الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique
—
Université
Yahia FARES de MEDEA

Faculté des Sciences

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
—
جامعة يحي فارس بالمدية

كليـــــة العلـــــوم

POLYCOPIE DE COURS

« Biochimie Microbienne»

Auteur :

KIRDI Rachida

Destiné aux étudiants de

Discipline : Chimie.

Spécialité : Chimie pharmaceutique.

Niveau : 1ere année Master

Approuvé par le Conseil Scientifique de la Faculté en date du : 28/06/2021

Année : 2021/2022

SOMMAIRE

Introduction..... 1

Etude Bibliographique

Chapitre 1.Types trophiques de microorganismes.

1. Sources d'énergie..... 2

1.1. Organismes phototrophes 3

1.1. 1. La phase photochimique 5

1.1. 2. La phase non photochimique 7

1.2. Organismes chimiotrophes..... 8

1.2. 1. Les réactions d'oxydoréduction..... 8

1.2.2. L'accepteur final d'électron..... 9

3. Source de carbone..... 15

Chapitre 2. Métabolisme chez les chimio-organohétérotrophes

- **Catabolisme des glucides**

1. Dégradation des grosses molécules organiques nutritives..... 15

1.1. Dégradation des polysaccharides..... 15

1.1. 1. Dégradation de l'amidon..... 15

1.1. 2. Dégradation de la cellulose..... 17

2. Catabolisme du glucose..... 19

2.1. La glycolyse..... 19

2.1.1. Les différentes de la glycolyse..... 21

2.1. 2. Régulation de la glycolyse..... 22

Cas : 1 Respirations (Présence de la chaine respiratoire)…….. 23

2.2. Oxydation complète du pyruvate formé……..... 23

2.2.1. Décarboxylation puis cycle de krebs (Métabolisme aérobie du pyruvate)…….. 23

2.2. 1. 1. Etapes enzymatiques du cycle……. 26

2. 2. 1. 2. Bilan énergétique de l'oxydation de l'acetyl-COA……..... 29

2. 2. 1. 3. Rôle du cycle de Krebs…… 30

2. 2. 1. 4. Régulation du cycle de krebs…….. 31

2.2. 2. Cycle du glyoxylate ou shunt glyoxylique……. 33

2.2. 2.1. Réaction spécifique du cycle du glyoxylate……..... 34

2.2. 2. 2. Bilan du cycle du glyoxylate……..... 34

2.2. 2.3 Rôle du cycle de glyoxylate…….. 34

2.3. Ré-oxydation des coenzymes réduits (Chaine respiration)…….……..... 36

2.3.1. Respiration aérobie……. 36

2.3. 1.1. Molécule matriciel et molécule cytosolique……..... 38

2.3. 2. Respiration anaérobie……..……..... 40

2.4. Fermentation…… 41

2. 4. 1. Application de la fermentation…… 41

2.4.1.1.Quelques types de fermentation dans l'alimentation…… 42

2. 4. 1.2. Les fermentations dans l'industrie non alimentaire……..... 44

Chapitre 3. Autres voies métaboliques

1. La voie des pentoses phosphates……. 46

1.1. Les étapes de la voie des pentoses phosphates…… 46

1.1.1. Phase oxydative…….. 47

1.1. 2. Phase non oxydative (réversible)……..... 48

1.2. Rôles métaboliques de la voie des pentoses……..……..... 49

1.3. Régulation de la voie des pentoses phosphates……..……..... 50

2.Voie d'Entner-Doudoroff……..... 51

2.1.Les étapes d'Entner-Doudoroff…… 52

Chapitre 4. Catabolisme des autres composés organique

Catabolisme des acides gras

1. Dégradation des lipides…… 55

1.1. Oxydation des acides gras……..... 56

1.2. Bilan énergétique…… 60

2.3. Régulation de la dégradation des lipides……..... 62

2. Devenir du glycérol, du propionyl-COA…… 63

2.1. Devenir du glycerol……..... 63

2.1. 1. Phosphorylation du glycérol…….. 63

2.1. 2. Déshydrogénation du glycérol 3-Ⓟ……. 63

2.1. 3. Isomérisation en glycéraldéhyde 3-Ⓟ ……..…… 65

2.2. Devenir du propionyl-CoA…….. 65

2.2.1. Carboxylation et formation du 2-méthyl malonyl-COA……. 64

2.2. 2. Isomérisation du 2-méthyl malonyl-COA…….. 65

Catabolisme des acides aminés 65

1.Dégradation des protéines……. 65

1. 1. Catabolisme des acides aminés libérés…… 66

- **Catabolisme du méthane et méthanol** 69

Chapitre 5 : Anabolisme et production de biomasse et de métabolites

1.Biomasse……. 70

1.1. Détermination de la biomasse microbienne…… 70

1.2. Application de la biomasse……... 70

2. Production industrielle des enzymes microbiennes…… 73

3.Production des acides aminés…… 74

3.1. Domaine d'utilisation des acides aminés produits par les microorganismes…….. 74

3.2. Les microorganismes producteurs des acides aminés……..… 75

4. Biosynthèse des vitamines…… 76

5. La production des polysaccharides…….. 77

5. 1. Applications industrielles……. 77

6. Biosynthèse des hormones…… 78

7. Biosynthèse des antibiotiques…….. 78

8. Biosynthèse des toxines…….. **79**

Biochimie microbienne

2021/2022
Dr. KIRDI
Rachida

Université Dr. Yahia Farès de
Médéa Faculté des Sciences
Département: Science de la Matière
Public cible : 1ère année Mastère Chimie Spécialité : chimie pharmaceutique Semestre : 2
Unité d'enseignement : Fondamentale
Identification du cours : Biochimie microbienne (BIOM)

Coefficient : 3

Crédits : 6

Durée : 12 semaines

Volume horaire hebdomadaire: 3h (3h cours et 3h Tp)
Amphi A : Cours, Lab 2 : Tp

Enseignante : Cours et Tp : Dr. Rachida KIRDI

Contact : par mail au youracha@yahoo.fr
Disponibilité :
A la salle des enseignants: Je suis disponible lundi et mercredi de 11h00 -12h30 seulement.

Réponse sur le forum : toute question en relation avec le cours doit être postée sur le forum dédié pour que vous puissiez, tous, tirer profit de ma réponse, je m'engage à répondre aux questions postées dans un délai de 48heures.

Par mail **:** Je m'engage à répondre par mail dans 24 heures qui suivent la réception du message.

-Objectif général

A la fin de ce cours, l'apprenant sera capable de :

- Comprendre les capacités métaboliques chez les microorganismes et la grande diversité de leurs métabolismes (réactions biochimiques) de dégradation et de synthèse.
- Connaître les différents intérêts de ce métabolisme :

- Intérêt industriel : connaissance des molécules produites par le microorganisme et utiles à l'homme après leurs extraction (antibiotiques, acides, éthanol…..) et conservation de certaines denrées par transformation microbienne afin d'obtenir de nouveaux aliments ; exemple : les fromages, les yaourts sont des aliments obtenus par transformation du lait par fermentation.

- Les fromages et les yaourts sont états transformés ou stabilisés du lait par fermentation. Le vin est un état stabilisé ou transforme de plusieurs substrats : les pommes, le raisin, le blé, le riz…..
- Intérêt taxonomique : connaissance de certains métabolismes spécifiques permet l'identification et la classification des microorganismes.

-Objectif spécifiques

Le cours « **Biochimie Microbienne**» vise à :

a. Décrire les différents types trophiques chez les microorganismes.
b. Connaître les différents mécanismes biochimiques utilisés par les bactéries.
c. Décrire le métabolisme énergétique des microorganismes eucaryotes et procaryotes.
d. Définir les différences entre les types respiratoires des microorganismes.
e. Savoir calculer le bilan énergétique selon le type répertoire.
f. Décrire les différents types fermentaires chez les microorganismes.
g. Expliquer dans quelles conditions le métabolisme est orienté vers des systèmes oxydatifs et/ou fermentaires.
h. Décrire les capacités lipolytiques des microorganismes pour produire des molécules plus simples énergétiques.
i. Détailler les réactions protéolytiques des microorganismes et de préciser les réactions de dégradation des acides aminés.
j. Expliquer les voies anaboliques microbiennes.

-Pré-requis

Pour pouvoir suivre ce module, l'étudiant a besoin d'avoir des pré-requis en terme des connaissances des modules suivant :

- Des notions de base en biochimie structurale et de cytologie : composition cellulaire (noyau, membrane, mitochondries…..).
- Des connaissances en Microbiologie générale.
- Enzymologie

1. Introduction

Les micro-organismes sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques se traduisant par la production de biomasse (corps cellulaires) et par la dégradation, la transformation ou la production de substances organiques ou minérales. Pour leur vie (entretien ou maintenance), pour leur développement (croissance et multiplication), pour l'expression de leurs propriétés (mobilité, luminescence,…), les micro-organismes ont besoin d'énergie et d'éléments nutritifs. L'énergie nécessaire est tirée du milieu, directement sous forme d'énergie lumineuse ou indirectement sous forme d'énergie chimique par oxydation de substances organiques ou minérales. Le catabolisme est l'ensemble des réactions permettant la récupération d'énergie biologiquement utilisable et la production de métabolites de base à partir de substrats organiques ou de réserves cellulaires. Cette dégradation est plus ou moins complète et donne lieu à la formation de métabolites (déchets du catabolisme). L'anabolisme est l'ensemble de réactions de synthèses cellulaires à partir de métabolites de base issus du catabolisme et d'éléments du milieu. Le terme bioconversion est utilisé lorsque des microorganismes sont employés en tant que moyen de transformation et jouent le rôle d'une enzyme ou d'un complexe multienzymatique. Dans ce cas, la croissance (et parfois même la vie cellulaire) n'est pas nécessaire. Le terme biotransformation doit être utilisé lorsque la réaction s'effectue avec croissance du microorganisme.

Les produits libérés par le métabolisme au cours d'une phase de croissance sont appelés « métabolites primaires », quelle que soit leur origine, catabolisme ou anabolisme : il s'agit de produits non spécifiques (acides aminés, nucléotides, vitamines, acides organiques, éthanol), le terme « métabolite secondaire » est utilisé dans le cas de produits spécifiques de l'anabolisme, dont l'apparition n'est pas liée à la phase de croissance proprement dite (antibiotiques, agents immunosuppresseurs, agents antitumoraux, bioinsecticides).

Chapitre : 1 Type trophiques des microorganismes

Les nutriments sont des substances utilisées dans la conversion de l'énergie (production d'ATP) ou dans la biosynthèse. Ils sont donc indispensables pour la croissance microbienne.

Les macro-éléments ou macronutriments sont nécessaires en quantités importantes

- ✓ (C, O, H, N, S, P), ils sont des constituants des glucides, lipides, protéines et les acides nucléiques.
- ✓ (K, Ca, Mg, Fe) existe dans la cellule à l'état de cations et jouent plusieurs rôles.

Les micro-éléments ou oligo-éléments

- ✓ (Zn, Co, Mo, Ni,Cu) sont nécessaires aux cellules en quantité infime.

Les micro-organismes sont classées en plusieurs types trophiques*selon:

1. La source d'énergie utilisée et la nature du donneur d'électrons.
2. L'accepteur final d'électrons.
3. La source de carbone.

1. Sources d'énergie

Il y a seulement deux sources d'énergies disponibles:

- ➢ L'énergie lumineuse captée durant la photosynthèse: on parle d'un microorganisme **phototrophe.**
- ➢ L'énergie provenant de l'oxydation des molécules organiques et inorganiques: on parle d'un microorganisme **chimiotrophe.**

Dans les deux cas, l'énergie est stockée sous forme d'énergie de liaison chimique biologiquement utilisable (Figure 1) (il s'agit de la liaison anhydride phosphorique de l'ATP). La formation d'ATP à partir de la source primaire d'énergie est plus ou moins complexe selon le type trophique ou métabolique.

* Le terme type trophique (du verbe grec trophus, « action de nourrir ») spécifie la manière dont un organisme vivant constitue sa propre matière organique.

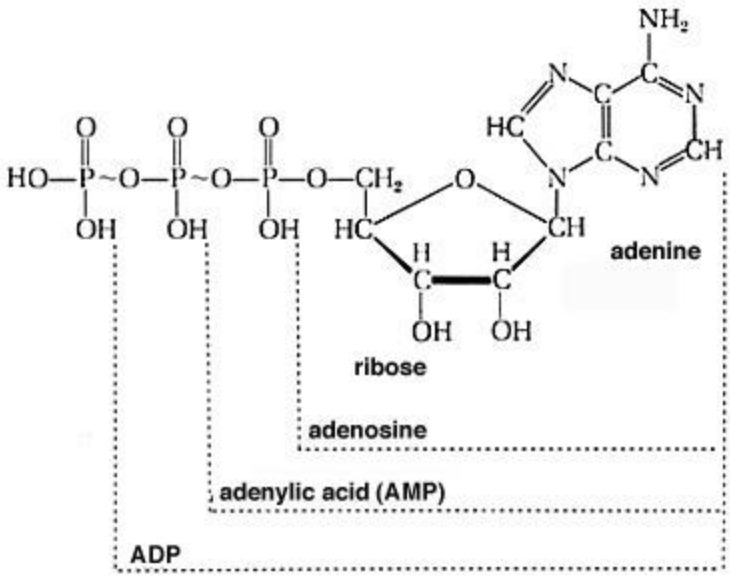


***Figure 1**: Structure de l'ATP*

1.1. Organismes phototrophes

La photosynthèse, qui signifie littéralement « synthèse [de matière organique] par la lumière », correspond au piégeage de l'**énergie lumineuse** provenant du Soleil, et de son stockage sous la forme de matière organique (des **glucides** notamment).Ce faisant, les végétaux et les **bactéries** photosynthétiques **produisent leurs propres composants à partir de l'énergie solaire** (on dits qu'ils sont **autotrophes**).

La photosynthèse des végétaux et des **cyanobactéries** consomme de l'**eau** (H_2O), du **dioxyde de carbone** (CO_2) et produit de l'**oxygène** (O_2) – des expériences de marquage radioactif ont montré que cet oxygène provient de l'eau, et non du CO_2 absorbé. Ce faisant, elle **enrichit l'atmosphère en oxygène**. Consommé par les êtres vivants (**respiration**), cet oxygène atmosphérique est renouvelé en permanence par l'activité de l'ensemble des organismes photosynthétiques – s'il n'y avait plus de photosynthèse sur Terre, son stock finirait par s'épuiser. Cas particulier, la photosynthèse des bactéries pourpres et des bactéries vertes ne rejette pas d'oxygène, mais d'autres sous-produits (essentiellement du **soufre** [S]).

La photosynthèse est le processus au cours duquel l'énergie lumineuse est captée et convertie en énergie chimique. L'intensité lumineuse optimale est différente d'une espèce végétale ou bactérienne à une autre. Les diverses radiations qui composent la lumière blanche ont une action spécifique : les radiations rouges (600 nm) et indigo (400-450 nm), absorbées par la chlorophylle, sont les plus efficaces ; les vertes ne sont d'aucun effet.

• La photosynthèse est le processus métabolique le plus important sur terre car presque toute l'énergie provient de l'énergie solaire.

• Elle fournit aux organismes photosynthétiques **l'ATP** et le pouvoir réducteur nécessaires **(NADP)** à la synthèse des matières organiques requises pour leur croissance.

• Les organismes photosynthétiques réduisant et incorpore le **CO_2**.

• La photosynthèse est aussi responsable duré approvisionnement de l'oxygène**O_2**.

• Bien que la photosynthèse est associée aux plantes supérieures mais les microorganismes sont responsables **au moitié** de la photosynthèse sur terre. Il s'agit des algues parmi les protistes supérieures ou Eucaryote et les bactéries photosynthétiques parmi les protistes inferieurs ou procaryotes.

Tableau 1.*Diversité des organismes phototrophes.*

Organismes eucaryotes	**Organismes procaryotes**
Plantes supérieures	Cyanobactéries (algues bleues)
Algues multicellulaires rouges, brunes et vertes	Bactéries vertes sulfureuse ou non
Algues unicellulaire (dinoflagellés, diatomée)	Bactéries pourpres Sulfureuses ou non

Chez les plantes et les **algues**, la photosynthèse s'effectue au niveau des parties vertes, et tout particulièrement des **feuilles** : leurs **cellules** renferment en effet de petites usines à photosynthèse, les **chloroplastes**, contenant eux-mêmes de la **chlorophylle**, un pigment de couleur verte qui permet la captation de l'énergie lumineuse. Chez les végétaux qui ne sont pas de couleur verte – par exemple les plantes à feuilles pourpres –, le processus et la localisation sont les mêmes : simplement, la chlorophylle est masquée par des pigments d'autres couleurs.

Chez les **bactéries** (notamment les abondantes **cyanobactéries**, mais aussi les bactéries vertes et les bactéries pourpres), qui sont dépourvues d'organites, la photosynthèse se fait dans le cytoplasme, sur des invaginations de la **membrane cellulaire** ou des corpuscules (appelés *chlorosomes*), qui renferment des *bactériochlorophylles*.

Chez les végétaux et les cyanobactéries, les pigments photosynthétiques sont groupés en *photosystèmes* : ceux-ci sont composés d'une **antenne collectrice** des **photons** (composée de chlorophylle b, de **caroténoïdes** et de **protéines**), et d'un **centre réactionnel** (composé de deux molécules de chlorophylle a), qui a pour fonction de transférer des **électrons** à une chaîne d'accepteurs d'électrons. Deux photosystèmes distincts ont été identifiés : le *photosystème I* et le *photosystème II* (numérotés dans l'ordre de leur découverte).

La photosynthèse se déroule en deux phases distinctes : une phase dépendante de la lumière (phase photochimique ou phase claire), au cours de laquelle **l'énergie solaire est captée par la chlorophylle**, suivie d'une phase indépendante de la lumière (phase non photochimique ou phase sombre, beaucoup plus longue, où cette **énergie** est utilisée pour **réaliser les synthèses chimiques.**

- ***La phase photochimique (Phase claire)***

Chez les végétaux, la *phase photochimique*, connue aussi sous les noms de phase claire ou phase lumineuse (bien que ces expressions soient aujourd'hui abandonnées par les scientifiques) se produit dans des replis de la membrane du **chloroplaste**, appelés thylakoïdes.

Au cours de cette phase, le photosystème I (PS I), frappé par les **photons** de la lumière solaire, éjecte des **électrons**. Ceux-ci sont transférés à une chaîne de transporteurs d'électrons, à l'issue de laquelle ils servent à réduire le $NADP^+$ en NADPH + H^+ (→ **nicotinamide**).

Des **photons** frappent aussi le photosystème II (PS II), qui libère également des électrons. Ceux-ci sont transférés à une chaîne de transfert d'électrons, puis à un complexe appelé *cytochrome*. Ce dernier transfert déclenche le passage d'ions H^+ dans le stroma du chloroplaste (le milieu aqueux à l'intérieur du chloroplaste) ; ce passage permet à une enzyme, l'ATP-synthétase, de produire des molécules d'ATP (**adénosine triphosphate**) – l'ATP est la molécule universelle de stockage de l'**énergie** chez les êtres vivants. Du cytochrome, les électrons passent sur le PS I, pour compenser la perte d'électrons subie à la suite de l'action des photons. Les photons provoquent également la destruction des molécules d'eau (c'est la *photolyse de l'eau*). Cette réaction ($H_2O \rightarrow 2H^+ + ½\ O_2 + 2e^-$) produit

des **protons** qui vont rejoindre le stroma du chloroplaste et des électrons qui vont combler le trou électronique du PS II ; c'est aussi cette réaction qui dégage de l'**oxygène** (on voit ainsi que l'oxygène est un sous-produit, un déchet du mécanisme de la photosynthèse).

Le processus de photosynthèse comprend deux étapes : phase lumineuse et phase obscure et se déroule dans le chloroplaste (*Figure 2*).

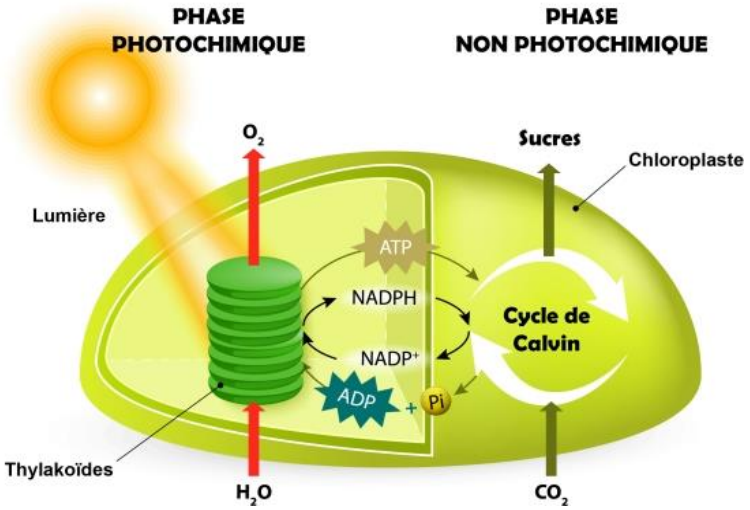


Figure 2 : *Schéma des principales étapes de la photosynthèse dans le chloroplaste***.**

L'équation bilan de la photosynthèse des végétaux et des cyanobactéries (dans laquelle l'eau est le donneur d'électrons), est la suivante :

$$6\ CO_2 + 6\ H_2O \rightarrow 6\ O_2 + 6\ C_6H_{12}O_6$$

Pour les microorganismes :

- Le processus de la photosynthèse se déroule dans le chloroplaste chez les protistes supérieurs ou les algues.
- Chez les bactéries (protistes inferieurs) les processus s'effectue dans les chromatophores : il s'agit de formes primitives des chloroplastes sous forme de vésicules simples contenant de la bactérie

- ***La phase non photochimique (Phase obscure)***

La *phase non photochimique*, autre fois appelée phase sombre ou phase obscure, se déroule dans le stroma du chloroplaste et ne nécessite pas de lumière. Elle correspond à la synthèse de la matière organique ; elle consomme du CO_2 et libère de l'eau. L'ATP et le NADPH + H^+ produits par la phase photochimique servent à transformer le CO_2 en **glucides**, au cours d'une série de réactions **biochimiques** appelées *cycle de Calvin* (Figure 3). Celui-ci débute par la fixation du dioxyde de carbone sur un composé appelé RuDP (ribulose-1,5-diphosphate), grâce à une **enzyme**, **la Rubisco** (ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygénase) – acteur majeur de la transformation du CO_2 en composés organiques, la Rubisco est la protéine la plus abondante sur Terre.

• Cette phase se déroule dans le stroma chez les microorganismes eucaryote et dans le cytoplasme chez les microorganismes procaryote.

• Cette énergie chimique (L'ATP et le $NADPH_2$ est utilisée pour réduire ou fixer le CO_2 et synthétiser les constituants cellulaires (le glucose).

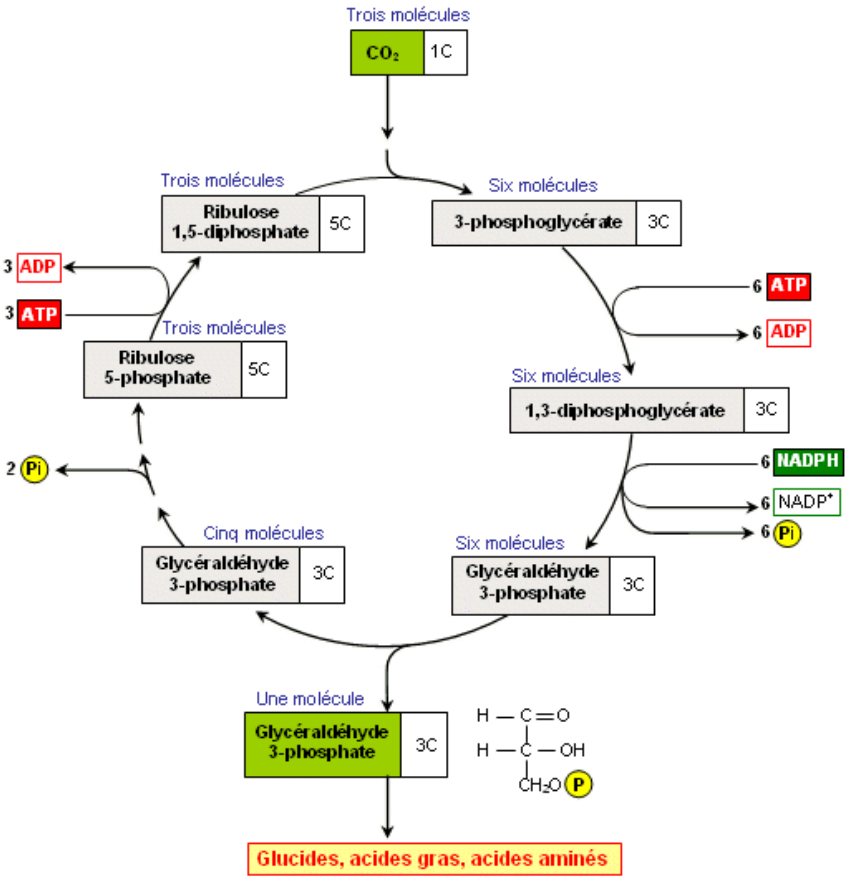


Figure 3 : *Cycle Calvin.*

1.2. Organismes chimiotrophes

Les levures, les moisissures et la plupart des bactéries, sont incapables d'effectuer la photosynthèse car ils sont dépourvues de pigments chlorophylliens et sont par conséquent incapables de faire la photosynthèse.

Elles doivent donc tirent leur énergie de l'oxydation des composés chimiques organique ou inorganiques (oxydoréduction)

Les chimio-organohétérotrophes regroupent la majorité des bactéries : de la contamination alimentaire et d'intérêts médicaux et industriels : antibiotique, vitamines et, bioéthanol etc.

Les substances organiques catabolisées par les chimiotrophes sont généralement : les glucides, protéines, lipides, les hydrocarbures, les alcools, les acides organiques.

1.2.1. Les réactions d'oxydoréduction

Plusieurs processus métaboliques impliquent des réactions d'oxydoréduction (transfert d'électrons)

Le transfert d'électrons d'un donneur à un receveur :

- Une **oxydation** est une perte d'électrons
- Une **réduction** est un gain d'électrons

Une oxydation est une perte d'électrons, qui conduit à une diminution du contenu énergétique de la molécule.

Dans un grand nombre d'oxydation cellulaire, deux électrons et deux ions hydrogène sont perdus en même temps, ce qui équivaut à la perte de deux atomes d'hydrogène

Dans la plupart des cas, l'oxydation est, en fait, une **déshydrogénation.**

- La constante d'équilibre de la réaction est appelé la potentiel de réduction standard (E_0) (potentiel redox), elle mesure la tendance à perdre des électrons et se mesure en Volts.

Le standard de référence pour le potentiel de réduction est le système hydrogène avec E0 (pH =7) de -0.42 volts.

- Plus cette valeur est négative et meilleure sera la capacité de donner des électrons. A l'inverse, plus la valeur est élevée et meilleure sera la capacité à recevoir des électrons.

Exemple :

$NAD + 2\ H^+ + 2\ e \rightarrow NADH^+H^+ EQ' = -0.32\ V$

$½o_2 + 2\ H+ + 2^e \rightarrow H2O \qquad EQ' = +0.82\ V$

$NADH^+H^+ + ½o_2 \rightarrow H_2O + NAD^+$

Lors de transfert des électrons une quantité d'énergie libre ΔG°' est libérée

La relation entre ΔG°' de la réaction et la différence entre les potentiels de réduction des deux couples ΔE°' est :

$$\Delta G°' = - NF. \Delta E°'$$

N : nombre d'électrons transférés.

F : constante de Faraday (23.062 kcal/mol.volt, 96.48 kJ/mol.volt)

Chaque variation de ΔE°' de 0.1 volt, une variation de 46 kcal de ΔG°' et deux électrons dans sens inverse (des potentiels plus positifs vers les négatifs) nécessite une quantité d'énergie.

Les transporteurs des électrons : NAD^+, NADP+, FAD, FMN , Coenzyme Q (ubiquinone), les cytochromes, le ferrédoxine.

1.2.2. L'accepteur final d'électron

Le comportement « respiratoire » du microorganisme et ses relations vis-à-vis de l'air sont conditionnés par la nature de l'accepteur final d'électrons et de protons.

Il existe plusieurs définitions des termes respiration et fermentation. Au sens strictement biochimique, le terme respiration, ou métabolisme oxydatif (Phosphorylation oxydative), est appliqué aux processus d'oxydation dans lesquels l'accepteur final est une molécule minérale, alors que le terme fermentation, ou métabolisme fermentaire, est appliqué au cas où l'accepteur final est un composé organique, généralement endogène.

Il existe également un mécanisme d'élimination directe des électrons et protons. Ce mécanisme, propre à de nombreuses bactéries anaérobies, entraine la formation d'hydrogène sous l'action d'une hydrogénase. Ce système n'est énergétique que si l'hydrogénation est liée à une phosphorylation directe du substrat.

Lorsqu'il y a métabolisme oxydatif, les produits carbonés (déchets du métabolisme) ont un degré d'oxydation du carbone supérieur à celui du substrat. La respiration « classique »

d'un substrat organique conduit à la dégradation complète de son squelette carboné avec formation de CO_2 (forme biologique la plus oxydée du carbone).

En microbiologie, toute dégradation incomplète du substrat, donnant des métabolites carbonés, est appelée fermentation, même s'il s'agit d'un métabolisme oxydatif (il est préférable dans ce cas de parler d'une fermentation oxydative).

A. Respiration

La respiration est l'ensemble des réactions biochimiques d'oxydation procurant àl'organisme l'énergie nécessaire à ses biosynthèses essentiellement grâce à desphosphorylations oxydatives membranaires (chaîne de transfert des électrons).

On distingue deux types de réactions en fonction de la nature chimique de l'accepteur final (*Tableau 2*):

- accepteur = O_2→ **respiration aérobie**
- accepteur ≠ O_2 → **respiration anaérobie**; l'accepteur peut être minéral (nitrates,sulfates, gaz carbonique) ou organique (ex: fumarate).

Tableau 2.*Différents accepteurs d'électrons utilisés lors de la respiration chez les Bactéries.*

Accepteur d'électrons	**Produit final réduit**	**Nom du processus**	**Exemples de microorganismes**
O_2	**H_2O**	Respiration aérobie	***Escherichia coli, Streptomyces.***
$\boldsymbol{NO_3^-}$	$\boldsymbol{No_2^-}$ **,** $\boldsymbol{NH_3}$**or** $\boldsymbol{N_2}$	Respiration anaérobie (dénitrification)	***Bacillus, Pseudomonas***
$\boldsymbol{SO_4^-}$	**S or H_2S**	Respiration anaérobie (réduction des sulfates)	***Desulfovibrio***
Fumarate	**Succinate**	Respiration anaérobie Utilisant un accepteur d'électrons organique	***Escherichia coli,***
CO_2	**CH_4**	Méthanogènes	***Methanococcus***

A. 1. Phosphorylation oxydative (chaîne de transfert des électrons)

La chaîne de transfert des électrons, encore appelée chaîne respiratoire, à laquelle sont associées les phosphorylations oxydatives, a une structure très complexe comparable à celles

des cellules eucaryotes mais il existe des différences notables d'une bactérie à l'autre (voir exemples ci-dessous).

En admettant, **pour simplifier**, que le seul transporteur soluble d'électrons au cours du métabolisme respiratoire soit le NAD^+, l'oxydation complète du glucose par la voie aérobie du cycle tricarboxylique correspond à la réaction globale suivante:

$$\mathbf{C_6H_{12}O_6 + 6H_2O + 12NAD^+ \rightarrow 6CO2 + 12NADH + 12\ H^+}$$

La chaîne respiratoire intervient pour réoxyder les coenzymes réduits:

$12NADH + 12H^+ + 6O_2 \rightarrow 12NAD^+ + 12H_2O$

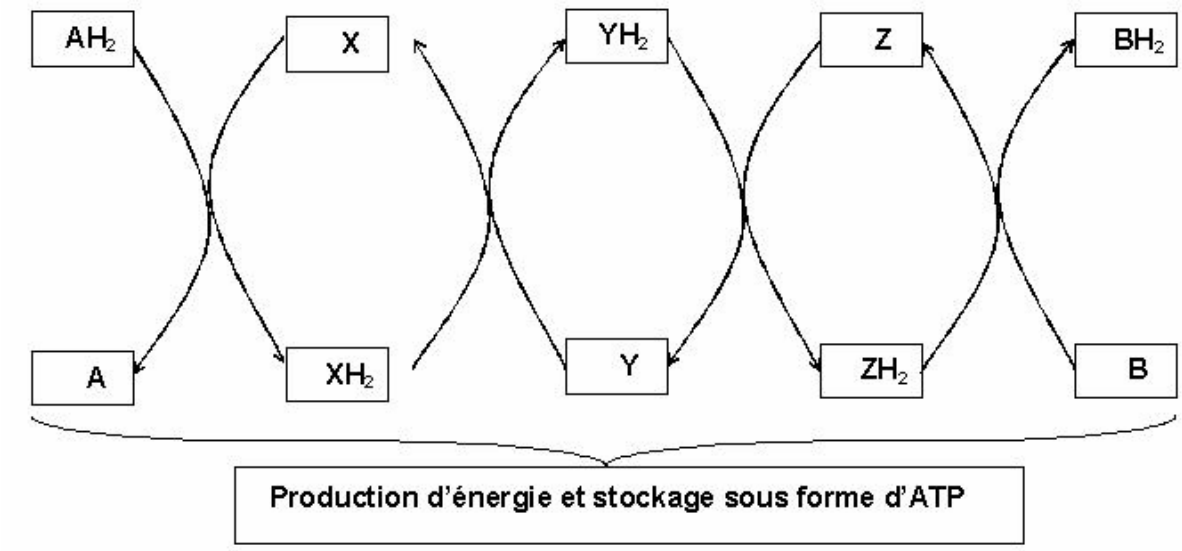


Figure 5 : *Représentation schématique de la chaîne respiratoire chez les bactéries.*

AH_2 : Donneur d'électrons (substrat énergétique)

A : Donneur oxydé

B : Accepteur final d'électrons

Les transporteurs intermédiaires (X, Y et Z) peuvent être des co-enzymes telsque NAD, FAD, FMN ou des cytochromes.

En fonction de la nature du donneur, on définit deux types trophiques:

- donneur minéral → **chimiolithotrophie**
- donneur organique → **chimioorganotrophie**

A. 2. Respiration aérobie

Il existe divers mécanismes de respiration aérobie (l'accepteur final des protons est l'oxygène de l'air), ils ne peuvent intervenir que dans des conditions d'aérobiose. Les microorganismes ne possédant qu'un système de ce type sont des « aérobies strictes ».

La voie la plus couramment rencontrée chez les microorganismes aérobies est la voie classique des cytochromes. L'enzyme terminale est la cytochrome oxydase, il y a formation de H_2O. Ce type de respiration est habituellement lié à la dégradation complète du substrat. La formation de H_2O peut se faire sans intervention du cytochrome oxydase ou être totalement cytochrome-indépendante. Des cas de respiration « insensible au cyanure » ont été décrits chez des microorganismes eucaryotes. Ces voies alternes peuvent présenter une part importante de la respiration et sont aussi localisées dans la mitochondrie. Chez certaines levures, ces oxydations interviennent au niveau du coenzyme Q et sont sensibles à l'action des acides hydroxamiques (acide salicylhydroxamique : SHAM). Il y a des systèmes équivalents chez les bactéries.

A. 3. Respiration anaérobie

Il s'agit d'un processus où l'accepteur final d'hydrogène est une substance minérale oxydée. De nombreux microorganismes sont capables d'oxyder complètement le glucose en l'absence d'air à condition qu'il y ait du nitrate dans le milieu. Outre les nitrates, d'autres produits peuvent être utilisés : nitrites, sulfates, soufre, CO_2…

Lors de la respiration anaérobie, la dégradation du substrat organique source d'hydrogène (H+, e-) peut ne pas être complète et aboutit à d'autres substances (acides organiques).

B. Fermentation

La fermentation est l'ensemble des réactions biochimiques d'oxydation qui fournissent à l'organisme de l'énergie grâce à des phosphorylations non couplées aux processus membranaires, mais ayant lieu uniquement dans le cytoplasme, au niveau du substrat.
La production d'énergie, par fermentation, est impossible chez les bactéries aérobiesstrictes. En aérobiose, seules les bactéries anaérobies facultatives aérotolérantes peuvent produire de l'énergie par fermentation; chez les bactéries anaérobies strictes et aéroanaérobies facultatives les voies fermentatives sont réprimées en aérobiose (effet inhibiteur de l'oxygène).

La fermentation du glucose, par exemple, se fait en deux étapes:

- une première série de réactions aboutissant à l'oxydation du glucose en un composé intermédiaire (acide pyruvique);
- une seconde série conduit à un ou plusieurs produits finals (acide lactique, acétate, éthanol, etc...).

L'énergie produite par fermentation est nettement inférieure à celle procurée par respiration. Exemple: l'oxydation complète du glucose en CO_2 et H_2O, par respiration aérobie, produit 674 kcal; alors que sa fermentation en acide lactique ne produit que 22,5kcal.

Ceci explique le faible rendement de croissance obtenu en anaérobiose, comparé à celui obtenu au cours des processus respiratoires.

3. Source de carbone

Certaines bactéries peuvent utiliser le gaz carbonique de l'air ou ses sels (carbonates) comme seule source de carbone; elles sont dites **autotrophes**. Elles sont donc capables de synthétiser la matière organique à partir de cette source minérale.

Parmi ces bactéries, on distingue:

- Les autotrophes **strictes** qui exigent le CO_2 comme source de carbone unique
- Les autotrophes **facultatives** qui peuvent utiliser le CO_2 et le carbone organique.

Pour la majorité des bactéries, la source de carbone est **organique**; elles sont dites **hétérotrophes**.

Parmi ces bactéries on distingue:

- Celles qui sont capables de se développer en présence d'une seule source de carbone organique (glucose par exemple); elles sont appelées **prototrophes**. A partir de cette source, elles sont capables de synthétiser tout ce dont elles ont besoin comme substance organique.
- d'autres bactéries, notamment parmi les souches parasites, sont incapables de synthétiser certaines substances indispensables à leur croissance (**facteurs de croissance**) à partir de la seule source de carbone organique fournie; il faut donc les leur apporter dans le milieu; elles sont dites **auxotrophes**.

Les facteurs de croissance regroupent les **acides aminés**, les **vitamines** et les **bases azotées (purines et pyrimidines)**.

La classification des microorganismes selon leurs besoins nutritionnels est montrée dans le tableau suivant :

Tableau 3. *Type trophique chez les microorganismes.*

Classe besoin	**Nature du besoin**	**Type trophique**
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation de composés Organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électrons	Minérale	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
Source de carbone	Composé minérale	Autotrophe
	Composé organique	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Non nécessaires	Phototrophe
	Nécessaires	Auxotrophe

Chapitre : 2 Métabolisme chez les chimio-organohétérotrophes

Catabolisme des glucides

1. Dégradation des grosses molécules organiques nutritives

1. 1. Dégradation des polysaccharides

Les glucides susceptibles d'être dégradés par les microorganismes sont nombreux et variés. Les polyholosides comme l'amidon, la cellulose, l'inuline et parfois des plus petites molécules comme le saccharose sont incapables de pénétrer dans la cellule. Ils doivent être au préalable découpés en fragments de faible poids moléculaire par des enzymes hydrolytiques, excrétées par le microorganisme dans le milieu. Les produits formés pénètrent ensuite dans la cellule. Dans la plupart des cas, la transformation des macromolécules glucidiques, ainsi que de diverses autres substances organiques, aboutit à la formation d'hexose (essentiellement glucose) ou de pentoses. Le glucose est le point de départ des principales voies du catabolisme cellulaire.

1. 1. 1. Dégradation de l'amidon

L'amidon constitue la principale réserve glucidique végétale, il est un homopolymère constitué de résidus d'α-D-glucose (98 à 99%) liés en α-1,4 et α -1,6. Ce dernier type de liaison est couramment dénommé " point de branchement " ou encore " point de ramification". Il est composé de deux macromolécules : l'amylose et l'amylopectine. L'amidon granulaire contient également un certain nombre de constituants mineurs (lipides, protéines, minéraux) dont la localisation au niveau du grain et la teneur varient selon l'origine botanique. Leurs rôles ne sont pas clairement définis mais ils peuvent se révéler importants pour la détermination des propriétés physico-chimiques de 1' amidon.

Amylose et amylopectine

L'amylose, considéré comme une molécule linéaire faiblement branchée (moins de 1% de points de branchement), constitue 20 à 30% du poids du grain d'amidon. Les chaînes en nombre limité (3 à 20) sont formées en moyenne de 500 à 6000 unités de glucose. Le degré de polymérisation (DP) dépend de l'origine végétale. Il est en moyenne de 940 pour le maïs, 1850 pour l'orge et 3200 pour la pomme de terre.

L'amylopectine est le composant majoritaire puisqu'elle représente 70 à 80% du poids du grain. Contrairement à l'amylose, l'amylopectine possède un taux de branchement qui

atteint 5 à 6%. Les chaînes constituant l'amylopectine sont en moyenne plus courtes que celles de l'amylose (15 à 60 résidus de glucose) et varient selon l'espèce végétale. Le degré de polymérisation de l'amylopectine est compris entre 10^7 et 10^8.

- **Alpha-amylase**

Les amylases Les amylases se repartissent en deux classes selon leur mode d'action : les endo-amylases et les exo-amylases.

-les endo-amylases, telles que les α-amylases (EC 3.2.1.1), sont capables de cliver les liaisons a-1,4 de manière aléatoire dans une molécule d'amylopectine solubilisée.

- les exo-amylases, telles que les β-amylases (EC 3 .2.1.2), hydrolysent quant à elles de manière récurrente le même type de liaison à partir d'une extrémité non-réductrice.

- **Mode d'action des endo-amylases**

Deux mécanismes d'attaque de l'amylose en solution par l'a-amylase ont été proposés. Il s'agit des mécanismes dits d'attaque multiple et d'attaque préférentielle.

- Au cours d'une attaque multiple, la rencontre de l'enzyme avec son substrat se fait au hasard et toutes les liaisons sont susceptibles d'être hydrolysées. Après hydrolyse, un des deux produits de la réaction est relâché, alors que l'autre est retenu au sein de l'enzyme. Celui-ci glisse le long du site actif pour y subir une nouvelle hydrolyse. C'est après plusieurs répétitions de ce processus, que le site catalytique de 1' enzyme est définitivement libéré par les produits de la réaction.
- L'attaque préférentielle se distingue de la précédente puisqu'elle ne conduit qu'à une hydrolyse unique. Les deux produits de la réaction sont relâchés après l'événement catalytique. Dans ce cas la susceptibilité des liaisons à 1 'hydrolyse enzymatique est variable. En général, les extrémités du glucane sont plus résistantes. L'attaque préférentielle concerne principalement les malto-oligosaccharides utilisés comme substrats par l'endo-amylase. Les a-amylases sont présentes dans la plupart des organismes vivants. D'une manière générale, leurs rôles semblent se cantonner à la dégradation de l'amidon.

- **Mode d'action des exo-amylases**

L'action des β-amylases depuis l'extrémité non-réductrice d'un polymère de glucose provoque la libération de maltose. C'est le mécanisme d'attaque multiple présenté ci-dessus qui est utilisé par les β-amylases. L'action de l'enzyme étant bloquée par la présence des liaisons α-1,6, la dégradation de l'amylopectine par celle-ci conduit à la production d'une β-dextrine limite de haut poids moléculaire.

1. 1. 2. Dégradation de la cellulose

La cellulose a été découverte en 1838 par **Anselme Payen**, un chimiste français qui observe alors une molécule composante de la paroi des plantes qui peut être dégradée, tout comme l'amidon, en glucose. La construction du mot cellulose vient donc de l'association de "cellule" et de "ose", suffixe français qui désigne les sucres, c'est donc "le sucre provenant des cellules". Cette dénomination a ensuite été adoptée par l'ensemble de la communauté scientifique mondiale. La cellulose est le polysaccharide naturel structural majeur des plantes.

La cellulose est un polysaccharide linéaire constitué d'un enchaînement d'unités glucosyles liées en β1-4. Cette caractéristique engendre la rotation de 180° par rapport à leur voisin des molécules de glucose composant la chaîne formant ainsi un motif de répétition de deux unités de glucose : le cellobiose. Cela induit une structure moléculaire hélicoïdale très étirée de pas de 7 unités de cellobiose. Chaque unité de glucose (AGU, unité anhydroglucose) a pour formule brute ($C_6H_{10}O_5$) et mesure 0,515nm. Elle possède trois groupements hydroxyles libres en positions équatoriales C 2,3 et 6 ainsi que deux atomes d'oxygène engagés dans les liaisons osidiques en C1 et 4.

La chaîne de cellulose peut être décrite selon trois parties : - l'extrémité réductrice dont le carbone anomère n'est pas lié à un autre glucose. Il en résulte un équilibre entre les formes hémiacétale et aldéhyde, conférant une réactivité spécifique à cette position, - le cœur de la chaîne saccharidique composé d'un nombre n variable d'AGU, - l'extrémité non réductrice dont le carbone anomère est engagé dans une liaison glucosidique.

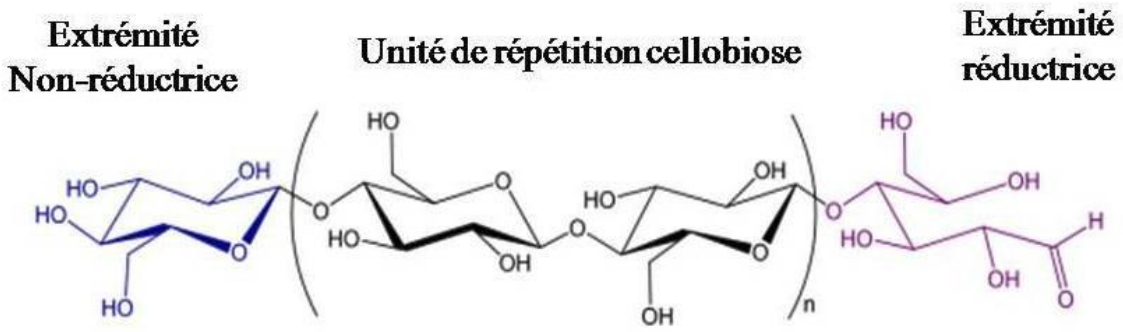


Figure 1 : *Chaine de cellulose.*

Le degré de polymérisation (DP) peut atteindre jusqu'à 20 000 molécules de glucose suivant l'origine du polysaccharide.

La cellulose est un polymère linéaire de D-glucose, les molécules de glucose sont liées entre elles par des liaisons β (1-4).

Naturellement, la cellulose est dégradée par une famille d'enzymes appelée cellulases appartenant aux glycoside-hydrolases. Les cellulases sont largement utilisées dans les industries papetières, textiles, agroalimentaires ou encore des détergents (Figure 2). Elles sont notamment utilisées pour le désancrage du papier, la décoloration de textiles et l'abrasion de surface du denim (bio-stoning). Dans les industries alimentaires, elles ont des applications en tant qu'additif, par exemple pour le dépulpage des fruits. Elles sont également utilisées dans l'industrie des vins et des huiles pour améliorer le pressage des fruits et la libération des arômes, ainsi que pour la nutrition animale.

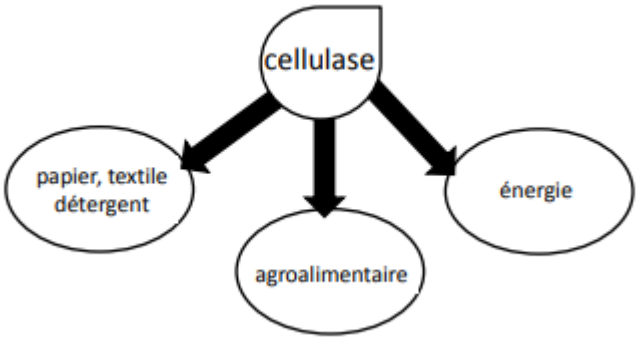


Figure 2*: Application des cellulases dans l'industrie.*

2. Catabolisme du glucose

Le principale voie métabolique utilisée par les microorganismes pour oxyder le glucose : **la glycolyse** (ou **voie d'Embden Meyerhof Parnas**).

Les autres voies possibles sont :

-Le **cycle des pentoses phosphates** (ou voie des hexoses monophosphates).

-La voie d'**Enter Doudoroff**.

2. 1. La glycolyse

La glycolyse est la voie métabolique anaérobie de transformation oxydative du glucose en pyruvate générant deux moles de ATP et deux moles de $NADH,H^+$.Leur rôle est d'assuré le besoin énergétique de la cellule vivante.

- La glycolyse est une série de réaction enzymatique en nombre de 10 catalysés par 10 enzymes.
- Cette voie présente chez la plupart des microorganismes :levures, moisissures, bactéries aérobies aéro-anaérobie (entérobactéries).
- Cette voie fonctionne en présence et en absence d'oxygène.
- La glycolyse se déroule dans le cytoplasme chez les eucaryotes et les procaryotes
- L'ATP produite par phosphorylastion au niveau du substrat par rupture exergonique d'une molécule du substrat riche en énergie.

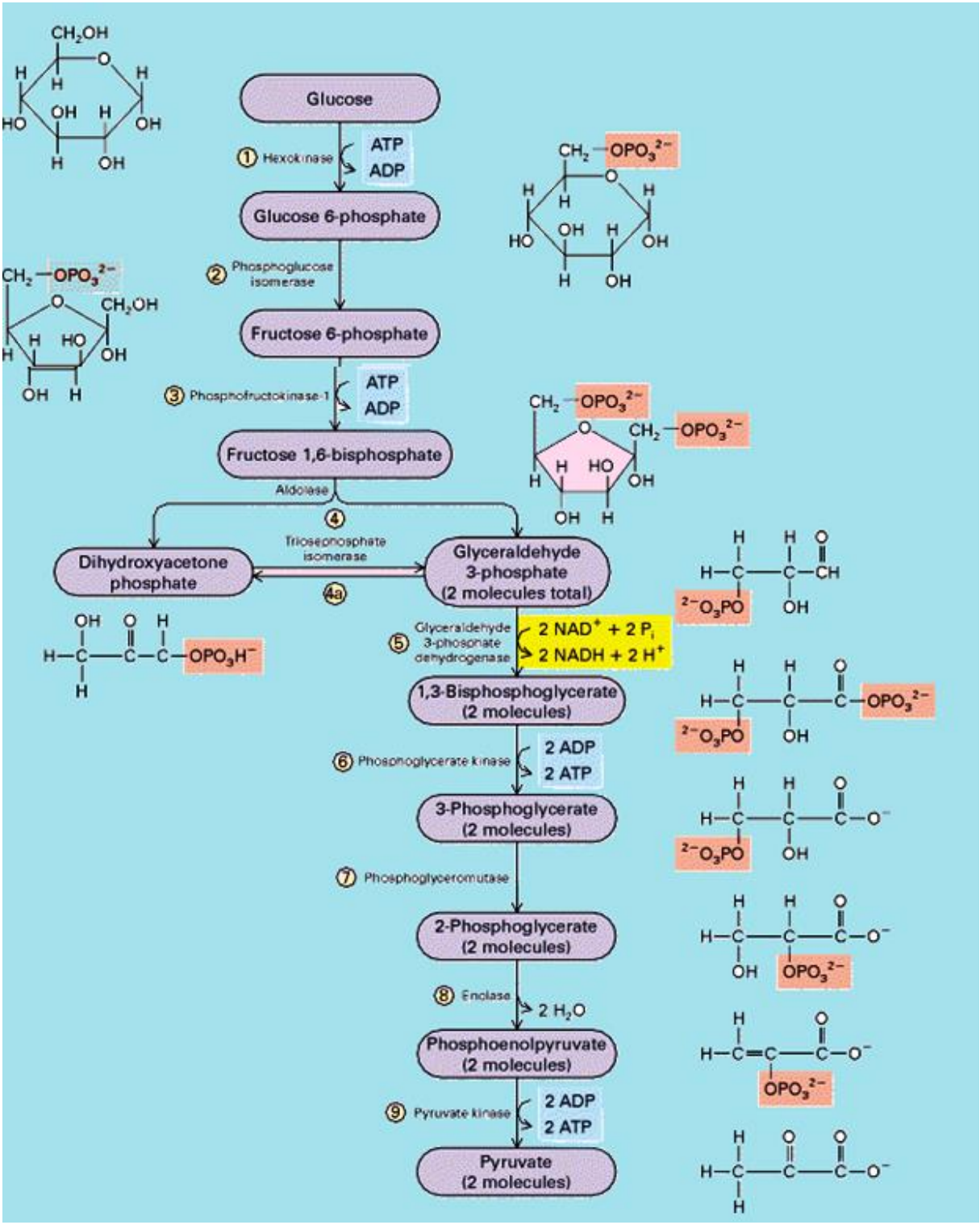


Figure 3 : *Voie de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas).(1)*: Hexokinase; (2) : Phosphoglucose isomerase ; (3) : Phosphofructokinase-1 ; (4) : Triosephosphate isomerase ;(5) : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ; (6) : Phosphoglycerate kinase ; (7) : Phosphoglyceromutase ; (8) : Enclase ;(9) : Pyruvatekinase.

2. 1. 1. Les différentes étapes de la glycolyse

La glycolyse est composée de 10 grandes étapes, faisant intervenir 10 enzymes :

1. Réaction de **transphosphorylation** du glucose en glucose-6-phosphate catalysée par la **glucokinase** au niveau du foie ou par l'**hexokinase** au niveau des autres organes. Cette réaction consomme une molécule d'ATP.
2. Réaction d'**isomérisation** du glucose-6-phosphate en fructose-6-phosphate catalysée par la **6-phosphohexose-isomérase**.
3. Réaction de **transphosphorylation** du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate catalysée par la **6-phosphofructo-kinase**. Cette réaction consomme une molécule d'ATP.
4. - Réaction de **dégradation** du fructose-1,6-biphosphate en dihydroacétone-phosphate et en gycéraldéhyde-3-phosphate catalysée par l'**aldolase**.

- Réaction d'**isomérisation** du dihydroacétone-phosphate en glycéraldéhyde-3-phosphate catalysée par la **triosephosphate-isomérase**.

5. Réaction de **phosphorylation** du glycéraldéhyde-3-phosphate en 1,3-biphosphoglycérate catalysée par la **glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase**. Cette réaction nécessite une molécule de phosphate ; elle permet également la formation de NADH, H^+ à partir de NAD^+.
6. Réaction de **transphosphorylation** du 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate catalysée par la **phosphoglycérate-kinase**. Cette réaction permet la formation d'ATP à partir d'ADP.
7. Réaction de **mutation** du 3-phosphoglycérate en 2-phosphoglycérate catalysée par la **phosphoglycéromutase**.
8. Réaction de **déshydrogénation** du 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate catalysée par l'**énolase**. Cette réaction relargue une molécule d'H_2O.
9. Réaction de **transphosphorylation** du phosphoénolpyruvate en énolpyruvate catalysée par la **pyruvate-kinase**. Cette réaction permet la formation d'ATP à partir d'ADP.

10. Réaction de **tautomérie cétone-énol** de l'énolpyruvate en pyruvate catalysée par la **pyruvate-kinase**.

Le bilan est:

Glucose + 2ADP + NAD^+ + 2 P_i ⟶ 2 pyruvate + 2 $NADH,H^+$ + 2 ATP.

La glycolyse peut être divisée en trois grandes parties :

1. **Activation du glucose** avec consommation d'énergie (2 ATP) :
    - Le premier du glucose au glucose-6-phosphate.
    - Le deuxième du fructose-6-phosphate au fructose-1,6-biphosphate
2. **Formation du glycéraldéhyde**.
3. Synthèse du pyruvate et **formation de molécules riches en énergie** (4 ATP et 2 NADH, H^+) :
    - Les deux premiers ATP du 1,3-Biphosphoglycérate au 3-Phosphoglycérate.
    - Les deux derniers ATP du phosphoénolpyruvate à l'énolpyruvate.
    - Les deux NADH, H^+ du Glycéraldéhyde-3-phosphate au 1,3-Biphosphoglycérate ; ils permettront chacun d'eux la formation théorique de 2 ATP chacun (en réalité de 1,5 ATP chacun).

Le bilan final théorique est donc de **6 ATP** (en réalité de **5 ATP**).

2. 1. 2. Régulation de la glycolyse

Dans les voies métaboliques, les enzymes qui catalysent des réactions irréversibles sont des sites potentiels de contrôle. Au niveau de la glycolyse les enzymes sont régulés par trois mécanismes : les régulations par des effecteurs allostériques, les régulations par phosphorylations/déphosphorylation et l'expression des gènes de ces enzymes.

Au niveau de la glycolyse on met en évidence essentiellement trois réactions irréversibles :

- La réaction de transphosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate catalysée par la **glucokinase** ou l'**hexokinase**. L'hexokinase est inhibée par le glucose-6-phosphate.
- La réaction de transphosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose-1,6-biphosphate catalysée par la **6-phosphofructokinase**. Cette enzyme est inhibée par

l'ATP, le citrate, le glucagon (foie) et l'adrénaline (muscle), et est activé par l'insuline et l'AMP.

- La réaction de transphosphorylation de l'acide phospho-énol-pyruvique en acide énol-pyruvique catalysée par la **pyruvate-kinase**. Cette enzyme est inhibée par le pyruvate, l'alanine, l'ATP et le NADH, H^+.

On retiendra globalement qu'il y a :

- **Inhibition** de la glycolyse lorsque l'organisme est en excès d'énergie et donc par l'**excès d'ATP**, le **citrate**dont la concentration cytosolique augmente, le **glucagon**, l'**adrénaline** et l'**acidose** (*cf. suite du cours : 2,3-DPG*).
- Activation de la glycolyse lorsque l'organisme est en déficit d'énergie et donc par l'**excès d'ADP et d'AMP**, l'**insuline** et l'**alcalose** (*cf. suite du cours : 2,3-DPG*).

Cas : 1 Respirations (Présence de la chaine respiratoire)

2. 2. Oxydation complète du pyruvate formé

2. 2. 1. Décarboxylation puis cycle de krebs (Métabolisme aérobie du pyruvate)

En présence d'aire, les microorganismes aérobies stricts ou facultatifs assurent l'oxydation complète du glucose par le cycle de Krebs.Le cycle de Krebs (ou de Szent-Györgyi et Krebs, ou encore cycle de l'acide citrique) est une voie métabolique ayant lieu dans toutes les cellules, au niveau du cytoplasme pour les bactéries, ou de la mitochondrie chez les eucaryotes.

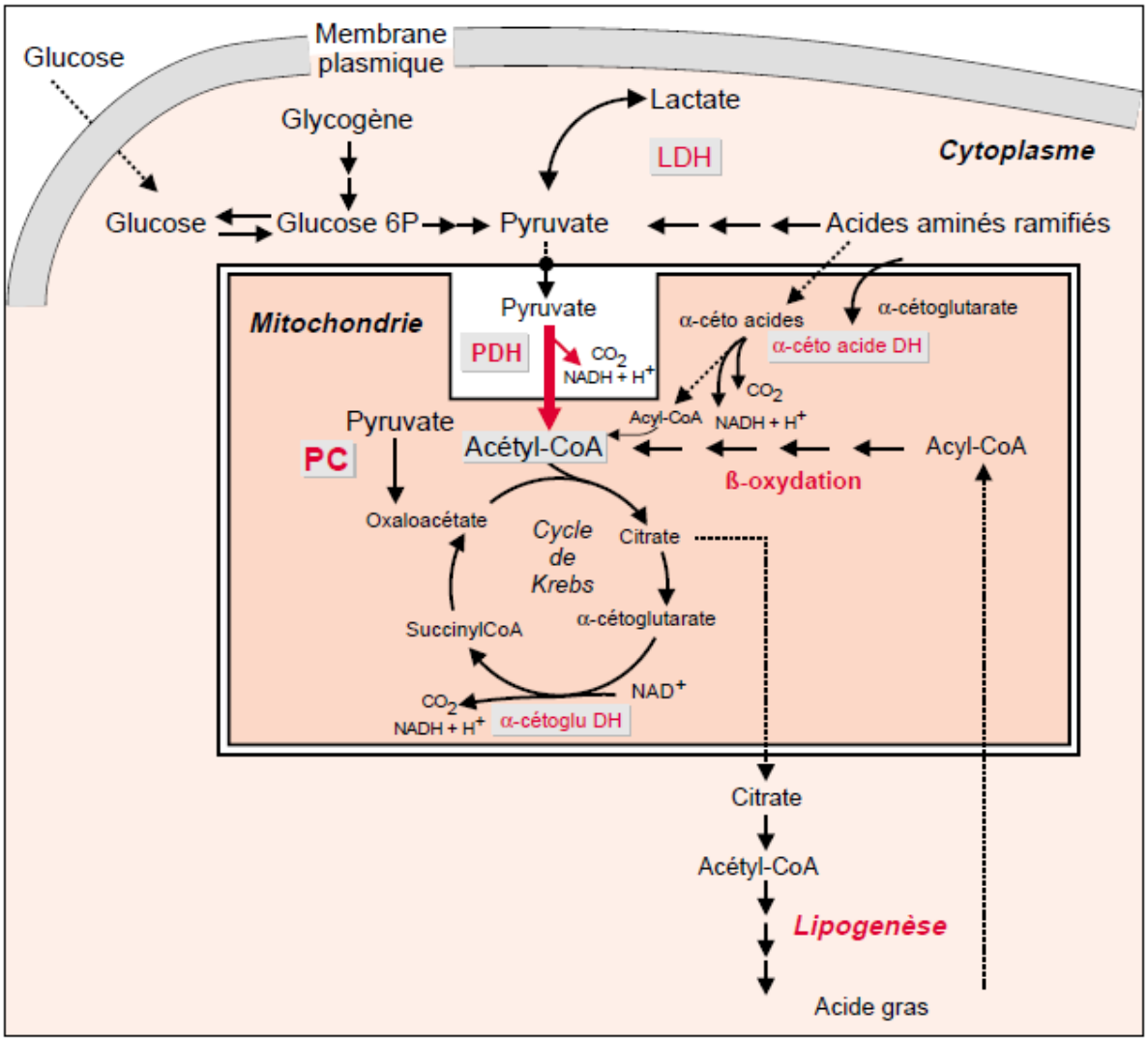


Figure 4 :*Localisation des α-cétoacides déshydrogénases dans le métabolisme énergétique. PDH : pyruvate déshydrogénase ; α-cétoacide DH : α- cétoacide déshydrogénase des acides aminés ramifiés ; α-cétoglu DH : α- cétoglutarate déshydrogénase ; LDH: lactate déshydrogénase ; PC: pyruvate carboxylase.*

Le pyruvate formé par la glycolyse est ensuite oxydé en acétyl-CoA. Cette réaction est catalysée par le complexe multi-enzymatique de la ***pyruvate déshydrogénase (complexe PDH***) constituéde 3 enzymes principales. La pyruvate déshydrogénase (enzyme ***E1***), ayant la thiaminepyrophosphate (TPP) comme groupement prosthétique, assure la décarboxylation dupyruvate et le transfert du radical obtenu sur le lipoate. La ***dihydrolipoyl transacétylase***(Enzyme ***E2***) transfère le radical acétyle du lipoate sur le coenzyme A, permettant ainsi lalibération de l'acétyl-CoA. La ***dihydrolipoyl déshydrogénase*** (enzyme ***E3***)

est uneflavoprotéine qui oxyde le dihydrolipoate et transfère les électrons et les protons sur leNAD+. Le mécanisme d'action de ce complexe est schématisé sur la figure 5.

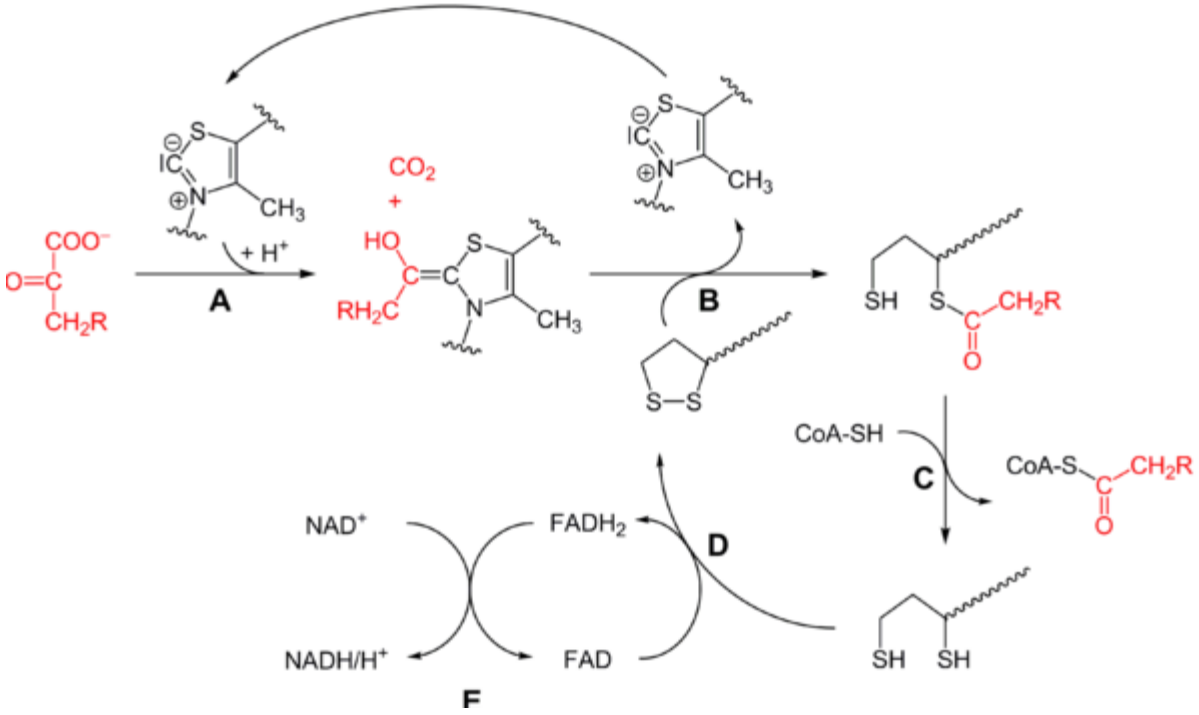
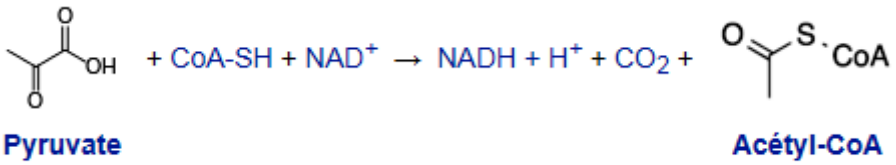


Figure 5 :*Mécanisme réactionnel du complexe pyruvate déshydrogénase (R = H sur ce schéma) : - la pyruvate déshydrogénase (E1) catalyse les étapes A et B avec la thiamine pyrophosphate (TPP), - la dihydrolipoamide S-acétyltransférase (E2) catalyse l'étape C avec le lipoamide et la coenzyme A(CoA-SH), - la dihydrolipoyl déshydrogénase (E3) catalyse les étapes D et E avec la FAD et la NAD+.*

La séquence de réactions conduisant du pyruvate à l'acétyl-CoA fait intervenir, dans l'ordre, les coenzymes suivant : TPP, lipoate, HSCoA, FAD et NAD+. La réaction globale, dans laquelle il ne reste que les coenzymes vrais, est :



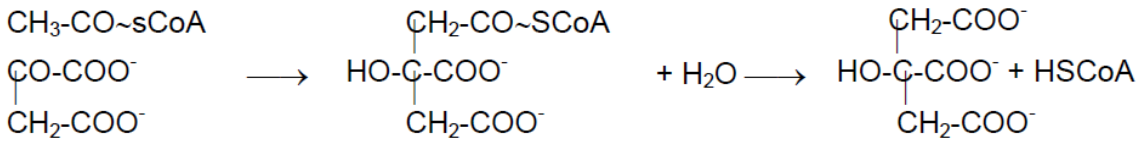
2. 2.1.1. Etapes enzymatiques du cycle

La séquence des réactions conduit à l'oxydation complète de l'acétyl-CoA en 2molécules de CO_2 et à la régénération de l'oxaloacétate, accepteur catalytique du cycle. Nous diviserons ce dernier en deux phases : une phase d'oxydation totale de l'acétyl-CoAet une phase où intervient la séquence de réactions de régénération de l'oxaloacétate (voirfigure 2).

A – Phase 1 : Etapes enzymatiques de l'oxydation de l'acetyl-COA

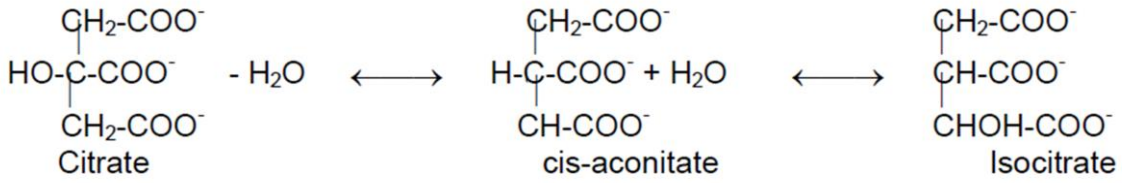
a- Formation du citrate

Le cycle débute par la condensation de ''oxaloacétate (en C4) avec ''acétyl-CoA (enC2) pour former le citroyl-CoA (en C6) qui, en présence de l'eau, est hydrolysé en citrate.L'enzyme qui intervient est la ***citrate synthase*** (une lyase).



b- Isomerisation du citrate en isocitrate

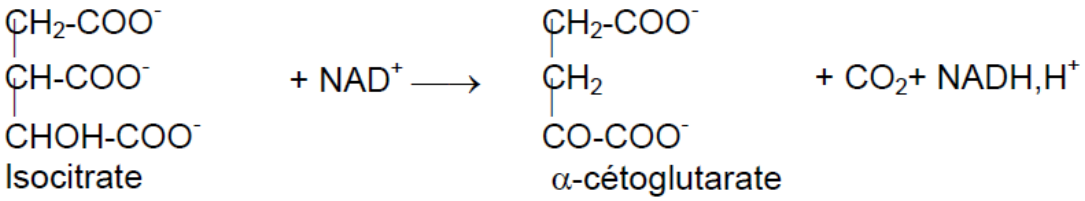
Cette isomérisation est le résultat d'une déshydratation et d'une réhydratationeffectuées par une enzyme appelée la ***cis-aconitase***.



c- Deshydrogenation decarboxylante de l'isocitrate

C'est la première des 4 réactions d'oxydoréduction du cycle du citrate. Ladécarboxylation est consécutive à la déshydrogénation de l'isocitrate. Cette dernière faitapparaître une fonction cétone en position b par rapport à la fonction carboxyliquemédiane. Il se forme l'oxalosuccinate (intermédiaire instable) qui se décarboxylespontanément en formant une molécule de l'α-cétoglutarate. La réaction est catalysée par***l'isocitrate déshydrogénase*** à NAD+. Il existe deux isocitrate déshydrogénase : l'une àNAD+ rencontrée exclusivement dans les mitochondries et fonctionnant dans le

cycletricarboxylique, l'autre à NADP+ présente à la fois dans les mitochondries et dans lecytoplasme et ayant un rôle différent.



d- Déshydrogénation de l'α-cetoglutarate

C'est la deuxième réaction d'oxydoréduction. Elle est catalysée par le ***complexemulti-enzymatique de l'α-cétoglutarate déshydrogénase***, analogue à celui delapyruvate déshydrogénase Il se forme du succinyl-CoA. La déshydrogénation de cecomposé est exergonique et fournit une énergie suffisante pour la formation d'une liaisonthioester, riche en énergie. Les cofacteurs suivants interviennent : TPP, lipoate, HSCoA,FAD et NAD+. La réaction globale est :

α-cétoglutarate + HSCoA + $NAD^+ \longrightarrow$ HOOC-CH2-CH2-CO~sCoA + CO_2 + $NADH,H^+$

B – Phase 2 : Régénération de l'oxaloacetate

Dans cette phase toutes les réactions qui conduisent du succinyl-CoA à l'oxaloacétate sont réversibles.

e- Formation d'une liaison riche a partir du succinyl-COA

La liaison thioester est très riche en énergie. En présence du phosphate et du GDP,elle est utilisée pour la synthèse du GTP suivant la réaction réversible :

$^-$OOC-$(CH2)_2$-CO~SCoA + GDP + Pi $\rightleftharpoons$ -OOC-$(CH2)_2$-COO- + GTP + HSCoA

La réaction est catalysée par une ***succinyl-CoA synthétase***, ou une ***succinatethiokinase***. Il se forme du succinate qui sera oxydé dans la séquence des réactionsterminales du cycle pour régénérer l'oxaloacétate. Les trois réactions qui composent cetteséquence sont réversibles.

f- Deshydrogenation de succinate en fumarate

La réaction est catalysée par la ***succinate déshydrogénase*** à FAD (uneflavoprotéine) comme accepteur des électrons et des protons. C'est la 3e réaction dedéshydrogénation. Elle conduit à la formation d'une double liaison. Le succinate est oxydéen fumarate.

$^{-}OOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COO^{-} + FAD \rightleftharpoons {}^{-}OOC\text{-}CH{=}CH\text{-}COO\text{-} + FADH_2$

g- Hydratation du fumarate et formation du malate

La réaction est catalysée par une lyase (hydratase) : ***la fumarase ou fumarate hydratase***

$$\text{-}OOC\text{-}CH{=}CH\text{-}COO\text{-} + H_2O \rightleftharpoons {}^{-}OOC\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}COO$$

h- Déshydrogénation de succinate en fumarate

La réaction est catalysée par la ***succinate déshydrogénase*** à FAD (une flavoprotéine) comme accepteur des électrons et des protons. C'est la 3e réaction de déshydrogénation. Elle conduit à la formation d'une double liaison. Le succinate est oxydé en fumarate.

$$\text{-}OOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}COO\text{-} + FAD \leftrightarrows {}^{-}OOC\text{-}CH{=}CH\text{-}COO^{-} + FADH_2$$

i- Deshydrogenation du malate en oxaloacetate

C'est la 4e déshydrogénation catalysée par la ***malate déshydrogénase*** à NAD^{+}.

Elle termine le cycle :

$$\text{-}OOC\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}COO^{-} + NAD^{+} \rightleftharpoons OOC\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}COO\text{-} + NADH,H^{+}$$

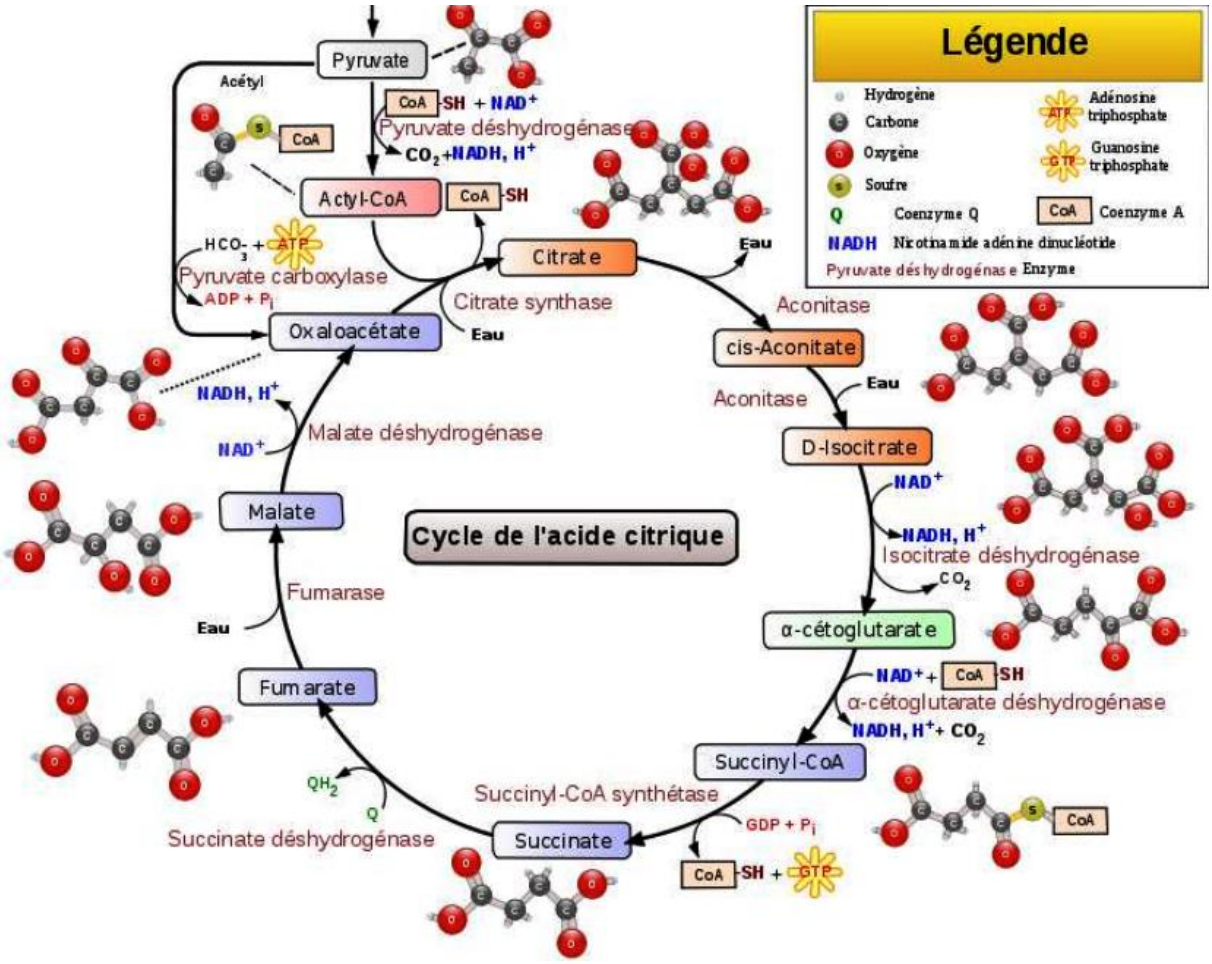


Figure 6 : *Cycle triacarboxylique de Krebs*

2. 2. 1.2. Bilan énergétique de l'oxydation de l'acetyl-COA

- Deux atomes de carbone entrent dans le cycle sous forme d'acétyl-CoA et enressortent sous forme de 2 CO_2 obtenus au cours des deux décarboxylations au niveau de l'isocitrate et de l'α-cétoglutarate.
- Quatre paires d'hydrogène sortent du cycle, trois sous forme de NADH,H+ et une sous forme de $FADH_2$, ce qui permet la formation de 11 liaisons phosphates riche en énergie au cours des phosphorylations mitochondriales.
- 1 liaison phosphate riche en énergie est formée sous forme de GTP.En conclusion l'oxydation totale de l'acétyl-CoA permet la formation de 12 liaisons phosphates riches en énergie (12 ATP).

Remarque : certaines mesures montrent que l'oxydation de NADH,H+ correspondrait à 2,5 ATP et celle de $FADH_2$ à 1,5 ATP. Le bilan énergétique du cycle serait donc 10 ATP.

2. 2. 1. 3. Rôle du cycle de Krebs

Le cycle de Krebs participe au métabolisme des glucides, des lipides et des protéines, mais il est surtout connu pour permettre la production d'énergie cellulaire sous forme de molécule de GTP. Il en produit une par cycle, à partir d'une molécule de GDP.

-Autres fonctions

En plus de la dégradation totale de l'acétyl-CoA, le cycle a d'autres fonctions :

- Formation de cofacteurs réduits riches en énergie, NADH,H+ et FADH2 pour la synthèse de l'ATP.
- Génération de précurseurs biosynthétiques. Les produits formés au cours de ce cycle peuvent aussi servir d'intermédiaires pour la synthèse de molécules essentielles. Les acides a-cétoniques peuvent être transaminés pour former des acides aminés en vue de la synthèse des protéines ; le citrate est un précurseur de la synthèse des acides gras, le malate est un précurseur de la synthèse de glucose par la voie de la néoglucogenèse.
- Autres fonctions cataboliques : certaines réactions cellulaires produisent des intermédiaires du cycle. Leur entrée et leur dégradation par cette voie contribuent au processus de renouvellement des structures.

La nature amphibolique de ce cycle tient donc au fait qu'il peut à la fois fournir desprécurseurs biosynthétiques et être une voie de dégradation et d'élimination de composésissus d'autres métabolismes.

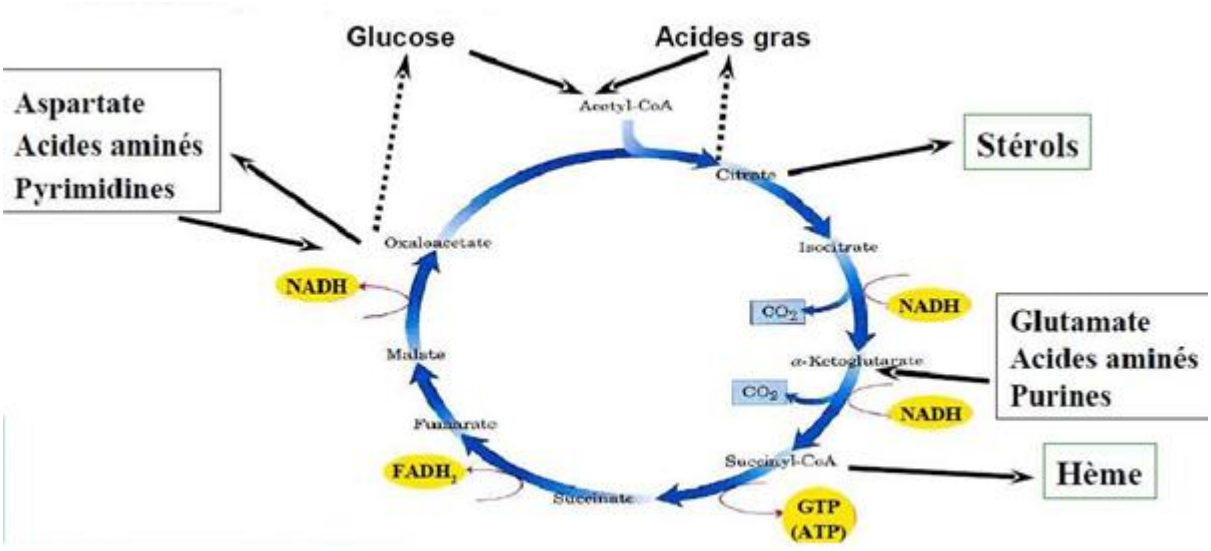


Figure 7 : *Rôle de cycle triacarboxylique de Krebs.*

2. 2. 1. 4. Régulation du cycle de krebs

Trois principes gouvernent la régulation du cycle :

- Disponibilité en substrats énergétiques (glucose, pyruvate, acétyl-CoA)
- Inhibition par les produits accumulés : régulation allostérique
- Régulation en amont au niveau du complexe multi-enzymatique de la pyruvate DH.

- **Disponibilité en substrat**

En ce qui concerne la disponibilité en substrats, le cycle de Krebs et la glycolyse fonctionnent de façon coordonnée de telle sorte que la vitesse de déroulement de la glycolyse lui permette de fournir les substrats (pyruvate et acétyl-CoA) qui alimentent le Cycle de Krebs. En outre certains produits de réaction leur sont communs (ATP et $NADH,H^+$) et contribuent à leur régulation. L'activité du citrate synthase peut être limitée par la disponibilité de l'oxaloacétate et l'acétyl-CoA. Dans ce cas la synthèse du citrate devient un facteur limitant du cycle.

- **Régulation allosterique interne au cycle**

Dans les conditions où les besoins énergétiques de la cellule sont satisfaits

- Le $NADH,H^+$ s'accumule entraînant l'élévation du rapport $NADH,H^+/NAD^+$. Il bloque à lafois ***l'isocitrate DH et l'a-cétoglutarate DH.***
- Le citrate s'accumule et rétro-inhibe la ***citrate synthase***
- Le succinyl-CoA s'accumule et devient un effecteur négatif de l'***a-cétoglutarate DH.***
- L'ATP, le produit terminal du processus de la production de l'énergie inhibe la ***citrate synthase*** et l'***a-cétoglutarate DH***. L'inhibition de la ***citrate synthase*** par l'ATP estlevée par l'ADP.

L'ensemble de ces effets est résumé sur la figure 6cycle de krebs

- **Régulation au niveau de la pyruvate déshydrogénase**

En fait le cycle est réglé par le statut énergétique de la cellule, qui dépend de sonapprovisionnement en acétyl-CoA.La véritable régulation se situe donc en amont, au niveau du complexe multienzymatiquede la pyruvate DH, chargé d'oxyder le pyruvate en acétyl-CoA. La conversiondu pyruvate en acétyl-CoA est une réaction irréversible. Elle engage en fait 2 atomes decarbone du pyruvate dans deux voies : celle de son oxydation

complète en CO_2 avecfourniture de l'énergie, ou celle de leur transformation en acides gras (lipogenèse).

La régulation du complexe multi-enzymatique de la ***pyruvate DH*** ne concerne que la***pyruvate DH*** (enzyme **E1** dont le coenzyme est la TPP). Deux modes interviennent.

a- Retro-inhibition

L'activité de la ***PDH*** peut être directement affectée par l'accumulation des deuxproduits de la séquence catalysée par le complexe multi-enzymatique à savoir l'acétyl-CoAet le $NADH,H^+$ (figure 3).

b- Régulation par phosphorylation/déphosphorylation

L'enzyme peut exister sous deux formes : une forme active ***(PDH déphosphorylée***)et une forme inactive ***(PDH phosphorylée).***Voir figure 3**.**Lorsqu'il y a accumulation de l'ATP, du $NADH,H^+$ et de l'acétyl-CoA, le $NADH,H^+$active une ***pyruvate DH kinase (PDH kinase)***, contenue dans le complexe multienzymatique. La ***PDH kinase*** phosphoryle la ***PDH*** et la rend inactive. La transformation du pyruvate en acétyl-CoA s'arrête. L'autre effecteur positif de la ***PDH kinase*** est l'acétyl-CoA.

Lorsque la consommation de l'ATP génère suffisamment de l'ADP pour attendre leseuil signal, nécessaire au réamorçage de la production de l'ATP le pyruvate active une pyruvate déshydrogénase phosphatase (***PDH phosphatase***) qui déphosphoryle la ***PDH*** etlui restitue son activité. Le processus de fourniture d'acétyl-CoA est ainsi rétabli. Les autres effecteurs positifs de la ***PDH phosphatase*** sont : insuline, $Ca2^+$ et Mg^{2+}Il va sans dire que les effecteurs positifs de la ***PDH kinase*** sont des effecteur snégatifs de la ***PDH phosphatase*** et *vice versa* (figure 8).

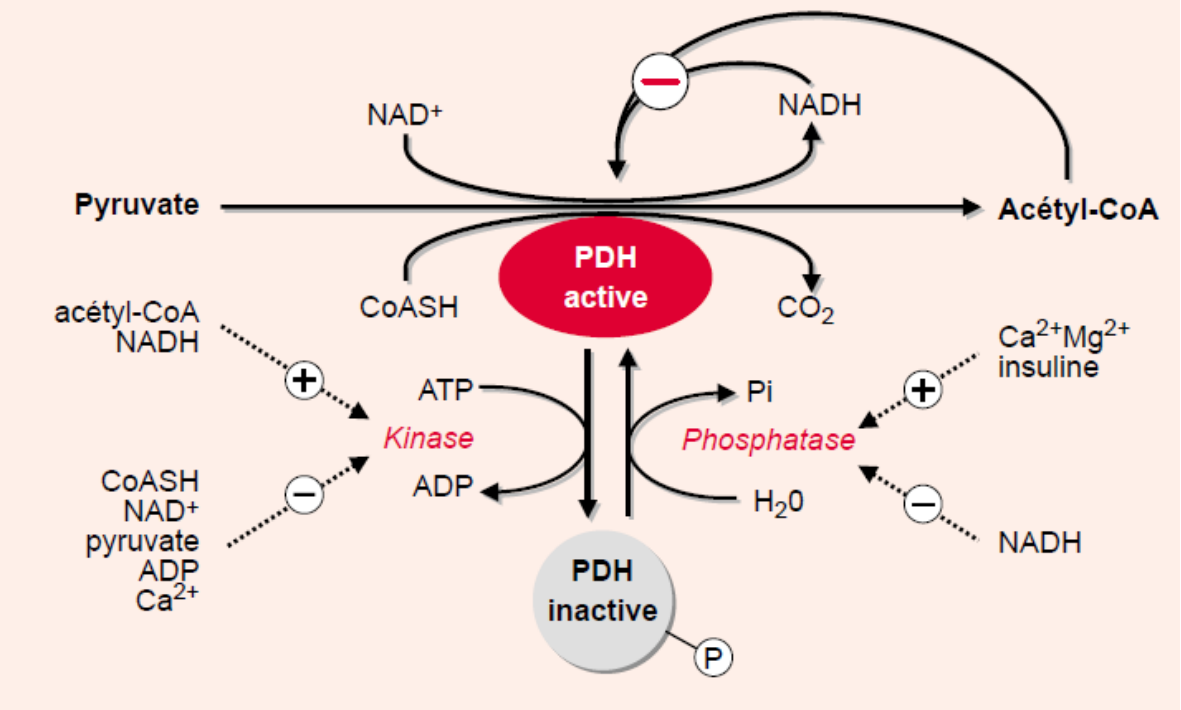


Figure 8 :*Mécanismes de régulation du complexe PDH. La régulation del'activité du complexe PDH s'effectue par un mécanisme de phosphorylation/déphosphorylation, catalysé par la PDH phosphatase qui active le complexeet par la PDH kinase qui l'inactive. Les produits finaux de la réaction(Acétyl-CoA et NADH) règlent le complexe par rétroaction négative. Sontreprésentés également les effecteurs qui règlent positivement ou négativement la phosphatase et la kinase.*

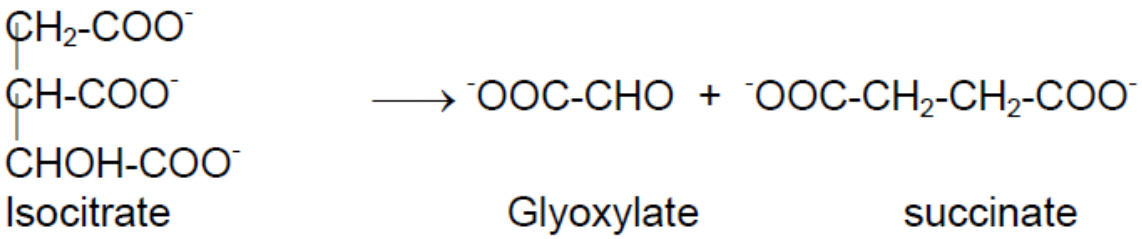
2. 2. 2. Cycle du glyoxylate ou shunt glyoxylique

Le Cycle du glyoxylate est une variante du cycle de Krebs (Figure 6). On le rencontrechez certains végétaux, notamment les graines oléagineuses en germination et chez lesmicro-organismes tels que les moisissures, les bactéries et les levures. Ils possèdent, enplus des enzymes du cycle de Krebs, une autre enzyme : ***l'isocitrase ou l'isocitrate lyase.***L'isocitrase leur permet de cliver l'isocitrate en succinate et glyoxylate. On trouve, dans cesorganismes, une seconde enzyme qui n'appartient pas au cycle du glyoxylate, la ***malatesynthase***. Cette dernière condense le glyoxylate avec un acétyl-CoA pour former un malate, précurseur de la néoglucogenèse. Ces deux enzymes n'existent pas chez les animaux. Chez ces végétaux, lorsque le cycle du glyoxylate fonctionne associé au cycle de Krebs et à la néoglucogenèse, le processus conduit à la formation du glucose à partir des lipides, de l'acétyl-CoA ou de l'acétate. Ceci se produit dans les graines oléagineuses engermination ne disposant comme source de carbone que les lipides. Dans ces conditionsles enzymes

communes au Cycle de Krebs et au cycle du glyoxylate sont enfermées dans^{+} et de l'acétyl-CoA, le NADH,H+active une ***pyruvate DH kinase (PDH kinase)***, contenue dans le complexe multienzymatique.des structures membranaires appelées glyoxysomes. Ces structures sont présentes essentiellement dans les tissus au cours de la germination. La ***PDH kinase*** phosphoryle la ***PDH*** et la rend inactive. La transformation du pyruvate en acétyl-CoA s'arrête. L'autre effecteur positif de la ***PDH kinase*** est l'acétyl-CoA.

2. 2. 2. 1. Réaction spécifique du cycle du glyoxylate

Par rapport au cycle tricarboxylase, une seule réaction est spécifique du cycle du glyoxyalate. Elle est catalysée par ***l'isocitrase ou isocitrate lyase*** qui shunte le cycle de Krebs. L'isocitrate, au lieu d'être oxydé en a-cétoglutarate, est coupé en succinate et glyoxylate.



2. 2. 2. 2. Bilan du cycle du glyoxylate

A partir du succinate, l'oxaloacétate est régénéré par les réactions réversibles ducycle de Krebs, identiques dans le cycle du glyoxylate. On en déduit suivant le mêmeprincipe, déjà vu, que le bilan de transformation de l'acétyl-CoA en glyoxylate est le suivant:

CH_3-CO~SCoA + 2 H_2O + FAD + NAD^+	⟶	$^-$OOC-CHO + HSCoA + $FADH_2$ + $NADH,H^+ + H^+$

2. 2. 2. 3 Rôle du cycle de glyoxylate

Comme nous venons de le voir le cycle du glyoxylate permet de faire l'oxydation ménagée de l'acétyl-CoA en glyoxylate. Ce dernier est ensuite utilisé dans une réaction catalysée par la *malate synthase*, autre enzyme spécifique de ces organismes, pour former du malate suivant :

$^-$OOC-CHO + CH_3-CO~SCoA + H_2O ⟶ $^-$OOC-CHOH-CH_2-COO- + HSCoA + H^+

Le glyoxylate est condensé à une autre molécule de l'acétyl-CoA. Grâce à la formation du malate (précurseur de néoglucogenèse), exporté vers le cytosol, ces organismes peuvent fabriquer du glucose à partir de l'acétyl-CoA, donc à partir des lipides.

Les organismes, qui possèdent le cycle du glyoxylate, peuvent procéder à une oxydation ménagéée de l'acétyl-CoA en glyoxylate. Comme ils disposent en même temps de la ***malate synthase,*** enzyme n'appartenant pas au cycle du glyoxylate, ils ont la capacité de condenser le glyoxylate et l'acétyl-CoA pour former du malate. Ce dernier est un précurseur de la néoglucogenèse. En conclusion ces organismes peuvent fabriquer du glucose à partir des lipides (figure 9).

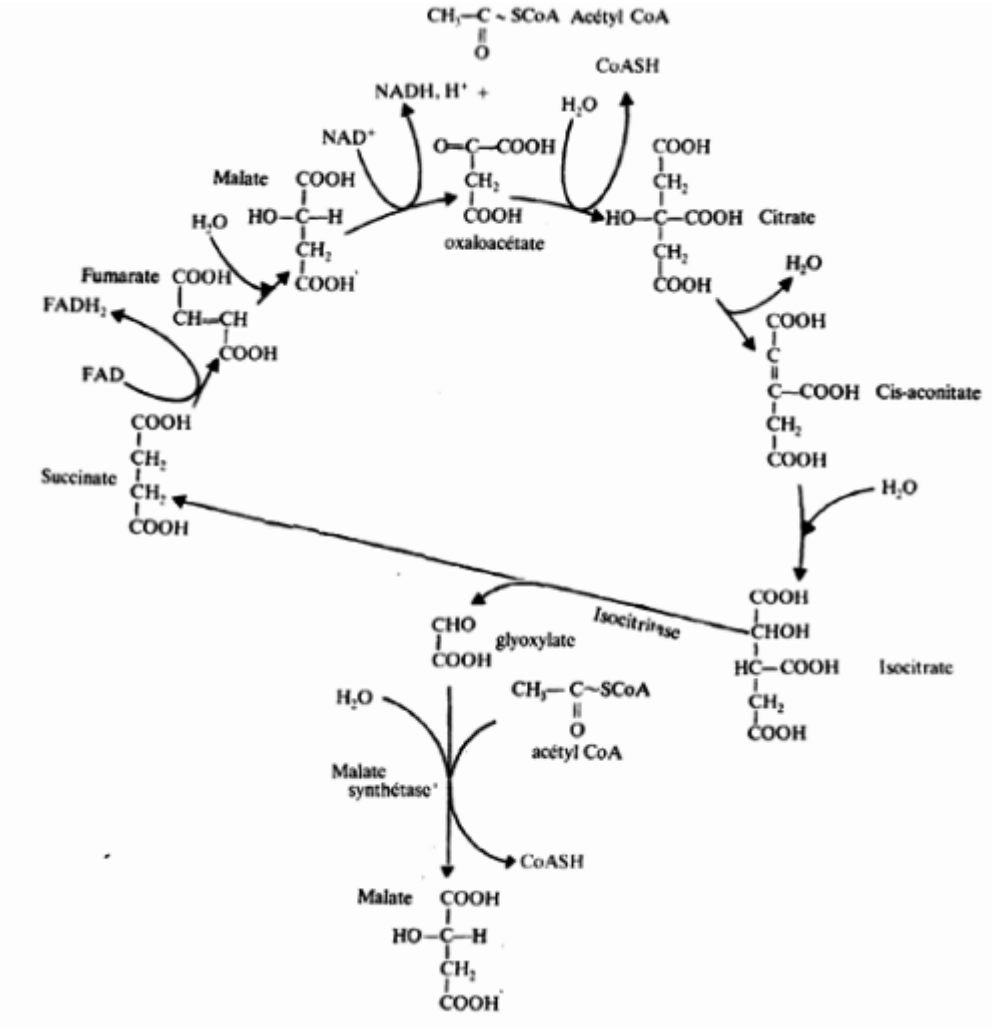


Figure 9 : *Cycle du glyoxylate : dérivé du cycle tricarboxylique. Il ne fonctionne que chez les végétaux, les graines oléagineuses en germination, quelques levures et les moisissures. Le glyoxylate, une fois formé, peut se condenser avec un autre acétyl-CoA pour donner du malate en présence de la* ***malate synthase****.*

2. 3. Ré-oxydation des coenzymes réduits (Chaine respiration)

2. 3. 1. Respiration aérobie

La **chaîne respiratoire** correspond à une association de complexes protéiques présents au sein de la membrane interne de la mitochondrie et responsable, avec l'ATP synthétase, de la **phosphorylation oxydative**. Le processus de transfert d'électrons dans la chaine de transport est étroitement associé a la formation endergonique de liaisons phosphoanhydride {riches} ADP, pi. Cette dernière réaction (ADP + Pi) est catalysée par **l'ATP synthase,** ou complexe **V.**

Les chaines de transport des électrons sont :

- Situées dans la membrane plasmique des bactéries et dans les mitochondries des levures et des moisissures
- Constitués de composés qui, certains, transportent des électrons et des protons et d'autres qui ne transportent que des électrons.
- Constitués de composés dont les potentiels d'oxydoréduction sont tels que chaque membre peut être réduit par la forme réduite du composé précédent.

Chez les bactéries la composition en cytochromes de la chaine respiratoire est très différente de celle des eucaryotes et varie en fonction de l'espèce et même pour une espèce donnée en fonction des conditions de culture.

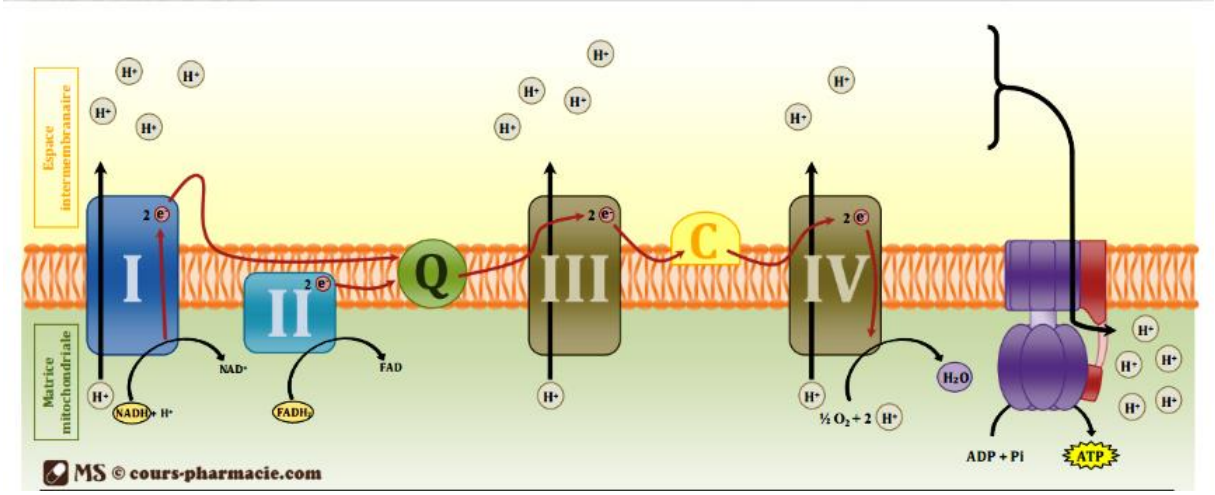


Figure 10:*Schéma simplifie représentant les mécanismes de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative.*

Tout au long de la chaîne respiratoire les électrons provenant du NADH et du $FADH_2$, vont perdre de l'énergie qui sera utilisée pour former le gradient électrochimique de proton entre l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale. Les électrons riches en énergie ainsi récupérés seront transportés successivement via les différents complexes :

- Le **complexe I** a une action **NADH coenzyme Q réductase**, récupérant les électrons du NADH et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe II** a une action **Succinate coenzyme Q réductase**, récupérant les électrons du $FADH_2$ et permet le transport d'aucun proton.
- Le **complexe III** a une action **Coenzyme Q cytochrome C réductase**, et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **complexe IV** a une action **Cytochrome C oxydase**, et permet le transport de 2 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.
- Le **coenzyme Q** (ou **ubiquinone**) permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III. Il est intéressant de préciser ici que le coenzyme Q accepte également les électrons provenant du cytosol.
- Le **cytochrome C** permet la transition entre le complexe III et le complexe IV.

Les électrons de basses énergies libérés à la fin de la chaîne respiratoire réagiront ainsi avec les molécules d'oxygène et les protons présents dans la matrice mitochondriale afin de former des molécules d'eau. Le fonctionnement progressif de la chaîne respiratoire est nécessaire car les électrons libérés par le NADH et le $FADH_2$ sont riches en énergie et de cette manière ne peuvent pas réagir d'emblée avec les molécules d'oxygène.

Le **NADH** permettra donc le transport de **10 protons** de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire, tandis que le **$FADH_2$** de seulement **6**.

Le cyanure bloque le transfert d'électrons au niveau du complexe IV par combinaison avec le fer ferrique Fe^{3+}. La roténone est un inhibiteur du complexe I.

L'ATP synthétase :

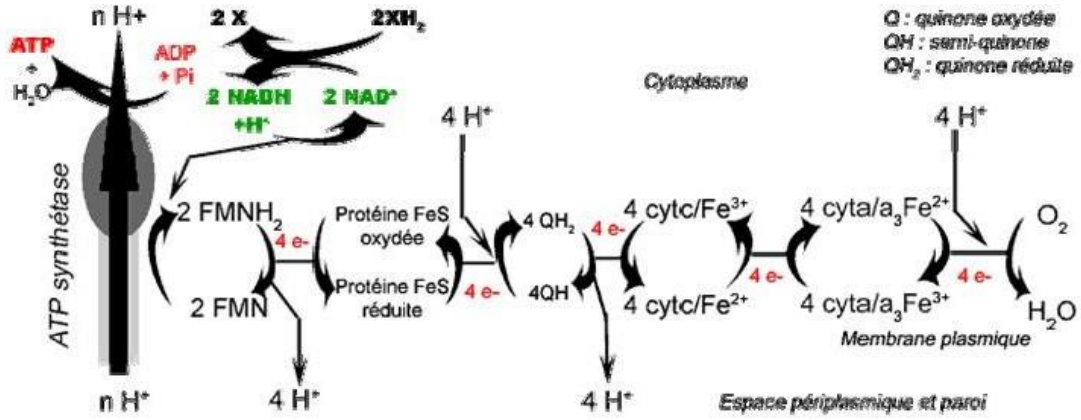
L'ATP synthétase est une pompe ionique inversée, qui au lieu de transporter les protons dans le sens inverse du gradient de concentration, entraîne la synthèse d'ATP grâce au passage des protons dans le sens du gradient.

Elle est constituée d'une sous-unité **F_0** intra-membranaire qui joue de rôle de canal protonique, d'une sous-unité **F_1** baignant dans la matrice mitochondriale et qui possède une activité ATP-synthétase, et d'une partie statique stabilisant la structure.

De cette manière le gradient de proton formé de part et d'autre la membrane interne de la mitochondrie permet la synthèse d'ATP qui sera libéré dans la matrice mitochondriale. Les 10 protons du NADH permettront une synthèse théorique de 3 ATP et les 6 protons du $FADH_2$ de 2 ATP.

Exemples de chaînes respiratoires rencontrées chez les bactéries

- ***Respiration aérobie chez les bactéries oxydase$^+$***



2. 3. 1. 1. Molécule matriciel et molécule cytosolique

Il est important de faire la distinction entre le rendement de la production d'ATP entre des molécules riches en énergie produites dans la matrice mitochondriale (cycle de Krebs et hélice de Lynen) et celles produites dans le cytosol (glycolyse). En effet les molécules produites dans la matrice interagissent directement avec les complexes

protéiques de la chaîne respiratoire, alors que celles produites dans le cytosol devront tout d'abord passer dans la matrice via des navettes.

❖ **Les différentes navettes**

Les molécules de NADH produites dans le cytosol passent facilement à travers la membrane externe de la mitochondrie qui est très perméable. Ceci n'est pas le cas de la membrane interne, obligeant le NADH à transmettre ses électrons riches en énergie à d'autre de molécules de transfert, différentes selon la navette.

a. La navette malate-aspartate

Les électrons riches en énergie sont ici transférés à l'oxaloacétate pour former le malate qui passera dans la matrice mitochondriale où il retransmettra ses électrons au NAD^+ afin de reformer le NADH.

La production d'ATP sera donc ici la même que pour les molécules de NADH produites dans la matrice. Cette navette est plus particulièrement présente au niveau du cœur et du foie.

b. La navette glycérol 3-phosphate

Les électrons riches en énergie sont ici transférés au glycérol 3-phosphate qui retransmettra ses électrons au $FADH_2$.La production d'ATP sera donc ici inférieure aux molécules de NADH produites dans la matrice. Cette navette est plus particulièrement présente au niveau des muscles squelettiques et du cerveau.

❖ **Bilan énergétique : 36 ou 38 ATP ?**

Le but ici est de comprendre pourquoi le bilan énergétique du catabolisme d'une molécule de glucose est tantôt de 36 ATP et tantôt de 38 ATP.

Connaissant maintenant la présence et le fonctionnement des navettes, ainsi que la présence de l'une ou l'autre d'entre elles dans les différents tissus considérés, nous pouvons facilement comprendre cette différence de 2 ATP.

En effet nous somme face à deux situations :

- La première consiste à considérer la navette malade-aspartate qui participe à la production de 3 ATP par molécules de NADH produites au niveau de la glycolyse.
- La deuxième consiste à considérer la navette glycérol 3-phosphate qui permet la production de seulement 2 ATP par molécules de NADH produites au niveau de la glycolyse.

2. 3. 2. Respiration anaérobie

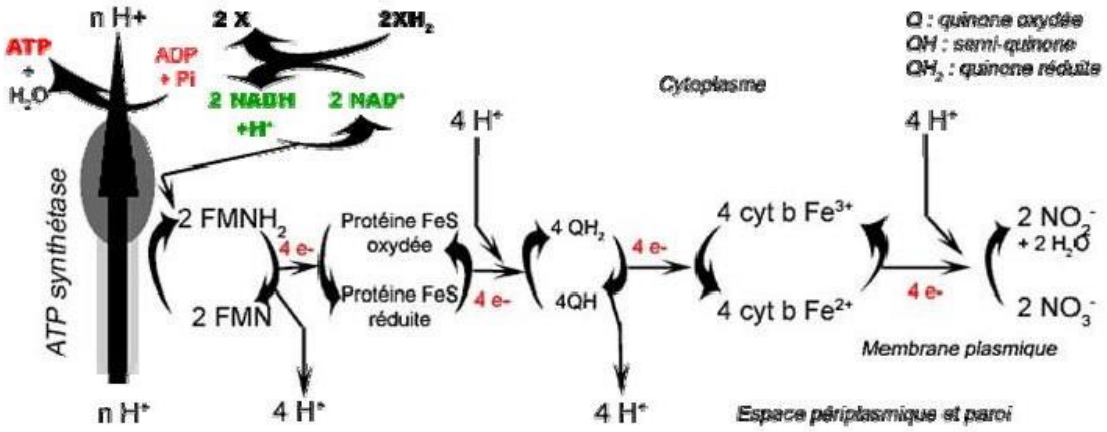
Quand l'accepteur final d'électron n'est pas le dioxygène dans une respiration, on parle de **respiration anaérobie**. Le nitrate, le sulfate, le dioxyde de carbone et l'ion ferrique sont les principaux accepteurs d'électrons, conduisant à la respiration nitrate dans le cas NO_3^-.Les électrons sont comme dans la respiration aérobie transférés au sein d'une chaîne de transporteurs mais l'accepteur final est une molécule minérale autre que l'O_2 (exemple: NO_3^- et NO_2^- pour les bactéries *dénitrifiantes* comme *Alcaligenes* ou *Acinetobacter* SO_4^{2-} pour les bactéries sulfito-réductrices comme *Desulfovibrio desulfitricans* qui produit de l'H_2S) ou bien encore l'accepteur final est une molécule organique.De nombreuses bactéries contiennent des enzymes anaérobies pour une nitrate réductase qui catalysent la réduction du nitrate de nitrite.

Tableau 1.*Les divers accepteurs terminaux d'électrons.*

	Produit réduits	**Exemple de microorganisme**
$\boldsymbol{NO_3^-}$	$\boldsymbol{NO_2^-}$	Entérobactéries
$\boldsymbol{NO_3^-}$	$\boldsymbol{N_2}$, $\boldsymbol{NO_2^-}$	Pseudomonas
$\boldsymbol{SO_4^{2-}}$	$\boldsymbol{S^{2-}}$	Desulfovibrio
$\boldsymbol{Fe^{3+}}$	$\boldsymbol{Fe^{2+}}$	Bacillus

Exemples de chaînes respiratoires rencontrées chez les bactéries

- ***Respiration anaérobie (nitrate comme accepteur final)***



Les nitrates sont réduits en nitrite par la nitrate réductase A qui remplace la Cytochrome oxydase de la respiration aérobie.

Remarque las nitrite formés sont toxique et donc plus souvent réduits en diazote.

- En présence d'O_2 réalisent une respiration aérobie
- En absence d'O_2 se procurent leur énergie par respiration nitrate.

Cas : 2 Fermentation (Absence de la chaine respiratoire)

2. 4. Fermentation

Les fermentations résultent de l'action d'enzymes microbiennes sur un substrat organique. Ces réactions biologiques qui dégradent le substrat sont des réactions d'oxydo-réduction se produisant à l'abri de l'air (anaérobiose) et qui dégagent peu d'énergie.

2. 4. 1. Application de la fermentation

L'homme a mis à profit les phénomènes de fermentation pour conserver certains aliments et en transformer d'autres en améliorant leurs qualités nutritionnelles ou organoleptiques.
De très nombreux aliments fermentés existent actuellement (plusieurs milliers) parmi lesquels

pêle-mêle : yaourts, fromages, saucisson, choucroute, pain, vin, cidre, bière mais aussi cacao, thé, café pour ne citer que quelques aliments courants dans nos régions.

2. 4. 1. 1. Quelques types de fermentation dans l'alimentation

Suivant la nature des produits issus de la réaction enzymatique, on distingue plusieurs types de fermentation :

- *Fermentation lactique* : Il se forme de l'acide lactique à partir du glucose.

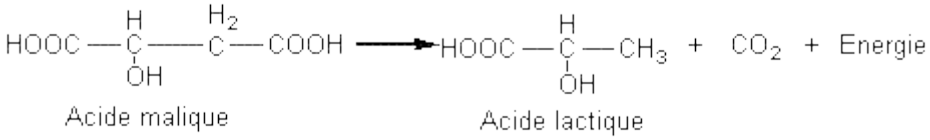
  $C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_3H_6O_3$

  L'acide lactique ayant comme formule semi-développée :

  $CH_3 - \underset{\underset{OH}{|}}{CH} - COOH$

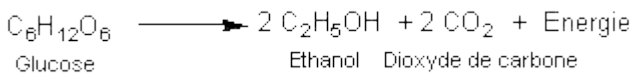
Elle intervient dans l'élaboration des yaourts, des laits fermentés, des saucissons, de la choucroute, du levain pour le pain, de certains fromages.Elle est homolactique quand sous l'action de bactéries homofermentaires l'acide lactique est majoritaire. Parmi les bactéries homofermentaires des bactéries des genres Lactococcus, Lactobacillus et Streptococcus. Elle est hétérolactique quand sous l'action de bactéries hétérofermentaires on obtient de l'acide lactique et d'autres produits, éthanol, acide éthanoïque, dioxyde de carbone. Parmi les bactéries hétérofermentaires des bactéries des genres Leuconostoc et certains Lactobacillus

<u>Remarque</u> : La fermentation malolactique est un cas particulier, l'acide lactique se formant au détriment de l'acide malique qui donne à un vin par exemple une acidité ("sa verdeur") la plupart du temps non souhaitée (vins rouges de qualité).



La gestion de la fermentation malolactique est un des axes majeurs du travail du vin. Elle est recherchée dans la vinification des vins rouges et au contraire évitée pour les vins blancs et, rosés pour lesquels on souhaite garder l'acidité apportée par l'acide malique. Les bactéries utilisées sont du genre Oenococcus (*Oenococcus oeni* par exemple).

- *Fermentation alcoolique* : Il se forme de l'éthanol à partir du glucose.



L'éthanol de l'ensemble des boissons alcoolisées provient de la fermentation du glucose apporté par les plantes, sous l'effet de la zymase, une enzyme produite par des levures (levure de bière : *Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis,* des champignons microscopiques). Les solutions glucosées aqueuses qui contiennent plus de 100 à 250g de sucre par litre, ne fermentent plus. Les solutions que l'on obtient peuvent atteindre une concentration maximale en alcool de 15% en volume ; un taux plus important empêcherait la fermentation. Les plantes ne contiennent, pour la plupart, que peu de glucose, car elles transforment un excédent de cette substance d'assimilation en amidon insoluble ; cet amidon est stocké dans la graine et transformé en sucre lors de la germination par l'enzyme amylase et il est ainsi disponible pour la plante mais aussi pour la fermentation alcoolique. On appelle l'orge germé, du malt, qui est la matière bien connue servant à la fabrication de la bière. Le whisky écossais provient de l'orge et le whisky canadien, du maïs. On utilise pour la fermentation alcoolique, en complément du malt, de l'amidon de pomme de terre. On utilise fréquemment pour obtenir des eau-de-vie des fruits à pépins ou à noyaux comme par exemple la prune, la cerise, la pomme et la poire.

- *Fermentation acétique* : Il se forme de l'acide éthanoïque à partir de l'éthanol.

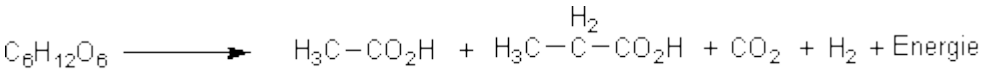


Remarquons que cette fermentation est aérobie, l'oxydation nécessitant l'oxygène de l'air pour avoir lieu.

C'est à Louis Pasteur (1808-1873) que nous devons la découverte de la nature biochimique du processus de formation du vinaigre. A partir de 1865, sur la base des recherches de Pasteur, la production industrielle de vinaigre a connu un grand essor. La bactérie du vinaigre "aceto-bacter" se développe dans le vin non bouché. Les petites mouches qui sont fortement attirées par le vin placé à l'air libre et qu'on appelle mouches du vinaigre (drosophiles) véhiculent l'aceto-bacter. Les bactéries de l'acide acétique forment une couche à

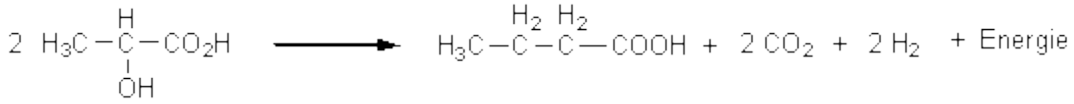
la surface que l'on appelle la mère du vinaigre. L'aceto-bacter utilise pour vivre l'énergie libérée par l'oxydation. Les processus qui ont lieu en présence d'oxygène de l'air sont dits aérobies. Toute solution alcoolique diluée peut donner de l'acide acétique ; dans ce cas le taux d'alcool correspond à la quantité d'acide acétique qui résultera de la transformation.

- *Fermentation propionique* : De l'acide propanoïque , de l'acide éthanoïque ainsi que du CO_2 et du dihydrogène se forment.



L'acide propionique (ou propanoïque) et l'acide éthanoïque sont responsables de la flaveur des fromages à pâte cuite et le gaz carbonique responsable de l'ouverture de ces fromages (Comté, Gruyère et Emmental). Les bactéries qui produisent ce type de fermentation sont les bactéries propioniques (Genre *Propionibacterium*).

- *Fermentation butyrique* : Il se forme de l'acide butanoïque, du CO_2 et du dihydrogène à partir de l'acide lactique déjà formé par fermentation lactique :



L'acide butyrique est responsable de l'odeur putride et du goût piquant de certains fromages à pâte cuite. Cette fermentation a lieu sous l'effet des bactéries *Clostridium butyricum*.

2. 4. 1. 2. Les fermentations dans l'industrie non alimentaire

- *Les biocarburants :* Trois procédés :

  - On extrait de la betterave à sucre ou de la canne à sucre, des jus sucrés que l'on fait fermenter.

  - On extrait des matières amylacées (amidon...) de céréales (froment, maïs). Ces matières sont hydrolysées en milieu acide pour obtenir du glucose que l'on fait fermenter.

  - D'un point de vue chimique on peut, dans des conditions très particulières, parvenir à

transformer du bois (matières ligno-cellulosiques) en sucres fermentescibles, comme le fait par exemple la Suède. Cette technique est encore sujet de recherches.

L'éthanol et l'ETBE **(**ethyl-tert-butyl-ether) qui peut en dériver sont de bons carburants (Pouvoir calorifique élevé : 21700kJ/kg pour l'éthanol, 28900kJ/kg pour l'ETBE contre 35600kJ/kg pour l'isooctane). On les mélange à l'essence (5% d'éthanol dans le biocarburant commercialisé en France, 15% d'ETBE dans le biocarburant commercialisé dans le reste de l'Europe). Jusqu'à 20% d'éthanol, les moteurs classiques fonctionnent sans problème, au delà une adaptation de ces moteurs est nécessaire.

- Les polymères dégradables :

  Une industrie des polymères dégradables se développe dans l'optique d'un développement durable, à partir de monomères ou de synthons obtenus par fermentation.

  On prépare ainsi les polymères :

- PLA , poly(lactide) utilisé notamment en chirurgie pour des implants. Le polymère qui se déforme dès 50°C, est dégradable dans l'organisme par hydrolyse des fonctions esters, les métabolites naturels étant l'acide lactique et l'acide glycolique, le terme ultime de la dégradation étant CO_2 et H_2O. Le monomère est l'acide lactique obtenu par fermentation lactique du D-glucose issu de l'amidon de maïs.

- PBS (PolButylène Succinate : Acide succinique et butanediol) et PBSA (PolyButylène Succinate Adipate : Acide succinique, acide adipique et butanediol).
Ce sont des polyesters biodégradables obtenus à partir de l'acide succinique, qu'on peut produire à partir du glucose (provenant de l'amidon de blé, de maïs ou de résidus ligno-cellulosiques ou provenant des sucres de la canne à sucre ou de la betterave) par métabolisme bactérien (fermentation) ; *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniproducens* mais aussi *Escherichia Coli* sont les principales bactéries utilisées.
L'acide succinique est un synthon à 4 carbones, base de départ de nombreuses synthèses.

Chapitre : 3 Autres voies métaboliques

La voie de dégradation des hexoses la plus anciennement connue est la glycolyse qui conduit à la formation transitoire d'acide pyruvique.

Il existe des alternatives de la glycolyse chez une grande variété de microorganismes aérobies ou anaérobies. Ces voies sont empruntées soit de façon exclusive, soit concurremment avec la glycolyse.

1. La voie des pentoses phosphates

La **voie des pentoses phosphates**, ou voie de Warburg-Dickens-Horecker, est l'une des quatre voies métaboliques principales du métabolisme énergétique, avec la glycolyse, la voie d'Entner-Doudoroff de dégradation du glucose en pyruvate et la voie du méthylglyoxal.
Les rôles essentiels de cette voie sont :

- la production de NADPH + H^+, utilisé lors de la biosynthèse des acides gras, du cholestérol et pour la réduction du glutathion,
- la production de ribose-5-phosphate utilisé lors de la synthèse des nucléotides,
- la production d'érythrose-4-phosphate, précurseur d'acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosineet tryptophane.

Cette voie existe chez tous les eucaryotes et la quasi-totalité des bactéries. Elle est indépendante de l'oxygène. Elle se fait aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, dans le cytoplasme (plus précisément dans le cytosol) chez la plupart des organismes, mais dans les plasteschez les plantes.
En 1959, Henri Laborit mit en évidence le rôle de la voie des pentoses phosphates en radio et oxygéno-protection et des radicaux libres en pathologie.

1. 1. Les étapes de la voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses est composée de deux phases. La première est une **phase oxydative** irréversible qui permet la formation de NADPH par réduction du NADP. La seconde est une **phase non oxydative** réversible qui permet la synthèse du ribose.

1. 1. 1. Phase oxydative

Durant cette phase, deux molécules de $NADP^+$ sont réduites en NADPH en utilisant l'énergie de conversion du glucose-6-phosphate (G6P) en ribulose-5-phosphate :

La première étape est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH). Cette étape d'oxydation permet la production du premier NADPH et produit de la 6-phosphoglucono-δ-lactone. Cette lactone est ensuite hydrolysée par une hydrolase pour donner du 6-phosphogluconate.

Le 6-phosphogluconate subi ununе décarboxylation oxydative catalysée par la 6-phosphogluconate déshydrogénase. Ceci produit un pentose phosphate, le ribulose-5-phosphate et génère une seconde molécule de NADPH.

Le ribulose-5-phosphate (un cétose) subit ensuite une isomérisation catalysée par la ribose-5-phosphate isomérase qui donne le ribose-5-phosphate (un aldose), précurseur de la biosynthèse des nucléotides, ou une épimérisation catalysée par la phosphopentose épimérase qui mène au xylulose-5-phosphate.

L'augmentation de la concentration en NADPH inhibe la glucose-6-phosphate déshydrogénase, ce qui limite l'augmentation de concentration du glucose-6-phosphate pour la glycolyse

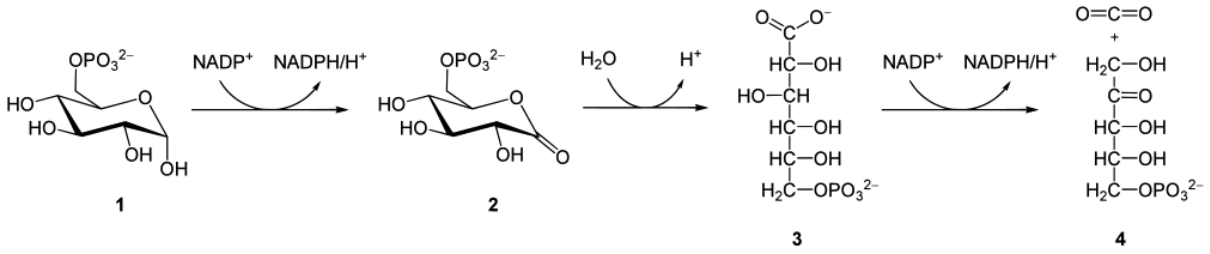


Figure 1. *Phase oxydative de la voie des pentoses phosphates : (**1**) glucose-6-phosphate, (**2**) 6-phosphoglucono-δ-lactone, (**3**) 6-phosphogluconate, (**4**) ribulose-5-phosphate.*

Tableau 1.*Phase oxydative de la voie des pentoses phosphates.*

Substrats	Produits	Enzyme	Description
Glucose-6-phosphate + $NADP^+$	6-phosphoglucono-δ-lactone + NADPH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase	déshydrogénation
6-phosphoglucono-δ-lactone + H_2O	6-phosphogluconate + H^+	6-phosphogluconolactonase	Hydrolyse
6-phosphogluconate + $NADP^+$	ribulose-5-phosphate + NADPH +CO_2	6-phosphogluconate déshydrogénase	Décarboxylation oxydative

1. 1. 2. Phase non oxydative (réversible)

Cette phase forme deux molécules de fructose-6-phosphate (F6P) et une molécule de glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P), à partir de trois molécules de ribulose 5-phosphate générées lors de la première phase. Le F6P peut être utilisé pour reformer du G6P afin de recommencer la première phase oxydative.

Cette phase est catalysée par deux enzymes, la transaldolase et la transcétolase, qui agissent sur des sucres-phosphate (aldoses et cétoses) à 3, 4, 5, 6 ou 7 atomes de carbone et catalysent des réactions de transfert de deux atomes de carbone (transcétolisation) ou de trois atomes de carbone (transaldolisation).

Elles ont comme substrats et produits :

- Le glycéraldéhyde-3-phosphate (triose)
- L'érythrose-4-phosphate (tétrose)
- Le ribose-5-phosphate et le xylulose-5-phosphate (pentoses)
- Le fructose-6-phosphate (hexose)
- Le sédoheptulose-7-phosphate (heptose)

Ces différents sucres-phosphates sont utilisés dans diverses voies métaboliques : le fructose et le glycéraldéhyde dans la glycolyse, l'érythrose dans la synthèse des acides aminés aromatiques, le ribose dans celle des nucléotides et le sédoheptulose dans celle du lipopolysaccharide de la paroi bactérienne.

Tableau 2. *Phase non oxydative de la voie des pentoses phosphates.*

Substrats	Produits	Enzymes
ribulose-5-phosphate	ribose-5-phosphate	ribose-5-phosphate isomérase
ribulose-5-phosphate	xylulose-5-phosphate	Phosphopentose épimérase
xylulose-5-phosphate + ribose-5-phosphate	glycéraldéhyde-3-phosphate + sédoheptulose-7-phosphate	Transcétolase
Sédoheptulose-7-phosphate + glycéraldéhyde-3-phosphate	érythrose-4-phosphate + fructose-6-phosphate	Transaldolase
xylulose-5-phosphate + érythrose-4-phosphate	glycéraldéhyde-3-phosphate + fructose-6-phosphate	Transcétolase

- **Bilan :**

3 glucose-6-phosphate + 6 $NADP^+$ + 3 H_2O ⟶ 2 fructose-6-phosphate + glycéraldéhyde-3-phosphate + 3 CO_2 + 6 NADPH + 6 H^+

1 .2. Rôles métaboliques de la voie des pentoses

La voie des pentoses phosphate remplit trois rôles principaux dans les cellules vivantes.
- Le premier est la biosynthèse du ribose, qui est utilisé ensuite pour la synthèse des acides nucléiques, ARN et ADN. Pour l'ADN, le désoxyribose est produit à partir du ribose par l'action de ribonucléotide réductases.

- Le deuxième rôle important de la voie des pentoses phosphates est de fournir de l'érythrose-4-phosphate, qui est un précurseur essentiel de la voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques : phénylalanine, tyrosine et tryptophane chez les organismes capables de les produire.
- Le troisième rôle important de la voie des pentoses phosphates est de fournir du NADPH. Le NADPH est un cofacteur essentiel de la glutathion réductase, l'enzyme qui réduit le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). Le glutathion réduit est essentiel au maintien de l'état redox de la cellule et à la lutte contre le stress oxydatif et les dérivés réactifs de l'oxygène (radicaux libres, peroxydes...), en particulier via l'action de la glutathion peroxydase qui élimine le peroxyde d'hydrogène.

Ceci se produit par exemple dans les globules rouges au niveau de l'hémoglobine (Hb) où il y a formation de radical superoxyde et oxydation de l'hémoglobine, ce qui peut conduire à son agrégation et la formation de corps de Heinz. La réaction d'oxydation est dans ce cas la suivante :

$(Hb)Fe^{2+} + O_2 \longrightarrow (MetHb)Fe^{3+} + O_2^{\bullet -}$

Le radical superoxyde peut également être produit par la réaction de Fenton en présence de fer ou au niveau de la cytochrome oxydase dans les mitochondries et doit être éliminé. Ce processus est assuré par la superoxyde dismutase, qui transforme le superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène. Ce dernier est ensuite éliminé par la glutathion peroxydase qui utilise le glutathion réduit. Toute cette chaîne nécessite le recyclage du glutathion et donc du NADPH, dont la production cellulaire est principalement assurée par la voie des pentoses phosphates. Ainsi, le déficit en glucose-6-phosphate déshydrogénase aboutit à une sensibilité accrue au stress oxydatif et à une maladie génétique appelée favisme.

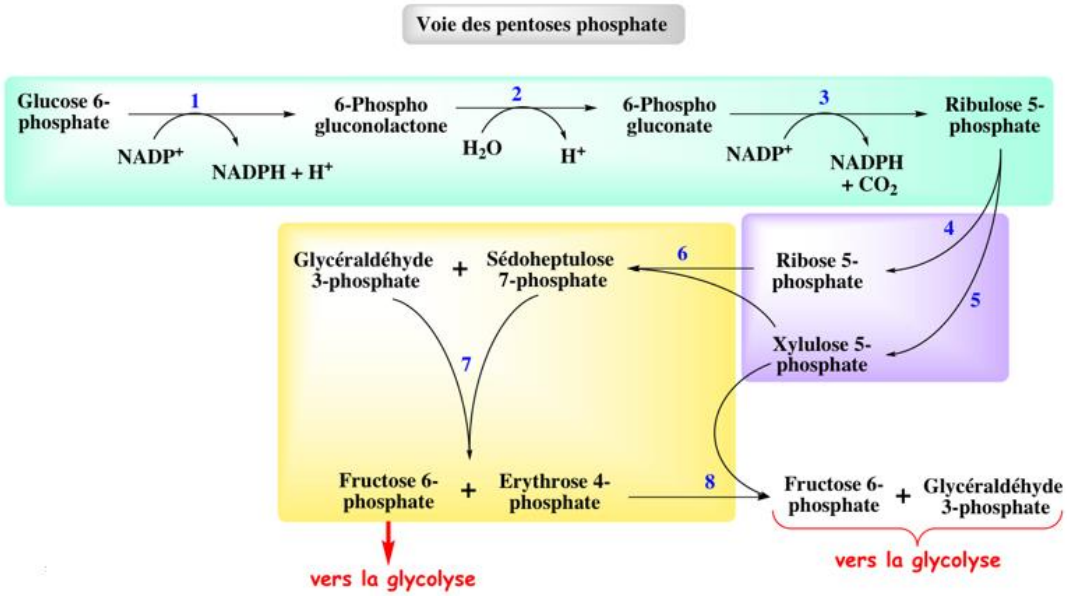


Figure 1 : *Voie des pentoses phosphate*

1 .3. Régulation de la voie des pentoses phosphates

En fonction des besoins de la cellule en ribose 5-phosphate, en NADPH et en ATP, la voie des pentoses phosphates peut fonctionner selon différents modes afin d'optimiser la concentration de ces métabolites :

1. Une quantité plus importante de ribose 5-phosphate que de NADPH est nécessaire. Exemple: les cellules en division rapide ont de forts besoins en ribose 5-phosphate pour la synthèse d'ADN. La transcétolase et la transaldolase forment le ribose 5-phosphate à partir du fructose 6-phosphate et du glycéraldehyde 3-phosphate : ces réactions fonctionnent alors dans le sens opposé.

2. Une quantité plus importante de NADPH que de ribose 5-phosphate est nécessaire : toute la voie des pentoses phosphates est utilisée. Exemple: les cellules des tissus adipeux ont besoin de beaucoup de NADPH pour la synthèse des acides gras. Il y a alors deux cas de figure :

- le glycéraldéhyde 3-phosphate et le fructose 6-phosphate formés sont convertis en glucose 6-phosphate par la néoglucogenèse. Le glucose 6-phosphate alimente la voie

des pentoses phosphates (1ère réaction de la partie oxydative) ce qui maximise la formation de NADPH.

- le glycéraldéhyde 3-phosphate et le fructose 6-phosphate formés sont convertis en pyruvate par la glycolyse pour la synthèse d'ATP. La voie produit aussi du NADPH.

3. Les besoins en ribose 5-phosphate et NADPH sont équilibrés : la partie oxydative de la voie des pentoses phosphates est utilisée.

Le ribose 1-phosphate généré lors du catabolisme des nucléosides entre également de cette manière dans la glycolyse, après avoir été converti en ribose 5-phosphate. La voie des pentoses phosphates sert donc de point d'entrée dans la glycolyse pour certains oses à 5 ou 6 carbones.

Une régénération efficace du NADPH est l'un des facteurs limitant dans la production par des processus de bio-transformation. Des souches d'*Escherichia coli* ont ainsi été manipulées par ingéniérie :

- remplacement de la glycéradéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH - glycolyse) endogène par la GAPDH NADP-dépendante de *Clostridium acetobutylicum*
- introduction de la NADH kinase de *Saccharomyces cerevisiae* qui catalyse directement la phosphorylation du NADH en NADPH

Ces modifications ont des effets remarquables sur les bioprocédés NADPH dépendants.

1. Voie d'Entner-Doudoroff

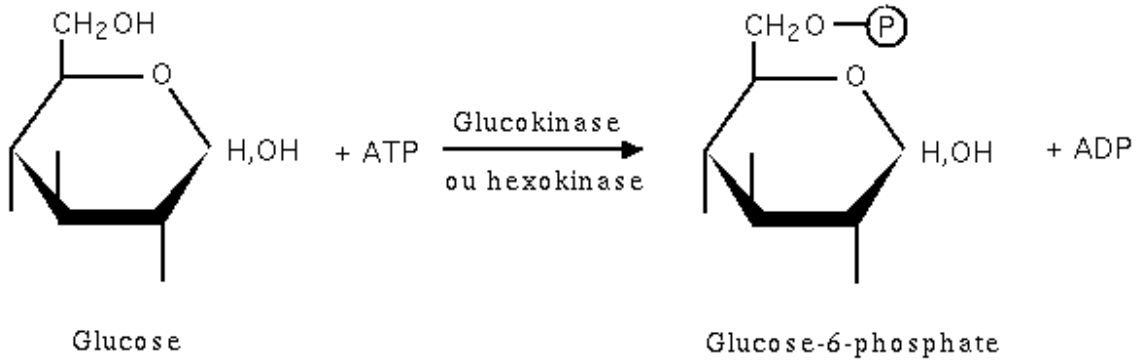
Cette voie possède des étapes communes à la fois avec la voie de l'hexose monophosphate et avec la glycolyse. Elle a été découverte par Entner et Doudoroff en étudiant l'oxydation du glucose par des espèces de *Pseudomonas* (microorganismes aérobies). Elle est rencontrée aussi chez Azotobacter et certaines moisissures. Actuellement, il n'y a qu'une seule bactérie, *Zymomonas mobilis*, qui utilise cette voie pour la fermentation anaérobie du glucose.

- La voie d'Entner Doudoroff qui est spécifique au monde microbien.
- Cette voie possède des étapes communes avec étapes communes avec la glycolyse et la voie des pentoses phosphate.

- Cette voie est présente chez microorganismes aérobies comme *Pseudomonas et Azotobacter*
- Chez les *Pseudomonas* cette voie est utilisée conjointement avec celle de l'hexose monophosphate.
- Seule une bactérie (Zymomonas mobilis) qui utilise cette en anaérobiose.
- Certaines bactéries utilisent cette voie pour décompser le glucose en pyruvate et en glycéraldéhyde P.
- Ces derniers pourront ensuite étre transformés en éthanole par fermentation alcoolique.
- Cette voie est utilisée pour la plupart des bacteries Gam négatives. Mais rarement chez les Gram positifs comme *Enteroccocus faecalis*

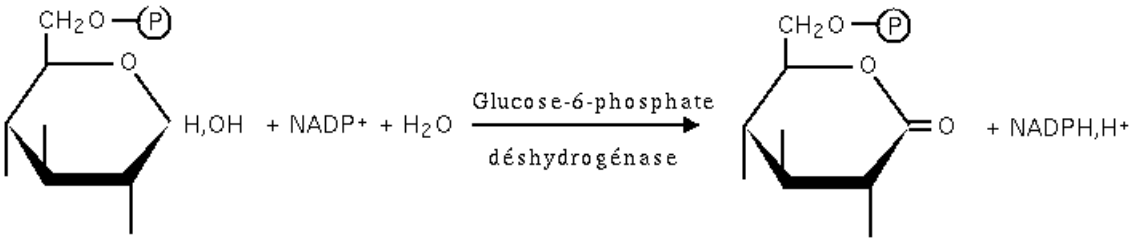
2. 1. Les étapes de la voie d'Entner-Doudroff

Phosphorylation du glucose le glucose, en présence de l'ATP, s'acquiert d'un phosphate pour donner du Glucose-P par la glucokinase.



- **Oxydation du glucose-6-phosphate**

Le G6P sous l'action du G-6P-déshydrogénase et en présence de NADP donne du 6-phosphogluconolactone

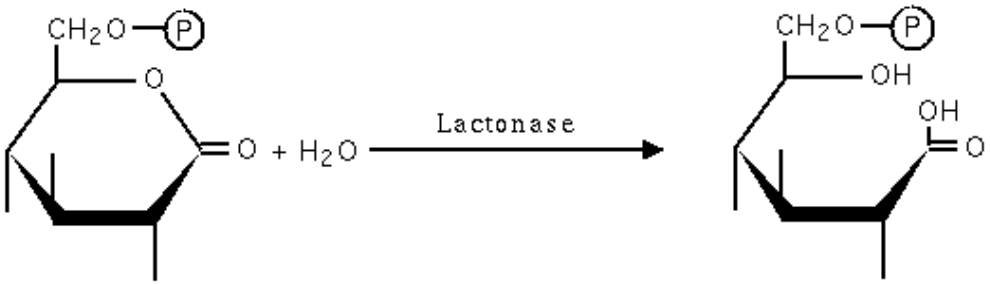


Glucose-6-phosphate

6-phosphogluconolactone

- **Hydratation de la 6-phosphogluconolactone**

6-phosphogluconolactone sous l'action d'une lactonase donne 6-phosphogluconate.

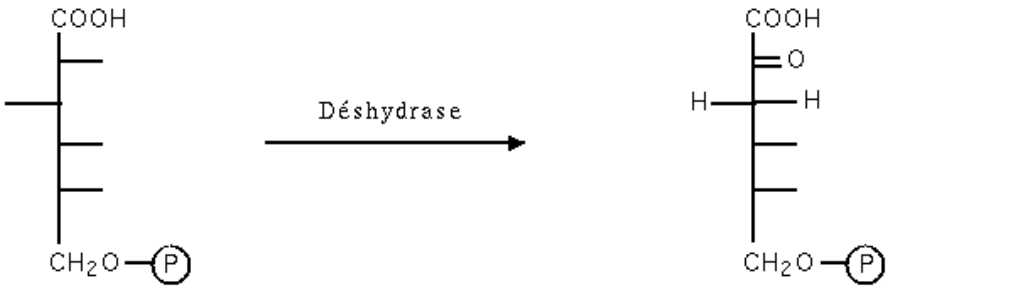


6-phosphogluconolactone

6-phosphogluconate

- **Déshydratation du 6-phosphogluconate.**

Par déshydrase, le 6-phosphogluconate. Perd une molecule d'eau et conduit a la formation du 2-céto-3-désoxy phosphogluconate (CDPG ou KDPG).

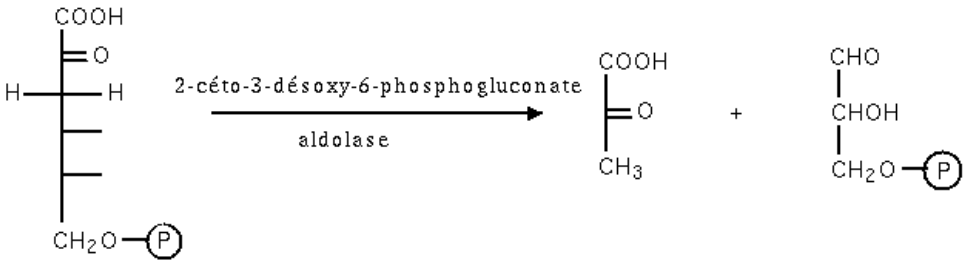


6-phosphogluconate

2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate

- **Synthèse du premier pyruvate**

Par CDPG-aldolase, la CDPG est fragmenté pour donner d'une part du glycéraldéhyde-3P et d'autre part du pyruvate.

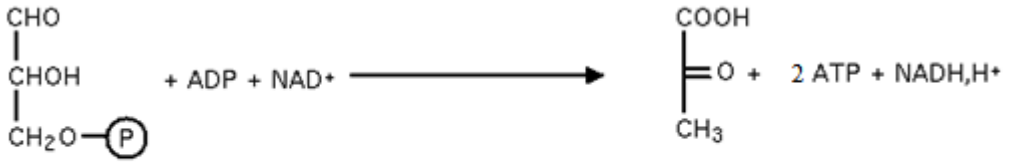


2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate Pyruvate 3-phosphoglycéraldéhyde

Le pyruvate chez les microorganismes a la particularité de subir une fermentation pour conduire à la formation de l'éthanol.

- **Synthèse du premier pyruvate**

Transformation du glycéraldéhyde-3P en pyruvate au moyen de la chaine de la glycolyse avec formation de 2ATP et une molécule de NADH, H^+.



3-phosphoglycéraldéhyde Pyruvate

Chapitre 4 : Catabolisme des autres composés organique

Catabolisme des acides gras

1. Dégradation des lipides

Les lipides constituent la matière grasse des êtres vivants et constituent la troisième grande classe de nutriments, après les glucides et les protéines. Ce sont des molécules organiques hydrophobes ou amphiphiles insolubles dans l'eau et solubles dans les solvants organiques apolaires comme le benzène, le chloroforme et l'éther. Les lipides sont principalement constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène et ont une densité inférieure à celle de l'eau.

Les lipides représentent environ 20% du poids du corps humain et sont une réserve énergétique mobilisable stockée dans le tissu adipeux. Ils jouent également un rôle de précurseurs pour la synthèse des stéroïdes, des vitamines, des prostaglandines et assurent un rôle structurel car ils sont des constituants essentiels des membranes cellulaires. Les lipides peuvent se présenter à l'état solide dans les composés tels que la cire, ou à létat liquide, comme dans les huiles.

Les lipides des organismes vivants sont divisés en deux classes. La classe des lipides simples auxquelles appartiennent des molécules comme les glycérides et les stérides (cholestérol) et une classe de lipides complexes regroupant les glycérophospholipides qui sont les constituants essentiels des membranes biologiques. Par leur imperméabilité dans les membranes ils permettent de former les barrières entre les différents compartiments des cellules.

Les glycérides sont des esters d'acide gras et de glycérol. Ils constituent une classe composée de monoglycérides (MAG), de diglycérides (DAG) et de triglycérides (TAG). Parmi ces catégories de lipides, les triglycérides également appelés triacylglycérols sont les plus abondants dans les cellules eucaryotes (Daum *et al.*, 2006) et ont été les plus étudiés.

Les triglycérides sont hydrolysés en acides gras et glycérol, grâce à des lipases ou à des estérases moins spécifiques, souvent exocellulaires. Ces lipases se rencontrent chez les moisissures (*Aspergillus, Penicillium, Rhizopus, Geotrichum…*), les levures (*Candida, Torulopsis, Saccharomyces, Saccharomycopsis…*) et les bactéries (*Serratia, Pseudomonas, Xanthomonas, Chromobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus…*).

Le glycérol entre dans la glycolyse au niveau de la dihydroxyacétone-P. Les acides gras, quant à eux, sont d'abord activés par l'ATP en présence de coenzyme A pour former un acyl-CoA, lequel est oxydé en β-céto-acyl-CoA. Après hydrolyse, il se forme de l'acétyl-CoA et un acyl-CoA possédant deux carbones de moins. Les réactions d'oxydation se poursuivent autant qu'il est nécessaire selon la longueur de la chaine carbonée. L'acétyl-CoA formé peut être incorporé dans le cycle de Krebs et le shunt glyoxylique.

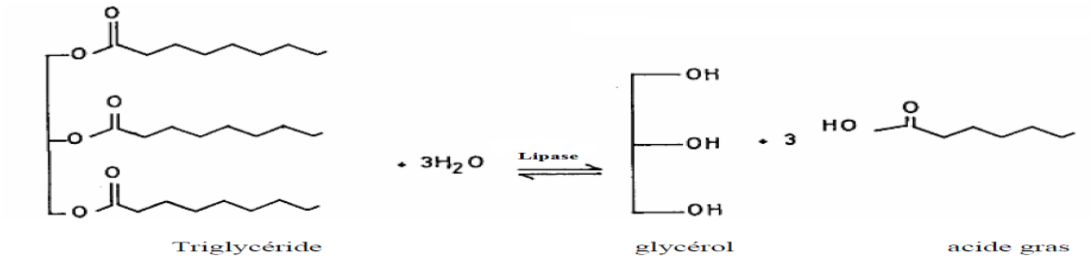


Figure 1*: Réaction enzymatique catalysant l'hydrolyse ou la synthèse de triglycéride (Jaeger et al., 1994 ; Sentaniello et al., 2006)*

1. 1. Oxydation des acides gras

Voie de dégradation enzymatique complète des acides gras en CO_2 et H_2O en aérobiose. Les enzymes impliquées dans cette voie sont mitochondriales. Elle se fait dans le foie, le coeur, les muscles au repos, les tissus adipeux, les reins. La dégradation des acides gras saturés ou β-oxydation se fait suivant un cycle décrit par Lynen en 1954.

Etape 1 : Activation des acides gras en acyl-CoA

- ***Activation des acides gras par le coenzyme A***

Les acides gras sont activés par leur fixation sur HSCoA. L'activation est catalysée par l'***acyl-CoA synthétase***. La réaction est la suivante :

$$R\text{-}CH_2\text{-}COO^- + H^+ + ATP + HSCoA \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + AMP + PPi$$

Au cours de la réaction, l'ATP subit une coupure libérant du pyrophosphate et de l'AMP. Le pyrophosphate est hydrolysé par une ***pyrophosphatase*** pour apporter l'énergie

complémentaire à la formation de la liaison thioester. L'AMP est rephosphorylé ensuite en ADP puis en ATP par Adénylate kinase.

Les acides gras à courte chaîne (nombre de carbones au plus égal à 10), peuvent être transportés directement dans la matrice et y subir leur activation par une acyl-CoA synthétase matricielle.

En ce qui concerne les acides gras à longue chaîne (nombre de carbones supérieur à 10) l'activation se fait dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie par une ***acyl-CoA synthétase*** liée à la face interne de la membrane mitochondriale externe, voir figure. Le radical acyle est alors transporté dans la matrice par le système cartine.

- ***Passage des acyl-CoA a travers la membrane interne mitochondriale***

Les acyl-CoA, à longue chaîne carbonée, formés dans la membrane externe mitochondriale ne traversent pas, intacts, la membrane interne : le groupe acyl est lié de façon transitoire à la L-carnitine, l'acyl-carnitine est transporté à travers la membrane interne, l'acyl-CoA est ensuite régénéré puis libéré dans la matrice.

La réaction est catalysée par l'***acyl-carnitine transférase 2***, située sur la face matricielle de la membrane interne. L'acyl-CoA ainsi reconstitué devient le substrat des réactions qui vont se dérouler dans la matrice mitochondriale.

Acyl-carnitine + HSCoA $\longrightarrow$ Acyl-CoA + Carnitine

En ce qui concerne les espèces à chaîne courte (inférieure à 12 carbones), elles traversent la membrane interne sous forme d'acides gras libres et sont activées en acyl-CoA directement dans la matrice.

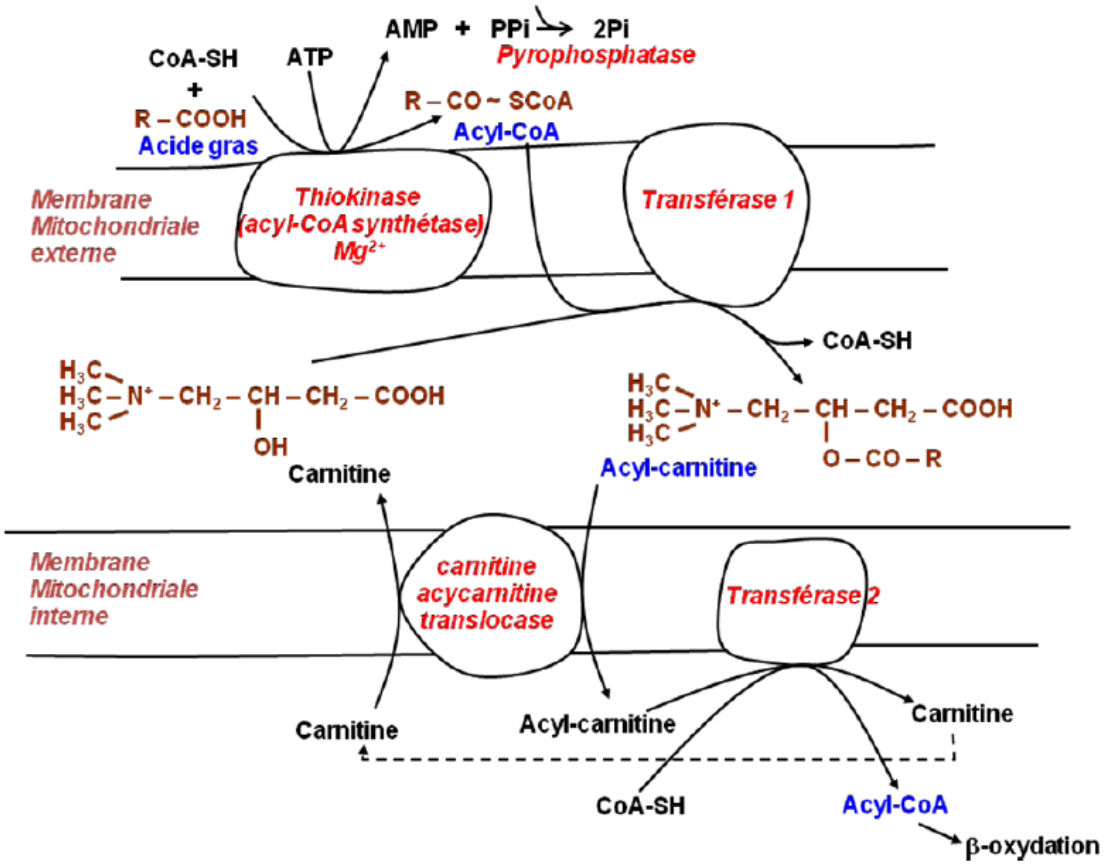


Figure 2 : *Activation des acides gras à longue chaîne et transport du radical acyle dans la matrice mitochondriale par la carnitine. ACT = Acyl-carnitine transférase.*

Etape 2 : Dégradation des acides gras saturés en acétyl-CoA : hélice de Lynen

(Oxydation mitochondriale)

La bêta-oxydation est la principale voie de dégradation des acides gras. Elle se caractérise par l'élimination de deux atomes de carbone de l'acide gras (Cruz et *al*, 2004). C'est un processus métabolique central qui fournit des électrons à la chaîne respiratoire et par conséquent de l'énergie chez les eucaryotes en conditions aérobies (Ghisla, 2004).

Dans les cellules de mammifères, la dégradation des acides gras s'effectue par le biais d'une ß-oxydation qui se déroule dans les mitochondries et les peroxysomes. En revanche, chez les levures, les enzymes qui interviennent dans cette voie de dégradation sont essentiellement localisées dans les peroxysomes.

La dégradation des acides gras est un processus qui se déroule en plusieurs étapes nécessitant l'implication de quatre réactions enzymatiques. La première étape de la ß-oxydation

est catalysée par un acyle coenzyme A (CoA) oxydase (Aoxp). De nombreuses études ont été effectuées sur les gènes responsables de cette première étape. Ces études ont en partie montré, qu'il existe un seul gène codant l'acyle coenzyme A (CoA) oxydase (Aoxp) chez *S. cerevisiae* . En revanche, chez *Y. lipolytica* les études ont d'abord montré l'existence de cinq gènes *POX (1-5)* codant cinq isoenzymes Aoxp avec différentes spécificités de substrat et différents niveaux d'activité . Le séquençage complet du génome de *Y. lipolytica* a révélé l'existence d'un sixième gène *POX6.* La protéine Aox2p intervient préférentiellement dans la dégradation des acides à longue chaine, en revanche Aox3p est spécifique des acides gras à chaîne courte chez *Y. lipolytica.* Les protéines Aox4p et Aox5p ne présentent pas de spécificité de substrat en fonction de la longueur des acides gras) chez *Y. lipolytica.*

L'oxydation des acides gras se déroule dans la matrice par cycles répétés de quatre réactions enzymatiques (hélice de Lynen). Pour un acide gras à 2n carbones (n-1) tours sont nécessaires pour son oxydation complète en n acétyl-CoA.

- **Déshydrogénation**

Entre les carbones 2 et 3 de l'acyl-CoA il se produit une déshydrogénation effectuée par l'***acyl-CoA déshydrogénase***, flavoprotéine à FAD, qui crée une double liaison.

$R\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + FAD \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CH{=}CH\text{-}CO\sim SCoA + FADH_2$

- ***Hydratation de la double liaison***

Elle est assurée par une ***énoyl-CoA (déhydroacyl-CoA) hydratase***. Le produit obtenu est le 3-hydroxyacyl-CoA. La fixation du radical OH est orientée sur le carbone 3 ou b.

$R\text{-}CH_2\text{-}CH{=}CH\text{-}CO\sim SCoA + H_2O \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}SCoA.$

- ***Deuxième déshydrogénation***

Elle porte sur le 3-hydroxyacyl-CoA. L'accepteur des hydrogènes est le NAD^+. L'oxydation de la fonction alcool conduit à une fonction cétone. L'enzyme est le 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase et le composé obtenu est le 3-cétoacyl-CoA :

$R\text{-}CH_2\text{-}CHOH\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + NAD^+ \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + NADH,H^+$

- ***Clivage de l'acide gras***

C'est la dernière réaction de la séquence. L'enzyme qui intervient est la ***ß-cétothiolase (lyase)***. Au cours de la thiolyse en présence d'un HSCoA il y a libération d'un acétyl-CoA et reformation d'un acyl-CoA dont la chaîne est privée de 2 carbones. Ce dernier acyl-CoA va servir de substrat pour le tour suivant.

$R\text{-}CH_2\text{-}CO\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + HSCoA \longrightarrow R\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + CH_3\sim CO\sim SCoA$

A la fin de chaque tour il y a libération de 1 acétyl-CoA, de 1 $FADH_2$ et de 1 $NADH,H^+$ à l'intérieur de la matrice. Si nous partons d'un acide gras à 2n carbones il faut (n-1) tours pour obtenir la ß-oxydation complète de l'acide gras avec la libération de n acétyl-CoA. Dans le cas d'un acide gras à (2n+1) carbones la ß-oxydation de l'acide conduit à la libération de (n-1) acétyl-CoA et de 1 propionyl-CoA.

1. 2. Bilan énergétique

A la fin de chaque tour il y a libération de 1 $FADH_2$, $NADH,H^+$ et 1 Acétyl-CoA. Il faut (n-1) tours pour assurer la b-oxydation totale d'un acide gras à 2n carbones ou à (2n+1) carbones.

La réaction globale de la b-oxydation d'un acide gras à 2n carbones s'écrit :

Acide gras (2n C) +ATP +n HSCoA + (n-1) FAD + (n-1) NAD^+	⟶	n Acétyl-CoA + AMP + PPi + (n-1) FADH2 + (n-1) $NADH,H^+$

Acide gras ((2n+1)C) +ATP+ n HSCoA + (n-1) FAD + (n-1) NAD^+	⟶	(n-1) Acétyl-CoA+ Proppionyl-CoA + AMP + PPi + (n-1) FADH2 + (n-1) $NADH,H^+$

Nombre de carbones	2n Carbones	(2n+1) Carbones
Coût de l'activation	2 liaisons phosphates	2 liaisons phosphates
Produits de la β-oxydation	(n-1) $FADH_2$	(n-1) $FADH_2$

	(n-1) $NADH,H^+$	(n-1) $NADH,H^+$
	n Acétyl-CoA	(n-1) Acétyl-CoA
		1 Proppionyl-CoA

- Exemple de l'acide palmitique 16 C. Pour sa dégradation complète, il faut 7 tours de cycle, le dernier tour libérant 2 x 2C.

$CH_3\text{-}(CH_2)_{14}\text{-}CO\sim S\text{-}CoA + 7\ FAD^+ + 7NAD^+ + 7H_2O + 7\ CoA\sim SH$

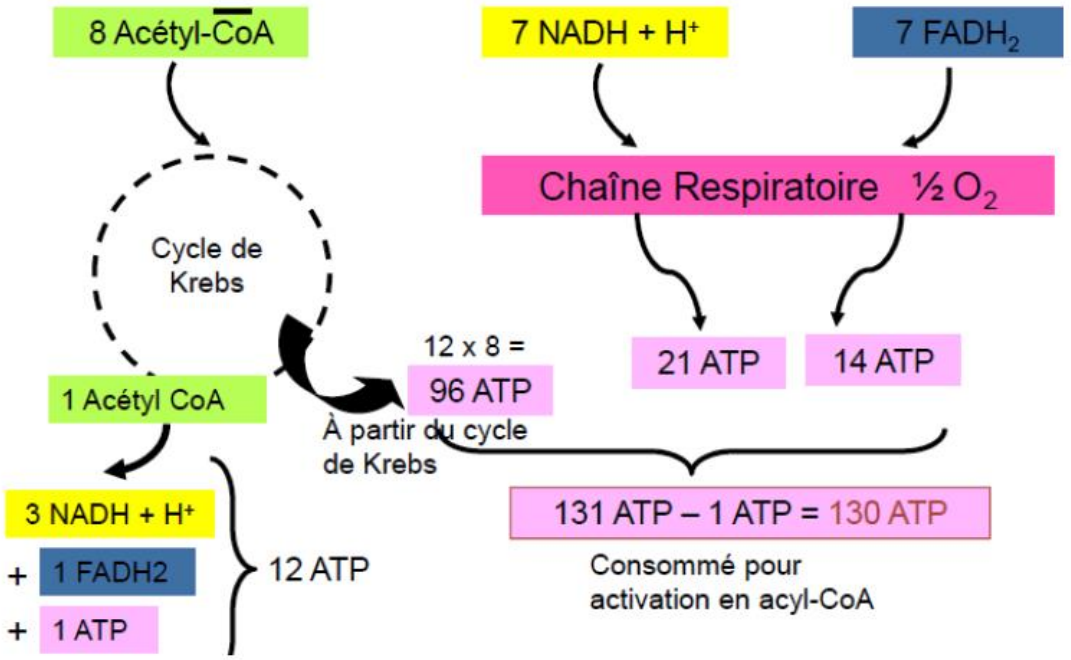
↓

$7\ FADH_2 + 7(NADH,H^+) + 7H_2O + 8CH_3\text{-}CoA\sim SH$

Remarque : o Pour un acide gras à 6C : 3 acétyl-CoA + 2 NADH + H+ et 2 FADH2 = 45 ATP contre 38 pour le glucose.

-Donc lipides plus énergétiques que les sucres

Réaction	**Composés libérés**	**Equivalent ATP**
Activation	1 AMP + 2Pi	-2 ATP
1ére oxydation	7 (1 $FADH_2$)	7 x 2ATP
2ére oxydation	7(1 $NADH,H^+$)	7x 3ATP
Thiolyse	8(1 Acétyl-CoA)	8 x 12 ATP
	Totale	129 ATP



2. 3. Régulation de la dégradation des lipides

La libération des acides gras par le tissu adipeux est contrôlée

- par la vitesse de l'hydrolyse des triacylglycérols
- et par celle de l'estérification du glycérol par les acyl-CoA

Dans le foie la b-oxydation et la ré-estérification des acyl-CoA sont possibles. La vitesse de l'oxydation des acides gras est déterminée par le taux d'entrée des acyl-CoA dans la matrice mitochondriale par l'intermédiaire de l'activité de ***l'acyl-carnitine tranférase 1.***. Ce taux peut être modifié par le **malonyl-CoA** (produit de carboxylation de l'acétyl-CoA) qui inhibe ***l'acylcarnitine transférase 1***.

Lorsque la concentration du malonyl-CoA est suffisante pour inhiber ***l'acylcarnitine transférase 1*** (ce qui maintient les acides gras dans le cytoplasme) la lipogenèse est stimulée (Figure 3).

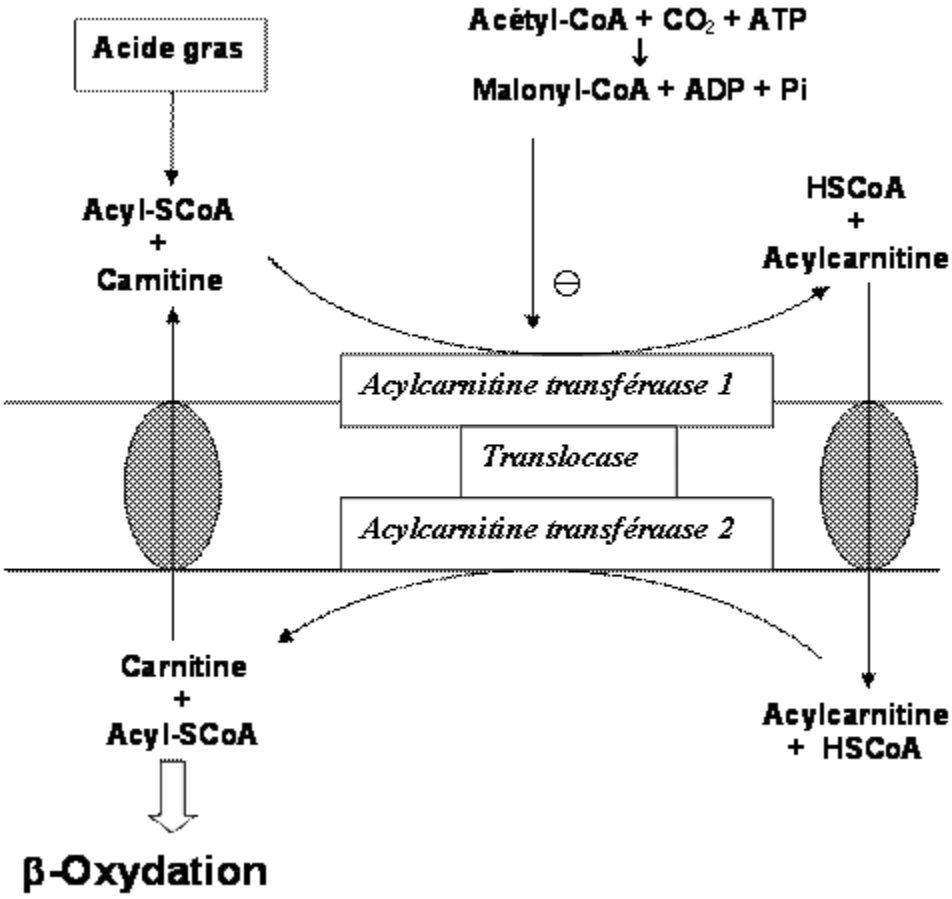


Figure 3** : Régulation allostérique de la b-oxydation. Le malonyl-CoA contrôle l'entrée des acides gras à longue chaîne dans la matrice mitochondriale en inhibant l'**acylcarnitinetransférase 1.

Le niveau de la glycémie est décisif de la voie à emprunter : -oxydation stoppée, glucose fournisseur d'énergieβSi glycémie élevé : Si glycémie baisse (jeûne) : AG utilisés pour fournir de l'énergie, glucose réservé aux GR et cerveau.

2. Devenir du glycérol, du propionyl-COA

Le glycérol est transformé glycéraldéhyde 3-è, le propionyl-CoA en succiniyl-CoA.

2. 1. Devenir du glycerol

Le glycérol issu de l'hydrolyse des triglycérides ou des phospholipides peut être réutilisé comme précurseur de la synthèse des lipides ou du glucose (néoglucogenèse) ou suivre la voie de la glycolyse. Il subit la séquence des réactions qui suivent :

2. 1. 1. Phosphorylation du glycérol

La réaction est catalysée par la ***glycérol kinase***. Le glycérol 3-Ⓟ formé peut être prélevé pour la synthèse des lipides

Glycérol + ATP ⟶ glycérol 3-Ⓟ + ADP

2. 1. 2. Déshydrogénation du glycérol 3-Ⓟ

Elle est catalysée par la ***glycérol-Ⓟ déshydrogénase***. Il se forme de la 3-Ⓟdihydroxyacétone.

Glycérol 3-Ⓟ + NAD^+ ⟷ 3-Ⓟdihydroxyacétone + $NADH,H^+$

2. 1. 3. Isomérisation en glycéraldéhyde 3-Ⓟ

L'enzyme qui intervient est la ***phosphotriose isomértase*** rencontrée dans la glycolyse. Le glycéraldéhyde 3-Ⓟ peut suivre la voie de la glycolyse ou celle de la néoglucogenèse.

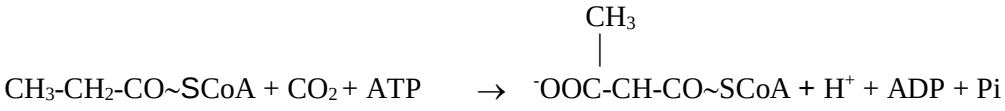
3-Ⓟdihydroxyacétone ⟷ glycéraldéhyde 3-Ⓟ

2. 2. Devenir du propionyl-CoA

Les acides gras à nombre impair de carbones sont rares et ne se trouvent que dans quelques organismes marins et dans les végétaux. On obtient, à l'issue de la ß-oxydation, un résidu final qui est le propionyl-CoA. Ce dernier subit une séquence de réactions qui le transforment en succinyl-CoA.

2. 2. 1. Carboxylation et formation du 2-méthyl malonyl-COA

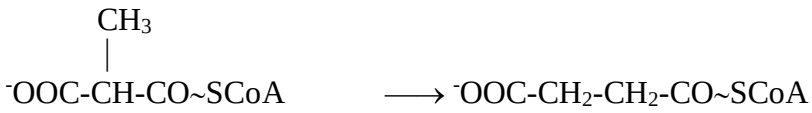
La réaction est catalysée par la ***propionyl-CoA Carboxylase.***



$$CH_3\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA + CO_2 + ATP \rightarrow {}^{-}OOC\text{-}CH(CH_3)\text{-}CO\sim SCoA + H^+ + ADP + Pi$$

2. 2. 2. Isomérisation du 2-méthyl malonyl-COA

Le 2-méthylmalonyl-CoA est transformé en succinyl-CoA par la ***2-méthyl malonyl-CoA carboxymutase,*** intermédiaire du cycle de Krebs et susceptible d'être converti en malate, précurseur de la néoglucogenèse.



$${}^{-}OOC\text{-}CH(CH_3)\text{-}CO\sim SCoA \longrightarrow {}^{-}OOC\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}CO\sim SCoA$$

Catabolisme des acides aminés

1. Dégradation des protéines

Suivant une nomenclature habituellement adoptée, les protéines sont les principes azotés qui forment des constituants essentiels et caractéristiques de la matière vivante; elles possèdent une, structure très complexe et un poids moléculaire élevé ; elles sont douées de propriétés spécifiques. Ces corps sont aussi dénommés "protéides, "substances protéiques" ou "matières albuminoïdes". Comme leurs molécules renferment toujours en proportion notable du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote, on leur a donné la désignation de "principes quaternaires".

Cependant, la classification en principes quaternaires ou ternaires est devenue désuète. On doit remarquer en effet que les protéines renferment souvent d'autres éléments que l e s quatre précités: le soufre est presque toujours présent en proportion plus ou moins notable ; l e phosphore est assez fréquent. La molécule protéique peut encore contenir, en faible dose, des métallor des ou des métaux divers, notamment de l'iode, du fer, du cuivre, du magnésium.

Les microorganismes protéolytiques sont les agents de la putréfaction et doivent leurs activités à la sécrétion des protéinases exo-cellulaires. On trouve dans ce groupe des moisissures, de nombreuses bactéries aérobies strictes (*Pseudomonas, Bcillus*) et d'autres

bactéries aéroanaérobies facultatives (*Proteus, Serratia*), et des anaérobies stricts sporulés (*Clostridium).*

- **Protéases :** se sont des enzymes exo-cellulaire. Les protéases microbienne sont divers et sécrétées en quantité considérables. *Clostridium histolyticum* Secrètes 4 types de protéases.Les *Bcillus subtilis* sécrètent jusqu'un 1g/l de protéases utilisées actuellement en industrie. Les protéases des moisissures contribuent a l'élaboration des différents produits alimentaires tels que le fromage de roquefort par *P roquefortii*. La gélatinase est recherchée dans un but diagnostique pour classer les espèces (*Bcillus, Entérobactéries*), d'autre protéases causent l'altération des produits alimentaires : lait (caséinases), le sérum, le blanc d'œuf...etc

- **Peptidases :** Les peptidases hydrolysent les polypeptides et les transforment en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés. De petits polypeptides pénètrent dans les cellules : chez la levure, il s'agit essentiellement de di- et tripeptides. L'entrée des acides aminés dépend de la présence de systèmes « perméase» nombreux et variés.

Les peptidases sont de deux types, les endopeptidases et les exopeptidases, en fonction de leur mode d'attaque de la chaine polypeptidique. Les exopeptidases sont elles-mêmes subdivisées en deux catégories :

- **Les aminopeptidases** commencent leur action par l'extrémité –NH2 libre du polypeptide et leur activité dépend souvent de la présence d'ions métalliques.
- **Les carboxypeptidases** débutent leur attaque par l'extrémité –COOH libre du polypeptide.

L'activité de ces différentes enzymes conduit à la libération de di- et tripeptides qui sont ensuite hydrolysés en acides aminés.

1. 1. Catabolisme des acides aminés libérés

Elle est très fréquemment opérée par les bactéries à Gram$^-$. Les enzymes responsables sont le plus soumises à un système de régulation. Les conditions expérimentales doivent être parfaitement définies :

Le pH u milieu : les décarboxylases sont synthétisées en milieu acide, les désaminases plutôt en milieu basique.

La composition du milieu : la présence de sucre fermentescible à faible dose favorise la synthèse des décarboxylases (pH acide) mais, à forte concentration, elle couvre les besoins énergétique et limite l'utilisation des protéines.

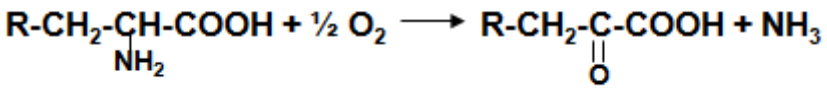
La pression partielle en oxygène : l'oxygène est indispensable pour la désamination oxydative (LDA, TDA…) mais il peut inhiber les désamination no oxydatives (aspartases).

La dégradation des acides aminés s'effectue principalement par désamination et décarboxylation. Contrairement a la dégradation des glucides, les réactions des dégradations des acides aminés ne produisent pas de l'ATP : l'énergie des laissons rompues est dégagée sous formes de chaleur. Seule la dégradation des radicaux carbones restants peut produire de l'énergie utilisable par la cellule.

Il existe deux voies principales : la désamination et la décarboxylation.

- **Les aminoacides désaminases** sont à la fois des enzymes <u>oxydatives</u> et des enzymes <u>non oxydatives</u>.

- **La désamination oxydative : l'acide aminé est hydrolysé en ammoniaque et en acides α-cétonique selon la réaction :**



- **La désamination non oxydative** peut être de trois types :

- *La désamination désaturante* : elle conduit à la formation l'ammoniaque (NH_3) et un acide insaturé. Par exemple, l'acide aspartique est transformé en acide fumarique par *E.Coli* et *P fluorescens* grâce à une aspartase.



- *La désamination par déshydratation* : ce mode de désamination est particulier aux acides aminés hydroxylés (serine) elle est exclusivement microbienne. Il y a formation

d'ammoniaque et d'un acide cétonique. Par exemple *E coli* possède une sérine désaminase.

- *La désamination réductive* consiste en une réduction de l'acide aminé en acide saturé correspondant, avec formation d'ammoniaque.Cette réaction s'effectue en anaérobiose ; on la rencontre en général chez les *Clostridium.*
- *La désamination couplée :* encore connue sous la réaction de SticKland. C'est une réaction d'oxydoréduction couplée entre deux acides aminés, l'un jouant le role de donneur d'électron et l'autre l'accepteurs d'électron. Dans la plupart des cas le cétoacide formé est décarboxylé. Par exemple, la fermentation de l'Alanine et de la glycine par *C. sporogenes* :

1Ala +2 Gly 3 acétates + $3NH_3$+ CO_2+ATP

- **Les décarboxylases** agissent sur les aminoacides pour former du CO_2 et une amine

$R\text{-}CH(NH_2)\text{-}COOH \longrightarrow CO2 + R\text{-}CH_2\text{-}NH_2$

Cette réaction est effectuée par un grand nombre de microorganismes protéolytiques ou non. Ces décarboxylases sont introduites à un pH acide. Les amines formées ont un pouvoir toxique observé lors des infections :

La lysine décarboxylase (LDC) : transforme la lysine en cadavérine (propriétés anémiantes).

L'ornithine décarboxylase (ODC) : produit de la putrescine (action parasympathicomimmétique).

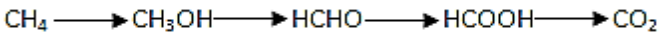
L'histidine décarboxylase (HDC) : conduit à l'histamine, responsable du phénomene de sensibilisation voire le choc.

L'arginine dihydrolase (complexe qui possède une arginine décarboxylase ADH) qui conduit à la formation d'agmatine.

La manière de dégrader un aminoacide est contrôlée en partie par le pH du milieu. Un milieu acide favorise la formation de décarboxylases alors que le milieu alcalin stimule celle de désaminases.

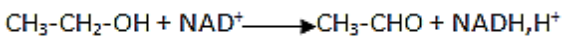
Catabolisme du méthane et méthanol

Les microorganismes capables de croître sur méthane et méthanol, comme seule source de carbone, (ex. *Pseudomonas*) oxydent le méthane selon la chaîne :

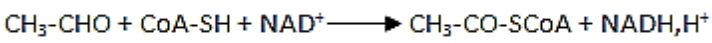


Ces microorganismes sont dits « méthylotrophes ». Ils peuvent être méthylotrophes stricts (ne dégradant que le méthane ou méthanol), ou méthylotrophes facultatifs (capables de dégrader, outre le méthane et méthanol, de nombreux composés à un ou plusieurs atomes de carbone).

L'éthanol peut être dégradé totalement en CO_2 et H_2O comme chez certaines levures (*Brettanomyces, debaryomyces, Hansenula, Pichia…*) comme il peut être transformé en acide acétique (*Acetobacter, Gluconobacter*). Dans les deux cas, la première étape conduit à la formation d'acétaldéhyde :



Dans le cas des levures, l'acétaldéhyde est incorporé dans le cycle de Krebs par oxydation en acétyl-CoA.



Cette dégradation est aérobie.
Dans le cas des bactéries acétiques, l'acétaldéhyde est transformé directement en acide acétique.



Chapitre 5 : Anabolisme et production de biomasse et de métabolites

1. Biomasse

Définition

Le terme de biomasse désigne le matériel organique cellulaire des organismes mis en culture (animaux, végétaux ou microbiens). La biomasse microbienne est aussi appelée "Single CellProtein"(SCP) ou protéines d'organismes unicellulaire (POU). Cette biomasse microbienne peut être une source de protéines, des vitamines, des antibiotiques, des vaccins, additifs alimentaires, des aliments et le bioéthanol…

1. 1. Détermination de la biomasse microbienne

- **Détermination de la masse sèche:** on récupère la biomasse par centrifugation puis séchée dans un dessiccateur. On procède ensuite au pesage. Plus la biomasse est élevée plus le nombre de bactérie est grand. Cette technique ne différencie pas les bactéries vivantes desmortes.
- **Mesure du trouble d'une suspension microbienne:** Elle ne distingue pas la biomasse morte de la vivante, mais son intérêt principal est sa rapidité et sa facilité d'application, notamment pour l'analyse dite "en ligne" c'est-à-dire en continu pour mesurer la biomasse dans unfermenteur.
- **Mesure directe de quelques constituants cellulaires**, tels que l'azote total, les protéines totales ou encore l'ADNtotal.
- **Mesure indirecte de l'activité métabolique**, en appréciant, par exemple la production ou la consommation d'oxygène ou deCO_2.

1. 2. Applications de la biomasse

La production de biomasse constitue souvent le but de nombreuses fermentations industrielles:

- Production de biomasse-aliment et plus particulièrement production de protéines d'organismes unicellulaires (Single CellProtéins)essentiellement de levures, plus rarement de bactéries, moisissures ou algues. Lorsque la biomasse est produite dans ce but, les protéines ne sont que rarement extraites et purifiées et le produit, en contenant environ50%.
- Production de levure diététique

- Production de levains pour les industries defermentations.
- Production d'agents biologiques pour bioconversions (cellules utilisées libres ou immobilisées, commecatalyseur).
- Production pour des applications particulières comme la lutte biologique (action insecticide).

Cinq secteurs sont actuellement concernés par le développement industriel des procédés biologiques mettant en œuvre des micro-organismes: la santé, 1'agro-alimentaire, l'agriculture, la chimie et l'énergie (Figure 1).

- ***La pharmacie***

C'est actuellement le secteur d'application privilégié des biotechnologies qui représente 40,6% de l'ensemble de ce marché. Les produits commercialisés ont une haute valeur ajoutée et les industriels de la pharmacie.

- Les antibiotiques sont des composés de structure variable produits par diverses espèces de micro-organismes ou par synthèse. Ils possèdent la propriété d'inhiber la croissance d'autres micro-organismes et constituent les plus importants produits anti- infectieux disponibles à ce Jour.
- Les vaccins, produits du sang et réactifs de diagnostic devraient voir leurs marchés doubler dans la décennie à venir grâce à un abaissement sensible du coût de production.
- Les hormones (peptidiques, anti-inflammatoires..) se prêtent bien à une production par des procédés biotechnologiques car elles ont une forte valeur ajoutée. Le génie génétique rend possible la production d'insuline, de somatestatine et d'hormone de croissance.
- Les vitamines obtenues par fermentation sont la vitamine B12 et les précurseurs des vitamines A etB2.

- ***Industrie alimentaire***

- L'utilisation des microorganismes est résumée pour la fabrication du pain,des fromages, de la bière et du vin par fermentation.
- Les protéines d'organismes unicellulaires (POU) constituent un type de produits occupant une place importante sur le marché des produits alimentaires issus des biotechnologies. Elles sont obtenues par culture de

micro-organismes sur des substrats de matière organique.

- Les sirops à haute teneur en fructose qui constituent l'essentiel des produits de ce marché (environ 92 %). Ils sont produits à partir de l'amidon du maïs.
- Les acides aminés (lysine et acide glutamatique surtout) et les acides organiques (citrique, lactique et itaconique) sont sont utilisés principalement comme additifs dans l'alimentation.

- ***Lachimie***

Il est possible de produire par voie biologique deux molécules de base de la chimie organique: le méthane et 1'ethylene. La première est obtenue directement par fermentation et la seconde à partir de l'alcool éthylique produit biologiquement. D'autres fermentations peuvent également être utilisées et conduire à la fabrication de produits de grande consommation : l'acétone, le butanol, le glycerol, le butanédiol, les acides organiques, les biodétergents, les huiles et les graisses...

- ***L'agriculture***

Deux types de production présentent un intérêt industriel : les bioinsecticides et les biopesticides.

- ***L'énergie et environnement***

Dans le domaine d'énergie, la production d'éthanol des micro-organismes à partir de la fermentation des plantes sucrières (canne à sucre, sorgho,betterave, topinambours) est devenue une réalité industrielle.

Les polluants sont majoritairement des composés organiques (hydrocarbures, composés phénolés et chlorés,...) mais la contamination par des métaux est également importante. La biodépollution de sols ou d'eaux par les micro-organismes repose sur l'exploitation de leurs capacités à réaliser l'ensemble de ces réactions.

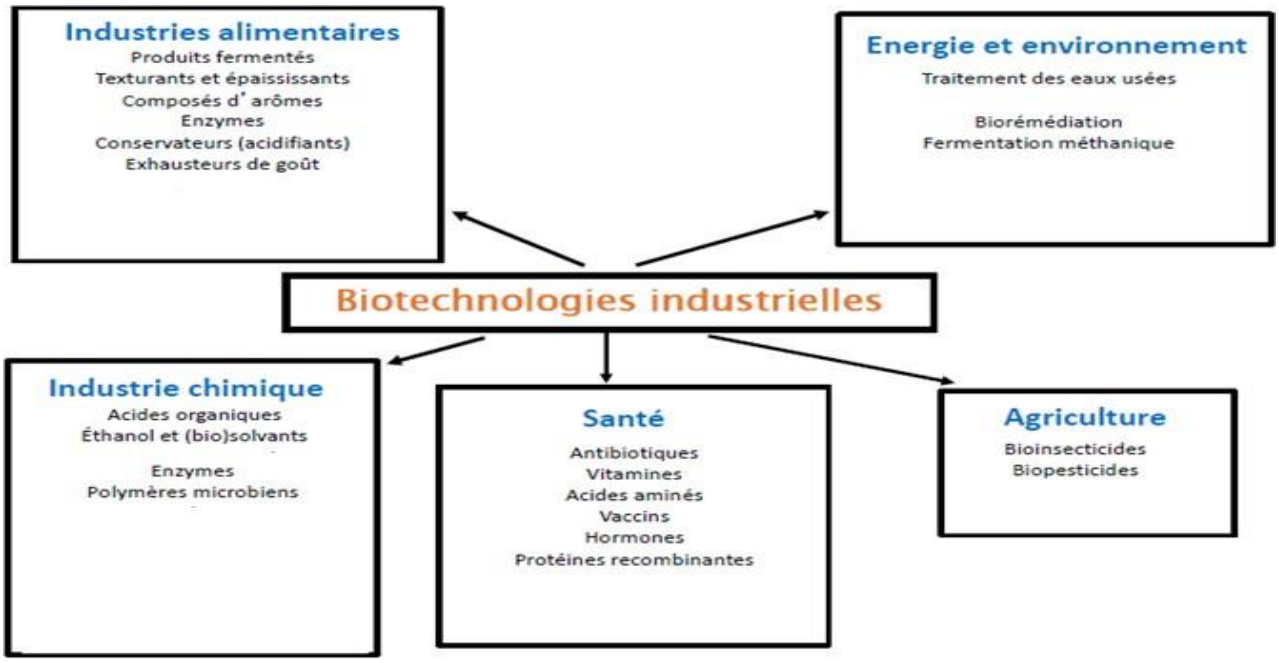


Figure 1 : *Les applications industrielles des microorganismes.*

2. Production industrielle des enzymes microbiennes

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protéique complexe. Seules les enzymes microbiennes produites par fermentation ont connu une expansion significative, et sont préparées industriellement, car les microorganismes présentent de nombreux avantages comme source d'enzymes: croissance exponentielle et la disponibilité. Dans les secteurs non alimentaires (chimie, diagnostic, analyses diverses…), le choix des souches n'est pas soumis aux mêmes contraintes. De façon générale, les micro-organismes sont sélectionnés selon les principaux critères suivants:

- Fournir une bonne production d'enzymes.
- En un minimum de temps
- Les enzymes extracellulaires (généralement des hydrolases) sont préférables aux endocellulaires (dont l'extraction est difficile à réaliser).
- La souche doit pouvoir se développer sur des substrats moins couteux.

De nombreuses enzymes peuvent être produites par culture microbienne (souvent grâce à des mutants hyper-producteurs et hyper-excréteurs) : il s'agit aussi bien d'enzymes

recueillies dans le milieu de culture, que d'enzymes à localisation interne qu'il faut ensuite extraire du corps microbien. Elles sont utilisées comme agent de transformation sous forme libre ou immobilisée, sous forme d'additifs, de biocapteurs… Les enzymes de grande importance industrielle sont : les cellulases, les pectinases, les amylases, les lipases, les protéases, l'invertase, la glucose oxydase, la glucose isomérase, la dextrane sucrase, la pénicillinase, la catalase.

3. Production des acides aminés

Les acides aminés synthétisés dans la cellule sont utilisés, pour la plus grande partie d'entre eux, pour la formation de protéines car de nombreux systèmes de régulation sont présents dans la cellule. De nombreux mutants ont été isolés pour augmenter la production d'acides aminés.Les acides aminés les plus intéressants du point de vue industriel sont les acides aminés « indispensables ».

Il existe plusieurs modes de production des acides aminés:

-Ils peuvent être obtenus par synthèse chimique

-Par catalyse enzymatique.

-Par extraction à partir d'une matière primaire riche en acide aminé recherché.

-Par culture microbienne (c'est l'intérêt du notre cours).

3. 1. Domaine d'utilisation des acides aminés produits par les microorganismes

- Ils entrent dans les produits alimentaires. Ex: la glycine et l'alanine sont ajoutés à certains produits alimentaires pour améliorer leur saveur. L'acide glutamique sert, sous forme de sel (glutamate monosodique ou GMS), de renforçateur de goût "goût de bouillon".
- Agents édulcorant (pouvoir "de goût sucré") en nutrition humaine. Ex:l'aspartam

  =d'aspartate + phénylalanine.
- Augmentation de la valeur nutritive des produits végétaux par l'addition des acides aminés essentiels comme la lysine et la méthionine.

3. 2. Les microorganismes producteurs des acides aminés

La culture microbienne est une méthode de production économique lorsqu'il existe une souche microbienne hyperproductrice de l'acide aminé désiré. Les bactéries appartenant au genre *Corynebacterium* (*Corynebacteriumglutamicum*, *Brevibacteriumflavum*) ainsi que des souches génétiquement modifiées de l'espèce bactérienne *Escherichia coli* sont les micro- organismes les plus souvent utilisés. **Le tableau 1** donne quelques microorganismes producteurs des différents acidesaminés.

Tableau 1. *Microorganismes producteurs des acides aminés.*

Acides aminés	**Micro-organismes producteur**
Acide aspertique	Bacillus megaterium- Pseudomonas
Alanine	Pseudomonas- Corynebacterium -Brevibacterium
Arginine	Corynebacterium glutamicum-Brevibacterium flavum
Acide glutamique	Corynebacterium glutamicum-Brevibacterium – Micrococcus
Lysine	Brevibacterium lactofermentum-Sccharomyces Candida
Phenylalanine	Brevibacterium lactofermentum-Flavobacterium spp Micrococcus

Pour la synthèse d'un acide aminé par un microorganisme, il nécessite la présence des intermédiaires pour former la chaine carbonée et d'autres pour la fonction amine (NH_2).La synthèse de la chaine carbonée des acides aminés s'effectue à partir de produits intermédiaires du métabolisme des glucides (glycolyse, voies des pentoses phosphate et cycle de Krebs). Ces intermédiaires sont phosphoénolpyruvate, phosphoglycérate, pyruvate, acétyl-CoA, oxaloacétate et α-cétoglutarate.Le groupement amine provient d'un autre acide aminé par une réaction de transamination ou il provient d'une molécule inorganique ($NH4^+$, N2..) par le processus d'amination.

La figure 2 résume la production des acides aminés à partir des différents intermédiaires.

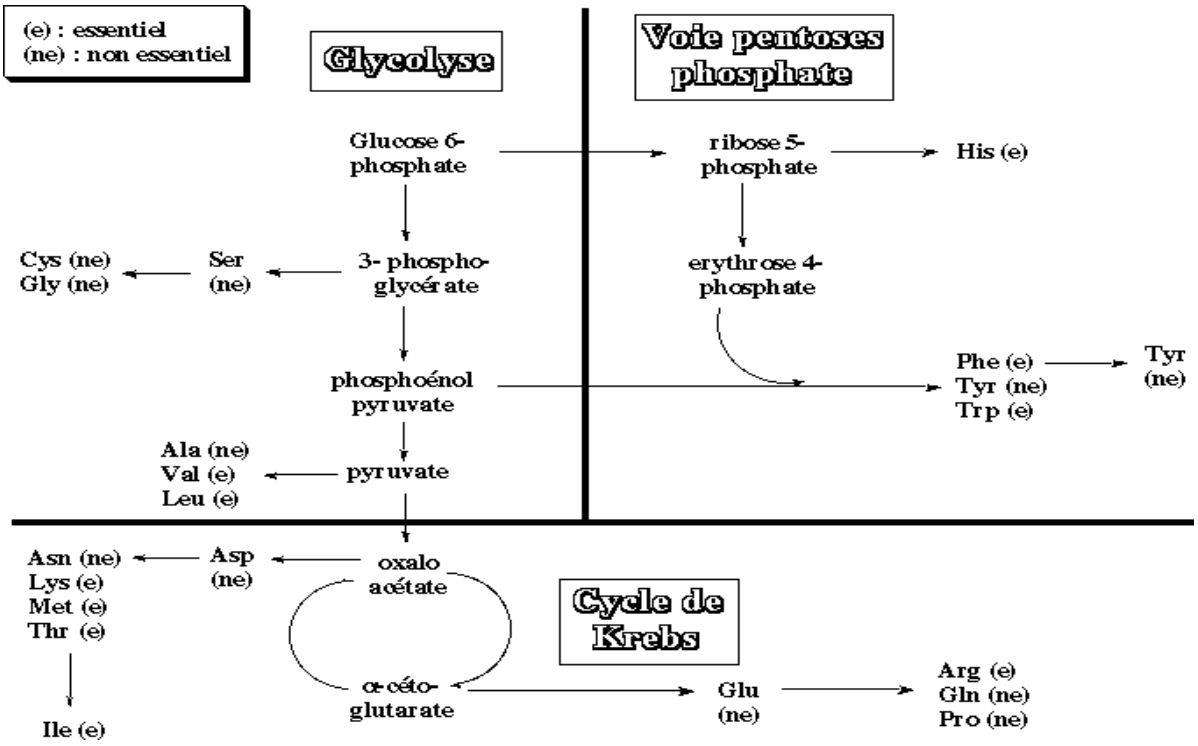


Figure 2 : *Production des acides aminés chez les microorganismes.*

4. Biosynthèse des vitamines

Les vitamines sont des substances organiques nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Le corps humain ne peut généralement pas les produire seul, et leur apport alimentaire est donc indispensable. Il s'agit d'un groupe de molécules chimiquement très hétérogènes. Ce sont des substances de faible poids moléculaire.

Les microorganismes prototrophes sont capables de synthétiser tous les facteurs de croissance, et en particulier toutes les vitamines dont ils ont besoin; certains en libèrent dans le milieu des quantités intéressantes. Il est possible, par perturbation du métabolisme, de faire préparer par des microorganismes (tableau) la plupart des vitamines ou provitamines (panthoténate, pyridoxine, biotine, thiamine, acide folique, acide lipoïque, nicotinamide, riboflavine, cyanocobalamine, précurseurs des vitamines A, C, D, vitamine K, coenzyme Q, inositol…). Certaines de ces productions ont un grand intérêt industriel, comme la vitamine B2 ou riboflavine et surtout la vitamine B12 ou cyanocobalamine dont la seule source est microbienne. En outre, le β-carotène, précurseur de la vitamine A, est souvent préparé par voiemicrobiologique.

5. La production des polysaccharides

Les polysaccharides (parfois appelés glycanes, polyosides, polyholosides ou glucides complexes) sont des polymères constitués de plusieurs oses liés entre eux par des liaisons osidiques.La plupart des microorganismes synthétisent plusieurs types de polysaccharides qui peuvent être classés selon leur localisation dans la cellule. Certains se trouvent à l'intérieur de la cellule, dans le cytoplasme, où ils sont utilisés par le microbe comme source d'énergie. D'autres sont des composants de la paroi tels que les peptidoglycanes et les acides téichoïques. Enfin, un troisième groupe de polysaccharides est excrété à l'extérieur de la cellule (exemple : dextranes, levanes, xanthanes...etc). Selon leur composition chimique, les polysacharides peuvent être subdivisés en deux groupes: les homopolysaccharides et les hétéropolysaccharides. Tandis que les homopolysaccharides sont constitués d'un seul type de monomère saccharidique, les hétéropolysaccharides peuvent contenir plusieurs types de sucres. Parmi les homopolysaccharides, on retrouve les dextranes et les levanes. Le groupe d'exopolysaccharidesle plus large et le plus diversifié est le groupe des hétéropolysaccharides.

5. 1. Applications industrielles

-La gomme Xanthane a été utilisée dans un grand nombre d'applications, en tant qu'agent de suspension, un stabilisateur d'émulsion, un amplificateur de mousse ou un améliorant du volume de la pâte, mais il est également utilisé comme adhésif et pour l'inhibition de la formation de cristaux de glace, tant dans les industries alimentaires que non alimentaires.

-Il a trouvé que les dextranes sont utilisés pour la premières fois dans le support chromatographique et dans le plasma sanguin pour moduler l'écoulement du sang.

-Dans les produits laitiers, les dextranes sont utilisés comme additifs alimentaires et agissent comme texturants en augmentant la viscosité et comme stabilisateurs.

-Les polysaccharides bactériens sont antigéniques et quelques-uns sont utilisés comme vaccins.

Le dextrane produit par *Leuconostocmesenteroides*est synthétisédans une solution de saccharose, mais il peut aussi être produit à partir d'un extrait enzymatique extracellulaire, la dextrane-sucrase. Le dextrane est aussi synthétisé par *Streptococcussanguis* qui produit un dextrane constitué de 82% de liaisons α (1-6) alors que *Streptococcusmutans* produit essentiellement un dextrane de 95% de liaisons α (l-3).

6. **Biosynthèse des hormones**

Les hormones sont des molécules organiques pouvant influencer la physiologie et le développement des plantes et des animaux, et ce, même en faible concentration.

Les hormones végétales, aussi appelées phytohormones, les plus connues sont l'auxine, la gibbérelline, la cytokinine, l'éthylène et l'abscissine (acide abscissique).Elles jouent notamment un rôle important dans la régulation de la croissance et la floraison de la plante.

Le champignon nommé *Gibberellafujikuroi* a été trouvé pour produire des gibbérellines. Il s'agit en fait d'un champignon pathogène de semis de riz. La production de gibberelline peut être effectuée en utilisant un milieu glucose-sel à pH 7,5 et une température de 25 ° C pendant 2-3 jours. Le processus de fermentation est effectué dans un procédé fermé aéré. Après la croissance du champignon est maximale, la production de gibbérellines commence.

7. Biosynthèse des antibiotiques

Un antibiotique est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit (a.b bactéricide) ou bloque la croissance des bactéries (bactériostatique). Un même antibiotique peut être bactériostatique à faible dose et bactéricide à dose plus élevée. Un grand nombre d'antibiotiques sont des molécules naturelles, fabriquées par des champignons ou d'autresbactéries. Cette production pour éliminer les bactéries concurrentes avec lesquelles dans leur environnement.

La plupart des métabolites secondaires sont en fait biosynthétisés par des microorganismes filamenteux comme les actinomycètes (environ 75%) et les moisissures (comme le genre *penicilium*) (17%). En outre, environ 20 types de métabolites secondaires peuvent être produits par les espèces *Streptomyces* seules. Les streptomycètes sont des producteurs puissants de métabolites secondaires, car environ 45 à 55% des 10 000 antibiotiques archivés sont fabriqués par eux. Plusieurs antibiotiques ont également été isolés de différentes souches de *Bacillus(B. moenomycines, B. difficidins, B. bacilllines et B. bacilles*).*Mycobacterium* est un autre genre de bactéries avec une production 'intéressante d'antibiotiques (environ 80% des *Mycobacterium* isolés produisaient des composés antibiotiques et antifongiques). Certains des antibiotiques les plus importants

avec des activités biologiques produites par des microorganismes sont enregistrés dans le tableau2.

Tableau 2. *Microorganismes producteurs des antibiotiques.*

Antibiotique	**Organisme producteur**
Penicillin	*Penicillium chrysogenum*
Griseofulvin	*Penicillium griseofuivum*
Baccitracin	*Bacillus subtilis*
Polymyxin B	*Bacillus polymyxa*
Amphotericin B	*Streptomyces nodosus*
Erythromycin	*Streptomyces erythreus*
Neomycin	*Streptomyces fradiae*
Streptomycin	*Streptomyces griseus*
Tetracycline	*Streptomyces rimosus*
Vancomycin	*Streptomyces orientalis*
Gentamicin	*Micromonospora purpurea*
Rifamycin	*Strepomyces mediterranei*

8. Biosynthèse destoxines

Les toxines sont des molécules synthétisées par un organisme et capables de perturber le fonctionnement de certaines cellules. Les toxines sont également plus ou moins immunogènes: elles sont capables d'induire une réponseimmunitaire.

Les principales exotoxines sont la toxine diphtérique (*Corynebacteriumdiphteriae*), les entérotoxines staphylococciques (*Staphylococcus aureus*), la toxine tétanique (*Clostridium tetani*), les toxines botuliniques (*Clostridium botulinum)*. Elles sont utilisées comme source d'antigènes mais surtout comme source d'anatoxine (vaccins).

Les principales endotoxines sont l'entérotoxine cholérique (*Vibriocholerae*) et l'endotoxine typhoïdienne (*Salmonella*). Certains produits peuvent jouer un grand rôle dans la lutte biologique.

Diverses moisissures excrètent aussi des substances toxiques comme les alcaloïdes. Ces substances sont produites par *Claviceps purpurea* et sont dotées de propriétés pharmacologiques et ont un intérêt médical. Les aflatoxines sont produites par le champignon *Aspergillus flavus*.

Claisse N. Préparation et modification d'oligosaccharides de cellulose par chimie douce bio-inspirée.Université de Grenoble**. 2008.**

Colleoni C. L'a-1,4 glucanotransférase est impliquée dans la biosynthèse de l'amidon chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhartii*. Thèse de doctorat. Université des Sciences et Technologies de Lille, 1999.

Daum G, Wagner A, Czabany T, Athenstaedt K. Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. Biochimie 89: **2006** ; 243-248.

Ghisla S, Thorpe C. Acyl-CoA dehydrogenases: a mechanistic overview. Eur. J. Biochem. 271: **2004** ; 494-508.

Horecker BL, Smyrniotis PZ, Seegmiller JE. The enzymatic conversion of 6-phosphogluconate to ribulose-5-phosphate and ribose-5-phosphate. J. Biol. Chem.193 :1951 ; 383-396.

Kabran Gnankon AP . Metabolisme lipidique et cycle du glyoxylate chez la levure yarrowia lipolytica. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). **2010.**

KIRDI R. Développement de procèdes enzymatiques de couplage de la synthèse a l'extraction d'aromes naturels : élaboration de modèles de simulation et design de bioreacteurs.Thèse de doctorat. Institut National des sciences appliquées et de technologie. Université de Carthage. **2018.**

Lee W-H, Kim M-D, Jin Y-S, Seo J-H."Engineering of NADPH regenerators in Escherichia coli for enhanced biotransformation" Appl. Microbiol. Biotechnol. 97 :**2013** ; 2761-2772.

Borde I. **BioMédia :** Sciences Sorbonne université**.** "Entrée des oses dans la vie de la glycolyse". Sur rnbio.upmc.fr/Biochimie_metabolisme (consulté 08-04-2020).

Djidel S. "Production des métabolites". Université Ferhat Abbas de Sétif sur fsnv.univ-setif.dz/telecharger/EDT2017/Production_des_metabolites.pdf (consulté 08-04-2020).

Jaspard E. " Voie des pentoses phosphate Enseignement recherche biochimie enzymologie bioinformatique " sur biochimej.univ-angers.fr (consulté le11 mars 2018).

Rodriguez C. Métabolisme lipidique.Tutorat Santé Lyon Sudsur www.studocu.com/fr/document/universite-de-rouen/physiologie-de-la nutrition/jurisprudence/3-metabolisme-lipidique/5094055/view. (consulté 08-04-2020)