

**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.

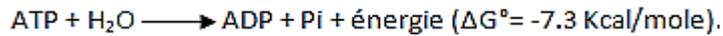
Les produits libérés par le métabolisme au cours d'une phase de croissance sont appelés « métabolites primaires », quelle que soit leur origine, catabolisme ou anabolisme : il s'agit de produits non spécifiques (acides aminés, nucléotides, vitamines, acides organiques, éthanol), le terme « métabolite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



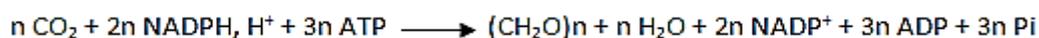
### 1-1- Organismes phototrophes

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 H<sub>2</sub>O, il y a donc libération de O<sub>2</sub>. Chez les bactéries il n'y a jamais libération d'O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O ne peut être donneur). Le donneur d'électrons et de protons peut être un composé minéral comme H<sub>2</sub>S 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<sup>+</sup> (il se transforme après réduction en NADPH, H<sup>+</sup>).

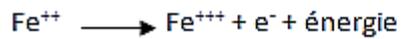
**La phase obscure** correspond à une phase de synthèse de composés organiques, elle aboutit à la formation de réserves de nature glucidique en utilisant du CO<sub>2</sub> ainsi que le pouvoir réducteur et l'ATP formés au cours de la phase lumineuse. Cette synthèse s'effectue par une suite de réactions ou cycle de Calvin dont le bilan se résume par la formule :



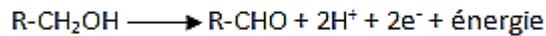
### 1-2- Organismes chimiotrophes

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 :

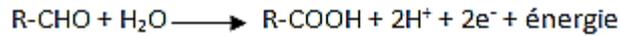
- Perte d'électrons :



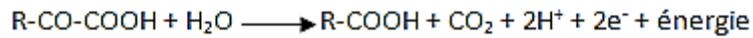
- Déshydrogénation :



- Hydratation-déshydrogénation :

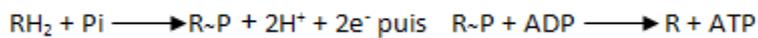


- déshydrogénation couplée à une décarboxylation



Certains microorganismes (chimolithotrophes) 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.



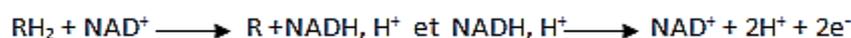
**Tableau des différents types trophiques chez les microorganismes :**

	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<sup>+</sup> 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 :

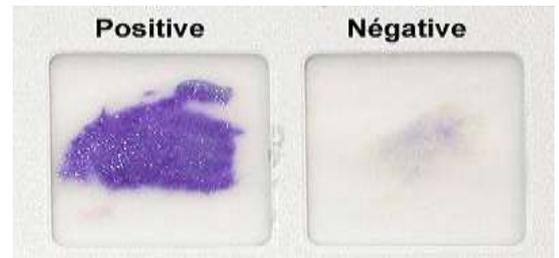
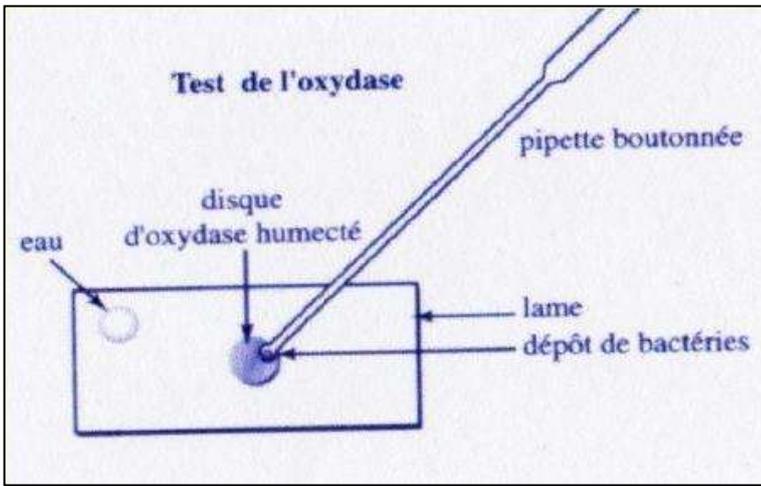


#### Test d'oxydase :

- 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

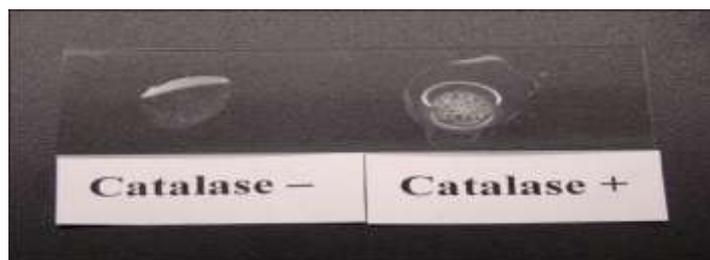
Déposer une goutte d'eau oxygénée au centre de la lame, prenez l'anse de platine, avec le fil de boucle, vous flamber bien jusqu'à que cette boucle et le fil de boucle deviennent rouge, vous patientez (quelques secondes), puis retirez le en laissant refroidir dans le champ stérile. Vous prenez votre 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.

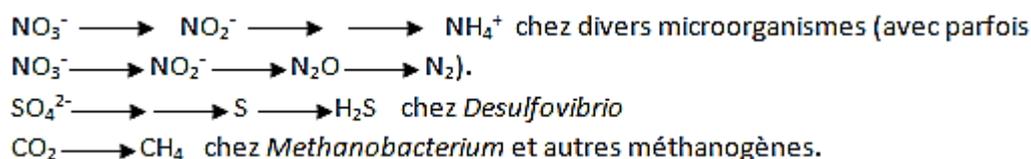
**4. Lecture**

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

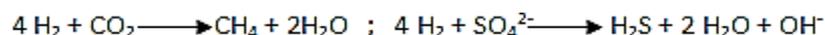


### 2-2-2- Respiration anaérobie

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, CO<sub>2</sub>...



L'oxydation anaérobie de l'hydrogène (H<sub>2</sub>) 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 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), le sulfate (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), CO<sub>2</sub>, 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<sup>+</sup> ).

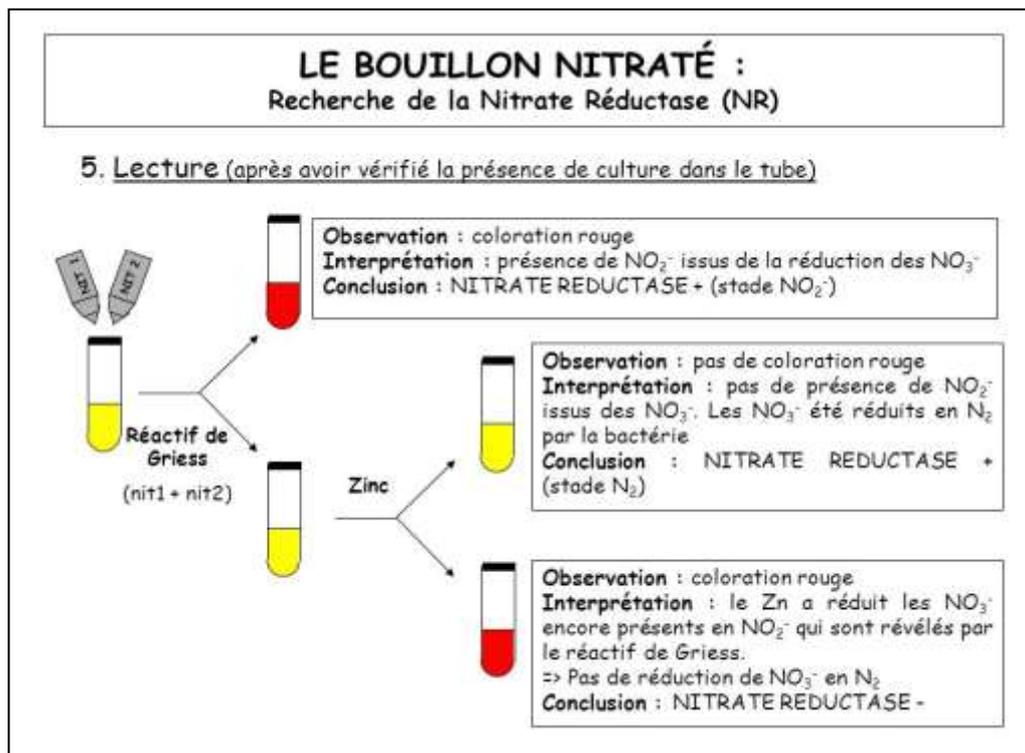
**B-** milieu restant incolore, ajoute un peu de poudre de zinc ( réducteur des nitrates). Agitation.

**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<sup>-</sup>).

**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<sup>+</sup>) → les nitrates chez certains

microorganismes ( *pseudomonas*) peuvent aller jusqu'à le stade azote (N<sub>2</sub>) ( nitrates réductase très active) . ce procédé appelé dénitrification est utilisé par *Pseudomonas* et quelques espèce de *Bacillus* (bactéries dénitrifiantes)

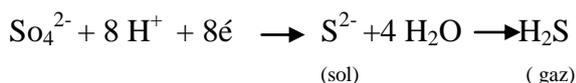
**Recherche de nitrate réductase (Voire travaux pratique de Biochimie Microbienne page 12 et 13)**



### 2-2-2-2- Réduction du sulfate (So<sub>4</sub><sup>2-</sup>) en sulfure(ion sulfure) s<sup>2-</sup> :

Réduction du sulfate (So<sub>4</sub><sup>2-</sup>) en sulfure(ion sulfure) s<sup>2-</sup> chez les Désulfovibrio puis en hydrogène sulfuré (H<sub>2</sub>S) (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 So<sub>4</sub><sup>2-</sup> en s<sup>2-</sup> puis en H<sub>2</sub>S 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  $\alpha$ -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  $\alpha$  (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 :

- **$\alpha$ -amylase ou  $\alpha$ (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  $\alpha$ -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  $\alpha$  (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  $\alpha$  (1-6) ainsi que les liaisons  $\alpha$ (1-4) et  $\alpha$ (1-3). Elle

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

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

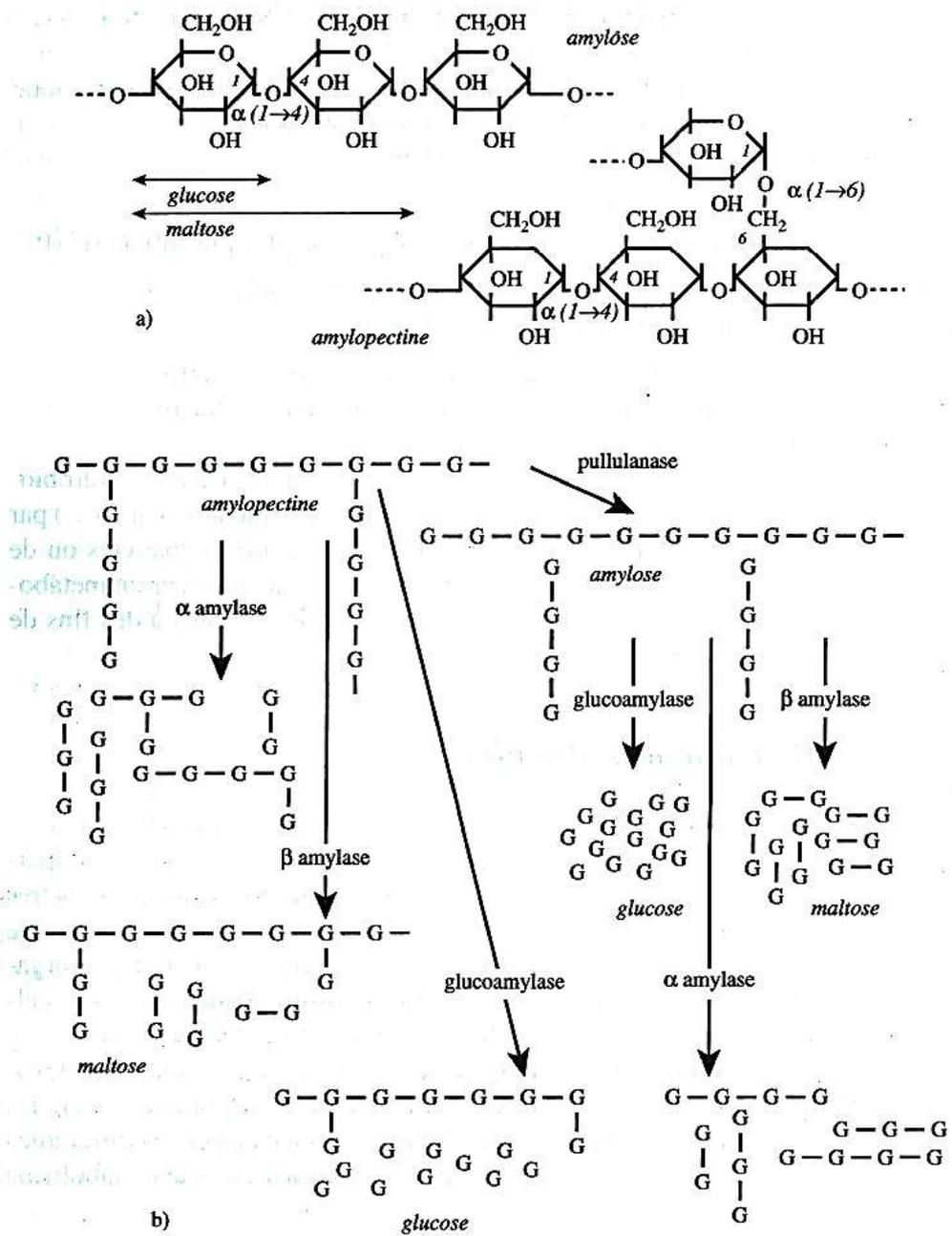


Figure 2 ■ Activités amylolytiques

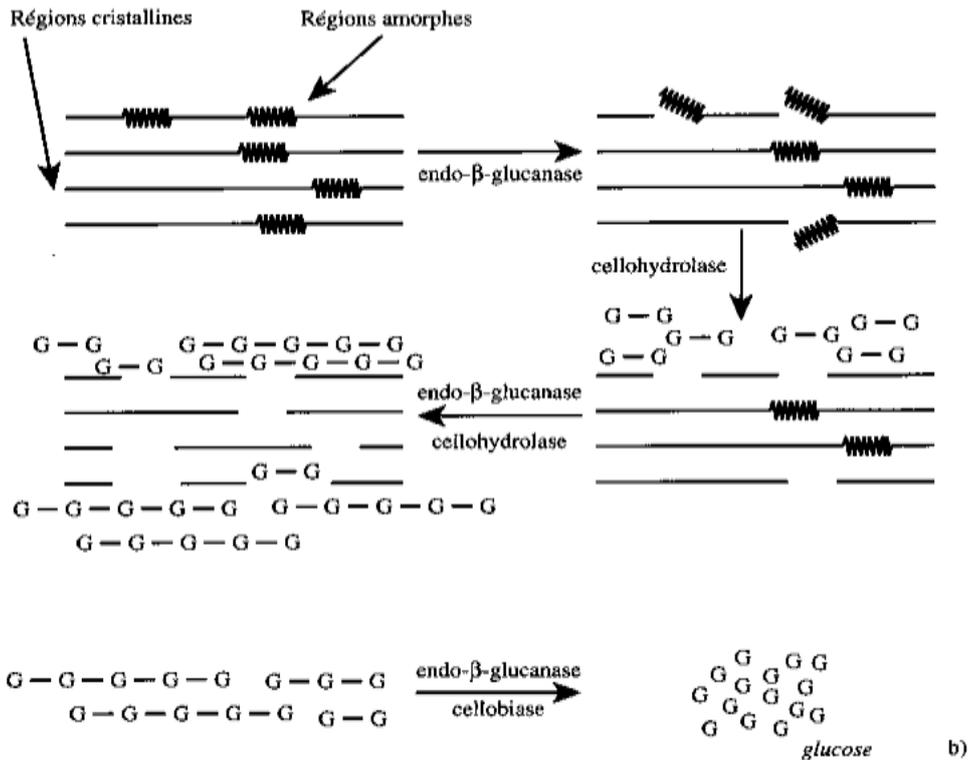
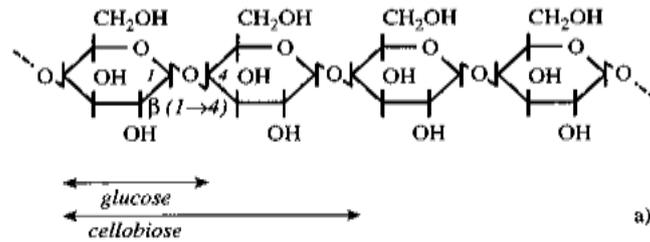
a) Structure des deux composants de l'amidon : amylose et amylopectine  
 b) Mode d'attaque des amylases sur l'amylose et l'amylopectine

**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  $\beta$  (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%).

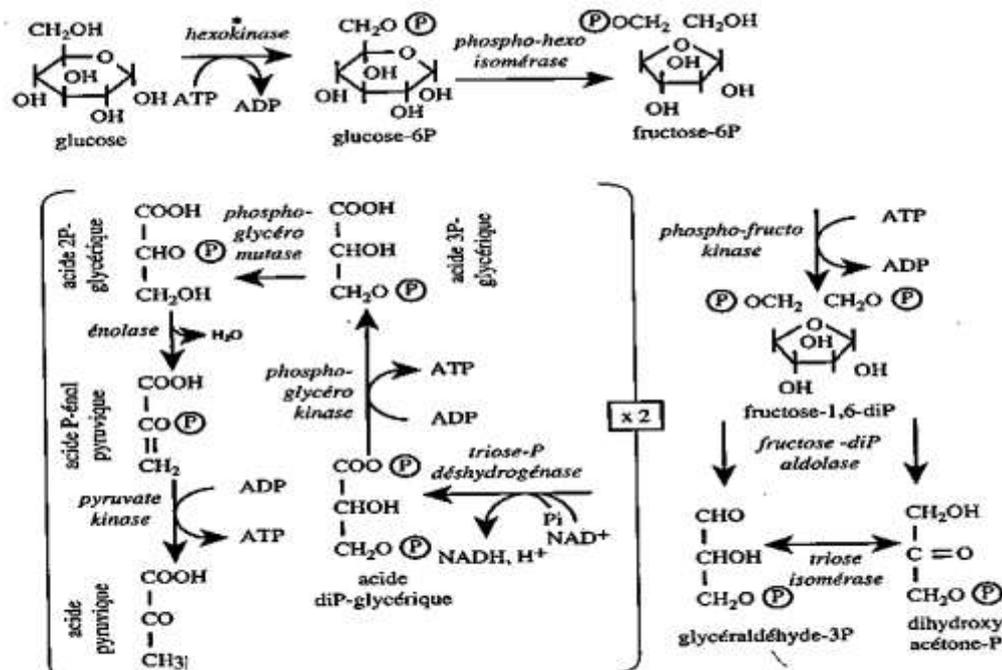


Figure 4 ■ Voie de la glycolyse (voie d'Embden-Meyerhof-Parnas)

\* 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<sup>+</sup>. 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 :  $\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{P}_i \longrightarrow 2 \text{pyruvate} + 2\text{NADH, H}^+ + 2\text{ATP}$

### 3-2- Voie de l'hexose monophosphate (HMP) ou voie de Warburg-Dickens-Horecker

Cette voie aérobie est très importante car elle fournit des pentoses, requis pour la synthèse des acides nucléiques et des groupements prosthétiques contenant des nucléotides. Elle fournit également les éléments nécessaires à la synthèse des acides aminés aromatiques et des vitamines. La voie de l'hexose monophosphate ne produit pas directement de l'énergie, mais le NADPH<sub>2</sub> formé est une source d'ATP lorsque les électrons sont transportés jusqu'à l'oxygène par l'intermédiaire de la chaîne respiratoire ; le NADPH<sub>2</sub> peut être également utilisé par le métabolisme lipidique. Cette voie est présente, aux côtés de la glycolyse à des proportions variables, chez de nombreux microorganismes. Elle est utilisée, au moins partiellement, par les levures et moisissures et de nombreuses bactéries aéro-anaérobies comme *Escherichia coli*. Elle joue un rôle fondamental chez les bactéries aérobies dépourvues de glycolyse (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Acetobacter xylinum*...). Les premières étapes conduisent à la formation de gluconate-6P et sont communes avec d'autres voies respiratoires et fermentaires. A partir du gluconate-6P, il y a formation de ribulose-5P, point de départ du cycle oxydatif des pentoses-P.

L'équation globale est :

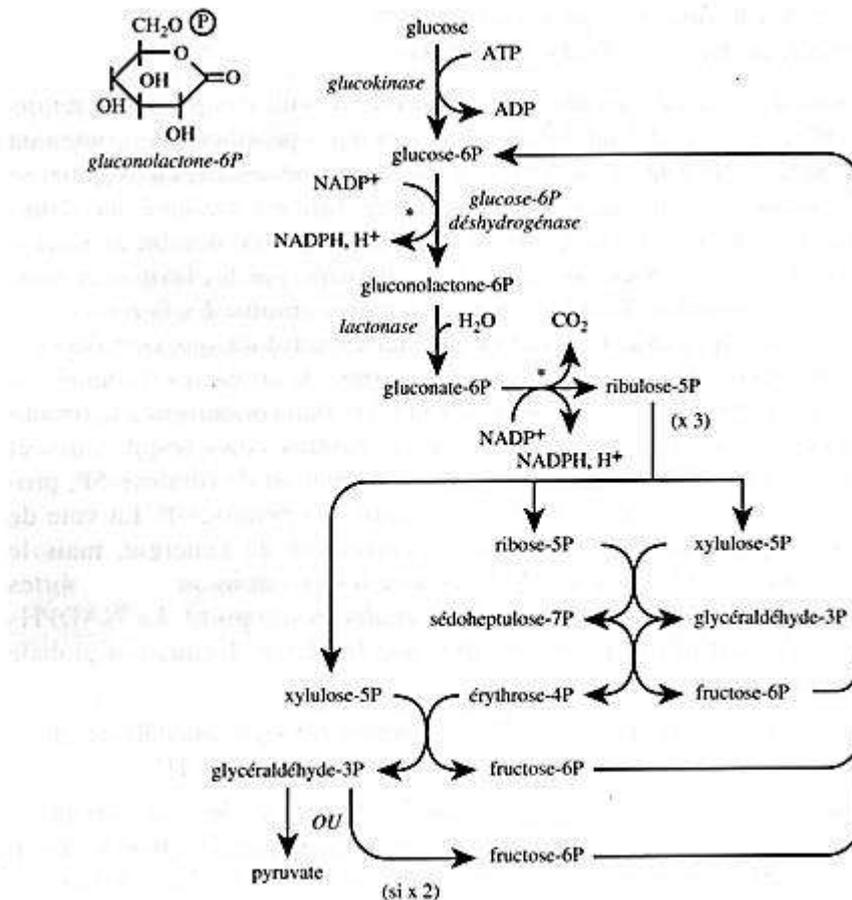
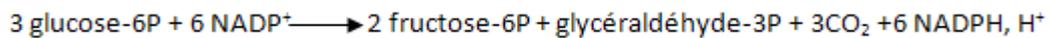


Figure 5 ■ Voie de l'hexose monophosphate (voie de Warburg-Dickens-Horecker)  
\* parfois NAD+/NADH,H+

### 3-3- Voie du 2-céto-3-désoxygluconate ou 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.

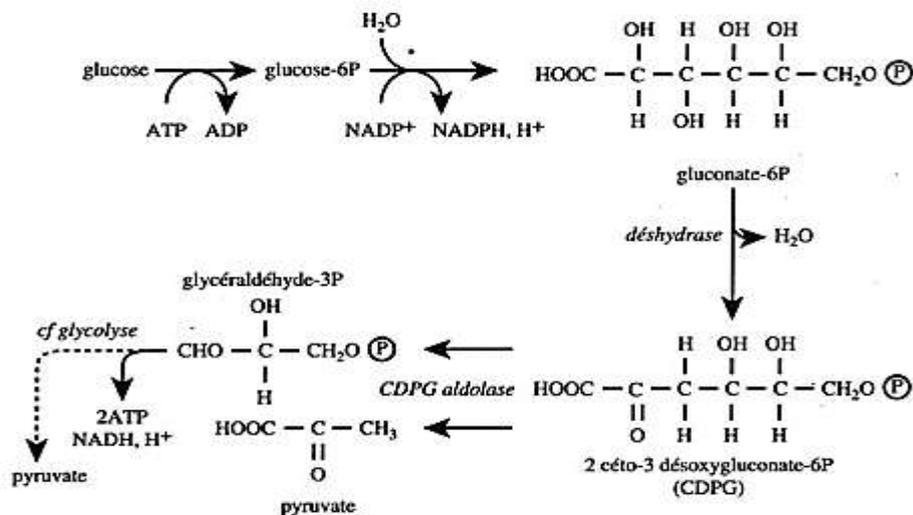


Figure 6 ■ Voie d'Entner-Doudoroff  
\* Les deux étapes ne sont pas représentées

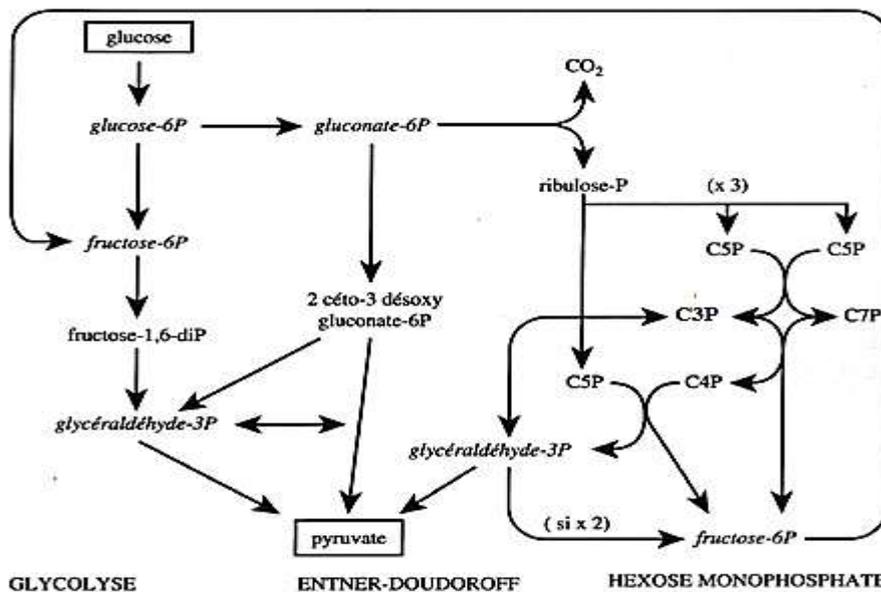


Figure 7 ■ Représentation schématique des rapports entre la glycolyse et les autres voies

Les étapes essentielles de cette voie sont :

- Activation du glucose par l'ATP.
- Oxydation du groupement aldéhyde du glucose-6P pour former le 6-phosphogluconate avec réduction parallèle du NADP<sup>+</sup>.
- Déshydratation du 6-phosphogluconate et formation du CDPG ou KDPG (2-céto-3-désoxy-6-phosphogluconate).
- Clivage par la CDPG-aldolase pour donner d'une part du glycéraldéhyde-3P et d'autre part du pyruvate.

- Transformation du glycéraldéhyde-3P en pyruvate au moyen de la glycolyse avec formation de 2 moles d'ATP et 1 mole de NADH<sub>2</sub> par mole de triose phosphate.

Pour une molécule de glucose, il y a formation de 1 ATP, 1 NADPH<sub>2</sub> et 1 NADH<sub>2</sub>.

Chez les *Pseudomonas*, cette voie est utilisée conjointement avec celle de l'hexose monophosphate.

### 3-4- Fermentations dérivées de la voie de l'hexose monophosphate

Le métabolisme des bactéries hétérolactiques en est un bon exemple « **voie des pentoses- phosphates** ». Elle aboutit, en dehors du lactate, à la formation d'éthanol, de CO<sub>2</sub> et d'acétate. Les bactéries hétérolactiques possèdent le système « glycéraldéhyde-P déshydrogénase », mais elles sont en revanche dépourvues de fructose-6P kinase. Il existe plusieurs systèmes de fermentation hétérolactique bactérienne.

Le plus courant est rencontré chez les *Leuconostoc* et les *Lactobacillus* hétérofermentaires. Cette voie est anaérobie facultative et produit du CO<sub>2</sub>. La voie de Warburg-Christian conduit au xylose-5P, puis la pentulose phosphocétolase, l'enzyme caractéristique, clive ce composé (C5) en acétyl-phosphate (C2) et triose-phosphate (C3). Le même type de fermentation se rencontre chez *Microbacterium*, *Pediococcus*, et certains *Bacillus*.

Une fermentation de type différent se rencontre chez les *Bifidobacterium* (ex. *Lactobacillus bifidus*). Outre l'acide lactique, il se forme de l'acétate. Dans cette voie, il y a des étapes de la voie de l'hexose monophosphate et de la voie des *Lactobacillus*. La pentulose phosphocétolase est présente, le clivage du fructose-6P est dû à une fructose-6P phosphocétolase.

### 3-5- fermentations gluconiques

Une grande variété de microorganismes aérobies stricts, comme les moisissures (*Aspergillus*, *Penicillium*), les *Pseudomonas* et les *Acetobacter*, oxydent le glucose en gluconate, sans phosphorylation préalable de l'hexose. Le glucose est transformé en gluconolactone grâce à une oxydation directe par l'oxygène, sous l'action d'une glucose oxydase (enzyme à cofacteur flavinique). La gluconolactone est ensuite hydratée en acide gluconique. Le produit de la fermentation est en fait constitué par un mélange d'acide gluconique et de δ- et γ-lactones. Cette fermentation nécessite une aération importante.

L'acide gluconique peut être recueilli par précipitation sous forme de gluconate de calcium (utilisé en médecine dans les déficiences calciques).

La glucose oxydase est utilisée pour éliminer le glucose de nombreuses préparations alimentaires.

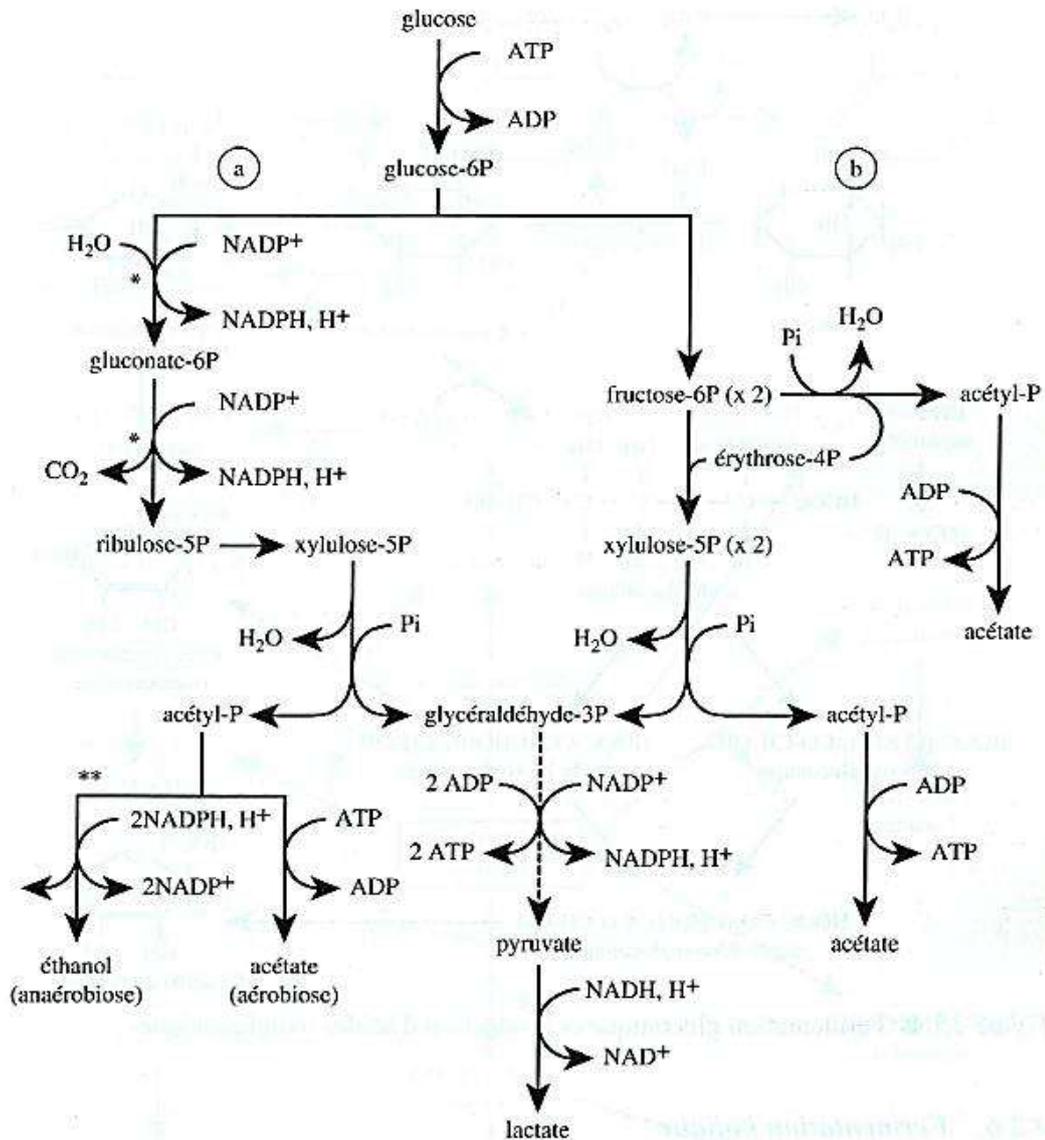


Figure 8 ■ Métabolisme du glucose par fermentation hétérolactique bactérienne

a) Voie des *Leuconostoc* et lactobacilles hétérofermentaires

b) Voie des *Bifidobacterium*

\* parfois  $\text{NAD}^+/\text{NADH, H}^+$ ; \*\* plusieurs étapes ( $\text{acétyl-P} \rightarrow \text{acétyl-CoA} \rightarrow \text{acétaldéhyde} \rightarrow \text{éthanol}$ )

### 3-6- fermentation kojique

Diverses espèces d'*Aspergillus* (groupe *flavus-oryzae*) peuvent produire des quantités importantes d'acide kojique à partir de glucose. La formation directe à partir de glucose sans rupture de la chaîne carbonée semble être la voie prépondérante. Cette biosynthèse s'effectue en aérobiose.

L'acide kojique peut être utilisé comme réactif d'identification chimique (fer ferrique), comme précurseur d'agents aromatiques (maltol), comme précurseur dans la synthèse d'insecticides et comme agent antimicrobien.

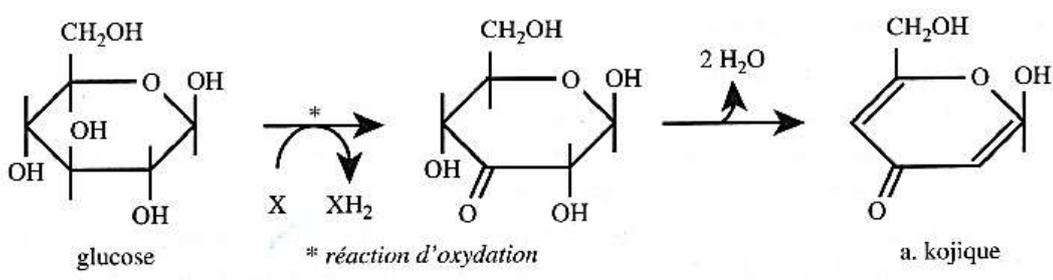
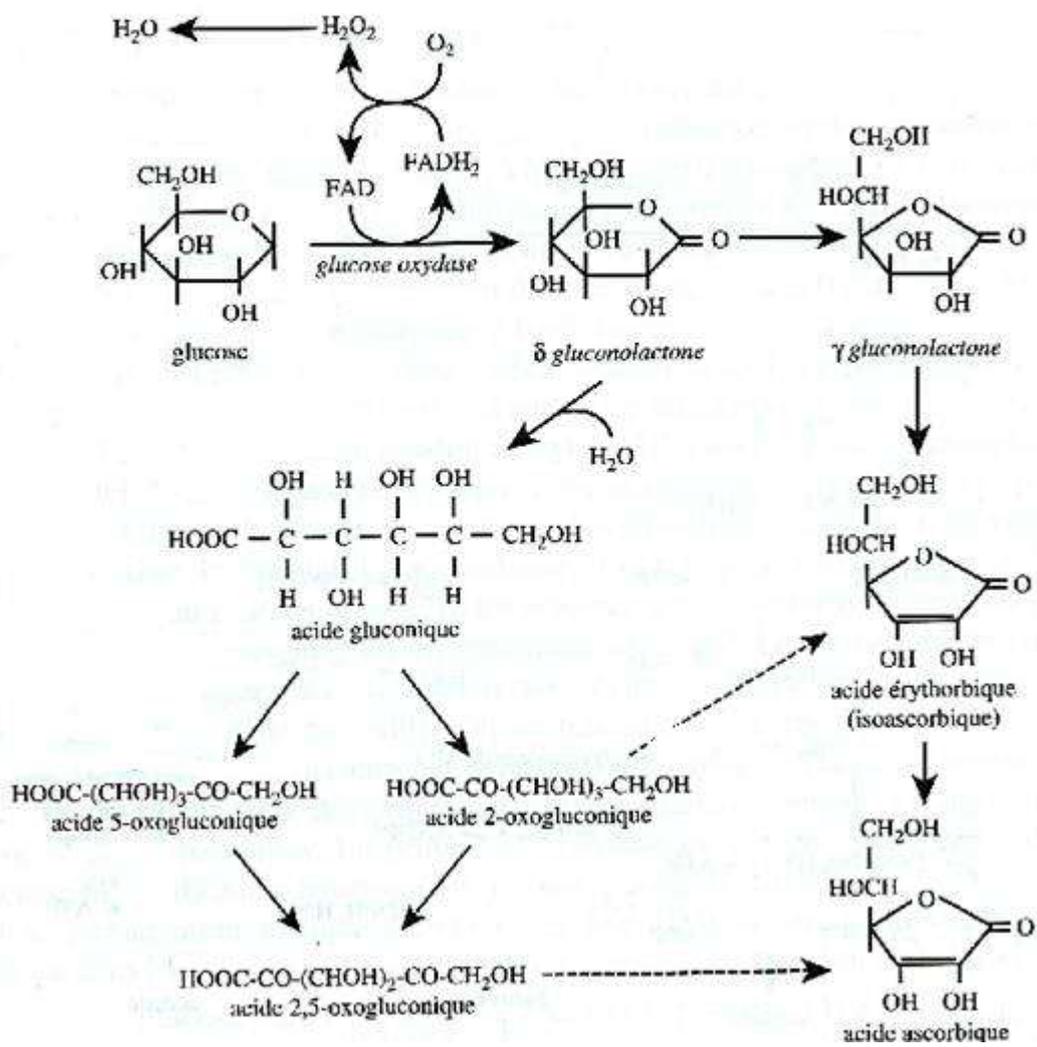


Figure 10 ■ Biosynthèse de l'acide kojique

#### 4- Métabolisme anaérobie du pyruvate

Différents microorganismes, en particulier des bactéries anaérobies strictes ou facultatives, métabolisent le pyruvate en anaérobiose par des voies variées

##### 4-1- Fermentation alcoolique

Il s'agit d'une fermentation très répandue chez les levures (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Brettanomyces*,...). Les bactéries capables de réaliser la fermentation alcoolique sont peu nombreuses (*Zymomonas mobilis*).

La glycolyse constitue la première grande étape de la fermentation alcoolique des levures. Dans le cas de *Zymomonas mobilis*, le glucose est dégradé par la voie d'Entner-Doudoroff. Les deux voies aboutissent au pyruvate, celui-ci est décarboxylé en acétaldéhyde et CO<sub>2</sub>.

La réduction de l'acétaldéhyde engendre la formation d'éthanol. D'autres substances peuvent être produites en faibles quantités (glycérol et acide acétique en particulier). La conversion d'une molécule de glucose en éthanol, par les levures, se traduit par la synthèse de 2 molécules d'ATP.

En anaérobiose, les levures ne transforment pas tous le glucose en éthanol et gaz carbonique ; de petites quantités de pyruvate et NADH<sub>2</sub> sont utilisées pour assurer la maintenance cellulaire. La réoxydation du NADH<sub>2</sub> est indispensable pour que la fermentation alcoolique s'accomplisse. Ceci s'effectue par l'intermédiaire de la réduction d'acétaldéhyde ; or celui-ci est initialement absent. Dans ce cas la dihydroxyacétone-phosphate (PDHA) joue le rôle d'accepteur d'hydrogène en se convertissant en L- $\alpha$ -glycérol-phosphate qui se transforme en glycérol. Ces réactions constituent la fermentation glycéropyruvique qui prend toujours place au début de la fermentation alcoolique. L'acétaldéhyde, plus facilement réductible que la PDHA, fixe préférentiellement l'hydrogène du NADH<sub>2</sub> et, dès que sa concentration est suffisante, la glycolyse se met à fonctionner normalement. Ceci explique la présence constante d'une certaine quantité de glycérol dans les liquides fermentés.

##### 4-2- fermentations homolactiques

L'acide lactique est le produit essentiel de ce type de fermentation (>90% des produits formés), contrairement à la fermentation hétérolactique (entre 25 et 90% d'acide lactique).

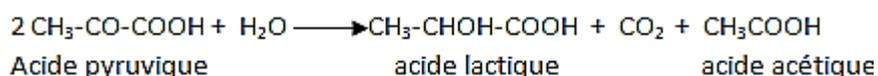
L'acide lactique provient de la réduction de l'acide pyruvique catalysée par la lactico-déshydrogénase. Il peut être de forme D, L, ou DL, ceci dépend de la stéréospécificité de la lactico-déshydrogénase et de la présence ou l'absence de racémase (le microorganisme peut posséder une L- lactico-déshydrogénase, une D- lactico-déshydrogénase ou les deux).

La fermentation homolactique est effectuée par tous les membres des genres bactériens *Streptococcus*, *Pediococcus* et *Microbacterium*, par beaucoup de *Lactobacillus*, par certains *Bacillus* et certaines moisissures (Phycomycètes : Oomycètes).

L'acide lactique est utilisé comme additif alimentaire. Les fermentations homo- et hétérolactiques interviennent également dans la fabrication de nombreux produits alimentaires (fromages, choucroute, salaisons, saumure de légumes...).

### 4-3- Fermentation hétérolactique fongique

Parmi les moisissures, *Rhizopus oryzae* constitue un cas particulier. Cultivé en aérobiose, il produit un mélange d'acide lactique, de l'acide acétique et du CO<sub>2</sub>, alors que dans des conditions anaérobies, il produit un mélange d'acide lactique, d'éthanol, et de CO<sub>2</sub>. Ces produits sont identiques à ceux obtenus au cours de la fermentation hétérolactique des *Leuconostoc* mais le mécanisme de formation est différent : la dégradation du glucose s'effectue par la voie de la glycolyse. En aérobiose, une partie du pyruvate est transformée en acide lactique, l'autre est oxydée.



En anaérobiose, une partie du pyruvate est transformée en éthanol et CO<sub>2</sub>, l'autre en acide lactique.

### 4-4- Fermentation acide mixte et butylène-glycolique

La fermentation acide mixte est réalisée par des Entérobactéries appartenant aux genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella*, *Yersinia*. Elle est aussi rencontrée chez les *Vibrio*, certains *Aeromonas*... Elle est caractérisée par la production d'éthanol et de plusieurs acides organiques : acides lactique, acétique, succinique et formique. Certaines espèces (*Escherichia coli*, *Proteus*, certaines *Salmonella*) possèdent l'hydrogène lyase formique et décomposent immédiatement l'acide formique en H<sub>2</sub> et CO<sub>2</sub> à pH neutre ou acide :



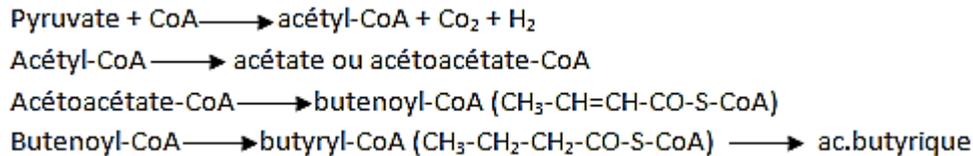
La fermentation butylène glycolique est réalisée par les membres des genres *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* (entérobactéries), mais aussi par certains *Aeromonas* et *Bacillus*. Elle aboutit aux produits de la fermentation acide mixte. Il y a en outre formation de 2,3-butanediol (ou 2,3-butylène glycol), qui est avec l'éthanol la substance la plus abondante. Le 2,3-butanediol est formé par réduction de l'acétylméthylcarbinol (ou acétoïne), produit issu du pyruvate par l'intermédiaire de l'acétolactate. L'acétoïne et le diacétyl sont formés en aérobiose.

Généralement, les acides sont en faible quantité, bien que *Serratia* produise beaucoup d'acide formique. Chez les autres Entérobactéries à fermentation butylène-glycolique, la présence d'hydrogène lyase formique entraîne la formation d'H<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> ; ce dernier est plus abondant que l'H<sub>2</sub> car il est également formé au cours de la synthèse du 2,3-butanediol. A pH neutre ou basique, le pourcentage des produits acides augmente.

### 4-5- Fermentations butyriques et acétono-butyliques

Certains *Clostridium* (*C.butyricum*, *C.perfringens*), les *Butyribacterium*, certaines *Serratia* et *Zymosarcina* produisent de l'acide butyrique, ainsi que de l'acide acétique, du CO<sub>2</sub> et de l'hydrogène. L'acide butyrique est formé par condensation de deux molécules d'acétyl-CoA en acétoacétate, lequel est ensuite réduit en β-hydroxybutyrate puis en butyrate. Une partie de l'acétyl-CoA, formé à partir du pyruvate, conduit à la formation d'ATP et d'acide acétique.

Chez les *Clostridium*, la décarboxylation du pyruvate se fait par réaction phosphoroclastique :



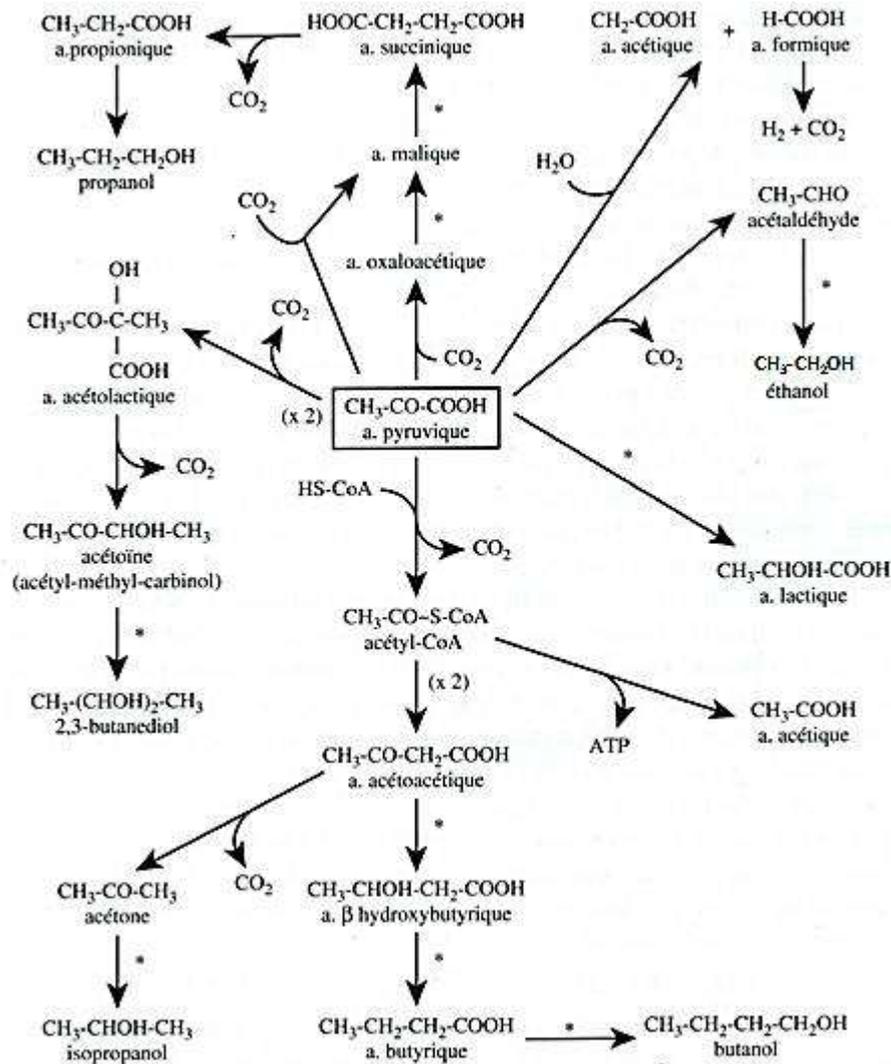
Outre les produits de la fermentation butyrique, certains *Clostridium* peuvent donner des alcools (butanol, éthanol, isopropanol) et de l'acétone.

#### 4-6- Fermentations propioniques

Diverses bactéries anaérobies strictes ou facultatives (*Propionibacterium*, certains *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Veillonella*...) produisent par fermentation l'acide propionique, l'acide acétique, CO<sub>2</sub> et l'acide succinique. L'acide propionique est formé par réduction du pyruvate (l'acide lactique étant l'intermédiaire), mais il peut l'être aussi produit par décarboxylation de l'acide succinique (*Propionibacterium pentosaceum*).

La fermentation propionique peut s'effectuer aussi à partir du lactate avec le pyruvate comme intermédiaire, sauf chez *Clostridium propionicum* où l'intermédiaire est l'acide acrylique.

Les *Propionibacterium* jouent un rôle important dans le tube digestif des ruminants. *Propionibacterium* intervient dans la fabrication des fromages à pâte cuite.



## 5- Métabolisme aérobie du pyruvate

### 5-1- cycle de Krebs (cycle des acides tricarboxyliques « TCA » ou cycle citrique)

En présence d'air, les microorganismes aérobies stricts ou facultatifs assurent l'oxydation complète du glucose. Le pyruvate formé est oxydé par le cycle de Krebs et le shunt glyoxylate. Le cycle de Krebs est la voie d'oxydation aérobie de l'acétate provenant non seulement de la glycolyse ou du shunt de l'hexose monophosphate, mais encore de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. Ses composantes enzymatiques participent directement ou indirectement à la dégradation du squelette carboné de la plupart des aminoacides. Le cycle fournit les composés de départ des réactions de synthèse. Il existe des différences sensibles entre organismes : dans le cycle « classique », le malate est oxydé en oxaloacétate par la malate déshydrogénase NAD-dépendante (*E. coli*), chez *Serratia* ou *Pseudomonas*, il existe une déshydrogénase directement liée aux cytochromes. Chaque tour du cycle produit, à partir de l'acétate, deux molécules de CO<sub>2</sub> et 8 (H<sup>+</sup>, e<sup>-</sup>), sous forme de 2 NADH<sub>2</sub>, 1 NADPH<sub>2</sub> et 1 FADH<sub>2</sub>. Ces électrons et protons sont transportés vers l'oxygène par la chaîne respiratoire. Il y a formation au maximum de 3 molécules d'ATP par paire d'électrons transportée entre les NAD et l'oxygène. Le rendement global par mole de glucose oxydé par l'intermédiaire de la glycolyse et du cycle de Krebs est donc au maximum de 38 ATP. Chez les bactéries, il est difficile de connaître le nombre réel d'ATP

libérés, la présence d'ATPase gênant la mise en évidence de l'ATP formé. Des mesures indirectes suggèrent que le bilan est identique à celui des organismes supérieurs alors que les mesures directes ne permettent de mettre en évidence que 16 ATP par mole de glucose.

Le cycle de Krebs ne peut fonctionner en conditions anaérobies car la succinate déshydrogénase et l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase sont inactives. Cependant, il peut encore se produire des réactions à partir de l'oxaloacétate vers le succinate (branche réductrice « à contre-sens » avec intervention d'une fumarate réductase) et vers l' $\alpha$ -cétoglutarate (branche oxydative) : cas d'*Escherichia coli*.

### **5-2- shunt glyoxylique**

Certains microorganismes (*E. coli* et de nombreuses espèces de moisissures et de *Pseudomonas*) sont capables de se développer à partir de l'acétate comme seule source de carbone et d'énergie. Ces organismes ont toutes les enzymes du cycle de Krebs mais ont en plus :

- l'isocitrate lyase, coupe l'isocitrate en succinate et glyoxylate.
- la malate synthétase condense le glyoxylate avec l'acétyl-CoA pour former le malate.

Le shunt glyoxylique ne fournit aucune énergie biologiquement utilisable. Il ne fonctionne que lorsque le micro-organisme est cultivé sur acétate car le glucose réprime ces deux enzymes.

Lors de la croissance sur acétate, les cellules décarboxylent l'oxaloacétate pour fournir du phosphoénolpyruvate, point de départ de la biosynthèse des hexoses et des pentoses.

### **5-3- Fermentations dérivées du cycle de Krebs et du shunt glyoxylique**

Ce sont des fermentations aérobies essentiellement réalisées par des moisissures. Elles aboutissent à la formation de divers acides organiques (métabolites directement issus du cycle de Krebs ou du shunt glyoxylate ou des produits de leur transformation). Ces acides sont accumulés lorsque le fonctionnement du cycle est interrompu. Cette interruption peut être obtenue par variation des conditions du milieu : pH, présence d'inhibiteurs des enzymes transformant normalement le produit formé. Elle peut être également obtenue par une mutation portant sur les gènes contrôlant ces enzymes.

Le point de départ de la synthèse des acides organiques du cycle de Krebs est l'oxaloacétate, ce dernier est normalement réobtenu dans la phase finale du cycle. Une abondante formation d'acides nécessite la présence d'un apport différent d'oxaloacétate. Il peut être formé par l'intermédiaire du succinate issu du shunt glyoxylique (2 molécules d'acétate donnent le succinate). Il peut aussi être formé par carboxylation du pyruvate. L'enzyme malique catalyse la réaction de carboxylation pour former le malate, lequel est transformé en oxaloacétate par la malate déshydrogénase. L'oxaloacétate peut être issu de la carboxylation du phosphoénolpyruvate (précurseur du pyruvate).

Les acides organiques obtenus par ces fermentations sont très variés (acide citrique, acide itaconique, acide fumarique, acide oxalique, acide malique, acide glutarique, acide succinique, acide époxysuccinique,...)

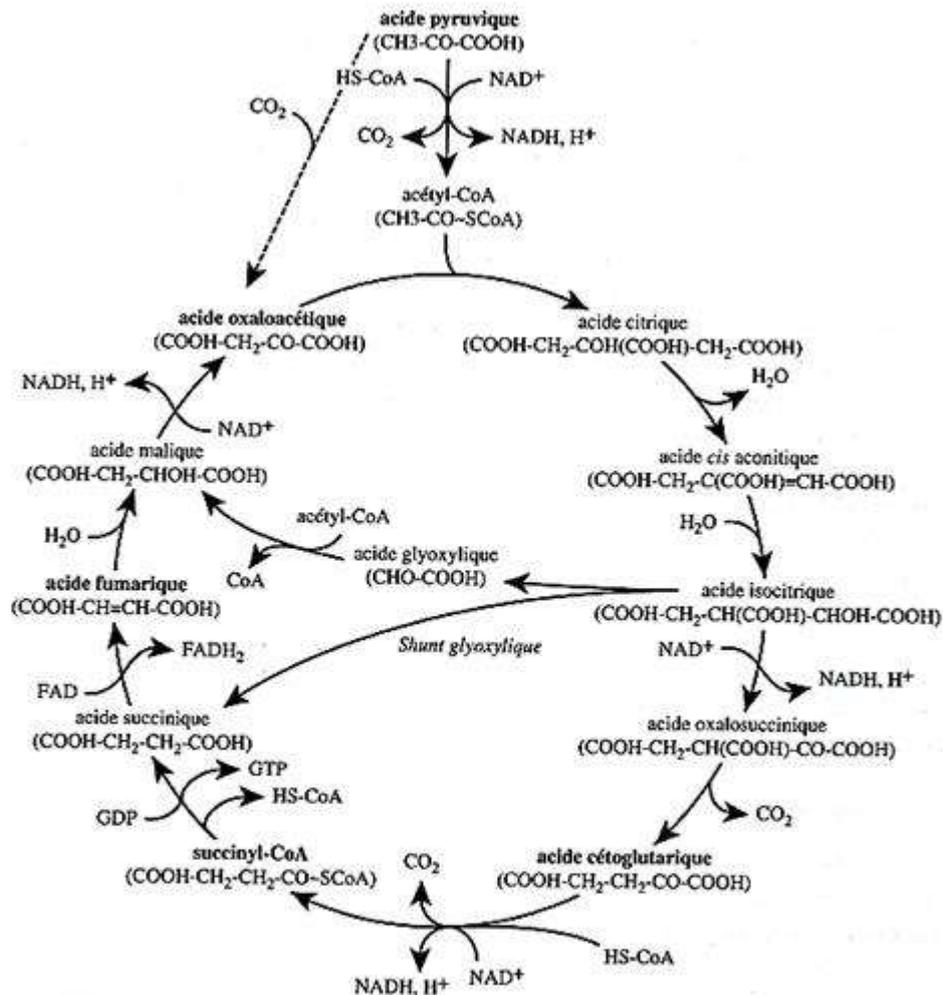


Figure 12 ■ Cycle tricarboxylique de Krebs et shunt glyoxylique

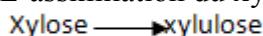
Les composés en gras sont les points de départ de réactions biosynthétiques ; les acides pyruvique, oxaloacétique,  $\alpha$ -cétoglutarique et fumarique sont impliqués dans la synthèse des acides aminés, le succinyl-CoA est utilisé dans la synthèse des porphyrines, l'acétyl-CoA sert dans les réactions d'acétylation. Il faut signaler également que la plupart des réactions sont réversibles.

## 6- Dégradation des autres sucres

### 6-1- catabolisme des pentoses

La dégradation des pentoses a été très bien étudiée chez les Entérobactéries et les Lactobacilles. Quel que soit le pentose métabolisé, sa dégradation aboutit à la formation de D-xylulose-5P, lequel est ensuite métabolisé soit par la voie de l'hexose monophosphate (cycle des pentoses) soit par celle des pentoses-phosphates (voie des bactéries hétérolactiques) avec intervention de la phosphocétolase. Selon le pentose de départ, il y a intervention d'isomérases, transcétolases et transaldolases, avant d'aboutir au xylulose-5P.

L'assimilation du xylose chez les bactéries fait intervenir une isomérase :



Alors que chez les levures, il y a une étape intermédiaire :





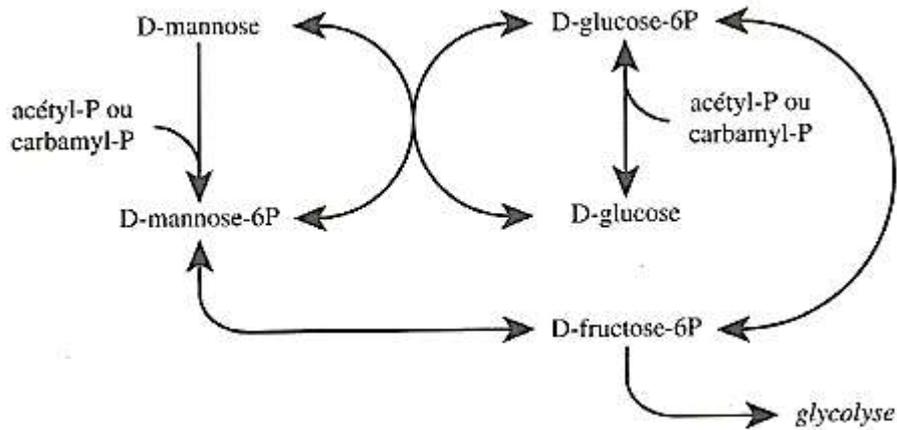


Figure 14 ■ Métabolisme cyclique du mannose

#### 6-4- dégradation du saccharose

Le saccharose est d'abord hydrolysé en glucose et fructose par l'invertase présente chez de nombreuses levures (*Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*...), de nombreuses moisissures (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*...) et de nombreuses bactéries (*Clostridium pasteurianum*, *Streptococcus*...). Le glucose et le fructose sont dégradés par les voies précédemment décrites.

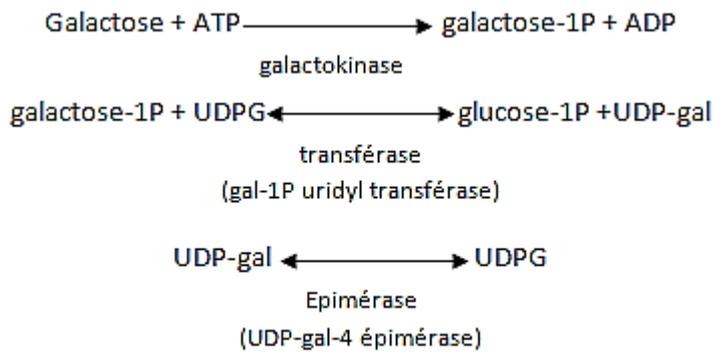
Le saccharose est hydrolysé à l'extérieur de la cellule chez les levures et moisissures. Chez de nombreuses bactéries (bactéries lactiques, *Bacillus subtilis*), le saccharose est transporté à l'intérieur de la cellule sous forme de saccharose-P et ensuite hydrolysé en glucose-6P et fructose.

Chez diverses bactéries (*Bacillus subtilis*, *Zymomonas*), il existe en outre une levane saccharase qui contribue à la synthèse des levanes :



#### 6-5- catabolisme du lactose et galactose

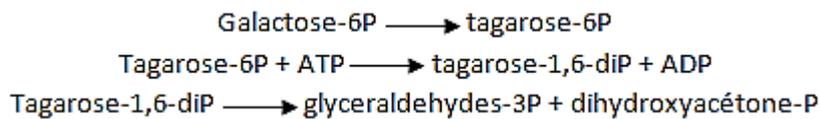
De nombreux microorganismes possèdent une  $\beta$ -galactosidase : des levures (*Kluyveromyces*, *Candida*...), des moisissures (*Aspergillus*...), des bactéries (*E. coli*, *Lactobacillus*, *Bacillus*...). Après hydrolyse du lactose, le glucose formé est dégradé par l'une des voies précédemment décrites. Quant au galactose, il est dégradé, notamment chez les levures, par la voie de Leloir-Kalchar. Il est d'abord phosphorylé puis transformé en glucose-1P, métabolite directement utilisable par la cellule après isomérisation en glucose-6P. Les réactions d'isomérisation font intervenir l'uridine diphospho-glucose (UDPG) et l'uridine diphospho-galactose (UDP-Gal) :



### Métabolisme du galactose par la voie de Leloir

Chez *Escherichia coli*, le métabolisme du lactose dépend d'une perméase spécifique et utilise la voie de Leloir comme chez la levure.

Chez *Lactobacillus casei*, le lactose est phosphorylé par un système phosphotransférase en lactose-P qui est scindé dans la cellule en glucose et en galactose-6P ; la métabolisation a lieu par la voie du tagarose :



La voie du tagarose est également utilisée chez *Staphylococcus aureus* pour le métabolisme du lactose et du galactose.

### **6-6- catabolisme du maltose**

Il est généralement hydrolysé en 2 molécules de glucose par une maltase (ou glucoamylase).

Chez *E. coli*, il est métabolisé avec intervention d'une transglycosylation :

