

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 -céto-glutarique (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 co-équipiers : 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, Himani 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.

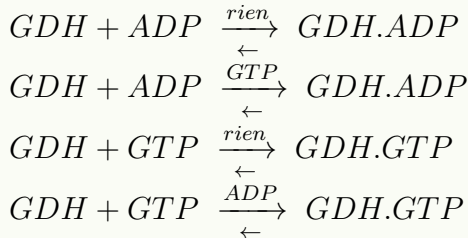
	Expérience 1	Expérience 2		Expérience 3	Expérience 4
R_{ADP}	$(^{32}\text{P} - \text{ADP})_F$	$(^{32}\text{P} - \text{ADP})_F$	R_{GTP}	$(^{32}\text{P} - \text{GTP})_F$	$(^{32}\text{P} - \text{GTP})_F$
1,2	0,65	2,5	0,3	4,3	15,6
2,4	1,75	6,6	0,6	10	35,7
3,6	3,92	16,7	1,2	26	95,2
4,2	6,08	23,3	1,8	60	214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

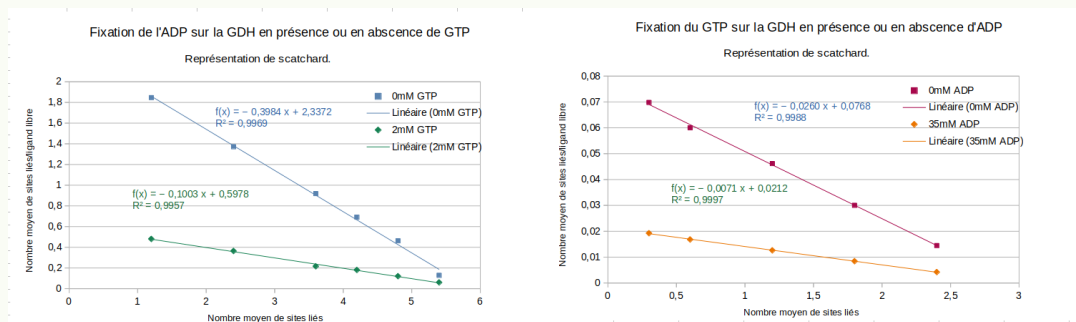
Calculez les constantes de dissociation ainsi que le nombre de site pour chaque ligand, en présence et en absence du second ligand.

La fixation de deux effecteurs sur la glutamate deshydrogénase est mesurée par dialyse à l'équilibre avec des effecteurs marqués au phosphore 32. L'effet de la fixation d'un ligand sur le second est aussi mesuré. Les réactions étudiées sont les suivantes :



Mécanisme de fixation (Scatchard)

Expérience 1		Expérience 2		Expériences 3 & 4		
ν_{ADP}	$\frac{\nu}{[ADP]_{\text{libre}}} (\mu\text{M}^{-1})$	ν_{ADP}	$\frac{\nu}{[ADP]_{\text{libre}}} (\mu\text{M}^{-1})$	ν_{GTP}	Exp 3 : $\frac{\nu}{[GTP]_{\text{libre}}}$	Exp 4 : $\frac{\nu}{[GTP]_{\text{libre}}}$
1,2	1,84	1,2	0,48	0,3	0,069	0,019
2,4	1,37	2,4	0,36	0,6	0,060	0,017
3,6	0,91	3,6	0,22	1,2	0,046	0,013
4,2	0,69	4,2	0,18	1,8	0,030	0,008
4,8	0,46	4,8	0,12	2,4	0,014	0,004
5,4	0,13	5,4	0,06	—	—	—



En

représentation de Scatchard, des droites sont obtenues pour chaque condition de fixation ($r^2 \approx 0,95$). Dans chaque condition, la fixation suit donc un modèle Mickaëlien.

Synthèse des constantes d'affinité

Pour obtenir les constantes d'affinité, l'équation de la droite obtenue est utilisée. En effet, d'après le modèle de Scatchard, la pente est égale à $\frac{-1}{K_D}$

donc $K_D = \frac{-1}{\text{pente}}$

Pour obtenir le nombre de site, deux méthodes peuvent être utilisées.

Le nombre de site est le point d'intersection entre la droite et l'axe des abscisses. Le nombre de site peut donc être lu sur le graphique.

A partir de l'équation de la droite, Le nombre de site est la valeur de x pour laquelle y=0 donc

$ax + b = 0$ donc $x = \frac{-b}{a}$

Le récapitulatif des valeurs est donné si dessous.

	Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Expérience 4
Ligand mesuré	ADP seul	ADP (+ GTP)	GTP seul	GTP (+ ADP)
K_d	2,5 μM	10 μM	38,5 μM	142,8 μM
Nombre de sites (n)	6	6	3	3

La fixation préalable de GTP multiplie par 4 le K_d de l'ADP (passe de 2,5 à 10 μM), ce qui divise son affinité par 4. Réciproquement, la fixation d'ADP multiplie par 4 le K_d du GTP (de 38,5 à 142,8 μM). La fixation d'un nucléotide diminue l'affinité pour l'autre sans modifier le nombre de sites. Ils se fixent donc sur des sites distincts mais en interaction allostérique.

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

CORRECTION

La GDH est une enzyme qui possède 6 protomères identiques. Nous pouvons observer un site actif par protomère et un site ADP par protomère : nous retrouvons bien les 6 sites identifiés pour l'ADP alors qu'on a un site GTP entre deux protomères et donc ne possède que 3 sites.

Le site de fixation du GTP est formé par 7 acides aminés : la plupart sont des acides aminés chargés positivement qui stabilisent les groupements phosphates du GTP (chargés négativement) : histidines, arginines, asparagine.

Le site de fixation de l'ADP est également formé d'acides aminés principalement chargés positivement : arginine et lysine qui stabilisent deux phosphate. Il y a besoin de moins d'acides aminés pour stabiliser car il y a moins de phosphate. Une hélice "pivot" est identifiée. Cette hélice doit être déplacée par la fixation dans le site.

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 ligand 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.

La GDH est un homohexamère (6 sous-unités).

- 6 sites ADP $\iff$ 1 site par sous-unité.
- 3 sites GTP $\iff$ 1 site GTP à l'interface de deux sous-unités.

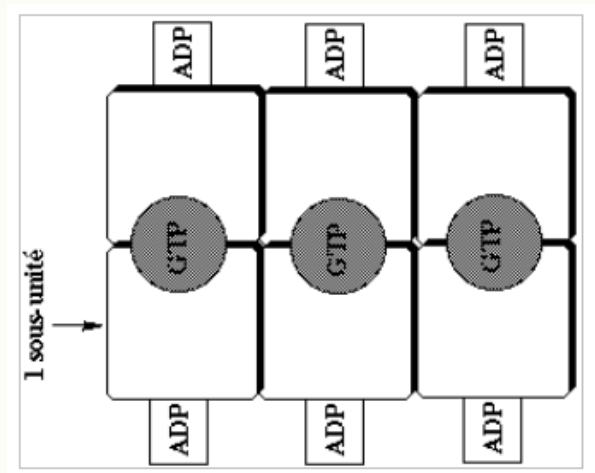
La GDH n'est fonctionnelle pour la régulation par le GTP qu'après assemblage de sa structure quaternaire.

Validation du schéma thermodynamique en carré : Le complexe ternaire [ADP-GDH-GTP] peut être formé selon deux voies équivalentes :

$$K_d^{(\text{GDH}, \text{ADP})} \times K_d^{(\text{GDH-ADP}, \text{GTP})} = 2,5 \mu\text{M} \times 141 \mu\text{M} = 352,5 \mu\text{M}^2$$

$$K_d^{(\text{GDH}, \text{GTP})} \times K_d^{(\text{GDH-GTP}, \text{ADP})} = 38,5 \mu\text{M} \times 10 \mu\text{M} = 385 \mu\text{M}^2$$

Les deux produits étant très proches, le modèle thermodynamique en carré est parfaitement valide.



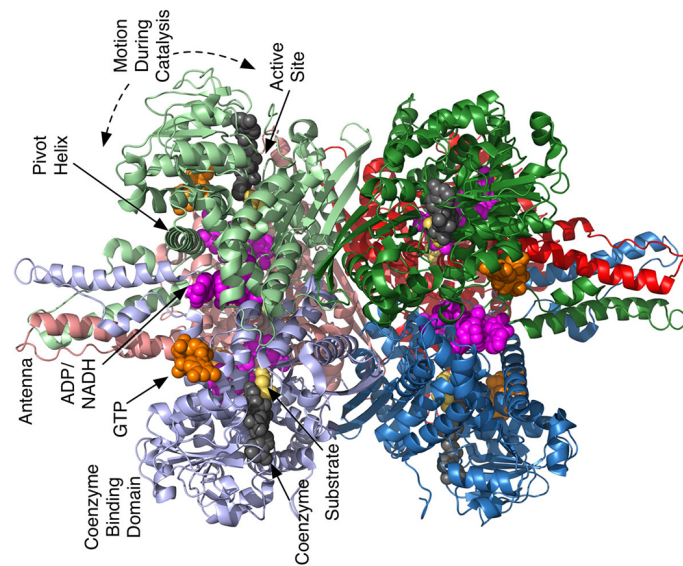


FIGURE 1.1 – **Structure de la GDH animale (2)**.. Chaque sous-unité est représentée sous forme de ruban et dans des couleurs différentes. La flèche met en évidence le mouvement clé du domaine de liaison au NAD lors de la catalyse. Les ligands liés GTP, NAD(P)(H), glutamate et ADP sont mis en évidence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

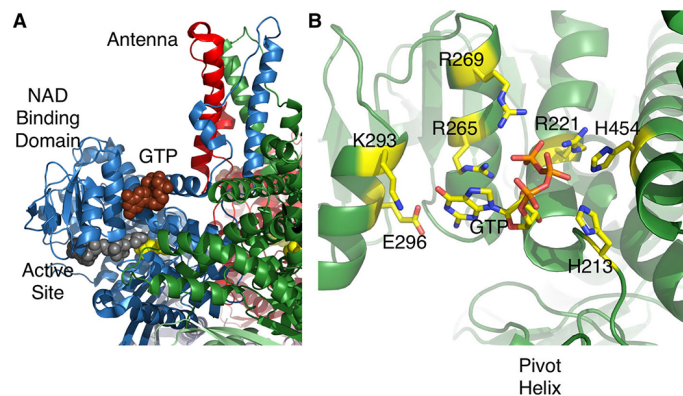


FIGURE 1.2 – **Emplacement du site de liaison de l'inhibiteur, le GTP (2)** . Les numéros de tous les résidus pour l'ensemble des figures correspondent à la GDH humaine. a La structure du GTP (sphères brunes) lié à la conformation fermée de la GDH. b Agrandissement du GTP lié à la GDH représenté sous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

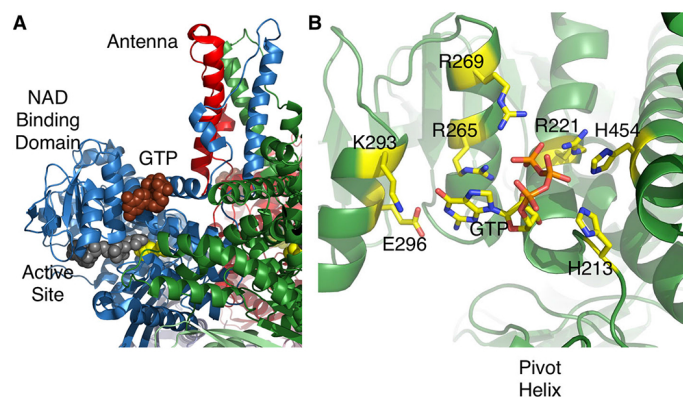


FIGURE 1.3 – **Emplacement du site de liaison de l'inhibiteur, le GTP (2).** . Les numéros de tous les résidus pour l'ensemble des figures correspondent à la GDH humaine. a La structure du GTP (sphères brunes) lié à la conformation fermée de la GDH. b Agrandissement du GTP lié à la GDH représenté sous forme de bâtonnets. Certains des résidus protéiques clés impliqués dans la liaison sont également mis en évidence.

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"

NB : La correction est la traduction directe de l'article par une IA (gemini) afin de faciliter l'accès à cette source et de vous entraîner à lire des analyses de résultats dans les articles

En plus d'être un métabolite important pour l'homéostasie du muscle squelettique,²⁷ le glutamate contribue également à la régulation de la neurotransmission et de la plasticité synaptique.³³ Afin d'évaluer la manière dont la modulation pharmacologique du métabolisme du glutamate affecte la dynamique complexe des adaptations musculaires et de la JNM dans la DMD, son abondance au niveau systémique a d'abord été analysée. La concentration circulante de L-glutamate était significativement augmentée dans le sérum de souris mdx par rapport à celle des souris saines, tandis que le traitement au R162 a encore accru son abondance systémique (Figure 5, A). Étant donné que le tissu musculaire squelettique constitue une source importante de glutamate, la capacité du R162 à moduler la libération de glutamate dans des cultures *in vitro* de myotubes dérivés de SC a été testée. Si le traitement au R162 n'a pas modifié le niveau de glutamate dans le surnageant de myotubes dérivés de SC isolées de souris saines (Figure 5, B), le glutamate était augmenté dans le milieu de culture de myotubes dérivés de SC isolées de souris mdx (Figure 5, C).

Ensuite, pour étudier les effets de la disponibilité accrue en glutamate dépendante du R162 sur les JNM, une analyse par imagerie calcique (*in vivo*, Ca^{2+}) a été réalisée chez des souris mdx, en exploitant la capacité du glutamate à stimuler l'influx de Ca^{2+} dans les fibres musculaires après sa liaison aux NMDAR. Plus précisément, le muscle tibial antérieur de souris mdx a été exposé pendant 1 heure à une incubation avec du milieu issu de cultures de myotubes contenant une concentration faible ou élevée de glutamate et un marqueur calcique Oregon Green 488 BAPTA-1 (Figure 5, D). L'analyse a montré que l'exposition à une forte concentration de glutamate (c'est-à-dire aux surnageants de myotubes dérivés de SC isolées de souris mdx et traitées au R162) entraînait une captation accrue de Ca^{2+} dans les fibres musculaires par rapport à la faible captation observée dans les muscles incubés avec des milieux sans ou pauvres en glutamate (c'est-à-dire exposés à un milieu normal ou aux surnageants de myotubes dérivés de SC isolées de souris mdx traitées au véhicule) (Figure 5, E), confirmant ainsi le rôle central de la signalisation du glutamate dans la contractilité musculaire.

De plus, il a été démontré que l'augmentation de la signalisation calcique dépendait à la fois de la signalisation des AChR et de la stimulation des NMDAR induite par le glutamate, car la pré-incubation du tissu musculaire avec de la -bungarotoxine (inhibiteur des AChR) ou du D-AP5 (inhibiteur des NMDAR) a complètement aboli l'influx accru de Ca^{2+} induit par la concentration extracellulaire élevée de glutamate (Figure 5, F et G).

Ensuite, afin de mieux définir la dynamique fonctionnelle entre la fonctionnalité de la JNM et la régulation métabolique de la fibre musculaire, les membres postérieurs de souris traitées au véhicule (VH) et au R162 (C57BL/6J-VH, mdx-VH et mdx-R162) ont été soumis à une dénervation, abolissant ainsi la fonction de la JNM, le membre contralatéral servant de témoin.

L'analyse métabolique a été réalisée sur les liquides interstitiels musculaires 2 jours après l'intervention chirurgicale, moment où l'infiltrat inflammatoire ne différait pas entre les membres dénervés et contralatéraux.³⁴ En accord avec le niveau de glutamate sérique (Figure 5, A), le muscle gastrocnémien des souris mdx présentait une concentration accrue de glutamate. Notamment, bien que le traitement au R162 ait encore augmenté le glutamate circulant, cette augmentation n'a pas été observée dans le tissu musculaire (Figure 5, H). De façon intéressante, une augmentation supplémentaire du glutamate interstitiel musculaire dépendante du R162 a également été observée après la dénervation, ce qui suggère que les terminaisons nerveuses et les JNM jouent un rôle majeur dans le tamponnage du glutamate extracellulaire (Figure 5, H).

Ces résultats, associés aux effets positifs du glutamate sur la fonctionnalité de la JNM (Figure 5, D à G), ont incité à élucider davantage l'impact de l'inhibition de GLUD1 sur la transmission neuromusculaire. L'évaluation métabolomique de l'abondance d'ACh dans le liquide interstitiel musculaire a montré que les muscles mdx étaient caractérisés par une réduction de trois fois de la libération d'ACh (c'est-à-dire dans les muscles contralatéraux des souris mdx-VH). Il est à noter que le traitement au R162 chez les souris mdx a restauré les niveaux d'ACh à des valeurs équivalentes à celles des souris saines (Figure 5, I). Comme attendu, en raison de l'absence de fonction de la JNM dans les muscles dénervés, les niveaux d'ACh étaient presque indétectables (Figure 5, I).

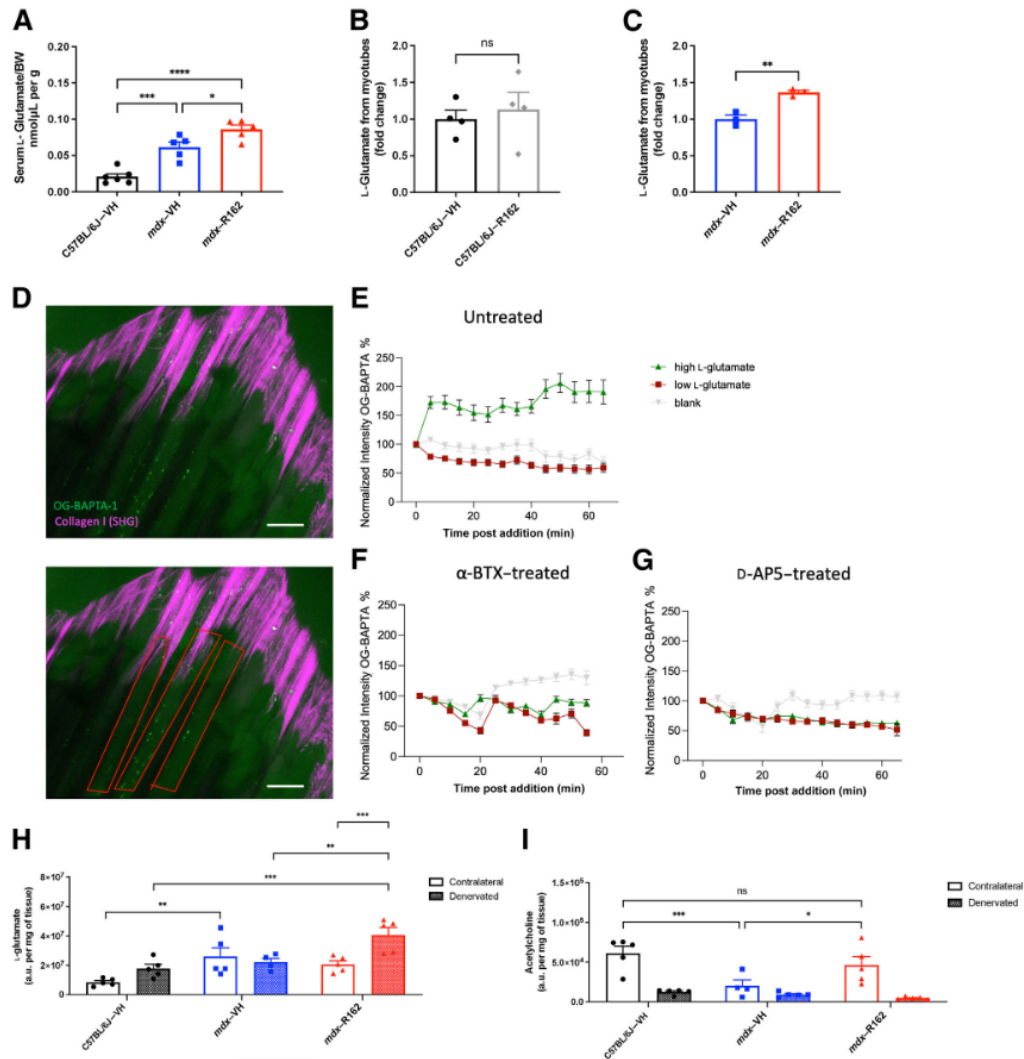


FIGURE 1.4 – Le glutamate dérivé de la fibre musculaire restaure les niveaux d’acétylcholine intramusculaire chez les souris mdx traitées au R162. (1). A et B : Quantification de la teneur en L-glutamate dans le sérum (A) et dans les surnageants de myotubes dérivés de cellules satellites (SC) isolées 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.