

BBA 66090

## GLUCOKINASES DU FOIE DE RAT

## PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DES FORMES PARTICULÉES

G. BERTHILLIER\*, L. COLOBERT, M. RICHARD ET R. GOT

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, 8, Avenue Rockefeller, Lyon 8ème (France)*

(Reçu le 30 décembre, 1969)

## SUMMARY

*Rat liver glucokinases. Purification and properties of the microsome-bound forms*

Particulate glucokinases (ATP:D-glucose 6-phosphotransferase, EC 2.7.1.2) from rat liver were localized in sucrose density gradient subfractions of the microsomal fraction. Most of this activity was extracted in soluble form with 0.1% (w/v) Triton X-100. A purification is described which involved  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation and the use of DEAE-Sephadex and DEAE-cellulose. By gel filtration on Bio-gel, two active fractions, G1 and G2, were obtained with a 760-fold purification for G1 and 250-fold one for G2. As assessed by polyacrylamide column, the molecular weights of rat hepatic glucokinases were 120 000 for G1 and 50 000 for G2, respectively. The preparations had specific activities of 1.15  $\mu\text{moles/min per mg}$  of protein for G1 and 0.37 for G2. The enzymes were found to have different temperature stabilities and pH sensitivities. They catalyzed the phosphorylation of glucose, glucosamine and, to a lesser extent, fructose, but significant differences were noted between the interactions of G1 and G2 with their substrates. Each purified glucokinase presented two apparent  $K_m$  values for glucose, glucosamine and ATP. These results suggested an activation of the catalytic activity of G1 and G2 by high concentrations of the substrate.

The other sugars tested, 2-deoxy-D-glucose, N-acetyl-D-glucosamine, D-mannose, D-galactose and D-xylose, were not phosphorylated.

The properties of glucokinases were briefly compared with those of other phosphotransferases.

## INTRODUCTION

Des travaux récents<sup>1-5</sup> ont montré la présence dans le foie de rat, de quatre hexokinases solubles qui comprennent trois enzymes à faible  $K_m$  et un enzyme à  $K_m$  élevé. Ce dernier enzyme considéré comme une glucokinase a été très étudié<sup>6-10</sup>; il

\* Ce mémoire constitue une partie de la thèse de Doctorat-es-Sciences Physiques qui sera soutenue par G. B. devant la Faculté des Sciences de Lyon.

semble cependant n'avoir été trouvé que dans la fraction surnageante d'un homogénat de foie de rat. PARRY ET WALKER<sup>6</sup> ont obtenu une préparation 870 fois purifiée dont les propriétés ont été comparées à celles des autres phosphotransférases.

A partir de travaux poursuivis dans ce laboratoire<sup>11</sup> on pouvait conclure qu'il existait également une glucokinase liée à des particules cellulaires du foie de rat. Dans cet article, la localisation subcellulaire de l'activité glucokinase est précisée, une méthode d'extraction et de purification est décrite et les principales propriétés des enzymes isolés sont établies et discutées.

## MATÉRIELS ET MÉTHODES

### *Matériels*

Les foies sont prélevés sur des rats Wistar pesant 250–300 g, nourris à volonté.

L'ATP (sel disodique), le NADH, le NADP<sup>+</sup>, l'ADP, le phosphoénolpyruvate, le glucose 6-phosphate, la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40), la glucose-6-phosphate déshydrogénase (EC 1.1.1.49), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (EC 1.1.1.44) et la lactate déshydrogénase (EC 1.1.1.27) du coeur de porc sont des produits Boehringer et Soehne (Mannheim). La trypsine (EC 3.4.4.4) et la pepsine (EC 3.4.4.1) proviennent de Worthington, le *p*-nitrophenyl phosphate, le cytochrome *c* et la serumalbumine bovine de Sigma. Tous les autres produits chimiques sont de qualité analytique.

### *Méthodes*

#### *Dosages enzymatiques*

L'activité hexokinase est dosée à l'aide du spectrophotomètre Beckman DB équipé de l'enregistreur 10 pouces thermostaté à 30° (température prise dans les cuves). Deux méthodes sont employées. Dans la première, on suit la formation de glucose 6-phosphate<sup>3</sup> en présence d'un excès de glucose-6-phosphate déshydrogénase, de 6-phosphogluconate déshydrogénase<sup>12</sup> et de NADP<sup>+</sup>, il apparaît du NADPH qui présente une bande d'absorption à 340 nm. Le mélange réactionnel, d'un volume total de 3 ml, dans une cuve de quartz de 1 cm d'épaisseur, contient: Tris-HCl (pH 8.1 ou 8.4) 80 mM, NADP<sup>+</sup> 0.55 mM, ATP 3.7 mM, MgCl<sub>2</sub> 7.4 mM, glucose-6-phosphate déshydrogénase (0.05 unité), 6-phosphogluconate déshydrogénase (0.05 unité), EDTA 0.01 mM et 2-mercaptoéthanol 0.01 mM. Lorsqu'on effectue ce dosage sur des fractions particulées, on ajoute à ce milieu 1% de Triton X-100. La préparation enzymatique est ajoutée sous un volume de 5–100 µl suivant son degré de purification. La réaction est initiée par addition du glucose: pour le dosage des hexokinases (ATP:D-hexose 6-phosphotransférase, EC 2.7.1.1) à faible  $K_m$  100 µl d'une solution 15 mM; pour le dosage de la glucokinase (ATP:D-glucose 6-phosphotransférase, EC 2.7.1.2) 200 µl d'une solution 1.5 M. Si l'on veut doser les deux activités, ces additions sont effectuées dans la même cuve<sup>13</sup>, la seconde 5 min après la première. Après initiation de la réaction et agitation du milieu réactionnel, la cinétique enzymatique est enregistrée durant 5 min, la partie linéaire de la courbe étant prise comme vitesse initiale.

La deuxième méthode de dosage de l'activité hexokinase est fondée sur la mesure de l'ADP formé<sup>14</sup>; en présence d'un excès de phosphoénolpyruvate, de pyruvate kinase, de lactate déshydrogénase et de NADH, il apparaît du NAD<sup>+</sup>; on suit la disparition correspondante du NADH à 340 nm. Le mélange réactionnel, d'un volume total de 3 ml, contient dans la cuve du spectrophotomètre: tampon Tris-HCl (pH 8.1

ou 8.4) 80 mM, ATP 3.7 mM, NADH 0.15 mM,  $MgCl_2$  3.7 mM, phosphoénolpyruvate 3 mM, pyruvate kinase (0.6 unité), lactate deshydrogénase (5 unités), EDTA 0.01 mM et 2-mercaptoethanol 0.01 mM. On vérifie l'évolution de l'absorption puis on ajoute la préparation enzymatique sous un volume variant de 5–100  $\mu$ l suivant le degré de purification.

La réaction est initiée par addition du substrat. Le dosage permet de vérifier la spécificité de la glucokinase grâce à l'utilisation de divers glucides comme accepteurs de phosphate. Suivant le cas 200  $\mu$ l d'une des solutions suivantes sont ajoutés: D-mannose 1.8 M, D-glucosamine 1.25 M, N-acétyl-D-glucosamine 0.6 M, D-galactose 0.45 M, D-xylose 1.8 M et 2-désoxy-D-glucose 1.8 M. Pour le fructose 1 ml d'une solution 3.6 M est ajouté. Comme précédemment, l'évolution de l'absorption à 340 nm est enregistrée durant 5 min.

Une unité d'hexokinase est définie comme étant la quantité d'enzyme qui catalyse la formation d'1  $\mu$ mole de glucose 6-phosphate par min ou d'1  $\mu$ mole d'ADP par min<sup>3-6</sup>.

On détermine par les dosages spectrophotométriques classiques l'activité de la cytochrome oxydase<sup>15</sup>, de la phosphatase acide<sup>16</sup>, de la glucose-6-phosphatase<sup>17</sup>, de la glucose-6-phosphate déshydrogénase<sup>18</sup>, de la trypsine<sup>19</sup> et de la pepsine<sup>20</sup>.

#### *Dosage des protéines*

Les protéines sont déterminées par la méthode du biuret<sup>21</sup> dans les fractions brutes, et par le dosage dans l'ultra-violet selon WARBURG ET CHRISTIAN<sup>22</sup> dans les préparations purifiées ou dans les fractions éluées des colonnes.

#### *Electrophorèses*

Les immunoélectrophorèses sont effectuées selon la microméthode de SCHEIDEGGER<sup>23</sup> avec un immunosérum de lapin obtenu par la technique suivante: 0.22 ml de préparation brute additionnée de 0.18 ml d'adjuvant complet de Freund sont injectés par voie sous-cutanée dans le flanc du lapin, 1 fois par semaine durant 3 semaines.

#### *Estimation du poids moléculaire*

Le poids moléculaire apparent des enzymes purifiés est estimé soit par ultracentrifugation en gradient de saccharose, soit par filtration sur gel de polyacrylamide.

L'ultracentrifugation est effectuée selon la technique de MARTIN ET AMES<sup>24</sup>. La glucose-6-phosphate déshydrogénase, poids moléculaire 110 000, et l'hémoglobine, poids moléculaire 68 000, sont utilisés comme étalons.

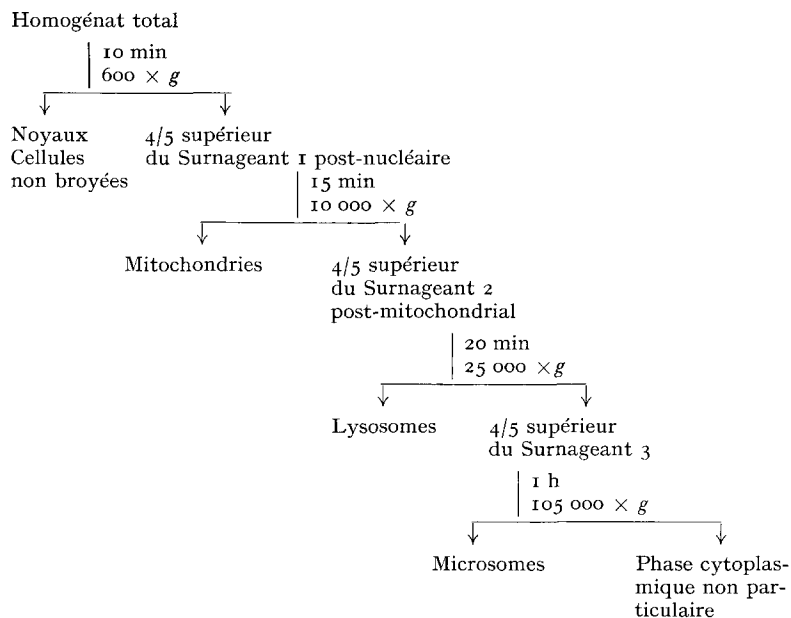
La filtration sur gel d'acrylamide est réalisée dans une colonne (2 cm  $\times$  30 cm) d'un mélange volume à volume de Biogel P 100 et de Biogel P 300 (Bio Rad Laboratories) dans le tampon utilisé au cours de la purification. La courbe d'étalonnage de la colonne, donnant la variation du volume d'élution en fonction du logarithme du poids moléculaire est obtenu par filtration d' $\alpha_1$ -macroglobuline de lapin, de glucose-6-phosphate déshydrogénase, de sérumalbumine bovine, de pepsine, de trypsine et de cytochrome *c* dont les poids moléculaires sont respectivement: 850 000<sup>25</sup>, 110 000, 65 000, 35 000, 23 800, 12 500<sup>26</sup>.

#### *Fractionnement cellulaire*

20 rats sont utilisés pour chaque préparation. Ils sont tués par décapitation, le foie est aussitôt prélevé, plongé dans une solution glacée de saccharose 0.25 M ajustée à pH 8.0, 0.001 M en EDTA. Toutes les opérations suivantes sont effectuées à 0–4°. Il est alors coupé en tranches et soumis à des lavages successifs dans cette solution.

L'homogénat (25 %, p/v) est préparé dans un broyeur type Potter-Elvehjem équipé d'un piston en Teflon. Le milieu de broyage est constitué par un tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 8.0) contenant du mercaptoéthanol 4 mM, de l'EDTA 4 mM et du saccharose 0.25 M.

L'homogénat ainsi obtenu est fractionné: (1) Soit par la méthode de APPELMANS *et al.*<sup>15</sup>, selon le schéma ci-dessous:



Chaque fraction obtenue est lavée 2 fois par le tampon de broyage et vérifiée par microscopie électronique.

(2) Soit par ultra-centrifugation en gradient discontinu de saccharose: 0.5 ml du Surnageant 1 post-nucléaire obtenu comme précédemment sont déposés sur un gradient discontinu constitué de 10 couches de 0.5 ml de solution de saccharose dont les concentrations vont de 27–67%. Après 3 h de centrifugation à 38 000 tours/min dans le Rotor SW-39 (Spinco Modèle L), 30 fractions sont récupérées par ponction du fond du tube.

Le Surnageant 3 du fractionnement selon APPELMANS *et al.*<sup>15</sup> est également soumis à une ultracentrifugation en gradient de saccharose<sup>27</sup> 2 ml sont déposés sur un gradient continu de 10–30% de saccharose dans un tampon Tris-HCl (pH 8.0) 5 mM avec, au fond du tube une butée de 2 ml de saccharose à 60%. Après 16 h de centrifugation à 18 000 tours/min dans le Rotor SW 25-1, 30 fractions sont récupérées comme précédemment.

#### *Solubilisation de la glucokinase microsomique*

Les essais effectués avec divers détergents ont confirmé que le Triton X-100, détergent neutre, était plus efficace que les autres détergents utilisés. En particulier, les détergents cationiques, comme le désoxycholate de sodium, tendent à inhiber l'activité enzymatique.

Les microsomes préparés comme ci-dessus, sont repris dans 3 fois leur volume de la solution de broyage contenant 1% de Triton X-100. Après 2 h de centrifugation à  $105\,000 \times g$ , on sépare ainsi les ribosomes et les membranes endoplasmiques qui restent en solution dans le surnageant.

*Purification de la glucokinase microsomique*

A partir de cet extrait, une préparation de glucokinase purifiée est obtenue en utilisant une méthode voisine de celle de PARRY ET WALKER<sup>6</sup>: le tampon "Tris" 0.02 M (pH 8) contient EDTA 4 mM, mercaptoéthanol 4 mM,  $MgSO_4$  4 mM et glucose 5 mM.

La première étape, fractionnement par le  $(NH_4)_2SO_4$ , permet d'éliminer le Triton X-100 dans le précipité obtenu à une concentration 1.8 M, en  $(NH_4)_2SO_4$ . Le surnageant obtenu est amené à une concentration 4 M (au lieu de 2.6 M) en  $(NH_4)_2SO_4$ .

La deuxième étape de PARRY ET WALKER<sup>6</sup>, chromatographie en cuve sur DEAE-Sephadex, est supprimée.

Dans l'étape suivante, chromatographie en colonne de DEAE-Sephadex, l'enzyme est fixé sur l'échangeur équilibré contre le tampon "Tris", 0.1 M en KCl et élué par le même tampon, 0.3 M en KCl.

La chromatographie sur DEAE-cellulose (DE 32, Whatman) est effectuée avec un gradient linéaire d'éluion, allant de 0.15–0.6 M en KCl dans le tampon "Tris". Les fractions (2 ml) actives sont rassemblées et concentrées par filtration sous vide à travers une ultra-gaine Schleicher et Schull.

La même méthode de concentration est utilisée à la fin de la dernière étape, la filtration sur Bio-gel.

Les fractions actives ainsi concentrées sont conservées à 0–4° en solution saturée en  $(NH_4)_2SO_4$ .

## RÉSULTATS

*Localisation subcellulaire de l'activité glucokinase*

La désignation des fractions est arbitraire. La composition réelle des fractions particulières est indiquée par la présence d'enzymes marqueurs qui sont connus pour se trouver dans une fraction déterminée.

La Fig. 1 donne le schéma de la répartition des activités enzymatiques dans les différentes fractions subcellulaires lavées 2 fois, obtenues par la méthode de fractionnement de APPELMANS *et al.*<sup>15</sup>. Les dosages de la cytochrome oxydase, de la phosphatase acide, de la glucose-6-phosphatase, de la glucose-6-phosphate déshydrogénase permettent de vérifier l'identité de chaque fraction puisque les activités maximales de chacun de ces enzymes se retrouvent respectivement dans les mitochondries, les lysosomes, les microsomes et le surnageant. L'activité hexokinase est intégralement dans le surnageant alors que l'activité glucokinase se répartit à peu près également entre le surnageant et les microsomes, les lysosomes en contiennent très peu. Afin d'éliminer l'éventualité d'une contamination des lysosomes et des microsomes, le surnageant post-nucléaire est analysé par ultracentrifugation en gradient de saccharose. La Fig. 2 donne la répartition des activités enzymatiques dans les différentes fractions du gradient. Les activités hexokinase et glucokinase se retrouvent exclusivement dans les fractions où se localisent également la glucose-6-phosphatase, enzyme caractéristique du réticulum endoplasmique et la glucose-6-

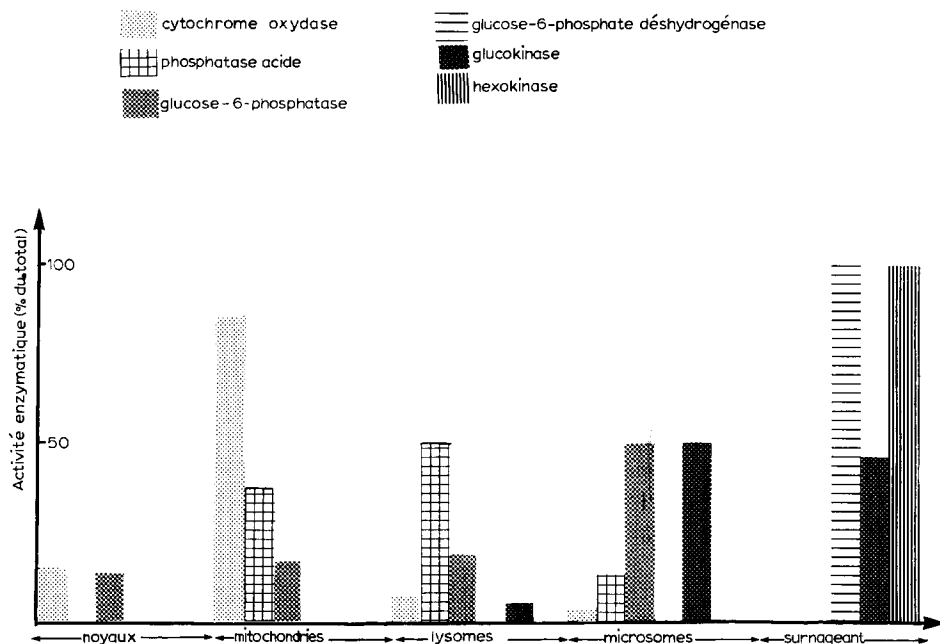


Fig. 1. Répartition des activités enzymatiques de la cytochrome oxydase, la phosphatase acide, la glucose-6-phosphatase, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, l'hexokinase et la glucokinase dans les fractions subcellulaires du foie de rat.

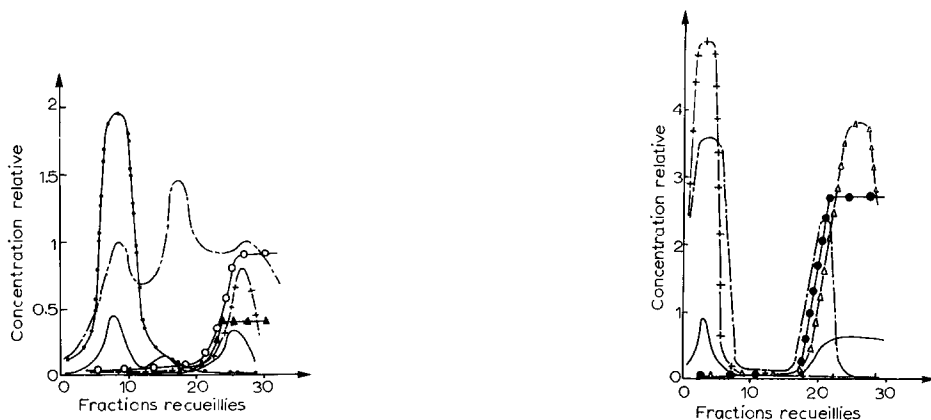


Fig. 2. Répartition des protéines et des diverses activités enzymatiques dans un gradient discontinu de saccharose (27-67%) après 3 h de centrifugation à  $130\,000 \times g$  (Rotor SW-39, centrifugeuse Spinco). En ordonnée, les activités enzymatiques exprimées en concentrations relatives selon BEAUFAY *et al.*<sup>42</sup>: —,  $A_{280\text{ nm}}$ ; ●—●, cytochrome oxydase; — — —, phosphatase acide; +—+, glucose-6-phosphatase et glucokinase; ○—○, glucose-6-phosphate déshydrogénase; △—△, hexokinase. En abscisses, les numéros d'ordre des fractions recueillies à partir du fond du tube.

Fig. 3. Répartition des protéines et des activités enzymatiques dans un gradient linéaire de saccharose (10-30%) après 16 h de centrifugation à  $35\,000 \times g$  (Rotor SW 25-1 Centrifugeuse Spinco). Les abscisses et les ordonnées sont identiques à celles de la figure précédente. —,  $A_{280\text{ nm}}$ ; +—+, glucose-6-phosphatase; ●—●, glucose-6-phosphate déshydrogénase; — — —, glucokinase; △—△, hexokinase.

phosphate déshydrogénase connue pour être un enzyme dissout dans le cytoplasme.

Il faut noter qu'au niveau de l'activité maximale de la phosphatase acide, aucune activité glucokinase ne se retrouve, ce qui exclut la possibilité d'une glucokinase liée aux lysosomes.

L'ultracentrifugation en gradient continu de saccharose (10–30%) permet de séparer sans ambiguïté les microsomes et la phase cytoplasmique non particulaire à partir du Surnageant 3, du fractionnement selon APPELMANS *et al.*<sup>15</sup>. La répartition des activités enzymatiques dans les fractions du gradient (Fig. 3) montre que l'hexokinase se localise avec la glucose-6-phosphate déshydrogénase, dans les fractions légères du gradient. Quant à l'activité glucokinase, les deux tiers environ coïncident avec l'activité de la glucose-6-phosphatase dans les fractions lourdes, c'est-à-dire, les microsomes, le reste se situe sensiblement au même niveau que la glucose-6-phosphate déshydrogénase. Précisons que les deux pics d'activité enzymatique sont séparés par une dizaine de fractions totalement dépourvues d'activité.

TABLEAU I

PURIFICATION DE LA GLUCOKINASE PARTICULÉE DE FOIE DE RAT

<i>Etapes de la purification</i>	<i>Protéine (mg)</i>	<i>Activité (U.I.)</i>	<i>Activité spécifique (U.I./mg protéine)</i>	<i>Facteur de purification (fois)</i>	<i>Rendement (%)</i>
Microsomes	1500	2.3	$1.5 \cdot 10^{-3}$	1	100
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	500	0.8	$1.6 \cdot 10^{-3}$	1.05	35
DEAE-Sephadex	19	0.34	$1.8 \cdot 10^{-2}$	12	15
DEAE-cellulose	0.48	0.25	0.52	350	10.8
Pic I (G1)	0.13	0.15	1.15	760	6.5
Bio-gel Pic II (G2)	0.35	0.13	0.37	250	5.7

#### *Purification de l'activité glucokinase liée aux microsomes*

La purification et le rendement obtenu par la méthode décrite sont donnés dans le Tableau I. La précipitation par le (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 M permet d'éliminer le Triton X-100, la glucose-6-phosphatase et les traces d'hexokinase qui peuvent contaminer cette fraction. La Fig. 4 donne le schéma d'élution de la chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex. L'étape la plus fructueuse est la chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, avec gradient d'élution, qui donne une purification d'environ 30 fois par rapport à l'étape précédente et un rendement de l'ordre de 70%. La Fig. 5 donne le diagramme d'élution de cette chromatographie: on peut constater que l'activité glucokinase semble se résoudre en deux pics. Toutefois, la séparation de ces deux pics n'est pas assez nette pour justifier une récupération distincte de chaque pic. C'est donc le mélange de toutes les fractions actives qui est chromatographié sur Bio-gel.

La chromatographie sur Bio-gel (Fig. 6) met en évidence deux pics d'activité que l'on peut donc récupérer séparément, le premier pic sera appelé G1 et le second G2. Ces deux fractions peuvent être conservées plusieurs mois dans le (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> saturé à +4°, sans perte d'activité sensible.

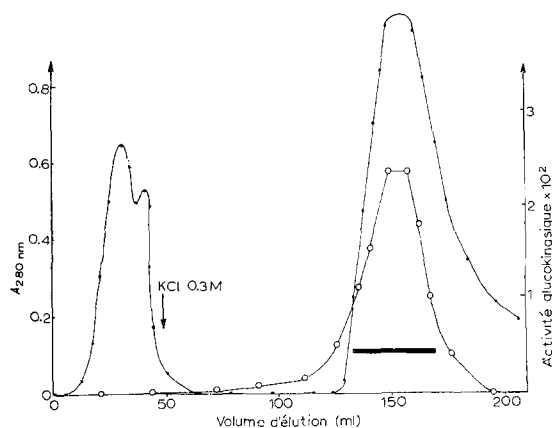


Fig. 4. Chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex de la glucokinase particulée de foie de rat. L'expérience est effectuée selon la description donnée dans le texte. ●—●,  $A_{280 \text{ nm}}$ ; ○—○, activité glucokinase particulée totale (unités/fraction) dosée par la Méthode 1. La barre horizontale représente les fractions actives réunies.

#### Poids moléculaire des fractions enzymatiques G1 et G2

La courbe d'étalonnage de la colonne de Bio-gel, tracée sur la Fig. 6 donne, comme poids moléculaire apparent 120 000 pour G1 et 50 000 pour G2.

Le diagramme d'ultracentrifugation en gradient de saccharose (Fig. 7) des fractions actives provenant de la chromatographie sur DEAE-cellulose confirme ces chiffres. En effet le premier pic d'activité glucokinase (G1) migre légèrement en avant du pic de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (poids moléculaire: 110 000)

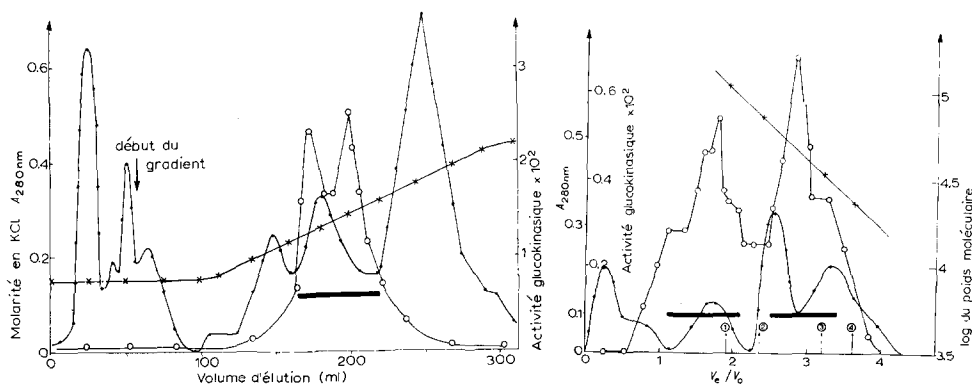


Fig. 5. Chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose de la glucokinase particulée de foie de rat. L'expérience est effectuée selon la description donnée dans le texte. ●—●,  $A_{280 \text{ nm}}$ ; ○—○, activité glucokinase particulée totale (unités/fraction) dosée par la méthode 1; ×—×, molarité en KCl dans l'effluent. La barre horizontale représente les fractions actives réunies.

Fig. 6. Chromatographie sur colonne de Bio-gel de la glucokinase particulée de foie de rat. L'expérience est effectuée selon la description donnée dans le texte. ●—●,  $A_{280 \text{ nm}}$ ; ○—○, activité glucokinase particulée totale (unités/fraction) dosée par la Méthode 1; ×—×, courbe d'étalonnage de la colonne (logarithme du poids moléculaire en fonction du rapport entre le volume d'éluion  $V_e$  et le volume d'exclusion  $V_0$ ). Les barres horizontales représentent les fractions actives réunies. Les flèches verticales représentent respectivement: 1, la glucose-6-phosphate déshydrogénase; 2, la serum albumine; 3, la pepsine; 4, la trypsine.



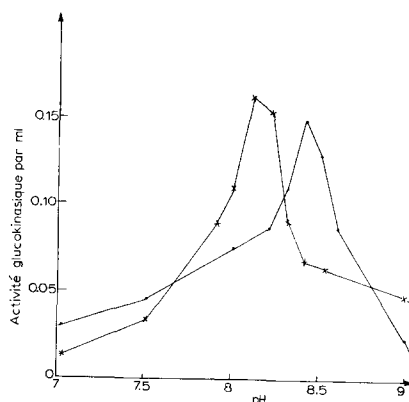
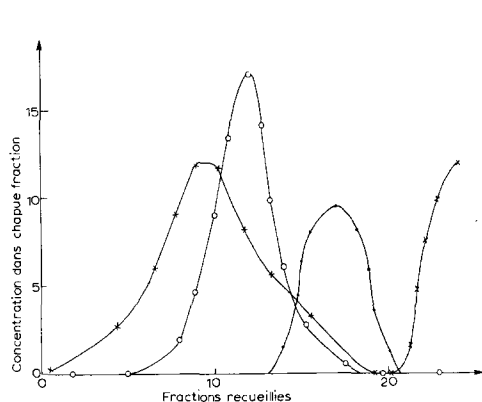


Fig. 7. Ultracentrifugation en gradient de saccharose (5–20%), tampon "Tris" (voir texte); 14 h de centrifugation à 38 000 tours/min dans le Rotor SW-39 (ultracentrifugeuse Spinco). En abscisses, les numéros d'ordre des fractions recueillies par ponction du fond du tube. En ordonnée:  $\times - \times$ , activité glucokinase particulée totale (unités/fraction) dosée par la Méthode 1;  $\circ - \circ$ , activité de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (unités/fraction);  $\bullet - \bullet$ ,  $A_{415 \text{ nm}}$  (hémoglobine).

Fig. 8. Variation de l'activité glucokinase particulée du foie de rat en fonction du pH. Tampon "Tris" (voir texte) jusqu'à pH 8.5. Au delà de pH 8.5, tampon véronal sodique 0.25 M.  $\times - \times$ , activité glucokinase particulée totale de G1 (unités/ml);  $\bullet - \bullet$ , activité glucokinase particulée totale de G2 (unités/ml). Le dosage est effectué par la Méthode 1.

qui précède lui-même le pic d'hémoglobine (poids moléculaire: 68 000). Un deuxième pic d'activité glucokinase (G2) apparaît dans les dernières fractions du gradient: il correspond à un poids moléculaire nettement inférieur à celui de l'hémoglobine.

#### Effet du pH sur l'activité de G1 et G2

Le pH optimum de G1, 8.1 diffère légèrement de celui de G2, 8.4 (Fig. 8). Dans les deux cas la diminution d'activité est très accentuée, de part et d'autre du pH optimum.

Il faut remarquer que, dans la zone de pH considérée, 7.9–8.6, les activités de la glucose-6-phosphate déshydrogénase et de la 6-phosphogluconate déshydrogénase, utilisées au cours du dosage par la Méthode 1, varient peu<sup>18,28</sup>. D'ailleurs, ces deux

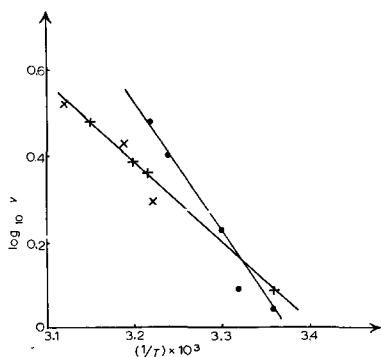


Fig. 9. Influence de la température sur l'activité glucokinase particulée du foie de rat. Les dosages d'activité sont effectués aux températures indiquées par la Méthode 1.  $\times - \times$ , activité glucokinase de G1;  $\bullet - \bullet$ , activité glucokinase de G2.

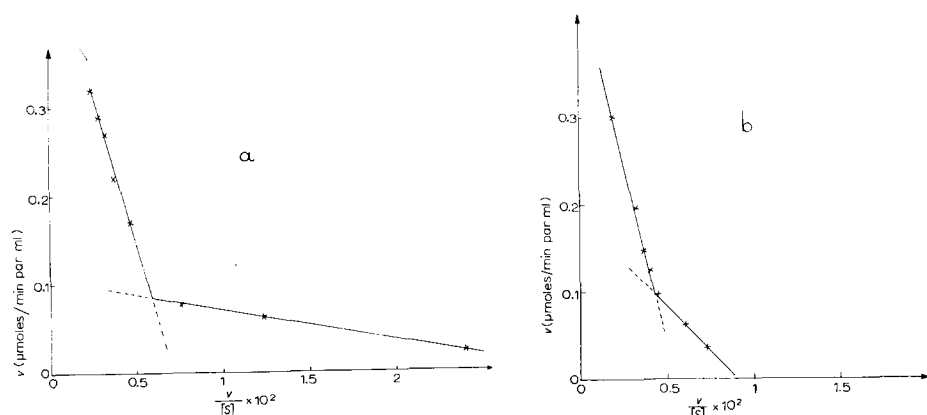


Fig. 10. Variation de l'activité glucokinase particulée du foie de rat en fonction de la concentration en glucose. Représentation d'Eadie,  $v = f(v/[S])$ . Les dosages sont effectués selon la Méthode 1, au pH optimum de chaque fraction, à  $30^\circ$ . Les concentrations en substrat varient de 0.5 à 120 mM. (a) G1. (b) G2.

enzymes se trouvent en très large excès dans les solutions utilisées au cours du dosage. Par conséquent, les effets mesurés ne sont pas dus à l'influence du pH sur les systèmes enzymatiques auxiliaires.

#### *Effet de la température (Fig. 9)*

La représentation d'Arrhenius, pour l'activité glucokinase mesurée par la Méthode 1, donne des droites de pente différente, dans un domaine de température compris entre  $24$  et  $47^\circ$  pour G1 et entre  $28$  et  $37^\circ$  pour G2.

#### *Accepteurs de phosphate: Spécificité et effets de la concentration*

Les Figs. 10 et 11 illustrent les résultats obtenus, dans la représentation d'Eadie, pour la détermination des  $K_m$  par la Méthode 1 avec le glucose et par la Méthode 2 avec la glucosamine. Les concentrations en substrats utilisées pour ces déterminations

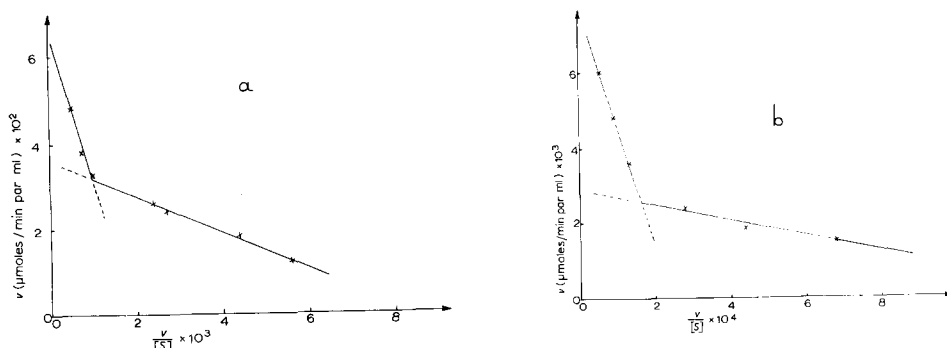


Fig. 11. Variation de l'activité glucokinase particulée du foie de rat en fonction de la concentration en glucosamine. Représentation d'Eadie  $v = f(v/[S])$ . Les dosages sont effectués selon la Méthode 2 au pH optimum de chaque fraction, à  $30^\circ$ . Les concentrations en substrat varient de 2 à 100 mM. (a) G1. (b) G2.

varient entre 0.5 et 120 mM pour le glucose et entre 2 et 100 mM pour la glucosamine. Il apparait nettement que, pour ces deux glucides, G1 et G2 présentent chacune deux valeurs de  $K_m$ .

D'autre part l'activité phosphorylante de G1 et G2 a été essayée vis à vis d'un certain nombre de sucres. Les valeurs des différents  $K_m$  et  $v_{\max}$  relatives obtenues sont rapportées dans le Tableau II. Les valeurs de ces  $K_m$  ne dépendent pas de la concentration en ATP.

TABLEAU II

SPÉCIFICITÉ VIS À VIS DES ACCEPTEURS DE PHOSPHORE DE LA GLUCOKINASE PARTICULÉE DU FOIE DE RAT

Les chiffres (1 et 2) entre parenthèses après chaque résultat indiquent la méthode de dosage employée, décrite dans le chapitre MATÉRIEL ET MÉTHODES. NP: non phosphorylé.

Substrat	G1		G2	
	$K_m$ (mM)	Vitesse maximum relative	$K_m$ (mM)	Vitesse maximum relative
D-Glucose	4 (1) 86 (1)	1 5.3	20 (1) 85 (1)	1 3.3
D-Glucosamine	4.4 (2) 16.6 (2)	0.33 0.59	2.2 (2) 16.6 (2)	0.27 0.7
D-Fructose	$1.3 \cdot 10^3$ (2)	0.7	$1.15 \cdot 10^3$ (2)	0.36
N-Acétyl-D-glucosamine	NP		NP	
D-Mannose	NP		NP	
2-Désoxy-D-glucose	NP		NP	
D-Galactose	NP		NP	
D-Xylose	NP		NP	

Les glucokinases G1 et G2 catalysent également le fructose. Sa vitesse de phosphorylation a été étudiée entre 100 et 1200 mM. Une seule valeur de  $K_m$  très élevée a été obtenue pour G1 et G2; toutefois cette valeur est certainement trop élevée car la forme fructofuranose, seule forme phosphorylée, représente seulement 20% de la concentration totale en fructose<sup>29</sup>.

Les autres sucres essayés ne sont pas phosphorylés par les glucokinases particulières.

#### Donneurs de phosphate

Le véritable donneur de phosphate, dans les réactions mettant en jeu des phosphokinases, est un complexe  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ ; la plupart des hexokinases présentent une activité maximale lorsque le rapport  $\text{ATP/Mg}^{2+}$  est voisin de l'unité; cette activité décroît lorsque le rapport est supérieur à 1 et reste constante pour des rapports inférieurs à 1. Dans le cas des glucokinases G1 et G2 l'activité maximale est obtenue pour des rapports compris entre 0.2 et 0.5 et décroît pour des rapports inférieurs ou supérieurs à ces valeurs (Fig. 12). Il est donc nécessaire de maintenir le rapport  $\text{ATP/Mg}^{2+}$  entre ces valeurs pour déterminer l'influence de la concentration en ATP sur la vitesse de catalyse. Comme dans le cas du glucose ou de la glucosamine, deux valeurs de  $K_m$  sont obtenues pour l'ATP avec G1 ou G2 (Fig. 13). Ces valeurs sont respectivement 0.61 mM et 0.112 mM pour G1 et 0.51 mM et 0.125 mM pour G2.

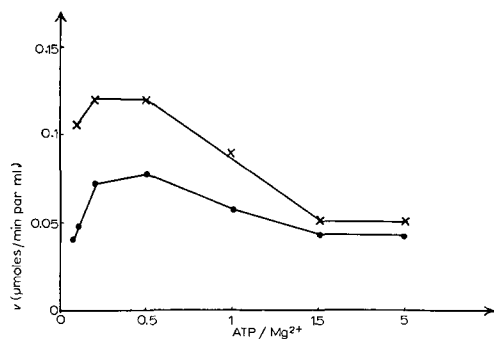


Fig. 12. Influence de la variation du rapport ATP/Mg<sup>2+</sup> sur l'activité glucokinase particulée du foie de rat. Le dosage est effectué par la Méthode 1 avec une concentration en ATP de 3.7 mM. ×—×, activité glucokinase de G1; ●—●, activité glucokinase de G2.

## DISCUSSION

S'il est probable que les hexokinases à faible  $K_m$  ont une répartition universelle<sup>30</sup> il semble bien que la glucokinase, caractérisée à la fois par son  $K_m$  élevé et par sa spécificité plus étroite, ne se trouve que dans le foie des vertébrés<sup>9,31</sup>. Quant aux formes particulées des hexokinases, mises en évidence dans le cerveau<sup>32,33</sup>, le muscle cardiaque<sup>32</sup>, la muqueuse intestinale<sup>34</sup>, les tumeurs ascitiques<sup>35</sup>, la rétine<sup>36</sup> et le muscle des pattes postérieures de la grenouille<sup>37</sup>, elles sont liées soit aux mitochondries, soit aux vésicules sarcoplasmiques et possèdent, au moins pour celles qui ont été caractérisées, un faible  $K_m$ .

Or, ce travail montre, qu'il existe, dans le foie de rat, une activité glucokinase particulée, à côté de la glucokinase soluble dans le suc cellulaire. Les diverses méthodes de fractionnement cellulaire, en particulier l'ultra-centrifugation en gradient de saccharose, précisent que cette activité glucokinase est liée aux microsomes caractérisés par ailleurs par leur forte teneur en glucose-6-phosphatase, et par examen au microscope électronique<sup>38</sup>.

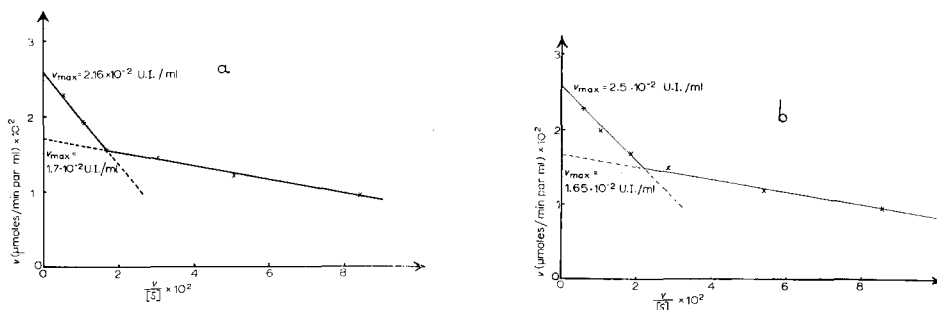


Fig. 13. Variation de l'activité glucokinase particulée de foie de rat en fonction de la concentration en ATP. Représentation d'Eadie  $v = f(v/[S])$ . Les dosages sont effectués selon la Méthode 1, au pH optimum de chaque fraction, à 30°. ATP/Mg<sup>2+</sup> = 0.5. Les concentrations en substrat varient de 0.1 à 4.5 mM. (a) G1. (b) G2.

La solubilisation maximale de l'activité glucokinase par le Triton X-100 est conforme aux résultats obtenus sur les diverses hexokinases liées à des structures cellulaires<sup>32,33</sup> et précise que cette activité se situe vraisemblablement au niveau des membranes de l'ergastoplasme.

La méthode de préparation décrite est assez voisine de celle proposée par PARRY ET WALKER<sup>6</sup> pour la glucokinase soluble du foie de rat. Cependant diverses étapes ont été supprimées ou modifiées. Ainsi, le surnageant 1.8 M en  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  est amené à 4 M, au lieu de 2.6 M. La fixation de l'activité glucokinase sur DEAE-Sephadex en cuve est supprimée. Ces modifications permettent de diminuer les pertes d'activité. Quant à la concentration effectuée par filtration sous vide à travers ultragaine, son rendement est proche de 100%.

Contrairement aux résultats publiés par PARRY ET WALKER<sup>6</sup> sur la glucokinase soluble, deux pics d'activité bien différenciés sont obtenus par filtration sur Bio-gel. Les facteurs de purification sont respectivement 760 pour le premier pic G1 et 250 pour le deuxième pic G2. Le rendement total est d'environ 13%. PARRY ET WALKER<sup>6</sup> purifiaient 870 fois la glucokinase soluble avec un rendement de 10%. Toutefois, il faut préciser que l'activité spécifique de cette glucokinase est de 8.7 unités/mg alors qu'elle n'est que de 1.15 pour G1 et 0.37 pour G2.

Comme pour ces auteurs, la faible quantité d'enzymes purifiés limite les tentatives effectuées pour vérifier la pureté. Les diverses méthodes électrophorétiques utilisées n'ont apporté aucun résultat probant car la quantité de protéine mise en jeu est trop faible pour être révélée directement et les essais de révélation spécifique ont échoué. Cependant l'immunoélectrophorèse ne donne plus qu'une ligne de précipitation pour les fractions éluées de la colonne de DEAE-Sephadex, mais il s'est avéré impossible de préciser si cette ligne correspond à un enzyme. Ainsi, les propriétés physiques et chimiques des protéines responsables de l'activité glucokinase de G1 et G2 n'ont pu être comparées.

A ce point de vue, le seul élément positif reste donc la différence de volume d'élution de G1 et G2, après chromatographie sur colonne de Bio-gel. Ces volumes d'élution correspondent à des poids moléculaires apparents voisins de 120 000 pour G1 et de 50 000 pour G2, valeurs confirmées par l'ultracentrifugation en gradient de saccharose. Pour l'hexokinase hépatique Type IV, le poids moléculaire apparent est de 48 000 par filtration sur Sephadex G-100, mais de 68 000 par filtration sur Bio-gel ou par ultracentrifugation en saccharose<sup>10</sup>. Les mêmes méthodes conduisent pour les hexokinases de Type I, II, III à un poids moléculaire légèrement inférieur à 100 000. Donc, si l'on se fonde sur cette caractéristique physique, les fractions glucokinases G1 et G2 se distinguent entre elles et ne correspondent à aucune hexokinase hépatique caractérisée antérieurement.

L'étude des propriétés catalytiques de G1 et G2 confirme leur originalité. Ainsi, l'action du pH sur l'activité conduit à des courbes caractérisées, pour chaque fraction, par un optimum différent mais surtout très aigu contrairement à la glucokinase soluble pour laquelle l'activité varie peu entre pH 7 et pH 8.5<sup>6</sup>.

L'effet de la température est également différent sur G1 et G2. L'étude de l'inactivation thermique montre d'ailleurs que G2 est plus sensible que G1 à la température.

L'étude de l'affinité de G1 et G2 pour les divers substrats accepteurs ou donneurs de phosphate apporte un élément nouveau dans la caractérisation de ces enzymes:

chacun présente deux valeurs de  $K_m$  pour le glucose, la glucosamine et l'ATP. La première explication que l'on pourrait donner est que chacune des glucokinases G1 et G2 renferme deux enzymes différents. Toutefois toutes les préparations obtenues au cours de ce travail présentaient ce même phénomène, or la présence de deux enzymes en proportions identiques dans ces différentes préparations est peu probable, ainsi peut-on rejeter cette éventualité. Il semblerait plutôt que l'on soit en présence d'une augmentation de la vitesse de catalyse aux fortes concentrations de substrat, c'est à dire d'une véritable activation par le substrat.

Divers exemples de ce mécanisme ont été donnés, ainsi l'hydratation du fumarate catalysée par la fumarase<sup>39</sup> ou l'hydrolyse d'esters par la trypsine<sup>40</sup>. Dans ce cas, les courbes de vitesse de catalyse en fonction de la concentration en substrat ne correspondent plus à la loi de Henry-Michaelis, mais à l'équation empirique donnée par ALBERTY *et al.*<sup>39</sup> qui permet de mettre en évidence une différence de pente à haute et basse concentration en substrat:

$$v = \frac{(a [S] + b [S]^2) [E_t]}{d [S]^2 + c [S] + 1}$$

Où  $a$ ,  $b$ ,  $c$  et  $d$  sont des constantes à pH et température donnés,  $[S]$  la concentration en substrat et  $[E_t]$  la concentration totale d'enzyme.

Ces divers paramètres ont été étudiés en particulier dans le cas de l'hydrolyse du *p*-toluène-sulfonyl-L-arginyl-méthyl-ester<sup>40</sup> ou du benzoyl-L-arginine-ethyl-ester<sup>41</sup> par la trypsine: la représentation d'Eadie permet alors de définir deux droites, l'une de pente  $K_m$  pour les faibles concentrations, l'autre de pente  $K'_m$  pour les fortes concentrations de substrat.

Les résultats obtenus avec les glucokinases G1 et G2 sont absolument similaires: on peut donc supposer qu'il s'agit là d'un phénomène identique. Quoiqu'il en soit, toutes les valeurs de  $K_m$  obtenues vis à vis du glucose sont élevées et correspondent donc à ce que l'on admet être une activité glucokinase. De plus, la spécificité vis à vis des divers substrats glucidiques est particulièrement étroite puisque seuls le D-glucose et la D-glucosamine sont phosphorylés. Le carbone en C-2 semble présenter une importance majeure dans cette spécificité. En effet la liaison de l'hydroxyle en C-2 est une liaison équatoriale basse dans le D-glucose alors qu'elle devient axiale haute dans le D-mannose qui n'est pas phosphorylé. Le remplacement du groupement -OH par un groupement -NH<sub>2</sub>, occupant la même position, ne semble pas nuire à l'activité catalytique des enzymes. Par contre, l'élimination de cet hydroxyle, comme dans le cas du 2-désoxyglucose, entraîne une perte totale d'activité, ce qui suggère que la richesse en électrons du groupement en C-2 est nécessaire à la fixation de l'accepteur de phosphate dans le site de spécificité. Le fait que la N-acétyl-D-glucosamine ne puisse être phosphorylée est vraisemblablement dû à l'encombrement stérique lié à la présence du groupement acétyl. Quant à l'affinité des glucokinases pour le fructose, elle est vraiment très faible, même si l'on considère que la forme fructofuranose, seule phosphorylée ne représente en solution que 20% de la concentration en fructose. Dans des conditions physiologiques le glucose et la glucosamine sont vraisemblablement les seuls substrats à être phosphorylés par les glucokinases particulées.

En conclusion, il existe donc, dans le foie de rat, une activité glucokinase fortement liée aux microsomes et plus particulièrement aux membranes de l'ergastoplasme puisqu'un traitement par le Triton X-100 est nécessaire pour solubiliser cette

activité. Les hexokinases particulées décrites dans la littérature sont liées aux mitochondries sauf celle du muscle de grenouille qui peut présenter un cas particulier. Dans le cas présent l'éventualité d'une contamination des microsomes par les mitochondries semble pouvoir être écartée. Les préparations purifiées de glucokinases particulées possèdent des caractéristiques qui les distinguent de la glucokinase soluble: leur comportement sur Bio-gel, ou en ultracentrifugation en gradient de saccharose et leurs propriétés catalytiques. Il faut retenir essentiellement le phénomène d'activation par le substrat et le fait qu'elles phosphorylent la glucosamine et non le mannose et le 2-désoxy-D-glucose, en opposition avec la glucokinase soluble. Il est peu probable que l'on puisse attribuer ces différences entre les propriétés catalytiques au traitement assez drastique nécessaire à leur solubilisation.

Les implications physiologiques de leur localisation membranaire ne sont pas évidentes; cependant, il n'est pas choquant de trouver une activité glucokinase dans les membranes puisque la glycolyse est une voie métabolique extra-mitochondriale. L'affinité relativement forte pour la glucosamine suggère encore que ces glucokinases auraient un rôle à jouer dans l'élaboration des membranes. Enfin, leurs rapports avec les hexokinases solubles ne pourront être clairement définis que lorsque les propriétés physico-chimiques de ces diverses protéines enzymatiques auront été établies.

#### RÉSUMÉ

Des glucokinases particulées (ATP: D-glucose 6-phosphotransférase, EC 2.7.1.2) du foie de rat ont été localisées dans la fraction microsomique, par des méthodes d'ultra-centrifugation et de gradient de densité en saccharose. L'activité est solubilisée presque complètement par l'action du Triton X-100 à 0.1% (p/v). Une méthode de purification comprenant un fractionnement par le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  et des chromatographies sur DEAE-Sephadex et DEAE-cellulose, est décrite. Deux fractions actives, G1 et G2, sont isolées par filtration sur Bio-gel, avec un facteur de purification de 760 pour G1 et de 250 pour G2. Les poids moléculaires apparents déterminés par filtration sur gel et par gradient de saccharose sont respectivement de 120 000 pour G1 et de 50 000 pour G2. L'activité spécifique de G1 est de 1.15  $\mu\text{moles/min}$  par mg de protéines, et celle de G2, de 0.37. L'influence de la température et du pH est différente pour G1 et G2. Ces deux enzymes catalysent la phosphorylation du glucose, de la glucosamine, et, avec une affinité beaucoup plus faible, du fructose. Chaque glucokinase purifiée présente deux valeurs apparentes de  $K_m$  pour le glucose, la glucosamine, et l'ATP. Ces résultats suggèrent une activation de l'activité catalytique de G1 et G2 par les fortes concentrations en substrats.

Les autres sucres essayés, le 2-désoxy-D-glucose, la N-acétyl-D-glucosamine, le D-mannose, le D-galactose et le D-xylose, ne sont pas phosphorylés.

Les propriétés des glucokinases particulées sont comparées brièvement à celles des autres phosphotransférases.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. GONZALES, T. URETA, R. SANCHEZ ET U. NIEMEYER, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16 (1964) 347.
- 2 H. M. KATZEN ET R. T. SCHIMKE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1218.

- 3 L. GROSSBARD ET R. T. SCHIMKE, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3546.
- 4 R. T. SCHIMKE ET L. GROSSBARD, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151 (1968) 332.
- 5 H. M. KATZEN, D. D. SODERMAN ET V. J. ARILLO, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151 (1968) 351.
- 6 M. J. PARRY ET D. G. WALKER, *Biochem. J.*, 99 (1966) 266.
- 7 M. J. PARRY ET D. G. WALKER, *Biochem. J.*, 105 (1967) 473.
- 8 P. McLEAN ET J. BROWN, *Biochem. J.*, 100 (1966) 793.
- 9 S. J. PILKIS, R. J. HANSEN ET M. E. KRAHL, *Comp. Biochem. Physiol.*, 25 (1968) 903.
- 10 S. J. PILKIS, R. J. HANSEN ET M. E. KRAHL, *Biochim. Biophys. Acta*, 154 (1968) 250.
- 11 G. BERTHILLIER ET L. COLOBERT, *Compt. Rend. (D)*, 267 (1968) 794.
- 12 P. McLEAN ET J. BROWN, *Biochem. J.*, 98 (1966) 874.
- 13 D. G. WALKER ET R. SHYAMALA, *Biochem. J.*, 90 (1964) 360.
- 14 A. KORNBORG ET W. E. PRICER, Jr., *J. Biol. Chem.*, 293 (1951) 481.
- 15 F. APPELMANS, R. WATTIAUX ET C. DE DUVE, *Biochem. J.*, 59 (1955) 438.
- 16 W. H. FISHMAN ET F. LERNER, *J. Biol. Chem.*, 200 (1953) 89.
- 17 C. DE DUVE, R. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX ET F. APPELMANS, *Biochem. J.*, 60 (1955) 604.
- 18 G. W. LÖHR ET H. D. WALKER, dans H. U. BERGMAYER, *Methods of Enzymatic Analysis*, Verlag Chemie et Academic Press, New York, 1965, p. 744.
- 19 B. C. W. HUMMEL, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (1959) 1393.
- 20 M. L. ANSON, *J. Gen. Physiol.*, 22 (1938) 79.
- 21 A. G. GORNALL, C. J. BARDAWILL ET M. M. DAVID, *J. Biol. Chem.*, 177 (1949) 751.
- 22 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 310 (1941) 384.
- 23 J. I. SCHEIDEGGER, *Intern. Arch. Appl. Immunol.*, 7 (1955) 103.
- 24 R. G. MARTIN ET B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
- 25 R. GOT, H. MOURAY ET J. MORETTI, *Biochim. Biophys. Acta*, 107 (1965) 278.
- 26 P. ANDREWS, *Biochem. J.*, 96 (1965) 595.
- 27 P. LOUISOT, A. RAY, R. FONTANGES ET L. COLOBERT, *Compt. Rend. (D)*, 264 (1967) 1208.
- 28 R. D. DE MOSS, dans S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New-York et London, 1955, p. 328.
- 29 A. GOTTSCHALK, *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 22 (1964) 291.
- 30 D. G. WALKER, dans P. N. CAMPBELL ET G. D. GREVILLE, *Essays in Biochemistry*, Vol. 2, Academic Press, London et New York, 1966, p. 33.
- 31 J. SALAS, M. SALAS, E. VINUELA ET A. SOLS, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1014.
- 32 R. K. CRANE ET A. SOLS, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 273.
- 33 P. TEICHGRÄBER ET D. BIESOLD, *J. Neurochem.*, 15 (1968) 979.
- 34 P. SHAKESPEARE, L. M. SRIVASTAVA ET G. HÜBSCHER, *Biochem. J.*, 103 (1967) 10 P.
- 35 R. B. McCOMB ET W. D. YUSHOK, *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 515.
- 36 O. H. LOWRY, N. R. ROBERTS, D. W. SCHULZ, J. E. CLOW ET J. R. CLARK, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2813.
- 37 S. KARPATKIN, *J. Biol. Chem.*, 242 (1967) 3525.
- 38 G. BERTHILLIER, P. MORELIS ET L. COLOBERT, *Compt. Rend.*, 268 (1969) 1793.
- 39 R. A. ALBERTY, V. MASSEY, C. FRIEDEN ET A. R. FUHLBRIGGE, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 2485.
- 40 J. J. BECHET ET J. YON, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 117.
- 41 C. GENTOU, J. YON ET S. FILITTI-WURMSER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 50 (1968) 2003.
- 42 H. BEAUFAY, D. S. BENDALL, P. BAUDHUIN, R. WATTIAUX ET C. DE DUVE, *Biochem. J.*, 73 (1959) 628.