

ÉTUDE DE CAS

1

LE GLUTAMATE DÉSHYDROGÉNASE, UNE ENZYME CLEF POUR LA DYSTROPHIE

La dystrophie est une maladie musculaire dégénérative due à une mutation dans le gène de la dystrophin qui entraîne une plus faible résistance des fibres musculaires mais aussi de la balance entre multiplication et différenciation des cellules souches musculaires. Des altérations dans les jonctions neuromusculaires sont aussi observées avec des morphologies anormales qui entraînent des mauvaises transmissions synaptiques.

La glutamate déshydrogénase (GDH) est une enzyme mitochondriale allostérique qui désamine l'acide glutamine en acide α -cétooglutarique (α -KG). C'est une réaction centrale dans l'élimination de l'azote mais elle est aussi déterminante dans le taux de glutamate cellulaire.. Les inhibiteurs de la glutamate déshydrogénase dans les macrophages ont montré améliorer le renouvellement musculaire. Une étude récente (1) montre que l'inhibition de la glutamate déshydrogénase dans les macrophages mais aussi dans les fibres musculaires augmente la disponibilité en glutamate dans l'espace synaptique. La fixation du glutamate sur son récepteur pré-synaptique augmente l'influx de calcium et le relargage d'acétylcholine, neurotransmetteur de la transmission synaptique.

Les perspectives thérapeutiques liées à la glutamate déshydrogénase engagent à mieux comprendre la régulation de cette enzyme. Au cours de ce travail, vous étudierez :

- les modalités quantitative de régulation de la glutamate déshydrogénase
- vous proposez un modèle structural pour cette régulation
- bonus : vous étudierez l'effet de l'inhibition sur la dystrophie

Partie 1 : Consignes à lire avant de commencer

Préparation en amont de la séance :

En amont de la séance, vous devez réaliser le travail programmé en distanciel asynchrone :

- **le chapitre 2 et 3 sur les fonctions des protéines** avec les QCM associés : Vous avez une version rédigée mais aussi la présentation vidéo à disposition.
- **Les exercices de préparation** TD d'interaction protéine-ligand

A l'issue de ce travail en ligne, vous devriez être capable de décrire les modèles théoriques de croissance et de traiter des données expérimentales simples. Remplissez le questionnaire d'auto-évaluation afin de vous positionner.

Objectifs d'apprentissage :

A l'issue de cette séance, l'étudiant sera capable d'obtenir les constantes des modèles à partir de données théorique mais aussi de traiter les données expérimentales de modèles non coopératifs.

Organisation de la séance :

Cette étude de cas est faite pour vous mettre en difficulté de prime abord. Vous allez travailler en équipe de 6 maximum afin de résoudre l'ensemble de données. Vous vous installez sur un îlot de travail. Vous pouvez utiliser des ordinateurs des tablettes MAIS vous ne pouvez pas utiliser l'IA. Elle ne vous permettra pas de réussir ce type de travail ni d'atteindre les objectifs d'apprentissage.

Vous **devez** échanger au sein d'une équipe mais entre membres de l'équipe pour réussir ce travail et vous équiper de :

- calculatrice
- papier millimétré, crayon gris et règle
- papier brouillon
- un support propre pour le rendu final
- pâte à modeler

Accompagnement de la séance :

Au cours de la séance pour passer d'une sous partie à l'autre, vous devrez **aller voir l'enseignant pour valider votre travail**.

Vous devez également remplir un **questionnaire d'autoévaluation avant la séance (une fois que vous avez lu le cours) et après la séance** afin que je puisse adapter la séance de retour en classe entière.

A la fin de la semaine, vous déposerez le fruit de votre travail en équipe en indiquant bien sur les parties individuelles qui a fait quoi dans l'espace moodle dédié. Ce document doit contenir le résultat correctement rédigé final de votre travail mais aussi vos difficultés et comment vous les avez résolues (voir la box Help).

HELP : QUE FAIRE ? _____

Vous ne pouvez pas m'interroger à chaque difficulté, vous allez suivre un parcours et remplir le document de type "Help" pour cela. Voici l'ordre du travail à réaliser quand vous ne voyez pas comment répondre à la question :

1. Reprendre la partie de cours correspondante et noter les informations
2. Aller voir dans l'énoncé de TD d'enzymologie correspondant afin de comprendre comment traiter les données et noter les informations
3. Échangez avec vos coéquipiers : notez les idées des autres
4. Échangez avec une autre équipe : notez les propositions de l'autre équipe

Vous serez autorisés à venir me demander quand vous aurez réalisé et noté toutes ces étapes.

Références :

(1) Andreia Pereira-Nunes 1, Umami Ammarah 2, Min Shang 3, Iris Charatsidou 4, Himal Sharma 4, Bruna Pereira Sorroche 5, Max Nobis 6, Thibaut Burg 7, Stijn Verschoren 7, Frédéric Relaix 8, Alessio Rotini 9, Ludo Van Den Bosch 7, Marcello Delfini 4, Emanuele Berardi 10, Massimiliano Mazzone 11 (2025) *Pharmacologic Inhibition of Glutamate Dehydrogenase 1 Improves Functional Recovery of Neuromuscular Junctions and Muscle Function in Duchenne Muscular Dystrophy* Am J Pathol 195(8) :1537-1552. doi : 10.1016/j.ajpath.2025.05.003.

(2) Li M, Li C, Allen A, Stanley CA, Smith TJ. Glutamate dehydrogenase : structure, allosteric regulation, and role in insulin homeostasis. Neurochem Res. 2014;39(3) :433-45. doi : 10.1007/s11064-013-1173-2. Epub 2013 Oct 12. PMID : 24122080; PMCID : PMC7808316.

Partie 2 : Étude pharmacologique de la régulation d'une enzyme allostérique : la glutamate déshydrogénase par deux effecteurs : le GTP et l'ADP

Cet enzyme est régulé positivement par l'ADP et négativement par le GTP. Nous allons étudier la fixation de ces deux régulateurs sur l'enzyme par dialyse à l'équilibre. Pour cela quatre expériences de dialyse à l'équilibre sont réalisées comme présentées ci-dessous. Dans le compartiment A, on met l'enzyme en présence ou non d'un des deux régulateurs. A $t=0$, on ajoute dans le compartiment B, du GTP ou de l'ADP radioactif.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4
Compartiment A	(GDH) $30\mu\text{M}$	(GDH) $30\mu\text{M}/(\text{GTP})\ 2\text{mM}$	(GDH) $30\mu\text{M}$	(GDH) $30\mu\text{M}/(\text{ADP})\ 35\text{mM}$
Compartiment B	$^{32}\text{P} - \text{ADP}$	$^{32}\text{P} - \text{ADP}$	$^{32}\text{P} - \text{GTP}$	$^{32}\text{P} - \text{GTP}$

TABLE 1.1 – Protocole des expériences de dialyse à l'équilibre

Au bout de 5 heures de dialyse, la radioactivité est comptée dans les deux compartiments et en sont déduits les rapports $R_{\text{ADP}} = (^{32}\text{P} - \text{ADP})_{\text{lié}} / (\text{GHD})$ et $R_{\text{GTP}} = (^{32}\text{P} - \text{GTP})_{\text{lié}} / (\text{GHD})$ ainsi que les concentrations en ligands radioactifs libres. Les résultats sont présentés ci-dessous.

	Expérience 1	Expérience 2		Expérience 3	Expérience 4
R_{ADP}	$(^{32}\text{P} - \text{ADP})_F$	$(^{32}\text{P} - \text{ADP})_F$	R_{GTP}	$(^{32}\text{P} - \text{GTP})_F$	$(^{32}\text{P} - \text{GTP})_F$
1,2	0,65	2,5	0,3	4,3	15,6
2,4	1,75	6,6	0,6	10	35,7
3,6	3,92	16,7	1,2	26	95,2
4,2	6,08	23,3	1,8	60	214
4,8	10,38	40	2,4	166	571
5,4	42,2	90			

TABLE 1.2 – Résultats : les concentrations en ligands sont données en micromolaires (B=bound, F=free)

Question 1

Calculez les constantes de dissociation ainsi que le nombre de site pour chaque ligand, en présence et en absence du second ligand.

Question 2

Quel est l'effet de la fixation préalable de l'ADP sur celle du GTP et réciproquement ?

Partie 3 : Étude structurale de la glutamate déshydrogénase

La structure de la glutamate déshydrogénase est présentée dans les deux figures ci-dessous ainsi que la position des inhibiteurs.

Question 1

Analyser les structures proposées en regardant :

- la structure globale : nombre de protomères et agencement de ceux-ci
- la position des différents sites de fixation
- les acides aminés liés à la fixation du GTP et de l'ADP (pour cela aller dans la pdb en ligne)

Question 2

En utilisant le matériel à votre disposition : pâte à modeler, scratch, modèles moléculaires, scotch, légo, proposer une représentation 3d de la glutamate déshydrogénase et de la fixation des ligands GTP et ADP en respectant la forme de l'enzyme, la forme des sites ainsi que les types de liaisons des ligands à leur sites.

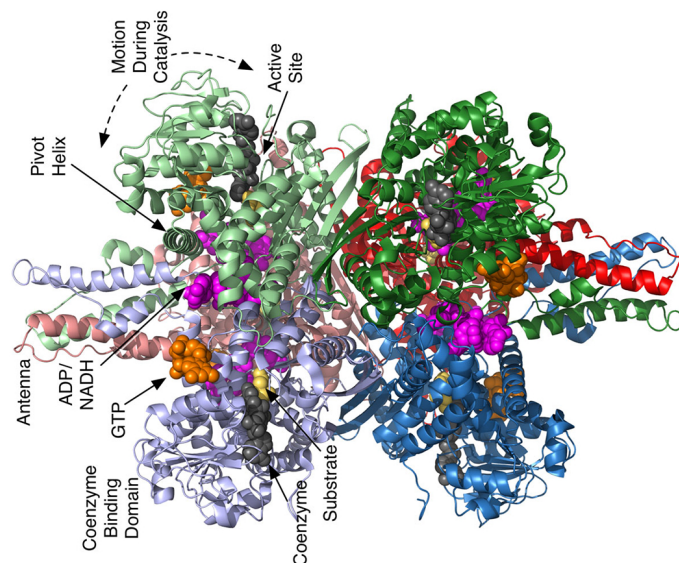


FIGURE 1.1 – **Structure de la GDH animale (2)**.. Chaque sous-unité est représentée sous forme de ruban et dans des couleurs différentes. La flèche met en évidence le mouvement clé du domaine de liaison au NAD lors de la catalyse. Les ligands liés GTP, NAD(P)(H), glutamate et ADP sont mis en évidence en orange, gris, jaune et mauve.

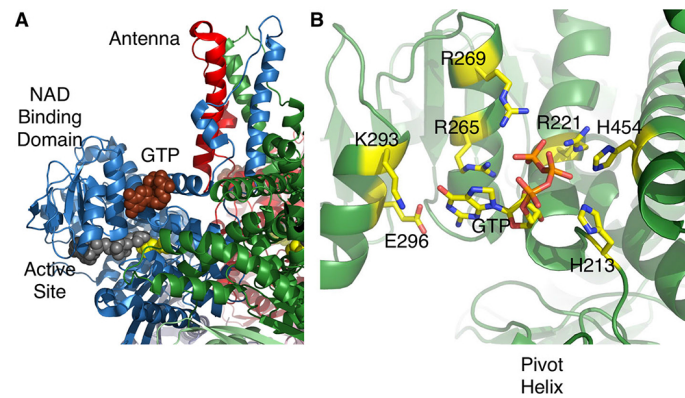


FIGURE 1.2 – **Emplacement du site de liaison de l'inhibiteur, le GTP (2)** . Les numéros de tous les résidus pour l'ensemble des figures correspondent à la GDH humaine. a La structure du GTP (sphères brunes) lié à la conformation fermée de la GDH. b Agrandissement du GTP lié à la GDH représenté sous forme de bâtonnets. Certains des résidus protéiques clés impliqués dans la liaison sont également mis en évidence.

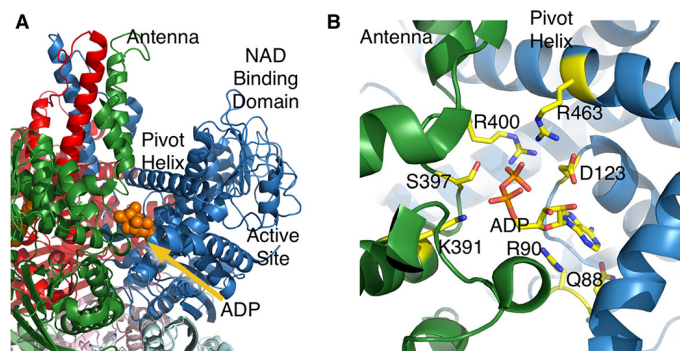


FIGURE 1.3 – **Emplacement du site de liaison du NAD (2)**. . Les numéros de tous les résidus pour l'ensemble des figures correspondent à la GDH humaine.

Partie 4 : BONUS : Étude des effets d'un inhibiteur de la GDH sur la dystrophie dans un modèle de souris

Une étude récente (1) propose que l'inhibition de la GDH entraîne une amélioration de l'acétylcholine dans l'espace synaptique. Les résultats sont présentés ci-dessous.

Question 1

Analysez ces données en respectant le plan "fait, voit, interprête"

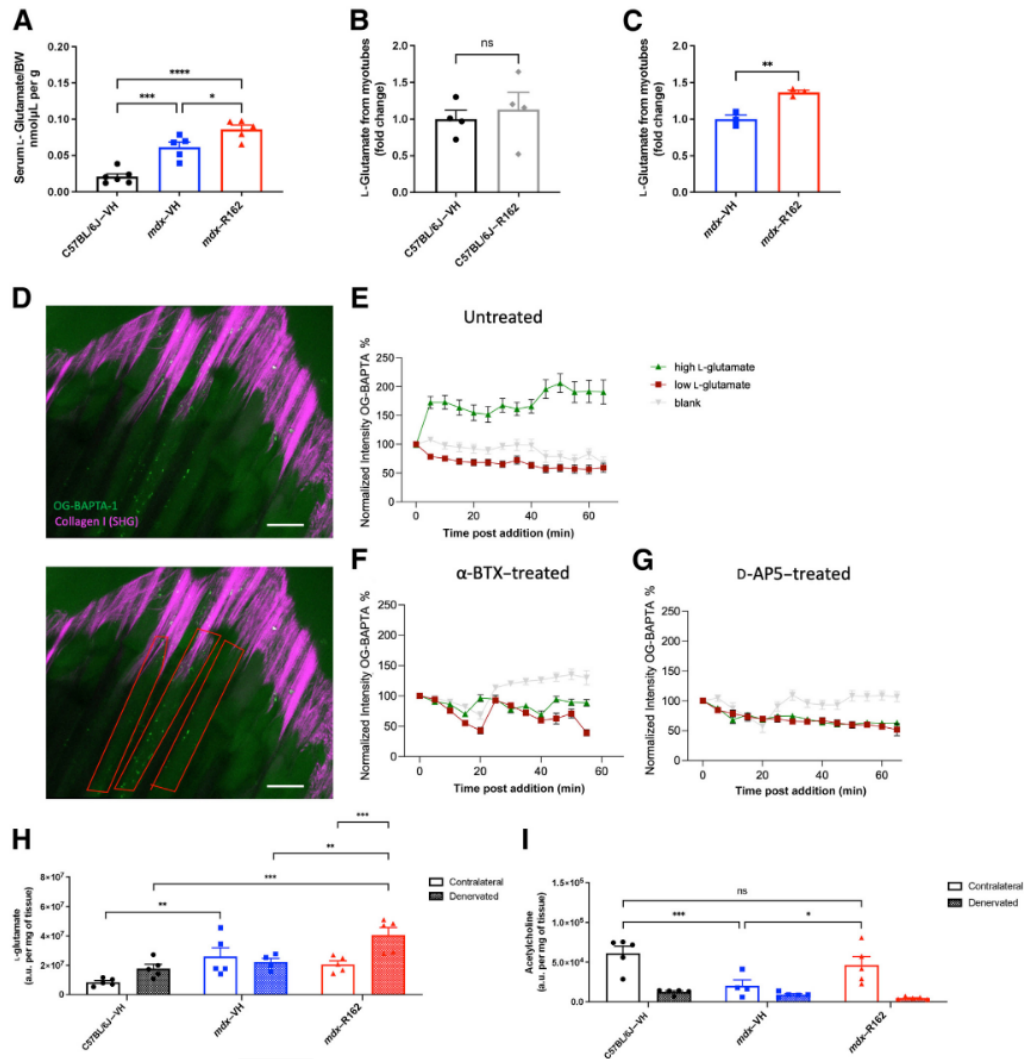


FIGURE 1.4 – Le glutamate dérivé de la fibre musculaire restaure les niveaux d’acétylcholine intramusculaire chez les souris mdx traitées au R162. (1). A et B : Quantification de la teneur en L-glutamate dans le sérum (A) et dans les surnageants de myotubes dérivés de cellules satellites (SC) isolées de souris C57BL/6J (B) et mdx (C) traitées avec le véhicule (VH - la solution sans R162) ou le R162. D à G : Images représentatives (D) et intensité de fluorescence du calcium dans les myofibres du muscle tibial antérieur de souris mdx traitées avec les surnageants de myotubes dérivés de SC traitées au VH (E) et de myotubes dérivés de SC traitées au R162 complétés par de la -bungarotoxine (-BTX) (F) et du D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) (G). Les zones encadrées indiquent les régions d’intérêt sélectionnées pour l’analyse du signal calcique. H et I : Niveaux de L-glutamate (H) et d’acétylcholine (I) dans le liquide interstitiel du muscle gastrocnémien de souris mdx traitées au VH et au R162 après section du nerf sciatique, en utilisant la patte contralatérale comme témoin. Les données sont exprimées sous forme de moyennes $\pm$ ESEM issues de trois expériences indépendantes. $n = 3$ (B, tous les groupes mdx, E à G, tous les groupes) ; $n = 4$ (B, tous les groupes C57BL/6J) ; $n = 5$ (A, mdx ; H et I, tous les groupes) ; $n = 6$ (A, C57BL/6J). $P < 0,05$, $P < 0,01$, $***P < 0,001$ et $****P < 0,0001$, évalués par ANOVA à un facteur avec le test de comparaisons multiples de Tukey (A) ; le test t non apparié et bilatéral (B et C) ; et une ANOVA à deux facteurs avec le test de comparaisons multiples de Tukey (H et I). Barres d’échelle = $100 \mu\text{m}$. BW, poids corporel ; ns, non significatif.