

VOIES METABOLIQUES PRINCIPALES

MECANISME "REDOX"

Les réactions d'oxydoréduction sont un processus de transfert d'électrons. Elles sont essentielles à la compréhension des différentes voies métaboliques.

OXYDATION

- Un oxydant (qui devient réduit) prend des électrons à une espèce chimique (qui devient oxydée)
- C'est donc **une perte** d'électrons pour l'espèce concernée, son nombre d'oxydation augmente.
- En biochimie il s'agit de réactions liées au **catabolisme**, permettant surtout la formation de cofacteurs réduits.

REDUCTION

- Un réducteur (qui devient oxydé) donne des électrons à une espèce chimique (qui devient réduite)
- C'est donc **un gain** d'électrons pour l'espèce concernée, son nombre d'oxydation diminue.
- En biochimie il s'agit de réactions liées à l'**anabolisme**, dans lesquelles les cofacteurs réduits sont oxydés en libérant leurs électrons.

METABOLISME

Ensemble des transformations moléculaires et transferts d'énergie dans une cellule

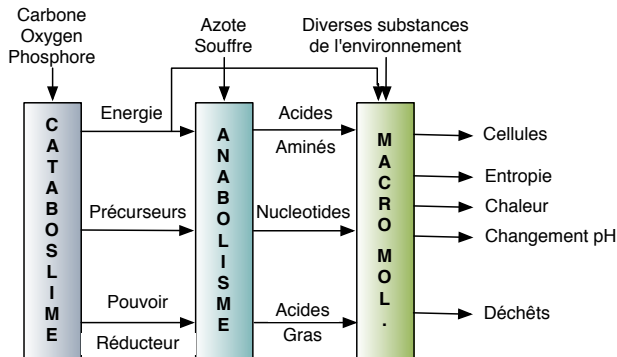
CATABOLISME

Réactions de dégradation moléculaire (**oxydations**, déhydrogénations) générant de l'énergie sous forme d'ATP et de cofacteurs réduits (NADH, FADH). Liés à **la respiration et la fermentation**.

ANABOLISME

Réactions de synthèse de métabolites (**réductions**), consomme de l'énergie (ATP) pour former les composants cellulaires (dont de nouvelles cellules)

METABOLISME PRIMAIRE



Vue d'ensemble du métabolisme primaire

Le métabolisme primaire est essentiel pour la cellule. Toutes les pathways nécessaires à sa croissance et à sa division y sont actives. On peut le séparer en 3 parties principales :

1. **Catabolisme** qui utilise le carbone, l'oxygène et le phosphore pour produire l'énergie qui sera nécessaire plus tard.
2. **Anabolisme** qui utilise cette énergie pour constituer les éléments de bases nécessaire à la vie de la cellule (acides aminés pour fabriquer les protéines, nucléotides pour les acides nucléiques)
3. **Synthèse de macromolécules** telles que les protéines, les acides nucléiques. La finalité étant d'avoir tous les éléments nécessaires à la division cellulaire.

CATABOLISME

Les voies principales du catabolisme sont :

- **Glycolyse** qui transforme du glucose en pyruvate (a lieu dans le cytoplasme)
- **Cycle de Krebs** qui, à partir du pyruvate, produit de l'ATP et des cofacteurs réduits (a lieu dans la mitochondrie)
- **Chaîne de transport des électrons** qui produit de l'ATP à partir des cofacteurs réduits (a lieu dans mitochondrie)
- **Voie fermentative** qui, (le plus souvent) en absence d'oxygène, produit du lactate ou de l'éthanol à partir du pyruvate issu de la glycolyse. (dans cytoplasme)

A noter qu'un élément limitant du catabolisme est l'entrée du glucose dans la cellule.

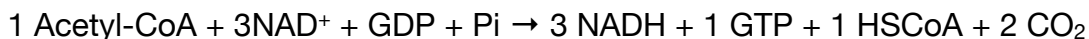
Glycolyse

La glycolyse a lieu dans le cytosol et est la pathway qui débute le catabolisme. Elle va permettre la production d'ATP et de NADH pouvant servir lors des réactions nécessitant de l'énergie. Elle permet également la formation de divers composés intermédiaires nécessaires à d'autres processus.



Cycle des acides citriques (Cycle de Krebs)

Pathway centrale du métabolisme qui prend place dans la mitochondrie, le cycle de krebs accepte une molécule d'Acetyl-CoA (préalablement synthétisée à partir de pyruvate) et permet la synthèse de nombreux cofacteurs réduits (NADH+H⁺) et de GTP (équivalent ATP). C'est l'étape intermédiaire entre la glycolyse et la chaîne de transport des électrons.



Chaîne de transport des électrons

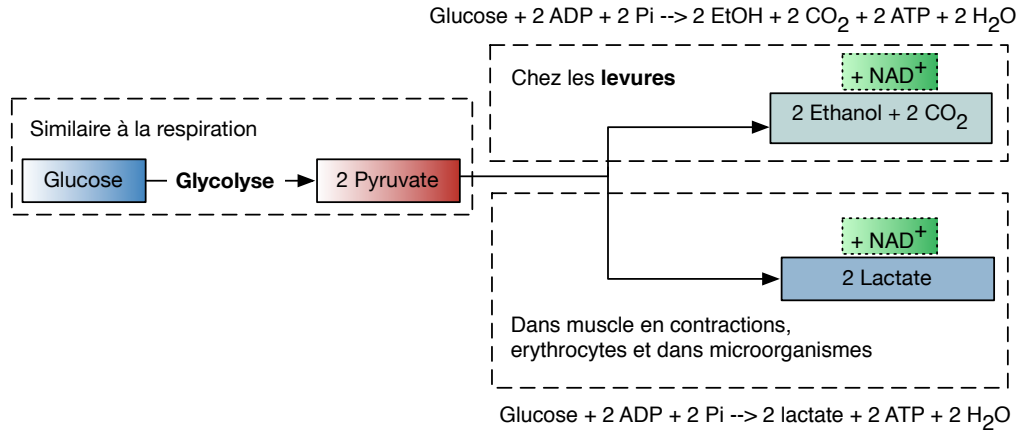
La chaîne de transport des électrons se trouve dans la mitochondrie. Les différents cofacteurs réduits peuvent y libérer leurs électrons qui serviront à créer un gradient de proton qui fournira de l'énergie via les ATPases (modèle Chemosmotique). La règle veut qu'un NADH donne 2.5 ATP et qu'un FADH₂ donne 1.5 ATP. (le FADH₂ entrant au complexe 2, il ne génère pas d'ATP en passant par le complexe 1).

Bilan de la respiration cellulaire

Etape	Cofacteur réduit	ATP
Etape préparatoire de la glycolyse		-2
Etape "payante" de la glycolyse		4
	2 NADH	5
Décarboxylation du pyruvate	2 NADH	5
Cycle de Krebs		2
	6 NADH	15
	2 FADH ₂	3
		32

Voie fermentative

La plupart du temps utilisée en absence d'oxygène (le plus souvent, la levure pouvant faire la fermentation même en condition aérobie), la voie fermentative permet la production d'ATP et la régénération du NAD⁺.



Plusieurs micro-organismes ont des voies fermentatives propres, c'est le cas par exemple de clostridium qui peut produire du butanol et du propanol. Dans ces voies, du carbone organique est le donneur d'électron (oxydé pour former de l'ATP lors de la glycolyse) et un composé organique sert de receveur d'électrons.

Certains organismes sont capables de produire de l'énergie en utilisant une respiration en conditions anaérobie. L'accepteur final n'est plus l'oxygène mais un composé provenant de l'environnement de la cellule (nitrate, sulfate, soufre...). **La respiration anaérobie est moins efficace que la respiration aérobie.**

FERMENTATION V.S. RESPIRATION ANAEROBE

La fermentation et la respiration anaérobie ne sont pas du tout la même chose. Dans le cas de la **fermentation**, après avoir formé du pyruvate via la glycolyse, la cellule va le transformer en acide lactique ou en éthanol tout en régénérant l'équivalent réducteur (NAD^+). La respiration anaérobie est similaire à la respiration aérobie (glycolyse --> krebs --> chaîne électrons) à la différence près que l'accepteur final est une autre molécule que l'oxygène. Il s'agit généralement d'éléments organiques provenant de l'environnement.

Voies des pentose phosphate (Hexose monophosphate shunt)

La voie des pentoses phosphate, qui a lieu dans le cytoplasme, a 2 fonctions principales :

- Génération d'équivalents réducteurs NADPH , utilisés pour la synthèse des lipides
- Mettre à disposition de la cellule du Ribose-5-Phosphate pour la synthèse des nucléotides et des acides nucléiques

CATABOLISME CELLULES ANIMALES

Les cellules animales sont des **anaérobies facultatifs** qui croissent sur des milieux contenant du glucose et de la glutamine (ou asparagine).

Besoins en glucose

Elles possèdent une capacité respiratoire limitée et sont donc soumises aux crabtree effect lorsque le glucose est présent en trop grande concentration. Du lactate et de l'alanine sont alors synthétisés par voie fermentative. Cet excès de glucose génère également un stress osmotique et affecte la glycolysation.

Besoins en glutamine

La glutamine est un précurseur important pour la synthèse des protéines mais également une source d'énergie qui sera oxydée en CO_2 et H_2O lors de la respiration. Une concentration élevée de glutamine résulte en un besoin d'oxygène important et à une accumulation d'ammoniaque.

La majorité des cellules animales ont besoin des deux substrats. Du fait des contraintes associées à chacun (crabtree pour le glucose et accumulation d'ammoniaque pour l'autre), chacun doit être ajouté dans un ratio précis avec un fort apport en oxygène. **Ces considérations vont affecter le choix du réacteur ainsi que du type de feeding.**

Les cellules Sf9 (insect cells) respirent, les hybridomas fermentent.

ANABOLISME DES CELLULES ANIMALES

L'anabolisme comprend les voies métaboliques qui fabriquent les briques de base des macromolécules (acides aminés, nucléotides, ...)

- Les substrats principaux de l'anabolisme sont également le **glucose** et la **glutamine** (cette dernière sert de source d'azote). Si tous les acides aminés sont présents dans le milieu, la glutamine sert alors uniquement de substrat pour le catabolisme
- Le **souffre** est fourni par la cystéine et la méthionine (ou des protéines dans les milieux contenant du serum).
- Le **phosphore** est fourni par des ions phosphates (sous forme de sels).
- Les lipides sont ajoutés au milieu mais posent un problème de solubilité (utilité des agents chélatants)
- Les acides nucléiques doivent être synthétisés.

REGULATION

Types d'activation

Il existe plusieurs types de régulation du métabolisme. La principale est la régulation des enzymes intervenant dans les différentes voies métaboliques :

- **Régulation allostérique** au niveau de l'enzyme : des effecteurs (activateurs ou inhibiteurs) se lient au niveau du site allostérique de l'enzyme (c'est à dire à un site différent du site actif de l'enzyme). Un exemple de feedback négatif serait le produit final d'une voie qui se lie à une des premières enzymes et l'empêche ainsi de catalyser de nouvelles réactions.
- **Régulation au niveau de la synthèse** : activation ou inhibition lors de la transcription et/ou transcription des gènes de l'enzyme
- **Modifications post-traditionnelles** : phosphorylation, glycosylation, clivage d'une petite précurseur
- **Compartmentalisation** : différentes voies métaboliques dans différents compartiments cellulaires
- **Rôle de l'environnement** : degré de réduction de l'environnement, pH (change activité)

NADH	Catabolisme	Mitochondries
NADPH	Anabolisme	Cytoplasme

Le catabolisme et l'anabolisme sont séparés (compartmentalisés). Leurs équivalents réducteurs également. Ainsi ces derniers ne seront pas les mêmes, ce qui facilite la régulation de l'un sans forcément influencer l'autre directement.

Pour éviter la surproduction de certains métabolites, les produits finaux accumulés inhibent leur propre synthèse. C'est un phénomène de feedback inhibition.

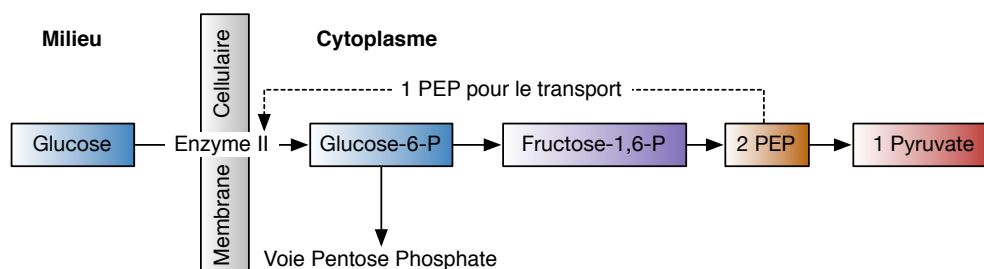
REGULATION CATABOLIQUES

Le catabolisme est régulé au point d'entrée des différents substrats dans les voies métaboliques centrales. Ces dernières sont des réactions successives toujours catalysées par des enzymes qui sont régulées en relation à la demande énergétique et aux propriétés du substrat.

La régulation catabolique concerne principalement les voies principales de production d'énergie citées plus haut. Le principe de base étant que le produit final est pratiquement toujours inhibiteur pour sa synthèse. Donc dans le cas du catabolisme, si beaucoup d'énergie est disponible, la glycolyse sera alors inhibée et il en va de même du cycle des acides citriques.

La répression catabolique se fait surtout par rapport aux substrats présents. Par exemple tant que du glucose est présent, il sera utilisé comme substrat. C'est le rôle du **LAC Operon, de la catabolite activator protein**. Le même principe existe pour les acides aminés (TRP operon).

Phosphotransferase-System (PTS)



Il s'agit d'une translocation de groupe qui permet de faire entrer du glucose (ou d'autres sources d'énergie) dans la cellule. Elle fait appel à plusieurs enzymes dont l'Enzyme II qui forme le complexe spécifique au sucre à importer. Une molécule de PEP est donc perdue pour la glycolyse pour chaque sucre entrant dans la cellule.

L'enzyme II joue un rôle régulateur. En effet lorsque le niveau de glucose intra-cellulaire est bas, l'enzyme II phosphorylée s'accumule et active l'adenylyl cyclase qui fait augmenter le niveau d'AMP cyclique ce qui active le CAP et va activer les gènes responsables de l'import d'autres sucres. Au contraire si le niveau de glucose est élevé, l'enzyme II est majoritairement dé-phosphorylée et va conduire à l'inhibition de ces gènes et favorise l'utilisation du glucose.

Overflow metabolism (crabtree effect)

Lorsque la quantité de sucre est faible et que la glycolyse se fait à un rythme normal, l'ensemble du pyruvate est oxydé en CO₂ dans le cycle de Krebs. Lorsque la concentration de sucre est élevée et que la vitesse de la glycolyse devient trop importante, une partie du pyruvate est réduit en éthanol (ou autre produit partiellement oxydé) par voie fermentaire. Ce dernier peut être converti en acetyl-CoA via l'acetate mais une accumulation peut être toxique pour la cellule. C'est donc une limitation au niveau de l'uptake du pyruvate qui conduit à cet effet ("Bottleneck Model"). Il touche les organismes **aerobes facultatifs** (car il dispose des 2 voies).

Une première hypothèse parlait répression catabolique de la respiration (au niveau de la synthèse des enzymes) après une exposition de longue durée à une haute concentration de glucose. Mais le modèle du bottleneck est plus plausible.

L'effet pasteur est similaire au crabtree mais concerne l'effet inhibiteur de l'oxygène sur le processus de fermentation.

REGULATION ANABOLIQUES

La régulation se fait surtout au niveau de substrat initial mais il existe également une régulation feedback des produits finaux qui inhibent les enzymes en début de voie métabolique.

Réponse stringente (régulation anabolique par rapport au manque d'acides aminés)

Lorsque l'apport en acide aminés est insuffisant pour assurer une synthèse des protéines normales, la cellule va court-circuiter un grand nombre de ses activités. La réponse stringente provoque une réduction massive (10 à 20 fois) de la synthèse d'ARNr et d'ARNt, conduisant à une réduction de 2/3 de la production globale d'ARNm. La vitesse de dégradation des protéines est également augmentée.

Cette réponse est signalée par l'accumulation de nucléotides inhabituels appelés **(p)ppGpp**. Ce sont des molécules effectrices qui se fixent aux protéines cibles et qui régulent leur activité.

Normalement seuls des ARNt chargés peuvent se présenter dans le site A du ribosome. Si un ou plusieurs acides viennent à manquer, un ARNt non-chargé peut alors se trouver dans le site A. Lorsque cette situation est détectée, le facteur stringente (relA) va catalyser la formation de (p)ppGpp à partir de GTP et de GDP (réaction qui demande un ATP). La réponse stringente est alors activée et la cellule est en mode de survie.

AEROBES OBLIGATOIRES

Ne croît qu'en présence d'oxygène.

ANAEROBES OBLIGATOIRES

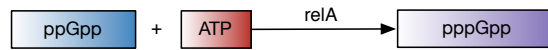
Ne croît qu'en absence d'oxygène.

ANAEROBES FACULTATIFS

Peut croître en présence et en absence d'oxygène.

La fermentation peut avoir lieu même en présence d'oxygène !

A noter que cette réponse est réversible et que la cellule est capable de revenir à un état normal très rapidement. La vitesse de croissance des cellules est directement inversement proportionnelles à la concentration de (p)ppGpp intracellulaire.



METABOLISME SECONDAIRE

Alors que le métabolisme primaire contient toutes les voies métaboliques nécessaires lors de la phase exponentielle de croissance, le métabolisme secondaire est principalement actif lorsque les cellules se trouvent en phase stationnaire. Beaucoup de produits à forte valeur ajoutée en sont issus, comme par exemple les **antibiotiques**.

REGULATION

En général, la production est inhibée par la présence de carbone ou d'azote dans le milieu. Il est donc nécessaire d'adapter les techniques de feeding pour avoir une production optimale (ne pas avoir trop de glucose ni d'azote).

LIEN AVEC METABOLISME PRIMAIRE

Il est étroitement lié au métabolisme primaire. En effet les molécules complexes qui en sont issues sont synthétisées à partir de briques produites par le métabolisme primaire. Par exemple les **Aflatoxines** qui sont des polyketides sont dérivées du malonyl-CoA.

SOURCES

Eyer K., Dubuis P. « Development of an Industrial Biotechnology Process : Metabolic basis of product formation and development of medium », HES-SO Valais. Sion, Mars 2008