

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**  $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}$ .

Pour l'hexokinase, le point d'intersection avec l'axe des ordonnées est égal à **8,12**  $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}$ .

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

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

### Question 1 :

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

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

### 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.

### 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**  $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$  et le  $K_m$  apparent est mesuré à **0,33** mM.

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

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.

### 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,  $\text{H}^+$  pour une molécule de glucose consommée.

Il est précisé :

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

- Le mélange est incubé à 37 °C pendant 1 minute.

- **25**  $\mu\text{L}$  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,  $\text{H}^+$  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.

**Question 1 :**

- 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)

- 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 :  $K_{\text{cat}}/K_m$  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 :**

- 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.

$$S = 0,55 \text{ KmGK (0,5 pt) } \implies V_0 = 0,55/1,55 V_{\max} \text{ (0,5 pt) } = 0,35 \times V_{\max} = 0,35 \times 4,76 = 1,67 \text{ (0,5 pt) } \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1} \text{ (0,5 pt)}$$

$$S = 15,6 \text{ KmHK (0,5 pt) } \implies V_0 = 15,6/16,6 V_{\max} \text{ (0,5 pt) } = 0,94 \times V_{\max} = 0,94 \times 0,12 = 0,188 \text{ (0,5 pt) } \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1} \text{ (0,5 pt)}$$

- 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 (1 pt)

En situation d'hyperglycémie, c'est surtout la GK et donc le foie qui va métaboliser le glucose. (1 pt)

**Question 3 :**

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

$V_{\max}$  app diminue,  $K_{\text{mapp}}$  identique  $\rightarrow$  INC (1 pt)

- 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.

$$V_{\max i} = V_{\max}/(1+I/K_i) \text{ (1 pt) } \rightarrow V_{\max}/V_{\max i} = 1 + I/K_i \rightarrow 0,12/0,05 = 1 + I/K_i \rightarrow I/K_i = 1,4 \rightarrow I = 1,4 K_i = 1,4 \text{ (0,5 pt) mM (0,5 pt)}$$

**Question 4 :**

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

$$\rightarrow V_0 = \Delta A \times 6/(6225 \times 0,6) \times 370/25 \times 10^6$$

$$\rightarrow F = 23775,1 \text{ (1 pt)}$$