

La chaîne de biosynthèse de la thréonine et sa régulation chez E. coli

But : Le but de ce qui suit est de permettre de construire un modèle de la chaîne de biosynthèse de la thréonine avec lequel on pourra déterminer l'évolution au cours du temps des différents métabolites.

Il pourra s'agir d'un système dynamique dans lequel on mélange à l'instant zéro de l'aspartate (asp) de l'ATP et du NADPH et où l'on suit l'apparition successive des différents métabolites et in fine de la thréonine. Les manipulations expérimentales ont été faites dans ces conditions : voir article 2 : Rais et al. BJ (2001), 356 : 425-432.

Il pourra s'agir d'une étude à l'état stationnaire dans laquelle on considèrera l'apparition de thréonine (considérée comme un métabolite externe au système et pas à l'état stationnaire).

Il pourra s'agir d'une étude à l'état stationnaire dans laquelle on considère aussi la concentration de thréonine comme constante. Il sera nécessaire dans ce cas de considérer une consommation de thréonine (voir modèle général dans l'article 3 : Chassignole et al. BJ (2001), 356 : 433-444. Dans ce cas on pourra calculer les coefficients de contrôle des différentes étapes sur les concentrations et les flux (étude de sensibilité au voisinage de l'état stationnaire). Ce dernier cas correspond à la chaîne de biosynthèse de la thréonine plongée dans l'ensemble du métabolisme cellulaire.

Chaîne métabolique

La chaîne de biosynthèse de la thréonine chez E.coli est constituée de 5 étapes décrites dans la Fig. 1 : (Pour la modélisation on ne tient pas compte des flèches en pointillé)

- Aspartokinase : 3 iso-enzymes ; on ne tiendra compte que de 2 d'entre eux : **AK I** inhibée par la thréonine et **AK III** inhibée par la lysine ; (AK II est en faible quantité).
- Aspartate semialdéhyde déshydrogénase : **ASD**. Pas de régulation particulière.
- Homosérine déshydrogénase : **HDH** inhibée par la thréonine.
- Homosérine kinase : **HK** Inhibée par la thréonine et la lysine.
- Thréonine synthétase, **TS**.

Note : Les activités AKI et HDHI sont portées par la même protéines. Il existe une AK II – HDH II en faible quantité qu'on néglige ici.

Les deux dernières étapes sont quasi-irréversibles, les trois premières sont réversibles.

Il faut noter qu'il s'agit en fait d'une chaîne branchée dont on ne considère qu'une branche.

Les autres branches permettent la synthèse de la méthionine, de la lysine et d'isoleucine. De plus les 4 derniers enzymes de la chaîne de biosynthèse de l'isoleucine à partir de la thréonine permettent la synthèse de la valine à partir du pyruvate ; enfin la biosynthèse de la leucine s'effectue à partir du précurseur direct de la valine. Nous ne considérerons pas ces diverses voies de biosynthèses mais cela permet de comprendre que tous ces acides aminés peuvent avoir un rôle régulateur y compris pour la voie de biosynthèse de la thréonine.

Régulation génétique :

- Les enzymes AK I-HDH I, HK et TS sont codés par les gènes thrA, thrB et thrC respectivement qui font partie d'un opéron, l'opéron thréonine.
- Cet opéron est soumis à une répression multivalente par thréonine et isoleucine, c'est à dire qu'il est nécessaire d'avoir un excès, à la fois, de thréonine et d'isoleucine (1 mM chacun) pour avoir une répression de la synthèse de ces trois protéines ; la présence de thréonine seule (ou d'isoleucine seule) n'a aucun effet. Cependant, dans un premier temps, dans le modèle on pourra supposer que la thréonine seule réprime l'expression de cet opéron.
- Un gène, thrO situé en amont de l'opéron thréonine agit comme atténuateur pouvant fixer les tARN^{thr} et tARN^{ile} chargés qui agiraient comme co-répresseur de l'opéron thréonine. La logique de cette régulation est la suivante : un excès de thréonine et d'isoleucine entraîne que les tARN correspondants existent de manière prépondérante sous forme chargée, inhibant la synthèse des enzymes de leur biosynthèse ; par contre de faibles concentrations de ces acides aminés fait que les tARN correspondant sont essentiellement libres et n'atténuent pas la transcription de l'opéron thréonine.
- Il existerait un site d'initiation de la transcription pour la partie du gène codant pour l'HDH I, au milieu du gène AK I-HDH I.
- Il y aurait aussi un promoteur interne pour le gène thr B (assurant aussi la transcription de thr C).

Conclusion :

On peut se poser la question de l'intérêt d'une telle modélisation. Parmi les réponses que l'on peut donner on donnera :

- le fait que l'association des équations de vitesses proposées à partir de l'étude des enzymes isolées permet une description correcte des résultats expérimentaux. Les différences entraînent des hypothèses qui peuvent être vérifiées expérimentalement (inhibition de l'HK par la lysine par exemple, extra-consommation de NADPH et d'ATP).
- Le fait que le premier enzyme d'une chaîne métabolique (AK) peut catalyser une réaction proche de l'équilibre, en tous cas pas une réaction irréversible, et que cette réaction soit régulée (par thr et lys) et ait un coefficient de contrôle non négligeable, c'est à dire que des variations de sa concentration ait une influence sur le flux de production de thréonine à l'état stationnaire.

- Figure 1 : Chaîne de biosynthèse de la thréonine.

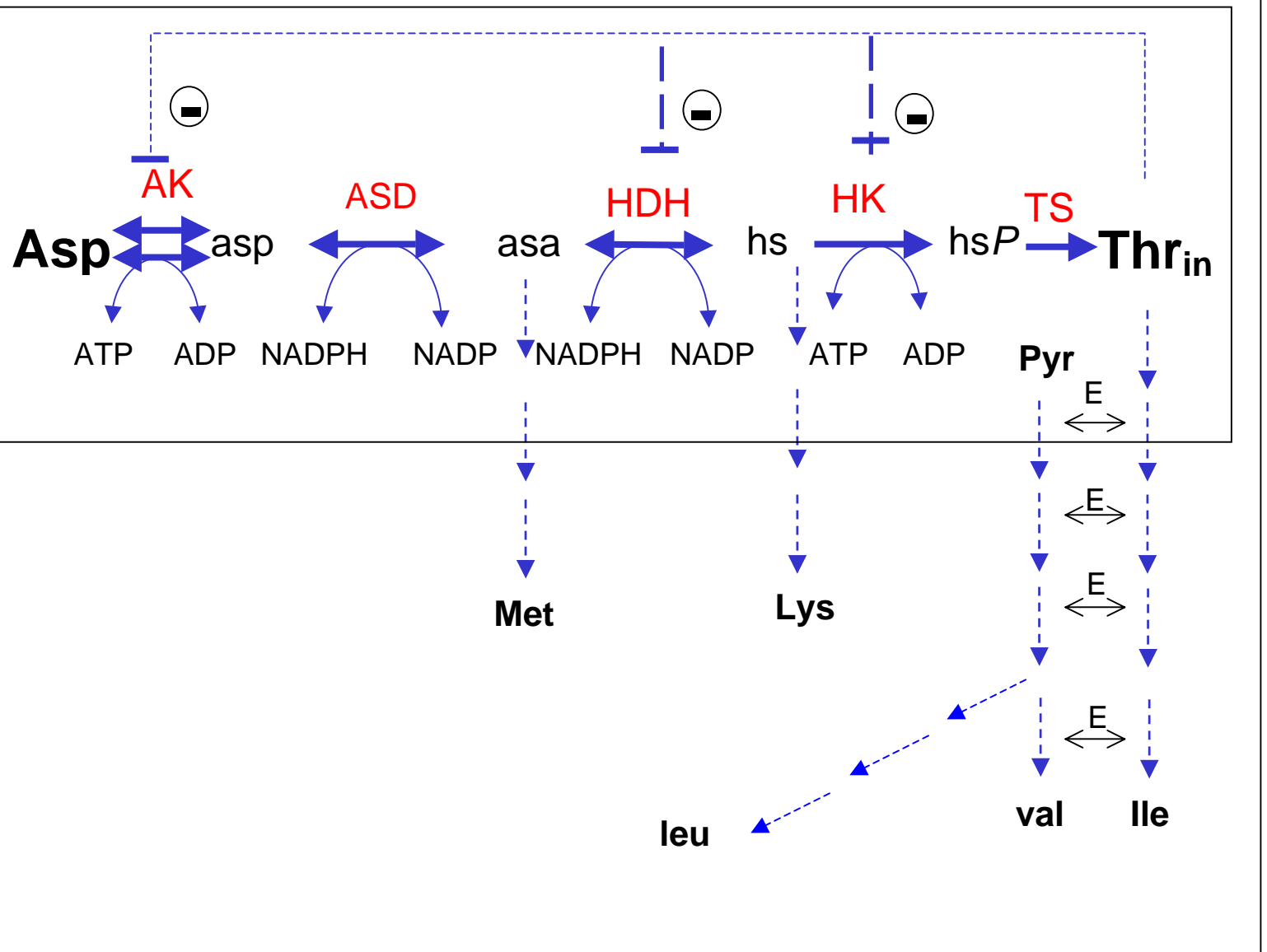


Figure 2 : Equations du modèle

$$v_{AK} = \frac{V_m \left(asp.ATP - \frac{aspp.ADP}{K_{eq}} \right)}{\left[\frac{1 + \left(\frac{thr}{K_{ithr}} \right)^{n_h}}{K_{asp} \frac{1 + \left(\frac{thr}{\alpha K_{ithr}} \right)^{n_h}} + aspp \frac{K_{asp}}{K_{aspp}} + asp} \right] \left(K_{ATP} \left(1 + \frac{ADP}{K_{ADP}} \right) + ATP \right)}$$

$$+ \frac{V_m \left(asp.ATP - \frac{aspp.ADP}{K_{eq}} \right)}{\left[1 + \left(\frac{lys}{K_{ilys}} \right)^{n_h} \right] \left(K_{asp} \left(1 + \frac{aspp}{K_{aspp}} \right) + asp \right) \left(K_{ATP} \left(1 + \frac{ADP}{K_{ADP}} \right) + ATP \right)}$$

$$v_{ASD} = \frac{V_m \left(aspp.NADPH - \frac{asa.NADP^+.P_i}{K_{eq}} \right)}{\left(K_{aspp} \left(1 + \frac{asa}{K_{asa}} \right) \left(1 + \frac{P_i}{K_{P_i}} \right) + aspp \right) \left(K_{NADPH} \left(1 + \frac{NADP^+}{K_{NADP^+}} \right) + NADPH \right)}$$

$$v_{HDH} = \frac{V_m \left(asa.NADPH - \frac{hs.NADP^+}{K_{eq}} \right)}{\left[\frac{1 + \left(\frac{thr}{K_{ithr}} \right)^n}{1 + \left(\frac{thr}{\alpha K_{ithr}} \right)^n} \right] \left(K_{asa} + hs \frac{K_{asa}}{K_{hs}} + asa \right) \left(K_{NADPH} \left(1 + \frac{NADP^+}{K_{NADP^+}} \right) + NADPH \right)}$$

$$v_{HK} = \frac{V_m \cdot hs.ATP}{\left(K_{hs} \left(1 + \frac{ATP}{K_{iatp}} \right) \left(1 + \frac{thr}{K_{ithr}} \right) + hs \right) \left(K_{ATP} \left(1 + \frac{hs}{K_{ihs}} \right) + ATP \right) \left(1 + \frac{lys}{K_{ilys}} \right)}$$

$$v_{TS} = \frac{V_m \cdot hsp}{K_{hsp} + hsp}$$

Remarque sur la Figure 2 : Les paramètres figurant dans les équations de vitesse sont décrits dans le tableau 2. Pour v_{AK} , le premier terme correspond à AK-I et le deuxième à AK-III. Ensuite la correspondance se fait par le nom de l'enzyme.

Par exemple, pour le premier terme de v_{AK} , $K_{iTHR} = 0,167$ mM et $V_m = 700$ nmole/min/mg prot, pour le deuxième terme, $V_m = 335$ nmole/min/mg prot

Tableau 1 : Tableau des variables.

asp	ATP
aspp	ADP
asa	NADP
hs	NADPH
hsp	
thr	

Certaines de ces variables pourront devenir des paramètres si on les considère comme fixes (par exemple ATP, ADP fixés, voir ci-dessous)

EQUATIONS DIFFERENTIELLE :

$$d(\text{asp}) / dt = - v_{AK}$$

$$d(\text{aspp}) / dt = v_{AK} - v_{ASD}$$

$$d(\text{asa}) / dt = v_{ASD} - v_{HDH}$$

$$d(\text{hs}) / dt = v_{HDH} - v_{HK}$$

$$d(\text{hsp}) / dt = v_{HK} - v_{TS}$$

$$d(\text{thr}) / dt = v_{TS}$$

$$d(\text{ATP}) / dt = - v_{AK} - v_{HK}$$

$$d(\text{ADP}) / dt = v_{AK} + v_{HK} \quad (\text{ATP} + \text{ADP} = \text{cte}).$$

$$d(\text{NADPH}) / dt = - v_{ASD} - v_{HDH}$$

$$d(\text{NADP}) / dt = v_{ASD} + v_{HDH} \quad (\text{NADPH} + \text{NADP} = \text{cte}).$$

REMARQUE : Dans la simulation, on pourra considérer ATP, ADP et asp comme constants (ATP = 1 mM ; ADP = 0 (en fait il faut prendre une concentration non nulle (0.000001) pour des raisons que j'ignore). ; asp = 10 mM).

On prendra aussi la variable lys comme constante (= 0 , 1 ou 10 mM).

Tableau 2 : Paramètres cinétiques de la chaîne de biosynthèse de la thréonine.

ETAPES	Km (mM)	Ki (mM) et autres facteurs d'inhibition	Keq	Vm (nmole/min/mg prot)
AK-I	ASP : 0,97 ± 50 %	K _i THR 0,167 ± 0,003	6,39 x 10 ⁻⁰⁴	700
	ATP : 0,98 ± 0,5	n _h 4,089 ± 0,26		
	ASPP 0,017 ± 0,004	α 2,47 ± 0,17		
	ADP 0,25*			
AK-III	ASP : 0,323 ± 0,081	K _i LYS 0,391 ± 0,08	6,39 x 10 ⁻⁰⁴	335
	ATP : 0,225 ± 0,024	n _h 2,78 ± 1,39		
	ASPP 0,017 ± 0,004			
	ADP 0,25*			
ASD	ASPP : 0,022 ± 0,001		2,84 x 10 ⁻⁰⁵ <u>17,84 x 10⁻⁰⁵</u>	920
	NADPH : 0,0287 ± 0,002			
	ASA : 0,11 ± 0,008			
	NADP : 0,144 ± 0,177			
	Pi : 10,2 ± 1,4			
HDH	ASA : 0,245 ± 0,03	K _i THR 0,097	1 x 10 ¹¹ M ⁻¹ *	3 670
	NADPH : 0,037 ± 0,0059	n 1,41		
	HS : 3,39 ± 0,33	α 3,93		
	NADP : 0,067 ± 0,006	<u>K_iASP</u> <u>10</u>		
HK	HS : 0,11	K _i THR 1,09		545
	ATP : 0,072	K _i LYS 9,45		
		K _i HS 4,7		
		K _i ATP 4,35		
TS	HSP : 0,306 ± 0,034			240

*valeur de la littérature