

Université Paris-Saclay
Faculté de Pharmacie

Biochimie
métabolique
UE4

2022-2023

Polycopié 1

*Les numéros entre crochets correspondent
aux diapositives du Diaporama PowerPoint.*

INTRODUCTION GENERALE

Le métabolisme se définit très largement comme l'ensemble des réactions chimiques qui s'accomplissent dans un organisme.

Le métabolisme intermédiaire est une notion plus restrictive et peut se définir comme un réseau hautement intégré de réactions chimiques couplées et interconnectées, localisées au sein d'une cellule (incluant les capacités d'échange de métabolites) et nécessaires afin de garantir le développement et la reproduction d'un organisme. Il est souvent réduit au métabolisme énergétique qui décrit l'ensemble des réactions impliquées dans le stockage et la production de métabolites nécessaires pour la biosynthèse de molécules fonctionnelles. Ces réactions sont souvent classées en voies anaboliques ou cataboliques.

Pour des contraintes d'enseignement, chacune de ces voies métaboliques est présentée, trop simplement, de façon isolée, compartimentée comme étant une succession de réactions enzymatiques aboutissant à un produit unique. Cette segmentation du métabolisme intermédiaire ne rend pas compte de :

- la complexité des voies métaboliques qui donnent naissance à de multiples produits par l'utilisation de substrats alternatifs surtout en situation pathologiques
- des aspects dynamiques de flux et de tissus spécificité
- des interrelations entre les différentes voies métaboliques et de leurs régulations fines.

Vous avez vu en PASS l'organisation des principales voies métaboliques, **cette année sera consacrée aux modes de régulation et aux interrelations métaboliques à travers les échanges inter-organes.**

LE METABOLISME ENERGETIQUE

La biochimie métabolique enseignée en DFGSP2 est essentiellement la biochimie métabolique des voies énergétiques.

Vont être successivement abordées dans cette partie introductive, l'organisation générale de ces voies métaboliques énergétiques, puis une approche tissulaire du métabolisme énergétique permettant de comprendre les besoins et les rôles des principaux tissus et organes de l'organisme en y intégrant les principaux mécanismes de la régulation de ce métabolisme.

1- Organisation générale [3 - 5]

Il faut tout d'abord se rappeler que chaque cellule de notre organisme doit assurer sa propre survie et accomplir un certain nombre de travaux en relation avec sa fonction propre. Tous ces phénomènes reposent sur l'existence au sein de la cellule de très nombreuses voies métaboliques (elles-mêmes reposant sur un nombre encore plus important d'enzymes et de transporteurs) qui coopèrent pour assurer :

- 1) l'obtention d'énergie chimique par la dégradation des nutriments riches en énergie
- 2) la conversion des nutriments en molécules de bases utilisables par la cellule
- 3) la synthèse et la dégradation de molécules complexes nécessaires à la vie de la cellule
- 4) le stockage de molécules énergétiques.

Enfin, dans le cas du métabolisme de nos cellules plusieurs remarques initiales peuvent être formulées :

- nos cellules puisent leur carbone, non pas du CO₂ atmosphérique (autotrophie) mais de molécules organiques apportées par l'alimentation (hétérotrophie)
- la plupart des réactions chimiques qui se déroulent dans les différentes voies métaboliques mises en jeu au sein de chaque cellule se font à pression constante et à température pratiquement constante (isothermie)

Il faut également distinguer parmi toutes les voies métaboliques

- **les voies cataboliques** : ce sont des voies d'oxydation des substrats énergétiques qui produisent principalement des formes réduites de coenzymes d'oxydo-réduction (NADH, H⁺ et FADH₂), sources de production d'ATP au niveau de la mitochondrie (voie de la phosphorylation oxydative) ; la production directe d'ATP sans passer par des coenzymes réduits est très limitée. Les principaux substrats de ces voies oxydatives sont les sucres (le glucose) et les lipides (acides gras), et dans une moindre mesure les protéines. Elles produisent des molécules intermédiaires importantes comme le pyruvate et l'acétyl-CoA, molécules à fort potentiel énergétique qui en aérobie et au travers du cycle de Krebs, conduisent à la production de coenzymes réduits et d'ATP, comme évoqués ci-dessus. Ces voies sont également qualifiées d'exergoniques (enthalpie libre négative, libère de l'énergie dont une partie se dissipe sous forme de chaleur).

Les corps cétoniques sont une autre source de substrats énergétiques, ils sont formés au niveau hépatique dans les situations de forte production d'acétyl-CoA et sont utilisables par la plupart des tissus (sauf le foie lui-même).

- **les voies anaboliques** : elles permettent la synthèse de molécules nécessaires à la croissance et des macromolécules de stockage de l'énergie (glycogène, triglycérides). Toutes ces voies exigent un apport énergétique et sont alors qualifiées de voies endergoniques. Ces voies concourent à différents travaux mécaniques (contraction) ou biologiques (transport actif, sécrétion, croissance) mais également à la production de chaleur (thermogénèse).

On notera que le métabolisme énergétique est essentiel pour le maintien de la température centrale des mammifères et que la thermogénèse ne résulte pas toujours de l'hydrolyse directe d'ATP en ADP, mais peut également provenir directement de nombreuses réactions d'oxydations.

2- Besoins et rôles des différents organes vis-à-vis du métabolisme énergétique [6 – 8]

En fonction de leurs rôles spécifiques et de leur équipement enzymatique, les différents organes vont utiliser tout ou partie des voies du métabolisme énergétique pour permettre l'adaptation de l'organisme a) à l'état nutritionnel et b) au niveau d'activité physique du moment.

Pour l'état nutritionnel, nous distinguerons l'état nourri ou phase postprandiale (1 à 2 h après le début du repas) suivit d'une phase intermédiaire puis de l'état de jeûne dit précoce (4 à 6 h après la fin du repas) puis dit physiologique (8 à 16 h après la fin du repas). De la même façon, pour l'exercice physique, il faudra distinguer l'effort physique bref et intense de quelques dizaines de secondes et l'effort physique prolongé (jogging de 30 minutes ou marathon de quelques heures).

Les spécificités du métabolisme énergétique et les interrelations métaboliques entre les différents organes clés seront abordées lors du 1^{er} cours-ED qui suivra l'ensemble des cours magistraux définissant ces voies (cf en fin de document)

3- Mécanismes de régulation [9 – 26]

Le fonctionnement harmonieux du métabolisme énergétique suppose naturellement que toutes les voies concourant à ce métabolisme soient étroitement régulées et coordonnées, de plus, de façon tissu-dépendant. Cette régulation repose sur l'existence de **signaux** (témoins du besoin d'adaptation) qui peuvent être **intracellulaires** (métabolites, calcium...) chargés de moduler l'activité enzymatique de diverses enzymes, ou qui peuvent être **extracellulaires** (hormones, neuromédiateurs) régulant à encore l'activité de certaines enzymes (variation qualitative des enzymes) ou modifiant leur niveau d'expression dans la cellule (variation quantitative des enzymes).

Trois hormones ou neuromédiateurs jouent un rôle très important dans le métabolisme énergétique. Il s'agit d'une part du **glucagon** et des **catécholamines** présents en cas de jeûne et/ou d'exercice physique et **qui de façon générale conduisent à une phosphorylation d'enzymes régulatrices**, et d'autre part de **l'insuline** (présente en phase post-prandiale) qui **conduit à l'opposé à une déphosphorylation de ces mêmes enzymes régulatrices**. De plus, ces trois molécules peuvent induire des régulations de nature transcriptionnelle conduisant à la modulation de la quantité de ces mêmes enzymes au niveau intracellulaire.

Dans tous les cas, **les effecteurs de ces signaux sont donc des enzymes** qui jouent un rôle particulier et spécifique dans la régulation des voies métaboliques du métabolisme énergétique [9 - 10].

Sur un plan théorique, plusieurs modes de régulation sont utilisées par la cellule :

- + La **disponibilité en substrat** est en soi un facteur limitant (voir en enzymologie l'équation de Michaelis-Menten) [11]
- + La **présence d'inhibiteur** (en général le produit ultime de la voie métabolique) est également un mode assez courant de régulation (rétrocontrôle négatif), qu'il s'agisse d'un mécanisme d'inhibition compétitif ou non

compétitif [11]

- + L'**allostérie** est quant à elle un mode très fréquent et très important de régulation **qui permet un « dialogue » (crosstalk) entre différentes voies métaboliques**. Le modulateur, positif ou négatif, agit par **modification de la structure quaternaire de l'enzyme**, ce peut être le produit ultime de la voie ou un témoin direct ou indirect de la charge énergétique de la cellule (ATP, AMP, citrate, acétyl-CoA). Parmi les enzymes régulées selon ce mode, citons en particulier, la PFK-1, l'Acétyl-CoA carboxylase, la Pyruvate carboxylase [12]

Ces trois premiers modes de régulation correspondent donc à des signaux intracellulaires et sont extrêmement rapide, presque instantanée (quelques ms à quelques s) à mettre en œuvre.

- + La régulation par **modification covalente** de l'enzyme repose essentiellement sur la modification de l'**état de phosphorylation** de certaines enzymes régulatrices. Elle est également un mode de régulation très fréquent.

Moins rapide que l'allostérie (quelques s à plusieurs mins), ce mode de régulation repose sur l'existence d'enzymes spécifiques capables de phosphoryler d'autres protéines. Ces enzymes sont **des protéines kinases qui phosphorylent les groupements OH de la Serine, de la Thréonine ou de la Tyrosine**. Comme évoqué plus haut, des hormones comme le glucagon et les catécholamines conduisent à l'activation de ces protéines kinases. Les enzymes régulatrices ainsi phosphorylées peuvent naturellement subir une déphosphorylation, ce qui est le fait de protéines phosphatases, qui sont régulièrement activées par l'insuline.

En fonction de l'enzyme considérée, certaines sont actives sous forme phosphorylée, alors que d'autres le sont sous forme non phosphorylée.

Parmi les enzymes régulées selon ce mode, citons en particulier l'enzyme bifonctionnelle PFK-2/FBPase-2, l'Acétyl-CoA carboxylase, la Glycogène phosphorylase, Glycogène phosphorylase kinase et la Glycogène synthase [13 - 14]

Il faut également souligner que ces modifications par phosphorylation donnent lieu à de véritables **casades de réactions enzymatiques**. Il y a ainsi **amplification** du message ; une voie de signalisation initiée par une faible concentration de ligand peut avoir comme résultat d'activer 1000 à 10.000 fois plus de molécules au final. La diffusion des molécules entraîne par ailleurs une **dispersion géographique** des signaux. Enfin, dans ce système, les activations se font avec des délais différents : il y a donc une **chronologie d'effet** qui s'établit.

Par définition, les **signaux de phosphorylation sont transitoires**. Toute phosphorylation, par une protéine kinase, sera obligatoirement suivie d'une déphosphorylation par une protéine phosphatase, qui, elle aussi, fait l'objet de régulations. On connaît des phosphatases spécifiques des (P) Ser/Thr ; ce sont par exemple les PP1, PP2A, PP2C assez peu spécifiques ou la PP2B très spécifique et qui peut être activée par un signal calcium. Il existe par ailleurs des phosphatases particulières pour les (P)Tyr.

- + La **régulation transcriptionnelle des gènes** codant pour des protéines enzymatiques est un autre mode de régulation [15 - 16]. Ce mode de régulation est un mécanisme d'adaptation beaucoup plus lent allant que les précédents.

+

Ces deux derniers modes de régulation s'exercent en réponse à des signaux extracellulaires et donc principalement aux modes d'action des hormones (glucagon, insuline) et des catécholamines déjà citées.

La liaison de molécules extracellulaires (hormones) reconnues par un récepteur spécifique qui déclenche une cascade de réactions spécifiques (amplification spatio-temporelle) définit un mécanisme appelé transduction du signal :

- Les récepteurs peuvent être directement localisés dans le cytoplasme des cellules pour les hormones lipophiles (ex : les stéroïdes et les hormones thyroïdiennes), le complexe hormone-ligand va alors gagner le noyau où il peut exercer directement ses effets sur le génome. Dans ce cas, la transmission de l'information est relativement simple et repose directement sur le complexe constitué de l'hormone et de son récepteur.
- Les récepteurs peuvent également être localisés au niveau des membranes cellulaires pour les hormones peptidiques ou protéiques. Dans ce cas, la cascade de transduction est complexe et nécessite : un transmetteur, un effecteur primaire, des seconds messagers (ou des ions) et des effecteurs secondaires [18]. En ce qui concerne le transmetteur, il en existe deux types correspondant ainsi à deux grands modes de transmission :
 - transmission par des récepteurs couplés à des protéines G (exemple du glucagon et des catécholamines) -
 - transmission par le récepteur lui-même (exemple de l'insuline).

En ce qui concerne les **récepteurs membranaires couplés aux protéines G**, le **récepteur** est toujours une **glycoprotéine transmembranaire** constitué d'une chaîne protéique unique réalisant **sept passages transmembranaires**, ou 7TMB. Il **reconnait de manière spécifique le ligand (premier messenger)**. Le **transmetteur** est constitué par des protéines G qui sont des **protéines hétérotrimériques**, localisées au niveau de la membrane, jouxtant le récepteur. Elles sont formées d'une sous-unité α contenant un site de liaison d'un nucléotide guanylique, d'une sous-unité β et d'une sous-unité γ .

A l'état de repos on trouve le complexe $\alpha\beta\gamma$.

La sous-unité α lie le GDP à l'état de repos. Lorsque le complexe ligand-récepteur se forme, il recrute une protéine G induisant un changement de conformation de la sous-unité α . Le site de fixation du GDP s'ouvre, libère le GDP, qui est alors remplacé par un GTP présent en concentration plus élevée dans le cytosol. C'est le signal d'activation de la protéine G : le complexe $\alpha\beta\gamma$ se dissocie, libère la sous-unité α qui va transmettre le relais vers l'élément suivant : l'**effecteur**. La sous-unité α possède également une propriété GTPasique, qui en hydrolysant le GTP en GDP programme l'arrêt du signal. Le complexe trimérique $\alpha\beta\gamma$ se reconstitue et revient à l'état de repos [19]. Il existe de nombreux types de sous-unités α spécifiques de l'effecteur quelle vont lier, certaines activatrices (Gs), d'autres inhibitrices (Gi)...

L'**effecteur** a pour rôle de générer un **second signal** qui non seulement transmet l'information mais l'amplifie. Toujours dans le cas du glucagon et des catécholamines, deux grands types d'effecteurs sont utilisés.

- Il s'agit d'une part de l'adénylyl- ou **adénylate-cyclase**, enzyme qui génère l'**AMPc**. Elle peut être couplée positivement à une protéine Gs, qui la stimule; c'est l'exemple du message reçu par les récepteurs α_2 adrénergiques ou le glucagon. L'adénylate cyclase peut aussi être couplée négativement à une protéine Gi qui au contraire l'inhibe, diminuant le taux d'AMPc intracellulaire message des récepteurs α_2 - adrénergiques. L'AMPc active à son tour une protéine kinase AMPc dépendante, ou PKA [20].

- Il s'agit d'autre part de la **phospholipase C (PLC)** qui se couple positivement à des protéines G activées par les agonistes α_1 -adrénergiques ou la vasopressine. La PLC est une enzyme qui **génère deux seconds messagers** à partir du phosphatidylinositol-bis-4,5(P) (PIP2). D'une part, le **diacylglycérol (DAG)**, composé hydrophobe qui reste à la membrane et active des **protéines kinases C (PKC)**. D'autre part, l'**inositol tri-(P) (IP3)**, molécule hydrophile qui diffuse dans le cytosol et provoque l'ouverture d'un **récepteur-canal transmembranaire du reticulum endoplasmique (RE)**. L'IP3 permet ainsi au Ca^{2+} concentré dans le RE de diffuser vers le cytosol (10^{-3} M dans le RE versus 10^{-7} M dans le cytosol). Cette augmentation du calcium ionisé dans le cytosol active des protéines kinases ou protéines phosphatases Ca-dépendantes [21].

Dans chacun de ces exemples, l'annulation du second messenger est réalisée soit par hydrolyse de l'AMPc par des phosphodiesterases, soit par une resynthèse du PIP2, soit par un repompage du Ca^{2+} dans le RE.

• Certains récepteurs membranaires possèdent directement une enzymatique de type kinase, par exemple le **récepteur de l'insuline**. Ce sont des **glycoprotéines transmembranaires, qui possèdent un domaine tyrosine kinase** cytosolique. La formation du complexe ligand-récepteur active l'activité tyrosine kinase qui va phosphoryler une cascade de protéines substrats intracellulaires qui vont être responsables de la réponse cellulaire. Il en découle le recrutement de diverses protéines portant des activités enzymatiques, ou elles-mêmes capables de recrutement ; l'ensemble forme alors des complexes protéiques à activités variées de transduction de signal [22].

• Parmi les mécanismes de transduction du signal, il convient de réserver une place particulière au **Calcium ionisé comme second messenger** [23]. En effet, l'ion Calcium est un second messenger ubiquitaire, ce qui peut paraître paradoxal car il ne possède pas de particularités structurales lui conférant une spécificité. Il peut se lier à des protéines possédant des domaines ne reconnaissant exclusivement que l'ion Ca^{2+} . Ce sont des "**Calcium Binding Protein**" ou Calciprotéines. La plus répandue est la **Calmoduline (Cam)**, qui dirige le Ca^{2+} vers des cibles protéines diverses ; la troponine, une autre calciprotéine, a une action plus spécifique en tant qu'activateur de la contraction musculaire.

Dans la cellule au repos, la concentration cytosolique de Ca^{2+} est de l'ordre de 10^{-7} M. Dans les liquides circulants et dans le RE, elle est de 10^{-3} M. La membrane plasmique permet l'entrée de calcium par des canaux, soit voltage-dépendants et répondant aux variations de potentiel (c'est particulièrement vrai pour des cellules excitables comme les neurones), soit répondant à d'autres stimuli. Le retour à l'état de repos, et donc la sortie Ca^{2+} du compartiment cytosolique, se fait contre un gradient, c'est un transport actif réalisé par des ATPases. Dans les cellules, il existe des compartiments de stockage comme la mitochondrie (mais d'où le calcium sort peu) et le RE lisse, ou dans le muscle le Reticulum Sarcoplasmique (RS), qui servent de réserves intracellulaires. La membrane du RE ou du RS sont elles aussi pourvues de canal récepteur transmembranaire (ce sont les récepteurs de l'IP3 et de la Ryanodine), ainsi que de pompes ATPases.

Dès que le Ca^{2+} sort de ses réserves, le gradient fait que $[\text{Ca}^{2+}]$ intracellulaire augmente massivement, jusqu'à être multipliée par 100. Ce signal est très transitoire car il y a un repompage très rapide dans les compartiments

de réserve.

La majorité des actions intracellulaires du Ca^{2+} sont médiées par la Calmoduline. C'est un polypeptide possédant 4 sites de liaison Ca^{2+} ou boucles calcium (séquence de 12 acides aminés très conservée au travers des espèces). Les conformations de ces boucles changent en quelques millisecondes sous l'effet de la liaison au Ca^{2+} qui se lie par des mécanismes coopératifs, transmettant ensuite à la protéine cible un signal de transconformation qui l'active. Cette liaison Ca^{2+} -Cam est réversible dès que $[\text{Ca}^{2+}]$ diminue.

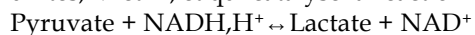
Ca^{2+} -Cam contrôle toutes sortes de protéines : les protéines kinases dites Ca^{2+} -dépendantes, les adénylate-cyclases qui forment l'AMPc, les phosphodiesterases qui hydrolysent les nucléotides cycliques dont l'AMPc. Le Ca^{2+} est au centre des mécanismes de sécrétion régulée, des neurones, de toutes les cellules sécrétrices comme a cellule β du pancréas.

+ La charge énergétique comme évoqué plus haut joue un rôle essentiel [24 et 58], l'énergie étant par définition critique pour toutes cellules, la fourniture et la demande énergétique doivent être étroitement organisée. Par les mécanismes d'allotérie déjà cités l'AMP et l'ATP régulent de façon opposée une sérine/thréonine kinase d'expression ubiquitaire : l'AMP kinase (AMPK). L'AMPK constitue un véritable sensor biologique des besoins énergétiques au niveau cellulaire. Activée par une augmentation des besoins énergétique (augmentation de l'AMP et diminution de l'ATP), L'AMPK a de multiples effets sur l'organisme selon l'organe concerné jouant directement sur l'activation ou l'inactivation de protéines par phosphorylation (modification qualitative) mais également sur le contrôle transcriptionnel (modification quantitative). Ainsi, schématiquement, au niveau hépatique L'AMPK stimule l'oxydation des acides gras et la synthèse des corps cétoniques, au niveau du tissu adipeux elle inhibe à la fois la lipolyse et la synthèse de triglycérides, au niveau du muscle elle stimule l'entrée du glucose et l'oxydation des acides gras.

+ Il ne faut pas non plus oublier le mode de régulation par les **formes isozymiques des enzymes** [25]. Par définition, les **isoenzymes** sont des enzymes catalysant la même réaction mais codées par des gènes différents, les séquences d'acides aminés différentes produisent des modifications de structure à l'origine de constantes cinétiques différentes (K_{cat} et K_m), ou de modes de régulation différents. Si ces isoenzymes ont des distributions cellulaires différentes, cela permet d'accéder à un nouveau mode de régulation.

Trois exemples peuvent être rapidement décrits :

1. la LDH ou lactico-deshydrogénase est une enzyme tétramérique constituée de deux types de sous-unités, M et H, et qui catalyse la réaction réversible :



Cinq isoenzymes sont par principe possibles et correspondent à ces cinq compositions en sous-unités (M₄, M₃H, M₂H₂, MH₃, H₄). La forme M₄, principalement présente dans le muscle, favorise la réaction dans le sens Pyruvate vers Lactate. La forme H₄, principalement présente dans le cœur, favorise la réaction inverse et la forme hépatique correspond à la forme H₂M₂ permet le fonctionnement dans les deux sens, en fonction des concentrations respectives de Pyruvate et de Lactate.

2. la Glycogène phosphorylase qui « dégrade » le glycogène en glucose existe également sous deux formes, codées d'ailleurs par deux gènes distincts : la forme hépatique régulable allostériquement par le glucose, et la forme musculaire qui elle est régulée par l'AMP de façon allostérique.

3. l'Hexokinase, enzyme de phosphorylation du glucose en glucose 6-P existe également sous plusieurs formes. En particulier, le foie exprime une Hexokinase de faible affinité pour le glucose ($K_m = 10 \text{ mM}$) appelée Glucokinase, alors que les hexokinases des autres tissus sont beaucoup plus affines pour ce même glucose ($K_m = 0,1 \text{ mM}$ en moyenne) [26].

+ Enfin, il convient de ne pas oublier que la **compartimentation cellulaire** (noyau, cytoplasme, mitochondrie) joue un rôle absolument essentiel pour la régulation globale du métabolisme énergétique avec en particulier le cytoplasme où a lieu la glycolyse, la voie des pentoses, le métabolisme du glycogène et la synthèse des acides gras, alors que la mitochondrie est le siège de la oxydation des acides gras, du cycle de Krebs, de la voie des phosphorylations oxydatives et de la première étape de la gluconéogenèse [27].

LE METABOLISME DES SUCRES

Au centre des métabolismes se trouve le **Glucose**.

- C'est l'ose circulant dont la concentration sérique de **5 mM** est l'objet d'une régulation très stricte sous le double contrôle du système nerveux central et du rapport hormonal **Insuline/Glucagon**. Le défaut de régulation à ce niveau va entraîner une hypoglycémie ou une hyperglycémie chronique c-a-d un diabète.
- Le glucose circulant **est capté par toutes les cellules** qui l'utilisent comme aliment énergétique ; certaines en sont particulièrement dépendantes : globule rouge, médullaire rénale, spermatozoïde, neurone ; ce sont les **tissus dits glucodépendants**.
- Certaines cellules utilisent le glucose, mais sont également capables d'utiliser d'autres substrats comme les acides gras et les corps cétoniques. C'est le cas par exemple du muscle squelettique et du myocarde.
- D'autres cellules ont pour vocation de mettre les substrats énergétiques en réserve. C'est le cas des cellules capables de stocker le glucose sous forme de glycogène comme le font le **muscle squelettique** et le **foie**. Ce dernier organe joue en outre un rôle essentiel de coordination de l'ensemble du métabolisme énergétique chez l'homme et plus particulièrement assure **l'homéostasie du glucose** [29].
C'est le cas également du **tissu adipeux** qui à partir du glucose peut synthétiser des acides gras et les stocker sous forme de **triglycérides**.

On voit donc que chaque type cellulaire va utiliser le glucose à des fins différentes nécessitant la mise en place de systèmes de régulation adaptés à ses propres objectifs métaboliques (cf fin de ce document).

DIGESTION ET ABSORPTION DES SUCRES

L'alimentation permet d'apporter à l'organisme des sucres complexes en quantité (amidon, glycogène...), peu de disaccharides (saccharose, lactose...), et encore moins de monosaccharides (glucose, fructose, mannose, galactose). Comme seuls ces monosaccharides sont absorbés au niveau du tractus digestif, il est nécessaire de transformer ces sucres complexes en sucres simples par le processus de digestion dans le tractus digestif et de terminer cette transformation dans les cellules intestinales [30].

- Plusieurs **enzymes digestives** sont susceptibles d'hydrolyser ces sucres [30].
 - **L'amylase salivaire** hydrolyse l'amidon et le glycogène en maltose, isomaltose et en dextrans à chaîne plus longue (coupure des liaisons $\alpha 1,4$ et $\alpha 1,6$). Cette action reste limitée car elle est inactivée pour un $\text{pH} \leq 4$, et donc cesse dans le milieu stomacal très acide.
 - La digestion se poursuit dans l'intestin grâce à **l'amylase pancréatique** qui possède des propriétés analogues à celles de l'amylase salivaire.
 - La digestion est complétée par les sécrétions intestinales de **disaccharidases** et **d'oligosaccharidases spécifiques**
- Les monosaccharides obtenus (principalement le glucose) sont **absorbés** avec un sodium au niveau du **pôle apical de l'entérocyte** (essentiellement dans le jéjunum), passent par des systèmes de transports spécifiques d'un ou plusieurs ose(s) qui nécessitent de l'énergie et un contre-transport d'ions sodium. Ces monosaccharides passent soit dans la circulation lymphatique, soit dans la circulation sanguine, et arrive massivement par la **veine porte (15 à 20 mM au moins)** au niveau des hépatocytes puis dans la circulation **sanguine générale** (5 mM normalement mais jusqu'à 7 à 8 mM en phase post prandiale) pour atteindre toutes les autres cellules [31].
- **L'entrée du glucose** dans les cellules nécessite impérativement la présence de transporteurs dont il existe deux types : des transporteurs actifs et des transporteurs passifs agissant selon le mécanisme général de diffusion facilitée [32-35].

- Les transporteurs actifs **SGLT1 et SGLT2** (Saturable Glucose Transporteur) [32-34]
 - * SGLT1, protéine transmembranaire (11 segments transmembranaires), **assure l'absorption du glucose dans l'entérocyte**. Fonctionne comme un symport glucose/Na⁺ couplée à une pompe Na/K permettant d'assurer le gradient de Na⁺
 - * SGLT2, **assure la réabsorption du glucose au niveau des néphrons**

- Les transporteurs passifs de type **GLUT** [35]

Famille de protéines d'environ 500 acides aminés à 12 passages transmembranaires. Chaque GLUT fonctionne comme une structure bilobulaire, 5 des 6 passages transmembranaires de chacun des lobules s'organisant pour former un canal permettant le passage des sucres. Les caractéristiques cinétiques de transport diffèrent d'un transporteur à l'autre et participe ainsi à la régulation de l'entrée du glucose dans les différents tissus où ils sont localisés [49]. Il a été mis en évidence à ce jour 12 GLUT dont les 5 principaux sont rapidement décrits dans le tableau ci-dessous.

Les Transporteurs du glucose [35]

	Localisation	Kt pour le glucose	Particularités
GLUT 1	Ubiquitaire : Cerveau , rein, colon, placenta, érythrocytes	~ 1 mM	Transport constant ~ V _{max}
GLUT 2	Foie, cellules β pancréatiques, rein	15 - 20 mM (entrée) 60 mM (sortie)	Transport adapté à la concentration
GLUT 3	Ubiquitaire : Cerveau , rein, placenta	~ 1 mM	Transport constant ~ V _{max}
GLUT 4	Muscles squelettiques, tissu adipeux	5 mM	Présence à la membrane dépend de l'insuline
GLUT 5	Intestin grêle		Couplé au transporteur SGLT1

GLYCOLYSE PAR LA VOIE D'EMBDEN MEYERHOF

Présentation [37]

La glycolyse par la voie d'Embden Meyerhof se définit comme la dégradation oxydative du glucose, par des étapes successives, et aboutissant à deux molécules de pyruvate, avec récupération de l'énergie directement sous forme d'ATP et indirectement en aérobie via la formation de coenzymes réduits NADH,H⁺.

Ultérieurement dans les cellules aérobies, des étapes qui prennent place dans la mitochondrie permettent la déshydrogénation décarboxylante (ou décarboxylation oxydative) du pyruvate en acétyl-CoA, puis via le cycle tricarboxylique de Krebs l'oxydation complète avec formation de CO₂ d' H₂O et de nouveaux Coenzymes réduits dont la réoxydation au niveau de la chaîne respiratoire aboutit à la formation de nouvelles molécules d'ATP.

Toutefois :

- certains organismes anaérobies stricts ne peuvent, en condition physiologique, tirer leur énergie que de la seule glycolyse cytosolique; on parle alors de **fermentation** (exemple des levures).
- Chez les mammifères, des conditions physiopathologiques peuvent faire que les cellules fonctionnent transitoirement en mode anaérobie : leur **seule source** de récupération **d'énergie** dans cette situation est la formation d'ATP dans le cytosol ; on parle alors de **glycolyse anaérobie**. La conséquence en est l'apparition d'une glycolyse exagérée : **effet Pasteur**. Cette glycolyse anaérobie nécessite impérativement la régénération du NAD⁺ à partir du NADH, H⁺ formé par la glycolyse. C'est pourquoi le pyruvate produit par la glycolyse est en condition d'anaérobie transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) qui régénère au court de la même réaction du NAD⁺ permettant la poursuite de la glycolyse sans passer par la chaîne respiratoire.

Différentes phases de la glycolyse (vu en PASS)

Globalement la glycolyse comporte :

- une phase de préparation (5 premières étapes) constituées de deux premières étapes d'investissement d'énergie (consommation de 2 ATP et obtention de Fru 1,6-bisP) plus une étape d'isomérisation et de deux étapes de « lyse » et d'isomérisation conduisant au glycéraldéhyde 3-P.
- une phase de récupération de l'énergie comportant aussi 5 étapes (récupération de 4 ATP, 2 NADH,H⁺ et formation de 2 pyruvates)

Les composés de toutes ces étapes sont des dérivés phosphates sous forme d'ester ou d'anhydride, sauf le produit final, le pyruvate.

L'intérêt de ces **intermédiaires phosphorylés** est triple :

1° entièrement ionisés à pH 7, chaque intermédiaire porte des charges (-). Comme les membranes sont imperméables aux composés chargés, **ils ne peuvent quitter ni la cellule ni le compartiment intracellulaire qui les contient**. En revanche, le pyruvate ou le lactate quitteront *in fine* la cellule par des systèmes de transport.

2° **conservation de l'énergie**, qui, en phase finale est transférée sur l'ADP pour régénérer l'ATP.

3° système de **reconnaissance** pour les sites actifs des enzymes régulant la glycolyse (régulation allostérique).

A - LES CINQ PHASES DE PRÉPARATION ET D'INVESTISSEMENT EN ÉNERGIE (rappel)

I - Formation de Glc 6-P

Irréversible $\Delta G^{\circ} = - 16,7 \text{ kJ/mole}$

L'une des trois grandes étapes de régulation de la glycolyse

Enzymes : Hexokinases et/ou Glucokinase

Consomme une molécule d'ATP

- 1° **Hexokinases** présentes dans la plupart des cellules
Nécessitent Mg²⁺

Faible spécificité de substrat : Glc, Fru, Man, qui entrent ainsi dans la glycolyse
Enzyme michaelienne fonctionnant pratiquement toujours à leur **vitesse maximale**

2° Glucokinase (ou hexokinase D) : enzyme hépatocytaire et cellules β du pancréas, absente ou présente en faible quantité dans les autres cellules.

Spécifique du glucose.

Couplée à GLUT2, l'ensemble formant un sensor biologique au glucose

Enzyme allostérique qui **adapte sa vitesse aux concentrations locales en glucose**

II - Isomérisation en Fructose 6-P

Transforme un aldose en cétose, via un intermédiaire ène-diol, et permet une phosphorylation dans la réaction suivante :

Phosphoglucoisomérase

Mg²⁺ nécessaire

Facilement réversible $\Delta G'^{\circ} = + 1,7 \text{ kJ/mole}$

Spécifique du Glc 6-P et du Fru 6-P

III - Phosphorylation en Fru 1,6-bisP

Phosphofructokinase-1: PFK-1

Consomme un second ATP pour cette phosphorylation du C1

Quasiment irréversible car très exergonique $\Delta G'^{\circ} = -14,2 \text{ kJ/mole}$

Second point important de régulation et l'un des plus complexes.

La PFK-1 est une enzyme régulée de façon majoritairement allostérique (jamais par phosphorylation/déphosphorylation), sensible à de nombreux effecteurs : témoins de la charge énergétique élevée (ATP, ADP, AMP) substrats intermédiaires (citrate), ainsi qu'à l'état nutritionnel [voir plus loin Fru 2,6-bisP].

IV - Clivage en deux trioses (P) : Glyceraldéhyde 3-P et dihydroxyacétone P ou (DHAP)

Fructose 1,6-bisP Aldolase. Enzyme tétramérique.

Produit un aldose et un cétose qui sont (P) : la dihydroxyacétone-P (DHAP) et le glyceraldéhyde 3-P.

Illustre un point métabolique important: la réaction est très **endergonique** dans des conditions standards, $\Delta G'^{\circ} = + 23,9 \text{ kJ/mole}$ et donc apparemment rend peu probable ce clivage. Toutefois si l'on tient compte de la concentration des réactants, le $\Delta G'$ réel = $-1,3 \text{ kJ/mole}$: apparaît à l'équilibre mais de fait évolue vers l'aval, en raison de la consommation rapide des produits par les étapes suivantes de la glycolyse.

V - Isomérisation de la DHAP en Glyceraldéhyde 3-P

Triose Phosphate Isomérase

Endergonique dans les conditions standards $\Delta G'^{\circ} = + 7,6 \text{ kJ/mole}$, mais le produit est rapidement « tiré » vers la réaction suivante, donc évolue vers l'aval.

Bilan des 5 premières réactions : 1 Glc + 2 ATP -----> 2 trioses-P + 2 ADP

avec pour chacun de ces deux trioses une énergie d'hydrolyse élevée, ce qui va permettre de régénérer ultérieurement l'ATP

L'investissement en énergie a été de deux ATP.

B - LES CINQ PHASES DE RÉCUPÉRATION DE L'ÉNERGIE

I - Génération du Premier Composé riche en Energie : le 1,3-bisP Glycérate

Glyceraldéhyde 3-P Deshydrogénase (G3PDH), coenzyme NAD⁺

L'une des étapes les plus importantes de la glycolyse ; va générer le premier intermédiaire riche en énergie, et des équivalents réducteurs. Production de 1 NADH, H⁺

Endergonique $\Delta G'^{\circ} = + 6,3 \text{ kJ/mole}$.

A ce niveau, la poursuite de la glycolyse dépend de la régénération de NAD^+ à partir du NADH,H^+ formé.

II - Transfert du Phosphate du 1,3-bisP glycérate sur l'ATP

Phosphoglycérate kinase

Forme le 3-P Glycérate

Réaction exergonique $\Delta G^{\circ} = -18,8 \text{ kJ/mole}$. (correspond à la différence du ΔG° d'hydrolyse du 1,3-bisP glycérate soit $-49,3$ et du ΔG° de l'ATP soit $+30,5$).

Transfère un G. (P), d'énergie d'hydrolyse élevée, du carboxyle du 3-P Glycéroyl P sur l'ADP pour régénérer de l'ATP en formant un 3-P glycérate.

III - Transformation du 3-P Glycérate en 2-P Glycérate

Phosphoglycérémotase, Mg^{2+} indispensable

$\Delta G^{\circ} = +4,4 \text{ kJ/mole}$, donc légèrement endergonique dans les conditions standards, mais la concentration intracellulaire du 3-P Glycérate est élevée par rapport à celle du 2-P Glycérate qui est rapidement consommé, donc la réaction évolue vers la droite.

IV - Génération du second composé riche en énergie : le Phospho Enol-Pyruvate ou PEP

Enolase, Mg^{2+} ou Mn^{2+} , inhibée par les ions fluorures

C'est la première étape de la seconde phosphorylation liée au substrat. Le mécanisme est une réaction d'oxydo-réduction intramoléculaire avec élimination d'une molécule d'eau.

Le ΔG° est faible ($-7,5 \text{ kJ/mole}$), mais la réaction d'oxydation a cependant pour effet d'augmenter considérablement l'énergie libre d'hydrolyse de la liaison (P) :

de $-17,6 \text{ kJ/mole}$ sur le 2-P Glycérate

à $-61,9 \text{ kJ/mole}$ sur le PEP

V - Transfert du (P) du PEP sur l'ATP et formation du pyruvate

Pyruvate Kinase, Mg^{2+} ou Mn^{2+} et K^+ . Tétramère 250 kD

Seconde partie de la réaction d'oxydation phosphorylante liée au substrat, dont l'intermédiaire commun est le PEP.

$\Delta G^{\circ} = -31,4 \text{ kJ/mole}$. En fait le ΔG° d'hydrolyse du PEP a une valeur quasiment du double, mais la moitié sert pour synthétiser l'ATP ($\Delta G^{\circ} = -30,5 \text{ kJ/mole}$), et le reste est utilisé comme force d'entraînement de la réaction qui est de ce fait irréversible

Etape régulée.

Cette dernière étape rend la glycolyse rentable par les 2 ATP récupérés en formant deux pyruvates.

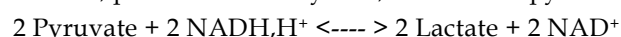
Devenir des produits formés

I Ø LE PYRUVATE

Est un métabolite central, carrefour des flux métaboliques.

En condition anaérobie [47]

Les coenzymes réduits formés, présents dans le cytosol, réduisent le pyruvate en lactate :



Les coenzymes sont régénérés pour continuer la glycolyse, le bilan total est de 2 ATP seulement (+ 2 lactate à exporter).

C'est ce qui se passe dans les conditions physiologiques d'hypoxie du muscle du squelette, ou du muscle strié cardiaque. C'est également le cas dans les globules rouges où il n'y a pas de mitochondrie et où le **seul apport énergétique** vient de la glycolyse anaérobie.

Le L-lactate s'accumule dans les cellules en produisant une acidose et est exporté

Le ΔG° de la réaction pyruvate \rightarrow lactate est de - 26 kJ/mole.

L'enzyme est la **lactate déshydrogénase** ou **LDH** déjà abordé précédemment.

Les isoenzymes de la LDH diffèrent par leur K_M , v_{Max} et leurs régulations par les flux en substrats ou produits et notamment selon les rapports :

$$\frac{[NAD^+]}{[NADH, H^+]} \quad \text{et} \quad \frac{[Pyruvate]}{[Lactate]} \quad \text{qui sont liés ;}$$

ces rapports sont le reflet du pouvoir réducteur (ou potentiel rédox) du cytosol de la cellule

Dans le muscle du squelette, au cours d'un exercice rapide (anaérobie relative), la LDH favorise la réduction du pyruvate en lactate en quantité importante (forme M4), lactate qui peut être exporté normalement vers les tissus aérobies : hépatocyte, muscle cardiaque et le rein. Le neurone, en situation de besoin énergétique est également capable d'utiliser le lactate comme substrat énergétique pour l'oxyder. On peut aller jusqu'à 50 % de pyruvate transformé en lactate, que l'hépatocyte, le cœur et le rein réutilisent.

Dans le foie et le cœur convenablement oxygénés, le rapport oxydo-réducteur est supérieur ($NAD/NADH, H^+$) à celui du muscle en exercice ; l'équilibre de la réaction évolue vers l'oxydation du lactate en pyruvate pour régénérer du $NADH, H^+$; c'est ce qui se passe majoritairement au niveau du cœur (forme H4 de la LDH). Le pyruvate formé va vers d'autres voies métaboliques : par exemple, dans la majorité des cellules, il subit une transamination intense en alanine, ou bien dans le cœur il va passer dans la mitochondrie pour être oxydé dans le cycle de Krebs, ou bien dans l'hépatocyte il va entrer dans la voie de la gluconéogenèse.

La transformation en lactate est le terme ultime de la transformation du glucose pour de nombreux microorganismes. C'est le cas des bactéries lactiques qui forment du lactate, qui lui-même acidifie le lait, dénaturant la caséine et les autres protéines du lait, ce qui les fait précipiter (le contrôle de cette réaction permet la production de fromages et de yaourts).

Autres Destinées du Pyruvate

* dans certains microorganismes, telle la levure, fermentation alcoolique anaérobie :

La **Pyruvate décarboxylase** (enzyme à Mg^{2+}) catalyse la première étape ; elle est présente dans la levure de bière et dans d'autres microorganismes capables de fermentation, y compris certaines plantes.

L'**Alcool déshydrogénase** catalyse la seconde étape. Elle est présente dans les nombreux microorganismes comme les levures capables d'effectuer la suite des réactions de fermentation ; elle est présente aussi chez l'homme dans l'hépatocyte et permet l'oxydation de l'éthanol en acétyl-CoA.

* transamination en **alanine**

En condition aérobie

Le pyruvate passe dans la mitochondrie où il sera réduit et décarboxylé et déshydrogéné par la **Pyruvate déshydrogénase**, enzyme soumise à une importante régulation, pour donner l'**acétyl-CoA** qui peut selon les besoins et les tissus :

- aller vers les réserves donnant acides gras et triacylglycérols. Etat de pléthore : le tissu adipeux forme des réserves de lipides, l'hépatocyte produit des VLDL, le muscle constitue ses réserves.
- aller vers l'oxydation dans le cycle de Krebs dans la mitochondrie : le neurone par exemple

II - LES COENZYMES RÉDUITS $NADH, H^+$

Le transport du pouvoir réducteur se fait par des navettes [48 - 50]

- Les coenzymes réduits doivent être réoxydés :
 - 1° pour pouvoir à nouveau remplir leur rôle de coenzymes pour l'oxydation des substrats
 - 2° pour que ces oxydations donnent lieu à une récupération d'énergie.

• Cette **régénération** prend place dans la **chaîne respiratoire** au niveau de la **mitochondrie**, alors que les divers nucléotides impliqués dans ces réactions d'oxydo-réduction sont produits dans le cytosol, le NADH,H⁺, et ne peut traverser les membranes et en particulier la membrane interne de la mitochondrie. Pour transporter les équivalents réducteurs (protons, électrons), du cytosol vers la matrice de la mitochondrie ou inversement, il faut des mécanismes appelés "navettes". Ils impliquent des réactions successives d'oxydo-réduction en utilisant des composés intermédiaires.

Deux des plus importantes de ces navettes, qui fonctionnent dans les réactions du métabolisme des glucides, sont la **navette α -glycérophosphate (muscle, cerveau)** et la **navette malate-aspartate (foie, rein, coeur)**. Pour leur fonctionnement, il est nécessaire que les enzymes catalysant les transformations nécessaires soient présentes dans chacun des compartiments, voire sur le versant correct de la membrane.

1° Navette α -glycérophosphate (monodirectionnelle) [49]

Au cours d'une première étape, le NADH,H⁺ cytosolique est régénéré en NAD⁺ par un transfert de son pouvoir réducteur sur la dihydroxyacétone-P pour former du glycérol-3P par la glycérol 3-Phosphate deshydrogénase cytosolique. Afin de régénérer la dihydroxyacétone-P à son tour intervient une seconde deshydrogénase qui va transférer le pouvoir réducteur dans la mitochondrie sur le FAD, en transformant du FADH₂. Cette seconde réductase est une autre isoenzyme de la glycérol 3-Phosphate deshydrogénase localisée dans la membrane interne de la mitochondrie. L'étape irréversible est ici catalysée par la glycérol 3-phosphate deshydrogénase mitochondriale qui régénère la dihydroxyacétone phosphate ; le site actif de cette enzyme est tourné vers cette membrane interne, ce qui évite au glycérol 3-phosphate de pénétrer complètement dans le mitosol (lumière de la mitochondrie). Le FADH₂ sera oxydé en FAD directement par les cytochromes de la chaîne respiratoire.

Il faut remarquer que

- chaque isoenzyme possède un coenzyme différent, le couple NAD⁺/NADH, H⁺ pour la glycérol 3-Phosphate deshydrogénase cytosolique et le couple FAD/FADH₂ pour l'isoenzyme mitochondriale
- par conséquent l'utilisation de cette navette ne permet pas un rendement optimum en ATP puisque l'utilisation du coenzyme à FADH₂ ne permet la production théorique que de deux ATP (au lieu de trois ATP pour le NADH,H⁺).

2° Navette malate-aspartate [50]

Par cette navette, le pouvoir réducteur est transféré sur l'oxaloacétate pour former du malate sous l'action de la malate deshydrogénase. Le malate qui possède un transporteur mitochondrial traverse la membrane interne de la mitochondrie où une autre isoforme de la malate deshydrogénase régénère le NADH,H⁺ et redonne de l'oxaloacétate. Le NADH,H⁺ sera oxydé en NAD⁺ directement par la chaîne respiratoire.

Le retour de l'oxaloacétate dans le cytosol est plus complexe car :

- l'oxaloacétate ne peut passer la membrane et doit donc subir une réaction de transamination
- l'enzyme catalysant la transamination (aspartate aminotransférase) est présente sous deux isoformes l'une dans le cytol et l'autre dans la mitochondrie et pourra donc catalyser les deux réactions de transamination de chaque côté de la membrane
- ces transporteurs permettent les échanges entre aspartate intra-mitochondrial contre glutamate cytosolique, et malate cytosolique contre α -cétoglutarate mitochondrial.

Nous avons vu précédemment que la LDH étant purement cytosolique, le rapport [lactate]/[pyruvate] est utilisé comme témoin du potentiel réducteur du cytosol ; pour la mitochondrie, c'est classiquement le rapport

[hydroxybutyrate]/[acétoacétate] en équilibre sous l'action de l'hydroxybutyrate déshydrogénase (voir cours de P. Billiard) le couple NAD^+ , NADH,H^+ étant le coenzyme commun de toutes les déshydrogénases de ces systèmes, ces rapports varient comme le rapport : $[\text{NADH,H}^+]/[\text{NAD}^+]$.

Bilan de la glycolyse

Le bilan énergétique final va dépendre du devenir des produits formés. **Bilan en anaérobie** [51]
Bilan en aérobie [52]

Régulation de la glycolyse

Les étapes régulées correspondent aux étapes irréversibles de la glycolyse, c'est-à-dire celles dont le ΔG est très négatif [53 - 54]. Il y a donc **trois points majeurs**, tous correspondant à des étapes catalysées par des **KINASES** et constituent de véritables carrefours métaboliques..

Pourquoi la glycolyse présente-t-elle ces multiples étapes de contrôle ?
Selon les cellules et les circonstances, la finalité métabolique est variable : anabolique ou catabolique. La glycolyse génère de l'ATP mais aussi des composés qui se dirigeront vers d'autres voies selon les besoins des cellules, en particulier au niveau des carrefours sujets à régulation. En fonction du rôle de la glycolyse dans chacun de ces organes, les étapes de contrôle vont être plus ou moins complexes.

NB : les trois étapes majeures de régulation sont celles qui sont catalysées par des enzymes différentes lors des trois étapes « inverses » de la gluconéogenèse [55]:

1. Glc ----> Glc 6-P [56]

Cette étape est commune à plusieurs voies métaboliques
-> Glycogénogenèse
-> Glycolyse par la voie d'Embden Meyerhof
-> Voie des pentoses (P)

Comme indiqué plus haut, deux enzymes peuvent être impliquées :

a) *Hexokinase*

Forte affinité, bas $K_m = 0,1\text{mM}$ (0,5 à 0,01) ; comme les concentrations intracellulaires de Glc sont beaucoup plus élevées, l'enzyme fonctionne en permanence en condition de V_{max} .

Forte capacité.

Plusieurs isoformes : isoenzymes diffèrent par leur régulation. Exemple : l'hexokinase du muscle squelettique est très inhibée par le Glc 6-P, pas l'isoenzyme adipocytaire.

En effet dans le muscle squelettique il n'y a de consommation nette de glucose qu'en cas d'effort, le glucose n'entre dans la cellule que via GLUT4 et donc uniquement si il y a sécrétion d'insuline (après un repas), dans cette phase post-prandiale le glucose est utilisé pour reconstituer les réserves (uniquement transformation en glycogène, réserve limitée) une fois les stocks refait il y a nécessité d'arrêter les entrées : le Glc 6-P s'accumule et freine l'hexokinase. Cette régulation n'intervient pas dans le tissu adipeux car le Glc entre pour être transformé en réserve non limitée sous forme de triacylglycérols.

b) *Glucokinase*

K_m élevé : 10 mM, affinité faible. Voit donc son activité augmentée quand la concentration en glucose s'élève dans la veine porte en état post prandial $\text{Glc} = [15-20\text{mM}]$ V_{max} élevée ; donc très efficace en post prandiale mais à l'opposé pratiquement inefficace en état de jeûne.

Dans l'hépatocyte ; la Glucokinase ne doit pas être inhibée pour pouvoir orienter le glucose vers la mise en réserve, soit sous forme de glycogène, soit éventuellement sous forme de triacylglycérols après glycolyse, ou bien pour être substrat de la glucose 6-Phosphatase et aller vers la sécrétion de glucose. De plus, l'hépatocyte doit tamponner les irrégularités d'afflux de glucose par la veine porte.

La Glucokinase n'est donc pas inhibée par le Glc 6-P mais elle est inhibée par le Fru 6-P par le biais d'une protéine régulatrice de la Glucokinase. Cette protéine qui lorsqu'elle lie le Fru 6-P joue alors son rôle inhibiteur de la Glucokinase, peut également lier le Fru 1-P qui rentre alors en compétition avec le Fru 6-P

et lève l'effet inhibiteur de ce dernier. La formation de Fru 1-P ne se produit qu'en présence de fructose (voir plus loin), qui ainsi active la phosphorylation de glucose dans le foie et, au-delà, la glycolyse et la néosynthèse d'acides gras.

Noter l'origine différente du Fru 1-P provenant du fructose (ou du sorbitol) et du Fru 6-P qui est un métabolite du glucose.

2. Fructose 6-P ----> Fructose 1,6-bisP [57]

Cette étape est catalysée par la phosphofructokinase-1 ou PFK-1

La **PFK-1** peut être considérée comme l'**enzyme clef** de contrôle de la glycolyse. C'est une enzyme allostérique, qui présente de nombreux sites régulateurs. Elle est le point de réponse à la charge énergétique de la cellule [74]. En pratique elle est **inhibée allostériquement par des témoins de pléthore énergétique** : concentrations élevées en ATP (qui est aussi substrat), en créatine (P) (dans le muscle), et en citrate (témoin d'acétyl-CoA dans le cytosol prêt à entrer dans la voie de synthèse des lipides) et à l'inverse, elle est activée par des concentrations élevées en AMP et en ADP (dans le muscle)

Son **activateur allostérique privilégié dans l'hépatocyte et l'adipocyte**, où la charge énergétique est très stable, est le **Fru 2,6-bis(P)**.

Le **Fru 2,6-bisP** [59] est un **témoin d'une charge nutritionnelle élevée**. Il est présent à des concentrations micromolaires contrairement au Fru 1,6-bisP qui lui est beaucoup plus concentré de l'ordre de la millimolaire.

* est présent essentiellement dans hépatocyte et adipocyte, mais également dans le muscle

* est un puissant inhibiteur allostérique de la FBPase-1 (voir plus loin, gluconéogenèse)

La concentration de Fru 2,6-bisP est essentiellement régulée par l'équilibre des activités des deux enzymes responsables de sa synthèse et de sa dégradation.

Noter la finalité différente en fonction des tissus : dans le foie et le tissu adipeux qui forment des réserves énergétiques non limitées (Triglycérides), en phase postprandial, le témoin de pléthore énergétique qu'est le Fru 2,6-bisP active la PFK1 par besoin de faire des triglycérides (en cas d'engorgement de cette voie métabolique le citrate s'accumule et contre-régule par inhibition allostérique) alors que dans le muscle où il ne fait qu'une réserve limitée de glycogène et où la charge énergétique varie considérablement selon l'effort physique, les témoins de pléthore freine la PFK1 (qui est au contraire activée par les témoins de besoin d'énergie).

En fait, les activités **PFK-2** et **FBPase-2** sont portées par une même enzyme bifonctionnelle [59]:

* Celle ci existe sous forme de plusieurs types d'isoenzymes: au moins quatre, dans l'hépatocyte, le cerveau, les muscles (squelettique ou cardiaque), et le testicule.

* La forme hépatique (à condition qu'elle soit phosphorylée) a la particularité de présenter une très forte affinité de l'activité FBPase-2 pour le Fru 2,6-bisP (x 1000).

* **Pour la forme hépatique**, et également pour la forme **adipocytaire**, quand le rapport Insuline/Glucagon est en faveur du Glucagon, ou quand on est en présence de catécholamines, il y a formation d'AMPc et activation de la PKA : l'enzyme bifonctionnelle est phosphorylée au niveau d'un site unique (serine), l'activité PFK-2 est inhibée, l'activité FBPase-2 est stimulée; la concentration de Fru 2,6-bisP est donc fortement diminuée ; la glycolyse s'arrête (foie et tissu adipeux), ce qui ouvre la voie à la gluconéogenèse (foie uniquement).

A l'opposé, quand le rapport Insuline/Glucagon est élevé, elle est déphosphorylée, PFK-2 est active, FBPase-2 est inactive, ce qui favorise l'activité de la PFK-1 : la glycolyse est élevée.

Au niveau musculaire l'activité de la PFK-1 est contrôlée différemment de celle du foie et du tissu adipeux. En effet dans cet organe, la forme phosphorylée de l'enzyme bifonctionnelle PFK-2/FBPase-2 stimule l'activité PFK-2 et inhibe l'activité FBPase-2 augmentant ainsi l'activité de la PFK-1 et donc la glycolyse. C'est ce qui se passe en particulier lors de l'exercice musculaire où la libération de catécholamines (qui via la PKA entraînent une phosphorylation de l'enzyme) active la glycolyse. Ainsi, les catécholamines activent la glycolyse musculaire mais freinent la glycolyse hépatique.

Noter que c'est la différence de régulation covalente entre le foie et le muscle qui permet d'avoir une régulation opposée du Fru 2,6-bisP dans ces deux organes comme noté plus haut.

3. PEP → Pyruvate [60]

Enzyme : **Pyruvate**

Kinase, PK

Il existe au moins trois formes isozymiques de la pyruvate kinase, dont la PKL qui prédomine dans le foie et la PKM dans le muscle et le cerveau.

De façon générale, la pyruvate kinase est régulée par allostérie et par son état de phosphorylation (foie).

1. allostérie :

- est activateur : le Fru 1,6-bisP en tant que témoin de l'activité de la glycolyse au niveau des premières étapes

- sont inhibiteurs :

l'ATP (qui diminue son affinité pour le PEP), le citrate et moins significativement l'acétyl-CoA et les acides gras à longue chaîne ; l'alanine est également inhibiteur, mais seulement au niveau hépatique (PKL)

2. covalence : la PKL, ou **Pyruvate kinase hépatique uniquement**, existe sous deux formes : une forme phosphorylée inactive et une forme non phosphorylée active. Cette phosphorylation par une PKA dépendante du rapport insuline/glucagon permet pendant le jeûne un blocage de la PKL permettant d'orienter le PEP vers la gluconéogenèse (voir plus loin) et évitant ainsi un cycle futile en bloquant toute possibilité de glycolyse.

Les déficits en pyruvate Kinase des globules rouges provoquent une anémie hémolytique par déficit en ATP, due à une enzyme mutée d'activité résiduelle de 5 à 25 %.

NE JAMAIS OUBLIER

- ü Glycolyse = Dégradation oxydative du glucose en pyruvate avec formation d'ATP et de NADH,H⁺
- ü En aérobie au final : 2 pyruvate + 2 ATP + 2 NADH
- ü En anaérobie au final : 2 lactate + 2 ATP
- ü Existe dans pratiquement toutes les cellules mais finalités métaboliques différentes selon les tissus
- ü Pour certaines cellules, seule voie de production de l'énergie (tissus glucodépendants stricts)
- ü 10 étapes exclusivement cytosoliques/cinq premières phases dites de préparation/cinq phases suivantes dites de récupération de l'énergie. Transformation de structures en C6 en structures en C3.
- ü Rendement énergétique : très faible en anaérobie (2 ATP) et très élevé en aérobie, dépendant du devenir du pyruvate
- ü Trois étapes de régulation :
 - ü Rôle fondamental de la charge énergétique (AMP-ADP-ATP) au niveau du muscle et du cerveau
 - ü Rôle fondamental du Fru 2,6-bisP au niveau du foie et du TA.
 - ü Capacités spécifiques de bloquer la PK hépatique pour mettre la gluconéogenèse

UTILISATION METABOLIQUE DES AUTRES OSES : FRUCTOSE, MANOSE, GALACTOSE

La majorité des monosaccharides utilisés comme composés cellulaires biologiques par les cellules des mammifères sont en relation avec le glucose ; nombre d'entre eux rejoignent la voie de la glycolyse ce qui suppose de nombreuses réactions d'interconversion et de transformation des sucres et met en évidence le rôle fondamental du glucose dans le métabolisme énergétique. Toutefois, il faut aussi considérer les oses comme matériel de structure.

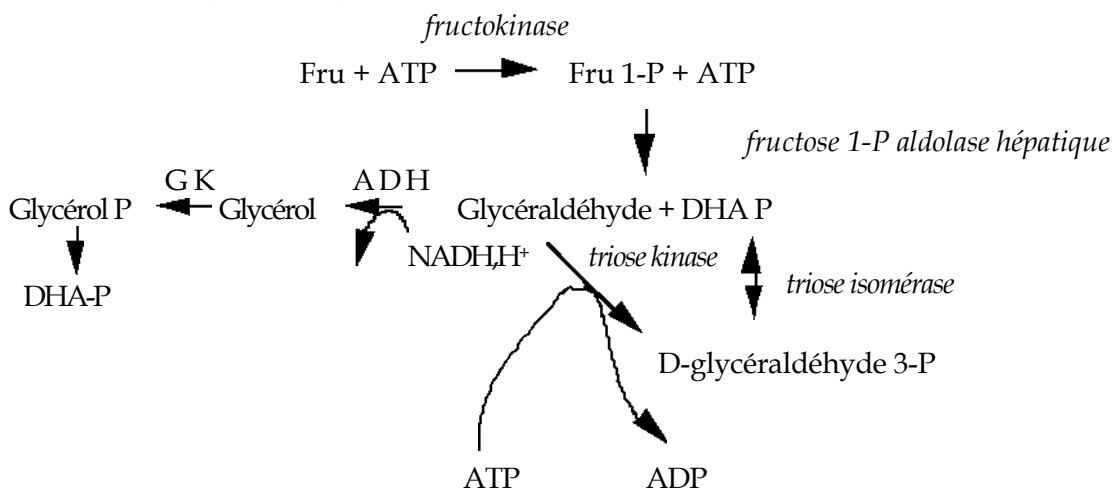
Nous n'allons toutefois aborder ici que l'utilisation de trois oses, le fructose, le mannose et le galactose à des fins énergétiques.

FRUCTOSE [62]

* Il vient de l'alimentation et il est présent dans de nombreux fruits ; il existe soit sous forme de monosaccharide soit sous forme de disaccharide comme cela est le cas pour le saccharose (« sucre alimentaire ») qui doit alors être hydrolysé pour produire le fructose. Il représente 15 à 20 % des calories absorbées par les Américains du Nord.

* Dans l'**entérocyte**, le muscle et le rein, il est phosphorylé par une hexokinase \rightarrow Fru 6-P \rightarrow Fru 1,6-bisP qui suit alors les réactions de la glycolyse.

* Dans l'**hépatocyte**, la glucokinase est très spécifique et ne peut effectuer cette phosphorylation ; c'est la **fructokinase** (Mg^{2+}/Mn^{2+}) spécifique qui la réalise mais donne alors le **Fru1-P** qui est clivé en deux trioses par la **fructose 1-P aldolase** (**aldolase B**) :



ADH : aldéhyde déshydrogénase

GK : glycérokinase

Le glycéraldéhyde est par la suite phosphorylé en glycéraldéhyde 3-P par la **triose kinase**.

Les deux trioses P ainsi formés (DHA P et Glycéraldéhyde 3-P) rejoignent alors la glycolyse.

* **Le métabolisme du fructose est donc plus rapide que celui du glucose car il bypass l'étape limitante de de la PFK1. Non régulé ce métabolisme est orienté préférentiellement vers la lipogénèse dans l'adipocyte.**

* Pathologie : Les déficits en Fructokinase donnent des fructosuries non létales; ceux en aldolase B donnent des intolérances très sévères au fructose.

MANNOSE [62]

Provient de la digestion de divers polysaccharides et des glycoprotéines de l'alimentation Hexokinase \rightarrow Man 6-P

Phosphomannoisomérase \rightarrow Fru 6-P qui rejoint alors la glycolyse

GALACTOSE [63]

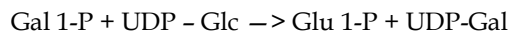
Epimère en 4 du glucose

Dans l'**intestin**, il est produit par l'hydrolyse du lactose par la *lactase*

Dans l'**hépatocyte**, il subit trois étapes de transformation

- 1) Phosphorylation par la **galactokinase** $ATP, Mg^{2+} Gal + ATP \rightarrow Gal\ 1-P + ADP$

- 2) Le Gal 1-P doit être épimérisé en 4 en Glc 1-P, par une série de réactions où l'UDP fonctionne comme transporteur



UDPG Glc-galactosyl-1(P) uridyl transférase ou Uridyl transférase

- 3) Épimérisation de l'UDP-Gal en UDP-Glc par l'**UDP-glucose 4-épimérase**, qui peut alors prendre en charge une nouvelle molécule de Gal 1-P et permettre la synthèse de glycogène (à partir du Glu 1-P) ou recombinaison avec le Gal 1-P pour un nouveau cycle

Au final, le métabolisme du galactose aboutit à la production nette de Glu 1-P qui après isomérisation en Glu 6-P sera orienté préférentiellement vers la synthèse de glycogène.

Pathologies : La Galactosémie congénitale correspond au déficit d'activité de l'uridyl transférase : Gal et Gal 1-P s'accumulent dans le foie, la circulation et les autres tissus \rightarrow cataracte, retard mental

D'autres mutations sur d'autres enzymes ont des expressions beaucoup moins graves : le déficit en galactokinase \rightarrow galactosurie, galactitol.

A remarquer que l'**UDP-Gal** participe à d'autres réactions de **biosynthèse** : donneur de Gal pour lactose, glycoprotéines, glycolipides, protéoglycannes.

NE JAMAIS OUBLIER

Pratiquement tous les sucres vont être métabolisés en produits d'intermédiaires de la glycolyse :

Mannose \rightarrow Mannose 6-P \rightarrow Glucose 6-P

Fructose \rightarrow Fru 1-P \rightarrow DHAP + Glyceraldéhyde \rightarrow Gal 3-P

Galactose \rightarrow Gal 1-P \rightarrow UDP-Gal + Glu 1-P \rightarrow Glu 6-P

GLUCONEOGENESE : GNG

Présentation [66 - 78]

La synthèse de glucose est une absolue nécessité quand l'apport alimentaire fait défaut, ne serait-ce que 5 à 6 heures après un repas, et surtout en cas de jeûne prolongé. En effet, certaines cellules sont totalement glucose dépendantes (neurone, érythrocyte).

C'est l'**hépatocyte** (et à un degré moindre le rein) qui fournit du glucose, d'abord aux dépens de ses réserves locales en glycogène, mais qui ne sont que de 100 g, alors que les neurones à eux seul consomment 120 g/jour d'équivalent glucose. Au-delà de la glycogénolyse, qui en condition régulière et physiologique permet de couvrir les besoins en glucose pendant les quelques heures qui suivent la période post-prandiale (en pratique les 1 à 2 heures qui courent après le début du repas), l'hépatocyte met en route le processus de gluconéogenèse qui permet la néosynthèse de glucose à partir du pyruvate.

Le **rein**, au niveau des tubules proximaux, possède également les équipements enzymatiques nécessaires pour cette gluconéogenèse. Cette gluconéogenèse rénale longtemps négligée peut dans certaines circonstances produire pratiquement autant de glucose que celle du foie.

Les réactions qui correspondent à cette voie sont à comparer avec celles de la glycolyse qui réalise la voie inverse de transformation du Glucose en Pyruvate. Toutefois, une voie de synthèse ne peut jamais être totalement comparable à une voie de dégradation, surtout quand les réactions sont localisées dans un même compartiment. Nous retrouverons les trois étapes essentielles de régulation, précédemment citées dans la glycolyse, qui seront contournées ou non et strictement régulées. Ceci est indispensable sous peine de voir s'installer un **cycle futile**, (concomitance de la glycolyse et de la gluconéogenèse), qui donnerait lieu à une perte d'ATP dissipée sous forme de chaleur. En fait, la voie inverse (ici la glycolyse) n'est jamais totalement inhibée, mais fonctionne à très bas niveau, lui permettant de s'inverser rapidement. Le contrôle de ces deux voies, glycolyse et gluconéogenèse, est d'abord allostérique à court terme, puis sous contrôle hormonal par régulation covalente à moyen terme, permettant à la cellule hépatique, principalement concernée, de s'adapter très rapidement à l'état métabolique général de l'organisme.

La GNG est une voie anabolique [66-68]

Il faut de l'**énergie** pour réaliser les réactions menant à la production de glucose. L'ATP ne pouvant provenir de la glycolyse (inhibée au détriment de la gluconéogenèse) ; il viendra d'une autre source : la § oxydation des acides gras après du **tissu adipeux** et transfert des acides gras au foie.

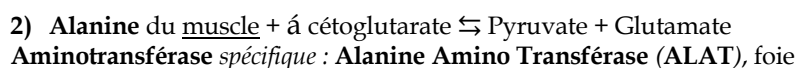
Outre l'énergie, il faut des **substrats carbonés** qui feront le squelette carboné du glucose : ce seront les substrats **glucoformateurs**, qui viennent en partie des acides aminés issus la **protéolyse musculaire** (alanine), du lactate produit par le globule rouge et par le muscle ainsi que du glycérol provenant lipolyse des **lipides** au niveau du TA.

Un **signal hormonal** est donc indispensable pour réaliser la coordination entre les tissus qui coopèrent pour la gluconéogenèse. C'est la diminution du rapport **Insuline/Glucagon**, traduisant à la fois une augmentation de la concentration sérique en glucagon et une diminution de la production d'insuline, aidée par une augmentation des catécholamines et éventuellement du cortisol, qui permet de déclencher la gluconéogenèse.

Enfin, il ne faut pas oublier que cet ensemble reste sous une commande associant régulation hormonale et régulation nerveuse.

Les substrats principaux de la gluconéogenèse [67-68]

La première étape de la gluconéogenèse est la transformation de différents substrats en pyruvate. Les deux principaux substrats glucoformateurs qui directement précurseurs du pyruvate, sont :



D'autres substrats interviendront à d'autres étapes ou empruntent des voies plus longues de transformation. Mentionnons en particulier :

3) Le **Glycérol** du tissu adipeux qui est libéré au cours de la lipolyse, passe dans la circulation, gagne le foie, est capté par l'hépatocyte puis phosphorylé en glycérol-phosphate (glycérol kinase) et transformé en dihydroxyacétone-phosphate par la glycérol-phosphate déshydrogénase.

4) des intermédiaires du cycle tricarboxylique de Krebs, dits gluco-formateurs, issus de la copule carboné de certains acides aminés, tels l'**oxaloacétate**, l'á-cétoglutarate, le succinylCoA ou le fumarate.

Noter que les acétyl-CoA dans les cellules de mammifères ne peuvent jamais servir de précurseurs carbonés. Les lipides ne sont donc jamais donneurs de carbone pour le glucose, en raison de la réaction catalysée par la pyruvate deshydrogénase (qui assure la transformation du pyruvate en acétyl-CoA) totalement irréversible et incontournable (voir cours de P. Billiald).

Les Etapes Irréversibles sont au nombre de trois

Sur les dix étapes de la glycolyse, sept sont communes car spontanément réversibles, trois sont irréversibles, car fortement exergoniques (dans la glycolyse), elles correspondent aux étapes régulées de cette voie. Pour la gluconéogenèse, elles seront soit contournées en passant dans un autre compartiment, soit strictement catalysées et régulées par des enzymes différentes si l'on reste dans le même compartiment.

Les autres étapes sont des étapes réversibles de la glycolyse. Ne seront mentionnées que celles consommant ou de l'ATP ou du NADH,H⁺ (pour les autres étapes, se référer aux différentes étapes de la glycolyse).

1) TRANSFORMATION DU PYRUVATE EN PEP [69-71]

La réaction de la Pyruvate kinase est totalement irréversible et la remontée vers le PEP ne peut se faire sans passer par la mitochondrie. Le passage du pyruvate dans la mitochondrie nécessite des transporteurs et la mise en jeu de plusieurs réactions :

Carboxylation en oxaloacétate

Le pyruvate passe du cytosol dans la mitochondrie grâce à un transporteur

Il est carboxylé par la **Pyruvate Carboxylase** dont le coenzyme est la biotine avec **consommation d'un ATP** Pyruvate + HCO₃⁻ + ATP à Oxaloacetate + ADP + Pi

L'**oxaloacétate** ainsi formé ne peut revenir directement dans le cytosol

Le retour vers le cytosol peut se faire selon deux modes différents [71]

* Si le substrat d'origine est l'alanine (jeûne prolongé ou état diabétique) la formation du pyruvate par l'ALAT ne génère aucun pouvoir réducteur. Il est donc impératif de sortir de la mitochondrie des équivalents réducteurs, NADH,H⁺ indispensables à la formation du glyceraldéhyde 3P (inverse de la réaction 6 de la glycolyse). Dans ce cas, l'oxaloacétate est réduit en Malate par la Malate Deshydrogénase mitochondriale

Cette réaction est fortement *exergonique* ($\Delta G^{\circ} = - 29,7 \text{ kJ/mole}$), mais en fonction des concentrations de malate et d'oxaloacétate dans la mitochondrie, le $\Delta G'$ est proche de 0, rendant cette réaction totalement réversible et pouvant conduire aussi bien à la formation de malate dans la gluconéogenèse qu'à la formation d'oxaloacétate dans le cycle de Krebs.

Le malate passe dans le cytosol par le transporteur malate/á-cétoglutarate

Par la suite il y a reformation de l'oxaloacétate dans le cytosol grâce à la Malate Deshydrogénase cytosolique Avec production de NADH,H⁺

* Si le lactate est le substrat d'origine (le lactate est le substrat d'origine le plus important en cas de jeûne physiologique), il apporte, par sa transformation en pyruvate dans le cytosol catalysée par la LDH (voir ci-dessus), l'équivalent réducteur nécessaire à la formation du glyceraldéhyde 3-P, inverse de la réaction R6 de la glycolyse.

Une fois produit, le pyruvate passe dans la mitochondrie grâce à un transporteur (comme ci-dessus).

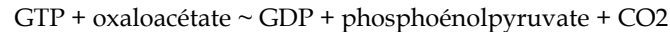
Pour revenir dans le cytosol après la réaction de carboxylation, l'oxaloacétate subit une transamination par une ASAT mitochondriale, en aspartate. L'aspartate qui possède un transporteur passe la membrane et redonne l'oxaloacétate dans le cytosol par la réaction inverse catalysée par l'ASAT cytosolique

Oxaloacétate + Glutamate <---> Aspartate + á-cétoglutarate

Aspartate AminoTransférase, ASAT mitochondriale/cytosolique

Décarboxylation de l'oxaloacétate (quel que soit son mode de « sortie ») en PEP

La **consommation d'un GTP** donneur d'énergie permet de créer un dérivé à haute énergie d'hydrolyse, le PEP

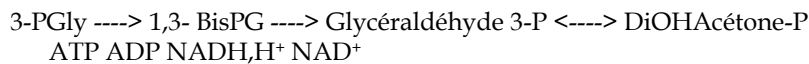
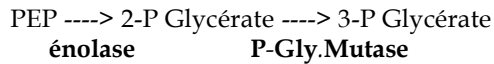


L'enzyme impliquée est la **Phosphoénolpyruvate carboxykinase, PEPCK**, Mg^{2+}

Globalement : $\text{Pyruvate} + \text{ATP} + \text{GTP} \rightarrow \text{PEP} + \text{ADP} + \text{GDP} + \text{P}$

$\Delta G^{\circ'} = -0,8 \text{ kJ/mole}$, mais dans des conditions usuelles $\Delta G' = -25 \text{ kJ/mole}$, en raison de la consommation rapide du PEP, rendant la réaction pratiquement irréversible.

La suite des réactions de la gluconéogenèse est celle déjà vue pour la glycolyse [67]



PGly.Kinase Glycéraldéhyde3PDeshy. Triose(P)isomérase

Le glycérate 3-P consomme un ATP pour donner le 1,3-bisP glycérate qu'une réduction a transformé en glycéraldéhyde 3-P.

Il faut noter qu'il existe une voie alternative permet la production directe de PEP à partir de l'oxaloacétate dans la mitochondrie (par une PEPCK mitochondriale codée par un gène différent de la PEPCK cytosolique) et le PEP repasse ensuite directement dans le cytosol

* Cas de l'utilisation du glycérol comme substrat de la gluconéogenèse [72]. Voir un peu plus loin.

2) CONVERSION DU FRU 1,6-bisP EN FRU 6-P [73]

La **fructose 1,6-bisPhosphatase-1 (FBPase-1)** (Mg^{2+}) permet l'hydrolyse, de façon quasi irréversible, du Fru 1,6-bisP en Fru 6-P.

$\Delta G^{\circ'} = -16,3 \text{ kJ/mole}$

Cette réaction est suivie de l'isomérisation du Fru 6-P en Glc 6-P

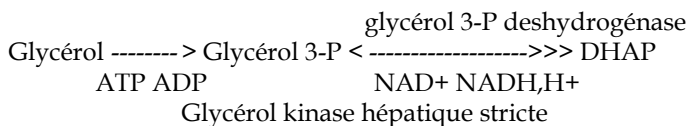
3) CONVERSION DU GLC 6-P EN GLUCOSE LIBRE [73]

$\Delta G^{\circ'} = -13,8 \text{ kJ/mole}$ **Glucose 6 Phosphatase**, Mg^{2+}

Enzyme localisée du côté luminal du réticulum endoplasmique.

L'hépatocyte peut ensuite sécréter ce glucose dans la circulation en utilisant le transporteur GLUT 2.

* Le glycérol qui vient de la lipolyse adipocytaire et qui est également utilisé comme substrat de la gluconéogenèse entre à une phase intermédiaire au niveau des trioses phosphates [72]



Bilan énergétique de la gluconéogenèse pour une molécule de glucose [74]

Pour une molécule de glucose, il y a **consommation de six liaisons d'énergie d'hydrolyse élevée et de 2 coenzymes réduits.**

Cette voie métabolique est hautement endergonique $\Delta G^{\circ'} = + 83,7 \text{ kJ/mole}$

L'énergie nécessaire est apportée, comme déjà indiqué par la béta oxydation des acides gras.

Régulation de la gluconéogenèse et régulation inverse et concertée de la glycolyse [75-78]

La régulation repose à la fois sur des mécanismes allostériques et sur l'état de phosphorylation des enzymes en fonction du rapport Insuline/Glucagon et en particulier la forte diminution de ce rapport en cas de jeûne qui va permettre d'induire la gluconéogenèse.

La régulation s'effectue majoritairement au niveau de deux étapes :

* Au niveau de la première étape [75 et 77]

Le problème repose sur l'orientation du pyruvate.

La **pyruvate carboxylase** est sous le contrôle allostérique positif des acétyl-CoA, tandis que la **pyruvate déshydrogénase** est modulée négativement par ces mêmes acétyl-CoA (voir cours de P Billiald). La 13-oxydation fournit abondamment ces acétyl-CoA à la mitochondrie, favorisant alors le flux métabolique vers la GNG et verrouillant la voie vers l'entrée du pyruvate dans le cycle de Krebs.

De plus, la pyruvate kinase L de l'hépatocyte, est simultanément inhibée allostériquement par un excès d'ATP, produits par la b-oxydation, empêchant le cycle futile PEP <---> Pyruvate. Cette action inhibitrice est renforcée par certains acides aminés substrats de la GNG, en particulier l'alanine. Ce blocage de la PK_L est considérablement renforcé par la phosphorylation de cette enzyme au niveau du foie, via l'action du glucagon.

* Au niveau de la seconde étape [76 et 77]

La **PFK-1** qui favorise la glycolyse est négativement régulée par l'ATP largement présent en période de 13-oxydation. A l'opposé la fructose 1-6 bisPhosphatase 1 est régulée positivement par ce même ATP ainsi que par la chute de la concentration de Fructose 2-6bisP, modulateur allostérique négatif de cette enzyme.

En effet, l'enzyme bifonctionnelle **PFK-2/PBPase-2** est (P) par la PKA en cas de jeûne (glucagon) : l'activité PFK-2 est inactivée alors que l'activité FBPase-2 est stimulée, entraînant l'hydrolyse du Fru 2,6-bisP qui n'active plus la PFK-1 et lève l'inhibition de la FBPase-1 permettant ainsi la gluconéogenèse (voir cours sur la glycolyse).

Au niveau hépathique, ce n'est pas tant la charge énergétique que la disparition du Fru 2,6-bisP qui est un élément clé pour permettre la GNG.

* Au niveau de l'étape catalysée par la glucose 6-phosphatase, il n'y a pas véritablement de régulation.

REMARQUES

* La GNG est très active chez les ruminants.

Chez le bétail qui se nourrit de végétaux, il y a fermentation, utilisation de la cellulose, production de lactate, acétate, propionate, butyrate, qui sont absorbés dans l'intestin et passent dans la circulation, alors que très peu de glucose passe ; le foie fait alors une GNG intense avec comme principal substrat le lactate.

* L'alcool inhibe la GNG (par diminution du NAD⁺ cytosolique indispensable à la conversion du malate en oxaloacetate) et de ce fait peut conduire à des hypoglycémies.

NE JAMAIS OUBLIER

- V¹ Néosynthèse de glucose à partir du pyruvate et issu de précurseurs « non sucrés »
 - V¹ Voie anabolique mise en place après 6 à 8 h de jeûne (après la glycogénolyse)
 - V¹ Voie exclusivement hépatique et rénale
 - V¹ Sept étapes réversibles communes avec la glycolyse
 - V¹ Quatre étapes spécifiques
-
- V¹ Seule la première étape est mitochondriale, les autres cytosoliques
 - V¹ Nombreux substrats mais trois principaux : Lactate-Alanine-Glycérol
 - V¹ Voie très hautement endergonique - doit être couplée avec une voie très exergonique : la β -oxydation des acides gras
 - V¹ Deux étapes principales de régulation (allostérie + covalence) :
 - Pyr \rightarrow PEP - Pyruvate carboxylase (orientation du Pyr entre PC et PDH)
 - Fru 1,6-bisP \rightarrow Fru 6-P - Fructose 1,6-bisphosphatase (rôle essentiel du Fru 2,6-bisP)

LA VOIE DES PENTOSE PHOSPHATES

Présentation [81]

Si la voie oxydative de la glycolyse d'Embden Meyerhof est prépondérante et a pour but la dégradation oxydative ou la mise en réserve du glucose, **la voie des pentoses phosphates a deux buts essentiels : (1) la formation de coenzymes réduits, (2) la formation des pentoses, constituants des acides nucléiques**

La formation des Coenzymes réduits NADPH, H⁺

* Ils sont indispensables à la **biosynthèse des lipides** au sens large : acides gras, stérols dont le cholestérol et les hormones stéroïdes.

C'est donc une voie métabolique importante dans tous les tissus où ces synthèses sont actives: adipocytes, hépatocytes, glandes mammaires, surrénales. En revanche, dans des tissus où ces métabolismes sont très peu actifs, où il y a peu de division cellulaire nécessitant du cholestérol, cette voie est moins active.

* Ils sont indispensables pour la **réduction du ribose** en désoxyribose par la **ribonucléotide réductase**.

* Ils sont indispensables pour la formation du glutathion réduit qui permet la réduction des espèces réactives de l'oxygène, toxiques pour la plupart des macromolécules.

La formation du squelette carboné du ribose et du désoxyribose

Pour la formation des **ARN et des ADN**.

Mais aussi comme constituants de certaines chaînes glycannes

Les Caractéristiques fonctionnelles principales de la voie des pentoses [82]

- Localisation dans le **cytosol**
- Pas de perte d'énergie
- Oxydation dans les deux premières étapes générant des coenzymes réduits et perte d'1 C par production de CO₂ ; ces deux premières étapes sont les seules régulées
- Suite de transferts de deux ou trois C avec formation de molécules interconvertibles
- **But** plutôt **anabolique** que catabolique
- La voie des pentoses débute à partir du glucose 6-P. L'étape préalable est donc commune avec la première étape de la glycolyse, première étape qui est différente selon les tissus (voir glycolyse). Cela pose d'ailleurs le problème particulier de l'orientation du glucose 6-P vers la glycolyse ou la voie des pentoses, mais également comme cela sera vu après, vers la glycogénogenèse.

Description de la voie métabolique

A - LES ETAPES OXYDATIVES [82]

I - Déshydrogénation du glucose 6-P par la 6-PGluconate Glucose 6-P Déshydrogénase (G6PDH), Mg²⁺

Le NADP⁺ est l'accepteur du pouvoir réducteur, NADPH, H⁺ est formé.

En fait, cette réaction évolue en deux sous- étapes :

-- Oxydation en lactone par la G6PDH : obtention de 6-P glucono 5-lactone

-- Hydrolyse par une **lactonase** à Mg²⁺

Le déficit en cette enzyme est responsable de pathologies du globule rouge

II - Décarboxylation oxydative en Ribulose 5 P par la 6-P gluconate déshydrogénase, Mg²⁺

Un second NADPH, H⁺ est formé.

III - Interconversion du Ribulose 5-P en Ribose 5-P par la Phosphopentose isomérase

(réaction analogue à la transformation de Fru 6-P en Glc 6-P ou de DHA P en glycéraldéhyde 3-P)

B - LES ÉTAPES NON OXYDATIVES D'INTERCONVERSION [83-84]

Les étapes suivantes ont pour but des réarrangements du squelette carboné.

L'ensemble des réactions sont réversibles et sont donc des moyens d'interconversions très aisées.

En effet, les deux premières réactions oxydatives ont fourni des Coenzymes réducteurs et du ribose. La quantité de ribose 5-P ainsi produite est parfois suffisante pour la synthèse des nucléotides mais la quantité de NADPH, H⁺ produite, elle, n'est pas suffisante. Dans ces conditions, une série d'interconversions va permettre la régénération de glucose 6-P (en fait de fructose 6-P ou de glycéraldéhyde 3-P, mais ce qui revient au même (voir gluconéogenèse) et de nouveau la rentrée de ce Glucose 6-P dans la voie des pentoses phosphates.

I - Transformation du Ribulose 5-P

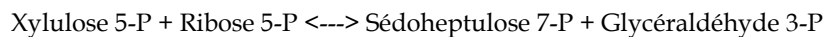
Deux possibilités :

- * Isomérisation en **Ribose 5-P** par la **phosphopentose isomérase**
- * Epimérisation en **Xylulose 5-P** par la **phosphopentose épimérase**

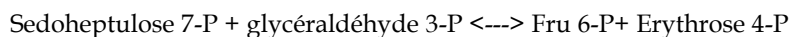
II - Réactions d'interconversion

Plusieurs enzymes interviennent :

* **transcétolase**, thiamine pyrophosphate-dépendante, catalyse le transfert de 2 carbones C1 et C2 du xylulose sur Ribose 5-P ; à partir des oses en C5 on forme donc des oses en C7 et en C3

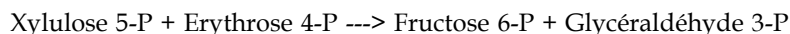


* **transaldolase**, qui catalyse le transfert de 3C, C1, C2 et C3 du sédoheptulose sur le glycéraldéhyde 3-P, formant le fructose 6-P et libérant de l'érythrose 4-P.



Globalement à ce stade: $2 \times 5C \rightarrow 6C + 4C$

* **transcétolase** transfère C1 et C2 du xylulose 5-P sur érythrose 4-P



et les 2 glycéraldéhyde 3-P restant se condensent en Fructose 6-P.

Ces successions de réarrangement peuvent être résumées dans le schéma [101] :

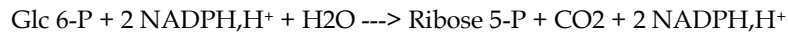
Il fait apparaître que **six pentoses (issus de six hexoses initiaux) permettent de régénérer 5 hexoses** pouvant de nouveau rentrer dans la voie des pentoses P.

A noter que toutes les étapes non oxydatives d'interconversion sont totalement réversibles ce qui permet donc de synthétiser du ribose 5-P directement à partir d'hexose phosphate, sans passer par les étapes oxydatives de la voie des pentoses phosphates.

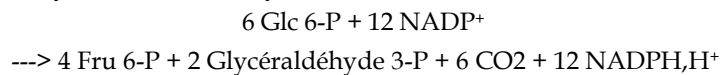
Bilan de la voie des pentoses [85]

Si on fait le bilan global de la voie des pentoses P on obtient :

1- En utilisant les seules phases oxydatives



2 En utilisant les phases oxydatives et non oxydatives



Les fructoses 6-P peuvent rentrer dans la glycolyse (ou la gluconéogenèse), les deux glycéraldéhydes-P peuvent (en s'isomérisant pour l'un en DHAP), se condenser en fructose 1-6 bisP et de même rentrer dans la glycolyse ou la gluconéogenèse. C'est donc bien 5 hexoses-P qui sont ainsi reformés.

Tout se passe en final comme si à partir de six glucoses, on oxydait une seule molécule entière, tandis que les cinq molécules restantes peuvent entrer dans la glycolyse d'Emden Meyerhof ou repartir dans le cycle des pentoses.

Régulation coordonnée de la glycolyse et de la voie des pentoses [86-87]

NE JAMAIS OUBLIER

V^o Voie métabolique essentielle pour :

- 1- Former les coenzymes réduits de type NADPH, H⁺ (biosynthèse des lipides, réduction du ribose, réduction du glutathion)
- 2- Former des Pentoses-P (ribose 5-P)

V^o Voie plutôt anabolique, cytosolique, très ubiquitaire qui commence au Glu 6-P

V^o Etapes oxydatives irréversibles qui produisent du NADPH, H⁺ et ribose 5-P

V^o Etapes non oxydatives réversibles : interconversion Hexoses-P/Pentoses-P peuvent aussi bien former des hexoses-P à partir de pentoses-P que former du ribose 5-P à partir d'hexoses-P mais sans formation de NADPH, H⁺

V^o Bilan : dépend du mode de fonctionnement : seules étapes oxydatives ou étapes oxydatives + étapes non oxydatives

V^o Régulation : coordonnée avec glycolyse et gluconéogenèse

- dépend de la disponibilité en NADP⁺
- dépend des besoins respectifs en ribose et en NADPH

MISE EN RESERVE DU GLUCOSE : LE GLYCOGENE

Présentation [90]

- Principales formes de stockage du glucose chez les vertébrés et les microorganismes
- Réserve du seul carburant possible dans des conditions de métabolisme anaérobie ° Cellules du muscle strié: 400g usage in situ ° Hépatocytes à l'état nourri : 100g usage général
- Une molécule de glycogène peut avoir une MM > 10⁸ D soit 6 x 10⁵ résidus Glc, se présentant sous forme de granules dans le cytosol de l'hépatocyte, granules où se localisent également les enzymes du métabolisme du glycogène nécessaires à sa synthèse et à sa dégradation. Cette forme compacte permet une réserve importante, sans créer de pression osmotique élevée, et en masquant les propriétés hydrophiles, empêche ainsi un gonflement exagéré.

Structure [91]

- Homopolysaccharide branché de α-D Glucose
 - ° **Chaînes principales** à liaisons α 1,4 : le premier Glc présente une extrémité réductrice, qui est liée en fait à une protéine, la glycogénine.
 - ° **Branchements à 1,6 par l'extrémité réductrice** sur les chaînes principales tous les 8 à 10 Glc, tandis que les chaînes branchées présentent ensuite des liaisons α 1,4.Les molécules de glycogène présentent ainsi une **structure arborescente** avec à sa base le seul glucose à extrémité réductrice libre. Toutes les arborescences se terminent par **un glucose non réducteur**.
- Les amylases salivaires et pancréatiques hydrolysent les liaisons α 1,4, de l'amidon et de son dérivé l'amylose, ainsi que celles du glycogène ; ce sont des endoglycosidases qui donnent du glucose, du maltose et des dextrans constituées de 10 à 12 résidus glucose.
- Isomaltase de la muqueuse intestinale attaque les liaisons α 1,6 des disaccharides
- Maltase coupe les disaccharides α 1,4 (maltose)

Introduction au métabolisme du glycogène

- Biosynthèse et dégradation obéissent à des régulations inverses, strictement coordonnées pour ne pas créer de cycle futile (fonctionnement simultané de la glycogénolyse et de la glycogénogenèse).
 - Selon les cellules, l'urgence variable commande un équipement diversifié en signaux : la glycogénolyse présente plusieurs types de régulation. La régulation de la synthèse en revanche est moins stratégique et présente moins de variabilité tissulaire quant à sa régulation.
- C'est d'ailleurs ce contrôle hormonal, qui a suscité les premières études sur l'activité des protéines kinases, en particulier la PKA et la glycogène phosphorylase kinase, et sur le rôle des phosphorylations sur l'activité des protéines.

Les étapes de la glycogénolyse [92-93]

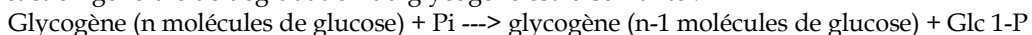
1° RACCOURCISSEMENT DES CHAÎNES

Il est lié à une activité de type **exoglucosidase** et doit conserver la liaison riche en énergie : c'est une réaction de **phosphorolyse**. L'enzyme impliquée est la **glycogène phosphorylase**, transglycosylase qui coupe les liaisons α 1,4 et qui assure le transfert d'un résidu glucosyl prélevé sur une extrémité non réductrice du glycogène pour le fixer sur un OH acide faible de l'acide phosphorique avec formation d'un **glucose 1-phosphate**.

Cette réaction permet de mobiliser le glucose d'un glycogène sous une forme directement activée en récupérant l'énergie qui se trouve dans la liaison osidyle, économisant ainsi l'énergie nécessaire pour la phosphorylation du glucose.

La glycogène phosphorylase présente des formes moléculaires très différentes selon les tissus (voir isoenzymes), ce qui explique la spécificité d'organes des maladies héréditaires portant sur cette enzyme.

La réaction générale de dégradation du glycogène est la suivante :



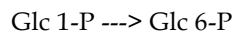
L'action de la glycogène phosphorylase s'arrête à 4 unités de glucose en amont d'une ramification à 1-6.

2° ENLÈVEMENT DES BRANCHES

Quand les chaînes terminales non réductrices deviennent trop courtes ($n = 4$) pour permettre l'action de la glycogène phosphorylase, c'est l'**enzyme débranchante** qui prend le relais. Cette protéine enzymatique comporte deux domaines portant deux activités enzymatiques différentes. • Une activité à 1,4 - à **1,4-transglycosylase** prélève un oligosaccharide (trois résidus) sur un branchement en ne laissant qu'un résidu à 1,6-glucosyl. Cet oligosaccharide est transféré en à 1,4 sur une extrémité non réductrice d'une chaîne plus longue. • Une activité à 1,6-**glucosidase** hydrolyse ensuite l' à **1,6-glucosyl** résiduel en libérant du glucose. La glycogène phosphorylase peut ainsi poursuivre la glycogénolyse.

L'enzyme débranchante n'est pas soumise à régulation, mais elle ne fonctionne que dans la mesure où la glycogène phosphorylase lui fournit un substrat.

3° DEVENIR ET UTILISATION DU Glc 1-P



Phosphoglucomutase

Etape intermédiaire mettant en jeu la formation de Glc 1,6-bisP. L'énergie d'hydrolyse (ΔG°) du Glc 1-P en Glc + Pi est de - 21 kJ/mol, celle du Glc 6-P en Glc + Pi est de - 14 kJ/mol. Grâce au fonctionnement de la phosphohexomutase selon un mécanisme ping-pong, la réaction est réversible malgré les 7 kJ/mol de différence d'énergie d'hydrolyse.

En pratique, dans le sens Glc 1-P \rightarrow Glc 6-P on obtient un $\Delta G^\circ = -7 \text{ kJ/mole}$; la réaction est donc en faveur de la formation de Glc 6-P ($K_{eq} = 19$)

Pour ce qui en est du devenir du Glc 6-P, cela dépend du tissu. Dans le cas de l'hépatocyte, le but est de sécréter du glucose pour l'homéostasie de la glycémie de l'organisme, donc dans ce cas action de la **glucose 6 phosphatase** qui s'ajoute à celle venant de l'enzyme débranchante (même mécanisme que pour le Glc 6-P issu de la gluconéogenèse).

Dans le cas du muscle, le Glc 6-P rentre directement dans la glycolyse.

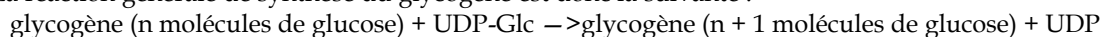
Les étapes de la glycogénogenèse [94-95]

1° L'ALLONGEMENT DES CHAINES DE GLYCOGÈNE

La glycogénogenèse est d'abord assurée par la **glycogène synthase**. C'est une glucosyltransférase qui prélève un résidu glucosyl sur un donneur glucosylnucléotidique (UDP glucose : uridyl diphosphate glucose ou alpha glucosyl de l'UDP) pour le fixer en à 1,4 sur un accepteur qui est un résidu glucosyl d'une des extrémités non réductrices d'une molécule de glycogène.

Les extrémités non réductrices s'allongent ainsi progressivement sous l'effet de la glycogène synthase pour former des chaînes à 1,4-glucosidiques prenant une conformation pseudo-hélicoïdale.

La réaction générale de synthèse du glycogène est donc la suivante :



L'initiation d'une première chaîne nécessite une protéine, la **glycogénine** (37 kD) qui joue le rôle d'initiateur et de catalyseur du départ d'une chaîne à 8 Glc, par attache d'un Glc sur la Tyrosine 194 de la glycogénine, catalysée par une **glucosyltransférase** (glycogen initiator synthase), qui continue à catalyser les transferts des 7 ou 8 Glc suivants, puis cède la place à la glycogène synthase.

2° LA RAMIFICATION DU GLYCOGÈNE (environ tous les 8 glucoses)

Quand l'allongement est suffisant, une à **1,4-à 1,6-transglycosylase (enzyme branchante)** catalyse le transfert d'un oligosaccharide terminal comportant 5 ou 8 résidus glucosyls prélevés sur une extrémité non réductrice (comportant au minimum 11 résidus) et transférés en à 1,6 sur un résidu glucosyl intrachaine.

Création d'une nouvelle ramification, point de départ pour une nouvelle chaîne à 1,4-glucosidique.

L'enzyme branchante n'est pas soumise à régulation mais son intervention n'est possible que dans la mesure où la glycogène synthase lui fournit des chaînes à 1,4 suffisamment longues.

3° ORIGINE DE L'UDP GLUCOSE NÉCESSAIRE À LA GLYCOGÉNOGÈNE

E Dans toutes les cellules, l'UDP-Glc peut être synthétisé directement à partir du glucose 1-P et de l'UTP grâce à l'**uridyl-transférase** (UTP-Glc 1-Puridyl transférase) ou UDP-glucose pyrophosphorylase:



Cette réaction comporte le transfert d'un UMP sur le glucose 1-P. Cet échange est thermodynamiquement équilibré ($\Delta G^\circ \neq 0 \text{ kJ/mole}$).

L'hydrolyse du pyrophosphate, par une pyrophosphatase, en deux molécules de phosphate ($\Delta G^\circ = -2,5 \text{ kJ/mole}$) rend de fait cette réaction irréversible in vivo.

La synthèse de l'UDP-Glc à partir du glucose consomme en fait deux équivalents ATP : un pour la phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate par l'hexokinase ou la glucokinase (voir ci-après), l'autre pour la formation de l'UDP-Glc à partir du Glc 1-P.

E Le glucose 1-P provient d'une isomérisation réversible du Glc 6-P en Glc 1-P catalysée par la **phosphohexomutase**

Toutefois, l'équilibre est très en faveur de la formation de Glc 6-P ($K_{eq} = 19$) (voir ci-dessus). La glycogénogenèse n'est donc possible qu'en présence de fortes concentrations intra-cellulaires en Glc 6-P.

E Le glucose 6-P provient essentiellement de la phosphorylation du glucose par la **glucokinase** (foie) ou l'**hexokinase** (muscle) (voir question sur la glycolyse).

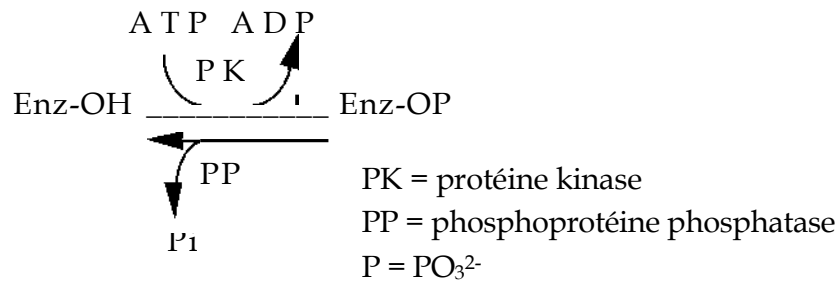
Dans le cas d'un jeûne physiologique (jusque 12 à 15 h) seules sont réellement actives, la glycogène phosphorylase. Il n'y a qu'en cas de jeûne prolongé qu'il y a action de l'enzyme débranchante nécessitant alors lors de la resynthèse du glycogène l'intervention de l'enzyme branchante pour la reconstitution de glycogène ce qui va prendre beaucoup plus de temps. Normalement, l'alternance physiologique repas/jeûne n'entraîne qu'une simple modification de la masse moléculaire de chacune des molécules de glycogène, sans variation de la concentration de ces molécules.

Remarque sur le métabolisme du glycogène : la totalité du métabolisme du glycogène s'effectue par les extrémités non réductrices de cette molécule et se traduit par une variation de la masse moléculaire de chacune des molécules du substrat et non par une variation de sa concentration, ce qui est assez exceptionnel. Dans une cellule d'un sujet bien nourri, une réserve de glycogène importante implique donc la présence de glycogène de masse moléculaire élevée avec une structure très ramifiée. Inversement, après un jeûne prolongé, le glycogène présente une structure moins ramifiée avec une faible masse moléculaire. Du fait de sa structure très ramifiée, les résidus glucosyls de la périphérie (extrémité non réductrice) d'une molécule de glycogène présentent un renouvellement rapide et intense (dans le sens synthèse ou lyse), ceux au voisinage de l'extrémité réductrice ne se renouvellent que très peu et très lentement.

Régulation du métabolisme du glycogène

1° CONDITIONS GÉNÉRALES [96]

La régulation du métabolisme du glycogène porte sur deux enzymes d'effet opposé ; la glycogène synthase qui intervient dans la glycogénogenèse et la glycogène phosphorylase qui intervient dans la glycogénolyse. Dans les deux cas, l'essentiel de cette régulation implique à court terme (quelques minutes) un mécanisme classique de phosphorylation-déphosphorylation. Par ailleurs, des modulations allostériques immédiates (quelques secondes) peuvent nuancer cette régulation. Nous retrouvons donc l'équilibre habituel des régulations cellulaires par phosphorylation-déphosphorylation.



Le changement de conformation de la protéine provoqué par la phosphorylation ou la déphosphorylation entraîne une modification de l'activité de la protéine enzymatique. Il existe donc une forme active de l'enzyme et une forme peu ou pas active. La proportion relative de chaque forme dépend de l'activité des protéine-kinases et des phosphoprotéine-phosphatases qui sont elles-mêmes contrôlées par la concentration en divers deuxièmes messagers. Une stimulation hormonale provoque ainsi un déplacement de l'équilibre qui entraîne alors une modification de l'activité de l'enzyme.

2° RÉGULATION COVALENTE DE LA GLYCOGÈNE PHOSPHORYLASE [97-98]

On sait depuis longtemps qu'une élévation de la concentration intra-cellulaire en deuxième messager (AMPc et Ca⁺⁺) entraîne une phosphorylation de la glycogène phosphorylase qui se trouve ainsi transformée en forme « a » active.

La **glycogène phosphorylase (G1 Ph)** est l'enzyme stratégique entre réserve et utilisation. Isolée sous forme cristallisée du muscle (dimère 190 kD ou tétramère). La forme phosphorylée de cette enzyme correspond à sa forme active.

Cette activation doit naturellement faire intervenir des protéine-kinases AMPc et/ou Ca⁺⁺ dépendantes.

Les différentes isoformes de la glycogène phosphorylase comportent toutes un seul et unique site de phosphorylation au voisinage de l'extrémité N Terminale (Ser 14). Il est maintenant bien établi que seule une protéine-kinase particulière, la **glycogène phosphorylase kinase (G1 Ph K)** ou plus simplement la **phosphorylase kinase**, est capable *in vivo* de phosphoryler ce site.

La phosphorylase kinase elle-même est un quadruple hétérotétramère, chaque hétérotétramère étant constituée de quatre sous-unités : une sous-unité catalytique (γ) et trois sous-unités régulatrices ; les deux premières (α et β) sont elles-mêmes régulées par phosphorylation/déphosphorylation et la troisième (α et β) par fixation de calcium.

Elle est ainsi activée, soit par fixation du Ca⁺⁺ sur sa sous-unité δ , soit par phosphorylation de ses sous-unités α et β par la protéine-kinase A. La phosphorylase kinase constitue donc un relais obligatoire dans l'activation de la glycogénolyse.

Cette régulation, avec intervention d'une cascade d'activations enzymatiques successives, est à l'origine d'un effet amplificateur du signal. Chaque molécule d'enzyme activée, active à son tour un grand nombre de molécules d'une autre enzyme.

Signaux

a) phosphorylation des sous-unités α et β de la G1 Ph K

Le glucagon, hormone pancréatique, porte à l'hépatocyte le signal de manque de glucose des autres tissus. L'hépatocyte répond en synthétisant le second messager AMPc, qui active la PKA, qui phosphoryle la G1 Ph K qui active la glycogène phosphorylase et dégrade le glycogène.

Les catécholamines, par les récepteurs β -adrénergiques, envoient le même signal que le glucagon. (Cet effet est plus particulièrement important dans les muscles striés).

b) fixation de Ca²⁺ à la sous-unité δ de la G1 Ph K

** La vasopressine, l'angiotensine, signaux reconnus par des récepteurs de l'hépatocyte, et l'adrénaline reconnue par les récepteurs α 1-adrénergiques de l'hépatocyte, activent la phospholipase C qui génère les deux seconds messagers diacylglycérol (DAG) et inositol triP (IP3) ; ce dernier libère les réserves en Calcium ionisé du réticulum endoplasmique: le [Ca²⁺] intracellulaire augmente, se lie à la sous-unité δ et active ainsi la G1 Ph K.

** Le Ca²⁺ libéré pour lancer la contraction musculaire (squelette, coeur) exerce le même effet. Ici, ce n'est pas un signal hormonal, mais un signal direct de travail mécanique du muscle strié, qui porte la commande d'activation de la glycogénolyse.

A noter *qu'en pratique*, l'activation de la phosphorylase kinase par le calcium a lieu dans le muscle lors de la contraction musculaire. L'activation de cette même enzyme par phosphorylation (par la protéine-kinase A) a lieu dans le foie sous le contrôle principal du glucagon et accessoirement des catécholamines, et dans le muscle sous le contrôle des catécholamines. L'activation de la phosphorylase kinase active la glycogène phosphorylase et induit la glycogénolyse.

3° RÉGULATION COVALENTE DE LA GLYCOGÈNE SYNTHASE [101-102]

Contrairement à ce que nous venons de voir pour la glycogène phosphorylase, les différentes isoformes de la glycogène synthase (homotétramère de 350 kDa) comportent de très nombreux sites de phosphorylation et sont phosphorylées par plusieurs protéines-kinases. Par exemple, la glycogène synthase musculaire possède une dizaine de sites de phosphorylation et peut être phosphorylée par au moins huit protéine-kinases différentes.

Les sites de phosphorylation sont tous localisés dans les domaines N-terminaux (NT) et C-terminaux (CT) de la glycogène synthase. Tous les sites de phosphorylation ne se retrouvent pas dans toutes les isoformes, d'où une sensibilité différente et adaptée de la glycogène synthase de chaque tissu à diverses stimulations de la glycogénogenèse.

Parmi les protéines kinases capables de phosphoryler la glycogène synthase, citons : la protéine-kinase A, la phosphorylase kinase (elle-même activée par Ca^{++} et la protéine-kinase A), la Calcium Calmoduline dépendante kinase II (Ca^{++} CaM dep kinase II). D'autres kinases découvertes dans les particules de glycogène à l'occasion de ces études interviennent également dans cette régulation, notamment la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), la GSK4 et la GSK5 (aussi appelée caséine kinase II).

On note *qu'en pratique*, la phosphorylation de la glycogène synthase, qui conduit à son inactivation, est réalisée par la protéine-kinase A dont l'activité est induite par les catécholamines dans le muscle, et le glucagon (accessoirement les catécholamines) dans le foie.

4° DÉPHOSPHORYLATION [104-106]

L'équilibre fondamental, enzyme phosphorylée – enzyme déphosphorylée doit pouvoir être déplacé dans les deux sens pour assurer la réversibilité des régulations. Les phosphorylations par les protéine-kinases sont compensées par les déphosphorylations réalisées par les phosphoprotéine-phosphatases.

On notera que pour le métabolisme du glycogène, ces déphosphorylations sont principalement catalysées par une seule phosphoprotéine-phosphatase, la **phosphoprotéine-phosphatase 1 (PP 1)**. Cette enzyme va déphosphoryler la glycogène synthase, la glycogène phosphorylase et les sous-unités α et β de la glycogène phosphorylase kinase.

La régulation de la PP 1 est différente dans le muscle et dans le foie.

Dans le muscle :

La PP 1 est elle-même régulée par un **peptide inhibiteur (Inh 1)**. Quand ce peptide est phosphorylé sur une thréonine (Thr 35) par la protéine-kinase A, il se fixe sur le centre actif de la PP 1 pour l'inhiber. Il s'agit donc d'un mécanisme auto-protégé : la protéine-kinase A activée par l'AMPc entraîne directement ou indirectement la phosphorylation de la glycogène synthase et de la glycogène phosphorylase pour déclencher la glycogénolyse et en même temps phosphoryle l'inhibiteur 1 pour empêcher la déphosphorylation de ces enzymes.

Pour interrompre la stimulation glycogénolytique, il faut l'intervention d'une autre phosphoprotéine-phosphatase, la **PP 2B** (CaM) : cette PP 2B d'une part déphosphoryle l'inhibiteur 1 ce qui le rend inactif et d'autre part déphosphoryle la sous-unité α de la glycogène phosphorylase kinase. Dans ces conditions, la PP 1 devient active et permet la déphosphorylation de la glycogène synthétase, de la glycogène phosphorylase et de la sous-unité α de la glycogène phosphorylase kinase. C'est le deuxième messenger Ca^{++} qui en activant la PP 2B interrompt le message de l'AMPc.

Dans le foie :

La PP 1 elle-même existe sous deux formes interconvertibles, une forme phosphorylée et active et une forme non phosphorylée et inactive. Cette phosphorylation est catalysée par une protéine kinase stimulée par l'insuline donc en cas de reprise alimentaire la PP 1 est phosphorylée et donc active et déphosphoryle tous les enzymes du métabolisme du glycogène conduisant à une activation de la glycogène synthase et donc à une glycogénogenèse.

Dans le muscle :

L'AMP : l'élévation de la concentration intracellulaire en AMP est un témoin très sensible d'un manque d'énergie ; l'AMP est un activateur allostérique de la glycogène phosphorylase **b** (inactive). En dehors de toute stimulation, la glycogénolyse peut donc être déclenchée localement par un manque d'énergie et ainsi fournir du substrat pour la glycolyse qui dans cet état physiologique, est elle-même stimulée par la PFK1. L'ATP produit rétablit la charge énergétique de la cellule. (Ce mécanisme est très efficace dans le muscle). Dans l'hépatocyte, la charge énergétique se maintient généralement à un niveau élevé et cette régulation n'intervient qu'exceptionnellement. Par ailleurs, l'ATP et la glucose 6-P se comportent comme des effecteurs allostériques négatifs de la glycogène phosphorylase b. L'ATP agit par compétition avec l'AMP, et le glucose 6-P empêche la fixation de l'AMP sur son site allostérique.

Le glucose 6-phosphate est un activateur allostérique de la glycogène synthase D (inactive). Une accumulation locale de Glc 6-P (période post-prandiale) entraîne donc une glycogénogenèse en dehors de toutes stimulations externes.

Dans le foie :

Le glucose se comporte comme un inhibiteur allostérique de la glycogène phosphorylase a (active) quand il se trouve à concentration suffisante dans le cytosol ; il se fixe sur son site en provoquant un changement de conformation de la phosphorylase **a** (R → T) qui devient ainsi un meilleur substrat pour la phosphoprotéine-phosphatase 1. La PP1 se fixe fortement sur la phosphorylase **a** mais n'agit que très faiblement quand le site allostérique du glucose n'est pas occupé. La fixation du glucose entraîne donc la déphosphorylation rapide de la phosphorylase **a** et donc son inactivation.

Ce phénomène se manifeste essentiellement dans l'hépatocyte dans lequel l'influx et l'efflux de glucose se produisent librement en fonction du gradient de concentration, grâce à un transporteur membranaire indépendant de l'insuline (GLUT 2) (voir plus haut). La glycogénolyse hépatique en réponse à une stimulation hyperglycémique, peut être inhibée par une concentration intracellulaire élevée en glucose qui, dans cette situation physiologique, provient de l'hydrolyse du glucose 6-phosphate produit par la gluconéogenèse. La sécrétion du glucose par l'hépatocyte étant assurée par cette gluconéogenèse, il devient inutile de poursuivre la glycogénolyse, la glycogène phosphorylase est inhibée. Après un certain temps de jeûne, la gluconéogenèse prend ainsi le relais de la glycogénolyse.

NE JAMAIS OUBLIER

- V' Principale forme de stockage du glucose (Glycogène = homopolysaccharide)
- V' 400 g dans le muscle strié, 100 g dans le foie
- V' Voies métaboliques cytosoliques
- V' Glycogénogenèse
 - Glu -, Glu 6-P -, Glu 1-P -, UDP-glu -, Glycogène (consommation de 2 équivalents « ATP »)
 - Glycogène Synthase + enzyme branchante
- V' Glycogénolyse :

Glycogène Phosphorylase et enzyme débranchante

ü Régulation :

Foie : alternance phase post-prandiale/jeune → rapport insuline-glucagon et état de phosphorylation de la glycogène Phosphorylase et de la Glycogène Synthase

Muscle : alternance repos/exercice physique → libération de Ca²⁺ et action des catécholamines

Régulation complémentaire par allostérie dans ces deux tissus

Rôle particulier des protéines phosphatases dans la régulation du métabolisme du glycogène

Cours-ED n°1 :

Le **cerveau**, qui ne représente que 2 % de la masse corporelle, consomme près de 20 % de l'oxygène de l'organisme au repos et a besoin d'en moyenne 120 g de glucose par jour soit 60 % de la consommation de sucres de l'organisme ce qui représente plus de la moitié des réserves hépatiques .

Sa consommation énergétique est presque exclusivement le fait du glucose (tissu dit gluco-dépendant) ; il est donc très dépendant du glucose circulant qui arrive à son niveau grâce aux transporteurs GLUT1 et GLUT3, transporteurs de forte affinité ($K_m = 1 \text{ mM}$) pour le glucose qui de fait travaillent toujours en conditions de V_{max} (environ 50 000 fois plus vite que par simple diffusion). Sans pratiquement de réserve de glycogène, le cerveau peut toutefois, en cas de jeûne prolongé, utiliser les corps cétoniques et le lactate comme substrats énergétiques.

Le **globule rouge** est quant à lui une cellule gluco-dépendante stricte car contrairement au cerveau, il n'utilise pas de substrats substitutifs au glucose. Il est alimenté en glucose par les mêmes transporteurs GLUT1 et GLUT3 cependant la glycolyse fonctionne sur un mode « anaérobie » dans cette cellule dépourvu de mitochondrie et produit une grande quantité de lactate qui pourra être redistribué aux organes consommateurs (principalement le foie, le cœur, le rein et le cerveau).

Le **rein** qui est naturellement chargé de la filtration et de l'élimination des déchets, est pratiquement dépourvu de réserves énergétiques. Il possède l'équipement enzymatique pour oxyder les acides gras, faire de la glycolyse mais peut également, en cas de jeûne, déclencher une activité néoglucogénique .

Pour le **muscle**, sa consommation énergétique va bien sûr être dépendante de l'exercice physique à fournir. Il possède à la fois des stocks énergétiques sous forme de glycogène et dans une moindre mesure de triglycérides. Il utilise également d'autres substrats énergétiques plus rapidement mobilisables: Dans les 1 à 2 secondes du début d'un effort, c'est l'ATP qui va couvrir les besoins énergétiques, puis la créatine phosphate (10 secondes environ) puis la glycolyse anaérobie suivie si l'exercice se poursuit et de façon non intensive par une glycolyse aérobie.

Enfin, en cas d'effort prolongé, la \hat{a} oxydation des acides gras (qui doit s'accompagner d'une lipolyse au niveau du tissu adipeux) pourra prendre le relais ou agir de pair avec la glycolyse aérobie. En ce qui concerne la glycolyse, elle se déroule à partir des stocks locaux de glycogène, correspondant à environ 400 g de glucose non-échangeables avec d'autres tissus. Ces stocks de glycogène ont été reconstitués en phase post-prandiale à partir du glucose circulant grâce au transporteur GLUT 4 actif en présence d'insuline (tissu insulino-dépendant). En phase de repos, c'est la \hat{a} oxydation des acides gras (pool de triglycérides musculaires) qui couvre majoritairement les besoins énergétiques.

Le **muscle cardiaque** ne couvre lui aussi, comme le muscle squelettique, que ses propres besoins énergétiques.

Au repos 80 % de ces besoins sont couverts par la \hat{a} oxydation des AGL (puisés dans la circulation sanguine à partir des triglycérides circulants dans les chylomicrons et les VLDL et hydrolysés par une lipoprotéine lipase « LPL », myocardique de très forte affinité), 10 % par la glycolyse et 10 % à partir du lactate puisé dans la circulation et converti en pyruvate par une forme de LDH qui privilégie la transformation de Lactate en Pyruvate (forme H₄, voir plus loin les isoenzymes).

A l'effort, après une brève première phase (moins de 2 min) où la glycolyse anaérobie domine (avec production de lactate), une seconde phase aérobie voit une très forte activation de la glycolyse aérobie (x par 10 à 30 fois) permettant de couvrir en moyenne 80 % des besoins énergétiques et une activation plus modérée (x par 2 à 5 fois) de la \hat{a} oxydation couvrant les 20 % restants. En cas de poursuite de l'effort, une hypoxie très délétère pour le cœur et l'organisme, peut survenir.

Le **tissu adipeux** (TA) est caractérisé par l'énorme réserve de lipides énergétiques qu'il renferme (environ 15 kg pour un poids corporel de 70 kg, soit plus de 140 000 Kcal) et par sa répartition totalement ubiquitaire.

En phase post-prandiale, le TA va synthétiser des AG à partir de l'acétyl-CoA provenant de la glycolyse du glucose qui a pu pénétrer dans le TA grâce au transporteur spécifique GLUT4 actif en présence d'insuline (tissu insulino-dépendant).

Par la suite ces AG néosynthétisés ainsi que ceux provenant de l'hydrolyse des triglycérides (TG) alimentaires et hépatiques (par le biais d'une lipoprotéine lipase à partir des chylomicrons et des VLDL), sont stockés sous forme de TG par estérification du glycérol 3-P provenant lui-même de la glycolyse.

En phase de jeûne ou d'exercice musculaire, la triglycéride lipase hormono-sensible (TGHS) activée par sa phosphorylation (glucagon au cours du jeûne et catécholamines au cours de l'exercice) va hydrolyser les TG en AG à destination du muscle, du cœur ou du foie et en glycérol à destination du foie.

Le **foie** occupe pour sa part une place centrale dans le métabolisme énergétique. Il intervient comme un véritable chef d'orchestre de l'homéostasie énergétique et de l'homéostasie du glucose, avec pour objectif principal le maintien d'une glycémie normale (4 - 6 mmol. L⁻¹), maintien capital pour les organes glucodépendants dont bien sûr le cerveau.

En période post-prandiale, le foie va stocker de l'énergie. A partir du glucose, qui dans cette situation va rentrer abondamment (transporteur GLUT2 qui va permettre une forte augmentation de transfert de glucose du fait de sa faible affinité pour le glucose), il va y avoir, synthèse de glycogène, activation de la glycolyse conduisant au pyruvate, puis à l'acétyl-CoA et à la néosynthèse d'acides gras. Ces derniers, estérifiés par l' α -glycéro-P, conduisent à des TG qui vont être exportés vers le TA dans des VLDL. Dans le même temps, les chylomicrons produits par l'entérocyte délivrent au foie des AG, également réestérifiés dans les mêmes conditions et acheminés sous forme de VLDL à différents organes. Les acides aminés arrivant au foie pendant cette phase post-prandiale vont permettre une synthèse protéique active.

En période de jeûne, le foie va être chargé de maintenir la glycémie, grâce à une glyco-génolyse active (4 à 12 premières heures de jeûne) ainsi qu'à la gluconéogenèse apparaissant dès la 6^{ème} heure de jeûne ; les AG qui arrivent au foie du fait de la lipolyse adipocytaire, sont oxydés, permettant de fournir l'énergie nécessaire à cette gluconéogenèse, et de produire d'importante quantité l'acétyl-CoA à l'origine de la synthèse des corps cétoniques .