



Disponible en ligne sur

ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte  
www.em-consulte.com



Article original

## Contribution à l'étude de l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase chez des sujets atteints de diabète type 2

*Contribution to the study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in patients with type 2 diabetes*

N. Senhaji, B. Elkhalfi, A. Soukri\*

Laboratoire de physiologie et génétique moléculaire, faculté des sciences Ain Chock, Km 8 Route Eljadida BP 5366 Maarif, Casablanca 20100, Maroc

### INFO ARTICLE

Historique de l'article :

Reçu le 7 septembre 2013

Accepté le 19 mars 2014

Mots clés :

GAPDH

Diabète type 2

Érythrocytes

Band 3

Keywords:

GAPDH

Type 2 diabetes

Erythrocytes

Band 3

### RÉSUMÉ

Le diabète est reconnu comme un problème majeur de santé publique, responsable d'une morbidité et d'une mortalité précoces avec une prévalence planétaire en permanente augmentation. Le diabète de type II, anciennement appelé diabète non insulino-dépendant, représente environ 90 % de l'ensemble des formes de diabète et se caractérise par des anomalies qui affectent l'insulino-sécrétion et l'action de l'insuline et par conséquent, induit une hyperglycémie. L'objectif de ce travail consiste à étudier l'implication d'une enzyme clé de la glycolyse, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans le diabète de type 2. Ce travail comprend une étude biochimique, cinétique et l'étude de l'expression de la GAPDH chez des sujets atteints du diabète de type 2. Au terme de notre étude, on a pu classer les sujets diabétiques en deux catégories : la première comprenant des sujets chez lesquelles la GAPDH possède une activité spécifique et un profil électrophorétique semblable aux sujets sains, et la deuxième chez laquelle on note une inhibition de la GAPDH. Nos résultats suggèrent que chez 60 % de nos sujets atteints de diabète de type 2, on assiste à une inhibition réversible de la GAPDH médiée probablement par une interaction ionique de cette dernière avec la protéine membranaire érythrocytaire, band 3.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### ABSTRACT

Diabetes is recognized as a major public health problem responsible for early morbidity and mortality with a worldwide prevalence in permanent increase. The type II diabetes once called non-insulin dependent diabetes, accounts for about 90 % of all forms of diabetes and is characterized by abnormalities that affect insulin secretion and insulin action and thus, induces hyperglycemia. The aim of this work is to study the involvement of a key enzyme of glycolysis, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in type 2 diabetes. This work includes a biochemical, kinetic studies, and the study of the expression of GAPDH in subjects with type 2 diabetes. From our study, we could classify the diabetic subjects into two categories: the first one, consisting of subjects in whom GAPDH has a specific activity and an electrophoretic profile similar to healthy subjects, and the second one, in which there is an inhibition of GAPDH. Our results suggest that, in 60 % of our patients with type 2 diabetes, a reversible inhibition of GAPDH is observed. This inhibition is probably mediated by the ionic interaction with the erythrocyte membrane protein, band 3.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Aujourd'hui, toutes les études s'accordent à dire que les maladies métaboliques et nutritionnelles et à leur tête le diabète sont en train de prendre des proportions alarmantes. En effet, en

\* Auteur correspondant.

Adresses e-mail : [ab.soukri@gmail.com](mailto:ab.soukri@gmail.com), [a\\_soukri@hotmail.com](mailto:a_soukri@hotmail.com) (A. Soukri).

2001, le nombre de diabétiques était évalué à 177 millions [1] et l'OMS prévoit une population de 366 millions de diabétiques pour 2030 [2].

Véritable épidémie mondiale, comme le décrit l'Organisation mondiale de la santé, le diabète est la première maladie non transmissible reconnue par les Nations unies comme une menace pour la santé mondiale aussi grave que les épidémies infectieuses, telles que le paludisme, la tuberculose et le sida [3].

Au Maroc, la tendance de la prévalence du diabète est passée de 6,1 % en 2003 à 10,3 % en 2009 [4]. L'enquête menée par le ministère de la Santé a montré une prévalence globale du diabète de 6,6 % chez les personnes âgées de 20 ans et plus (4,7–8,6 % chez les hommes et 5,1–8,1 % chez les femmes) Cette prévalence est différente selon le milieu : 9,0 % (7,1–10,8 %) en milieu urbain et 4,4 % (3,0–5,8 %) en milieu rural [4].

Le diabète sucré représente une affection chronique résultant de nombreux facteurs, environnementaux ou génétiques, qui agissent le plus souvent ensemble [5]. Il est défini par un désordre métabolique d'étiologies diverses, qui se présente habituellement accompagné d'une perturbation des métabolismes glucidique, lipidique et protéique, résultant d'un défaut de sécrétion d'insuline, de son activité ou des deux associées, provoquant une augmentation de la glycémie qui conduit aux complications diabétiques.

Le diabète provoque une variété de changements pathologiques dans les artères, les capillaires et les nerfs périphériques. Plusieurs études ont montré qu'il existe une forte relation entre le taux d'hyperglycémie et à la fois, l'apparition et la progression des complications microvasculaires diabétiques dans la rétine, les reins et les nerfs périphériques [6–8]. L'hyperglycémie semble aussi avoir un rôle important dans la pathogenèse du diabète macrovasculaire [7,8].

L'hyperglycémie chronique [9] s'accompagne d'une augmentation de l'entrée cellulaire de glucose. L'augmentation de la glycolyse aérobie est responsable d'une augmentation de la production de radicaux libres oxygénés [10] par la mitochondrie qui active la PARP (Poly-(ADP-ribose)-polymérase) et s'accompagne d'une accumulation de métabolites intermédiaires de la glycolyse qui se détournent vers quatre voies métaboliques délétères pour la cellule : l'activation de la PKC (protéine kinase C) via le DAG (Diacyl glycérol) ; la synthèse de méthylglyoxal qui conduit à une production rapide d'AGEs ; l'activation de la voie des hexoamines (qui conduit à la formation d'UDP-nacetylglucosamine) et celle du sorbitol.

La glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) est l'une des enzymes clés de la glycolyse les mieux caractérisées au niveau biochimique et structural [11–14]. Elle catalyse l'oxydation phosphorylante réversible du D-glyceraldéhyde-3-phosphate (D-G3P) en acide 1,3-diphosphoglycérique (1,3dPG) en présence du NAD(H) comme cofacteur.

La GAPDH intervient dans la glycolyse, le cycle de Krebs et la voie des pentoses phosphate, intervenant ainsi dans les trois voies du métabolisme central du carbone [15]. En dehors de sa fonction glycolytique la GAPDH phosphorylante présente des activités diverses selon sa localisation membranaire, cytoplasmique ou nucléaire [16,17].

Une série d'investigations a montré l'implication de la GAPDH dans divers mécanismes et pathologies : l'apoptose, le stress oxydatif, les maladies neurodégénératives, le cancer... [18].

Dans le but d'élucider l'implication des enzymes glycolytiques dans le diabète de type 2, « diabète non insulino-dépendant », on s'est intéressé à l'étude d'une enzyme clé de la glycolyse, la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). Ce travail comprend une étude biochimique, cinétique et l'étude de l'expression de la GAPDH chez des sujets atteints du diabète de type 2.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1.1. Matériel

Les expériences effectuées lors de cette étude ont été réalisées à partir du sang frais, provenant d'un total de 27 sujets recrutés au centre de prélèvement au CHU de Casablanca et à l'Institut Pasteur du Maroc (IPM), dont 16 diabétiques et 11 sujets sains. Pour chaque sujet, 4 mL du sang périphérique ont été prélevés sur un tube EDTA.

### 2.2. Méthodes

#### 2.2.1. Obtention de l'extrait enzymatique

2.2.1.1. *Traitement du sang.* On procède d'abord à une centrifugation (2500 g, 15 min) de l'échantillon sanguin afin d'obtenir une séparation en trois couches distinctes. Ensuite, on élimine le plasma et les globules blancs par aspiration. On procède alors au lavage des hématies avec le sérum physiologique (NaCl 0,9 %).

2.2.1.2. *Lyse des hématies.* Cinq volumes d'eau distillée glacée ont été ajoutés au culot globulaire lavé et conservés à 4 °C pendant 10 min. L'extrait protéique brut est obtenu après centrifugation à 13 200 g pendant 30 min.

2.2.1.3. *Dégradation de la membrane.* Un agent lytique des érythrocytes (Quaternary Ammonium Salts : 19–26 g/L. Isopropanol : 1–2 %. Potassium cyanide : 0,15–0,5 g/L) a été ajouté au culot globulaire lavé pour être ensuite centrifugé à 13 200 g pendant 30 min.

L'extrait protéique brut, obtenu par les deux méthodes de lyse, servira à l'étude biochimique de la GAPDH.

2.2.1.4. *Isolement des membranes des hématies.* Les membranes sont préparées selon la méthode de Dodge et al. modifiée [19]. Après lyse des globules rouges et après centrifugation, le culot contenant les membranes érythrocytaires est lavé dans le tampon phosphate [0,05 M, pH 5,8]. Une fois que le surnageant devient incolore, on arrête les lavages, on l'élimine et on resuspend le culot dans un tampon phosphate (0,01 M pH 8,0), on incube 1 h à 4 °C, après on centrifuge afin d'éliminer l'hémoglobine des membranes. Puis, on les lave 3 fois avec du tampon phosphate (0,005 M, pH 8,0).

2.2.1.5. *Solubilisation des protéines membranaires.* Reprendre le culot membranaire dans le tampon [Tris-HCl, 0,1 M, EDTA 5 mM, pH 9,0], refroidi à 4 °C, mélanger doucement, puis incuber le tout pendant 2 h à 4 °C et centrifugation à 13 200 g pendant 15 min.

Les surnageants et culots serviront au dosage des protéines, à la détermination de l'activité enzymatique et à l'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

Remarque : toutes les procédures ont été effectuées à 4–5 °C et toutes les solutions utilisées pour cette préparation sont préalablement portées à 4 °C.

#### 2.2.2. Étude biochimique de la GAPDH

2.2.2.1. *Dosage des protéines totales.* Les protéines ont été quantifiées suivant la technique de Bradford [20]. Dans la présente étude, la BSA (Bovin Serum Albumine) est utilisée comme protéine standard.

2.2.2.2. *Détermination de l'activité de la GAPDH phosphorylante NAD<sup>+</sup> dépendante.* - L'activité enzymatique de la GAPDH phosphorylante NAD<sup>+</sup> dépendante est déterminée par spectrophotométrie à 25 °C en mesurant l'apparition du NADH à 340 nm [21].

La réaction enzymatique a été initiée par addition de 5 à 10 µL de la préparation enzymatique au mélange réactionnel contenant le tampon Tricine-NaOH 50 mM (pH 8,5), le NAD<sup>+</sup> 10 mM, le DL-G3P 1 mM et l'Arsenate de sodium 10 mM (Na<sub>2</sub>HASO<sub>4</sub>).

Le DL-G3P est obtenu par hydrolyse acide du sel disodique DL-glyceraldéhyde-3-phosphate diéthylacétal suivant les indications du fournisseur (Sigma).

Dans la réaction suivie, le substrat (G-3-P) donne du 1,3 bisphosphoglycérate tout en consommant du NAD<sup>+</sup>. La variation d'absorption mesurée à 340 nm (spectrophotometer model 6405, Jenway, Dunmow, UK) correspond à la diminution de la concentration en cofacteur (NAD<sup>+</sup>).

2.2.2.3. *Électrophorèse en conditions dénaturantes (PAGE-SDS).* Les protéines ont été séparées par électrophorèse verticale sur gel de polyacrylamide 12 % (w/v) en conditions dénaturantes en présence du sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) selon la méthode décrite par Laemmli [22] l'électrophorèse est réalisée dans un appareil : mini-protean-II (Bio-Rad) adapté pour mini-gel (8 × 10 cm), avec des cales d'une épaisseur de 0,75 mm en utilisant le marqueur de poids moléculaire (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range, Bio-Rad).

2.2.2.4. *Immunodétection par Western blot.* L'immunodétection a été effectuée après électrophorèse sur gel de polyacrylamide SDS-12 %. Les protéines ont été

transférées sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Keene, États-Unis) par la technique du western blot [23]. Le transfert est réalisé à l'aide du système de transfert Bio-Rad Trans-Blot. La membrane est préalablement équilibrée dans le tampon de transfert Tris-HCl 25 mM (pH8,3), glycine 192 mM, SDS 1,3 mM et le méthanol 20 % (v/v). Après s'être assuré de l'efficacité du transfert, la membrane est incubée dans une solution de BSA à 5 % (p/v) en présence d'azide de sodium à 0,05 % (p/v) sous agitation douce pendant une nuit à température ambiante. Par la suite, la membrane est lavée au TBS Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM puis incubée pendant 2 h sous agitation en présence de l'anticorps polyclonal monospécifique primaire dilué au 1:500 dans le TBS. Après 4 lavages de 15 min chacun avec le TBSt (TBS contenant le Tween-20 à 0,05 % (v/v)), la membrane est incubée pendant 1 h avec l'anticorps secondaire (Aticorps Anti-IgG de lapin conjugué à la peroxydase, SIGMA) à une dilution de 1/1000 dans du TBSt.

Ensuite, la membrane est lavée avec le TBSt 3 fois pendant 15 min, puis rincée avec le TBS pendant 15 min, elle est ensuite révélée dans une solution de 12 mg de 4-chloro-1-naphtol dissous dans 4 mL de méthanol, 16 mL de TBS et 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 30 % (v/v). Dès que les bandes sombres apparaissent, la réaction est arrêtée par lavage à l'eau courante, puis la membrane est séchée entre deux papiers Whatman.

### 3. Résultats et discussion

L'objectif de notre travail, étant d'étudier l'implication de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase dans le diabète de type 2.

Tout d'abord, nous avons procédé au dosage d'activité de l'enzyme GAPDH phosphorylante NAD<sup>+</sup> dépendante dans l'extrait brut des érythrocytes des sujets sains.

La moyenne d'activité spécifique de la GAPDH du surnageant des globules rouges lysés par la 1<sup>re</sup> méthode (lyse par l'eau), mesurée chez des sujets sains était de 0,020 µmol/min/mg de protéine. Il s'agit tout de même d'une faible activité comparée à celle mesurée dans d'autres organes telle, dans le cerveau ou elle est approximativement égale à 1,8 (µmol/min/mg de protéine) [24].

Cette faible activité est expliquée par le fait qu'à l'état physiologique normal, 60–70 % de l'ensemble de la GAPDH des érythrocytes se trouve associée à la membrane [25], cette association induit une interaction ionique inhibitrice réversible de la GAPDH [26–31].

Par la suite nous avons dosé l'activité spécifique de la GAPDH chez les sujets diabétiques, le Tableau 1 indique les moyennes des activités spécifiques chez les différents patients présentant un profil diabétique.

Selon les résultats obtenus, on a pu classer les sujets diabétiques, recrutés dans la présente étude, en deux catégories :

- une 1<sup>re</sup> catégorie qui comprend des sujets diabétiques (40 %) ayant une moyenne d'activité spécifique de la GAPDH de l'ordre de 0,019 (U/mg de protéine), pratiquement égale à celle mesurée chez les sujets sains ;
- et une 2<sup>e</sup> catégorie qui comprend des sujets diabétiques (60 %) chez lesquels l'activité de la GAPDH est pratiquement nulle.

L'absence d'activité chez 60 % de nos sujets diabétiques peut être expliquée par plusieurs hypothèses parmi lesquelles une association à la membrane des érythrocytes qui concernerait la majorité de la fraction cytosolique de l'enzyme, contrairement à l'état physiologique normal où on observe un pourcentage d'association allant de 60–70 % de l'ensemble de la GAPDH.

Cette absence d'activité peut être également due à une déficience de l'enzyme causée par l'action de différents composés qui exercent des effets via des mécanismes différents tels que l'oxydation directe du NADH, la stimulation de la translocation réversible membrane-cytoplasmique, ou l'induction de la liaison du NAD<sup>+</sup> (H) à l'enzyme [31–38].

Afin de vérifier la 1<sup>re</sup> hypothèse qui explique l'absence de l'activité de la GAPDH par sa liaison à la membrane érythrocytaire, nous avons procédé à l'utilisation d'un tampon ayant une capacité

**Tableau 1**

Activité spécifique de la GAPDH, après lyse des globules rouge, chez les sujets sains et diabétiques.

Catégorie	Activité spécifique (µmol/min/mg de protéine)	p	t-test
Sujets sains	0,021 (0,016–0,026)		Réf
Sujets diabétiques : catégorie 1	0,019 (0,012–0,025)	0,31	1,109
Sujets diabétiques : catégorie 2	0,001 (0,001–0,005)	< 0,0001	19,636

lytique permettant ainsi de libérer les composantes membranaires des hématies en dégradant leur membrane.

La moyenne d'activité spécifique de la GAPDH mesurée chez les sujets sains, retrouvée après dégradation de la membrane érythrocytaire est de l'ordre de 0,324 U/mg de protéine. Ainsi, on constate qu'on obtient une valeur seize fois supérieure à celle obtenue sans dégradation de la membrane érythrocytaire (0,020 U/mg).

Ce résultat renforce l'idée que l'enzyme dans les érythrocytes est souvent associée à la membrane. On peut admettre que la raison de cette association serait la proximité d'enzymes glycolytiques comme source d'énergie pour le transport actif [39,40]. Sachant que son élution pour activation est très sensible au pH et à la force ionique [41].

Par la suite, nous avons utilisé ce même procédé chez les sujets diabétiques, notamment ceux de la 2<sup>e</sup> catégorie (60 % de nos sujets diabétiques) chez qui l'enzyme était inhibée.

Ainsi montré dans la Fig. 1 nous avons constaté que chez les mêmes sujets qui n'avaient pas d'activité de GAPDH, on retrouve une moyenne d'activité spécifique de 0,119 (U/mg de protéine), ce résultat vient consolider notre hypothèse, sachant que le tampon de lyse est un agent lytique érythrocytaire, ayant la capacité de dégrader la membrane des globules rouges, et par conséquent libère les protéines membranaires ou celles incorporées à la membrane, son utilisation a pu probablement libérer la GAPDH membranaire, ce qui nous a permis de retrouver une activité.

Afin de mieux répondre, d'une part à la problématique de liaison à la membrane, et d'autre part dans le but de conforter nos arguments avancés en ce qui concerne les différentes activités observées chez les sujets diabétiques, notamment pour la catégorie 2, nous avons effectué un gel SDS-PAGE des différents extraits obtenus chez les sujets de cette catégorie.

Les extraits protéiques déposés ont été préalablement dosés par la méthode de Bradford afin de déterminer la quantité de protéines à déposer. Dans cette étude, pour chacune des fractions, nous avons déposé l'équivalent de 40 µg de protéines.

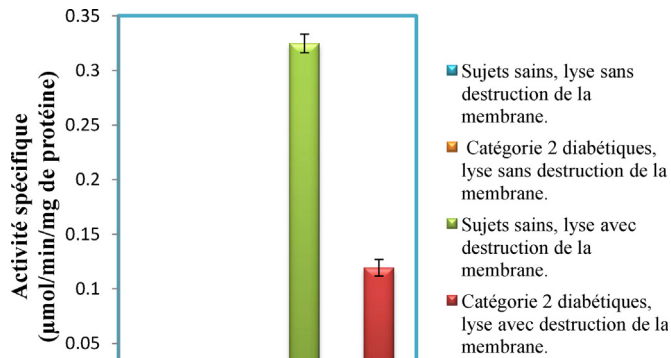
La localisation de la bande de la GAPDH a été vérifiée en utilisant l'anticorps anti-GAPDH humain qui reconnaît une seule bande d'un poids moléculaire de 36 kDa.

Ainsi montré dans la Fig. 2, le gel regroupe le profil électrophorétique des fractions solubles et membranaires obtenues après lyse des globules rouge chez les sujets diabétiques de la catégorie 2.

On remarque à première vue que chez cette catégorie de patients, les fractions membranaires sont beaucoup plus riches en protéines que les fractions cytosoliques.

Il est à noter qu'en ce qui concerne la GAPDH cytosolique, l'intensité de la bande chez les patients de la catégorie 1 est similaire à celle des sujets sains (résultat non montré). Cependant, chez les patients de la 2<sup>e</sup> catégorie, la bande est très faible et pratiquement inexistante, ce qui est en accord avec l'activité, pratiquement nulle, mesurée chez cette catégorie.

Afin de vérifier la différence d'activité obtenue avant et après la dégradation de la membrane, nous avons effectué un gel SDS-PAGE



**Fig. 1.** Comparaison des moyennes de l'activité spécifique de la GAPDH (U/mg de protéine) des sujets sains et diabétiques de la 2<sup>e</sup> catégorie dont le sang a été lysé sans et après la destruction de la membrane.

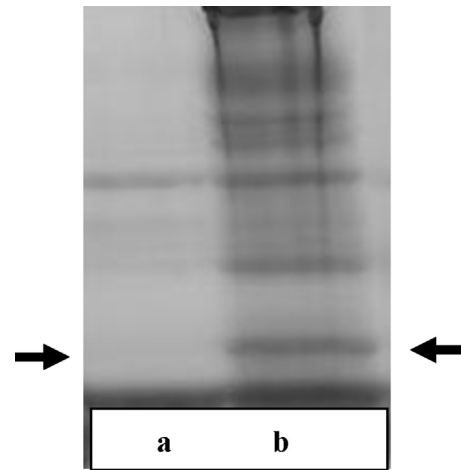
des extraits obtenus chez les sujets diabétiques de la catégorie 1 et 2. Ainsi montré dans la Fig. 3, on constate que l'intensité de la bande GAPDH diffère entre les deux classes de sujets diabétiques et c'est selon la fraction cytosolique ou membranaire.

En effet, on remarque que d'une part, il y a une différence d'intensité de la bande entre le surnageant et l'extrait membranaire correspondant (a et b, d et e). D'autre part, la bande GAPDH chez le sujet de la 2<sup>e</sup> catégorie des diabétiques est pratiquement absente dans le surnageant de la lyse, tandis que dans l'extrait obtenu après la dégradation de la membrane, on observe une bande nettement visible (d et f) et qui reste malgré tout faible par rapport à celle observée chez la catégorie 1 des diabétiques (c).

Ces observations sont en accord avec les activités mesurées dans les deux extraits et dans les deux conditions de lyse.

Toutes les observations à partir de nos résultats : dosage d'activités et gels, nous montre que chez 60 % des sujets diabétiques de la présente étude, l'enzyme GAPDH est inhibée par sa liaison à la membrane des érythrocytes.

Cependant, beaucoup de questions restent à être soulevées, à savoir pourquoi chez la 1<sup>re</sup> catégorie de diabétiques l'enzyme est active tandis que chez la 2<sup>e</sup> elle est inhibée ? Qu'est-ce qui induit cette inhibition ? Quelles sont les conséquences physiologiques de cette inhibition ? Il semblerait donc que de nouvelles perspectives s'ouvrent en vue de cette étude, afin de répondre à ces questions, il



**Fig. 2.** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS) des extraits bruts du sang lysé par la 1<sup>re</sup> méthode chez les sujets de la catégorie 2 : (a : Surnageant ; b : culot). La GAPDH correspond à la bande en face des flèches.

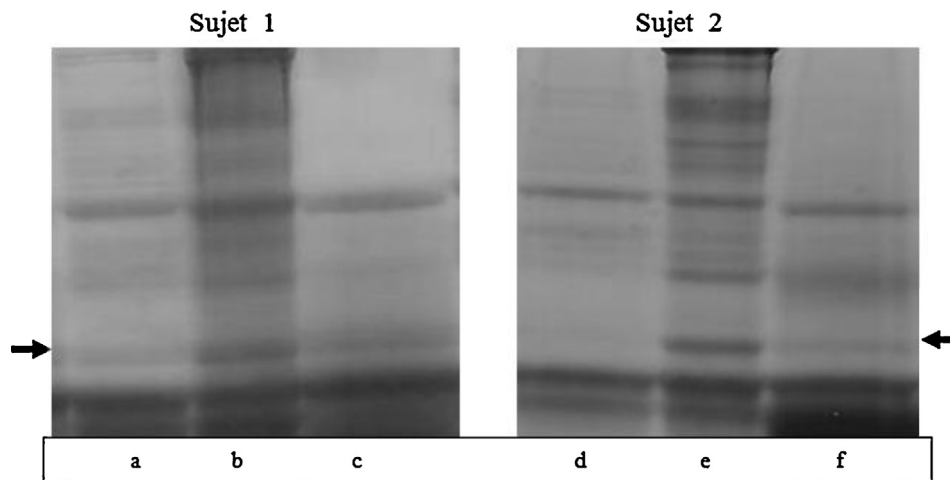
serait également plus approprié de faire une étude selon le sexe, le poids et l'âge du patient.

À noter qu'il y a peu d'informations rencontrées en ce qui concerne l'utilisation du sang total comme matériel d'étude. Tous les travaux effectués ont été réalisés soit sur des lignées cellulaires ou des modèles animaux [41].

Afin de vérifier si cette inhibition est réversible, nous avons procédé à la solubilisation de la GAPDH membranaire chez des sujets diabétiques appartenant à la deuxième catégorie, l'électrophorèse de l'extrait enzymatique correspondant est représentée dans la Fig. 4 :

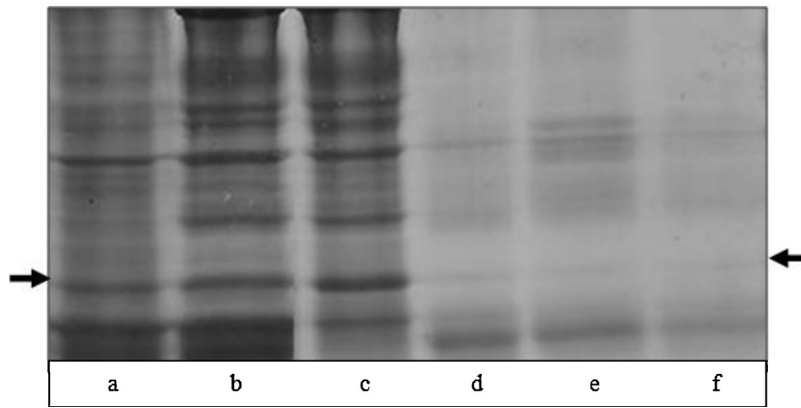
On détecte dans les surnageants des fractions membranaires solubilisées, la présence d'une bande à faible intensité correspondante à la sous-unité de la GAPDH. Dans ces mêmes surnageants de solubilisation, on a pu mesurer une activité spécifique de la GAPDH de l'ordre de 0,016 U/mg de protéine. Des travaux similaires de Reynolds et Trayer [42] ont solubilisé 90 % des protéines de la membrane de l'érythrocyte humain par contact durant 96 h à 20 °C avec une solution aqueuse d'EDTA 5 mM à pH 7,5.

Ce résultat confirme la présence d'une activité réversible de la GAPDH dans la membrane de l'érythrocyte humain, dissociable par un détergent ou un chélateur. L'effet des chélateurs suggère des interactions ioniques dans la liaison de l'enzyme à la membrane.



**Fig. 3.** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS) montrant les extraits bruts de : sujet diabétique [1<sup>re</sup> catégorie] (a ; b : surnageant et culot du sang lysé ; c : sang lysé avec la dégradation de la membrane) ; sujet diabétique [2<sup>e</sup> catégorie] (d ; e : surnageant et culot du sang lysé sans dégradation de la membrane ; f : sang lysé avec dégradation de la membrane). La GAPDH correspond à la bande en face des flèches.





**Fig. 4.** Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (PAGE-SDS) montrant les fractions membranaires de la GAPDH de 3 sujets diabétiques de la 2<sup>e</sup> catégorie (a ; b ; c : culot du sang lysé par la 1<sup>re</sup> méthode) ; et les surnageants de solubilisation respectivement des trois sujets, (d ; e ; f : protéines membranaires solubilisées).

La déshydrogénase liée est localisée sur la face intérieure ou cytoplasmique de la membrane d'une telle manière qu'elle n'est pas en mesure de contacter son substrat lorsque la membrane est imperméable [25].

L'ensemble des interprétations des résultats de l'expression de l'enzyme GAPDH dans les différents cas de sujets étudiés et en fonction de la fraction cytosolique ou membranaire ont été à nouveau reconfirmés par le Western blot (résultat non montré).

L'implication de la GAPDH dans plusieurs pathologies a été également mise en évidence, en particulier dans les cancers de la prostate et la pathogenèse virale [43]. Elle est également la cible unique de l'oxyde nitrique [44].

Par ailleurs, d'autres études démontrent son implication dans l'apoptose, les troubles neurodégénératifs et les cancers [16]. L'inactivation de la GAPDH dans le muscle d'animaux diabétiques a également été observée [18].

L'implication de la GAPDH dans ces pathologies engage plusieurs changements à savoir le changement de son expression, l'apparition de nouveaux isoformes, ou encore des modifications post-traductionnelles de la dite enzyme.

#### 4. Conclusion

Au terme de notre étude, la première réalisée sur le sang humain, on a pu classer les sujets diabétiques en deux catégories, la 1<sup>re</sup> (40 %) comprenant des sujets chez lesquelles la GAPDH possède une activité spécifique et un profil électrophorétique semblable aux sujets sains, et une deuxième (60 %) où on note une inhibition de la GAPDH par liaison à la membrane des érythrocytes. Ces résultats suggèrent que chez une certaine tranche de diabétiques de type 2, on assiste à une inhibition réversible de la GAPDH médiée par une interaction ionique de cette dernière avec la protéine membranaire érythrocytaire, band 3.

#### Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

#### Remerciements

Nos sincères remerciements à Mr Abderrazak Essari, responsable du centre du prélèvement à l'hôpital universitaire Ibn Rochd (CHU), à Dr. M. Bellik, médecin biologiste, centre de biologie

médicale, IPM et à Mlle. Jihane ALLEM, pour leur contribution dans la réalisation de ce travail.

#### Références

- [1] Amos AF, Mc Carty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications : estimates and projections to the year. *Diabet Med* 2010;14: 1–85.
- [2] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes estimates or the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047–53.
- [3] IDF. International Diabetes Federation; <http://www.idf.org/about-diabetes>.
- [4] MS., DELM.. Projet plan national stratégique de prévention et de contrôle du diabète 2010–2015; 2009.
- [5] Derot M. Diabète. In: *Encyclopaedia Universalis*. 6. Paris: Encyclopaedia Universalis France SA; 1985. p. 66–70.
- [6] The diabetes control and complications trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1993;329:977–86.
- [7] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998;352:837–53.
- [8] Wei M, Gaskill SP, Haffner SM, Stem MP. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. *The San Antonio Heart Study*. *Diabetes Care* 1998;21:1167–72.
- [9] Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int* 2001;60:2041–55.
- [10] Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S. End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions. *Am J Kidney Dis* 1999;34: 795–808.
- [11] Soukri A, Mougin A, Corbier C, Wonacott A, Branlant C, Branlant G. Role of the histidine 176 residue in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as probed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 1989;28:2586–92.
- [12] Fillinger S, Boschi-Muller S, Azza S, Dervyn E, Branlant G. Two glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J Biol Chem* 2000;275:14031–7.
- [13] Iddar A, Valverde F, Serrano A, Soukri A. Expression, purification and characterization of recombinant non-phosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*, protein expression and purification; 25. 2002; p. 519–26.
- [14] Roitel O, Vachette P, Azza S, Branlant G. P but not R-axis interface is involved in cooperative binding of NAD on tetrameric phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Mol Biol* 2003;326:1513–22.
- [15] Fothergill-Gilmore LA, Michels PAM. Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Biol* 1993;95:105–35.
- [16] Sirover MA. New insight of an old protein, Cell cycle regulation of DNA repair enzymes and pathways. In: Milo GE, Casto BC, editors. *Transformation of human fibroblasts: molecular and genetic mechanisms*. Boca Raton: CRC Press; 1999. p. 29–54.
- [17] Sirover Michael A. Mazola. New nuclear functions of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2005;95:45–52.
- [18] Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal* 2011; 23:317–23.

- [19] Dodge JT, Mitchell C, Hanahan J. Arch Biochem Biophys 1963;100:119–1305.
- [20] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.
- [21] Iglesias AA, Losada M. Purification and kinetic and structural properties of spinach leaf NADP-dependent non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Arch Biochem Biophys 1988;260:830–40.
- [22] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:4668–73.
- [23] Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio-iodinated protein A. Anal Biochem 1981;112:195–203.
- [24] Kish SJ, Lopes-Cendes I, Guttman M, Furukawa Y, Pandolfo M, Rouleau GA, et al. Brain glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in human trinucleotide repeat disorders. Arch Neurol 1998;55:1299–304.
- [25] Kant JA, Steck TL. Specificity in the association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with isolated human erythrocyte membranes. J Biol Chem 1973;248(24):8457–64.
- [26] Mallozzi C, Di Stasi AMM, Minetti M. Free radicals induce reversible membrane cytoplasm translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. Arch Biochem Biophys 1995;231:345–52.
- [27] Galli F, Rovidati S, Ghibelli L, Canestrà F. S-Nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase decreases the enzyme activity to the erythrocyte membrane. Nitric Oxide 1998;2:17–27.
- [28] Low PS. Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: centre of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. Biochim Biophys Acta 1986;864:145–67.
- [29] Rogalski AA, Steck TL, Waseem A. Association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with the plasma membrane of the intact human red cell. J Biol Chem 1989;264:6438–46.
- [30] Maretzki D, Reimann B, Rapoport SM. A reappraisal of the binding of cytosolic enzymes to erythrocyte membranes. Trends Biochem Sci 1989;14:93–6.
- [31] Albertini MC, Teodori L, Accorsi A, Soukri A, Campanella L, Baldoni F, et al. Sulphurous mineral water oral therapy: effects on erythrocyte metabolism. Food Chem Toxicol 2008;46:3343–50.
- [32] McDonald LJ, Moss J. Stimulation by nitric oxide of a NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci 1993;90:6238–41.
- [33] Dimmeler S, Brune B. Nitric oxide preferentially stimulates auto-ADP-ribosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase compared to alcohol or lactate dehydrogenase. FEBS Lett 1993;315:21–4.
- [34] Kots AY, Skurat AV, Sergienko EA, Bulargina TV, Severin ES. Nitroprusside stimulates the cysteine-specific mono (ADP-ribosylation) of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. FEBS Lett 1992;300:9–12.
- [35] Kawamoto RM, Caswell AH. Autophosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphorylation of protein from skeletal muscle microsomes. Biochemistry 1986;25:656–61.
- [36] Minetti M, Pietraforte D, Di Stasi AM, Mallozzi C. Nitric oxide-dependent NAD linkage to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: possible involvement of a cysteine thiol radical intermediate. Biochem J 1996;319:369–75.
- [37] Soukri A, Valverde F, Hafid N, Elkebbaj MS, Serrano A. Occurrence of a differential expression of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in muscle and liver from euthermic and induced hibernating jerboa (*Jaculus orientalis*). Gene 1996;181:139–45.
- [38] Batthyany C, Schopfer FJ, Baker PR, Duran R, Baker LM, Huang Y, et al. Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. J Biol Chem 2006;281:20450–63.
- [39] Schrier SL. Studies of the metabolism of human erythrocyte membranes. J Clin Invest 1963;42:756–66.
- [40] Green DJ, Murer E, Hulton HO, Baum H. Association of integrated metabolic pathways with membranes. I. Glycolytic enzyme of red blood corpuscle and yeast. Arch Biochem Biophys 1965;112:635–47.
- [41] Mc D, Kirtley ME, Tanner MJA. The interaction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with human erythrocyte membranes. J Biol Chem 1974;249:6478–85.
- [42] Blatnik M, Frizzell N, Thorpe S, Baynes JW. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes. Diabetes 2008;57.
- [43] Elkhalfi B, Senhaji N, Benomar H, Soukri A. Study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in the tumor process of: breast, cervix and prostate cancers. Adv Biol Chem 2012;02:335–40.
- [44] Reynolds JA, Trayer H. Solubility of membrane proteins in aqueous media. J Biol Chem 1971;246(23):7337–42.