


METABOLISME BIOCHIMIQUE BACTERIEN





1- Définition :

- Il est défini comme l'ensemble des transformations chimiques (réactions de biosynthèse et de dégradation), qui assurent l'élaboration des constituants bactériens et leur fonctionnement.
 - Grâce à un équipement enzymatique très complet, toutes les réactions chimiques du métabolisme bactérien sont catalysées par des enzymes spécifiques.
 - L'étude du métabolisme bactérien permet de définir des caractères d'identification biochimique qui représentent des critères essentiels dans la classification (ou Taxonomie) bactérienne.
- 

ALIMENTS

Réactions cataboliques

MOLECULES SIMPLES

**METABOLITES
INTERMEDIAIRES**

ATP

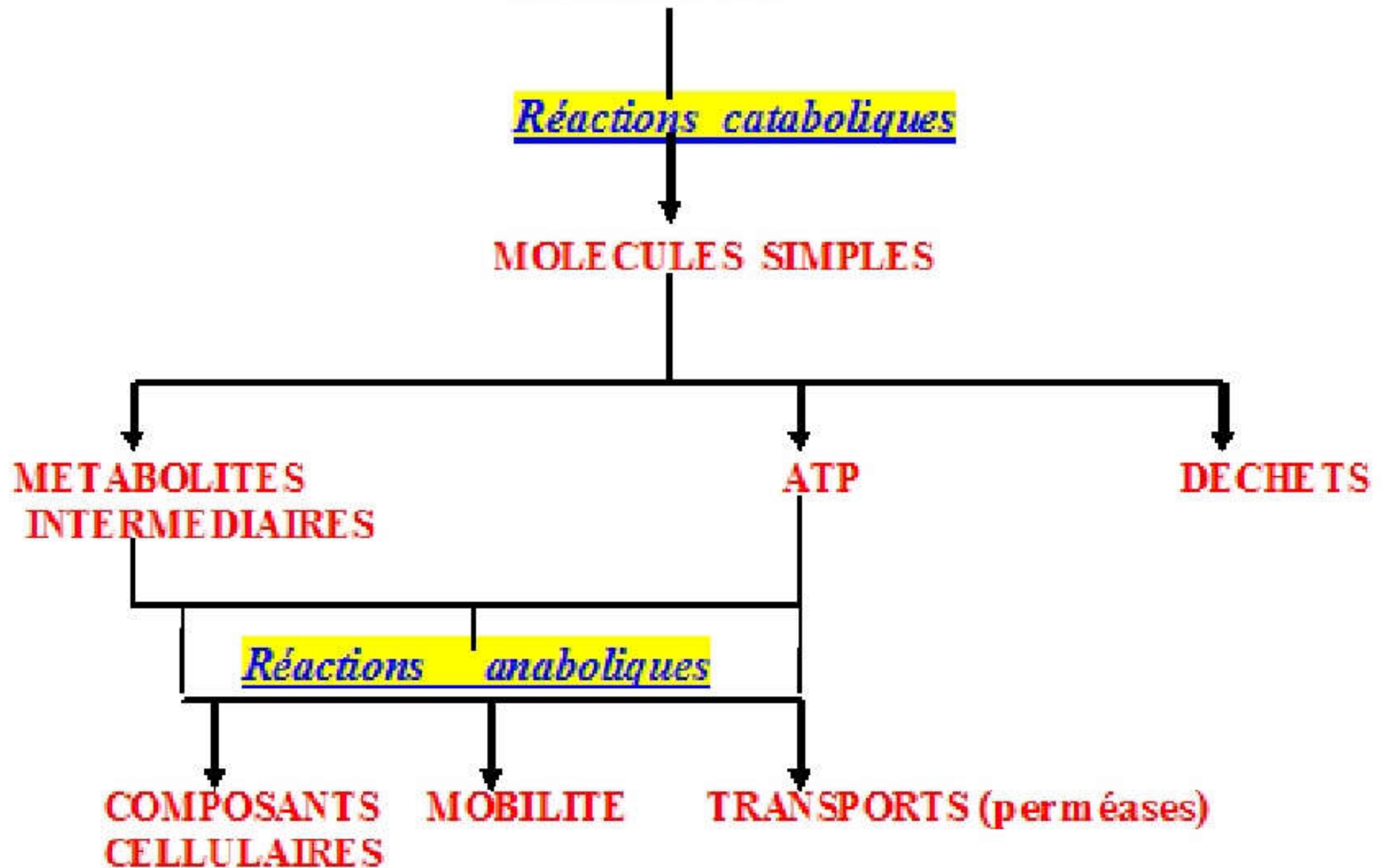
DECHETS


Réactions anaboliques

**COMPOSANTS
CELLULAIRES**

MOBILITE


TRANSPORTS (perméases)





Les réactions cataboliques permettent à la bactérie de convertir les aliments mis à sa disposition (Protéines , Lipides , Polysaccharides) en molécules organiques simples ou en métabolites intermédiaires , avec production d'énergie sous forme de liaison phosphate ADP ~ Pi .

Les liaisons anaboliques sont les voies de biosynthèse que la bactérie emprunte à partir de ces molécules simples pour synthétiser des macromolécules intervenant dans la structure et le fonctionnement bactérien . L'énergie utilisée dans ces biosynthèses provient du catabolisme .





2- Métabolisme énergétique :

2-1- Généralités

- La bactérie produit de l'énergie au cours du catabolisme par le biais de réactions **EXERGONIQUES**.


Pour éviter toute perte sous forme de chaleur, ces réactions exergoniques (productrices d'énergie) sont couplées à des réactions dites **ENDERGONIQUES** (absorbent l'énergie).

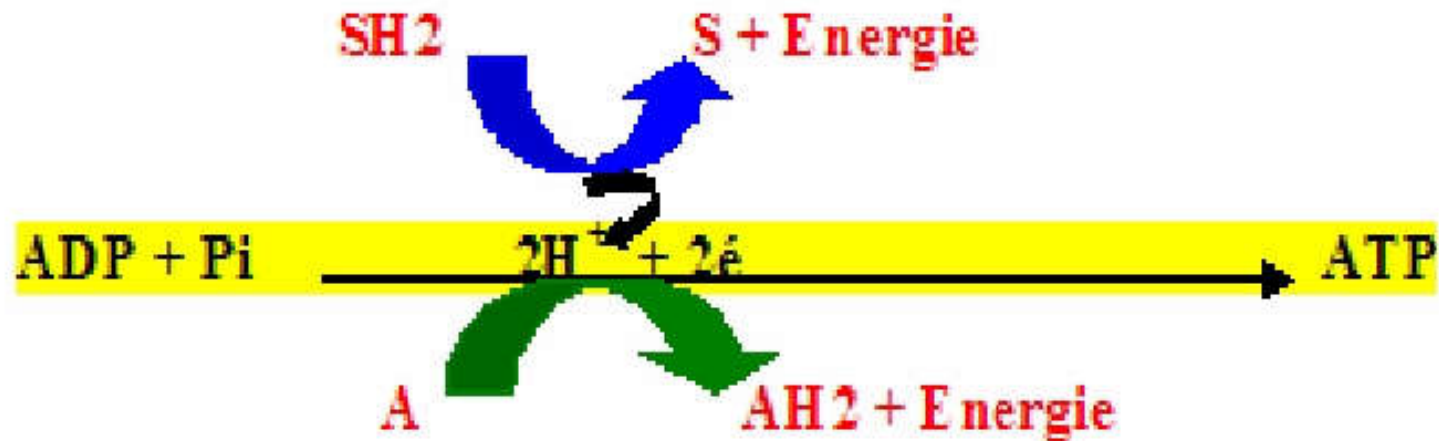
L'énergie est ainsi emmagasinée dans des molécules d'ATP ou immédiatement consommée dans une réaction qui nécessite de l'ATP..

- Chez les bactéries d'intérêt médical, les réactions exergoniques sont **des réactions d'oxydoréduction d'un composé organique**.

A partir d'un substrat SH_2 , la réaction d'oxydation ou **DESHYDROGENATION** fait perdre 2 électrons et 2 protons au substrat qui est oxydé.

Ne pouvant rester libres, ces derniers sont éjectés puis captés par un accepteur d'électrons A qui est ainsi réduit en AH_2 .






La réaction REDOX

Le métabolisme énergétique d'une bactérie chimioorganotrophe est constitué d'une suite de réactions REDOX avec libération d'énergie, partant d'un substrat organique.

Le composé organique peut être :

- un hydrate de carbone (surtout le glucose) source la plus importante d'énergie
- un acide aminé
- un acide gras
- un alcane
- une base purique ou pyrimidique



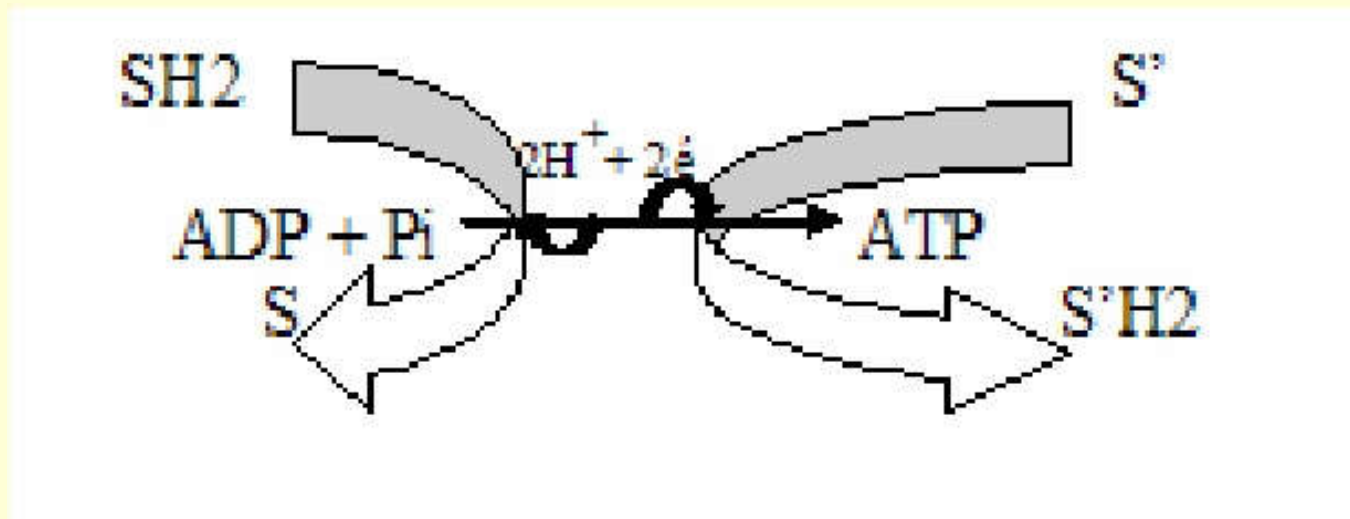
**Les réactions redox productrices
d'énergie sont intégrées dans 2
types de processus énergétiques :**

La Fermentation et la Respiration

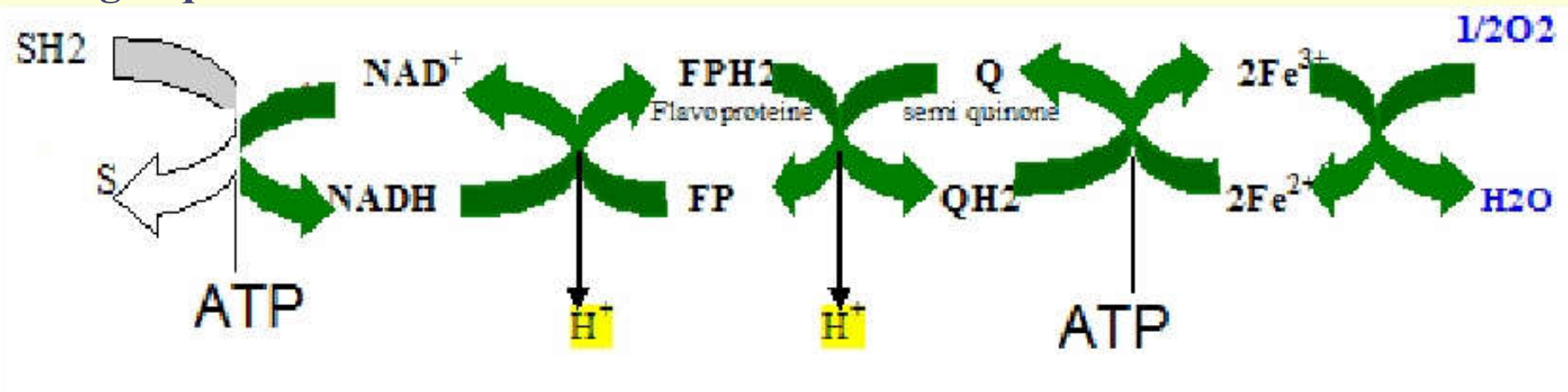


La fermentation a été définie par Pasteur comme la
« vie sans air » .

C'est une oxydation biologique au cours de laquelle
l'accepteur final d' H_2 et d' e^- est un composé organique. Ce
composé peut être présent dans le milieu ou provenir de la
dégradation d'un substrat oxydable . Les voies fermentaires
se déroulent au sein du cytoplasme bactérien. Le bilan
énergétique est réduit.



La Respiration est l'ensemble des voies métaboliques au cours desquelles l'oxygène moléculaire ou des composés oxygénés inorganiques ou ioniques jouent le rôle d'accepteur d'électrons et d' H_2 dans les réactions redox. Ces voies sont liées à la membrane cytoplasmique de la bactérie. L'énergie est produite par phosphorylation dite oxydative et libérée par paliers via une chaîne de transfert d'électrons ; Le bilan énergétique est élevé.



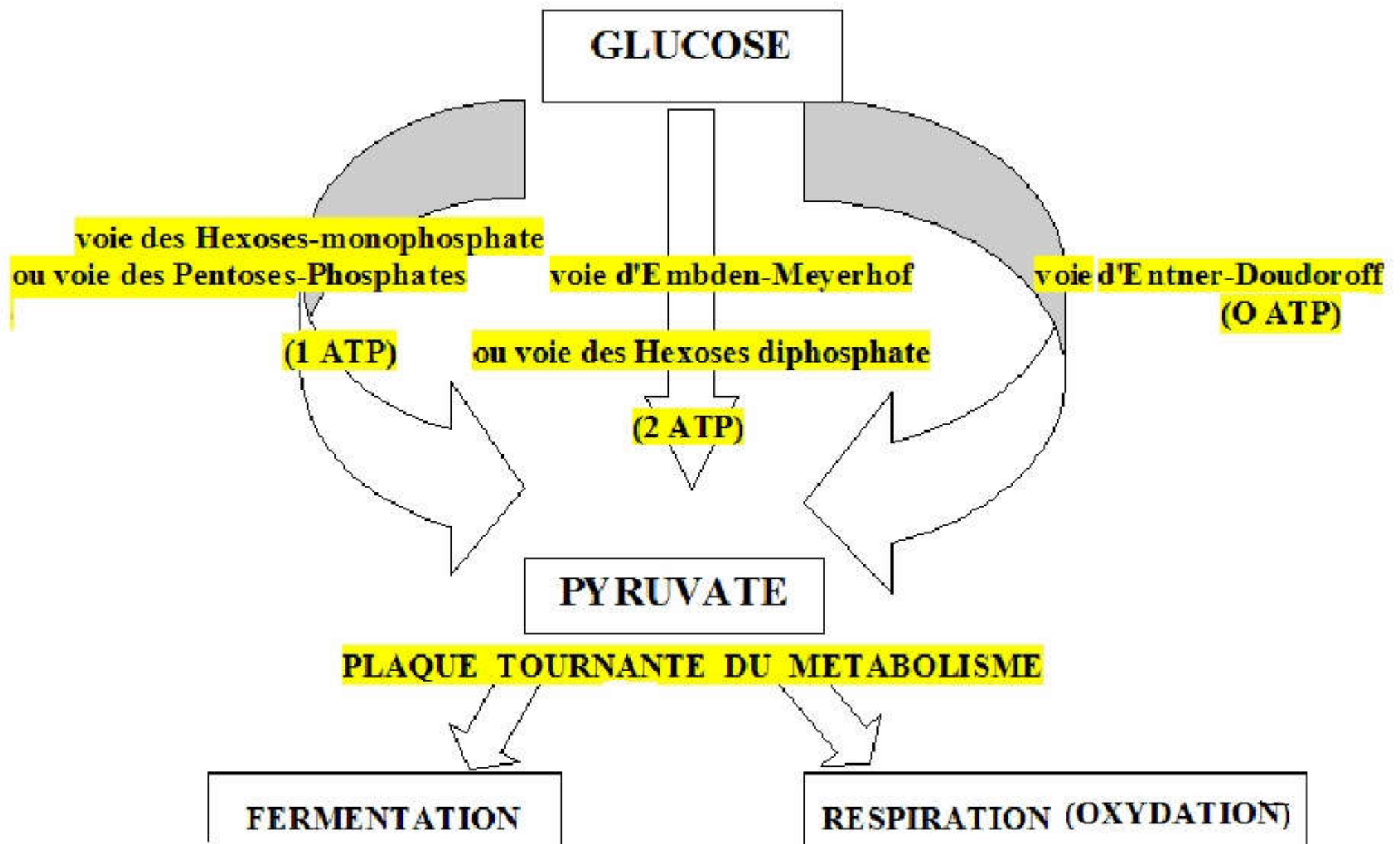


2-2- Voies du Métabolisme intermédiaire

**On distingue 3 principales voies enzymatiques , à
localisation cytoplasmique , qui oxydent le glucose en acide
pyruvique , véritable plaque tournante du métabolisme et
situé au carrefour du métabolisme intermédiaire**



Exemple du métabolisme du Glucose





2-3- La respiration :

Le Pyruvate est le point d'aboutissement obligé de toutes les voies de dégradation du Glucose et des voies d'oxydation de nombreux acides aminés. Il est transformé en Acetyl~CoA par décarboxylation oxydative.






2-3-1- Le cycle de Krebs :

L'Acetyl~CoA réagit avec l'acide oxaloacétique pour former de l'acide citrique .

Il s'en suit une succession de réactions d'oxydation et de décarboxylation , avec réductions de NAD en NADH₂ couplées aux réactions d'oxydation .Du point de vue énergétique , chaque tour de cycle de Krebs génère 4 réactions de déshydrogénation donc un bilan énergétique de 12 ATP.



2-3-2- La chaîne respiratoire :

C'est la chaîne cytochromique de transfert des électrons , à laquelle sont associés des phosphorylations oxydatives . Ses composants sont disposés de façon séquentielle en fonction de leur potentiel redox. Le mouvement des électrons ou des protons le long de la chaîne s'effectue graduellement à partir des constituants les plus électronégatifs pour aller vers le constituant le plus électropositif (O_2). Ces composants sont des enzymes associés à des groupements prosthétiques et qui agissent comme transporteurs d'électrons.

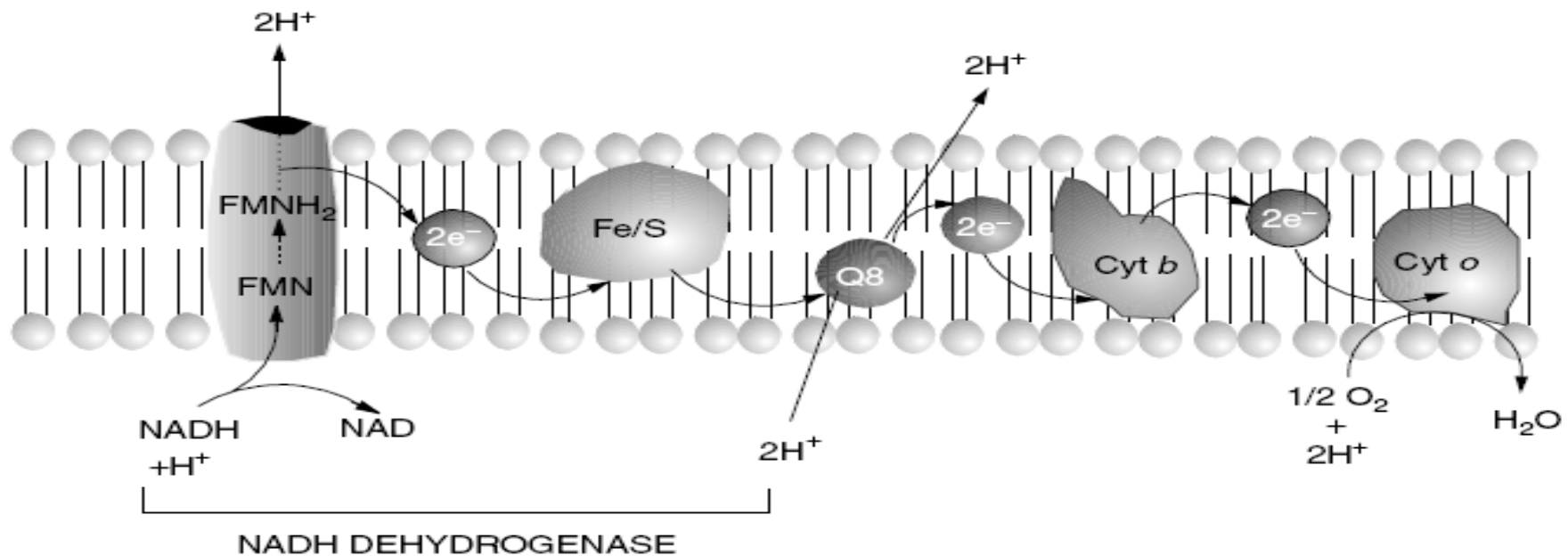



Fig. 9-2. An electron transport chain of *E. coli*.



*** NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ou Coenzyme I :**
Coenzyme fonctionnant comme transporteur d'hydrogène
dans de nombreuses réactions redox. La molécule d'H₂ est
portée sur le résidu Nicotinamide.


Forme oxydée : NAD⁺

Forme réduite : NADH + H⁺

(N.B. NADP= Coenzyme II)

*** FP : Ce sont des protéines de haut poids moléculaire**
contenant des flavines comme groupement prosthétique .
Appartiennent aux FP la Flavine mononucléotide (FMN) et
Flavine Adénine dinucléotide (FAD). Ces flavoprotéines ont
pour fonction d'accepter l'H₂ qui provient du NADH.

*** Ubiquinone ou Coenzyme Q : transporteur d'hydrogène ,**
non lié à une protéine.






* Cytochromes : Systèmes redox qui transfèrent des électrons et ne sont pas capables de transporter de l'hydrogène.

Le cytochrome terminal qui joue le rôle d'accepteur final d'électron est appelé Cytochrome Oxydase.

Au cours de la respiration , il y a dégagement important d'énergie puisqu'il y a oxydation du substrat jusqu'au stade $H_2O + CO_2$.
De ce fait , l'énergie , trop importante pour être libérée d'un seul coup, est libérée par palier au cours d'une succession de réactions redox allant de la réduction du NAD puis d'une flavoprotéine et d'une ubiquinone avec transfert d'électrons et de protons jusqu'à l'accepteur final , les électrons étant transférés seuls par les cytochromes .





La respiration se fait donc en 2 étapes :


1) Le cycle tricarboxylique de Krebs , avec libération de CO₂ par oxydation couplée à la réduction de 3 NAD⁺ et de 1 FAD⁺ par tour de cycle .

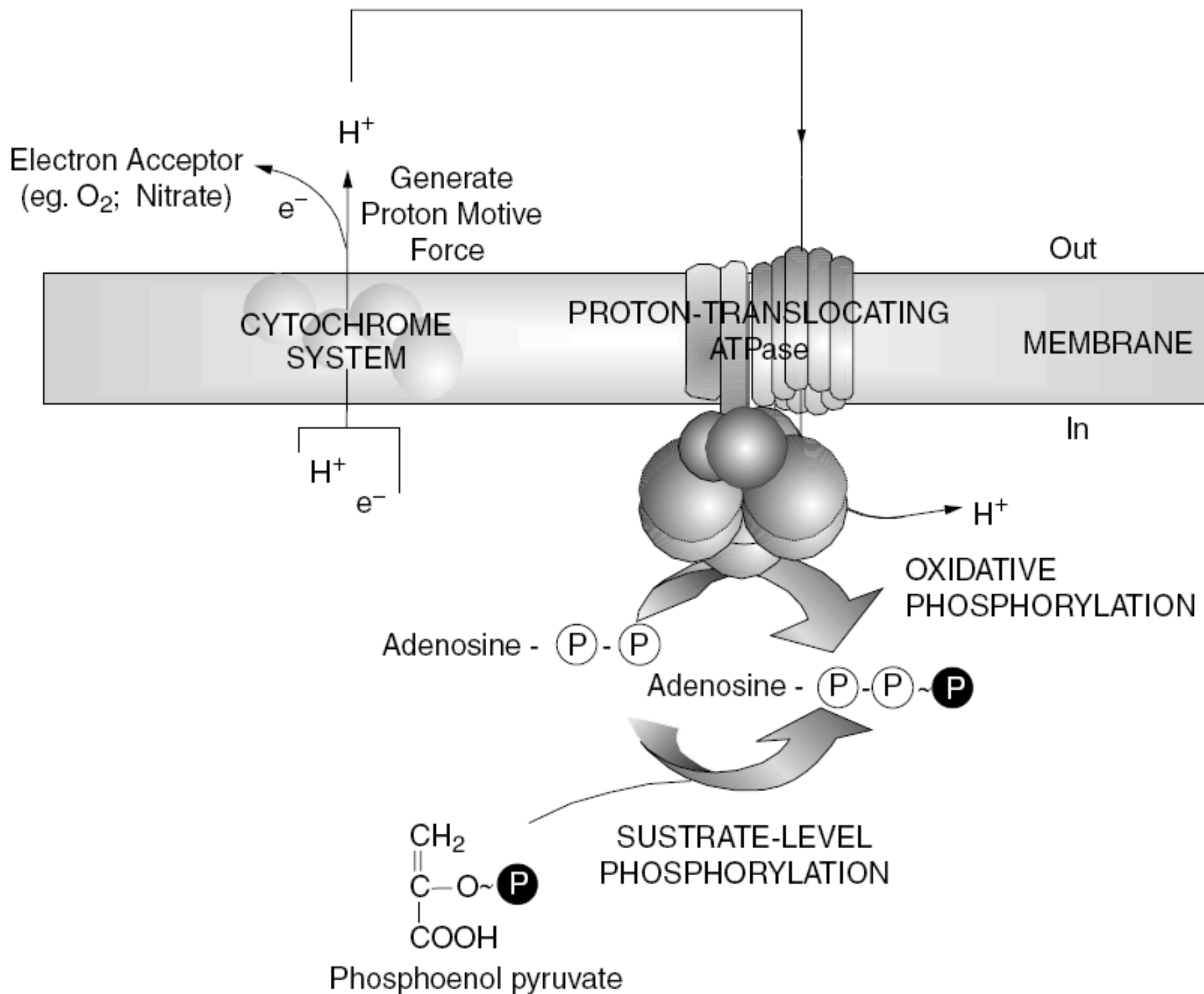
2) La chaîne respiratoire avec coenzymes de déshydrogénases , Quinones et Cytochromes .

Selon l'accepteur final d'électrons et d'H₂ , on peut distinguer :

1) Dans la respiration aérobie , l'accepteur final est l'O₂

2) Dans la respiration anaérobie , l'accepteur final est un composé inorganique ou ionique (NO₃-fumarate)








2-4- Fermentation du Glucose :

La première étape comporte les différents voies du métabolisme intermédiaire qui aboutissent au Pyruvate .

Puis viennent les réactions de réduction du Pyruvate qui différentient les bactéries fermentaires car elles conduisent à des produits finals divers , soit uniques , soit plus souvent mélangées . On distingue , selon la nature des produits finals de fermentation :



PYRUVATE

Fermentation Alcoolique



Alcool
(Champignon)

Fermentation

Acides complexes

(Exemple: Entérobactéries)



**Voie des
Acides Mixtes**

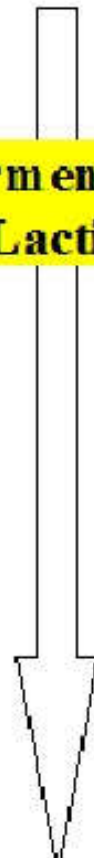
**Voie du
Butanédiol**

Acides +++
(exemple : E.coli)

2,3 Butylène Glycol
(KES : groupe des VP+)

Fermentation

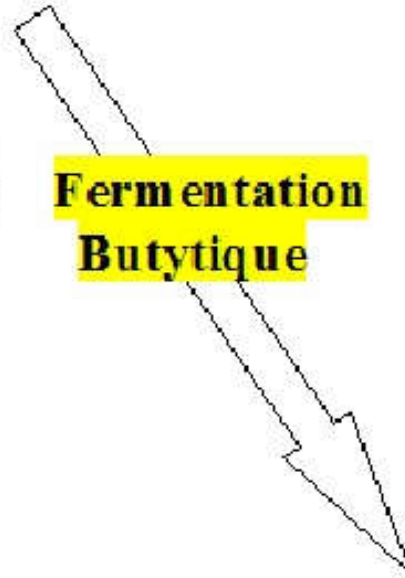
Lactiques




Acide Lactique
(Streptocoques)

Fermentation

Butyrique



Acide Butyrique
(Clostridium)




2-5- Tests d'exploration du métabolisme énergétique :

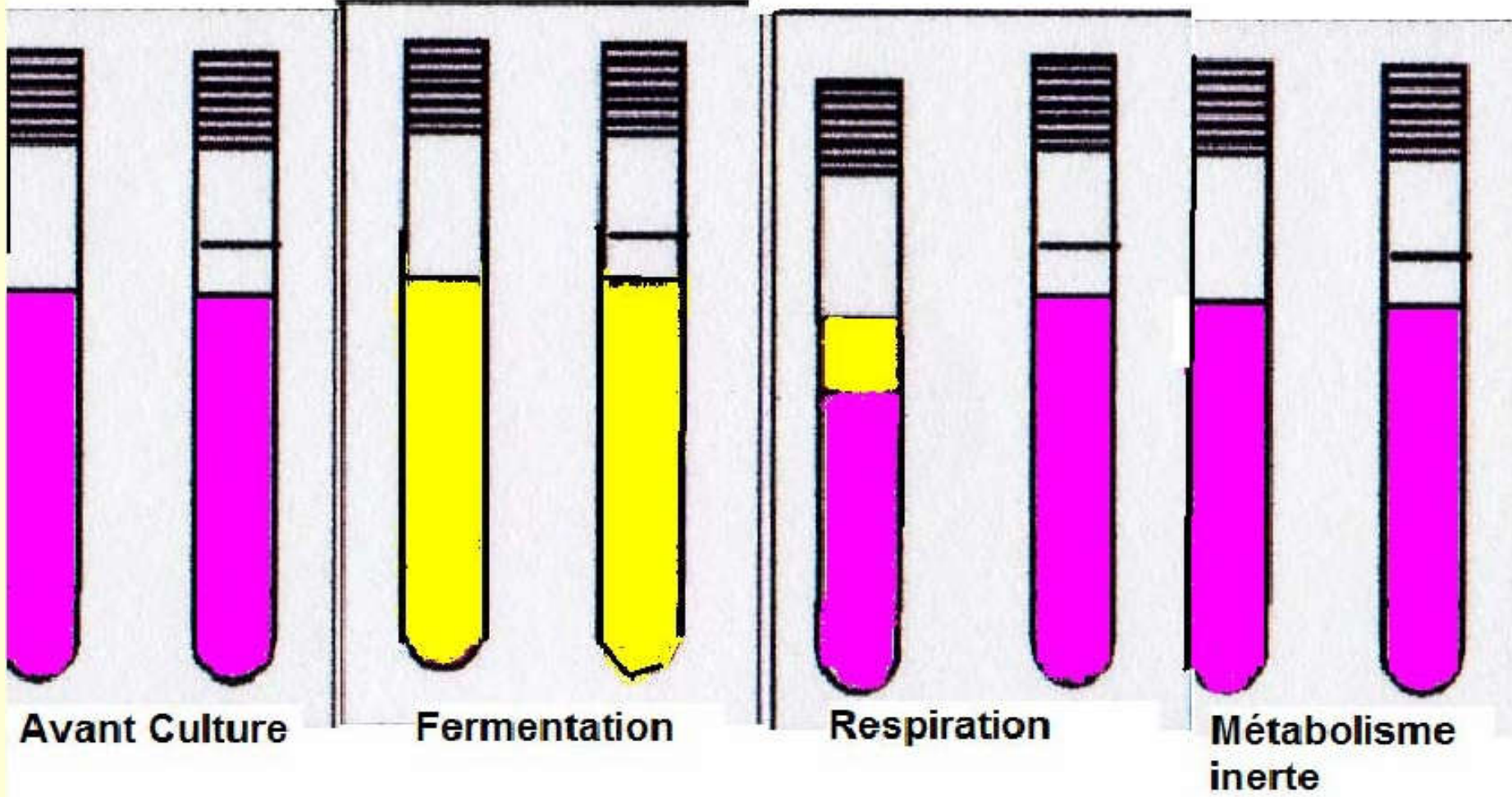
2-5-1- Épreuve de HUGH et LEIFSON :

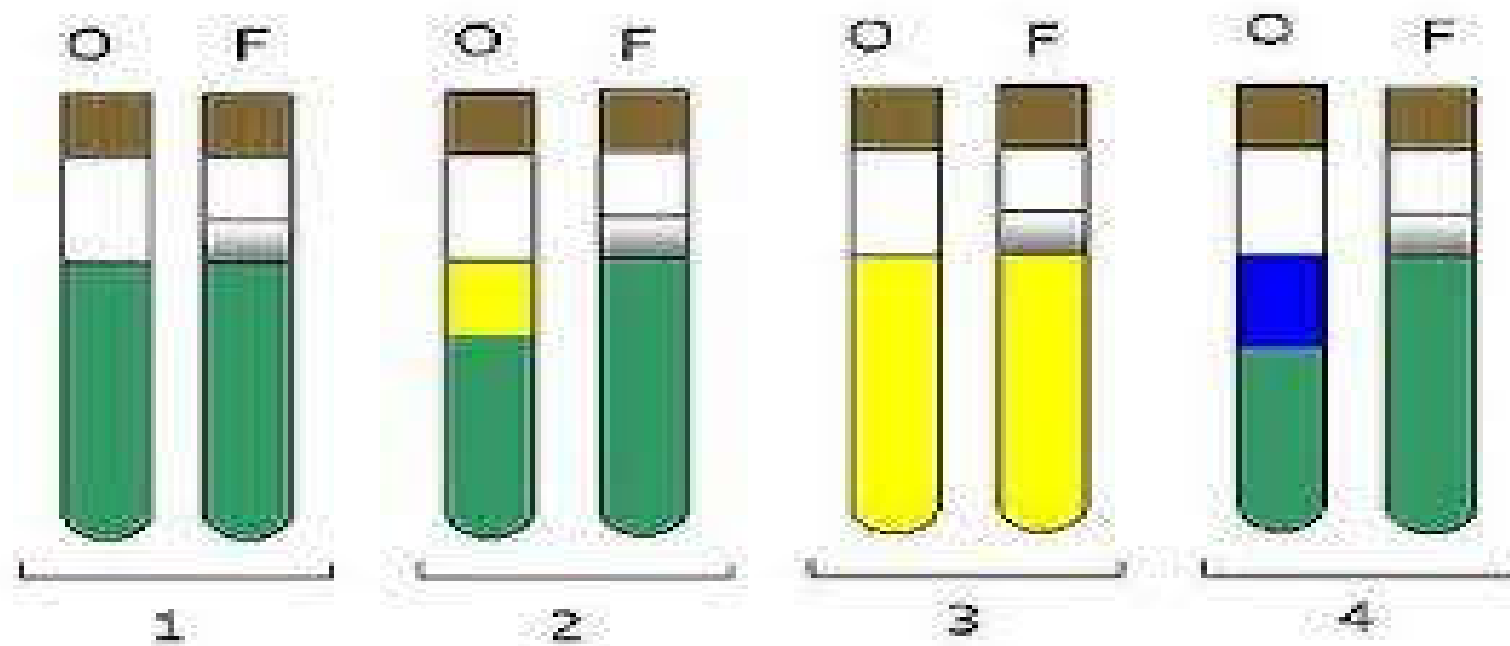
Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides (M.E.V.A.G) :

Géloses molles , faiblement peptonée , additionnées de glucose à 1%, coulées en culot , fondues au moment de l'emploi .L'ensemencement se fait par piqûre centrale de 2 tubes de milieu , à partir d'une suspension riche du germe à étudier. Un tube est laissé ouvert « O » , l'autre est fermé par une couche de vaseline « F ».



MEVAG



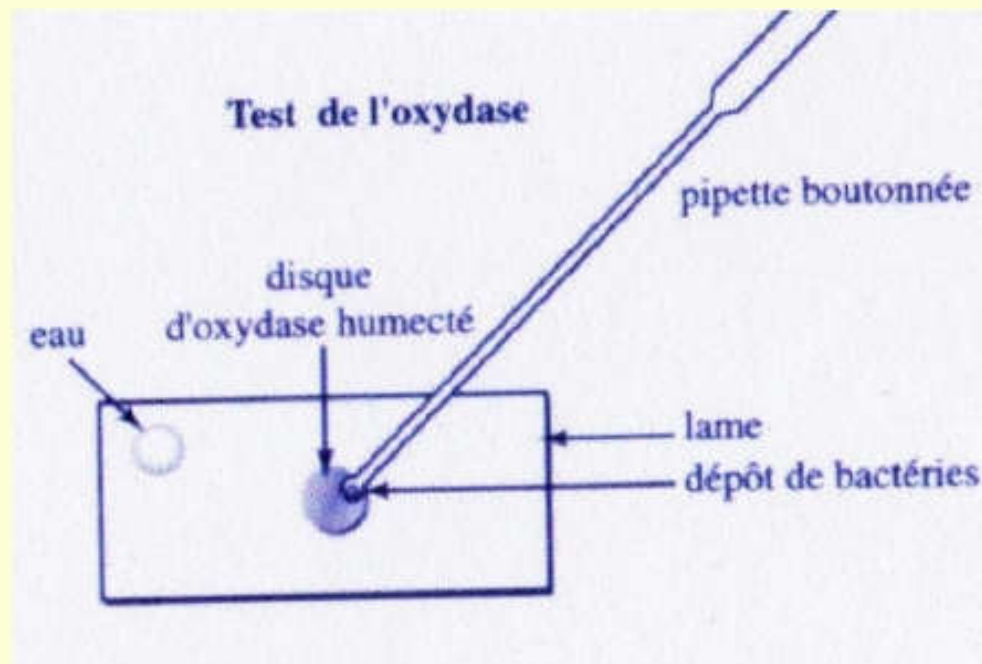


2-5-2- Test dit de l'Oxydase :

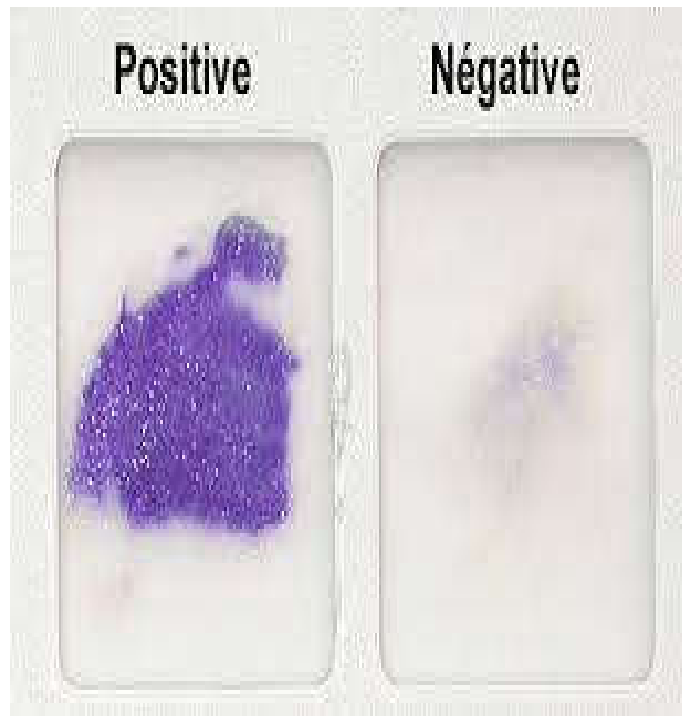
Cyt aa3 + Cyt c ont la propriété d'oxyder le diméthyl ou le tetraméthylparaphénylène diamine en une demi-quinone rouge.



Attention : - ne pas utiliser d'anse bactériologique métallique pour faire le test
- ne pas faire le test à partir d'une pente de TSI ou KIA



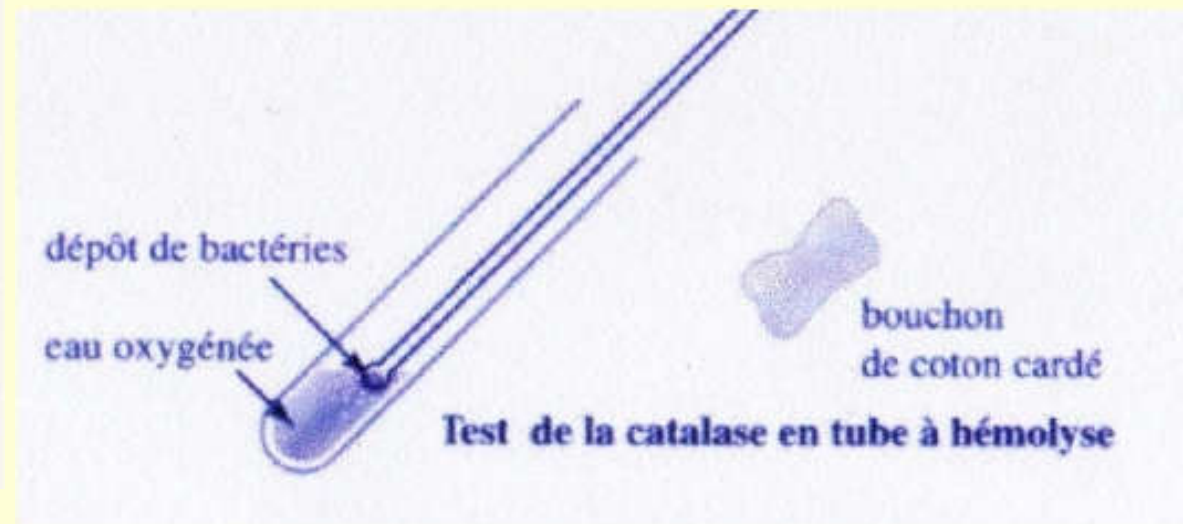
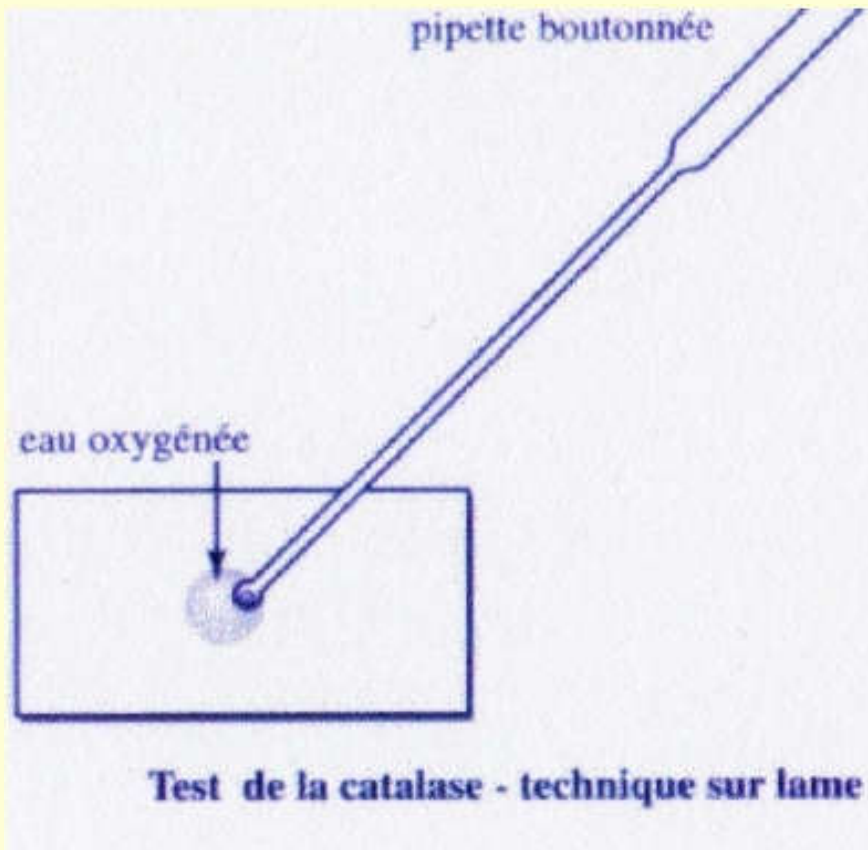
Test de l'oxydase



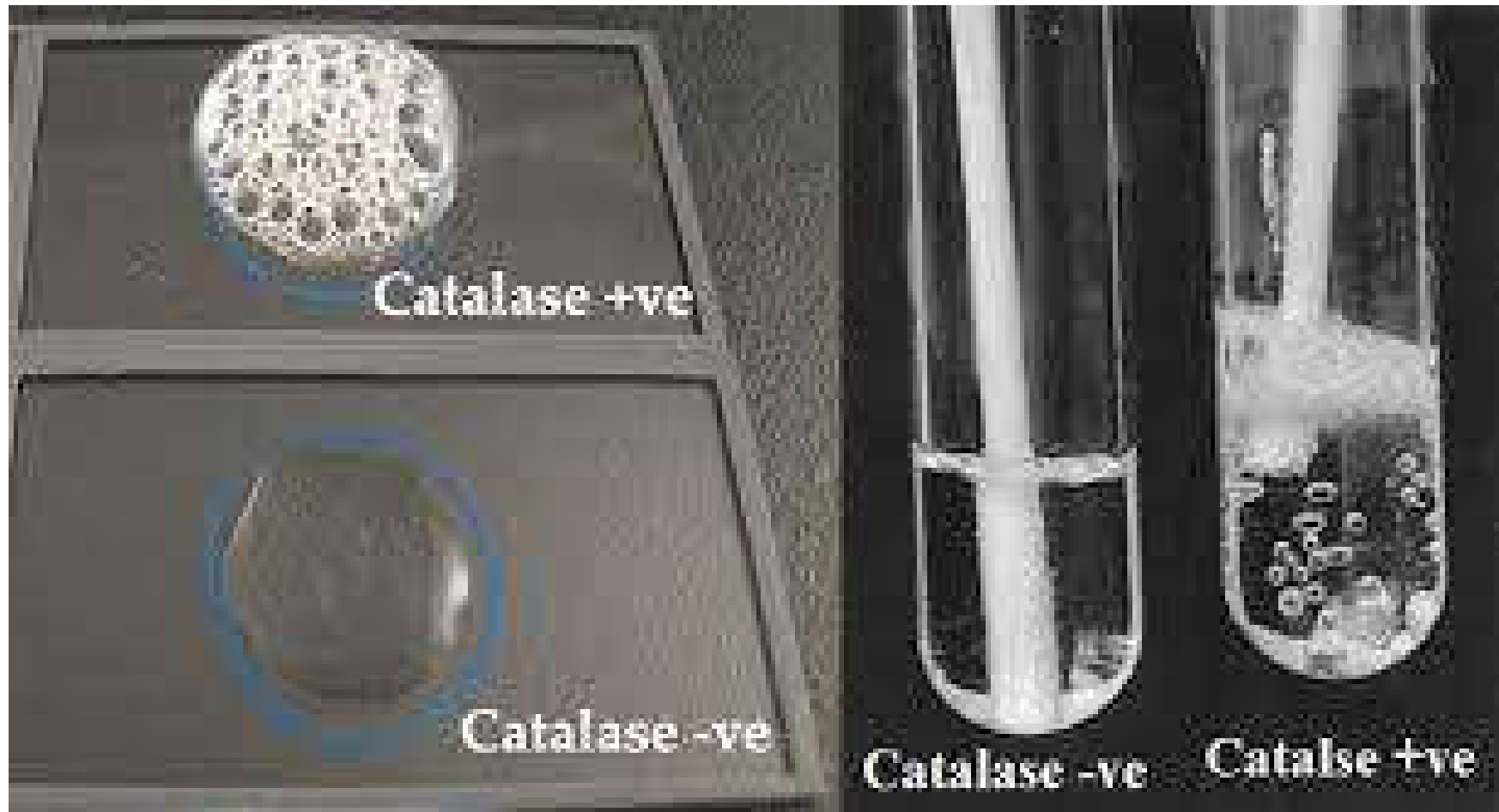
Tube contenant des disques d'oxydase:



2-5-3- Recherche de la catalase : on met en présence une colonie microbienne et une goutte d'eau oxygénée sur une lame . L'apparition de bulles d'air signe la présence d'une catalase . Attention : ne pas prélever la culture à partir d'une gélose au sang.



Test de la catalase sur lame et en tube:

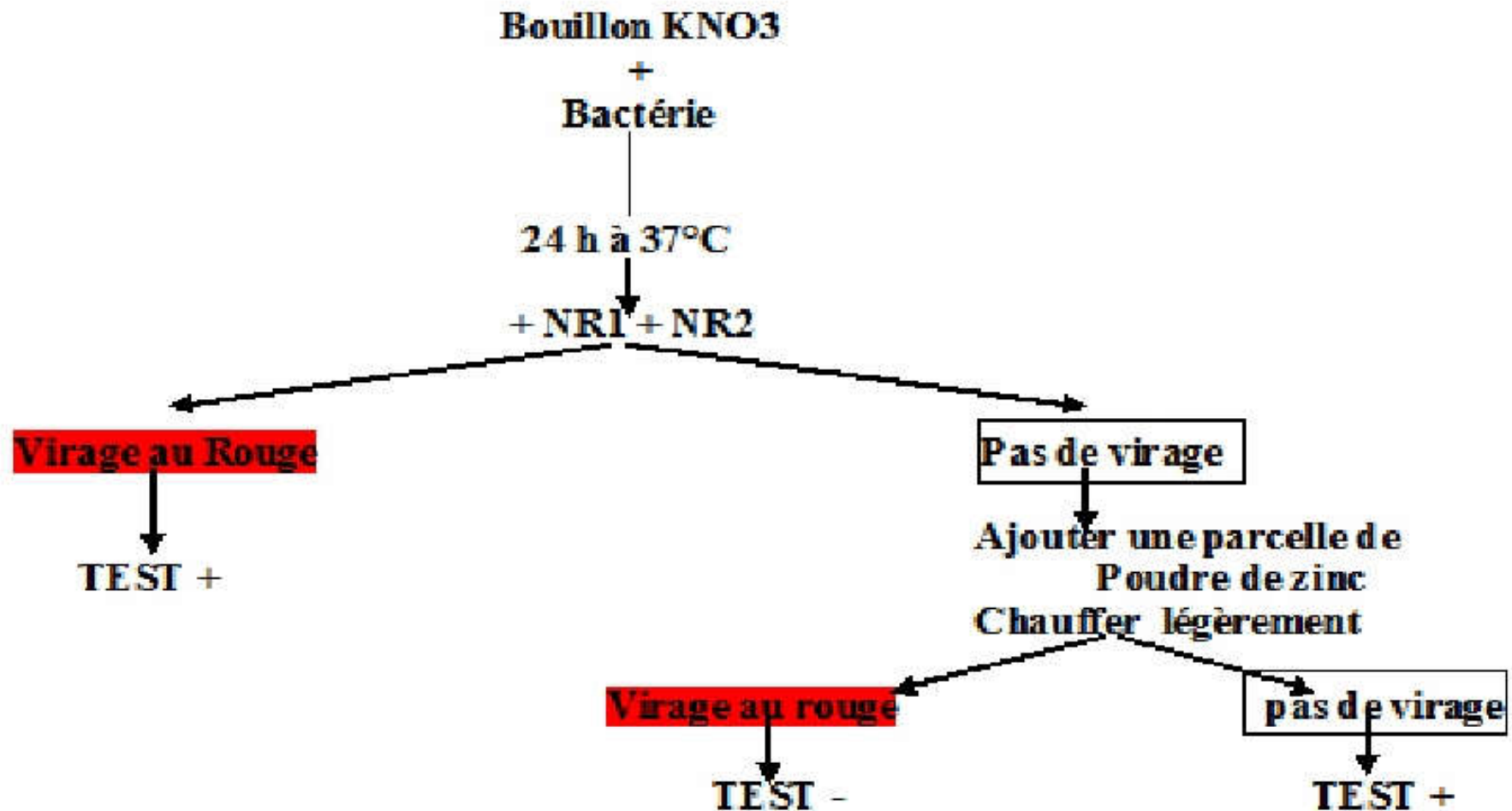


2-5-4- Test de GRIESS-ILOSWAY :

Bouillon Nitrate à 1‰ KNO_3 ensemencé à partir de la souche à étudier

Réactifs de révélation : Acide Sulfanilique et alpha-naphtylamine

Poudre de Zinc



RECHERCHE DE NITRATE REDUCTASE



Beillon Nitraté



Kilieu Mannitol-
Mobilité

2-5-4- Etude de la voie fermentaire des Acides complexes: Bouillon CLARK et LUBS

Bouillon CLARK et LUBS inoculé par une goutte d'une suspension trouble de bactéries.

Après 18h à 37°C, on divise le bouillon dans 2 tubes stériles.

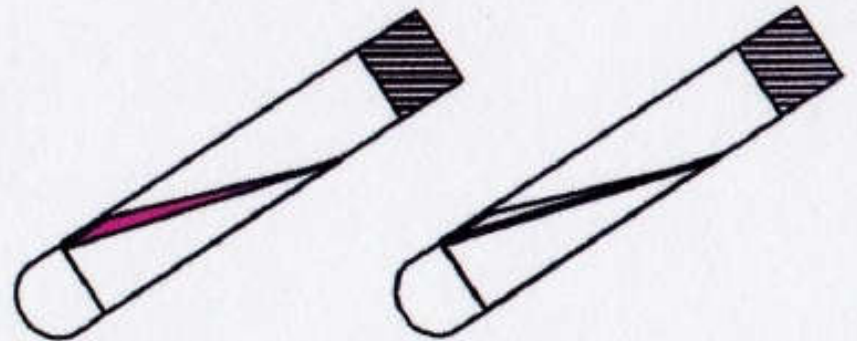
Chaque tube sert à révéler une des 2 voies :

- Voie des Acides mixtes : Addition d'une goutte de ROUGE de METHYL (test au RM)
- Voie Butylène-Glycolique : Addition de 2 gouttes de KOH à 10% et d'Alpha-naphtol (Réaction de VOGES-PROSKAUER)



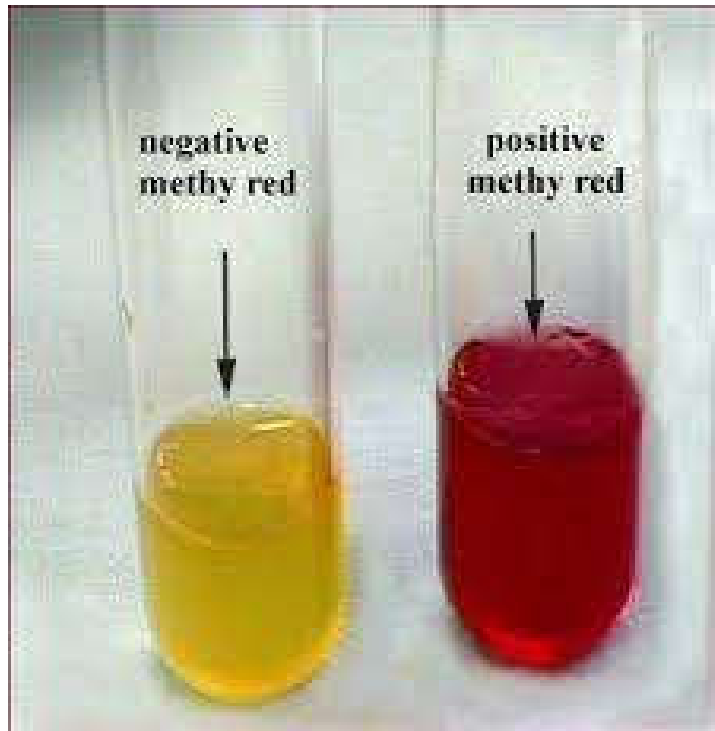
Jaune : RM⁻

Rouge : RM⁺ (beaucoup d'acides produits)

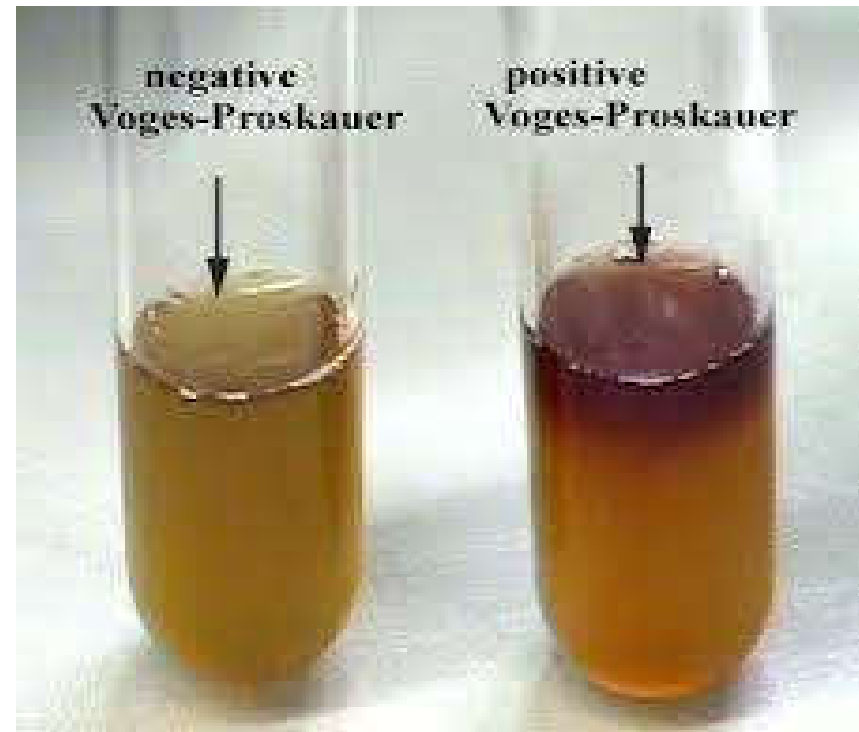


Coloration rouge cerise : VP⁺

Pas de coloration VP⁻



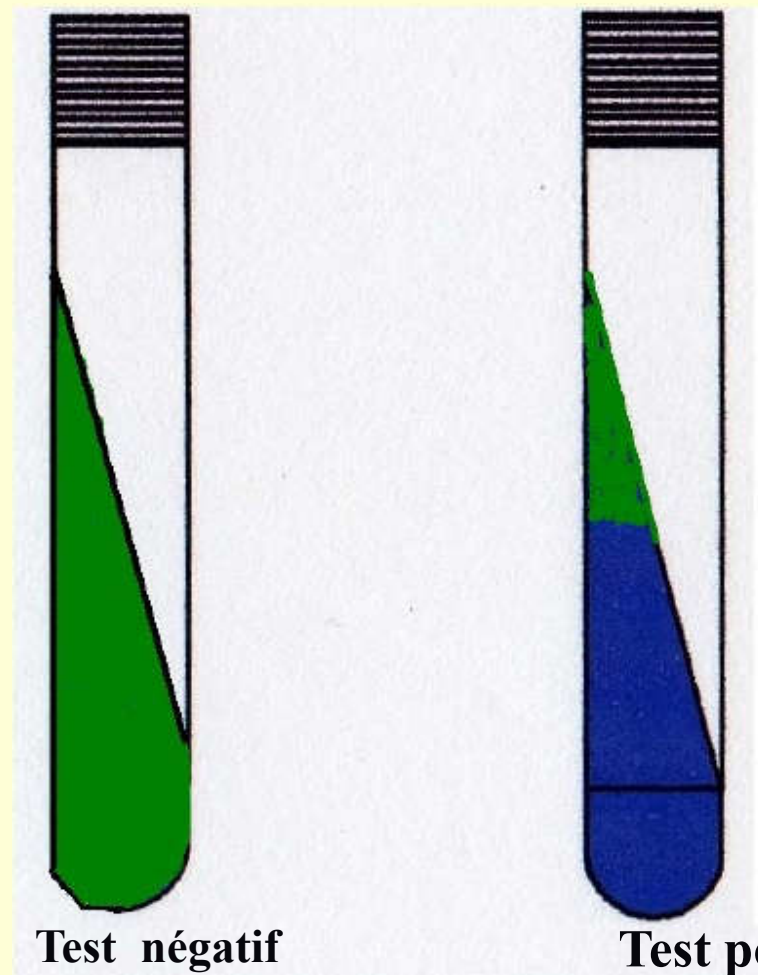
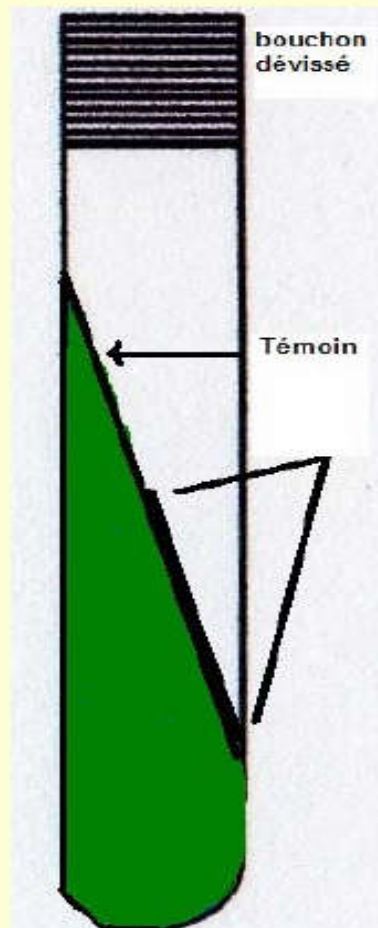
RM+ : e.coli ,citrbacter
Bactérie lac +



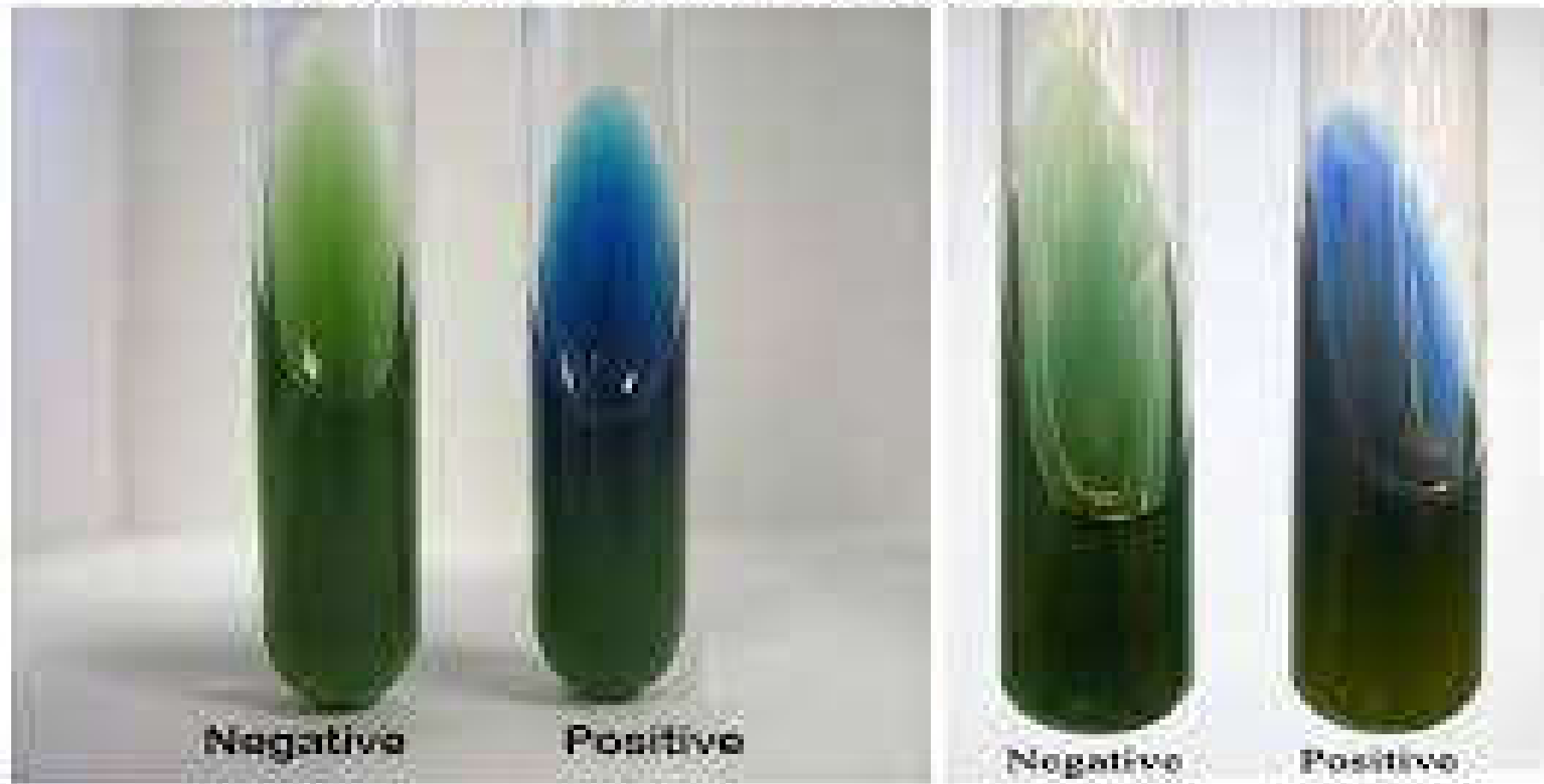
VP+: klebsiella, enterobacter,
Serratia (KES)

**2-5-5- Utilisation du Citrate comme seule source de Carbone :
Milieu au Citrate de SIMMONS ou au Citrate de KRISTENSEN**

**Milieu au
Citrate de
SIMMONS**



Citrate Utilization Test





3- Métabolisme Glucidique :

3-1- L'Auxanogramme : Etude d'une gamme de sucres dégradables par la bactérie (en milieu liquide ou solide)

3-2- L'étude de l'attaque des sucre en :

- **Milieux glucidiques gélosés simples : gélose + sucre + indicateur de pH (exemple : le milieu Mannitol-mobilité-nitrate)**

- **Milieux gélosés glucidiques complexes :**

TSI (Tri-Sugar-Iron) et

KIA (Kligler-Iron-agar)

Ce sont des géloses inclinées avec pente +culot :

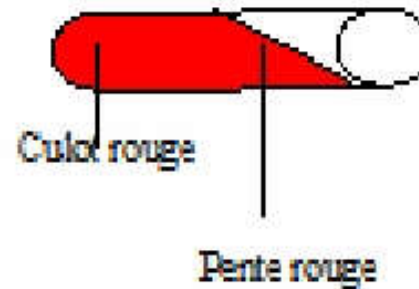
1‰ Glucose et 10‰ Lactose et Saccharose

L'indicateur de pH est le Rouge de Phénol

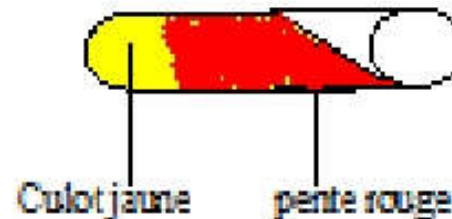


Lecture : T.S.I.

Bactérie
oxydative



Bactérie
fermentaire
lactose – et saccharose –



l'attaque des peptones
alcalinise la pente

Bactérie
Fermentaire
lactose + et/ou Saccharose +



l'attaque des peptones
alcalinise la pente mais
l'acidification par attaque des
sucres prend le dessus.

301

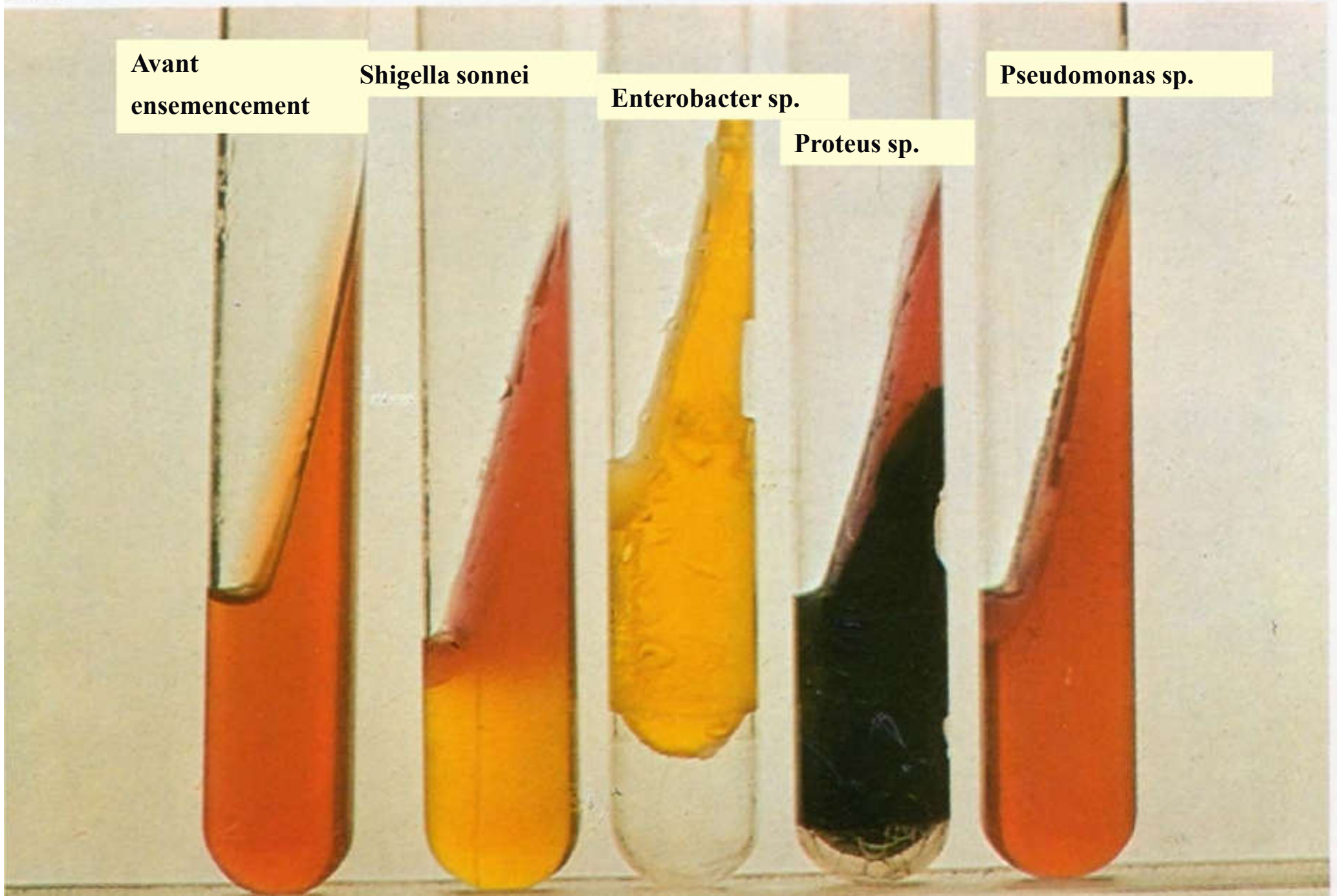
Avant
ensemencement

Shigella sonnei

Enterobacter sp.

Proteus sp.

Pseudomonas sp.





Mannitol-Mobilité



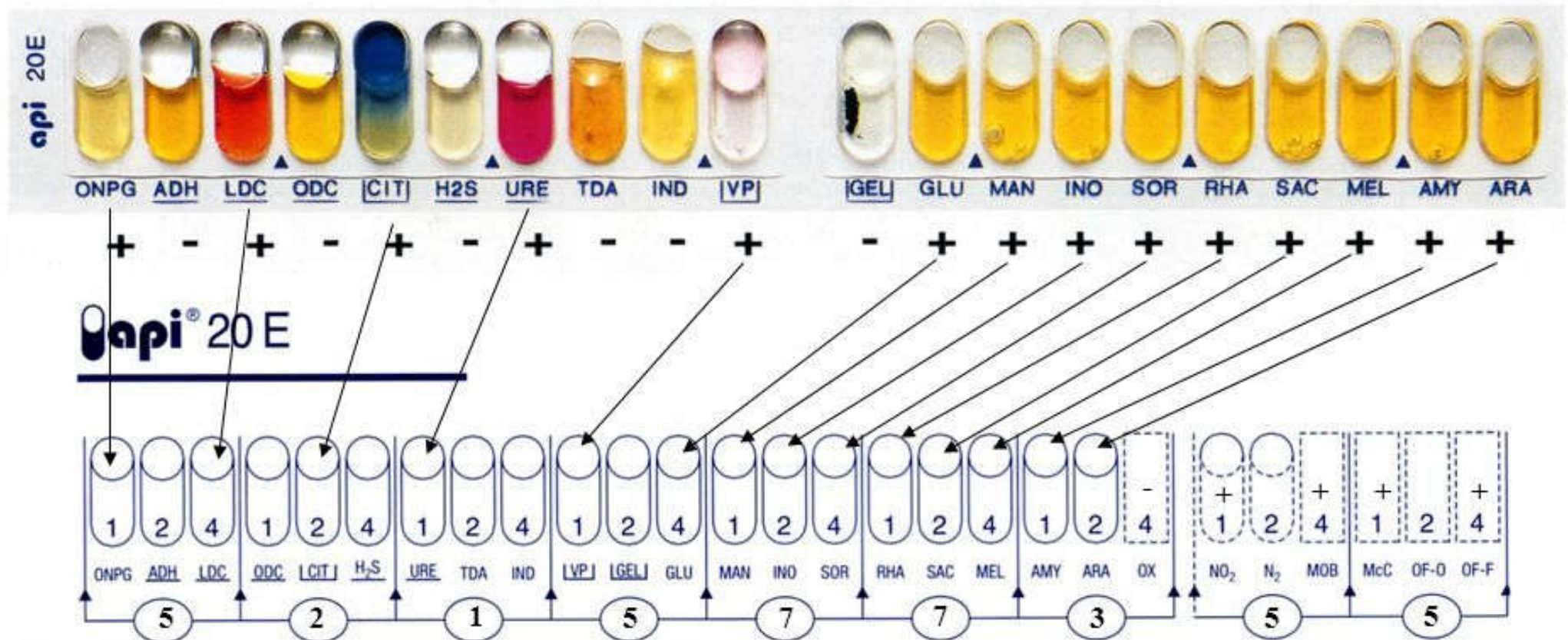
Galerie API 20E (identification des Enterobactéries)



Exemples de Milieux Glucidiques simples

5- Identification de la souche

Résultats de la galerie:



Résultats reportés sur la fiche d'identification

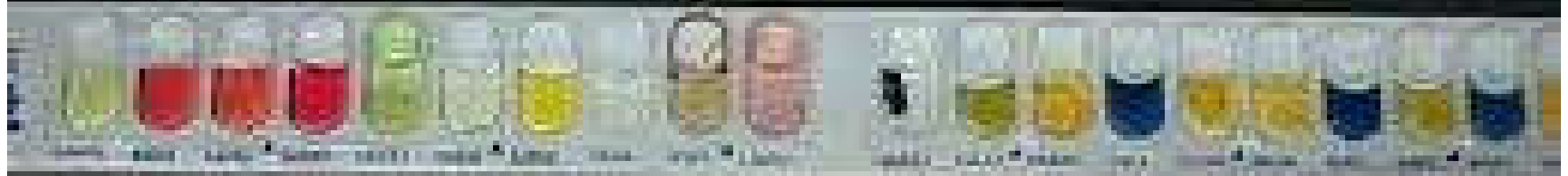
Coden°: 5 215 773 (55)

Ident.

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code



Salmonella



E. coli



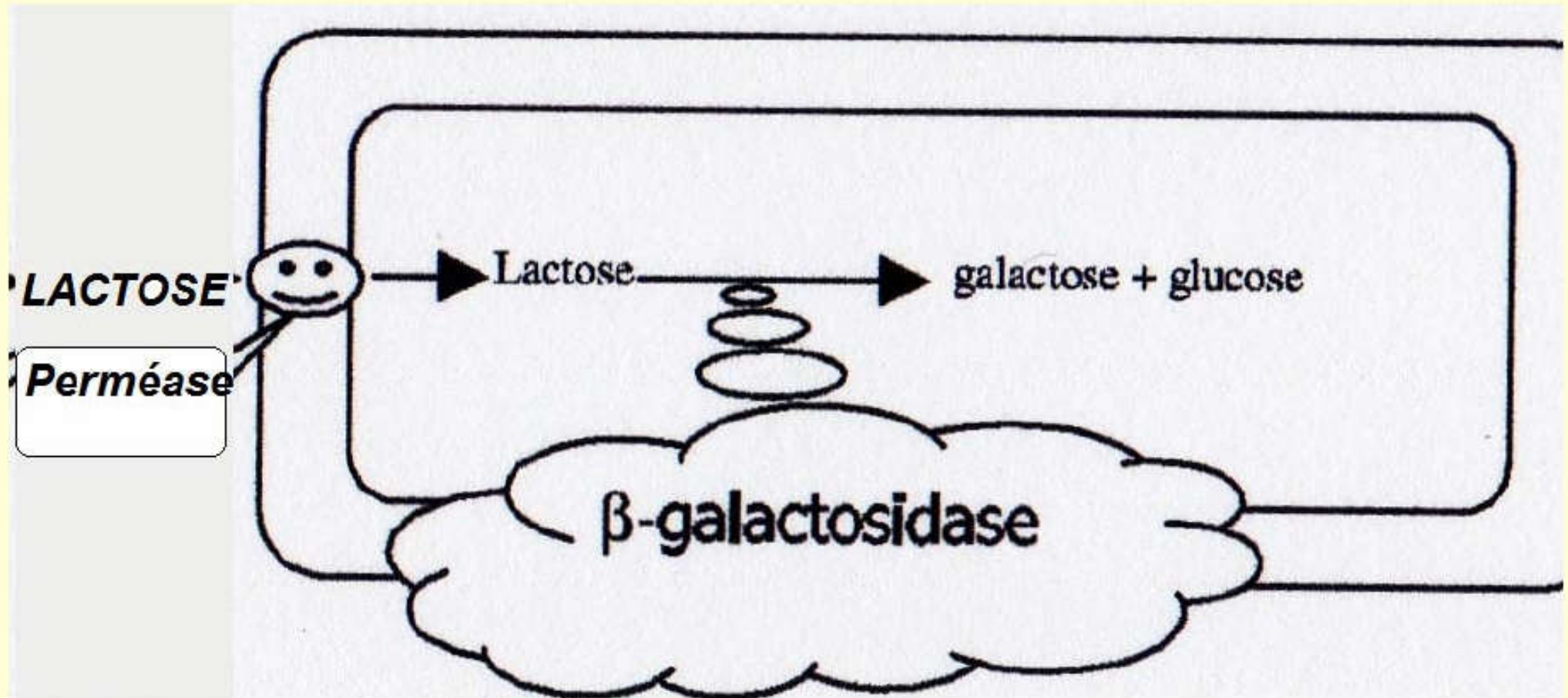
Klebsiella pneumoniae

3-3- Révélation d'enzymes du métabolisme glucidique:

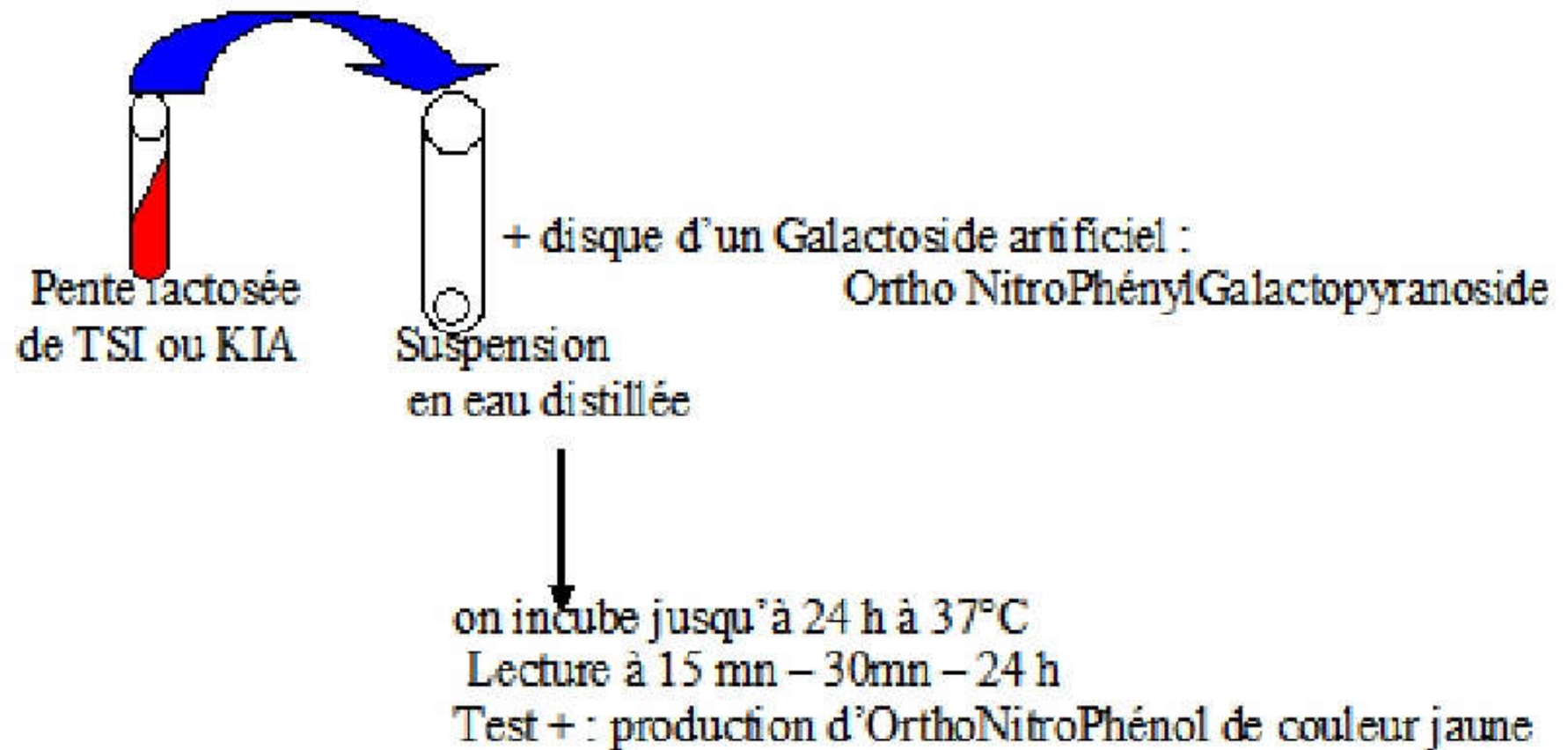
on détecte essentiellement la Bêta galactosidase , enzyme qui dégrade le lactose en glucose et galactose.

Cette enzyme a 2 caractéristiques : 1) elle est intra-cellulaire
2) elle est inductible

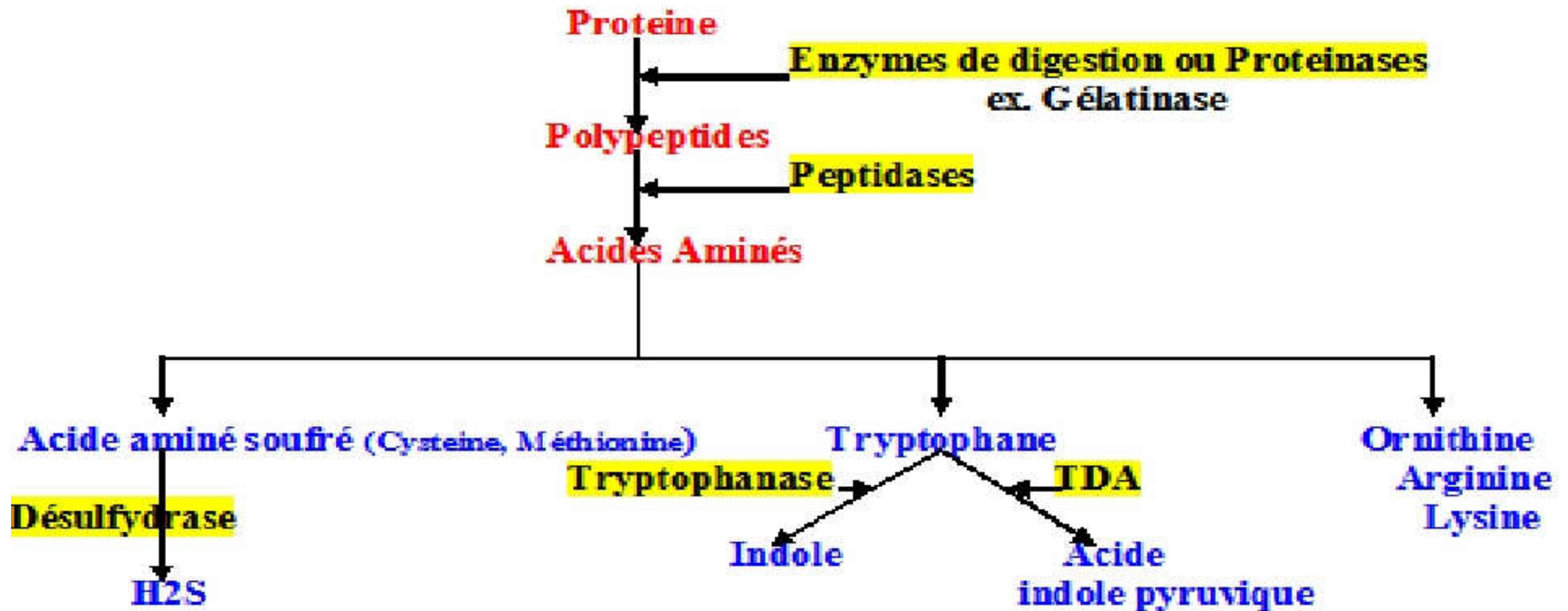
Il faut donc une perméase pour faire passer quelques molécules de lactose en intra-cellulaire et induire la synthèse de l'enzyme.



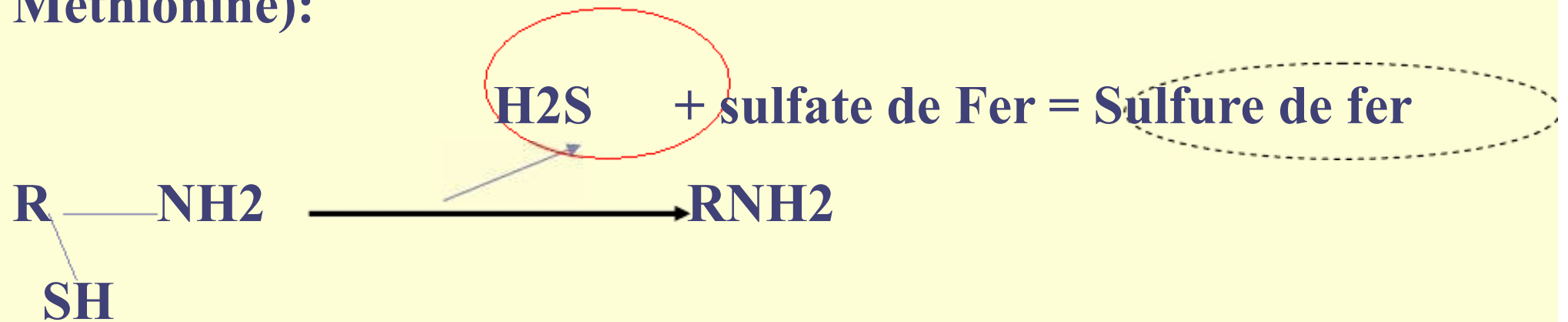
Le test de laboratoire est appelé test ONPG



4- Métabolisme Protidique :



4-1- Métabolisme des Acides Aminés soufrés (Cystéine, Méthionine):

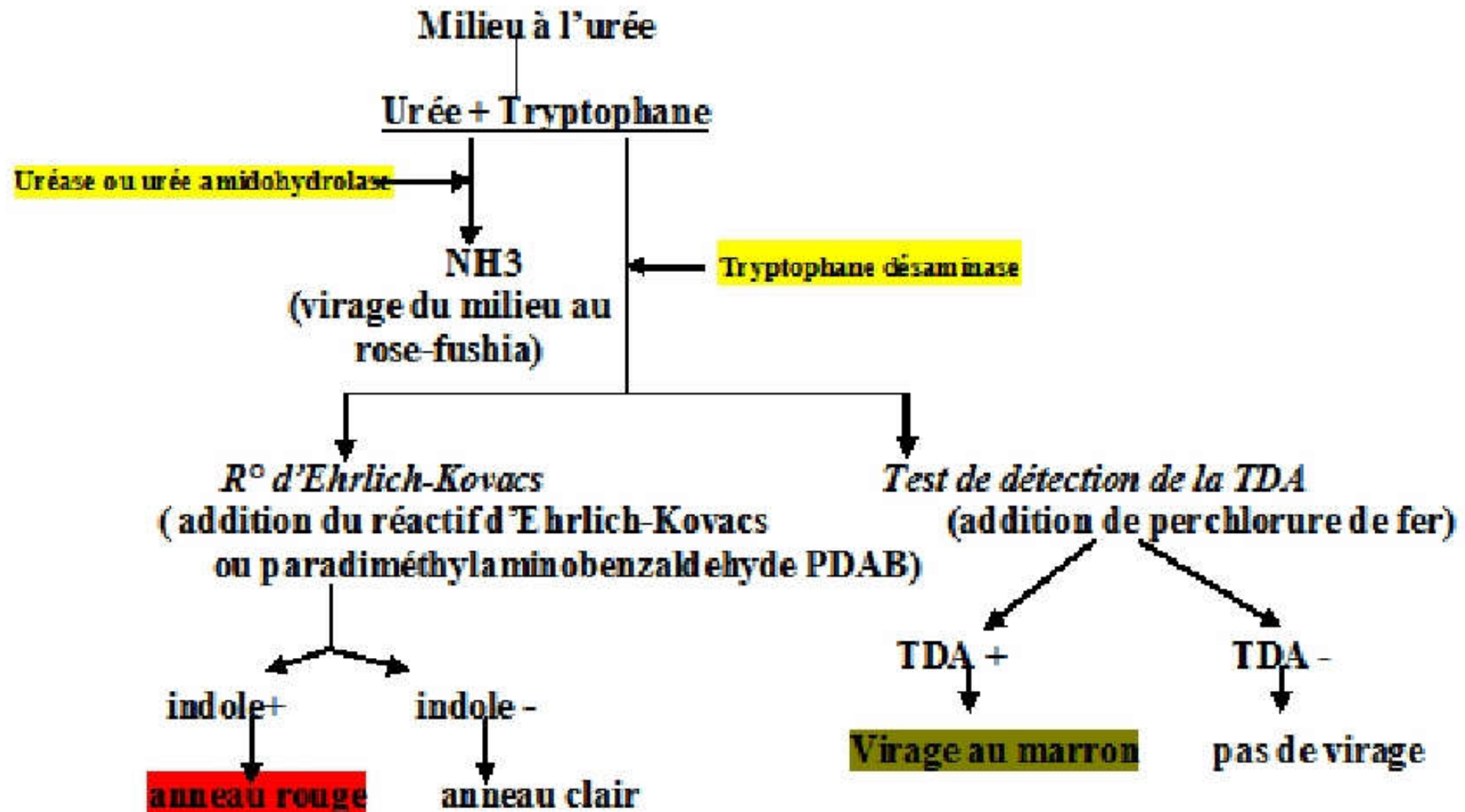


TEST : On utilise le milieu TSI ou KIA (milieux glucidiques gélosés complexes) qui contiennent Thiosulfate de sodium (liaison thiol)



TSI : fermentation Glucose,Lac,Sacc
Production de gaz
H₂S (noircissement du milieu)

4-2- Métabolisme de l'urée et du Tryptophane



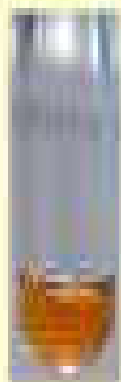
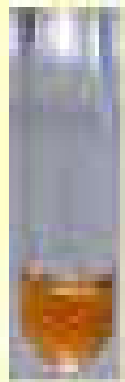
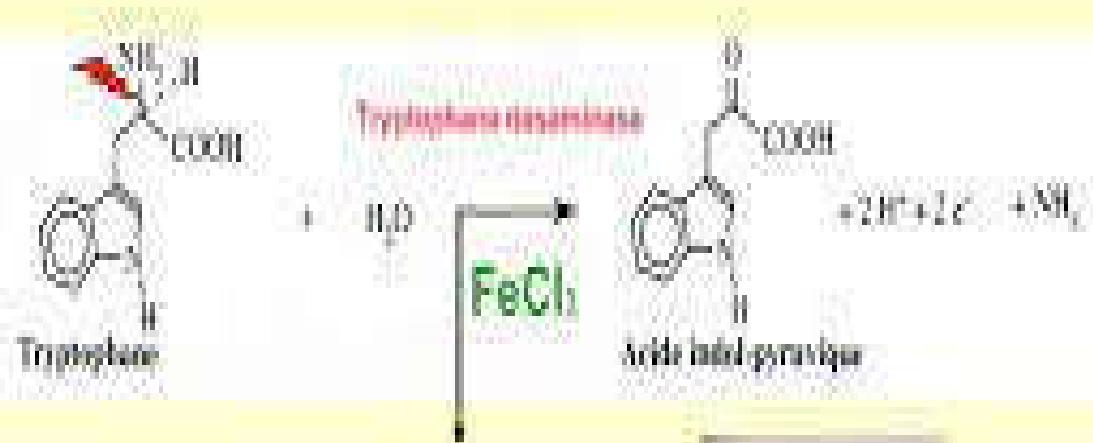


Uréease+: KP, proteus



Indole+: e.coli, proteus vulgaris

Recherche de la Tryptophane DésAminase (TDA)

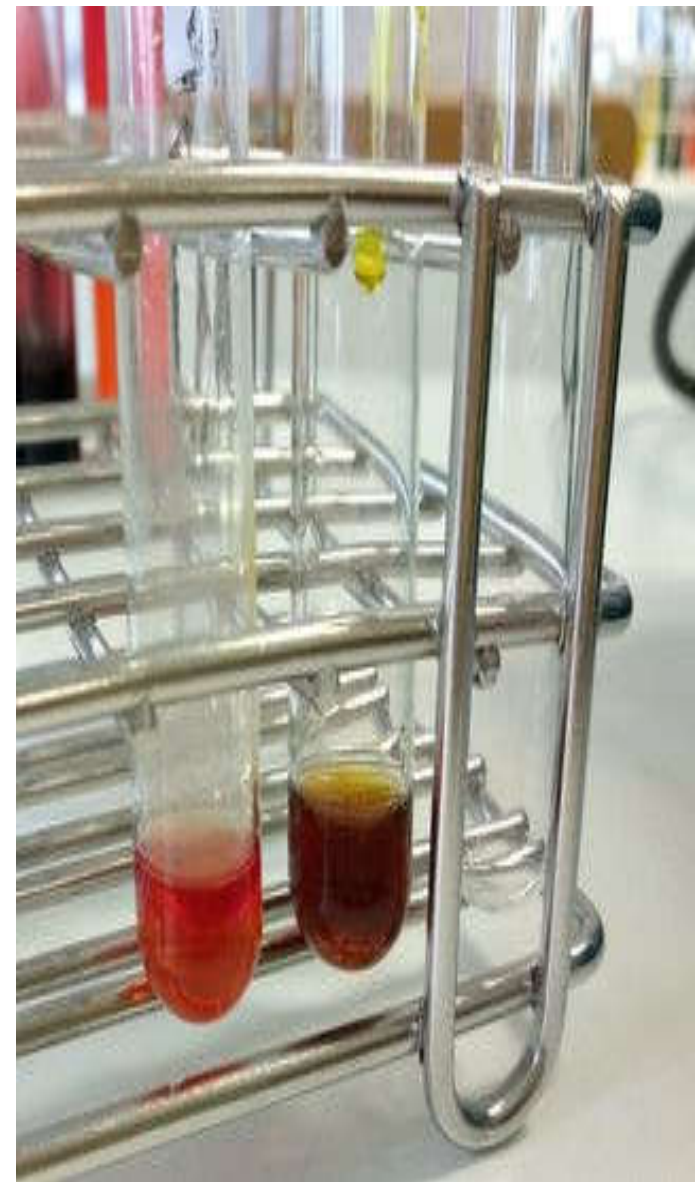


TDA -



Précipité
marron

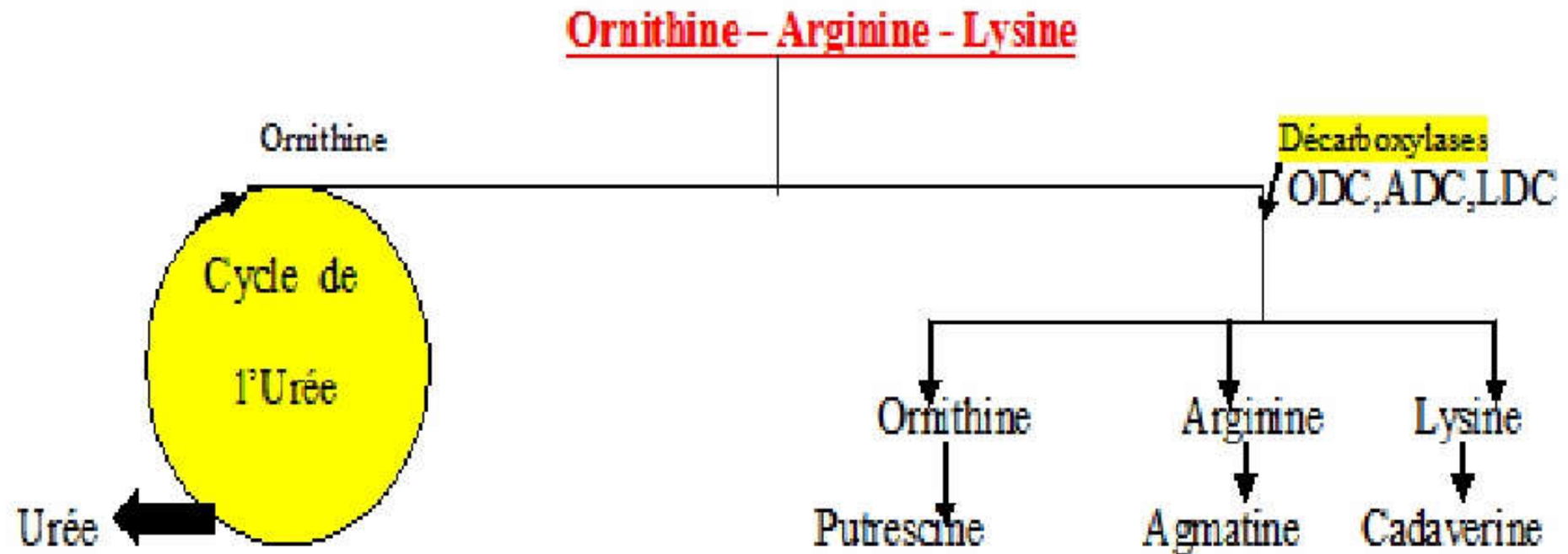
TDA +



TDA+ : groupe PMP

4-3- Catabolisme des Acides Aminés:

Catabolisme de l'Ornithine, Arginine et Lysine :



Le test des décarboxylases :

Au laboratoire , on met en évidence les décarboxylases sur milieu de MOELLER-FALKOW :

(sucre=Glucose , Indicateur=Pourpre de Bromocrésol

Vaseline
stérile

Milieu + Ornithine

Milieu + Arginine

Milieu + Lysine

Témoin milieu



négatif

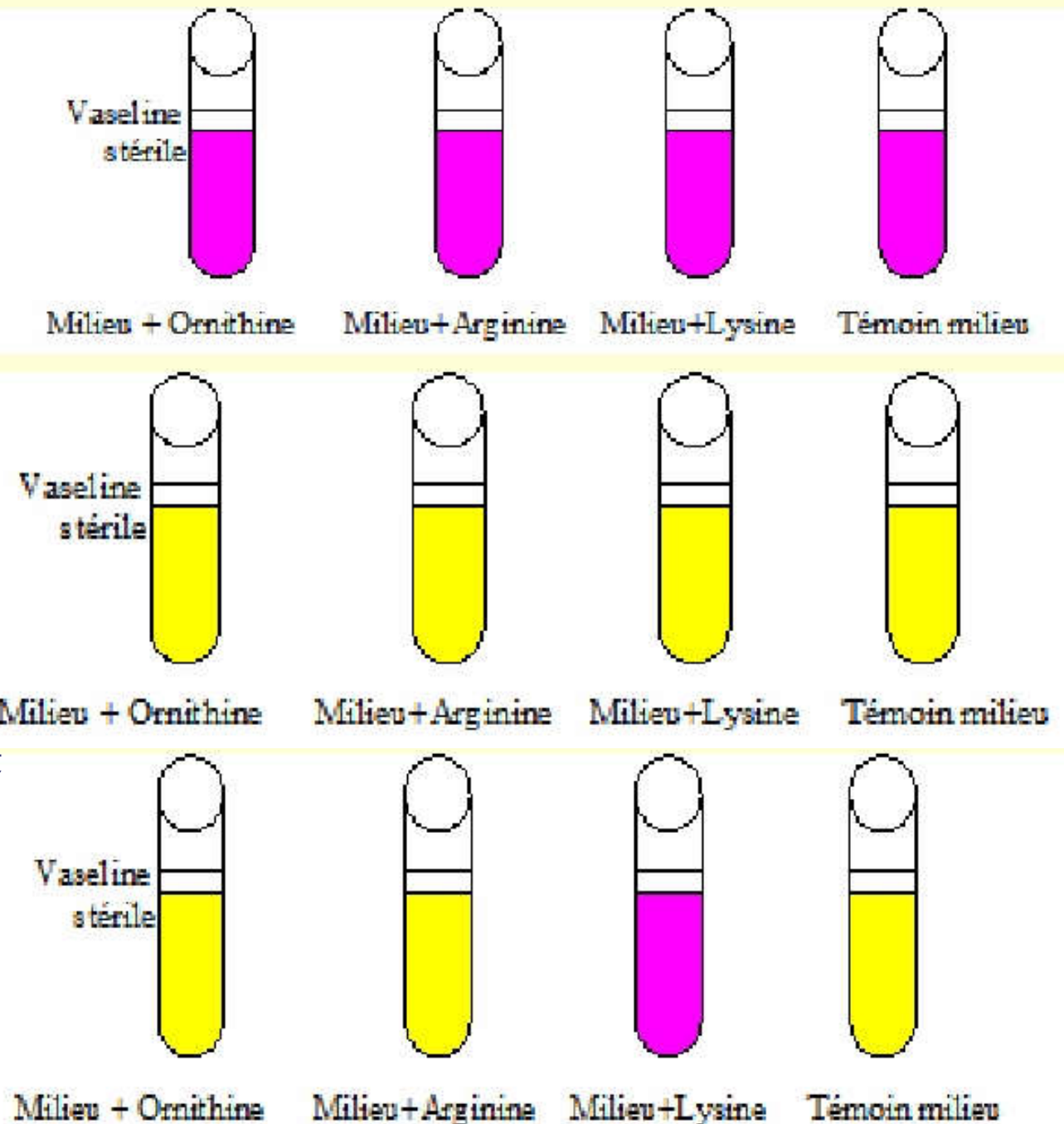
positif

1^{er} temps : Au départ, tous les tubes sont « couleur violette »

2^{ème} temps : Acidification de tous les tubes par attaque du glucose: Tous les tubes virent au « jaune »

3^{ème} temps : Décarboxylation et libération de catabolites alcalins d'où virage au bleu violacé- le tube témoin reste jaune

**Lecture : tube jaune : négatif
tube violet : positif**





MERCI POUR VOTRE ATTENTION