

SL Dr. Liviu Tămaş tamas.liviu@umft.ro et tliviu33@yahoo.com

Toutes les questions seront envoyées à SL Dr. Liviu Tămaş aux les adresses de email fournis (**IMPORTANT** – les questions seront envoyées simultanément aux les deux adresses de email fournis et pas seulement a une !!!)

LA VOIE DE PENTOSE PHOSPHATES (CYCLE). LA DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ DE GLUCOSE 6P-DÉSHYDROGÉNASE. LE TEST DE BREWER

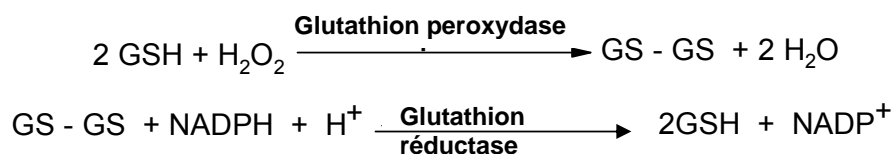
Introduction

La voie de pentose phosphates (VPP) est une voie non énergogène de dégradation du glucose, à localisation cytoplasmique, qui fonction en parallèle avec la voie d'Embden-Meyerhof, en présentant des interférences avec celle la.

Le rôle principal de la voie est de fournir $\text{NADPH} + \text{H}^+$, mais aussi de transformation des hexoses en pentoses, d'interconversion entre les oses avec 3, 4, 5, 6, 7 et 8 atomes de carbone.

Le VPP est très actif dans certaines cellules (foie, tissu adipeux, les glandes surrénales, glandes sexuelles, la thyroïde, le sein en lactation, érythrocytes) et a une activité réduite dans d'autres cellules (muscle squelettique).

Pour érythrocytes, la VPP joue un rôle important dans la prévention de l'accumulation de peroxyde d'hydrogène qui a une action oxydante sur l'hémoglobine et les structures lipidiques. À cet égard, on utilise un mécanisme axé sur le glutathion:



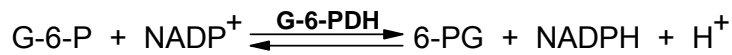
Le système qui permet la réduction permanente de la méthémoglobine à d'hémoglobine est basé sur l'action de deux méthémoglobine réductases érythrocytaires : cytochrome B5 réductase (diaphorase I), NAD-dépendante (85%) et une flavine réductase (diaphorase II), NADP-dépendante (15%). Dans les situations pathologiques, où la méthémoglobine s'accumule (par exemple, empoisonnement aux nitrites), elle peut être réduite à l'hémoglobine en stimulant la diaphorase II (et donc la VPP) par l'interpose d'un système redox qui prend les équivalents réducteurs du NADPH (réduit) et qui peut ainsi participer à une nouvelle déshydrogénation dans la VPP et de les fournir à la diaphorase II. Tel est le système redox de méthylène bleu qui, administré par voie intraveineuse en cas d'empoisonnement au nitrite a une action thérapeutique.

Partie expérimentale

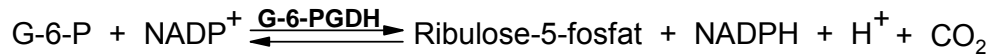
La détermination de l'activité de glucose 6P-déshydrogénase

Principe

La glucose 6P-déshydrogénase (G6P-DH) catalyse la première étape du voie de pentose phosphates qui oxyde le glucose 6-phosphate (G-6-P) en 6-phosphogluconate (6-PG) et de réduire le NADP^+ en NADPH.



Le NADP^+ (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) est réduite par G-6-PDH en présence d'G-6-P. La vitesse de formation de NADPH est proportionnelle à l'activité de G-6-PDH et est mesurée par spectrophotométrie comme une augmentation de l'absorption de lumière à 340 nm. La réaction qui peut produire un seconde équivalent molaire de NADPH, par l'action de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGDH) est:



Cette réaction sera bloquée à l'aide de maleimide, un inhibiteur de la 6-PGDH.

Réactifs et matériaux

1. Réactif de travail: NADP 1,5 mmol / l et maleimide 12 mmol / l (le réactif contient aussi solution tampon, solution de stabilisation et un agent de lyse)
2. Solution de substrat: glucose 6-phosphate 1,05 mmol / l, solution tampon, sel de magnésium et azoture de sodium comme agent de conservation.

Les réactifs qui ne sont pas utilisés sont conservés au réfrigérateur à 2-8°C et le réactif de travail, reconstitué dans de l'eau bidistillée, comme indiqué sur l'étiquette ou le protocole, est stable pendant 8 heures à la température du laboratoire (18-26°C) ou 5 jours dans un réfrigérateur (2-8°C).

Mode opératoire

Travaillez à la température du laboratoire (23°C)

1. Préparez le mélange réactionnel:
 - a. Insérez 0,01 ml de sang directement dans le récipient contenant 1 ml de réactif de travail et bien mélangez jusqu'à ce que les érythrocytes seront complètement suspendus. Puis laissez reposer pendant 5-10 minutes à la température du laboratoire (23°C).
 - b. Ajouter 2 ml de solution de substrat G-6-PDH directement dans le récipient et secouez-le doucement en inversant le récipient à plusieurs reprises.
 - c. Transférez le mélange réactionnel dans la cuvette spectrophotométrique et passez à l'étape suivante.
2. Placez la cuvette dans le spectrophotomètre.
3. Ensuite, mesurez l'absorption de lumière (A) à 340 nm en utilisant l'eau distillé comme témoin. C'est l'absorption initiale (A_i).
4. Juste après 5 minutes, mesurez l'absorption, en résultant l'absorption finale, A_f .

Calcul

Calculez $\Delta A/\text{min}$:

$$\Delta A = \frac{A_f - A_i}{5}$$

L'activité de G-6-PDH est exprimée comme U/10¹² érythrocytes ou comme U/g hémoglobine (Hb).

$$\text{Activite G - 6 - PDH (U/10}^{12} \text{ erythrocytes)} = \frac{\Delta A/\text{minute} \times 3,01 \times 10^{12} \times \text{FCT}}{0,01 \times 6,22 \times (\text{N} \times 10^6) \times 1000}$$

ou:

3,01 = volume total de réaction
 10^{12} = facteur pour exprimer l'activité en 10^{12} cellule
 0,01 = volume du probe (ml)
 $N \times 10^6$ = numéro d'érythrocytes/mm³, déterminé pour chaque probe
 1000 = facteur de conversion du numéro d'érythrocytes/mm³ en numéro d'érythrocytes/ml
 FCT = facteur de conversion de la température (1,55 à 23°C)

Valeurs normales

Hommes et femmes: 146-376 U/ 10^{12} érythrocytes

Les valeurs pour nouveaux née peuvent être légèrement plus élevé.

Le test de Brewer

Principe

Le test de Brewer est un test afin de réduire la méthémoglobine in vitro, en conditions de l'intégrité enzymatique de la VPP. L'hémoglobine des érythrocytes est oxydée avec du nitrite de sodium dans la méthémoglobine, procès réversible en présence de méthylène bleu et a la condition d'intégrité enzymatique de la VPP. L'existence d'un déficit enzymatique de la VPP (notamment la glucose 6P-déshydrogénase) provoque la transformation irréversible de l'hémoglobine en méthémoglobine.

Réactifs

1. Solution de nitrite de sodium 0,18 M dans une solution de glucose 0,28 M
2. Solution de méthylène bleu 0,0004 M dans du NaCl 0,9%
3. L'héparine de 50 UI pour 1 ml de sang

Mode opératoire

Introduisez dans trois tubes étiquetés 1, 2, 3:

Reactifs (ml)/tube	1	2	3
Sang hépariné	2,00	2,00	2,00
Nitrite de sodium	-	0,10	0,10
Méthylène bleu	-	-	0,10

Mélangez les contenus des tubes.

Incubez 3 heures à 37°C.

Interprétation

Tube - 1: est le tube de référence pour l'hémoglobine, couleur rouge.

Tube - 2: est le tube de référence pou la méthémoglobine, couleur brun.

Tube - 3: est la probe elle-même, qui peut être:

- Rouge (semblable à E 1): situation normale, la production de NADPH, H⁺ présents.
- Brun (semblable à E 2) : situation pathologique, la production de NADPH, H⁺ altéré par défaut enzymatique de la voie (chez les individus homozygotes).

Le méthylène bleu est un system d'oxydoréduction qui est oxydant pour le couple NADPH / NADP⁺ et réducteur pour la réaction catalysée par hémoglobine réductase.

Importance médicale du déficit en glucose-6P-déshydrogénase

Les mutations génétiques du gène de la glucose-6P-déshydrogénase, qui affectent consécutivement la production de NADPH, se produisent dans les populations méditerranéennes ou afro-caribéennes.

Le gène est situé sur le chromosome X, a une transmission liée à l'X et affecte principalement les hommes.

Il existe plus de 400 millions de porteurs des mutations du gène G6PDH, mais la plupart sont asymptomatiques.

En fonction de défaut génétique, l'enzyme qui résulte provoque une anémie hémolytique lorsque les individus sont soumis à un stress oxydatif, à diverses infections, à des médicaments (antipaludéens, par exemple la primaquine ou les sulfonamides), ou lorsqu'ils utilisent dans l'alimentation un certain type de haricots, *Vicia faba*, qui va produire une maladie appelée favisme (le mécanisme de production de la maladie n'est pas encore élucidé mais on suppose que deux composés des haricots, l'isouramil et la divicine agissent sur le glutathion, ayant un effet inhibiteur sur sa régénération, ce qui conduit à l'accumulation de H_2O_2 et des autres radicaux libres).

Les variantes mutantes du gène sont plus usuelles dans les populations touchées par le paludisme, ce qui suggère une augmentation de la résistance à cette maladie par une enzyme déficiente (le parasite *Plasmodium falciparum* est très sensible au stress oxydatif, de sorte que dans les érythrocytes où existe une variante enzymatique avec une faible activité antioxydante (mutante), l'environnement devient toxique pour le parasite, mais pas pour la cellule hôte).

Il existe deux types de défauts enzymatiques résultant par les mutations génétiques:

1. **La variante méditerranéenne**, représentée par une enzyme stable, mais avec une activité réduite, qui peut provoquer de graves crises hémolytiques qui peuvent être fatales au patient.
2. **La variante afro-caribéenne**, représentée par une enzyme instable, qui affecte principalement les érythrocytes vieux, de sorte que le patient présente des crises hémolytiques plus légères et auto-limitantes