

Introduction au métabolisme

La cascade de signalisation est le mécanisme par lequel une cellule répond à un signal (chimique, électrique...). Elle aboutit à la réalisation d'activités cellulaires, par exemple, la synthèse de protéines. Elle se compose de trois phases :

1. La réception du signal extra-cellulaire par un récepteur.
2. La réalisation de voies de transduction c-à-d d'un ensemble de processus cellulaires.
3. La réponse cellulaire.

État stationnaire les concentrations en composés restent stables. Elles sont maintenues par la cellule grâce à des échanges de matière et d'énergie.

Pour fonctionner, les cellules ont besoin d'énergie qu'elles extraient soit de :

La dégradation de molécules (chimiotrophe)	La photosynthèse (phototrophe)
--	--------------------------------

L'énergie libérée est stockée dans un nombre réduit de molécules telles que l'ATP ou NADPH. L'énergie chimique pourra être libérée pour servir à :

- Créer des liaisons et fabriquer des molécules plus complexes à partir de plus simples.
- Lutter contre l'entropie (par exemple, en maintenir un gradient chimique).

Les molécules de stockage de l'énergie

Les molécules riches en énergie sont :

l'ATP	Les nucléotides triphosphate	Les dérivés nicotinamides
-------	------------------------------	---------------------------

L'ATP est formée d'une adénine et d'un ribose (adénosine) et de plusieurs groupements phosphates.

La rupture d'une liaison phosphate-phosphate comme pour l'hydrolyse de l'ATP libère $G^{0'} = 30,5 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} = 7.3 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ en condition standard (1 atm et 25 °C) et $G^{0'} = -50 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ à 37 °C.

Chimiosmose processus d'utilisation du gradient électronique pour effectuer un travail. C'est la chimiosmose qui permet la synthèse de l'ATP.

Rendement biomasse formée (g)/substrat consommé

Introduction aux réactions métaboliques

Le métabolisme possède deux composantes, les activités :

Anaboliques (synthèse de molécules)	Cataboliques (dégradation de molécules)
-------------------------------------	---

L'activité anabolique consiste à additionner de petites molécules simples pour en former des plus complexes. Cette opération nécessite de l'énergie.

Rmq : Une réaction thermodynamiquement impossible c-à-d endergonique peut se dérouler si elle est couplée avec une réaction exergonique.

Voie métabolique successions de réactions intermédiaires qui permettent d'obtenir un produit.

Rmq : certains intermédiaires servent dans plusieurs voies métaboliques.

Compartmentation de l'organisme

L'apparition des compartiments a permis :

- De faciliter la rencontre entre les substrats.
- à des réactions antagonistes de pouvoir se dérouler au même moment dans la cellule.

On trouve des compartiments à la fois au niveau :

- Cellulaire (Cellulaire mitochondrie, cytosol, lysosome, REL, peroxyosome).
- Tissulaire (par exemple, le foie produit du glucose).

Rmq : Il est possible de catégoriser les organes en fonction de leur rôle : utilisateur, de stockage ou synthétiseur.

Réaction

Pour qu'une réaction chimique est lieu, il faut que les molécules atteignent un niveau d'énergie plus élevé que celui initial appelé état de transition. Les réactions principales sont :

- Hydrolyse (hydrolase).
- Addition/élimination.
- Isomérisation (isomérase) transfert d'un groupement au sein d'une molécule.
- Transfert de groupe (transférase) transfert d'un groupement entre deux molécules.
- Oxydo-réduction (oxydoréductase). Elle utilise deux sortes de co-enzymes NADH et FADH₂.
- Ligation (ligase) liaison entre deux substrats. Ce type de réaction nécessite de l'ATP.

Rmq : Les réactions où l'état de transition est inférieur au niveau d'énergie sont spontanées et par définition, elles ont déjà eu lieu.

Les réactions font intervenir des transporteurs.

Particules échangées	Transporteurs
Groupe acyle (ex : cétone)	Coenzyme A
Électrons	NADH FADH ₂
Énergie	ATP

Les enzymes

Les enzymes sont des protéines qui jouent le rôle de catalyseur. Elles servent à faciliter la réaction c'est-à-dire à augmenter sa vitesse en :

- Diminuant la barrière énergétique de la réaction.

- Facilitant la rencontre et le positionnement des groupements réactionnels.

La régulation de l'activité métabolique peut se faire par :

- La régulation de la quantité d'enzymes disponible. Elle dépend de l'activités de dégradation et de synthèse pré ou post traductionnelle.
- La catalyse enzymatique. Par exemple, l'ajout de groupement sur certaines protéines permet de modifier l'activité de l'enzyme comme pour les enzymes digestives qui adoptent leur conformation active à la suite d'une coupure d'une partie de la chaîne peptidique.
- L'accessibilité du substrat. Par exemple, la quantité de glucose dans la cellule dépend du nombre de molécules phosphorylées.

Les sites de contrôle sont souvent des étapes irréversibles.

Régulation des enzymes

Le rétrocontrôle enzymatique peut être :

Positif	Négatif (ou inhibiteur)
---------	-------------------------

L'inhibiteur peut être réversible ou irréversible. Dans le deuxième cas, le site de liaison est permanent sur le site actif (compétitif) ou non (non compétitif).

La catabolisme

Le catabolisme consiste en :

1. La dégradation de macromolécules en petites unités :
 - Les lipides en acide gras et glycérols par les lipases.
 - Les protéines en acides aminés par les protéases (appelé aussi peptidases). Elles subissent une dénaturation par la diminution du pH pour pouvoir être dégradées.
 - Les polysaccharides (polymère de sucres) en glucose et sucres simples par les glycosidases.

2. Une partie des plus petites unités est transformée en un nombre restreint de molécules appelées métabolites comme le pyruvate ou l'acétyl-coA. Par exemple :

- l'oxydation complète de l'acétyl-coA sert à produire les molécules énergétiques notamment l'ATP au cours du cycle de l'acide citrique et de la phosphorylation oxydative.
- Le pyruvate sera utilisé dans la fermentation alcoolique, la respiration aérobie et la production de lactate dans les cellules musculaires.

Rmq. : seuls les nucléotides issus de la dégradation de ADN, ARN par les nucléases ne peuvent pas être utilisés pour fabriquer de l'énergie.

La respiration cellulaire

La respiration cellulaire consiste à extraire l'énergie du acétyl-CoA en utilisant du dioxygène pour recharger l'ADP en ATP. Elle a lieu dans les mitochondries et est composée :

1. Du cycle de l'acide citrique (cycle de Krebs).
2. De la phosphorylation oxydative.

L'énergie stockée dans l'ATP pourra être libérée pour réaliser :

- Les mouvements des flagelles
- Le transport actif de solutés
- La polymérisation
- La contraction musculaire

Rmq. : la glycolyse est le mécanisme qui génère la majorité de l'acétyl-coA et donc de l'énergie dans les cellule aérobies. Une mole de glucose permet de produire en moyenne 32 moles ATP.

La mitochondrie

La mitochondrie est composée de :

- Une membrane externe est perméable protéines canaux = porine, transporteur laisse passer les protéines (TOM et TIM).
- Une membrane interne comportant de nombreux replie appeler crête qui augmente sa surface. C'est le lieu de la chaine respiratoire.
- La matrice mitochondriale qui contient notamment de l'ADN et des ribosomes servant à la synthèse de protéines spécifiques.

Production d'acétyl coA pour le cycle de l'acide citrique

Le cycle de l'acide citrique a comme substrat l'acétyl-coA. Il est produit à partir

- De l'oxydation du glucose.
- D'acide gras découpés en morceaux de deux carbones (groupement acétyl) au cours de la bêta oxydation. Cela a lieu dans la mitochondrie. Au cours de cette réaction, il y a production de FADH_2 .

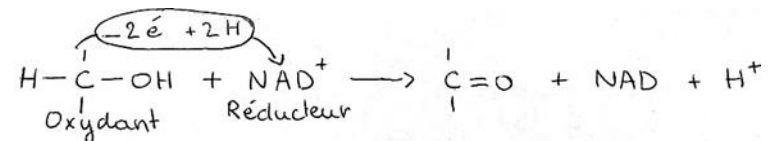
Rmq. : Une partie de l'acétyl-coA est modifiée pour produire certains acides aminés.

Le cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs)

Le cycle de l'acide citrique qui produit 2x ATP, 3x NADH, 1x FADH_2 . Ces deux derniers serviront notamment à la phosphorylation oxydative. Le cycle libère deux CO_2 .

Le cycle se déroule en huit étapes avec notamment :

1. L'acétyl-coA est ajouté à une molécule d'oxaloacétate pour produire du citrate.
2. Les électrons sont apportés au NAD^+ par la déshydrogénase qui devient du NADH.



3. Le malate est retransformé en oxaloacétate et du NADH est produit.

Rmq : le NAD^+ est un dérivé de la vitamine B_3 .

Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative est l'étape qui produit 90% de l'ATP. Il est composé de deux étapes :

1. La chaîne de transport d'électrons qui crée le gradient de H^+ .
2. La chimiosmose qui phosphoryle l'ADP en ATP.

Chaîne de transport

Les électrons sont apportés à la chaîne de transport par le NADH (et le FADH_2) puis ils sont transférés par une succession de transporteurs dont le niveau d'électronégativité augmente au fur et à mesure ce qui a pour effet de les attirer et de libérer progressivement l'énergie. L'élément le plus électronégatif, le dioxygène, se trouve en bout de chaîne. Il se combine avec quatre protons (H^+) et quatre électrons pour former deux molécules d'eau. Durant leur trajet, l'énergie totale libérée est de -222kJ/mol .

Rmq : En absence de dioxygène, l'accepteur final peut être substitué par l'ion sulfate SO_4^{2-} qui se combine pour former du H_2S (qui confère une odeur d'œuf pourri). C'est la respiration anaérobie.

Les chaînes de transport d'électrons sont enchâssées dans :

Eucaryotes dans la membrane des mitochondries.	Procaryotes dans la membrane plasmique.
--	---

La chaîne de transport est constituée d'une succession de complexes multiprotéiques qui contiennent les accepteurs et qui sont associés à des groupements non protéiques appelés prosthétiques.

Le NADH présent dans la matrice mitochondriale apporte les électrons au complexe I. Puis ils passent successivement entre les accepteurs :

1. Complexe I (ou complexe II pour le FADH_2) avec comme accepteur la flavine mononucléotide (FMN) puis un Fe-S.
2. Les électrons sont apportés au complexe III par une ubiquinone appelés coenzyme Q, qui est mobile dans la membrane.
3. Complexe III avec comme accepteur un cytochrome puis Fe-S puis un cytochrome.
4. Un cytochrome libre apporte les électrons au complexe IV.
5. Complexe IV composé de deux cytochromes.
6. À la fin les électrons se combinent avec le dioxygène O_2 (accepteur final) et deux H^+ présent dans la matrice, pour former de $2\text{H}_2\text{O}$.

Au cours de leur voyage, les électrons font fonctionner des pompes à protons, présent dans le complexe I, III, et IV, qui transfèrent des H^+ de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire (au total 3 pour NADH et 2 pour FADH).

Rmq : FADH peut remplacer NADH en donnant ses électrons au complexe II qui ne produit pas de gradient. Les électrons produiront 33% d'énergie en moins.

Rmq : le cyanure est un inhibiteur des cytochromes.

Le NADH entre dans la mitochondrie par un système de navette. Le NADH sert à transformer l'oxaloacétate en malate. C'est ce dernier qui est transloqué puis retransformé en oxaloacétate pour régénérer le NADH.

Le FADH_2 est transporté par les navettes G3P/DHAP.

Phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative utilise le gradient d' H^+ créé par les complexes de la chaîne de transport dans l'espace intermembranaire. Le gradient ionique est ensuite dissipé pour régénérer au maximum entre 26 et 28

molécules d'ATP en négligeant les pertes et l'utilisation du gradient H^+ dans d'autres processus.

Bilan

La glycolyse a un rendement de 34% comparativement au moteur de voiture qui est de 25%. En comptant la glycolyse, une molécule de glucose permet de produire 32 molécules d'ATP.

Rmq. : Une partie de l'énergie est dissipée sous forme de chaleur n'est pas totalement perdue puisqu'elle sert au maintien de notre température corporelle.

Métabolisme du glucose

Le sucre entre dans la fabrication de nombreux constituants comme les graisses, les aa, les nucléosides.

- Oxydation par la voie des pentoses P.
- Oxydation par glycolyse.
- Mise en réserve sous forme de glycogène dans le foie et les muscles.
- Synthèse de polymères structuraux.

Le glucose circule dans les cellules par diffusion facilitée grâce à des transporteur GLUT. Il ne peut plus circuler lorsqu'il est transformé en glucose-6-phosphate qui sert alors à :

- La glycolyse pour produire du pyruvate grâce à l'enzyme hexokinase.
- Être déphosphorylé par une glucose-6-phosphatase présente dans le foie et les reins pour redevenir du glucose et être relâché dans le sang pour maintenir la glycémie. La régulation de la glucose-6-phosphatase se fait par une hormone, le glucagon.

Les sources de glucose

Le glucose-6-phosphate peut être fabriqué à partir de la dégradation de :

Du lait (disaccharide : Glucose + Galactose)	Galactose	Fructose
--	-----------	----------

Glycogénolyse processus qui sert à fabriquer des glucose-6-phosphate à partir du glycogène.

Gluconéogenèse production de glucose à partir de précurseurs comme le glycérol, le lactate, les acides aminés.

Néoglucogénèse

La glycogénèse est une voie métabolique qui permet la production de glucose à partir de deux pyruvates pour maintenir la glycémie constante. Elle sert notamment aux globules rouges ou à certaines cellules du cerveau qui ne sont pas capables de produire leur énergie à partir de molécules autres que le glucose.

Rmq. : les globules rouges ne possèdent pas de mitochondries et produisent leur ATP par fermentation lactique.

La glycogénèse est régulée par le glucagon, une hormone.

Rmq. : Elle est particulièrement active en cas de jeûne.

Plusieurs précurseurs peuvent servir de substrats :

- certains acides aminés.
- le lactate.
- le glycérol. Lorsqu'il est transformé, il y a production de corps cétoniques qui confère à l'haleine une odeur rance.
- le pyruvate

Trois organes sont capables de réaliser la glycogénèse : le foie (principalement), les reins et l'intestin.

La glycolyse

La glycolyse est l'ensemble des réactions qui permet de transformer le glucose-6-phosphate en deux pyruvates : $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_3H_3O_3^-$

Le procédé nécessite un investissement deux molécules d'ATP pour être initié et génère 4 ATP et 2 NADH.

La réaction consiste à :

1. Ajout d'un groupement phosphate qui empêche la molécule de sucre de sortir de la cellule et qui la rend plus réactive. Cette étape nécessite l'utilisation d'un ATP et est catalysée par une hexokinase dans les cellules musculaires et une glucokinase dans le foie et le pancréas.
2. Transfert d'un groupement au sein de la molécule pour produire un fructose.
3. Ajout d'un nouveau groupement phosphate. Cette étape nécessite l'utilisation d'un ATP et est catalysée par la phosphofructokinase.
4. Clivage.
5. Récupération et oxydation pour obtenir deux pyruvates.

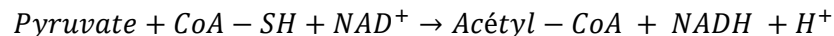
Rmq : le départ de la glycolyse est l'embranchement de nombreuses voies de synthèse comme celle qui conduit à produire du ribulose pour la fabrication des nucléotides ou des triglycérides.

Les deux pyruvates peuvent ensuite servir dans :

Un prolongement de la glycolyse appelé fermentation	La respiration cellulaire
---	---------------------------

La respiration cellulaire

Le pyruvate est ensuite converti en acétyl-CoA dans les mitochondries pour être utilisé pour la respiration :



La fermentation

La fermentation est le prolongement de la glycolyse : le pyruvate est transformé pour devenir un accepteur d'électron. Elle permet de produire

deux molécules d'ATP et régénérer le NAD^+ pour la glycolyse. Il existe deux types de fermentation :

Alcoolique qui produit de l'éthanol. $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3^- \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4\text{O} + -\text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_5\text{OH}$	Lactique qui produit du lactate. $\text{C}_3\text{H}_3\text{O}_3^- \rightarrow \text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3^-$
---	---

Dans la fermentation alcoolique, le pyruvate libère deux CO_2 avant d'être réduit contrairement à la fermentation lactique où il est directement réduit.

Effet de Crabtree : La concentration de glucose régule les enzymes de la respiration. Lorsqu'elle est trop élevée, ces dernières sont inhibées. C'est notamment le cas pour les levures. C'est ce phénomène qui est exploité dans la vinification lorsque le raisin est cueilli bien mur pour être riche en sucre.

Fermentation lactique

Les cellules musculaires produisent de l'ATP en utilisant la fermentation lactique lorsque l'oxygène vient à manquer. C'est notamment le cas lorsque l'on débute une activité physique. Le lactate est ensuite transporté au foie pour être converti en pyruvate.

Il semblerait que la glycolyse est une origine ancienne. Elle serait apparue avant que l'atmosphère est été saturé en dioxygène.

Il existe trois types de fermentation lactique :

Fermentation	Déchets métaboliques	Espèces
Homolactique	H^+	streptocoques
Hétérolactique	CO_2 et H^+	lactobacilles
Acéto-lactique	acide lactique et acétique	bifidobacterium

Rmq : la fermentation lactique est utilisée dans la production du fromage.

La fermentation alcoolique

La fermentation alcoolique peut être prolongée par la fermentation acétique qui sert à produire du vinaigre.

Le métabolisme associé aux lipides

La digestion et l'assimilation des lipides a lieu :

1. Au cours de la digestion, les triglycérides découpés en acides gras et le glycérol et les autres molécules liposolubles comme le cholestérol traversent la paroi des cellules intestinales, les entérocytes.
2. À l'intérieur de la cellule, les acides gras et le glycérol s'assemblent pour former des triglycérides.
3. Les lipides sont entourés par un complexe formé de lipides et de lipoprotéines, appelé chylomicron, pour permettre leur transport.
4. Les chylomicrons, appelés LDL, sont acheminés vers les tissus pour la production d'énergie et le stockage (adipocyte).
5. Les chylomicrons qui n'ont pas été utilisés, appelés HDL, sont traités par le foie.

Les chylomicrons sont stabilisés par des apolipoprotéines, un complexe.

Chylomicrons (CM) structure de protéines et de lipides formant une vésicule et entourant les triglycérides.

Stockage et libération des acides gras

Les acides gras sont stockés dans les cellules adipeuses. Des lipases présentes sur la membrane plasmique du côté du lumen des veines libèrent les lipides des chylomicrons qui, à cause de leur propriétés hydrophobes, vont dans les adipocytes.

La libération des lipides survient en réponse à certaines hormones, par exemple, l'adrénaline qui transportée dans le sang par une protéine, l'albumine.

Production d'énergie à partir d'acides gras

Les acides gras peuvent être transformés en acétyl-coA pour servir de substrat à la respiration cellulaire. Cette réaction a lieu dans la mitochondrie et se déroule suivant :

1. Les AG sont activés par l'ajout d'un Co pour former de l'acyl-CoA.
2. La translocation de l'acyl-coA dans les mitochondries c'est le passage de la membrane mitochondriale. Elle a lieu grâce à une translocase. L'acétyl-coA est transporté par un carnitine.
3. L'acyl-coA est transformé en acétyl-coA par une réaction de Beta-oxydation qui se déroule en quatre étapes :
 - a. La perte de deux carbones et la réduction d'un FAD^+ .
 - b. Hydratation.
 - c. La réduction d'un NAD^+ .
 - d. La coupure (thiolyse) par CoA.

Rmq: Un acide gras contient 4 fois plus d'énergie d'une molécule de glucose. C'est la raison pour laquelle il est plus difficile de perdre de la graisse.

Les méthodes d'études des protéines

Ces méthodes servent à identifier une protéine d'intérêt.

Pour dénaturer (déplier) une protéine, il faut utiliser deux types de substances :

- Des agents réducteurs qui suppriment les ponts disulfures
- Des dénaturants de suppriment les liaisons non covalentes (hydrogène ou Van der Waal).

Vocabulaire

Ne pas utiliser le terme tache. On parlera de bande ou de spot.

Dialyse technique consistant à diminuer la concentration de molécules en créant un gradient chimique.

Chromatographie ensemble de méthodes qui permet la séparation de composants chimiques.

Lyophiliser méthode qui consiste à retirer l'eau d'un produit en le congelant puis en faisant évaporer la glace par une baisse de la pression.

Westernblot (ou transfert de protéines) est une méthode combinatoire :

1. Électrophorèse sur gel.
2. Transfert sur une membrane.
3. Coloration des protéines.

Chromatographie

Il existe quatre types de chromatographie :

- d'exclusion qui sépare en fonction de la taille et de la forme appelé poids moléculaire en kDa.
- D'affinité qui filtre par affinité avec un ligand. Les composés se détachent progressivement (élus).
- D'échange d'ions. Des billes chargées retiennent les molécules d'intérêt et sont éluées progressivement.
- Sur couche mince.

Rmq. : il existe une chromatographie qui utilise des anticorps à la place des ions.

Chromatographie d'exclusion

Les molécules passent dans des billes percées. Plus la molécule est grosse plus vite elle sortira. On a une relation linéaire entre log de la taille en fonction du volume élué.

v_{mort} volume d'élution des plus grosses molécules, celles qui ne peuvent pas entrer dans les billes.

K_a coefficient de partage : $K_a = \frac{v_{élue} - v_{mort}}{v_{total} - v_{mort}}$.

Chromatographie d'échanges d'ions

Les protéines sont mises dans une colonne échangeuse avec des billes qui possèdent une charge opposée à la protéine d'intérêt. Les protéines sont détachées progressivement par plusieurs lavages (le solvant est appelé analyte) qui cassent les interactions faibles c-à-d de type :

Hydrogènes	Van Deer Val
------------	--------------

Électrophorèse

Il existe plusieurs types d'électrophorèse :

- En gel de polyacrylamide contenant du dodécysulfate de sodium (PAGE SDS) sépare par la taille.
- Par focalisation isoélectrique (IEF) sépare par la charge électrique.

L'électrophorèse 2D consiste à réaliser une séparation :

en fonction du point isoélectrique (IEF)	par la taille.
--	----------------

Méthode révélation

Pour révéler la présence de protéines, il est possible de colorer par :

Bleu de Coomassie (non spécifique)	Antigène (spécifique)
------------------------------------	-----------------------

Épitope région de fixation de l'anticorps.

Purification de protéines

Activité spécifique activité totale de la protéine étudiée par rapport à la quantité de protéines présente.

Rendement activité de la protéine de l'étape par rapport à l'activité de départ.

Facteur de purification activité spécifique de l'étape par rapport à celle de départ.

Rappel et synthèse de thermodynamique et de chimie en solution :

Température en K = 273+T C°

Vrai pour toutes réactions !!!!

- À l'équilibre c'est-à-dire quand les concentrations n'évoluent plus $\Delta G^{0'} = -RT \cdot \ln(K_{eq})$
- $\Delta G^0 = \Delta G^{0'} + RT \cdot \ln(K)$

En plus pour les réactions d'oxydoréduction

- ΔE différence de potentiel entre le couple.
- $\Delta G = -n \cdot F \cdot \Delta E$ avec n le nbre d'électrons échangés.

Le transport entre deux compartiments

- $\mu_i = \mu_0 + R \cdot T \cdot \ln[S] + z \cdot F \cdot E$ (Equation de Nernst) elle donne le potentiel.
- $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln \frac{final}{initial} + z \cdot F \cdot E_{membranaire}$ avec E le potentiel entre les compartiments et z la charge de la particule échangée.

NB : les formules d'oxydoréduction et de Nernst se ressemblent car le premier est calculé grâce au deuxième.