

INTERNAT BLANC PHARMACIE

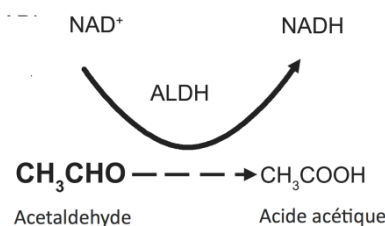
EXERCICE 2

40 points

Charlotte QUILLIEN

Samedi 9 mars 2013

L'aldéhyde deshydrogénase 2 (ALDH2) est une enzyme mitochondriale hépatique qui intervient notamment dans le métabolisme de l'éthanol en convertissant l'acétaldéhyde résultant de l'oxydation de l'éthanol en acide acétique:



La mutation E487K, induisant la substitution d'un glutamate (ALDH2E) par une lysine (ALDH2K), est retrouvée chez 50% de la population asiatique. Elle conduit à une forme très peu active de l'ALDH2.

La consommation d'alcool chez ces personnes induit une hypersensibilité communément appelée "alcohol flush" ou "asian flush". Ceci se caractérise par un rougissement de la peau, une accélération du rythme cardiaque ainsi qu'une difficulté respiratoire accompagnée de nausées et vomissements.

Question 1 :

- Décrivez brièvement en quoi une mutation peut modifier l'activité d'une enzyme.
- Quelle peut être la cause des symptômes observés chez les personnes ayant ALDH2K ?

Les ADN complémentaires de ces 2 formes de l'ALDH2 ont été séquencés puis clonés et exprimés séparément dans *Escherichia coli*. Afin de comparer l'activité enzymatique de ALDH2E et ALDH2K, les 2 enzymes sont purifiées.

Voici les étapes de purification :

Etape de purification	Protéines (mg)	Activité enzymatique (U)
Lysat <i>E. coli</i>	11250	175
Eluat colonne DEAE-Sephacel	350	75
Eluat chromatographie d'affinité HAP	210	70
Précipitation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	89	49
Eluat colonne Q-Sepharose	47	35
Eluat colonne 5'-AMP-Sepharose	20	???

Question 2 :

Calculez le rendement et le taux de purification de chacune des étapes par rapport à la préparation initiale (lysat *E. coli*).

En fin de purification, on ajoute dans une cuve de spectromètre un aliquot de la préparation correspondant à 20 µg de protéine à une solution d'acétaldéhyde et de NAD^+ qui restent en excès pendant toute la mesure.

La longueur du trajet optique de la cuve est de 1 cm et le volume final de la préparation est de 1 mL. À 340nm, le coefficient d'extinction molaire de NADH est de $6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Après 2 min, l'absorbance enregistrée est passée de 0 à 0,311.

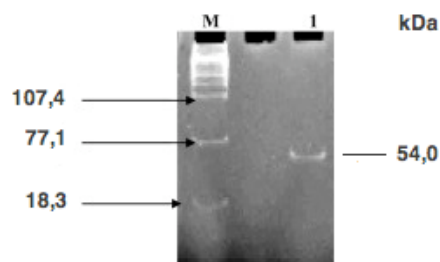
Question 3 :

Calculez l'activité spécifique de la préparation à ce stade de purification et déduisez en le taux de purification final. Complétez le tableau concernant l'activité enzymatique de cette préparation.

Le produit final de purification est soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Le résultat de l'électrophorèse est le suivant :

M : Marqueur de poids moléculaire. 1 : Produit de purification



Question 4 :

Sachant que l'ALDH2 fonctionnelle se présente sous forme de tétramère :

- Expliquez brièvement le principe de l'électrophorèse. Que pouvez-vous conclure de cette électrophorèse quant à la pureté de la préparation ?
- Quelle est l'activité spécifique molaire de l'enzyme (en s^{-1})

On se propose d'étudier les caractères cinétiques de ces 2 enzymes vis-à-vis de leur substrat, l'acétaldéhyde. Les expérimentations sont réalisées en présence de NAD^+ en concentration saturante et les résultats sont transcrits dans le tableau suivant :

ALDH2E	$(CH_3CHO) (10^{-5} mol.L^{-1})$	0,20	0,30	0,44	0,80	2,00
	Vitesse initiale $10^{-6} mol.L^{-1}.min^{-1}$	0,99	1,37	1,81	2,7	4,00
ALDH2K	$(CH_3CHO) (10^{-3} mol.L^{-1})$	0,17	0,25	0,37	0,67	1,67
	Vitesse initiale $10^{-7} mol.L^{-1}.min^{-1}$	0,13	0,18	0,24	0,36	0,53

Question 5 :

Comparez K_m et V_{max} des 2 enzymes et conclure sur l'effet de la mutation E487K sur les caractères cinétiques de l'ALDH2.

CORRECTION

INTERNAT BLANC PHARMACIE

EXERCICE 2 Enzymologie

Charlotte QUILLIEN

Samedi 9 mars 2013

Question 1 :

- a) Une mutation peut directement affecter la liaison de l'enzyme avec son substrat si elle concerne un acide aminé du site catalytique de l'enzyme. La mutation peut également conduire à des modifications de conformation de l'enzyme conduisant à des perturbations de la reconnaissance "enzyme-substrat".
- b) L'acétaldéhyde non transformé par l'ALDH se concentre et s'accumule au niveau du foie et passe également dans la circulation sanguine. Ce métabolite, toxique, est responsable des symptômes observés.

Question 2 :

Activité spécifique = Activité enzymatique / masse de protéine

Rendement = Activité totale / Activité totale avant l'étape de purification

Taux de purification = Activité spécifique/activité spécifique avant l'étape de purification

Etape de purification	Rendement (%)	T purification
Lysat <i>E. coli</i>	100	1
Eluat colonne DEAE-Sephacel	43	13,8
Eluat chromatographie affinité HAP	40	21,4
Précipitation (NH ₄) ₂ SO ₄	28	35,4
Eluat colonne Q-Sephrose	20	47,9
Eluat colonne 5'-AMP-Sephrose	14	???

Question 3 :

Absorption à 340 nm pour NADH seulement (NAD⁺ à 260 nm), augmentation de DO de 0,311 correspond à la production de NADH.

Loi de Beer-Lambert : $\Delta DO = \epsilon \cdot l \cdot C$ → $C = \Delta DO / \epsilon \cdot l$
→ $C_{\text{NADH}} = 0,311 / (6220 \cdot 1) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Soit pour 1 mL de solution : $5 \cdot 10^{-5} \cdot 10^{-3} = 5 \cdot 10^{-8}$ mole de NADH produit
→ donc consommation d'autant de mole de CH₃CHO en 2 min, soit $2,5 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$.

La réaction se fait sur 20 µg de protéines soit $2 \cdot 10^{-2}$ mg.
AS = $2,5 \cdot 10^{-8} / 2 \cdot 10^{-2} = 1,25 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} = 1,25 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$

Etape de purification	Protéines (mg)	Activité enzymatique (U)	Activité spécifique (U.mg ⁻¹)	T purification
Lysat <i>E. coli</i>	11250	175	0,015	1
Eluat colonne 5'-AMP-Sephrose	20	25	1,25	80,4

Question 4 :

a) Principe : L'électrophorèse sur gel est une technique séparative.

Le traitement dénaturant (SDS : Sodium Dodécyl Sulfate) détruit la structure tridimensionnelle native de la protéine. La forme de la protéine n'intervient donc plus et la séparation à travers le gel de polyacrylamide se fait uniquement en fonction de la masse moléculaire.

L'utilisation d'un marqueur de masse moléculaire permet d'estimer la masse moléculaire de l'échantillon.

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide se fait en conditions dénaturantes donc le tétramère est dissocié en 4 monomères. L'image du gel indique la présence d'une seule protéine reconnue de 54 kDa. La préparation enzymatique ne contient donc pas d'autres protéines. On peut la considérer pure.

L'enzyme tétramère a donc un poids moléculaire de 216 kDa soit $216\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

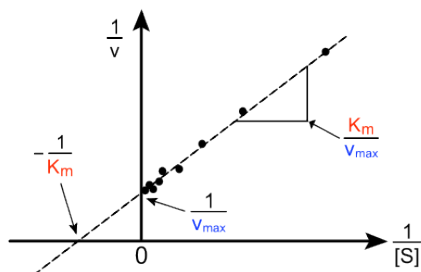
b) L'activité spécifique molaire de l'enzyme se calcule à partir de l'activité spécifique de la préparation pure par rapport au poids moléculaire :

$$\text{ASM} = 1,25 \cdot 10^3 (\text{mg} \rightarrow \text{g}) \cdot 216\,000 = 270 \cdot 10^6 \text{ U}\cdot\text{mol}^{-1} = 270 \text{ min}^{-1} = 4,5 \text{ s}^{-1}$$

Question 5 :

Pour calculer K_m et V_{\max} , nous passons par la représentation de Lineweaver-Burk :

ALDH2E	$1/(\text{CH}_3\text{CHO})$ ($10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ⁻¹	5,00	3,33	2,27	1,25	0,5
	$1/V_0$ ($10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) ⁻¹	1,01	0,73	0,55	0,37	0,25
ALDH2K	$1/(\text{CH}_3\text{CHO})$ ($10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) ⁻¹	5,88	4,00	2,70	1,49	0,60
	$1/V_0$ ($10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) ⁻¹	7,69	5,56	4,17	2,78	1,89



$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Equation du type : $y = ax + b$

Pour ALDH2E :

$$\text{Avec pente } a = \frac{K_m}{V_{\max}} = \frac{y_B - y_A}{x_B - x_A} = 1,7$$

$$b = y - ax = 1,6 \cdot 10^5 = \frac{1}{V_{\max}} \rightarrow V_{\max} = 6,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \text{ et donc } K_m = 10 \cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

Pour ALDH2K:

$$V_{\max} = 0,9 \cdot 10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{min}^{-1} \text{ et } K_m = 0,9 \cdot 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

L'affinité de ALDH2K pour l'acétaldéhyde est beaucoup plus faible que celle de ALDH2E et la vitesse maximale est fortement diminuée dans la forme mutée.