

COURS DE METABOLISME

Chapitre 14

Pr C. ZINSOU

METABOLISME DE L'AZOTE ET DE L'AMMONIAC

1 - ORIGINE ET ASSIMILATION DE L'AZOTE

- 1.1 - Fixation biologique de l'azote
- 1.2 – Fixation non biologique de l'azote

2 - ASSIMILATION DE L'AMMONIAC

- 2.1 – Glutamate déshydrogénase
- 2.2 – Glutamine synthétase
- 2.3 – Glutamate synthase

3 –Transamination

4 - ORIGINE ET TRANSPORT DE L'AMMONIAC

- 4.1 – Source de l'ammoniac
- 4.2 – Transport de l'ammoniac

5 – CYCLE DE L'UREE – UREOGENESE

A - PHASE MITOCHONDRIALE

- 5.1 – Synthèse du carbamoylphosphate
- 5.2 – Synthèse de la citrulline

B- PHASE CYTOSOLIQUE

- 5.3 – Transfert du carbamoyle sur la citrulline.
- 5.4 – Clivage de l'argininosuccinate
- 5.5 – Hydrolyse de l'arginine et formation de l'uree

C - BILAN DU CYCLE

6 – HYPERAMMONIEMIE

- 6.1 – Déficiences acquises
 - 6.2 – Déficiences héritées
 - 6.2 – Toxicité de l'ammoniac
-

1 - ORIGINE ET ASSIMILATION DE L'AZOTE

L'azote représente 78 % de l'air et constitue la principale source de cet élément. On le trouve sous forme gazeuse ou minérale. Pour son incorporation dans les molécules biologiques nous distinguerons deux processus : la fixation biologique, apanage uniquement des microorganismes fixateurs, et la fixation non biologique portant sur l'azote minéral. Quelle que soit sa forme initiale, l'azote est converti en ammoniac ou en ion ammoniac qui est transformé en fonction amine ou amide.

1.1 - FIXATION BIOLOGIQUE DE L'AZOTE

La fixation biologique de l'azote est le processus biochimique le plus important après l'assimilation du CO₂. Elle assure la transformation de l'azote gazeux atmosphérique en ammoniac. Seuls quelques microorganismes diazotrophes sont capables d'assurer ce processus, parmi lesquels on distingue

- les bactéries libres vivant dans le sol (*Klebsiella* et *Azotobacter*), les cyanobactéries (algues bleu-vert)
- les rhizobactéries, bactéries symbiotiques vivant en association avec les légumineuses dans des structures racinaires ou caulinaires organisées appelées **nodosités**.

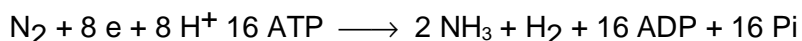
Ces bactéries et certaines levures sont capables de réduire l'azote suivant la réaction globale :



La fixation biologique de l'azote se déroule à 25°C et est catalysée par un complexe enzymatique : la **Nitrogénase/Hydrogénase**. La réaction, réalisée par les fixateurs biologiques, exige

- 8 électrons et 8 protons pour la réduction,
- et 16 ATP pour la fourniture de l'énergie d'activation.

La réaction globale devient :



La formation de l'ammoniac s'accompagne toujours de celle d'hydrogène. Les électrons proviennent :

- de NADH, H⁺ ou/et FADH₂ fournis par les processus cataboliques (cycle de Krebs, β-oxydation des acides gras, etc.)
- de la ferrédoxine ou/et de NADPH, H⁺ formé au cours de la photophosphorylation acyclique.

Le complexe enzymatique de **Nitrogénase/Hydrogénase** est constitué de 2 protéines.

- La première est une **réductase** (encore appelée **nitrogénase 1**) et renferme 2 sous-unités identiques. Elle contient du fer et se comporte comme une réductase (64 kDa). Pour chaque électron récupéré du donneur et cédé à la **nitrogénase** il y a consommation de 2 liaisons phosphates riches en énergie (2 ATP).

- La seconde est la **nitrogénase** (**nitrogénase 2**), organisée en 2 sous-unités α identiques et en 2 sous-unités β identiques. Sous forme tétramérique $\alpha_2\beta_2$, elle reçoit les électrons de la **réductase** pour réduire l'azote atmosphérique.

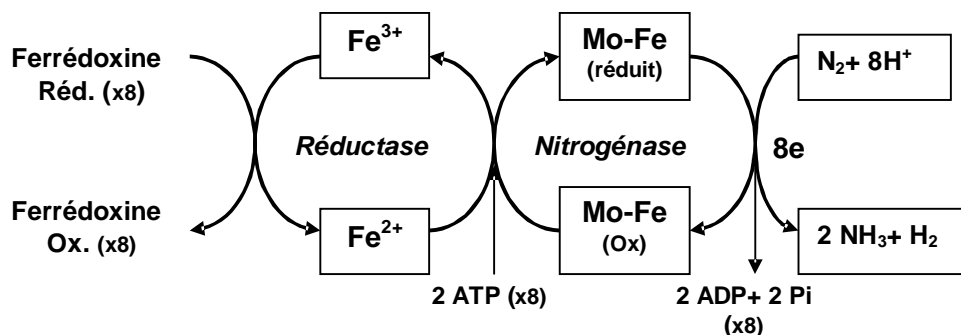


Figure 1 : Fixation biologique de l'azote par le complexe **Nitrogénase/Hydrogénase**. Pour chaque électron fourni par l'intermédiaire de la réductase à la **nitrogénase** pour la réduction de l'azote il y a consommation de 2 liaisons phosphates riches en énergie (2 ATP). Une molécule de H_2 est formée en même temps que celle de l'ammoniac.

Dans le cas de la symbiose *Rhizobium-légumineuse*, l'activité symbiotique

- met en place des structures racinaires ou caulinaires organisées appelées **nodosités** (de préférence à nodules), où sont hébergées les bactéries fixatrices.
- assure, dans les nodosités, la formation d'une protéine spécifique appelée **leghémoglobine**. Dans cette molécule la partie « **globine** » est synthétisée par la plante et la partie « **hème** » par le *Rhizobium*. La fonction de la leghémoglobine est de maintenir la pression de l'oxygène à un niveau assez bas dans l'environnement de l'enzyme, compatible avec le fonctionnement de la fixation de l'azote. Le complexe enzymatique Nitrogénase/Hydrogénase est très sensible à l'oxygène.

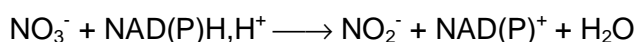
En conclusion les organismes supérieurs dépendent de l'azote fixé par l'activité réductrice des bactéries.

1.2 – FIXATION DE L'AZOTE MINERAL

La majeure partie de l'azoté atmosphérique, retrouvée dans les organismes supérieur, est due à la fixation biologique bactérienne. Elle représente environ 60 % de l'azote total fixé. Le rayonnement ultraviolet et la foudre contribuent pour 15 %. Le reste provient de l'industrie des engrais. On retrouve dans le sol, apportés sous forme de fertilisants minéraux, ou résultant de la minéralisation des différents composés organiques, de l'azote sous trois formes : nitrate (NO_3^-), nitrite (NO_2^-) et ion ammonium (NH_4^+). La réduction des nitrates et des nitrites, assurée par les microorganismes et les plantes, conduira aussi à la formation d'ammoniac ou d'ion ammonium qui sera assimilé comme l'ammoniac issu directement de la fixation biologique. Deux enzymes importantes interviennent : la **nitrate réductase** et la **nitrite réductase**.

1.2.1 – Réduction des nitrates

Bien que l'ion ammonium soit directement utilisable par la plante, c'est sous la forme nitrate que l'azote est préférentiellement absorbé. Il subit alors une séquence de réduction qui conduit le nitrate à l'ion ammonium. La première enzyme qui intervient est la **nitrate réductase**. C'est une flavo-métallo-protéine cytoplasmique, dont le potentiel de réduction standard est $E'^{\circ} = + 0,46$ V. Dans la racine les électrons nécessaires à la réduction sont apportés par le NADPH, H^+ ou le NADH, H^+ . Cette réaction est inhibée par le NH_4^+ et stimulée par le NO_3^- . L'enzyme est sensible à la lumière et aux hormones (cytokinines). La réaction catalysée est :

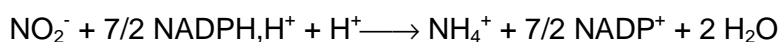


Le nitrate est réduit en nitrite.

1.2.2 – Réduction des nitrites

Le nitrite rentre dans une séquence de réaction dont le produit final est l'ion ammonium. L'enzyme qui intervient est la **nitrite réductase** qui est une métallo-protéine contenant du fer. Dans le stroma, le donneur des électrons est la ferrédoxine ou le NADPH, H^+ .

La réaction globale catalysée est :



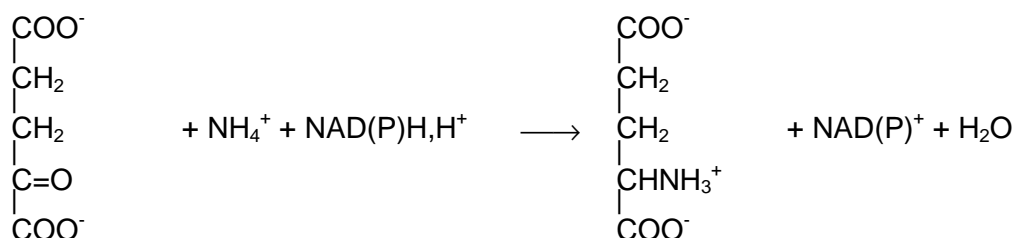
Les plantes préfèrent absorber l'ion NO_3^- et en assurer elles-mêmes la réduction.

2 - ASSIMILATION DE L'AMMONIAC

L'ammoniac, qu'il dérive de la fixation biologique de l'azote atmosphérique, de la réduction des nitrates ou des nitrates ou de l'absorption directe de l'ion ammonium, est toxique pour l'organisme. Il sera transformé en fonction amine ou amide non toxique. On parle alors de l'assimilation de l'ammoniac. Trois enzymes interviennent : **la glutamate déshydrogénase, la glutamine synthétase et la glutamate synthase (GOGAT : glutamine 2-oxogutarate aminotransférèse)**.

2.1 – GLUTAMATE DESHYDROGENASE

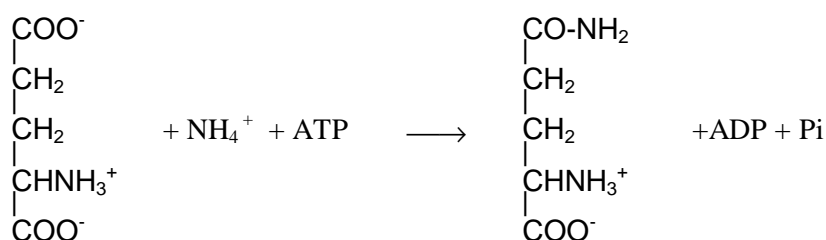
L'assimilation de l'ammoniac est réalisée dans tous les organismes par une enzyme allostérique : **la glutamate déshydrogénase**. On la rencontre dans les mitochondries et dans les chloroplastes. Elle utilise aussi bien le NADPH, H^+ que le NADH, H^+ . Elle catalyse :



La réaction est réversible. Son sens dépend des concentrations relatives du glutamate, de l' α -cétoglutarate, de NH_3 et du rapport des formes réduites et oxydées des coenzymes ($\text{NADPH,H}^+/\text{NADP}^+$ et $\text{NADH,H}^+/\text{NAD}^+$). Elle intervient donc aussi bien dans la réaction d'assimilation de l'ammoniac que dans celle du catabolisme des acides aminés. La **glutamate déshydrogénase** est très active dans le foie et les reins. Elle fait l'objet d'une régulation allostérique, inhibée par ATP et GTP mais activée par ADP et GDP.

2.2 – GLUTAMINE SYNTHETASE

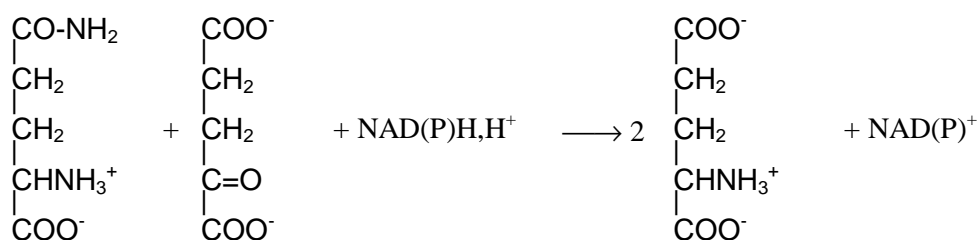
L'assimilation de l'ammoniac peut aussi se faire par l'action de la **glutamine synthétase** avec consommation d'énergie, sous forme d'une liaison phosphate riche en énergie de l'ATP. Elle catalyse la réaction :



La glutamine devient un transporteur du groupement amine à partir du foie **via** le plasma sanguin vers les autres tissus.

2.3 – GLUTAMATE SYNTHASE

La glutamine peut être impliquée dans une deuxième réaction catalysée par la **glutamine synthase** (Glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase ou GOGAT) qui conduit à la formation du glutamate.

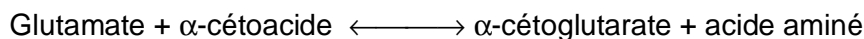


L'action de la **glutamine synthétase** et de la **glutamate synthase** est couplée dans les cyanobactéries et dans les systèmes symbiotiques associant *Rhizobium-légumineuses*. Le groupe amide du glutamate sert à la synthèse des autres acides aminés (transamination) et fournit l'azote dans la synthèse des autres composés azotés.

3 - LA TRANSAMINATION : TRANSFERT DU GROUPEMENT AMINE

C'est le processus qui conduit à un échange de la fonction amine entre un acide aminé (principalement le glutamate) et un α -cétoacide ou 2-oxo-acide (figure 2). Les enzymes qui catalysent de telles réactions sont appelées des **aminotransférases** ou **transaminases**.

Les **aminotransférases** majeures se trouvent dans tous les tissus et la réaction catalysée est réversible. Le transfert de la fonction amine du glutamate sur un α -cétoacide s'écrit :



Le cofacteur impliqué est le pyridoxal phosphate qui dérive de la vitamine B6. Il constitue le groupement prosthétique de toutes les **aminotransférases** et est lié au reste lysine de l'apoenzyme par une liaison covalente sous forme de base de SCHIFF en l'absence de substrat. Sa liaison provisoire avec l'acide aminé substrat est aussi une base de SCHIFF. Le mécanisme détaillé sera détaillé dans le chapitre du métabolisme des acides aminés.

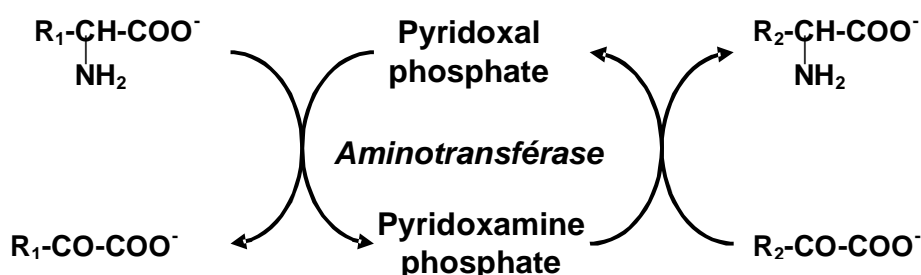


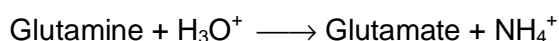
Figure 2 : La transamination ou l'aminotransfert. Le groupement aminé est transféré de l'acide aminé 1 sur un α -cétoacide pour former l'acide aminé correspondant (acide aminé 2).

4 – ORIGINE ET TRANSPORT DE L'AMMONIAC CHEZ LES ANIMAUX

4.1 – SOURCE DE L'AMMONIAC

Le catabolisme d'un grand nombre de composés azotés dans la cellule animale conduit à la production de l'ammoniac. Ce dernier est toxique pour l'organisme à partir d'un certain seuil de concentration.

- Les acides aminés, provenant de l'hydrolyse des protéines, sont quantitativement les producteurs majeurs d'ammoniac grâce à l'action combinée des **aminotransférases** (qui transfèrent le groupement amine d'un acide aminé sur l' α -cétoglutarate pour former le glutamate), et de la **glutamate déshydrogénase**.
- La glutamine est la forme de transport non toxique de l'ammoniac. Elle est formée dans les muscles, le foie et aussi dans le système nerveux. Elle est ensuite excrétée dans le sang où son taux est supérieur à celui des autres acides aminés. Dans les reins et dans l'intestin, la glutamine circulante subit l'action de la **glutaminase** qui l'hydrolyse en glutamate et en ammoniac.



- La dégradation des purines, des pyrimidines, des catécholamines et des autres amines, est aussi source de formation d'ammoniac.

4.2 – TRANSPORT DE L'AMMONIAC

Deux formes de transport sont privilégiées :

- la glutamine formée par fixation de l'ammoniac sur le glutamate avec consommation d'énergie (paragraphe 2.2),

- l'urée formée exclusivement dans le foie des animaux et qui contribue à l'élimination de l'ammoniac. La séquence de réactions conduisant à la formation de l'urée constitue le **cycle de l'Urée** ou l'**Uréogenèse**.

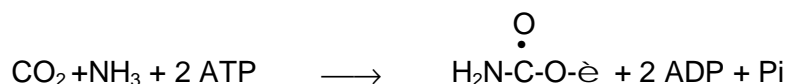
5 - UREOGENESE OU CYCLE DE L'UREE (ELIMINATION DE L'ION AMMONIUM)

L'excès d'ammoniac ou d'ion ammonium doit être éliminé. Les poissons l'excrètent sous la forme d'ion ammonium dans l'eau. La forme sous laquelle il est éliminé chez les batraciens a permis de distinguer les 2 stades de vie : ammoniotèles (vie aquatique où l'élimination se fait sous forme d'ion ammonium) ; uréotèles (vie terrestre où l'élimination se fait sous forme d'urée). Chez les autres vertébrés terrestres l'ion ammonium est éliminé sous forme d'urée. La séquence des réactions qui vont intervenir comporte une phase mitochondriale et une phase cytosolique, illustrée dans la figure 3. Elle ne se déroule que dans le foie.

PHASE MITOCHONDRIALE

5.1 - SYNTHÈSE DU CARBAMOYLPHOSPHATE

Dans les mitochondries la **carbam(o)ylphosphate synthétase** utilise le CO₂, le NH₃ et 2 ATP comme substrats pour former le carbam(o)ylphosphate. Deux liaisons phosphates riches en énergie sont consommées.



5.2 – SYNTHÈSE DE LA CITRULLINE

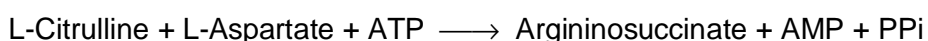
Une fois le carbam(o)ylphosphate formé, il est rejoint par l'ornithine transportée du cytosol. Sous l'action de l'**ornithine carbam(o)yltransférase** (transcarbamylase) le radical carbamoyle est transféré sur l'ornithine pour former la citrulline.



PHASE CYTOSOLIQUE

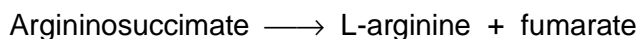
5.3 - FORMATION DE L'ARGININOSUCCINATE.

La citrulline obtenue est transportée dans le cytosol. Sous l'action de l'**argininosuccinate synthétase** la citrulline se condense avec l'aspartate pour donner l'argininosuccinate avec consommation de deux liaisons phosphates riches en énergie d'une molécule d'ATP.



5.4 – FORMATION DE L'ARGININE

Elle est catalysée par une **argininosuccinate lyase** qui assure le clivage en L-arginine et en fumarate. Cette réaction intervient aussi dans la synthèse de l'arginine.



Le fumarate est transporté dans les mitochondries et repris par le cycle de Krebs qui l'oxyde en oxaloacétate. Ce dernier sera transaminé en aspartate par l'**aspartate aminotransférase**. Ainsi est créé un lien entre les deux cycles de Krebs et de l'Urée.

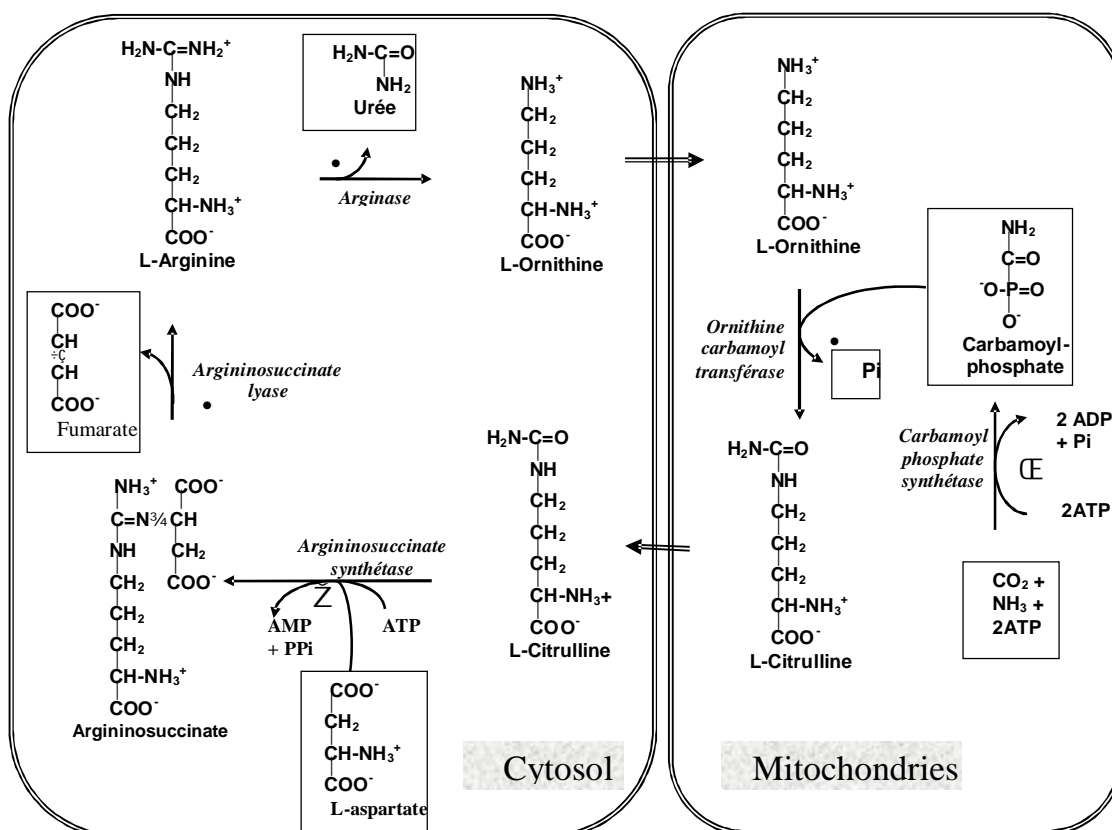
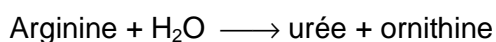


Figure 3 : Cycle de l'Urée ou Uréogénèse. On distingue bien les deux phases mitochondriale et cytosolique.

5.5 - HYDROLYSE DE L'ARGININE

L'hydrolyse de l'arginine termine le cycle. Il se forme de l'urée et de l'ornithine. La réaction est catalysée par l'**arginase**



Alors que l'urée est excrétée pour être éliminée par l'urine, l'ornithine est transportée dans les mitochondries pour réinitier le cycle

C – BILAN DU CYCLE

Le bilan brut du cycle s'écrit :



Au cours de la formation d'une molécule de l'urée 4 liaisons riches en énergie ont été utilisées (2 ATP en 2 ADP+ 2 Pi, ATP en AMP + PPi). Lorsque le fumarate est transformé en oxaloacétate (cycle de Krebs) pour régénérer l'aspartate après transamination, il en résulte la formation d'une molécule de NADH,H⁺ qui correspond à 3 ATP. En conclusion l'élimination d'un ion ammonium libre et de l'amine de l'aspartate sous forme d'une molécule d'urée ne consomme qu'une liaison phosphate riche en énergie.

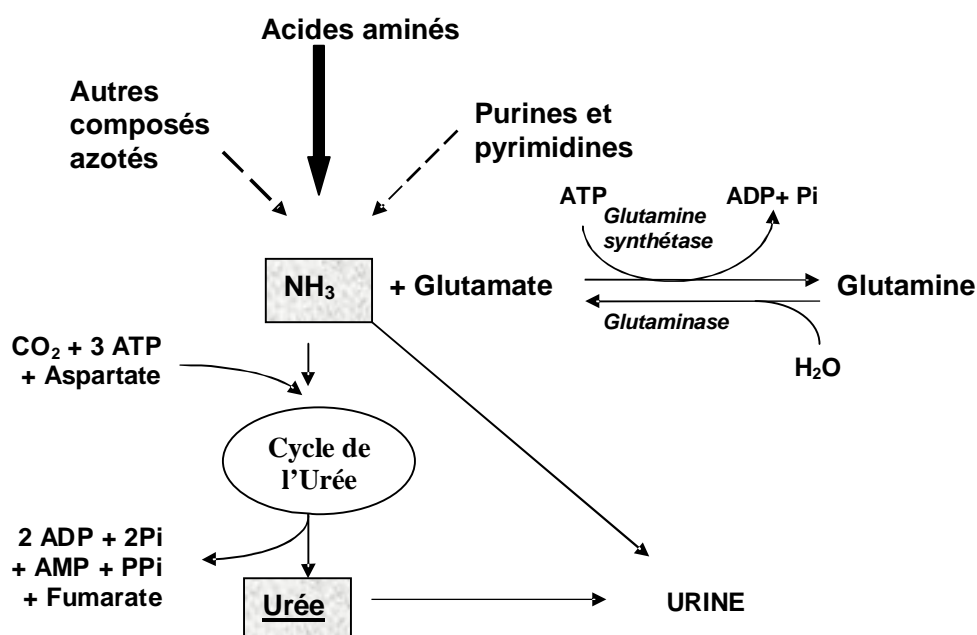


Figure 4 : Résumé du métabolisme de l'ammoniac.

6 – HYPERAMMONIEMIE

Une augmentation de l'ammoniac (ion ammonium) dans le sang conduit à l'**hyperammoniémié**. L'excès d'ammoniac peut provoquer des dommages irréversibles dans le cerveau, le coma et la mort. Il entraîne par voie de conséquence une élévation excessive du glutamate et de la glutamine (acides aminés acides). Cette hyperammoniémié peut résulter de déficiences acquises ou héritées portant sur les enzymes du cycle de l'urée.

6.1 – DEFICIENCES ACQUISES

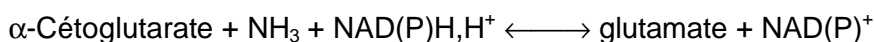
Tout dysfonctionnement du foie causé par l'alcoolisme, l'hépatite, l'obstruction des canaux biliaires, lorsqu'il n'est pas traité, altère le rôle de détoxification du foie, donc l'uréogénèse. Il s'ensuit une élévation de l'ammoniac dans la circulation sanguine. Le cerveau est très sensible à l'hyperammoniémié.

6.2 – DEFICIENCES HERITEES

Des déficiences peuvent affecter une ou plusieurs enzymes du cycle de l'urée et bloquer ainsi l'uréogénèse. On estime qu'à la naissance 1 foie sur 30 000 ne peut pas assurer l'élimination de l'ammoniac sous forme d'urée. Elles sont souvent responsables du retard mental au cours de la croissance de l'enfant.

6.3 – TOXICITE DE L'AMMONIAC

Le mécanisme qui explique la toxicité de l'ammoniac au niveau du cerveau réside dans l'augmentation du glutamate et de la glutamine en cas d'hyperammoniémie. En effet la formation excessive du glutamate entraîne un déplacement de l'équilibre de la réaction catalysée par la **glutamate déshydrogénase** dans le sens de l'assimilation de l'ammoniac.



Ceci se traduit par un prélèvement excessif de l' α -cétoglutarate, intermédiaire essentiel du cycle de Krebs. La réduction de ce composé affecte fortement le fonctionnement de ce cycle et par voie de conséquence l'ensemble du processus de production de l'énergie dont le cerveau est grand consommateur.
