

Matière Enzymologie approfondie et métabolisme
Module Biochimie métabolique et Génétique humaine
Master Biologie, Environnement et Santé (Enseignant : M. Baaziz)

Juin 2015 Durée : 2 heures

EXAMEN

(Université Cadi Ayyad, Faculté des Sciences-Semlalia, Marrakech, Maroc)

QUESTION 1

Lors de la glycolyse, le glucose est phosphorylé sous l'action des kinases. La première réaction de cette voie métabolique est une phosphorylation pouvant être catalysée par deux enzymes différentes: 1/ La **glucokinase** au niveau du foie et des cellules β du pancréas ou 2/ l' **hexokinase** qui catalyse la phosphorylation d'hexoses comme le D-glucose, le D-mannose et le D-fructose. On se propose d'étudier les caractères cinétiques de ces deux enzymes vis à vis de leur substrat commun; le glucose. Les vitesses initiales des réactions ont été mesurées pour des concentrations différentes en substrat à 20°C et à pH = 7. Pour les mêmes concentrations en enzymes, les résultats expérimentaux relatifs aux deux enzymes, sont analysés à l'aide des représentations graphiques de Lineweaver-Burk $1/v = f(1/(S))$ comme il est montré dans la figure 1 ci-dessous.

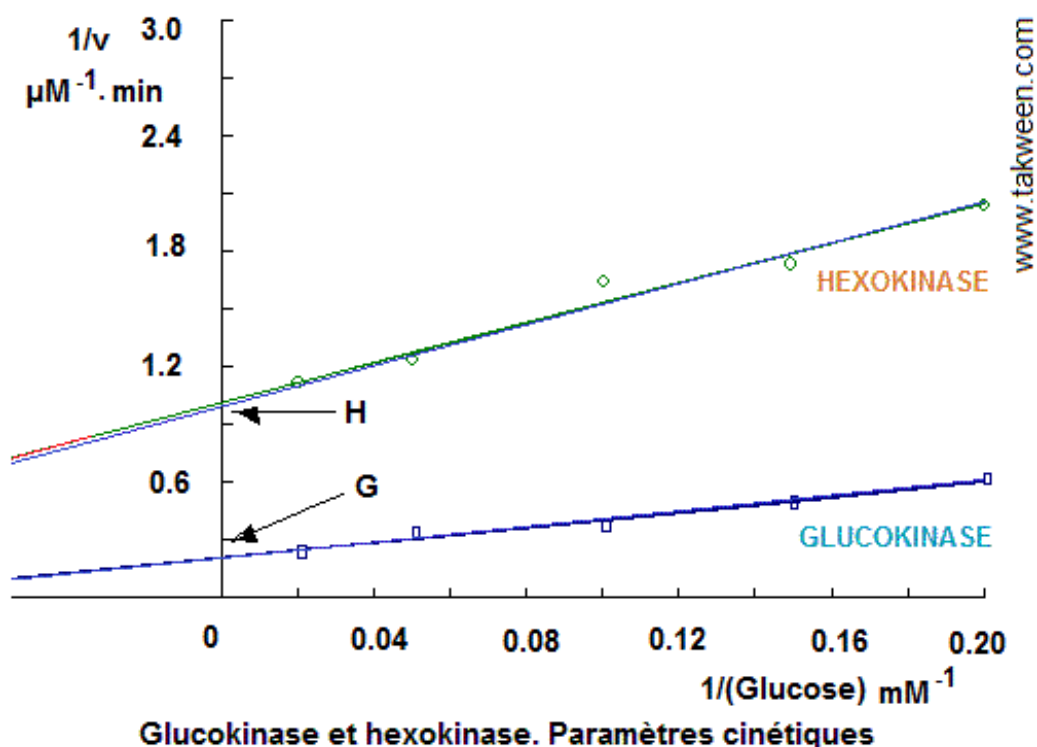
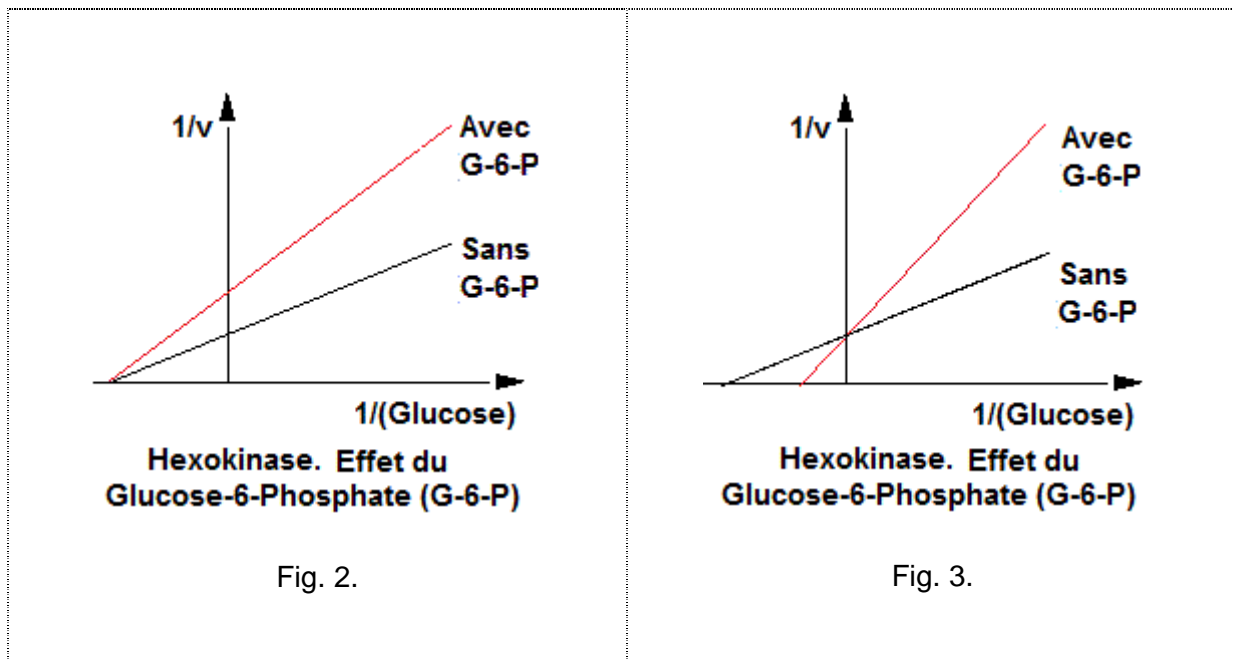


Fig. 1.

Données :

- G (0,21 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}$) et H (1,02 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}$) représentent les points d'intersection des courbes avec l'axe des ordonnées obtenus pour la glucokinase et l'hexokinase, respectivement.
- G' (-0,105 mM^{-1}) et H' (-0,196 mM^{-1}), non représentés sur la figure, correspondent aux points d'intersection des courbes avec l'axe des abscisses pour la glucokinase et l'hexokinase, respectivement.

D'autre part, certaines études comme celle de Weil-Malherbe & Bone (1951, *Biochem. J.* 49, 339–347) ont montré que la cinétique de l'hexokinase en absence ou en présence du glucose-6-phosphate (G-6-P) donne des résultats répondant à une représentation de Lineweaver-Burk de la figure 2. Cependant d'autres travaux comme ceux de Vowels & Easterby (1979, *Biochim. Biophys. Acta* 566, 283–295) avaient montré un résultat inverse, représenté par la figure 3.



1. Déterminer les valeurs de K_m et de V_{max} pour ces deux enzymes et en déduire leurs **efficacités catalytiques** (V_{max}/K_m) sur le glucose. Comparer les résultats relatifs aux deux enzymes. Quelles conclusions déduisez-vous?
2. Sachant que la concentration intracellulaire hépatique de glucose est de 5 mM (**glycémie normale**), calculer en pourcentage de V_{max} , les vitesses initiales des réactions catalysées par les deux enzymes. Quelle serait l'influence d'une augmentation importante de la glycémie? Indiquer laquelle de ces deux enzymes est susceptible d'intervenir efficacement en cas d'élévation de la concentration en glucose au delà de 5 mM. Justifier votre réponse.
3. Interpréter les effets du glucose-6-phosphate sur l'hexokinase aux niveaux de la catalyse enzymatique et du métabolisme du glucose relatés par les figures 2 et 3. Qu'en déduisez vous à propos du fonctionnement de l'hexokinase.

QUESTION 2

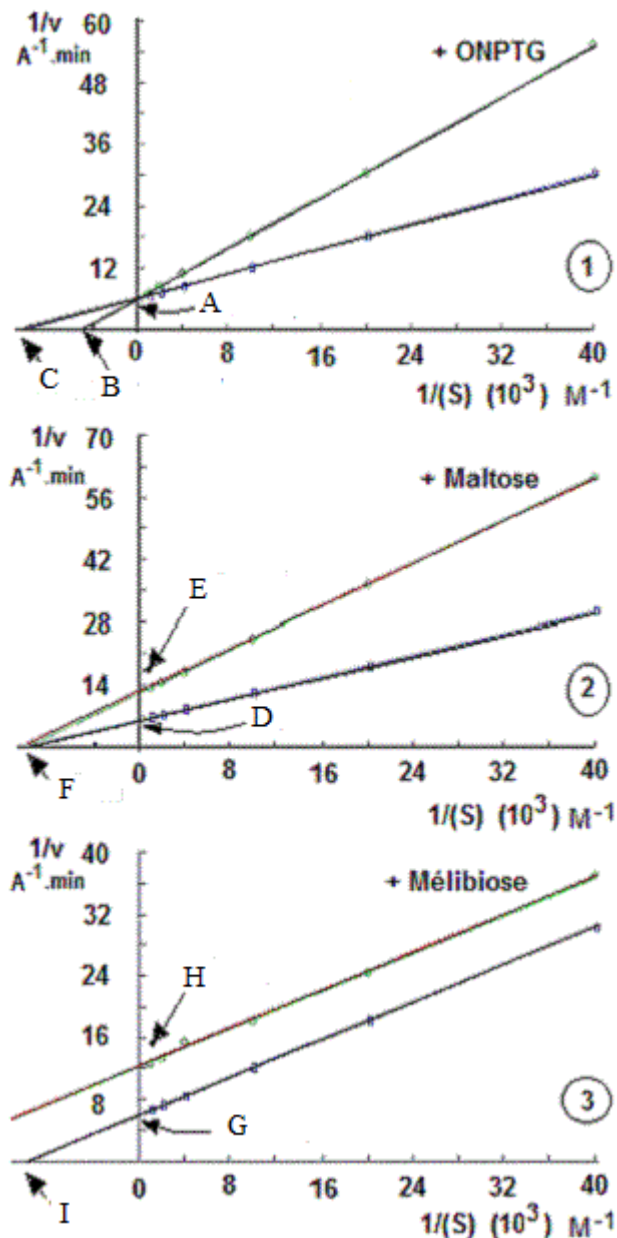
La **β -galactosidase** (EC 3.2.1.23) est une hydrolase dont le rôle est d'hydrolyser des β -galactosides en monosaccharides. Son absence (ou sa présence à faibles concentrations) dans l'intestin est derrière l'intolérance au lactose (incapacité à digérer le lactose chez l'Homme). Une déficience au niveau du gène GLB1 provoque la mucopolysaccharidose de type IV (MPS4), la galactosialidose ou la gangliosidose GM1.

A pH 7,7 et 25°C, les cinétiques d'hydrolyse de l'o-nitrophényl-galactoside (S) par la **bétagalactosidase** de la bactérie *Escherichia coli* ont été étudiés en absence ou en présence de l'un des inhibiteurs suivants: o-nitrophényl-bétagalactoside (ONPTG $3 \cdot 10^{-4}$ M), maltose (0,26 M) et mélibiose (0,17 M).

Les mesures de vitesses initiales, v (absorbance à 410 nm par minute, $A \cdot \text{min}^{-1}$) pour chacune de ces expériences ont permis d'avoir des cinétiques représentées par les courbes de Lineweaver-Burk ($1/v = f(1/(S))$) correspondant aux figures 1, 2 et 3.

1. A partir des représentations graphiques tracées en absence ou en présence de l'inhibiteur (I), préciser les types d'inhibition exercés par les trois inhibiteurs vis à vis du substrat ($S = \text{ONPG}$). Calculer les constantes cinétiques V_{max} (en absence d'inhibiteur), V_{max}' (en présence d'inhibiteur), K_m (en absence d'inhibiteur) et K_m' (en présence d'inhibiteur). Discuter l'effet de chaque inhibiteur sur l'activité enzymatique et la liaison entre l'enzyme (E), le substrat (S) et l'inhibiteur (I).

2. Calculer les constantes d'inhibition pour chaque inhibiteur (K_i et K_i') et comparer l'affinité de l'enzyme pour chaque inhibiteur



Données :

- A, D et G représentent les points d'intersection des courbes avec l'axe des ordonnées obtenus en absence des inhibiteurs.
- E et H représentent les points d'intersection des courbes avec l'axe des ordonnées obtenus respectivement en présence des inhibiteurs maltose et mélibiose.
- C, F et I représentent les points d'intersection des courbes avec l'axe des abscisses obtenus en absence des inhibiteurs.
- B et J représentent les points d'intersection des courbes avec l'axe des abscisses obtenus respectivement en présence des inhibiteurs ONPTG et mélibiose.

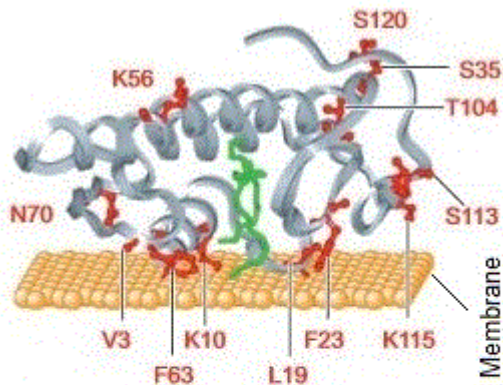
$$\mathbf{A = D = G = 6 \text{ A}^{-1} \cdot \text{min}, \mathbf{B = -5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}, \mathbf{C = F = I = -10 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1},}$$

$$\mathbf{E = 12 \text{ A}^{-1} \cdot \text{min}, \mathbf{H = 12,19 \text{ A}^{-1} \cdot \text{min}, \mathbf{J = -20 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}}$$

QUESTION 3

La **phospholipase A2** trouvée dans les **venins** de serpents et d'abeilles, coupe la liaison ester en position 2 des 1,2-diacylphosphoglycérides des membranes plasmiques, libérant un acide gras et un lysophospholipide. La réaction catalysée par la phospholipase A2 implique la présence d'ions

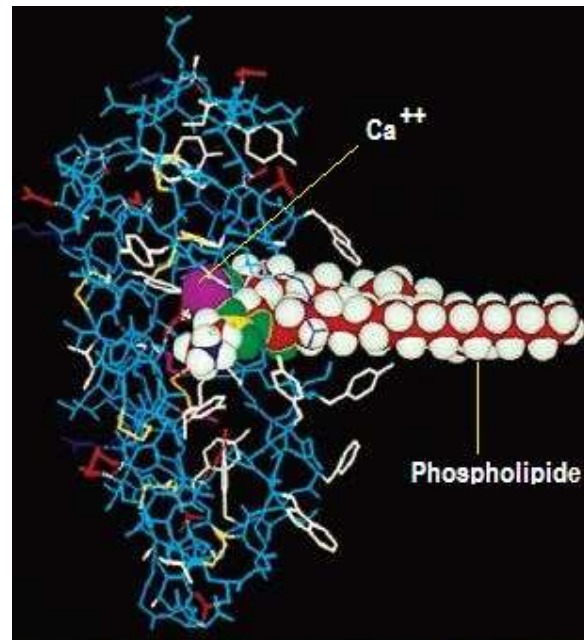
calcium (Ca^{++}). L'étude de l'interaction enzyme-substrat a permis d'aboutir aux complexes montrés dans les figures 1 et 2 ci dessous. Donner une interpréter de ces illustrations structurales.



Phospholipase . A short chain phospholipid analog in the active site is shown in the center (Lambeau et al. 2008. Annu.Rev.Biochem)

F: Phenylalanine, K: Lysine, L: Leucine, N: Asparagine , V: Valine, S: Serine, T: Threonine

Fig. 1



Phospholipase A2 (complexe avec un phospholipide)
J. Lipid Res.-2009-Burke-S237-42

Fig.2

Réponses brèves

QUESTION 1

Réponse 1.

	Km (mM)	Vmax ($\mu\text{M}/\text{min}$)	Vmax/Km
Glucokinase	9,47	4,76	0,50
Hexokinase	5,1	0,98	0,19

L'hexokinase possède plus d'affinité pour le glucose, car possédant un Km faible. Par contre le glucokinase a une vitesse plus élevée par rapport à celle de l'hexokinase. Ainsi, la glucokinase peut phosphoryler environ 5 fois plus de glucose par min par rapport à l'hexokinase. Cette dernière ne peut aller qu'à 0,98 μM de glucose phosphorylé par minute et dans les conditions optimales.

La spécificité de la glucokinase pour le glucose (V_{max}/K_m) est plus élevée par rapport à l'hexokinase.

Réponse 2.

- v à (Glucose) = 5 mM (en pourcentage de Vmax).

Pour la **glucokinase** :

Avec (Glucose) = 5 mM, $1/(\text{Glucose}) = 0,20 \text{ mM}^{-1}$, ce qui correspond à $1/v = 0,6 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}$ et donc $v = 1,67 \mu\text{M}/\text{min}$, soit environ **35%** de Vmax.

Pour l'hexokinase :

Avec (Glucose) = 5 mM, $1/(\text{Glucose}) = 0,20 \text{ mM}^{-1}$, ce qui correspond à $1/v = 2 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{min}$ et donc $v = 0,50 \mu\text{M}/\text{min}$, soit environ **50%** de V_{max} .

- Influence d'une augmentation importante de la glycémie.

Avec des concentrations élevées en glucose (exemple 20 mM), l'hexokinase aura presque atteint sa vitesse maximale et ne pourra pas phosphoryler plus de glucose. Par contre, la glucokinase n'aura pas encore atteint sa vitesse maximale et continue à phosphoryler le glucose.

- Enzyme susceptible d'intervenir efficacement lors de l'élévation de la glycémie.

Glucokinase

Réponse 3.

Figure 2 : pour l'hexokinase, le produit glucose-6-phosphate est inhibiteur non compétitif vis-à-vis du glucose. Il agit sur le même site que le substrat et sur un autre site sur l'enzyme ne fixant pas le substrat, car il forme un complexe ternaire avec l'enzyme.

Figure 3 : pour l'hexokinase, le produit glucose-6-phosphate est inhibiteur compétitif vis-à-vis du glucose. Il agit sur le même site que le substrat. Il forme uniquement un complexe binaire avec l'enzyme.

L'inhibition non compétitive du glucose-6-phosphate (produit final de la réaction) montre que le glucose se fixe bien sur un autre site que le site actif. Il s'agit d'un site régulateur. Ce résultat démontre que l'Hexokinase est une enzyme régulatrice (enzyme allostérique).

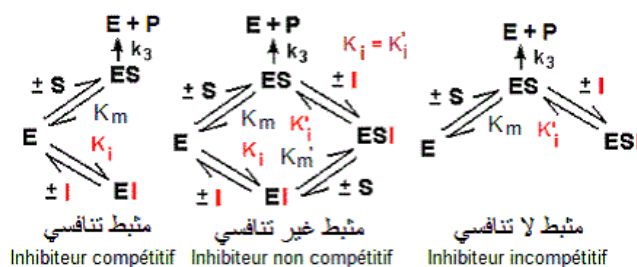
Lien web : <http://www.takween.com/enzymologie/enzymes-metabolisme-exercices.html>

QUESTION 2

Réponse 1. Inhibition vis-à-vis du substrat (ONPG)

- **ONPTG** : inhibiteur compétitif, **Maltose** : inhibiteur non compétitif, **Mélibiose** : inhibiteur incompétitif.

	ONPG Sans inhibiteur	ONPTG ($3 \cdot 10^{-4}$ M)	Maltose (0,26 M)	Mélibiose (0,17 M)
K_m (M)	$1 \cdot 10^{-4}$	-	-	-
V_{max} (A.min ⁻¹)	0,167	-	-	-
K_m' (M)	-	$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$0,5 \cdot 10^{-4}$
V_{max}' (A.min ⁻¹)	-	0,167	0,082	0,082
K_i (M)	-	$3 \cdot 10^{-4}$	0,25	-
K_i' (M)	-	-	0,25	0,164



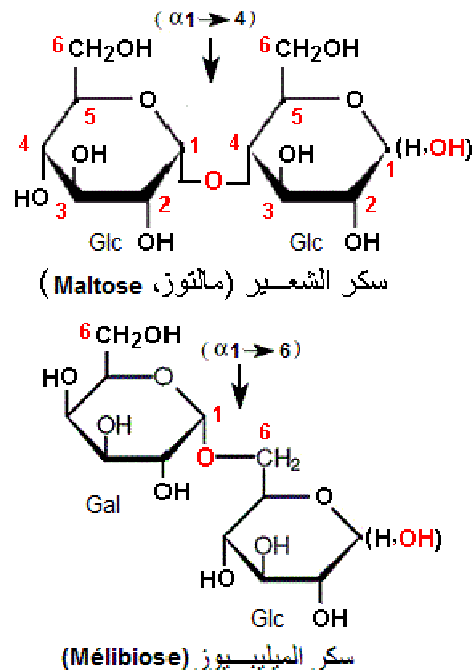
Réponse 2.

- Pour ONPTG (inhibiteur compétitif) : $K_m' = K_m \times (1 + (I)/K_i)$, soit $2.10^{-4} = 1.10^{-4} \times [1 + (3.10^{-4})/K_i]$ ce qui donne $K_i = 3.10^{-4} \text{ M}$

- Pour le maltose (inhibiteur non compétitif) : $V_{max}' = V_{max}/(1 + (I)/K_i)$, ce qui donne $K_i = 0,25 \text{ M}$

- Pour le mélibiose (inhibiteur incompétitif) : $V_{max}' = V_{max}/(1 + (I)/K_i')$, ce qui donne $K_i' = 0,164 \text{ M}$

L'affinité de l'enzyme pur les inhibiteurs est décroissante dans l'ordre ONPTG ($K_i = 3.10^{-4} \text{ M}$), Mélibiose ($K_i' = 0,164 \text{ M}$) et Maltose ($K_i = K_i' = 0,25 \text{ M}$)



Lien web : <http://www.takween.com/enzymologie/enzymes-catalyse-exercices.html>

QUESTION 3

Les figures 1 et 2 montrent que la phospholipase A2 est une enzyme à Ca^{++} .

La figure 1 montre que le contact de l'enzyme (phospholipase A2) avec la membrane plasmique est réalisé à l'aide de deux types d'acides aminés de l'enzyme dont des acides aminés polaires comme la lysine (ici K10 et K115) pouvant engager des liaisons ioniques avec la membrane et des acides aminés apolaires comme la valine (ici V3), la leucine (ici L19) et la phénylalanine (ici F23 et F63) qui engagent des interactions hydrophobes avec les lipides de la membrane plasmique. La figure 2 montre que l'extrémité hydrophile du phospholipide est dirigée vers le Ca^{++} alors que la partie hydrophobe (chaînes carbonnées d'acides gras) est orientée vers les résidus aromatiques des acides aminés de l'enzyme (Tyr, Trp, Phe). Cette structure montre l'importance des interactions hydrophobes dans la fixation et l'orientation des phospholipides, substrats de la phospholipase A2.

Lien web : <http://www.takween.com/enzymologie/phospholipase-examen.html>

Contact: baaziz@uca.ma