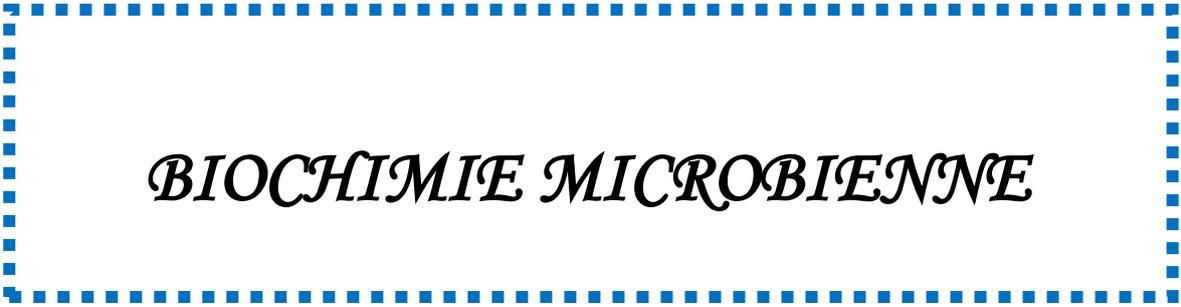


République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche
scientifique
Université Abdelhafid BOUSSOUF -MILA-
Faculté des sciences de la nature et de la vie
3ème année

Cours de



BIOCHIMIE MICROBIENNE

Cours disponible en ligne:
<http://elearning.centre-univ-mila.dz>

Biochimie microbienne

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. 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.

1. Métabolisme énergétique

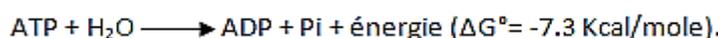
1.1. Sources d'énergie et types trophiques

Le type trophique définit la manière dont un organisme vivant construire sa propre matière organique et produit l'énergie dont il a besoin. Les types trophiques s'analysent en trois axes :

- La nature de source du carbone
- La nature de source d'électron
- **La nature de source d'énergie**

1.1.1. Source d'énergie

L'énergie nécessaire aux micro-organismes est fournie par la lumière (**organismes phototrophes**) ou par l'oxydation de substances chimiques (**organismes chimiotrophes**). Dans les deux cas, l'énergie libérée sous forme chimique est stockée dans la cellule sous forme d'un composé à haute énergie l'ATP (Adénosine tri-phosphate). L'ATP intervient dans tous les processus énergétique de la cellule. Les réactions de synthèse utilisent l'énergie libérée par la décomposition de l'ATP en ADP :



1.1.1.1 Organismes phototrophes

Les plantes tirent leur énergie de la lumière, celle-ci intervient également chez les algues vertes, les Cyanophycées et quelques espèces bactériennes. Le processus de photosynthèse comprend deux étapes : phase lumineuse et phase obscure. La phase lumineuse ou photophosphorylation aboutit à la formation d'ATP, c'est une réaction génératrice d'énergie utilisable par la cellule.

1.1.1.2. Organismes chimiotrophes

Les levures, les moisissures et la plupart des bactéries, sont incapables d'effectuer la photosynthèse. Ces microorganismes utilisent l'énergie libérée au cours de réactions chimiques d'oxydation, ce sont les « chimiotrophes ». Les réactions d'oxydation s'effectuent de plusieurs façons. Certains microorganismes (**chimiolithotrophes**) tirent leur énergie de **l'oxydation des substances minérales**, alors que d'autres la tirent de **substances organiques (chimioorganotrophes)**. Dans la plupart des cas la perte d'électrons est couplée à une perte de protons. Ces électrons et protons réduisent un accepteur final par l'intermédiaire d'une chaîne d'oxydoréduction. La formation d'ATP s'effectue en grande partie durant ce transport d'électrons et de protons.

1.1.2. Source d'électrons

Suivant la nature de source d'électron prélevée dans le milieu par la bactérie, on décrit deux types différents : **L'organotrophie**, la source d'électrons est organique, exemple : glucose, acide gras, ...et **la lithographie**, la source d'électrons est minérale, exemple : ammoniac, soufre,

1.1.3. Source de carbone

Suivant la nature organique de la source de carbone prélevée dans le milieu par la bactérie, on décrit deux types nutritionnels différents : **l'autotrophie au carbone**, la source de carbone de la bactérie est inorganique , le dioxyde de carbone (CO_2) et mono hydrogénocarbonates (HCO_3^-) du milieu et **l'hétérotrophie au carbone** , la source de carbone est organique, une molécule organique.

Ces trois axes fondamentaux, combinés, sont à la source de huit mécanismes sont utilisés par les microorganismes.

Tableau I : Huit types trophiques chez les microorganismes

Source d'énergie	Source d'électrons	Source de carbone	Type trophique
Lumière -Photo-	Composés organiques -Organo-	Organique (Ex glucose) -Hétérotrophe	Photo-organo-hétérotrophe
		Minérale (CO ₂) -Autotrophe	Photo- organo -autotrophe
	Composés minérales -Litho-	Organique : -Hétérotrophe	Photo-litho -hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Photo-litho-autotrophe
Composés Chimiques (organique ou Minérale) -Chimio-	Composés organiques -Organo-	Organique : -Hétérotrophe	Chimio-organo-hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Chimio-organo-autotrophe
	Composés (minérale) -Litho-	Organique : -Hétérotrophe	Chimio-litho-hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Chimio-litho-autotrophe

2. Classification par rapport à l'accepteur final d'électrons

2.1. Respiration aérobie

Traditionnellement, lorsque l'**accepteur final** d'électrons est l' Oxygène moléculaire, on parle de **respiration** et les **micro-organismes** de ce type sont dits **aérobies**. Il existe divers mécanismes de respiration aérobie, ils ne peuvent intervenir que dans des conditions d'aérobiose. Les microorganismes ne possédant qu'un système de ce type sont des« **aérobies strictes** ». Les micro-organismes réalisant la respiration possèdent une chaîne de **transport électronique** « **chaîne respiratoire** » ou « **chaîne des Phosphorylations oxydatives** »liée à une membrane cellulaire.

La **phosphorylation oxydative** est le processus permettant la synthèse d'ATP à partir de l'énergie libérée lors du transfert des électrons. L'hypothèse la plus largement acceptée pour produire l'ATP est la **théorie chimiosmotique** (ou couplage chimiosmotique), qui fut formulé par le biochimiste britannique **Peter Mitchell, 1961**. Selon cette hypothèse. **Chez les bactéries, la localisation des** transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire **est membranaire (membrane cytoplasmique)** et il existe de nombreuses variantes, en revanche sont localisés dans la **membrane interne des mitochondries chez les Eucaryotes. Voir figure 1.**

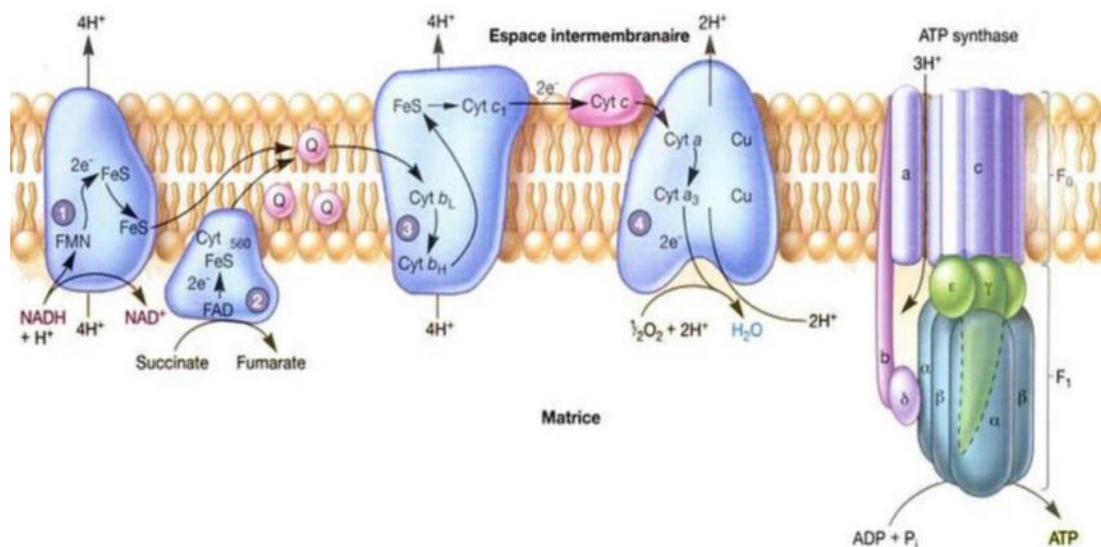


Figure 1 : Mécanisme de respiration aérobie

Dans ce schéma, les transporteurs sont organisés de façon asymétrique dans la membrane interne des eucaryotes ou dans la membrane plasmique des bactéries, de sorte que les protons sont transportés au travers, pendant que les électrons se déplacent le long de la chaîne.

La libération des protons dans l'espace inter-membranaire chez les eucaryotes ou le milieu extracellulaire chez les bactéries a lieu quand les électrons sont transférés d'un transporteur membranaire d'électron à l'autre. La coenzyme Q transporte des électrons depuis les complexes I et II vers le complexe III. Le cytochrome C déplace les électrons entre les complexes III et IV. Le complexe IV pompe les électrons à travers la membrane, lorsque ceux-ci passent du cytochrome à l'oxygène qui est finalement réduit par deux électrons pour former une molécule d'eau. La circulation des électrons le long de la chaîne respiratoire génère un gradient de concentration de

protons (**gradient électrochimique ou force proton motrice**). Le passage des protons à travers la membrane génère l'ATP. La synthèse d'ATP au niveau d'une enzyme située sur la face interne de la membrane cytoplasmique, Pour les bactéries, l'ATP synthétase.

Test d'oxydase :

- Sur un papier filtre, déposer un disque d'oxydase imprégné de « N-diméthylparaphénylène diamine » - humidifier le disque avec l'eau distillée à l'aide d'une anse de platine.- On prendre la bactérie à identifier (culture de 18 à 24 heures) et la déposer sur ce disque. - Apparition d'une coloration violette immédiatement, la souche est dite oxydase positive. -La présence de complexe IV (respiration aérobie) c'est à dire l'enzyme cytochrome oxydase à une grande impotence sur l'identification de bactéries aérobies strictes. Sous le nom test oxydase. - si le papier présente une touche violette Oxydase (+) présence d'enzyme. - si le papier ne présente pas cette couleur (reste incolore) Oxydase (-) absence d'enzyme.

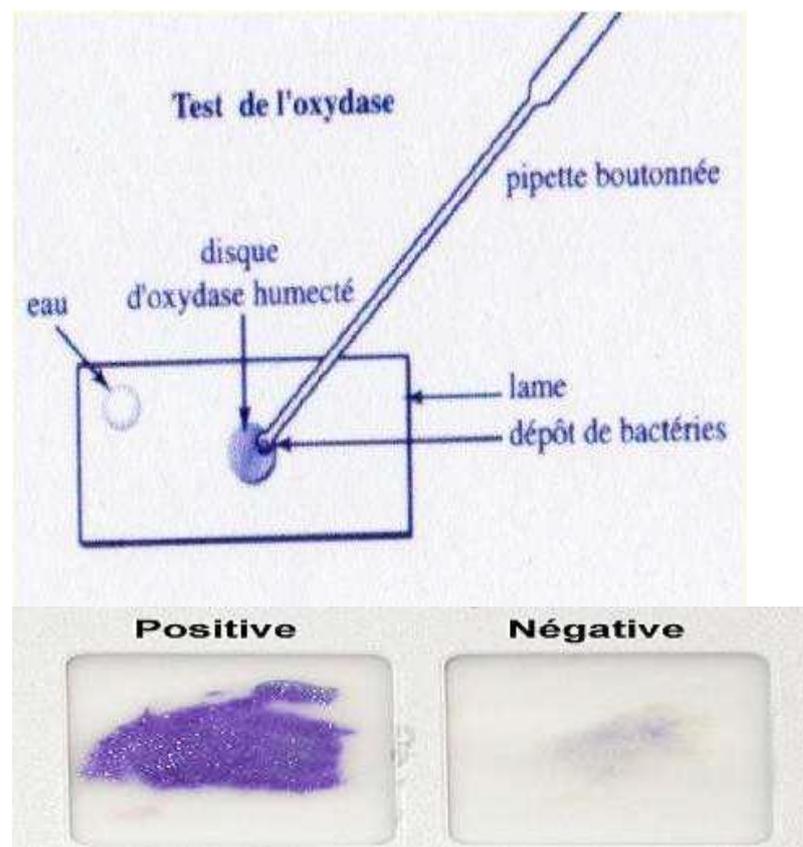


Figure 2 : Test d'oxydase

2.2. Respiration anaérobie

Il s'agit d'un processus où l'accepteur final 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 : sulfates, fumarate, CO₂...

Tableau II : Différents accepteurs d'électrons utilisés lors de la respiration anaérobies chez les bactéries

Accepteur d'électrons	Produit final réduit	Nom du processus	Exemples de microorganismes
NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻ , NH ₃ or N ₂	Respiration anaérobie (dénitrification)	<i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i>
SO ₄ ²⁻	S or H ₂ S	Respiration anaérobie (réduction des sulfates)	<i>Desulfovibrio</i>
fumarate	Succinate	Respiration anaérobie utilisant un accepteur d'e ⁻ organique	<i>Escherichia coli</i>
CO ₂	CH ₄	Méthanogenèse	<i>Methanococcus</i>

Tableau 3. Différents accepteurs d'électrons utilisés lors de la respiration anaérobie chez les bactéries

Exemple n° 1

Respiration de nitrates :

Les microorganismes qui utilisent le nitrate comme accepteur d'électrons réduisent le nitrate en nitrites par l'action de nitrate réductase selon l'équation suivante :



Test de nitrate réductase

A une culture en bouillon nitraté de 24 à 48 h d'incubation à 37 °C , on ajoute quelques gouttes de réactifs de griess . Après agitation. La lecture est immédiate.

A- coloration rouge orangé, ex : E-coli : nitrates réduites en nitrites (nitrate réductase positives NR⁺).

B -milieu restant incolore, ajoute un peu de poudre de zinc (réducteur des nitrates) et on agite bien.

C- Si le milieu devient rouge, il reste des nitrates, donc ces derniers n'ont pas été réduits par la bactérie (nitrate réductase négative NR⁻).

D- si le milieu reste incolore, il ne reste plus de nitrates, les bactéries les ont réduits au-delà du stade nitrites en azote (nitrate réductase positive NR⁺) → les nitrates chez

certain microorganismes (*Pseudomonas*) peuvent aller jusqu'à le stade azote (N₂) (nitrates réductase très active) . Ce procédé appelé dénitrification est utilisé par *Pseudomonas* et quelques espèce de *Bacillus* (bactéries dénitrifiantes) .

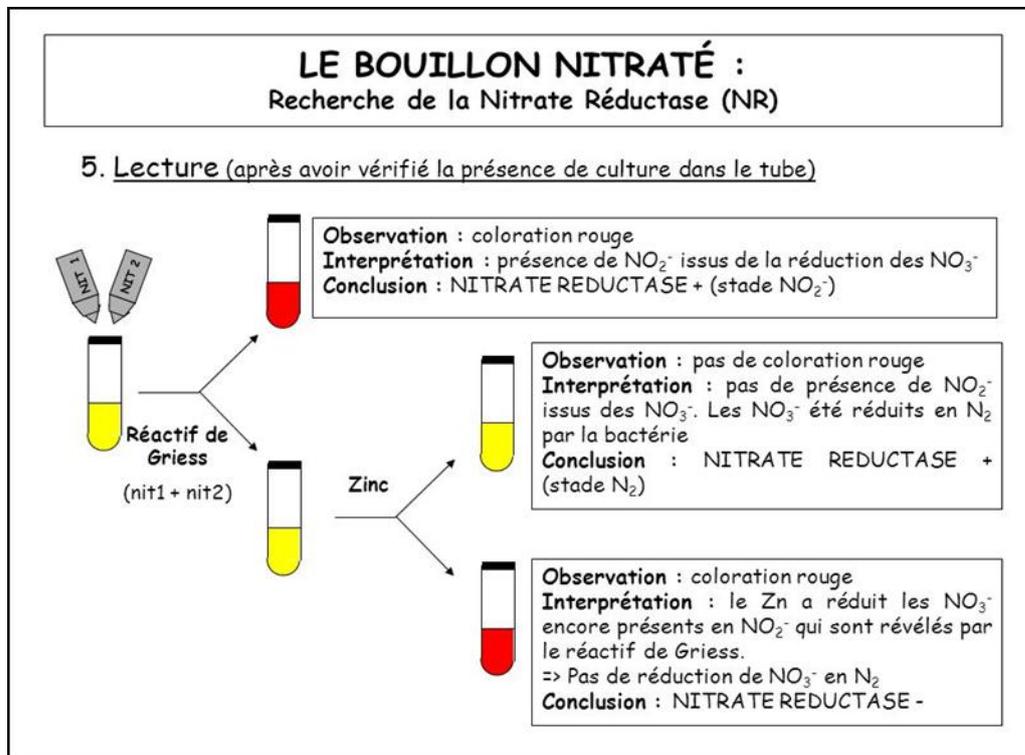


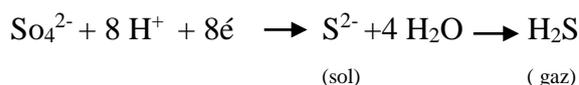
Figure 3 : Test de nitrate réductase

Exemple n°2

Réduction du sulfate (SO₄²⁻) en sulfure (ion sulfure) S²⁻ :

Réduction du sulfate (SO₄²⁻) en sulfure(ion sulfure) S²⁻ chez les Désulfovibrio puis en hydrogène sulfuré (H₂S) (sulfure d'hydrogène).**Désulfovibrio desulfuricans** : ce sont des bactéries anaérobies à une métabolisme généralement respiratoire utilisant le sulfate pour remplacer l'oxygène dans la respiration cellulaire donc ces bactéries utilisent le sulfate ou autre composé soufrés comme accepteurs finaux d'électron.

La réduction du SO₄²⁻ en S²⁻ puis en H₂S se fait selon la réaction :



Ces bactéries réductrices de soufre ont une grande importance dans le recyclage de soufre dans les écosystèmes.

2.3. Fermentation

Dans le cas d'une fermentation l'**accepteur final d'électron (et de protons) est une molécule organique.**

De nombreuses fermentations peuvent s'effectuer **en anaérobiose** car tous les électrons et protons issus de l'oxydation du substrat servent à réduire l'accepteur organique (exemple cas de la fermentation homolactique).

La fermentation est utilisée par : les **bactéries aéro-anaérobies facultatives**, qui utilisent préférentiellement la **respiration** quand elle est possible et les bactéries **anaérobies strictes** (ex : *Clostridium*).

Le rendement énergétique des fermentations est inférieur à ceux des respirations

Respiration aérobie > respirations anaérobies > fermentations.

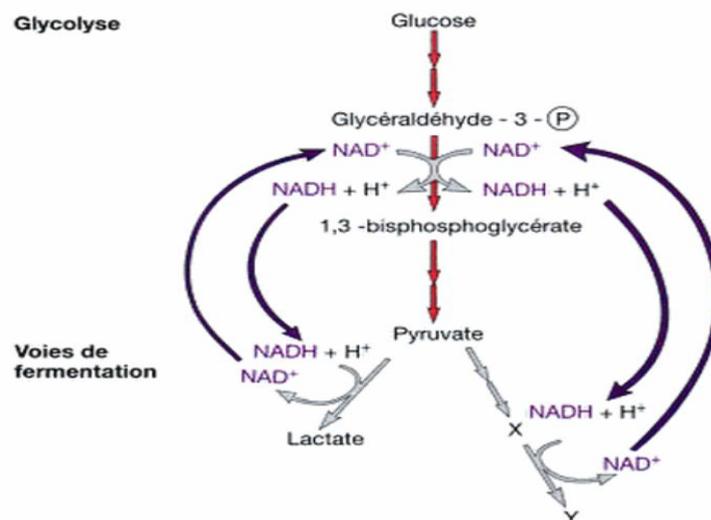


Figure 4 : L'oxydation du NADH durant la fermentation. Le NADH provenant de la glycolyse est oxydé, lorsqu'il est utilisé pour réduire le pyruvate ou on dérivé du pyruvate(X). Le produit résultant est le lactate, soit un produit Y réduit

3. Classification en fonction de leurs rapports avec l'oxygène (test de type respiratoire)

Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

- **aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'Aire. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électron, est réduit en eau (*Pseudomonas, Acinetobacter, Neisseria*).

- **microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter*, *Mycobacteriaceae*).

- **aéro-anaérobies facultatives** se développent avec ou sans air : les entérobactéries (*Escherichia*, *Salmonella*), **les streptocoques, les staphylocoques**. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.

- **anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. C'est le cas des bactéries intestinales (*Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Clostridium*) et de nombreuses bactéries présentes dans les flores normales de l'organisme. Certaines bactéries à respiration anaérobie (et les bactéries anaérobies strictes) le dioxygène est inutile et même souvent toxique. En effet le dioxygène peut par réaction chimique produire des ions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), des radicaux hydroxyles (HO \cdot) et du **peroxyde d'hydrogène (H_2O_2)** qui peuvent oxyder des lipides et protéines de la cellule bactérienne. Ces bactéries n'ont pas d'enzymes de protection telles que la super oxyde dismutase, **la catalase** ou la peroxydase.

Test de catalase

Déposer une goutte d'eau oxygénée au centre de la lame, prenez l'anse de platine, avec le fil de boucle, vous flamber bien jusqu'à que cette boucle et le fil de boucle deviennent rouge, vous patientez (quelques secondes), puis retirez le en laissant refroidir dans le champ stérile. Vous prenez votre boîte de Pétri où il y a la souche à identifier et grattez quelques colonies avec anse de platine. Vous déposez ensuite les bactéries prélevés dans la goutte de H_2O_2 et observer si il y a formation des bulles ou (effervescence). Si des bulles se forment, la bactérie synthétise l'enzyme catalase (catalase positive) si non la bactérie ne la synthétise pas (catalase négative). Sans oublier de flambez pour le 2^{ème} fois l'anse de platine puisque il reste un liquide (il faut stériliser et bruler la bactérie qui reste). Une fois l'expérience est terminée, vous jetez la lame dans la poubelle de décontamination (un récipient rempli d'eau du javel).



Remarque : l'utilisation de l'anse est possible à condition qu'elle ne possède pas d'action catalasique, ce que l'on vérifiera facilement par un test sans bactérie.

4. Lecture

Bulles d'oxygène	Pas de bulle
La bactérie possède la catalase, elle est dite :	La bactérie ne possède pas la catalase, elle est dite :
Catalase + 	Catalase - 

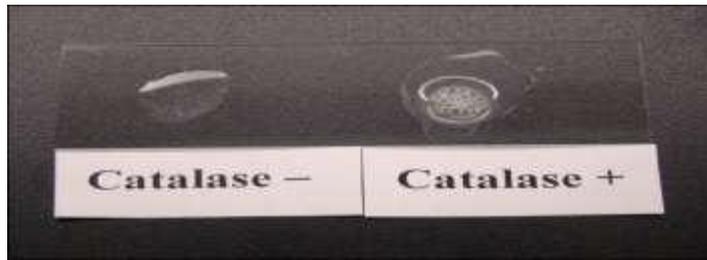


Figure 5 : Test de catalase.