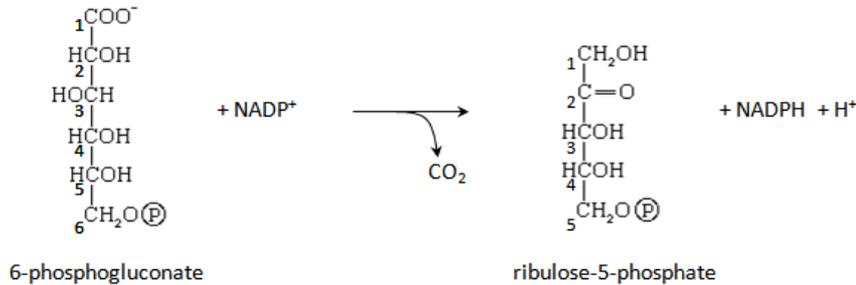


**LV303 EXAMEN 1<sup>ère</sup> session, 1<sup>ère</sup> partie - CORRIGE**

**La 6-phosphogluconate deshydrogénase**

Sujet inspiré de Ceyhan D. et al. Protein J. 2005;24 :293-301

L'enzyme 6-phosphogluconate deshydrogénase (6-PGD) catalyse la réaction suivante :



**Partie I (10 points) : Métabolisme et 6-phosphogluconate deshydrogénase**

Q1) A quelle voie métabolique cette enzyme appartient-elle ?

**Voie des pentoses-P (PP), branche oxydative.**

Q2) Indiquez comment, à partir du glucose comme seule source de carbone, des cellules hépatiques synthétisent le ribose 5- phosphate lorsque le rapport  $[\text{NADPH}]/[\text{NADP}^+]$  est très élevé ( $> 200$ ) dans le cytosol. Vous justifierez vos réponses en détaillant les différentes réactions métaboliques mises en jeu en précisant le nom des intermédiaires et des enzymes impliqués (les formules ne sont pas demandées).

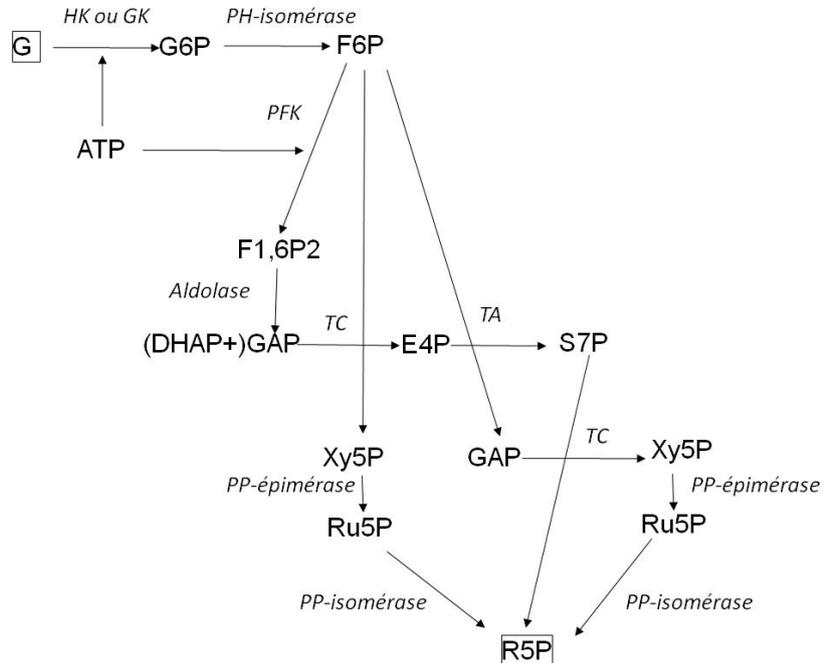
**NADPH inhibe la glucose 6-P déhydrogénase : la branche oxydative de la voie des PP est donc bloquée. Pour synthétiser du ribose 5-P, on doit alors emprunter la glycolyse, puis remonter la branche non-oxydative de la voie de PP, à partir du Fru 6-P et du GAP (voir schéma ci-dessous) :**

(a) Entre Glucose et Ribose 5-P, les 8 intermédiaires suivants doivent être mentionnés :

**G6P - F6P - F1,6P2 - GAP - E4P - S7P - Xy5P et Ru5P**

(b) Entre Glucose et Ribose 5-P, les 8 enzymes suivantes doivent être mentionnées :

**HK (GK) - PH isomérase - PFK - Aldolase - TC - TA - PP épimérase et PP isomérase.**



## Partie II (20 points) Purification et étude enzymatique de la 6-phosphogluconate deshydrogénase

*NB : toute réponse numérique exprimée sans ses unités ne sera pas considérée*

Le déficit physiologique en cette enzyme conduit à une pathologie héréditaire qui provoque la destruction des globules rouges. Ceux-ci deviennent alors sensibles aux phénomènes d'oxydation cellulaire. Pour étudier le mécanisme de cette enzyme, une équipe de chercheurs l'a purifiée à partir de l'intestin grêle du rat.

### Purification

L'homogénat de départ a été préparé à partir de plusieurs intestins grêles broyés. La 6-PGD a été purifiée suite à 4 étapes successives :

- ultracentrifugation à 105 000 g pendant 1h,
- colonne de chromatographie d'exclusion (Sephadex),
- colonne de DEAE-Sepharose,
- chromatographie d'affinité (la 6-PGD possède de l'affinité pour l'ADP).

Le tableau de suivi de la purification est présenté ci-dessous :

Etapes	Quantité protéine (mg)	Volume (mL)	Activité (UI.mL <sup>-1</sup> )	Activité spécifique (unité ?)
Ultracentrifugation	600	10	1,2	0,02
Sephadex	250	25	0,4	0,04
DEAE Sepharose	12	12	0,5	0,5
ADP-Sepharose	0,4	4	1	10

**Q1) Selon quel(s) critère(s) les protéines sont-elles séparées sur une colonne de DEAE-Sepharose ?**

**Le DEAE-Sepharose est une colonne échangeuse d'anions retenus par le groupement diethylaminoethyle (DEAE) chargé positivement, et lié covalament au Sepharose (polymère de polysaccharide) : les protéines sont séparées selon leur charge globale (d'autant plus retenues qu'elles sont chargées négativement).**

**Q2) Quelle est l'unité de l'activité spécifique ? UI.mg<sup>-1</sup>**

**Ecrivez la formule permettant d'obtenir les valeurs des activités spécifiques.**

**Activité x Volume/Quantité protéine.**

**Q3) Calculez le facteur de purification et le rendement globaux de la purification.**

$$\text{FP global} = 10 / 0,02 = 500$$

$$\text{Rdt global} = 1 \times 4 / 1,2 \times 10 = 33,3\%$$

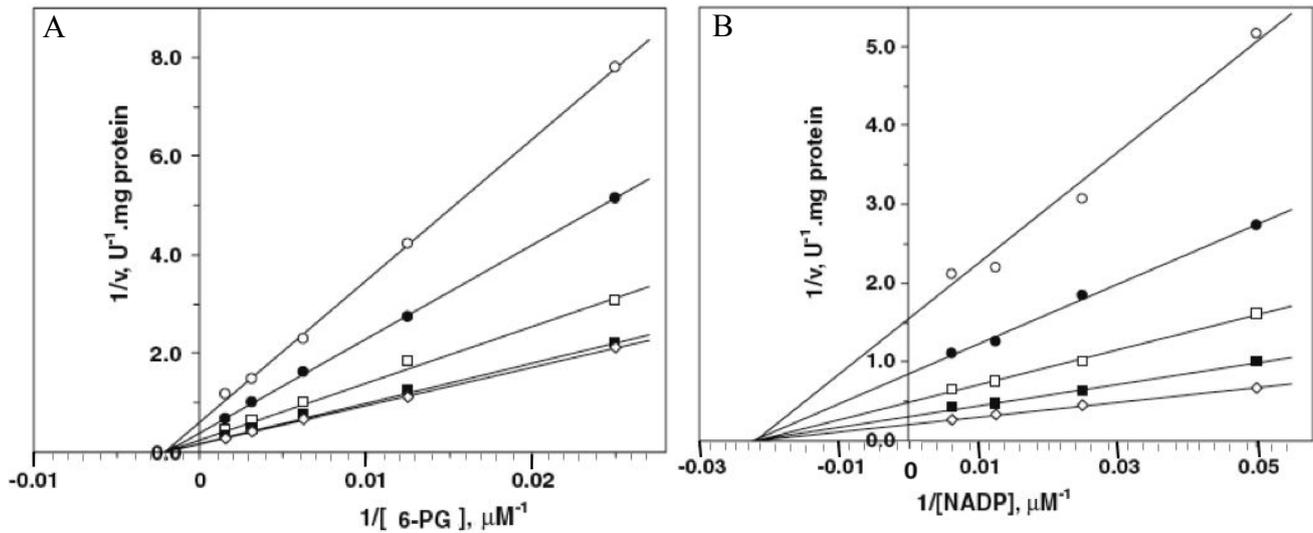
**Q4) Question bonus (ne perdez pas de temps dans les calculs, sinon passez aux questions suivantes) : calculez les facteurs de purification entre chaque étape.**

$$\text{FP Sephadex} = 2 \quad \text{DEAE-Sépharose} = 12,5 \quad \text{FP ADP-Sépharose} = 20$$

**En vous basant uniquement sur ces valeurs, quel procédé de purification vous semble-t-il le plus efficace ? FP ADP-Sépharose.**

### Etude enzymatique

Les vitesses initiales de la réaction d'oxydation du 6-phosphogluconate ont été mesurées pour des concentrations variables de 6-phosphogluconate et de NADP<sup>+</sup>. Les représentations sont présentées Figure 1.



**Figure 1 :** Réaction d'oxydation du 6-phosphogluconate (6-PG) par la 6-PGD pour des concentrations variables de 6-PG (A) et de  $\text{NADP}^+$  (B). L'activité est déterminée à 37°C dans un tampon phosphate 100 mM pH 7,7.

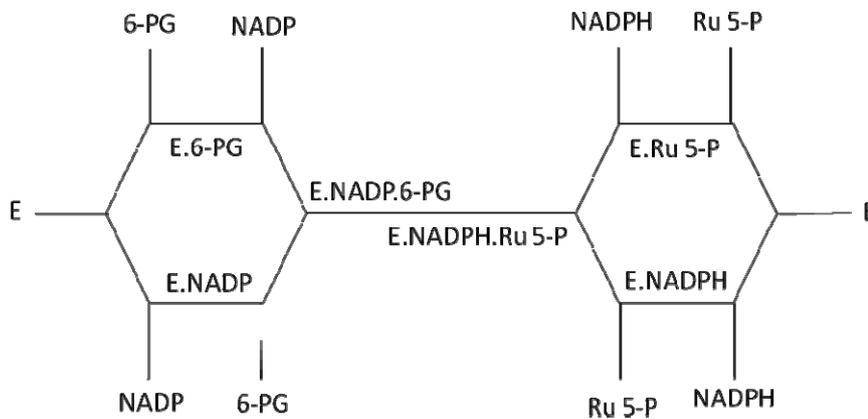
**Q5) A quoi correspondent les 5 droites sur chacune des figures ?**

**A l'utilisation de 5 concentrations du 2<sup>ème</sup> substrat, soit  $\text{NADP}^+$  (A) et 6-PG (B).**

**Q6) D'après ces représentations graphiques, quel est le mécanisme de la réaction d'oxydation du 6-phosphogluconate catalysée par la 6PGD ? Justifiez votre réponse.**

**NOCI. Intersection des courbes sur les axes des abscisses.**

**Dessinez la représentation de Cleland correspondante.**



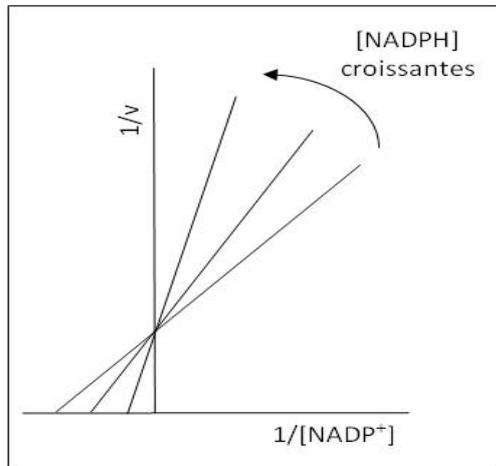
**Q7) Déterminez les  $K_M$  de chacun des substrats (avec leurs unités). Discutez.**

**Fig. 1A :  $-1/K_{M(6-PG)} \approx -0.002 \mu\text{M}^{-1} \rightarrow K_{M(6-PG)} \approx 500 \mu\text{M}$**

**Fig. 1B :  $-1/K_{M(\text{NADP}^+)} \approx -0.02 \mu\text{M}^{-1} \rightarrow K_{M(\text{NADP}^+)} \approx 50 \mu\text{M}$**

**L'affinité apparente pour le  $\text{NADP}^+$  est 10 fois supérieure à celle du 6-PG.**

L'effet de l'**inhibition par le NADPH** a été étudié sur l'activité de l'enzyme. Pour cela, l'expérience a été réalisée en présence de 6-phosphogluconate en excès par rapport au  $\text{NADP}^+$ , et de différentes concentrations de  $\text{NADP}^+$  et de NADPH (voir Figure 2).



**Figure 2** : Réaction d'oxydation du 6-phosphogluconate pour des concentrations variables de  $\text{NADP}^+$  et de NADPH.

**Q8) Quel type d'inhibition le NADPH exerce-t-il sur la 6PGD (justifiez votre réponse) ?**

**Inhibition compétitive, intersection des courbes sur l'axe des ordonnées, même  $V_{\text{max}}$ ,  $K_{\text{M}}$  différents.**

**Cela confirme-t-il le mécanisme identifié à la Q6 ?**

**Oui, car pour un NOCI, les produits sont inhibiteurs compétitifs des substrats et réciproquement.**

**Q9) En présence de  $\text{NADPH } 30 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , le  $K_{\text{M}}$  de la 6PGD est le double de celui déterminé en son absence. Calculez la constante  $K_{\text{I}}$  du NADPH (avec ses unités) en justifiant votre réponse.**

**Pour une IC,  $K'_m = K_m (1 + [I]/K_i)$ . Donc, si  $K'_m = 2 K_m$ , c'est que  $K_i = [I] = 30 \mu\text{M}$ .**