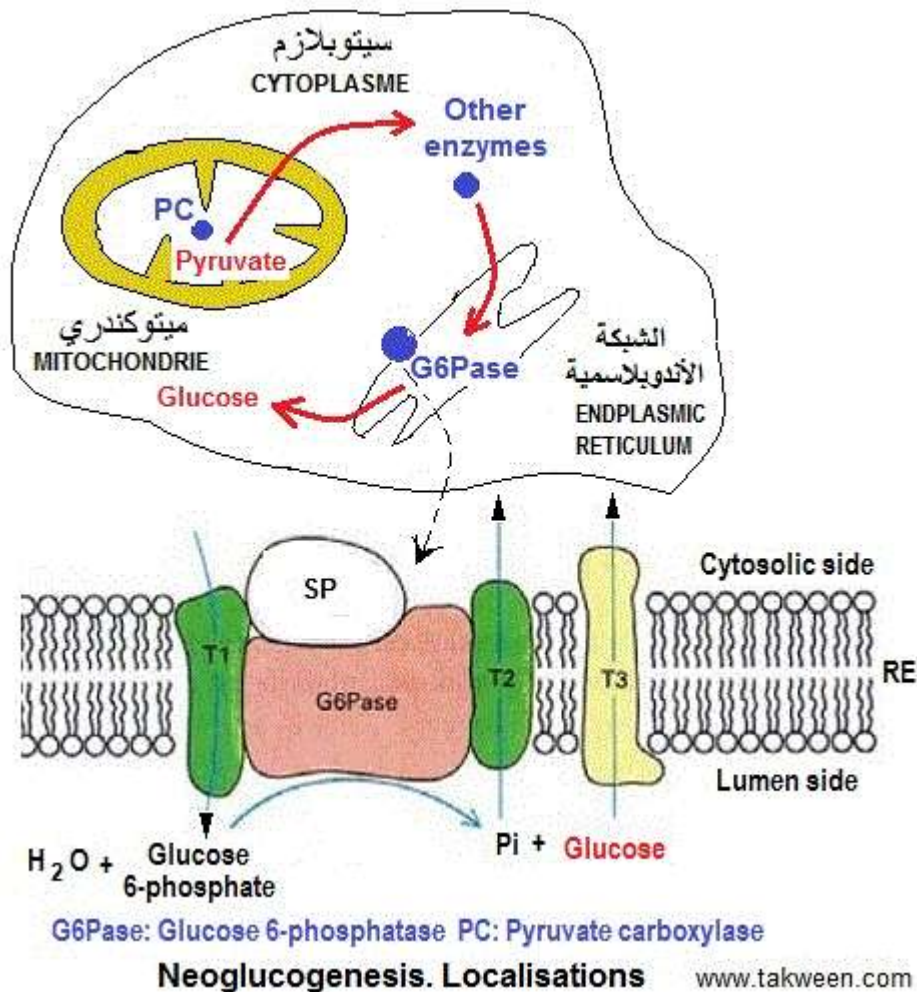


Pour faire la synthèse du glucose, la **néoglucogénèse** contourne les **étapes irréversibles** rencontrées dans la glycolyse. La Glucose 6-phosphatase est une **enzyme liée à la membrane du réticulum endoplasmique** des cellules du foie et reins (absente dans le cerveau et les muscles).

Elle forme un complexe protéique avec la glucose-6-phosphate translocase (T) qui agit à la fois en provoquant l'entrée du glucose-6-phosphate dans la lumière du réticulum endoplasmique et en l'hydrolysant pour libérer le D-glucose. Ce dernier est alors transféré hors du réticulum endoplasmique par des transporteurs de glucose..



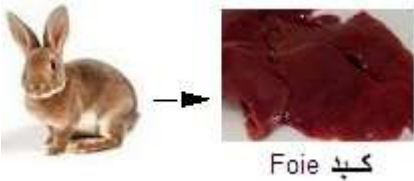
Texte Eng: Glucose-6-phosphate phosphatase, catalyzing the final metabolic step of gluconeogenesis, faces the endoplasmic reticulum (ER) lumen. Thus, glucose produced in the ER has to be either exported from the ER into the cytosol before release into circulation or exported directly by a vesicular pathway.

Préparation des homogénats de foie de lapin

Matériel et réactifs

- Deux bechers de 100 ml
 - Scalpel, balance, moulin électrique, éprouvette, glace en paille.
 - Centrifugeuse réfrigérée (hautes vitesses), tubes de centrifugation de 50 ml.
 - Tampon d'extraction constitué de Saccharose 0,25 M, Tris-HCl 5mM (pH 6,5) et EDTA 0,1 mM.
-

Matériel biologique.

- Deux lapins (dont un normalement nourri et un autre mis à jeûne) desquels on enlève le foie (F) qu'on lave dans le tampon d'extraction (Saccharose 0,25 M, Tris-HCl 5mM (pH 6,5) et EDTA 0,1 mM). Peser les deux organes et découper les en petits fragments.
- 
- Homogénéiser, séparément, les fragments de foie au moulin électrique à couteaux à raison de 100 ml de milieu d'extraction pour 10 grammes de tissus (10% (p/v)).
 - Centrifuger les homogénats à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée pendant 10 minutes à 15000 g.
 - Transférer les surnageants dans des flacons propres et conserver les dans la glace. Ils serviront comme source d'enzyme pour tester l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (substrat exogène). Ils seront appelés 'homogénats'.

Hydrolyse du glucose-6-phosphate par la glucose-6 phosphatase du foie

L'évaluation de l'activité glucose-6 phosphatase du foie est réalisée par la vitesse d'hydrolyse du substrat (glucose-6-phosphate). La réaction catalysée par la glucose-6 phosphatase est :



Pi ou phosphate inorganique, est l'ortho-phosphate, forme la plus simple du phosphore (PO₄, souvent appelée Pi par les biologistes).
Le phosphate libéré est dosé par la méthode de Macheboeuf et Delsal.

Matériel et réactifs utiles pour le test d'activité d'hydrolyse du glucose-6-

phosphate

- Bain-marie à 37°C, tubes à essai en verre, pipettes.
- Centrifugeuse de paillasse, microtubes de 2 ml
- Spectrophotomètre, cuve de mesure d'absorbance.
- Agitateur vortex.
- Homogénats (source d'enzyme) résultant de la centrifugation des homogénats de foie (FJ : foie de lapin à jeûne, FN : foie de lapin nourri).
- Tampon citrate 0,01 M pH 6,5) ;
- Glucose-6-phosphate 0,05 M préparé dans le tampon.
- EDTA (Acide éthylène diamine tétra-acétique) 0,01 M préparé dans le tampon.
- Acide trichloroacétique (TCA) 10% (p/v).

Quel est le rôle de EDTA ? Dans le milieu réactionnel, EDTA chélate (piège) les ions Mg^{++} nécessaire à l'activité de la phosphatase alcaline dont l'activité peut interférer avec celle de la glucose-6 phosphatase, toutes libérant le phosphate. En effet la phosphatase alcaline est bien présente dans le foie et dans d'autres organes comme l'intestin, le rein et l'os. Elle agit sur les esters phosphoriques avec libération du phosphate minéral.

Protocole du test d'activité de la glucose-6 phosphatase du foie.

Le protocole de dosage prend en compte la présence éventuelle de phosphate préexistant dans les homogénats de foie et ne relevant pas de l'activité de la glucose-6 phosphatase. Le tableau des tests ci dessous montre la répétition des tests deux fois pour chaque type d'homogénat. Le phosphore net de la réaction correspond à la soustraction de la quantité de Pi préexistants (témoins de la réaction) de la quantité totale de Pi obtenue dans les tubes des tests de la réaction.

	Témoins de la réaction				Tests de la réaction			
Tubes	FJ1	FJ2	FN1	FN2	FJ1	FJ2	FN1	FN2
Tampon citrate, pH 6,5(ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
EDTA (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
l'homogénat (ml)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
TCA 10% (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0	0	0	0
Glucose-6-phosphate 0,1 M (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Incubation à 37°C	30 minutes après agitation							
TCA 10% (ml)	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Centrifugation à 7000 g	3 minutes après transfert des contenus des tubes à essai dans des microtubes pour centrifugation. On récupère les surnageants pour y doser le phosphate							

Après le dernier ajout de TCA 10% pour arrêter la réaction de la glucose-6 phosphatase, placer les tubes dans la glace pendant 5 minutes. Transvaser le contenu des tubes dans des microtubes de deux millilitres. Centrifuger 3 minutes et récupérer 0,5 ml de surnageant pour mesurer le phosphore libéré.

Hydroquinone (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Incubation à l'obscurité	30 minutes après agitation au vortex												
DO à 690 nm													
<p>Se rappeler de la loi de Bee Lambert dans les dosages spectrophotométriques --> voir cette vidéo.</p> <p>Dosage des protéines dans les homogénats de foie de lapin (TP. Séance 2)</p> <p>Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Lowry (1951). Pour plus de détail voir la page web 'dosage des protéines par la méthode de Lowry'.</p>													

Le dosage des protéines est effectué selon le tableau :

	Gamme étalon					Homogénat FJ, dilué 20 fois			Homogénat FN, dilué 20		
	0	1	2	3	4	FJ1	FJ2	FJ3	FN1	FN2	FN3
stillée (ml)	0,8	0,7	0,6	0,4	0	0,7	0,6	0,5	0,7	0,6	0,5
,25 mg/ml) en ml	0	0,1	0,2	0,4	0,8	0	0	0	0	0	0
généats dilués 20 x (ml)	0	0	0	0	0	0,1	0,2	0,3	0,1	0,2	0,3
n cupro-alcaline * (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
tion	10 minutes après agitation des tubes au vortex										
f de Folin (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
tion à l'obscurité	30 minutes après agitation au vortex										
ance (DO) à 750 nm											
té de protéines (mg)											

* La solution cupro-alcaline est préparée selon le mélange des réactifs suivants, pour 100 ml: 96 ml de réactif A, 2 ml de réactif B et 2 ml de réactif C

- Réactif A : Na₂CO₃ à 2% dans NaOH 0,1 N.
- Réactif B : tartrate de Na et K à 2% dans l'eau.
- Réactif C : CuSO₄, 5 H₂O à 1% dans l'eau

Présentation des résultats et Compte-rendu (CR)

1- Tracer les courbes des gammes étalons des dosages du phosphore et des protéines.

2- Déterminer l'activité de la glucose-6 phosphatase dans chacun des homogénats de foie. L'expression de cette activité est donnée en **µg Pi/heure/ml d'homogénat**, en **micromoles de Pi/heure/ml d'homogénat** et en **µg Pi/g de foie**.

3- Déterminer le **nombre d'unités enzymatiques**, sachant que 1 unité = libération de 1 µg de Pi/heure) par gramme de tissu frais, sachant que l'homogénat est à 10%.

4- Calculer l'**activité spécifique** de la glucose-6 phosphatase correspondant au foie à jeûne et au foie nourri.

5- Donner un commentaire aux résultats obtenus

Quelques indications pour la rédaction du compte-rendu

Dosage du phosphore

Calcul du Pi de la gamme-étalon. Tube P2: 100 µg --> 1 ml, combien dans 0,3 ml?, donc dans P2 il y'a 30 µg. Même calcul pour les autres tubes.

Tracer la gamme-étalon: DO à 690 nm = f((Pi)

- Calcul de Pi libéré par la glucose-6 phosphatase de l'homogénat du **foie du lapin nourri** (FN):

(Pi)FN libéré = Pi total moyen - Pi préexistant moyen avec:

(Pi) préexistant moyen = [(Pi)FN1 + (Pi)FN2]/2, (Pi) total moyen = [(Pi)FN1' + (Pi)FN2']/2, Si on calcule la concentration en µg/ml, il faudra multiplier les quantités de phosphore trouvées **par 2**, sachant que les essais ne concernaient que 0,5 ml de surnageant.

- Calcul de Pi libéré par la glucose-6 phosphatase de l'homogénat du **foie du lapin à jeûne** (FJ):

(Pi)FJ libéré = Pi total moyen - Pi préexistant moyen avec:

(Pi) préexistant moyen = [(Pi)FJ1 + (Pi)FJ2]/2, (Pi) total moyen = [(Pi)FJ1' + (Pi)FJ2']/2,

---> Quantité de Pi libéré dans le milieu réactionnel (volume = 1,6 ml): à multiplier les valeurs (Pi) (exprimées en µg/ml) par 1,6. Cette quantité de Pi est libérée par 30 min. Pour calculer (Pi) par heure (60 minutes), il faut multiplier encore **par 2**.

---> Pour calculer la quantité de Pi libérée/h/ml d'homogénat, il faut multiplier la quantité de Pi libérée/h **par 2,5**, car le volume de l'homogénat utilisé dans le test de la réaction était 0,4 ml.

Expression de l'activité de la glucose-6 phosphatase en µmole de Pi/h/ml d'homogénat:

1 mole de Pi correspond à 31 g de P, soit 1 µmole correspond à 31 µg.

Calcul de la concentration des protéines dans l'homogénat du foie:

A partir de la gamme étalon SAB calculer les 3 concentrations de protéines correspondantes aux prises d'essai 0,1 ml, 0,2 ml et 0,3 ml. Faire la moyenne. Comme on a dosé les protéines sur l'homogénat dilué 20 fois, il faut multiplier par 20 pour remonter à la concentration des protéines dans l'homogénat non dilué.

Calcul de l'activité spécifique de la glucose-6 phosphatase en μ mole de Pi/h/mg de protéines:

Tenir compte de la prise d'essai d'uniquement 0,4 ml d'homogénat. Combien cela représente en mg de protéines. Si on veut remonter au poids (en g) de foie, il faut aussi tenir compte du rapport poids du foie par volume de tampon d'extraction (10 g de foie dans 100 ml de tampon).

Commentaire:

Théoriquement le nombre d'unité enzymatiques dans le foie du lapin à jeûne est supérieur à celui calculé pour le foie de lapin nourri. Parler du rôle de la [néoglucogénèse](#). Dans la discussion, on peut évoquer des **maladies métaboliques** comme celle due à un déficit en glucose-6 phosphatase chez l'Homme aboutissant à la maladie de Von Gierke (glycogénose), s'exprimant par une hypoglycémie, acidose lactique,..