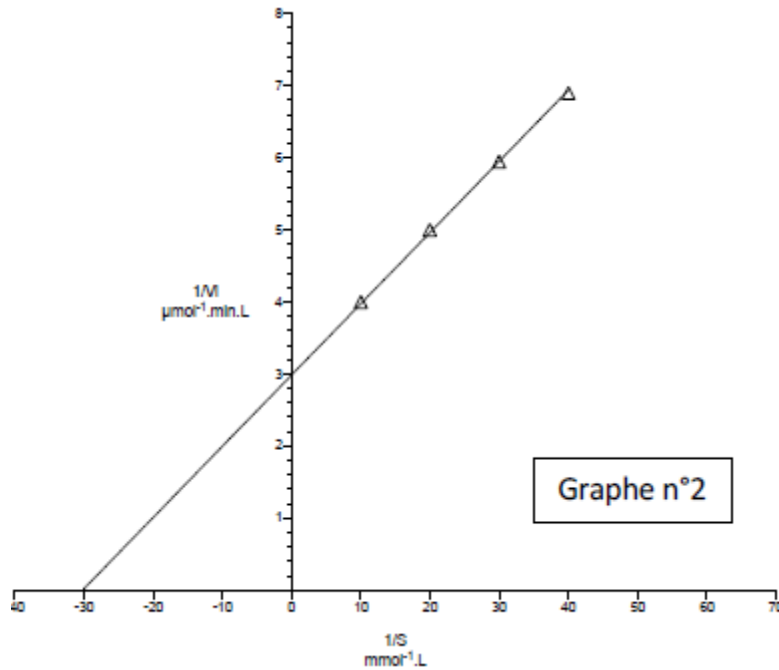
On obtient le graphe n°1 suivant :



- **Question 1** : Compte-tenu du graphe n°1 obtenu, comment se comporte d'un point de vue enzymatique la galactosyltransférase ? Justifiez votre réponse.
- **Question 2** : Déterminez graphiquement la V_{max} mesurée et le K_m mesuré de la galactosyltransférase vis-à-vis du substrat utilisé.

On réalise la même étude avec la solution de substrat précédente enrichie en manganèse (10 nM).

On obtient le graphe n°2 suivant :



- **Question 3 :** Comment se comporte le manganèse vis-à-vis de la réaction enzymatique étudiée ? Justifiez votre réponse.
- **Question 4 :** Tracez schématiquement, sur le même graphe (sur votre copie), les 2 représentations de Michaelis-Menten correspondantes (sans manganèse ajouté et avec manganèse).

Afin de déterminer l'activité enzymatique (en U/L et en nanoKatal/L) de la galactosyltransférase contenue dans un extrait protéique leucocytaire humain, on utilise une solution de substrat de concentration = 100 Km contenant du manganèse (10 nM). Les conditions opératoires (température, volume d'échantillon, volume de solution tamponnée de substrat) sont identiques à celles décrites plus haut.

La vitesse initiale (V_i) mesurée est égale à $0,023 \text{ mmoles.min}^{-1}.\text{L}^{-1}$

- **Question 5 :** Quels sont les intérêts de se placer à une concentration en substrat = 100 Km ?
- **Question 6 :**
 Quelle est l'activité enzymatique correspondant à la V_i mesurée ? En U/L ? En nanoKatal/L ?
 Quelle est l'activité enzymatique (en nanoKatal/L et en mU/L) de l'extrait protéique leucocytaire ?

EXERCICE N °4 - pharmacocinétique /40 points

Un médicament Y est perfusé à un volontaire sain à un débit de 125 mg/h.

Les caractéristiques de ce médicament sont les suivantes : cinétique monocompartmentale et constante de vitesse d'élimination 0,07 /h et volume de distribution de 50L.

- **Question 1** : Déterminer la concentration à l'équilibre de la perfusion.
- **Question 2** : Déterminer la concentration 4 h après le début de la perfusion.
- **Question 3** : Déterminer le temps nécessaire à l'obtention de cette concentration à l'équilibre.
- **Question 4** : Quel schéma thérapeutique faut-il envisager si l'on veut obtenir directement cette concentration à l'équilibre ? Préciser les modalités d'administration et les doses à administrer.
- **Question 5** : Déterminer la concentration 12h après l'arrêt de la perfusion :
 - a) Si la perfusion dure 72h
 - b) Si la perfusion dure 24h

Un autre schéma d'administration est testé chez le volontaire sain : l'administration réitérée par voie IV bolus soit 2000 mg toutes les 12h.

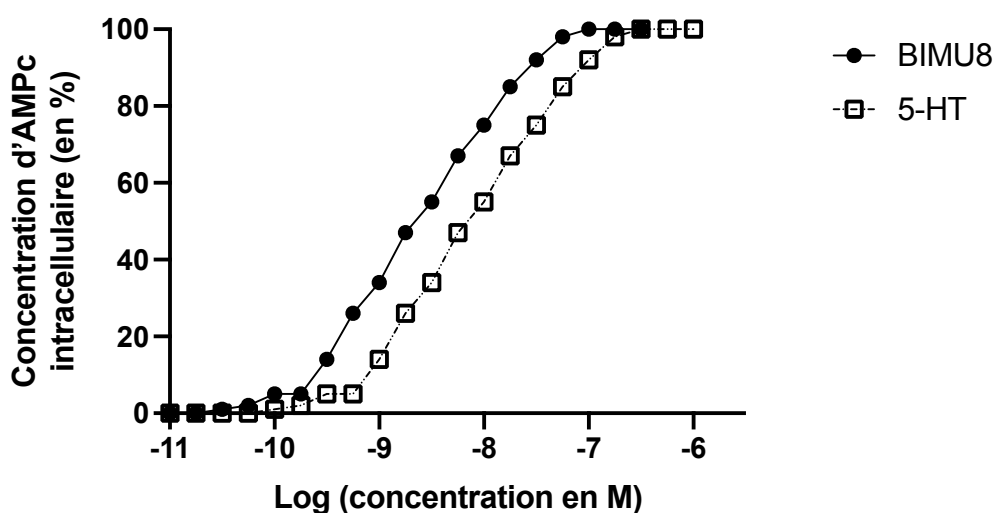
- **Question 6** : Déterminer le rapport d'accumulation, les concentrations maximales et minimales à l'équilibre avec ce nouveau schéma d'administration.

EXERCICE N °5 - pharmacologie /40 points

Des cellules d'ovaires de hamster de chine (CHO) qui expriment la forme humaine du sous type de récepteur 5-HT₄ de la sérotonine (5-HT) sont mises en culture. Sur ces cultures, les concentrations intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) sont mesurées après un traitement soit avec de la sérotonine soit avec un autre ligand, le BIMU8.

Les résultats sont exprimés en pourcentage (%) des concentrations en AMPc obtenues ([figure 1](#)).

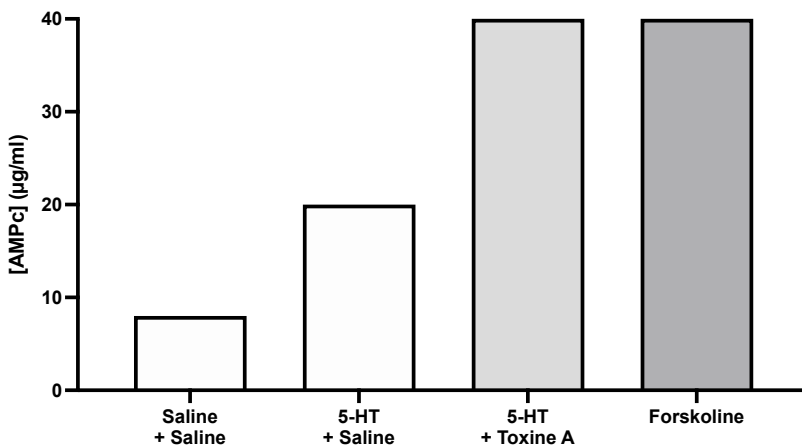
Figure 1 : Effets de différents ligands du récepteur 5-HT₄ sur les concentrations d'AMPc intracellulaire



- **Question 1 :** Définissez puis donnez les valeurs des paramètres pharmacologiques qui permettent de caractériser ces ligands. Comparez les ligands. Précisez la nature des ligands sérotonine et BIMU8 vis-à-vis du sous type de récepteur 5-HT₄ de la sérotonine.
- **Question 2 :** Que pouvez-vous en déduire quant au couplage du récepteur 5-HT₄ de la sérotonine et de la voie de signalisation recrutée ?

Afin de confirmer le couplage du récepteur 5-HT₄ de la sérotonine, une expérience reprenant des conditions expérimentales similaires à celles ayant permis d'obtenir la figure 1 a été réalisée. La variation de la concentration intracellulaire d'AMPc dans les cellules CHO a été mesurée après l'application de différentes conditions dont notamment l'utilisation d'une toxine A en présence de sérotonine (5-HT). Les effets de la forskoline administrée seule sont aussi étudiés ([figure 2](#)).

Figure 2 : Effets de la sérotonine seule ou en présence de différents agents pharmacologiques sur la production d'AMPC



- **Question 3 :** Quel est l'effet de la toxine A ? Quel est son mécanisme d'action ? Que permet cette toxine ?
- **Question 4 :** Quel est le mécanisme d'action de la forskoline ?

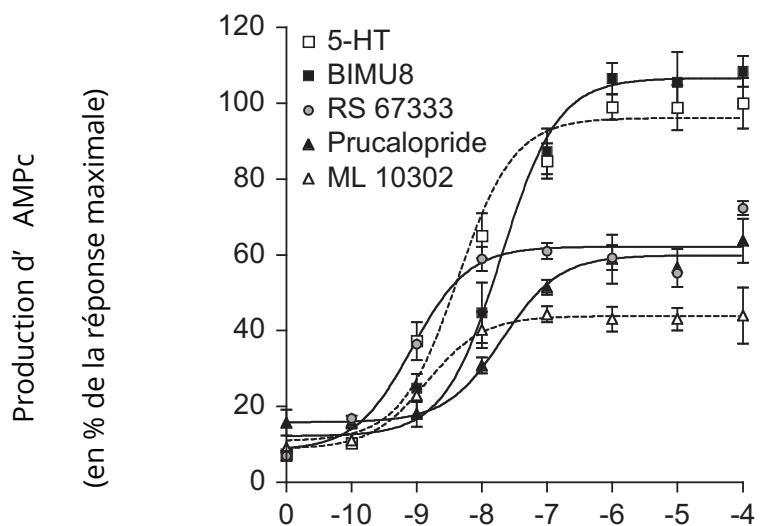
Dans la même étude, deux nouvelles expériences sont réalisées permettant de déterminer le Kd de la sérotonine (5-HT) et du ML10302 pour les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₄. Les valeurs sont consignées dans le tableau de valeurs suivant :

	5-HT _{1A} (Kd en M)	5-HT ₄ (Kd en M)
5-HT	1.10 ⁻⁹ M	3.10 ⁻⁹ M
ML10302	5.10 ⁻⁶ M	2.10 ⁻⁹ M

- **Question 5 :** Définissez le Kd ? Comment est-il obtenu ? Que pouvez-vous en conclure au sujet de la 5-HT et du ML10302 ?

Les effets du RS6733 et d'autres ligands du récepteur 5-HT₄ sur les concentrations d'AMPC ont été étudiés dans des cellules en culture. Les résultats sont présentés dans la figure 3 suivante :

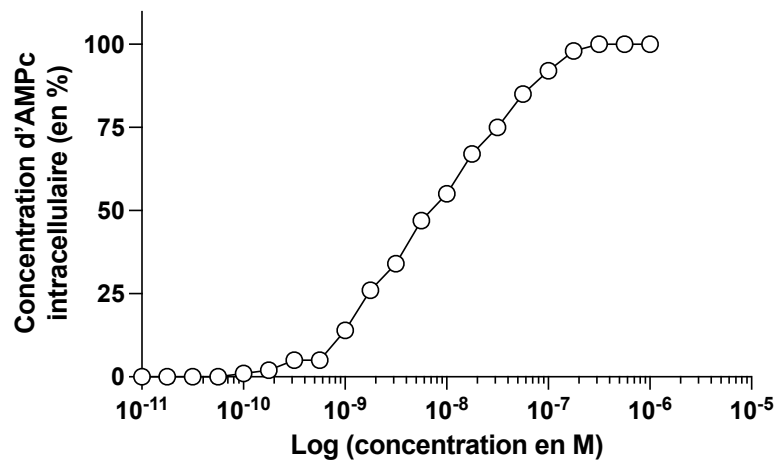
Figure 3 : Effets de différents ligands du 5-HT₄ sur les concentrations d'AMPC intracellulaire



- **Question 6** : Comment appelle-t-on ce type de représentation?
Classez et caractérissez les molécules selon les paramètres pharmacologiques obtenus sur la **figure 3**.
- **Question 7** : Rappelez la définition de la pA2 et ce que ce paramètre caractérise.
- **Question 8** : Dessinez « à main levée » et légendez la courbe qui pourrait être obtenue en répétant la stimulation par des concentrations croissantes de (5-HT) en présence de $10^{-7}M$ de GR113808 (qui a une pA2 de 9.5)

Vous pouvez annoter la **figure 4** ci-dessous et/ou justifier votre réponse

Figure 4 : Effets de la 5-HT sur les concentrations d'AMPc intracellulaire



P