

# Vers une meilleure compréhension de la régulation métabolique

Pendant la période classique de l'étude de la régulation métabolique, on a pensé qu'elle pouvait s'expliquer complètement en termes d'effets de molécules régulatrices sur des enzymes clés, c'est-à-dire en termes d'effets allostériques et coopératifs. Le développement depuis 1973 de la théorie du contrôle métabolique a souligné la nécessité de considérer les voies métaboliques comme des systèmes d'enzymes organisées, au lieu de les considérer comme des ensembles d'éléments indépendants. Bien que beaucoup de chercheurs aient considéré ces deux approches comme contradictoires, nous montrerons que les mécanismes classiques sont indispensables pour comprendre le comportement des systèmes complets. Ainsi, la rétro-inhibition coopérative n'a pas beaucoup d'effet sur les flux métaboliques (à l'inverse de ce que l'on pensait), mais elle est indispensable pour réguler les concentrations des métabolites intermédiaires.

Athel CORNISH-BOWDEN - María Luz CÁRDENAS - Jan-Hendrik S. HOFMEYR

**L**e développement de la biologie moléculaire pendant les dernières années a produit une très grande augmentation de l'activité en biotechnologie. De grands efforts ont été faits pour utiliser les connaissances de la biologie moléculaire pour améliorer la production bactérienne des métabolites utiles et pour trouver de nouvelles voies de production. Néanmoins, quand on examine le résultat de l'énorme investissement financier et humain, on ne peut qu'être très déçu, parce qu'il n'y a apparemment pas de bons exemples d'augmentation importante de rendement obtenus par les techniques modernes de clonage et de génie génétique.

## L'impact de la biologie moléculaire sur la biotechnologie

Nous commençons en examinant un travail récent de Niederberger et coll. (1992).

## Efforts d'augmenter des flux utiles

Pour quatre des cinq enzymes de la voie de biosynthèse du tryptophane dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, ces auteurs ont trouvé que n'importe quelle augmentation de l'activité d'une seule enzyme n'a presque aucun effet sur la production du tryptophane : ainsi, l'augmentation de l'activité de l'indole-glycérol phosphate synthase par un facteur de 50 n'a aucun effet sur le flux vers le tryptophane ; l'augmentation de l'activité de la phosphoribosyltransférase par un facteur de 20 n'a donné qu'une augmentation de 30 % du flux ; etc.

L'explication « classique » de ces résultats serait que l'anthranilate synthase, l'enzyme qui n'a pas été examinée toute seule dans cette expérience, est l'enzyme « clé » de cette voie, c'est-à-dire qu'elle contrôle le flux. Malheureusement pour cette explication, quand l'activité de cette enzyme a été augmentée par un facteur 30 en même temps que deux autres activités ont été augmentées par des facteurs de

30 et 40, l'effet sur le flux n'a été que de 20 %. Une augmentation importante du flux vers le tryptophane a été produite seulement par l'augmentation des cinq activités (ou de toutes sauf de celle de la phosphoribosylisomérase, laquelle apparemment a très peu d'importance).

Cette étude est la plus détaillée qui existe dans la littérature, mais elle n'est pas la seule. Ainsi, par exemple, Schaaff et coll. (1989) ont fait des essais assez semblables pour augmenter le rendement de l'éthanol dans la levure, avec essentiellement les mêmes résultats. C'est seulement quand on cherche des exemples de réussite qu'on cherche en vain.

## Besoin d'une théorie de la régulation

Nous pensons que c'est plus l'optimisme qu'une vraie compréhension du comportement des voies métaboliques qui dirige les efforts pour utiliser le génie génétique afin

de réaliser les buts biotechnologiques. Plus important, nous pensons que ces buts ne seront atteints sur une échelle significative qu'avec le développement d'une théorie moderne de la régulation métabolique.

A partir de la découverte de la rétro-inhibition d'une enzyme par le produit final de la voie à laquelle elle appartient (Yates et Pardee, 1956; Umbarger, 1956), les travaux classiques des années 1955-1970 ont donné beaucoup d'informations sur les façons de modifier l'activité d'une enzyme dans la cellule; en plus, les études théoriques de Monod et coll. (1965) et de Koshland et coll. (1966) ont donné une bonne compréhension des propriétés moléculaires qui permettent les variations de l'activité enzymatique.

Néanmoins, comprendre la régulation métabolique n'est pas seulement comprendre ses composants; un système doit être considéré comme un vrai système, et pas seulement comme l'ensemble de ses composants. La théorie du contrôle métabolique développée à la suite des études de Kacser et Burns (1973) et de Heinrich et Rapoport (1974) peut être conçue comme une réaction contre une insistance excessive sur les rôles

des enzymes individuelles, mais elle va peut-être un peu trop loin dans le rejet des idées classiques. En effet les mécanismes classiques sont indispensables pour expliquer la régulation, comme nous le montrerons ci-dessous, bien qu'ils soient incomplets en l'absence de cette théorie du contrôle.

### Incorporation des mécanismes classiques dans la théorie du contrôle

Donc les mécanismes classiques doivent être incorporés dans la théorie du contrôle, afin d'arriver à une théorie de la régulation. L'un des mécanismes le plus important à considérer est la *rétro-inhibition*, où le produit « final » d'une voie inhibe l'activité de l'enzyme qui catalyse la première étape de sa biosynthèse à partir d'un réservoir de matériel initial. (Les molécules dites « finales » dans la biochimie ne sont pas des produits excrétés par l'organisme; elles sont les substrats d'autres voies.) La rétro-inhibition est souvent *coopérative*, c'est-à-dire que l'enzyme inhibée répond à la concentration en inhibiteur avec plus de sensibilité que celle qu'on attend pour les mécanismes les plus simples. La coopérativité peut être exprimée en termes d'un para-

mètre  $h$ , égal à 4 pour le plus haut niveau de coopérativité normalement observé, pour lequel une augmentation de 3 fois de la concentration en inhibiteur suffit pour faire chuter l'activité résiduelle de 90% de l'activité sans inhibiteur à 10% de la même activité; quand il n'y a pas de coopérativité,  $h = 1$ , une augmentation de 81 (=  $3^4$ ) fois est nécessaire pour produire le même effet.

### A quoi servent la rétro-inhibition et la coopérativité ?

On a supposé qu'elles étaient nécessaires pour permettre à un système métabolique de répondre efficacement aux demandes de produit final: quand la vitesse d'utilisation augmente, la vitesse de biosynthèse doit augmenter aussi. Nous avons étudié le modèle présenté sur le schéma 1 pour savoir si cette interprétation est correcte: dans ce modèle un produit final  $S_3$  d'une voie de trois étapes sert comme substrat de deux voies d'utilisation 4a et 4b. Quand le système est bien régulé, on attend que le flux dans la voie 4a augmente quand l'activité catalytique de cette voie augmente (parce que cette activité représente la demande pour les produits de la voie), mais qu'il soit insensible aux changements de l'activité de la voie 4b.

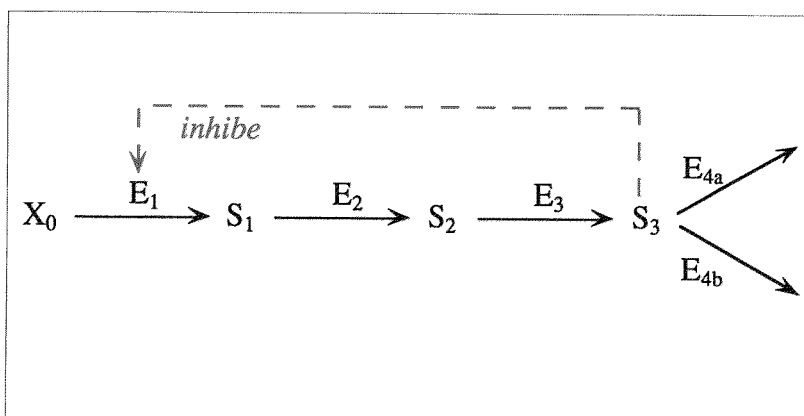


Schéma 1 : Modèle d'une voie métabolique avec cinq enzymes, dont  $E_{4a}$  et  $E_{4b}$  représentent des étapes de demande. Normalement on considère que la voie se termine avant les étapes de demande, c'est-à-dire que  $S_3$  est le « produit final ». Les équations de vitesse suivantes étaient définies pour simuler le comportement cinétique de cette voie :

$$\begin{aligned} v_1 &= (10[X_0] - [S_1]) / (1 + [X_0] + [S_1] + [S_3]^h); \\ v_2 &= (10[S_1] - 2[S_2]) / (1 + [S_1] + [S_2]); \\ v_3 &= (10[S_2] - 2[S_3]) / (1 + [S_2] + [S_3]); \\ v_{4a} &= V_{4a}[S_3] / (1 + [S_3]); \\ v_{4b} &= V_{4b}[S_3] / (1 + [S_3]). \end{aligned}$$

La concentration  $[X_0]$  était fixée à une valeur de 10. Dans le cas où il n'y avait pas rétro-inhibition le terme  $[S_3]^h$  était absent de la première équation, et dans les autres l'exposant  $h$  avait les valeurs 1 ou 4. La simulation du comportement du modèle a été faite avec le logiciel MetaModel (Cornish-Bowden et Hofmeyr, 1991).

En effet, ce comportement se produit même sans rétro-inhibition ou avec rétro-inhibition non-coopérative, comme le montre la figure 1. Qu'il n'y ait pas d'inhibition, qu'elle soit fortement coopérative ( $h = 4$ ), ou qu'elle ne le soit pas ( $h = 1$ ), la réponse du flux 4a aux changements de demande est presque la même: dans les trois cas, le flux 4a augmente quand la demande 4a augmente, mais il change peu en réponse aux changements de la demande 4b; pour le flux 4b on observe l'inverse. Il faut remarquer que la constante d'équilibre entre  $X_0$  et  $S_3$  dans le modèle est 250. Même sans rétro-inhibition directe, le produit final dans une voie assez courte peut inhiber sa synthèse par l'action de masse; comme nous l'avons montré ailleurs (Hofmeyr et Cornish-Bowden, 1991), la biosynthèse de la sérine chez les mammifères en offre un exemple.

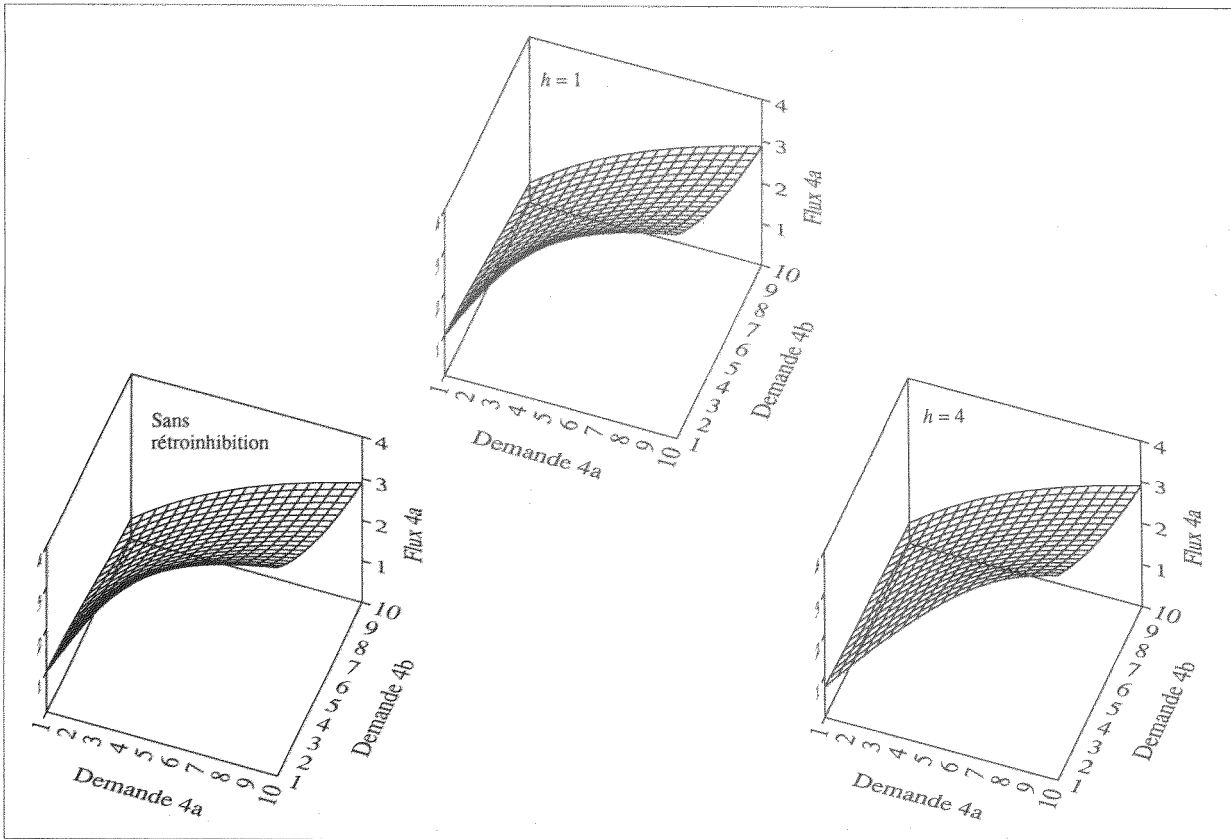


Fig. 1 : Effets des changements de demande dans les étapes 4a et 4b (modèle montré dans le schéma 1) sur le flux dans l'étape 4a. Il y a très peu de différence entre les trois cas : la sensibilité du flux à la demande est presque la même sans ou avec rétro-inhibition coopérative.

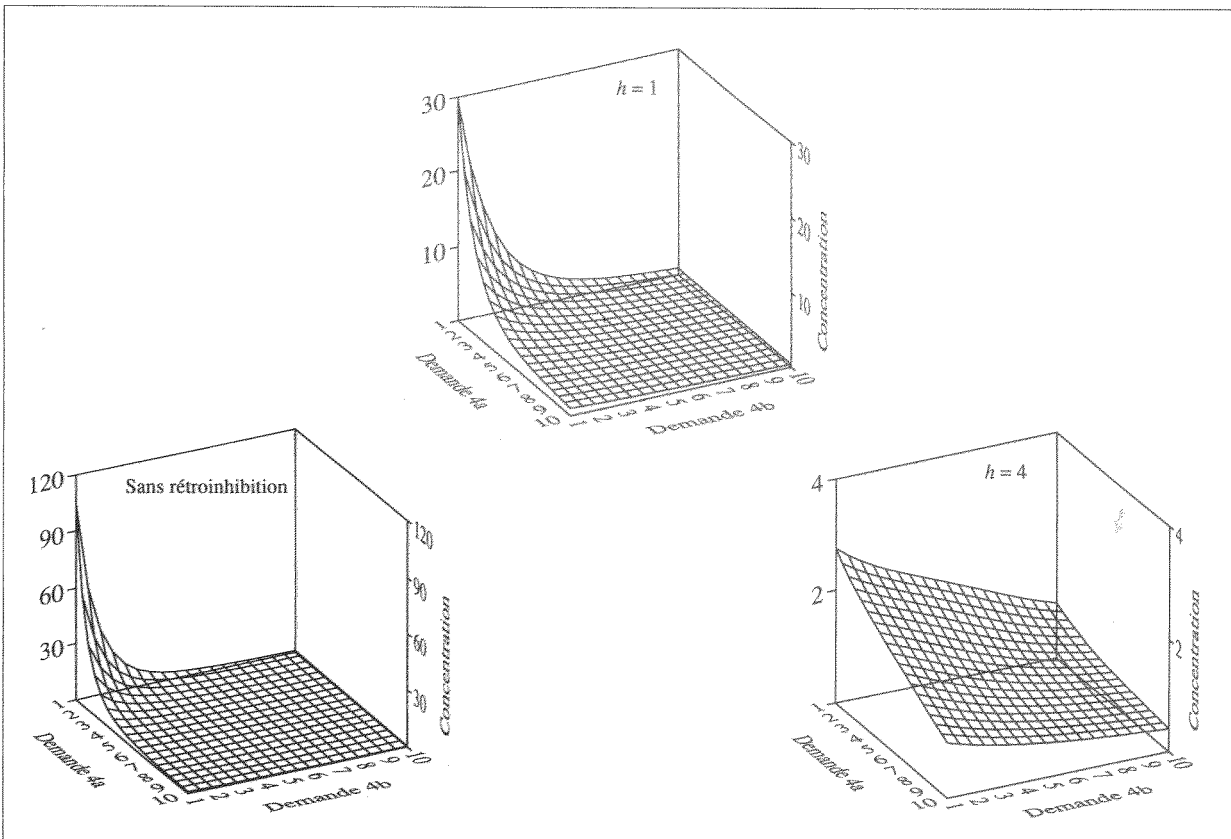


Fig. 2 : Effets de changements de demande dans les étapes 4a et 4b sur la concentration du produit final  $S_3$  (dans le modèle montré dans le schéma 1). La figure montre que les effets de la rétro-inhibition et de la coopérativité sur la concentration sont très importants, en contraste avec leurs effets presque nuls sur le flux (figure 1).

Peut-on donc conclure que la rétro-inhibition coopérative ne sert à rien dans les systèmes métaboliques ? En effet elle est vraiment très importante, mais son rôle n'est pas celui qu'on avait pensé. Pour la réponse de la concentration du produit final  $S_3$  (fig. 2), au lieu de celles des flux, les trois cas sont très différents : le système coopératif ( $h = 4$ ) permet essentiellement les mêmes flux dans une gamme de concentration beaucoup plus faible que les autres. Donc le rôle de la coopérativité n'est pas de permettre de réguler le flux, mais de minimiser la variation de concentration du produit final quand le flux change, c'est-à-dire de contribuer à l'homéostasie du produit final.

#### Exemple expérimental de la suppression de la rétro-inhibition

La figure 2 montre que s'il n'y a pas de rétro-inhibition la concentration du produit final peut augmenter fortement. Si la demande n'est pas très élevée on peut imaginer que le métabolite va s'accumuler et pourrait alors être excrété dans le milieu. Ceci est effectivement le cas des mutants bactériens résistants à la rétro-inhibition. Par exemple, des mutants d'*Escherichia coli* dans lesquels l'aspartokinase du type normalement sensible à la lysine est devenue résistante à la rétro-inhibition, c'est-à-dire qu'elle est insensible à l'inhibition par la lysine, excrètent de la lysine dans le milieu (Boy et Patte, 1972). Cette excrétion implique une augmentation considérable dans la production de la lysine (par un facteur d'au moins dix). Par contre, les augmentations de la production de la lysine sont très modestes quand on augmente le nombre de copies des gènes qui codent pour certaines enzymes de la voie de biosynthèse de la lysine dans ces couches qui l'excrètent : par exemple, la production augmente seulement par un facteur de 1,7 alors que l'activité de la dihydrodipicolinate réductase est augmentée de 30 fois (Dauce-Le Reverend et coll., 1982).

On voit donc que ces résultats classiques sont en bon accord avec ceux de Niederberger et coll. (1992) discutés au début de cet

article. (Par égard pour la simplicité nous ne discutons pas ici le fait que la synthèse d'une protéine n'est pas strictement proportionnelle au nombre de copies du gène.)

Par conséquent ces résultats illustrent l'idée que la façon la plus efficace d'augmenter le rendement d'un produit final est la suppression de l'inhibition par ce produit.

### Incorporation de la régulation dans la théorie du contrôle métabolique

Le rôle du produit final est prééminent dans la transmission d'un signal métabolique à une enzyme régulatrice. Ce rôle a toujours été reconnu dans les études classiques de la régulation, mais il a eu tendance à disparaître dans la théorie actuelle du contrôle, parce que quoique celle-ci traite très bien les effets des paramètres (activités des enzymes et concentrations des métabolites externes), elle a considéré les concentrations des métabolites internes comme des variables du système, c'est-à-dire comme des effets et pas comme des causes. En réalité, tout métabolite interne agit à la fois comme un effet et comme une cause, et pour cela une théorie adéquate de la régulation doit pouvoir analyser ce double rôle. Nous développons actuellement ce type d'analyse, et nous étudions des modèles plus réalistes que celui du schéma 1.

Pour finir nous remarquons que même quand la rétro-inhibition est fortement coopérative, les variations de la concentration du produit final ne sont pas négligeables. Dans la figure 2 la concentration varie entre 0,4 et 2,7 quand  $h = 4$ , une gamme qu'on pourrait parfois considérer comme excessive. Il y a très peu d'enzymes individuelles connues avec des valeurs de  $h$  plus élevées que 4, mais la Nature a trouvé une autre solution : comme nous le disons ailleurs (Cárdenas et Cornish-Bowden, 1989 ; Szedlasek et coll., 1992), des systèmes plus complexes, dits « cascades

d'enzymes interconvertibles », peuvent donner un très grand degré de sensibilité. ■

A. CORNISH-BOWDEN,  
M.L. CÁRDENAS,  
Laboratoire de Chimie  
Bactérienne, CNRS,  
31, chemin Joseph-Aiguier,  
F 13402 Marseille Cedex 20.  
Tél. : 91 16 41 38.  
Fax : 91 71 89 14.

J.H.S. HOFMEYR,  
Department of Biochemistry,  
University of Stellenbosch,  
7600 Stellenbosch,  
République d'Afrique du Sud.  
Tél. : 27 2231 77 3038.  
Fax : 27 2231 77 3022.

#### Remerciements

Nous remercions Mme Simone Bermond et le Dr Jean-Claude Patte de leur aide dans la préparation du texte français de cet article.

#### BIBLIOGRAPHIE

- E. BOY et J.-C. PATTE, *J. Bacteriol.*, 112, 84-92 (1972).
- B. DAUCE-LE REVEREND, M. BOITEL, A.M. DESCHAMPS, J.-M. LEBEAULT, K. SANO, K. TAKINAMI et J.-C. PATTE, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15, 227-231 (1982).
- M.L. CÁRDENAS et A. CORNISH-BOWDEN, *Biochem. J.*, 257, 339-345 (1989).
- A. CORNISH-BOWDEN et J.-H. S. HOFMEYR, *CABIOS Rev.*, 7, 89-93 (1991).
- R. HEINRICH et T.A. RAPOPORT, *Eur. J. Biochem.*, 42, 89-95 (1974).
- J.-H. S. HOFMEYR et A. CORNISH-BOWDEN, *Eur. J. Biochem.*, 200, 223-236 (1991).
- J.-H. S. HOFMEYR, A. CORNISH-BOWDEN et J.M. ROHWER, *Eur. J. Biochem.*, 212, 833-837 (1993).
- H. KACSER et J.A. BURNS, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 27, 65-104 (1973).
- H. KACSER et J.A. BURNS, *Genetics*, 97, 639-666 (1981).
- D.E. Jr. KOSHLAND, G. NÉMETHY et D. FILMER, *Biochemistry*, 5, 365-385 (1966).
- J. MONOD, J. WYMAN et J.-P. CHANGÉUX, *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118 (1965).
- P. NIEDERBERGER, R. PRASAD, G. MIOZZARI et H. KACSER, *Biochem. J.*, 287, 473-479 (1992).
- I. SCHAAFF, J. HEINISCH et F.K. ZIMMERMANN, *Yeast*, 5, 285-290 (1989).
- S.E. SZEDLASEK, M.L. CÁRDENAS et A. CORNISH-BOWDEN, *Eur. J. Biochem.*, 204, 807-813 (1992).
- H.E. UMBARGER, *Science*, 123, 848 (1956).
- R.A. YATES et A.B. PARDEE, *J. Biol. Chem.*, 221, 757-770 (1956).