

GLUCOKINASE MICROSOMIQUE DU FOIE DE RAT. UN ENZYME RÉGULATEUR DE LA GLYCOLYSE?

G.BERTHILLIER et R.GOT

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine
69, Lyon, France*

Received 13 April 1970

Kinetic properties of microsomal glucokinase of rat liver have been investigated. The enzyme is inhibited by ATP and activated or deinhibited by AMP. It displays properties associated with a typical allosteric enzyme which could realize a feedback control of glycolysis.

1. Introduction

Dans un récent travail [1], nous avions montré qu'il existait une activité hexokinase liée aux microsomes du foie de rat. Après purification, cette activité se répartissait en deux pics par filtration sur colonne de Biogel P 225, avec des poids moléculaires apparents, respectivement de 110 000 et 50 000.

En fait, les enzymes correspondants présentaient un K_m élevé vis à vis du glucose, caractéristique qui différencie les glucokinases des hexokinases. La spécificité étroite de ces enzymes qui ne phosphorylent que le glucose et la glucosamine confirmait, en l'occurrence, cette définition.

Les propriétés catalytiques de ces glucokinases n'étaient pas sans rappeler celles de la phosphofructokinase dont les propriétés allostériques sont connues. Il était donc intéressant d'étudier, sur ces glucokinases, l'action des effecteurs allostériques qui font de la phosphofructokinase l'enzyme régulateur de la glycolyse.

2. Matériel et méthodes

Les foies, prélevés sur des rats Wistar nourris à volonté, sont soumis à un fractionnement cellulaire selon la méthode de Duve [2]. A partir des membranes endoplasmiques solubilisées par le Triton X100, les glucokinases microsomiques sont préparées

selon la méthode précédemment décrite [1], les principales étapes sont, successivement, un fractionnement par le sulfate d'ammonium, une chromatographie sur DEAE-sephadex, une chromatographie sur DEAE-cellulose. Après concentration des fractions actives par filtration sous vide à travers ultra-gaine Schleicher et Schull, une dernière étape de purification sur colonne de Biogel P 225 permet de séparer deux pics d'activité glucokinase que l'on a appelé G1 (poids moléculaire apparent 110 000) et G2 (poids moléculaire apparent 50 000).

L'activité glucokinase est dosée en suivant, dans un spectrophotomètre Beckman DB thermostaté à 30° (température prise dans les cuves), la formation de glucose-6-phosphate [3]. Le milieu réactionnel contient: Tris-HCl (80 mM) pH 8,1 (pour G1) ou 8,4 (pour G2), NADP⁺ (0,55 mM), glucose-6-phosphate déshydrogénase (0,05 unité), 6-phosphogluconate déshydrogénase (0,05 unité), EDTA (0,01 mM), 2-mercptoéthanol (0,01 mM), ATP et MgCl₂ (en concentrations variables selon les expériences). La réaction est initiée par addition de glucose (de 20 à 120 mM); la cinétique enzymatique est enregistrée durant 5 minutes à 340 nm, la partie linéaire de la courbe étant prise comme vitesse initiale.

3. Résultats et discussion

Les courbes donnant la vitesse de phosphorylation

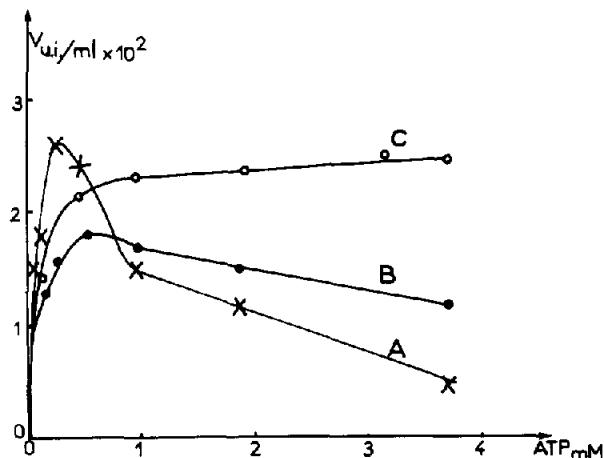


Fig. 1. Variation de la vitesse de phosphorylation du glucose par les glucokinases microsomiques G1 et G2 en fonction de la concentration en ATP. Le milieu d'incubation contient, en plus des réactifs précisés au paragraphe "Matériel et méthode": glucose (30 mM), MgCl₂ (0,5 mM) et ATP comme il est indiqué en abscisse. Courbe A: G1; courbe B, G1 en présence d'AMP (1 mM); courbe C: G2.

du glucose en fonction de la concentration en ATP sont tracées sur la fig. 1. La concentration en glucose est de 30 mM, celle en MgCl₂ est de 0,5 mM. Pour la glucokinase G1, qui a le poids moléculaire le plus élevé, la vitesse passe par un maximum à environ 0,3 mM d'ATP et décroît aux concentrations plus élevées. Aux plus faibles concentrations en ATP, alors que l'enzyme est saturé pour le Mg²⁺ et le glucose, l'addition de 1 mM d'AMP diminue la vitesse de catalyse jusqu'au point d'intersection des courbes A et B, dont l'abscisse correspond à 0,8 mM d'ATP. A ce point, on peut considérer que l'addition d'AMP est sans effet, car son action sur la saturation de l'enzyme est compensée par son action sur la vitesse maximale.

Lorsque la concentration en ATP augmente, l'affinité pour le glucose diminue au point qu'une concentration de 30 mM de ce substrat ne peut saturer davantage l'enzyme; c'est la cause essentielle de l'inhibition observée. Aussi, l'AMP, qui augmente l'affinité de l'enzyme pour le glucose, peut-il accroître la vitesse de réaction à ces concentrations élevées en

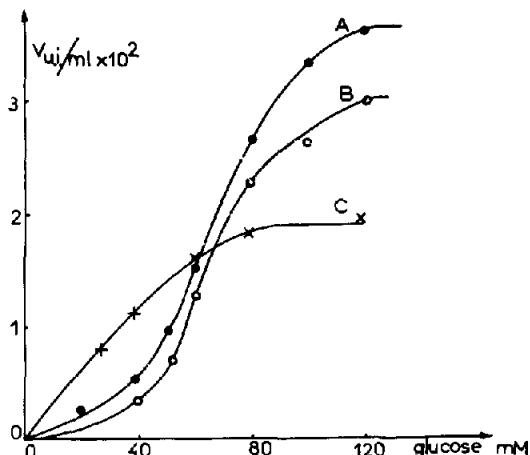
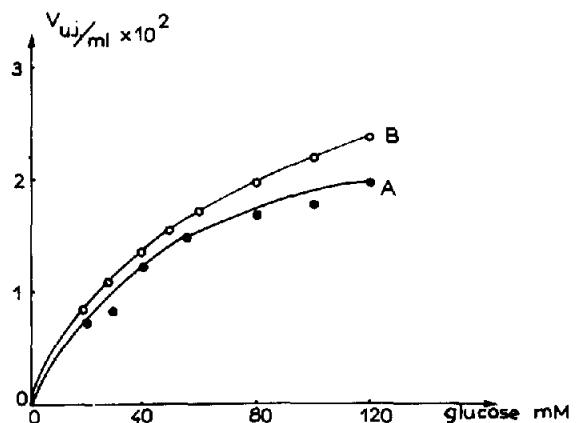


Fig. 2. Variation de la vitesse de phosphorylation du glucose par les glucokinases microsomiques G1 (a) et G2 (b) en fonction de la concentration en glucose. Le milieu d'incubation contient, en plus des réactifs précisés au paragraphe Matériel et méthode: MgCl₂ (1 mM), glucose, comme il est indiqué en abscisse. Courbe A: ATP (0,5 mM); Courbe B: ATP (1,5 mM); Courbe C: ATP (0,5 mM), AMP (1 mM).



ATP. L'AMP est donc un effecteur positif et l'ATP un effecteur négatif.

Quant à la courbe C obtenue avec la glucokinase G2 de plus faible poids moléculaire, elle correspond sensiblement à une cinétique michaelienne.

Ces premières conclusions sont confirmées par les courbes de la fig. 2 qui représentent la variation de la vitesse de phosphorylation du glucose en fonction de la concentration en glucose.

La concentration en $MgCl_2$ est alors de 1 mM, celles d'ATP sont respectivement de 0,5 mM (courbes A et C) et de 1,5 mM (courbe B). Ces courbes mettent en évidence les effets de la concentration en ATP sur l'affinité de l'enzyme pour le glucose. Aussi, pour la glucokinase G1 (fig. 2a, courbes A et B), l'augmentation de la concentration en ATP amène une élévation de la concentration en glucose correspondant à la demi-vitesse maximale et donne une forme plus sigmoidale aux courbes. Au contraire l'addition de 1 mM d'AMP déplace les courbes vers la gauche et leur donne pratiquement l'allure de cinétiques "normales" (courbe C).

Ces divers résultats semblent donc montrer l'existence, sur G1, de sites régulateurs dont l'occupation par l'AMP convertit l'enzyme en une forme qui catalyse la phosphorylation du glucose à des vitesses plus faibles, mais qui est saturée par des concentrations plus faibles de ce substrat. A l'inverse, la fixation de l'ATP favorise une forme de l'enzyme qui nécessite des concentrations en glucose nettement plus élevées pour sa saturation.

Les propriétés de la glucokinase G1 sont très voisines de celles des phosphofructokinases [4-9] dont le caractère allostérique est bien établi.

De plus, il est intéressant de constater que l'augmentation de la concentration en ATP ne modifie en rien l'allure michaelienne des phosphorylations du glucose par G2 (fig. 2b); elle entraîne simplement une

élévation de la vitesse de catalyse. Ainsi G2 ne possède pas les caractéristiques d'un enzyme régulateur. Or la glucokinase microsomique est constituée de deux enzymes G1 et G2 que l'on ne sépare que par filtration sur Biogel et dont les propriétés catalytiques sont identiques. Ces constatations suggèrent que l'on est en présence d'un équilibre monomère-dimère, dont le dimère G1 possède le caractère allostérique. En l'état actuel de nos recherches, aucun autre argument ne permet encore d'étayer cette hypothèse.

Il est admis qu'au niveau des glucokinases, la régulation de la glycolyse est une régulation de synthèse et non une régulation d'activité comme c'est le cas au niveau des phosphofructokinases. Des résultats préliminaires décrits dans cette note, de leur similitude avec ceux qui ont été publiés antérieurement pour les phosphofructokinases, il semble que l'on puisse conclure qu'une régulation allostérique de la glycolyse peut être effectuée par la glucokinase microsomique du foie de rat G1.

Références

- [1] G.Berthillier, L.Colobert, M.Richard et R.Got, Biochim. Biophys. Acta 206 (1970) 1.
- [2] F.Appelmans, R.Wattiaux et C.de Duve, Biochem. J. 59 (1955) 438.
- [3] L.Grossbard et R.T.Schimke, J. Biol. Chem. 241 (1966) 3546.
- [4] O.H.Lowry et J.V.Passonneau, J. Biol. Chem. 241 (1966) 2268.
- [5] M.L.Salas, E.Vinuela, M.Salas et A.Sols, Biochim. Biophys. Res. Commun. 19 (1965) 371.
- [6] D.E.Atkinson et G.M.Walton, J. Biol. Chem. 240 (1965) 757.
- [7] T.E.Mansour, J. Biol. Chem. 238 (1963) 2285.
- [8] D.Blangy, H.Buc et J.Monod, J. Mol. Biol. 13 (1968) 31.
- [9] R.Odeide, M.Guilloton, B.Dupuis et A.J.Rosenberg, Bull. Soc. Chim. Biol. 50 (1968) 2035.