

# RÉTRO-INHIBITION ET RÉPRESSION DE L'HOMOSÉRINE DÉSHYDROGÉNASE D'*ESCHERICHIA COLI*

JEAN-CLAUDE PATTE, GISELE LE BRAS, THÉRÈSE LOVINY  
ET GEORGES N. COHEN

*Laboratoire d'Enzymologie, Centre National de la Recherche Scientifique,  
Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise (France)*

(Reçu le 16 avril 1962)

## SUMMARY

*End-product inhibition and repression of the homoserine dehydrogenase  
of *Escherichia coli**

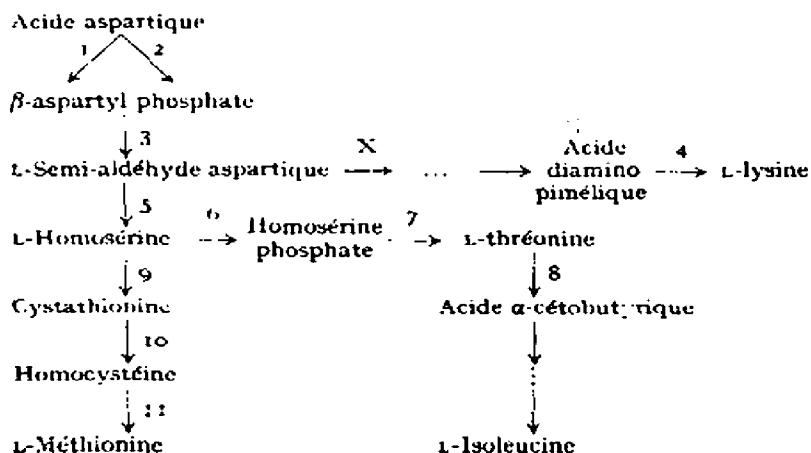
The homoserine dehydrogenase of *Escherichia coli* K12 is under the control of the two types of known regulatory negative feedback mechanisms: repression and end-product inhibition. The regulatory agent is L-threonine.

End-product inhibition by L-threonine is highly specific and strictly non-competitive. The inhibition site of the enzyme can be selectively destroyed by heat. The stability of the enzyme and of its capacity to be inhibited have been studied. The sedimentation constant of the inhibitable enzyme is higher than that of the enzyme having lost its inhibition site.

The synthesis of *E. coli* homoserine dehydrogenase is greatly and specifically repressed by L-threonine in the culture medium. The genetic control of the synthesis of the aspartic acid family of amino acids is discussed.

## INTRODUCTION

Chez *Escherichia coli*, les métabolites essentiels suivants sont synthétisés à partir de l'acide aspartique: acide mésodiaminopimélique et lysine, méthionine, thréonine et isoleucine. Le schéma simplifié ci-dessous résume les étapes de leur biosynthèse:



Abréviations: ASA, Semi-aldehyde aspartique; HS, homoséruine.

1 et 2,  $\beta$ -aspartokinases (deux enzymes distincts effectuent cette réaction, chez *E. coli*, mais sont soumis à des régulations différentes<sup>1</sup>); 3, semi-aldehyde aspartique déshydrogénase; 4, décarboxylase de l'acide diaminopimélique; 5, homosérine déshydrogénase; 6, homosérine kinase; 7, homosérine phosphate mutaphosphatase; 8, L-thréonine déaminase; 9, cystathionine synthétase; 10, cystathionase; 11, méthionine synthase (homocystéine méthylase).

Il semble qu'au cours de l'évolution aient été sélectionnés des organismes possédant des systèmes de régulation tels qu'une économie soit réalisée tant dans la synthèse des enzymes (répression) que dans leur fonctionnement (rétro-inhibition).

On connaît actuellement pour certains des enzymes de la famille de l'acide aspartique les régulations suivantes:

**Répression:** (a) Par la lysine: enzymes 1 et 4 (*E. coli*) (voir réfs. 1, 2). (b) Par la méthionine: enzymes 9, 10 (voir réfs. 3, 4) et 11 (voir réfs. 5, 6) (*E. coli*). (c) Par l'isoleucine: enzyme 8 (*E. coli*) (voir réf. 7). (d) Par la thréonine: enzyme 2 (*Saccharomyces cerevisiae*, chez qui il n'existe qu'une seule  $\beta$ -aspartokinase<sup>1</sup>).

**Rétro-inhibition (negative feedback):** (a) Par la lysine: enzyme 1 (*E. coli*) (voir réf. 1). (b) Par la méthionine: enzyme 9 (*E. coli*) (voir réf. 4). (c) Par l'isoleucine: enzyme 8 (*E. coli*) (voir réfs. 8, 9). (d) Par la thréonine: enzyme 2 (*E. coli*, *S. cerevisiae*) (voir réf. 1); enzyme 6 (*E. coli*) (voir réf. 10).

L'examen du schéma de biosynthèse semble indiquer qu'il puisse exister des contrôles autres que ceux indiqués ci-dessus. Ainsi, une rétro-inhibition de l'enzyme X par la lysine serait favorable, permettant à la semi-aldehyde aspartique d'être plus ou moins dirigée vers l'homosérine, en fonction des concentrations cellulaires de lysine. Cette situation existe pour les enzymes 6, 8 et 9 et l'addition du métabolite essentiel synthétisé par les enzymes de la chaîne ne droit pas affecter la croissance normale de l'organisme.

L'obtention par GILVARG<sup>11</sup> d'un mutant n'effectuant pas la réaction 3 et exigeant l'acide diaminopimélique, la méthionine et la thréonine pour sa croissance semble indiquer que c'est un enzyme unique qui effectue cette réaction. Dans ce cas, l'absence de tout contrôle régulateur de cet enzyme semblerait nécessaire au fonctionnement normal de la chaîne; en effet, une régulation efficace par un des métabolites (lysine, par exemple) entraînerait une carence en thréonine et méthionine. Cependant, l'absence de répression de l'enzyme 3 par la lysine<sup>12</sup>, alors que les enzymes 1 et 4 sont réprimés, doit, si l'on admet les conceptions actuelles sur les opérons<sup>13</sup>, faire penser que son gène de structure appartient à un opéron distinct.

Le présent travail a pour objet l'étude de la régulation de l'enzyme 5, l'homosérine déshydrogénase, décrit par BLACK ET WRIGHT<sup>14</sup> chez *S. cerevisiae*. Pour cet enzyme, la situation est assez semblable à celle de l'enzyme 3. Dans le cas d'un enzyme unique, toute régulation par la thréonine ou la méthionine doit entraîner un besoin en l'autre facteur. Les résultats obtenus montrent que, chez *E. coli*, seule la thréonine exerce les deux effets de régulation sur l'homosérine déshydrogénase.

#### MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

##### Obtention des bactéries

Les bactéries (*E. coli* K12, Hfr H) sont cultivées à 37° en milieu synthétique 63 agité<sup>15</sup>, additionné de glucose à 2% et de thiamine (0.5 µg/ml). Elles sont prélevées

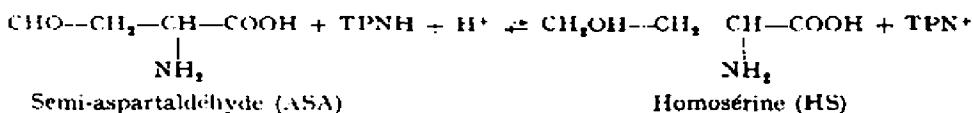
en phase exponentielle de croissance, centrifugées, lavées avec le tampon suivant: Tris 0.01 M (pH 7.6) additionné de "Magnesium Titriplex"  $2 \cdot 10^{-3}$  M et de  $\beta$ -mercaptopropanoïd  $10^{-2}$  M. Le culot de centrifugation peut être conservé congelé pour la préparation ultérieure des extraits.

### *Préparation des extraits*

Les bactéries sont mises en suspension homogène dans le tampon ci-dessus (10 g poids humide/100 ml) contenant ou non du chlorure de potassium 0.4 M. Elles sont ensuite sonnées à l'aide de l'oscillateur Raytheon de 10 kc pendant 12 min. Les débris sont éliminés par centrifugation pendant 10 min (13 000 rev./min). Le surnageant est additionné de streptomycine à la concentration finale de 1%. Le précipité obtenu est éliminé par centrifugation. La plus grande partie de l'enzyme est contenue dans la fraction protéique précipitant entre 25 et 45% de saturation de sulfate d'ammonium. Le précipité est repris dans le tampon Tris 0.01 M décrit plus haut, additionné ou non de KCl. La plupart des propriétés de l'homosérine déshydrogénase ont été étudiées sur cette solution qui sera appelée désormais Extrait; elles sont identiques à celles de l'enzyme plus purifié obtenu par élution d'une colonne de DEAE-cellulose. Toutes les opérations précédentes sont effectuées à froid. Le Tableau I est typique d'une préparation.

### *Mesure de l'activité de l'homosérine déshydrogénase*

La réaction étudiée est la suivante :



Elle peut être mesurée dans les deux sens; toutefois l'équilibre est en faveur de la formation d'homosérine.

1. Dans le sens ASA → HS, le mélange réactionnel est le suivant, dans un volume total de 1 ml: DL-ASA\*,  $10^{-3} M$ ; KCl,  $0.8 M$ ; tampon Tris (pH 7.5),  $4 \cdot 10^{-2} M$ ; TPNH,  $3 \cdot 10^{-6} M$  (ajouté en dernier).

La vitesse initiale de la réaction est mesurée par la diminution de densité optique à  $340 \text{ m}\mu$ , l'unité d'enzyme étant définie par un changement de 0.001 unité de densité optique par 30 sec.

Dans le sens ASA → HS, les valeurs d'activité ont été obtenues après déduction de l'activité TPNH-oxydase; ceci dans l'extrait brut ou après précipitation par la streptomycine; en effet, dans la fraction précipitée par le sulfate d'ammonium, cette activité perturbatrice est négligeable.

2. Dans le sens HS → ASA, le mélange réactionnel est le suivant, dans un volume total de 1 ml: pL-HS (pH 9),  $5 \cdot 10^{-2} M$ ; KCl,  $0.8 M$ ; tampon Tris (pH 9),  $10^{-1} M$ ; TPN,  $4 \cdot 10^{-4} M$  (ajouté en dernier).

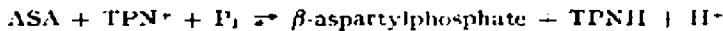
\* L'aldéhyde aspartique est préparé par ozonisation de la DL-alanylglycine selon la technique de BLACK ET WRIGHT<sup>18</sup>. La solution stock en HCl à N. conservée congelée, est neutralisée par KOH extemporanément.

TABLEAU I  
PURIFICATION DE L'HOMOSÉRINE DÉSHYDROGÉNASE  
Mesure dans le sens ASA → HS.

	Volume (ml)	Activité initial (unités)	Activité totale (unités)	Protéines (mg)	Activité spécifique (unités/mg)
Extrait brut	37	4 600	170 200	12.5	610
Surnageant Streptomycine	31	4 200	130 200	9.2	756
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 0-25% saturation	1	1 400	1 400	11	220
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , 25-45% saturation	2.45	30 000	73 500	13.6	3657
Surnageant 45% saturation	51	470	23 970	4.5	173

La vitesse initiale de la réaction est mesurée par l'augmentation de densité optique à 340 m $\mu$ , l'unité d'enzyme étant définie comme ci-dessus.

La semi-aspartaldéhyde est également le substrat de l'enzyme 3, la semi-aspartaldéhyde déshydrogénase qui effectue la réaction



Cette réaction, qui devrait normalement interférer avec la mesure de l'activité de l'homosérine déshydrogénase, est totalement inhibée dans l'extrait de *E. coli* par le Tris à la molarité utilisée.

Les protéines sont dosées par la méthode au biuret.

#### Nécessité de l'ion K<sup>+</sup> pour l'activité; antagonisme de l'ion Na<sup>+</sup>

Le Tableau II montre l'influence de l'ion K<sup>+</sup> sur l'activité et l'inhibition par l'ion Na<sup>+</sup>. Cet antagonisme semble avoir un caractère compétitif.

TABLEAU II  
INFLUENCE DES IONS K<sup>+</sup> ET Na<sup>+</sup> SUR L'ACTIVITÉ  
DE L'HOMOSÉRINE DÉSHYDROGÉNASE

Mesure dans le sens HS → ASA. L'homosérine utilisée n'était pas ajustée à pH 9, pour ne pas apporter d'ions K<sup>+</sup> ou Na<sup>+</sup>. L'extrait exigeant du KCl pour sa conservation, il possède une activité mesurable, même sans addition de K<sup>+</sup>. (Des extraits préparés en l'absence d'ion K<sup>+</sup> ne montrent aucune activité et sont activés par cet ion). Les concentrations molaires en KCl et NaCl sont les concentrations terminales (sans tenir compte du K<sup>+</sup> apporté par l'extrait: 0.012 M terminal).

K <sup>+</sup> (M)	Na <sup>+</sup> (M)	Activité (unités)
		55
0.04	—	90
0.08	—	108
0.08	0.02	105
0.08	0.04	52
0.08	0.08	32
0.12	—	120
0.12	0.04	69
0.12	0.08	54
0.16	—	110
0.16	0.08	100
0.16	0.16	79
2	—	110

### Stabilité de l'homosérine déshydrogénase

L'enzyme ne se conserve pas à + 2° ou congelé en l'absence de chlorure de potassium. Le Tableau III montre qu'en présence de KCl 0.4 M, il ne perd pas son activité même après une semaine à + 2°. Le chlorure de sodium a un effet bien moindre sur la stabilité de l'enzyme. Une protection efficace peut être obtenue par la thréonine (les activités plus faibles figurant sur le tableau sont dues à l'inhibition de l'enzyme par cet amino acide).

TABLEAU III  
STABILITÉ DE L'HOMOSÉRINE DÉHYDROGÉNASE

Le précipité 25-45% de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  est divisé en 5 parties, reprises dans le tampon Tris 0.05 M, additionné ou non de 0.1 M Tris, NaCl, KCl, DL-thréonine aux concentrations terminales données dans le tableau. Les vitesses au temps zéro sont ramenées à la valeur arbitraire 100. Mesures dans le sens ASA → HS et en  $\text{K}^+$  optimal. L'inhibition par la thréonine a été mesurée en présence de DL-thréonine  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  terminale.

Additifs	Temps de conservation (en jours)						
	0	1	2	3	4	5	Inhibition thréonine (%)
	Activité (unités)	Activité (%)	Inhibition thréonine (%)	Activité (%)	Activité (%)	Activité (%)	
0	105	100	54	28	26	18	6
Tris 0.1 M	100	100	30	32	17		
KCl 0.05 M	140	100	50	68	49	26	
KCl 0.4 M	130	100	55	108	105	98	46
NaCl 0.1 M	91	100	75	80	45		
DL-thréonine $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	47	100	108	89	105		

Au cours de la perte d'activité qui se produit rapidement en absence des agents protecteurs ci-dessus, l'enzyme perd la faculté d'être inhibé par la thréonine.

### Proportionnalité de l'activité à la quantité d'enzyme

La Fig. 1 montre que l'activité enzymatique est proportionnelle à la quantité de protéine de l'extrait au moins jusqu'à 0.6 mg.

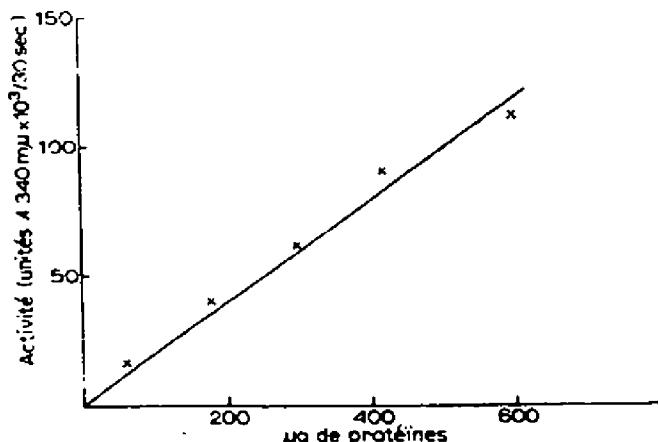


Fig. 1. Variation de l'activité en fonction de la quantité d'enzyme. Mesure dans le sens ASA → HS. Concentrations: voir Mesure de l'activité de l'HS-déshydrogénase.

*pH optimum*

Dans le sens ASA  $\rightarrow$  HS, la réaction a lieu à une vitesse identique entre pH 6.0 et pH 8.0, puis décroît régulièrement pour atteindre 15% de la vitesse optimale à pH 11.0. Dans le sens HS  $\rightarrow$  ASA, la vitesse de la réaction, nulle à pH 6.0 croît régulièrement et présente une valeur optimale à pH 9.0.

*Équilibre de la réaction*

La constante d'équilibre de la réaction a été déterminée. On trouve à pH 7.5:

$$K = \frac{(\text{homosérol}) (\text{TPN})}{(\text{aspartaldéhyde}) (\text{TPNH}) (\text{H}^+)} = 1.6 \cdot 10^{11}$$

Cette valeur est tout à fait comparable à celle de  $1.3 \cdot 10^{11}$  observée par BLACK ET WRIGHT<sup>14</sup> dans le cas du même enzyme extrait de la levure à pH 7.9.

*Activité de l'homosérol déshydrogénase en fonction de la concentration des substrats*

Les Figs. 2 et 3 donnent une représentation selon LINEWEAVER ET BURK<sup>17</sup> de la variation d'activité de l'homosérol déshydrogénase en fonction des concentrations d'homosérol, de TPN, de semi-aspartaldéhyde et de TPNH. Avec ces trois derniers

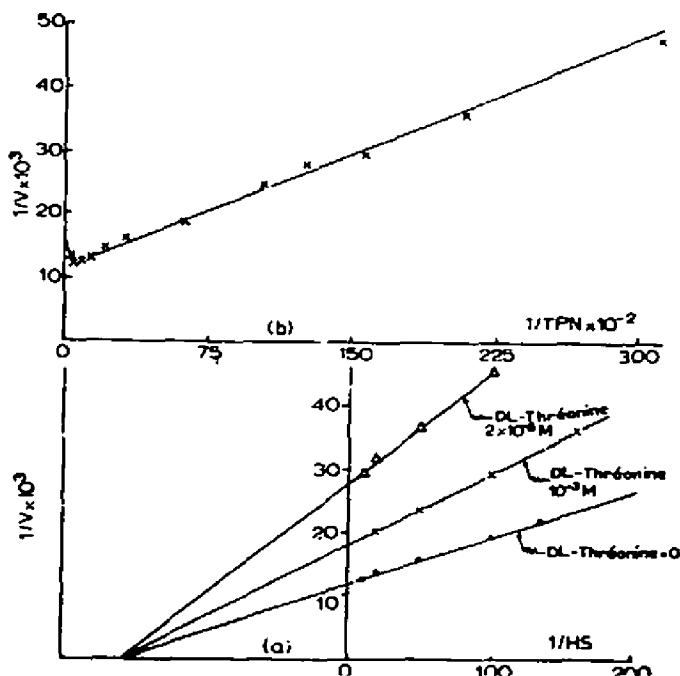


Fig. 2. Variations de l'activité en fonction des concentrations de: a, DL-Homosérol; b, TPN. Représentation selon LINEWEAVER ET BURK. Les autres constituants sont utilisés aux concentrations données dans le texte.

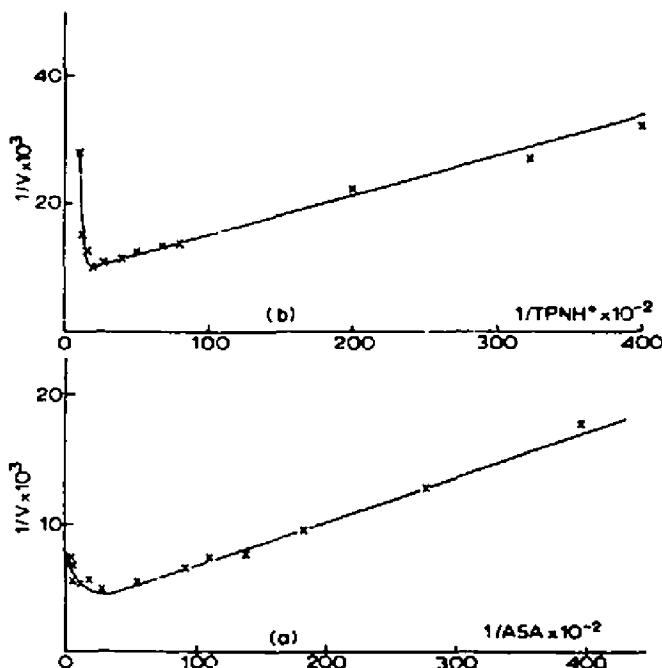


Fig. 3. Variations de l'activité en fonction des concentrations de: a. ASA; b. TPNH. Représentation selon LINEWEAVER ET BURK. Les autres constituants sont utilisés aux concentrations données dans le texte.

composés, on note une inhibition par excès de substrat. Les constantes obtenues sont les suivantes:  $K_m$  HS =  $6.5 \cdot 10^{-3} M$ ;  $K_m$  TPN =  $1.1 \cdot 10^{-4} M$ ;  $K_m$  ASA =  $1.4 \cdot 10^{-4} M$ ;  $K_m$  TPNH =  $8 \cdot 10^{-5} M$ . La réaction a également lieu avec le DPN au lieu du TPN, mais il faut atteindre des concentrations de l'ordre de 20 fois supérieures pour obtenir la même vitesse de réaction. Le DPN n'exerce pas d'action inhibitrice sur l'activité mesurée en présence de TPN. Chez *S. cerevisiae*, BLACK ET WRIGHT<sup>14</sup> avaient observé que le DPN avait plus d'affinité que le TPN pour l'homosérine déshydrogénase.

#### Spécificité du substrat

Dans le sens ASA → HS, nous avons utilisé la DL-semiaspartaldéhyde et n'avons pas tenté la résolution du racémique. Dans le sens HS → ASA, seule la L-homosérine est substrat; la D-homosérine n'est ni substrat ni inhibiteur, pas plus que les homologues en C<sub>6</sub> et en C<sub>8</sub> de l'homosérine (DL-penta et DL-hexahomosérine) (Tableau IV).

#### Inhibition par la L-thréonine

De tous les amino acides et dérivés essayés sur l'homosérine déshydrogénase, seuls la L-thréonine et l'acide L- $\alpha$ -aminobutyrique exercent une action inhibitrice, comme le montre le Tableau V.

L'examen des résultats de ce tableau permet de donner la configuration minimum nécessaire à l'action inhibitrice sur l'enzyme: (a) Groupement  $\alpha$ -amino acide libre.

Additifs	Activité (%)
L-Homosérolle $4 \cdot 10^{-2} M$	80
D-Homosérolle $4 \cdot 10^{-2} M$	0
L-Homosérolle $4 \cdot 10^{-2} M +$ D-Homosérolle $4 \cdot 10^{-2} M$	83
L-Homosérolle $4 \cdot 10^{-2} M -$ D-Homosérolle $1.1 \cdot 10^{-1} M$	73
DL-Hexahomosérolle $5 \cdot 10^{-2} M$	0
DL-Pentahomosérolle $5 \cdot 10^{-2} M$	0

TABLEAU V

SPÉCIFICITÉ DE LA L-THRÉONINE COMME INHIBITEUR  
DE L'HOMOSÉRINE DÉHYDROGÉNASE

Conditions: I, DL-homosérolle  $5 \cdot 10^{-2} M$ ; TPN,  $4 \cdot 10^{-4} M$ ; Tampon Tris (pH 9.0). II, DL-ASA,  $10^{-2} M$ ; TPNH,  $2.5 \cdot 10^{-2} M$ ; Tampon Tris (pH 7.5). Aucun des composés non inhibiteurs de la série II ne modifie la vitesse de la réaction en présence de DL-thréonine  $10^{-2} M$ .

Additifs (M)	Activité (unités)	Inhibition (%)
I-Témoin	147	—
L-Thréonine $2 \cdot 10^{-2}$	40	73
D-Thréonine $2 \cdot 10^{-2}$	141	0
DL-Thréonine $4 \cdot 10^{-2}$	40	73
Glycine $2 \cdot 10^{-2}$ , L-lysine $10^{-2}$	—	—
DL-Alanine $10^{-2}$ , DL-proline $2 \cdot 10^{-2}$	—	—
DL-Valine $2 \cdot 10^{-2}$ , DL-méthionine $2 \cdot 10^{-2}$	—	—
L-Aspartate $10^{-2}$ , DL-leucine $10^{-2}$	—	—
DL-Phénylalanine $2 \cdot 10^{-2}$ , DL-isoleucine $2 \cdot 10^{-2}$	113-150	0
L-Glutamate* $10^{-2}$	184	0
DL-β-Hydroxybutyrate $2 \cdot 10^{-2}**$	141	0
II-Témoin	143	—
L-thréonine $10^{-2}$	60	58
L-α-Aminobutyrate $2 \cdot 10^{-2}$	111	22
L-α-Aminobutyrate $7.6 \cdot 10^{-2}$	72	50
D-Thréonine $2 \cdot 10^{-2}$	139	0
DL-Allothréonine $7 \cdot 10^{-2}$	141	0
D-α-aminobutyrate $7.6 \times 10^{-2}$	140	0
DL-β-aminobutyrate $7.6 \cdot 10^{-2}$	143	0
DL-α-aminoisobutyrate $2 \cdot 10^{-2}$	137	0
α-Cétobi.tyrate $3.8 \cdot 10^{-2}$	137	0
DL-O-phosphothréonine $3.8 \cdot 10^{-2}$	143	0
Glycyl-L-thréonine $10^{-2}$	136	0

\* L'activité accrue en présence de glutamate est due à la glutamo-déshydrogénase de l'extrait.

\*\* L'extrait ne présente pas d'activité β-hydroxybutyrate déshydrogénase en présence de TPN.

L' $\alpha$ -acetoxybutyrate, l'acide  $\beta$ -hydroxybutyrique, l'acide  $\beta$ -aminobutyrique, la glycyl-L-thréonine ne sont pas inhibiteurs. (b) Configuration L du carbone en  $\alpha$  du carboxyle: la D-thréonine et l'acide D- $\alpha$ -aminobutyrique sont sans action sur l'activité de l'enzyme. (c) Le groupe hydroxyle est important, car l'acide L- $\alpha$ -aminobutyrique quoiqu'inhibiteur, l'est à un bien moindre degré: une concentration 100 fois supérieure à celle de la thréonine est nécessaire pour obtenir une inhibition identique. D'autre part, la O-phosphothréonine est sans action.

#### Nature de l'inhibition

Comme le montrent les Figs. 4 et 5, à concentration de substrat constant, l'inhibition par la thréonine n'est jamais totale, montrant que le complexe enzyme-

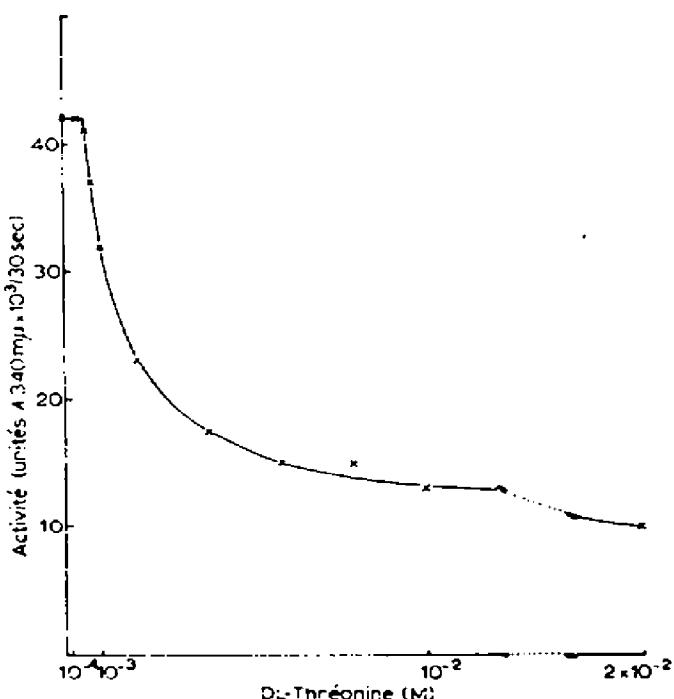


Fig. 4. Inhibition de l'activité de l'homosérine déshydrogénase par la DL-thréonine. Mesure dans le sens HS  $\rightarrow$  ASA. DL-homosérine =  $10^{-2} M$ ; les autres constituants aux concentrations habituelles.

substrat-inhibiteur est encore actif même quand il est saturé par l'inhibiteur.

La Fig. 2 montre que l'inhibition par la thréonine de la réaction HS  $\rightarrow$  ASA est de type non- compétitif. L'inhibition est également non- compétitive si la réaction est effectuée dans l'autre sens.

#### Destruction par chauffage du site d'inhibition

Le fait que l'inhibition soit non- compétitive indique l'existence d'un site d'in-

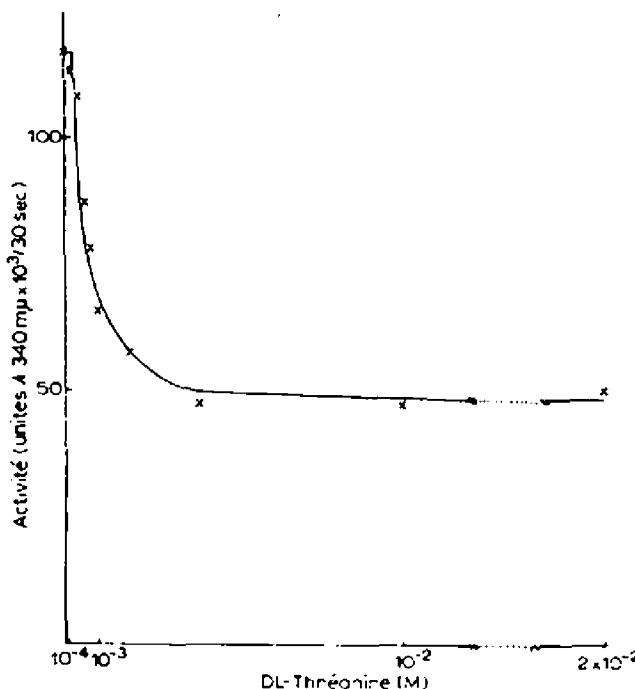


Fig. 5. Inhibition de l'activité de l'homoserine déshydrogénase par la DL-thréonine. Mesure dans le sens ASA → HS. ASA =  $5 \cdot 10^{-4} M$ ; les autres constituants aux concentrations habituelles.

TABLEAU VI  
DESTRUCTION PAR CHAUFFAGE DU SITE D'INHIBITION  
DE L'HOMOSÉRINE DÉSHYDROGÉNASE

Le chauffage est réalisé par addition de 0.75 ml d'extrait à 2.25 ml de tampon Tris (pH 7.6) contenant du KCl 0.4 M, préchauffé dans un bain-marie réglé à  $49^\circ \pm 0.05$ . Des prélèvements de 0.3 ml sont effectués aux temps indiqués et portés immédiatement dans la glace fondante. Mesure dans le sens ASA → HS. DL-thréonine:  $2 \cdot 10^{-3} M$ .

Expérience	Temps de chauffage (min)	Enzyme mesuré		Inhibition (%)
		Sans thréonine (unités)	Avec thréonine (unités)	
I	0	165	56	66
	1	153	54	65
	8	103	93	10
II	0	119	57	52
	2	69	65	0
	4	57	60	0
	6	48	52	0
	9	42	45	0
	12	36	37	0

hibition indépendant du site d'activité. Dans le cas de deux autres enzymes sujets à la rétro-inhibition, il a été possible de détruire sélectivement par chauffage le site d'inhibition: carbamyltransférase de l'acide aspartique inhibée par le cytidine triphosphate<sup>18</sup>, et thréonine désaminase inhibée par l'isoleucine<sup>9</sup>.

Un phénomène identique est démontrable avec l'homosérine déshydrogénase d'*E. coli*, comme le montrent les résultats du Tableau VI. L'enzyme non inhibitable obtenu par chauffage a le même  $K_m$  que l'enzyme non chauffé.

#### *Critères de l'unicité de l'homosérine déshydrogénase*

La destruction sélective du site d'inhibition et l'inhibition incomplète par cet amino acide de l'homosérine déshydrogénase pourraient faire penser qu'*E. coli* possède deux (ou plus) homosérine déshydrogénases, dont une seule serait inhibée par la thréonine. Un tel cas a été observé dans le cas des deux  $\beta$ -aspartokinases d'*E. coli*, qui sont soumises à des régulations indépendantes par la lysine et la thréonine<sup>1</sup>. Les faits suivants montrent que ceci est hautement improbable: (a) aucun autre amino acide de la chaîne dérivant de l'acide aspartique n'est inhibiteur; (b) l'activité enzymatique est éluee en un seul pic homogène d'une colonne de DEAE-cellulose par un gradient de chlorure de potassium (Fig. 6); (c) l'activité enzymatique est

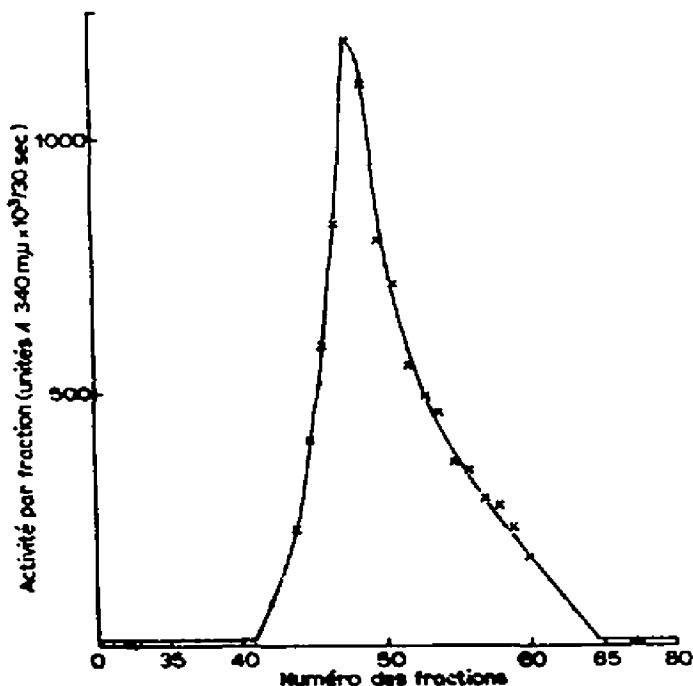


Fig. 6. Fractionnement de l'HS-déshydrogénase par passage sur colonne de DEAE-cellulose. Colonne de DEAE-cellulose (1.8 cm de diamètre; 1 g de DEAE-cellulose/25 mg de protéine), lavée avec le tampon Tris 0.01 M (pH 7.6) + KCl 0.1 M. Gradient de KCl en tampon Tris 0.01 M (pH 7.6) de 0.1 M à 0.4 M. Chaque fraction = 0.45 ml recueillie en 2 min. Activité totale déposée = 22 960 unités. Activité récupérée = 9 425 unités.

récupérée en un pic homogène par centrifugation dans un gradient de saccharose (voir plus loin); d'ensin, il existe des mutants exigeant l'homosérine (ou la thréonine plus la méthionine) pour leur croissance et qui sont totalement dépourvus d'homosérine déshydrogénase. Par mutation réverse, l'activité enzymatique réapparaît en même temps que la prototrophie (Tableau VII).

TABLEAU VII  
ACTIVITÉ HOMOSÉRINE DÉSHYDROGÉNASE DES MUTANTS RÉVERSIS  
DE *E. coli* K

Les mutants B 150 et B 174 exigent la thréonine et la méthionine pour leur croissance. Les activités spécifiques, mesurées dans le sens ASA  $\rightarrow$  HS, sont obtenues après soustraction de l'activité TPNH-oxydase.

	B	B 150	B 160-1	B 150-3	B 150-4	B 150-5	B 171	B 174-2
<hr/>								
Addition au milieu de culture de								
DL-thréonine $10^{-2} M$	0	+	-	0	0	0	0	0
DL-méthionine $5 \cdot 10^{-4} M$	62	39*	0	179	75	96	133	0
Activité spécifique (unités/mg)								

\* La diminution de l'activité spécifique en présence de thréonine est due à la répression de l'homosérine déshydrogénase (voir texte).

#### *Différence entre les constantes de sédimentation de l'enzyme inhibitable et de l'enzyme non inhibitable*

Les vitesses différentes d'inactivation du site d'inhibition et du site d'activité en absence d'agents protecteurs (KCl, thréonine) ou par chauffage à 49° pourraient être liées à des états différents d'agrégation ou tout au moins à une configuration différente de l'enzyme. Aussi avons-nous entrepris une étude de la sédimentation de l'enzyme en gradient de saccharose, i.e. gradient a été obtenu à l'aide du dispositif décrit par BRITTON ET ROBERTS<sup>18</sup>. Il s'étend de 20% à 5% (poids/poids). La quantité de protéine déposée à la surface du liquide varie entre 4.8 et 5.2 mg dans un volume d'extrait de 0.4 ml. Après la centrifugation, le fond du tube est percé et des gouttes sont collectées dans une série de tubes, chaque fraction contenant 5 gouttes. La concentration en saccharose des fractions a été contrôlée par réfractométrie.

On observe qu'en présence de chlorure de potassium 0.4 M ou de DL-thréonine  $2 \cdot 10^{-2} M$ , l'enzyme se trouve décalé vers le fond du tube. Ceci ne semble pas du à la force ionique accrue du milieu, car le chlorure de sodium n'a pas d'effet sur la position de l'enzyme. Le calcul, selon NOMURA, HALI ET SPIEGELMAN<sup>20</sup>, montre que la constante de sédimentation est environ 2 fois plus grande quand l'enzyme est protégé par le chlorure de potassium ou la thréonine. On note que l'activité (toujours inhibée par la thréonine) est récupérée totalement en chlorure de potassium et en thréonine, alors qu'en n'en retrouve que 50% (non inhibée par la thréonine) dans le témoin et en chlorure de sodium. GERMART ET PARDEE<sup>18</sup> ont également observé que l'aspartate transcarbamylase rétro-inhibitable possède une constante de sédimentation deux fois plus élevée que celle de l'enzyme non inhibable.

### Répression de l'homosérine déshydrogénase par la thréonine

En présence de concentrations de l'ordre de  $5 \cdot 10^{-3} M$  de DL-thréonine, la croissance de Hfr H est très lente et il est difficile d'obtenir des quantités de bactéries suffisantes pour préparer un extrait. Toutefois, le taux de croissance est ramené à une valeur convenable par addition de DL-méthionine  $5 \cdot 10^{-6} M$ .

Dans ces conditions, il est possible de mesurer l'activité spécifique de l'homosérine déshydrogénase dans les extraits bruts de bactéries dont la croissance a eu lieu sur thréonine + méthionine, ou sur méthionine seule. Le Tableau VIII montre que la thréonine exerce une répression très efficace de la synthèse de l'homosérine déshydrogénase, alors que la méthionine et la lysine n'exercent aucun contrôle répressif, même à ces concentrations élevées.

TABLEAU VIII  
RÉPRESSION DE L'HOMOSÉRINE DÉSHYDROGÉNASE.

Additifs au milieu de culture	Protéines (mg/ml)	Activité spécifique (unités/mg)	Répression (%)
0	26.3	645	
0	9	633	
L-Lysine $10^{-2} M$	33.7	586	8.4
DL-Méthionine $5 \cdot 10^{-3} M$	22	703	-19.2
DL-Thréonine $5 \cdot 10^{-3} M$			
DL-Méthionine $5 \cdot 10^{-6} M$	34	185	+1.1

\* Les activités spécifiques, mesurées dans le sens ASA  $\rightarrow$  HIS, sont obtenues après soustraction de l'activité TPNH-oxydase.

### DISCUSSION

Il ressort des résultats ci-dessus que l'homosérine déshydrogénase d'*E. coli* K12 (Hfr H) est soumise aux deux types de régulation connus chez les microorganismes.

Le contrôle par rétro-inhibition est dû à une inhibition hautement spécifique par la L-thréonine. Cette inhibition est de type non-compétitif, le complexe enzyme-substrat-inhibiteur conservant encore de l'activité à saturation d'inhibiteur. Cette particularité permet à l'organisme de continuer à synthétiser l'homosérine et par conséquent la méthionine même quand l'homosérine déshydrogénase est saturée par la thréonine. L'inhibition non-compétitive correspond bien à un site d'inhibition distinct du site d'activité, qui peut être inactivé sélectivement par chauffage.

L'existence et l'inactivation sélective d'un site d'inhibition ont déjà été décrites par CHANGEUX<sup>9</sup> dans le cas du contrôle de l'activité de la L-thréonine désaminase par la L-isoleucine et par GERHART ET PARDEE<sup>18</sup> dans le cas du contrôle de l'aspartate transcarbamylase par le CTP. Dans le cas de la thréonine-désaminase, CHANGEUX observe une cinétique bimoléculaire vis-à-vis du substrat et de l'inhibiteur qu'il interprète comme due à l'existence d'un site d'activité et d'un site d'inhibition interférant l'un avec l'autre. La destruction du site d'inhibition rend normale la cinétique de l'enzyme. L'aspartate transcarbamylase présente une cinétique très complexe qui n'a pas été analysée en détail par les auteurs; l'inhibition par le cytidine triphosphate semble cependant être du type compétitif. L'enzyme se comporte comme la thréonine-désaminase, car après destruction du site d'inhibition par la chaleur, il obéit à l'équation de HENRI-MICHAELIS.

L'homosérine déshydrogénase diffère des deux autres enzymes à deux sites mentionnés ci-dessus par la fait qu'elle est inhibée non- compétitivement par la thréonine et qu'elle présente d'emblée une cinétique de HENRI-MICHAELIS. La rétro-inhibition n'est donc pas nécessairement compétitive. Une illustration supplémentaire de ce fait est donnée par les deux  $\beta$ -aspartokinases de *E. coli* dont les rétro-inhibitions typiquement "allostériques" par la thréonine et la lysine sont la première, compétitive et la seconde, non-compétitive<sup>1</sup>.

Il est important de noter que, contrairement aux deux enzymes étudiés par CHANGEUX ET PARDEE, dont les deux sites, quoique distincts, ne sont pas entièrement indépendants, l'homosérine déshydrogénase désinhibée par chauffage a une constante de dissociation inchangée avec son substrat, ce qui est un argument supplémentaire en faveur de l'indépendance totale des deux sites.

Pour posséder sa pleine activité et sa capacité d'être inhibé par la thréonine, l'enzyme semble devoir posséder une configuration spéciale stabilisée, soit par le chlorure de potassium, soit par la thréonine. En effet, il ne se conserve qu'en présence de ces agents; par ailleurs, il possède alors une constante de sédimentation plus élevée que celle de l'enzyme non stabilisé dont l'activité résiduelle n'est plus sensible à la thréonine. Nous espérons que des études ultérieures nous montreront si l'enzyme inhibable correspond à une forme polymérisée ou à une forme plus globulaire de l'enzyme non inhibable.

La répression de l'homosérine déshydrogénase est également hautement spécifique, la thréonine étant le seul amino acide répresseur. En effet, la lysine et la méthionine qui sont les autres métabolites essentiels dérivant de l'acide aspartique n'affectent pas la synthèse de l'enzyme.

COHEN ET HIRSCH<sup>21</sup> avaient trouvé que la thréonine n'exerce pas d'effet répresseur sur les enzymes de *E. coli* transformant l'homosérine en thréonine et ce fait avait été confirmé pour l'un d'eux, l'homosérine kinase, par WORMSER ET PARDEE<sup>10</sup>. Chez *E. coli*, tout au moins, la thréonine n'exerce donc un effet répressif que sur l'homosérine déshydrogénase; en effet, les aspartokinases<sup>1</sup>, la semi-aspartaldéhyde déshydrogénase<sup>12</sup> et les deux enzymes transformant l'homosérine en thréonine échappent à la répression.

Il serait intéressant de vérifier si l'homosérine déshydrogénase, seul enzyme de la séquence réprimé par la thréonine, et la semi-aspartaldéhyde déshydrogénase, enzyme non réprimé par la lysine, appartiennent à des opérons séparés, eux-mêmes distincts d'autres opérons contrôlant la synthèse des autres enzymes conduisant à la lysine et à la thréonine.

Les régulations portant sur l'homosérine déshydrogénase sont la cause apparente la plus probable du taux de croissance extrêmement réduit d'*E. coli* K12 sur thréonine, car elles doivent rendre la synthèse de méthionine limitante pour la croissance. L'addition de méthionine rétablit d'ailleurs le taux de croissance à une valeur presque normale.

Pendant que ce travail était en cours de rédaction, nous avons pris connaissance du récent article de NARA *et al.*<sup>22</sup> qui ont étudié l'effet de la thréonine et de la méthionine sur la L-homosérine déshydrogénase d'une souche de *Micrococcus glutamicus*. Cet enzyme, qu'ils ont étudié uniquement dans le sens HS → ASA, fonctionne avec le TPN, mais pas avec le DPN.

La thréonine est le seul amino acide rétro-inhibiteur de l'homosérine déshydrogénase chez *M. glutamicus*; les auteurs ne mentionnent pas si l'inhibition est com-

pétitive ou non, mais peuvent obtenir une inhibition de 100%. La différence essentielle entre leurs résultats et les nôtres réside dans la répressibilité de l'homosérine déshydrogénase par la méthionine (75% de répression avec la D,L-méthionine  $3.5 \cdot 10^{-3} M$ ) alors que chez *E. coli* K12, la méthionine ne réprime absolument pas cet enzyme. Les auteurs japonais n'ont pas essayé la répression par la thréonine. Ainsi, des organismes différents utilisent soit l'un, soit l'autre des métabolites dérivant de l'homosérine pour établir la régulation nécessaire à la production optimale de ces constituants essentiels.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. GINGRAS et le Dr. BERLINGUET, de l'Université Laval de Québec pour les homologues en C<sub>5</sub> et C<sub>6</sub> de l'homosérine.

Ce travail a bénéficié de l'aide de la National Science Foundation (Grant G-14856) et du Fonds de Développement de la Recherche Scientifique et Technique (Convention 61-FR-063).

#### RÉSUMÉ

L'homosérine déshydrogénase de *Escherichia coli* K12 est soumise aux deux types de régulation connus, répression et rétro-inhibition. L'agent régulateur est la L-thréonine.

La rétro-inhibition par la thréonine est hautement spécifique et strictement non- compétitive. On peut sélectivement inactiver le site d'inhibition de l'enzyme par chauffage. Les propriétés de stabilité de l'activité et de la capacité d'être inhibé de l'enzyme ont été étudiées. La constante de sédimentation de l'enzyme inhibible est nettement plus élevée que celle de l'enzyme non inhibable.

La synthèse de l'homosérine déshydrogénase de *E. coli* est fortement et spécifiquement réprimée par la présence de L-thréonine dans le milieu de culture. Le contrôle génétique de la synthèse des amino acides de la famille aspartique est discuté.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> E. R. STADTMAN, G. N. COHEN, G. LE BRAS ET H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 2033.
- <sup>2</sup> J. C. PATTÉ, T. LOVINY ET G. N. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 58 (1962) 359.
- <sup>3</sup> R. J. ROWBURY ET D. D. WOODS, *J. Gen. Microbiol.*, 24 (1951) 129.
- <sup>4</sup> R. J. ROWBURY, *Biochem. J.*, 82 (1962) 241.
- <sup>5</sup> M. COHN, G. N. COHEN ET J. MONOD, *Compt. rend.*, 230 (1953) 746.
- <sup>6</sup> S. WIJESUNDERA ET D. D. WOODS, *Biochem. J.*, 55 (1953) VIII.
- <sup>7</sup> H. E. UMBARGER ET B. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 415.
- <sup>8</sup> H. E. UMBARGER, *Science*, 123 (1956) 848.
- <sup>9</sup> J. P. CHANGEUX, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26 (1961) 313.
- <sup>10</sup> E. H. WORMSER ET A. B. PARDEE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 78 (1958) 416.
- <sup>11</sup> C. GILVARG, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 282.
- <sup>12</sup> J. A. BOEZA, communication personnelle.
- <sup>13</sup> F. JACOB ET J. MONOD, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961) 318.
- <sup>14</sup> S. BLACK ET N. G. WRIGHT, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 51.
- <sup>15</sup> G. N. COHEN ET H. V. RICKENBERG, *Annu. inst. Pasteur*, 91 (1956) 693.
- <sup>16</sup> S. BLACK ET N. G. WRIGHT, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 39.
- <sup>17</sup> H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- <sup>18</sup> J. C. GERHART ET A. B. PARDEE, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 891.
- <sup>19</sup> R. J. BRITTON ET R. B. ROBERTS, *Science*, 131 (1960) 32.
- <sup>20</sup> M. NOMURA, H. D. HALL ET S. SPIEGELMAN, *J. Mol. Biol.*, 7 (1960) 306.
- <sup>21</sup> G. N. COHEN ET M. L. HIRSCH, *J. Bacteriol.*, 67 (1954) 182.
- <sup>22</sup> T. NARA, H. SAMEJIMA, C. FUJITA, M. ITO, K. NAKAYAMA ET S. KINOSHITA, *Agr. Biol. Chem.*, 25 (1961) 532.