

La Génie Métabolique

La génie métabolique est la pratique consistant à optimiser les processus génétiques et régulateurs dans les cellules pour augmenter la production de certaines substances par les cellules. Ces processus sont représentés comme des réseaux chimiques qui utilisent une série de réactions biochimiques et d'enzymes qui permettent aux cellules de convertir les matières premières en molécules nécessaires à la survie de la cellule. La Génie métabolique cherche spécifiquement à modéliser mathématiquement ces réseaux, à calculer le rendement de produits utiles et à identifier les parties du réseau qui limitent la production de ces produits. Les techniques de génie génétique peuvent alors être utilisées pour modifier le réseau afin de pallier ces contraintes. Une fois de plus, ce réseau modifié peut être modélisé pour calculer le rendement du nouveau produit.

But

Le but ultime de l'ingénierie métabolique est de pouvoir utiliser ces organismes pour produire des substances de valeur à l'échelle *industrielle* de manière rentable. Les exemples actuels comprennent la production de bière, de vin, de fromage, de produits pharmaceutiques et d'autres produits biotechnologiques. Certaines des stratégies communes utilisées pour l'ingénierie métabolique sont (1) surexprimer le gène codant pour l'enzyme limitant la vitesse de la voie de biosynthèse, (2) bloquer les voies métaboliques concurrentes, (3) l'expression génique hétérologue et (4) la Génie enzymatique.

Puisque les cellules utilisent ces réseaux métaboliques pour leur survie, les changements peuvent avoir des effets drastiques sur la viabilité des cellules. Par conséquent, des compromis dans l'ingénierie métabolique se produisent entre la capacité des cellules à produire la substance désirée et ses

besoins de survie naturels. Par conséquent, au lieu de supprimer et / ou de surexprimer directement les gènes qui codent pour les enzymes métaboliques, l'objectif actuel est de cibler les réseaux de régulation dans une cellule pour concevoir efficacement le métabolisme.

Histoire et applications

Autre fois, pour augmenter la productivité d'un métabolite désiré, un micro-organisme était génétiquement modifié par une mutation chimiquement induite, et la souche mutante qui surexprimait le métabolite désiré était alors choisie. Cependant, l'un des principaux problèmes avec cette technique était que la voie métabolique pour la production de ce métabolite n'était pas analysée, et par conséquent, les contraintes à la production et les enzymes de la voie à modifier étaient inconnues.

Dans les années 1990, une nouvelle technique appelée ingénierie métabolique a émergé. Cette technique analyse la voie métabolique d'un micro-organisme et détermine les contraintes et leurs effets sur la production des composés désirés. Il utilise ensuite le génie génétique pour soulager ces contraintes. Quelques exemples d'ingénierie métabolique réussie: (i) Identification des contraintes à la production de lysine chez *Corynebacterium glutamicum* et insertion de nouveaux gènes pour soulager ces contraintes afin d'améliorer la production (ii) Ingénierie d'une nouvelle voie de biosynthèse des acides gras voie d'oxydation bêta inversée, qui est plus efficace que la voie native dans la production d'acides gras et d'alcools pouvant potentiellement être convertis catalytiquement en produits chimiques et carburants (iii) Amélioration de la production de DAHP, un métabolite aromatique produit par *E. coli* intermédiaire dans la production d'acides aminés aromatiques. Il a été déterminé par analyse de flux métabolique que le rendement maximal théorique de DAHP par molécule de glucose utilisée était de

3/7. En effet, une partie du carbone provenant du glucose est perdue sous forme de dioxyde de carbone au lieu d'être utilisée pour produire du DAHP. En outre, l'un des métabolites (PEP ou phosphoénolpyruvate) utilisés pour produire du DAHP était converti en pyruvate (PYR) pour transporter le glucose dans la cellule et, par conséquent, n'était plus disponible pour produire du DAHP. Afin de pallier la pénurie de PEP et d'augmenter le rendement, Patnaik et al. ont utilisé le génie génétique sur *E. coli* pour introduire une réaction qui convertit le PYR en PEP. Ainsi, le PEP utilisé pour transporter le glucose dans la cellule est régénéré, et peut être utilisé pour fabriquer du DAHP. Cela a abouti à un nouveau rendement maximal théorique de 6/7 – le double de celui du système *E. coli* natif.

À l'échelle industrielle, le Génie métabolique devient plus pratique et rentable. Selon l'Organisation de l'industrie biotechnologique, «plus de 50 installations de bioraffinage sont construites en Amérique du Nord pour appliquer le génie métabolique afin de produire des biocarburants et des produits chimiques à partir de biomasse renouvelable pouvant aider à réduire les émissions de gaz à effet de serre». Les biocarburants potentiels comprennent les alcools à chaîne courte et les alcanes (pour remplacer l'essence), les esters méthyliques d'acides gras et les alcools gras (pour remplacer le diesel) et les biocarburants à base d'acides gras et d'isoprénoïdes (pour remplacer le diesel).

Le génie métabolique continue d'évoluer dans l'efficacité et les processus aidés par des percées dans le domaine de la biologie synthétique et des progrès dans la compréhension des dommages métaboliques et de sa réparation ou préemption. Les premières expériences d'ingénierie métabolique ont montré que l'accumulation d'intermédiaires réactifs peut limiter le flux dans les voies d'ingénierie et être délétère pour les cellules hôtes si les systèmes correspondants de contrôle des dommages sont manquants ou inadéquats. Les chercheurs en biologie

synthétique optimisent les voies génétiques, qui à leur tour influencent les résultats métaboliques cellulaires. Les baisses récentes du coût de l'ADN synthétisé et des développements dans les circuits génétiques aident à influencer la capacité de l'ingénierie métabolique à produire les extrants désirés.

Analyse du flux métabolique

Mise en place d'une voie métabolique pour l'analyse

La première étape du processus consiste à identifier un objectif souhaité à atteindre par l'amélioration ou la modification du métabolisme d'un organisme. Des ouvrages de référence et des bases de données en ligne sont utilisés pour rechercher des réactions et des voies métaboliques capables de produire ce produit ou ce résultat. Ces bases de données contiennent de nombreuses informations génomiques et chimiques, y compris des voies de métabolisme et d'autres processus cellulaires. En utilisant cette recherche, on choisit un organisme qui sera utilisé pour créer le produit ou le résultat désiré. Les considérations qui sont prises en compte lors de cette prise de décision sont à quel point la voie métabolique de l'organisme est proche de la voie désirée, les coûts d'entretien associés à l'organisme, et comment il est facile de modifier la voie de l'organisme. *Escherichia coli* (*E. coli*) est largement utilisé en génie métabolique pour synthétiser une grande variété de produits tels que les acides aminés, car il est relativement facile à maintenir et à modifier. Si l'organisme ne contient pas la voie complète pour le produit ou le résultat souhaité, alors les gènes qui produisent les enzymes manquantes doivent être incorporés dans l'organisme.

Analyser une voie métabolique

La voie métabolique achevée est modélisée mathématiquement pour trouver le rendement théorique du produit ou les flux de réaction dans la cellule. Un flux est la vitesse à laquelle une réaction donnée se produit dans le réseau. L'analyse de la voie métabolique simple peut être faite à la main, mais la plupart nécessitent l'utilisation d'un logiciel pour effectuer les calculs. Ces programmes utilisent des algorithmes complexes d'algèbre linéaire pour résoudre ces modèles. Pour résoudre un réseau en utilisant l'équation pour les systèmes déterminés ci-dessous, il faut entrer les informations nécessaires sur les réactions pertinentes et leurs flux. Des informations sur la réaction (telles que les réactifs et la stoechiométrie) sont contenues dans les matrices G_x et G_m . Les matrices V_m et V_x contiennent les flux des réactions pertinentes. Une fois résolue, l'équation fournit les valeurs de tous les flux inconnus (contenus dans V_x).

$$V_x = -(G_x)^{-1} * (G_m * V_m)$$

Déterminer les manipulations génétiques optimales

Après avoir résolu les flux de réactions dans le réseau, il est nécessaire de déterminer quelles réactions peuvent être modifiées afin de maximiser le rendement du produit désiré. Pour déterminer quelles manipulations génétiques spécifiques effectuer, il est nécessaire d'utiliser des algorithmes de calcul, tels que OptGene ou OptFlux. Ils fournissent des recommandations pour quels gènes devraient être surexprimés, assommés, ou introduits dans une cellule pour permettre une production accrue du produit désiré. Par exemple, si une réaction donnée a un flux particulièrement faible et limite la quantité de produit, le logiciel peut recommander que l'enzyme catalysant cette réaction soit surexprimée dans la cellule pour augmenter le flux de réaction. Les manipulations

génétiq ues nécessaires peuvent être effectuées en utilisant des techniques de biologie moléculaire standard. Les gènes peuvent être surexprimés ou assommés d'un organisme, selon leur effet sur la voie et le but ultime. [15]

Mesures expérimentales

Afin de créer un modèle solvable, il est souvent nécessaire de connaître ou de mesurer expérimentalement certains flux. De plus, afin de vérifier l'effet des manipulations génétiques sur le réseau métabolique (pour s'assurer qu'elles s'alignent avec le modèle), il est nécessaire de mesurer expérimentalement les flux dans le réseau. Pour mesurer les flux de réaction, les mesures de flux de carbone sont effectuées en utilisant un marquage isotopique au carbone 13. L'organisme est alimenté par un mélange contenant des molécules dans lesquelles des atomes de carbone spécifiques sont transformés en atomes de carbone-13, au lieu du carbone-12. Après l'utilisation de ces molécules dans le réseau, les métabolites en aval sont également marqués au carbone 13, car ils incorporent ces atomes dans leurs structures. Le profil de marquage spécifique des différents métabolites est déterminé par les flux de réaction dans le réseau. Les modèles de marquage peuvent être mesurés en utilisant des techniques telles que la chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS) ainsi que des algorithmes de calcul pour déterminer les flux de réaction.