

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

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.

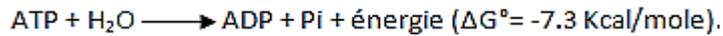
Les produits libérés par le métabolisme au cours d'une phase de croissance sont appelés « métabolites primaires », quelle que soit leur origine, catabolisme ou anabolisme : il s'agit de produits non spécifiques (acides aminés, nucléotides, vitamines, acides organiques, éthanol), le terme « métabolite 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 hypocholestérolémiants, agents antitumoraux, bioinsecticides).

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.

Métabolisme énergétique

1-Sources d'énergie et types trophiques

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 est stockée sous forme d'énergie de liaison chimique biologiquement utilisable (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. Les réactions de synthèse utilisent l'énergie libérée par la décomposition de l'ATP en ADP :



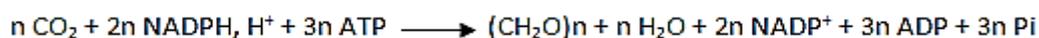
1-1- Organismes phototrophes

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. Cette phase nécessite la présence de pigments de type chlorophylle, la nature des pigments varie selon la nature de l'organisme phototrophe.

Il existe deux types de photophosphorylation : photophosphorylation cyclique ne produit que l'ATP et la photophosphorylation non cyclique qui produit à la fois de l'ATP et du « pouvoir réducteur » et nécessite la présence d'un donneur d'électrons (et de protons). Chez les plantes, algues et cyanophycées, la substance donatrice de protons (et d'électrons) intervenant dans la phase de synthèse est H₂O, il y a donc libération de O₂. Chez les bactéries il n'y a jamais libération d'O₂ (H₂O ne peut être donneur). Le donneur d'électrons et de protons peut être un composé minéral comme H₂S chez les *Thiorhodaceae* et les *Chlorobacteriaceae* (photolithotrophes ou photo autotrophes), ou un composé organique comme l'acide succinique chez les *Athiorhodaceae* (photoorganotrophes ou photohétérotrophes). La plupart des bactéries photosynthétiques peuvent aussi utiliser l'hydrogène moléculaire. L'accepteur d'électrons et de protons est le NADP⁺ (il se transforme après réduction en NADPH, H⁺).

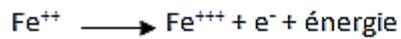
La phase obscure correspond à une phase de synthèse de composés organiques, elle aboutit à la formation de réserves de nature glucidique en utilisant du CO₂ ainsi que le pouvoir réducteur et l'ATP formés au cours de la phase lumineuse. Cette synthèse s'effectue par une suite de réactions ou cycle de Calvin dont le bilan se résume par la formule :



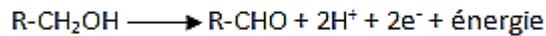
1-2- Organismes chimiotrophes

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 :

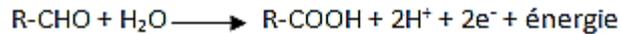
- Perte d'électrons :



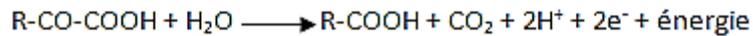
- Déshydrogénation :



- Hydratation-déshydrogénation :



- déshydrogénation couplée à une décarboxylation



Certains microorganismes (chimioolithotrophes) tirent leur énergie de l'oxydation de 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), elle est donc différée par rapport à la réaction d'oxydation.

Il existe des mécanismes de formation d'ATP ne passant pas par une chaîne d'oxydoréduction, il y a phosphorylation d'un substrat organique par le phosphore inorganique avec oxydation par déshydrogénation et génération d'une liaison riche en énergie, la déphosphorylation entraîne ensuite la formation d'une molécule d'ATP.

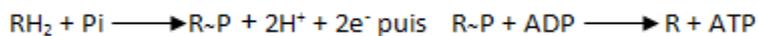


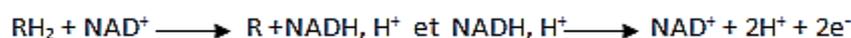
Tableau des différents types trophiques chez les microorganismes :

	Source d'électrons	Source de carbone	Type trophique
Lumière -Photo-	Composés organiques -Organo-	Organique : -Hétérotrophe	Photo-organo-hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Photo-organo-autotrophe
	Composé inorganiques (minérale) -Litho-	Organique : -Hétérotrophe	Photo-litho-hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Photo-litho-autotrophe
Composés Chimiques (organique ou non organiques) -Chimio-	Composés organiques -Organo-	Organique : -Hétérotrophe	Chimio-organo-hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Chimio-organo-autotrophe
	Composé inorganiques (minérale) -Litho-	Organique : -Hétérotrophe	Chimio-litho-hétérotrophe
		Minérale : -Autotrophe	Chimio-litho-autotrophe

2- Types respiratoires : destinée des électrons

2-1- Chaines de transport d'électrons

Le système de transport des électrons est plus ou moins complexe selon la nature du substrat oxydé, et varie d'un organisme à l'autre. Il fait intervenir des enzymes (déshydrogénases, cytochromes réductases,...) et des coenzymes (FAD, NAD, NADP, cytochromes,...) qui constituent des intermédiaires à la fois accepteurs et donneurs d'électrons (et parfois de protons). Il s'agit d'une suite de réactions couplées d'oxydoréductions. L'énergie libérée par les réactions d'oxydoréductions successives est utilisée pour le transfert membranaire des protons (théorie de Mitchell), ce qui crée un gradient électrochimique dont le rééquilibrage permet la genèse de l'ATP. Il y a souvent découplage entre le transport des protons et celui des électrons, exemple :



Les H⁺ vont directement à l'accepteur tandis que les électrons sont transportés par une chaîne spécifique.

Le type classique de transport est celui de la « chaîne respiratoire » ou « chaîne des phosphorylations oxydatives » des eucaryotes, cette chaîne est localisée pour sa plus grande partie dans les mitochondries. Sa présence et sa structure peuvent être mises en évidence par l'action de différents inhibiteurs : cyanure, azide, antimycine A, roténone,...

Chez les bactéries, la localisation est membranaire (membrane cytoplasmique) et il existe de nombreuses variantes (voir figures).

En principe, le rendement énergétique des chaînes longues est supérieur à celui des chaînes courtes. Le rendement énergétique maximal par couple d'électrons et de protons est de 3ATP (non compris les ATP éventuellement formés par le mécanisme de phosphorylation du substrat), il est souvent inférieur. Chez les bactéries, la présence d'ATPases gêne l'étude des rendements énergétiques.

2-2 Accepteurs finaux d'électrons

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.

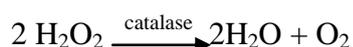
Il existe plusieurs définitions des termes respiration et fermentation. Au sens strictement biochimique, le terme respiration, ou métabolisme oxydatif, est appliqué aux processus d'oxydation dans lesquels l'accepteur final est une molécule minérale, alors que le terme fermentation, ou métabolisme fermentaire,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

2-2-1- 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 le cytochrome oxydase. **L'oxydase ou cytochrome oxydase** : est une enzyme présente dans certaines chaînes respiratoires bactériennes, c'est une enzyme qui catalyse une réaction d'oxydo-réduction en impliquant une molécule d'oxygène comme accepteur d'électrons. Dans ces réactions, l'oxygène est réduit en eau H_2O ou en eau oxygénée H_2O_2 .

Remarque : certaines oxydations entraînent la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (sous produit des processus métaboliques). Le peroxyde d'hydrogène est toxique pour la cellule sauf si elle la possède l'enzyme catalase, capable de décomposer le H_2O_2 en H_2O et O_2 . Lorsqu'un microorganisme possède ce système et pas de catalase, le contacte avec l'oxygène de l'air est toxique et il est donc anaérobie stricts. Selon la réaction :

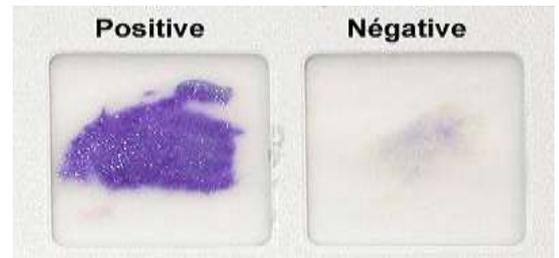
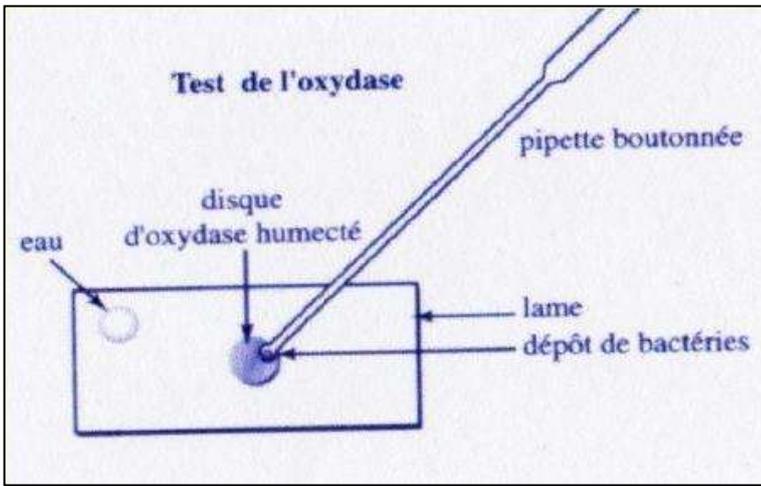


Test d'oxydase :

- Sur un papier filtre, déposer un disque d'oxydase imprégné de « N- diméthylparaphénylène **daimine** »
- humidifier le disque avec l'eau distillée à l'aide d'une anse de platine.
- On prend 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 à d l'enzyme cytochrome oxydase a une grande importance sur l'identification des bactéries aérobies stricts. 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.



Test de catalase

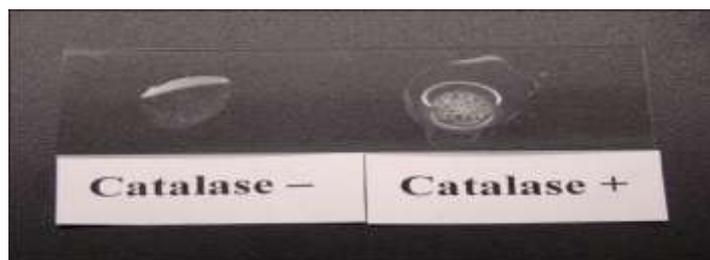
Déposer une goutte d'eau oxygénée au centre de la lame, prenez l'anse de platine, avec le fil de boucle, vous flamber bien jusqu'à que cette boucle et le fil de boucle deviennent rouge, vous patientez (quelques secondes), puis retirez le en laissant refroidir dans le champ stérile. Vous prenez votre boîte de Pétri où il y a la souche à identifier et grattez quelques colonies avec le fil à boucle. Vous déposez ensuite les bactéries prélevées dans la goutte de H_2O_2 et observez 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 2ème fois l'anse de platine puisque il reste un liquide (il faut stériliser et brûler la bactérie qui reste). Une fois l'expérience 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.

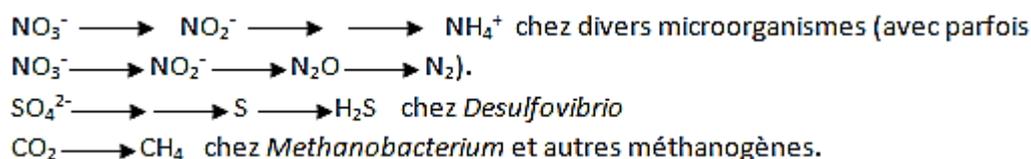
4. Lecture

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 -

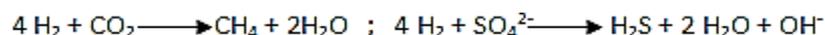


2-2-2- Respiration anaérobie

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, CO₂...



L'oxydation anaérobie de l'hydrogène (H₂) chez les chimiotrophes fait intervenir le même type de réaction :



De nombreux microbes vivant dans les environnements dépourvus d'oxygène (pauvre d'oxygène). Pour utiliser les mécanismes du transfert des électrons pour la synthèse d'ATP, d'autres accepteurs finaux des électrons sont utilisés à la place d'oxygène, par exemple : le nitrate (NO₃⁻), le sulfate (SO₄²⁻), CO₂, soufre, ...ect.

2-2-2-1- 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⁺).

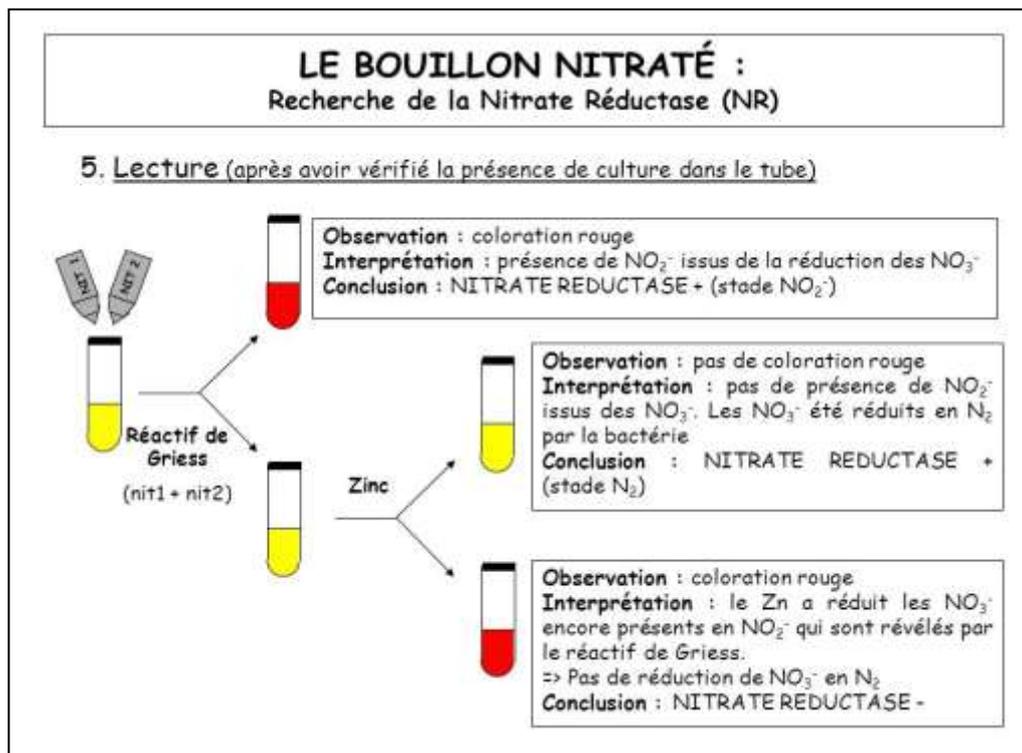
B- milieu restant incolore, ajoute un peu de poudre de zinc (réducteur des nitrates). Agitation.

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 certains

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)

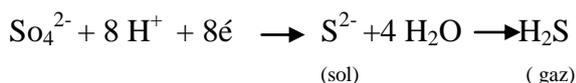
Recherche de nitrate réductase (Voire travaux pratique de Biochimie Microbienne page 12 et 13)



2-2-2-2- 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.

2-2-3- La fermentation

Une substance organique, généralement endogène et issue de la dégradation du substrat, sert d'accepteur d'électrons (et de protons) : ce substrat est souvent l'acide pyruvique ou un produit dérivé (acétaldéhyde, acétolactate...).

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 (cas de la fermentation homolactique).

Pour d'autres fermentations, une partie seulement des électrons et protons est ainsi utilisée : l'oxygène intervient comme accepteur complémentaire, de manière facultative (certaines fermentations hétérolactiques bactériennes) ou obligatoire (fermentation des pentoses par certaines levures).

2-2-4- Fermentation oxydative

Les fermentations oxydatives donnent des produits plus oxydés que le substrat et nécessitent habituellement la présence d'oxygène comme accepteur d'électrons et de protons (fermentation gluconique, fermentation acétique...). Il s'agit de respirations « incomplètes ».

Catabolisme des glucides

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- Dégradation de l'amidon

L'amidon constitue la principale réserve glucidique végétale, il renferme deux polysaccharides en proportions variables selon les cas : l'amylose (constituant majeur) et l'amylopectine (constituant mineur).

L'amylose est une molécule flexible, de structure linéaire correspondant à plusieurs centaines de résidus α -D-glucopyranose unis par des liaisons 1-4.

L'amylopectine est aussi un polymère du glucose, composé de chaînes linéaires similaires à celle de l'amylose, mais reliées les unes aux autres par des liaisons α (1-6). Les points de branchement sont distants d'environ 20 à 30 unités de glucose.

Les amylases microbiennes peuvent être classées essentiellement en deux grands groupes en fonction de leur mode d'attaque :

- **α -amylase ou α (1-4)-glucane glucanohydrolase (EC 3.2.1.1)**, dont l'action est toujours de type endomoléculaire et conduit à la formation de D-glucose, de maltose et d'une petite quantité de maltodextrines. Les α -amylases se rencontrent chez de nombreuses bactéries (des genres *Bacillus* et *Clostridium*), de nombreuses moisissures (des genres *Aspergillus* et *Rhizopus*), ainsi que chez quelques levures (des genres *Candida*, *Pichia*, *Endomycopsis*, *lipomyces* et *Schwanniomyces*).

- **Glucoamylase ou α (1-4)-glucane glucohydrolase (EC 3.2.1.3)**, elle libère des unités de glucose à partir des extrémités non réductrices des polymères. Elle hydrolyse l'amylopectine et l'amylose complètement en D-glucose et est également capable d'hydrolyser les liaisons α (1-6) ainsi que les liaisons α (1-4) et α (1-3). Elle

hydrolyse aussi le maltose. L'amyloglucosidase (glucoamylase ou γ -amylase) est rencontrée chez les moisissures (*Aspergillus*, *Rhizopus*), les levures (*Endomyces*, *Endomycopsis*, *Candida*, *Saccharomyces diastaticus*...) et chez les bactéries.

Il existe des β -amylases (*Bacillus subtilis*, quelques moisissures), dont l'action est exomoléculaire. Elle est répandue chez les végétaux et rare chez les microorganismes.

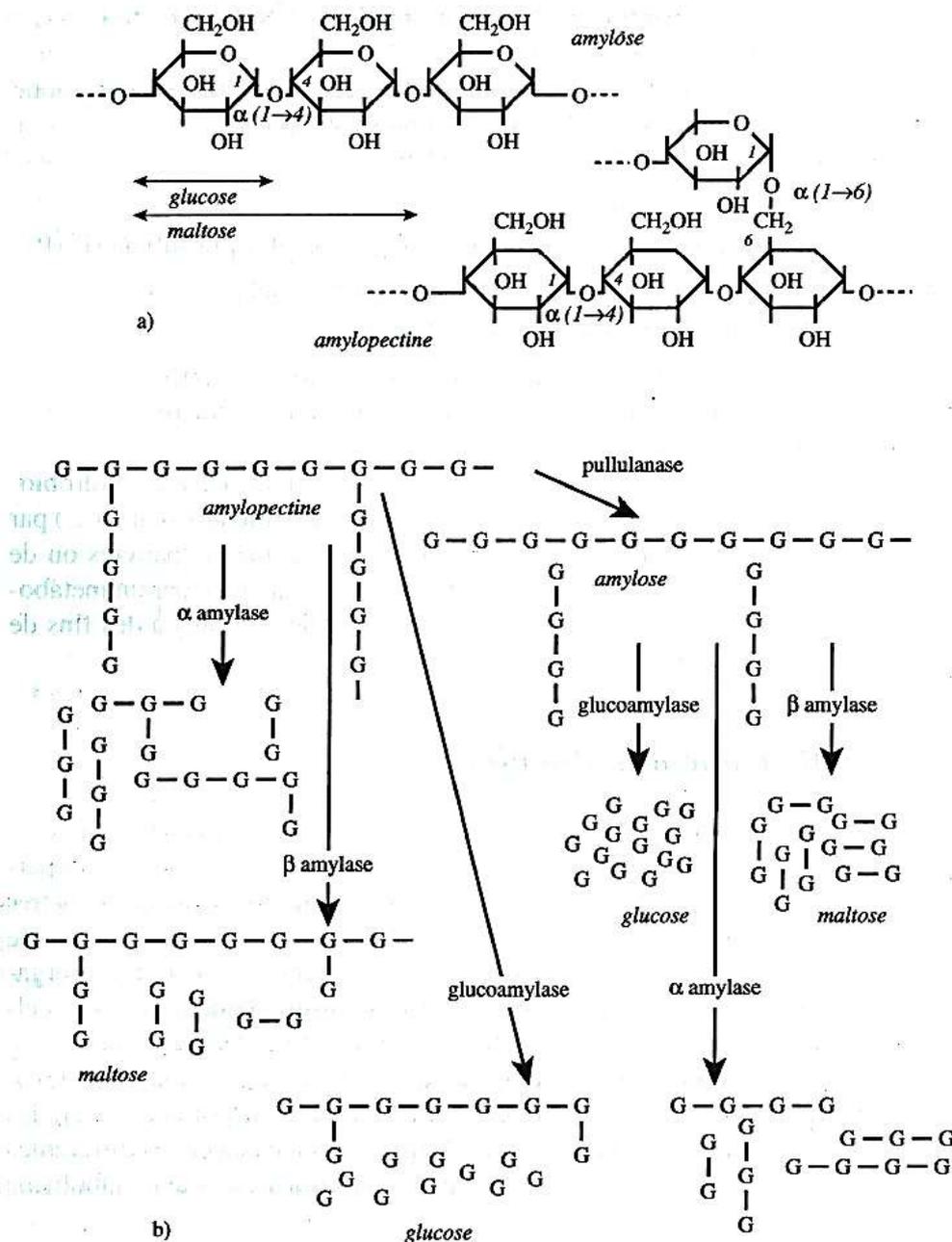


Figure 2 ■ Activités amylolytiques

a) Structure des deux composants de l'amidon : amylose et amylopectine
 b) Mode d'attaque des amylases sur l'amylose et l'amylopectine

Recherche d'amylase (Voire travaux pratiques de la Biochimie Microbienne page 17)

2- Dégradation de la cellulose

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

Des microorganismes cellulolytiques sont rencontrés dans une grande variété de genres bactériens (*Acetivibrio*, *Bacillus*, *Cellovibrio*, *Cellulomonas*, *Clostridium*, *Cytophaga*, *Erwinia*, *Streptomyces*...) et de moisissures (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Fusarium*...), qui jouent un rôle de premier plan dans le cycle du carbone. Chez les levures ces enzymes sont rares.

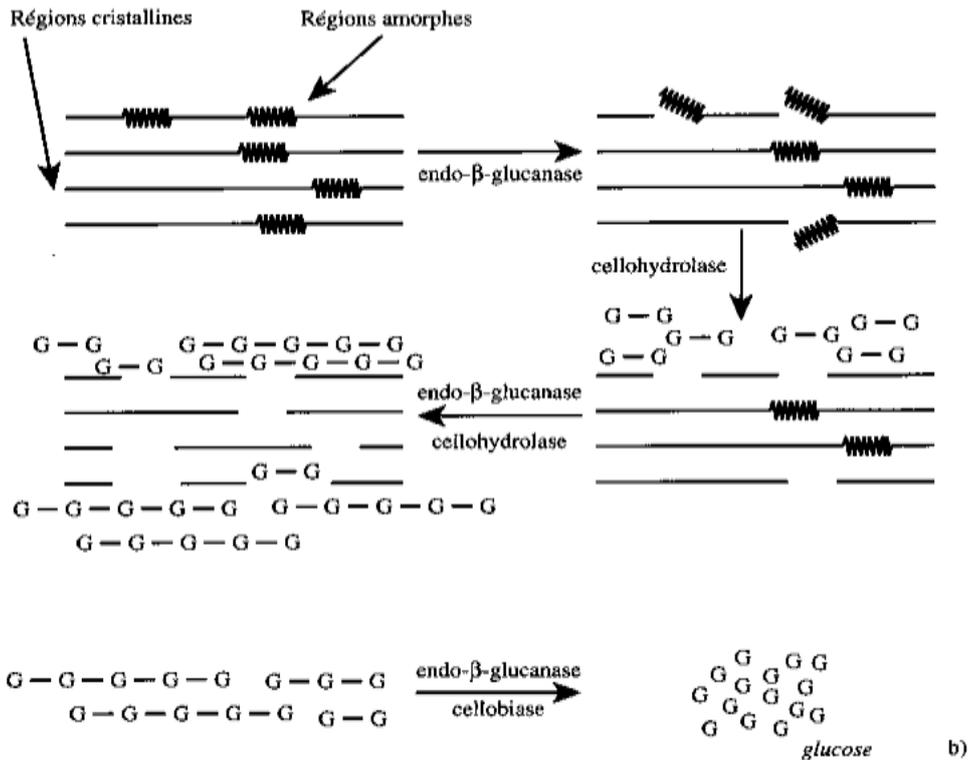
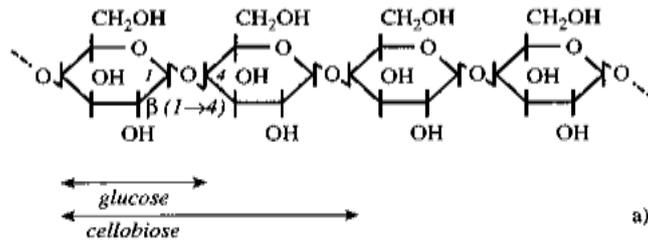


Figure 3 | ■ Activités cellulolytiques
a) Structure de la cellulose
b) Représentation schématique des étapes séquentielles de la cellulolyse

3- Catabolisme du glucose

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.

3-1- La glycolyse ou voie d'Embden-Meyerhof (EM) ou d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)

Cette voie dite de l'hexose diphosphate, est très largement répandue parmi les microorganismes : levures, moisissures, bactéries aéro-anaérobies (Entérobactéries...). Pour certains, le glucose est dégradé exclusivement, ou presque, par cette voie (*Streptomyces griseus* 97%, *Trypanosoma* 100%).

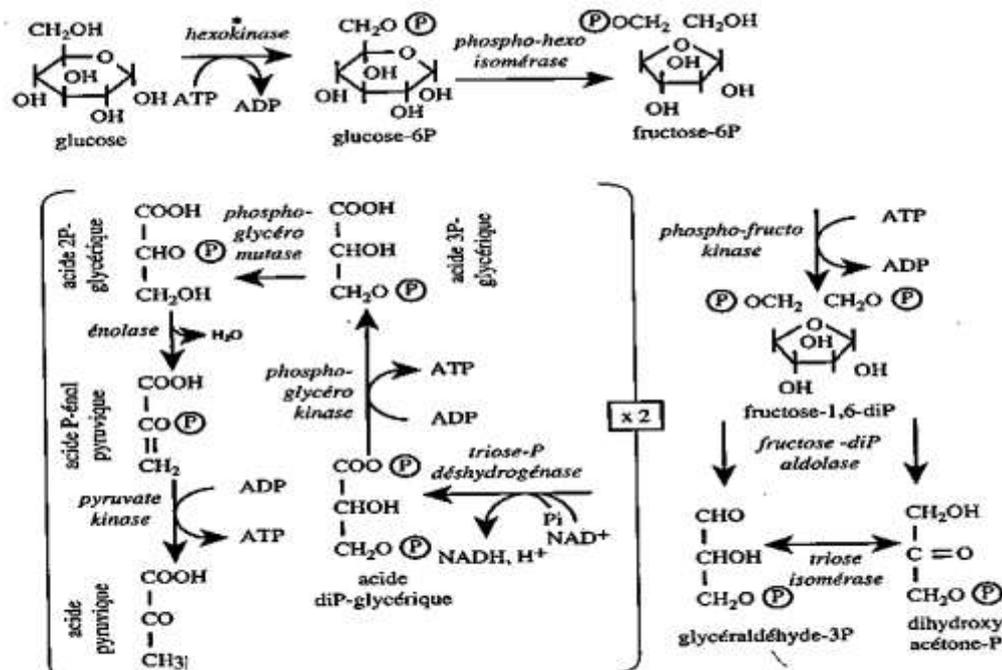


Figure 4 ■ Voie de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas)

* La phosphorylation du glucose peut aussi se faire dans le cadre de la translocation de groupe par couplage avec la réaction : phosphoénol pyruvate → pyruvate

Les points importants de la chaîne de la glycolyse sont :

- Activation du glucose sous forme de glucose-6P au moyen d'ATP, isomérisation et seconde phosphorylation pour donner du fructose-1,6-diphosphate et deux ADP.
- Clivage du fructose-1,6 diP en deux molécules de triose-phosphate, sous l'action de l'aldolase (enzyme caractéristique de cette voie métabolique).
- Isomérisation 3-phosphoglycéraldéhyde/dihydroxyacétone-phosphate et déshydrogénation avec réduction de NAD+. Cette réaction s'accompagne d'une phosphorylation au niveau du substrat et conduit à la formation de 1,3diphosphoglycérate (possède une liaison riche en énergie).
- Transfert d'une liaison ester phosphorique du 1,3diphosphoglycérate à l'ADP.
- Transfert de la liaison ester phosphorique du phosphoénolpyruvate à l'ADP et formation de pyruvate et ATP.

Le bilan est : $\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{P}_i \longrightarrow 2 \text{pyruvate} + 2\text{NADH, H}^+ + 2\text{ATP}$