



HAL
open science

**Etudes de cinétiques enzymatiques par polarisation
dynamique nucléaire avec dissolution (D-DNP) :
application à l'étape oxydative de la voie des pentoses
phosphates (PPP)**

Aude Sadet

► **To cite this version:**

Aude Sadet. Etudes de cinétiques enzymatiques par polarisation dynamique nucléaire avec dissolution (D-DNP) : application à l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates (PPP). Chimie analytique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066217 . tel-01893014

HAL Id: tel-01893014

<https://theses.hal.science/tel-01893014>

Submitted on 11 Oct 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale : Chimie physique et chimie analytique de Paris Centre

Laboratoire des Biomolécules

Etudes de cinétiques enzymatiques par Polarisation Dynamique Nucléaire avec Dissolution (D-DNP) : application à l'étape oxydative de la voie des Pentoses Phosphates (PPP)

Par Aude Sadet

Thèse de doctorat en Chimie-Physique, Chimie Analytique

Dirigée par Daniel Abergel

Co-encadrée par Emeric Miclet

Présentée et soutenue publiquement le 9 Octobre 2017

Devant un jury composé de :

Dr Sandrine Sagan	Directrice de recherche, UPMC	Examinatrice
Dr Bénédicte Elena-Hermann	Ingénieur de recherche, CNRS, ENS Lyon	Rapporteur
Pr Sami Jannin	Professeur, ISA à Lyon	Examinateur
Pr Patrick Giraudeau	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
Dr Emeric Miclet	Maître de conférences, UPMC	Co-Encadrant
Dr Daniel Abergel	Directeur de recherche, CNRS, ENS Paris	Directeur de thèse

Abbréviations

RMN : Résonance magnétique nucléaire

D-DNP : Polarisation dynamique nucléaire suivie de Dissolution

PPP : voie des pentoses phosphates

ATP : adénosine triphosphate

ADP : adénosine diphosphate

NADP⁺: nicotinamide adénine dinucléotide phosphate

NAPDH : dihydronicotinamide adénine dinucléotide phosphate

Gluc/ Glc : glucose

G6PD: glucose-6-phosphate déshydrogénase (enzyme)

G6PDH: glucose-6-phosphate déshydrogénase humaine (enzyme)

G6P: glucose-6-phosphate

6PGL: 6-phosphogluconolactonase

6PGA: acide 6-phosphogluconique

δ-PGL: 6-phosphoglucono-δ-lactone

γ-PGL: 6-phosphoglucono-γ-lactone

Tb: Trypanosoma brucei

DSS : acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique

Hepes : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

6PGD : 6-phosphogluconate déshydrogénase

Ru5P : Ribulose-5-phosphate

R5P : Ribose-5-phosphate

G3P : glycéraldehyde-3-phosphate

S7P: sedoheptulose monophosphate

Xu5P: xylulose-5-phosphate

Table des matières

ABBREVIATIONS	2
INTRODUCTION	6
CHAPITRE 1 : LA VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES	10
1.1 INTRODUCTION.....	10
1.2 DECOUVERTE DE LA VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES (PPP) :.....	12
1.3 L'ETAPE OXYDATIVE DE LA VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES :.....	18
1.3.1 LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE, LA G6PD :.....	19
1.3.2 LA 6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE, LA 6PGL :.....	26
LA 6PGL CHEZ L'HOMME.....	28
1.4 MALADIES INFECTIEUSES LIEES A LA PPP :.....	28
1.4.1 PARASITOSE.....	28
1.4.2 MALADIES PROVOQUEES PAR LES BACTERIES :.....	31
1.5 METHODES ANALYTIQUES POUR CARACTERISER LA PPP :.....	32
CHAPITRE 2 : DE LA RMN A LA D-DNP	36
2.1 PRINCIPES GENERAUX DE LA RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE, LA RMN :.....	36
2.2 LA POLARISATION DYNAMIQUE NUCLEAIRE SUIVIE PAR DISSOLUTION, D-DNP :.....	39
2.2.1 INSTRUMENTATION.....	41
2.2.2 EXPERIENCE D-DNP.....	43
2.2.3 APPLICATIONS DE LA D-DNP AUX REACTIONS ENZYMATIQUES :.....	49
CHAPITRE 3: ETUDE DE LA PREMIERE ENZYME DE L'ETAPE OXYDATIVE DE LA VOIE DES PPP, LA GLUCOSE-6-PHOSPHATE DESHYDROGENASE, LA G6PD :.....	52
3.1 EXPERIENCES PRELIMINAIRES POUR L'ETUDE DE LA G6PD :.....	52
3.2 ETUDE DE LA G6PDH DANS UN TUBE DE 10 MM DE DIAMETRE :.....	62
3.2.1 EXTRACTION DES PARAMETRES CINETIQUES DU CYCLE DES « LACTONES ».....	69
3.2.2 EXTRACTION DES PARAMETRES CINETIQUES DE L'HK ET DE LA G6PD.....	78
3.3 ETUDE DE LA G6PD A PARTIR DU [U- ¹³ C-D ₇] G6P PAR D-DNP.....	90
3.3.1 SYNTHÈSE ET PURIFICATION DU [U- ¹³ C-D ₇]-G6P.....	90
3.3.2 ETUDE DE LA G6PD A PARTIR DU [U- ¹³ C-D ₇]-G6P PAR D-DNP.....	112
CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA 6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE (6PGL), DEUXIEME ENZYME DE L'ETAPE OXYDATIVE DE LA PPP :.....	119
4.1 ETUDE CINETIQUE DE LA <i>T_B</i> -6PGL PAR D-DNP :.....	121
4.1.1 ETUDE CINETIQUE DE LA <i>T_B</i> -6PGL A PARTIR DU GLUCOSE :.....	121
4.1.2 ETUDE DE LA 6PGL A PARTIR DU [¹³ C-D ₇]-G6P.....	128

4.1.2.2 CASCADE ENZYMATIQUE AVEC 240 µG DE <i>Tb</i> -6PGL (EXPERIENCE B)	130
4.1.2.3 ANALYSES DES CINETIQUES DES CASCADES ENZYMATIQUE G6PDH – <i>Tb</i> -6PGL (EXPERIENCE A ET B) :...	130
4.2 INHIBITION DE LA 6PGL :	138
4.2.1 LA METHODE.....	138
4.2.2 RESULTATS :	142
4.2.3 DETERMINATION DE L'IC ₅₀ :	144
4.2.4 INHIBITION DE LA 6PGD :	145
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	149

ANNEXES.....152

ANNEXE 1 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES PRELIMINAIRES REALISEE A L'EPFL :	152
ANNEXE 1.1 EXPERIENCE TEST REALISEE AVEC L'HK SEUL :	152
ANNEXE 1.2 EXPERIENCE TEST REALISEE AVEC L'HK SEUL APRES L'AMELIORATION DU SYSTEME D'INJECTION DE LA SOLUTION POLARISEE :	152
ANNEXE 1.3 EXPERIENCE TEST REALISEE AVEC L'HK ET LA G6PD APRES L'AMELIORATION DU SYSTEME D'INJECTION DE LA SOLUTION POLARISEE :	153
ANNEXE 2 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES REALISEES SUR LA G6PD A PARTIR D'UN TUBE DE 10 MM DE DIAMETRE :	153
ANNEXE 2.1 EXPERIENCE REALISEE AVEC L'HK ET LA G6PD DANS UN TUBE DE 10 MM DE DIAMETRE :	153
ANNEXE 2.2 EXPERIENCE REALISEE AVEC L'HK ET LA G6PD DANS UN TUBE DE 10 MM DE DIAMETRE DANS LE BUT D'OBSERVER LA SELECTIVITE DE LA G6PD :	154
ANNEXE 2.3 EXPERIENCE REALISEE AVEC L'HK ET LA G6PD DANS UN TUBE DE 10 MM DE DIAMETRE A PARTIR DU [¹³ C ₁ -D ₁]-GLUCOSE :	154
ANNEXE 3 : MATERIEL ET METHODES DE LA SYNTHESE ET DE LA PURIFICATION DU [U- ¹³ C-D ₇]- G6P:	155
ANNEXE 3.1 : ETUDE UV-VIS DU G6P.....	155
ANNEXE 3.2 : PURIFICATIONS REALISEES SUR UNE HPLC EQUIPEE D'UN DETECTEUR ELSD (A CERGY-PONTOISE)..	155
ANNEXE 3.3 : PURIFICATIONS REALISEES SUR UNE HPLC EQUIPEE D'UN DETECTEUR UV-VISIBLE.....	156
ANNEXE 3.4 : PURIFICATIONS REALISEES SUR UNE FPLC	158
ANNEXE 3.5 : MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE DETECTION DU G6P POST PURIFICATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE	158
ANNEXE 3.6 : MISE EN PLACE D'UNE METHODE DE QUANTIFICATION DU G6P POST PURIFICATION PAR RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE (RMN)	159
ANNEXE 3.7 : REALISATION D'UNE SYNTHESE ENZYMATIQUE SUIVIE D'UNE PURIFICATION DANS UN TAMPON TRIS	159
ANNEXE 3.8 : REALISATION D'UNE SYNTHESE ENZYMATIQUE SUIVIE D'UNE PURIFICATION DANS UN TAMPON HEPES	160
ANNEXE 3.9 : SYNTHESE ET PURIFICATION DU [¹³ C, D ₇]-G6P	160
ANNEXE 3.10 : QUANTIFICATION DU [U- ¹³ C, D ₇]-G6P REALISEE PAR RMN :	162
ANNEXE 4 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES REALISEES SUR LA G6PD A PARTIR DU SUBSTRAT DE L'ENZYME, LE GLUCOSE-6-PHOSPHATE (G6P) :	162
ANNEXE 4.1 : EXPERIENCE D-DNP REALISEE AVEC UNE FAIBLE ACTIVITE DE G6PD	162
ANNEXE 4.2 : EXPERIENCE D-DNP REALISEE AVEC UNE FORTE ACTIVITE DE G6PD.....	162
ANNEXE 5 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES REALISEES SUR LA 6PGL A PARTIR DU SUBSTRAT [U- ¹³ C-D ₇]-GLUCOSE :	163

ANNEXE 6 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES REALISEES SUR LA 6PGL A PARTIR DU SUBSTRAT [¹³C₁-D₁]- GLUCOSE :	163
ANNEXE 7 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES REALISEES SUR LA 6PGL A PARTIR DU SUBSTRAT [U-¹³C-D₇]-G6P :	164
ANNEXE 7.1 : EXPERIENCE A	164
ANNEXE 7.2 : QUANTIFICATION POST-REACTIONNELLE DE L'EXPERIENCE A	164
ANNEXE 7.3 : EXPERIENCE B	165
ANNEXE 7.4 : MESURE DU TEMPS DE RELAXATION LONGITUDINAL (T₁) DU [U-¹³C-D₇]-6PGA	165
ANNEXE 8 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES D'INHIBITION REALISEES SUR LA 6PGL	166
LE PROTOCOLE :	166
ANNEXE 9 : MATERIEL ET METHODES DES ETUDES D'INHIBITION REALISEES SUR LA 6PGD	167
LE PROTOCOLE :	167
 REFERENCES	 169
 RESUME	 181

Introduction

La cellule est l'élément constitutif essentiel à tous les organismes vivants. Cette usine chimique produit ou transforme l'ensemble des molécules nécessaires à la vie. Les voies métaboliques cellulaires consistent de successions de réactions chimiques. Ces cascades sont catalysées par des enzymes, qui permettent de réaliser ces transformations. Ces voies métaboliques fonctionnent en cohésion et répondent simultanément aux conditions extérieures et aux stimuli arrivés des cellules voisines.

L'une des voies métaboliques les plus importantes est la voie des Pentoses Phosphates, qui participe au métabolisme énergétique de la cellule. Cette voie métabolique est composée de deux étapes : (i) une partie oxydative dans laquelle trois réactions enzymatiques irréversibles convertissent un hexose phosphate, le glucose-6-phosphate (G6P), en un dioxyde de carbone et un pentose phosphate, le ribulose-5-phosphate (Ru5P), avec une production de 2 molécules de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH) ; et (ii) d'une partie non-oxydative lors de laquelle 5 réactions enzymatiques réversibles transforment le ribulose-5-phosphate (Ru5P), en d'autres pentoses phosphates (ribose-5-phosphate et xylulose-5-phosphate), en triose (Glyceraldehyde-3-phosphate), en tétrose (Erythrose-4-phosphate), hexose (Fructose-6-phosphate) et en heptose (Sedoheptulose-5-phosphate). Parmi l'ensemble des produits de réactions, cette cascade enzymatique synthétise deux molécules essentielles pour le fonctionnement cellulaire : le NADPH, produit lors de la première et troisième catalyse de l'étape oxydative et le Ribose-5-phosphate, qui est produit lors de la première synthèse enzymatique de la voie non oxydative.¹ Le NADPH joue un rôle central dans la cellule² : ce puissant réducteur protège la cellule contre les dommages causés par le stress oxydatif et il participe à la biosynthèse de nombreuses molécules nécessaires au bon fonctionnement de la cellule comme les acides nucléiques (donc de l'ADN et de l'ARN), les acides gras, les acides aminés aromatiques et les isoprénoïdes.² Le ribose-5-phosphate est l'un des précurseurs de la biosynthèse des acides nucléiques et des acides aminés.¹ Une perturbation enzymatique liée à la déficience d'une des 8 enzymes actives sur cette voie peut entraîner un dysfonctionnement cellulaire et induire des maladies telles que le favisme pour la déficience de la G6PD.

L'étude cinétique des cascades enzymatiques permet de comprendre le fonctionnement, le rôle et l'incidence d'une perturbation enzymatique au sein de la cellule, grâce à la modification de la vitesse de transformation des substrats, régie par la catalyse enzymatique. Différentes techniques analytiques permettent de mesurer la cinétique enzymatique, notamment la spectrophotométrie UV-Vis, la spectrofluorimétrie, la conductimétrie... L'application de la plupart de ces techniques nécessite des propriétés physico-chimiques particulières des molécules analysées, comme la présence d'un chromophore pour détecter l'absorbance UV-Vis au cours du temps. Ces contraintes limitent l'application des techniques concernées. La résonance magnétique nucléaire (RMN) permet d'observer directement l'évolution des métabolites au cours du temps grâce aux spins nucléaires (^1H , ^{31}P , ^{13}C ...) qui sont présents dans les molécules. Cette technique spectroscopique n'est pas assez sensible pour étudier les cinétiques enzymatiques intracellulaires. Dans une cellule, les concentrations de chaque métabolite intervenant dans les biosynthèses sont très faibles (typiquement en dessous de 10^{-6} M)³ et chaque substrat est transformé rapidement dans le produit final de la chaîne métabolique, dont la constante de temps caractéristique est bien inférieure au temps d'accumulation nécessaire pour l'enregistrement d'un spectre 1D (de l'ordre de quelques dizaines des minutes à quelques heures pour des noyaux différents du proton, tel que le carbone-13). En conséquence, les flux métaboliques sont difficilement observables⁴ par RMN et il est nécessaire d'étudier aussi bien individuellement que simultanément les enzymes dans les mêmes conditions physiologiques pour mieux comprendre les transformations observées dans les cellules. Récemment, une nouvelle technique spectroscopique basée sur la résonance magnétique nucléaire, la Polarisation Dynamique Nucléaire suivie de Dissolution (D-DNP)⁵, a rendu observables les différentes cascades enzymatiques impliquées dans la transformation d'un substrat injecté dans le milieu cellulaire grâce à l'amplification de son signal RMN ("hyperpolarisation").^{6,7} Cette technique combine la polarisation des spins nucléaires à partir des spins électroniques, à des températures de l'ordre de 1 K, avec la détection des noyaux dans un spectromètre de résonance magnétique de haute résolution. La D-DNP offre un gain de sensibilité d'un facteur 10 000 et plus⁵, qui permet une réduction très conséquente du temps expérimental, rendant ainsi possible l'observation des métabolites par RMN en 1 s même pour le carbone-13. Ainsi, les cinétiques rapides peuvent être observées par D-DNP avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde, soit *in vitro*, soit dans des cellules ou bien *in vivo*.^{8,9,10}

Le but de cette thèse est d'étudier par D-DNP RMN la cinétique de différentes enzymes de l'étape oxydative du cycle des pentoses phosphates. Pour déterminer les paramètres cinétiques des enzymes dans les conditions physiologiques, des études par D-DNP ont été réalisées *in vitro*. Durant cette thèse, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) et la 6-phosphogluconolactonase (6PGL) ont été étudiées seules ou en association en utilisant divers substrats, le glucose ou le glucose-6-phosphate, en utilisant divers types de marquages isotopiques. L'ENS Paris ayant mis en place un polariseur, ces mesures cinétiques ont nécessité d'optimiser les conditions de polarisation DNP, de dissolution, et d'observation du signal RMN. Les données obtenues ont été analysées à l'aide des modèles développés afin d'extraire les paramètres cinétiques. Par ailleurs, des études d'inhibition par un nouvel inhibiteur de l'activité enzymatique de la 6PGL issue du parasite *Trypanosoma brucei*, responsable de la maladie du sommeil, ont été réalisées de manière préliminaire pour les tests en D-DNP. L'ensemble de ces travaux est décrit dans ce manuscrit.

Dans le premier chapitre, l'étape oxydative de la PPP est présentée, afin de permettre au lecteur de comprendre les enjeux physiologiques des enzymes impliquées dans cette voie, l'importance des études cinétiques des voies métaboliques ainsi que les outils utilisées au cours de ces années, et plus spécifiquement dans le cadre de cette thèse.

Dans le second chapitre sont décrits les principes généraux de la D-DNP ainsi que l'application de cette technique pour nos études cinétiques.

Dans le troisième chapitre, les études réalisées sur la première enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphate, la G6PD, à partir du [U-¹³C-D₇]/[U-¹³C₁-D₁]-Glucose et du [U-¹³C-D₇]-Glucose-6-phosphate sont présentées. La mise en place d'une méthode de synthèse et de purification du substrat de la G6PD est expliquée.

Dans le quatrième chapitre, les résultats des études réalisées sur la deuxième enzyme de la voie oxydative de la voie des pentoses phosphates, la 6PGL, sont développés. Le substrat de cette enzyme étant très peu stable en milieu aqueux, les expériences ont été réalisées à partir de [U-¹³C-D₇]/[U-¹³C₁-D₁]-Glucose et du [U-¹³C-D₇]-Glucose-6-phosphate. Les résultats préliminaires d'inhibition de la 6PGL par spectrophotométrie UV sont également présentés.

La conclusion de ce manuscrit est accompagnée de la présentation des perspectives pour la suite de cette recherche.

CHAPITRE 1 : LA VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES

1.1 Introduction

Une cellule est l'élément de base fonctionnel et structural qui compose les tissus et les organes des êtres vivants. Elle contient l'information génétique de l'individu et est à l'origine de la création biologique. Elle est constituée de différents compartiments et d'une membrane qui lui permettent d'être autonome, ce qui ne l'empêche pas d'entrer en interaction avec les autres cellules (**Figure 1**).

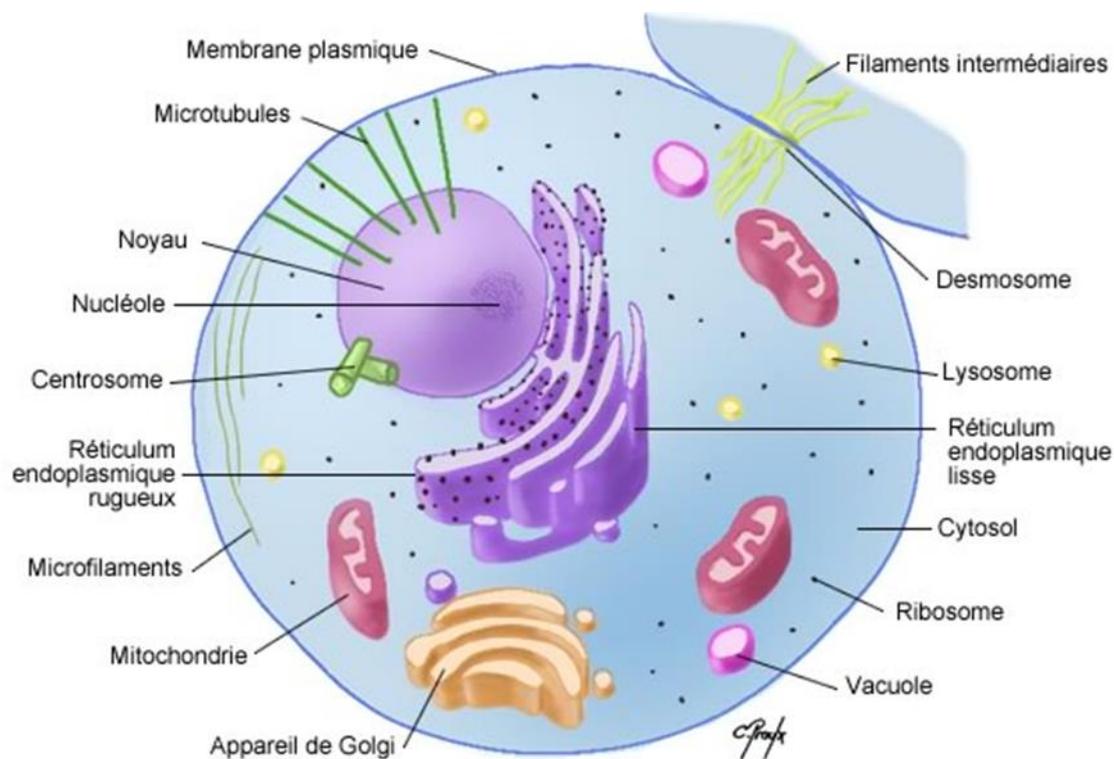


Figure 1 : Schéma représentatif de la compartimentation cellulaire d'une cellule eucaryote (image réalisée par Chantal Proux).¹¹

La cellule est une structure organisée. Chaque compartiment possède son propre rôle et permet de réaliser certaines synthèses chimiques qui sont nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. Une voie métabolique correspond à un ensemble de réactions séquentielles catalysées par des enzymes. Parmi les différentes voies métaboliques, certaines ont lieu dans des compartiments cellulaires dédiés (ex : cycle de Krebs dans la matrice de la mitochondrie), d'autres se produisent en partie ou exclusivement dans le cytosol (ex : glycolyse). Chacune des voies fonctionne selon un réseau organisé en fonction des besoins de

la cellule. Dans certains cas, la perturbation ponctuelle d'une réaction enzymatique peut être compensée par une adaptation des flux de métabolites voisins. (Figure 2).

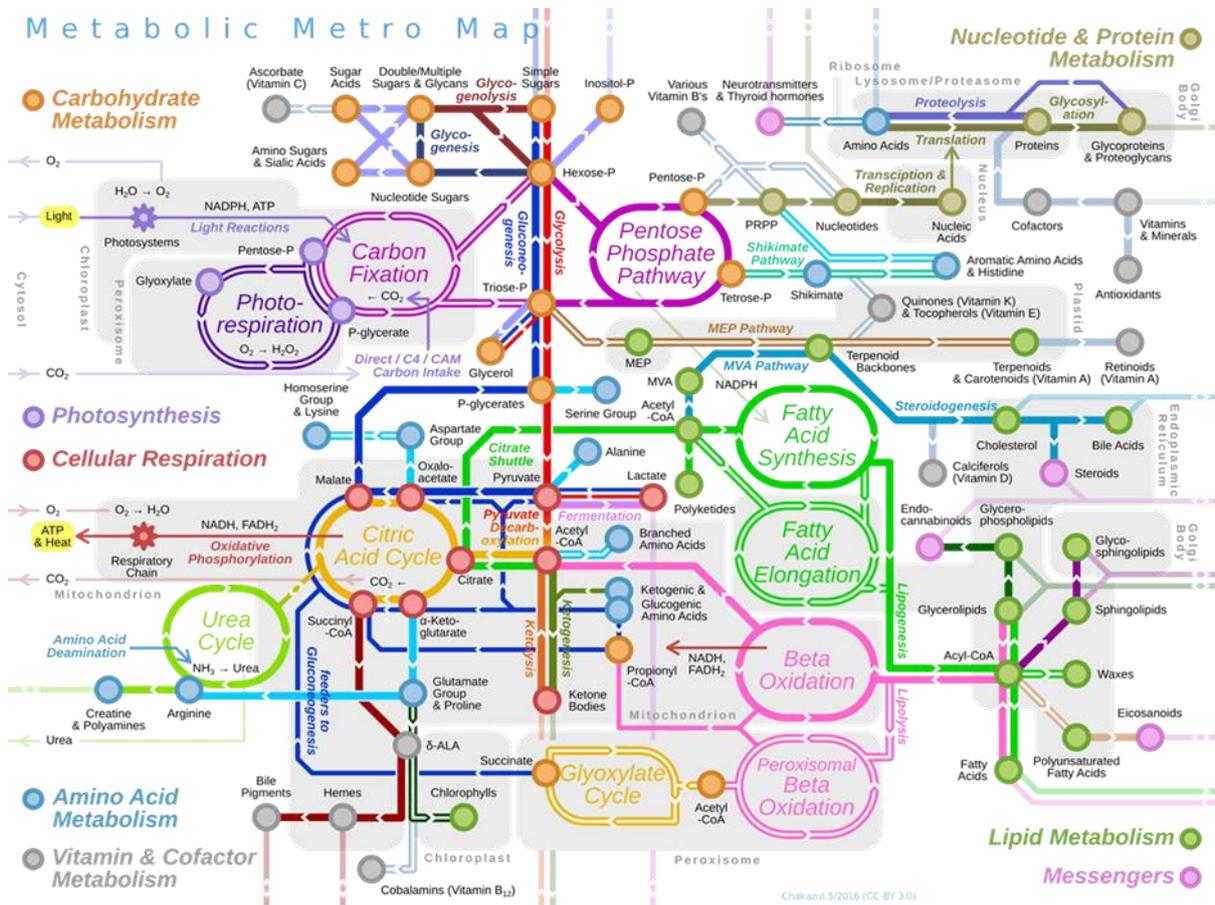


Figure 2 : Représentation de l'interconnexion des différentes voies métaboliques qui composent la cellule.¹²

L'une des voies métaboliques les plus importantes dans la cellule est la voie des pentoses phosphates (PPP). Cette voie de dégradation du glucose se décompose en deux parties : une voie oxydative et une voie non-oxydative. L'ensemble permet de maintenir l'homéostasie des carbones, de synthétiser les précurseurs des biosynthèses des acides nucléiques, des acides gras et des nucléotides, de produire des agents réducteurs pour l'anabolisme et de combattre le stress oxydatif. Son rôle plurifonctionnel rend la cellule vulnérable lorsqu'un dysfonctionnement de cette voie se produit. L'origine de tels dérèglements fonctionnels peut être liée à des facteurs extérieurs ou à des anomalies génétiques. L'étude des caractéristiques détaillée de le PPP comme la mesure précise de son flux métabolique ou le devenir de ses métabolites dans différentes conditions physiologiques, *in vitro* ou *in cell*, est donc nécessaire pour mieux comprendre son importance dans certaines pathologies et imaginer de nouvelles voies thérapeutiques.

1.2 Découverte de la voie des pentoses phosphates (PPP) :

En 2014, Keller et al. ont montré que l'origine de la voie des pentoses phosphates semblait dater de la période océanique prébiotique de la terre. Dans une reconstitution, la PPP originelle a été catalysée par une enzyme dans laquelle le Fe(II) joue le rôle de cofacteur. L'élément inorganique, qui est abondant dans l'océan, facilitait l'interconversion des sucres phosphatés. Néanmoins, l'oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en lactone (6PGL) n'était pas observée.¹³

La voie des pentoses phosphates fut la troisième voie métabolique à avoir été mise en évidence, après la glycolyse (Embden-Meyer-Parnas pathway) et le cycle de Krebs (le cycle de l'acide tricarboxylique).¹ Dans les années 1930, les premières réactions successives de transformation d'un hexose phosphate en un pentose phosphate ont été décrites. Warburg, Dickens et Lipmann découvraient l'existence des deux coenzymes, le NADP⁺ et le NAD⁺, qui participaient à l'oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconate (6PGA) et la décarboxylation du 6PGA en un pentose phosphate.^{14,15,16} A cette époque, la nature précise de ce pentose phosphate n'a pas été identifiée (**Figure 3**).

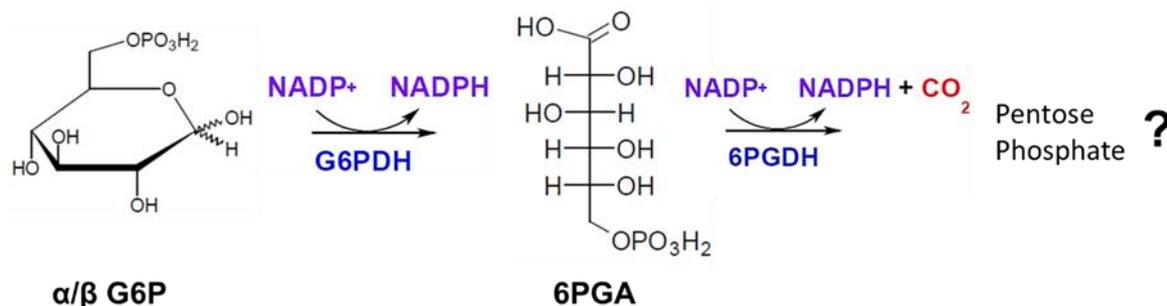


Figure 3 : Représentation des deux réactions enzymatiques découvertes par Warburg, Dickens et Lipmann. Cette succession de réactions enzymatiques est catalysée par deux enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) qui oxyde le glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconate (6PGA) à l'aide d'un équivalent de NADP⁺ qui se réduit en NADPH, et la 6-phosphogluconolactonate déshydrogénase (6PGDH) qui décarboxyle le 6-phosphogluconate (6PGA).

Vingt ans plus tard, grâce à des études de spectrophotométrie, le ribulose-5-phosphate (Ru5P) a été identifié comme étant le produit de la décarboxylation du 6PGA. Horecker découvre par la même occasion que le Ru5P s'isomérisait en ribose-5-phosphate (R5P) en présence de l'isomérase 5 phosphate.¹⁷ Suite aux travaux réalisés par Z. Dische en 1938 sur des extraits de moelle osseuse de lapin, montrant que le ribose-5-phosphate se convertit en un hexose mono-phosphate, Horecker et Seegmiller ont supposé que cette voie métabolique

était cyclique.^{18,17} Ce métabolisme oxydatif composé de 4 enzymes, produit une molécule de dioxyde de carbone et une molécule de pentose phosphate à chaque cycle. Le pentose phosphate produit un hexose phosphate pour qu'il devienne à son tour le substrat de la « voie oxydative » (Figure 4). Ainsi, 6 cycles sont nécessaires pour oxyder une molécule de glucose. Cette hypothèse fut avancée alors que l'ensemble des réactions enzymatiques responsables de cette voie métabolique était encore inconnu.¹⁹

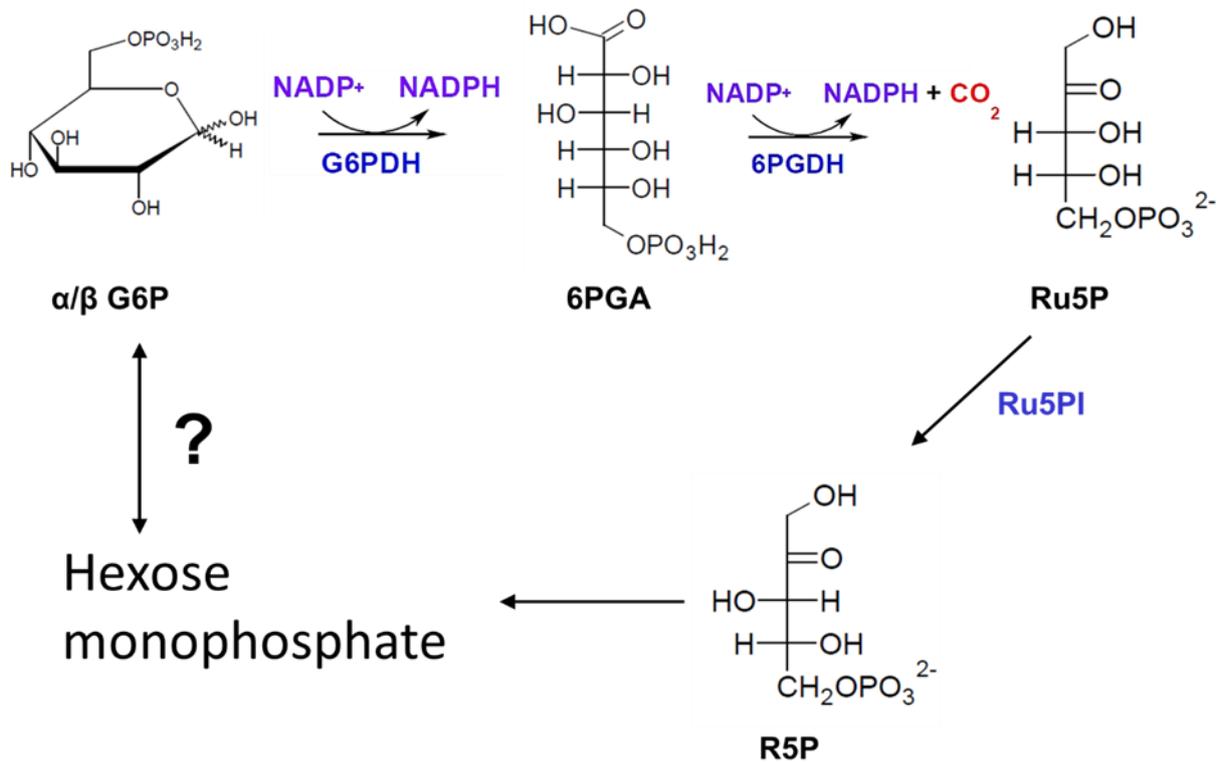


Figure 4 : Représentation du cycle oxydatif imaginé par Horecker et Seegmiller. Ce cycle enzymatique se compose de 4 enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) qui oxyde le glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconate (6PGA) à l'aide d'un équivalent de NADP^+ qui se réduit en NADPH, une 6-phosphogluconolactonate déshydrogénase (6PGDH) qui décarboxyle le 6PGA en Ribulose-5-phosphate (Ru5P), d'un ribose-5-phosphate isomérase (Ru5PI) qui isomérisse le Ru5P en ribose-5-phosphate (R5P) et d'une dernière enzyme, dont le nom était alors inconnu, qui transforme le R5P en un hexose monophosphate. Cette hexose phosphate est potentiellement du G6P.

Parallèlement, Cori et Lipmann montraient que le produit de l'oxydation du G6P catalysée par la G6PDH était la δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) et non la 6PGA.²⁰ En présence d'une hydroxylamine, la δ -PGL se transformait en acide hydroxylamique. En revanche, en absence de l'hydroxylamine, cette lactone s'hydrolysait spontanément en un acide phosphogluconate (6PGA).²⁰ Ce n'est que quatre ans plus tard, qu'une équipe de Boston montre pour la première fois une activité enzymatique qui hydrolyse la δ -6PG en 6PGA.²¹ La première dénomination se réalise quant à elle 9 ans plus tard (Figure 5).²²

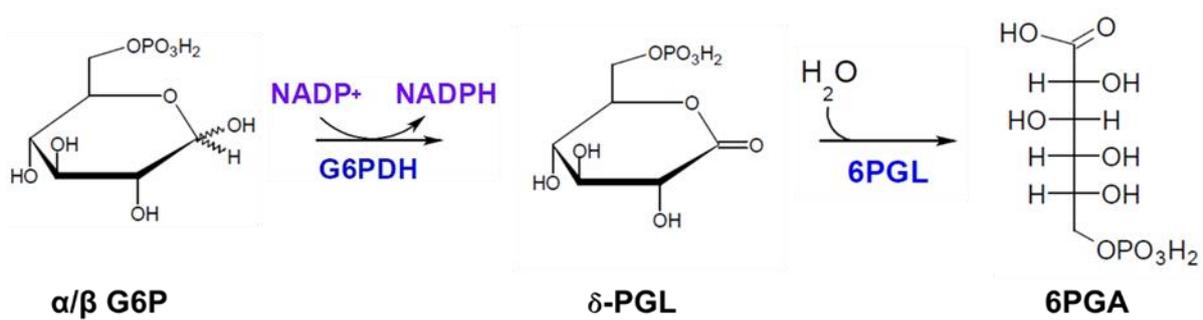


Figure 5 : Mise à jour du schéma de la première réaction oxydative découverte par Cori, Brodie et Lipmann. La δ-6-phosphogluconolactone (δ-PGL) est le produit de l'oxydation de la G6P catalysée par la G6PDH à l'aide d'un équivalent de NADP⁺. Cette réaction enzymatique est suivie par l'hydrolyse de la δ-PGL en 6PGA catalysée par la 6-phosphogluconolactonase (6PGL).

L'hypothèse émise par Horecker et Seegmiller fut remise en cause, lorsque E. Racker, P. Smyrniotis and H. Klenow se sont intéressés à la découverte d'un sucre à 3 carbones, le glycéraldehyde-3-phosphate (G3P) dans les précédentes recherches.^{23,24} En utilisant la réaction d'orcinol de Dische²⁵ avec des enzymes purifiées provenant de foie de rat, ils montrent que le Ru5P était également transformé en un sedoheptulose monophosphate (S7P) à l'aide d'une transcétolase. Cependant, une différence de stéréochimie avec le carbone hydroxyle sur le troisième carbone du S7P et du Ru5P a été observée. Cette incompréhension fut résolue par P. Stumpf qui a mis en évidence une « épimérase », qui convertit le Ru5P en un xylulose-5-phosphate (Xu5P).²⁶ Ainsi, la stéréochimie entre le Xu5P et le S7P est conservée. Le 6-phosphogluconate est donc oxydé en Ru5P, qui est lui-même converti en Xu5P et R5P par une épimérase et une isomérase. Ces deux sucres ainsi formés sont ensuite transformés en S7P et G3P par une transcétolase.

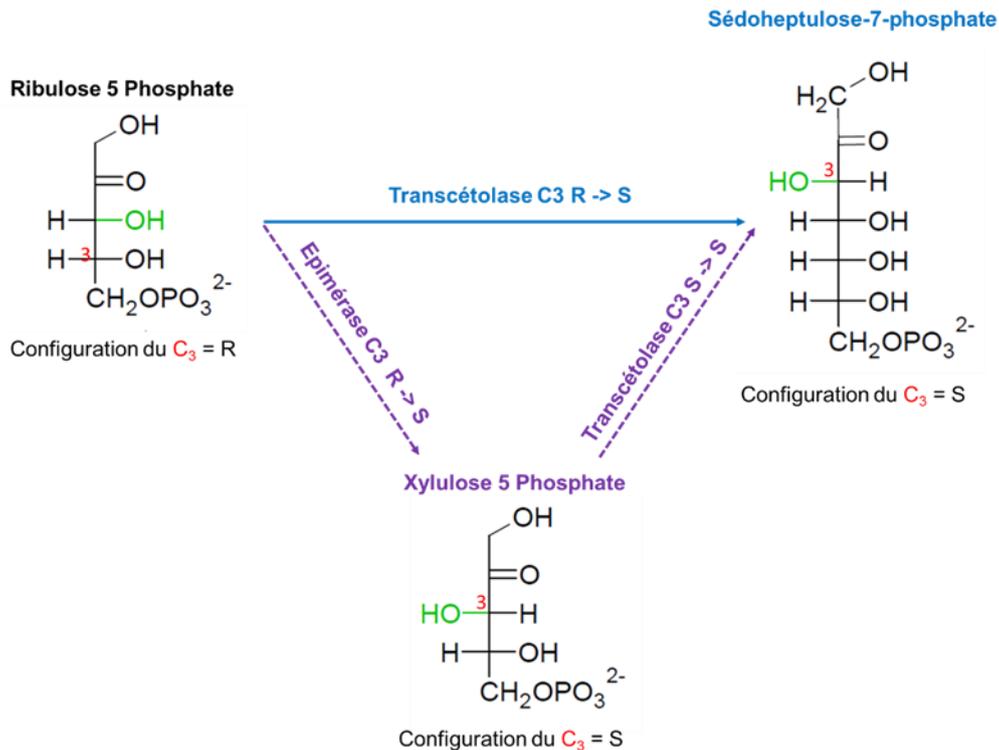


Figure 6 : Représentation de la différence de stéréochimie lors de la transformation du ribulose-5-phosphate en sédoheptulose-7-phosphate catalysée par une transcétolase et en xylulose-5-phosphate catalysée par une épimérase. Les sucres sont dans la représentation de Fisher. Le carbone 3 est indiqué en rouge, ainsi que sa stéréochimie.

Finalement, Horecker et ses collaborateurs ont montré que le S7P se combinait avec un triose phosphate pour former un hexose monophosphate et un fragment phosphate à 4 carbones. Avec l'aide de H. Barker, ils ont démontré, en utilisant des enzymes et un triose phosphate uniformément marqué en carbone 13, que l'hexose phosphate formé était en fait un fructose-6-phosphate (F6P). Cette réaction était alors catalysée par une enzyme nommée "transaldolase".²⁷ Peu de temps après, ils identifient le fragment phosphate à 4 carbones comme étant l'érythrose-4-phosphate (E4P) et montrent également que le S7P peut se condenser avec une dihydroxyacétone phosphate via le fructose biphosphate aldolase (DHAP).

La voie des pentoses phosphate est une voie de dégradation du glucose-6-phosphate et elle est catalysée par des enzymes sophistiquées, excepté la conversion de δ -PGL en 6PGA, qui peut être spontanée.^{14,28,21} Cette voie métabolique se réalise dans le cytosol pour la plupart des organismes et dans d'autres organelles, tels que les plastes pour les plantes, les peroxyosomes et les glycosomes pour les parasites.^{29,30} Cette cascade enzymatique se compose de deux étapes :

(i) une voie oxydative dans laquelle trois réactions enzymatiques irréversibles convertissent un hexose phosphate, le glucose-6-phosphate (G6P), en un dioxyde de carbone et un pentose phosphate, le ribulose-5-phosphate (Ru5P), avec une production de 2 NADPH ;

(ii) une voie non-oxydative dans laquelle 5 réactions enzymatiques réversibles transforment un pentose phosphate en un hexose phosphate, F6P, et un G3P.

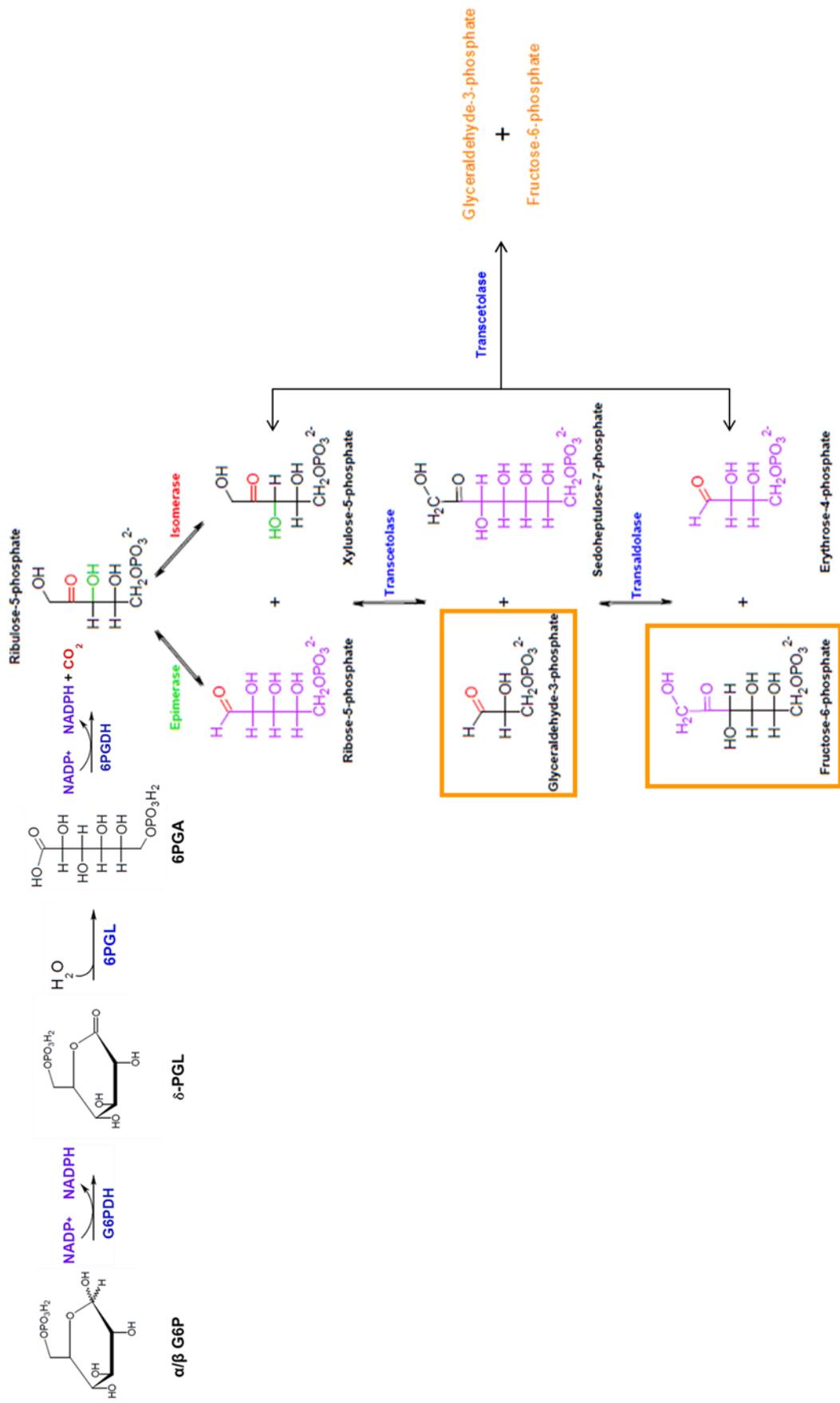


Figure 7 : Représentation du cycle des pentoses phosphates tel qu'il a été élucidé

1.3 L'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates :

Le substrat initial de la PPP, le G6P, est commun à trois autres voies métaboliques : la glycolyse, la biosynthèse des hexosamines et la glycogénèse. En fonction des besoins de la cellule, le G6P est métabolisé par l'une de ces quatre voies métaboliques. Une fois que le glucose est entré dans la cellule via ses transporteurs membranaires (Glut), le sucre est directement phosphorylé en G6P par une hexokinase (HK) en présence d'un ion Mg^{2+} et d'ATP comme source de phosphate (**Figure 8**).³¹

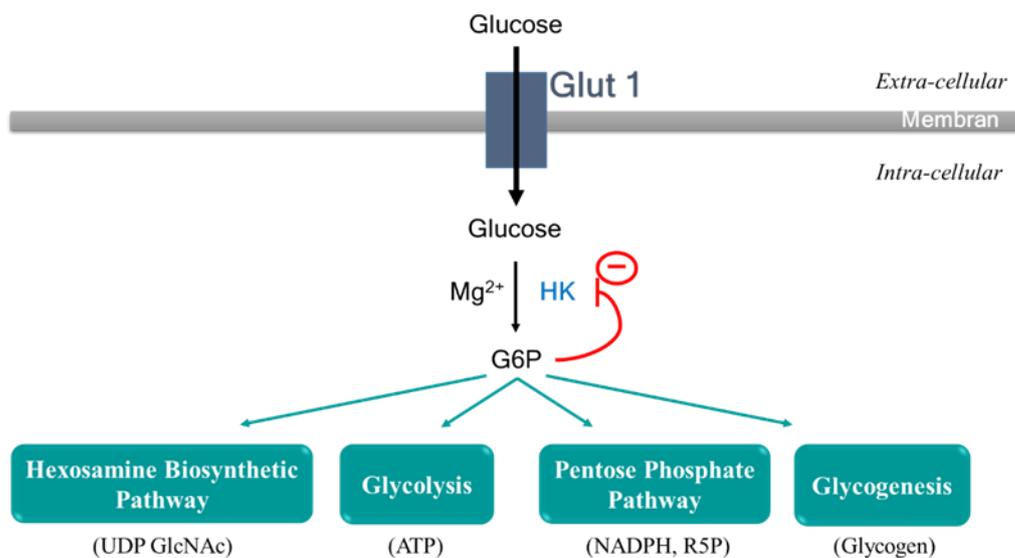


Figure 8 : Entrée du glucose via un transporteur membranaire, Glut-1, dans la cellule. Le glucose est phosphorylé par l'hexokinase, utilisant l'ion magnésium Mg^{2+} . A forte concentration, le G6P formé est un inhibiteur de la HK (rétro-contrôle négatif). Les quatre voies métaboliques qui utilisent le G6P sont représentées sur ce schéma, ainsi que les métabolites importants qu'elles produisent.

Lorsque la cellule a besoin de NADPH et de ribose-5-phosphate, qui sont tous deux des précurseurs pour la biosynthèse des acides nucléiques et des nucléotides, le flux métabolique de la PPP augmente. Le G6P sera dans un premier temps converti dans une voie oxydative en un ribulose-5-phosphate (Ru5P) avec une production de 2 équivalents de NADPH. Cette étape est réalisée par trois enzymes, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), la 6-phosphogluconolactonase (6PGL) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD). Pour la première et la troisième réaction, les enzymes ont besoin d'un coenzyme, le $NADP^+$, pour catalyser l'oxydation du G6P en δ -6-phosphogluconolactone et la décarboxylation de la 6PGA en Ru5P. Ainsi, 2 molécules de $NADP^+$ sont réduites en 2 molécules de NADPH (**Figure 9**).³²

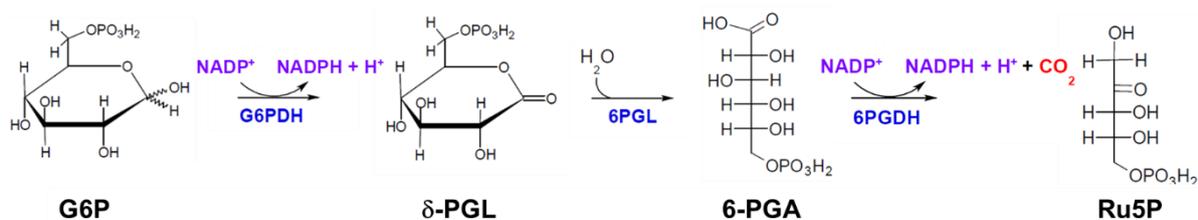


Figure 9 : Voie oxydative de la PPP qui se compose de trois enzymes: la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), la 6-phosphogluconolactonase (6PGL) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD). Deux équivalents de NADP^+ sont réduits en NADPH lors de la première et la troisième réaction enzymatique. Le G6P est donc oxydé en δ-6-phosphogluconolactone (δ-PGL), puis hydrolysé en 6-phosphogluconate (6PGA) et décarboxylé en ribulose-5-phosphate (Ru5P).

1.3.1 La glucose-6-phosphate déshydrogénase, la G6PD :

La glucose-6-phosphate déshydrogénase a été l'une des enzymes les plus étudiées à cause de son rôle majeur dans la cellule : régulateur de nombreuses voies métaboliques biosynthétiques.² Cette enzyme clé de la voie oxydative de la PPP, catalyse la déshydrogénation du glucose-6-phosphate en une δ-6-phosphogluconolactone à l'aide de la réduction d'un équivalent de NADP^+ en NADPH.

La G6PD possède un autre substrat que le glucose-6-phosphate (G6P), le galactose-6-phosphate (GA6P).³³ La vitesse d'oxydation du GA6P étant très faible comparée à celle du G6P, ce substrat est souvent négligé. Les coenzymes, qui sont des molécules non protéiques participant activement à l'activité de l'enzyme, ici la G6PD, sont des nicotinamides adénines dinucléotides qui sont phosphorylés (NADP^+) ou non (NAD^+). Le choix de fixation du coenzyme dépend de l'espèce. Trois groupes ont été définis en fonction du co-enzyme choisi, [Tableau 1](#).

	NADP^+	NAD^+	Exemple
Groupe 1	Uniquement	Non	<i>Aspergillus Aculeatus</i> ³⁴
Groupe 2	Préférentiellement	Faible	Homme
Groupe 3	Aucune préférence		<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ³⁵

Tableau 1 : Sélectivité du co-enzyme en fonction du type de la G6PD.

L'affinité du coenzyme et du substrat pour l'enzyme dépend des conditions de l'expérience (nature du tampon utilisé et pH), mais pas du type de coenzyme préférentiel ([Tableau 2](#)).² Un troisième site de fixation, loin du site actif, permet la fixation d'un second coenzyme dans chaque unité. Cette deuxième fixation du coenzyme maintient la conformation active de la

G6PD (**Figure 10**). Cette liaison stabilise l'enzyme.³⁶ La G6PD est active entre 30 et 92°C, avec une température d'activité optimale à 50°C, et à un pH compris entre 6,6 < pH < 9,2.²

L'un des inhibiteurs commun à toutes les espèces est le coenzyme lui-même sous sa forme réduite. Le NADPH inhibe de manière efficace l'ensemble des trois groupes et pour chaque type d'organisme : animaux,³⁷ bactéries,^{38,39} levures,^{40,41,42} et plantes⁴³ ... Il se comporte généralement comme un inhibiteur compétitif. Pour le troisième groupe, comme dans les *Leuconostoc méésentéroïdes*, qui acceptent aussi bien le NADP⁺ que le NAD⁺, le rapport de concentrations en cofacteur réduit (NADPH ou NADH) et en substrat (G6P) détermine le type d'inhibition. Lorsque la concentration en NADP⁺ varie, le NADPH inhibe linéairement de manière compétitive l'enzyme. A l'inverse, lorsque c'est la concentration du substrat qui varie, le NADPH inhibe l'enzyme linéairement de manière non compétitive.³⁵ Lorsque le coenzyme est le NAD⁺, et que la concentration en G6P varie, le NADH inhibe la G6PD de manière compétitive quel que soit la concentration de NAD⁺.³⁵ Autre exception à la règle, des recherches réalisées par Haghghi et ses collaborateurs⁴⁴ ont montré que chez le *S aureofaciens*, le NADH est un inhibiteur compétitif tandis que le NADPH est un inhibiteur non compétitif.

Une enzyme similaire à la G6PD a été découverte dans les microsomes, vésicules issues du réticulum endoplasmique (RE) qui est le lieu de synthèse des protéines.¹ L'héxose-6-phosphate déshydrogénase (H6PDH)^{45,46} est moins spécifique pour le substrat et n'a aucune préférence pour un coenzyme. En plus du G6P, l'enzyme peut catalyser l'oxydation du glucose, du galactose-6-phosphate et du 2 deoxyglucose-6-phosphate.^{47,46} Cependant, en raison d'une forte concentration de NADPH dans la lumière du RE, il a été établi que le G6P et le NADP⁺ sont les substrats préférentiels à la H6PDH. Les localisations alternatives de la PPP en dehors du cytosol montre que le NADPH est un précurseur important dans la biosynthèse des protéines.¹

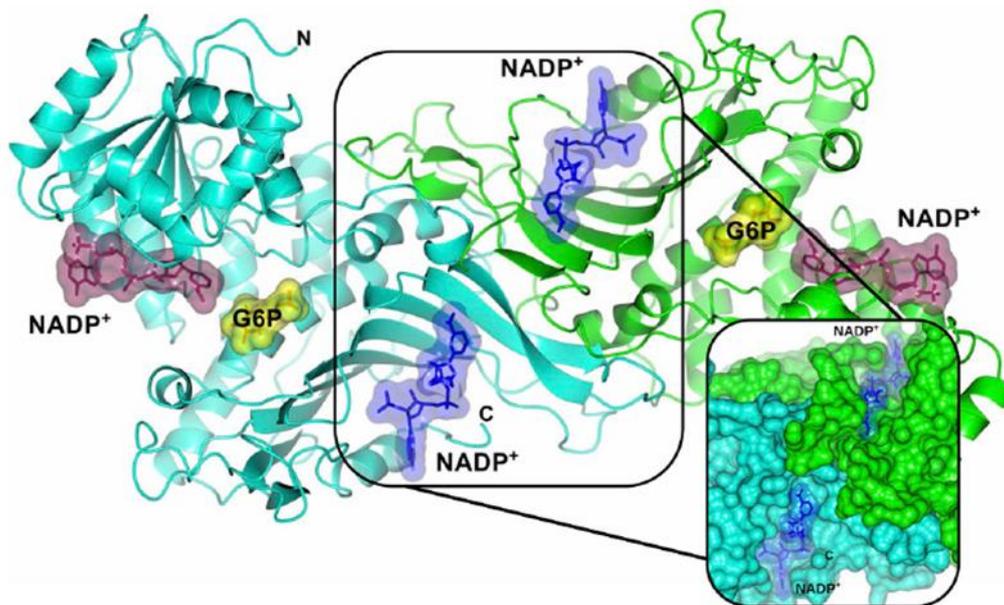


Figure 10 : Structure cristallographique de la G6PDH humaine sauvage dimérique, montrant le NADP⁺ structural (surface moléculaire en bleu), le NADP⁺ catalytique (surface moléculaire en violet) et le substrat G6P (surface moléculaire en jaune) dans le dimère. Les deux monomères sont montrés en cyan et en vert. A droite de l'image se trouve un agrandissement de l'interface entre les dimères qui montre l'insertion précise des deux NADP⁺ structuraux. La figure a été obtenue d'après la référence. ⁴⁸

Sources	K _m (μM)			Références
	G6P	NADP ⁺	NAD ⁺	
<i>Leucocytes</i>	11 ^a	80		Bonsignore et al. (1966)
<i>pH 5,0</i>				
<i>pH 6,0</i>	16 ^a	82		
<i>pH 7,5</i>	31 ^a	81		
<i>pH 8,5</i>	34 ^a	80		
<i>pH 9,5</i>	39 ^a	83		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	81 ^a	5,69	106	Olive et al (1971)
	52,7 ^a			Scott ad Tatum (1971)
<i>Neurospora crassa</i>	37 ^a	12		Heise and Oppendoes (1999)
<i>Trypanosoma brucei</i>	138 ^a	5,3		Duffieux et al (2000)
	138 ^a	35		
<i>Aspergillus Aculeatus</i>	75 ± 6 ^a	6 ± 1		Ibraheem et al (2005)
<i>Human placenta</i>	40 ± 8 ^a	20 ± 10		Ozer et al (2001)
<i>Methylomonas M15</i>	110 ^a	14	200	Steinbach et a (1978)
	290 ^b			
<i>Souris</i>	50 ^a	10		Lee et al (1979)

Tableau 2 : Quelques exemples de constantes Michaelis (K_m) obtenues sur différents organismes appartenant aux différents groupes selon leurs préférences pour le cofacteur.

La G6PDH chez l'homme

- **Structure et fonctionnement :**

La glucose-6-phosphate déshydrogénase est composée de 515 acides aminés avec un poids moléculaire de 59 kDa.⁴⁹ Cette enzyme peut prendre différentes formes : un dimère, un tétramère ou un hexamère. Cependant, seul le dimère et le tétramère sont actifs et l'équilibre entre les deux formes est pH-dépendant.⁵⁰ Pour l'homme, l'enzyme est sous forme de tétramère à un pH ≤ 6 ou sous forme de dimère à un pH ≥ 8 .⁵¹ Chaque monomère possède deux domaines $\alpha + \beta$ qui sont reliés par une hélice α . Trois sites de liaison existent sur chacun des domaines dont deux motifs sont hautement conservés entre les espèces - le site de fixation du substrat à l'enzyme : RIDHYLGK (résidus 198 à 205) et le site de fixation du coenzyme : GXXGDLX (X étant un acide aminé quelconque, résidus 38 à 44).⁵¹

- **Rôle du NADPH**

Le NADPH est un puissant réducteur. Son rôle polyfonctionnel est central dans la cellule :

1. il protège la cellule contre les dommages causés par le stress oxydatif. C'est un régulateur du potentiel rédox et un cofacteur des enzymes antioxydantes,
2. il participe à la biosynthèse de nombreuses molécules nécessaires au bon fonctionnement de la cellule comme les acides nucléiques (donc de l'ADN et de l'ARN), les acides gras, les acides aminés aromatiques, les isoprénoïdes.^{52,53,54,55,56}
3. Inhibiteur de la G6PDH

1. Stress oxydant

Les dérivés réactifs de l'oxygène (communément appelés reactive oxygen species (Ros) en anglais) servent de molécules signal pour réguler des processus biologiques et physiologiques. A hautes concentrations, ces molécules peuvent induire un stress oxydatif, provoquer des dommages aux membranes cellulaires et des blessures oxydatives à différents organes et tissus comme le cœur, le cerveau, ainsi qu'aux vaisseaux sanguins. Ces dommages peuvent entraîner la maladie d'Alzheimer et de Parkinson, ainsi que le vieillissement prématuré des cellules. Cependant, le stress oxydatif peut également être provoqué par des mutations ou des facteurs externes (e.g., le rayonnement UV). Le NADPH est le cofacteur des enzymes antioxydantes tel que la G6PDH, la glutathion réductase et la catalase participent

ainsi à la détoxification des cellules.^{57,58,59} Dans l'exemple de la détoxification par la glutathion peroxydase, l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG) permet de transformer les Ros en eau et alcool. Le glutathion oxydé est alors régénéré par la glutathion réductase grâce à la fixation d'un équivalent de NADPH (Figure 11). La G6PDH joue donc un rôle clé dans les processus de détoxification de la cellule.

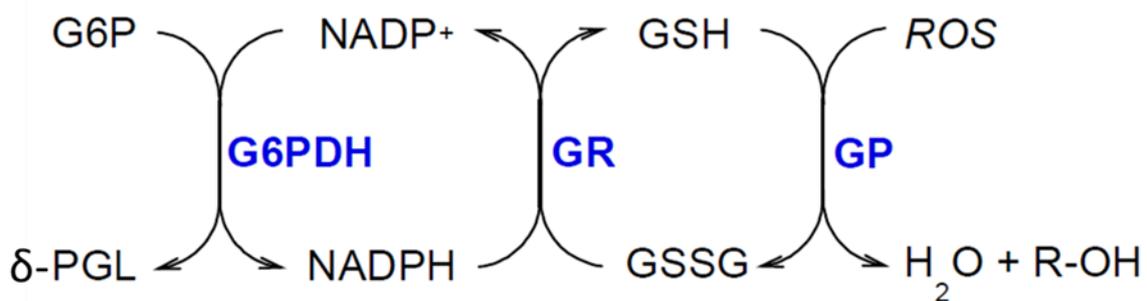


Figure 11 : Mécanisme réactionnel du système de réduction des radicaux libres via le système GSSG/GSH.

Pour des cellules comme les globules rouges la PPP est la seule voie de synthèse du NADPH. Ces cellules sont donc plus exposées au stress oxydatif et elles sont les premières à être affectées par une déficience de la G6PDH, de la GR et des peroxydases. Ainsi, le flux de la PPP dans les globules rouges est importante pour que la [GR] soit suffisante en cas de problème.

Pour d'autres cellules, la délétion de la G6PDH perturbe la balance des Ros produits et des Ros neutralisés :

Pour les cellules souches, la présence des Ros est nécessaire pour la différenciation et la croissance placentaire et la croissance des trophoblastes durant le premier trimestre de la grossesse.⁶⁰ Une concentration trop importante en Ros induit une prolifération excessive des cellules souches entraînant un effet tératogène et tumorigène.⁶¹

Pour les spermatozoïdes, le flux de la PPP est augmenté lors de la capacitation des spermatozoïdes. Cependant, la concentration des ROs est contrôlée et maintenue à un niveau nécessaire pour la maturation des spermatozoïdes.⁶² Des études réalisées sur des souris ayant un déficit partiel de la transaldolase (enzyme de l'étape non oxydative de la PPP) ont montré une stérilité via un métabolisme anormal des spermatozoïdes.⁶³

2. NADPH, substrat de nombreuses biosynthèses

Le NADPH est donc l'un des substrats principal de nombreuses biosynthèses tels que les acides nucléiques (donc de l'ADN et de l'ARN), les acides gras, les acides aminés aromatiques,

les isoprénoïdes. Excepté pour le globule rouge, le NADPH peut également être produit via les enzymes maliques, des aldéhydes déshydrogénases et des isocitrates déshydrogénases.

La déficience de la G6PDH peut donc provoquer des perturbations sur les autres métabolismes cellulaires. Des études ont montré que la G6PDH est activée par l'insuline, hormone protéique sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas et régulatrice avec le glucagon de la concentration en glucose dans le sang. Cette hormone régule entre autre la glycolyse. Chez les patients atteints du diabète de type 1, les cellules pancréatiques β produisent très peu d'insuline. L'expression de la G6PDH est restreinte mais le niveau de glucose est important. Ainsi, la concentration de NADPH est réduite, les ROs augmentent et la prolifération cellulaire est altérée.⁶⁴ Les cellules ne sont plus protégées contre le stress oxydant. Sans prise d'insuline, cette maladie peut être mortelle.

D'autres études ont montré que la déficience de la G6PDH pouvait être une conséquence de la résistance à l'insuline et la cause du diabète de type 2 ;⁶⁵ dont ces patients souffrent généralement d'une hypertriglycéridémie et d'une hypercholestérolémie. Les concentrations d'acides gras libres et de triglycérides sont généralement plus faibles chez les sujets déficients en G6PDH.⁶⁶

3. Inhibiteur de la G6PDH

L'activité de la G6PDH est également régulée par le rapport $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. En fonction des besoins cellulaires, le flux de la PPP est augmenté, le ratio $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ diminue et la concentration intracellulaire du NADPH augmente. Ce NADPH est un inhibiteur qui se fixe à la place du NADP^+ . Le NADPH ne permet pas de stabiliser l'enzyme. L'activité de la G6PDH est donc réduite. Des études ont montré que la G6PDH ne fonctionne qu'à 1-2 % de son potentiel maximal en raison du haut niveau de NADPH dans les conditions de repos. Lorsque le NADPH est consommé par les différents métabolismes dont il est le substrat, le rapport $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ diminue et ainsi l'activité de la G6PDH augmente.

- **Régulation de la G6PDH**

La G6PD est une enzyme-clé dans le métabolisme cellulaire en raison de sa production du NADPH et de pentoses phosphates qui participent à de nombreuses biosynthèses ainsi qu'à la division cellulaire. La régulation de son activité est donc primordiale pour la cellule. Son activité est régulée par différents facteurs tels que :

1. Les facteurs nutritionnels et hormonaux:

Un régime riche en glucide stimule la production d'insuline via la voie des phosphatidylinositol-3-kinase, induisant une accumulation de l'ARNm du G6PD. A l'inverse un régime riche en acides gras polyinsaturés tels que l'acide arachidonique inhibe la signalisation de l'insuline par l'activation des protéines kinases activées par les mitogènes p38 (p38MAPK) et la phosphorylation de la Ser307 du récepteur à l'insuline (IRS-1). L'ARNm de l'enzyme est donc inhibé.⁶⁷

2. Les facteurs liés au stress oxydatif :

Le stress oxydatif s'accompagne de la présence accrue de ROs. Les agents responsables de la production des radicaux régulent eux-mêmes les enzymes requises pour protéger les cellules contre les dommages causées par les radicaux.⁶⁸

3. autres facteurs :

e.g., les rayons lumineux inhibent l'enzyme via l'activation du système ferrédoxine/thiorédoxine.

Des études montrent qu'une délétion ou une inhibition de l'enzyme entraînent une mort cellulaire communément appelée apoptose.⁶⁹ L'inhibition de la G6PDH entraîne également une augmentation des peroxydes hydrogène, la perte de protéine thiols ainsi que des modifications des protéines kinases phosphorylées activées par les mitogènes.⁷⁰ La déficience en G6PD est généralement associée à des nombreuses maladies.

- **Déficience de la G6PDH**

Aujourd'hui, 400 000 000 de personnes à travers le monde possèdent une déficience de la G6PDH à travers 217 mutations possibles.^{51,71,48} Environ 400 phénotypes ont répertoriés en 5 classes en fonction de l'activité de l'enzyme et des manifestations cliniques. Dans plusieurs cas, l'enzyme mutée est moins stable, adopte un mauvais repliement et présente des paramètres cinétiques anormaux (k_m G6P, NADP+, affinité et dépendance au pH).

Comme expliqué précédemment, les globules rouges (GR) sont les premières cellules touchées par la déficience en G6PDH. Les globules rouges permettent de transporter l'oxygène des poumons vers l'ensemble du corps. Une déficience de la G6PDH, qui se produit généralement chez les hommes, provoque systématiquement une dégradation des globules

rouges. Lorsque la destruction des GR est plus rapide que leur construction, ce phénomène se nomme anémie hémolytique. Cette destruction rapide des GR peut être déclenchée par des infections bactériennes ou virales, après inhalation du pollen issu des plantes de fava, après avoir mangé des fèves et par la prise de médicaments générant du stress oxydant comme les anti-malariaux.

Le NADPH et le R5P sont les deux précurseurs des biosynthèses des acides nucléiques et donc de l'ADN et de l'ARN. Généralement les cellules en mitose et en méiose ont un flux de la voie des pentoses phosphate accru en raison des besoins de ces deux précurseurs. Les cellules cancéreuses qui sont continuellement en division cellulaire, sont les premières concernées par la nécessité en NADPH et en R5P. D'ailleurs, 80 % des pentoses sont incorporés dans leurs ADN.

Les études fonctionnelles et structurales de cette enzyme, dans sa forme sauvage ou sa forme mutée, sont donc primordiales pour comprendre son fonctionnement dans le but de développer des stratégies thérapeutiques.

1.3.2 La 6-phosphogluconolactonase, la 6PGL :

La 6 phosphogluconolactonase est la deuxième enzyme de la voie oxydative de la PPP. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de la δ -6-phosphogluconolactone en 6-phosphogluconate. Cette transformation peut également se réaliser sans enzyme (en absence de 6PGL).

La 6-phosphogluconolactonase est une des enzymes de la PPP qui a été très peu étudiée. Pendant de nombreuses années, de nombreux chercheurs considéraient que l'hydrolyse de la δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) était spontanée. Dès la découverte de la voie des Pentoses Phosphate, Warburg et al pensaient d'ailleurs que le produit de l'oxydation du G6P était l'acide phosphogluconate (6PGA). Vingt ans plus tard, Cori et Lipman montraient seulement que le produit de l'oxydation du G6P catalysée par la G6PDH était la δ -6-phosphogluconolactone.²⁰ De plus, ils constataient qu'en présence d'une hydroxylamine, le produit obtenu se transformait en acide hydroxylamique mais qu'en l'absence de l'hydroxylamine, elle s'hydrolysait spontanément en un acide phosphogluconate.²⁰ Ce n'est que quatre ans plus tard, qu'une équipe de Boston montre pour la première fois une activité enzymatique qui hydrolyse la δ -PGL en 6PGA.²¹

L'étude de l'activité de la 6PGL est complexe dans la mesure où l'hydrolyse de la δ -lactone s'effectue en l'absence de l'enzyme. Le substrat de la 6PGL est donc très instable en milieu aqueux. C'est pourquoi de nombreux chercheurs ont jugés que l'étude détaillée de la 6PGL ne présentait pas d'intérêt majeur.⁷² Pourtant, certaines équipes ont tenté de caractériser les propriétés cinétiques de cette enzyme. Pour pallier à l'instabilité de la lactone, un substrat analogue, la γ -6-phosphogluconolactone (γ -PGL), a été synthétisé (Figure 12).⁷³ Des études ont montré que cet homologue est beaucoup plus stable et possède une plus grande affinité pour l'enzyme.⁷³ Les études réalisées sur des érythrocytes ont montré que la déficience de la 6PGL interagissait avec la déficience de la G6PDH dans les anémies hémolytiques.⁷²

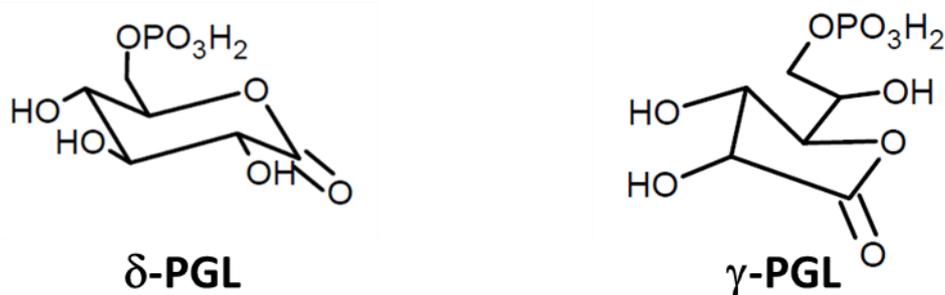


Figure 12 : Représentation des deux substrats de la 6PGL : la δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) et la γ -6-phosphogluconolactone (γ -PGL).

En 1974, Ueberschar et al ont montré que le second substrat de la 6PGL, γ -PGL, pouvait être produit par l'isomérisation spontanée de la δ -PGL sans passer par la forme ouverte de l'acide phosphogluconate.⁷⁴ Ce n'est qu'en 2001, que des études réalisées par ¹³C-RMN ont montré que la δ -PGL était le seul substrat de la 6PGL. En absence de l'enzyme, la δ -PGL s'isomériser plus rapidement en γ -PGL, qu'elle ne s'hydrolyse en 6PGA.⁷⁵ Dans les conditions expérimentales de l'étude menée, l'isomérisation est réversible et la γ -PGL ne peut pas (ou très faiblement) s'hydrolyser spontanément. Ces résultats ont également montré que les deux lactones, qui sont très électrophiles, peuvent réagir avec des nucléophiles potentiels, comme les hydroxylamines, provoquant ainsi des dommages à la structure cellulaire et au métabolisme par l'altération structurale et catalytiques des protéines.⁷⁵ La 6PGL possède donc un rôle important dans la protection cellulaire.

La 6PGL chez l'homme

Chez l'homme la 6PGL est composée 258 acides aminés⁷⁶ avec un poids moléculaire de 31 kDa sous sa forme native et de 30 kDa à pH 6.⁷³ Des études réalisées sur des lysats d'érythrocytes⁷³ ont montré que l'activité de la 6PGL était dépendante du pH :

- $5.8 < \text{pH} < 7.2$, la vitesse de la 6PGL augmentent de 0.03 à $0.13 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$
- $\text{pH} = 7.4$, la vitesse de la 6PGL est maximale et égale à $0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$
- $7.6 < \text{pH} < 8.2$, la vitesse de la 6PGL diminue de 0.14 à $0.08 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$

En l'absence de l'enzyme, l'hydrolyse spontanée est également dépendante du pH :

- $\text{pH} < 7.0$, la vitesse de l'hydrolyse spontanée est faible et d' $\sim 5 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$
- $\text{pH} > 7.0$, la vitesse de l'hydrolyse spontanée augmente d' $\sim 5 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ à $\sim 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$

De plus, la concentration en hexoses monophosphate ainsi que le rapport des concentrations entre $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$ obtenus sont très faibles. Les résultats indiquent que dans ces conditions physiologiques la réaction d'oxydation catalysée par la G6PDH est inhibée à moins que la concentration en 6PGL soit au moins de $10 \text{ nmoles}\cdot\text{g}^{-1}$. Ces résultats montrent que la 6PGL est essentielle dans le maintien du rapport $[\text{NADP}^+]/[\text{NADPH}]$.⁷³

Au cours de ce sous chapitre, nous avons montré que les deux premières enzymes de l'étape oxydative de la PPP sont cruciales à la survie cellulaire en raison de leurs implications dans la production de précurseurs à de nombreuses biosynthèses. Un quelconque dysfonctionnement sur cette voie peut avoir des conséquences dramatiques pour la cellule. Ces deux enzymes sont donc des cibles potentielles pour l'élaboration de nouveaux médicaments contre les maladies liés à ces deux enzymes comme le favisme ou le cancer. Par ailleurs, leur étude est également pertinente dans le cadre des maladies infectieuses.

1.4 Maladies Infectieuses liées à la PPP :

1.4.1 Parasitoses

Les parasites protozoaires sont des organismes unicellulaires qui vivent aux dépens d'un hôte en se nourrissant essentiellement des tissus, des aliments et du sang. Cette intrusion est responsable d'un bon nombre d'infections et de maladies chez l'homme dans les pays en développement. Trois classes existent :

1. **les kinétoplastides** : ce sont des eucaryotes eugléozoaires parasites non pigmentés qui ont un ou deux flagelles et un kinétoplaste volumineux. Ils n'ont qu'une seule mitochondrie. Deux groupes constituent cette famille : (i) les trypanosomatidés, qui possèdent un seul flagelle et une membrane ondulante pour se mouvoir ; (ii) et les bododina qui possèdent deux, voire trois flagelles. Les kinétoplastides les plus connus sont les *trypanosomes brucei*, les *trypanosomes cruzei* et les *Leishmania spp* qui sont respectivement responsables de la maladie du sommeil, de la maladie de Chagas et de la Leishmaniose.⁷⁷

2. **Les plasmodiums ou acanoidasida** sont responsables de la malaria.

3. **Les archeamobeans** sont responsables d'amoebiasis - une forme de diarrhée aiguë ainsi que des abcès, principalement dans le foie.

La relation hôte-parasite, le processus d'infection et l'identification des cibles thérapeutiques dépendent fortement du métabolisme du protozoaire. Les systèmes immunitaires de l'organisme hôte luttent contre le parasite grâce aux ROs. La génération des ROs étant liée à la production de NADPH via la PPP, cette information nous montre que la PPP peut donc être une cible attractive pour la lutte contre ces parasites.

1.4.1.1 Les kinétoplastides :

Ces parasites possèdent une voie des pentoses phosphates complète et fonctionnelle. Elle métabolise 5 à 10 % du glucose total dans le cytosol mais également dans le glycosome, un peroxisome trypanosomatide, qui contient majoritairement les enzymes de la glycolyse et du système oxydatif du parasite et exclusivement celles de la biosynthèse des nucléotides. La PPP possède donc ici trois rôles majeurs : (i) elle échange des intermédiaires réactionnels avec la glycolyse. (ii) Elle produit le R5P, précurseur de la biosynthèse des nucléotides et (iii) elle forme le réducteur NADPH pour le système antioxydant.

Le système oxydatif repose exclusivement sur le système N¹-N⁸-bisglutathionylspermidine (T(SH)₂)/ trypanothione reductase (TryR) qui est NADPH dépendant. T(SH)₂ est un analogue au glutathion. Cette réponse au stress oxydatif qui remplace le système GSH/GR montre encore une fois une dépendance du système oxydatif de la PPP et l'importance de cette dernière. Des études réalisées sur la G6PDH des trypanosomes⁷⁸ ont montré que dans les formes infectieuses de la *Trypanosoma cruzei*, 70 μM de H₂O₂ augmentent l'activité de la G6PDH par un facteur 46. A l'inverse, dans les

formes insectes (natives) l'activité de l'enzyme diminue en présence de 20 μM de H_2O_2 . Barret montre également que la 6PGD joue un rôle important dans la PPP des *trypanosoma brucei*. Une délétion sur cette enzyme et sur la G6PD montre un phénotype létal lorsque la 6PGA s'accumule dans la cellule.⁷⁹

Ces résultats montrent que la PPP des kinétoplastides, qui se déroule en partie au sein du glycosome constitue une cible thérapeutique potentielle.

1.4.1.2 Les *plasmodium spp* :

Les *plasmodium spp* possèdent une voie des pentoses phosphates complète et fonctionnelle. Cependant, ce parasite possède une particularité. Sa voie oxydative de la PPP n'est composée que de 2 enzymes : la 6-phosphate déshydrogénase 6-phosphogluconolactonase (GluPho)- qui fusionne la G6PDH et la 6PGL - et la 6PGD. La GluPho synthétise le 6-phosphogluconate à partir du glucose-6-phosphate avec la réduction d'un équivalent de NADP^+ en NADPH. Cette enzyme « fusion » est régulée par la S-glutathionylation qui est impliquée dans le stress oxydatif.⁸⁰ D'autres enzymes combinant la G6PDH avec d'autres enzymes de la PPP ont été retrouvées dans le parasite. Cette originalité indique une efficacité de la PPP dans la synthèse des métabolites majeurs du métabolisme.⁸¹

Dans les globules rouges, ces parasites sont constamment soumis au stress oxydatif. Ils produisent des radicaux hydroxyl et du H_2O_2 grâce à l'oxydation de Fe^{2+} en Fe^{3+} via l'hémoglobine et la production d'anions superoxydes. Le système anti-oxydant de ces parasites implique la glutathion réductase et la thioredoxine réductase, qui sont toutes les deux NADPH dépendantes. Sachant que le R5P peut également être produit à partir de l'absorption et la dégradation des purines hôtes, PPP est la seule source de NADPH chez les *plasmodium spp*.

Pour le Plasmodium le plus dangereux, le *Plasmodium falciparum*, qui cause le paludisme chez l'homme, la PPP est indispensable pendant l'infection. Dans les globules rouges infectés, l'activité de la PPP parasitaire représente 82 % de l'activité totale et 72 % pour les globules rouges déficient en G6PDH.⁸² Cette activité est encore plus importante lorsque le parasite est dans sa période de maturation, également appelée (étape) trophozoïte.⁸² Des études ont montré que la déficience en G6PDH protège contre la malaria.^{83,84} Environ 46 % des femelles hétérozygotes et 58 % des mâles hémizygotés ont augmenté cette résistance.⁸⁵ Ce phénomène n'est pas totalement compris, et deux hypothèses ont été proposées : (i) Le

stress oxydatif important dû à la déficience en G6PDH serait responsable d'une perturbation de l'infection, (ii) les érythrocytes infectées sont plus facilement reconnues et détruites par le système immunitaire.⁸⁶

1.4.1.3 *Entamoeba histolytica* :

L'*Entamoeba histolytica* possède très peu de G6PDH, 6PGDH et de TAL.^{79,87} Ce parasite a donc développé une voie d'interconversion hexose-pentose alternative à la voie oxydative de la PPP. Ce métabolisme alternatif est composé de 3 enzymes : une transketolase (TKL), une fructose-biphosphate aldolase (FBA) et d'une pyrophosphate dépendant phosphofruktokinase ((PPi)PFK).⁸⁸ Lorsque le parasite est soumis au stress oxydatif, la production des métabolites de la voie non oxydative de la PPP, la biosynthèse du glycérol et de la chitine est augmentée. Ce phénomène est dû à l'inhibition des enzymes glycolytiques et favorise également le retour du flux de carbone.⁸⁷ La voie non oxydative de la PPP joue un rôle indépendant de NADPH dans la réponse au stress oxydatif.⁸⁹

1.4.2 Maladies provoquées par les bactéries :

La bactérie est un organisme unicellulaire et sans noyau dont le génome est constitué d'un seul chromosome. Parfois, elle se compose d'un plasmide. Ces organismes sont pour la plupart pathogènes pour l'homme. Lorsqu'une bactérie infecte l'homme, les mécanismes de défense nécessaires à la survie se déclenchent. Des capteurs microbiens activent des voies signalétiques ainsi que des effecteurs. Récemment, une étude a montré qu'une kinase nommée SHPK modulait la régulation des macrophages. L'expression de SHKP est associée à la polarisation de macrophage 1 (M1). Mais une surexpression de la kinase induit par la réponse pro-inflammatoire est associée à une production de radicaux superoxydes. Ce phénomène est similaire à la réponse neutrophile en réponse au système immunitaire.⁹⁰ Des études réalisées sur des *H. pylori* ont montré que l'activation rapide des neutrophiles augmentait la production des DROs.⁹¹ Les niveaux de GSH sont ainsi augmentés et cela montre que le système glutathion est également une réponse auto-immune.⁹²

La bactérie possède aussi bien une PPP qu'une voie glycolytique. Ces deux voies sont d'ailleurs les constituants majeurs du métabolisme des carbones dans les bactéries.⁹³ La PPP possède les mêmes rôles que chez les eucaryotes, mais avec une fonction supplémentaire : l'initiation de la biosynthèse des lipopolysaccharides (LPS) par le sédoheptulose-7-phosphate.

De plus, le D-xylose, D-ribose et le L-arabinose ne sont catalysés que par la PPP.^{28,93} Lorsque la bactérie infecte l'hôte, la bactérie doit s'adapter en fonction de sa localisation dans l'organisme. Selon l'environnement cellulaire ou tissulaire, les nutriments diffèrent. Le métabolisme, la structure intra- et extra-cellulaire, et la croissance bactérienne s'adaptent à ce changement et la virulence de la bactérie est dépendante de cette localisation.

La PPP joue un rôle central dans la biosynthèse des lipopolysaccharides (LPS) qui recouvrent la surface externe des membranes bactériennes. Les LPS ne protègent pas seulement la bactérie mais ils induisent l'activation de la réponse auto-immune.⁹⁴ De nombreuses recherches ont été effectuées sur ces LPS pour trouver des nouveaux agents thérapeutiques. Une des cibles a été la sédoheptulose-7-phosphate isomérase (SHI) qui permet de transformer le sédoheptulose-7-phosphate provenant de la PPP en un précurseur lipopolysaccharidique, le glycéro-manno-heptose-7-phosphate^{95,96,97} et l'arabinose 5-phosphate isomérase (API) qui convertit le ribulose-5-phosphate provenant de la PPP en un précurseur lipopolysaccharidique l'arabinose-5-phosphate.⁹⁸

1.5 Méthodes analytiques pour caractériser la PPP :

Afin de juger l'influence d'une perturbation sur l'une des enzymes de la PPP dans une cellule, perturbation qui peut être induite par des facteurs internes cellulaires ou externes, il est important de connaître le fonctionnement et la régulation de cette cascade enzymatique dans l'état natif. Dans ce but, le choix de la technique d'analyse qualitative et quantitative est important. L'observation de la PPP est délicate en raison de la faible concentration des métabolites intermédiaires dans la cascade enzymatique.⁹⁹ L'accumulation de ces métabolites est entravée par des transformations rapides en aval de la chaîne enzymatique, car les constantes de temps correspondant aux transformations qui consomment ces intermédiaires sont de l'ordre de la seconde ou moins.^{100,101,102} Afin de détecter l'ensemble des acteurs de la PPP, la méthode d'observation doit être sensible, non-invasive, simple, et elle doit également posséder une résolution temporelle suffisante pour différencier ces métabolites.

De nombreuses techniques (telles que des essais colorimétriques, des mesures fluorimétriques et spectroscopiques)^{103,104,99,105} ont été choisies pour réaliser les mesures quantitatives. Différentes sondes ont été testées : en RMN le [U-¹³C]-Glucose et le [U-²H]-Glucose, en traçage radioactif le [U-¹⁴C]-Glucose.^{106,107} En UV-Vis, des sondes indirectes

comme le NADPH ont également été utilisées. Le marquage du substrat est nécessaire pour l'observation RMN afin d'éliminer les autres signaux provenant des molécules présentes dans la cellule. La technique la plus performante à cette date pour décrire la PPP est la spectrométrie de masse couplée à une méthode chromatographique (LC, CPG, HPLC). Cette méthode sensible, sélective et robuste a permis de déterminer les concentrations absolues de l'ensemble des sucres phosphorylés de la PPP.¹⁰⁸ Cependant, l'inconvénient principal de cette technique est qu'elle n'est pas applicable à des études *in vivo* en temps réel.

Récemment, le potentiel analytique de la RMN a été substantiellement amélioré par l'invention des méthodes dites d'hyperpolarisation pour la résonance magnétique à haute résolution^{5,109}. A l'état liquide, l'hyperpolarisation par DNP suivie de dissolution⁵ permet d'observer des voies métaboliques *in vivo* en temps réel, de manière non-invasive. Sa capacité d'augmenter le signal des molécules par un facteur 10'000⁵ comparé à des mesures identiques effectuées sans hyperpolarisation permet de détecter des signaux provenant de molécules en faibles concentrations dans un système complexe. Cette nouvelle technique a permis l'observation⁷ et l'identification des métabolites impliqués dans les voies métaboliques¹¹⁰ et la quantification des métabolites présents dans un extrait cellulaire.¹¹¹ Le seul inconvénient de cette technique est sa dépendance critique de la durée de vie de l'aimantation. Cette durée de vie est dictée par les constantes de temps de relaxation longitudinale des noyaux hyperpolarisés. Ces durées de vie sont, pour des noyaux choisis pour optimiser l'expérience, dans des molécules endogènes typiques pour la finalité de ces expériences, *in vivo*, – e.g. observation du pyruvate via son carbone-1 enrichi isotopiquement - de l'ordre de 30 s.¹ Nonobstant cette limitation, cette méthode a déjà prouvé un panel varié d'applications comme l'injection de molécules hyperpolarisées directement dans le flux sanguin et le suivi du devenir de cette molécule par IRM pour le diagnostic d'un cancer de la prostate.^{112,10} La détermination des quantités de molécules endogènes présentes dans un flux métabolique est rendue possible grâce au développement de la D-DNP.¹¹³

Dans le contexte de la chimie analytique, la Polarisation Dynamique Nucléaire suivie de dissolution (D-DNP pour Dissolution-Dynamic Nuclear Polarisation) est l'une des méthodes d'hyperpolarisation privilégiées pour l'observation des réactions cinétiques.^{4,114} Cette méthode repose sur l'hyperpolarisation du substrat à l'état solide, substrat qui est ensuite dissout et injecté dans un aimant de détection qui contient le matériel nécessaire à la réaction

enzymatique. La première étude quantitative sur une réaction enzymatique simple a été l'hydrolyse du N-Benzoyl-L-Arginine-Ethyl-Ester (BAEE) catalysée par la trypsine, une endoprotéase issue du pancréas ; cette expérience a été réalisée par Bowen et Hilty en 2008.¹¹⁵ Le signal obtenu après détection a été normalisé à l'aide de valeurs de référence obtenues en absence de l'enzyme. Cette procédure permet d'éliminer les effets de la relaxation longitudinale pendant le temps de réaction. Grâce à cette méthode, Bowen & Hilty ont extrait directement la constante catalytique par une multiplication de la pente de la courbe représentant le ratio intensité expérimental/intensité référence en fonction du temps par le ratio $C_{\text{substrat}}/C_{\text{enzyme}}$. Pour montrer le potentiel de la D-DNP, une expérience similaire a été réalisée par UV-spectrophotométrie. Des valeurs $k_{\text{cat}} = 12,1 \pm 1 \text{ s}^{-1}$ et $12,5 \text{ s}^{-1}$ ont été obtenues par D-DNP et UV-vis, respectivement.¹¹⁵ Ces résultats montrent qu'il est donc possible de quantifier par D-DNP des réactions enzymatiques. Cependant, ce modèle de quantification a été appliqué à un système enzymatique simple. La quantification d'un système plus complexe doit prendre en compte l'évolution de la concentration des métabolites au cours de la réaction, la relaxation longitudinale de chaque métabolite, la méthode d'acquisition et le mélange de la solution lors de l'injection, qui peuvent fausser le signal lors de l'expérience.¹¹⁶ Il est donc nécessaire de développer un programme de fit (d'interpolation des données) qui permette de modéliser les différents paramètres liés à la méthode et à la réaction cinétique enzymatique de manière simultanée. Dans ce sens, Allouche-Arnon et al. montrent qu'il est possible de quantifier une succession de réactions enzymatiques de premier ordre catalysées par la même enzyme dont le substrat intermédiaire s'isomérisse.¹¹⁶ Une autre méthode de quantification des vitesses de transformation enzymatiques a été réalisée par E. Miclet et al.¹¹⁷ L'étude de la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate via l'hexokinase, qui est l'étape commune à plusieurs voies métaboliques a montré que les deux anomères de glucoses se transformaient respectivement en leurs anomères respectifs de G6P avec des vitesses similaires.¹¹⁷ Ces deux travaux montrent qu'il est difficile de quantifier l'ensemble des points obtenus en raison du problème de mélange lié à l'injection qui fausse la concentration des métabolites détectés.

L'objectif de cette thèse est de quantifier les composantes de la cascade enzymatique de la partie oxydative sur la voie des pentoses phosphates. Ce système enzymatique complexe est une cible thérapeutique de choix en raison de l'importance physiologique de chaque

enzyme pour la cellule. Pour ce faire, les cinétiques des transformations catalysées par chaque enzyme seront quantifiées d'abord séparément, puis de manière simultanée, *in vitro*, par D-DNP. Par la suite, des tests d'inhibitions seront réalisés pour connaître l'influence des inhibiteurs sur la voie oxydative. Des tests *in vivo* seront ensuite réalisés pour observer l'influence de ces inhibiteurs sur l'ensemble des processus cellulaires.

Chapitre 2 : De la RMN à la D-DNP

2.1 Principes généraux de la Résonance Magnétique Nucléaire, la RMN :

La Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) est une spectroscopie qui se base sur l'observation des spins nucléaires dans un champ magnétique \mathbf{B}_0 . Le moment de spin peut avoir différentes valeurs en fonction du nombre de protons et du nombre de neutrons qui composent le noyau (Equation 1 et Tableau 3).

$$|\mathbf{I}| = \hbar[I(I+1)]^{1/2} \quad (1)$$

Nombre de protons	Nombre de neutrons	I
Pair	Pair	0
Impair	Impair	1, 2 ou 3 ...
Pair	Impair	1/2, 3/2 ou 5/2
Impair	Pair	1/2, 3/2 ou 5/2

Tableau 3 : Règle de prédiction du nombre quantique associé au moment de spin d'un noyau (I) en fonction du nombre de protons et de neutrons qui composent le noyau.

La composante I_z du spin suivant un axe z de référence (donné par le champ magnétique B_0) peut prendre les valeurs discrètes :

$$I_z = m\hbar \quad (2)$$

où \hbar désigne la constante de Planck réduite, $\hbar = h/(2\pi)$ et m peut prendre les valeurs :

$$m = -I, -I+1, \dots, I \quad (3)$$

Au moment du spin est associé un moment magnétique $\boldsymbol{\mu}$ par la relation :

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma\mathbf{I} \quad (4)$$

où γ est le rapport gyromagnétique du noyau.

Dans un échantillon contenant N noyaux ayant un nombre de spin I non-nul, l'aimantation macroscopique \mathbf{M}_0 est la somme des moments magnétiques $\boldsymbol{\mu}_i$ des noyaux :

$$\mathbf{M}_0 = \sum_{i=1}^N \boldsymbol{\mu}_i \quad (5)$$

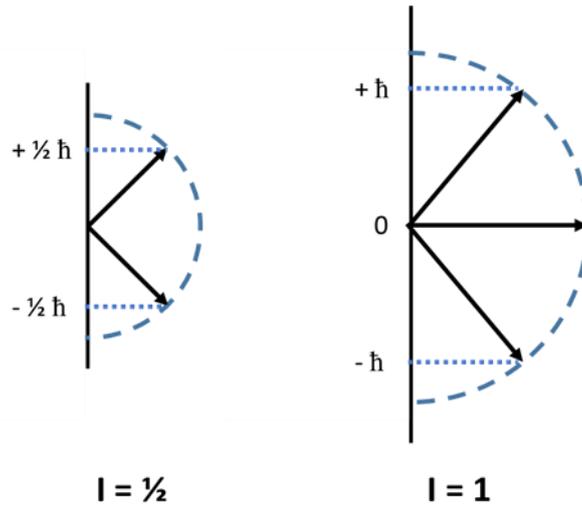


Figure 13 : Interprétation géométrique du spin (ici, $I = \frac{1}{2}$ et $I = 1$). Le moment angulaire du spin a une longueur (norme) $\hbar[I(I+1)]^{1/2}$ et une composante $m\hbar$ sur l'axe z.

En présence d'un champ magnétique, les énergies des différents états caractérisés par des nombres quantiques m associés à l'opérateur de spin I_z sont différentes :

$$E = -\boldsymbol{\mu}_z \mathbf{B}_0 = -m\hbar\gamma B_0 \quad (6)$$

Comme ces énergies sont déterminées par la composante I_z du moment, cela implique que chaque moment magnétique peut prendre $2I+1$ orientations. Les transitions entre deux niveaux d'énergie obéissent à la règle de sélection $\Delta m = \pm 1$. Les transitions entre deux états de spin sont donc associées à une énergie :

$$\Delta E = \pm \hbar \gamma B_0. \quad (7)$$

où la quantité $\omega_0 = \gamma B_0$ est connue comme fréquence (pulsation) de Larmor. Pour $I = \frac{1}{2}$, on a deux états de spin (α et β , d'énergies respectives E_α et E_β correspondant à $\mathbf{m} = \pm \frac{1}{2}$).

Les populations des noyaux ayant des états de spin différentes dépendent des énergies respectives de ces états. D'après la loi de Boltzmann, pour les spins $\frac{1}{2}$ il y a un excès de population dans l'état de spin α

$$\frac{N_\beta}{N_\alpha} = \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_b T}\right) = \exp\left(-\frac{\hbar\gamma B_0}{k_b T}\right) \quad (8)$$

La polarisation (\mathbf{P}) est définie comme la différence de populations entre les niveaux α et β normalisée par la somme des populations (Equation 9).¹¹⁸

$$P = \frac{N_\alpha - N_\beta}{N_\alpha + N_\beta} \sim \frac{\Delta E}{2k_b T} \quad (9)$$

Dans le cas des protons ($I = \frac{1}{2}$), la polarisation dans un champ $B_0 = 9.4 \text{ T}$ (correspondant à une fréquence de résonance ^1H : $\nu_0 (^1\text{H}) = \omega_0 (^1\text{H}) / (2\pi) = 400 \text{ MHz}$) à température ambiante ($T = 300 \text{ K}$) est de seulement

$$P(^1\text{H}) \sim 0,003 \%.^{118}$$

C'est cette faible polarisation, résultant directement de la basse énergie ΔE des transitions entre les niveaux, qui explique la faible sensibilité de la spectroscopie RMN (Figure 14).

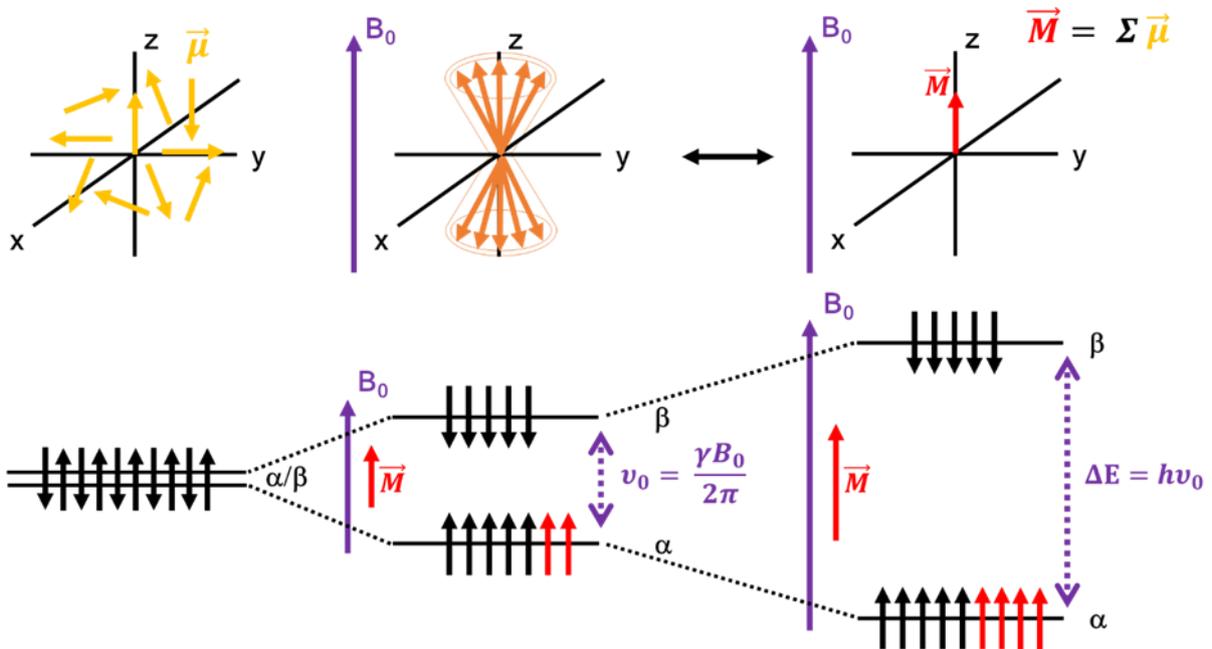


Figure 14 : Levée de la dégénérescence en énergie des états propres des spins nucléaires sous l'influence du champ B_0 pour $I = \frac{1}{2}$. L'excès de la population du niveau α par rapport à la population par rapport à celle du niveau β est donné par la distribution statistique de Boltzmann (flèches rouges). Ces différences de populations varient avec la différence d'énergie entre les deux populations relatives (niveaux), en présence de champs B_0 d'intensités différentes.

Différentes techniques ont été développées pour augmenter la polarisation de spin des noyaux. La surpopulation du niveau énergétique magnétique de base d'un ensemble de spins nucléaires, ou hyperpolarisation des spins nucléaires, peut être obtenue par :

- (i) Absorption de la lumière polarisée par un gaz rare résultant dans l'hyperpolarisation des spins électroniques et par la suite dans l'hyperpolarisation des spins nucléaires, avec des applications en imagerie¹¹⁹, comme détaillé par la review de Walker et al.¹²⁰

(ii) Transfert de polarisation à partir du para-hydrogène¹²¹ en présence de champs magnétiques intenses (PASADENA)¹²² ou dans des champs magnétiques faibles suivi par transfert dans un champ magnétique intense.¹²³

(iii) Transfert de polarisation à partir des spins électroniques.¹²⁴ Le développement de cette technique d'hyperpolarisation a permis l'étude cinétique des réactions chimiques et enzymatiques.

2.2 La polarisation dynamique nucléaire suivie par dissolution, D-DNP :

Les techniques de polarisation dynamique nucléaire suivie par dissolution de l'échantillon (Dissolution-DNP ou D-DNP, pour « Dissolution Dynamic Nuclear Polarization ») a été développée pour augmenter la sensibilité de la RMN. La D-DNP permet d'amplifier, à basse température (celle de l'hélium liquide), la polarisation de noyaux d'intérêt puis d'effectuer la détection de ces noyaux après dissolution et transfert dans un site de détection (spectromètre ou imageur), à température ambiante. Le transfert de polarisation des spins électroniques, qui sont hautement ordonnés à $T = 1\text{ K}$, vers les spins nucléaires permet d'augmenter le signal RMN d'un facteur important, $\epsilon = S_{\text{hyperpolarisé}} / S_{\text{non-hyperpolarisé}} > 10\ 000$. La D-DNP a été développée par l'équipe de Jan Adenkaer-Larsen à Malmö⁵.

Depuis 2003, de nombreuses équipes de recherche développent des méthodes pour étendre le champ d'application de la D-DNP à différents domaines, allant de l'étude de cinétiques de réactions chimiques^{115,116} aux applications de la spectroscopie *in vivo*.^{9,8,125,126} L'une des plus belles avancées a été la première observation d'une tumeur se trouvant sur la prostate d'un patient par IRM. Après l'injection intraveineuse de pyruvate hyperpolarisé, la transformation du pyruvate en lactate, dont la cinétique rapide est le marqueur d'une tumeur prostatique, est observée en temps réel. Ces résultats montrent que la D-DNP peut devenir un nouvel outil diagnostique.¹⁰

Depuis l'introduction du transfert de polarisation des électrons vers les noyaux (iii) pour la spectroscopie RMN haute-résolution à l'état solide¹⁰⁹ et liquide⁵ les groupes de recherche de l'EPFL et de l'ENS Paris ont démontré une série d'applications et des améliorations de la méthode.

Le premier développement envisagé à Lausanne, utilisant le système développé dans le département de physique¹²⁷, concernait la conservation de la polarisation obtenue suite au transfert des spins électroniques et suite à la dissolution dans des états propres des spins nucléaires ayant des longs temps de vie.¹²⁸ Des recherches sur la conservation optimale de l'hyperpolarisation ont été continuées en utilisant des hétéronoyaux tels que l'azote-15¹²⁹ ou les protons.¹³⁰ L'utilité du surplus de polarisation pour l'observation des noyaux avec des faibles constantes gyromagnétiques a été mise en évidence par l'étude de l'yttrium dans des complexe de type DOTA.^{131,132} La D-DNP utilisée en conjonction avec la relaxométrie a permis d'améliorer la sensibilité pour les mesures de relaxation à bas champs.¹³³ La recherche de longs temps de vie a continué à des champs intermédiaires entre le polariseur et l'aimant de détection, ainsi que utilisant des cohérences a longs temps de vie, en présence des radicaux libres ou lorsque ces derniers sont éliminés par des réactions chimiques.^{134,135,136}

La polarisation croisée^{137,138} a permis d'améliorer la sensibilité de mesure par RMN des signaux des hétéronoyaux tels que le carbone-13 tout en utilisant des temps relativement courts de polarisation, proportionnels aux constantes de temps de relaxation des hydrogènes à basse température.

Une étape importante pour l'amélioration du signal obtenu a été la modulation en fréquence du rayonnement micro-onde appliquée aux spins électroniques, de manière à mieux couvrir les lignes spectrales larges des électrons à basse température.¹³⁹

A ce point, l'étude des cinétiques enzymatiques par D-DNP a déjà été envisagée dans le groupe.¹¹⁷

L'amélioration du signal hyperpolarisé a continué via l'utilisation des radicaux libres incorporés dans une matrice¹⁴⁰ qui ne se retrouvait plus dans la solution finale analysée, étant filtrés lors de la dissolution.

Les applications biomédicales comptent l'étude de l'échange entre l'état libre d'un ligand et son interaction avec une protéine¹⁴¹ ainsi que des substrats ayant des protons équivalents chimiquement, qui conservent mieux l'hyperpolarisation dans des états à longs temps de vie, avant la transformation enzymatique.¹⁴¹ Les bénéfices de la protection du substrat polarisé des faibles champs magnétiques, où la relaxation est accentuée, via l'utilisation d'un tunnel magnétique ont été démontrés.¹⁴²

La polarisation d'un spin peut être détectée via le rapport entre les intensités des lignes dues à l'éclatement engendré par le J-coupling à la fréquence de son voisin, comme démontré par une étude récente.¹⁴³

Pour les études de métabolique, la D-DNP offrait le potentiel d'une amélioration de la sensibilité qui était hautement nécessaire pour les mesures dans les milieux complexes, pourvu que ces mesures restent reproductibles. Ce potentiel de la D-DNP pour la métabolomique a été valorisé dans la publication de 2016.¹¹¹

Les temps de vie courts de l'hyperpolarisation restaient l'obstacle principal pour les applications de la D-DNP pour les analyses par RMN ou pour le diagnostic par RMN. L'avancée avec le plus grand écho a été l'obtention des métabolites transportables avec des temps de vie de l'aimantation pouvant atteindre des dizaines d'heures.¹⁴⁴

La capacité de la D-DNP de peupler des états propres des spins nucléaires qui seraient autrement difficilement observables a été utilisée à l'ENS pour observer un état appartenant à la fois aux spins ^2H et ^{13}C des groupes méthyl qui possèdent des longs temps de vie.¹⁴⁵ Les longs temps de vie des groupements méthyl ont été utilisés pour la DNP dans le cadre d'une collaboration entre Lausanne, ENS Paris et Southampton.¹⁴⁶

La relaxation électronique peut varier en fonction de la fréquence de l'électron. Les effets de l'anisotropie de la relaxation électronique sur la D-DNP ont été étudiés à l'ENS.¹⁴⁷

2.2.1 Instrumentation

L'instrumentation permettant la réalisation des expériences D-DNP comprend trois éléments principaux:

1. Un polariseur, composé d'un aimant et d'un cryostat qui contient de l'hélium liquide dont la température peut être maintenue à $T = 1,2 \text{ K}$ grâce à un système de pompage qui maintient une faible pression dans le cryostat. Une source micro-onde permet d'irradier les électrons libres (de radicaux stables) présents dans les radicaux stables utilisés pour le processus de polarisation dynamique.

2. Une canne de dissolution permet de transférer de l'eau à $\sim 180 \text{ }^\circ\text{C}$ et à haute pression (typiquement 10 bar) pour dissoudre l'échantillon « hyperpolarisé ». La solution est ensuite envoyée vers l'aimant de détection (spectromètre RMN liquide, IRM). Au cours de cette étape,

la solution « hyperpolarisée » circule dans un tunnel magnétique, qui permet de limiter la perte de polarisation lors du transfert entre le polariseur et le site de détection.

3. Un spectromètre RMN enregistre le signal des noyaux hyperpolarisés.

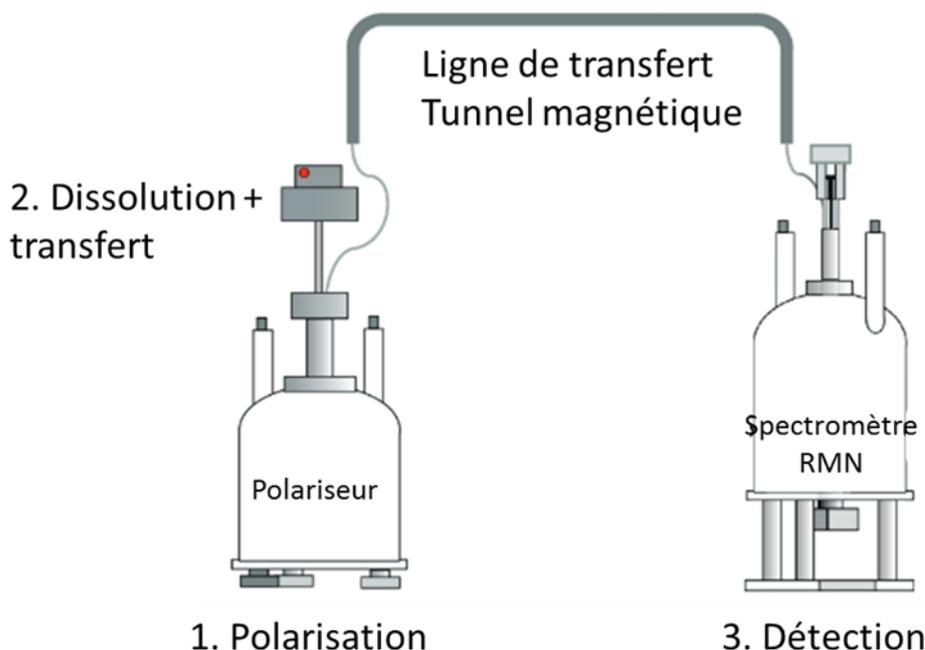


Figure 15 : Représentation schématique de l'appareillage utilisé pour la D-DNP. L'ensemble des étapes de réalisation d'une expérience est décrite. Le sucre est hyperpolarisé à $T = 1.2$ K, (1). L'échantillon est ensuite dissout par l'injection de 5 mL de D_2O via l'insertion d'une canne de dissolution dans le polariseur, (2). La solution est ensuite envoyée dans le tunnel magnétique pour être injectée à l'aide d'un piston dans le spectromètre de détection (3). Cette figure est inspirée du système expérimental D-DNP de l'article original (Ardenkjaer-Larsen et al, PNAS 2003), repris dans la thèse de Basile Vuichoud (EPFL, 2017)¹⁴⁸.

Le polariseur utilisé dans notre laboratoire (ENS) est un prototype fabriqué par Bruker Biospin. Il est composé d'un aimant supraconducteur de champs magnétique $B_0 = 6,7$ T dans lequel est placé un cryostat refroidi à l'hélium liquide pouvant atteindre $T = 1,2$ K. Une sonde RMN double résonance $^1H/^{13}C$ se trouve directement dans le cryostat (donc à la température de l'hélium liquide). Une source micro-ondes opérant à $\omega_0^{mw}/(2\pi) = 94$ GHz, disposée en amont d'un doubleur de fréquence, permet d'irradier à une fréquence proche de la fréquence de transition de spins électroniques dans le champ magnétique du polariseur (188 GHz pour $B_0^{polariseur} = 6,7$ T). Les micro-ondes sont acheminées à l'aide d'un guide d'ondes vers l'échantillon se trouvant à l'intérieur des bobines radiofréquences (rf), dans l'aimant de polarisation.

2.2.2 Expérience D-DNP

2.2.2.1 Polarisation

L'effet DNP repose sur le transfert de la polarisation des électrons, $P(e)$, vers les noyaux d'intérêt. Du fait de la constante gyromagnétique élevée de l'électron (660 fois plus importante que celle du proton et 2640 fois plus grande que celle du carbone, car $\gamma_c = \frac{1}{4}\gamma_{(H)}$), le facteur de Boltzman devient suffisamment grand de sorte que la polarisation des électrons avoisine les 100 % à basse température : à $B_0 = 6,7$ T nous avons $P(e) = 79,05$ % à $T = 4,2$ K et $P(e) = 99,89$ % à $T = 1,2$ K. Par comparaison, la polarisation du proton n'est respectivement que de $P(^1H) = 0,16$ % et $P(^1H) = 0,57$ %. Ainsi, au cours de nos expériences D-DNP, nous avons diminué la température du cryostat à $T = 1,2$ K pour obtenir la meilleure polarisation de l'électron. Le transfert de cette forte polarisation de l'électron vers les noyaux se fait à l'aide d'une irradiation micro-ondes à une fréquence proche de la fréquence de résonance RPE des électrons dans le champ magnétique du polariseur.

La description des mécanismes de DNP est extrêmement complexe et se situe au-delà du cadre de ce travail, qui porte sur des applications de ces techniques à des problèmes biologiques. Nous nous contenterons donc de les introduire brièvement et donnerons les références utiles. On distingue plusieurs mécanismes de polarisation, à savoir l'effet solide, l'« effet croisé » (« Cross effect ») et le mélange thermique. Lequel de ces divers mécanismes est effectivement à l'œuvre dépend de différents facteurs, au premier rang desquels les propriétés de la raie électronique du radical utilisé, notamment sa largeur de raie, mais également les temps de relaxation T_1 et T_2 électronique et nucléaire.

Parmi les trois mécanismes évoqués, l'effet solide¹⁴⁹ met en jeu un système d'un spin électronique et un spin nucléaire couplés par une interaction dipolaire. Si la largeur de raie électronique est petite devant la fréquence de transition nucléaire, il est possible d'exciter les transitions $|e_{\alpha n_{\alpha}}\rangle \leftrightarrow |e_{\beta n_{\beta}}\rangle$ à la fréquence $\omega_0(e) + \omega_0(n)$ et $|e_{\alpha n_{\beta}}\rangle \leftrightarrow |e_{\beta n_{\alpha}}\rangle$ à la fréquence $\omega_0(e) - \omega_0(n)$. Ce mécanisme met en jeu des transitions « interdites » (zéro et double quanta) et nécessite donc en général des puissances microondes élevées. (Figure A).

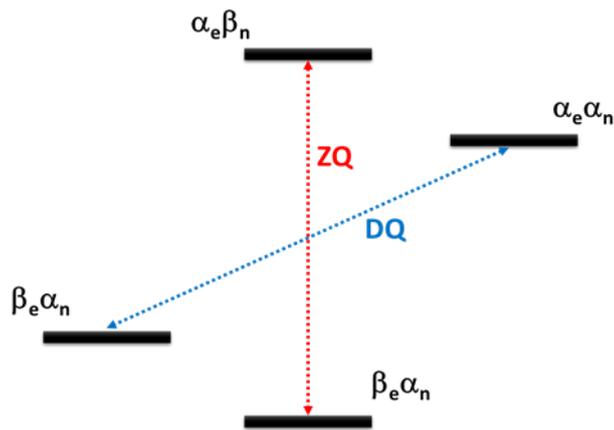


Figure A : Diagramme énergétique représentant un système à deux spins impliquant un électron (e) et un noyau (n).

Le « Cross-Effect » met en jeu un système de deux spins électroniques e1 et e2 et un spin nucléaire. Dans ce cas, les deux spins électroniques sont tels que $\omega_0(e_1) - \omega_0(e_2) = \pm \omega_0(n)$. Cela signifie qu'il s'agit d'un processus à trois spins dans lequel l'énergie est conservée. Dans ce cas, une irradiation à la fréquence $\omega_0(e_1)$ couple un état $|\beta\beta\beta\rangle$ avec $|\alpha\beta\beta\rangle$, puis un réarrangement $|\alpha\beta\alpha\rangle$ qui finalement va polariser l'état nucléaire.

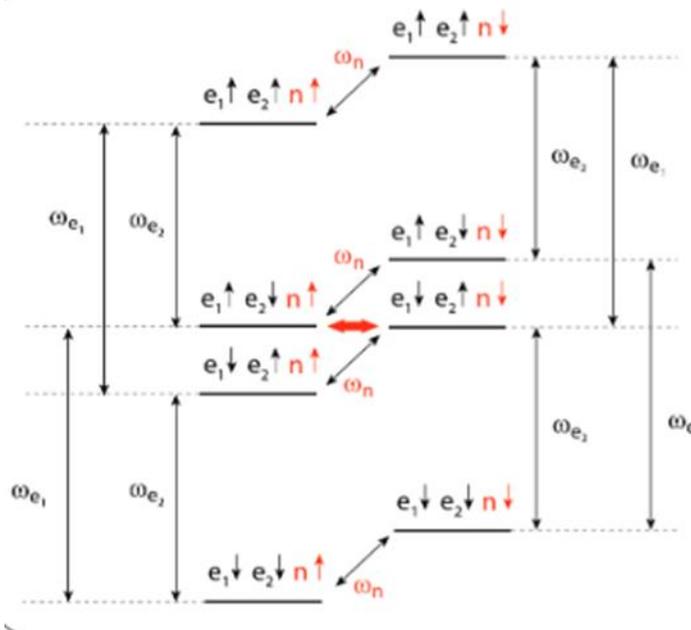


Figure B : Diagramme énergétique représentant un système à trois spins impliquant deux électrons (e_1 et e_2) et un noyau (n). Les différents états sont séparés par les transitions des spins des électrons ω_{e_1} et ω_{e_2} et la fréquence de Larmor du noyau ω_n . La flèche rouge représente le transfert de polarisation entre les électrons et le noyau. Cette figure est issue de la thèse de Basile Vuichoud (EPFL, 2017)¹⁴⁸

Finalement, le mécanisme le plus complexe, mais celui qui est impliqué dans le cas du TEMPOL utilisé dans ce travail est le mélange thermique. Cette description repose sur la notion de température de spin. Dans un système isolé de spins en interaction (spins

électroniques en interaction dipolaire) l'évolution mène à un état qui peut être caractérisé par une température.¹⁴⁹ Dans ce cas, les populations de deux états sont reliées par une loi de Boltzman (Equation 8), ce qui définit une température de spin T , différente de la température de réseau T_L . Ceci est possible si le temps d'équilibrage sous l'effet des interactions spin-spin est très court devant le temps de retour à l'équilibre des populations, T_1 .

La théorie du mélange thermique, qu'il serait hors de propos de développer ici. Un réservoir d'énergie Zeeman nucléaire est couplé (par interactions de type dipolaire) au réservoir d'énergie spin-spin (interaction électronique dipôle-dipôle), et sont donc en échange thermique. En l'absence d'irradiation microonde, ceux-ci sont isolés du réservoir d'énergie Zeeman électronique. Le point important est qu'en présence d'irradiation microonde (à une fréquence $\omega_0(e)+\Delta\omega$ décalée par rapport à la fréquence de Larmor électronique), le réservoir Zeeman devient couplé au réservoir dipolaire électronique, ce qui les amène dans des états de températures de spin différentes : le réservoir Zeeman est partiellement « réchauffé » et le réservoir « refroidi ». Comme ce dernier est couplé au réservoir Zeeman nucléaire, ce processus aboutit en définitive à un refroidissement des spins nucléaires, donc une polarisation accrue.

Dans les applications biologiques de la D-DNP, les observations RMN portent essentiellement sur le ^{13}C qui permet d'observer sélectivement les déplacements chimiques des métabolites sans avoir des signaux parasites provenant des autres molécules/métabolites présentes.⁴ De plus, la dispersion spectrale des ^{13}C est, en général, plus favorable mais l'avantage principal de ce noyau réside dans ses temps caractéristiques de relaxation longitudinale, sensiblement plus longs que ceux des ^1H . La recherche des noyaux avec des temps de relaxation longitudinale suffisamment longs dans les sites moléculaires est, comme nous aurons l'occasion de remarquer au cours de ce travail, l'un des aspects critiques des expériences de cinétique par D-DNP.

Dans ce contexte, il faut noter que le processus de polarisation nucléaire dynamique à partir du TEMPOL est beaucoup moins efficace pour les noyaux ^{13}C que pour les ^1H . La cinétique de polarisation est plus lente- peut durer plusieurs heures- en raison notamment d'un rapport gyromagnétique plus petit, et donc d'un couplage électron-noyau plus faible, ce diminue l'efficacité du transfert. Plusieurs méthodes ont été développées pour réduire ce temps de polarisation. L'une des méthodes développées implique l'utilisation du proton, dont

le rapport gyromagnétique est 4 fois plus grand que celui du carbone, comme intermédiaire entre l'électron et le ^{13}C ^{150,151,152} dans le cadre d'une polarisation croisée (dite CP pour « cross polarization ») (Figure 16).^{137,153,154}

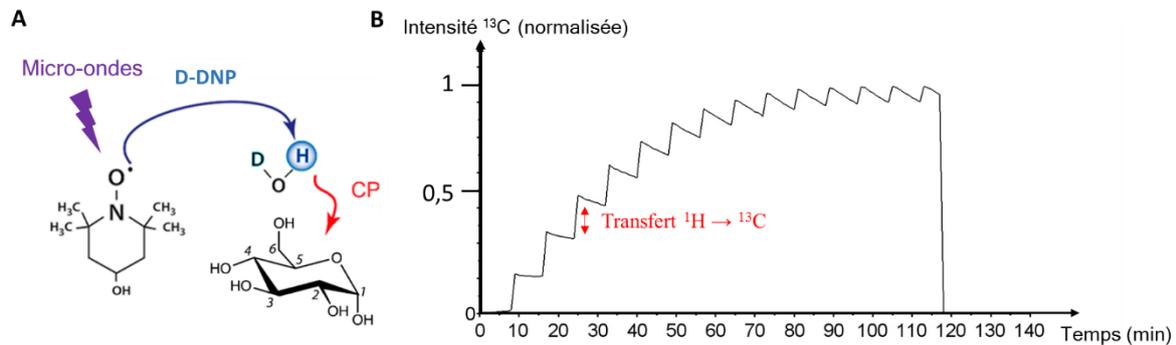


Figure 16 : A) Représentation du transfert de polarisation des spins électroniques vers les noyaux ^{13}C d'une molécule de glucose. Le transfert de la polarisation s'effectue de l'électron au proton par effet DNP puis du proton au ^{13}C par polarisation croisée (CP). B) Suivi de l'intensité du signal ^{13}C au cours de la polarisation. Des transferts de polarisation du ^1H vers le ^{13}C par CP sont implémentés toutes les ca. 4 min (flèche rouge).

La polarisation croisée entre le proton et le carbone nécessite d'abord deux impulsions 90° sur les carbones et les protons pour amener dans le plan xy l'aimantation existante (Figure 17). Ces impulsions sont suivies de deux spins-locks simultanés (Figure 17). Ces deux spins-locks doivent être tels que les amplitudes des champs de radiofréquence appliqués soient : $\gamma_H B_1(^1\text{H}) = \gamma_C B_1(^{13}\text{C})$ (condition de Hartmann-Hahn). L'échange de polarisation peut alors se réaliser avec conservation de l'énergie à travers le couplage dipolaire. On ajoute ensuite un pulse de 90° sur chaque noyau pour ramener l'aimantation obtenue le long de l'axe z. La polarisation ainsi obtenue sur le ^{13}C est conservée jusqu'à l'étape suivante de polarisation croisée, et ce qu'il reste de polarisation sur ^1H est aussi conservé, de sorte qu'il faut moins de temps entre chaque CP car l'aimantation longitudinale n'est pas annulée.

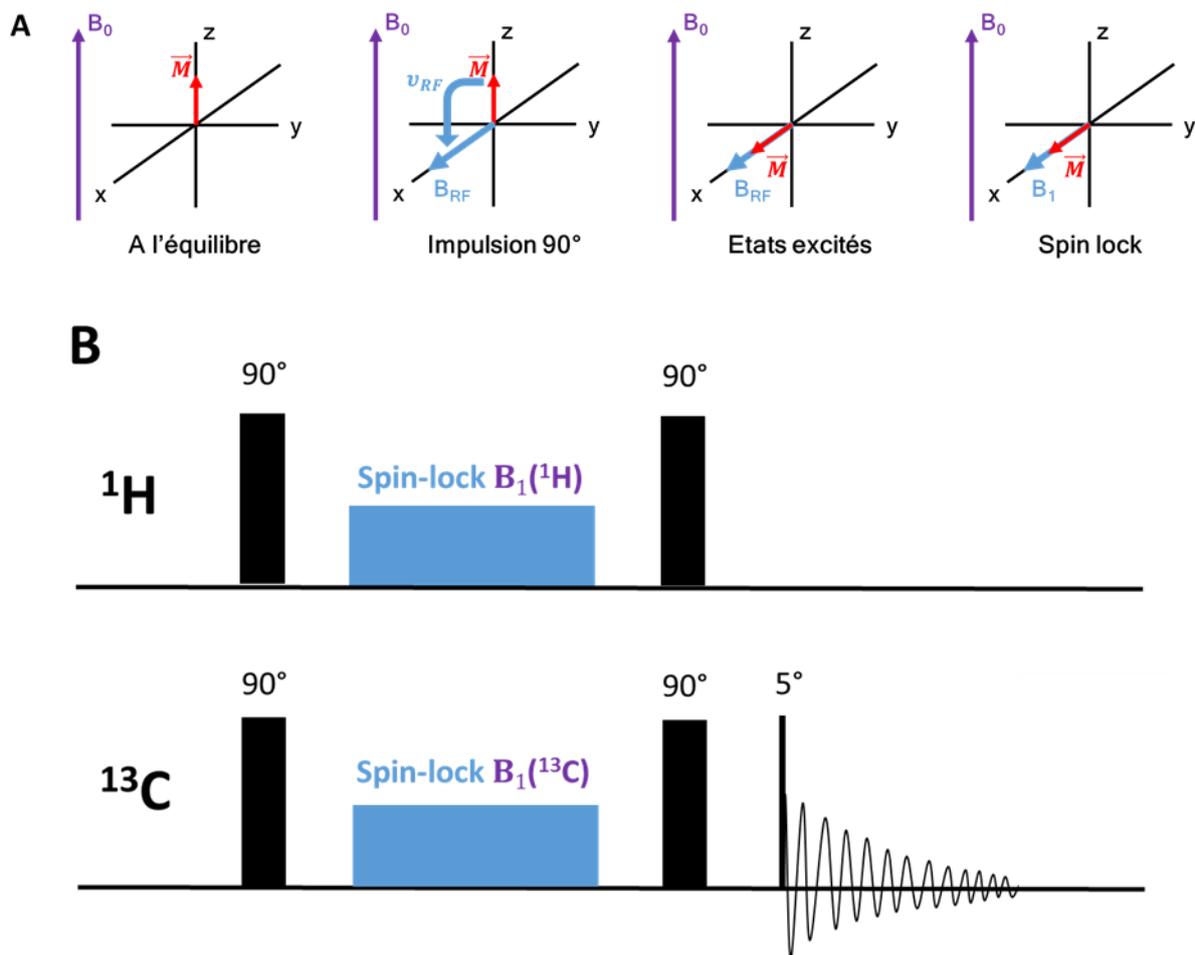


Figure 17 : (A) Principe de la polarisation croisée. Une impulsion de 90° bascule l'aimantation de l'axe z vers l'axe x. Un champ radio-fréquence de spin lock $B_1(^1\text{H})$ permet de bloquer l'aimantation sur cet axe. B) Séquence d'impulsions pour polarisation croisée dans les expériences de D-DNP.

2.2.2.2 Dissolution et transfert

Une fois que les noyaux d'intérêt sont hyperpolarisés à l'état solide, la solution doit être dissoute pour pouvoir être ensuite injectée dans le spectromètre RMN où l'on réalise des expériences à température ambiante. Pour ce faire, on utilise une canne dite « de dissolution » par laquelle un volume d'eau (typiquement 5 mL) est projeté sur l'échantillon solide. L'eau est préalablement chauffée (à $T = 180^\circ\text{C}$) puis injectée avec une pression suffisante (~ 10 bar) pour liquéfier instantanément la solution gelée et l'envoyer vers l'aimant de détection.

Un des problèmes rencontrés lors de ce transfert est la perte d'aimantation, notamment liée à la relaxation paramagnétique due à la présence du radical dans la solution. L'interaction dipolaire entre les moments magnétiques des électrons non-appariés et les noyaux est particulièrement importante lors du passage dans des régions où le champ magnétique est

faible, voire nul. Afin de réduire la relaxation durant cette phase, la solution hyperpolarisée transite dans un tunnel magnétique où un champ magnétique ($B_0 = 0,8 \text{ T}$) est maintenu par un système d'aimants permanents. Le tunnel magnétique utilisé au laboratoire est une réplique du dispositif décrit dans la référence.¹⁴²

2.2.2.3 Injection et détection

La solution hyperpolarisée est transférée vers le champ magnétique de détection ($B_0 = 9,4 \text{ T}$ pour les expériences décrites dans ce travail) à l'aide d'un injecteur situé dans l'ouverture de l'aimant (voir figures). Le démarrage de la séquence d'impulsions est synchronisé avec le début du mouvement du piston permettant l'injection de la solution.

Une série de spectres 1D successifs est effectuée à l'aide d'impulsions de lecture de petit angle (de l'ordre de 10°) afin de préserver l'aimantation et de pouvoir observer le signal sur une durée de l'ordre de quelques T_1 (en l'absence de réaction consommant le substrat). Les spectres sont typiquement acquis toutes les secondes, sachant que l'intervalle entre deux spectres successifs est limité par la durée de l'acquisition. Pour simplifier les spectres et augmenter la qualité du signal sur les espèces doublement enrichies en ^{13}C et ^2H , un découplage du deutérium est appliqué pendant la durée de l'acquisition. Dans certains cas, un découplage ^1H est également utilisé (cf infra).

Relaxation

La relaxation désigne l'ensemble des mécanismes qui font que l'aimantation d'un échantillon retourne à sa valeur d'équilibre thermique caractéristique pour le champ magnétique B_0 dans lequel il se trouve, suite à une perturbation. Les sources de relaxation sont multiples, et elle peut dans le cas des expériences de DNP s'avérer délétère.

De manière générale, la relaxation provient de l'existence de fluctuations rapides au cours du temps des interactions magnétiques entre spins (nucléaires ou électroniques), et dues à la mobilité des molécules. Dans le cas de spins $\frac{1}{2}$, il s'agit d'interactions dipôle-dipôle, de l'anisotropie de déplacement chimique (CSA) et des interactions entre spins électronique et nucléaire (dipolaire ou hyperfine).

En solution, ces interactions peuvent être modulées par des mouvements de rotation (interaction intra-moléculaire) ou de translation lorsque les spins concernés appartiennent à

des molécules différentes. Dans le contexte de la DNP par dissolution, la présence de radicaux dans la solution représente un facteur potentiellement « aggravant » de la relaxation.

La vitesse de relaxation longitudinale du spin I par interaction dipolaire avec le spin S est de la forme :

$$R_1 = K^2 [j(\omega_I - \omega_S) + 3j(\omega_I) + 6j(\omega_I + \omega_S)],$$

où K est une constante et $j(\omega)$ est la fonction de densité spectrale, toutes deux dépendant du mécanisme de relaxation. Dans le cas où les deux spins appartiennent à la même molécule, $K = (\mu_0 \gamma_I \gamma_S \hbar) / (8\pi^2 \langle r^3 \rangle)$ (μ_0 est la perméabilité du vide ($4\pi \cdot 10^{-7}$ H.m⁻¹), τ_c est le temps de corrélation rotationnelle, γ_I et γ_S sont respectivement les constantes gyromagnétiques d'un spin I et d'un spin S) et $j(\omega)$ est la fonction de densité spectrale de rotation. Lorsque la fonction de corrélation de diffusion rotationnelle est exponentielle, on a $j(\omega) = \tau_c / (1 + (\omega\tau_c)^2)$, et τ_c est le temps de corrélation de rotation.

Pour une diffusion rotationnelle (qui décrit la relaxation paramagnétique dans le cas d'une solution), les expressions de K et de $j(\omega)$ ^{155, 156} montrent notamment que lorsque l'échantillon se trouve dans une région où le champ magnétique est très faible, la contribution paramagnétique est particulièrement importante. De plus, dans le cas de la relaxation paramagnétique, K est proportionnel (entre autres) à la concentration de radical dans la solution. Ces facteurs sont donc importants dans le contexte des expériences que nous présenterons dans ce travail.

2.2.3 Applications de la D-DNP aux réactions enzymatiques :

Dans le but d'observer les cascades enzymatiques de la voie oxydative de la PPP, le [U-¹³C₆-D₇]-glucose, le [¹³C₁-D₁]-glucose ou le [U-¹³C₆-D₇]-glucose-6-phosphate ont été congelés et introduits dans le polariseur pour être hyperpolarisés. Des substrats doublement marqués ²H, ¹³C ont été utilisés afin de diminuer la relaxation des noyaux ¹³C.¹¹⁶ Le sucre a ensuite été dissout dans du D₂O à l'aide de la canne de dissolution et transféré via le tunnel magnétique dans l'aimant d'observation contenant les enzymes, les co-facteurs et le tampon. Toutes les secondes, les signaux du sucre injecté et des différents métabolites intermédiaires sont détectés.

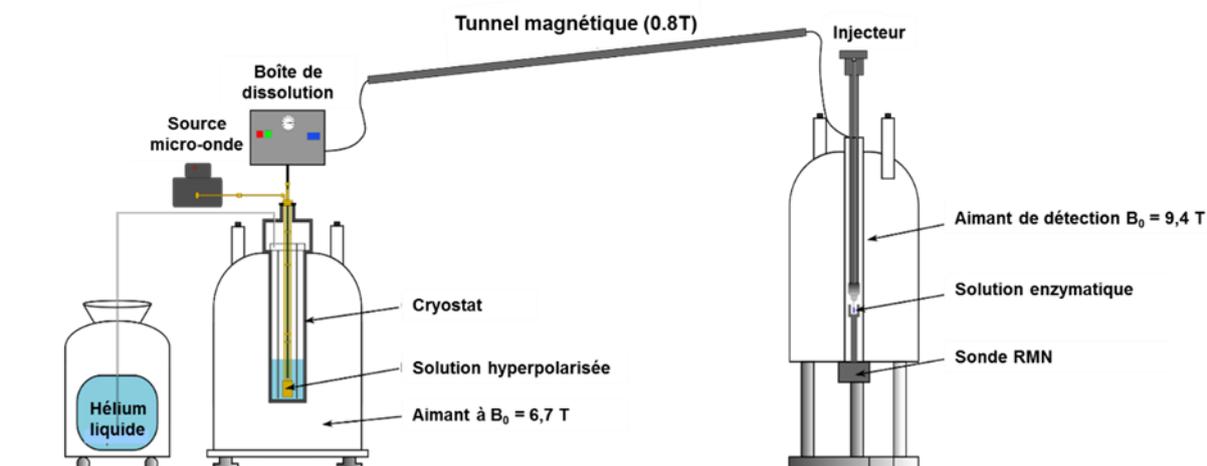


Figure 18 : Description d'une expérience D-DNP-RMN pour l'observation des réactions cinétiques enzymatiques. La solution d'hyperpolarisation est insérée dans le polariseur à 6.7 T et à 4.5 K. Une solution aqueuse contenant les enzymes, co-facteurs et le tampon est insérée dans un aimant de détection de 9.4 T. Une fois la polarisation du carbone accumulée à 1.2 K, de l'eau très chaude (140 °C) est introduite à haute pression (10 bar) dans le polariseur à l'aide de la boîte de dissolution. Grâce à la pression, la solution dissoute est transférée du polariseur vers l'aimant de détection à travers un tunnel magnétique de 0.8 T. Un système d'injection permet d'injecter la solution hyperpolarisée dans le spectromètre. Un système de déclenchement automatisé (« trigger » en anglais), démarre la séquence d'impulsions en vue de l'acquisition du signal une fois que le piston commence à injecter la solution. Cette figure a été réalisée par Mathieu Baudin.

2.2.3.1 Préparation de la solution pour l'hyperpolarisation des substrats

Pour hyperpolariser le substrat de la cascade enzymatique, le sucre est dissout dans un mélange H_2O/D_2O /Solvant (glycérol ou éthylène glycol) en présence d'un radical libre, le TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl), qui sert d'agent de polarisation. Le processus de polarisation nucléaire dynamique à partir du TEMPOL est beaucoup moins efficace pour les noyaux ^{13}C avec $P(^{13}C) = 10\%$ à $B_0 = 3.35\text{ T}$ que pour les 1H , $P(^1H) = 40\%$ à $B_0 = 3.35\text{ T}$.¹⁴⁸ L'application de la polarisation croisée est donc judicieuse pour obtenir une meilleure polarisation en ^{13}C . Ce radical a l'avantage d'être soluble dans l'eau, d'être stable et économique. Les protons de l'eau servent d'intermédiaires pour le transfert de polarisation entre l'électron et le carbone par CP. L'abondance des 1H ne doit pas être inférieure à 5 % dans la solution pour permettre qu'une polarisation suffisante se construise. Le solvant, aussi appelé agent vitrifiant, assure que le radical est réparti de manière homogène (si c'est le cas les billes formées par la solution dans l'azote liquide sont transparentes), et permet ainsi un transfert de polarisation optimal. Plusieurs agents vitrifiant, le glycérol et l'éthylène glycol, ont été testés dans les différents protocoles utilisés dans cette thèse.

2.2.3.3 Préparation des solutions de détection :

Une solution tamponnée (2 mL) contenant le matériel nécessaire pour la réalisation de ces réactions cinétiques a été préparée dans un tube RMN de 10 mm de diamètre pour permettre une meilleure homogénéisation lors de l'injection de la solution hyperpolarisée dans la solution enzymatique ([Chapitre 3.1](#)). Cette solution est insérée avant la dissolution dans l'aimant de 9.4 Tesla (400 MHz) d'un spectromètre RMN Bruker Avance III.

2.2.3.4 Détection :

Une série de spectres 1D successifs sont acquis à l'aide d'impulsions de 10° utilisant une sonde BBO avec une bobine de détection pour les noyaux avec des constantes gyromagnétiques basses proche du tube RMN, ce qui assure une bonne sensibilité pour la détection ^{13}C . L'utilisation d'impulsions faibles permet de préserver l'aimantation et d'observer le signal sur une durée de l'ordre de quelques T_1 (en l'absence des réactions qui consomment le substrat). Les spectres sont typiquement acquis toutes les secondes, sachant que l'intervalle entre deux spectres successifs est limité par la durée de l'acquisition. Pour simplifier les spectres et augmenter la qualité du signal sur les espèces doublement enrichies en ^{13}C et ^2H , un découplage du deutérium est appliqué pendant la durée de l'acquisition. Dans certains cas, un découplage ^1H est également utilisé. Toutes les expériences ont été réalisées à 309 K.

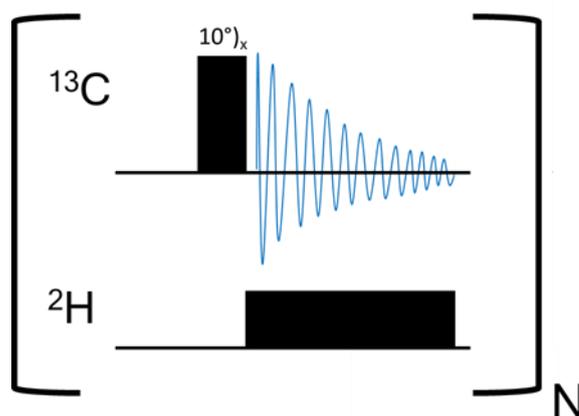


Figure 19 : Séquence d'impulsions pour la détection du carbone hyperpolarisé au cours des réactions enzymatiques. Le deutérium est découplé pendant l'acquisition.

Chapitre 3: Etude de la première enzyme de l'étape oxydative de la voie des PPP, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la G6PD :

3.1 Expériences préliminaires pour l'étude de la G6PD :

Pour observer la cinétique de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), la première enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates (PPP), du glucose a été hyperpolarisé. L'hexokinase phosphoryle le glucose dans la cellule en glucose-6-phosphate (G6P). La glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) oxyde le glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconolactone (δ -PGL). Les premières expériences de RMN hyperpolarisée ont été réalisées en associant l'hexokinase et la G6PD, deux enzymes qui agissent successivement dans la cellule. L'objectif était d'extraire les paramètres cinétiques relatifs à la G6PD à partir de l'évolution des signaux RMN observés des métabolites impliqués dans cette cascade enzymatique : le glucose, le glucose-6-phosphate (G6P) et la 6-phosphogluconolactone (δ -PGL) (Figure 20).

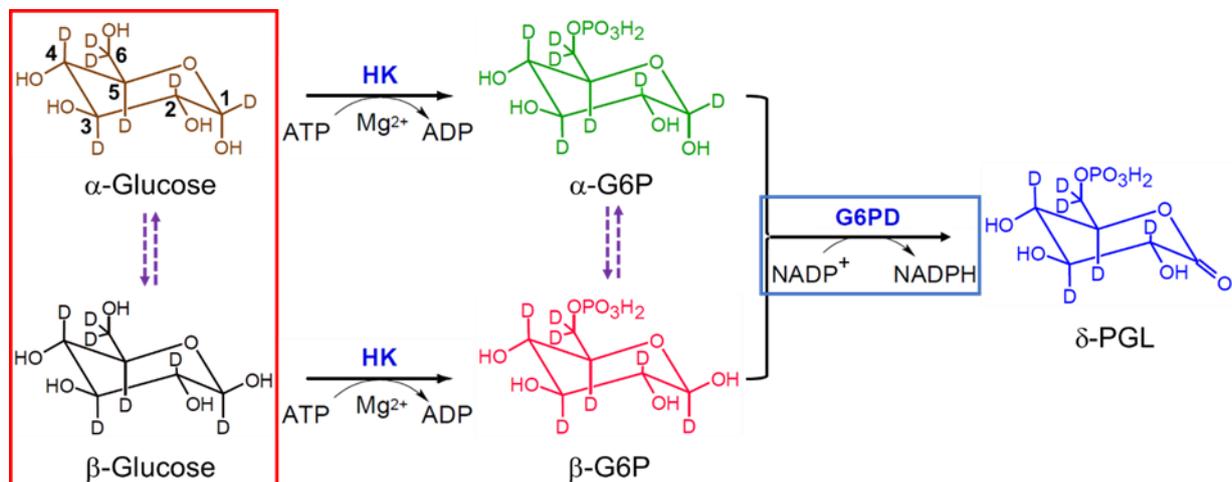


Figure 20 : Représentation de la cascade enzymatique utilisée pour étudier la cinétique de la G6PD. Le glucose, qui possède un carbone anomérique en position 1 du cycle, peut présenter deux configurations, l'anomère α (α -Gluc) et l'anomère β (β -Gluc). La constante de temps de l'isomérisation entre les anomères de glucose est de l'ordre de 120 min à $T = 293.2 \pm 0.1$ K, Figure 35, flèches violette en pointillées¹²⁷. L' α -Gluc et le β -Gluc sont tous les deux phosphorylés en deux anomères de glucose-6-phosphate, l' α -G6P et le β -G6P, via l'hexokinase (HK) et la déphosphorylation de l'ATP en ADP en présence d'un ion Mg^{2+} . Les deux anomères de G6P, l' α -G6P et le β -G6P, sont ensuite oxydés en δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) via la G6PD et la réduction d'une $NADP^+$ en $NADPH$. L'encadré rouge représente le substrat qui a été hyperpolarisé. L'encadré bleu représente l'enzyme étudiée.

Dans une première expérience, l'HK et ses co-facteurs : l'ATP et le Mg^{2+} , sont introduits en grande quantité dans le but de produire une phosphorylation très rapide (c.a. < 10 s) du

glucose en glucose-6-phosphate (G6P). De cette manière, la réaction d'oxydation du G6P en δ -PGL catalysée par la G6PD est l'étape limitante de cette chaîne de réactions enzymatiques. La cinétique de cette réaction enzymatique a pu être étudié (**Figure 20**).

Des études préliminaires ont été nécessaires pour optimiser les conditions expérimentales. Nous avons utilisé pour l'expérience de D-DNP du glucose sélectivement marqué en ^{13}C et deutéré en position anomérique [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose (le glucose et le G6P possède deux configurations en fonction de la position du deutérium sur le carbone 1 ($^{13}\text{C}_1$) : α et β). Un des avantages du marquage sélectif du $^{13}\text{C}_1$ est l'absence de couplage $^1\text{J}(\text{C}_1\text{-C}_2)$, $^2\text{J}(\text{C}_1\text{-C}_3)$ et $^3\text{J}(\text{C}_1\text{-C}_6)$ pour l'anomère β du glucose et du G6P, et $^1\text{J}(\text{C}_1\text{-C}_2)$, $^2\text{J}(\text{C}_1\text{-C}_5)$ et $^3\text{J}(\text{C}_1\text{-C}_6)$ pour l'anomère α du glucose et du G6P avec les autres carbones du cycle (**Figure 21 A et B**).¹¹⁷ Ainsi, les structures complexes des multiplets que l'on retrouve dans le glucose uniformément marqué en ^{13}C et ^2H ([U- $^{13}\text{C}_7\text{-D}_7$]-Glucose) sont simplifiés et un singulet est observé pour les $^{13}\text{C}_1$ du β -Glucose, du β -G6P, de α -Glucose et de α -G6P (**Figure 21 B et C**).¹¹⁷ Un des autres avantages du marquage sélectif du glucose en $^{13}\text{C}_1$ est l'isolement des signaux des $^{13}\text{C}_1$ de chaque métabolite impliqué dans la cascade enzymatique (**Figure 21 C**). Le marquage ^2H est destiné à ralentir la relaxation ^{13}C au cours de l'expérience, en diminuant le dipôle magnétique des partenaires d'interaction. L'augmentation du temps de relaxation longitudinale du ^{13}C nous permet d'observer pendant plus longtemps la cinétique enzymatique.

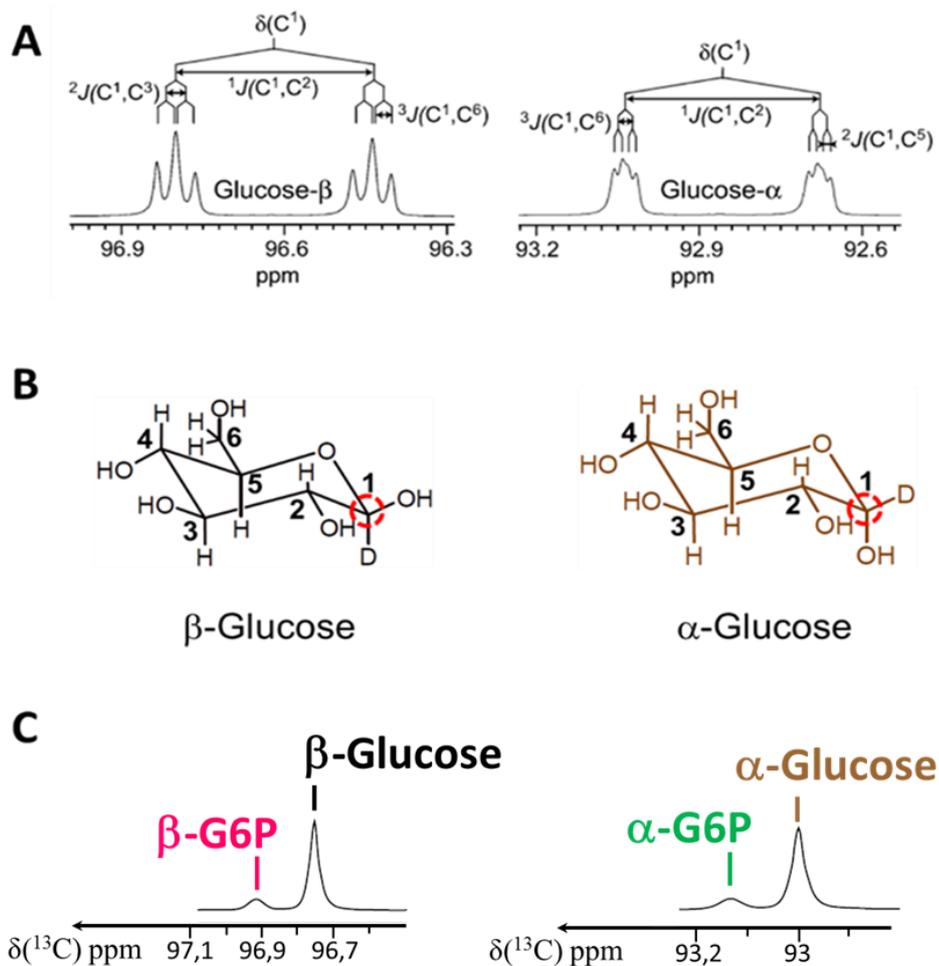


Figure 21 : A) Spectres de la région anomérique obtenus lors d'études de cinétique de l'hexokinase par D-DNP à partir du $[U-^{13}C-D_7]$ -glucose (à $B_0 = 11.75$ T et $T = 298.15$ K) dans la ref. 114. Les constantes de couplages des résonances du β -Glucose et de l' α -Glucose sont représentées. La séquence d'impulsions, utilise une excitation de 10° toutes les secondes et découple le deutérium. B) Les structures des deux anomères de $[^{13}C_1-D_1]$ -glucose sont représentées. Chaque carbone est numéroté et le carbone 1 observé sur le spectre est entouré d'un cercle rouge. C) Spectres de la région anomérique obtenus lors d'études de cinétique de l'hexokinase par D-DNP à partir du $[^{13}C_1-D_1]$ -glucose (à $B_0 = 11.75$ T et $T = 298.15$ K). La séquence d'impulsions, utilise une excitation de 10° toutes les secondes et découple le deutérium et le proton.

La première cinétique enzymatique a été réalisée avec l'HK seule pour observer l'effet d'une augmentation de la concentration des molécules sur la viscosité dans la solution réactionnelle par rapport aux expériences réalisées précédemment sur la cinétique de l'hexokinase (Figure 22).¹¹⁷ Une solution enzymatique contenant l'enzyme et des excès en co-facteurs de l'HK et la G6PD : l'ATP, le $NADP^+$, le $MgCl_2$, a été préparée et introduite dans un tube RMN (5 mm) placé dans le spectromètre de détection de champ magnétique $B_0 = 11.75$ T ($\nu_0 (^1H) = 500$ MHz, Annexe 1.1). La polarisation du $[^{13}C_1-D_1]$ -Glucose a été réalisées sur le dispositif expérimental installé à l'EPFL en raison de la mise en place d'un dispositif similaire à l'ENS. L'expérience ^{13}C -RMN a été réalisée sans découplage du proton.

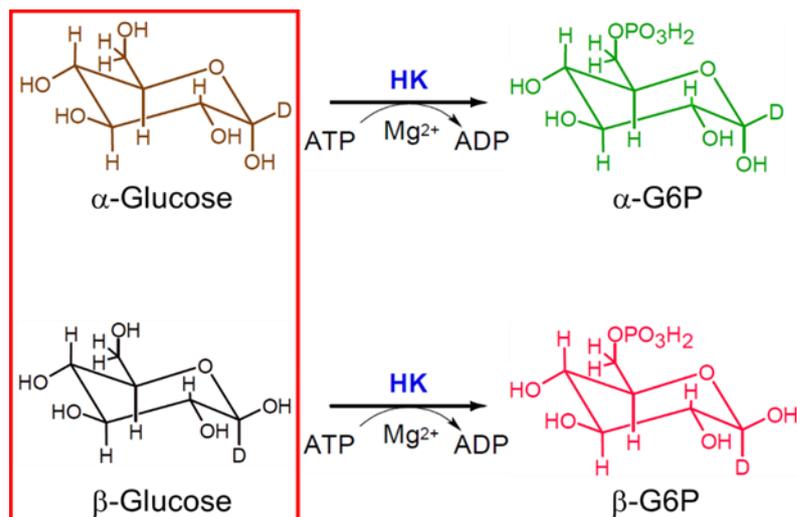


Figure 22 : Représentation de la phosphorylation des deux anomères de glucose, l' α -Glucose et le β -Glucose en deux anomères de glucose-6-phosphate (G6P), le β -G6P et l' α -G6P. Cette réaction est catalysée par l'hexokinase (HK) en présence de Mg^{2+} , à l'aide de la déphosphorylation de l'ATP en ADP.

L'expérience montre un doublet de doublet dédoublé ($^2J_{\text{CH}} = 5,25 \text{ Hz}$ $^3J_{\text{CH}} = 2,55 \text{ Hz}$ et $1,2 \text{ Hz}$) à $94,92 \text{ ppm}$ et un singulet très large à $91,15 \text{ ppm}$, avec une largeur de raie à mi-hauteur de $6,36 \text{ Hz}$ ($0,05 \text{ ppm}$) (Figure 23). Sachant qu'en début d'expérience les intensités les plus grandes correspondent au substrat de l'enzyme, la fréquence de résonance de ces deux signaux est attribuée respectivement aux déplacements chimiques du β -Glucose et de l' α -Glucose. La largeur de raie trop importante de l' α -Glucose et du β -Glucose, nous empêche d'observer les signaux correspondant aux deux anomères de G6P et de constater si la phosphorylation du glucose en G6P s'est produite. Cependant, les intensités du Glucose semblent décroître tout le long de l'expérience en fonction de leurs temps de relaxation uniquement). Ces résultats semblent indiquer que la phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate n'a pas eu lieu.

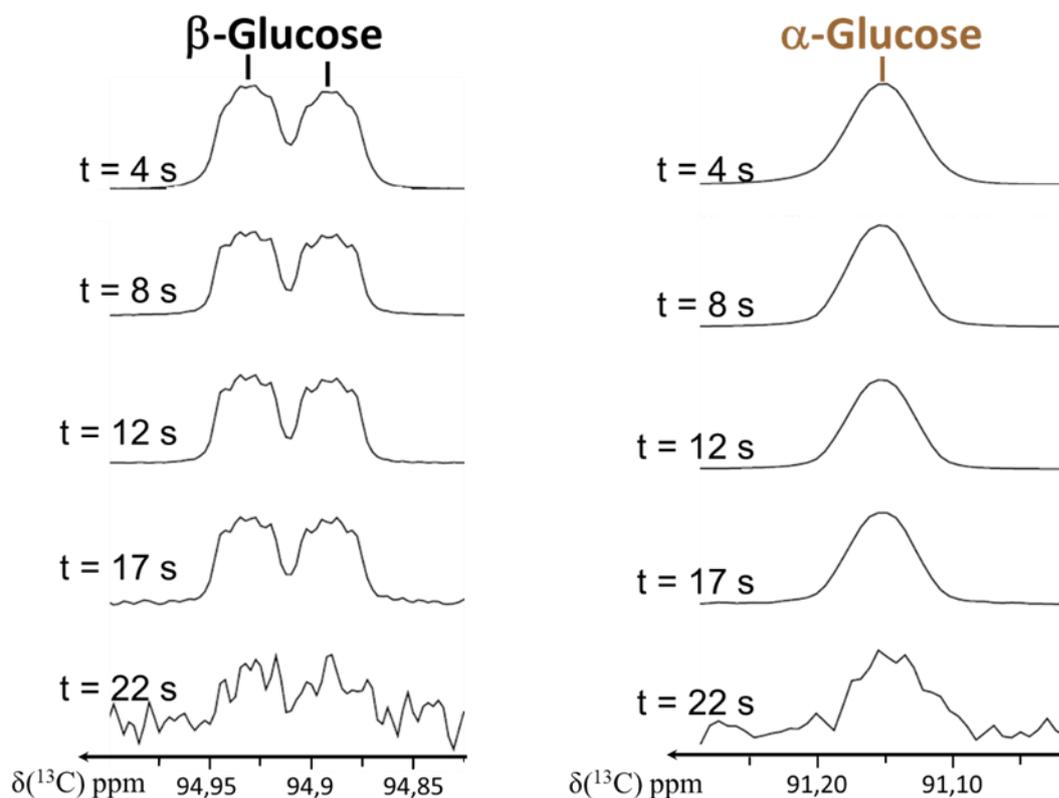


Figure 23 : Spectres obtenus au cours de la réaction enzymatique observée après dissolution du [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose hyperpolarisé. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps. Spectres obtenus au cours de l'observation de la chaîne de réactions enzymatiques réalisée à partir de [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose hyperpolarisé. La durée de l'injection du [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose hyperpolarisé dure 3 s. Cette succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites à $t = 4$ s, $t = 8$ s, $t = 12$ s, $t = 17$ s et $t = 22$ s après le début de l'injection.

Lorsque nous avons retiré l'échantillon du spectromètre après l'expérience, deux phases distinctes ont été observées dans le tube RMN. L'injection de la solution hyperpolarisée s'effectuant par le haut du tube et la solution contenant l'ensemble du matériel nécessaire pour la réalisation de la cinétique enzymatique étant plus dense ($400 \mu\text{L}$ à pH 7,0 composée de 137 mM ATP, 137 mM NADP^+ , 19 mM Tris, 137 mM MgCl_2 , 35 mM DCl, 253 mM NaOH, 114 μM HK) que celle contenant le sucre hyperpolarisé ($450 \mu\text{L}$ d'une solution à 5 mM de [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose), nous pouvons supposer que la solution hyperpolarisée se situe au-dessus de la solution enzymatique. La position de la bobine étant située entre les deux phases et la forte intensité des signaux du glucose semblent montrer que le spectromètre détecte uniquement le glucose issu de la phase supérieure qui ne se mélange pas à la solution réactionnelle (Figure 24). Les résultats suggèrent un problème de mélange entre la solution hyperpolarisée et la solution contenant l'enzyme. Dans ces conditions, nous pouvons dire que la phosphorylation ne s'est pas produite.

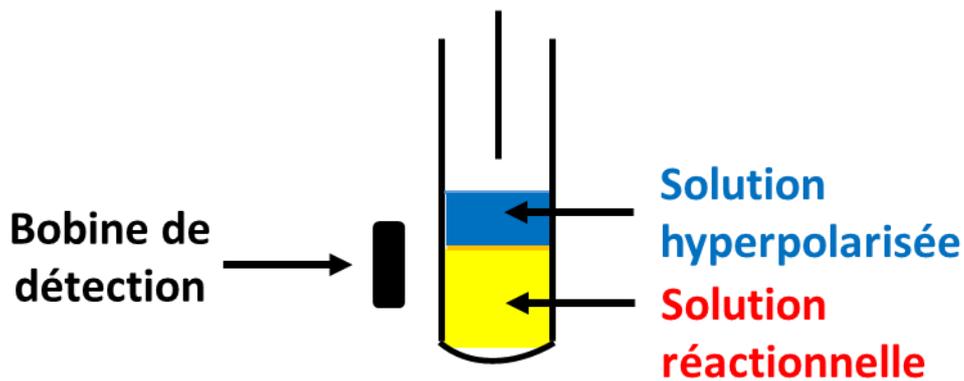


Figure 24 : Représentation des deux phases obtenues après l'injection de la solution hyperpolarisée contenant le $[^{13}\text{C}_1\text{-D}_1]$ -Glucose dans la solution réactionnelle contenant l'hexokinase, les co-facteurs, d'ATP, Mg^{2+} et de NADP^+ et le tampon phosphate.

Ce problème d'homogénéisation des deux solutions a été confirmé de manière simple, en injectant de l'eau non hyperpolarisé dans un tube RMN contenant une solution aqueuse composé de sucre et de colorant. Lors de l'injection, le liquide est clairement repoussé vers le haut et seule la partie supérieure de la solution de colorant apparaît légèrement diluée. Pour une meilleure miscibilité des deux solutions lors de l'injection, le mélange des deux phases est obtenu mécaniquement par agitation à l'aide de l'aiguille d'injection. Pour réduire le temps de mélange post-injection, un capillaire plus long a été inséré au bout de l'aiguille.

Grâce à la mise en place d'un capillaire plus long, nous avons retenté l'expérience en présence seulement de l'HK (Annexe 1.2). Nous avons également mis en place une séquence de découplage proton pendant l'acquisition du signal, de façon à observer uniquement le signal du carbone marqué sans découplage lié au proton et réduire les largeurs de raies.

Dans cette expérience, les deux anomères de glucose apparaissent aux déplacements chimiques attendus, respectivement à 93,00 ppm et 96,77 ppm pour l' α -Gluc et le β -Gluc (Figure 25). Le produit de la phosphorylation, le glucose-6-phosphate (G6P) apparaît à $t = 2$ s après le début de l'injection. Chaque anomère de G6P apparaît respectivement à environ 0,16 ppm vers les hautes fréquences de leurs anomères de glucose respectifs. Ainsi, le signal de l' α -G6P et du β -G6P apparaissent respectivement à 93,13 ppm et à 96,92 ppm. L'intensité relative des deux anomères de G6P reste toujours faible par rapport à celles des deux anomères de glucose. Le spectre thermique montre uniquement les singulets de l' α -G6P et du β -G6P (Figure 26). Ces résultats montrent que, dans ces conditions, la vitesse de phosphorylation est lente comparée à celle attendue (avec 187 ± 10 U d'HK, nous nous attendions à consommer 5 mM de glucose en 1,47 s). Malgré l'injection de la solution

hyperpolarisée contenant le substrat de l'enzyme dans le fond du tube pour une meilleure homogénéisation, la viscosité semble continuer d'inhiber la réaction.

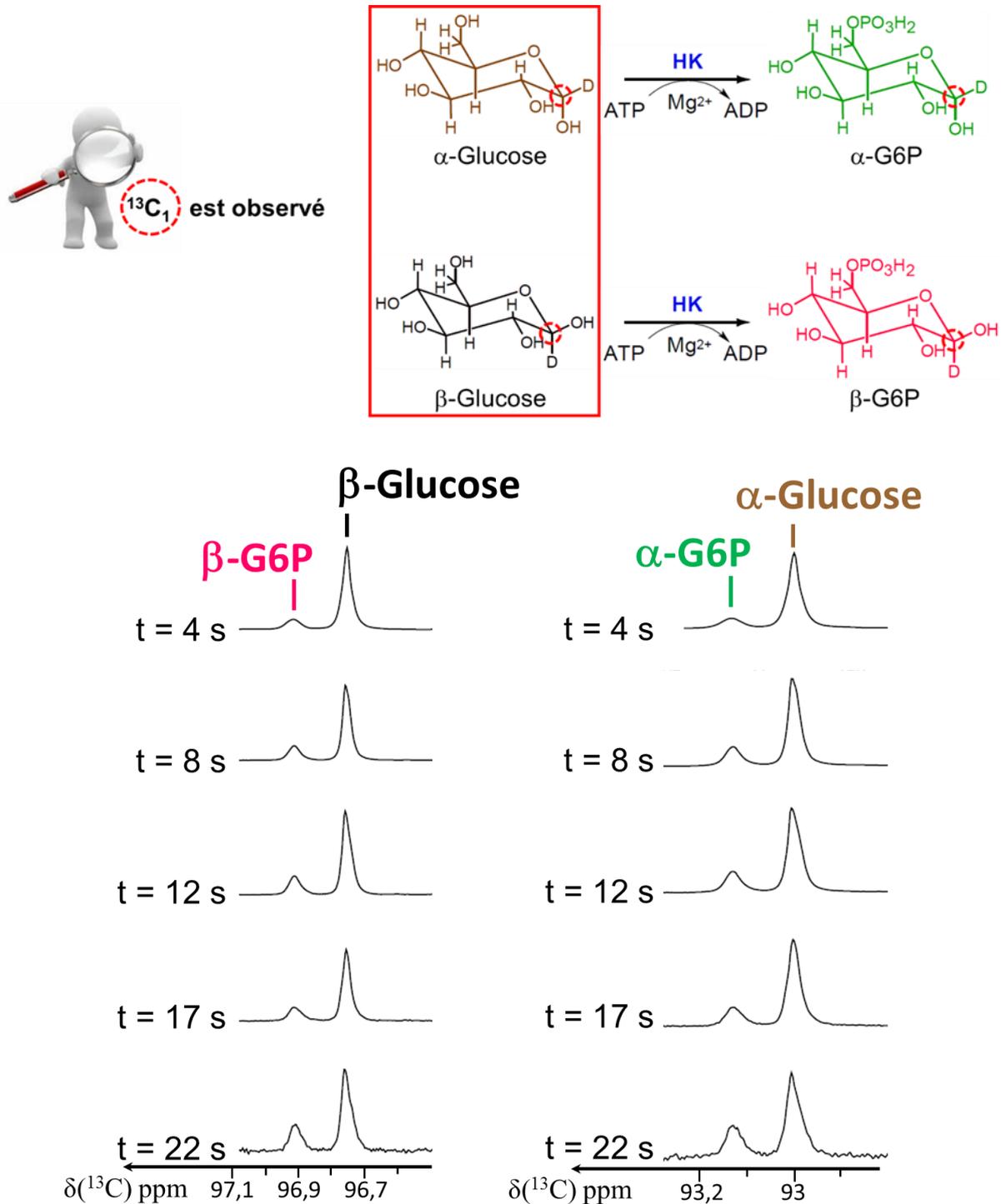


Figure 25 : Spectres obtenus au cours de la réaction enzymatique observée après dissolution du $[^{13}\text{C}_1\text{-D}_1]$ -Glucose hyperpolarisé. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps à t = 4 s, t = 8 s, t = 12 s, t = 17 s et t = 22 s après le début de l'injection. Au-dessus des spectres, la cascade enzymatique est représentée. L'encadré rouge montre le substrat qui a été hyperpolarisé avant son injection dans le tube contenant l'enzyme, l'HK ainsi que les co-facteurs (ATP, Mg^{2+} et le NADP^+). Le site $^{13}\text{C}_1$ des métabolites impliqués dans cette cascade enzymatique a été entouré par un cercle rouge.

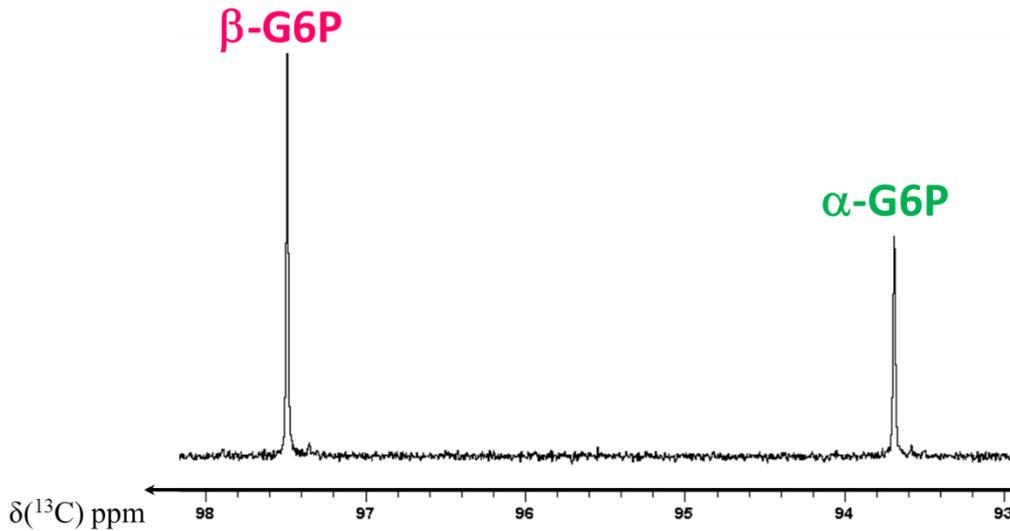


Figure 26 : Agrandissement du spectre thermique obtenu après l'expérience de D-DNP (Figure 26) sur la région anomérique du G6P. Le deutérium ainsi que le proton ont été découplé pendant l'acquisition. Spectre calibré en fonction de la Figure 26.

Une autre expérience a été réalisée en ajoutant la G6PD dans le même milieu réactionnel que précédemment. L'activité d'HK a été augmentée par un facteur 2 par rapport à l'expérience précédente dans le but d'augmenter la cinétique de phosphorylation malgré la viscosité de la solution enzymatique (Figure 27, annexe 1.3). Le $[^{13}\text{C}_1\text{-D}_1]$ -Glucose a de nouveau été hyperpolarisé.

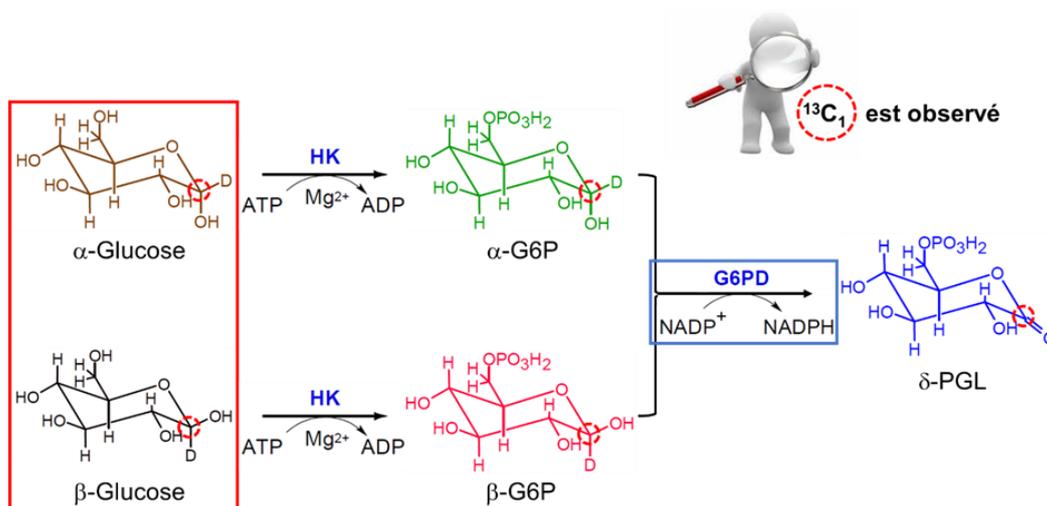


Figure 27 : Représentation de la cascade enzymatique réalisée pour étudier la première enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphate, la G6PD (encadré bleu). Le glucose, qui possède un carbone anomérique en position 1 du cycle, possède deux configurations, l'anomère α (α -Gluc) et l'anomère β (β -Gluc). L' α -Gluc et le β -Gluc sont tous les deux phosphorylés en deux anomères de glucose-6-phosphate, l' α -G6P et le β -G6P, via l'hexokinase (HK) et la déphosphorylation de l'ATP en ADP en présence d'un ion Mg^{2+} . Le substrat de la G6PD, le G6P, est ainsi produit. Les deux anomères de G6P, l' α -G6P et le β -G6P, sont ensuite oxydés en une δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) via la G6PD et la réduction d'une NADP^+ en NADPH . Le cercle rouge met en évidence le carbone 1 qui sert de sonde pour observer l'ensemble des métabolites au cours de la cascade enzymatique. L'encadré rouge représente le substrat qui a été hyperpolarisé.

Dans cette expérience, les deux anomères de glucose apparaissent aux déplacements chimiques attendus, respectivement à 93,14 ppm et 96,75 ppm pour l' α -Gluc et le β -Gluc. Le produit de la phosphorylation, le glucose-6-phosphate (G6P) apparaît à $t = 2$ s après le début de l'injection (**Figure 28**). Le signal de l' α -Glucose disparaît plus rapidement que le signal du β -G6P. L' α -G6P et le β -G6P apparaissent de nouveau à environs 0,16 ppm vers les hautes fréquences de leurs anomères de glucose respectifs. Ainsi, le signal de l' α -G6P et du β -G6P apparaissent respectivement à 93,08 ppm et à 96,88 ppm. Le signal du produit de la cascade enzymatique, la δ -PGL, apparaît à 175,2 ppm à $t = 3$ s après le début de l'injection.

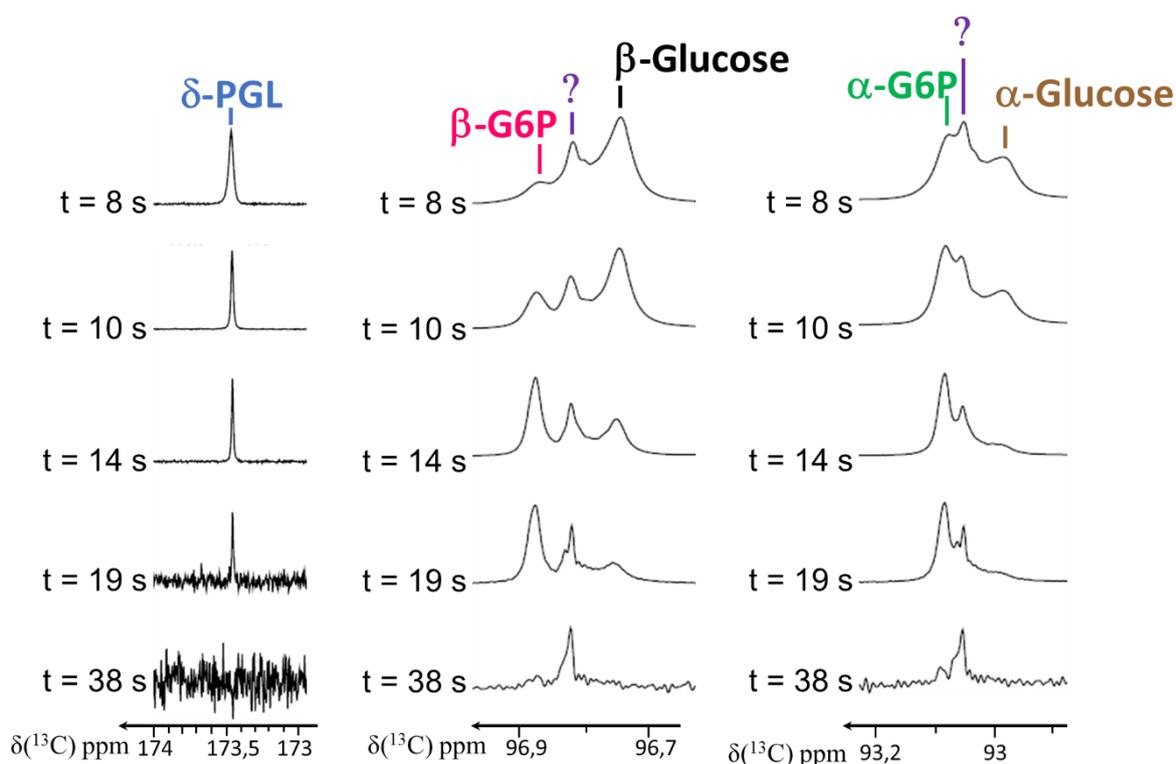


Figure 28 : Spectres obtenus au cours de la réaction enzymatique observée après dissolution du [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose hyperpolarisé. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps à $t = 4$ s, $t = 8$ s, $t = 12$ s, $t = 17$ s et $t = 22$ s après le début de l'injection. Spectres calibrés sur la δ -PGL.

Toutefois, deux signaux apparaissent entre les signaux du β -G6P et du β -Glucose et entre les signaux de l' α -G6P et de l' α -Glucose, respectivement à 94,85 et à 91,12 ppm. Ces pics restent présents tout le long de l'expérience même après la disparition des signaux de l' α -G6P et du β -G6P. Le spectre thermique montre uniquement deux singulets à 95,53 ppm et 91,70 ppm dans la région correspondant aux anomères de G6P (**Figure 29**). Ces résultats montrent que le signal supplémentaire qui possède également deux anomères est finalement

métabolisé. Nous supposons que ce signal correspond à du glucose libre qui ne peut être métabolisé rapidement à cause de la viscosité.

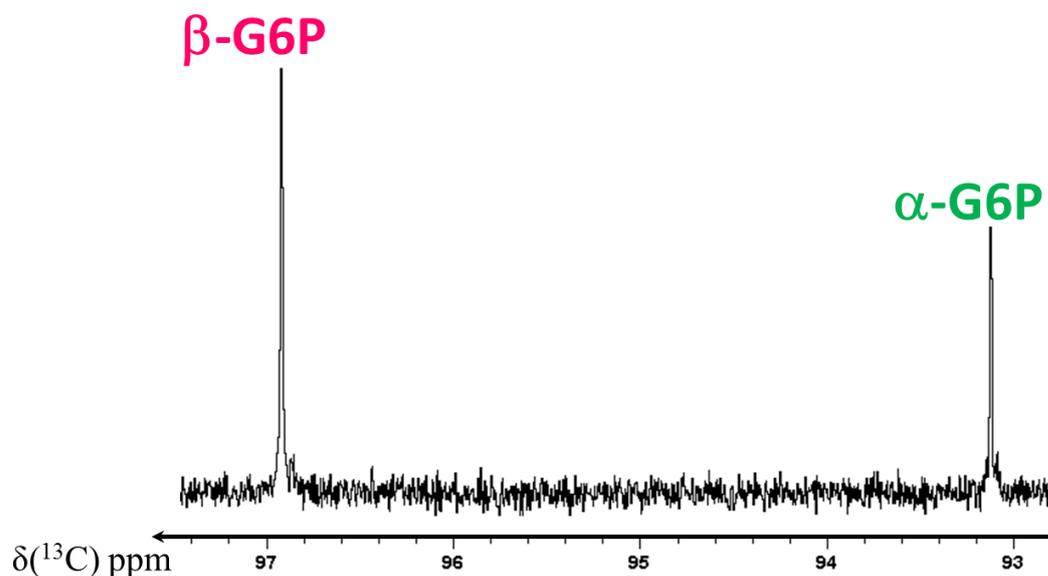


Figure 29 : Agrandissement du spectre thermique obtenu après l'expérience de D-DNP (Figure 28) sur la région anomérique du G6P. Spectre calibré selon la figure 28.

Dans ces conditions d'inhomogénéité, l'étude quantitative précise de la G6PD s'est avérée impossible. Dans le but de réduire la viscosité de la solution enzymatique deux stratégies ont été mises en place. La première a été de diluer la solution enzymatique pour réduire les concentrations en co-facteurs. Les expériences ont donc été réalisées dans un tube RMN de 10 mm de diamètre, passage d'un volume de solution réactionnelle de 400 μ L à 2 mL, dans le but d'améliorer la miscibilité des deux solutions. La deuxième stratégie proposée a été de s'affranchir de l'étape de phosphorylation qui permet de produire le substrat de la G6PD. Ainsi, l'hexokinase, le $MgCl_2$ et l'ATP sont éliminés de la solution enzymatique et seule la G6PD et son co-facteur, le $NADP^+$, seront présents dans la solution réactionnelle. Ces deux stratégies seront présentées dans la suite de ce chapitre.

3.2 Etude de la G6PDH dans un tube de 10 mm de diamètre :

Après avoir acquis un prototype d'instrumentation de D-DNP (Octobre 2015), nous avons pu réaliser les premières études cinétiques de la G6PD dans un tube de 10 mm de diamètre. Le volume initial de la solution enzymatique que l'on introduit dans le spectromètre est donc 5 fois plus important (le volume initial était de 400 μL dans le tube de 5 mm et le volume initial dans le tube de 10 mm est de 2 mL). Les concentrations en co-facteurs sont donc réduites d'un facteur 4 par rapport aux expériences préliminaires réalisées dans un tube RMN de 5 mm.

Les expériences ont été réalisées en associant deux enzymes, l'HK et la G6PD, en présence d'excès de co-facteurs à l'aide d'un spectromètre à 9,4 T ($\nu_0(^1\text{H}) = 400 \text{ MHz}$) (annexe 2.1 ; **Figure 30**). La concentration du substrat à polariser a donc été diminuée par un facteur 9 pour que la variation des concentrations en co-facteurs n'influence pas les cinétiques des enzymes. Pour débiter ces expériences sur le prototype D-DNP acquis, nous avons préféré d'hyperpolariser du glucose uniformément marqué ($[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$) en raison de son bas prix par rapport au glucose sélectivement marqué en ^{13}C et ^2H sur le carbone anomérique ($[\text{C}_1\text{-D}_1]\text{-Glucose}$). Suite aux résultats des expériences préliminaires en 3.1, un capillaire plongeant au fond du tube RMN a été utilisé pour permettre une meilleure homogénéisation du mélange réactionnel lors de l'injection de la solution hyperpolarisée.

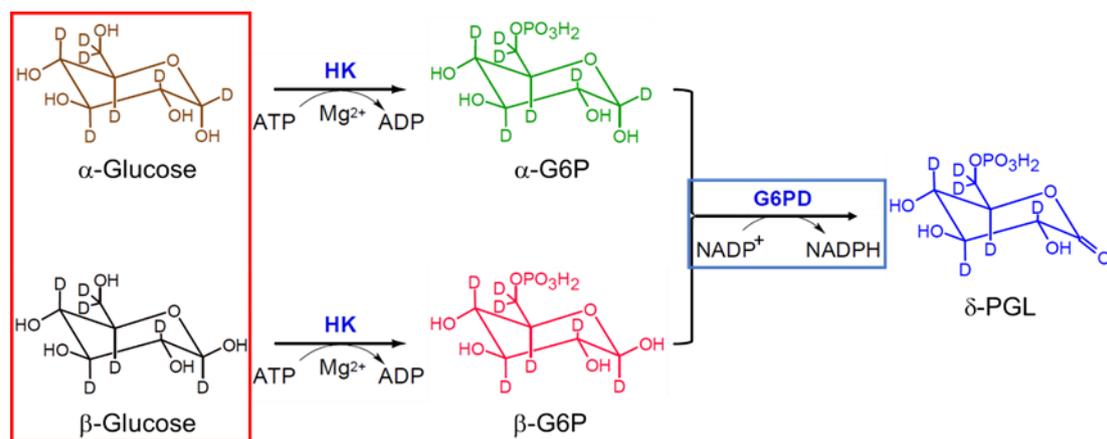


Figure 30 : Représentation de la cascade enzymatique réalisée pour étudier la première enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphate, la G6PD (encadré bleu). Le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate à l'aide de l'hexokinase (HK) et la déphosphorylation de l'ATP en ADP en présence d'un ion Mg^{2+} .. Le G6P est ensuite oxydé en une δ -6-phosphogluconolactone ($\delta\text{-PGL}$) via la G6PD et la réduction d'un équivalent de NADP^+ en NADPH . L'encadré rouge représente le substrat qui a été hyperpolarisé.

Dans de précédentes études réalisées dans un champ $B_0 = 11,75 \text{ T}$ ($\nu_0(^1\text{H}) = 500 \text{ MHz}$), les signaux des anomères du glucose et de G6P sont des doublets de triplet pour l'anomère β

et des doublet de doublet de doublet pour l'anomère α avec 3 constantes de couplages : $^1J(C_1-C_2)$, $^2J(C_1-C_3)$ et $^3J(C_1-C_6)$ pour l'anomère β du glucose et du G6P, et $^1J(C_1-C_2)$, $^3J(C_1-C_6)$ et $^2J(C_1-C_5)$ pour l'anomère α du glucose et du G6P (Figure 31 A et B).¹¹⁷ Dans nos expériences, les spectres montrent que ces multiplets ne sont pas résolus dans notre tube RMN utilisé (10 mm) dans un champ $B_0 = 9,4$ T ($\nu_0(^1H) = 400$ MHz) et ce, malgré l'application d'un découplage deutérium pendant l'acquisition. Seules les constantes de couplages $^1J(C_1-C_2)$ du β -Gluc, du β -G6P, de l' α -Gluc et de l' α -G6P sont observées (Figure 31 C). Cette mauvaise résolution spectrale est due à l'augmentation du diamètre du tube RMN (qui fait qu'une bonne homogénéité du champ magnétique à l'intérieur du tube est plus difficile à réaliser). Les raies sont donc plus larges et les multiplets ne sont pas résolus (Figure 31).

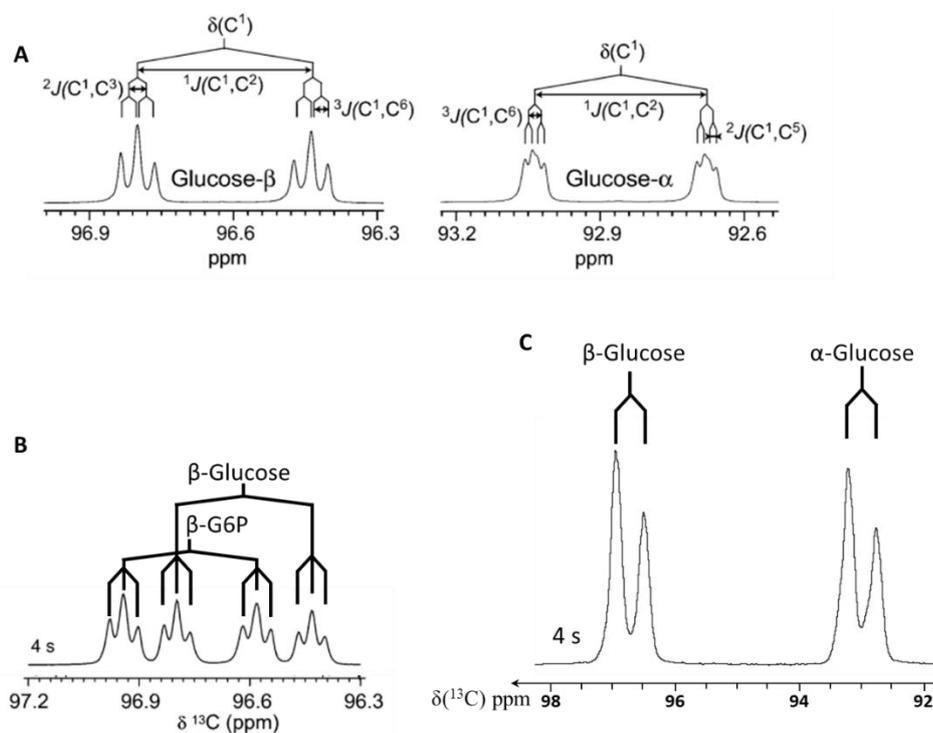


Figure 31 : A) Agrandissement d'un spectre ^{13}C entre 96,33 ppm et 96,9 ppm (à gauche) et entre 92,6 ppm et 93,2 ppm (à gauche) obtenu lors de l'étude cinétique de l'hexokinase par D-DNP (à $B_0 = 11.75$ T et $T = 298.15$ K) dans un tube 5 mm de la ref. 114. Ces deux agrandissements correspondent aux fréquences de résonances des carbones anomériques du glucose. L'arbre de couplages des résonances du β -Glucose et de l' α -Glucose sont représentées. B) Agrandissement d'un spectre ^{13}C entre 96,33 ppm et 97,2 ppm à $t = 4$ s au cours de la phosphorylation du glucose en G6P. C) Agrandissement de la région anomérique d'un spectre ^{13}C observé au cours de la cinétique enzymatique à $t = 4$ s après l'injection du glucose à $B_0 = 9.4$ T et $T = 310.15$ K dans un tube RMN de 10 mm. Seul le couplage $^1J(C_1-C_2)$ est résolu, les couplages 2J et 3J observés précédemment ne sont plus observables.

Dès l'injection, les deux anomères de glucose apparaissent aux déplacements chimiques attendus, respectivement à 92,9 ppm et 96,6 ppm pour le α -Gluc et β -Gluc (Figure 32). Les deux signaux de l' α -Gluc et du β -Gluc diminuent au cours du temps du fait de leurs

transformations respectives en α -G6P et en β -G6P et de la relaxation spin-réseau. A partir de 5 secondes, les signaux des deux anomères de G6P apparaissent distinctement à $\sim 0,2$ ppm vers les hautes fréquences de leurs anomères respectifs de glucose. Malgré le manque de résolution, nous observons distinctement l'évolution des deux anomères de G6P par rapport aux deux anomères du glucose au cours du temps.

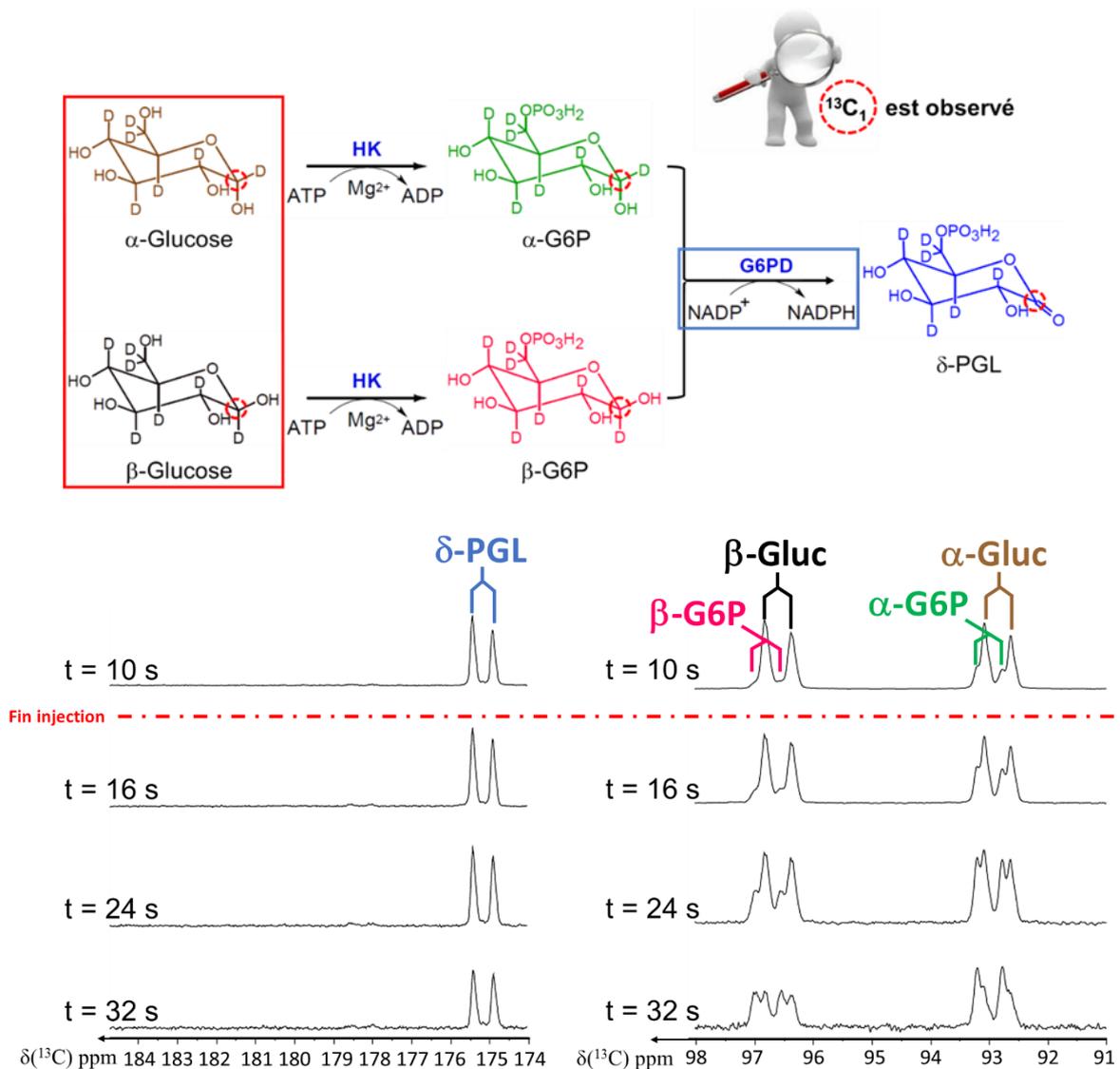


Figure 32 : Spectres obtenus au cours de la chaîne de réactions enzymatiques observée après dissolution du $[U-^{13}C-D_7]$ -Glucose hyperpolarisé. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}C_1$ des différents métabolites obtenus au temps à $t = 10$ s, $t = 16$ s, $t = 24$ s et $t = 32$ s après le début de l'injection. La durée de l'injection du $[U-^{13}C-D_7]$ -Glucose hyperpolarisé a été de 10 s (le trait en rouge montre la séparation entre les spectres obtenus pendant l'injection et les spectres obtenus après l'injection). Au-dessus des spectres, la cascade enzymatique est représentée. L'encadré rouge montre le substrat qui a été hyperpolarisé avant son injection dans le tube contenant les enzymes (HK et la G6PD) ainsi que leur co-facteur (ATP, Mg^{2+} et le $NADP^+$). Le site $^{13}C_1$ des métabolites impliqués dans cette cascade enzymatique provenant du $^{13}C_1$ du glucose a été entouré par un cercle rouge. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la δ -PGL.

L'intensité du pic de résonance du β -G6P par rapport à celui du β -Gluc augmente faiblement, restant toujours plus faible que ce dernier. A l'inverse, l'intensité du pic de résonance de l' α -G6P ne cesse d'augmenter par rapport à celui du β -G6P. Son intensité devient supérieure à celle de l' α -Glucose à partir de $t = 32$ s, malgré la relaxation spin-réseau. Les temps de relaxation longitudinale entre le β -G6P et l' α -G6P étant similaires ($T_{1,\beta\text{-G6P}} = 2,83$ s et $T_{1,\alpha\text{-G6P}} = 2,55$ s valeurs obtenues après l'étude cinétique de la phosphorylation du glucose en G6P de la référence ¹¹⁷), l'évolution des intensités relatives de ces métabolites montre que leurs vitesses d'oxydation sont très différentes. Ainsi, l'oxydation de β -G6P semble plus rapide que celle de l'anomère α du G6P. La cinétique de la phosphorylation ne semble pas être la cause de la faible production du G6P à cause de la similarité des intensités des signaux du glucose au cours du temps.

L'apparition du signal du produit final de la cascade enzymatique, la δ -PGL, est observée à 175,2 ppm dès la 4^{ème} seconde après l'injection. Au cours du temps, le signal de la δ -PGL, apparaît en raison de sa production puis il décroît sous l'effet de sa constante de relaxation longitudinale, $R_{1,\delta\text{-PGL}}$. L'analyse quantitative fine de ces cinétiques enzymatiques est présentée dans la suite de ce manuscrit (Chapitre 3.2.2).

Afin de confirmer la différence de vitesses d'oxydation des deux anomères de G6P observée qualitativement (différence d'activité de la G6PD vis-à-vis de l' α -G6P et le β -G6P), nous avons réalisé une nouvelle expérience. Les activités enzymatiques (donc les quantités des deux enzymes) de l'HK et de la G6PD ont été modifiées dans le but d'observer une différence d'oxydation des deux anomères du G6P, dans des conditions où la vitesse de transformation de la totalité du Glucose en du G6P se réalise en quelques secondes (**Figure 33**, annexe 2.2). La quantité d'HK a donc été augmenté à 618 ± 10 U (au lieu de 412 ± 10 U, 1 U correspond à 1 μ moles de glucose transformé par min). Nous avons également diminué la quantité de la G6PD 321 ± 23 U (au lieu de 458 ± 23 U) pour observer plus facilement la différence d'oxydation des deux anomères de G6P.

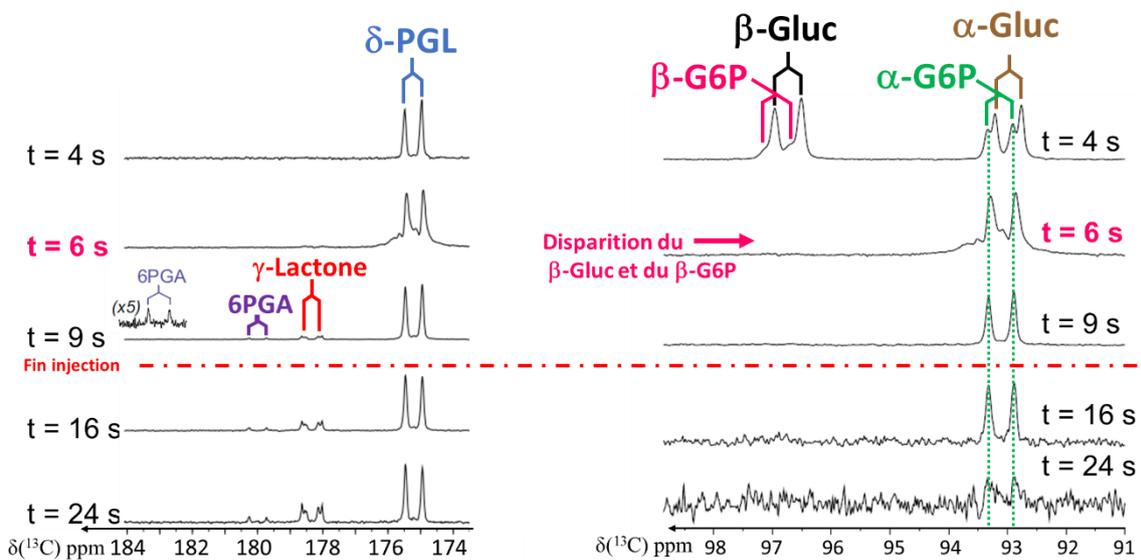
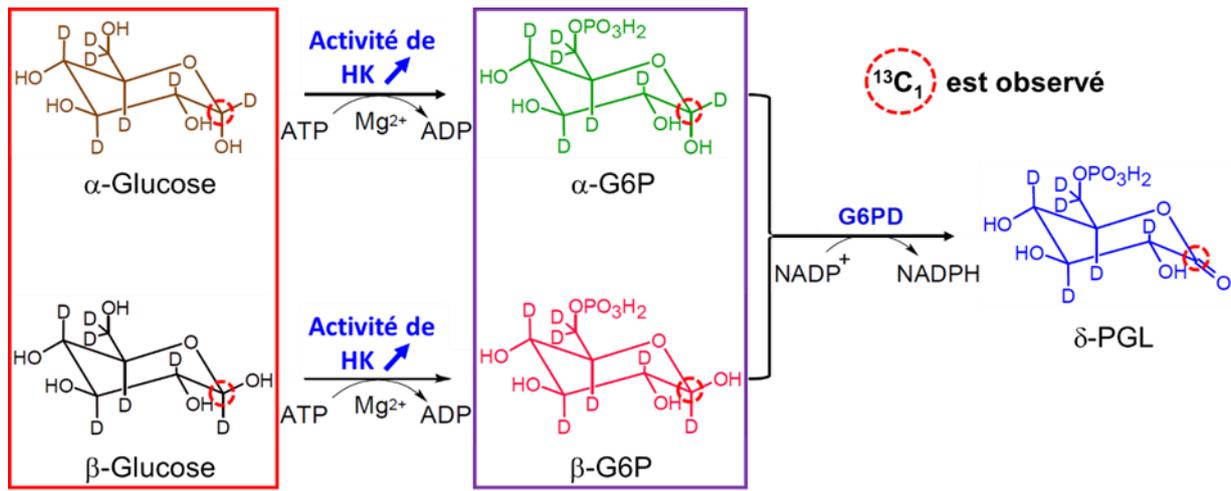


Figure 33 : Spectres obtenus au cours de la chaîne de réactions enzymatiques observée après dissolution du $^{13}\text{C}\text{-D}_7\text{-Glucose}$ hyperpolarisé (encadré rouge). Au-dessus des spectres, la cascade enzymatique correspondant à l'expérience observée est représentée. L'ensemble des spectres ont été apodisés par une exponentielle multiple avec une valeur de LB de 5 Hz. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites (cercle rouge sur le schéma représentant la cascade enzymatique) obtenus au cours du temps à $t = 4$ s, $t = 6$ s, $t = 9$ s, $t = 16$ s et $t = 24$ s après le début de l'injection. La durée de l'injection puis de l'homogénéisation du $[\text{U-}^{13}\text{C}\text{-D}_7]\text{-Glucose}$ hyperpolarisé est estimée à 10 s (le trait en rouge montre la séparation entre les spectres obtenus pendant l'injection et les spectres obtenus après l'injection. Seuls les spectres obtenus après le trait rouge ont été analysés quantitativement). La flèche rose montre l'absence du signal du $\beta\text{-Glucose}$ et $\beta\text{-G6P}$ à $t = 6$ s. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la $\delta\text{-PGL}$.

Dans cette expérience, l'anomère β du glucose est totalement phosphorylé à la 6^{ème} seconde (disparition de sa résonance), tandis que l'anomère α du glucose est totalement transformé à la 9^{ème} seconde. Le signal du $\beta\text{-G6P}$ (96,9 ppm) disparaît nettement dès la 6^{ème} seconde apr s le début de l'injection (**Figure 33**). Seul le $\alpha\text{-G6P}$, à 93,1 ppm, persiste tout au long de l'expérience et semble diminuer au cours du temps avec sa constante de vitesse de relaxation longitudinale, $R_{1, \alpha \text{ G6P}} = 1 / T_{1, \alpha \text{ G6P}}$ (**Figure 33**). Le produit de la cascade, la $\delta\text{-PGL}$.

phosphogluconolactone (δ -PGL), apparaît à 175,2 ppm dès l'injection du [U- ^{13}C -D $_7$]-Glucose dans la solution réactionnelle (Figure 33).

Ces résultats suggèrent une forte sélectivité de substrat de la G6PD pour le β -G6P, bien que nous ne puissions pas formellement éliminer, sur la base de ces expériences, une très faible activité de la G6PD sur l' α -G6P. Mais si elle existe, elle semble négligeable par rapport à l'activité du β -G6P dans la fenêtre temporelle explorée par nos expériences. Toutefois, des études ont montré que la constante de temps d'isomérisation entre les formes α et β du Glucose est de l'ordre d'environ 120 minutes (à $T = 293,2 \pm 0,1$ K, Figure 34)¹⁵⁷ et que celle entre les formes α et β du Glucose est de l'ordre d'environ 30 secondes (à $T = 293,2 \pm 0,1$ K et pH 7,5).¹⁵⁸ Cependant, les précédentes études réalisées la G6PD de levure¹⁵⁹ et sur des *Pseudomonas fluorescens*¹⁶⁰ avaient montré que cette enzyme était sélective pour le β -G6P. Salas *et al.* avaient montré que l'enzyme avait une activité résiduelle sur le glucose et une spécificité pour l'anomère β . Ces auteurs ont supposé que la sélectivité observée pour β -Gluc pouvait s'étendre au β -G6P.¹⁵⁹ L'autre étude réalisée sur une G6PD issue de *Pseudomonas fluorescens* a également montré de manière directe une sélectivité pour le β -G6P.¹⁶⁰ De plus, Nous pouvons considérer que, à l'échelle de temps de notre expérience, la δ -PGL provient uniquement du β -G6P et du β -Gluc, et la formation du signal de la δ -PGL provient uniquement de la disparition du signal de ces deux derniers métabolites (Figure 34 et Figure 35). Ainsi, nous n'avons pas tenu compte de la faible activité de la G6PD sur l' α -G6P dans l'analyse quantitative de cette cinétique (Chapitre 3.2.2).

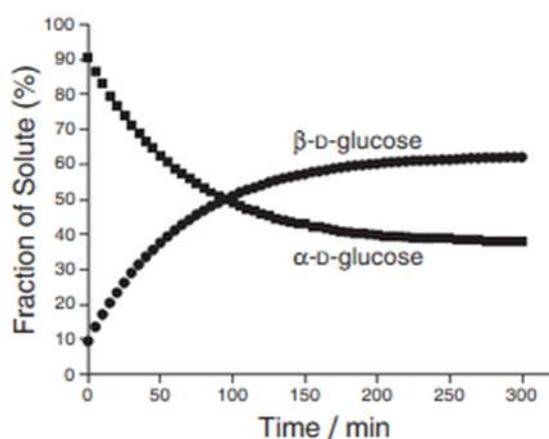


Figure 34 : Conversion de de l'anomère α -glucose en β -glucose dans une solution aqueuse à $T = 293,2 \pm 0,1$ K. ¹⁵⁷

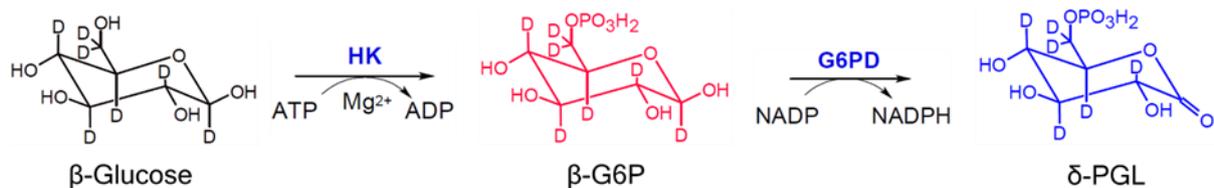


Figure 35 : Représentation simplifiée de la cascade enzymatique après observation de la sélectivité de la G6PD pour le β -G6P.

Dans la région spectrale du $^{13}C_1$ de la δ -PGL, deux nouveaux signaux sont observés à $t = 9$ s (**Figure 33**). Cette apparition se produit en même temps que la disparition complète du signal provenant du β -G6P. Les fréquences de résonances de ces deux signaux, 178,4 ppm et 180,0 ppm, correspondent à celles de la γ -6-phosphogluconolactone (γ -PGL), produit d'isomérisation de la δ -PGL, et de l'acide 6-phosphogluconate (6PGA), produit de l'hydrolyse spontanée de ces deux δ -/ γ -PGLs. Ces deux métabolites sont produits en l'absence de la 6-phosphogluconolactonase (6PGL), la deuxième enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates (**Figure 36**).⁷⁵ L'évolution de ces trois espèces : la δ -PGL, la γ -PGL et du 6PGA sous l'effet de ces réactions chimiques est clairement observée sur la succession des spectres enregistrés (**Figure 33** et **Figure 38**). L'intensité du signal de la δ -PGL étant plus importante que celle de la γ -PGL, qui est elle-même plus importante que celle de la 6PGA, ces données qualitatives semblent montrer que la vitesse d'isomérisation δ -PGL \rightarrow γ -PGL est plus rapide que les vitesses d'hydrolyse spontanées de la δ -PGL et de la γ -PGL.

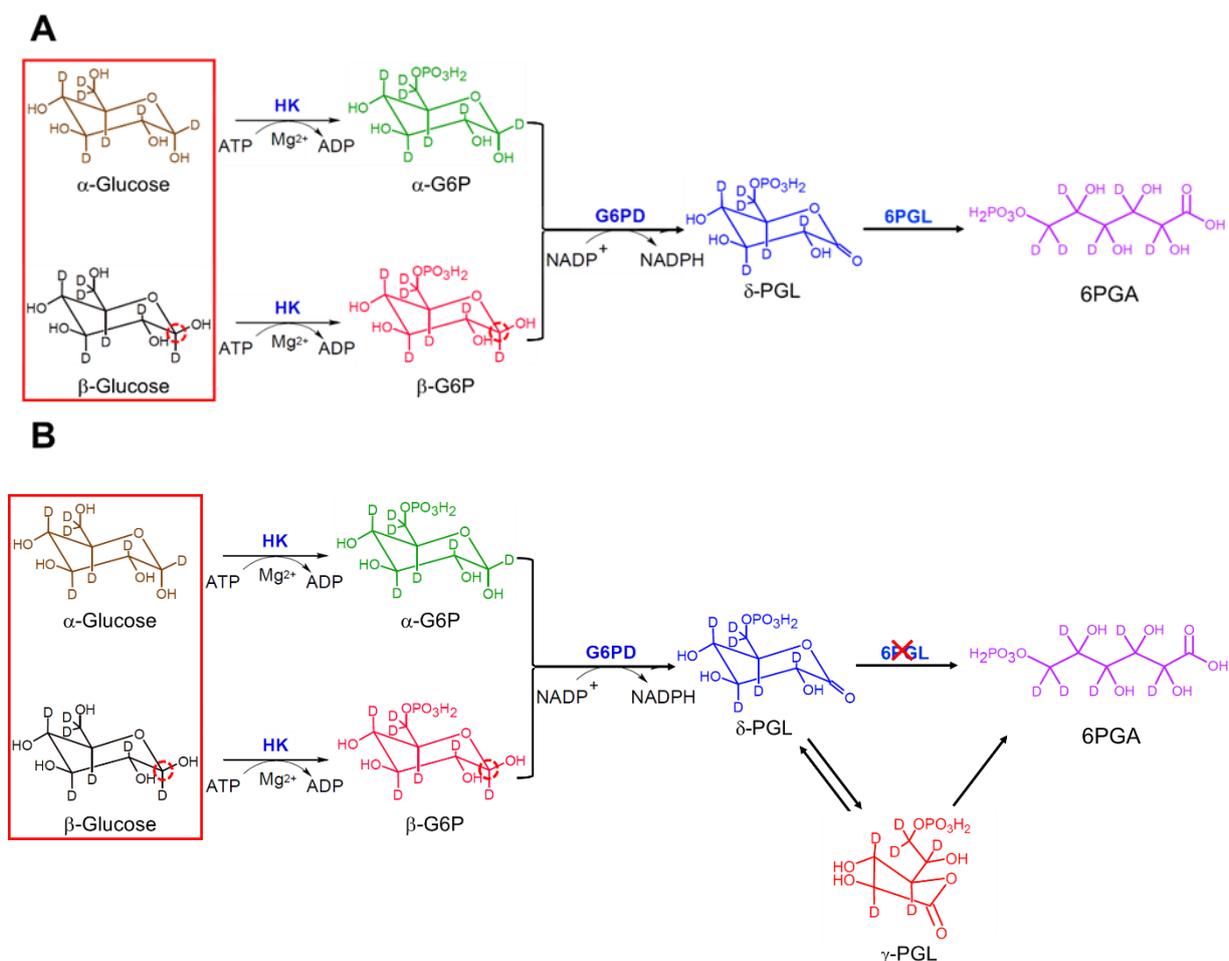


Figure 36 : Représentation des deux premières réactions de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates ; précédées par l'étape de phosphorylation du glucose. A) Les deux anomères de glucose-6-phosphate (α -G6P et β -G6P) sont ensuite oxydés en une δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) via la G6PD en présence de NADP^+ . Cette δ -PGL est ensuite hydrolysée par la 6PGL en un acide 6-phosphogluconate (6PGA). B) En absence de la 6PGL, la δ -PGL peut s'isomériser en γ -6-phosphogluconolactone (γ -PGL) qui s'hydrolyse également spontanément en 6PGA.

Ces résultats mettent donc en lumière le « cycle chimique des lactones » qui se produit en l'absence de la deuxième enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, la 6PGL (**Figure 36 et Figure 37**).

L'ensemble des expériences nous a permis, d'une part, de simplifier le schéma cinétique de la catalyse enzymatique impliquant l'HK et la G6PD (**Figure 35**) et, d'autre part, d'isoler le « cycle des lactones » indépendamment des réactions enzymatiques. L'analyse quantitative préliminaire de ces expériences sont présentées dans le paragraphe suivant.

3.2.1 Extraction des paramètres cinétiques du cycle des « lactones »

L'expérience réalisée pour observer la sélectivité de la G6PD pour l'un des deux anomères de G6P, nous a permis de modéliser et d'extraire les paramètres cinétiques de

l'isomérisation de la δ -PGL en γ -PGL et de leurs hydrolyses spontanées en acide 6-phosphogluconate (6PGA) (Figure 37).⁷⁵ Dans toutes les analyses quantitatives menées, les spectres acquis dans les 10 premières secondes ne sont pas pris en compte. Cette durée correspond à la phase d'injection et le temps d'homogénéisation de la solution polarisée dans la solution enzymatique. Une amélioration de l'injecteur a permis dans des études ultérieures de diminuer cette durée à 5 s (cf 3.4).

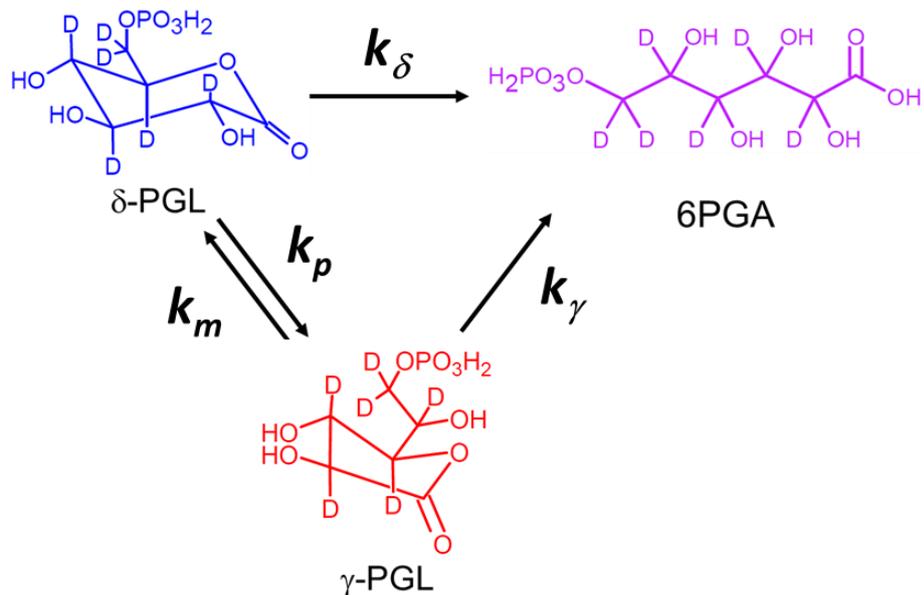


Figure 37 : Représentation des réactions chimiques observées en l'absence de la 6PGL.

Dans ce système de réaction, la δ -PGL joue le rôle de précurseur du « cycle des lactones ». L'absence de signal du β -G6P à $t = 6$ s après le début de l'injection, montre que la totalité du β -G6P est oxydé en δ -PGL. L'isomérisation de la δ -PGL en γ -PGL, ainsi que l'hydrolyse spontanée des δ/γ -PGL en 6PGA s'effectue en l'absence d'enzyme et de co-facteurs et en présence d'eau, qui est en excès par rapport aux métabolites. Nous avons donc pu modéliser ce système réactionnel par un ensemble de cinétiques de premier ordre.

Tout d'abord, les intensités relatives de chaque métabolite ont été extraites en intégrant le spectre entre 174,7 ppm et 175,8 ppm pour la δ -PGL, 177,8 ppm et 178,9 ppm pour la γ -PGL et entre 180,4 ppm et 179,6 ppm pour la 6PGA.

L'évolution de la composante longitudinale de l'aimantation portée par le $^{13}\text{C}_1$ de chaque métabolite est donnée par :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_{\delta-PGL} \\ M_{\gamma-PGL} \\ M_{6PGA} \end{pmatrix} = \mathbf{AM} \quad (11) \quad \text{avec}$$

$$\mathbf{AM} = \begin{pmatrix} -k_p - k_\delta - R_{1,\delta-PGL} & k_m & 0 \\ k_p & -k_m - k_\gamma - R_{1,\gamma-PGL} & 0 \\ k_\delta & k_\gamma & R_{1,6PGA} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_{\delta-PGL} \\ M_{\gamma-PGL} \\ M_{6PGA} \end{pmatrix}$$

Dans cette équation, $M = [M_{\delta-PGL}, M_{\gamma-PGL}, M_{6PGA}]^t$, où $M_{\delta-PGL}$, $M_{\gamma-PGL}$ et M_{6PGA} désignent respectivement les composantes z de l'aimantation de δ -PGL, γ -PGL, et 6PGA. L'effet de la relaxation est pris en compte par les constantes de relaxation longitudinale du $^{13}\text{C}_1$ de chaque molécule : $R_{1,\delta-PGL}$ pour la δ -PGL, $R_{1,\gamma-PGL}$ pour la γ -PGL, $R_{1,6PGA}$ pour la 6PGA.

Le signal $S(p\Delta t)$, correspondant à chaque espèce, observé après p impulsions d'angle θ égal à 10° est donné par :

$$S(p\Delta t) = \begin{bmatrix} S_{\delta-PGL} \\ S_{\gamma-PGL} \\ S_{6PGA} \end{bmatrix}^{p\Delta t} = \exp(Ap\Delta t) \cos^p(\theta) S(0) \quad (12)$$

avec $p\Delta t$ l'intervalle de temps entre p impulsions consécutives et $S(0) = \begin{bmatrix} S_{\delta-PGL}(t_0) \\ S_{\gamma-PGL}(t_0) \\ S_{6PGA}(t_0) \end{bmatrix}$ la valeur initiale du signal à $t_0 = 10$ s.

Dans cette description, les valeurs initiales des signaux sont également des paramètres ajustables du modèle, qui en comporte ainsi dix valeurs ajustées : 4 constantes cinétiques, 3 vitesses de relaxation longitudinales et 3 concentrations initiales. Compte-tenu du nombre relativement important de paramètres à extraire, nous avons évité les algorithmes basés sur des calculs de dérivées, qui risquent de laisser le système piégé dans un minimum local et nous avons utilisé un programme d'ajustement basé sur la méthode d'évolution différentielle.¹⁶¹ Cet algorithme permet en principe de trouver le minimum global d'une fonction cible dans le cas où le nombre de paramètres à ajuster est important.¹⁶¹

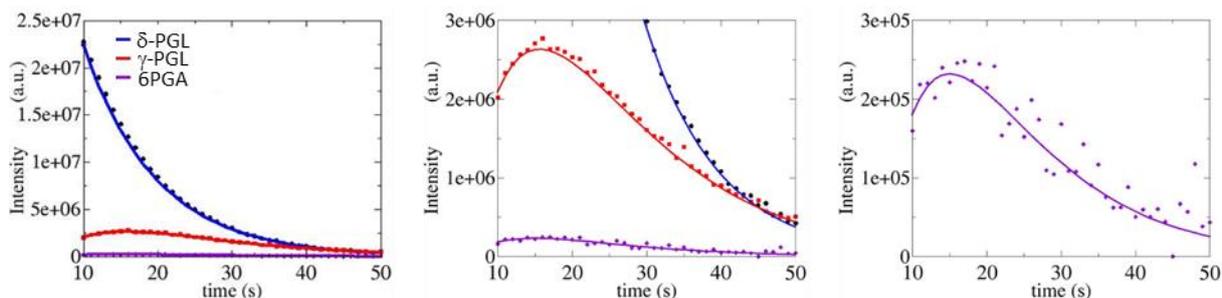


Figure 38 : Intensités des signaux et courbes de fits obtenus pour le δ -PGL (en bleu), le γ -PGL (en rouge) et le 6PGA (en violet) lors de l'isomérisation de la δ -PGL et des hydrolyses spontanées de la δ -PGL et de la γ -PGL (Figure 7) (cf tableau 4 qui incorporent l'ensemble des paramètres obtenus pour ce fit).

Le calcul de l'erreur expérimentale dans ces expériences de D-DNP reste une question relativement ouverte. En effet, dans l'approche habituelle en spectroscopie RMN, l'erreur sur les paramètres d'un modèle est calculée en faisant l'hypothèse d'une simple propagation de l'erreur expérimentale commise sur la mesure des intensités. Ceci suppose que l'erreur expérimentale est bien décrite par une variable aléatoire de distribution gaussienne. Ceci est en général admis dans le cadre de la RMN conventionnelle où c'est le bruit de la chaîne de détection du spectromètre qui est prédominant. Dans cette configuration, les outils statistiques standards permettent d'estimer l'erreur commise sur les paramètres, et la qualité de l'ajustement, typiquement avec un test du Chi2. Par ailleurs, la distribution des paramètres autour d'une valeur moyenne peut être obtenue par des simulations de type Monte Carlo, consistant à réaliser une série d'ajustement à partir des valeurs expérimentales perturbées par des valeurs aléatoires extraites d'une distribution normale centrée sur la valeur expérimentale et dont l'écart-type est donné par le bruit du spectre RMN.^{162,163}

Dans le cas des expériences hyperpolarisées, dans lesquelles le rapport signal sur bruit (S/B) peut être très élevé, la source prédominante d'erreur expérimentale ne semble plus être le bruit de détection, mais la présence d'erreurs systématiques ou d'évènements non contrôlés (e.g dérive initiale de la température, phase de mélange de la solution polarisée injectée), qui ne sont pas *a priori* modélisables par une loi normale.

Dans le cas de cette expérience, cependant, le rapport signal sur bruit pour le δ -PGL, γ -PGL et le 6PGA sont respectivement de 500, 50, et 5 à $t = 10$ s (Figure 38). Compte tenu du faible rapport signal sur bruit du signal provenant du 6PGA, nous avons considéré que l'hypothèse d'un bruit de détection comme source prédominante d'erreur expérimentale pouvait être justifiée. Nous avons ainsi décidé d'estimer l'influence de ce type d'erreur sur l'ensemble des paramètres du modèle cinétique par une simulation de type Monte-Carlo.

Mais compte-tenu des remarques ci-dessus, nous ne disposons pas de critère statistique bien établi pour évaluer la qualité de l'ajustement (Chi2). Des histogrammes regroupant les différents paramètres obtenus pour chaque Monte-Carlo permettent d'observer l'ensemble des paramètres estimés avec cette approche (Figure 39).

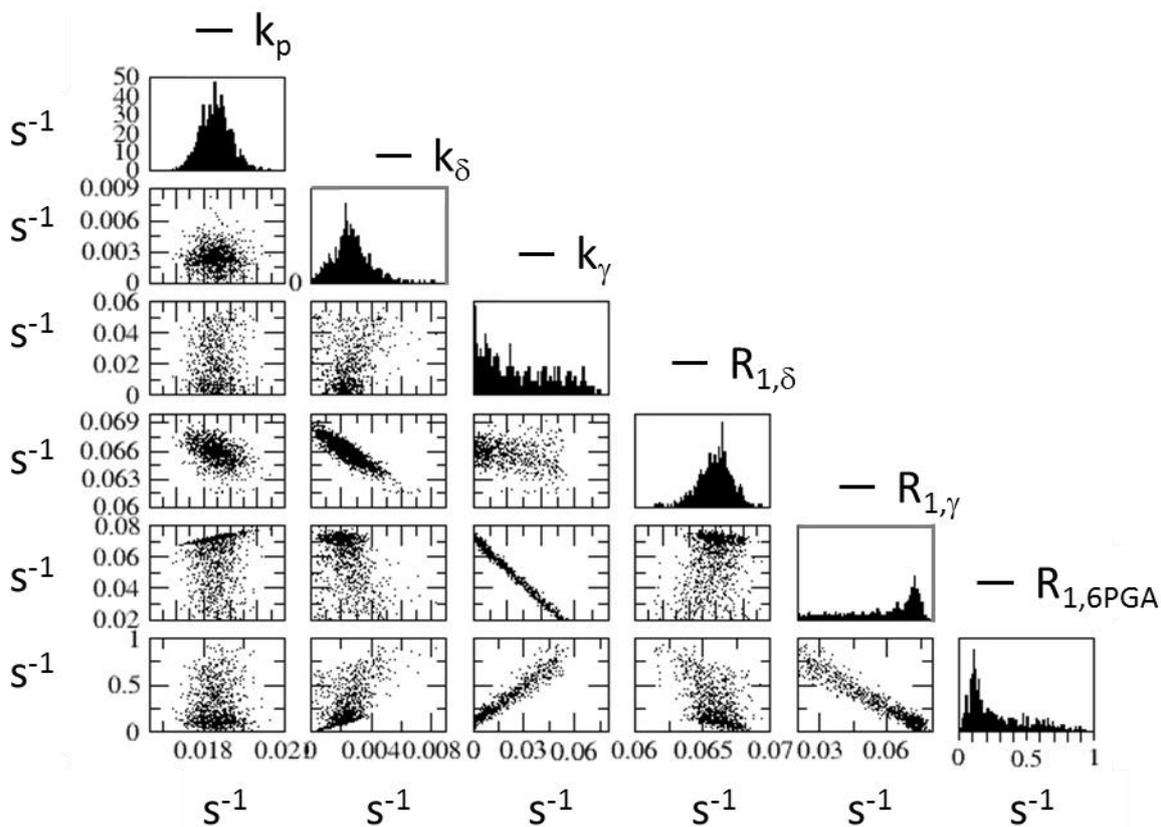


Figure 39 : Histogrammes des paramètres obtenus après 1000 essais Monte Carlo. Seules les solutions telles que $R_{1,\gamma} \geq 10^{-2} s^{-1}$ et $k_\gamma \geq 10^{-10} s^{-1}$ ont été retenues comme possibles car elles sont représentatives de la réalité. L'histogramme des valeurs obtenues pour chaque paramètre est représenté en haut de chaque colonne. Les diagrammes de corrélations entre les différents paramètres pris deux à deux sont indiqués en dessous. L'échelle de chaque graphe est en s^{-1} .

Ces histogrammes, montrent que les distributions des paramètres k_p , k_δ et $R_{1,\delta-PGL}$ sont unimodales et relativement symétriques (Figure 39). La constante k_m est, quant à elle, systématiquement proche de zéro (non reporté dans le graphe). Les distributions des paramètres k_γ , $R_{1,\gamma-PGL}$ et $R_{1,6PGA}$ sont asymétriques. Des diagrammes de corrélation entre les valeurs des différents paramètres permettent de préciser ces observations. En effet, on observe une interdépendance entre les paramètres k_γ et $R_{1,\gamma-PGL}$, entre k_γ et $R_{1,6PGA}$, entre k_δ et $R_{1,\delta-PGL}$, et entre $R_{1,\gamma-PGL}$ et $R_{1,6PGA}$. Les valeurs des paramètres k_γ , $R_{1,\gamma-PGL}$ et $R_{1,6PGA}$ obtenues pour chaque Monte Carlo sont très étalées. L'interdépendance et les valeurs étendues

obtenues pour certains paramètres montrent que le programme d'ajustement ne distingue pas facilement les constantes de relaxation des constantes cinétiques.

Pour pallier à ce problème, nous avons tenté de mieux contraindre le programme. Nous avons repris cette stratégie en utilisant la valeur expérimentale de $R_{1,6PGA} = 1/T_{1,6PGA}$ (Annexe 7.4). Nous avons choisi de contraindre ce paramètre particulier car cette mesure est difficilement réalisable sur les PGLs, qui sont des espèces instables, s'hydrolysant spontanément en 6PGA. Sachant que le rapport signal sur bruit du 6PGA est très faible, l'incertitude de mesure sur le 6PGA est donc plus importante que sur les autres métabolites. La mesure du temps de relaxation du 6PGA a été réalisée en utilisant la solution post réactionnelle ayant servi à l'étude de la seconde enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, la 6PGL (chapitre 4.1.2.2). En fin de réaction, le 6PGA est en effet parfaitement stable dans le tube RMN et suffisamment concentré pour entreprendre ces mesures (chapitre 4.1.2.3). Un nouvel ensemble de simulations de type Monte-Carlo a donc été obtenu en prenant compte la valeur de $R_{1,6PGA}$ trouvée ($0,110 \text{ s}^{-1}$) et son erreur de mesure ($0,008 \text{ s}^{-1}$).

Grâce à cette approche, la gamme des valeurs obtenues pour $k_{\gamma\text{-PGL}}$, $R_{1,\gamma\text{-PGL}}$ et $R_{1,6PGA}$ est plus restreinte (**Figure 40**). Les précédentes corrélations observées entre les paramètres $k_{\gamma\text{-PGL}}$ et $R_{1,\gamma\text{-PGL}}$, entre $k_{\gamma\text{-PGL}}$ et $R_{1,6PGA}$, entre $k_{\delta\text{-PGL}}$ et $R_{1,\delta\text{-PGL}}$, et entre $R_{1,\gamma\text{-PGL}}$ et $R_{1,6PGA}$ n'existe plus lorsque la recherche des paramètres optimaux du modèle est contrainte par la valeur expérimentale de $R_{1,6PGA}$. D'ailleurs, nous remarquons que les diagrammes de corrélations sont proches d'une seule valeur entre les constantes de relaxations $R_{1,\delta\text{-PGL}}$ et $R_{1,\gamma\text{-PGL}}$, $R_{1,\gamma\text{-PGL}}$ et $R_{1,6PGA}$, $R_{1,\delta\text{-PGL}}$ et $R_{1,6PGA}$, entre les constantes de vitesse, entre les trois constantes de relaxation $R_{1,\delta\text{-PGL}}$, $R_{1,\gamma\text{-PGL}}$ et $R_{1,6PGA}$ et entre chaque constante de vitesse et les constantes de relaxations. Les vitesses de relaxation des deux lactones sont comparables vers ca. 0.07 s^{-1} (Tableau 4). La distribution des vitesses k_m et k_p calculées semblent en revanche ne pas être affectées par la contrainte imposée sur $R_{1,6PGA}$, que ce soit au niveau de leurs valeurs moyennes trouvées ou de leurs distributions.

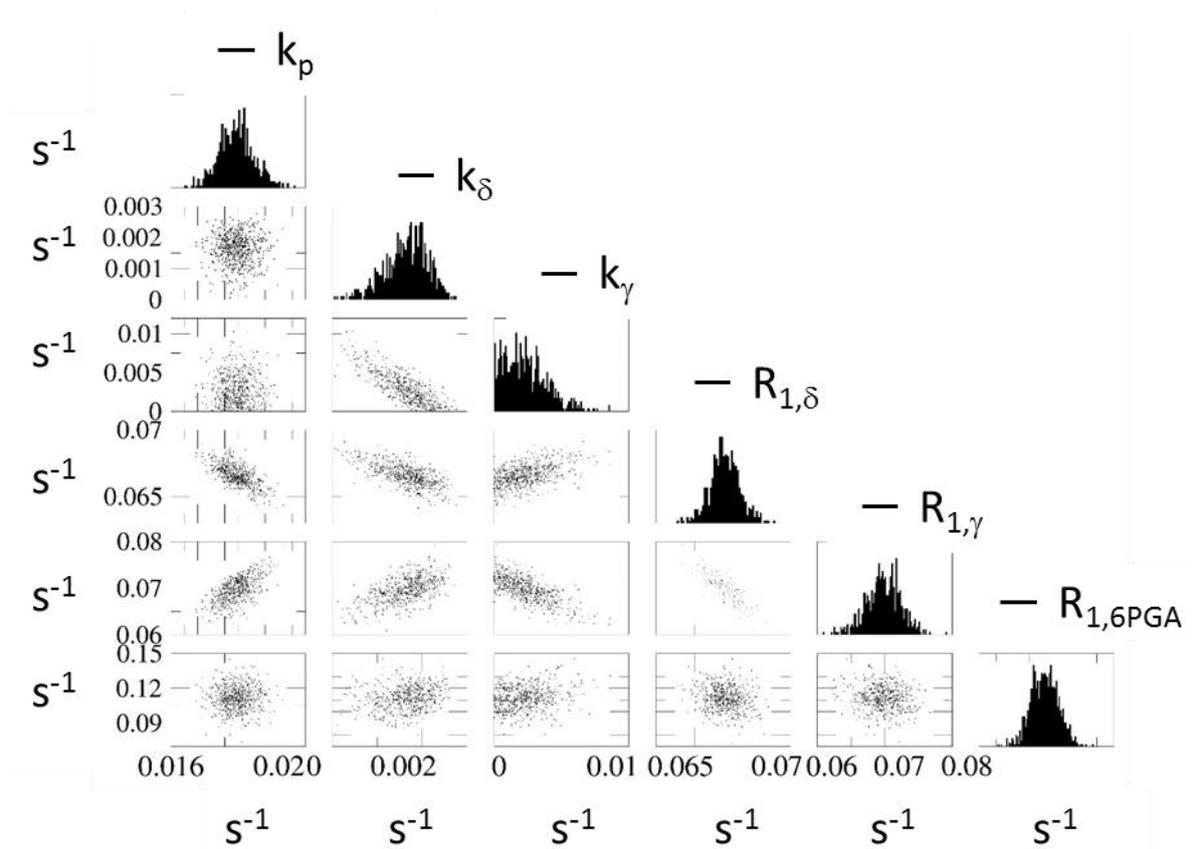


Figure 40 : Histogrammes de paramètres obtenus après 1000 essais de Monte Carlo avec la valeur de $R_{1,6PGA} = 0.110 \pm 0.008$ s. Cette valeur a été obtenue à l'aide d'une expérience d'inversion récupération sur une solution post-réactionnelle contenant 4 mM [^{13}C -D $_7$]-6PGA, 0.172 mg 6PGL, 1.74 μ M G6PD, 27,7 mM ATP, 18,7 mM NADP $^+$, 18,4 mM MgCl $_2$, 73,4 mM Hepes, 118 mM NaOH et 476 μ M Tempol. Seules les solutions pour lesquelles $R_{1,\gamma} \geq 10^{-2} s^{-1}$ et $k_\gamma \geq 10^{-10} s^{-1}$ ont été retenues.

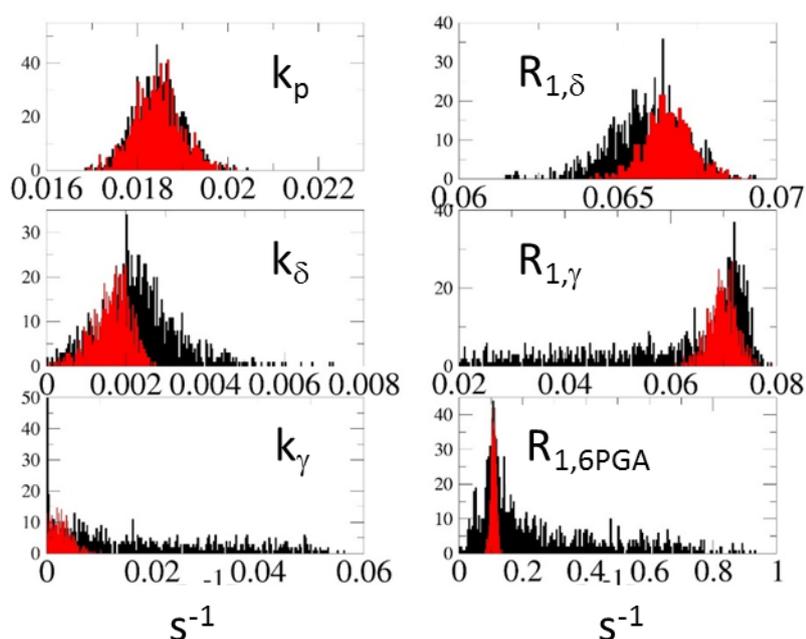


Figure 41 : Comparaison des histogrammes obtenus après 1000 itérations de Monté Carlo en en absence de contrainte (en noir) ou en fixant la constante de relaxation longitudinale $R_{1,6PGA} = 0.110 \pm 0.008 \text{ s}^{-1}$ mesurée sur une solution post-réactionnelle contenant du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-6PGA}$.

La superposition des histogrammes obtenus pour chaque paramètre dans ces deux essais montre que les valeurs obtenues, lorsque le programme d’ajustement est contraint, sont semblables aux valeurs les plus probables déterminées sans fixer de paramètre (Figure 41). Cette superposition montre que la contrainte imposée à un paramètre permet de mieux modéliser la cinétique d’un cycle chimique. Cela évite que le faible rapport signal sur bruit obtenu pour le 6PGA devienne une source d’incertitude plus importante que les erreurs systématiques évoquées plus haut.

Paramètres	Médiane (en s^{-1})	Moyenne (en s^{-1})	σ (en s^{-1})
k_p	$1,84 \cdot 10^{-2}$	$1,85 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-4}$
$k_{\delta\text{-PGL}}$	$1,7 \cdot 10^{-3}$	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-4}$
$k_{\gamma\text{-PGL}}$	$2,6 \cdot 10^{-3}$	$2,8 \cdot 10^{-3}$	$1,9 \cdot 10^{-3}$
k_m	0	0	0
$R_{1,\delta\text{-PGL}}$	0,067	0,067	$8 \cdot 10^{-4}$
$R_{1,\gamma\text{-PGL}}$	0,070	0,070	$2,6 \cdot 10^{-3}$

Tableau 4 : Paramètres obtenus lors de l’itération du modèle cinétique avec contrainte sur $R_{1,6PGA}$. L’ensemble des médianes, des moyennes et des erreurs obtenues pour chaque paramètre est représenté.

Les résultats de cette modélisation (Tableau 4) montrent l’irréversibilité de l’isomérisation de la $\delta\text{-PGL}$ en $\gamma\text{-PGL}$ (Figure 42). En effet, la valeur k_m trouvée est

invariablement nulle que ce soit avec ou sans contrainte sur R_{1-6PGA}. L'isomérisation est environ 10 fois plus rapide que les hydrolyses spontanées. Les hydrolyses des deux PGL sont du même ordre de grandeur, malgré des incertitudes relatives importantes. L'ensemble de ces résultats permet de prédire une accumulation de la forme γ de la 6-phosphogluconolactone en absence de l'enzyme 6PGL (**Figure 42**).

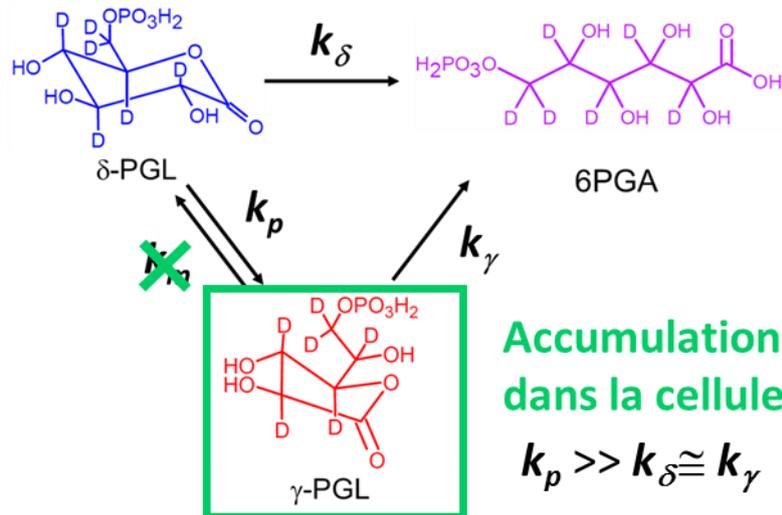


Figure 42 : Représentation des transformations biologiques du [U-¹³C-D₇]-Glucose obtenu à partir des résultats.

Des études cinétiques similaires, utilisant la RMN du phosphore, avaient révélé des constantes de vitesse significativement différentes pour cet ensemble de réactions spontanées.⁷⁵ Les constantes cinétiques trouvées se situaient dans un ordre de grandeur totalement différent : $k_p = 0,028 \text{ min}^{-1}$, $k_m = 0,021 \text{ min}^{-1}$ et $k_\gamma = 0,010 \text{ min}^{-1}$. Cependant, les conditions expérimentales utilisées dans cette étude étaient nettement différentes pour être compatibles avec une étude ³¹P, que ce soit au niveau du tampon (TEA, pH 6,5) ou de la température (278 K). Ces deux paramètres influent notablement sur les vitesses d'hydrolyse. Dans ces conditions de pH et de température, la conversion de la γ -PGL en δ -PGL était possible, malgré le fait que sa vitesse était plus lente que celle de l'isomérisation inverse. En outre, seule la δ -PGL s'hydrolysait spontanément en 6PGA.

Nos expériences ont pour leur part été réalisées à 37 °C (T = 309 K) et à un pH 7,5 proches des conditions physiologiques. Nos résultats représentent en cela une estimation plus réaliste des cinétiques mises en jeu dans la cellule. Ainsi, une perte d'activité de la 6PGL devrait conduire à l'accumulation de la γ -PGL, issue de l'isomérisation du produit de la G6PD. Les données de réactivité de la γ -PGL disponibles dans la littérature indiquent que ce composé est

très électrophile. En effet, les lactones sont connues pour être des puissants électrophiles. Des études *in vitro* ont montré que les lactones réagissaient avec des acides aminés, du glutathion,¹⁶⁴ des acides nucléiques¹⁶⁵ et des hydroxylamines⁷⁵. Ainsi, cette forme de lactone pourrait réagir avec des nucléophile endogènes en entraînant des effets toxiques pour la cellule.

La nécessité d'imposer une contrainte dans le programme d'ajustement montre les limites dans la modélisation simultanée d'un grand nombre de paramètres. Allouche et al¹¹⁶ avaient déjà montré la difficulté d'extraire des paramètres cinétiques dans un modèle contenant 7 paramètres. Ces résultats confirment que la « fixation » des valeurs de temps de relaxation permettrait d'éviter l'obtention de valeurs en inadéquation avec les observations qualitatives.

Nous avons déterminé la cinétique de cette suite de réactions en temps réel en utilisant une technique nouvelle. Une partie des résultats est en accord avec les expériences précédentes, pendant que les résultats concernant l'isomérisation mènent à des nouvelles conclusions sur l'inter-conversion des lactones (**Figure 42**).

3.2.2 Extraction des paramètres cinétiques de l'HK et de la G6PD

L'analyse de la cinétique enzymatique réalisée en présence des deux enzymes, HK et G6PD, en faible quantité, nous a permis d'observer sur plusieurs dizaines de secondes la disparition des deux anomères du glucose, et, de manière concomitante, l'apparition de leurs formes phosphorylées (**Figure 32**). Par ailleurs, le produit d'oxydation du G6P apparaît dès les premières secondes de cette expérience. L'analyse quantitative de cette expérience a nécessité une déconvolution minutieuse des signaux RMN du glucose et du G6P particulièrement difficile en raison du chevauchement des signaux du β -G6P et β -Gluc et de la faible intensité du β -G6P au cours du temps, et des largeurs de raies. (**Figure 31**).

Deux superpositions entre les signaux du glucose et du G6P existent, la superposition entre les signaux anomères alpha des deux molécules et, de l'autre côté, celle correspondant aux anomères beta des deux molécules. Ces deux groupes de signaux vont être discutés séparément.

Pour obtenir les valeurs d'intensités, nous avons utilisé un programme qui permet d'approximer les spectres expérimentaux utilisant des raies lorentziennes pour chaque signal.

Une gamme de valeurs potentielles est explorée pour les déplacements chimiques, les largeurs de raie et les intensités des lorentziennes. Le meilleur accord obtenu avec les données expérimentales permet d'extraire les valeurs d'intégrales de chaque composé, même en présence d'un recouvrement de leurs résonances. Cependant, l'un des paramètres d'entrée du programme doit être la structure de multiplet – i.e., le nombre de lorentziennes qui doivent recomposer le signal expérimental.

La superposition des signaux des deux molécules et des largeurs de raie trop importantes, ne permettent pas, contrairement à une précédente étude (Ref 104), d'observer la structure de multiplet des signaux provenant des différents couplages $^2J_{(C1-C3)}$ et $^3J_{(C1-C6)}$. Seul le couplage $^1J_{(C1-C2)}$ est résolu (Figure 31). Pour obtenir les valeurs d'intensités, nous avons fait dans un premier temps l'hypothèse d'un spectre correspondant à la structure de couplage scalaire attendu, soit un doublet de triplets d'intensités 1 : 2 : 1 pour l'anomère beta utilisant un profil lorentzien pour chaque composante des multiplets. Nous avons envisagé de modéliser la forme du signal du β -G6P de la même manière que celui du β -Glucose. Cette approche s'est avérée infructueuse, notamment en raison d'un profil de raie qui ne semblait pas correspondre totalement à ces motifs, possiblement en raison d'un effet d'inhomogénéité de champ (Figure 43).

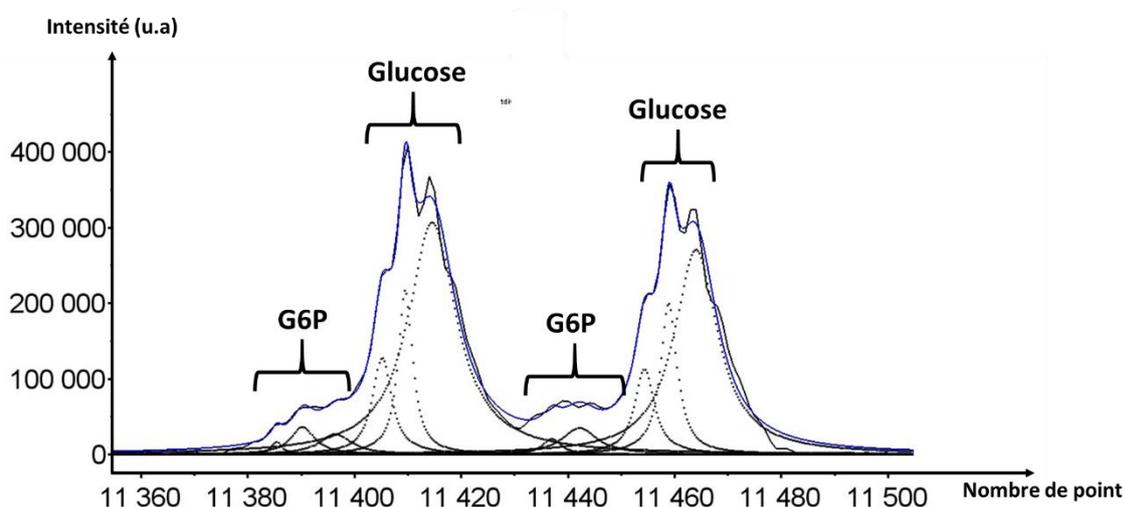


Figure 43 : Modélisation des motifs du β -Glucose et du β -G6P. La position de chaque lorentzienne du β -Glucose est : 11385, 11391, 11396, 11434, 11440 et 11444. La position de chaque lorentzienne du β -G6P est : 11405, 11410, 11414, 11454, 11459 et 11463. Dans la modélisation nous laissons une variation de la position de +/- 2 points. Les bornes des largeurs de raies minimales et maximales autorisées sont 1 et 10.

Nous avons donc adopté une approche empirique visant simplement à reproduire l'enveloppe du signal observé, sans s'attacher à la structure attendue des spectres, mais dont

le but était avant tout d'attribuer correctement les intensités aux deux espèces, β -glucose et β -G6P. Pour ce faire, nous avons imposé une lorentzienne à chaque sommet ou épaulement de la raie du glucose. Puis nous avons supposé la même composition pour le β -G6P, bien que ces motifs ne soient pas toujours identifiables. (Figure 44) Nous avons ainsi utilisé une superposition de quatre raies lorentziennes par composante du doublet $^1J_{(C1-C2)}$, pour les signaux de l'anomère β du glucose et du G6P. Les résultats de cette modélisation montrent que les lorentziennes utilisées pour le β -glucose reproduisent raisonnablement le signal obtenu expérimentalement (Figure 44).

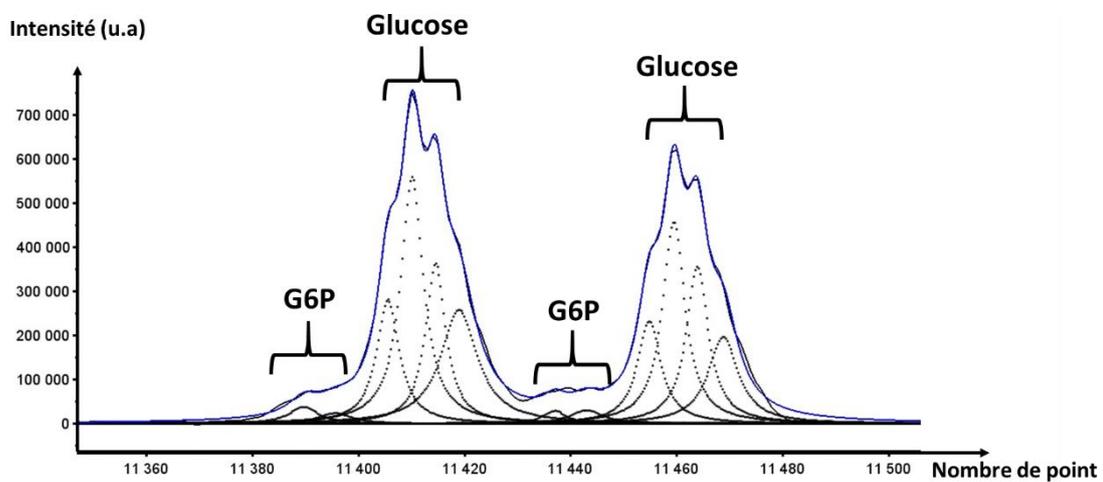


Figure 44 : Modélisation des motifs du β -Glucose et du β -G6P. La position des lorentziennes utilisées pour le β -G6P est : 11385, 11390, 11396, 11400, 11434, 11439, 11444 et 11449. La position de chaque lorentzienne du β -Glucose est : 11406, 11410, 11414, 11419, 11455, 11459, 11464 et 11468. Dans la modélisation nous laissons une variation de la position de +/- 2 points. Les bornes des largeurs de raies minimales et maximales autorisées sont 1 et 10.

Dans le cas de l'anomère alpha, la même stratégie s'est avérée moins fructueuse, ne permettant pas un ajustement totalement satisfaisant du spectre. (Figure 45 et Figure 46). Cependant, comme nous l'avons vu, compte tenu de la sélectivité de substrat de la G6PD, ces signaux n'ont pas d'utilité pour notre analyse cinétique.

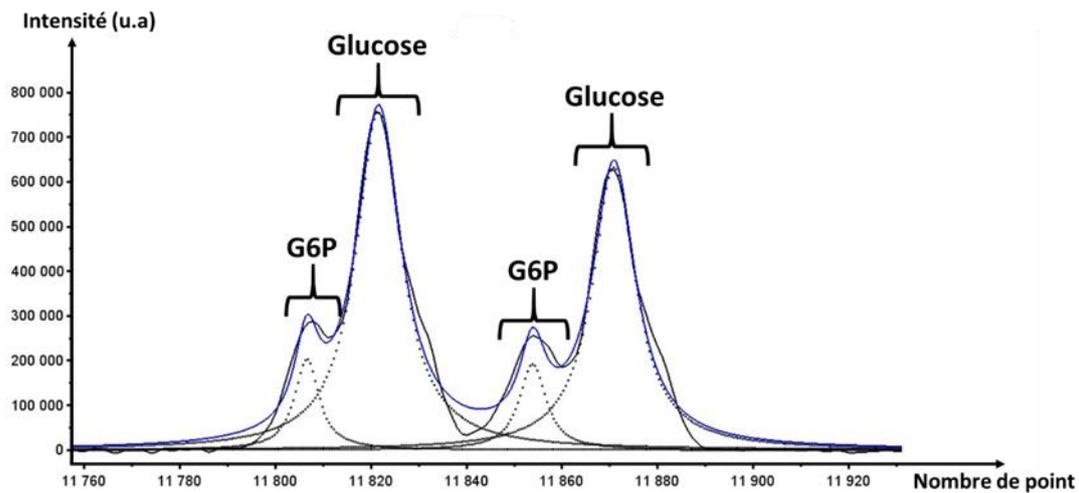


Figure 45 : Modélisation empirique des motifs de l'α-Glucose et de l'α-G6P. La position de chaque lorentzienne de l'α-G6P est : 11807 et 11854. La position de chaque lorentzienne de l'α-Glucose est : 11821 et 11870. Dans la modélisation nous laissons une variation de la position de +/- 2 points. Les bornes des largeurs de raies minimales et maximales autorisées sont 1 et 10.

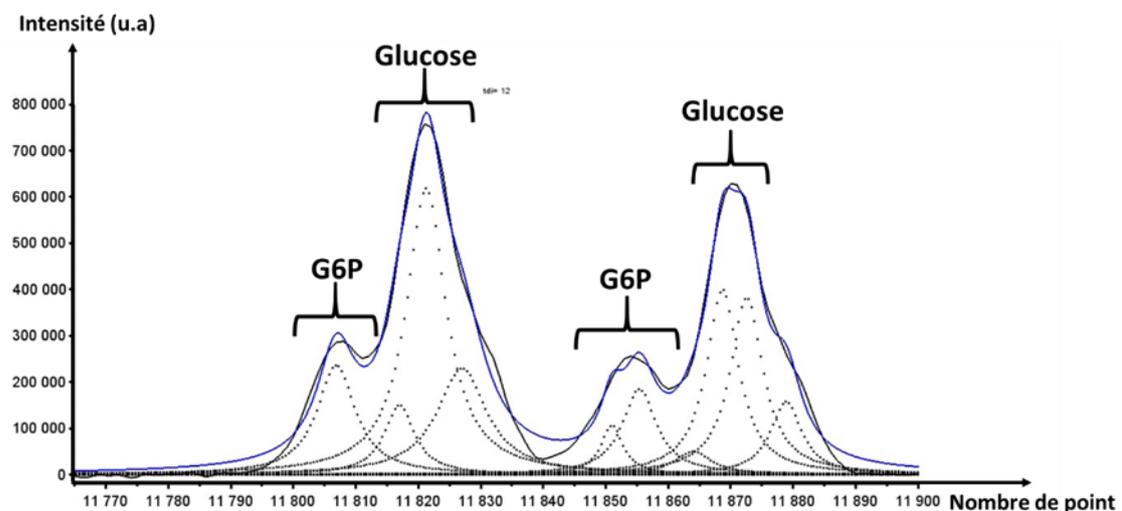


Figure 46 : Modélisation des motifs du β-Glucose et du β-G6P selon la multiplicité attendue (doublet de triplet). La position de chaque lorentzienne du β-G6P est : 11806, 11813, 11818, 11847, 11852 et 11860. La position de chaque lorentzienne du β-Glucose est : 11823, 11838, 11842, 11865, 11870 et 11876. Dans la modélisation nous laissons une variation de la position de +/- 2 points. Les bornes des largeurs de raies minimales et maximales autorisées sont 1 et 10.

Les intensités relatives de δ-PGL ont simplement été extraites en intégrant le spectre entre 175,6 ppm et 174,7 ppm.

Grâce à l'expérience réalisée avec une grande activité d'HK et de G6PD, la sélectivité de la G6PD pour l'anomère β-G6P a été observée (Figure 33). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les interconversions entre les anomères du G6P et du Glucose sont négligeables sur l'échelle de temps de nos expériences (Cf.). Ainsi, nous avons modélisé la cascade

enzymatique à partir du β -Glucose uniquement et supposé que seul le β -G6P est oxydé en δ -PGL. Les cofacteurs étant en excès (chapitre 3.2.2.1 et annexe 2.1) seule la variation de la concentration en métabolites influence les cinétiques des enzymes (e.g. la concentration du β -Glucose au cours du temps influence la vitesse de phosphorylation catalysée par l'HK). Nous avons donc traité chaque étape de ce schéma réactionnel comme des cinétiques de pseudo-premier ordre.

L'évolution de la composante longitudinale de l'aimantation portée par le $^{13}\text{C}_1$ de chaque métabolite, dM/dt , est modélisée dans ce cas par :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_{\beta-Gluc} \\ M_{\beta-G6P} \\ M_{\delta-PGL} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{HK} - R_{1,\beta-Gluc} & 0 & 0 \\ k_{HK} & -k_{G6PD} - R_{1,\beta-G6P} & 0 \\ 0 & k_{G6PD} & R_{1,\delta-PGL} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_{\beta-Gluc} \\ M_{\beta-G6P} \\ M_{\delta-PGL} \end{pmatrix}$$

$= \mathbf{AM}$ (13)

Dans cette équation, $M = \begin{bmatrix} M_{\beta-Gluc} \\ M_{\beta-G6P} \\ M_{\delta-PGL} \end{bmatrix}$, où $M_{\beta-Gluc}$, $M_{\beta-G6P}$ et $M_{\delta-PGL}$ désignent respectivement les composantes z de l'aimantation de β -Glucose (β -Gluc), β -G6P, et δ -PGL. L'effet de la relaxation est pris en compte par les constantes de relaxation longitudinales de chaque molécule : $R_{1,\beta-Gluc}$ pour le β -Glucose (β -Gluc), $R_{1,\beta-G6P}$ pour le β -G6P, $R_{1,\delta-PGL}$ pour le δ -PGL.

De manière analogue au cas précédent (Chapitre 3.2.1), le signal $S(p\Delta t)$, correspondant à chaque espèce, observé après p impulsions d'un angle θ de 10° est donné par :

$$S(p\Delta t) = \begin{bmatrix} S_{\beta-Gluc} \\ S_{\beta-G6P} \\ S_{\delta-PGL} \end{bmatrix}_{(p\Delta t)} = \exp(Ap\Delta t) \cos^p(\theta) S(0) \quad (14)$$

avec $p\Delta t$ l'intervalle de temps et $S(0) = \begin{bmatrix} S_{\beta-Gluc}(t_0) \\ S_{\beta-G6P}(t_0) \\ S_{\delta-PGL}(t_0) \end{bmatrix}$ la valeur initiale du signal à $t_0 = 10$ s.

Dans cette description, les valeurs initiales des signaux sont également des paramètres ajustables du modèle, qui en comporte ainsi huit valeurs ajustées : 2 constantes cinétiques, 3 vitesses de relaxation longitudinales et 3 concentrations initiales.

Lorsqu'on applique le programme d'ajustement des intensités expérimentales au modèle cinétique proposé, on observe un bon accord apparent entre la cinétique observée et le modèle. Cependant la valeur du paramètre $R_{1,\beta\text{-G6P}}$ est toujours nulle, ce qui n'est pas acceptable. L'utilisation de contraintes expérimentales dans ce cas serait souhaitable. Malheureusement, et contrairement au cas précédent (« cycle des lactones ») nous n'avons pas pu introduire la vitesse de relaxation de l'un des composants du mélange, puisque toutes les espèces subissent une transformation chimique. De ce fait, la séparation entre les constantes de vitesses de relaxation et les constantes de vitesses de transformation n'est pas possible. En effet, même le produit de la cascade enzymatique, la δ -PGL, s'hydrolyse et s'isomérisse spontanément en γ -PGL et 6PGA. La mesure du $R_{1,\delta\text{-PGL}}$ sur l'échantillon dépolarisé n'est pas possible. En revanche, nous avons supposé, que la vitesse de relaxation du $^{13}\text{C}_1$ de l'anomère β du G6P est comparable à celle du même atome sur le β -Glucose, dû à l'environnement moléculaire similaire. Nous avons donc repris l'analyse de la cinétique en ajustant les paramètres du modèle sous la condition que $R_{1,\beta\text{-G6P}} = R_{1,\beta\text{-Gluc}} (1 + x)$, où x est pris de manière arbitraire dans l'intervalle $[-0,2 ; +0,2]$ (i.e., $R_{1,\beta\text{-G6P}}$ diffère de $R_{1,\beta\text{-Gluc}}$ d'un maximum de 20 %).

Nous avons donc effectué pour chaque valeur de x une série de 500 simulations de Monte Carlo (dont 60% typiquement ont convergé environ). Nous avons ensuite estimé la moyenne des paramètres du modèle ($k_{HK,x}$, $k_{G6PD,x}, \dots$), pour chaque x . Puis la déviation standard de chacune de ces moyennes a été évaluée sur l'ensemble des résultats correspondant à chaque valeur de x . Ceci permet de se rendre compte qualitativement de l'effet de la contrainte imposée à $R_{1,\beta\text{-G6P}}$ sur les valeurs des paramètres. L'ensemble des valeurs ainsi obtenues sont regroupées dans le tableau suivant :

Paramètres	Moyenne (en s^{-1})	σ (en s^{-1})
k_{HK}	0,048	0,010
k_{G6PD}	0,123	0,002
$R_{1,\beta\text{-Gluc}}$	0,088	0,010
$R_{1,\beta\text{-G6P}}$	0,084	0,025
$R_{1,\delta\text{-PGL}}$	0,104	0,001

Tableau 5 : Valeurs moyennes et écarts-types des constantes cinétiques de l'HK et de la G6PD (k_{HK} et k_{G6PD}) et des constantes de relaxation spin-réseau de chaque métabolite intervenant dans la cascade enzymatique ($R_{1,\beta\text{-Gluc}}$, $R_{1,\delta\text{-PGL}}$) obtenues après 500 itérations utilisant différentes valeurs de $R_{1,\beta\text{-G6P}}$ autour de 0.084 s^{-1} avec une variation de $\pm 0.025 \text{ s}^{-1}$ est une valeur d'entrée du modèle.

Par conséquent, il apparaît que la constante cinétique k_{HK} varie de 20% environ. Cette variation est du même ordre que celle imposée à $R_{1,\beta\text{-G6P}}$. En revanche, les valeurs des autres paramètres ont des variations relatives beaucoup plus faibles, même si, bien sûr, elles sont toutes corrélées à la contrainte imposée à $R_{1,\beta\text{-G6P}}$. Cependant, la constante cinétique k_{G6PD} semble relativement insensible à cette dernière.

Il semble donc que l'analyse quantitative ne soit pas totalement satisfaisante. Nous pouvons envisager plusieurs explications. D'une part, la difficulté de distinguer les signaux du β -Glucose et du β -G6P est probablement à l'origine d'erreurs sur les valeurs des intensités extraites. D'autre part, la durée de la phase d'injection, encore longue sur ces expériences, nous empêche d'observer de manière très claire le sommet de la cinétique du « buildup » du signal de la lactone. De plus, dans ces conditions expérimentales, nous n'observons pas d'augmentation du signal du β -G6P (une fois l'injection complète), qui est simultanément produit et détruit.

L'ensemble de ces explications ont rendu difficile l'extraction des paramètres

Toutefois, ces résultats montrent que l'étape limitante dans ces conditions est la phosphorylation du β -Gluc en β -G6P (Figure 47). La superposition entre les courbes et les points expérimentaux montre que le modèle cinétique est adéquat.

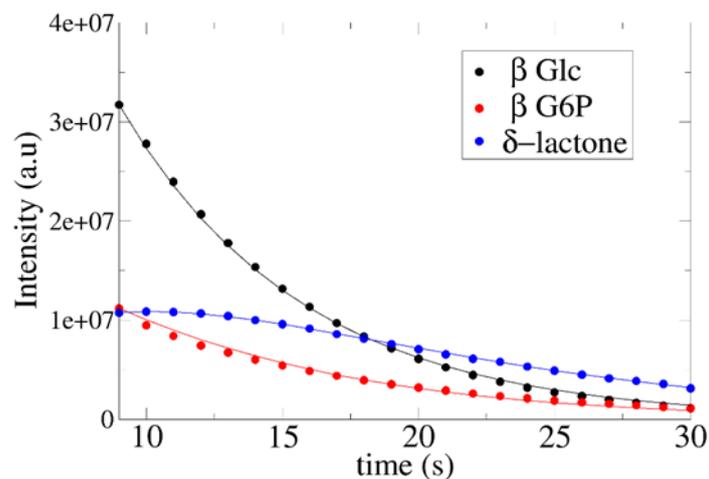


Figure 47 : Intensités des signaux et courbes des fits obtenus pour les signaux de la δ -PGL (en bleu), β -G6P (en rouge) et β -Glucose (en noir) lors de la phosphorylation du β -Glucose et de l'oxydation du β -G6P (Figure 13). Les intensités obtenues à $t = 9$ s n'ont pas été prises en compte pour la modélisation des cinétiques de HK et de la G6PD.

Dans les expériences décrites précédemment, le suivi des cinétiques des différents métabolites de la cascade enzymatique repose sur l'observation de leur $^{13}\text{C}_1$. En effet, comme il est indiqué sur la **Figure 48**, ce carbone a un déplacement chimique élevé par rapport aux autres carbones du glucose ou du G6P, car il est le seul à être lié à deux oxygènes.

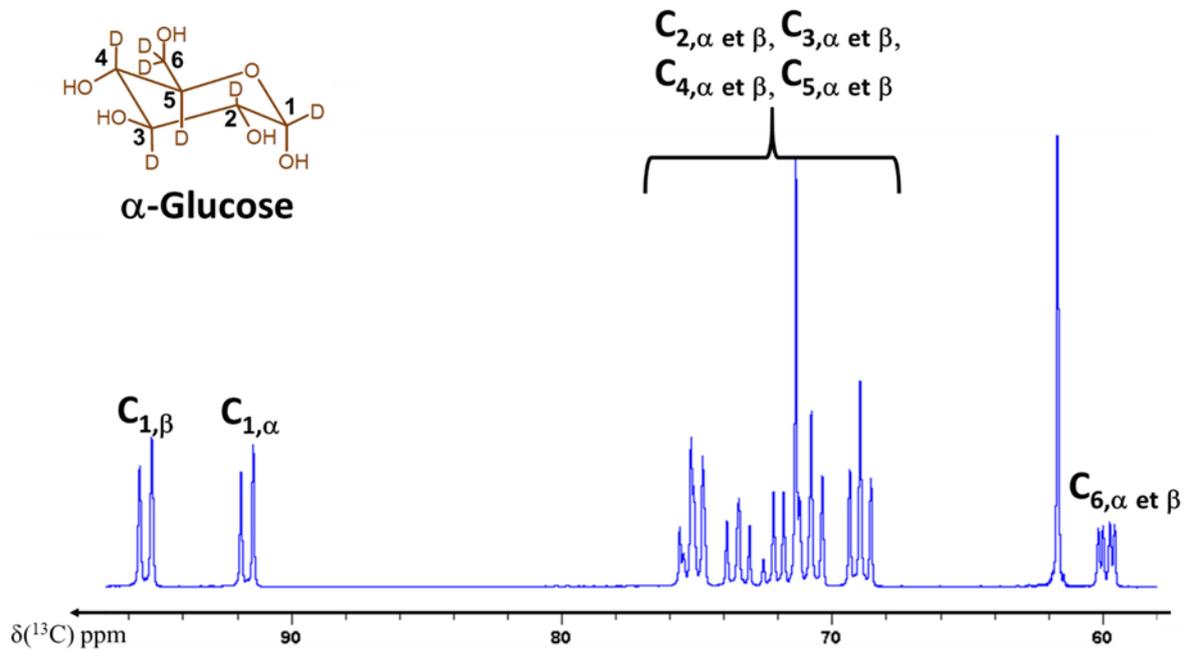


Figure 48 : Spectre ^{13}C découplé deutérium et proton du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]$ -Glucose.

Ainsi, sa résonance à bas champs permet de l'observer indépendamment des autres carbones qui sont souvent superposés dans une région du spectre comprise entre 68 et 80 ppm. Toutefois, comme nous avons pu l'observer précédemment, la déconvolution des signaux RMN du $^{13}\text{C}_1$ du glucose et du G6P est difficile en raison de la faible intensité du β -G6P au cours du temps, des largeurs de raies et du chevauchement des signaux du β -G6P et β -Gluc en utilisant la sonde de 10 mm à $B_0 = 9,4 \text{ T}$ ($\nu_0(^1\text{H}) = 400 \text{ MHz}$). Nous nous sommes donc intéressés aux signaux correspondant aux $^{13}\text{C}_6$ des deux anomères du glucose et du G6P, qui sont également isolés à 60 ppm. Les résonances du $^{13}\text{C}_6$ du glucose sont identifiables et caractérisés par des doublets mettant en évidence le couplage $^1J(\text{C}_6\text{-C}_5) = 45 \text{ Hz}$, à 60.1 ppm et à 59,7 ppm (différence de 15 Hz) pour le β -Gluc et pour l' α -Gluc. Dans le but d'obtenir une seconde estimation des constantes cinétiques, k_{HK} et k_{G6PD} , l'interpolation des signaux des $^{13}\text{C}_6$ de chaque métabolite aurait été intéressante à réaliser. Malheureusement, les signaux des $^{13}\text{C}_6$ des deux anomères de G6P se superposent à 59,9 ppm (**Figure 49**).

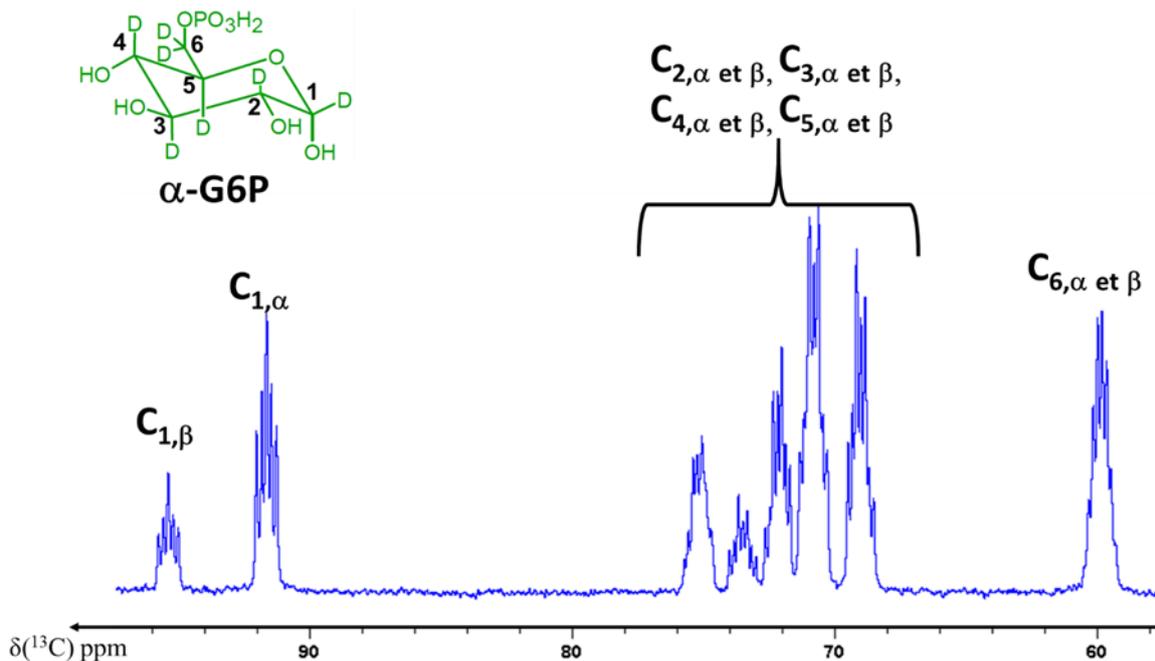


Figure 49 : Spectre ^{13}C découplé en deutérium (uniquement) du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-G6P}$.

De plus, malgré l'application d'un découplage deutérium et proton pendant l'acquisition les résonances $^{13}\text{C}_6$ des deux anomères du G6P se superposent au triplet de l'éthylène glycol (63,7 ppm, $^1\text{J}_{\text{C-H}} = 141 \text{ Hz}$)¹⁶⁶ qui a été utilisé comme agent vitrifiant (Figure 50). Les $^{13}\text{C}_6$ ne sont donc pas de bonnes sondes pour étudier les cinétiques enzymatiques.

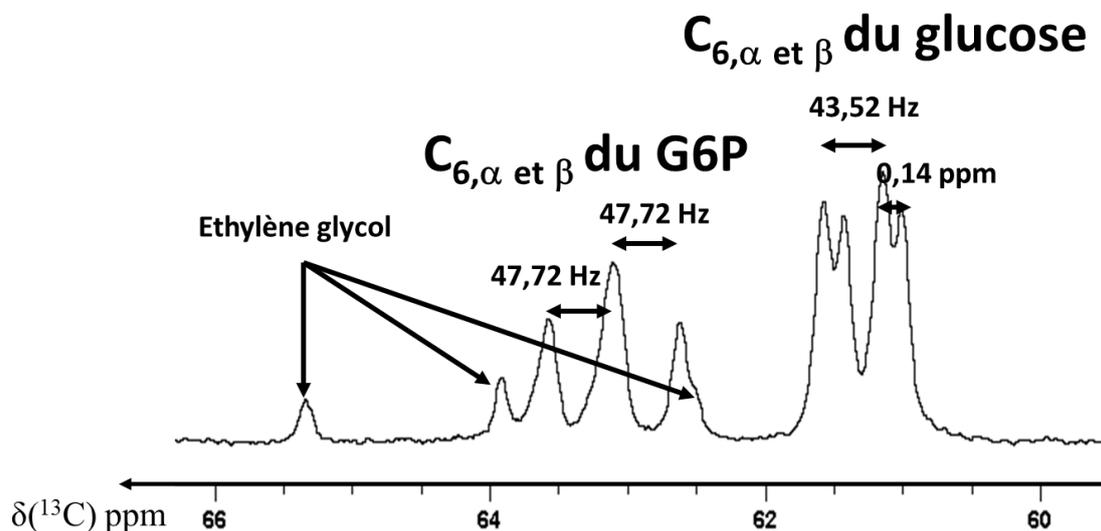


Figure 50 : Agrandissement du spectre ^{13}C entre 66 et 58 ppm correspondant au spectre obtenu à 4 s après l'injection de $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$ lors de l'expérience réalisée avec une grande quantité d'HK et de G6PD en présence d'éthylène glycol.

Dans le but de diminuer les largeurs de raie due aux constantes de couplages $^{13}\text{C-}^{13}\text{C}$ pour observer plus facilement le G6P du Glucose, du $^{13}\text{C}_1\text{-D}_1\text{-Glucose}$ a été hyperpolarisée.

Dans cette expérience, l'activité obtenue pour l'HK est identique à celle obtenue dans l'expérience D-DNP présentée en (3.2.1). Les co-facteurs sont toujours en excès (Chapitre 4.1.2.3 et annexe 2.3). Grâce à l'application d'une séquence découplage du deutérium pendant la détection, un singulet est obtenu pour chaque métabolite de la cascade enzymatique (**Figure 51**).

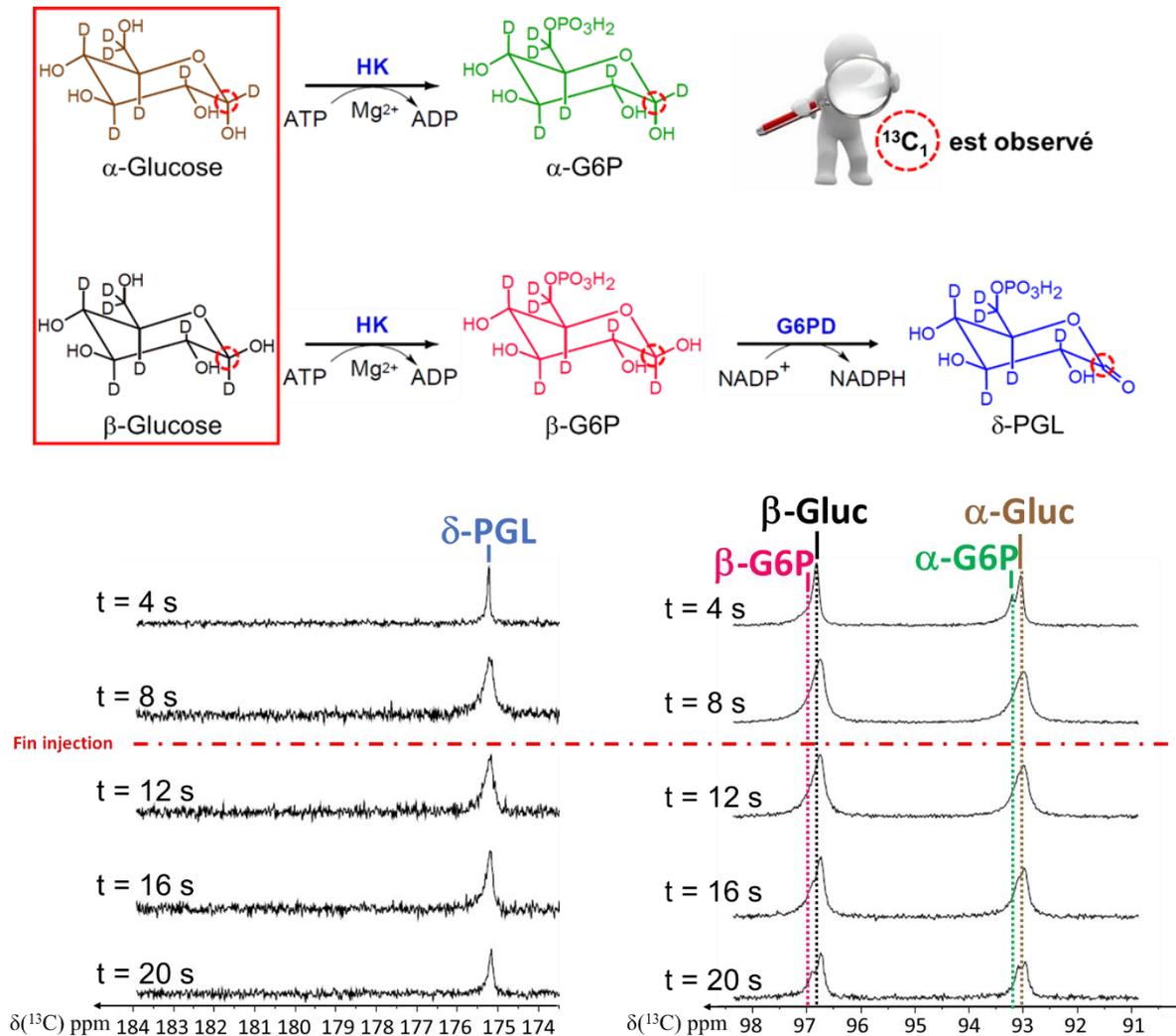


Figure 51 : Spectres obtenus au cours de la réaction enzymatique observée après dissolution du [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose hyperpolarisé. Ces spectres ont été apodisés par une exponentielle multiple ($\exp(\text{LB} \cdot t)$) avec une valeur LB de 5 Hz. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps à $t = 4 \text{ s}$, $t = 8 \text{ s}$, $t = 12 \text{ s}$, $t = 16 \text{ s}$ et $t = 20 \text{ s}$ après le début de l'injection. La durée de l'injection du [$^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$]-Glucose hyperpolarisé est de 10 s. Au-dessus des spectres, la cascade enzymatique est représentée. L'encadré rouge montre le substrat qui a été hyperpolarisé avant son injection dans le tube contenant les enzymes (HK et la G6PD) ainsi que leurs co-facteurs (ATP, Mg^{2+} et le NADP^+). Le site $^{13}\text{C}_1$ des métabolites impliqués dans cette cascade enzymatique a été entouré par un cercle rouge. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la $\delta\text{-PGL}$.

Malgré le marquage sélectif du $^{13}\text{C}_1$, les signaux des α/β Gluc et α/β G6P ne sont pas résolus entre $t = 6 \text{ s}$ et $t = 20 \text{ s}$. Il est intéressant de remarquer, qu'il est possible de distinguer

les anomères de glucose et de G6P qu'à partir de $t = 20$ s (Figure 51 et Figure 52). L'évolution des signaux au cours du temps montre que les anomères de G6P continuent à être produits tout le long de l'expérience. L'intensité relative du β -G6P semble augmenter par rapport au β -Gluc jusqu'à ce qu'elles deviennent égales, à $t = 34$ secondes. Toutefois, le rapport signal sur bruit étant faible, aucune analyse qualitative ne peut être réalisée à partir de 20 secondes. Le signal de la δ -PGL est déjà présent à $t = 4$ s et persiste jusqu'à la fin de l'expérience. Le spectre enregistré à l'équilibre thermique (Figure 53) montre une faible présence des deux anomères de G6P ou de Glucose. Ce même spectre révèle également l'isomérisation de δ -PGL et la production de 6PGA. En raison d'une faible résolution entre $t = 6$ et $t = 20$ secondes et d'un rapport signal sur bruit trop faible, l'extraction des intensités du β -Gluc, β -G6P, de l' α -Gluc et de l' α -G6P n'a pas été possible.

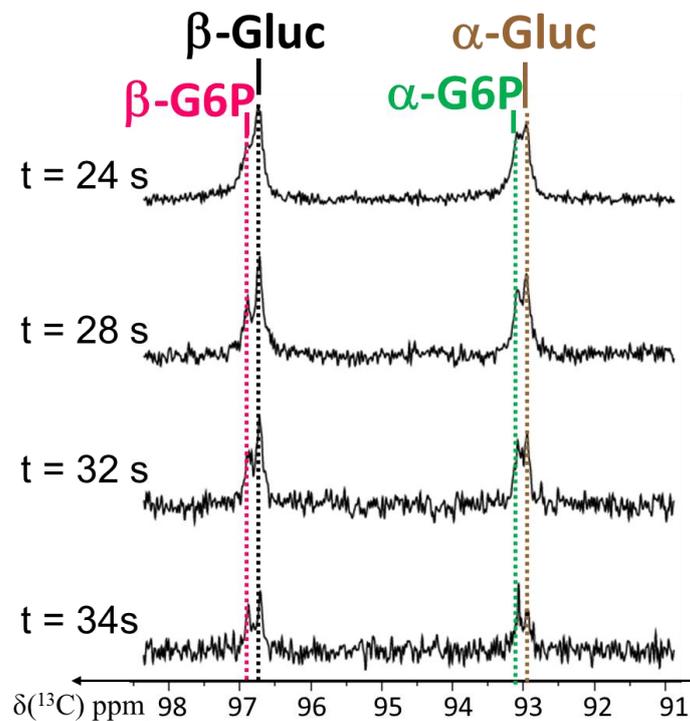


Figure 52 : Spectres obtenus au cours de la chaîne de réactions enzymatiques observée après dissolution du $[^{13}\text{C}_1\text{-D}_1]$ -Glucose hyperpolarisé. L'ensemble des spectres ont été apodisés par une exponentielle multiple ($\exp(\text{LB} \cdot t)$) avec une valeur LB de 5 Hz. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps à $t = 24$ s, $t = 28$ s, $t = 32$ s et $t = 34$ s après le début de l'injection et fait suite à la figure 53. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la δ -PGL.

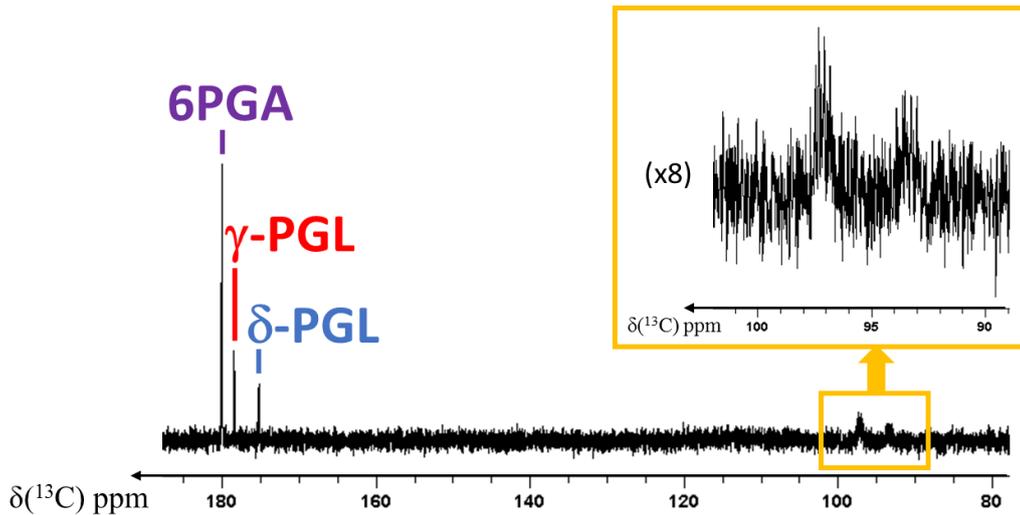


Figure 53 : Spectre RMN-carbone enregistré à l'équilibre thermique.

Les résultats obtenus avec le $[^{13}\text{C}_1\text{-D}_1]$ -Glucose sont en désaccords avec les résultats obtenus pour les expériences réalisées avec du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]$ -Glucose. Pourtant, les activités en HK et en G6PD ainsi que les concentrations en co-facteurs utilisées entre ces expériences sont proches. Ces résultats sont d'autant surprenant du fait que l'oxygène lié au carbone-6, qui se phosphoryle, est plus nucléophile (plus dense en électrons) lorsque le carbone 6 est protoné que s'il était deutéré (le deutérium est plus électronégatif que le proton).

L'ensemble de ces expériences ont montré que le substrat de la deuxième enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphate, la G6PD, est bien le β -G6P. Un autre modèle du cycle des lactones en absence de 6PGL a également été observé. Ce modèle permet de montrer l'irréversibilité de l'isomérisation de la δ -PGL dans des conditions expérimentales particulières et que les deux PGLs s'hydrolysent spontanément avec des vitesses identiques (Figure 54).

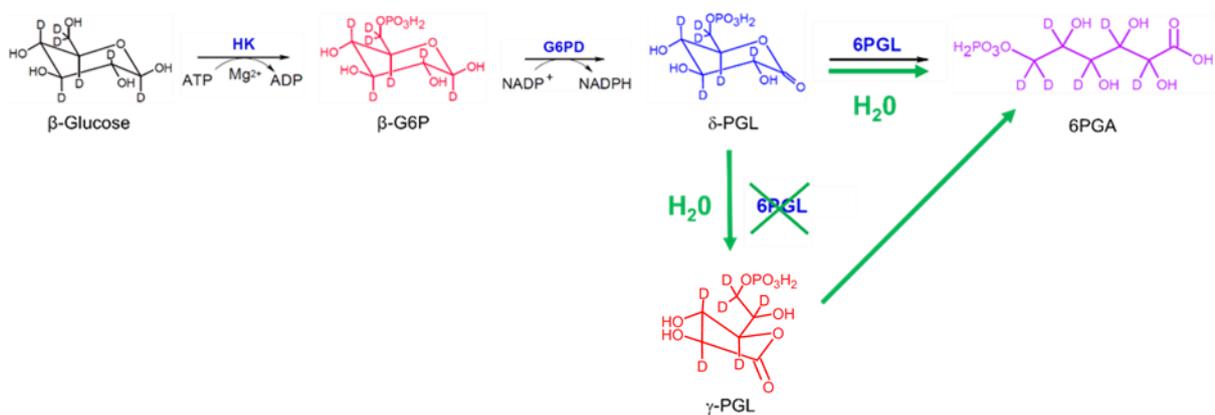


Figure 54 : Représentation de la production du substrat de la voie des pentoses phosphates et des deux premières réactions enzymatiques de la partie oxydative de la PPP à partir des résultats. Les réactions chimiques qui se produisent en l'absence de la 6PGL sont indiquées en vert.

Dans la troisième partie de ce chapitre, l'utilisation d'un G6P synthétisé et purifié pour observer directement la cinétique de la G6PDH sera développé.

3.3 Etude de la G6PD à partir du [U-¹³C-D₇] G6P par D-DNP

Pour étudier de manière indépendante la première enzyme de la voie des pentoses phosphates (G6PD), nous avons entrepris l'étude de la cinétique de la G6PD directement à partir de son substrat, le G6P, sans utiliser la phosphorylation préalable du glucose. Cette stratégie permet de contourner les problèmes liés au mélange parfois difficile de solutions visqueuses du fait de la présence de nombreux co-facteurs et d'enzymes dans la solution réactionnelle. Le G6P doublement marqué ¹³C, ²H, uniformément ou sélectivement, étant disponible commercialement à un prix prohibitif, nous avons souhaité développer une méthode de synthèse et de purification au sein du laboratoire préalablement à l'étude de la cinétique enzymatique de la G6PD.

3.3.1 Synthèse et purification du [U-¹³C-D₇]-G6P

Le G6P a été produit de manière enzymatique. L'optimisation des quantités des différents co-facteurs a permis de réaliser la phosphorylation du glucose à l'échelle du gramme. Dans ces conditions, un grand excès en co-facteur n'est pas nécessaire. Ainsi, seulement 1,2 équivalents d'ATP et de MgCl₂ suffisent à produire un équivalent de G6P (**Figure 55**).

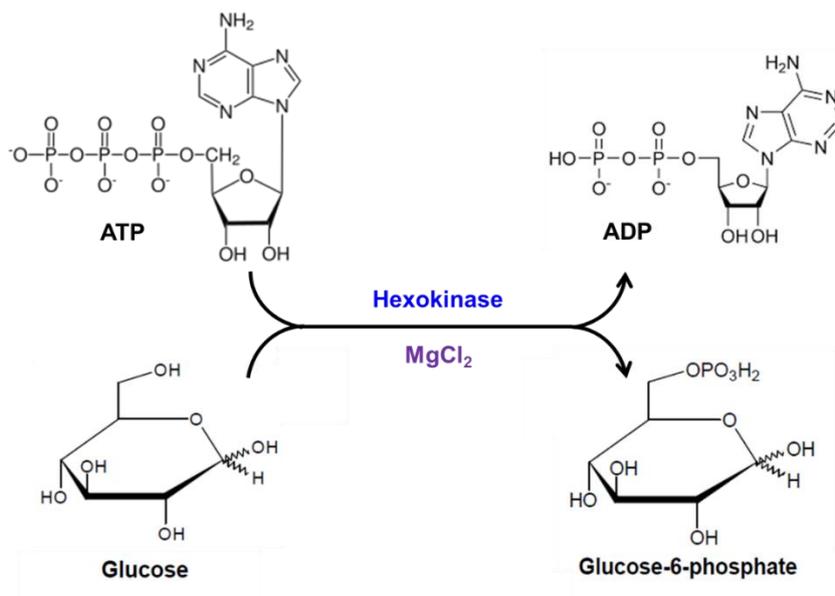


Figure 55: Réaction de phosphorylation du [U-¹³C-D₇]-glucose en [¹³C-D₇]-glucose-6-phosphate catalysé par l'hexokinase (HK) à l'aide de la déphosphorylation de l'ATP en ADP.

Une fois synthétisé, le G6P doit être extrait du mélange réactionnel contenant l'excès de 0,2 équivalent d'ATP, 1 équivalent d'ADP, l'HK, le MgCl₂ et le tampon (**Figure 55**). Un protocole de purification et de détection efficaces est indispensable afin d'isoler le G6P du mélange réactionnel. Le glucose-6-phosphate ne possédant pas de groupement chromophore absorbant entre 200 et 800 nm, une détection par spectrophotométrie UV-vis est inutile. L'ensemble de nos équipements de purification étant composés uniquement d'un détecteur UV, la purification et la détection du G6P au sein du même système dans notre laboratoire a été difficile à mettre en place.

3.3.1.1 Tests préliminaires

Pour séparer le G6P des cinq autres substances chimiques présentes dans la solution post-réactionnelle : l'ATP, l'ADP, l'HK, MgCl₂ et le tampon (**Figure 55**), nous avons, dans un premier temps, tenté de mettre à profit les différences d'hydrophobie entre ces molécules, en utilisant une colonne hydrophobe en HPLC. Si l'enzyme et les sels (chlorure de magnésium et tampon) semblent être bien différents de ce point de vue, la séparation entre ATP, ADP et G6P paraissait plus ardue. Nous avons toutefois tenté cette purification en testant les différentes colonnes HPLC disponibles au laboratoire. En second lieu et après des essais infructueux, nous avons eu recours à une chaîne de purification, la FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography), équipée d'une colonne échangeuse d'anion. Seule cette deuxième stratégie a permis de purifier le G6P avec une bonne efficacité.

3.3.1.1.1 La colonne hydrophobe

Les premiers tests ont été réalisés par chromatographie de type HPLC Agilent LC1100 (expériences réalisées dans le département de chimie de l'université de Cergy-Pontoise), qui est équipé de deux détecteurs : une lampe UV et un détecteur de type ELSD (Evaporating Light Scattering Detector en anglais, Détecteur à diffusion de la lumière en français) (**Figure 56**). Ce détecteur analyse des molécules non-volatiles et semi-volatiles. Dans un premier temps, la solution détectée est nébulisée. Les gouttelettes ainsi formées passent dans une chambre d'évaporation dans laquelle seules les particules restent. Ces particules traversent ensuite une chambre de détection, dans laquelle une photodiode détecte la lumière diffusée. Le signal émis est proportionnel aux masses des particules analysées.

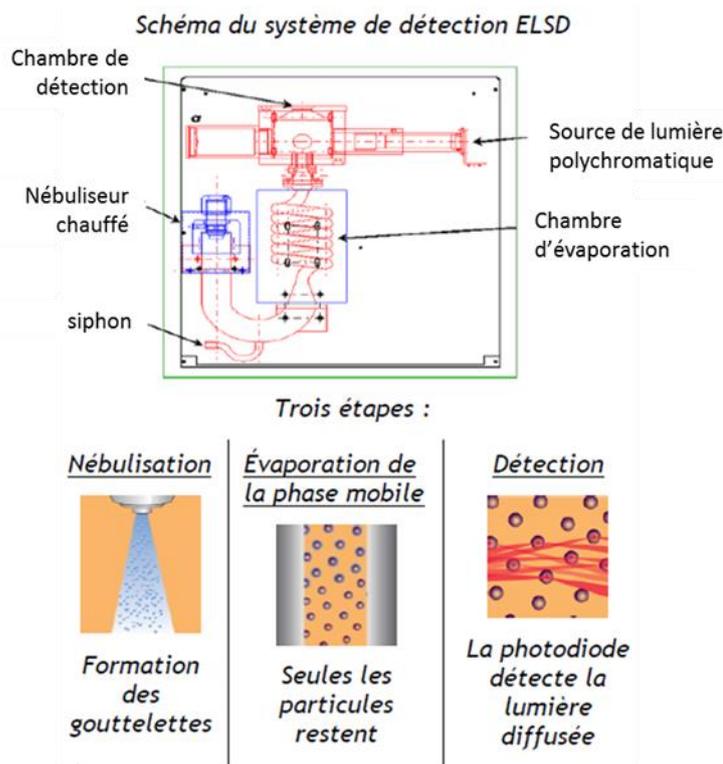


Figure 56 : Schéma représentant le système de détection ELSD (Evaporating Light Scattering Detector). Cet appareil est composé d'une source de lumière polychromatique, d'une chambre de détection, d'un nébuliseur chauffé, d'une chambre d'évaporation et d'un siphon. La détection s'effectue en trois étapes. Dans un premier temps, la solution détectée est nébulisée. Les gouttelettes ainsi formées passent dans une chambre d'évaporation dans laquelle seules les particules restent. Ces particules traversent ensuite une chambre de détection, dans laquelle une photodiode détecte la lumière diffusée. Le signal émis est proportionnel aux masses des particules analysées. Schéma issu du site internet du laboratoire génie des procédés et matériaux (LGPM).¹⁶⁷

Les premiers essais ont été réalisés sur une colonne hydrophobe sur laquelle sont greffés des groupements polaires et TMS (tétraméthylsilane). En faisant varier le pH, la colonne peut retenir des composés polaires, acides, basiques ou hydrophobes.

Dans le but de tester la rétention du glucose et du G6P par la colonne, nous avons procédé à deux injections de 60 mM glucose et une injection de 588 mM G6P. Les temps de rétention obtenus étaient de $t_r = 3,89$ min et $t_r = 4,03$ min respectivement pour le glucose à des gradients d' H_2O/ACN : 10/50 et 5/20 et $t_r = 3,78$ min pour le G6P (cf annexe 3.2, [Figure 57](#)).

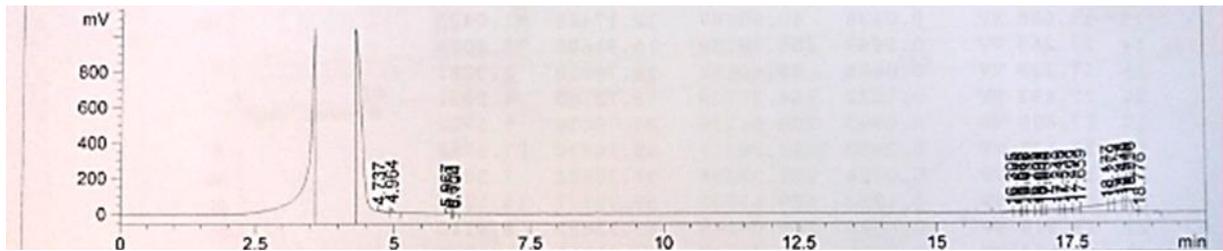


Figure 58 : Chromatogramme obtenu après l'éluion d'une solution composée de 17.8 mM G6P, 41.8 mM ATP, 44.4 mM tampon phosphate à pH 7.25, 49,3 mM NaOH, 8.9 mM HCl et 5 % D₂O avec un gradient 5 à 20 % d'ACN (solution A).

Pour augmenter les temps de rétention de l'ATP et de l'ADP, afin de les séparer du G6P, nous nous sommes intéressés à la polarité des molécules d'ATP et d'ADP. En effet, la différence de polarisabilité entre le G6P ($20,56 \text{ \AA}^3$)¹⁶⁸ de l'ATP et de l'ADP (respectivement $38,92 \text{ \AA}^3$, $34,24 \text{ \AA}^3$)^{169,170} semble suffisante pour isoler le G6P. Nous avons donc utilisé des groupements polaires greffés sur la colonne hydrophobe pour tenter d'augmenter les temps de rétentions de l'ATP et de l'ADP.¹⁷¹ Nous avons donc utilisé un mélange de tampon phosphate et de TBAHS (tétrabutylammonium hydrogensulfate) comme éluant et un gradient d'ACN de 2 à 30 % pendant 35 min avec un débit de 2 mL/min pour isoler le G6P issu de la solution A. Le tampon phosphate à ~ 40 mM sature le détecteur ELSD. Même avec une dilution du tampon phosphate d'un facteur 10, le détecteur est saturé (Figure 59). Sachant que seulement ~ 9 % de la solution réactionnelle a été injectée, une dilution de cette solution n'a pas été envisagée. Les groupements polaires de la colonne sont donc inutiles dans la rétention des différents composés.

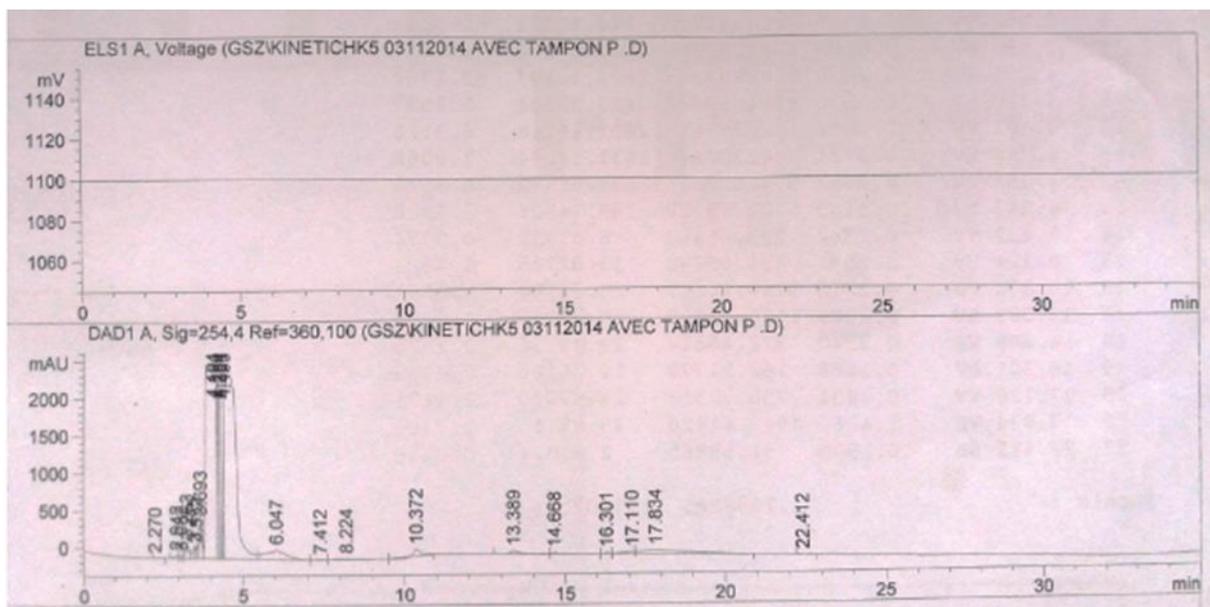


Figure 59 : Chromatogramme obtenu après l'éluion d'une solution composée de 17.8 mM G6P, 41.8 mM ATP, 44.4 mM tampon phosphate à pH 7.25, 49,3 mM NaOH, 8.9 mM HCl et 5 % D₂O avec un gradient 5 à 20 % d'ACN (solution A). Le tampon phosphate contenu dans la solution d'éluion est de 19,5 mM à H 7.

Nous avons alors tenté de revenir à l'utilisation de la colonne hydrophobe C18 et d'améliorer la séparation des métabolites que nous avons observée avec un gradient de 5 à 20 % d'ACN en 20 min (Figure 57). Les essais présentés dans la section suivante ont donc été réalisés sur une colonne Proto C18 de diamètre 5 µm et de taille 100 × 4,6 mm dans notre laboratoire.

Les HPLC analytiques et semi préparatives de notre unité, équipées uniquement de détecteurs UV-vis, ne permettent pas de détecter le G6P. Avant de déterminer la méthode de détection, des solutions, d'ATP, d'hexokinase, d'ATP/ADP ont été utilisées pour évaluer la possible rétention et séparation sur cette colonne. Différents gradients d'H₂O+TFA/ACN+TFA (TFA = Acide trifluoroacétique et ACN = Acétonitrile) : 5-50 %, 0-10 %, 0-5 %, 0-2 %, isocratiques à 0 %, 2 % et 5 % ont été testés (annexe 3.3).

Les résultats montrent que l'enzyme est retenue sur la colonne à 50 % d'ACN. L'ADP est toujours co-élués dans le pic du solvant, même à de très faibles concentrations d'ACN. En revanche le chromatogramme obtenu après l'éluion d'ATP, montre deux pics : l'un correspondant au pic du solvant et l'autre à $t_r = 4,2$ min correspondant potentiellement à l'ATP (Figure 60 et Figure 61). Une infime affinité du G6P pour la colonne C18 pourrait donc être suffisante pour séparer le sucre phosphorylé des composants présents dans le mélange

réactionnel, entre le pic du solvant et celui de l'ATP. Cependant, en l'absence d'une méthode de détection du G6P, nous ne pouvons pas savoir si une co-élution du G6P avec l'ATP et l'ADP existe. La recherche d'une méthode de détection a donc été nécessaire pour valider ce protocole de purification.

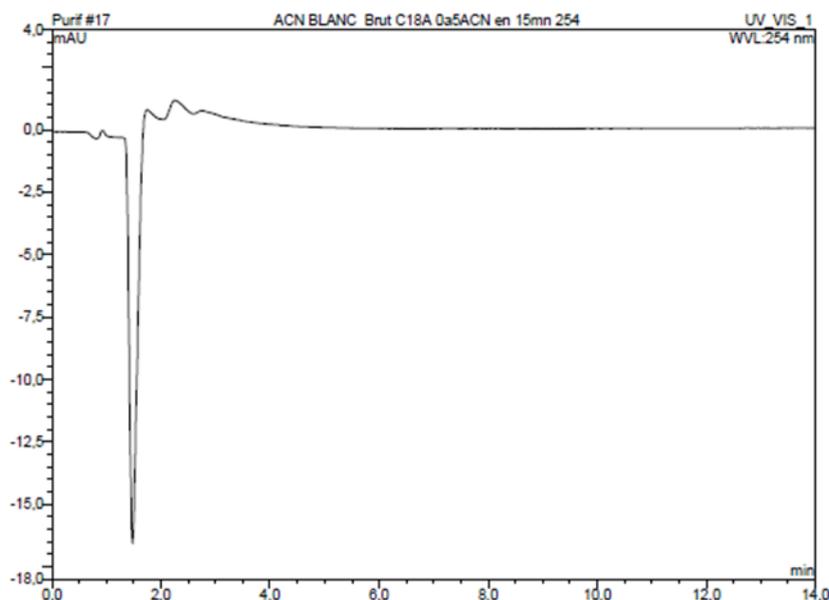


Figure 60 : Chromatogramme obtenu à $\lambda = 254$ nm, 260 nm et 280 nm après l'élution d'ACN pur dans une colonne Proto C18 de diamètre 5 μ m et de taille 100 \times 4,6 mm. Les deux solutions d'élutions qui ont été utilisées sont : solution A = H₂O et solution B = ACN (acétonitrile). Un gradient d'élution de 0 % à 5 % de solution B a été réalisé pendant 15 min.

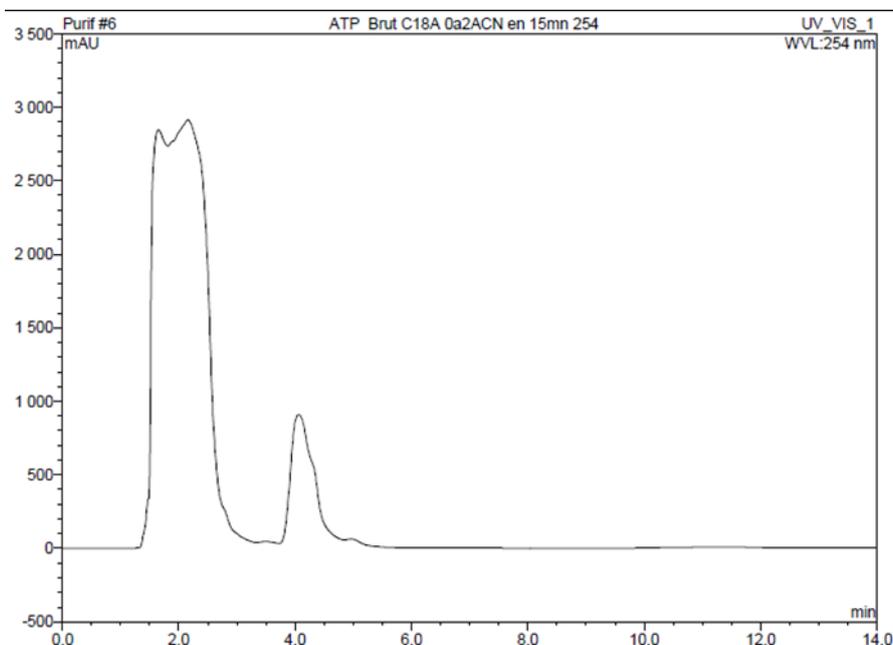


Figure 61 : Chromatogramme obtenu à $\lambda = 254$ nm, 260 nm et 280 nm après l'élution d'une solution aqueuse contenant 10 mM ADP. L'élution s'est effectuée dans une colonne Proto C18 de diamètre 5 μ m et de taille 100 \times 4,6 mm. Les deux solutions d'élutions qui ont été utilisées sont : solution A = H₂O et solution B = ACN (acétonitrile). Un gradient d'élution de 0 à 2 % de solution B a été réalisé pendant 15 min.

La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) permet de tester et d'analyser rapidement (1 goutte par solution pour 56 « spots » disponibles) la présence de molécules issues de fractions de solution obtenue par HPLC.

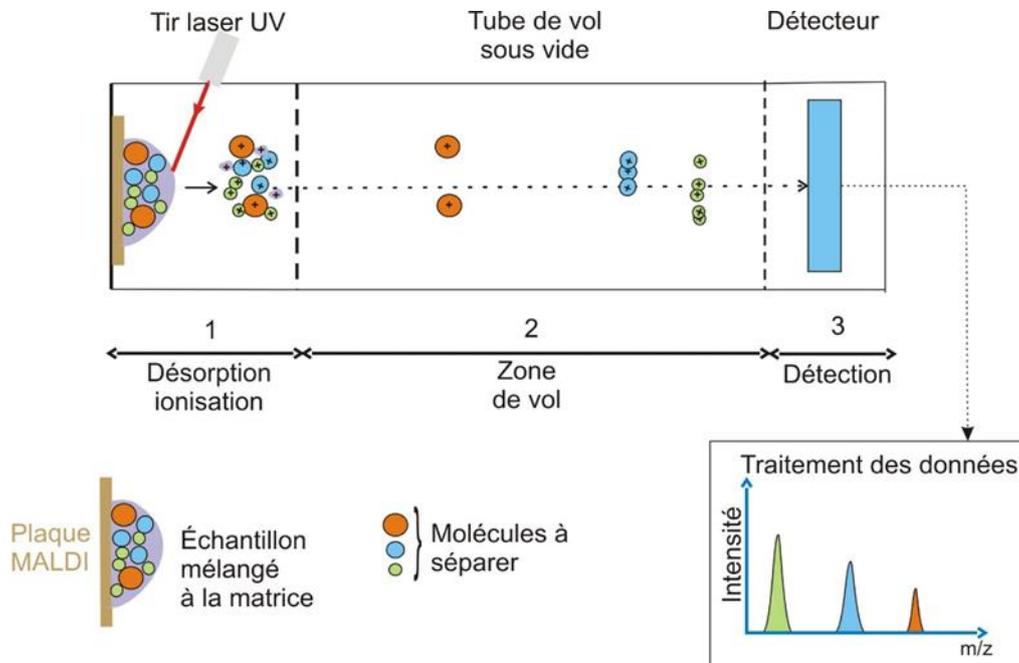


Figure 62 : Schéma du principe de la spectrométrie de masse en Mald-Tof.^{172,173} L'échantillon est mélangé à une matrice (choisi en fonction des molécules à étudier). Sous l'action de tirs laser ce mélange se vaporise. En fonction du mode choisi, il se forme des ions moléculaires de charges positives ou négatives. Les ions moléculaires sont accélérés vers un tube de vol sous vide. Ils traversent le tube jusqu'au détecteur à une vitesse proportionnelle au rapport masse sur charge (m/z). Les molécules en faible poids moléculaire atteindront le détecteur en premier. Le détecteur transforme l'intensité ionique en intensité électrique. Le traitement des données permet d'obtenir un spectre : intensité = $f(\text{temps de vol})$ ou intensité = $f(m/z)$.

Les détections des ions du G6P à $m/z = 259$, de l'ATP à $m/z = 505$ et de l'ADP à $m/z = 426$ sont obtenues en mode négatif ($[M-H]^-$) avec le 9-aminoacridine comme matrice (annexe 3.5).¹⁷⁴ Les spectres de masses montrent une fragmentation importante et récurrente de l'ATP en ADP. En présence de sel (NaCl), le G6P s'ionise beaucoup moins (Figure 63). La raison de cette ionisation plus faible du G6P est difficilement explicable du fait que le processus d'ionisation en MALDI est encore mal connu.¹⁷² Par ailleurs, une dilution est nécessaire pour que la concentration en sel soit moins importante et ne puisse gêner le processus d'ionisation du produit désiré. Ainsi, même à faible concentration, le G6P s'adsorbe sur la matrice (9-aminoacridine). Les deux pics caractéristiques du phosphate sont observés à $m/z = 79,4$ et $m/z = 97,5$ provenant du G6P et du tampon phosphate (Figure 63). Cette méthode rapide permet d'observer l'ensemble des molécules composant le mélange post phosphorylation.

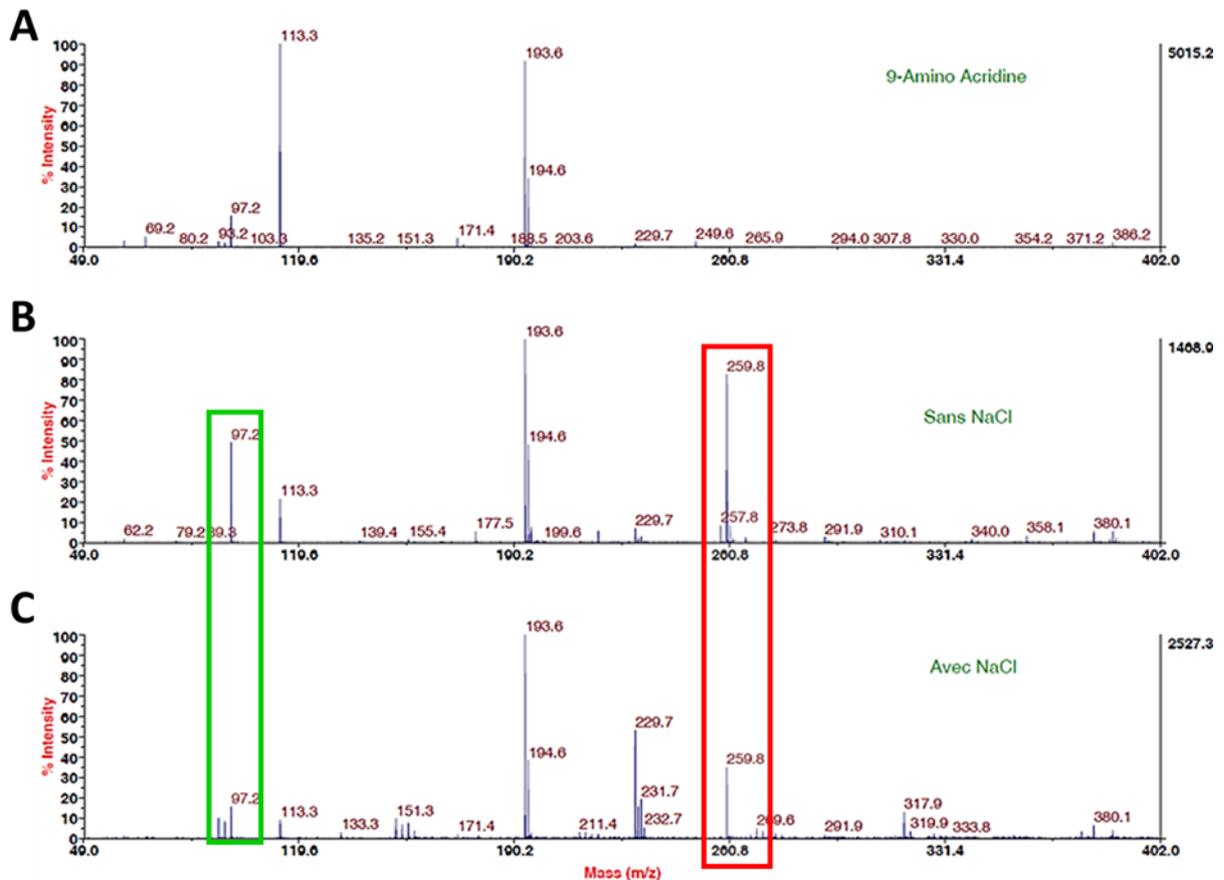


Figure 63 : Spectre de Masse obtenue avec la matrice seule (A), avec une solution composée de 5 μM G6P et 5 μM de tampon phosphate (B) et avec une solution composée de 5 μM G6P, 5 μM de tampon phosphate et 250 μM de tampon phosphate (C). L'encadré rouge représente le pic m/z du G6P. L'encadré vert représente le pic m/z du phosphate.

Maintenant que nous possédons une méthode de détection adéquate pour observer le G6P de l'ATP et de l'ADP, nous l'avons utilisé pour évaluer nos essais de purifications par HPLC analytique sur la colonne hydrophobe. Des mélanges de différentes molécules qui composent la solution réactionnelle enzymatique ont été injectés. Aucune séparation significative n'a été obtenue entre les différents composés (Figure 64). D'autres tests ont été réalisés en supprimant le TFA des deux éluants, qui masque les charges en protonant les phosphates, et en ajoutant du Mg^{2+} pour augmenter sélectivement l'hydrophobicité de l'ATP et de l'ADP (Figure 65). Toutefois, aucun de ces changements n'a été concluant. La colonne hydrophobe C18 ne permet pas de séparer le G6P de l'ATP, de l'ADP et du tampon phosphate dans les nombreuses conditions testées.

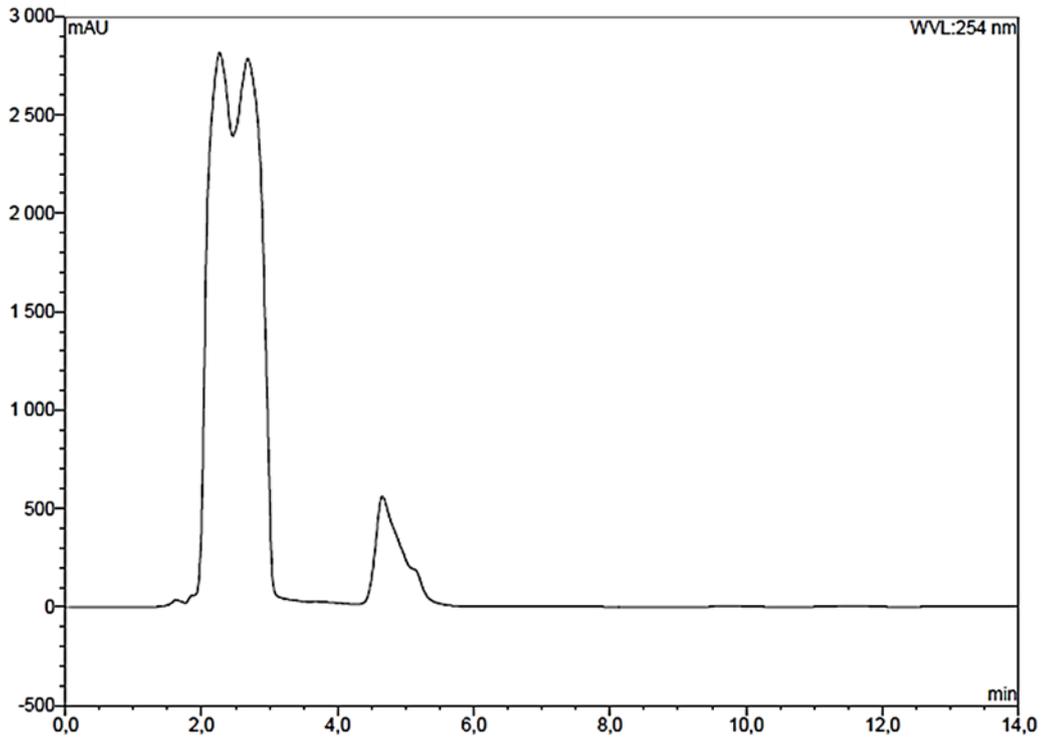


Figure 64 : Chromatogramme obtenu à $\lambda = 254 \text{ nm}$, 260 nm et 280 nm après l'élution d'une solution composée de 17.8 mM G6P , 42 mM ATP , 44.4 mM tampon phosphate à $\text{pH } 7.25$, $24,6 \text{ mM NaOH}$, $4,4 \text{ mM HCl}$ et 5% D_2O . L'élution s'est effectuée dans une colonne Proto C18 de diamètre $5 \mu\text{m}$ et de taille $100 \times 4,6 \text{ mm}$. Les deux solutions d'élutions qui ont été utilisées sont : solution A = H_2O et solution B = ACN (acétonitrile). Un gradient d'élution de 0 à 5% de solution B a été réalisé pendant 15 min .

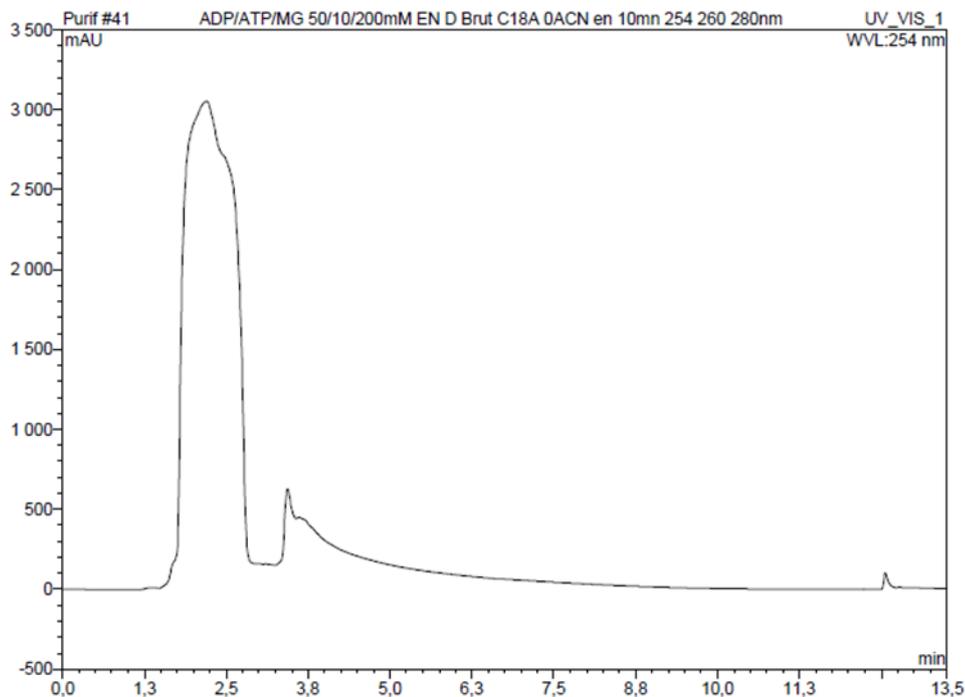


Figure 65 : Chromatogramme obtenu à $\lambda = 254 \text{ nm}$, 260 nm et 280 nm après l'élution d'une solution aqueuse contenant 50 mM ATP , 10 mM ADP et 200 mM MgCl_2 . L'élution s'est effectuée dans une colonne Proto C18 de diamètre $5 \mu\text{m}$ et de taille $100 \times 4,6 \text{ mm}$. Les deux solutions d'élutions qui ont été utilisées sont : solution A = H_2O et solution B = ACN (acétonitrile). Une élution isocratique avec 0% de solution B a été réalisée pendant 10 min .

L'ensemble des conditions expérimentales testées n'a pas permis d'isoler le G6P du mélange post-réactionnel. Une approche FPLC sur une colonne échangeuse d'ions a ainsi été testée.

3.3.1.1.2 La colonne Cationique

L'ATP, l'ADP, l'Hexokinase et le G6P peuvent s'ioniser en fonction du pH. Grâce à leurs différences de pKa, ces molécules peuvent présenter des différences de charges et être séparées à l'aide d'une colonne d'affinité échangeuse d'anions (Figure 66).¹⁷⁵

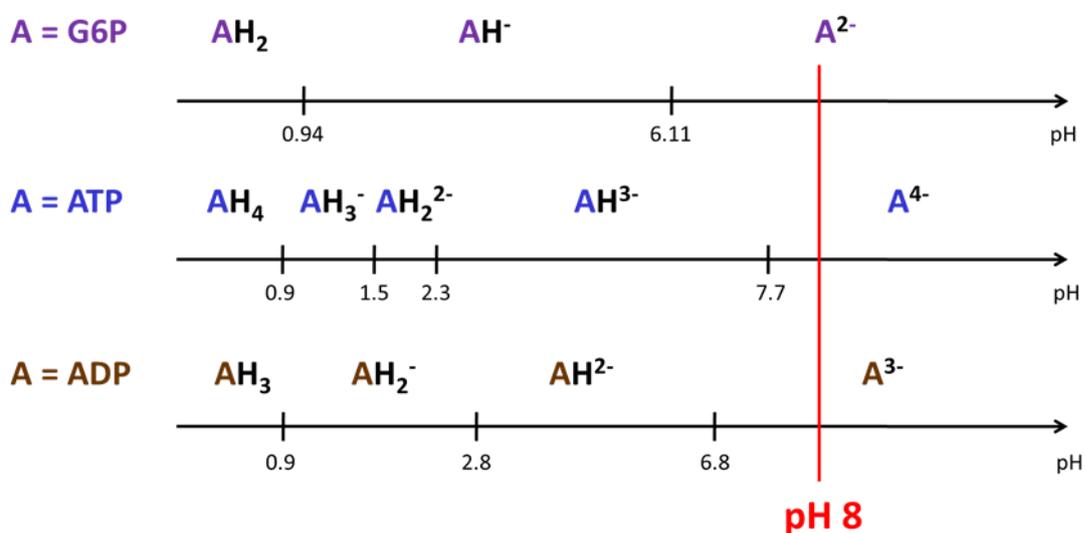


Figure 66 : Représentation des différents états acido-basiques du G6P (en violet), de l'ATP (en bleu) et de l'ADP (en marron) en fonction de leurs pKa.

Les travaux de P.A Ockerman montrent qu'il est possible de séparer des intermédiaires glycolytiques phosphorylés, du glycogène, du glucose et des nucléotides dans un même mélange à l'aide d'un gradient linéaire de NaCl + Tampon phosphate, d'une deuxième solution d'élution contenant du tampon phosphate et d'une colonne « maison » composée de Sephadex.¹⁷⁶ Nous avons donc appliqué ce protocole d'élution sur une colonne MonoQ (GE) placée dans une FPLC. Cette colonne est une échangeuse d'anion. Sa matrice contient des groupements ammonium quaternaire qui lui permettent de retenir les molécules chargées négativement. Ce système possédant seulement des lampes UV et une électrode, la détection du G6P a été réalisée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF), après collection des différentes fractions. La longueur d'onde UV de la première lampe a été calibrée au maximum

d'absorbance de l'ATP, c'est-à-dire à $\lambda = 280$ nm. Une première injection de G6P à 2 mM à pH 7 a été réalisée (annexe 3.4). Cette première tentative s'est soldée par un échec puisque le sucre phosphorylé n'a pas été retenu par la colonne. Le tampon phosphate des éluants, qui entre en compétition avec le G6P pour se fixer sur le groupement ammonium de la colonne, a pour cette raison été remplacé par de l'eau milliQ. Cette fois, le G6P a été élué au bout d'1 heure, correspondant à une concentration de la phase mobile de 25 mM en NaCl. La durée de l'élution et le gradient NaCl ont été réduits respectivement à 3 h et 0 à 30 % de NaCl (annexe 3.4).

Avec ces conditions d'élution, une injection d'un mélange, à pH 7, composé de 6 mM G6P, 1 mM ATP, 6 mM ADP et 394 mM tampon phosphate montre une saturation du signal UV lors de l'injection (annexe 3.4, [Figure 67](#)). L'ensemble des composés a d'ailleurs été détecté dans le tube de chargement (correspondant au temps de l'injection de la solution dans la colonne). Une partie du G6P a également été éluée dans les 4 premières fractions (entre 19 min et 39 min soit entre 0 % et 3,3 % NaCl). Les premier et second pics UV détectés après le démarrage du gradient correspondent respectivement à l'ADP (fraction 9 à 21, 8 % à 17 % NaCl) et l'ATP (fraction 23 à 35, 19 % à 28 % NaCl).

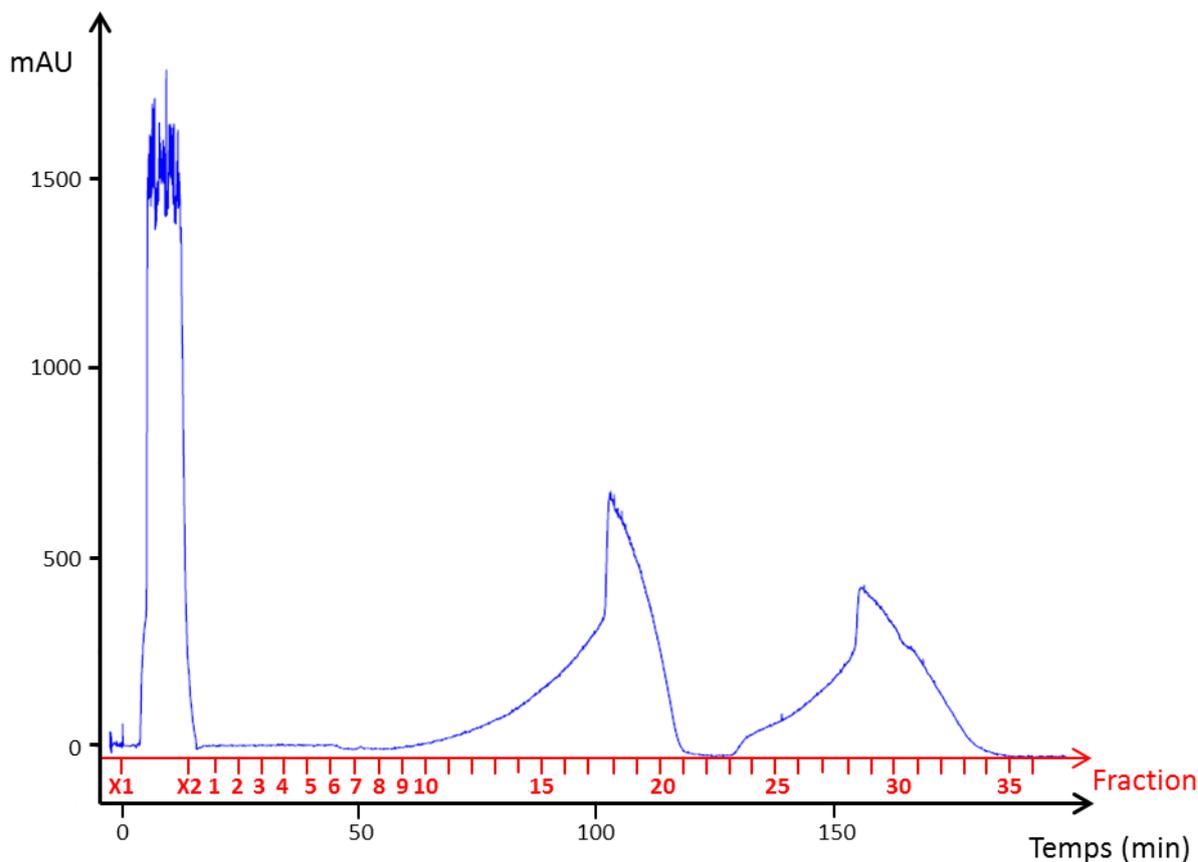


Figure 67 : Spectre d'absorbance obtenue à $\lambda = 280 \text{ nm}$ lors de l'éluion d'une solution composée de 60 mM G6P, 10 mM ATP, 60 mM ADP et 394 mM tampon phosphate.

L'utilisation d'un mélange 10 fois moins concentré a permis d'éviter la saturation de la colonne (Figure 68). Cette dilution correspond aux 30 μmoles de G6P nécessaire pour la polarisation. Ainsi, une purification nous permettrait de réaliser une expérience D-DNP. Le G6P est le seul métabolite à être détecté dans la fraction correspondant au chargement, suggérant que le tampon phosphate est de nouveau responsable de sa faible rétention. Toutefois, une plus grande quantité de G6P est élué dans les fractions 2 à 4 (entre 16 et 31 min), ainsi que le tampon phosphate. L'ADP et l'ATP sont élués respectivement entre 80-121 min (fraction 15 à 23, 12,6 % à 20,4 % NaCl) et 156-186 min (fraction 30 à 37, 24,6 % à 30 % NaCl) (Figure 68).

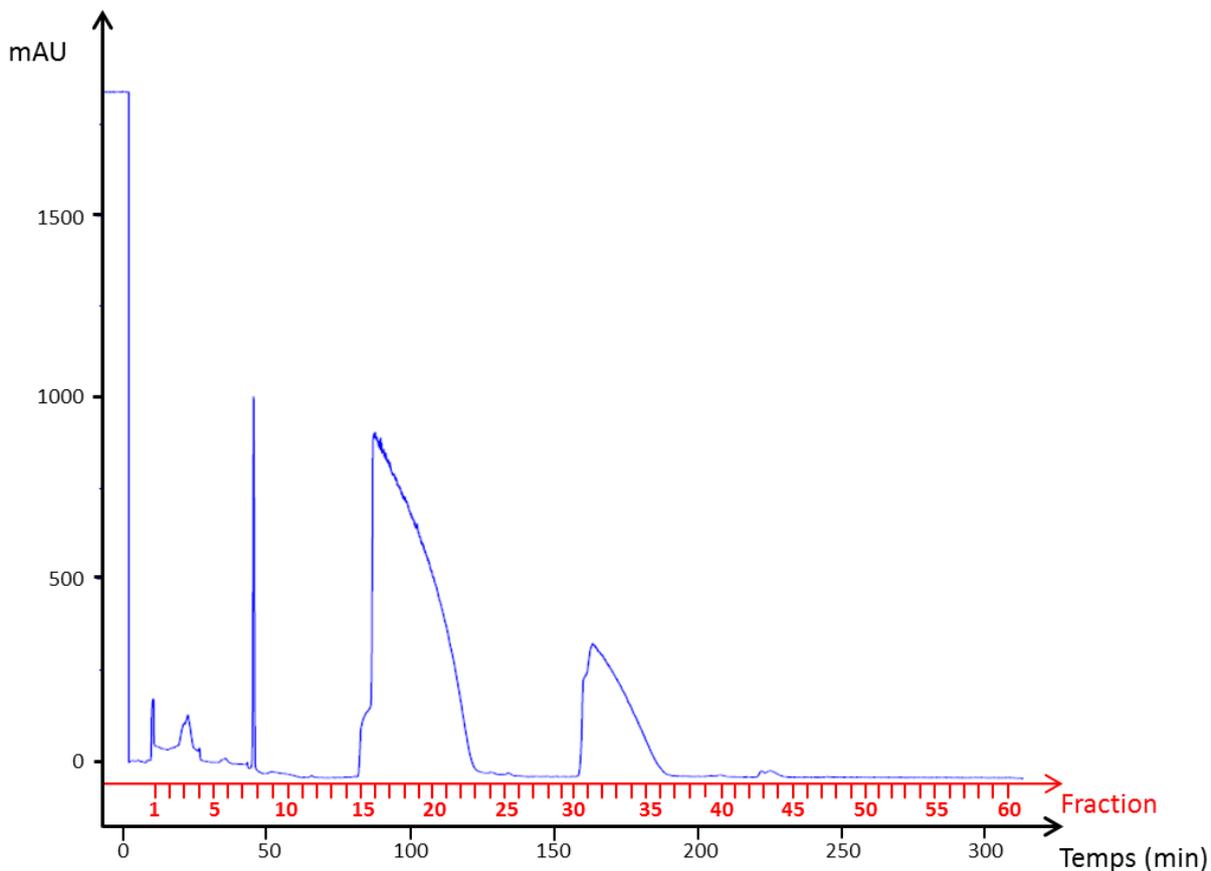


Figure 68 : Spectre d'absorbance obtenue à $\lambda = 280$ nm lors de l'élution d'une solution composée de 6 mM G6P, 1 mM ATP, 6 mM ADP et 394 mM tampon phosphate.

Leurs absences dans la fraction de chargement montrent qu'ils ne sont pas perturbés par la présence de phosphate. En effet, ces deux molécules possèdent respectivement 2 et 3 groupements phosphates. Ils sont plus chargés négativement que le phosphate et le G6P qui ne possède qu'un seul groupement phosphate. Le spectre d'absorption UV montre le même profil d'élution à $\lambda = 280$ nm que précédemment (**Figure 67 et Figure 68**). L'analyse qualitative réalisée en spectrométrie de masse confirme que l'élution de l'ADP et de l'ATP correspondent respectivement aux deux pics d'absorption obtenus. Par ailleurs, la présence d'AMP est détectée dans certaines fractions contenant l'ADP ou l'ATP, provenant probablement de la déphosphorylation spontanée de l'ATP. En effet, le spectre RMN ^1H montre, dans la région des aromatiques, une distance caractéristique pour l'AMP de 0,32 ppm entre les pics correspondant aux protons aromatiques de la fonction nicotinamide a été observée (**Figure 69**). Pour l'ADP et l'ATP cette différence de ppm est identique et vaut 0,24 ppm. De plus, l'analyse par RMN de l'ATP utilisée pour notre synthèse enzymatique du G6P a confirmé la présence d'AMP.

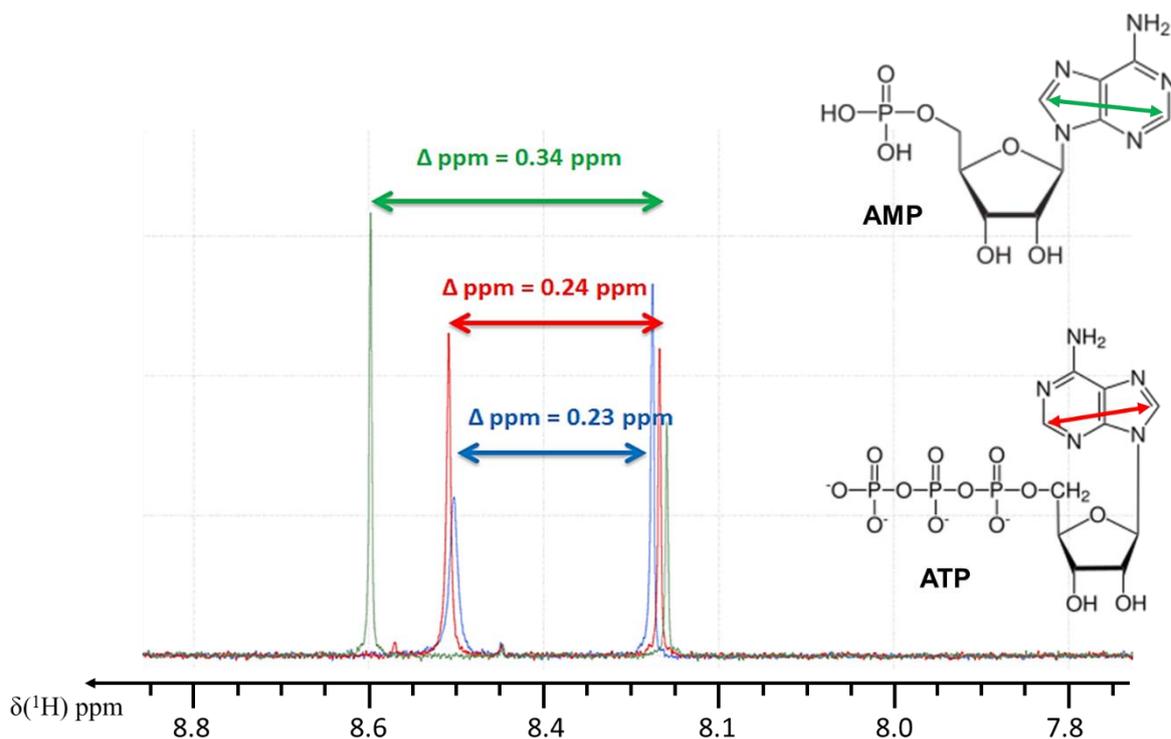


Figure 69 : Agrandissement sur la région aromatique des spectres ^1H obtenus sur différentes fractions de purification. La distance entre les deux pics correspondants aux 2 H aromatiques est représentée sur l'ATP (en bleu), l'ADP (en rouge) et l'AMP (en vert).

Nous avons décidé de remplacer le tampon phosphate par un tampon Tris pour éviter la saturation de la colonne. Le pH de la solution pré-injection a été augmenté à pH 11 pour augmenter la rétention du G6P (Figure 66). Dans ces conditions, le G6P est élué de la fraction de chargement à la fraction 8 (entre 0 min et 40 min). Cependant, la séparation n'est pas parfaite, de l'ADP est également détecté dans les fractions 7 et 8 (entre 30 et 40 min). Pour connaître le rendement de la purification, une analyse quantitative a été réalisée par RMN ^1H avec l'ajout de DSS (acide 4,4-diméthyl-4-silapentane-1-sulfonique) dans les fractions contenant le G6P (annexe 3.6). Cette quantification indique que 34,7 % de G6P se trouve dans la fraction de chargement et que seulement 9,6 % d'AMP se retrouve co-élué avec 29,8 % de G6P.

La RMN permet également d'observer le carbone ou le phosphore. L'analyse qualitative et la quantification peuvent donc être obtenues par la RMN. L'analyse par spectrométrie de masse a été abandonnée.

La purification sur une colonne cationique par FPLC nous a permis d'isoler le G6P des autres molécules présentes à l'issue de sa synthèse enzymatique. Nous avons pu tester un

protocole de synthèse du G6P suivi d'une purification. Les résultats sont décrits dans la suite de ce chapitre.

3.3.1.2 Tests du protocole synthèse et purification

Le protocole de purification étant optimisé, les premières purifications de [U-¹³C-D₇]-G6P produit par synthèse enzymatique ont commencé. La première synthèse enzymatique a été réalisée dans du tampon Tris qui maintient l'hexokinase à son pH optimal, pH 7.5-9 (annexe 3.7). La réaction enzymatique a été réalisée avec 1,2 équivalent d'ATP rapport au G6P. La réaction est totale lorsque 0,2 équivalents d'ATP et 1 équivalent d'ADP sont obtenus. Pour vérifier que la synthèse de G6P est terminée, la solution post-réactionnelle est analysée par ³¹P-RMN. La région du spectre qui regroupe le signal du P_α, un des phosphores communs à l'ATP et l'ADP, est intégrée. La valeur d'intégration est calibrée à une valeur de 100. Cette valeur de 100 correspond aux 1,2 équivalents d'ATP insérés en début de réaction. L'intégrale qui regroupe les deux P_α de l'ATP et de l'ADP est ensuite coupée de manière à ce que deux intégrales apparaissent respectivement pour le P_α de l'ATP et pour P_α de l'ADP. Ainsi deux valeurs apparaissent. Ces deux valeurs reflètent directement la proportion d'ATP et d'ADP produit. Si une valeur proche de 20 est obtenue pour l'intégration de l'ATP, ce qui correspondrait à 0,2 équivalents d'ATP, la réaction est considérée comme totale (**Figure 70**).

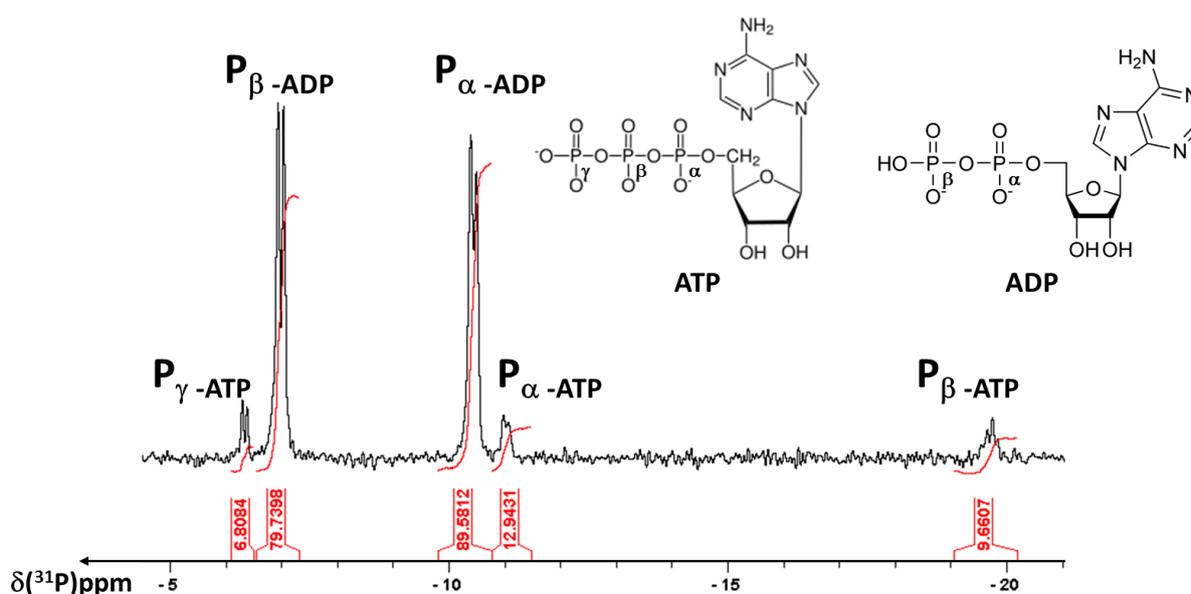


Figure 70 : Spectre ³¹P obtenu au cours de la réaction de phosphorylation du [U-¹³C-D₇]-Gluc en [U-¹³C-D₇]-G6P.

La purification de cette solution post réactionnelle montre le même profil UV lors de l'élution que celui obtenu dans les tests préliminaires. Deux pics correspondent à l'ADP et de l'ATP (**Figure 71**). Le pic correspondant à l'AMP détecté en UV entre 40 min et 55 min (dans les fractions 7 à 9) montre que cette molécule reste plus longtemps retenue que précédemment.

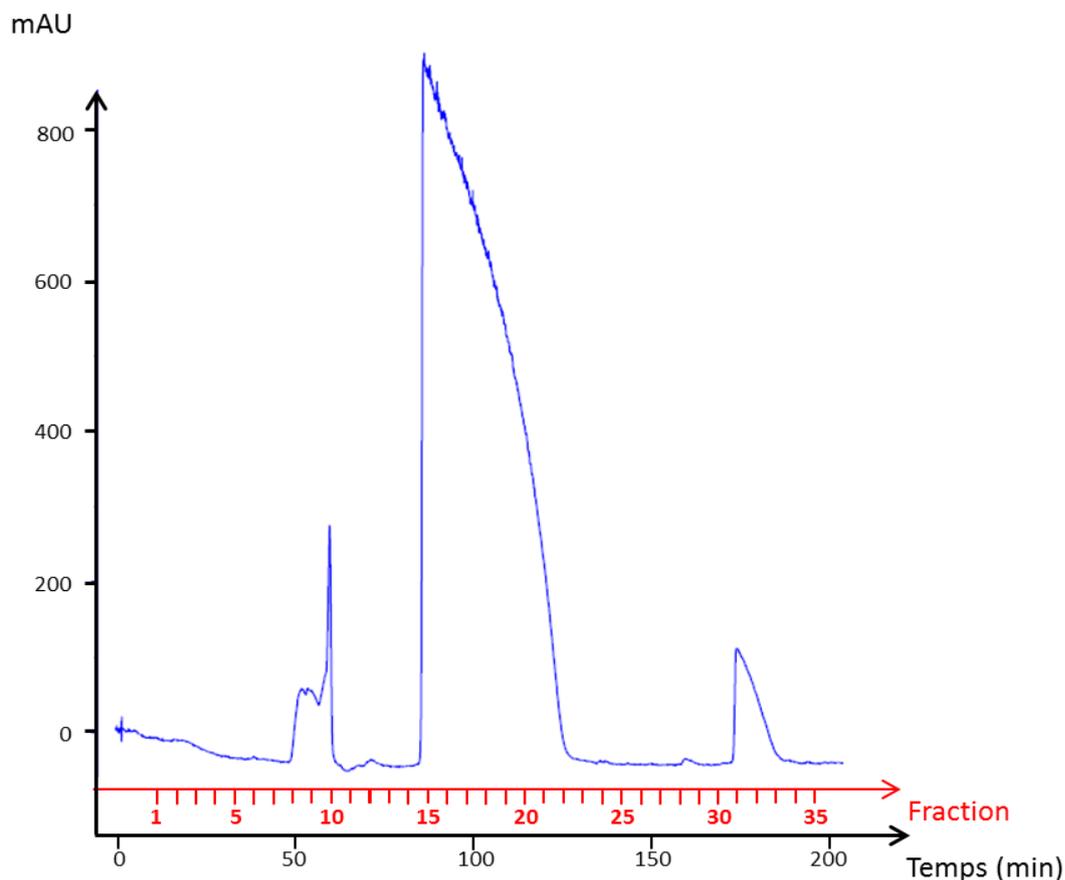


Figure 71 : Spectre d'absorbance obtenue à $\lambda = 280$ nm lors de l'élution d'une solution de pH 10,71 composée de 9 mM de G6P, 55.4 mM d'ATP, 55 mM $MgCl_2$, 21 mM NaOH, 11 mM Tampon Tris à pH 7 et 0.17 U d'hexokinase.

L'analyse quantitative par RMN révèle la présence de G6P dans les fractions 5 à 8 (entre 30 min et 50 min) avec une forte concentration d'AMP dans les mêmes fractions. La proportion d'AMP comparée à celle du G6P varie de 27 % dans la fraction 6 (entre 35 min et 40 min) à 50 % dans la fraction 8 (entre 45 min et 50 min) (**Figure 72**). Ces résultats sont en accords avec les mesures d'absorbance UV obtenues pour les fractions 7 à 9 (entre 40 min et 55 min). Le rendement total obtenu est de 65 %.

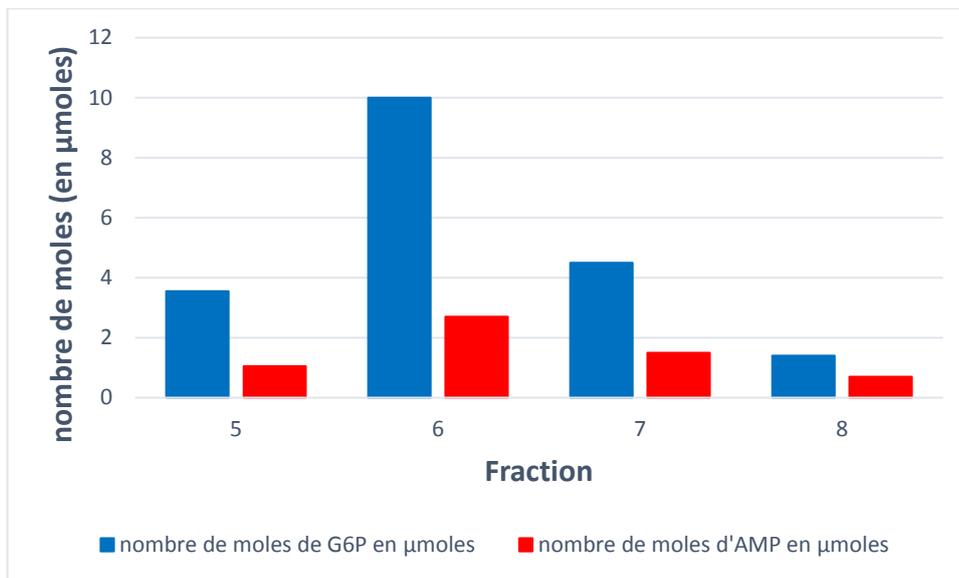


Figure 72 : Graphique représentant le nombre de moles obtenu pour le G6P (en bleu) et pour l'AMP (en rouge) dans les fractions 5 à 8 issues de la purification en présence du tampon Tris.

Pour essayer d'augmenter la pureté du G6P, nous avons réalisé une synthèse enzymatique dans un tampon Hepes. La caractérisation des fractions obtenues après purification montrent une élution un peu plus étendue du G6P entre les fractions 4 et 8 (**Figure 73**, annexe 3.8.1). L'absorption du premier des trois pics d'absorption UV est ici plus faible que précédemment (**Figure 74**). Cette observation est confirmée par l'analyse quantitative qui montre que la proportion d'AMP par rapport au G6P est seulement de 10 à 13 %. Ce tampon permet donc une meilleure purification du G6P, avec dans ce cas un rendement de 85 %.

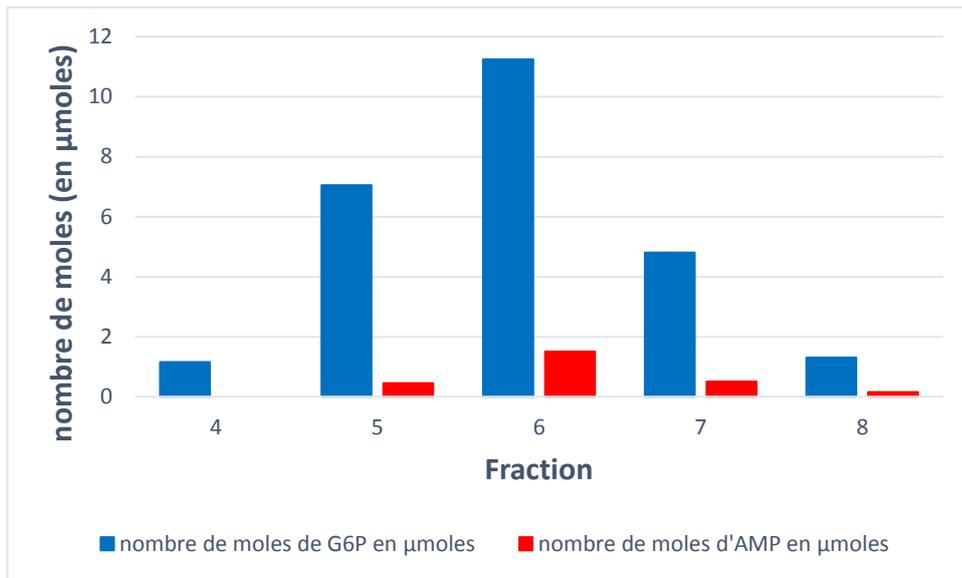


Figure 73 : Graphique représentant les concentrations de G6P (en bleu) et d'AMP (en rouge) obtenues dans les fractions 4 à 8 issues de la purification en présence du tampon Hepes.

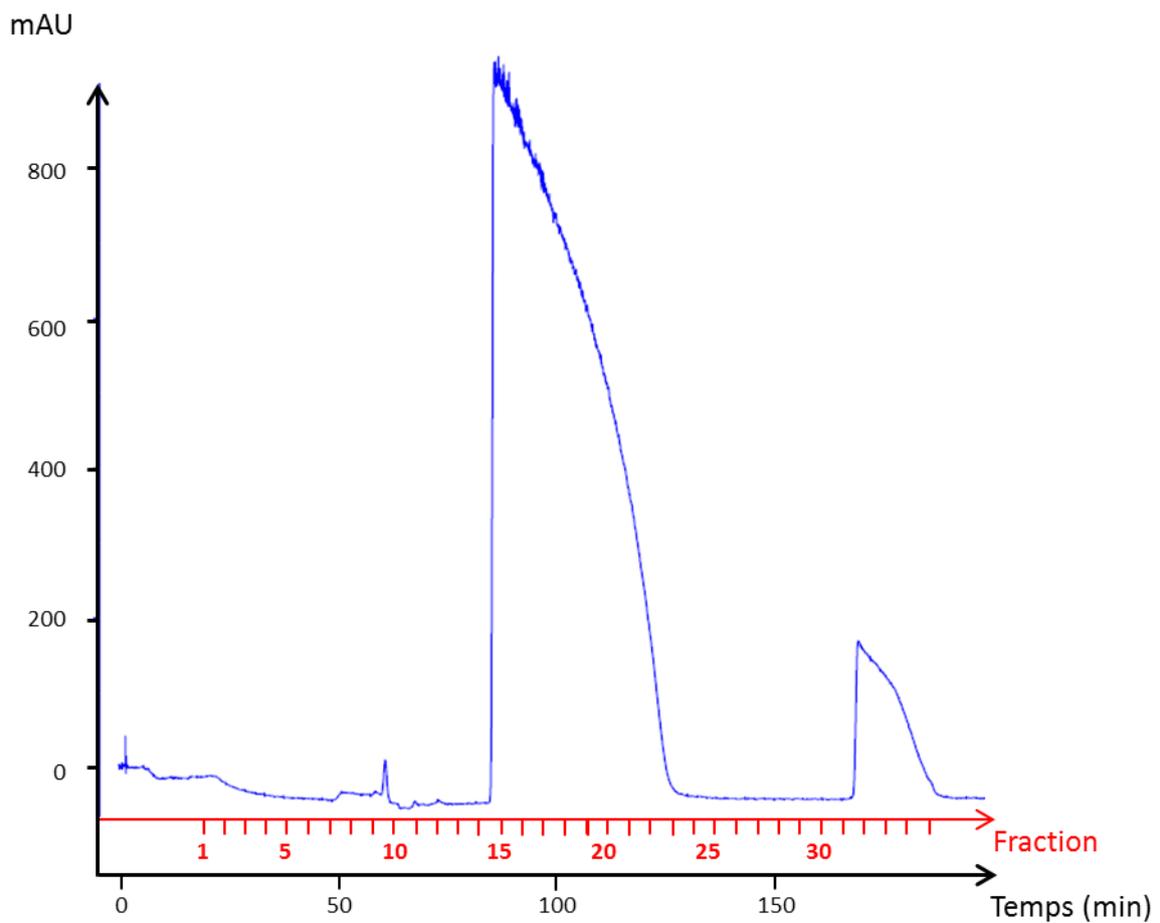


Figure 74 : Spectre d'absorbance obtenue à $\lambda = 280 \text{ nm}$ lors de l'élution d'une solution de pH 10,94 composée de 60 mM de G6P, 80 mM d'ATP, 80 mM MgCl_2 , 37 mM NaOH, 22 mM d'Hepes et 0.17 U d'hexokinase.

Cette différence de rendement est surprenante. Comme expliqué plus haut, chaque réaction post-réactionnelle a été basifiée à un pH ~ 10 pour permettre une meilleure rétention du G6P par rapport à l'AMP, l'ATP et l'ADP. Le tampon Tris est un 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol. Son pKa étant de 8,30, à pH ~ 10, le tampon Tris est majoritairement sous sa forme non chargée. Le tampon Hepes est un acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique. Son pKa étant de 7,55, à pH ~ 10, le tampon Hepes est majoritairement sous sa forme anionique. La colonne anionique possède un groupement ammonium quaternaire qui est cationique. Une interaction électrostatique ou interaction charge-charge s'effectue entre le tampon Hepes et le ligand de la colonne. Le tampon Tris qui est neutre ne peut interagir avec la colonne. Il est donc étrange que le changement de tampon soit responsable d'un meilleur rendement.

Une fois le protocole de synthèse et de purification établie, un nouveau test est réalisé dans les mêmes conditions pour observer la reproductibilité de la méthode (annexe 3.7.2). Le rendement obtenu est ici de 70 %. Cependant, l'élution du G6P est de nouveau plus étendue, puisque le G6P se retrouve également dans les fractions 2 et 3 en plus des fractions 4 à 8 (**Figure 75**). Une proportion plus importante de 14 à 16 % d'AMP par rapport au G6P est observée. Cependant, la présence de l'AMP est plus faible puisqu'elle est observée seulement dans les fractions 5 à 7. Une différence de rendement de 15 % est obtenue entre les deux protocoles utilisant le tampon Hepes. Cette fois 5 % de rendement sépare le test de reproductibilité et la synthèse-purification réalisé avec le tampon Tris. Le tampon n'est donc pas responsable de cette différence de rendement. Cette faible valeur provient probablement de la perte de [U-¹³C, D₇]-G6P qui, lors de l'acidification de la solution post réactionnelle, précipite avec les ions présents en solution. En effet, un précipité blanc s'est formé lors de l'ajout de NaOH à 1M. Ce précipité est dû à la complexation des différentes molécules anioniques présentes dont le G6P à l'ion magnésium. Plusieurs augmentations de pH suivis de centrifugations ont été nécessaires pour pouvoir obtenir une solution limpide nécessaire à l'injection dans la FPLC. Malgré tout, nous avons réussi à purifier la majorité du G6P obtenu par synthèse enzymatique.

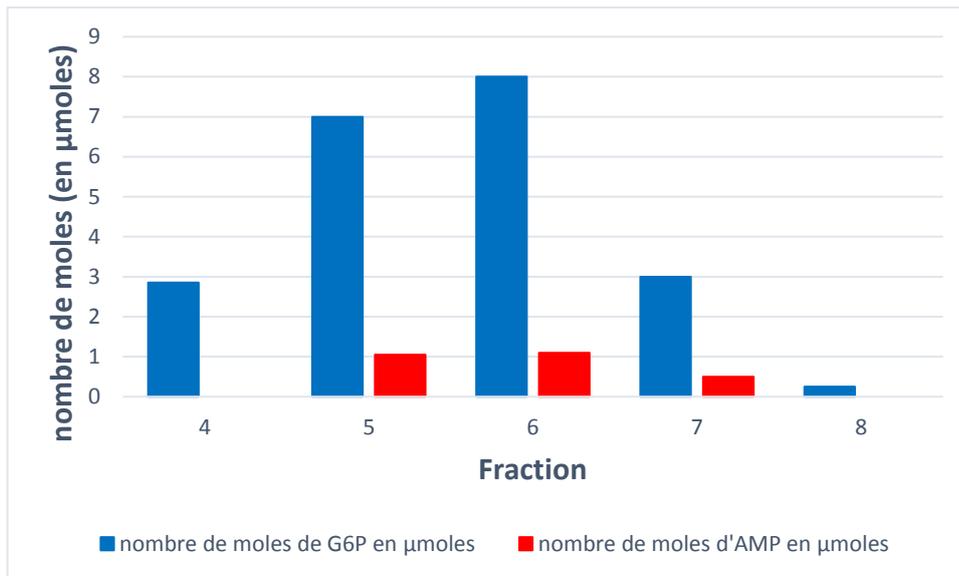


Figure 75 : Graphique représentant les concentrations de G6P (en bleu) et d'AMP (en rouge) obtenues dans les fractions 4 à 8 issues de la 2^{ème} purification en présence du tampon Hepes.

Pour connaître les conséquences de la présence de l'AMP sur la polarisation, des expériences de D-DNP ont été réalisées. Les résultats ont montré que l'AMP ne présentait aucune perturbation à la polarisation du G6P (courbe noir de la Figure 76).

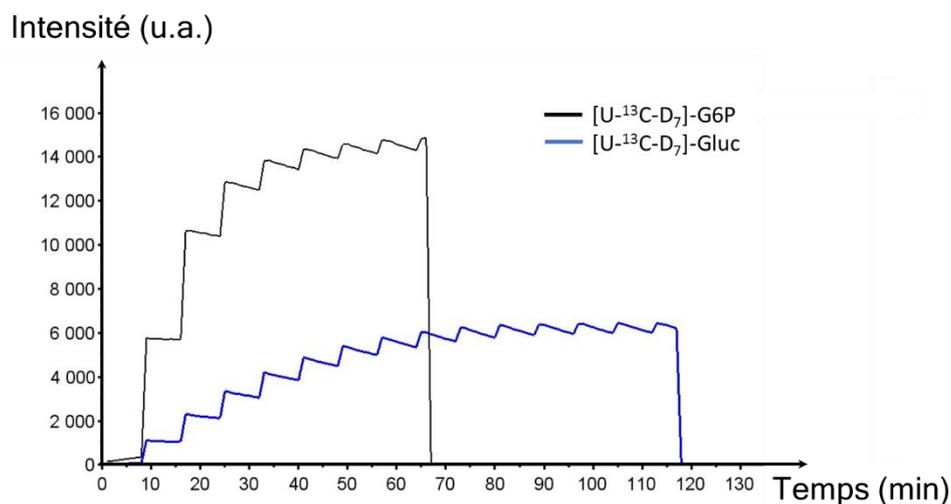


Figure 76 : Comparaison entre les polarisations ¹³C obtenues lors d'une expérience de polarisation croisée entre le ¹H et le ¹³C sur du [U-¹³C-D₇]-Glucose (en bleu) et sur du [U-¹³C₇-D₇]-G6P (en noir). La quantité en Tempol est la même dans les deux échantillons. Ces deux expériences ¹³C ont été réalisées à 1.2 K dans un champ magnétique B₀ = 6.7 T. Les impulsions de 90° pour le ¹³C et ¹H sont de 5 μs avec les puissances P_{90°}(¹H) = 49 W et P_{90°}(¹³C) = 280 W pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose et P_{90°}(¹H) = 63 W et P_{90°}(¹³C) = 250 W pour le [U-¹³C₇-D₇]-G6P. La durée de la CP est de 4 ms pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose et de 3 ms pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose. La dernière impulsion de 5 ° pour détecter la polarisation du ¹³C est de 0.864 W pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose et de 0.77 W pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose.

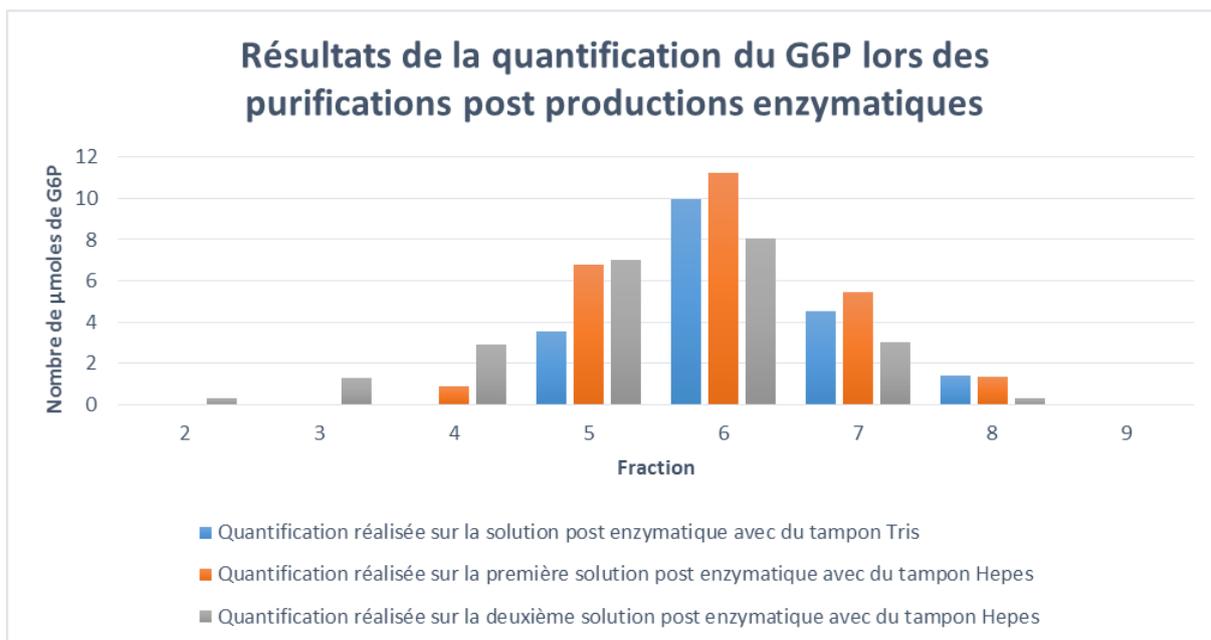


Figure 77 : Graphique représentant les quantités de G6P obtenues lors des purifications réalisées dans le tampon Tris (en bleu) et dans le tampon Hepes (en rouge et gris)

Les rendements de purification du [^{13}C , D_7]-G6P indiquent donc qu'environ 21 μmoles à 25,5 μmoles sont purifiées à chaque élution (**Figure 77**). Nous devons réaliser deux purifications pour obtenir 30 μmoles de G6P nécessaires à une expérience de D-DNP. A partir de 1 g de [$\text{U-}^{13}\text{C}$, D_7]-glucose, nous avons obtenu 346,7 μmoles de [$\text{U-}^{13}\text{C}$, D_7]-G6P à l'aide de 17 purifications (annexe 3.9 et 3.10). Le rendement global est de 68 %. Notre G6P uniformément marqué en ^{13}C et ^2H , nous a permis de réaliser les études cinétiques de la G6PD seule. Les expériences ainsi que les résultats obtenus sont décrits dans le prochain paragraphe.

3.3.2 Etude de la G6PD à partir du [U-¹³C-D₇]-G6P par D-DNP

La production et la purification du substrat de la G6PD, le G6P, nous a permis de réaliser les premières cinétiques avec l'enzyme seule (**Figure 78**). Deux activités d'enzymes ont été testées : 206 ± 23 U (1 U correspond à 1 μ moles de substrat transformé en une minute, ainsi nous nous attendons à ce que 30 μ moles de G6P soit transformées en 9 s) et 550 ± 23 U (nous nous attendons à ce que 30 μ moles de G6P soit transformées en 3 s) (annexe 4). Dans ces expériences, le dispositif d'injection a légèrement été modifié dans le but de réduire la durée de l'injection à 5 s. Grâce à cette optimisation, 5 points supplémentaires sont obtenues en dehors des problèmes d'inhomogénéité liés à l'injection. Ces valeurs sont essentielles pour la quantification puisque les temps de relaxation longitudinal des métabolites impliqués dans la voie des pentoses phosphates, T_1 , sont très rapides. Ces expériences ont également été réalisées à 37 °C en excès de co-facteurs avec une concentration en substrat 100 fois plus grande que la K_m du G6P pour la G6PD (Cf Chapitre 4.1.2.3). Dans ce sous chapitre, une étude qualitative des deux cinétiques est dans un premier temps présentées. Puis, dans un second temps, l'analyse qualitative est décrite et analysée.

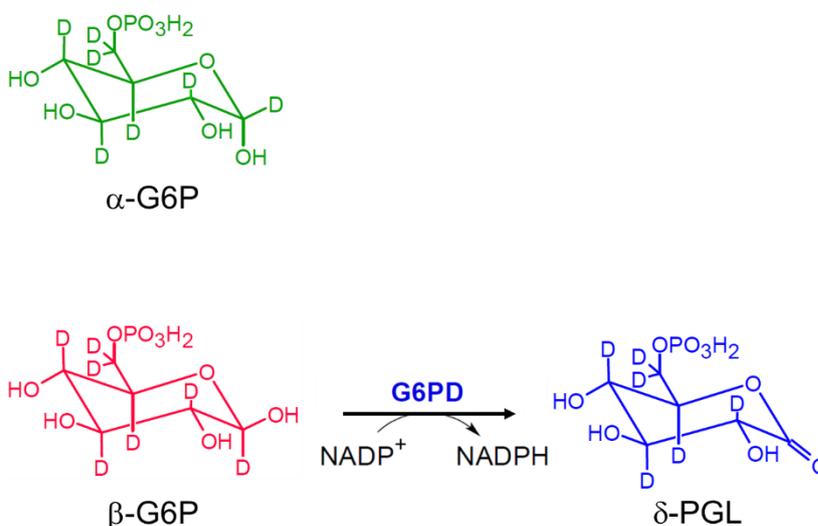


Figure 78 : Représentation de l'oxydation du glucose-6-phosphate(G6P) en δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL) qui est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) à l'aide de la réduction de NADP⁺ en NADPH. La G6PD est sélective pour l'anomère β -G6P, ainsi seul le β -G6P est oxydé en δ -PGL.

3.3.2.1 Expériences menées avec 206 U G6PD (expérience I) :

Les résultats montrent la présence de β -G6P, de l' α -G6P et de δ -PGL à leurs déplacements chimiques attendus, respectivement à 96,8 ppm, 93,0 ppm et 175,2 ppm (**Figure 79**). A $t = 4$ s, l'intensité du signal du β -G6P est plus importante que celle de l' α -G6P

(intégrale relative 1 : 0,6). A t = 8 s, les intensités relatives entre les deux anomères sont similaires (1 : 1), puis le signal du β -G6P devient plus faible que celui de l' α -G6P jusqu'à la fin de l'expérience. Sachant que leurs temps de relaxation sont similaires, ces résultats illustrent une fois de plus la sélectivité de la G6PD pour le β -G6P.

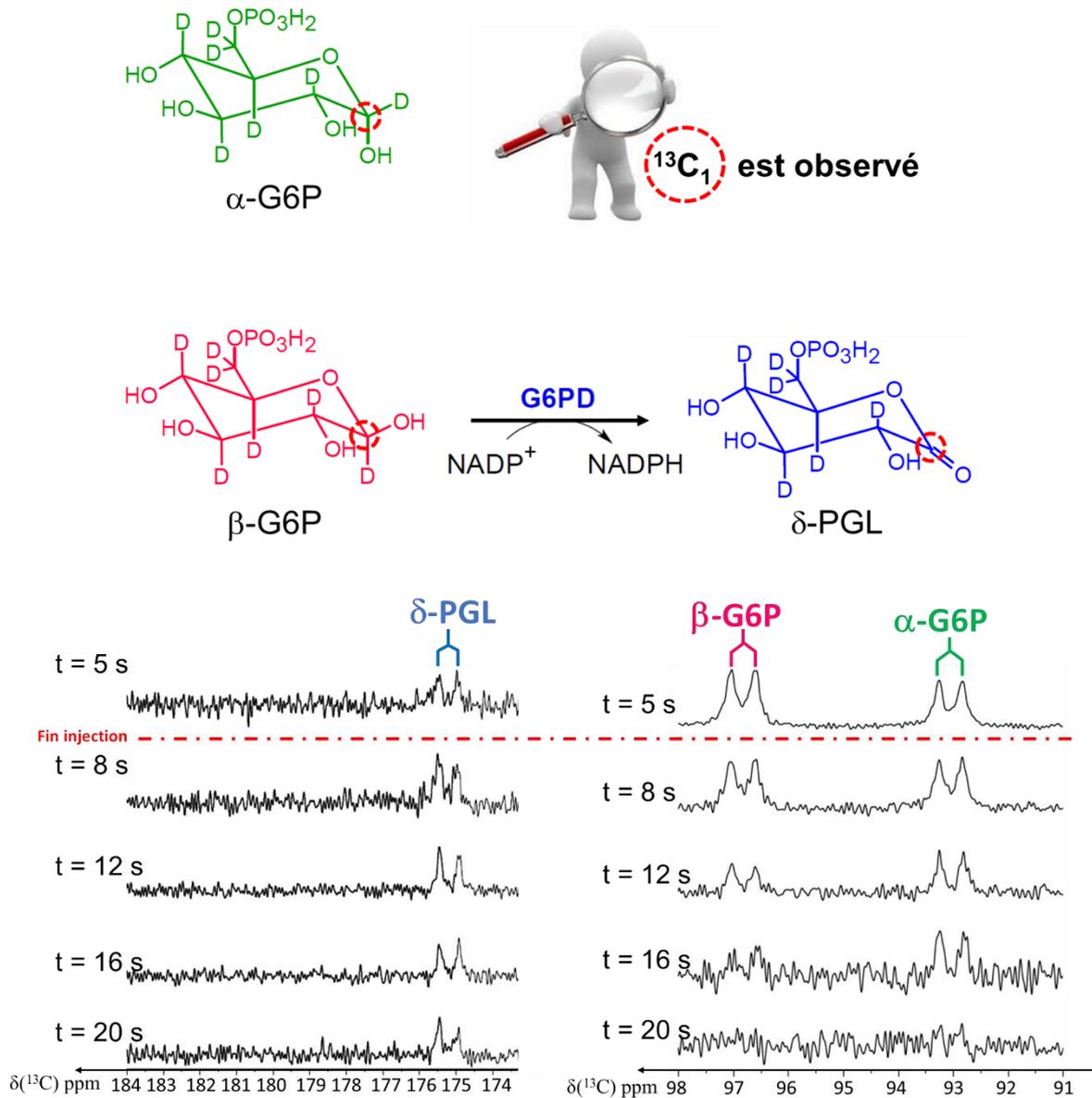


Figure 79 : Spectres obtenus au cours la réaction enzymatique observée après dissolution du $[U-^{13}C-D_7]$ -G6P hyperpolarisé. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}C_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps à t = 5 s, t = 8 s, t = 12 s, t = 16 s et t = 20 s après le début de l'injection. La durée de l'injection du $[U-^{13}C-D_7]$ -G6P hyperpolarisé dure 5 s (le trait en rouge montre la séparation entre les spectres obtenus pendant l'injection et les spectres obtenus après l'injection). Au-dessus des spectres, la réaction d'oxydation est représentée. L'encadré rouge montre le substrat qui a été hyperpolarisé avant son injection dans le tube contenant l'enzyme (la G6PD) ainsi que son co-facteur (le NADP⁺). Le site $^{13}C_1$ des métabolites impliqués a été entouré par un cercle rouge. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la δ -PGL.

L'oxydation et la relaxation longitudinale sont ainsi responsables de la décroissance du β -G6P alors que la diminution du signal de l' α -G6P est due à la relaxation spin-réseau. Le produit de l'enzyme, la δ -PGL, est observé dès la 5^{ème} seconde.

3.3.2.2 Expériences menées avec 550 U G6PD (expérience II):

Une nouvelle expérience a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment, avec une augmentation de la quantité de G6PD d'un facteur d'environ 2,7. La même solution enzymatique que celle utilisée pour l'expérience précédente a été employée pour faciliter la comparaison entre les deux expériences.

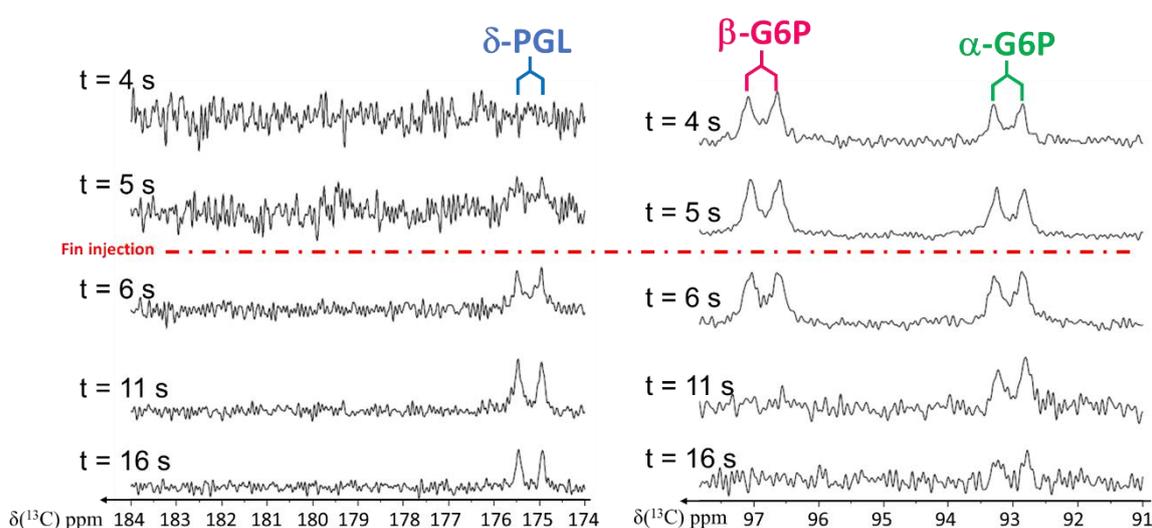


Figure 80 : Spectres obtenus au cours de la réaction enzymatique observée après dissolution du $[U-^{13}C-D_7]$ -G6P hyperpolarisé. La succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}C_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps à $t = 4$ s, $t = 5$ s, $t = 6$ s, $t = 11$ s et $t = 16$ s après le début de l'injection. La durée de l'injection du $[U-^{13}C-D_7]$ -G6P hyperpolarisé a été de 5 s (le trait en rouge montre la séparation entre les spectres obtenus pendant l'injection et les spectres obtenus après l'injection). Au-dessus des spectres, la cascade enzymatique est représentée. L'encadré rouge montre le substrat qui a été hyperpolarisé avant son injection dans le tube contenant l'enzyme (la G6PD) ainsi que son co-facteur (le $NADP^+$). Le site $^{13}C_1$ des métabolites impliqués dans cette cascade enzymatique a été entouré par un cercle rouge. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la δ -PGL.

Dans cette expérience, le β -G6P et l' α -G6P sont respectivement obtenus à 93 ppm et 96,8 ppm à $t = 4$ s. Le produit de la réaction est observé à $t = 6$ s à 174 ppm (**Figure 80**). La disparition du β -G6P à $t = 11$ s atteste que la totalité du δ -PGL est transformé. L'augmentation de l'activité par un facteur d'environ 2,7 ne permet pas d'observer le γ -PGL ainsi que le 6PGA.

3.3.2.3 Extraction des paramètres cinétiques des expériences menées avec 206 U et 550 U G6PD :

Dans ces expériences, en négligeant la mutarotation du β/α -G6P, le β -G6P est le seul substrat de la G6PD du fait de l'excès en co-facteur (Cf Chapitre 4.1.2.3 et annexe 4). Nous avons donc considéré la cinétique de la G6PD comme une cinétique de pseudo-premier ordre pour modéliser cette expérience en utilisant le même programme d'ajustement que décrit dans le chapitre 3.2.1.

L'évolution de la composante longitudinale de l'aimantation portée par le $^{13}\text{C}_1$ de chaque métabolite est donnée par :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_{\beta-G6P} \\ M_{\delta-PGL} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{G6PD} - R_{1,\beta-G6P} & 0 \\ k_{G6PD} & R_{1,\delta-PGL} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_{\beta-G6P} \\ M_{\delta-PGL} \end{pmatrix} = \mathbf{A}M \quad (15)$$

Dans cette équation, $M = \begin{bmatrix} M_{\beta-G6P} \\ M_{\delta-PGL} \end{bmatrix}$, où $M_{\beta-G6P}$ et $M_{\delta-PGL}$ désignent respectivement les composantes z de l'aimantation du β -G6P, et δ -PGL. L'effet de la relaxation est pris en compte par les constantes de relaxation longitudinales de chaque molécule : $R_{1,\beta-G6P}$ pour la β -G6P, $R_{1,\delta-PGL}$ pour la δ -PGL.

Le signal $S(p\Delta t)$, correspondant à chaque espèce, observé après p impulsions d'angle θ égal à 10° est donné par :

$$S(p\Delta t) = \begin{bmatrix} S_{\beta-G6P} \\ S_{\delta-PGL} \end{bmatrix}_{(p\Delta t)} = \exp(\mathbf{A}p\Delta t) \cos^p(\theta) S(0) \quad (16)$$

avec $p\Delta t$ l'intervalle de temps entre deux impulsions consécutives et $S^i(0) = \begin{bmatrix} S_{\beta-G6P}(t_0) \\ S_{\delta-PGL}(t_0) \end{bmatrix}$ la valeur initiale du signal à $t_0 = 5$ s, correspondant à la fin du remplissage.

Dans cette description, les valeurs initiales des signaux sont également des paramètres ajustables du modèle, qui en comporte ainsi cinq valeurs ajustées : 1 constante cinétique, 2 vitesses de relaxation longitudinales et 2 concentrations initiales.

Les intensités ont été calculées par à la somme des points compris entre $\sim 174,5$ ppm et 176 ppm pour le produit de la réaction et entre 96,0 ppm et 97,5 ppm pour le β -G6P.

Dans l'expérience réalisée en présence de 206 ± 23 U de G6PD, les histogrammes des paramètres obtenus après une simulation de Monte Carlo montrent des distributions de

paramètres globalement symétriques et unimodales et relativement peu disperses. Ces résultats semblent indiquer que le modèle est correctement déterminé par les données (Figure 81).

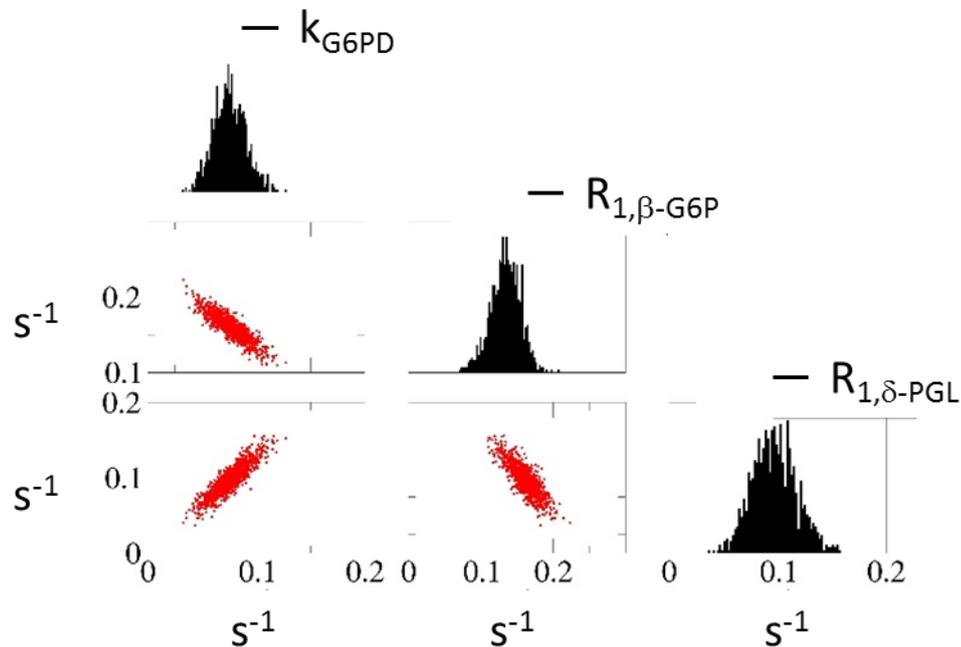


Figure 81 : Histogrammes de paramètres obtenus après 1000 essais de Monte Carlo.

Les valeurs obtenues pour les deux expériences sont résumées dans le tableau ci-dessous :

	A' = 206 U de G6PDH		A'' = 550 U de G6PDH		
Paramètres	Moyenne (en s ⁻¹)	σ (en s ⁻¹)	Paramètres	Moyenne (en s ⁻¹)	σ (en s ⁻¹)
k'_{G6PD}	0,075	0,015	k''_{G6PD}	0,256	0,018
$R'_{1,\beta-G6P}$	0,162	0,017	$R''_{1,\beta-G6P}$	0,146	0,024
$R'_{1,\delta-PGL}$	0,097	0,021	$R''_{1,\delta-PGL}$	0,109	0,009

Tableau 6 : Résumé de la moyenne ainsi que les écarts-types des constantes cinétiques de la G6PD (k'_{G6PD}) et des constantes de relaxation spin-réseau de chaque métabolite intervenant dans la cascade enzymatique ($R'^n_{1,\beta-G6P}$, $R'^n_{1,\delta-PGL}$) obtenues après 1000 itérations pour l'expérience à 206 ± 23 U de G6PD ($n = '$) et l'expérience à 550 ± 23 U de G6PD ($n = ''$).

Intensité (a.u)

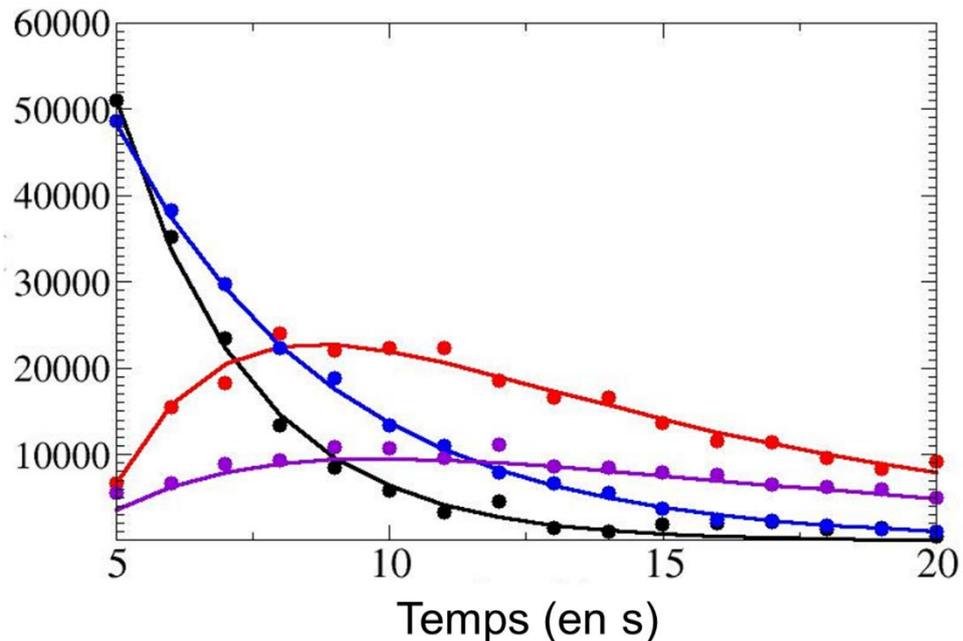


Figure 82 : Intensités des signaux obtenus par intégrations numériques et courbes de fits calculées des signaux du β -Glucose (en bleu et noir) et du β -G6P (en rouge et violet) lors de l'oxydation du G6P avec ~ 206 U de G6PD (bleu et violet) et ~ 550 U de G6PD (noir et rouge).

Les courbes obtenues par le programme d'ajustement pour les deux expériences se superposent avec les données expérimentales (Figure 82). Le rapport des activités attendues peut être estimé, A'/A'' est de $2,70 \pm 0,41$, d'après les quantités d'enzymes introduites et les incertitudes de manipulation lors de la réalisation des échantillons. Le rapport entre les vitesses cinétiques calculées, k'_{G6PD}/k''_{G6PD} , est de $3,41 \pm 0,92$. Les rapports obtenus entre les activités théoriques et les vitesses cinétiques sont donc similaires et en accord avec les données expérimentales. La vitesse de la G6PD à 550 ± 23 U est donc plus rapide que celle obtenu avec 206 ± 23 U de G6PD.

Le rapport des constantes de relaxations obtenues pour les deux expériences, respectivement $R''_{1,\beta-G6P}/R'_{1,\beta-G6P} = 1,1 \pm 0,3$ et $R'_{1,\delta-PGL}/R''_{1,\delta-PGL} = 1,12 \pm 0,33$, sont également similaires entre les deux expériences. Cependant, la présence de la fonction carbonyle sur le $^{13}C_1$ du δ -PGL à la place d'un alcool et d'un deutérium sur le $^{13}C_1$ du β -G6P, augmente le temps de relaxations du carbone-1. Notre modèle cinétique ainsi que notre programme d'ajustement semble pour le moment être pertinent à ce stade pour étudier ces cinétiques enzymatiques.

Ces paramètres peuvent être comparés avec ceux obtenus dans l'étude de la G6PD à partir du Glucose (dans le paragraphe 3.2) dans d'autres concentrations en co-facteurs et à environ 458 ± 23 U G6PD. Le rapport entre les activités et les vitesses sont résumées dans le tableau ci-dessous :

Rapport entre les expériences	Rapport des activités	Rapport des k_{G6PD}
I et #	$A'_{G6PD} / A^{\#}_{G6PD} =$ $0,45 \pm 0,07$	$k'_{G6PD} / k^{\#}_{G6PD} =$ $0,76 \pm 0,20$
II et #	$A^{\#}_{G6PD} / A''_{G6PD} =$ $0,83 \pm 0,07$	$k^{\#}_{G6PD} / k''_{G6PD} =$ $0.84 \pm 0,28$

Tableau 7 : Résumé des différents rapports entre les activités de la G6PD (A^n_{G6PD} avec n égal à I, II et #), les constantes cinétiques de la G6PD (k^n_{G6PD} avec n égal à I, II et #) obtenus entre des expériences réalisées avec la G6PD seule (I et II) et l'expérience réalisée avec la G6PD en combinaison avec la HK (n = #, chapitre 3.2.2).

Ces rapports montrent que la vitesse d'oxydation est plus lente à 458 ± 23 U. Une différence de 0,7 mM en NADPH qui aide l'enzyme à oxyder peut expliquer cette différence de vitesse. Ces résultats montrent alors l'importance du ratio enzyme/NADPH sur la vitesse cinétique. Toutefois, dans l'expérience à 458 ± 23 U de G6PD, l'oxydation dépendait de la vitesse de phosphorylation du G6P qui était l'étape cinétiquement déterminante dans la cascade enzymatique. Ainsi, la vitesse d'oxydation obtenue à 458 ± 23 U est donc plus faible en raison de sa dépendance à la vitesse de l'HK qui produit son substrat.

Au cours de ce chapitre, nous avons pu démontrer l'intérêt de pouvoir produire et purifier le substrat de la G6PD. L'utilisation de ce substrat marqué, nous a permis d'étudier facilement la cinétique de la G6PD alors que les études cinétiques mettant en jeu deux enzymes se sont révélées plus difficile à traiter. L'extraction des intensités du glucose et du G6P est un travail délicat en raison d'un recouvrement spectral de leurs signaux.

Chapitre 4 : Etude de la 6-phosphogluconolactonase (6PGL), deuxième enzyme de l'étape oxydative de la PPP :

Chez le *Trypanosoma brucei* (*Tb*), les trois premières enzymes de la voie des pentoses phosphates (PPP), la G6PD, la 6PGL et la 6PGD, se trouvent dans le glycosome.¹⁷⁷ Les autres enzymes de la voie des PPP se situent dans le cytosol. Ce compartiment cellulaire est un dérivé du peroxysome, organite cellulaire qui est impliqué dans la métabolisation des acides gras et des acides aminés, la réduction des « Reactive Oxygen Species » (Ros) ainsi que la synthèse de certains phospholipides, les plasmalogènes. Le NADP⁺, produit lors de l'oxydation du glucose-6-phosphate, catalysée par la G6PD, et de la décarboxylation du 6-phosphogluconate, catalysée par la 6PGD, dans l'étape oxydative de la PPP, est l'un des précurseurs de la détoxification de la cellule (Chapitre 1, [Figure 11](#)). Les différences structurales entre la G6PD et la 6PGL des *Trypanosoma brucei* (*Tb*-G6PD et *Tb*-6PGL) et la G6PD et la 6PGL de l'homme (seulement 53 % d'homologie entre l'enzyme hôte et celle du *Tb* pour la G6PDH et seulement 37 % d'homologie entre l'enzyme hôte et celle du *Tb* pour la 6PGL), et particulièrement au niveau de leurs sites actifs, font de la *Tb*-G6PD et *Tb*-6PGL des cibles thérapeutiques potentielles.¹⁷⁸

Nous présentons dans ce chapitre des études cinétiques de la 6PGL de *Trypanosoma brucei* (*Tb*-6PGL), réalisées via D-DNP. Sachant que le substrat de l'enzyme, la δ -6-phosphogluconolactone (δ -PGL), est instable en milieu aqueux ([Figure 33](#)), nous avons utilisé différents substrats des enzymes situées en amont de la 6PGL dans la cascade enzymatique. (i) Dans un premier temps, du [U-¹³C-D₇]-Glucose a été utilisé comme substrat en présence d'HK, de la G6PD et de *Tb*-6PGL. (ii) Dans un second temps, le [U-¹³C-D₇]-G6P a été utilisé comme substrat en présence de la G6PD et la *Tb*-6PGL uniquement ([Figure 83](#)).

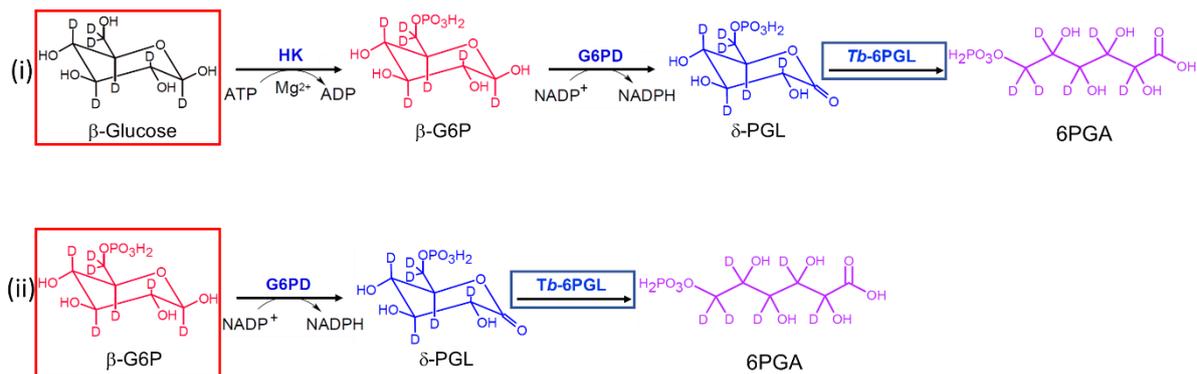


Figure 83 : Représentation des différentes stratégies utilisées pour étudier la *Tb*-6PGL. La première stratégie est d'étudier la *Tb*-6PGL à partir du [U-¹³C-D₇]-Glucose (i). La deuxième stratégie est d'étudier la *Tb*-6PGL à partir du [U-¹³C-D₇]-G6P (ii). L'encadré rouge montre le substrat de chaque cascade enzymatique qui a été hyperpolarisé. L'encadré bleu montre l'enzyme qui est étudiée.

Nous nous sommes également intéressés à l'étude d'un ligand, le « GP269 », synthétisé récemment et conçu comme un possible analogue du substrat de la *Tb*-6PGL (M. Sollogoub, IPCM). Nous présenterons des études d'inhibition de l'enzyme par ce ligand fondées essentiellement sur des expériences d'absorption en UV-Vis.

4.1 Etude cinétique de la *Tb*-6PGL par D-DNP :

4.1.1 Etude cinétique de la *Tb*-6PGL à partir du Glucose :

La première expérience cinétique pour l'étude de la *Tb*-6PGL a été réalisée à partir de [U-¹³C-D₇]-Glucose en présence de l'HK, de la G6PD ainsi que les co-facteurs de ces enzymes, ATP, MgCl₂ et NADP⁺ (Figure 84, annexe 5). Afin de comparer les études cinétiques réalisées à partir du [U-¹³C-D₇]-Glucose sur la G6PD avec celles de la *Tb*-6PGL, les mêmes quantités d'HK et de G6PD ont été utilisées.

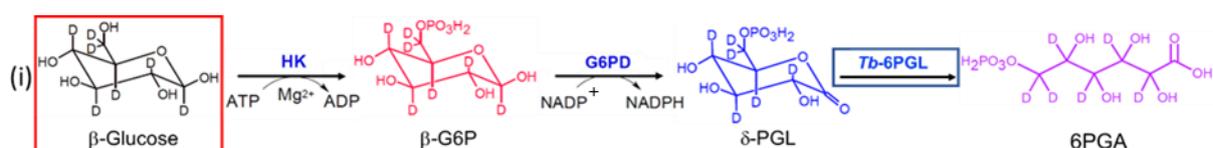


Figure 84 : Première stratégie pour l'étude de la cascade enzymatique de l'hexokinase (HK), de la G6PD et de la *Tb*-6PGL. L'encadré rouge montre le substrat de la cascade enzymatique qui a été hyperpolarisé. L'encadré bleu montre l'enzyme qui est étudiée.

Dans cette expérience, la durée de l'injection est de 10 s. Le spectre obtenu à $t = 4$ s après le début de l'injection permet d'identifier le β-Gluc, le β-G6P, l'α-Gluc et l'α-G6P respectivement à 96,7 ppm, 96,9 ppm, 93 ppm et 93,2 ppm (Figure 85). A partir de $t = 5$ s jusqu'à $t = 14$ s, l'observation de l'évolution et la différenciation au cours du temps entre les signaux du β-Gluc et β-G6P d'une part, et entre ceux de l'α-Gluc et de l'α-G6P d'autre part sont difficiles. Un des pics du doublet observé pour chaque anomère β-Gluc/G6P et α-Gluc/G6P possède une largeur à mi-hauteur d'environ 40 Hz. Dans l'expérience réalisée à partir [U-¹³C-D₇]-Glucose en présence uniquement de l'HK et la G6PD (Chapitre 3.2.1, Figure 33), la distance entre les signaux ¹³C₁ du G6P et du Gluc était de 0,03 ppm (12 Hz) et la largeur de raie d'un des pics du doublet du β-Gluc était de 14,5 Hz à $t = 11$ s après l'injection. Ces valeurs montrent qu'il est impossible de distinguer le glucose du G6P entre $t = 5$ s et $t = 14$ s dans l'expérience réalisée avec la *Tb*-6PGL.

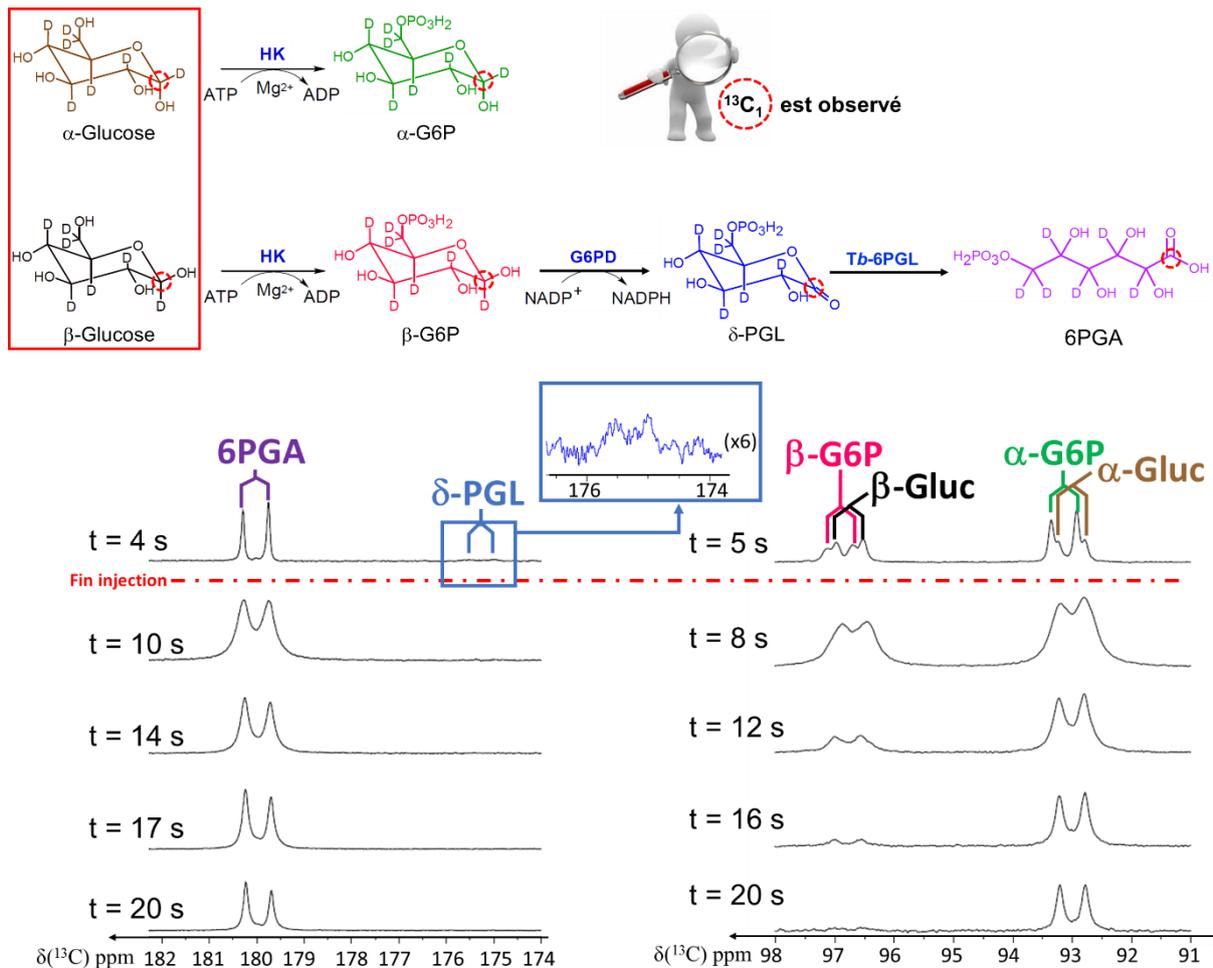


Figure 85 : Spectres obtenus au cours de l'observation de la chaîne de réactions enzymatiques réalisée à partir de $[U-^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$ hyperpolarisé. La durée de l'injection du $[U-^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$ hyperpolarisé a été de 10 s (le trait discontinu en rouge montre la séparation entre les spectres obtenus pendant l'injection et les spectres obtenus après l'injection). Cette succession de spectres montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites à $t = 4$ s, $t = 10$ s, $t = 14$ s, $t = 17$ s et $t = 20$ s après le début de l'injection. Au-dessus des spectres, la cascade enzymatique est représentée. L'encadré rouge montre le substrat qui a été hyperpolarisé avant son injection dans le tube contenant la solution réactionnelle. Le site $^{13}\text{C}_1$ des métabolites impliqués dans cette cascade enzymatique a été entouré par un cercle rouge. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la 6PGA.

Les signaux du $^{13}\text{C}_6$, qui permettent également d'observer l'évolution des différents métabolites, montrent aussi un élargissement des signaux des $^{13}\text{C}_6$ entre $t = 5$ s et $t = 14$ s (**Figure 86**). La disparition des signaux du $^{13}\text{C}_6$ du glucose, à 61,3 ppm, indique que le substrat de la cascade enzymatique est totalement consommé à $t = 14$ s. Toutefois le temps de relaxation longitudinale est plus court pour le $^{13}\text{C}_6$ que pour le $^{13}\text{C}_1$ ($T_1(^{13}\text{C}_1) \sim 13,5$ s et $T_1(^{13}\text{C}_6) \sim 10,1$ s). Nous pouvons supposer que les signaux observés dans la région des $^{13}\text{C}_1$ à $t > 17$ s correspondent uniquement aux anomères du G6P. A partir de $t = 17$ s, la largeur à mi-hauteur du doublet observé à 95,5 ppm est de 15 Hz. Ainsi, ce doublet correspond uniquement à l'anomère $\alpha\text{-G6P}$. Le signal du $\beta\text{-G6P}$ a totalement disparu à $t = 17$ s. Le produit de la cascade

est, quant à lui, observé dès la 4^{ème} seconde à 180 ppm alors que le δ -PGL, 175,2 ppm, est faiblement observé au même moment. Cette expérience montre également qu'en présence de la 6PGL, la γ -PGL, produit de l'isomérisation de la δ -PGL, n'est pas observée (cf **Figure 33** du chapitre 3).

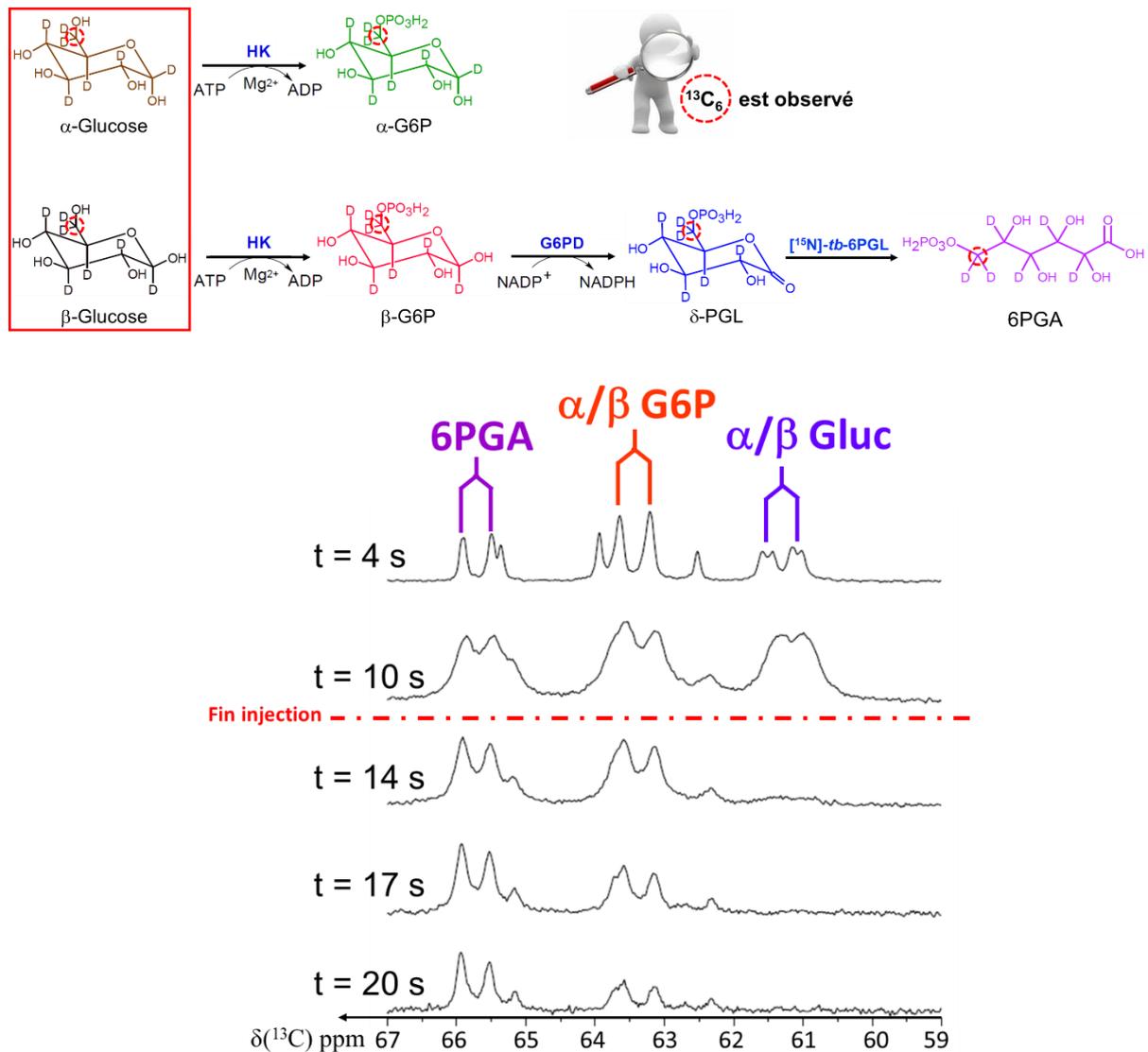


Figure 86 : Région spectrale centrée sur les signaux des $^{13}\text{C}_6$ des différents métabolites à $t = 4 \text{ s}$, $t = 10 \text{ s}$, $t = 14 \text{ s}$, $t = 17 \text{ s}$ et $t = 20 \text{ s}$ après le début de l'injection, au cours de la transformation $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]$ -Glucose hyperpolarisée par les enzymes (HK, G6PD et la Tb-6PGL). La durée de l'injection est de 10 s (trait rouge). L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la 6PGA.

L'extraction des intensités du glucose et du G6P entre $t = 10 \text{ s}$ et $t = 14 \text{ s}$ est difficile. Nous avons cependant tenté d'extraire de ces spectres les contributions de chaque espèce, en utilisant pour les signaux du glucose et du G6P une décomposition en multiplets composés de plusieurs lorentziennes (cf chapitre 3.2.1). Malheureusement, cette stratégie s'est révélée infructueuse dans ce cas, ne permettant pas de «déconvoluer» les spectres.

Dans ces conditions expérimentales, le β -G6P et le glucose disparaissent tardivement, respectivement à $t > 20$ s et $t = 17$ s après le début de l'injection. Ces observations indiquent que la vitesse de phosphorylation du glucose en G6P et la vitesse d'oxydation du β -G6P sont plus lentes que celles attendues pour des activités (A) enzymatiques théoriques respectives de $A_{HK} = 630 \pm 42,6$ U (phosphorylation du glucose injectée, théoriquement 30 μ moles, en 2,9 s) et de $A_{G6PD} = 321 \pm 23$ U (oxydation du G6P, théoriquement 30 μ moles, en 5,6 s). En effet, l'expérience réalisée en présence de l'HK et de la G6PD avec une $A_{HK} = 618 \pm 10$ U et $A_{G6PDH} = 321 \pm 23$ U, montrait une disparition du glucose à $t = 6$ s et du β -G6P à $t = 9$ s après le début de l'injection (**Figure 32**). A partir de ces informations, nous pouvons dire que les réactions de phosphorylation et d'oxydation sont trop lentes pour l'activité de l'HK et de G6PD utilisées. L'absence de la δ -PGL, l'apparition rapide (à $t = 4$ s) du 6PGA ainsi que la vitesse d'oxydation du β -G6P lente, qui permet de produire le δ -PGL, supposent que l'hydrolyse de ce métabolite est rapide.

Ces observations, ainsi que l'élargissement des raies, montrent qu'en présence de la *Tb*-6PGL, les cinétiques de l'HK et de la G6PD sont plus lentes en raison de la viscosité. En effet, dans ces expériences, la *Tb*-6PGL est conservée dans une solution aqueuse composée de tampon Hepes, DTT et de NaCl. La solution enzymatique composée d'ATP, NADP, $MgCl_2$, d'Hepes et de NaOH a été lyophilisée puis diluée pour ajouter directement le volume nécessaire de *Tb*-6PGL. Les concentrations des solutés dans la solution de conservation de la *Tb*-6PGL sont du même ordre de grandeur que celles des molécules composant la solution enzymatique. L'élargissement des raies ainsi qu'une diminution des vitesses de réactions ont déjà été rencontré lors des études préliminaires réalisées à l'EPFL (Chapitre 3.1). La viscosité, causée par la solution aqueuse dans laquelle la *Tb*-6PGL est conservée, peut donc être responsable de l'élargissement des raies ainsi qu'un ralentissement des réactions enzymatiques. Toutefois, dans cette expérience aucune séparation de phase n'a été observée.

Dans le but de distinguer les anomères α - β du Gluc des anomères α - β du G6P, une nouvelle expérience a été réalisée en polarisant du [$^{13}C_1$ -D $_1$]-Glucose (annexe 6). Le signal attendu de chaque métabolite impliqué dans la cascade enzymatique est un singulet. Aucune constante de couplage ne devrait être observée. Ainsi, nous pouvons espérer une résolution suffisante pour distinguer les signaux des deux espèces distantes d' ~ 0.2 ppm (~ 80 Hz). La quantité de *Tb*-6PGL (son activité) a été diminuée de moitié dans le but d'observer la

formation et la transformation de la δ -PGL. Les concentrations d'HK et de G6PD ont été légèrement diminuées de 7 % et 30 % respectivement. L'influence de cette légère diminution des concentrations des deux premières enzymes ne devraient pas perturber la transformation de la δ -PGL. En effet, Les expériences réalisées dans l'étude de la G6PD montraient qu'une diminution de 62 % de la concentration de cette enzyme n'empêchait pas l'observation de l'oxydation dès l'injection (Cf Chapitre 3). Ainsi, la Tb-6PGL est l'étape limitante dans cette cascade enzymatique.

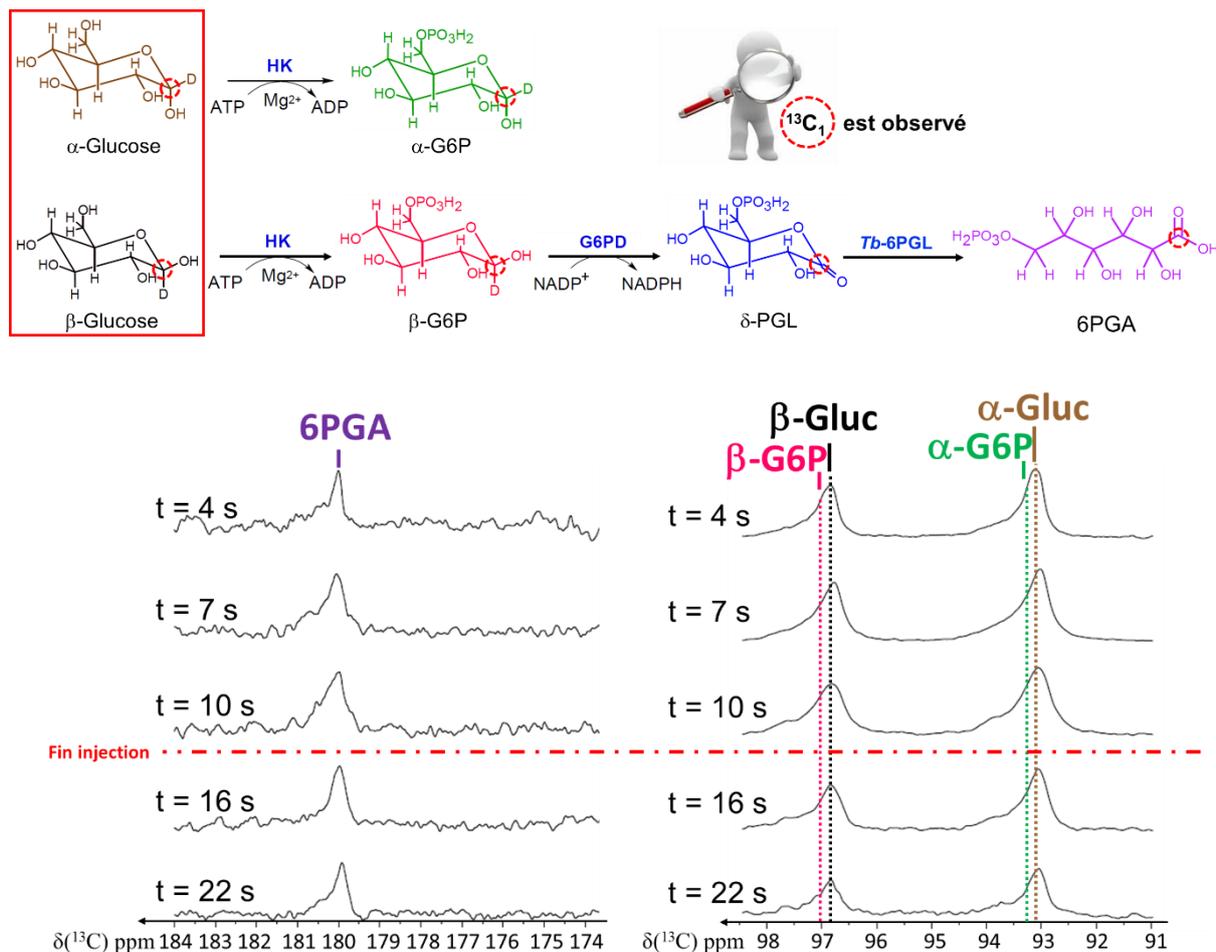


Figure 87 : Evolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ à $t = 4$ s, $t = 7$ s, $t = 10$ s, $t = 16$ s et $t = 22$ s après le début de l'injection (10 s) dans les spectre obtenus au cours des réactions enzymatiques réalisée en présence de HK, G6PD et la Tb-6PGL à partir du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$ hyperpolarisé. L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la 6PGA.

Les résultats montrent que la distinction entre les différents anomères de glucose et de G6P est une nouvelle fois difficile (Figure 87). La résolution et le rapport signal sur bruit étant très faibles tout le long de l'expérience, l'attribution des fréquences des anomères de glucose et de G6P est impossible. La basse sensibilité est due à une mauvaise polarisation du $[\text{U-}^{13}\text{C}_1\text{-D}_1]\text{-Glucose}$.

Glucose par rapport au [U-¹³C-D₇]-Glucose (Figure 88). L'extraction des intensités des signaux des différents métabolites intervenant dans cette cascade enzymatique est impossible.

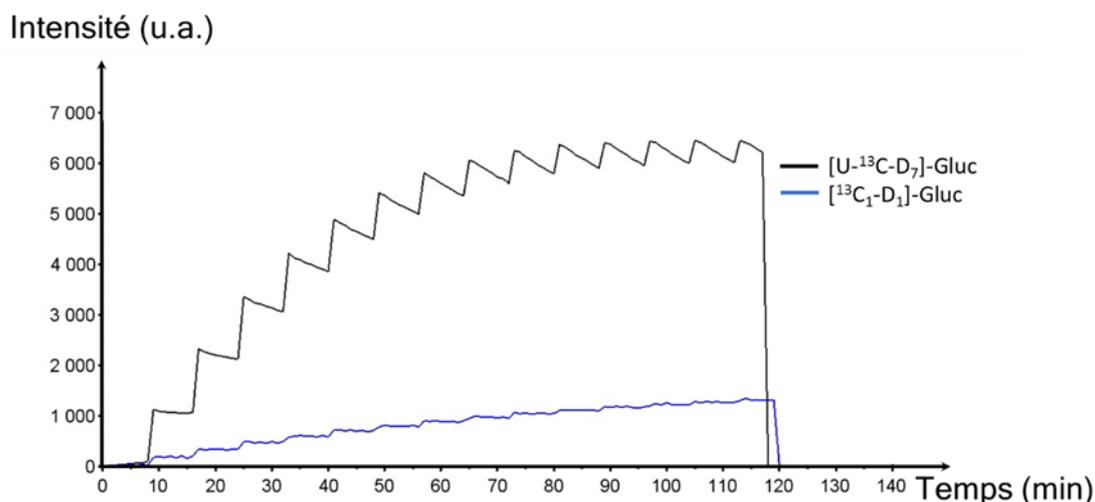


Figure 88 : Comparaison entre les polarisations ¹³C obtenues lors d'une expérience de polarisation croisée entre le ¹H et le ¹³C sur du [¹³C₁-D₁]-Glucose (en bleu) et sur du [U-¹³C₇-D₇]-Glucose (en noir). La même concentration en radicaux, 50 mM Tempol, a été utilisée. Ces deux expériences ¹³C ont été réalisées à 1.2 K dans un champ magnétique B₀ = 6.7 T. Les impulsions de 90° pour le ¹³C et ¹H sont de 5 μs avec les puissances P_{90°}(¹H) = 49 W et P_{90°}(¹³C) = 280 W pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose et P_{90°}(¹H) = 50 W et P_{90°}(¹³C) = 260 W pour le [¹³C₁-D₁]-Glucose. La durée de la CP est de 4 ms pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose et de 3.5 ms pour le [¹³C₁-D₁]-Glucose. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du ¹³C est de 0.864 W pour le [U-¹³C₇-D₇]-Glucose et de 0.802 W pour le [¹³C₁-D₁]-Glucose.

Nous observons cependant le signal du 6PGA, produit de la cascade enzymatique, au déplacement chimique de 180 ppm. Dans cette expérience, le δ-PGL n'est pas observée.

L'absence de cet intermédiaire peut supposer deux choses : soit la vitesse d'oxydation du β-G6P en δ-PGL est rapide, soit la vitesse d'hydrolyse du δ-PGL en 6PGA est rapide. Comme nous avons pu le voir précédemment la modélisation de cette cascade enzymatique est impossible. Nous ne pouvons donc pas savoir si l'activité des enzymes ajoutés dans la solution réactionnelle est la même que leurs activités théoriques attendues. Toutefois, sachant que nous avons mis l'HK et la G6PD en excès de manière à ce que l'étape de l'hydrolyse spontanée soit l'étape limitante de la cascade enzymatique, nous pouvons éliminer la première hypothèse.

Pour toutes les raisons évoquées précédemment, la quantification des constantes de vitesse des différentes réactions enzymatiques n'aurait pas pu être réalisée en l'absence de δ-PGL.

L'observation des cinétiques utilisant le glucose sélectivement marqué en ^{13}C et ^2H en position anomérique dans le but d'améliorer la résolution des différents signaux des métabolites impliqués dans la cascade enzymatique observée n'a pas eu le succès escompté. Les résultats obtenus avec l'utilisation du $^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$ -Glucose et le $[\text{U-}^{13}\text{C}_6\text{-D}_7]$ -Glucose montrent que la deutération de l'ensemble des sites de la molécule est importante pour obtenir une bonne résolution pour les expériences. En effet, les interactions dipolaires du carbone marqué, $^{13}\text{C}_1$, sont plus fortes dans la molécule majoritairement protonée, $^{13}\text{C}_1\text{-D}_1$ -Glucose, que dans la molécule non protonée, $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]$ -Glucose, et conduisent à l'élargissement des lignes. Une meilleure résolution a d'ailleurs été obtenue avec le $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]$ -Glucose dans chaque étude enzymatique réalisée sur la G6PD et la 6PGL.

L'étude de la *Tb*-6PGL, à partir d'une cascade enzymatique composée de l'HK, la G6PD et de la *Tb*-6PGL, avec le glucose comme substrat, ne nous a pas permis d'extraire les paramètres cinétiques de la *Tb*-6PGL. Afin de simplifier la cascade enzymatique et de contourner les problèmes rencontrés, nous avons décidé d'utiliser le $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]$ -G6P comme substrat, afin d'étudier la cinétique de la *Tb*-6PGL en présence de deux enzymes : la G6PD et de la *Tb*-6PGL.

4.1.2 Etude de la 6PGL à partir du $[^{13}\text{C-D}_7]\text{-G6P}$

Pour faciliter l'analyse des signaux RMN, notamment ceux des anomères α/β du G6P, l'étude de la cinétique de la *Tb*-6PGL a été réalisée en présence de la G6PD et de la $[^{15}\text{N}]\text{-Tb-6PGL}$ à l'aide du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-G6P}$ comme substrat (Figure 89, annexe 7).

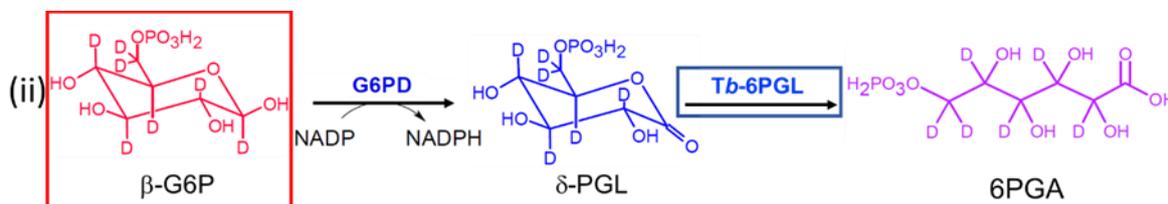


Figure 89 : Représentation de la cascade enzymatique utilisée pour l'étude de la *Tb*-6PGL (encadré bleu). Le $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-G6P}$, substrat de la cascade enzymatique (encadré rouge), a été polarisé. La solution réactionnelle contient la G6PD, ainsi que son co-facteur, le NADP^+ , et la *Tb*-6PGL.

Deux expériences ont été réalisées avec deux quantités différentes de *Tb*-6PGL : $172 \pm 6.22 \mu\text{g}$ (A) et $240 \pm 6.22 \mu\text{g}$ (B) (Tableau 8). La quantité de G6PD a été ajustée selon la quantité de *Tb*-6PGL dans l'expérience A. La proportionnalité $[\text{G6PD}]/[\text{Tb-6PGL}]$ est donc identique pour les expériences A et B. La quantité de G6PD utilisée dans l'expérience B est la même quantité utilisée dans les expériences réalisées dans l'étude de la G6PD avec l'HK et la G6PD et dans l'étude de la *Tb*-6PGL en présence de l'HK et de la G6PD à partir du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$. Ainsi, nous pouvons comparer les constantes de vitesses obtenus pour la G6PD dans deux contextes différents. Les concentrations en co-facteurs dans la solution enzymatique sont donc les mêmes que celles utilisées pour les réactions enzymatiques réalisées sur la G6PD à partir du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-G6P}$ (Chapitre 3.3).

	Expérience A	Expérience B
<i>Tb</i> -6PGL	$172 \pm 6 \mu\text{g}$	$240 \pm 6 \mu\text{g}$
G6PDH	$229 \pm 23 \text{ U}$	$321 \pm 23 \text{ U}$

Tableau 8 : Résumé des quantités de *Tb*-6PGL et des activités de G6PDH utilisée pour les deux expériences A et B.

4.1.2.1 Cascade enzymatique avec 172 µg Tb-6PGL (Expérience A)

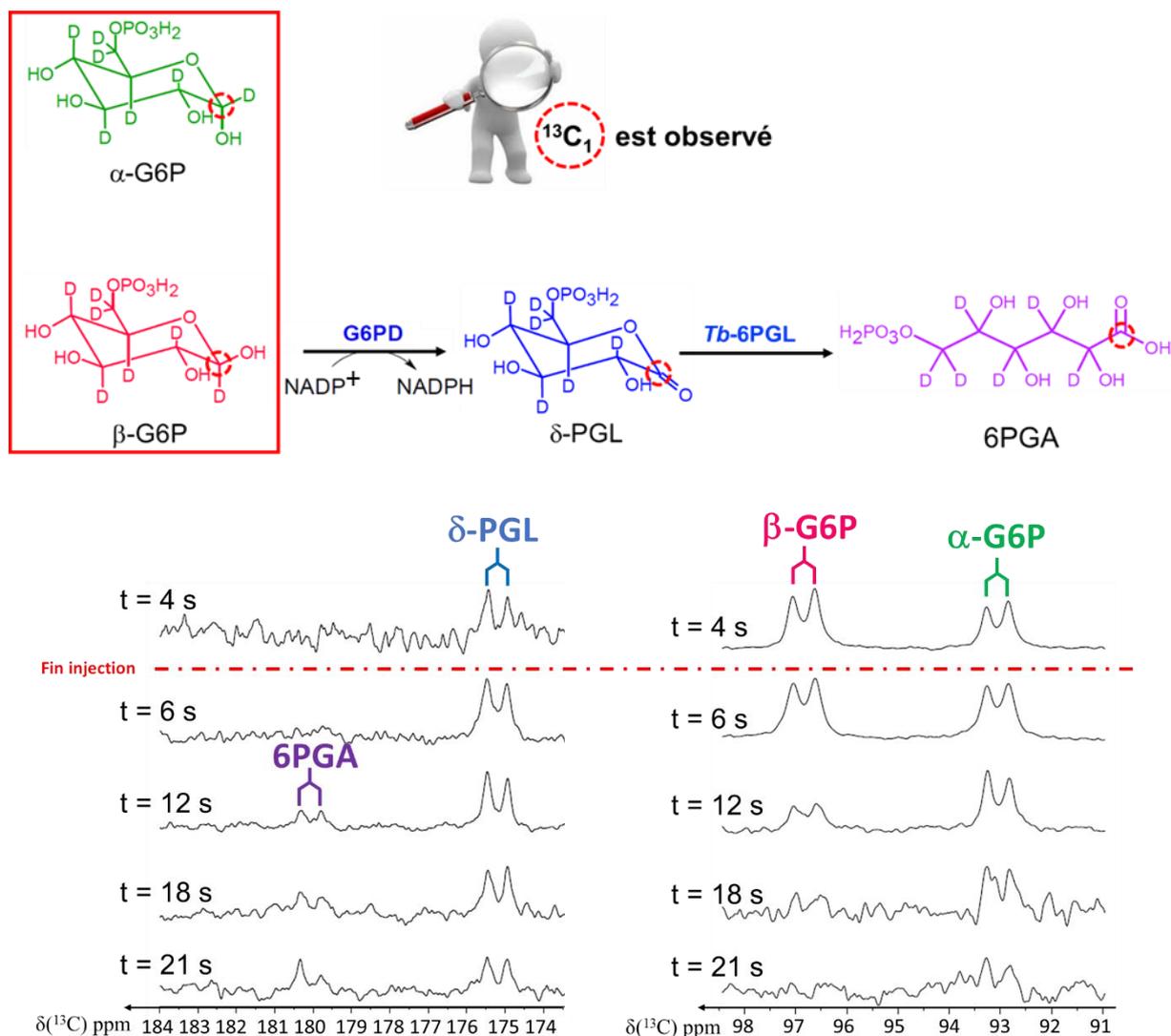


Figure 90 : Cinétique d'oxydation (G6PD) puis hydrolyse (6PGL) observée à partir du $[^{13}\text{C}\text{-D}_7]\text{-G6P}$ hyperpolarisé. La succession de spectres (à $t = 4$ s, $t = 6$ s, $t = 12$ s, $t = 18$ s et $t = 21$ s) montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps. La durée de l'injection a été de 5 s (trait rouge). L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la δ -PGL.

Dans cette expérience, la durée de l'injection est de 5 s. La série de spectres obtenue permettent de suivre les deux réactions simultanément. En effet, le signal du β -G6P (96,8 ppm) apparaît au court de l'injection et il est totalement consommé dès la 18^{ème} seconde après le début de l'injection (Figure 90). De plus, la δ -PGL (175,2 ppm) ainsi que la 6PGA (180,0 ppm) apparaissent successivement sur les spectres. Dans ces conditions expérimentales, la vitesse d'oxydation est suffisamment lente pour permettre l'observation de l'espèce intermédiaire, la δ -PGL.

4.1.2.2 Cascade enzymatique avec 240 µg de *Tb*-6PGL (Expérience B)

En augmentant l'activité de la *Tb*-6PGL, le β -G6P est totalement consommé à la 17^{ème} seconde (Figure 91). Le produit de la G6PD (175,2 ppm) et la 6PGA (180,0 ppm) apparaissent successivement mais plus rapidement (passe de 12 s à 6 s pour la 6PGA).

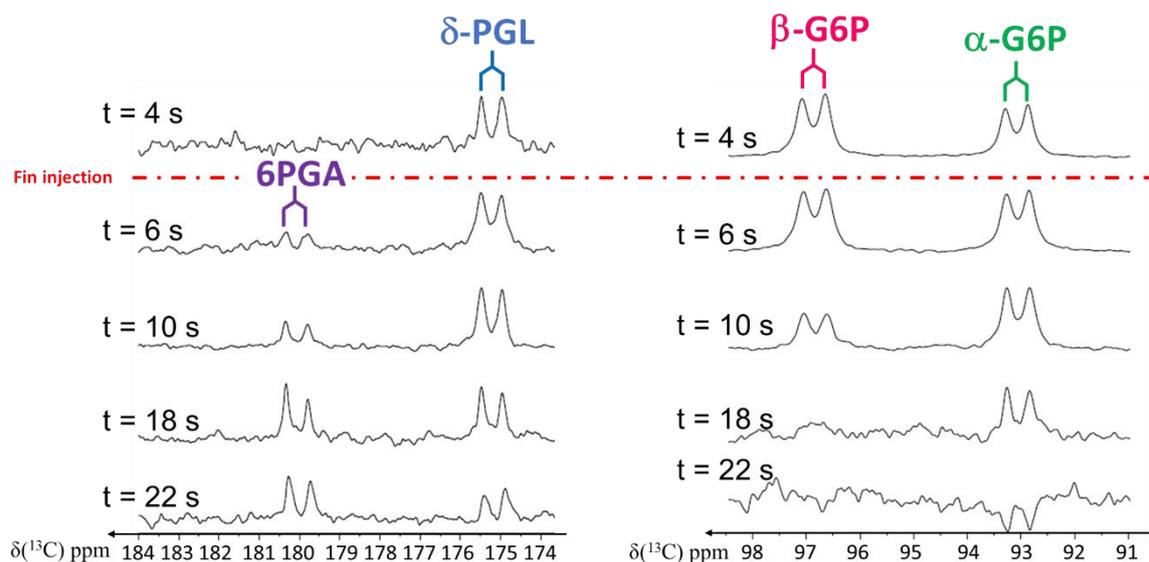


Figure 91 : Cinétique d'oxydation (G6PD) puis hydrolyse (6PGL) observée à partir du $[^{13}\text{C-D}_7]$ -G6P hyperpolarisé. La succession de spectres (à $t = 4$ s, $t = 6$ s, $t = 12$ s, $t = 18$ s et $t = 21$ s) montre l'évolution des signaux $^{13}\text{C}_1$ des différents métabolites obtenus au cours du temps. La durée de l'injection a été de 5 s (trait rouge). L'ensemble des spectres ont été calibrés sur le pic de la δ -PGL.

Ces données qualitatives montrent une nouvelle fois que la vitesse d'oxydation est lente mais plus rapide que l'hydrolyse de la δ -PGL. Une analyse quantitative est cependant nécessaire pour confirmer ces premières observations.

4.1.2.3 Analyses des cinétiques des cascades enzymatique G6PDH – *Tb*-6PGL (Expérience A et B) :

Dans ces deux expériences, en négligeant la mutarotation de α/β -G6P, le β -G6P est le substrat de la cascade enzymatique. Une analyse quantitative a été réalisée sur l'expérience A en fin de réaction, une fois que l'équilibre thermique des polarisations des spins nucléaires était rétabli, pour connaître la concentration réelle de substrat injecté et pour savoir si les cofacteurs sont effectivement en excès. La solution post réactionnelle de A a été lyophilisée puis re-dissoute avec une solution aqueuse de 600 µL contenant 20 mM de $[U-^{13}\text{C}]$ -Glycine. Chaque signal observé a été intégré. Les intégrations ont été calibrés sur le $^{13}\text{C}_\alpha$ de la glycine à 20 mM (notre référence), car la constante de temps de relaxation est plus lente que celle du $^{13}\text{C}_{\text{C=O}}$ de la glycine. Une concentration de 25,4 mM 6PGA a été obtenue. Sachant que 5,25 mL est le

volume réel de la solution réactionnelle obtenue après dissolution, la concentration post réactionnelle du 6PGA est de 3 mM. Sachant que 5 mL a permis de dissoudre les 202,7 mM de [U-¹³C-D₇]-G6P hyperpolarisée, la concentration de [U-¹³C-D₇]-G6P dans les 5 mL est de 6 mM. Toutefois, seulement 52 % de la solution hyperpolarisée (2.6 mL/ 5 mL) a été injecté. La concentration finale injectée attendue de [U-¹³C-D₇]-G6P est de 3,12 mM. Ces résultats semblent montrer que la proportion du substrat hyperpolarisée, le [U-¹³C-D₇]-G6P, est proportionnelle au volume injecté après la dissolution. Grâce à cette quantification, nous pouvons dire que le NADP⁺ (49 mM), co-facteur de la G6PDH, est bien en excès par rapport au [U-¹³C-D₇]-G6P. Ainsi, une cinétique de pseudo 1^{er} ordre a été utilisée pour modéliser cette expérience utilisant le même programme d'ajustement (décrit dans le chapitre 3.2.1).

L'évolution de la composante longitudinale de l'aimantation du ¹³C₁ de chaque métabolite est donnée par :

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} M_{\beta-G6P}^i \\ M_{\delta-PGL}^i \\ M_{\gamma-PGL}^i \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -k_{G6PDH}^i - R_{1,\beta-G6P}^i & 0 & 0 \\ k_{G6PDH}^i & -k_{\delta PGL}^i - R_{1,\delta-PGL}^i & 0 \\ 0 & k_{\delta PGL}^i & R_{1,6PGA}^i \end{pmatrix} \begin{pmatrix} M_{\beta-G6P}^i \\ M_{\delta-PGL}^i \\ M_{\gamma-PGL}^i \end{pmatrix} = \mathbf{AM}^n \quad (16)$$

Où i est égal = * ou ** (* et ** correspondent respectivement à l'expérience A et B)

et $M^i = \begin{bmatrix} M_{\beta-G6P}^i \\ M_{\delta-PGL}^i \\ M_{\gamma-PGL}^i \end{bmatrix}$ avec :

➤ pour l'expérience A : M*_{β-G6P} pour le β-G6P, M*_{δ-PGL} pour la δ-PGL, M*_{6PGA} pour la 6PGA

➤ pour l'expérience B : M**_{β-G6P} pour le β-G6P, M**_{δ-PGL} pour la δ-PGL, M**_{6PGA} pour la 6PGA.

L'effet de la relaxation est également pris en compte :

➤ pour l'expérience A : R*_{1,β-G6P} pour la β-G6P, R*_{1,δ-PGL} pour la δ-PGL, R*_{1,6PGA} pour la 6PGA

➤ pour l'expérience B : R**_{1,β-G6P} pour la β-G6P, R**_{1,δ-PGL} pour la δ-PGL, R**_{1,6PGA} pour la 6PGA.

Le signal $S^i(p\Delta t)$, correspondant à chaque espèce, observé après n impulsions d'un angle θ égal à 10° , est donné par :

$$S^i(p\Delta t) = \begin{bmatrix} S_{\beta\text{-G6P}}^i \\ S_{\delta\text{-PGL}}^i \\ S_{\gamma\text{-PGL}}^i \end{bmatrix} (p\Delta t) = \exp(Ap\Delta t) \cos^p(\theta) S(0) \quad (17)$$

avec $p\Delta t$ l'intervalle de temps entre deux impulsions consécutives et $S^i(0) = \begin{bmatrix} S_{\beta\text{-G6P}}^i(t_0) \\ S_{\delta\text{-PGL}}^i(t_0) \\ S_{\gamma\text{-PGL}}^i(t_0) \end{bmatrix}$

la valeur initiale du signal à $t_0 = 5$ s dans lesquelles :

- pour l'expérience A : $S_{\beta\text{-G6P}}^*(t_0)$ correspond au signal initial du $\beta\text{-G6P}$, $S_{\delta\text{PGL}}^*(t_0)$ correspond au signal initial de la $\delta\text{-PGL}$, $S_{6\text{PGA}}^*(t_0)$ correspond au signal initial du 6PGA ;
- pour l'expérience B : $S_{\beta\text{-G6P}}^{**}(t_0)$ correspond au signal initial du $\beta\text{-G6P}$, $S_{\delta\text{PGL}}^{**}(t_0)$ correspond au signal initial de la $\delta\text{-PGL}$, $S_{6\text{PGA}}^{**}(t_0)$ correspond au signal initial du 6PGA.

Dans cette description, les valeurs initiales des signaux sont également des paramètres ajustables du modèle. Ce modèle comporte ainsi 9 paramètres ajustables pour l'expérience A et B : 3 constantes cinétiques, 3 vitesses de relaxation longitudinales et 3 concentrations initiales. Les intensités relatives de chaque métabolite pour l'expérience A et B ont été extraites en intégrant le spectre entre 94,7 ppm et 96,5 ppm pour le $\beta\text{-G6P}$, entre 173,0 ppm et 175,0 ppm pour la $\delta\text{-PGL}$ et entre 178,0 ppm et 179,4 ppm pour la 6PGA. Les histogrammes représentant les différents paramètres estimés pour chaque itération réalisée par notre programme d'ajustement pour les expériences A et B sont représentés en [Figure 92](#).

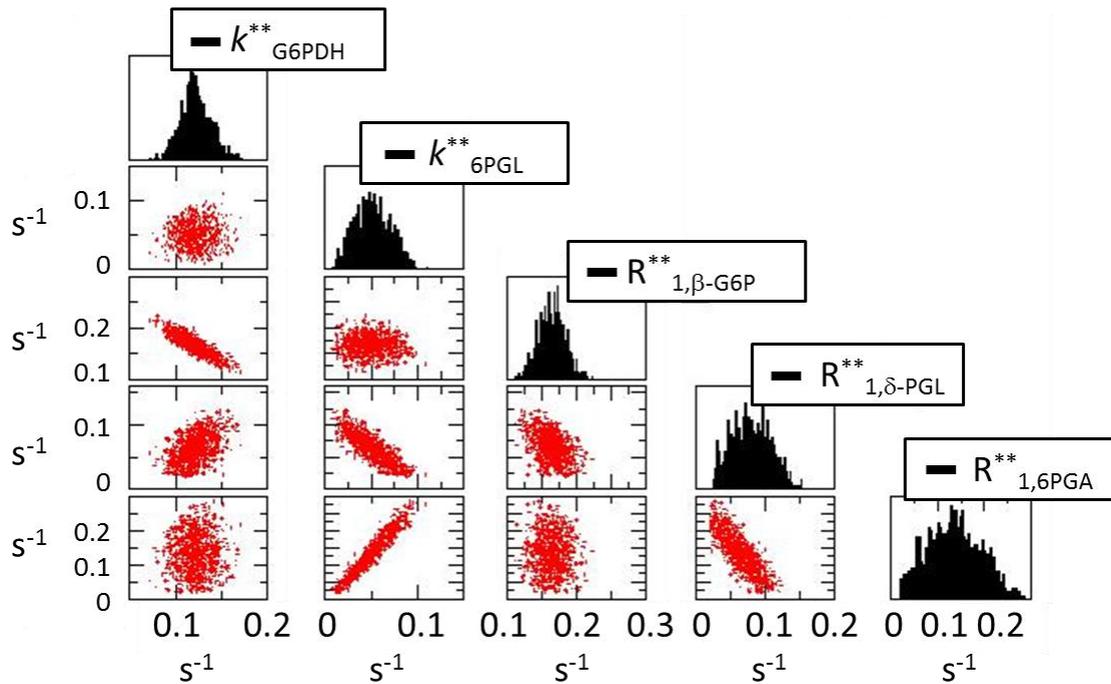


Figure 92 : Histogrammes des paramètres obtenus après 1000 essais Monte Carlo. L'histogramme des valeurs obtenues pour chaque paramètre est représenté en haut de chaque colonne. Les diagrammes de corrélations entre les différents paramètres pris deux à deux sont indiqués en dessous. L'échelle de chaque graphe est en s^{-1} .

Les histogrammes obtenus pour l'expérience A montrent que les distributions des paramètres k^{**}_{G6PDH} , $k^{**}_{\delta-PGL}$, $R^{**}_{1,\beta-PGL}$, et $R^{**}_{1,\delta-PGL}$ sont relativement symétriques et unimodales. La distribution de la constante de relaxation, $R^{**}_{1,6PGA}$, est asymétrique. La corrélation entre $R^{**}_{1,6PGA}$ et les paramètres $k^{**}_{\delta-PGL}$ et $R^{**}_{1,\beta-PGL}$ montre une dépendance de l'ajustement de $R^{**}_{1,6PGA}$ avec la vitesse de l'enzyme *Tb*-6PGL.

Expérience A			Expérience B		
Paramètres	Moyenne (en s^{-1})	σ (en s^{-1})	Paramètres	Moyenne (en s^{-1})	σ (en s^{-1})
k^*_{G6PD}	0,12	0,01	k^{**}_{G6PD}	0,11	0,02
k^*_{6PGL}	0,056	0,009	k^{**}_{6PGL}	0,097	0,026
$R^*_{1,\beta-G6P}$	0,16	0,01	$R^{**}_{1,\beta-G6P}$	0,18	0,02
$R^*_{1,\delta-PGL}$	0,06	0,01	$R^{**}_{1,\delta-PGL}$	0,03	0,03
$R^*_{1,6PGA}$	0,15	0,02	$R^{**}_{1,6PGA}$	0,14	0,08

Tableau 9 : Résumé de la moyenne ainsi que les écarts-types des constantes cinétiques de la G6PDH et de la 6PGL (k^n_{G6PDH} et k^n_{6PGL}) et des constantes de relaxation spin-réseau de chaque métabolite intervenant dans la cascade enzymatique ($R^n_{1,\beta-G6P}$, $R^n_{1,\delta-PGL}$ et $R^n_{1,6PGA}$) obtenues après 1000 itérations pour l'expérience A ($n = *$) et l'expérience B ($n = **$).

Les valeurs obtenues (Tableau 9) confirment l'hypothèse que l'hydrolyse du δ -PGL est plus rapide que l'oxydation du β -G6P dans les expériences A et B. L'étape limitante dans cette cascade enzymatique est donc l'hydrolyse de la δ -PGL. La cinétique de la G6PDH n'est donc pas ralentie par la cinétique de la *Tb*-6PGL. Le rapport obtenu pour les vitesses dans les deux

expériences A et B, k^{**}_{G6PD}/k^*_{G6PD} , égal à $0,9 \pm 0,2$, est équivalent au rapport des activités choisie de G6PD, dont le rapport A^{**}_{G6PD}/A^*_{G6PD} est égal à $0,7 \pm 0,1$. Les vitesses d'oxydations sont donc identiques entre les deux expériences.

De plus, la comparaison entre les expériences A et B avec celles réalisées avec la G6PD seule (I et II, Chapitre 3.3, résumé des valeurs dans le **Tableau 10**) montre que les rapports d'activités correspondent parfaitement avec leurs rapports des vitesses respectifs, excepté pour le rapport A^{**}_{G6PD}/A''_{G6PD} , où le rapport des activités est plus importante que le rapport des vitesses (**Tableau 11**).

Expérience	A_{G6PD}	k_{G6PD} en s⁻¹	R_{1,β-G6P} en s⁻¹
I	A' _{G6PD} = 206 ± 23 U	k' _{G6PD} = 0,075 ± 0,015	R' _{1,β-G6P} = 0,162 ± 0,017
II	A'' _{G6PD} = 550 ± 23 U	k'' _{G6PD} = 0,256 ± 0,018	R'' _{1,β-G6P} = 0,146 ± 0,024
A	A* _{G6PD} = 229 ± 23 U	k* _{G6PD} = 0,12 ± 0,02	R* _{1,β-G6P} = 0,16 ± 0,02
B	A** _{G6PD} = 321 ± 23 U	k** _{G6PD} = 0,11 ± 0,01	R** _{1,β-G6P} = 0,18 ± 0,01
#	A# _{G6PD} = 458 ± 23 U	K# _{G6PD} = 0,123 ± 0,002	

Tableau 10 : Résumé des activités utilisées lors des expériences réalisées avec la G6PDH seule (I et II ; Cf Chapitre 3.3) et des expériences réalisées avec la G6PDH en combinaison avec la 6PGL (A et B). L'ensemble des constantes cinétiques k_{G6PDH} ainsi que les constantes de relaxation spin-réseaux $R_{1,\beta-G6P}$ sont répertoriés dans ce tableau. Les indices * et ** correspondent respectivement aux expériences A et B. Les indices ' et '' correspondent respectivement aux expériences I et II. L'indice # correspond à l'expérience réalisée avec l'HK et la G6PDH dans le chapitre 3.2.

Rapport entre les expériences	Rapport des Activités	Rapport des k_{G6PDH}	Rapport des $R_{1,\beta-G6P}$
<i>I et B</i>	$A'_{G6PD} / A^{**}_{G6PD} =$ $0,64 \pm 0,12$	$k'_{G6PD} / k^{**}_{G6PD} =$ $0,7 \pm 0,2$	$R'_{1,\beta-G6P} / R^{**}_{1,\beta-G6P} =$ $0,90 \pm 0,14$
<i>I et A</i>	$A'_{G6PD} / A^*_{G6PD} =$ $0,90 \pm 0,19$	$k'_{G6PD} / k^*_{G6PD} =$ $0,62 \pm 0,32$	$T^*_{1,\beta-G6P} / T'_{1,\beta-G6P} =$ $0,99 \pm 0,23$
<i>II et B</i>	$A^{**}_{G6PD} / A''_{G6PD} =$ $0,58 \pm 0,01$	$k^{**}_{G6PD} / k''_{G6PD} =$ $0,43 \pm 0,07$	$T''_{1,\beta-G6P} / T^{**}_{1,\beta-G6P} =$ $0,81 \pm 0,18$
<i>II et A</i>	$A^*_{G6PD} / A''_{G6PD} =$ $0,42 \pm 0,06$	$k^*_{G6PD} / k''_{G6PD} =$ $0,47 \pm 0,11$	$T''_{1,\beta-G6P} / T^*_{1,\beta-G6P} =$ $0,91 \pm 0,26$

Tableau 11 : Résumé des différents rapports entre les activités de la G6PD (A^n_{G6PD}), les constantes cinétiques de la G6PD (k^n_{G6PD}) et les constantes de temps de relaxation spin-réseau du β -G6P ($T^n_{G1, \beta-G6P}$) obtenus entre des expériences réalisées avec la G6PD seule (I et II respectivement $n = ' \text{ et } ''$; Cf Chapitre 3.3) et des expériences réalisées avec la G6PD en combinaison avec la 6PGL (A et B respectivement $n = * \text{ et } **$). L'ensemble des valeurs d'activités de la G6PD (A^n_{G6PD}), des constantes cinétiques de la G6PD (k^n_{G6PD}) et des constantes de temps de relaxation spin-réseaux ($T^n_{G1, \beta-G6P}$) sont reportés dans le tableau 1.

Ces deux expériences utilisant deux activités de G6PD, $550 \pm 23 \text{ U}$ et $321 \pm 23 \text{ U}$ ont été réalisées dans les mêmes concentrations de co-facteurs. Le volume d'injection du $[U-^{13}C-D_7]$ -G6P est également identique. De plus, comme le montre la discussion plus haut, le NADP⁺ et le $[U-^{13}C-D_7]$ -G6P sont en quantités suffisantes. La comparaison entre les rapports des vitesses $k^{**}_{G6PD} / k''_{G6PD}$ et des activités $A^{**}_{G6PD} / A''_{G6PD}$ montrent que soit l'activité de la G6PD à $550 \pm 23 \text{ U}$ est faible, soit l'activité de la G6PD à $321 \pm 23 \text{ U}$ est plus lente. La similarité des résultats obtenus à $321 \pm 22,9 \text{ U}$ (A^{**}_{G6PD} , expérience B) et à $550 \pm 23 \text{ U}$ (A''_{G6PD} , expérience II) avec les autres expériences A et I montre que leurs rapports de vitesses correspondent parfaitement avec leurs rapports en activités (Tableau 11). Les différences de vitesses par rapport aux différences activités entre les expériences B et II sont donc surprenants.

Le rapport $T^*_{1,\beta-G6P} / T^{**}_{1,\beta-G6P}$, égal à $0,9 \pm 0,1$, montre que les temps de relaxation spin-réseau sont semblables. Lorsque ces valeurs sont comparées aux $T_{1,\beta-G6P}$ obtenus avec les expériences réalisées avec la G6PD seule (Chapitre 3.3 et tableau 3), les valeurs de $T_{1,\beta-G6P}$ sont presque identiques.

Le rapport des vitesses $k^{**}_{6PGL} / k^*_{6PGL}$ et des activités $A^{**}_{6PGL} / A^*_{6PGL}$ pour la *Tb*-6PGL sont respectivement égaux à $0,58 \pm 0,32$ et $0,72 \pm 0,04$. Ces valeurs montrent que les vitesses sont similaires au rapport des quantités de *Tb*-6PGL utilisées dans les deux expériences avec la G6PD et la *Tb*-6PGL (Expérience A et B). La vitesse d'hydrolyse obtenue en présence de la

Tb-6PGL est plus rapide que celle de l'hydrolyse spontanée de la δ -PGL (chapitre 3,2 ; $k_{\delta-6PGL} = 0,0016 \pm 0,0004 \text{ s}^{-1}$) et plus rapide que celle de l'hydrolyse spontanée de la γ -PGL (chapitre 3,2 ; $k_{\gamma-6PGL} = 0,0028 \pm 0,0019 \text{ s}^{-1}$). Les constantes de relaxation longitudinales $R^*_{1,6PGA}$, $R^{**}_{1,6PGA}$, $R^*_{1,\delta-PGL}$ et $R^{**}_{1,\delta-PGL}$ obtenues dans les deux expériences réalisées avec la G6PD et la 6PGL sont semblables. Les vitesses de relaxation de la δ -PGL, $R^*_{1,\delta-PGL}$ et $R^{**}_{1,\delta-PGL}$ sont plus lente que $R^*_{1,6PGA}$, $R^{**}_{1,6PGA}$, $R^*_{1,\beta-G6P}$ et $R^{**}_{1,\beta-G6P}$. Les constantes de relaxation obtenues pour le 6PGA, $R^*_{1,6PGA}$ et $R^{**}_{1,6PGA}$, sont proches de celle obtenue lors d'une mesure réalisée sur la solution post réactionnelle de l'expérience A, $R_{1,6PGA} = 0,110 \pm 0,008 \text{ s}^{-1}$.

Expérience	V_{6PGL}	k_{6PGL} en s^{-1}	$R_{1,\delta-6PGL}$ en s^{-1}
A	$V^*_{6PGL} = 143 \pm 6,22 \mu\text{L}$	$k^*_{6PGL} = 0,056 \pm 0,026$	$R^*_{1,\delta-PGL} = 0,06 \pm 0,03$
B	$V^{**}_{6PGL} = 240 \pm 6,22 \mu\text{L}$	$k^{**}_{6PGL} = 0,097 \pm 0,009$	$R^{**}_{1,\delta-PGL} = 0,03 \pm 0,01$
\$\$	$V_{6PGL} = 0 \mu\text{L}$	$k_{\delta-PGL} = 0,0028 \pm 0,0019$	$R_{1,\delta-PGL} = 0,067 \pm 0,001$

Tableau 12 : Résumé des activités utilisées lors des expériences réalisées avec la combinaison de l'HK et la G6PDH (\$\$; Cf Chapitre 3.1.3) et des expériences réalisées avec la G6PD en combinaison avec la 6PGL (A et B). L'ensemble des constantes cinétiques k_{6PGL} , ainsi que les constantes de relaxation spin-réseau, $R_{1,\delta-PGL}$, sont répertoriées dans ce tableau.

Cependant, les $R_{1,\delta-PGL}$ obtenues lors de l'ajustement du cycle des lactones et dans les expériences de cinétiques réalisées avec la G6PD seule (I et II), $R'_{1,\delta-PGL}$ et $R''_{1,\delta-PGL}$, sont 3 fois plus lentes que les $R^*_{1,\delta-PGL}$ et $R^{**}_{1,\delta-PGL}$, déterminées pour les cascades G6PD et 6PGL (A et B ; **Tableau 12**).

Rapport entre les expériences	Rapport des $T_{1,\delta-PGL}$
I et B	$T'_{1,\delta-PGL} / T^{**}_{1,\delta-PGL} = 0,31 \pm 0,17$
I et A	$T^*_{1,\delta-PGL} / T'_{1,\delta-PGL} = 0,62 \pm 0,44$
II et B	$T''_{1,\delta-PGL} / T^{**}_{1,\delta-PGL} = 0,27 \pm 0,11$
II et A	$T''_{1,\delta-PGL} / R^*_{1,\delta-PGL} = 0,55 \pm 0,32$

Tableau 13 : Résumé des différents rapports des temps de relaxation spin-réseau du δ -PGL ($T_{1,\delta-PGL}$) obtenues entre des expériences réalisées avec la G6PDH seule (I et II ; Cf Chapitre 3.3) et des expériences réalisées avec la G6PDH en combinaison avec la 6PGL (A et B).

Ces différences de valeurs peuvent être dues

1. à la différence des concentrations des différents co-facteurs qui influencerait le temps de relaxation longitudinale du δ -PGL, $T_{1,\delta\text{-PGL}}$. En effet, le temps de relaxation spin-réseau est inversement proportionnel au temps de corrélation qui est proportionnelle à la viscosité. Ainsi, plus la concentration en co-facteur est importante, plus la viscosité est importante et plus le temps de relaxation sera lent.

Expériences	[ATP] en mM	[NADP] en mM	[Hepes] en mM	[MgCl₂] en mM	[NaOH] en mM	[HCl] en mM	pH
\$\$	34,8	44	64	32	138,6	45,8	7,86
A et B	72,7	49	192,8	48,2	309,2	0	7,5

Tableau 14 : Résumé des différentes quantités en co-facteurs, en tampon Hepes, en soude et an acide chloridrique utilisées dans l'expérience réalisées avec la G6PD et l'HK (\$\$; Cf Chapitre 3.2) et des expériences réalisées avec la G6PDH en combinaison avec la 6PGL (A et B).

2. à un problème à la prise en compte d'éventuelles erreurs systématiques tel que la variation de la température...

L'ensemble des manips montrent que le modèle cinétique est approprié pour ces conditions expérimentales. L'activité de la G6PD est suffisante pour produire le substrat de la Tb-6PGL suffisamment vite pour étudier cette enzyme. Après avoir étudié la cinétique de la Tb-6PGL, les études d'inhibitions ont été réalisées.

4.2 Inhibition de la 6PGL :

Comme présenté dans l'introduction de ce chapitre, la 6PGL de *Trypanosoma brucei* (Tb-6PGL) est une cible thérapeutique pour guérir la maladie du sommeil. Pourtant, aucun inhibiteur n'a pour le moment été conçu. L'équipe du Prof Sollogoub a récemment synthétisé un analogue du substrat de la Tb-6PGL, « le GP269 ». Ce lactame, présente un atome d'azote à la place de l'oxygène en position alpha du carbonyle de l'ester du G6P (Figure 93). Dans ce chapitre nous présentons une étude réalisée par spectrophotométrie UV-Vis destinée à tester un éventuel pouvoir inhibiteur sur 6PGL de ce composé.

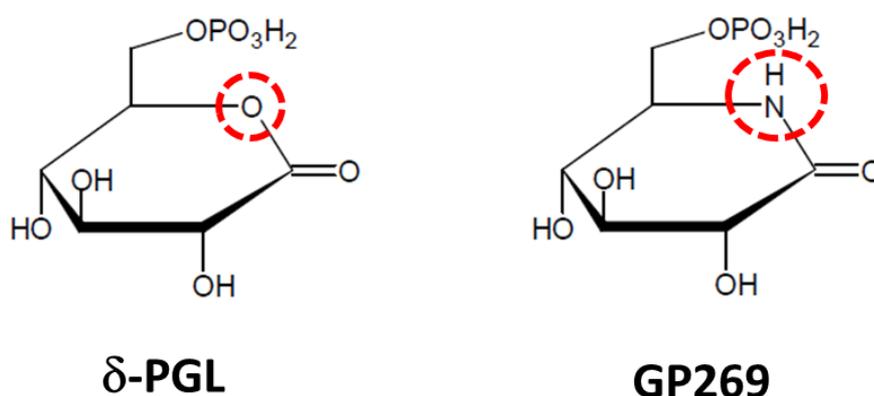


Figure 93 : Représentation du substrat de la Tb-6PGL, le δ -PGL (à gauche) ainsi que l'analogue du substrat, la GP269 (à gauche), potentiel inhibiteur de la Tb-6PGL. Le cercle discontinu en rouge représente le seul atome qui se différencie entre le substrat de la Tb-6PGL et son analogue.

4.2.1 La méthode

La spectrophotométrie UV-visible permet de mesurer l'absorption du rayonnement incident sur une cuve par les molécules contenues dans la cuve possédant des groupements chromophores. L'intensité du rayonnement sortant de la cuve contenant la substance analysée (I) est comparée à l'intensité sortante absorbée d'une cuve de référence ('le blanc'), I_0 . Le blanc est enregistré avec la même cuve et le même solvant que l'analyte. La valeur de l'absorbance, $A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right)$, est donnée par la loi de Beer-Lambert : $A = \varepsilon \cdot C \cdot l$, où C est la concentration, ε le coefficient d'extinction molaire de la molécule, et l la section de la cuve traversée par la lumière. Dans les expériences réalisées, la section traversée est $l = 1$ cm.

L'activité de la Tb-6PGL est obtenue à partir de la mesure de l'absorbance en fonction du temps. L'enzyme possède des groupements chromophores, par la présence des acides aminés aromatiques (Phénylalanine (Phé), Tryptophane (Trp) et Tyrosine (Tyr)) qui absorbent

aux longueurs d'ondes $\lambda_{\text{Trp et Tyr}} = 280 \text{ nm}$ et $\lambda_{\text{Phé}} = 260 \text{ nm}$. L'activité de l'enzyme ne peut pas être mesurée de manière directe puisque le produit de l'enzyme (6PGA) ne possède pas de chromophore. L'activité de l'enzyme a donc été observée de manière indirecte en utilisant les propriétés d'absorption du coenzyme, NADPH ($\lambda_{\text{NADPH}} = 340 \text{ nm}$). Lors des réactions d'oxydation du G6P et de décarboxylation de la δ -PGL, respectivement par la G6PD et la 6PGD, un équivalent de NADPH est produit à chaque étape. Ces deux réactions encadrent la réaction d'hydrolyse de la δ -PGL, catalysée par la 6PGL (Figure 94 et Figure 95).

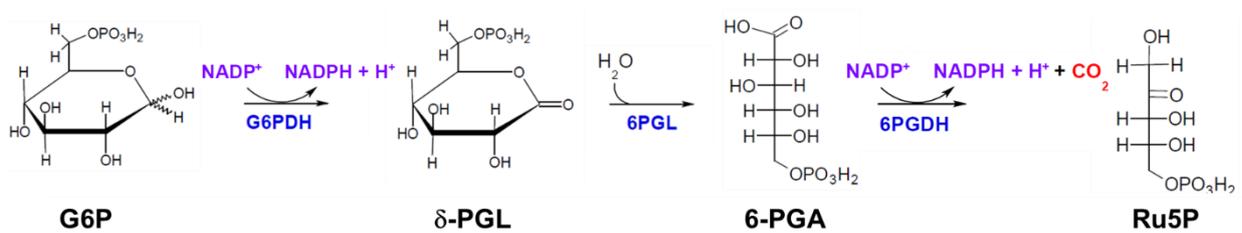


Figure 94 : Branche oxydative de la voie des pentoses phosphates. Les trois enzymes (G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase, *Tb*-6PGL : 6-phosphogluconolactonase de *Trypanosoma brucei* (*Tb*), 6PGD : 6 phosphogluconate déshydrogénase) qui composent cette cascade enzymatique sont indiquées en bleu foncé. Les co-enzymes sont en violet. Le nom de chaque métabolite (G6P : glucose-6-phosphate, δ -PGL : δ -6 phosphogluconolactone, Ru5P : ribulose-5-phosphate) est en noir.

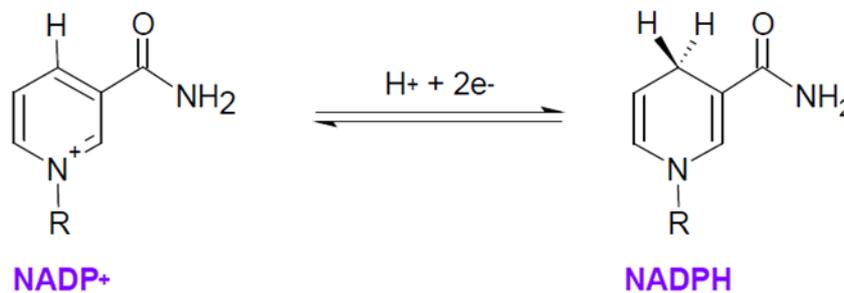


Figure 95 : Représentation de la réaction rédox entre le NADP⁺ et le NADPH.

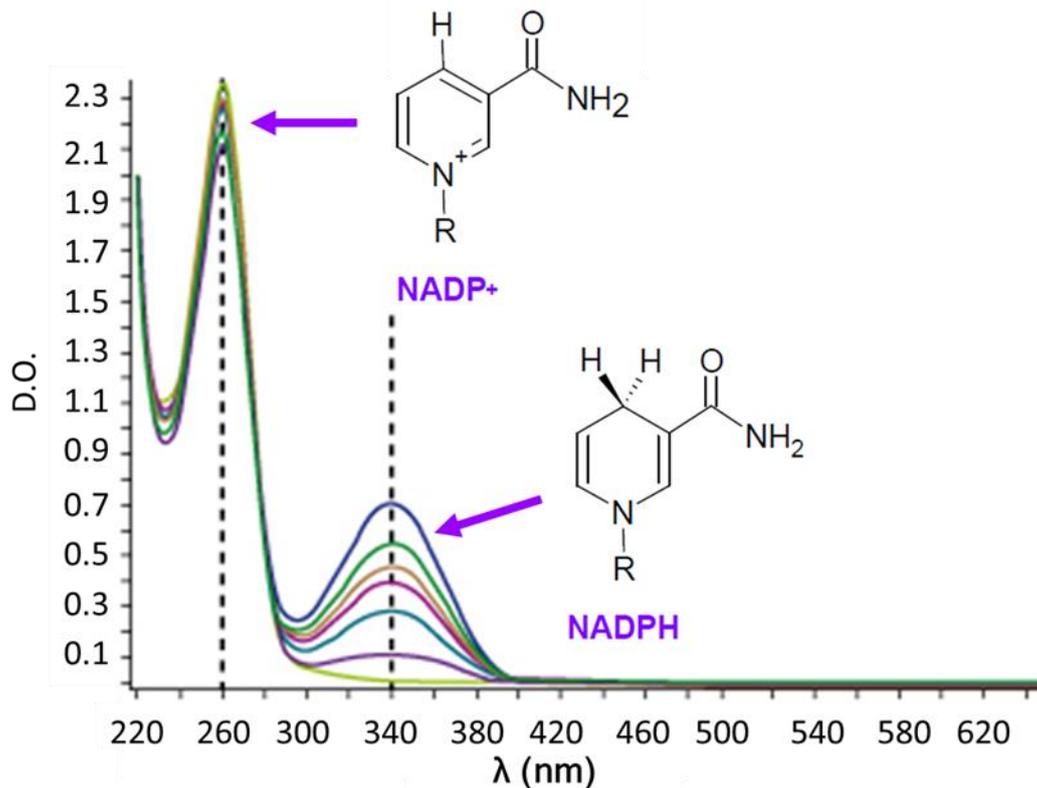


Figure 96 : Spectre représentant l'absorption de NADP^+ et de NADPH entre $\lambda = 220 \text{ nm}$ et $\lambda = 620 \text{ nm}$.

Le principe du suivi de la cinétique de la 6PGL est donc de produire tout d'abord le substrat de la 6PGL (d-PGL) à partir de G6P, en présence l'enzyme G6PD et de son cofacteur, le NADP^+ . L'oxydation du G6P est attestée par l'augmentation rapide de l'absorbance jusqu'à une valeur plateau, correspondant à la production d'un équivalent de NADPH par la réaction. Dans cette étape, la production de la δ -PGL doit être rapide et complète pour que cette réaction ne se superpose pas à l'action de la lactonase (qui n'est pas encore présente dans l'échantillon). De plus, la solution contient également la troisième enzyme du cycle des pentoses phosphates, la 6PGD, en quantité telle que son activité soit très grande devant celle de la protéine à tester, la 6PGL. Ainsi, lors de l'ajout de 6PGL au milieu réactionnel, le 6PGA formé par oxydation de la lactone est « immédiatement » transformée en ribulose-5-phosphate par la 6PGD. Cette étape s'accompagne de la production d'un équivalent de NADPH . L'absorbance permet donc de suivre indirectement la production de 6PGA et l'activité enzymatique de la 6PGL.

Le résultat de cette expérience est illustré sur la **Figure 97** où la courbe bleue correspond à la mesure d'absorbance du NADPH en fonction du temps en l'absence de 6PGL. Dans ce cas, on introduit le G6P à $t = 1 \text{ min}$. Nous observons une augmentation rapide de l'absorbance, correspondant à l'oxydation du G6P. Cependant, un plateau n'est pas atteint. L'absorbance

augmente lentement, mais continûment. Cet effet provient de l'hydrolyse spontanée de la d-PGL en 6PGA, lui-même immédiatement transformé en Ru-5P, qui s'accompagne d'une production de NADPH.

Lorsqu'au cours de cette expérience, nous ajoutons la 6PGL (à $t = 3$ min sur la [Figure 97](#)), on observe une augmentation rapide de l'absorbance jusqu'à atteindre un plateau correspondant à la production d'un second équivalent de NADPH. Nous voyons très bien sur la courbe noir, que pour la quantité utilisée (150 ng) de 6PGL, la réaction est rapide et le plateau déjà atteint lorsque les mesures reprennent (la cuve est retirée du spectromètre pour permettre l'ajout de l'enzyme). Pour une quantité plus faible de 6PGL (15 ng), nous observons une croissance de l'absorbance, permettant d'extraire la cinétique de la 6PGL, comme nous le verrons plus bas.

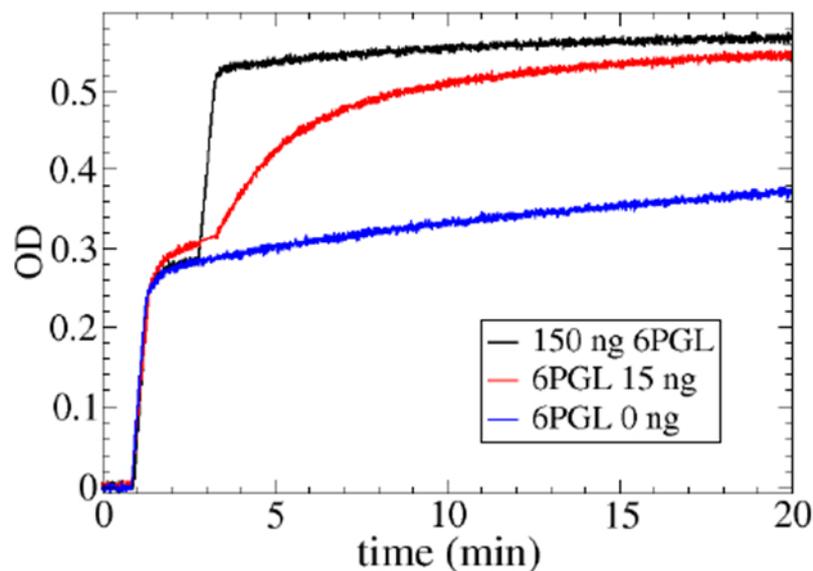


Figure 97 : Courbes obtenues lors des tests préliminaires pour observer la production de NADPH à différentes concentrations de 6PGL : 150 ng de *Tb*-6PGL (en noir), 15 ng de *Tb*-6PGL (en rouge), 0 ng de *Tb*-6PGL (en bleu).

Il est possible d'estimer grossièrement l'activité de la 6PGL dans les cas de la [Figure 97](#) de la manière suivante. Supposant que la 6PGL est effectivement l'étape limitante de la cascade et que la d-PGL est toujours en grand excès (ce qui est bien sûr faux en fin de réaction), une estimation de l'activité par interpolation linéaire entre les deux plateaux peut être faite. Nous trouvons dans ce cas ($m_{6PGL} = 150$ ng) $A_{150} \sim 0,04$ U (1 U correspond à 1 micromole de substrat transformée par minute). Par ailleurs, lorsque la quantité de 6PGL est $m_{6PGL} = 15$ ng, l'activité mesurée devient $A_{15} \sim 0.005$ U, soit un facteur 10. Ces résultats montrent que la vitesse de production de NADPH varie proportionnellement à l'activité (et la concentration) de 6PGL.

Donc dans ces deux cas, l'activité 6PGL est bien plus faible que l'activité 6PGD, dans ce cas égale à $A_{6PGD} = 0,983$ U. Ces expériences tests montrent bien que la réaction catalysée par la 6PGL est bien l'étape limitante de la cascade. Dans la suite des expériences présentées dans ce chapitre, nous avons travaillé avec une activité de 6PGD plus faible, $A_{6PGD} = 0,3$ U, et $m_{6PGL} = 15$ ng, ce qui nous place effectivement en condition limitante de 6PGL.

Différentes concentrations d'inhibiteur ont été ajoutées dans la solution réactionnelle. Seul le substrat de départ (G6P) et la 6PGL sont ajoutés au cours de l'enregistrement de l'absorbance, respectivement à 1 et 3 minutes après le début de la détection. L'ajout à 1 min du G6P permet de produire par la G6PD (en excès), le premier équivalent de NADPH et le substrat de la 6PGL. Ainsi, à 3 min, l'ajout de la 6PGL permet d'observer l'hydrolyse via la production du deuxième équivalent de NADPH produit par la 6PGD (en excès).

4.2.2 Résultats :

Une série de mesures cinétiques en présence de différentes concentrations de GP269 nous a permis de démontrer son effet inhibiteur sur la 6PGL. Les courbes correspondantes montrent clairement une diminution des vitesses de production du NADPH ([Figure 98](#)) et donc une diminution de l'activité 6PGL. Ces courbes montrent une partie linéaire, témoignant d'une cinétique d'ordre zéro en présence d'un excès de substrat. Pour chaque courbe une pente est extraite de cette partie linéaire et permet d'obtenir une activité enzymatique.

Il y a quelques détails techniques à mentionner. Tout d'abord, en raison de la présence d'une hydrolyse spontanée de la δ -PGL, la fin de la réaction d'oxydation du G6P ne peut pas être simplement déterminée par le temps où le premier plateau est atteint. En supposant une cinétique exponentielle (rapide, de temps caractéristique τ_1) pour l'oxydation enzymatique et une cinétique exponentielle (lente, de temps caractéristique τ_2) pour l'hydrolyse de la lactone, on ajuste cette partie de la courbe avec l'équation :

$$s(t) = A(2 - e^{-\frac{t-t_0}{\tau_1}} - e^{-\frac{t-t_0}{\tau_2}}) \quad (17)$$

dans laquelle t_0 indique le temps de début de réaction (ajout de G6P). On trouve, $\tau_1 \sim 20$ s, ce qui justifie l'introduction de la 6PGL à $\tau_0 - t_0 = 2 \text{ min} \sim 6 * \tau_1$, $t_0 = 1$ min étant le début des expériences cinétiques.

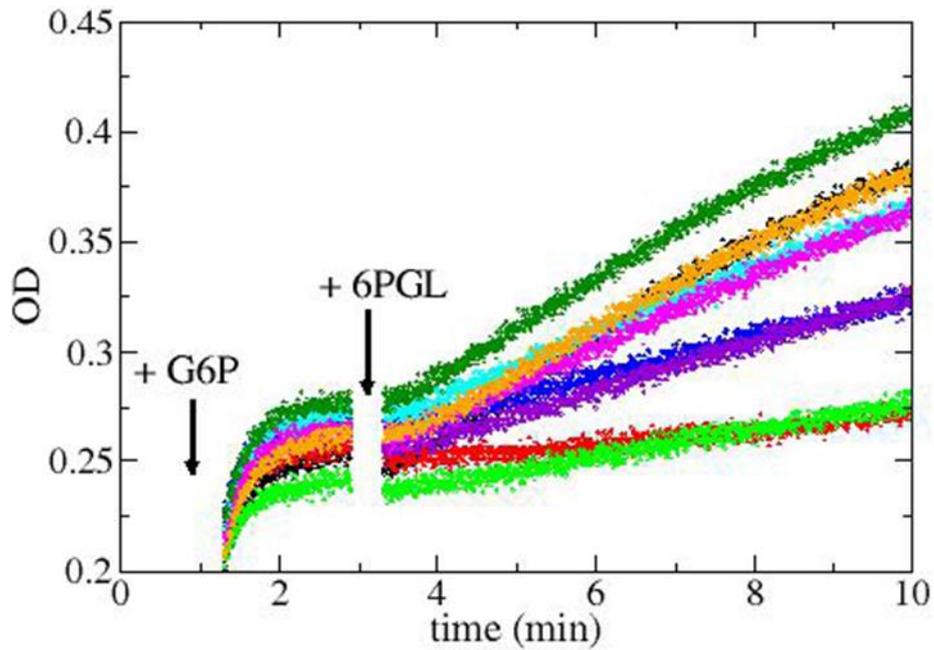


Figure 98 : Regroupement des courbes d'absorption obtenues lors des expériences réalisées avec des différentes concentrations d'inhibiteurs : 0 μM (en noir), 1 μM (en vert foncé), 2,5 μM (en magenta), 3 μM (en orange), 10 μM (en bleu clair), 25 μM (en violet), 30 μM (en bleu foncé), 100 μM (en vert clair), 250 μM (en rouge) dans le but d'observer l'effet sur l'activité de la 6PGL.

Les pentes des régions linéaires ont été déterminées dans l'intervalle 5-8 min et sont présentées dans la Figure 99.

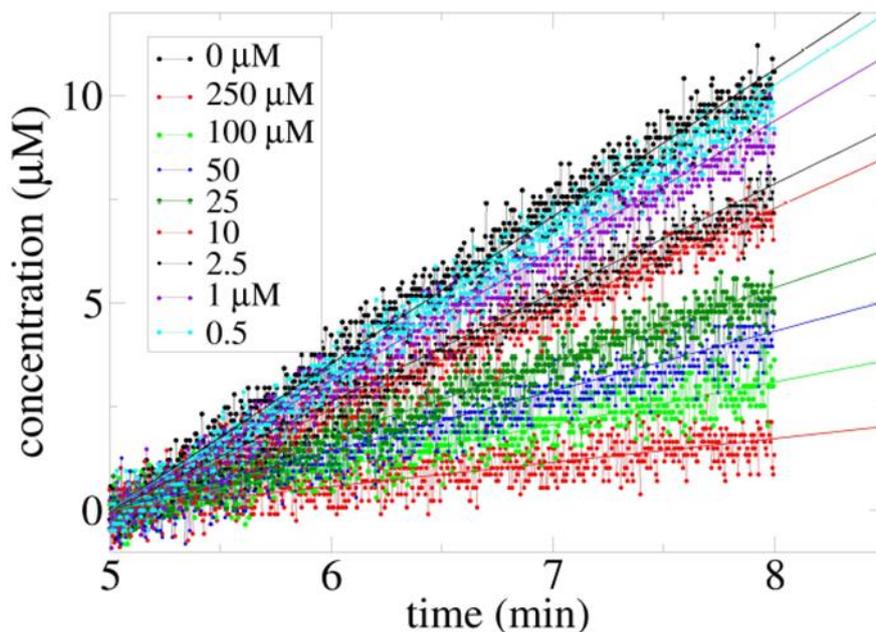


Figure 99 : Agrandissement des courbes obtenues entre 5 et 8 min. Les points représentent les valeurs d'absorption obtenues à 0 μM d'inhibiteur (en noir), 0,5 μM d'inhibiteur (en bleu ciel), 1 μM d'inhibiteur (en violet), 2,5 μM d'inhibiteur (en marron), 10 μM d'inhibiteur (en orange), 25 μM d'inhibiteur (en vert foncé), 50 μM d'inhibiteur (en bleu foncé), 100 μM d'inhibiteur (en vert clair), 250 μM d'inhibiteur (en rouge) et les droites correspondent aux fonctions affines correspondantes.

Pour chaque concentration c de l'inhibiteur, les valeurs des pentes $\Delta(c)$ ont ensuite été corrigées pour prendre en compte la contribution provenant de l'hydrolyse spontanée, Δ_{sh} . Celle-ci est associée à la constante τ_2 de l'équation (17), $\tau_2 \sim 34$ min. Nous trouvons ainsi $\Delta_{sh} = 10^{-6} \text{ M.min}^{-1}$ et les pentes « vraies » : (Equation 18 et Tableau 15).

$$a(c) = \Delta(c) - \Delta_{sh} \quad (18)$$

Les valeurs corrigées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous. Ces valeurs, ainsi que l'allure des courbes, attestent très clairement de la diminution de l'activité de la 6PGL en présence de GP269.

[Inhibiteur] en μM	250	100	50	25	10	2.5	1	0.5	0
$a(1)$ en $10^6 \cdot \text{M.min}^{-1}$	0.58	1.03	1.44	1.79	2.43	2.62	3.13	3.42	3.54
$a(2)$ en $10^6 \cdot \text{M.min}^{-1}$	0.66	1.23	1.54	1.80	2.65	3.03	3.50	3.52	3.97

Tableau 15 : Pentas de l'absorption de NADPH dans les expériences d'inhibition de la 6PGL obtenues entre $t = 5$ min et $t = 8$ min. Différentes concentrations d'inhibiteurs ont été testées et deux séries d'expériences ont été réalisées. Le coefficient d'extinction molaire de NADPH à $\lambda = 340$ nm est $\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1}$. En l'absence de 6PGL, une pente $a_{\infty} = 10^{-6} \text{ M.min}^{-1}$ a été obtenue.

4.2.3 Détermination de l'IC₅₀ :

L'IC₅₀ est un indicateur de l'efficacité d'un inhibiteur, qui mesure la concentration d'inhibiteur nécessaire pour inhiber 50 % de l'activité de l'enzyme A(n) :

$$A_n = \frac{a(c)}{a_0} = \frac{1}{1 + \left(\frac{c}{IC_{50}}\right)^{1/d_c}} \quad (19)$$

avec a_0 correspondant à la pente obtenue sans inhibiteur.

(a) normalisé

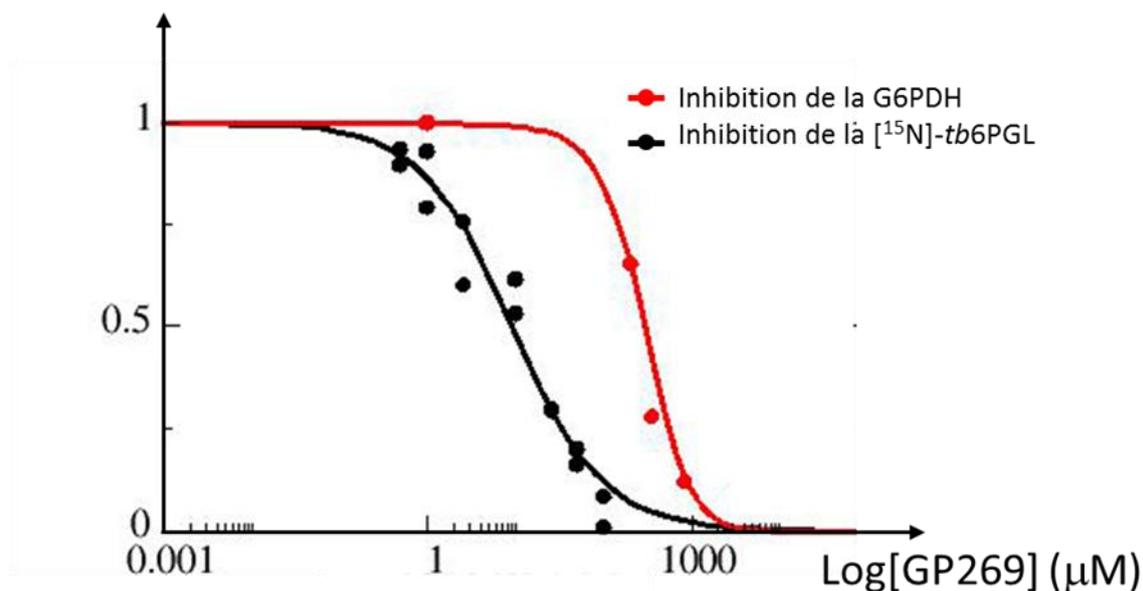


Figure 100 : Graphique représentant les courbes obtenues après l'ajustement des pentes normalisées obtenus pour les expériences d'inhibitions de la GP269 sur la Tb-6PGL (en noir) et la 6PGD (en rouge). Les pentes normalisées obtenues expérimentalement sont représentés par des cercles.

Les paramètres de l'équation 18 ont été ajustés à l'aide des valeurs des pentes normalisées en fonction des concentrations de GP269. On obtient pour le paramètre IC_{50} des valeurs d'environ $9.3 \mu\text{M}$ et $8.7 \mu\text{M}$ ont été obtenues respectivement pour les deux séries d'expériences (Figure 100). L'erreur résultante du fit pour l' IC_{50} est de $0.6 \mu\text{M}$. Par ailleurs, une procédure d'ajustement incluant simultanément les pentes normalisées obtenues dans les deux séries d'expériences donne une valeur $\text{IC}_{50} \sim 9.3 \mu\text{M}$.

4.2.4 Inhibition de la 6PGD :

Les expériences réalisées à forte concentration d'inhibiteur $[I] = 250 \mu\text{M}$ montrent que la vitesse de l'hydrolyse spontanée est plus rapide que celle de la réaction catalysée par la 6PGL. Ces résultats indiquent que le GP269 n'inhibe pas seulement la 6PGL mais également la 6PGD, la dernière enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphate.

Dans le but d'observer l'inhibition sur cette seconde enzyme, des expériences d'inhibition à des concentrations comprises entre 0 et $800 \mu\text{M}$ de GP269 ont été réalisées de la même manière que précédemment (la préparation des échantillons est expliquée en annexe). A $t_0 = 1 \text{ min}$, le substrat de l'enzyme, le 6-phosphogluconate, a été ajouté pour

observer le NADPH obtenu via son absorbance à $\lambda = 280$ nm. L'absorbance obtenue représente cette fois l'activité de la 6PGD à différentes concentrations d'inhibiteurs.

Les résultats montrent une légère inhibition à partir de 50 μM GP269 et une inhibition plus importante à partir de 100 μM d'inhibiteur (Figure 101). Les pentes ont été extraites en utilisant les points entre 1.4 < t < 2.4 minutes (Figure 102).

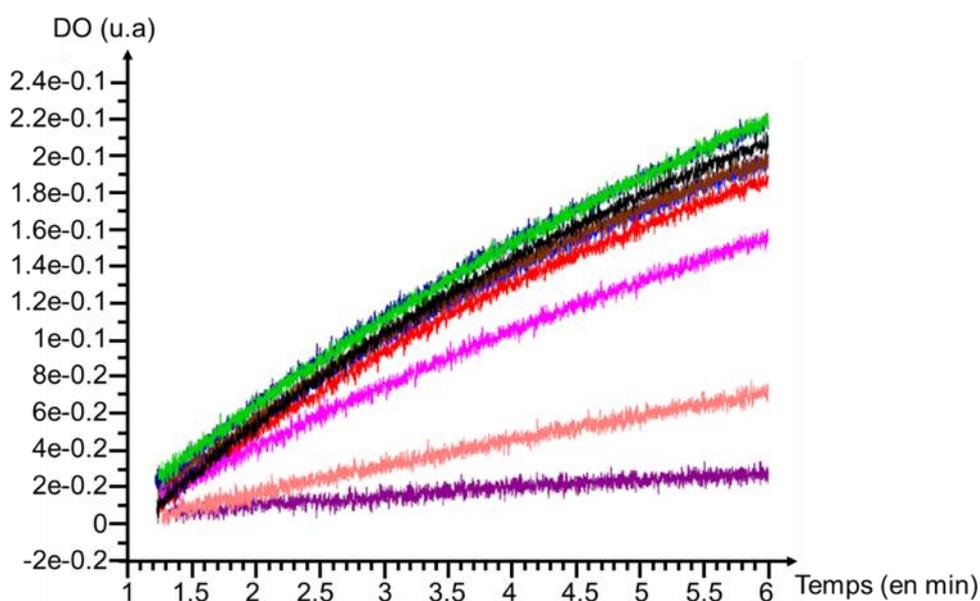


Figure 101 : Courbes d'absorbances obtenues à partir des expériences d'inhibition réalisées en 800 μM (en violet), 340 μM (en corail), 250 μM (en vert), 200 μM (en magenta), 100 μM (en bleu foncé), 50 μM (en rouge et marron) et 10 μM (en bleu) d'inhibiteur et en son absence (en noir).

Nous remarquons que les pentes obtenues à 10 μM , 50 μM et 250 μM d'inhibiteur sont plus faibles qu'à 100 μM de GP269. Leurs incertitudes étant élevées et semblables, l'inhibition pour des concentrations comprises entre 0 et 100 μM ont été considérées négligeables. La pente et l'incertitude sur la mesure obtenue à 200 μM GP269 est suffisamment faible pour considérer que la valeur obtenue à 250 μM d'inhibiteur soit considérer comme minime. La GP269 inhibe donc la 6PGD à de fortes concentrations (Tableau 16).

[Inhibiteur] en μM	0	10	50	50	100	250	800	340	200
$a(3)$ en $10^6 \text{ M} \cdot \text{min}^{-1}$	8.71	7.80	7.76	7.76	8.49	7.92	1.06	2.44	5.69
Incertainitude	0.40	0.36	0.36	0.36	0.39	0.37	0.08	0.13	0.27

Tableau 16 : Pentas de l'absorption de NADPH dans les expériences d'inhibition de la 6PGD obtenues entre $t = 1.4$ min et $t = 2.4$ min. Différentes concentration d'inhibiteurs ont été testées. Le coefficient d'extinction molaire de NADPH à $\lambda = 340$ nm est $\epsilon = 6300 \text{ M}^{-1}$.

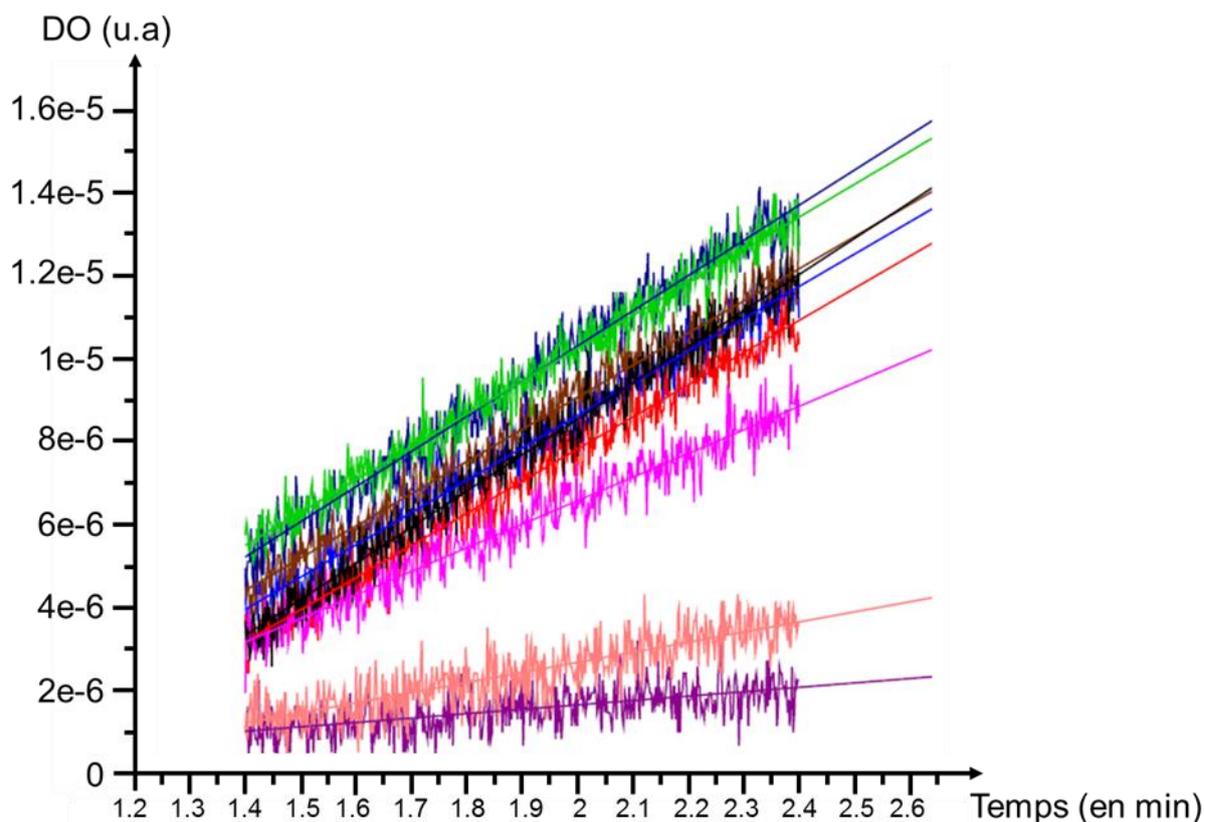


Figure 102 : Agrandissement des courbes d'absorbance obtenues à partir des expériences d'inhibition réalisées en 800 μM (en violet), 340 μM (en corail), 250 μM (en vert), 200 μM (en magenta), 100 μM (en bleu foncé), 50 μM (en rouge et marron) et 10 μM (en bleu) d'inhibiteur et en son absence (en noir) entre 1.2 et 2.5 s. Les droites correspondent aux fonctions affines obtenues respectivement pour chaque portion de courbes.

Une IC_{50} égale à $265 \pm 14 \mu\text{M}$ a été obtenue. Un ordre de grandeur de différence sépare l'inhibition de la 6PGL et celle de la 6PGD montrant ainsi qu'à 18.6 μM de GP269 seule, la 6PGL est inhibée (Figure 100).

La valeur d' IC_{50} obtenue pour la *Tb*-6PGL est du même ordre de grandeur que celles des concentrations des métabolites dans la cellule (10^{-6}M). De plus, si les valeurs obtenues sont comparées aux différents inhibiteurs considéré comme sélectifs pour d'autres enzymes, comme le *m*-bromophenyl glucosamide ($\text{IC}_{50} = 500 \mu\text{M}$)¹⁷⁹ et la quercétine ($\text{IC}_{50} = 4.1 \pm 0.8 \mu\text{M}$)¹⁸⁰ inhibiteurs pour l'hexokinase de la *Trypanosoma brucei* (*Tb*-HK) ou 16 α -bromoepiandrosterone ($\text{IC}_{50} = 86 \pm 8 \text{nM}$) inhibiteur de la G6PD de la *Trypanosoma brucei* (*Tb*-G6PD). L'inhibiteur que nous avons testé peut être considéré comme un « drug-lead » dans le traitement de la maladie du sommeil. A haute dose, la GP269 permet d'inhiber deux enzymes de la voie oxydative de la PPP dans les *Trypanosoma brucei* (Figure 103).

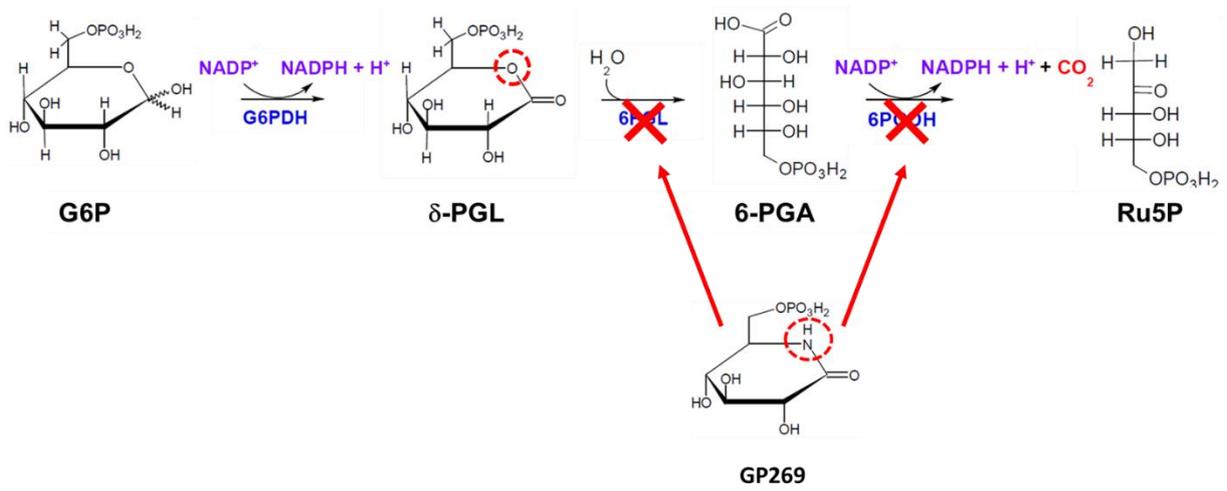


Figure 103 : Représentation de l'inhibition de la GP269 sur l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates.

Conclusions et perspectives

Au cours de cette thèse, nous avons réussi à observer en temps réel le fonctionnement des deux premières enzymes de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates. La caractérisation de l'activité de ces deux enzymes a été réalisée par Résonance Magnétique Nucléaire avec sensibilité amplifiée par Polarisation Dynamique Nucléaire suivie de dissolution (D-DNP-NMR). Cette spectroscopie offre l'opportunité de suivre le devenir des substrats en temps réel. Les activités des enzymes ont été mesurées aussi bien dans des cascades enzymatiques que individuellement. L'étude individuelle de ces enzymes a nécessité de mettre au point des protocoles pour la production de leurs substrats marqués avec des isotopes ayant un spin nucléaire. La spectroscopie dans le domaine UV-visible a été utilisée lorsqu'un groupement chromophore était présent sur le substrat et le produit. Une fois les activités enzymatiques connues, l'inhibition de l'une de ces enzymes a été testée en utilisant un nouvel inhibiteur proposé. Ces résultats sont pertinents pour des études cliniques.

Dans le cadre de l'introduction de la D-DNP pour l'étude *in vitro* des activités enzymatiques de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, un protocole expérimental a été établi : (i) les substrats nécessitent des marquages avec des isotopes nucléaires ayant des propriétés magnétiques optimisées pour que la durée de l'aimantation hyperpolarisée soit optimale (e.g., le glucose marqué sélectivement en carbone-13 au site C₁ et uniformément deutéré a une durée de l'aimantation de $T_1 \sim 12$ s). (ii) lorsque l'étude individuel d'une réaction enzymatique était impossible, car le substrat marqué pour D-DNP-RMN manquait, l'enzyme actif en amont sur la PPP a été introduit pour obtenir le substrat par une réaction biochimique ; (iii) nous avons montré que, pour observer des cascades enzymatiques, il était nécessaire de réaliser ces expériences dans un tube de 10 mm pour éviter une viscosité trop importante du fait de la forte concentration en co-facteurs nécessaire pour observer des cinétiques de pseudo-premier ordre.

Nous avons réussi à observer en temps réel, via D-DNP, le fonctionnement de deux enzymes de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates : la G6PD et la 6PGL de *Trypanosoma brucei* (Tb-6PGL), cibles potentielles pour le traitement contre la maladie du sommeil. Ces deux enzymes catalysent respectivement l'oxydation du glucose-6-phosphate (G6P) en 6-phosphogluconolactone (δ -PGL) et l'hydrolyse de la 6-phosphogluconolactone (δ -PGL) en acide 6-phosphogluconate (6PGA). L'étude de ces deux enzymes nous a permis :

1. d'affirmer la sélectivité de la première enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD), pour l'un des deux anomères du G6P, le β -G6P.

2. d'observer qu'en absence de la deuxième enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, la 6-phosphogluconolactonase (6PGL), son substrat, la 6-phosphogluconolactone (δ -PGL), s'isomériser en une autre 6-phosphogluconolactone (γ -PGL) et s'hydrolyse spontanément en acide 6-phosphogluconate (6PGA), produit de l'hydrolyse catalysée par l'enzyme. L'isomérisation est réversible et la γ -PGL s'hydrolyse spontanément en 6PGA.

3. d'observer que l'extraction des intensités pour l'obtention des paramètres cinétiques était impossible en utilisant plus que deux enzymes dans la cascade et leurs co-facteurs en raison d'une viscosité trop importante.

4. d'extraire les constantes cinétiques des deux premières enzymes de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, la G6PD et de la 6PGL, les constantes de temps de relaxation de chaque métabolite, à partir du substrat de la G6PD, le [U- 13 C-D $_7$]-G6P, nouvellement synthétisé au cours de cette thèse.

La dernière enzyme étudiée, la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD), est l'enzyme responsable de la transformation de l'acide 6-phosphogluconate (6PGA), en ribulose-5-phosphate (Ru5P). L'étude de cette enzyme à partir du [U- 13 C-D $_7$]-Gluc et du [U- 13 C-D $_7$]-G6P est difficile en raison de la largeur des lignes due à la viscosité de l'échantillon. La synthèse et la purification du substrat de la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD), l'acide 6-phosphogluconate (6PGA), est nécessaire pour étudier la cinétique de l'enzyme (6PGD). Une synthèse et une purification préliminaires ont été réalisées au cours de cette thèse: la [U- 13 C-D $_7$]-6PGA a été synthétisé enzymatiquement à partir du [U- 13 C-D $_7$]-Glucose.

Des études d'inhibition de la 6-phosphogluconolactonase de *Trypanosoma brucei* (*Tb*-6PGL), qui transforme la 6-phosphogluconolactone (δ -PGL) en acide 6-phosphogluconate (6PGA), ont été réalisées en utilisant l'inhibiteur GP269. Les résultats obtenus par spectrophotométrie ont montré que le GP269, un lactame, inhibait à la fois la deuxième et la troisième enzyme de l'étape oxydative de la voie des pentoses phosphates, respectivement, la 6-phosphogluconolactonase de *Trypanosoma brucei* (*Tb*-6PGL) et la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6PGD). L' IC_{50} obtenu pour la *Tb*-6PGL, égale $9.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$, est environ 30 fois

plus petite que l'IC₅₀ obtenue pour la 6PGD, qui est égale à 265 ± 14 μM. Ainsi, les valeurs obtenues pour l'IC₅₀ de la *Tb*-6PGL ne sont pas influencées par l'inhibition de la 6PGD. Ces valeurs de référence pourront être comparées aux valeurs qui seront obtenues par D-DNP. La stratégie pour réaliser ces expériences d'inhibition en D-DNP est de produire rapidement le substrat, ici la δ-PGL, à partir de la G6PD via l'hyperpolarisation du [U-¹³C-D₇]-G6P, en raison de l'instabilité de la δ-PGL en milieu aqueux.

Une fois qu'un inhibiteur de la *Tb*-6PGL sera déterminé, des études de la voie oxydative dans la cellule permettront d'analyser l'inhibition de cette enzyme dans des conditions proches des conditions physiologiques. Nous pourrions également observer le devenir des cellules dans ces conditions. Le *Trypanosoma brucei*, organisme responsable de la maladie du sommeil, possède les trois premières enzymes de la PPP dans un organite cellulaire, le glycosome. *In cell*, les flux métaboliques des cascades enzymatiques reflètent de l'efficacité de l'inhibiteur. Sachant que seul la 6PGL du *Trypanosoma brucei* (*Tb*-6PGL) a été étudié et que nous possédons le savoir-faire des conditions expérimentales pour l'étude des cinétiques enzymatiques, il serait important d'étudier le fonctionnement des trois enzymes de la voie oxydative de la PPP du *Trypanosoma brucei* dans des conditions physiologiques, *in cell* ou dans des lysats cellulaires. L'observation d'une inhibition efficace de la PPP dans ce microorganisme pourra faire de l'inhibiteur un « drug lead » pour la maladie provoquée par le *Trypanosoma brucei*, la maladie du sommeil.

L'approche expérimentale développée en utilisant la D-DNP-RMN pour ce système, menant de l'observation individuelle de l'activité des différentes enzymes à l'étude des cascades enzymatiques et à l'effet des inhibiteurs, pourra être utilisée dans l'étude d'autres voies métaboliques similaires, prenant en compte les stratégies de marquage isotopique et d'observation DNP-RMN développées au cours de cette thèse.

Annexes

Annexe 1 : Matériel et méthodes des études préliminaires réalisée à l'EPFL :

Annexe 1.1 Expérience test réalisée avec l'HK seul :

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μL contenant 5.6 M $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$, 50 mM Tempol ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2 \text{ K}$.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 400 μL à pH 7,0 composée de 137 mM ATP, 137 mM NADP^+ , 19 mM Tris, 137 mM MgCl_2 , 35 mM DCl, 253 mM NaOH, 114 μM HK ($\sim 187 \text{ U}$) a été placée dans le spectromètre à 11.75 T à $T = 298.15 \text{ K}$. Un volume de 850 μL a été obtenu après dissolution. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^6(^{13}\text{C})} = 11,25 \text{ } \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,9 \text{ s}$.

Annexe 1.2 Expérience test réalisée avec l'HK seul après l'amélioration du système d'injection de la solution polarisée :

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μL contenant 5.6 M $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$, 50 mM Tempol ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2 \text{ K}$.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 400 μL à pH 7,0 composée de 144 mM ATP, 144 mM NADP^+ , 23 mM Tris, 144 mM MgCl_2 , 269 mM NaOH, 114 μM HK ($\sim 187 \text{ U}$) a été placée dans le spectromètre à 11.75 T à $T = 298.15 \text{ K}$. 400 μL de solution hyperpolarisée ont été injecté dans la solution enzymatique. Un volume total de 720 μL et un pH de 6.96 ont été obtenu après dissolution. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^6(^{13}\text{C})} = 11,25 \text{ } \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,9 \text{ s}$.

Annexe 1.3 Expérience test réalisée avec l'HK et la G6PD après l'amélioration du système d'injection de la solution polarisée :

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μL contenant 5.6 M $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$, 50 mM Tempol ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2 \text{ K}$.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 400 μL à pH 7,0 composée de 144 mM ATP, 144 mM NADP^+ , 23 mM Tris, 144 mM MgCl_2 , 269 mM NaOH, 25 μM HK ($\sim 350 \text{ U}$) et 7 μM G6PD (750 U) a été placée dans le spectromètre à 11.75 T à $T = 298.15 \text{ K}$. 400 μL de solution hyperpolarisée ont été injecté dans la solution enzymatique. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 11,25 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,9 \text{ s}$.

Annexe 2 : Matériel et méthodes des études réalisées sur la G6PD à partir d'un tube de 10 mm de diamètre :

Annexe 2.1 Expérience réalisée avec l'HK et la G6PD dans un tube de 10 mm de diamètre :

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μL contenant 616 mM $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-Glucose}$, 50 mM Tempol, 25 mM Glycérol, 12 % H_2O et 6 % D_2O ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2 \text{ K}$. La CP a été réalisée à $T = 1.2 \text{ K}$ avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ${}^{13}\text{C}$ et ${}^1\text{H}$ sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 50 \text{ W}$ et $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 250 \text{ W}$. La durée de la CP est de 3,5 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du ${}^{13}\text{C}$ est de 0.7716 W.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL composée de 32 mM ATP, 33 mM NADP^+ , 60 mM Hepes, 30 mM MgCl_2 , 140 mM NaOH, 18 μM HK (412 U), 8 μM G6PD (458 U) a été placée à $T = 309 \text{ K}$ dans le spectromètre à 9.5 T. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 1,667 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3 \text{ s}$, $\text{RG} = 16$, $\text{SW} = 149,65 \text{ ppm}$ et $\text{O1P} = 125 \text{ pm}$.

Annexe 2.2 Expérience réalisée avec l'HK et la G6PD dans un tube de 10 mm de diamètre dans le but d'observer la sélectivité de la G6PD :

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μ L contenant 616 mM [U- 13 C-D₇]-Glucose, 50 mM Tempol, 57 % Ethylène glycol, 12 % H₂O et 6 % D₂O ont été congelées et insérées dans le polariseur à 4.2 K. La CP a été réalisée à T = 1.2 K avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le 13 C et 1H sont de 5 μ s avec les puissances $P_{90^\circ}(^1\text{H}) = 45$ W et $P_{90^\circ}(^{13}\text{C}) = 280$ W. La durée de la CP est de 1,5 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du 13 C est de 0.864 W.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL composée de 34.8 mM ATP, 44 mM NADP⁺, 64 mM Hepes, 32 mM MgCl₂, 139 mM NaOH, 27 μ M HK (~ 618 U) et 5 μ M G6PD (~ 321 U) a été placée à T = 309 K dans le spectromètre à 9,4 T. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}(^{13}\text{C}) = 1,67$ μ sec, $D_1 = 1$ s, NS = 1, $t_{\text{acq}} = 0,3$ s, RG = 16, SW = 149,65 ppm et O1P = 125 pm.

Annexe 2.3 Expérience réalisée avec l'HK et la G6PD dans un tube de 10 mm de diamètre à partir du [13 C₁-D₁]-Glucose :

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μ L contenant 592 mM [U- 13 C-D₇]-Glucose, 50 mM Tempol, 57 % Ethylène glycol, 11.6 % H₂O et 6.4 % D₂O ont été congelées et insérées dans le polariseur à T = 4.2 K. La CP a été réalisée à T = 1.2 K avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le 13 C et 1H sont de 5 μ s avec les puissances $P_{90^\circ}(^1\text{H}) = 50$ W et $P_{90^\circ}(^{13}\text{C}) = 280$ W. La durée de la CP est de 3,5 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du 13 C est de 0.864 W.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL composée de 43 mM ATP, 33 mM NADP⁺, 60 mM Hepes, 30 mM MgCl₂, 62 mM NaOH, 18 μ M HK (~ 412 U) et 7 μ M G6PD (~ 389 U) a été placée à T = 309 K dans le spectromètre à 9,4 T. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}(^{13}\text{C}) = 1,670$ μ sec, $D_1 = 1$ s, NS = 1, $t_{\text{acq}} = 0,3$ s, RG = 16, SW = 149,05 ppm et O1P = 125 pm.

Annexe 3 : Matériel et méthodes de la synthèse et de la purification du [U-¹³C-D₇]- G6P:

Annexe 3.1 : Etude UV-vis du G6P

Pour connaître l'absorbance du G6P, un balayage entre 800 et 190 nm a été réalisé sur une solution contenant 10 mM de G6P ainsi que 4 mM de tampon phosphate.

Annexe 3.2 : Purifications réalisées sur une HPLC équipée d'un détecteur ELSD (à Cergy-Pontoise)

Les tests pour purifier le glucose-6-phosphate ont été réalisés sur un système HPLC quantitative Agilent LC 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, US) comprenant un système de pompe quaternaire avec un détecteur UV (Agilent Technologies, Santa Clara, US) et un détecteur ELSD Agilent 1290 (Agilent Technologies, Santa Clara, US). Une colonne Synergie Fusion RP 80 de diamètre 4 µm et de taille 150 × 10 mm (Phenomenex) a été utilisée. Les solvants utilisés, les différentes solutions injectées, la composition de ces solutions ainsi que le volume d'injection et le temps d'éluion utilisés pour la purification sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Test	Solution	Eluant	Gradient ACN (%)	Temps de run	Vinj (µl)
1	Eau	H ₂ O/ACN	10 à 50 %	20 min	100
2	60 mM Glucose	H ₂ O/ACN	10 à 50 %	20 min	100
3	60 mM Glucose	H ₂ O/ACN	5 à 20 %	20 min	100
4	588 mM G6P	H ₂ O/ACN	5 à 20 %	20 min	100
5	53 mM G6P et 44.4 mM TP à pH 8	H ₂ O/ACN	5 à 20 %	20 min	100
6	Solution A	H ₂ O/ACN	5 à 20 %	20 min	100
7	Solution A	TP/ACN	2 à 30 %	35 min	100
8	Solution A	TP/ACN	2 à 30 %	35 min	100
9	22.7 mM ATP	TP/ACN	2 à 30 %	35 min	100

Tableau 17 : Résumé des différentes éluions réalisée dans le laboratoire de Cergy-Pontoise. Le début de chaque éluion est de 2 mL.min⁻¹. TP correspond au tampon phosphate. Le tampon phosphate qui constitue l'éluant est composée de 40.35 mM de Na₂HPO₄ et 14.7 mM de NaH₂PO₄. Le pH de ce tampon est de 7.0. La solution A est composée de 17.8 mM G6P, 42 mM ATP, 44.4 mM tampon phosphate à pH 7.25, 24,6 mM NaOH, 4.4 mM HCl et 5 % D₂O.

Annexe 3.3 : Purifications réalisées sur une HPLC équipée d'un détecteur UV-visible

Les tests pour purifier le glucose-6-phosphate ont été réalisés sur un système HPLC quantitative en phase inverse (RPHPLC, *Reverse Phase Hight Purification Liquid Chromatography*) marque Ultimate 3000® sur une chaîne Waters® comprenant un système de pompe (Waters 2535 FlexInject®) avec un détecteur UV (Waters 2489®). Une colonne Proto C18 (Higgins Analytical) de diamètre 5 µm et de taille 100 × 4,6 mm a été utilisée.

Une **solution A** contenant de l'acétonitrile et 0.01% de TFA et **une solution B** contenant de l'eau et 0.01% de TFA puis une **solution A'** contenant de l'acétonitrile et **une solution B'** contenant de l'eau ont été testé pour purifier le G6P. Les différents tests réalisés sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Test	Produit	C en mM	V inj μ L	Solution A	Solution A'	λ en nm
1	ATP	0.77	20	5 à 50%		254
3	HK	18.7 U	20	5 à 50%		254
4	ATP	0.77	20	0 à 10%		254
5	ATP	0.77	20	0 à 5%		254
6	ATP	0.77	20	0 à 2%		254
9	ATP	0.77	20	Iso 2%		254
10	ATP	1	20	Iso 0%		254/260/280
11	ATP	1	20	Iso 5%		254/260/280
12	ATP	25	20	Iso 0%		254/260/280
13	ATP	25	20	Iso 5%		254/260/280
14	ATP	0.77	20	Iso 0%		254/260/280
15	ATP	50	20	Iso 5%		254/260/280
16	ATP	5	20	5 à 30 %		254/260/280
17	TP	400	20	5 à 30 %		254/260/280
18	ADP	5	20	0 à 30 %		254/260/280
19	ATP	5	20	0 à 30 %		254/260/280
20	ATP/G6P	25/25	20	Iso 0%		254/260/280
21	Eau		50	Iso 0%		254/260/280
22	ATP/G6P	25/25	20	Iso 5%		254/260/280
23	ATP/G6P	1/50	20	Iso 0%		254/260/280
24	ATP/Mg	1/10	20	Iso 5%		254/260/280
25	ATP/Mg	1 /10	20	Iso 0%		254/260/280
26	ATP/ADP/Mg	1/1/10	20		Iso0%	254/260/280
27	ATP/ADP/Mg	50/10/200	20		Iso 0%	254/260/280
28	Solution A		20		Iso 0%	254/260/280
29	ADP	1	20		Iso0%	254/260/280

Tableau 18 : Résumé des différentes éluions réalisée dans notre laboratoire. Le début de chaque éluion est de 2 mL.min⁻¹. TP correspond au tampon phosphate. La solution A est composée de 17.8 mM G6P, 42 mM ATP, 44.4 mM tampon phosphate à pH 7.25, 24,6 mM NaOH, 4.4 mM HCl et 5 % D₂O.

Annexe 3.4 : Purifications réalisées sur une FPLC

Le système de FPLC utilisé est une ÄKTA de chez General Electric (GE). Le détecteur UV permet de suivre la longueur d'onde d'absorption de l'ATP et de l'ADP, $\lambda = 280 \text{ nm}$. La colonne utilisée est une colonne monoQ GL (porosité : $7 \mu\text{m}$, diamètre : 5 mm , taille particule : $10 \mu\text{m}$) provenant de GE. La phase stationnaire est greffée d'ions ammonium quaternaire pour retenir, via des interactions ioniques, les molécules anioniques.

Test	Solution	Eluant	Gradient ACN (%)	Durée run	Débit $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	mL/tube
1	2 mM de G6P	A/B	0 à 100 % de solution B	20 h	0.5	15
2	5 mM de G6P	A/C	0 à 100 % de solution C	20 h	0.5	15
3	D	A/C	0 à 30 % de solution C	3 h	1	5
4	E	A/C	0 à 30 % de solution C	3 h	1	5
5	F	A/C	0 à 30 % de solution C	3 h	1	5

Tableau 19 : Résumé des différents tests réalisés par FPLC sur la colonne MonoQ. Les éluants utilisés dans les différents tests sont l'eau (A), 10 mM de Tampon phosphate à pH 7.0 (B) et 500 mM NaCl (C). Les différentes solutions aqueuse élué pour les tests 3 à 5 sont respectivement composées de 6 mM G6P, 1 mM ATP, 6 mM ADP, 394 mM Tampon Phosphate à pH 7 (D à pH 6.99) ; 6 mM de G6P, 1 mM d'ATP, 6 mM d'ADP, 6 mM Tampon Phosphate à pH 7 (E à pH 6.96) ; 6 mM de G6P, 7.2 mM d'ATP, 7.2 mM MgCl_2 , 12 mM Hepes à pH 7 (F à pH 7.04).

Annexe 3.5 : Mise en place d'une méthode de détection du G6P post purification par spectrométrie de masse

Toutes les expériences de détection par masse ont été réalisé sur un spectromètre de masse Voyager DE-PRO MALDI-TOF (Applied Biosystems SCIEX), équipé d'un laser nitrogène qui pulse à 337-nm (20 Hz) et d'un panneau de numérisation Acqiris® 2 GHz. Les spectres de masses ont été obtenus dans un mode réflecteur ion positif et ion négatif avec les réglages suivants: accélération de la tension de 20 kV, tension de grille 70% d'accélération de la tension, fil de guidage de 0.02 et un temps d'extraction de 70 ns. L'intensité du laser a été définie juste au-dessus du seuil de génération d'ions pour obtenir des pics avec le rapport signal/bruit le plus élevé possible (S/N) sans augmentation significative du pic. Toutes les données ont été traitées à l'aide du logiciel Data Explorer (Applied Biosystems).

Préparation matrice :

La matrice est composée de 12 mM de 9-aminoacridine dans du MeOH.

Préparation des spots :

Des solutions composées de 100 µL de Matrice sont mélangées à 100 µL de solution issue des fractions obtenues par FPLC ont été préparées pour être appliquées sur la plaque de détection.

Spots de références :

- 500 mM NaCl
- 400 mM de tampon phosphate et 5 mM G6P
- 400 mM de tampon phosphate et 5 mM ATP
- 400 mM de tampon phosphate et 5 mM ADP

Annexe 3.6 : Mise en place d'une méthode de quantification du G6P post purification par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Pour quantifier les fractions, une solution composée de 100 % des fractions avec 100 mM de DSS a été réalisée dans le but d'intégrer les 9 protons du DSS à la valeur de sa concentration et d'obtenir, après intégration des pics, la concentration des substances présente dans la fraction.

Des expériences en RMN du phosphore ont également été réalisées pour identifier la présence de molécules phosphorylées.

Annexe 3.7 : Réalisation d'une synthèse enzymatique suivie d'une purification dans un tampon Tris

Une solution A contenant de l'eau milliQ et une solution B contenant 500 mM de NaCl. Une seconde solution à pH 8.31, contenant 9 mM de Glucose, 55 mM d'ATP, 55 mM MgCl₂, 21 mM NaOH, 11 mM Tampon Tris à pH 7 et 0.17 U d'hexokinase a permis de synthétiser le G6P. Cette réaction enzymatique a été suivie par une pseudo-2D par RMN du Phosphore. Le pH de la solution qui est de 5.72 a été augmenté à pH 10.24 par l'ajout de 8.8 µL de NaOH à 1 M. Un précipité s'est formé ainsi seul le surnageant a été prélevé puis dilué. Le pH ayant baissé, il a été remonté à pH 10.71 avec l'ajout de 1 µL de NaOH à 1M. Cette solution a été injectée dans une colonne MonoQ analytique (GE). Une élution de 3 h avec gradient de 0 à 30 % de solution B et un débit de 1 mL.min⁻¹ a été lancée. Un fractionnement s'effectuait tous les 5 mL.

Annexe 3.8 : Réalisation d'une synthèse enzymatique suivie d'une purification dans un tampon Hepes

3.8.1 Essai numéro 1 :

Une solution A contenant de l'eau milliQ et une solution B contenant 500 mM de NaCl. Une seconde solution à pH 7.35, contenant 60 mM de G6P, 80 mM d'ATP, 80 mM MgCl₂, 37 mM NaOH, 22 mM d'Hepes et ~ 0.17 U d'hexokinase a permis de synthétiser le G6P. Cette réaction enzymatique a été suivie par une pseudo-2D par RMN du phosphore. Le pH de la solution qui est de 5.74 a été augmenté à pH 10.06 par l'ajout de 8 µL de NaOH à 1M et 1 µL de DCl à 1M. Un précipité s'est formé, ainsi seul le surnageant a été prélevé puis dilué avec 5 mL d'eau milliQ. Le pH ayant baissé, il a été remonté à pH 10.94 avec l'ajout de 1 µL de NaOH à 1M. Cette solution a été injectée dans une colonne MonoQ analytique (GE). Une élution de 3 h avec gradient de 0 à 30 % de solution B et un débit de 1 mL.min⁻¹ a été lancée. Un fractionnement s'effectuait tous les 5 mL.

3.8.2 Essai numéro 2 :

Une solution A contenant de l'eau milliQ et une solution B contenant 500 mM de NaCl. Une seconde solution à pH 7.55, contenant 49 mM de G6P, 65 mM d'ATP, 65 mM MgCl₂, 29 mM NaOH, 14 mM DCl, 16 mM d'Hepes, 111 µM DSS et 0.17 U d'hexokinase a permis de synthétiser le G6P. Cette réaction enzymatique a été suivie par une pseudo-2D par RMN du phosphore. Le pH de la solution est de 5.78. Cette solution a été diluée avec 4.489 mL d'eau milliQ et 11 µL de NaOH à 1M pour augmenter le pH à une valeur de 10.97. Cette solution a été injectée dans une colonne MonoQ analytique (GE). Une élution de 3 h avec gradient de 0 à 30 % de solution B et un débit de 1 mL.min⁻¹ a été lancée. Un fractionnement s'effectuait tous les 5 mL.

Annexe 3.9 : Synthèse et purification du [¹³C, D₇]-G6P

Une solution A contenant de l'eau milliQ et une solution B contenant 500 mM de NaCl. Une seconde solution à pH 7.5, contenant 127 mM de G6P, 152 mM d'ATP, 152 mM MgCl₂, 470 mM NaOH, 314 mM d'Hepes et 150 ng d'hexokinase (~ 3,8 U) a permis de synthétiser le G6P. Cette réaction enzymatique a été suivie par une pseudo-2D par RMN du phosphore.

Une fois le G6P produit, le pH de la solution post-réactionnelle est ajusté à pH 11 par l'ajout de NaOH à 1 M. Lors de cette addition, un précipité blanc est apparu. Il provient de la

complexation des ions Mg^{2+} et Na^+ avec l'ATP et l'ADP. L'ajout de NaOH puis d'eau à pH 11 a été répété plusieurs fois afin d'éliminer au maximum les impuretés. Le surnageant a ensuite été réparti en 10 fractions (soit 500 μ l/fraction) qui ont été lyophilisées. Chaque fraction a ensuite été solubilisée avec 15 mL d'eau à pH 11. Pour éviter la saturation de la colonne analytique, chaque fraction a été sous-divisée en 3. Par conséquent, seulement un tiers de la solution a été injecté dans la colonne.

Une fois la solution chargée sur la colonne, la purification du G6P a été réalisée avec un débit de 1 mL/min, un gradient d'élution de 0 à 30 % de solution B en 3 h et un fractionnement de la solution éluée toutes les 5 min. Cependant, la purification a été arrêtée au bout d'une heure car les tests préliminaires ont montré que l'élution du G6P se déroulait entre 10 et 40 min (**Figure 104**).

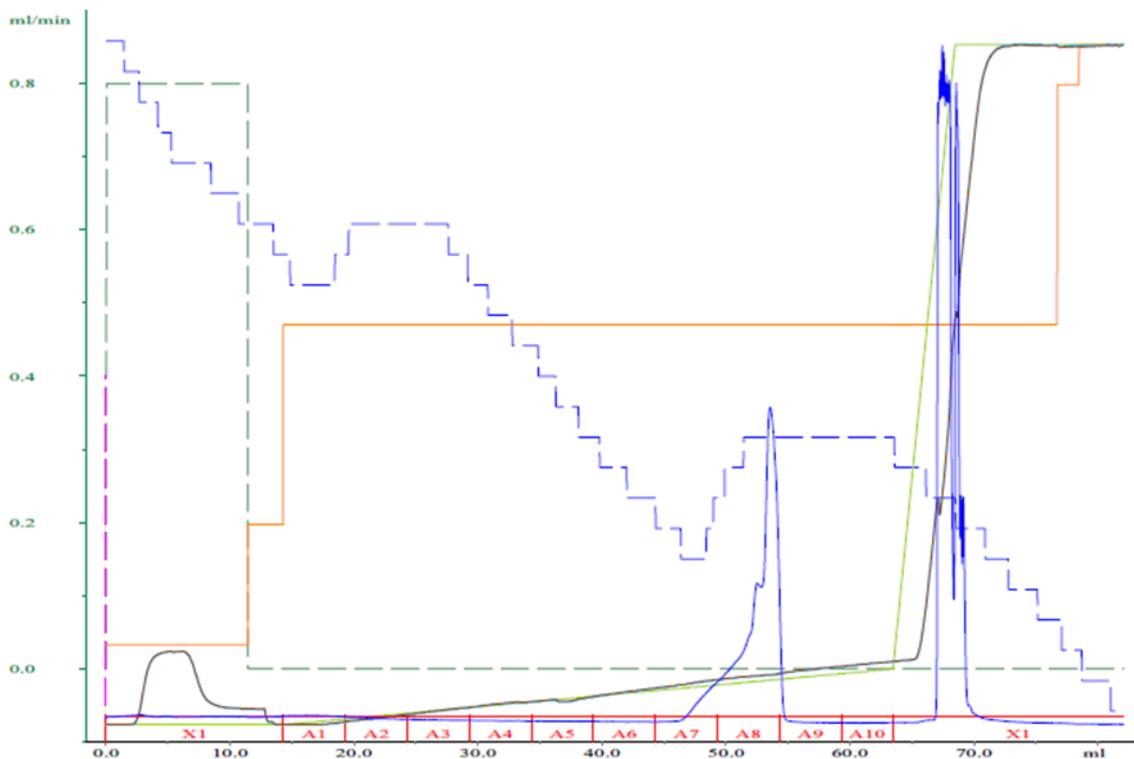


Figure 104 : Spectre typique obtenu pendant l'élution en FPLC. Ce graphique montre le débit en fonction du volume d'élution. Les autres courbes correspondent aux signaux du détecteur qui est composé de 2 lentilles UV-Visible (en bleu et rouge), de deux conductimètres (en vert et marron) et d'un thermomètre (en bleu). Le graphique montre également le fractionnement (X1, A1, A2, A3...) en fonction du volume élué.

Annexe 3.10 : Quantification du [U-¹³C, D₇]-G6P réalisée par RMN :

La quantification du [U-¹³C, D₇]-G6P a été réalisée dans un spectromètre de 11.75 T à ($B_0 = 500$ MHz). Les paramètres d'acquisitions pour un spectre ¹³C sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 11,6 \mu\text{sec}$, $D_1 = 60$ s, $NS = 16$, $t_{\text{acq}} = 1,1$ s, $RG = 128$, $SW = 236,6$ ppm et $O1P = 100$ ppm.

Annexe 4 : Matériel et méthodes des études réalisées sur la G6PD à partir du substrat de l'enzyme, le glucose-6-phosphate (G6P) :

Annexe 4.1 : Expérience D-DNP réalisée avec une faible activité de G6PD

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μL contenant 203 mM G6P, 17 mM Tempol, 38 % Ethylène glycol, 39 % D₂O, 15 % H₂O ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2$ K. La CP a été réalisée à $T = 1.2$ K avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ¹³C et ¹H sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 50$ W et $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 270$ W. La durée de la CP est de 2,1 ms. La dernière impulsion de 5 ° pour détecter la polarisation du ¹³C est de 0.52 W.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL composée de 73 mM ATP, 49 mM NADP⁺, 192.8 mM Hepes, 48 mM MgCl₂, 309 mM NaOH, et 3 μM G6PD (~ 206 U) a été placée à $T = 309$ K dans le spectromètre à 9,4 T. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 1,667 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1$ s, $NS = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3$ s, $RG = 16$, $SW = 149,65$ ppm et $O1P = 125$ pm.

Annexe 4.2 : Expérience D-DNP réalisée avec une forte activité de G6PD

- Solution à polariser :

5 billes de 10 μL contenant 202.7 mM G6P, 16.9 mM Tempol, 38.5 % Ethylène glycol, 39.2 % D₂O, 15.3 % H₂O ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2$ K. La CP a été réalisée à $T = 1.2$ K avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ¹³C et ¹H sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 55$ W et $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 255$ W. La durée de la CP est de 3,5 ms. La dernière impulsion de 5 ° pour détecter la polarisation du ¹³C est de 0.787 W.

- Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL composée de 73 mM ATP, 49 mM NADP⁺, 193 mM Hepes, 48 mM MgCl₂, 309 mM NaOH, et 9.4 μM G6PD (550 U) a été placée à $T = 309$ K dans le

spectromètre à 9,4 T. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 1,667 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3 \text{ s}$, $\text{RG} = 16$, $\text{SW} = 149,65 \text{ ppm}$ et $\text{O1P} = 125 \text{ pm}$.

Annexe 5 : Matériel et méthodes des études réalisées sur la 6PGL à partir du substrat [U- ${}^{13}\text{C}$ -D $_7$]-Glucose :

➤ Solution polarisée :

5 billes de 10 μL contenant 608 mM [U- ${}^{13}\text{C}$ -D $_7$]-Glucose, 50 mM Tempol, 57 % éthylène glycol, 11.6 % H_2O et 6.4 % D_2O ont été congelées et insérées dans le polariseur à 4.2 K. La CP a été réalisée à $T = 1.2 \text{ K}$ avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ${}^{13}\text{C}$ et ${}^1\text{H}$ sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 49 \text{ W}$ et $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 280 \text{ W}$. La durée de la CP est de 4 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du ${}^{13}\text{C}$ est de 0.864 W.

➤ Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL à pH 7.74 composée de 30 mM ATP, 30 mM NADP^+ , 60 mM Hepes, 30 mM MgCl_2 , 119 mM NaOH, 7 μM HK (~ 639 U), 5 μM G6PD (~ 321 U) et 2.4 mg 6PGL a été placée à $T = 309 \text{ K}$ dans le spectromètre à 9,4 T. Après dissolution, un volume final de 5.263 mL a été obtenu. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 1,667 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3 \text{ s}$, $\text{RG} = 16$, $\text{SW} = 200,33 \text{ ppm}$ et $\text{O1P} = 125 \text{ pm}$.

Annexe 6 : Matériel et méthodes des études réalisées sur la 6PGL à partir du substrat [${}^{13}\text{C}_1$ -D $_1$]-Glucose :

➤ Solution polarisée :

5 billes de 10 μL contenant 592 mM [${}^{13}\text{C}_1$ -D $_1$]-Glucose, 50 mM Tempol, 57 % éthylène glycol, 11.6 % H_2O et 6.4 % D_2O ont été congelées et insérées dans le polariseur. La CP a été réalisée à $T = 1.2 \text{ K}$ avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ${}^{13}\text{C}$ et ${}^1\text{H}$ sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 50 \text{ W}$ et $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 280 \text{ W}$. La durée de la CP est de 3,5 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du ${}^{13}\text{C}$ est de 0.864 W.

➤ Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL à pH 7.74 composée de 30 mM ATP, 30 mM NADP^+ , 60 mM Hepes, 30 mM MgCl_2 , 118.7 mM NaOH, 6 μM HK (~ 596 U), 4 μM G6PD (~ 229 U) et 1.2 mg 6PGL a été placée à $T = 309 \text{ K}$ dans le spectromètre à 9,4 T. Après dissolution un volume

final de 5.263 mL a été obtenu. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 1,67 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $NS = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3 \text{ s}$, $RG = 16$, $SW = 149,05 \text{ ppm}$ et $O1P = 125 \text{ pm}$.

Annexe 7 : Matériel et méthodes des études réalisées sur la 6PGL à partir du substrat [U- ${}^{13}\text{C}$ -D $_7$]-G6P :

Annexe 7.1 : Expérience A

➤ Solution polarisée :

15 billes de 10 μL contenant 203 mM [U- ${}^{13}\text{C}$ -D $_7$]-G6P, 17 mM Tempol, 39 % éthylène glycol, 15 % H_2O et 39 % D_2O ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2 \text{ K}$. La CP a été réalisée à $T = 1.2 \text{ K}$ avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ${}^{13}\text{C}$ et ${}^1\text{H}$ sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}({}^1\text{H}) = 55 \text{ W}$ et $P_{90^\circ}({}^{13}\text{C}) = 250 \text{ W}$. La durée de la CP est de 3,5 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du ${}^{13}\text{C}$ est de 0.8179 W.

➤ Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL à pH 7.5 composée de 73 mM ATP, 49 mM NADP^+ , 193 mM HEPES, 48 mM MgCl_2 , 309 mM NaOH, 4 μM G6PD (206 U) et 143 μg 6PGL a été placée à $T = 309 \text{ K}$ dans le spectromètre à 9,4 T. Après dissolution un volume final de 5.25 mL a été obtenu. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 1,67 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $NS = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3 \text{ s}$, $RG = 16$, $SW = 149,05 \text{ ppm}$ et $O1P = 125 \text{ pm}$.

Annexe 7.2 : Quantification post-réactionnelle de l'expérience A

Le volume final est de 4.6 mL. Cette solution post-réactionnelle est donc composée de 32 mM ATP, 21.3 mM NADP^+ , 83 mM HEPES, 21 mM MgCl_2 , 134 mM NaOH.

Cette solution a été lyophilisée puis dissous avec une solution aqueuse de 600 μL composée de 55.5 % D_2O , 44.5 % H_2O milliQ et 20 mM [U- ${}^{13}\text{C}$]-Glycine. Cette solution a été inséré dans un spectromètre de 11.75 T à ($B_0 = 500 \text{ MHz}$). Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}({}^{13}\text{C}) = 11,6 \mu\text{sec}$, $D_1 = 60 \text{ s}$, $NS = 8$, $t_{\text{acq}} = 1,1 \text{ s}$, $RG = 912$, $SW = 236,6 \text{ ppm}$ et $O1P = 100 \text{ ppm}$. Le ${}^{13}\text{C}\alpha$ de la glycine à 20 mM en tant que référence a été intégré et calibré à 20 mM car la constante de temps de relaxation est plus lente que celle du ${}^{13}\text{C}_{\text{C=O}}$. Le ${}^{13}\text{C}_1$ du 6PGA a ensuite été intégré. Une concentration de 25.4 mM 6PGA a été obtenue.

Annexe 7.3 : Expérience B

➤ Solution à polariser :

15 billes de 10 μL contenant 203 mM $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-G6P}$, 17 mM Tempol, 39 % éthylène glycol, 15 % H_2O et 39 % D_2O ont été congelées et insérées dans le polariseur à $T = 4.2 \text{ K}$. La CP a été réalisée à $T = 1.2 \text{ K}$ avec une micro-onde à 150 mW. Les impulsions de 90° pour le ^{13}C et ^1H sont de 5 μs avec les puissances $P_{90^\circ}(^1\text{H}) = 55 \text{ W}$ et $P_{90^\circ}(^{13}\text{C}) = 245 \text{ W}$. La durée de la CP est de 3 ms. La dernière impulsion de 5° pour détecter la polarisation du ^{13}C est de 0.765 W.

➤ Solution enzymatique :

Une solution aqueuse de 2 mL à pH 7.5 composée de 71 mM ATP, 47 mM NADP^+ , 188 mM HEPES, 47 mM MgCl_2 , 302 mM NaOH, 5 μM G6PD ($\sim 229 \text{ U}$) et 240 μg 6PGL a été placée à $T = 309 \text{ K}$ dans le spectromètre à 9,4 T. Après dissolution un volume final de 5,263 mL a été obtenu. Les paramètres d'acquisitions sont : $P_{10^\circ}(^{13}\text{C}) = 1,67 \mu\text{sec}$, $D_1 = 1 \text{ s}$, $\text{NS} = 1$, $t_{\text{acq}} = 0,3 \text{ s}$, $\text{RG} = 16$, $\text{SW} = 149,05 \text{ ppm}$ et $\text{O1P} = 125 \text{ pm}$.

Annexe 7.4 : Mesure du temps de relaxation longitudinal (T_1) du $[\text{U-}^{13}\text{C-D}_7]\text{-6PGA}$

La mesure du temps de relaxation longitudinale est réalisée par l'application d'une séquence inversion-récupération (**Figure 105**). L'expérience consiste à inverser la magnétisation sur l'axe z par une impulsion de 180° et appliquer différents temps τ pour pouvoir détecter la relaxation de la magnétisation résultante dans le plan xy après une impulsion de 90° . Le profil des raies obtenus après transformer de Fourier, montre une évolution des pics d'intensités négatives, puis nulles et enfin positives en fonction de l'augmentation du temps τ (**Figure 105**).

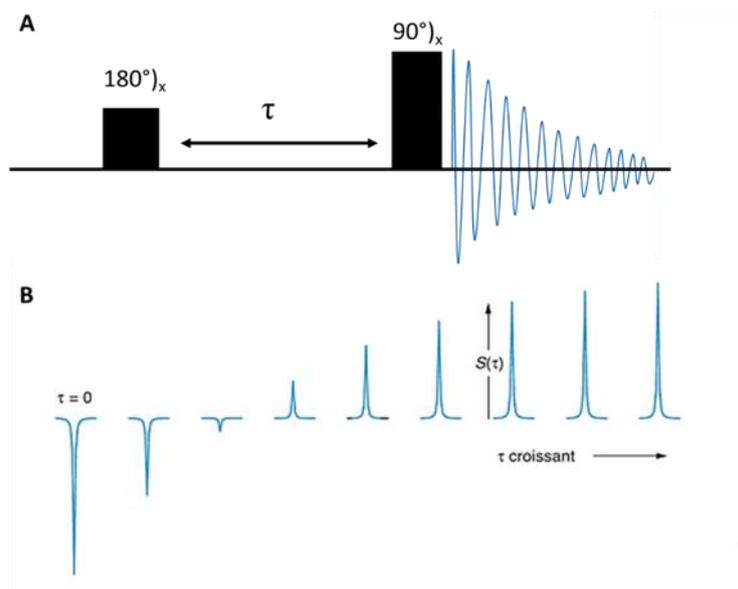


Figure 105: A) Séquence d'impulsion représentant l'expérience d'inversion-récupération utilisée pour obtenir la valeur de la constante de temps T1. B) Ensembles de spectres typiques tels qu'ils seraient obtenus à l'aide de la séquence d'impulsion d'inversion-récupération.¹¹⁵

Annexe 8 : Matériel et méthodes des études d'inhibition réalisées sur la 6PGL

Ces expériences ont été réalisées dans un spectrophotomètre Unicam UV 300 UV à 20°C et à $\lambda_{\text{NADPH}} = 340 \text{ nm}$. L'absorption observée est celle du NADPH produit dans la réaction. Une cuve de 1 cm a été utilisée.

Un mélange composé des enzymes G6PDH et 6PGD, et NADP⁺ dans la solution-tampon a été préparé. Ces composés sont ajoutés en excès pour que seule l'activité de la 6PGL soit observée. Différentes concentrations en inhibiteur sont intégrées au mélange pour chaque expérience - 'run' (10 min). Le blanc est mesuré sur ce mélange avant chaque run. Le G6P est ensuite additionné au mélange à 1 minute après le début de l'enregistrement. A la 3^{ème} minute, la 6PGL est ajoutée au mélange. Les résultats des expériences ont été traités utilisant le logiciel Scilab.

Le Protocole :

Pour chaque expérience, une solution de 500 μL à pH 7.5 contenant 250 μM NADP⁺, 10 U G6PDH, 0.3 U 6PGD et 10 mM HEPES a été préparée à partir des mêmes solutions stocks. Des concentrations variables : 0.5 μM , 1 μM , 2.5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM et 250 μM en inhibiteurs ont été ajoutées aux solutions. De plus, une réaction sans inhibiteur a été réalisée pour obtenir l'activité de référence de la [¹⁵N]-Tb6PGL. Ces solutions ont été placées dans une cuve de longueur 1 cm. La longueur d'onde d'observation est placée à $\lambda_{\text{NADPH}} =$

340 nm. La production de NADPH par les deux enzymes G6PDH et 6PGDH est donc observée. Comme ces deux enzymes sont en excès par rapport à la [¹⁵N]-Tb6PGL, le surcroît de NADPH lors de l'ajout de [¹⁵N]-Tb6PGL sera uniquement due à l'activité de cette enzyme et non à celle de la 6PGDH.

Pour vérifier le blanc, l'enregistrement démarre avec la solution réactionnelle sans le G6P et sans la 6PGL. 4 points sont enregistrés par seconde. A 1 minute, 50 µM de G6P sont ajoutées en dehors du spectromètre. Une première production de NADPH est ainsi observée. A la 3^{ème} minute, 10 µL de [¹⁵N]-Tb6PGL à 1.5 µg.ml⁻¹ sont additionnés en dehors du spectrophotomètre. La production de NADPH liée à l'activité de [¹⁵N]-Tb6PGL est observée pendant 7 minutes.

Annexe 9 : Matériel et méthodes des études d'inhibition réalisées sur la 6PGD

Ces expériences ont été réalisées dans un spectrophotomètre Unicam UV 300 UV à 20°C et à $\lambda_{\text{NADPH}} = 340 \text{ nm}$. L'absorption observée est celle du NADPH produit dans la réaction. Une cuve de 1 cm a été utilisée. Un mélange composé de la 6PGD et NADP⁺ dans la solution-tampon a été préparé. Le NADP⁺ est ajouté en excès pour que la cinétique ne dépende que du substrat. Différentes concentrations en inhibiteur sont intégrées au mélange pour chaque expérience - 'run' (10 min). Le blanc est mesuré sur ce mélange avant chaque run. Le 6PGA est ensuite additionné au mélange à 1 minute après le début de l'enregistrement. Les résultats des expériences ont été traités utilisant le logiciel Scilab.

Le Protocole :

Pour chaque expérience, une solution de 500 µL à pH 7.5 contenant 250 µM NADP⁺, 88.10⁻³ U 6PGD et 10 mM Hepes a été préparée à partir des mêmes solutions stocks. Des concentrations variables : 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 250 µM, 340 µM et 800 µM en inhibiteurs ont été ajoutées aux solutions. De plus, une réaction sans inhibiteur a été réalisée pour obtenir l'activité de référence de la 6PGD. Ces solutions ont été placées dans une cuve de longueur 1 cm. La longueur d'onde d'observation est placée à $\lambda_{\text{NADPH}} = 340 \text{ nm}$. La production de NADPH par la 6PGD est donc observée.

Pour vérifier le blanc, l'enregistrement démarre avec la solution réactionnelle sans le substrat. 4 points sont enregistrés par seconde. A 1 minute, 100 µM de 6PGA sont ajoutées

en dehors du spectromètre. La production de NADPH est ainsi observée pendant 7 minutes.
L'expérience réalisée avec 50 μ M GP269 a été réalisée une seconde fois.

Références

1. Stincone, A. *et al.* The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol. Rev.* **90**, 927–963 (2015).
2. Singh, S., An, A. & Srivastava, P. K. Regulation and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase: A review. *Int. J. Plant Physiol. Biochem.* **4**, 1–19 (2012).
3. Yamashiro, T., Murata, K. & Kawai, S. Extremely high intracellular concentration of glucose-6-phosphate and NAD(H) in *Deinococcus radiodurans*. *Extrem. Life Extreme Cond.* **21**, 399–407 (2017).
4. Meier, S., Jensen, P. R., Karlsson, M. & Lerche, M. H. Hyperpolarized NMR Probes for Biological Assays. *Sensors* **14**, 1576–1597 (2014).
5. Ardenkjær-Larsen, J. H. *et al.* Increase of signal-to-noise of more than 10,000 times in liquid state NMR. *Discov. Med.* **3**, 37–39 (2003).
6. Harris, T., Eliyahu, G., Frydman, L. & Degani, H. Kinetics of hyperpolarized ^{13}C -pyruvate transport and metabolism in living human breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18131–18136 (2009).
7. Meier, S., Karlsson, M., Jensen, P. R., Lerche, M. H. & Duss, J. Ø. Metabolic pathway visualization in living yeast by DNP-NMR. *Mol. Biosyst.* **7**, 2834–2836 (2011).
8. Balzan, R. *et al.* Pyruvate cellular uptake and enzymatic conversion probed by dissolution DNP-NMR: the impact of overexpressed membrane transporters. *Magn. Reson. Chem. MRC* **55**, 579–583 (2017).
9. Kurhanewicz, J. *et al.* Analysis of Cancer Metabolism by Imaging Hyperpolarized Nuclei: Prospects for Translation to Clinical Research. *Neoplasia N. Y. N* **13**, 81 (2011).
10. Nelson, S. J. *et al.* Metabolic Imaging of Patients with Prostate Cancer Using Hyperpolarized $[1-^{13}\text{C}]$ Pyruvate. *Sci. Transl. Med.* **5**, 198ra108 (2013).
11. Biologie au collégial - Chantal Proulx. Available at: <http://www.colvir.net/prof/chantal.proulx/>. (Accessed: 27th August 2017)
12. Wikipedia:WikiProject Molecular and Cell Biology/Metabolic Pathways task force/proposals. *Wikipedia* (2016).
13. Keller, M. A., Turchyn, A. V. & Ralser, M. Non-enzymatic glycolysis and pentose phosphate pathway-like reactions in a plausible Archean ocean. *Mol. Syst. Biol.* **10**, (2014).
14. Horecker, B. L. The Pentose Phosphate Pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 47965–47971 (2002).
15. Warburg, O., Christian, W. & Griese, A. Wasserstoff{ü}bertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. *Biokemische Zeitschrift* 157–205 (1935).
16. Warburg, O. & Christian, W. Optischer Nachweis der Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungs-Co-Ferment. *Biokemische Zeitschrift* 81 (1936).
17. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z. & Seegmiller, J. E. The enzymatic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose 5-phosphate and ribose 5-phosphate. 383–396 (1951).

18. Dische, Z. Phosphorylierung der im Adenosin enthaltenen d-Ribose und nachfolgender Zerfall des Esters unter Triosephosphatbildung im Blute. *Naturwissenschaften* **26**, 252–253 (1938).
19. Horecker, B. L. The metabolism of pentose phosphate. *J. Cell. Physiol. Suppl.* **41**, 137–164 (1953).
20. Cori, O. & Lipmann, F. The primary oxidation product of enzymatic glucose-6-phosphate oxidation. *J. Biol. Chem.* **194**, 417–425 (1952).
21. Brodie, A. F. & Lipmann, F. Identification of a gluconolactonase. *J. Biol. Chem.* **212**, 677–685 (1955).
22. Kagawa, Y., Kagawa, A. & Shimazono, N. Enzymatic Studies on Metabolic Adaptation of Hexose Monophosphate Shunt in Rat Liver. *J. Biochem. (Tokyo)* **56**, 364–371 (1964).
23. Horecker, B. L., Smyrniotis, P. Z. & Klenow, H. The Formation of Sedoheptulose Phosphate from Pentose Phosphate. *J. Biol. Chem.* **205**, 661–682 (1953).
24. Racker, E., Haba, G. D. L. & Leder, I. G. THIAMINE PYROPHOSPHATE, A COENZYME OF TRANSKETOLASE. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1010–1011 (1953).
25. Dische, Z. Qualitative and quantitative colorimetric determination of heptoses. *J. Biol. Chem.* **204**, 983–997 (1953).
26. Stumpf, P. K. & Horecker, B. L. The role of xylulose 5-phosphate in xylose metabolism of *Lactobacillus pentosus*. *J. Biol. Chem.* **218**, 753–768 (1956).
27. Horecker, B. L., Hurwitz, J. & Smyrniotis, P. Z. XYLULOSE 5-PHOSPHATE AND THE FORMATION OF SEDOHEPTULOSE 7-PHOSPHATE WITH LIVER TRANSKETOLASE. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 692–694 (1956).
28. Wood, T. M. Properties of cellulolytic enzyme systems. *Biochem. Soc. Trans.* **13**, 407–410 (1985).
29. Kruger, N. J. & von Schaewen, A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 236–246 (2003).
30. Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R. & Michels, P. A. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**, 11 (2003).
31. Roberts, D. J. & Miyamoto, S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Acting on mitochondria and TORCing to autophagy. *Cell Death Differ.* **22**, 248–257 (2015).
32. Ozcicek, F., Aktas, M., Türkmen, K., Coban, T. A. & Cankaya, M. The Investigation of Plasma Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, Glutathione Reductase in Premenopausal Patients with Iron Deficiency Anemia. *Pak. J. Med. Sci.* **30**, 809–913 (2014).
33. Scott, W. A. & Tatum, E. L. Purification and Partial Characterization of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **246**, 6347–6352 (1971).
34. Ibraheem, O., Adelawe, I. O. & Afolayan, A. Purification and properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Aspergillus aculeatus*. *J. Biochem. Mol. Biol.* **38**, 584–590 (2005).
35. Olive, C., Geroch, M. E. & Levy, H. R. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.* **246**, 2047–2057 (1971).

36. Wang, X.-T., Chan, T. F., Lam, V. M. S. & Engel, P. C. What is the role of the second “structural” NADP⁺-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **17**, 1403–1411 (2008).
37. Ozer, N., Bilgi, C. & Hamdi Ogüs, I. Dog liver glucose-6-phosphate dehydrogenase: purification and kinetic properties. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **34**, 253–262 (2002).
38. Rangunathan, S. & Levy, H. R. Purification and characterization of the NAD-preferring glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Acetobacter hansenii* (*Acetobacter xylinum*). *Arch. Biochem. Biophys.* **310**, 360–366 (1994).
39. Hansen, T., Schlichting, B. & Schönheit, P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the g6pd gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. *FEMS Microbiol. Lett.* **216**, 249–253 (2002).
40. Gould, B. J. & Goheer, M. A. Kinetic mechanism from steady-state kinetics of the reaction catalysed by baker’s-yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase in solution and covalently attached to sepharose. *Biochem. J.* **157**, 389–393 (1976).
41. Niehaus, W. G. & Mallett, T. C. Purification and Characterization of Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans*: Identification as ‘Nothing Dehydrogenase’. *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, 304–309 (1994).
42. Tsai, C. S. & Chen, Q. Purification and kinetic characterization of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **76**, 107–113 (1998).
43. Demir, H., Beydemir, S., Çiftçi, M. & Küfrevioğlu, Ö. Ç. Purification and Properties of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Coriander (*coriandrum Sativum*) Leaves. *J. Food Biochem.* **28**, 155–168 (2004).
44. Haghghi, B., Aghatabar, A. & Shahsavari, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Streptomyces aureofaciens*: Ligand I nduced conform ational change. 71–78
45. Bublitz, C. & Steavenson, S. The pentose phosphate pathway in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **263**, 12849–12853 (1988).
46. Senesi, S. *et al.* Hexose-6-phosphate dehydrogenase in the endoplasmic reticulum. *Biol. Chem.* **391**, 1–8 (2010).
47. Krczal, D., Ritter, H. & Kömpf, J. Polymorphism of glucose dehydrogenase (GDH, EC 1.1.1.47): formal and population genetic data. *Hum. Genet.* **91**, 290–292 (1993).
48. Gómez-Manzo, S. *et al.* Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Update and Analysis of New Mutations around the World. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
49. Luzzatto, L. & Notaro, R. Malaria. Protecting against bad air. *Science* **293**, 442–443 (2001).
50. Luzzatto, L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica* **91**, 1303–1306 (2006).

51. Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M. & Adams, M. J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure* **8**, 293–303 (2000).
52. Tuner, J. & Turner, D. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. In the *Biochemistry of Plants*, (Stumpf, P. K. and Conn, E. E., eds). 279:316 (1980).
53. Copeland, L. & Turner, J. The regulation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. In the *Biochemistry of Plants*, (Stumpf, P. K. and Conn, E. E., eds). 107–125 (1987).
54. Bowsher, C. G., Boulton, E. L., Rose, J., Nayagam, S. & Emes, M. J. Reductant for glutamate synthase in generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J.* **2**, 893–898 (1992).
55. Graeve, K., von Schaewen, A. & Scheibe, R. Purification, characterization, and cDNA sequence of glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J. Cell Mol. Biol.* **5**, 353–361 (1994).
56. Hauschild, R. & von Schaewen, A. Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiol.* **133**, 47–62 (2003).
57. Fico, A. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a crucial role in protection from redox-stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **11**, 823–831 (2004).
58. Leopold, J. A. & Loscalzo, J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1332–1340 (2005).
59. Farhud, D. D. & Yazdanpanah, L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Deficiency. *Iran. J. Public Health* **37**, 1–18 (2008).
60. Ufer, C., Wang, C. C., Borchert, A., Heydeck, D. & Kuhn, H. Redox Control in Mammalian Embryo Development. *Antioxid. Redox Signal.* **13**, 833–875 (2010).
61. Riganti, C., Gazzano, E., Polimeni, M., Aldieri, E. & Ghigo, D. The pentose phosphate pathway: An antioxidant defense and a crossroad in tumor cell fate. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 421–436 (2012).
62. Miraglia, E. *et al.* The pentose phosphate pathway plays an essential role in supporting human sperm capacitation. *Fertil. Steril.* **93**, 2437–2440 (2010).
63. Perl, A. *et al.* Transaldolase is essential for maintenance of the mitochondrial transmembrane potential and fertility of spermatozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14813–14818 (2006).
64. Zhang, Z. *et al.* High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase, leading to increased oxidative stress and β -cell apoptosis. *FASEB J.* **24**, 1497–1505 (2010).
65. Park, J. *et al.* Increase in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Adipocytes Stimulates Oxidative Stress and Inflammatory Signals. *Diabetes* **55**, 2939–2949 (2006).
66. Gupte, S. A. Targeting the Pentose Phosphate Pathway in Syndrome X-related Cardiovascular Complications. *Drug Dev. Res.* **71**, 161–167 (2010).

67. Talukdar, I., Szeszel-Fedorowicz, W. & Salati, L. M. Arachidonic acid inhibits the insulin induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase via p38 MAP kinase. *J. Biol. Chem.* **280**, 40660–40667 (2005).
68. Greenberg, J. T., Monach, P., Chou, J. H., Josephy, P. D. & Demple, B. Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6181–6185 (1990).
69. Filosa, S. *et al.* Failure to increase glucose consumption through the pentose-phosphate pathway results in the death of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene-deleted mouse embryonic stem cells subjected to oxidative stress. *Biochem. J.* **370**, 935–943 (2003).
70. Tian, W. N. *et al.* Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am. J. Physiol.* **276**, C1121–1131 (1999).
71. Vulliamy, T. J. *et al.* Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**, 5171–5175 (1988).
72. Beutler, E., Kuhl, W. & Gelbart, T. 6-Phosphogluconolactonase deficiency, a hereditary erythrocyte enzyme deficiency: possible interaction with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 3876–3878 (1985).
73. Bauer, H. P., Srihari, T., Jochims, J. C. & Hofer, H. W. 6-Phosphogluconolactonase. *Eur. J. Biochem.* **133**, 163–168 (1983).
74. Ueberschär, K.-H., Blachnitzky, E.-O. & Kurz, G. Reaction Mechanism of d-Galactose Dehydrogenases from *Pseudomonas saccharophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Eur. J. Biochem.* **48**, 389–405 (1974).
75. Miclet, E. *et al.* NMR spectroscopic analysis of the first two steps of the pentose-phosphate pathway elucidates the role of 6-phosphogluconolactonase. *J. Biol. Chem.* **276**, 34840–34846 (2001).
76. Collard, F., Collet, J.-F., Gerin, I., Veiga-da-Cunha, M. & Van Schaftingen, E. Identification of the cDNA encoding human 6-phosphogluconolactonase, the enzyme catalyzing the second step of the pentose phosphate pathway. *FEBS Lett.* **459**, 223–226 (1999).
77. Dictionnaire des Sciences Animales. Available at: <http://dico-sciences-animales.cirad.fr/>. (Accessed: 28th June 2017)
78. Igoillo-Esteve, M. & Cazzulo, J. J. The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress. *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**, 170–181 (2006).
79. Barrett, M. P. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitol. Today Pers. Ed* **13**, 11–16 (1997).
80. Jortzik, E. *et al.* Glucose-6-phosphate dehydrogenase–6-phosphogluconolactonase: a unique bifunctional enzyme from *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.* **436**, 641–650 (2011).

81. Stover, N. A., Dixon, T. A. & Cavalcanti, A. R. O. Multiple independent fusions of glucose-6-phosphate dehydrogenase with enzymes in the pentose phosphate pathway. *PLoS One* **6**, e22269 (2011).
82. Atamna, H., Pascarmona, G. & Ginsburg, H. Hexose-monophosphate shunt activity in intact Plasmodium falciparum-infected erythrocytes and in free parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **67**, 79–89 (1994).
83. Luzzatto, L. & Bienzle, U. The malaria/G.-6-P.D. hypothesis. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 1183–1184 (1979).
84. Ruwende, C. & Hill, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **76**, 581–588 (1998).
85. Cappellini, M. D. & Fiorelli, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet Lond. Engl.* **371**, 64–74 (2008).
86. Müller, S. Redox and antioxidant systems of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol. Microbiol.* **53**, 1291–1305 (2004).
87. Husain, A., Sato, D., Jeelani, G., Soga, T. & Nozaki, T. Dramatic Increase in Glycerol Biosynthesis upon Oxidative Stress in the Anaerobic Protozoan Parasite Entamoeba histolytica. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, (2012).
88. Susskind, B. M., Warren, L. G. & Reeves, R. E. A pathway for the interconversion of hexose and pentose in the parasitic amoeba Entamoeba histolytica. *Biochem. J.* **204**, 191–199 (1982).
89. Krüger, A. & Ralser, M. ATM is a redox sensor linking genome stability and carbon metabolism. *Sci. Signal.* **4**, pe17 (2011).
90. Haschemi, A. *et al.* The sedoheptulose kinase CARKL directs macrophage polarization through control of glucose metabolism. *Cell Metab.* **15**, 813–826 (2012).
91. Obst, B., Wagner, S., Sewing, K. F. & Beil, W. Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* **21**, 1111–1115 (2000).
92. Matthews, G. M. & Butler, R. N. Cellular mucosal defense during Helicobacter pylori infection: a review of the role of glutathione and the oxidative pentose pathway. *Helicobacter* **10**, 298–306 (2005).
93. Sprenger, G. A. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of Escherichia coli K-12. *Arch. Microbiol.* **164**, 324–330 (1995).
94. Raetz, C. R. H. & Whitfield, C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 635–700 (2002).
95. Kneidinger, B., Graninger, M., Puchberger, M., Kosma, P. & Messner, P. Biosynthesis of Nucleotide-activated glycerol-d-manno-Heptose. *J. Biol. Chem.* **276**, 20935–20944 (2001).
96. Valvano, M. A., Messner, P. & Kosma, P. Novel pathways for biosynthesis of nucleotide-activated glycerol-manno-heptose precursors of bacterial glycoproteins and cell surface polysaccharides. *Microbiology* **148**, 1979–1989 (2002).

97. Taylor, P. L. *et al.* Structure and function of sedoheptulose-7-phosphate isomerase, a critical enzyme for lipopolysaccharide biosynthesis and a target for antibiotic adjuvants. *J. Biol. Chem.* **283**, 2835–2845 (2008).
98. Mosberg, J. A. *et al.* A unique arabinose 5-phosphate isomerase found within a genomic island associated with the uropathogenicity of *Escherichia coli* CFT073. *J. Bacteriol.* **193**, 2981–2988 (2011).
99. Casazza, J. P. & Veech, R. L. The measurement of xylulose 5-phosphate, ribulose 5-phosphate, and combined sedoheptulose 7-phosphate and ribose 5-phosphate in liver tissue. *Anal. Biochem.* **159**, 243–248 (1986).
100. Weibel, K. E., Mor, J.-R. & Fiechter, A. Rapid sampling of yeast cells and automated assays of adenylate, citrate, pyruvate and glucose-6-phosphate pools. *Anal. Biochem.* **58**, 208–216 (1974).
101. Koning, W. de & Dam, K. van. A method for the determination of changes of glycolytic metabolites in yeast on a subsecond time scale using extraction at neutral pH. *Anal. Biochem.* **204**, 118–123 (1992).
102. Douma, R. D. *et al.* Intracellular metabolite determination in the presence of extracellular abundance: Application to the penicillin biosynthesis pathway in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.* **107**, 105–115 (2010).
103. Sable, H. Z. Pentose metabolism in extracts of yeast and mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 687–697 (1952).
104. Kauffman, F. C., Brown, J. G., Passonneau, J. V. & Lowry, O. H. Effects of Changes in Brain Metabolism on Levels of Pentose Phosphate Pathway Intermediates. *J. Biol. Chem.* **244**, 3647–3653 (1969).
105. King, M. T., Passonneau, J. V. & Veech, R. L. Radiometric measurement of phosphoribosylpyrophosphate and ribose 5-phosphate by enzymatic procedures. *Anal. Biochem.* **187**, 179–186 (1990).
106. Fan, J. *et al.* Corrigendum: Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature* **513**, 574–574 (2014).
107. Lewis, C. A. *et al.* Tracing Compartmentalized NADPH Metabolism in the Cytosol and Mitochondria of Mammalian Cells. *Mol. Cell* **55**, 253–263 (2014).
108. Wamelink, M. M. C. *et al.* Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS/MS: application to two new inherited defects of metabolism. *J. Chromatogr. B* **823**, 18–25 (2005).
109. Becerra, null, Gerfen, null, Temkin, null, Singel, null & Griffin, null. Dynamic nuclear polarization with a cyclotron resonance maser at 5 T. *Phys. Rev. Lett.* **71**, 3561–3564 (1993).

110. Timm, K. N. *et al.* Assessing Oxidative Stress in Tumors by Measuring the Rate of Hyperpolarized [1-¹³C]Dehydroascorbic Acid Reduction Using ¹³C Magnetic Resonance Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **292**, 1737–1748 (2017).
111. Bornet, A. *et al.* Highly Repeatable Dissolution Dynamic Nuclear Polarization for Heteronuclear NMR Metabolomics. *Anal. Chem.* **88**, 6179–6183 (2016).
112. Nelson, S. J. *et al.* DNP-Hyperpolarized ¹³C Magnetic Resonance Metabolic Imaging for Cancer Applications. *Appl. Magn. Reson.* **34**, 533–544 (2008).
113. Harris, T., Degani, H. & Frydman, L. Hyperpolarized ¹³C NMR studies of glucose metabolism in living breast cancer cell cultures. *NMR Biomed.* **26**, 1831–1843 (2013).
114. Koptug, I. V. Spin hyperpolarization in NMR to address enzymatic processes in vivo. *Mendeleev Commun.* **23**, 299–312 (2013).
115. Bowen, S. & Hilty, C. Time-Resolved Dynamic Nuclear Polarization Enhanced NMR Spectroscopy. *Angew. Chem.* **120**, 5313–5315 (2008).
116. Allouche-Arnon, H. *et al.* Quantification of rate constants for successive enzymatic reactions with DNP hyperpolarized MR. *NMR Biomed.* **27**, 656–662 (2014).
117. Miclet, E. *et al.* Toward Quantitative Measurements of Enzyme Kinetics by Dissolution Dynamic Nuclear Polarization. *J. Phys. Chem. Lett.* **5**, 3290–3295 (2014).
118. Hore, P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*.
119. Albert, M. S. *et al.* Biological magnetic resonance imaging using laser-polarized ¹²⁹Xe. *Nature* **370**, 199–201 (1994).
120. Walker, T. G. & Happer, W. Spin-exchange optical pumping of noble-gas nuclei. *Rev. Mod. Phys.* **69**, 629–642 (1997).
121. Eisenschmid, T. C. *et al.* Para hydrogen induced polarization in hydrogenation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 8089–8091 (1987).
122. Bowers, null & Weitekamp, null. Transformation of symmetrization order to nuclear-spin magnetization by chemical reaction and nuclear magnetic resonance. *Phys. Rev. Lett.* **57**, 2645–2648 (1986).
123. Pravica, M. G. & Weitekamp, D. P. Net NMR alignment by adiabatic transport of parahydrogen addition products to high magnetic field. *Chem. Phys. Lett.* **145**, 255–258 (1988).
124. Carver, T. R. & Slichter, C. P. Polarization of Nuclear Spins in Metals. *Phys. Rev.* **92**, 212–213 (1953).
125. Day, S. E. *et al.* Detecting tumor response to treatment using hyperpolarized ¹³C magnetic resonance imaging and spectroscopy. *Nat. Med.* **13**, 1382–1387 (2007).
126. Dzien, P. *et al.* Following Metabolism in Living Microorganisms by Hyperpolarized ¹H NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 12278–12286 (2016).
127. Comment, A. *et al.* Design and performance of a DNP prepolarizer coupled to a rodent MRI scanner. *Concepts Magn. Reson. Part B Magn. Reson. Eng.* **31B**, 255–269 (2007).

128. Vasos, P. R. *et al.* Long-lived states to sustain hyperpolarized magnetization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 18469–18473 (2009).
129. Sarkar, R. *et al.* Proton NMR of ¹⁵N-Choline Metabolites Enhanced by Dynamic Nuclear Polarization. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 16014–16015 (2009).
130. Ahuja, P., Sarkar, R., Jannin, S., Vasos, P. R. & Bodenhausen, G. Proton hyperpolarisation preserved in long-lived states. *Chem. Commun.* **46**, 8192–8194 (2009).
131. Miéville, P., Jannin, S., Helm, L. & Bodenhausen, G. Kinetics of yttrium-ligand complexation monitored using hyperpolarized (89)Y as a model for gadolinium in contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 5006–5007 (2010).
132. Miéville, P., Jannin, S., Helm, L. & Bodenhausen, G. NMR of insensitive nuclei enhanced by dynamic nuclear polarization. *Chimia* **65**, 260–263 (2011).
133. Miéville, P., Jannin, S. & Bodenhausen, G. Relaxometry of insensitive nuclei: optimizing dissolution dynamic nuclear polarization. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **210**, 137–140 (2011).
134. Bornet, A., Jannin, S. & Bodenhausen, G. Three-field NMR to preserve hyperpolarized proton magnetization as long-lived states in moderate magnetic fields. *Chem. Phys. Lett.* **512**, 151–154 (2011).
135. Bornet, A. *et al.* Ultra High-Resolution NMR: Sustained Induction Decays of Long-Lived Coherences. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 15644–15649 (2011).
136. Miéville, P. *et al.* Scavenging Free Radicals To Preserve Enhancement and Extend Relaxation Times in NMR using Dynamic Nuclear Polarization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 6182–6185 (2010).
137. Jannin, S., Bornet, A., Colombo, S. & Bodenhausen, G. Low-temperature cross polarization in view of enhancing dissolution Dynamic Nuclear Polarization in NMR. *Chem. Phys. Lett.* **517**, 234–236 (2011).
138. Jannin, S., Bornet, A., Melzi, R. & Bodenhausen, G. High field dynamic nuclear polarization at 6.7T: Carbon-13 polarization above 70% within 20min. *Chem. Phys. Lett.* **549**, 99–102 (2012).
139. Bornet, A. *et al.* Microwave frequency modulation to enhance Dissolution Dynamic Nuclear Polarization. *Chem. Phys. Lett.* **602**, 63–67 (2014).
140. Gajan, D. *et al.* Hybrid polarizing solids for pure hyperpolarized liquids through dissolution dynamic nuclear polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201407730 (2014). doi:10.1073/pnas.1407730111
141. Bornet, A. *et al.* Long-Lived States of Magnetically Equivalent Spins Populated by Dissolution-DNP and Revealed by Enzymatic Reactions. *Chem. – Eur. J.* **20**, 17113–17118 (2014).
142. Milani, J. *et al.* A magnetic tunnel to shelter hyperpolarized fluids. *Rev. Sci. Instrum.* **86**, 024101 (2015).
143. Vuichoud, B. *et al.* Measuring absolute spin polarization in dissolution-DNP by Spin Polarimetry Magnetic Resonance (SPY-MR). *J. Magn. Reson.* **260**, 127–135 (2015).
144. Ji, X. *et al.* Transportable hyperpolarized metabolites. *Nat. Commun.* **8**, ncomms13975 (2017).

145. Jhajharia, A. *et al.* Communication: Dissolution DNP reveals a long-lived deuterium spin state imbalance in methyl groups. *J. Chem. Phys.* **146**, 041101 (2017).
146. Dumez, J.-N. *et al.* Dynamic Nuclear Polarization of Long-Lived Nuclear Spin States in Methyl Groups. *J. Phys. Chem. Lett.* **8**, 3549–3555 (2017).
147. Weber, E. M. M. *et al.* Anisotropic longitudinal electronic relaxation affects DNP at cryogenic temperatures. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **19**, 16087–16094 (2017).
148. Vuichoud, B. Novel Sample Formulations for Pure and Persistent Hyperpolarized Solutions via Dissolution Dynamic Nuclear Polarization. (2017). doi:10.5075/epfl-thesis-7507, urn:nbn:ch:bel-epfl-thesis7507-6
149. Abragam, A. & Goldman, M. Principles of dynamic nuclear polarisation. *Rep. Prog. Phys.* **41**, 395 (1978).
150. Hartmann, S. R. & Hahn, E. L. Nuclear Double Resonance in the Rotating Frame. *Phys. Rev.* **128**, 2042–2053 (1962).
151. Pines, A., Gibby, M. G. & Waugh, J. S. Proton-enhanced NMR of dilute spins in solids. *J. Chem. Phys.* **59**, 569–590 (1973).
152. Pines, A., Gibby, M. G. & Waugh, J. S. Proton-Enhanced Nuclear Induction Spectroscopy. A Method for High Resolution NMR of Dilute Spins in Solids. *J. Chem. Phys.* **56**, 1776–1777 (1972).
153. Bornet, A. *et al.* Boosting Dissolution Dynamic Nuclear Polarization by Cross Polarization. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 111–114 (2013).
154. Bornet, A., Melzi, R., Jannin, S. & Bodenhausen, G. Cross Polarization for Dissolution Dynamic Nuclear Polarization Experiments at Readily Accessible Temperatures 1.2 < T < 4.2 K. *Appl. Magn. Reson.* **43**, 107–117 (2012).
155. Polnaszek, C. F. & Bryant, R. G. Nitroxide radical induced solvent proton relaxation: Measurement of localized translational diffusion. *J. Chem. Phys.* **81**, 4038–4045 (1984).
156. Borah, B. & Bryant, R. G. NMR relaxation dispersion in an aqueous nitroxide system. *J. Chem. Phys.* **75**, 3297–3300 (1981).
157. Thermodynamic and Kinetic Studies of Glucose Mutarotation by Using a Portable Personal Blood Glucose Meter (PDF Download Available). *ResearchGate* Available at: https://www.researchgate.net/publication/237729801_Thermodynamic_and_Kinetic_Studies_of_Glucose_Mutarotation_by_Using_a_Portable_Personal_Blood_Glucose_Meter.
158. Walsh, C. *Enzymatic reaction mechanisms*. (San Francisco : W. H. Freeman, 1979).
159. Salas, M., Vinuela, E. & Sols, A. SPONTANEOUS AND ENZYMATICALLY CATALYZED ANOMERIZATION OF GLUCOSE 6-PHOSPHATE AND ANOMERIC SPECIFICITY OF RELATED ENZYMES. *J. Biol. Chem.* **240**, 561–568 (1965).

160. Lessmann, D., Schimz, K. L. & Kurz, G. D-glucose-6-phosphate dehydrogenase (Entner-Doudoroff enzyme) from *Pseudomonas fluorescens*. Purification, properties and regulation. *Eur. J. Biochem.* **59**, 545–559 (1975).
161. Storn, R. & Price, K. Differential Evolution – A Simple and Efficient Heuristic for global Optimization over Continuous Spaces. *J. Glob. Optim.* **11**, 341–359 (1997).
162. Krauth, W. Introduction to Monte Carlo algorithms. (2006).
163. Grage, H. & Akke, M. A statistical analysis of NMR spectrometer noise. *J. Magn. Reson. San Diego Calif 1997* **162**, 176–188 (2003).
164. Schmidt, T. J. Helenanolid-type sesquiterpene lactones--III. Rates and stereochemistry in the reaction of helenalin and related helenanolides with sulfhydryl containing biomolecules. *Bioorg. Med. Chem.* **5**, 645–653 (1997).
165. Snyder, C. A., Garte, S. J., Sellakumar, A. R. & Albert, R. E. Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents. *Cancer Lett.* **33**, 175–181 (1986).
166. Fulmer, G. R. *et al.* NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **29**, 2176–2179 (2010).
167. Welcome to www.ecp.fr/cms/site/lgpm. Available at: <http://www.lgpm.ecp.fr/>. (Accessed: 27th August 2017)
168. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Glucose 6-phosphate (HMDB0001401). Available at: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB01401>. (Accessed: 31st August 2017)
169. Human Metabolome Database: Showing metabocard for Adenosine triphosphate (HMDB0000538). Available at: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00538>. (Accessed: 31st August 2017)
170. Human Metabolome Database: Showing metabocard for ADP (HMDB0001341). Available at: <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB01341>. (Accessed: 31st August 2017)
171. Contreras-Sanz, A. *et al.* Simultaneous quantification of 12 different nucleotides and nucleosides released from renal epithelium and in human urine samples using ion-pair reversed-phase HPLC. *Purinergic Signal.* **8**, 741–751 (2012).
172. MALDI (Désorption-ionisation laser assistée par matrice). *Spectrométrie de masse* (2016).
173. Identification de micro-organismes par spectrométrie de masse MALDI-TOF MS | Biotechnologies-ST2S. Available at: <http://disciplines.ac-montpellier.fr/biotechnologies/ressources/microbiologie/identification-de-micro-organismes-par-spectrometrie-de-masse-maldi-tof-ms>. (Accessed: 3rd September 2017)
174. Burrell, M. M., Earnshaw, C. J. & Clench, M. R. Imaging Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry: a technique to map plant metabolites within tissues at high spatial resolution. *J. Exp. Bot.* **58**, 757–763 (2007).

175. Wiley: Applications of Ion Chromatography in the Analysis of Pharmaceutical and Biological Products - Lokesh Bhattacharyya, Jeffrey S. Rohrer. Available at:
<http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-0470467096.html>. (Accessed: 18th July 2017)
176. Öckerman, P. A. Separation of phosphorylated glycolytic intermediates, nucleotides and glycogen in blood cells, using diethylaminoethyl-sephadex in columns. *Biochim. Biophys. Acta* **74**, 588–597 (1963).
177. Opperdoes, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 127–151 (1987).
178. Duffieux, F., Roy, J. V., Michels, P. A. M. & Opperdoes, F. R. Molecular Characterization of the First Two Enzymes of the Pentose-phosphate Pathway of *Trypanosoma brucei* GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE AND 6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE. *J. Biol. Chem.* **275**, 27559–27565 (2000).
179. Willson, M., Sanejouand, Y.-H., Perie, J., Hannaert, V. & Opperdoes, F. Sequencing, Modeling, and Selective Inhibition of *Trypanosoma brucei* Hexokinase. *Chem. Biol.* **9**, 839–847 (2002).
180. Dodson, H. C. *et al.* Quercetin, a fluorescent bioflavonoid, inhibits *Trypanosoma brucei* hexokinase 1. *Exp. Parasitol.* **127**, 423–428 (2011).

Résumé

Les enzymes sont des protéines et des catalyseurs biologiques qui jouent des rôles essentiels dans l'ensemble des voies métaboliques d'une cellule. Leur dysfonctionnement engendre fréquemment des altérations des voies métaboliques avec des conséquences souvent pathologiques. Dans le cas de la voie oxydative de la PPP, cette cascade enzymatique produit un cofacteur, le NADPH, qui est responsable du processus de détoxification de la cellule par son activité réductrice et un précurseur de diverses biosynthèses comme la lipogénèse. Un dysfonctionnement d'une des trois enzymes peut engendrer la mort cellulaire (apoptose).

Une nouvelle technique, la Polarisation Dynamique Nucléaire par Dissolution (D-DNP) montre la capacité à suivre des réactions enzymatiques de manière quantitative. Cette technique combine la polarisation à basse température de spins nucléaires, avec leur détection après dissolution et transfert dans un spectromètre de résonance magnétique. La D-DNP permet d'obtenir un gain de sensibilité d'un facteur 10 000 et rend ainsi possible la quantification de paramètre cinétique dans les conditions physiologiques, *in vitro* ou *in cell*.

Le but de cette thèse est de quantifier les enzymes de la voie oxydative de la PPP. Dans un premier temps, pour développer un modèle de quantification simple et efficace, des études ont été réalisées *in vitro*, dans des conditions natives ou en présence d'inhibiteur, avec des enzymes seules ou de manière simultanée. Pour la détermination des paramètres cinétiques des enzymes seules, une méthode de production et de purification a été mise en place pour produire l'ensemble des substrats des enzymes de la voie oxydative de la PPP. Des études d'inhibitions ont été réalisées sur la deuxième enzyme de la voie oxydative. Cette enzyme a été produite à partir des *Trypanosoma brucei*, parasite, responsable de la maladie du sommeil dont les propriétés diffèrent avec celle de l'homme. Finalement, des études préliminaires ont été réalisées *in cell* sur des *Trypanosoma brucei*.

Ce travail a permis de montrer un nouveau modèle de quantification des paramètres cinétiques par des mesures D-DNP dans la littérature scientifique. Grâce à ces expériences, une confirmation de la sélectivité de la première enzyme de la voie oxydative pour l'un des deux anomères de glucose-6-phosphate et le rôle antioxydant de la deuxième enzyme de la PPP ont été obtenues. Sachant que ces enzymes se trouvent à la fois dans le cytosol et dans un compartiment cellulaire particulier, le glycosome, l'absence de signal dans les expériences réalisées sur les *trypanosomes brucei*, indique potentiellement la difficulté de pénétration du glucose.