

Lors de la glycolyse, le glucose peut être phosphorylé sous l'action de deux enzymes michaeliennes :

1) La **glucokinase** au niveau du foie ou 2) l'**hexokinase** qui catalyse la phosphorylation d'hexoses comme le D-glucose, le D-mannose et le D-fructose.

On étudie le comportement de ces deux enzymes vis à vis du glucose.

Pour les mêmes concentrations en enzymes, les vitesses initiales (V_0) des réactions sont mesurées pour différentes concentrations en substrat, à 37°C et à pH = 7,35. Les résultats sont analysés à l'aide des représentations graphiques de Lineweaver et Burk.

Pour la glucokinase, le point d'intersection avec l'axe des ordonnées est égal à **0,21** μM^{-1} .min.

Pour l'hexokinase, le point d'intersection avec l'axe des ordonnées est égal à **8,12** μM^{-1} .min.

Pour la glucokinase, le point d'intersection avec l'axe des abscisses est égal à **-0,11** mM^{-1}

Pour l'hexokinase, le point d'intersection avec l'axe des abscisses est égal à **-3,12** mM^{-1}

Question 1 :

a) Déterminez les valeurs de K_m pour ces deux enzymes. Commentez

$$K_m \text{ GK} = 9,09 \text{ (0,5 pt) mM (0,5 pt)}$$

$$K_m \text{ HK} = 0,32 \text{ (0,5 pt) mM (0,5 pt)}$$

La GK a beaucoup moins d'affinité pour le glucose que l'HK (1pt)

-b) Comparez leurs efficacités catalytiques respectives à l'égard du glucose. Commentez.

$$V_{\max} \text{ GK} = 4,76 \text{ (0,5 pt) } \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \text{ (0,5 pt)}$$

$$V_{\max} \text{ HK} = 0,12 \text{ (0,5 pt) } \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1} \text{ (0,5 pt)}$$

Eff cat : K_{cat}/K_m prop à V_{\max}/K_m puisque concentrations en enzymes identiques dans énoncé (1 pt)

$$V_{\max \text{ GK}}/K_{m \text{ GK}} = 4,76/9,09 = 0,52 \text{ (0,5 pt)}$$

$$V_{\max \text{ HK}}/K_{m \text{ HK}} = 0,12/0,32 = 0,38 \text{ (0,5 pt)}$$

La GK a une meilleure efficacité catalytique que l'HK – plus spécifique que l'HK .

Question 2 :

a) Pour une concentration intracellulaire de glucose de **5 mM** (en situation de glycémie normale), calculez les V_0 des réactions catalysées par les deux enzymes.

b) Indiquer laquelle est susceptible de voir son activité modulée de façon significative en cas d'hyperglycémie (post-prandiale, par exemple) ? Justifiez votre réponse et commentez.

a) Pour une concentration intracellulaire de glucose de 5 mM (en situation de glycémie normale), calculez les V_0 des réactions catalysées par les deux enzymes.

$$S = 0,55 \text{ KmGK} \Rightarrow V_0 = 0,55/1,55 V_{\max} = 0,35 \times V_{\max} = 0,35 \times 4,76 = 1,67 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$S = 15,6 \text{ KmHK} \Rightarrow V_0 = 15,6/16,6 V_{\max} = 0,94 \times V_{\max} = 0,94 \times 0,12 = 0,1128 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$$

b) Indiquer laquelle est susceptible de voir son activité modulée de façon significative en cas d'hyperglycémie (post-prandiale, par exemple) ? Justifiez votre réponse et commentez.

En situation normale, l'activité de l'HK a quasiment déjà atteint son activité maximale. Pas d'adaptation significative à l'hyperglycémie. Ceci contrairement à la GK

En situation d'hyperglycémie, c'est surtout la GK et donc le foie qui va métaboliser le glucose.

Question 3 :

On étudie l'effet du glucose-6-phosphate (glu-6P) sur l'activité de l'hexokinase.

Dans les mêmes conditions que précédemment, mais en présence de glu-6P, la V_{\max} apparente de l'hexokinase est mesurée à $0,05 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ et le K_m apparent est mesuré à $0,33 \text{ mM}$.

a) Précisez l'effet du glu-6P sur l'activité de l'hexokinase vis-à-vis du glucose.

V_{\max} app diminue, K_{mapp} identique \rightarrow INC

b) Sachant que la constante de dissociation (K_i) du glu-6P pour l'hexokinase est égale à 1 mM , calculez la concentration de glu-6P utilisée.

$$V_{\max i} = V_{\max} / (1 + I/K_i) \rightarrow V_{\max} / V_{\max i} = 1 + I/K_i \rightarrow 0,12 / 0,05 = 1 + I/K_i \rightarrow I/K_i = 1,4 \rightarrow I = 1,4 K_i = 1,4 \text{ mM}$$

Question 4 :

La vitesse initiale V_0 de l'hexokinase est mesurée grâce à une séquence enzymatique associant une réaction principale et une réaction indicatrice avec production d'une molécule de NADH, H^+ pour une molécule de glucose consommée.

Il est précisé :

- $220 \text{ } \mu\text{L}$ de tampon réactionnel (pH 7,35 ; Mg^{2+}) sont mélangés à $125 \text{ } \mu\text{L}$ de réactif 1 dans une cuve de spectrophotomètre de $0,6 \text{ cm}$ de trajet optique.

- Le mélange est incubé à $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ pendant 1 minute.

- $25 \text{ } \mu\text{L}$ de la solution d'enzyme sont alors ajoutés et l'absorbance à 340 nm est mesurée toutes les 10 secondes pendant 2 minutes.

Le coefficient d'extinction molaire à 340 nm du NADH, H^+ étant égal à $6225 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, calculez le facteur permettant de déterminer directement la V_0 (en $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$) de l'hexokinase dans la solution initiale à partir de la variation d'absorbance mesurée en 10 secondes dans la cuve pendant la phase stationnaire.

$A = ELC \rightarrow C = A/EL \rightarrow V_0 \text{ dans la cuve} = \Delta A \times 1/EL \text{ (1pt)} \times 6 \text{ (0,5 pt)} \times 10^6 \text{ (0,5 pt)} \times$
 $\text{Vol total/Vol ech (0,5 pt)}$
 $\rightarrow V_0 = \Delta A \times 6 / (6225 \times 0,6) \times 370 / 25 \times 10^6$
 $\rightarrow F = 23775,1 \text{ (1 pt)}.$