

RESUME

La glucokinase (Hexokinase IV ou D) est une des quatre hexokinases qui catalysent l'étape première et irréversible de la glycolyse et de la synthèse du glycogène en phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate aux dépens de l'ATP-Mg. Cette thèse est consacrée à l'identification des déterminants structuraux sous-jacents aux propriétés cinétiques particulières de cette enzyme et à la compréhension de son mécanisme de coopérativité pour le glucose.

Dans l'Introduction (Chapitre I à III), nous avons retracé l'historique de la découverte de la glucokinase et présenté le mode de la régulation de son gène ainsi que les propriétés physiques et cinétiques de cette enzyme. Quatre de ces propriétés cinétiques ne sont pas partagées avec les hexokinases à bas K_m à savoir (1) une faible affinité pour le glucose; (2) une courbe de saturation sigmoïde pour ce substrat; la propriété d'être inhibée (3) par le palmitoyl-CoA et (4) par une protéine appelée la protéine régulatrice de la glucokinase. Dans le Chapitre I, nous avons décrit ces trois premières propriétés distinctives de la glucokinase ainsi que son mode de régulation à long terme. La découverte de la protéine régulatrice, ses propriétés physiques et régulatrices, son mode d'action et son rôle physiologique dans l'inhibition de la glucokinase et dans la translocation de l'enzyme constituent les principaux thèmes abordés dans le Chapitre II. Le dernier Chapitre de l'Introduction a été consacré au rôle physiologique de la glucokinase dans le foie et les cellules β des îlots de Langerhans et son implication dans la physiopathologie du diabète sucré et de l'hyperinsulinisme.

Dans la partie Résultats, nous présentons le travail de mutagenèse dirigée dans lequel un certain nombre de résidus spécifiques de la glucokinase sont remplacés par les résidus en position équivalente dans les hexokinases à bas K_m (Chapitre IV). Cette étude a permis d'identifier plusieurs acides aminés responsables de la faible affinité de l'enzyme pour le glucose. En combinant trois mutations, nous sommes même parvenus à produire une glucokinase dont l'affinité est comparable à celle des hexokinases à bas K_m . Une de ces trois mutations provoque aussi une diminution importante du coefficient de Hill concomitante à une augmentation de l'affinité pour le glucose. La localisation de ces trois résidus mutés indique que la zone charnière de l'enzyme est importante pour la faible affinité et la coopérativité positive pour ce sucre. Nous avons identifié aussi une mutation qui diminue l'affinité pour le palmitoyl-CoA et qui s'ajoute à deux autres mutations précédemment décrites dans la littérature. Les résidus correspondants sont situés sur la face supérieure du grand lobe de la glucokinase ce qui suggère que l'acyl-CoA et l'ATP se lient au même site.

Une deuxième question à laquelle nous nous sommes intéressés est celle de déterminer si la sigmoïdité de la courbe de saturation de la glucokinase n'était pas due à l'existence d'un second site de fixation pour le glucose (Chapitre V). A cette fin, nous avons exploré l'effet stimulateur du glucose sur la phosphorylation du fructose en utilisant une nouvelle méthode de dosage du fructose-6-phosphate qui emploie la sorbitol-6-phosphate-déshydrogénase d'*Escherichia coli* comme enzyme de couplage. Nous montrons que (1) cet effet stimulateur est réduit chez deux mutants de la glucokinase ayant un faible coefficient de Hill ou quand l'ATP est remplacé par de mauvais donneurs de phosphoryle; (2) la mutation de deux résidus, voisins immédiats de résidus liant le glucose au niveau du site catalytique, réduit l'affinité pour le glucose dans son effet stimulateur sur la phosphorylation du fructose, ainsi d'ailleurs que l'affinité pour le glucose comme substrat; (3) parmi une série d'analogues au glucose, seuls trois, tous substrats, stimulent la phosphorylation du fructose; (4) le glucose augmente l'affinité apparente pour des inhibiteurs compétitifs analogues au glucose mais ne fait pas de

de coopérativité qui supposent l'existence de deux formes, lentement interconvertibles, de la glucokinase. Nos résultats montrent que ces formes diffèrent par leur affinité non seulement pour le glucose mais aussi pour ses analogues.

En fonction des données de la mutagenèse, nous proposons que la forme à faible affinité pour le glucose correspond à une conformation dans laquelle l'angle entre les deux lobes de l'enzyme est plus largement ouvert. Par simulation mathématique, nous montrons que l'effet activateur du glucose ainsi que d'autres propriétés de la glucokinase peuvent s'expliquer par un modèle de coopérativité cinétique de ce type.

La Discussion (Chapitre VI) est consacrée à une interprétation globale des résultats obtenus pendant ce travail et à leur confrontation avec les résultats publiés par d'autres groupes de chercheurs.