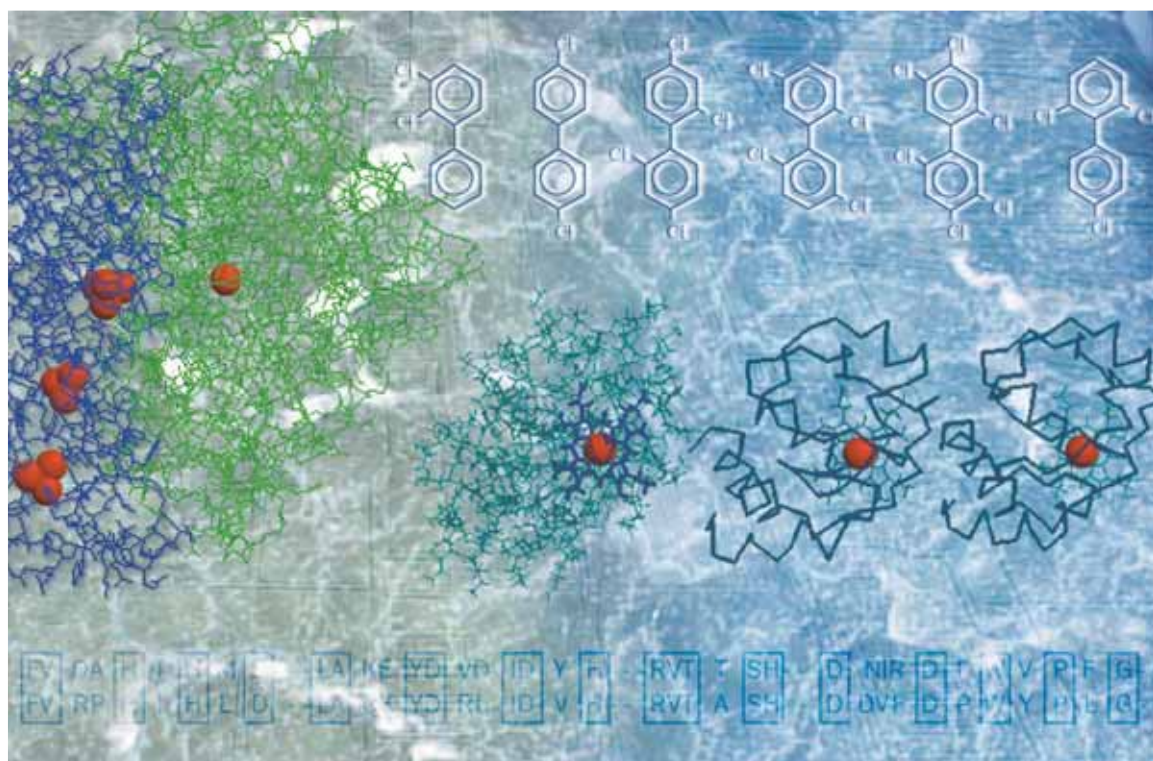




BIODÉGRADATIONS ET MÉTABOLISMES

LES BACTÉRIES POUR LES TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT

■ Jean PELMONT



BIODÉGRADATIONS ET MÉTABOLISMES

*LES BACTÉRIES POUR LES
TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT*

Grenoble Sciences

Grenoble Sciences poursuit un triple objectif :

- réaliser des ouvrages correspondant à un projet clairement défini, sans contrainte de mode ou de programme,
- garantir les qualités scientifique et pédagogique des ouvrages retenus,
- proposer des ouvrages à un prix accessible au public le plus large possible.

Chaque projet est sélectionné au niveau de Grenoble Sciences avec le concours de referees anonymes. Puis les auteurs travaillent pendant une année (en moyenne) avec les membres d'un comité de lecture interactif, dont les noms apparaissent au début de l'ouvrage. Celui-ci est ensuite publié chez l'éditeur le plus adapté.

(Contact : Tél. : (33)4 76 51 46 95 - E-mail : Grenoble.Sciences@ujf-grenoble.fr)

Deux collections existent chez EDP Sciences :

- la **Collection Grenoble Sciences**, connue pour son originalité de projets et sa qualité
- **Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques**, collection présentant des thèmes de recherche d'actualité, traités par des scientifiques de premier plan issus de disciplines différentes.

Directeur scientifique de Grenoble Sciences

Jean BORNAREL, Professeur à l'Université Joseph Fourier, Grenoble 1

Comité de lecture pour "Biodégradations et métabolismes"

- ♦ **Paulette VIGNAIS**, Directrice de recherche CNRS au CEA de Grenoble
- ♦ **Pierre CAUMETTE**, Professeur à l'Université de Pau et des Pays de l'Adour
- ♦ **Yves JOUANNEAU**, Directeur de recherche CNRS au CEA de Grenoble
- ♦ **Philippe NORMAND**, Professeur à l'Université Claude Bernard de Lyon

Grenoble Sciences est soutenu par **le Ministère de l'Éducation nationale**
le Ministère de la Recherche et **la Région Rhône-Alpes**
Grenoble Sciences est rattaché à l'**Université Joseph Fourier de Grenoble**

Réalisation et mise en pages : **Centre technique Grenoble Sciences**

Illustration de couverture : **Alice GIRAUD**

ISBN 2-86883-745-X

© EDP Sciences, 2005

BIODÉGRADATIONS ET MÉTABOLISMES

*LES BACTÉRIES POUR LES
TECHNOLOGIES DE L'ENVIRONNEMENT*

Jean PELMONT



17, avenue du Hoggar
Parc d'Activité de Courtabœuf, BP 112
91944 Les Ulis Cedex A, France

Ouvrages Grenoble Sciences édités par EDP Sciences

Collection Grenoble Sciences

Chimie. Le minimum à savoir (*J. Le Coarer*) • Electrochimie des solides (*C. Déportes et al.*) • Thermodynamique chimique (*M. Oturan & M. Robert*) • Chimie organométallique (*D. Astruc*) • De l'atome à la réaction chimique (*sous la direction de R. Barlet*)

Introduction à la mécanique statistique (*E. Belorizky & W. Gorecki*) • Mécanique statistique. Exercices et problèmes corrigés (*E. Belorizky & W. Gorecki*) • La cavitation. Mécanismes physiques et aspects industriels (*J.P. Franc et al.*) • La turbulence (*M. Lesieur*) • Magnétisme : I Fondements, II Matériaux et applications (*sous la direction d'E. du Trémolet de Lacheisserie*) • Du Soleil à la Terre. Aéronomie et météorologie de l'espace (*J. Liliensten & P.L. Blelly*) • Sous les feux du Soleil. Vers une météorologie de l'espace (*J. Liliensten & J. Bornarel*) • Mécanique. De la formulation lagrangienne au chaos hamiltonien (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) • Problèmes corrigés de mécanique et résumés de cours. De Lagrange à Hamilton (*C. Gignoux & B. Silvestre-Brac*) • La mécanique quantique. Problèmes résolus, T. 1 et 2 (*V.M. Galitsky, B.M. Karnakov & V.I. Kogan*) • Analyse statistique des données expérimentales (*K. Protassov*) • Description de la symétrie. Des groupes de symétrie aux structures fractales (*J. Sivardière*) • Symétrie et propriétés physiques. Du principe de Curie aux brisures de symétrie (*J. Sivardière*)

Exercices corrigés d'analyse, T. 1 et 2 (*D. Alibert*) • Introduction aux variétés différentielles (*J. Lafontaine*) • Analyse numérique et équations différentielles (*J.P. Demailly*) • Mathématiques pour les sciences de la vie, de la nature et de la santé (*F. & J.P. Bertrandias*) • Approximation hilbertienne. Splines, ondelettes, fractales (*M. Attéia & J. Gaches*) • Mathématiques pour l'étudiant scientifique, T. 1 et 2 (*Ph.J. Haug*)

Bactéries et environnement. Adaptations physiologiques (*J. Pelmont*) • Enzymes. Catalyseurs du monde vivant (*J. Pelmont*) • La plongée sous-marine à l'air. L'adaptation de l'organisme et ses limites (*Ph. Foster*) • Endocrinologie et communications cellulaires (*S. Idelman & J. Verdeti*) • Eléments de biologie à l'usage d'autres disciplines (*P. Tracqui & J. Demongeot*) • Bioénergétique (*B. Guérin*) • Cinétique enzymatique (*A. Cornish-Bowden, M. Jamin & V. Saks*)

L'Asie, source de sciences et de techniques (*M. Soutif*) • La biologie, des origines à nos jours (*P. Vignais*) • Naissance de la physique. De la Sicile à la Chine (*M. Soutif*) • Le régime oméga 3. Le programme alimentaire pour sauver notre santé (*A. Simopoulos, J. Robinson, M. de Lorgeril & P. Salen*) • Gestes et mouvements justes. Guide de l'ergomotricité pour tous (*M. Gendrier*)

Listening Comprehension for Scientific English (*J. Upjohn*) • Speaking Skills in Scientific English (*J. Upjohn, M.H. Fries & D. Amadis*) • Minimum Competence in Scientific English (*S. Blattes, V. Jans & J. Upjohn*)

Grenoble Sciences - Rencontres Scientifiques

Radiopharmaceutiques. Chimie des radiotraceurs et applications biologiques (*sous la direction de M. Comet & M. Vidal*) • Turbulence et déterminisme (*sous la direction de M. Lesieur*) • Méthodes et techniques de la chimie organique (*sous la direction de D. Astruc*) • L'énergie de demain. Techniques - Environnement - Economie (*sous la direction de J.L. Bobin, E. Huffer & H. Nifenecker*)

AVERTISSEMENT

Cet ouvrage s'adresse aux chercheurs, ingénieurs et étudiants intéressés par le rôle des bactéries dans la défense de l'environnement et le mécanisme biochimique des biodégradations de substances polluantes variées. Pour tenter de présenter un aperçu du problème à partir de la masse énorme des informations sur le sujet, souvent dispersées parmi les sources nombreuses éparpillées dans les publications scientifiques, il a fallu s'appuyer sur les notions fondamentales en biochimie métabolique, en enzymologie et en microbiologie. Il n'était pas question de faire double emploi avec les traités généraux qui sont souvent excellents et bien adaptés à la formation scientifique. Il convenait donc de rester dans un cadre modeste en renonçant à toute tentative de réaliser un essai encyclopédique, qui de toute façon aurait été hors de portée de l'auteur.

La difficulté est vite apparue de trouver les limites entre les données de base et les rappels jugés indispensables. Aussi a-t-on ajouté à la fin des quatorze chapitres un glossaire assez volumineux pour accompagner les rubriques traitées, en rappelant les définitions et propriétés essentielles. On peut estimer néanmoins que cet ouvrage ne conviendra qu'aux étudiants ayant l'expérience d'au moins trois années de cursus universitaire avec un bagage de biochimie et de microbiologie. Par contre les connaissances de chimie requises restent simples et le programme du Premier Cycle suffira généralement. Le but est de créer un outil utile pour les différents spécialistes intéressés par la défense de l'environnement et les biodégradations, afin de leur permettre de se documenter rapidement sur des sujets qui sortent un peu de leur domaine habituel. L'idéal serait évidemment d'apporter des idées qui pourraient enrichir leur travail. On a donc pris soin d'apporter une bibliographie assez abondante, arrêtée sauf quelques exceptions à la fin 2002, et il a fallu naturellement effectuer des choix assez arbitraires. La facilité d'accès à Internet et aux grandes bases de données fait que les informations peuvent être rapidement collectées ou retrouvées, notamment par *Medline*. On a donc privilégié les références trouvées dans les journaux dont on peut se procurer en un temps très court le contenu des articles en ligne. Il a paru inutile d'introduire des adresses de sites Internet, parfois volatiles, que chacun peut se procurer en toute liberté avec les moteurs de recherche du type *Google*.

L'intervention des bactéries dans les biodégradations a été privilégiée, parce qu'elle est en général à la fois essentielle et bien documentée. Ce choix comporte une part d'arbitraire, puisque les champignons, levures et autres ensembles d'acteurs apportent leur part. Il y a donc été fait parfois allusion dans plusieurs rubriques où cela était indispensable.

INTRODUCTION

LES DONNÉES DU PROBLÈME

Comment les bactéries éliminent-elles les déchets de l'activité humaine ? Le thème de ce livre est la biochimie du nettoyage de l'environnement qu'elles effectuent. Le problème est replacé dans le cadre des grands cycles naturels. Ils nous aident à mieux comprendre comment les procédés mis en jeu dans le recyclage des substances naturelles ont été adaptés et mis au service de l'élimination des composés artificiels, c'est-à-dire la **bioremédiation**.

L'accumulation de rejets de toutes sortes dans l'environnement est devenue un sujet de préoccupation majeure depuis plusieurs décennies. Elle a donné lieu à une forte prise de conscience dans les pays développés qui en sont les premiers responsables. La course pourrait sembler perdue d'avance au vu de la formidable progression des activités industrielles, de la consommation et du développement de l'agriculture intensive. La pollution va des emballages aux produits chimiques utilisés comme pesticides et herbicides, en passant par les nitrates, les hydrocarbures et les métaux lourds. Les micro-organismes contribuent largement à les détruire ou à les neutraliser malgré leurs limites. Tous les êtres vivants participent à des degrés divers au recyclage des matières organiques et minérales de l'environnement. Par leur aptitude à coloniser tous les milieux, les micro-organismes viennent au premier rang. Bactéries, champignons, microalgues et protistes forment une gigantesque usine chimique planétaire dont les produits se propagent tout au long des chaînes nutritionnelles. Un premier choix a été de ne considérer majoritairement que les bactéries, ou plus exactement les procaryotes en général, c'est-à-dire les protéobactéries ou bactéries au sens strict, les cyanobactéries et les archaebactéries. Pourquoi cette limitation ? Les procaryotes sont presque toujours en première ligne. Ce sont les organismes les plus simples dont on connaît plutôt bien la machinerie métabolique et assez souvent la génétique. Les mécanismes régulateurs sont moins complexes que chez les eucaryotes mais peuvent mettre en jeu un bouleversement de l'expression de nombreux gènes qui n'est pas sans rappeler les différenciations cellulaires des organismes plus évolués. La présence des procaryotes est universelle et leur participation aux grands cycles naturels est essentielle. Parmi les bactéries du sol se trouvent les actinomycètes aux potentialités particulièrement riches et complexes qui excellent en même temps dans l'art de faire des antibiotiques. L'extrême versatilité de tous ces organismes et leur faculté d'adaptation en font des acteurs très actifs dans la lutte contre les pollutions. Ce livre en est une première approche.

Depuis les années 1960 a paru une abondante littérature scientifique sur les biodégradations lorsque les chercheurs, au départ incrédules, se sont aperçus que de nombreux produits organiques jugés toxiques ou rébarbatifs comme le benzène, les phénols, le pétrole brut et autres, étaient effectivement dégradés activement par les bactéries, parfois avec la collaboration d'autres organismes dont les levures. Les résultats ne sont accessibles en général que dans des revues dispersées et spécialisées. Une pollution peut avoir des causes naturelles comme artificielles. Pour lutter contre ses effets pervers, il est bon de connaître les mécanismes de son élimination qui peut s'opérer parfois spontanément par oxydation à l'air, hydrolyse ou destruction photochimique. La microflore de l'environnement s'est habituée à traiter les polluants naturels par des facteurs enzymatiques appropriés sélectionnés au cours des périodes géologiques. La végétation est une des premières responsables de l'émission d'une immense variété de substances, des terpènes, flavonoïdes, alcaloïdes et autres composés qui sont des déchets ou des agents de défense contre les autres organismes. L'industrie humaine n'a fait que compliquer les choses en introduisant des molécules qui n'existaient pas auparavant dans la nature. On désigne ces composés artificiels sous le vocable de **xénobiotiques**. Il peut arriver qu'un xénobiotique ne soit qu'un "analogue" qui ne diffère d'un composé naturel que par un détail de sa formule chimique le rendant acceptable par les enzymes des micro-organismes. Le xénobiotique devenu biodégradable est traité comme un substrat naturel et son élimination est possible si les réactions du métabolisme en acceptent tous les intermédiaires. Dans les cas les plus favorables, la substance étrangère est minéralisée, c'est-à-dire transformée en gaz carbonique, ammoniac et eau. Un cas de figure très important est celui du **cométabolisme**. L'agent microbien dégrade effectivement le xénobiotique, mais ne peut pas l'utiliser seul pour sa croissance. Les transformations ont alors lieu parallèlement à celles des substrats normaux en utilisant les mêmes outils. Dans bien des cas, le cométabolisme peut avoir un caractère fortuit. Il est évidemment intéressant dans la mesure où il permet d'éliminer des produits gênants. Des complications naissent quand un xénobiotique a une action toxique sur la microflore et les plantes. Sa destruction, partielle ou non, est alors une réaction de défense, une **détoxification** du poison. La gamme des situations rencontrées est vaste, et nous en trouverons de nombreux exemples.

Dans un cadre général, un substrat donné se trouve en présence, non pas d'une entité biologique unique, mais de populations mixtes de bactéries ou d'autres espèces. Tous ces organismes apportent leurs propres potentialités. Les premières transformations sont catalysées par une espèce donnée et les produits formés sont reçus par d'autres qui prennent le relais. Des échanges ont lieu, minéralisation et détoxification sont éventuellement simultanées. C'est la situation la plus commune dans l'environnement mais aussi la plus difficile à démêler sur le plan expérimental puisqu'il n'est pas simple de reproduire artificiellement et de façon stable la cohabitation des différents acteurs. Il existe dans la littérature scientifique un grand nombre d'articles faisant état de la disparition de tel ou tel contaminant dans un milieu naturel, interprété comme l'activité d'une association microbienne (un "consortium" dans les articles anglosaxons). Ces recherches sont intéressantes et rassurent sur la nature de tel ou tel produit, mais n'apportent pas

toujours d'information précise sur les mécanismes impliqués. De plus la principale qualité d'un résultat scientifique est d'être reproductible par d'autres. En général les descriptions faites sur le terrain ne sont jamais reproduites en l'état, puisqu'il s'agit de milieux complexes variables dans le temps et l'espace. Reconnaître le caractère biodégradable d'un produit est néanmoins essentiel. Son évaluation par différentes méthodes standards, comme la *BOD**¹, est recherchée par les industriels désireux de se mettre en conformité avec la législation.

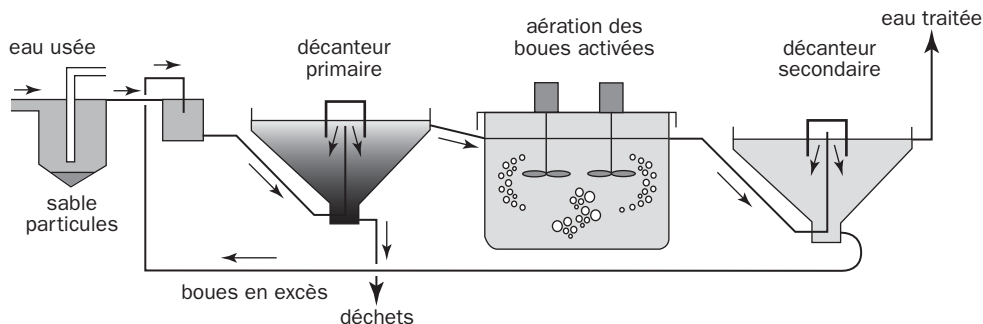
La disparition de certains polluants est conditionnée par leur solubilité, leur caractère volatil (émission dans l'atmosphère et destruction photochimique), ou leur adsorption sur les particules du sol (humus et argiles). Un produit fortement adsorbé reste plus longtemps dans le sol alors qu'un produit très soluble est entraîné rapidement vers la nappe phréatique et les cours d'eau. Ce n'est pas forcément avantageux. Un lessivage trop rapide ne laisse pas le temps aux micro-organismes du sol de s'adapter et d'entamer le nettoyage, et le produit polluant ira contaminer les rivières. La tendance plus ou moins importante à s'adsorber est mesurée par le *coefficient Koc**. Elle est réglée entre autres par la nature des molécules, leur caractère plus ou moins hydrophobe et leur ionisation. La récalcitrance intégrale de certains polluants qui résistent à toute attaque microbienne est évidemment la situation la plus néfaste et nécessite le recours, quand on le peut, à l'incinération ou au recyclage. Il s'agit principalement de certaines matières plastiques, de goudrons, de noyaux chimiques d'une stabilité exceptionnelle et d'éléments minéraux tels que les métaux : cadmium, zinc, mercure et autres. La pollution par les hydrocarbures est à l'ordre du jour. La biodégradation de bon nombre de ces composés est connue, parfois rapide et a fait l'objet d'une expérimentation très vaste. Malheureusement certains hydrocarbures, polycycliques ou à haute masse moléculaire, sont de véritables dangers. Tout le monde pense évidemment aux bitumes lourds de l'*Erika* ou du *Prestige*. La lenteur de leur élimination naturelle est telle que leur présence, longtemps après les récentes marées noires, constitue la calamité que l'on sait. Les métaux offrent un cadre à part. Lorsqu'ils sont présents sous forme d'oxydes, d'hydroxydes, de sulfures ou de combinaisons organiques, les métaux peuvent être solubilisés et entraînés par les eaux avant d'être dilués dans l'environnement. La gestion des concentrations métalliques est un problème épineux en biologie. Un chapitre montrant comment les bactéries traitent ce problème a été inclu dans ce livre, car la pollution métallique est loin d'être absente des problèmes contemporains.

Enfin il convient de mentionner la participation des plantes dans tout ceci. Elles ne sont pas le sujet de ce livre, mais leur présence ne saurait être ignorée car leurs racines attirent dans ce qu'on appelle la rhizosphère des bactéries et des champignons avec lesquels elles collaborent activement. En outre la majorité des plantes hébergent dans leurs racines des champignons formant les mycorhizes, qui présentent eux-mêmes des interactions avec les bactéries. Limiter le sujet aux bactéries, à quelques exceptions près, est donc une première simplification qui ne doit pas faire oublier que l'environnement est un tout faisant participer un grand nombre d'organismes différents.

1 - Les mots repérés par * sont définis dans le glossaire situé à la fin de l'ouvrage.

L'ÉPURATION

La législation actuelle oblige toutes les communes à se raccorder à une station d'épuration. Certaines industries ont leur propre installation. L'épuration biologique permet de débarrasser l'eau de ses principales impuretés. Son évocation très succincte ici ne sert qu'à nous mettre dans le bain du sujet. La méthode la plus ancienne est le **lagunage**, qui utilise des plans d'eau où s'effectuent les processus naturels de dégradation et de recyclage des polluants grâce au développement de bactéries, de levures, de protozoaires et d'algues. Il s'établit une chaîne alimentaire naturelle oxygénée en surface. On utilise au besoin la capacité d'auto-épuration des terres cultivées. La méthode a l'inconvénient d'occuper des surfaces assez vastes et sa capacité de traitement est devenue trop faible pour les grandes agglomérations. Les stations d'épuration fonctionnent sur un principe similaire mais avec une plus grande efficacité. Les eaux usées sont décantées puis brassées et aérées en présence des micro-organismes qui s'agglomèrent en boues et granules destinés à sédimenter, tandis que les eaux clarifiées sont peu à peu débarrassées de leurs matières organiques dissoutes. La présence de l'oxygène est essentielle et garantit les biodégradations les plus rapides. Selon la technologie utilisée, ces cultures bactériennes peuvent être libres (**boues activées**) ou fixées (lits bactériens et biofilms). L'emploi des boues activées est le plus classique. Les micro-organismes se développent et se rassemblent en flocons ou "flocs", maintenus en suspension par brassage accompagné d'une aération. Une décantation élimine les boues, dont une partie est réinjectée en amont, le restant étant éliminé, opération qui demande souvent des solutions techniques délicates. Il existe maintenant une variété de techniques et le schéma symbolise le principe de base.



La demande en eau recyclée de haute qualité a stimulé les progrès techniques. Une économie des volumes traités est recherchée dans les villes par la séparation des eaux usées et pluviales. La charge minérale et organique d'une eau est estimée par la **MES** ou teneur en matières en suspension, et par la **DBO5*** qui permet d'estimer la teneur en matière organique. La MES d'une eau urbaine ne dépasse guère $200\text{--}300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, et la DBO5 varie de 100 à $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Ces valeurs peuvent être fortement augmentées, de 10 à 50 fois à la sortie de certaines industries alimentaires (brasseries, conserveries, fromageries, abattoirs). Deux autres paramètres sont la **DCO** (demande chimique en oxygène) et le **COT** (carbone

organique total). Des mesures rapides et automatisées permettent ainsi d'évaluer la pollution. Il est généralement intéressant de pouvoir estimer la nature précise des polluants présents comme les pesticides ou les hydrocarbures. Les techniques analytiques modernes y parviennent. Parmi celles-ci figurent des enzymes immobilisées dans des électrodes polarographiques. Diverses sociétés se sont spécialisées dans la production de biocapteurs. La conception des biocapteurs s'est diversifiée et perfectionnée depuis une vingtaine d'années. La détection automatique d'une pollution permet de déclencher un système d'alerte et de commander le réglage des installations. Divers procédés ont été mis au point pour traiter certains effluents en anaérobiose, comme le *procédé UASB**.

Des efforts menés en vue de diminuer les coûts d'investissement et d'entretien ont conduit à de nombreuses améliorations dans la filtration, l'immobilisation des bactéries et l'évacuation des boues. La conduite d'une station d'épuration sur le principe de base évoqué précédemment connaît plusieurs catégories de problèmes, dont le rejet des boues ou la qualité des microbes épurateurs. La nature de ces micro-organismes est cruciale. On trouve généralement des *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Flavobacterium* et autres espèces dont le nom reviendra fréquemment dans le courant de ce livre comme acteurs des biodégradations. L'arrivée des polluants sélectionne des espèces compétentes qui se développent plus vite que d'autres et sont capables d'échanger de l'information génétique sous forme de plasmides. On s'efforcera sans doute dans l'avenir d'introduire des bactéries génétiquement modifiées spécialisées dans le traitement de certaines pollutions. Toutes ces recherches reposent à la base sur des études expérimentales utilisant les méthodes de culture afin d'étudier les propriétés physiologiques des germes. Les méthodologies sont bien décrites dans les manuels de microbiologie pratique. Cela va du plus simple par des cultures axéniques discontinues (en *batch*) aux cultures continues en *chémostat** ou en *turbidostat**. Ces techniques ont été largement perfectionnées et automatisées. Malheureusement elles ne rendent encore compte qu'imparfaitement des conditions naturelles où de nombreuses espèces de micro-organismes sont en association et en compétition. L'étude des cultures mixtes stables se heurte à de grandes difficultés mais devrait concentrer les efforts de recherche à l'avenir.

CHAPITRE 1

LA COLLECTE DE L'ÉNERGIE

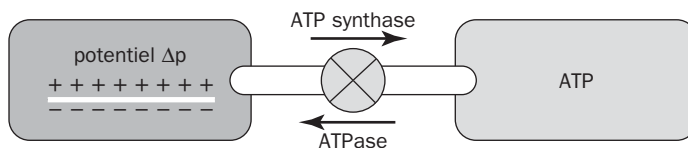
Ce premier chapitre a pour objet de dresser un rappel des mécanismes énergétiques fondamentaux situés à la base des cycles naturels et de toute biodégradation. Que l'énergie soit tirée des oxydations ou de la lumière, elle apparaît invariablement sous forme d'un potentiel électrochimique membranaire ou de composés énergétiques comme l'ATP.

<i>1.1 - Respirations et fermentations</i>	<i>15</i>
<i>1.2 - Le rôle des fermentations</i>	<i>20</i>
<i>1.3 - ATPases, ATP synthases</i>	<i>26</i>
<i>1.4 - Cytochromes</i>	<i>30</i>
<i>1.5 - Complexes de type bc₁</i>	<i>34</i>
<i>1.6 - Oxydases respiratoires terminales</i>	<i>38</i>
<i>1.7 - Phototrophie non-oxygénique</i>	<i>46</i>
<i>1.8 - Les cyanobactéries</i>	<i>56</i>

1 – LA COLLECTE DE L'ÉNERGIE

1.1 - RESPIRATIONS ET FERMENTATIONS

Toute cellule dispose invariablement de deux réservoirs d'énergie de base, représentés par un potentiel membranaire et un stock de composés énergétiques comme l'ATP. Le potentiel est alimenté par le passage de protons préférentiellement dans un seul sens, avec pour résultat une dissymétrie de pH et de charges des deux côtés de la membrane, avec un excédent de protons et de charges positives hors du cytoplasme. L'ATP est l'archétype des molécules énergétiques dites à haut potentiel et source d'énergie chimique directe. Ces deux réservoirs communiquent par une pompe membranaire réversible, qui est l'ATPase/ATP synthase. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate peut générer un potentiel de membrane. Inversement ce potentiel, qui évoque celui d'un condensateur chargé, peut actionner une synthèse en retour de l'ATP. L'idée fondamentale est donc de voir que toute l'énergie immédiatement disponible pour la cellule est répartie entre ces deux réservoirs. Le **potentiel électrochimique** membranaire ou force proton-motrice (Δp) est alimenté essentiellement par les respirations et les oxydoréductions liées à la photosynthèse. De l'autre côté, le réservoir **ATP** représente les molécules à haut potentiel énergétique produites par les fermentations. Celles-ci engendrent de l'ATP en phase soluble par couplage direct avec des réactions du métabolisme. Une autre fraction d'ATP est produite par la pompe réversible qui est l'ATPase/ATP synthase. Elle permet de recharger le potentiel membranaire par l'hydrolyse de l'ATP, ou au contraire de faire une synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate au détriment du potentiel membranaire.



Ce schéma est utile aux microbiologistes et biochimistes, car il fait appel au mécanisme mis en jeu au cours de la conservation d'énergie. Les modalités sont parfois plus complexes et le mécanisme des échanges d'énergie n'est pas toujours connu

avec certitude. La notion de fermentation adoptée ici est restrictive. Dans la pratique industrielle, la récupération de produits utiles à partir d'une culture de micro-organismes est considérée comme une fermentation au sens large. L'oxydation de l'alcool en acide acétique dans la préparation du vinaigre est ainsi désignée comme une fermentation, alors qu'au sens biochimique du terme c'est le résultat d'oxydations respiratoires.

Le **potentiel membranaire** est bâti par des oxydoréductions capables de coupler le transport d'électrons avec une translocation de protons. Ce principe de conservation d'énergie est réversible. Le potentiel membranaire peut contribuer aux courants d'électrons inverses, générateurs de molécules réduites comme le NADH ou le NADPH. Il actionne de façon générale un retour des protons à travers la membrane, couplé à un certain nombre d'activités comme la rotation des flagelles ou le transport de substances et d'ions à travers la membrane. Ce sont les transports actifs dits de type 1. Ainsi la perméase du lactose dans le colibacille fait entrer simultanément une molécule de glucose et un proton. La pression exercée sur l'entrée du proton tire la molécule de lactose vers l'intérieur. La perméase agit donc comme synporteur. Si l'entrée des protons était couplée à la sortie d'une autre entité, il s'agirait d'un antiporteur. La contribution essentielle du potentiel membranaire consiste évidemment à coupler la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP grâce au retour des protons vers le cytoplasme.

Le réservoir **ATP** renferme une énergie convertible en différentes molécules à haut potentiel énergétique dont l'acétyl-coenzyme A. L'ATP actionne de nombreuses synthèses, actionne la mobilité cellulaire chez certaines espèces, ainsi que des transports actifs, notamment les *transporteurs ABC** des **bactéries**. Dans la réalité l'ATP n'est pas le seul nucléotide énergétique, mais il faut introduire en toute rigueur l'ADP, ou encore des nucléotides susceptibles d'échanger leur phosphate comme l'UDP, le CDP et le GTP. L'hydrolyse de l'ATP en ADP et phosphate libre $32 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ dans les conditions standards. L'énergie réelle est bien supérieure ($50\text{-}70 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$). Elle croît avec le rapport ATP/ADP, ou mieux avec la "charge énergétique" définie par ATKINSON comme $(\text{ATP} + 0,5 \text{ ADP}) / (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$. Comparable en quelque sorte à la charge d'une batterie, ce rapport serait étroitement régulé par les cellules dans une fourchette d'environ 0,85-0,95 dans les conditions normales de croissance.

On sait que la variation d'énergie libre au cours d'une oxydoréduction est donnée par la *loi de NERNST**. Une oxydation chimique quelconque devrait dégager essentiellement de la chaleur. Les biomembranes offrent un milieu hydrophobe favorable à la **conservation de l'énergie** par translocation unidirectionnelle d'entités ioniques. On admet que cette conversion s'opère avec un rendement très élevé par le canal de protéines membranaires transporteurs d'ions, animées de changements de conformation. L'énergie des oxydations est donc consacrée à des changements de conformations cycliques au sein de ces transporteurs, qui leur permettent de se charger d'un ion sur une face de la membrane, et de le rejeter de l'autre côté, créant un potentiel électrochimique.

Dans les cas les plus courants, le potentiel s'établit par une translocation de protons. Des ions sodium peuvent jouer le même rôle. Les protons, ou noyaux

d'hydrogène, ne sont pas des entités libres comme le serait un ion sodium anhydre, par exemple. En milieu aqueux, un proton est présent combiné à des molécules d'eau, sous forme H_3O^+ (ou H_5O_2^+ et autres), alors que dans les molécules organiques et en particulier les protéines, sous forme de groupes ionisables à caractère acide (cystéine, tyrosine, aspartate, glutamate), basique (arginine, lysine, histidine)¹. Les transferts de protons dans les protéines se font de groupe donneur vers groupe accepteur (acide vers base). Lorsque les protons parviennent à l'extérieur, ils sont acceptés par des molécules d'eau et leur présence contribue à faire baisser le pH. Ils peuvent être aussi retenus à la surface de la membrane sous forme de charges positives échangeables. La translocation des protons revient donc à acidifier le milieu extérieur, ou à créer un excédent de charges positives, ou les deux à la fois. Le potentiel électrochimique membranaire a donc deux composantes : une acidité par rapport à l'autre face, une charge globale positive par rapport à celle-ci. La tendance qu'ont les protons à faire ce mouvement inverse dépend à la fois du pH et de la répartition asymétrique des charges. C'est pourquoi on a coutume de représenter le potentiel membranaire par une force protonmotrice, analogue à une force électromotrice, désignée par Δp ou $\Delta \mu\text{H}$, et exprimée en volts :

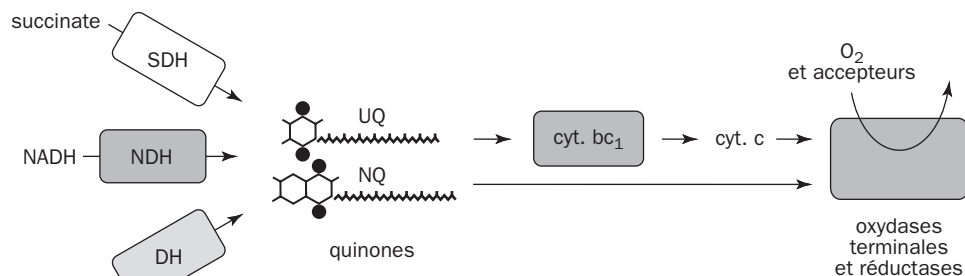
$$\Delta p = \Delta \Psi - 2,3 (RT/F) \Delta \text{pH}.$$

La différence de potentiel électrique $\Delta \Psi$ entre les deux faces de la membrane est positive si l'extérieur est chargé positivement par rapport au cytoplasme. La différence ΔpH du pH entre les deux compartiments est négative si l'extérieur est le côté le plus acide. Le coefficient $2,3 (RT/F)$ vaut à peu près 0,059 volt. Selon ces conventions de signe, une Δp positive tend à faire entrer des protons et donc à faire synthétiser de l'ATP. Beaucoup d'auteurs préfèrent l'exprimer en millivolts. Elle est couramment de 200 à 250 millivolts dans les systèmes biologiques. On voit tout de suite que ΔpH peut être nul si toute la force protonmotrice est établie par une différence de charges entre les deux faces de la membrane qui peut provenir d'une distribution inégale d'ions sodium, potassium ou autres. Des interconversions plus compliquées peuvent avoir lieu par le jeu des mouvements de molécules et d'ions chargés à travers la membrane, soit par diffusion, soit à l'aide de transporteurs spécifiques. Toute substance rendant la membrane perméable à certains ions peut donc avoir un effet découplant. C'est le cas des ionophores et des protonophores. Par exemple la valinomycine transporte spécifiquement les ions potassium à travers la membrane et agit comme découplant si ces ions sont présents. Ce phénomène peut ralentir le développement de la microflore et retarder les biodégradations, quand sont répandues certaines substances phénoliques qui ont un tel effet découplant.

Les **oxydations respiratoires** ont donc une fonction cruciale dans l'établissement d'un potentiel membranaire. Les oxydations liées à la photosynthèse fonctionnent

1 - *Rappel - la notion d'acide ou de base donnée ici correspond aux définitions de BROENSTED, très commode pour les biochimistes. Un acide est donneur de proton, une base un accepteur. Par exemple l'acide glutamique se dissocie réversiblement en acide glutamique $\leftrightarrow$ glutamate⁻ + H⁺, le proton étant accepté par une base (molécule organique, eau).*

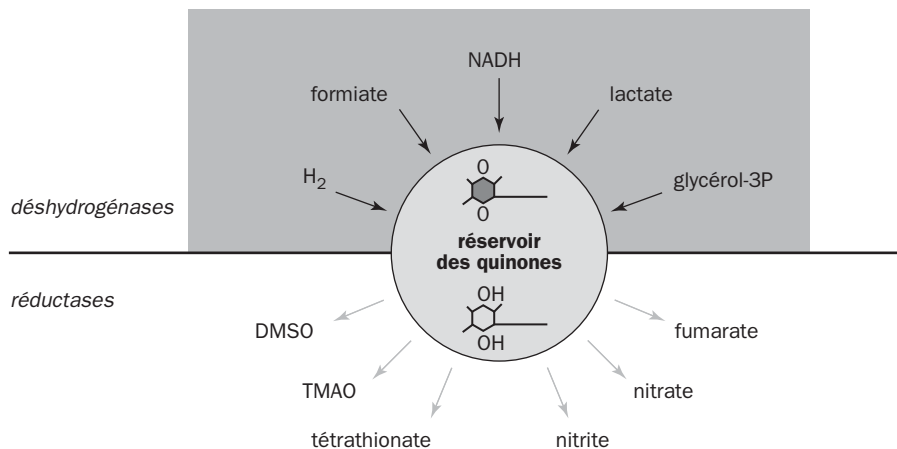
sur le même principe. La figure symbolise le modèle de base d'une chaîne de transporteurs d'électrons débouchant sur un accepteur final qui est supposé ici être le dioxygène.



Chaînes respiratoires

Les rectangles ombrés sont des sites de conservation d'énergie. Ils correspondent à des systèmes enzymatiques complexes où le passage des électrons contribue à bâtir un potentiel membranaire par la translocation à sens unique de protons. On y voit la **NADH déshydrogénase** (NDH) qui est un système complexe avec un composant flavinique et des noyaux fer-soufre, le **cytochrome bc₁** et la **cytochrome c oxydase** terminale ou cytochrome aa₃², remplaçable en anaérobiose par des réductases (comme la nitrate réductase).

Vers les quinones respiratoires de la membrane convergent les électrons venant du NADH, du succinate et de donneurs variés par le canal de diverses déshydrogénases ou de l'hydrogénase, systèmes enzymatiques qui ont tous des noyaux fer-soufre dans leur structure. Les quinones forment un réservoir d'électrons qu'elles distribuent en aval dans différentes directions.



Anaérobiose (*E. coli*)

2 - Une nomenclature traditionnelle mais vieillie appelle "complexe I" de la mitochondrie animale la NADH déshydrogénase (NDH), "complexe II" la SDH, "complexe III" le bc₁ et "complexe IV" la cytochrome c oxydase.

TABLE DES MATIÈRES	795
5.5 - Les voies du nitrate	264
5.6 - Le passage à l'anaérobiose	270
5.7 - Une optimisation très poussée	275
Conclusion	280
CHAPITRE 6 - RÉDUCTION DES OXYDES D'AZOTE	287
6.1 - Nitrate réductases et molybdène	287
6.2 - Nitrate réductases variées	290
6.3 - La réduction des nitrites	293
6.4 - Le passage direct du nitrite à l'ammonium	301
6.5 - De l'oxyde nitrique à l'oxyde nitreux	303
6.6 - De N ₂ O au diazote	307
6.7 - Des champignons dénitrifiant	309
En guise de conclusion	311
CHAPITRE 7 - OXYDATIONS ANAÉROBIES DIVERSES	319
7.1 - Des accepteurs variés et inattendus	319
7.2 - Du sulfate au sulfure	326
7.3 - Biochimie de la réduction du sulfate	332
7.4 - Le fer et le manganèse comme accepteurs anaérobies	340
7.5 - Déshalogénéation respiratoire - Oxyde de chlore	351
Conclusion sommaire	359
CHAPITRE 8 - L'OXYGÉNATION DES AROMATIQUES	365
8.1 - Introduction	365
8.2 - L'oxygénation du benzène	366
8.3 - L'attaque du toluène et du styrène	368
8.4 - Des oxygénases aux cibles nombreuses et variées	373
8.5 - La naphtalène dioxygénase	377
8.6 - L'abondance naturelle des phénols	382
8.7 - Dérivés nitrés	386
8.8 - Haloaromatiques	394

<i>8.9 - Le benzoate et les halobenzoates</i>	<i>398</i>
<i>8.10 - Aromatiques fluorés</i>	<i>404</i>
<i>Conclusion</i>	<i>406</i>
 <i>CHAPITRE 9 - OUVERTURE INTRADIOL DU CYCLE AROMATIQUE</i>	 <i>413</i>
<i>9.1 - Rupture aérobie du cycle</i>	<i>413</i>
<i>9.2 - Voies ortho</i>	<i>414</i>
<i>9.3 - Régulateurs</i>	<i>422</i>
<i>9.4 - Voies ortho modifiées</i>	<i>424</i>
<i>9.5 - Les dioxygénases ortho</i>	<i>429</i>
<i>9.6 - Déshalogénéation aérobie avec ouverture du cycle</i>	<i>435</i>
<i>9.7 - Les cyclo-isomérases</i>	<i>439</i>
<i>9.8 - Hydrolases et réductases des voies ortho</i>	<i>443</i>
<i>9.9 - Déshalogénéation aérobie après ouverture du cycle</i>	<i>445</i>
<i>Conclusion</i>	<i>448</i>
 <i>CHAPITRE 10 - OUVERTURE EXTRADIO - VOIE DU GENTISATE</i>	 <i>455</i>
<i>10.1 - Rupture extradiol du cycle aromatique</i>	<i>455</i>
<i>10.2 - Le plasmide TOL</i>	<i>458</i>
<i>10.3 - Naphtalène et salicylate</i>	<i>464</i>
<i>10.4 - Les polycycliques</i>	<i>467</i>
<i>10.5 - Biphényle et PCB</i>	<i>470</i>
<i>10.6 - Dioxygénases de l'ouverture extradiol</i>	<i>476</i>
<i>10.7 - Aromatiques azotés</i>	<i>482</i>
<i>10.8 - Dioxines !</i>	<i>485</i>
<i>10.9 - Voie du gentisate</i>	<i>490</i>
<i>Conclusion</i>	<i>495</i>
 <i>CHAPITRE 11 - LES AROMATIQUES À L'ABRI DE L'OXYGÈNE</i>	 <i>503</i>
<i>11.1 - Attaque anaérobie par les dénitrifiants</i>	<i>503</i>
<i>11.2 - Benzène - toluène - éthylbenzène - crésol</i>	<i>507</i>
<i>11.3 - La voie du benzylsuccinate</i>	<i>512</i>