

LA GLYCOLYSE

Objectifs du cours :

- Connaître la structure, l'origine biologique, et le rôle vis-à-vis des enzymes et des coenzymes utilisés lors des différentes réactions.
- Décrire les étapes de la glycolyse
- Faire les bilans énergétiques de la combustion du glucose libre ou provenant du glycogène et de ses utilisations biologiques respiratoire ou fermentative.

I/ Introduction :

Les glucides ont différents rôles au sein de l'organisme : production énergétique ou mise en réserve, synthèse de glycoprotéines et de macromolécules, synthèse des nucléotides (ribose et NADPH), interrelation métabolique.

La plupart des tissus ont un besoin minimal de glucose par contre pour le cerveau et les érythrocytes ce besoin est important et même primordial.

II/ Définition :

La glycolyse, voie métabolique décrite par Embden et Meyerhoff, consiste en l'oxydation progressive d'une molécule de glucose à 6C en deux molécules de pyruvate à 3C et la phosphorylation couplée de l'ADP en ATP. Elle a donc pour but de transférer et de produire de l'énergie. Elle est présente dans le cytosol de toutes les cellules. Elle n'est pas seulement la voie principale du métabolisme du glucose, mais elle est aussi la voie du fructose et du galactose présents dans l'alimentation. Cette voie est particulière car elle peut utiliser l'oxygène s'il est disponible à travers la chaîne respiratoire de la mitochondrie (aérobiose) ou elle peut fonctionner totalement en absence d'oxygène (anaérobiose).

Parmi les métabolites de la glycolyse, certains sont des carrefours métaboliques importants :

- **le G6P** conduit à la synthèse du glycogène, des pentoses P, de la glucosamine, constituant des glycoprotéines.
- **les trioses P** sont en relation avec le fructose, les pentoses P et le glycérol 3 P
- **le pyruvate** produit final de la glycolyse, est en relation directe dans le cytosol, avec le lactate et l'alanine, et dans mitochondries avec l'acétyl CoA et l'oxaloacétate.

La glycolyse aérobie conduit à la formation de 2 molécules de pyruvate, 2ATP, 2NADH, H⁺. C'est une phase indispensable à la formation du pyruvate et sa conversion mitochondriale en Acétyl CoA, élément essentiel du cycle de Krebs. Le glucose, dans ces conditions, subit une oxydation totale en CO₂ et H₂O.

La glycolyse anaérobie produit également 2 molécules de pyruvate, 2 ATP, et 2 NADH, H⁺. Les réactions suivantes dépendent à la fois de l'équipement enzymatique de la cellule et de la disponibilité en oxygène. Elles conduisent à la réoxydation du NADH, H⁺ avec une production finale :

- Soit du lactate (fermentation lactique) : c'est ce système qui fournit de l'ATP aux cellules qui ne possèdent pas de mitochondries comme les globules rouges et aux cellules en hypoxie comme les muscles striés en contraction rapide.
- Soit de l'éthanol (fermentation alcoolique).

II/ Intérêt biomédical :

La capacité de la glycolyse à fournir de l'ATP en absence d'oxygène est d'une grande importance biomédicale car elle permet au muscle squelettique de fonctionner à des niveaux très élevés quand l'oxydation aérobie devient insuffisante, et permet aux tissus capables d'une glycolyse importante de survivre à des épisodes d'anoxie. Par contre, dans le muscle cardiaque, adapté au travail en aérobose, la capacité glycolytique est relativement faible et, dans des conditions d'ischémie, sa survie est basse.

III/ Entrée du glucose dans la cellule :

Le glucose, petite molécule hydrosoluble, est transporté dans le sang sous forme libre. Le taux sanguin, ou glycémie, est relativement constant entre 0,70 et 1,10 g/l.

- En période alimentaire, le glucose provient de l'intestin. L'augmentation de la glycémie déclenche la sécrétion d'insuline par les cellules B du pancréas. Le foie, premier tissu traversé par le sang portal, capte 30 à 40 % du glucose. Le glucose restant se répartit entre les autres tissus : cerveau, GR, muscles, tissu adipeux...il est dégradé en pyruvate par la voie de la glycolyse et stocké par la voie de la glycogénogénèse dans le foie et les muscles.
- En situation de jeûne, le glucose sanguin provient du foie, à partir de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse sous l'influence des taux élevés de glucagon sécrété par les cellules A du pancréas.

Le glucose ne peut pas pénétrer dans la cellule par simple diffusion. Son entrée est assurée par les deux mécanismes suivants :

- **Transport facilité** : le glucose franchit la membrane phospholipidique et hydrophobe des cellules par un mécanisme de diffusion facilitée, à l'aide de transporteurs passifs. Ces transporteurs, appelés GLUT (glucose transporter) sont codés par des gènes différents, et classés suivant l'ordre chronologique de leur découverte. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires. La fixation du glucose sur la face extracellulaire de la membrane provoque un changement de conformation de la protéine ce qui fait passer l'ose sur la face interne où il est libéré. On connaît actuellement 5 transporteurs membranaires de glucose appelés GLUT numérotés de 1 à 5 soit GLUT 1 à GLUT 5. Ce sont des protéines qui ont une certaine ressemblance dans les premières séquences mais présentent ensuite des séquences spécifiques à leurs membranes d'accueil.

Les transporteurs GLUT s'expriment plus ou moins selon les types cellulaires et se distinguent par leur K_m pour le glucose.

C'est ainsi que les **GLUT 1** abondants dans le GR, ont une K_m voisine de 1mM, concentration nettement inférieure à la glycémie (voisine de 5mM) ; ils favorisent ainsi la pénétration du glucose dans le globule rouge (GR) quand la glycémie est basse, en période de jeûne.

Les **GLUT 2** prépondérants dans le foie et le pancréas, ont une K_m comprise entre 15 et 20mM, nettement plus élevée que la glycémie post-prandiale ; le glucose diffuse donc très rapidement dans l'hépatocyte quand le taux sanguin est élevé comme c'est le cas dans la veine porte en période alimentaire ; inversement, le glucose ne pénètre que faiblement dans l'hépatocyte quand la glycémie est basse, en période de jeûne.

Les **GLUT 3** abondants dans le cerveau, possèdent les mêmes caractéristiques que les GLUT 1.

Les **GLUT 4** prépondérants dans les graisses corporelles (tissu adipeux) et les muscles ont une K_m voisine de 5mM ; la synthèse et l'affinité des GLUT 4 pour le glucose, sont régulées par l'insuline.

- **Transport actif** : processus qui consomme de l'énergie. Le glucose est transporté contre un gradient de concentration, c'est-à-dire d'un milieu à concentration faible en glucose vers l'intérieur de la cellule à concentration plus élevée en glucose. Le glucose et le Na^+ sont transportés dans le même sens et en même temps à travers la membrane. Ce type de transport intervient dans les cellules épithéliales, dans l'intestin, dans le rein etc....

III/ Etapes de la glycolyse :

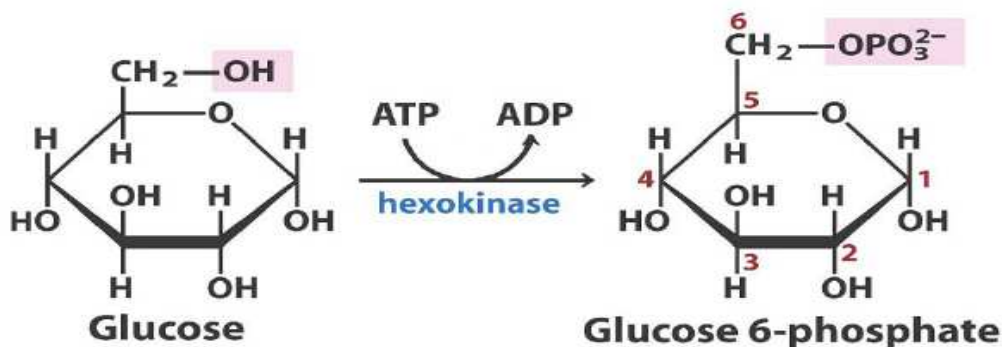
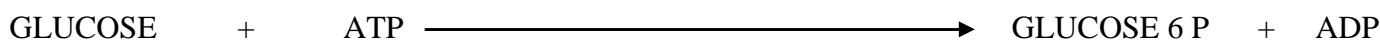
La glycolyse est une série de 10 réactions catalysées par 10 enzymes localisées dans le cytosol. Tous les intermédiaires de la glycolyse sont phosphorylés. Ces groupements étant chargés négativement cela les empêche de traverser la membrane plasmique.

A / Phosphorylation du glucose par l'ATP :

Pour entrer dans la voie de la glycolyse, le glucose doit être phosphorylé en glucose 6 phosphate. Cette réaction est catalysée par une hexokinase. Cependant, dans les cellules hépatiques et dans les cellules des îlots pancréatiques cette fonction est effectuée par la glucokinase dont l'activité dans le foie est soumise aux variations de l'état nutritionnel. L'hexokinase est inhibée de façon allostérique par le produit direct qui est le glucose 6 phosphate. L'hexokinase rencontrée dans toutes les cellules montre une affinité élevée (faible K_m) pour son substrat, le glucose. Elle a pour fonction d'assurer l'apport de glucose dans les tissus, même en présence de faibles concentrations sanguines de glucose. Elle agit sur les anomères α et β du glucose et elle catalyse aussi la phosphorylation des autres hexoses, mais à une vitesse plus lente que celle du glucose.

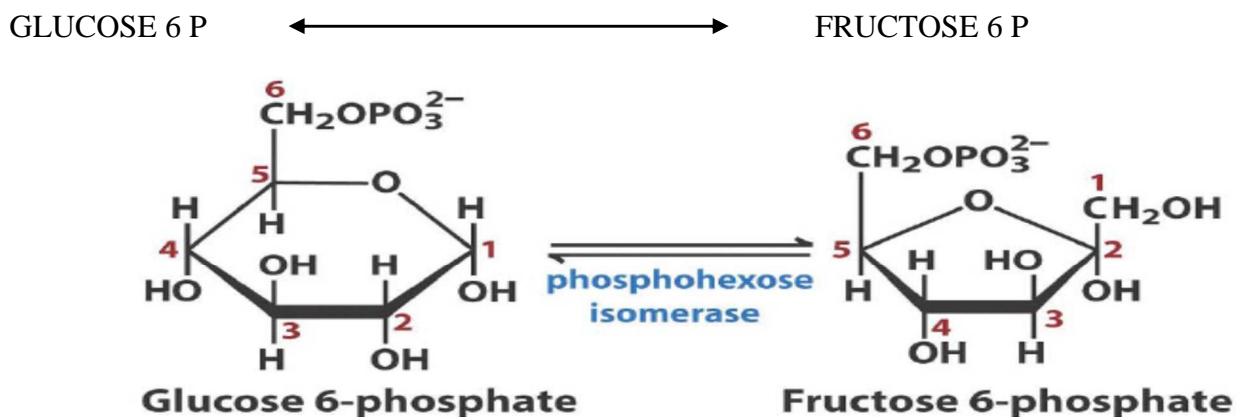
La glucokinase a pour fonction d'éliminer le glucose du sang après les repas. Contrairement à l'hexokinase, la glucokinase a une K_m élevée pour le glucose et son activité est optimale à des concentrations de glucose sanguin au dessus de 5 mmol/l (0,90 g/l). Elle est spécifique au glucose.

C'est la première grande étape. Elle est consommatrice d'une molécule d'ATP (ou d'une liaison phosphate riche en énergie). La réaction est irréversible. Comme dans toutes les phosphorylations le Mg^{++} est indispensable à la réaction. La réaction catalysée est la suivante :



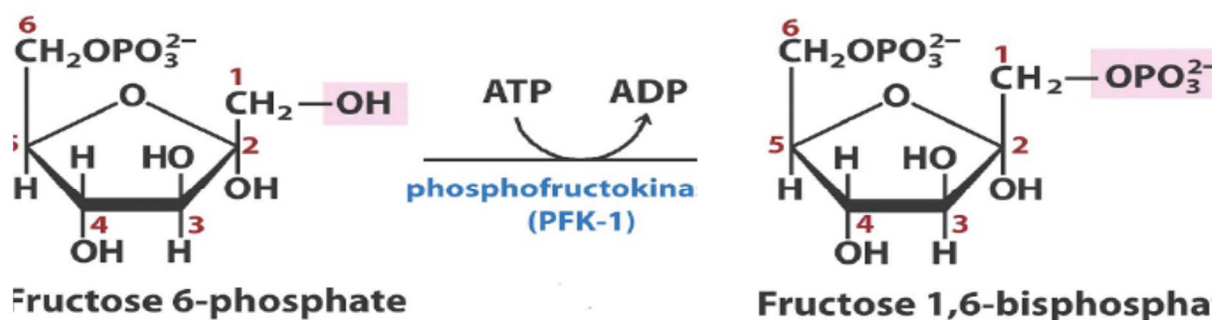
B/ Isomérisation du glucose 6P en fructose 6P :

C'est une réaction d'isomérisation, réversible, catalysée par la phosphoglucose isomérase (PGI). Elle est spécifique de ces deux composés au point qu'en partant de l'un on arrive toujours au même équilibre.



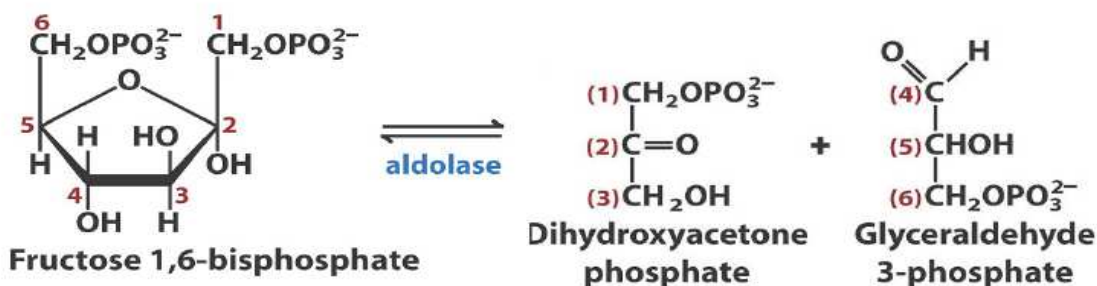
C/ Phosphorylation du fructose 6P en fructose 1,6 biP :

La réaction est assurée par la phosphofructokinase 1 (PFK1) comme suit :



Le Mg^{+} est indispensable à la réaction qui est totalement irréversible. L'UTP et l'ITP peuvent remplacer l'ATP. La phosphofructokinase est une enzyme allostérique dont l'activité joue un rôle important dans la régulation du taux de la glycémie.

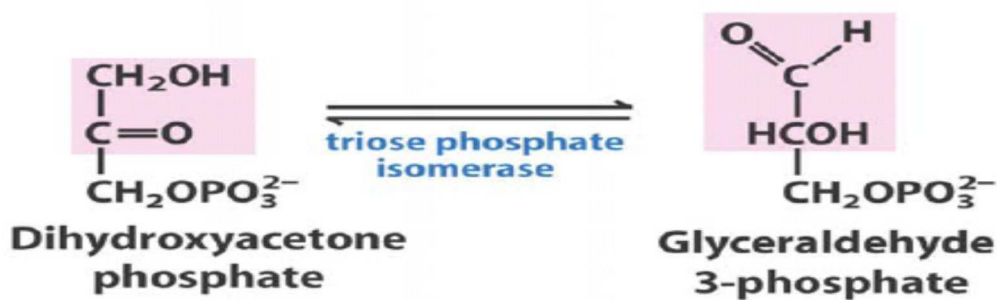
D/ Scission du fructose 1,6 biP et interconversion des trioses phosphates :



Glycéraldéhyde 3P

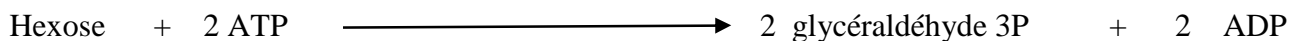


Dihydroxyacétone phosphate



Lors du clivage de fructose 1,6 biP, la réaction réversible est catalysée par une aldolase (fructose 1,6 biphosphate aldolase). Il existe plusieurs aldolases différentes comportant toutes quatre sous-unités. L'aldolase A existe dans la plupart des tissus et l'aldolase B, dans le foie et le rein. Seul le glycéraldéhyde 3P est dégradé dans la suite des réactions de la glycolyse. Le 3 phosphodihydroxyacétone est l'isomère le plus stable, mais il ne peut pas entrer directement dans la voie de la glycolyse. Il faut d'abord qu'une triose phosphate isomérase convertisse cette molécule en glycéraldéhyde 3 phosphate en passant par un intermédiaire énediol pour que la glycolyse puisse se poursuivre. Cette réaction termine la première phase de la glycolyse.

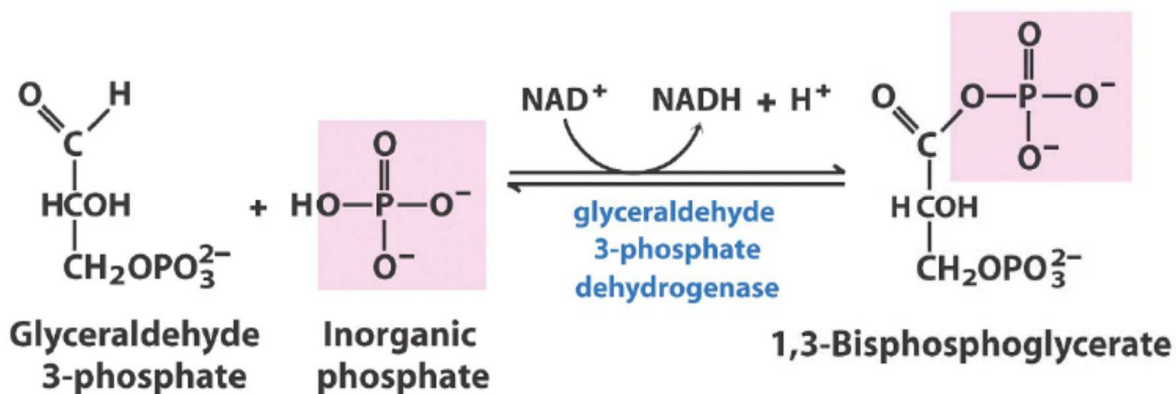
A la fin de cette phase tous les hexoses présentent la réaction globale suivante :



La suite des réactions est caractérisée par une production d'ATP et de pyruvate

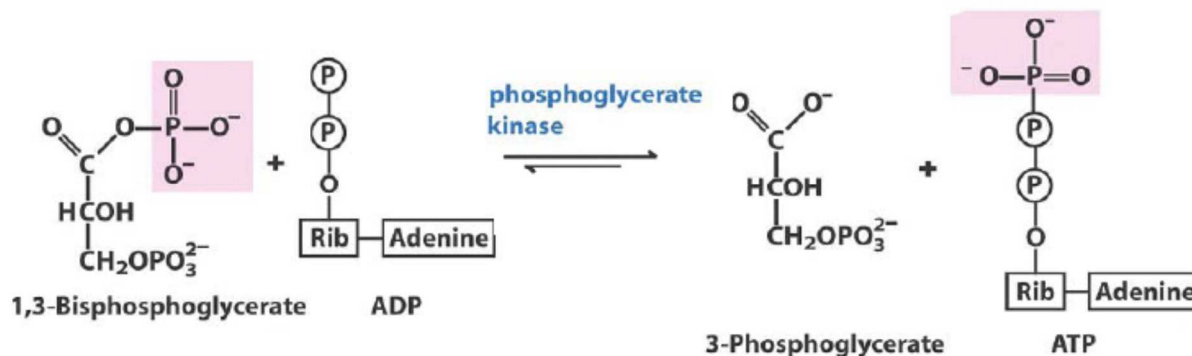
E/ Formation d'ATP et oxydation du glycéraldéhyde 3P :

L'enzyme qui catalyse la réaction est la 3 phosphoglycéraldéhyde déshydrogénase. Elle exige la présence du phosphate minéral. Le groupe carboxyle issu de l'oxydation de la fonction aldéhyde est lié par une liaison riche en énergie au phosphate. Le produit obtenu est le 1,3 biphosphoglycérate. Les électrons libérés sont pris en charge par le NAD^+ . La réaction est réversible.

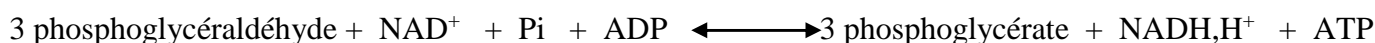


F/ Transfert du phosphate sur l'ADP et synthèse de l'ATP :

Il est catalysé par la 3 phosphoglycérate kinase (phosphotransférase). La réaction est réversible.

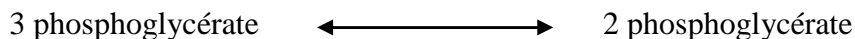


En résumé, par l'intermédiaire des deux enzymes (complexe multienzymatique de la glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase), on a la réaction suivante qui conduit à la formation d'ATP.



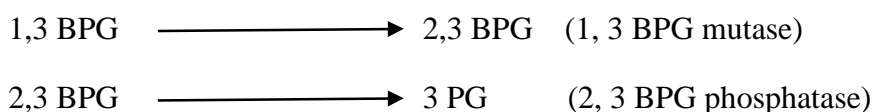
G/ Isomérisation du 3 phosphoglycérate en 2 phosphoglycérate :

Le phosphate est déplacé de la position 3 à la position 2. La réaction est catalysée par la phosphoglycérate mutase (isomérisation par transfert intramoléculaire de radical) ; le Mg^{++} est indispensable et la réaction est réversible.



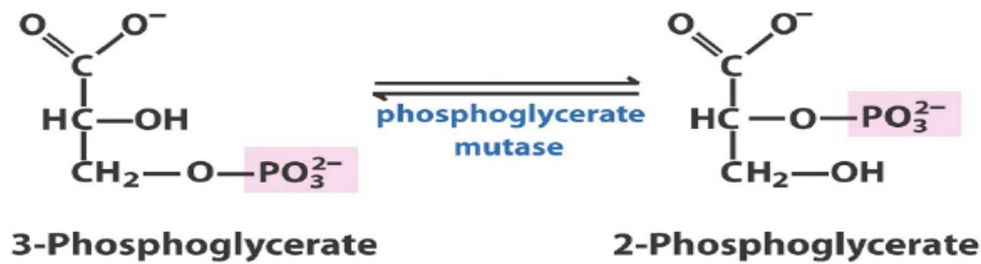
La phosphoglycérate mutase catalyse la conversion réversible du 3 phosphoglycérate en 2 phosphoglycérate. La phosphoglycérate mutase lie le 3 phosphoglycérate et le phosphoryle transitoirement en 2,3 biphosphoglycérate qui est rapidement converti en 2 phosphoglycérate.

La quantité requise de 2, 3 biphosphoglycérate est fournie par une dérivation de la glycolyse, la voie de Rapoport-Lubering :



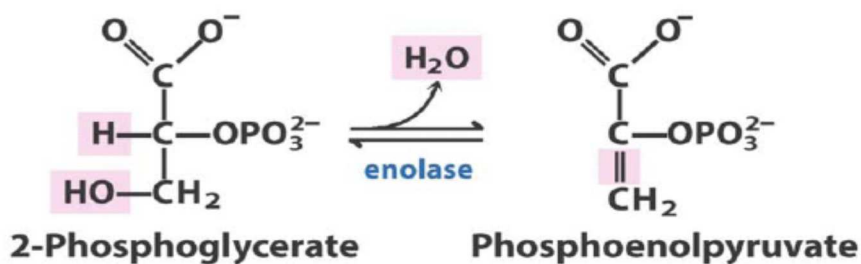
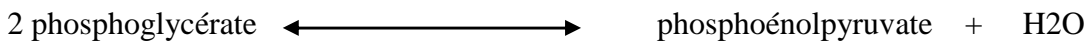
Le 2,3 BPG est une molécule qui constitue un régulateur allostérique. Une augmentation de sa concentration favorise la dissociation du complexe Hb-O₂ par diminution de l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. Un effet opposé est observé en cas de diminution de la concentration en 2,3 biphosphoglycérate.

Le globule rouge peut modifier sa concentration interne en 2,3 biphosphoglycérate en fonction des besoins en oxygène de l'organisme et du taux d'hémoglobine libre. Ce mécanisme est mis à profit lors des modifications adaptatives de la fonction respiratoire du sang (vie en altitude à p(O₂) basse, anoxie, anémie, etc ...) pour assurer un apport optimal d'oxygène aux tissus (lorsque la concentration en 2, 3 biphosphoglycérate augmente, l'hémoglobine voit son affinité pour l'oxygène diminuer et libère plus facilement l'O₂ aux tissus)



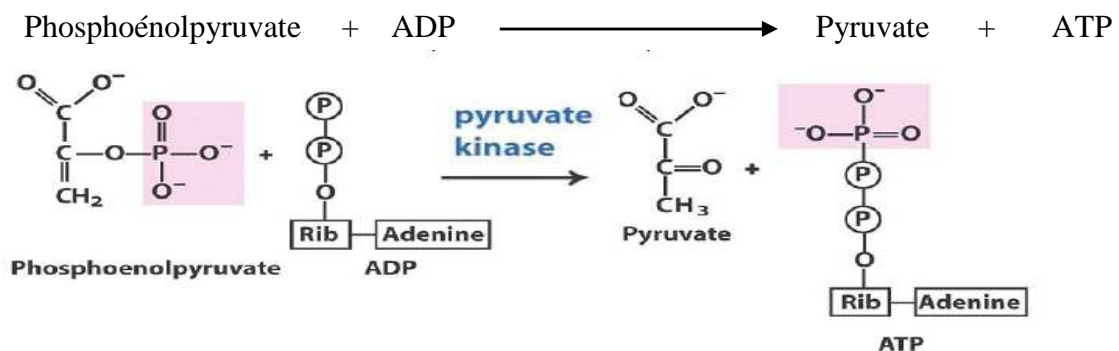
H/ Déshydratation du 2 phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate :

C'est la seconde réaction qui va donner naissance à la formation d'une liaison phosphate riche en énergie. Elle est catalysée par une énoïase. Cette déshydratation entraîne un réarrangement électronique et donc une redistribution de l'énergie à l'intérieur de la molécule. Le phosphate en position 2 devient riche en énergie et il y a formation du phosphoénolpyruvate (c'est la molécule la plus riche en énergie fabriquée par la cellule). L'énoïase est inhibée par le fluorure. Cette propriété est utile lorsqu'il est nécessaire d'empêcher la glycolyse avant de mesurer le glucose sanguin. L'enzyme nécessite aussi la présence de Mg^{++} ou de Mn^{++} .



I/ Transfert du phosphate du phosphoénolpyruvate sur l'ADP :

Le phosphate à haute énergie du phosphoénolpyruvate est transféré sur l'ADP par une pyruvate kinase pour générer 2 molécules d'ATP par molécule de glucose oxydé. Cette réaction passe par un intermédiaire énolique, l'énolpyruvate qui se réarrange spontanément par réaction non enzymatique en la forme cétonique du pyruvate. C'est une réaction irréversible qui nécessite la présence de Mg^{++} ou de Mn^{++} . On connaît plusieurs variétés moléculaires de la pyruvate kinase : la forme L (hépatique), la forme M (musculaire) et la forme A (autres tissus). La formation du pyruvate termine la séquence des réactions de la glycolyse.



IV/ Bilan énergétique de la glycolyse :

Pour chaque glucose il y a eu :

-consommation de 2 ATP lors de la formation du G6P et du F1,6 biP.

- chaque molécule de glucose donne 2 glycéraldéhyde 3P. Au niveau de chaque triose phosphate, il y a formation d'un NADH, H⁺, de 2 ATP et d'un pyruvate.

Le bilan final conduit à la formation de 4 ATP et consommation de 2 ATP. La dégradation d'une molécule de glucose dans la glycolyse conduit donc à la synthèse de 2 ATP et à la formation de 2 NADH,H⁺ et de 2 pyruvates, d'où la réaction globale :



Dans les cellules aérobies, les hydrogènes et électrons du NADH, H⁺ sont transportés dans les mitochondries par des systèmes navettes pour être oxydés par la chaîne respiratoire.

Dans les cellules anaérobies, le NADH, H⁺ réduit le pyruvate en lactate dans le cytosol.

V/ Régulation de la glycolyse :

A/ Régulation métabolique :

La glycolyse fournit à la fois de l'ATP, essentiel pour couvrir les besoins énergétiques des organismes anaérobies et des précurseurs biosynthétiques. La vitesse de la glycolyse s'établit de manière à satisfaire ces deux besoins. Dans les voies métaboliques les réactions irréversibles sont souvent les lieux de contrôle. Les 3 sites de régulation se situent au niveau des 3 enzymes allostériques catalysant les réactions irréversibles de la glycolyse à savoir : l'hexokinase, la phosphofructokinase 1 (PFK 1) et la pyruvate kinase.

1^{er} point de contrôle :

La première étape $\text{glucose} \longrightarrow \text{G6P}$ se déroule sous l'action de l'hexokinase qui est une enzyme allostérique. Son action est régulée par la concentration de son produit immédiat, le G6P.

Dans les conditions normales, le sang fournit du glucose à toutes les cellules. La faible K_m de l'hexokinase (0,1mM) signifie que même à basse concentration, le glucose qui pénètre dans une cellule est rapidement converti en G6P, lequel s'engage alors dans la voie de la glycolyse. A mesure que les besoins énergétiques de la cellule se trouvent satisfaits, la concentration du G6P augmente réduisant ainsi l'activité de l'hexokinase. Après un repas riche en glucides, la concentration de glucose augmente car l'hexokinase est complètement saturée. Ceci va augmenter le flux de glucose au contact de la glucokinase hépatique. Cependant celle-ci ne peut opérer à une vitesse proche de sa V_{max} que si les niveaux du glucose sont \geq à 10 mM de sa K_m.

Ainsi, dans le cas où le glucose se trouve en excès par rapport à la demande normale, l'action réciproque des deux enzymes permet d'assurer sa conversion spécifique dans le foie en G6P lequel est ensuite stocké sous forme de glycogène hépatique.

2^{ème} point de contrôle :

La troisième étape $F6P \longrightarrow F1,6 \text{ BiP}$ se déroule sous l'action de la PFK1 enzyme allostérique qui est régulée de la manière suivante :

- Augmentée par l'ADP ou l'AMP :

Lorsqu'une cellule se trouve à faible niveau d'énergie, les quantités d'ADP et d'AMP sont plus élevées que la normale alors que l'ATP est peu abondante. Dans ces conditions l'enzyme est entièrement activée et présente une forte affinité pour son substrat le F6P.

- Inhibée par l'ATP, le NADH, H^+ , le citrate :

- Lorsque la cellule se trouve à haut niveau d'énergie, la concentration d'ATP est élevée et celles d'AMP et d'ADP sont faibles. Dans ce cas l'ATP s'attache à un site régulateur de l'enzyme pour ralentir son activité. L'enzyme a maintenant une affinité plus faible pour son substrat et la vitesse de la réaction décroît.
- L'enzyme est également inhibée par le citrate qui est un intermédiaire du cycle de l'acide citrique. Un taux élevé de citrate signifie que les précurseurs biosynthétiques sont abondants et ainsi une quantité supplémentaire de glucose ne doit pas être dégradée dans ce but. Le citrate inhibe la PFK en augmentant l'effet inhibiteur de l'ATP.
- Le NADH, H^+ inhibe également l'activité de la PFK en potentialisant l'effet inhibiteur de l'ATP. Cette inhibition sera levée dès que le NADH, H^+ est réoxydé en NAD^+

- Autre régulateur de la glycolyse : le fructose 2,6 BIP est un activateur très puissant de la PFK1 dans le foie. Il augmente son affinité pour le F6P et diminue l'effet inhibiteur de l'ATP.

Ce fructose 2,6 BIP est formé par phosphorylation du F6P grâce à la PFK2. D'autre part, le fructose 2,6 BIP est hydrolysé en F6P par une phosphatase spécifique : la fructose biphosphatase 2.

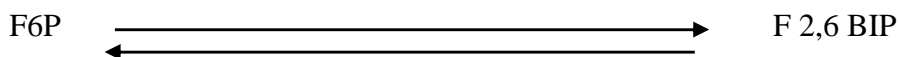
La PFK 2 et la fructose biphosphatase 2 sont toutes deux présentes dans une seule et unique chaîne polypeptidique appelée enzyme en tandem.

Le F6P accélère la synthèse de F 2,6 BIP et inhibe son hydrolyse. De ce fait, une augmentation de la disponibilité en F6P conduit à une concentration plus élevée de F 2,6 BIP qui elle-même stimule la PFK1.

De plus, les activité de la PFK2 et la fructose biphosphatase 2 sont réciproquement contrôlées par phosphorylation d'un seul résidu sérine.

Quand le taux de glucose est bas, une augmentation dans le sang du glucagon déclenche une cascade de réactions conduisant à la phosphorylation de cette enzyme bifonctionnelle. Cette phosphorylation active la fructose biphosphatase 2 et inhibe la PFK2 diminuant ainsi le taux de F2,6 BIP. Cela signifie que la glycolyse est freinée.

Inversement, quand le taux de glucose est augmenté, l'enzyme perd le groupement phosphate qui lui était attaché, ce qui conduit à une augmentation du niveau de F2,6 BIP et donc à une accélération de la glycolyse



3^{ème} point de contrôle :

Se situe au niveau de la dernière étape de la glycolyse PEP \longrightarrow PYRUVATE
sous l'action de la pyruvate kinase. La pyruvate kinase existe sous 3 formes :

- Type L : foie
- Type M : muscle et cerveau
- Type A : autres tissus

Ces variétés sont appelées isoenzymes : elles ont la même structure architecturale et le même mécanisme catalytique mais diffèrent par leur mécanisme de régulation.

- Les propriétés catalytiques de l'isoenzyme L sont également contrôlées par une phosphorylation réversible : quand le taux de glucose sanguin est bas, le glucagon déclenche une cascade de réactions qui augmente la proportion de pyruvate kinase phosphorylée (forme moins active). Le rôle de cette phosphorylation est d'empêcher le foie de consommer du glucose quand il est beaucoup plus urgent d'en fournir au cerveau et au muscle.
- L'isoenzyme M à l'inverse n'est pas phosphorylée de manière réversible
- L'isoenzyme A est intermédiaire entre M et L dans sa susceptibilité au contrôle par modification covalente.

La pyruvate kinase, enzyme allostérique, est activée par le F 1,6 BIP et le PEP. Elle est inhibée par l'ATP, le citrate et les acides gras à longues chaînes.

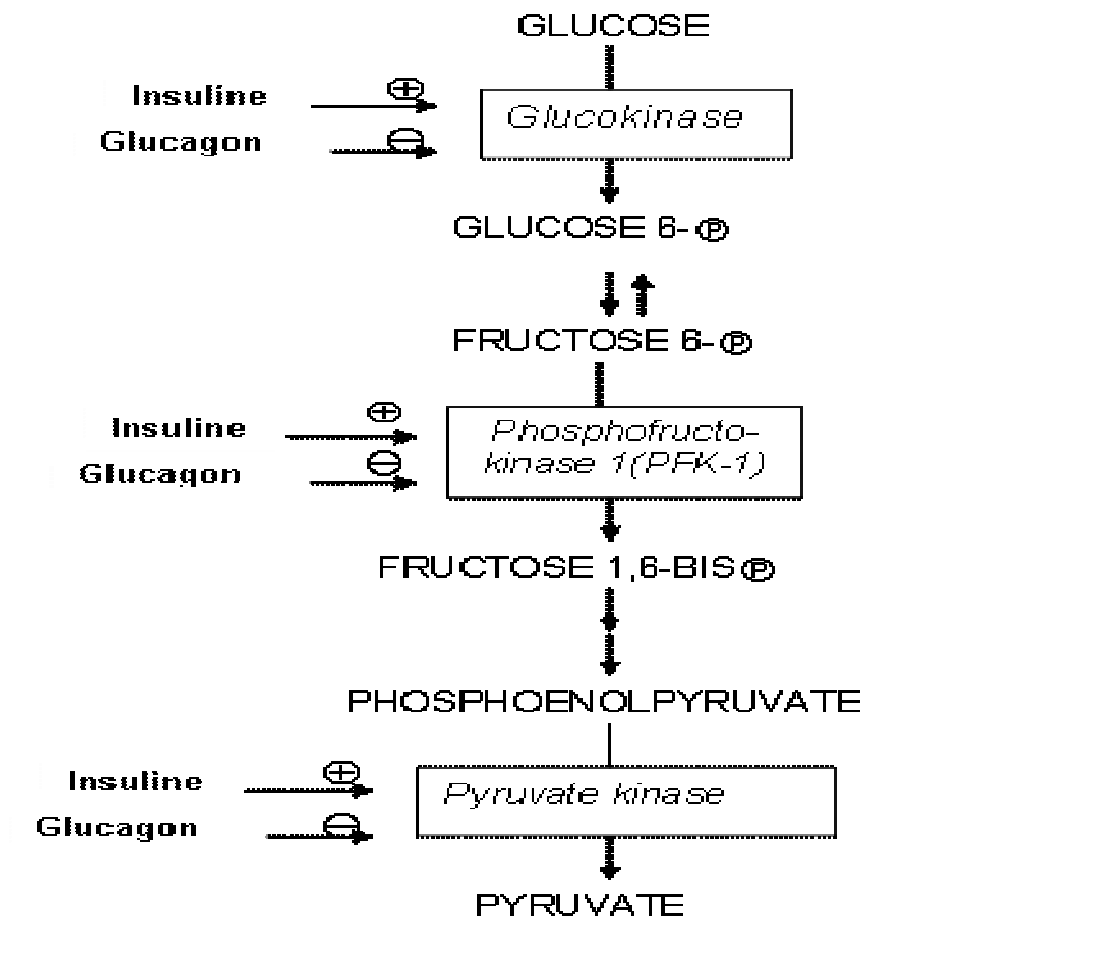
L'activité de la pyruvate kinase est régulée de manière analogue à celle de la PFK. Les deux enzymes sont inhibées quand la cellule se trouve dans un état d'énergie élevé ou lorsque sont disponibles d'autres combustibles (AG) que le glucose.

Quand la concentration d'ATP est basse, la PFK est activée ; elle produit le F 1,6 BIP (activateur de la pyruvate kinase) lequel est converti en un second activateur le PEP.

Quand la concentration d'ATP est élevée l'activité de la pyruvate kinase et celle de la PFK sont réduites ce qui entraîne une augmentation de la concentration du F6P, et par là même une augmentation de la concentration du G6P inhibant de ce fait l'hexokinase.

La glycolyse est donc contrôlée dans toutes les cellules par ces trois enzymes. Si des cellules se trouvent à un niveau énergétique élevé ou si le glucose y est abondant, sous l'action de la glucokinase celui-ci est capturé par le foie où il sera stocké sous forme de glycogène.

B/ Régulation hormonale :



VI/ Anomalie de la glycolyse dans le foie et dans le pancréas :

La découverte de mutations sur le gène de la glucokinase a permis de caractériser un diabète monogénique à début précoce appelé diabète MODY 2 (Maturity Onset Diabetes of the Young, type 2). La diminution de l'activité enzymatique de la glucokinase est associée dans les cellules B du pancréas à une diminution du flux glycolytique pour un niveau glycémique donné. Ce défaut se traduit par l'élévation du seuil glycémique induisant la sécrétion d'insuline ; celle-ci est globalement diminuée de moitié. Dans les hépatocytes, le stockage du glucose en glycogène est diminué et la néoglucogénèse augmentée expliquant l'hyperglycémie. Ce type de diabète est donc à la fois une maladie hépatique et pancréatique.

Docteur N KOUIDER

Laboratoire de Biochimie

CHU Constantine

Année universitaire 2016-2017

Bibliographie :

- Florian Horn, Gerd Lindenmeier, Christian Grillhosl, Isabelle Moc, Silke Berghold, Nadine Schneider, Brigit Munster Biochimie humaine 2005
- Geneviève Durand, Jean-Louis Beaudeux Biochimie médicale : marqueurs et perspectives 2008
- Werner Muller, Esterl Biochimie et Biologie Moléculaire 2007
- Bernadette et Philippe heketsweiler Voyage en Biochimie : circuits en biochimie humaine, nutritionnelle et métabolique 3^{ème} édition 2012