

# Rapport de stage

Ilan Chaffurin

Mai 2022



Université Claude Bernard



Lyon 1

Auteur :  
Ilan Chaffurin

Responsables :  
Olivier Biondi  
Sabine Peres

Laboratoire : Laboratoire de Biologie de l'Exercice pour la Performance et la Santé

## Construction d'un modèle du métabolisme énergétique dans le cas de la calpainopathie



## *Remerciements*

*Je remercie particulièrement Sabine Peres et Olivier Biondi qui ont réussi à m'apporter les bons outils pour réussir ce stage malgré les contraintes spatiales et temporelles.*

## Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>5</b>
1.1	La calpainopathie et la calpaïne 3 . . . . .	5
1.2	Le métabolisme énergétique . . . . .	6
1.3	Modélisation du métabolisme . . . . .	8
1.4	Flux Balance Analysis . . . . .	10
1.5	Objectifs du stage . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Matériel et Méthode</b>	<b>13</b>
2.1	Modèles métabolique sains . . . . .	13
2.2	Base de données . . . . .	13
2.3	Environnement de travail . . . . .	14
2.3.1	Outils . . . . .	14
<b>3</b>	<b>Résultats</b>	<b>14</b>
3.1	Adaptations des modèles . . . . .	14
3.1.1	Modifications de mitocore pour représenter la souris . . . . .	14
3.1.2	Modifications des modèles pour représenter un muscle squelettique . . . . .	15
3.1.3	Modification du modèle pour représenter la calpainopathie . . . . .	16
3.2	Analyse des modèles . . . . .	17
3.2.1	Analyse des différentes voies métaboliques . . . . .	17
3.2.2	Analyse de l'origine de l'acétyl-CoA . . . . .	19
3.2.3	Comparaison des flux . . . . .	20
3.2.4	Quotient respiratoire . . . . .	21
3.2.5	Production d'atp . . . . .	21
<b>4</b>	<b>Discussion</b>	<b>22</b>
4.1	Contrôle de la qualité des modèles . . . . .	22
4.1.1	Contribution des voies métaboliques pendant l'exercice . . . . .	22
4.1.2	Production d'ATP . . . . .	22
4.2	Entrées des métabolites et limites des modèles . . . . .	22
4.3	Acétyl-CoA et flux des voies métaboliques . . . . .	23
4.4	Impact de la calpainopathie sur le métabolisme énergétique . . . . .	23
4.5	Adaptation du modèle à d'autre maladies . . . . .	24
<b>5</b>	<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>24</b>
<b>6</b>	<b>Annexe</b>	<b>26</b>

## Table des figures

1	Symptômes de la calpainopathie . . . . .	5
2	Schéma des différentes voies métaboliques aboutissant à la production d'ATP . . . . .	7
3	Matrice de stœchiométrie de la glycolyse . . . . .	8
4	Exemple de réaction d'un modèle . . . . .	9

5	Espace de solutions d'un modèle . . . . .	10
6	Fonction objectif d'un modèle . . . . .	10
7	Solution optimale d'un modèle FBA . . . . .	11
8	schéma d'une FBA . . . . .	12
9	Workflow du stage . . . . .	13
10	Workflow modifications des modèles . . . . .	17
11	Flux des différentes voies du métabolismes énergétique humain . . . . .	18
12	Pourcentage des différentes origine de l'Acétyl-CoA . . . . .	19
13	Heatmap des flux des réactions du Mitocore . . . . .	20

## Liste des tableaux

1	Tableau d'entrée des métabolites principaux dans un muscle squelettique de souris .	15
2	Tableau d'entrée des métabolites principaux dans un muscle squelettique humain . .	15
3	Tableau des voies métaboliques analysées . . . . .	18
4	Quotient respiratoire des modèles . . . . .	21
5	Production d'ATP des modèles . . . . .	21
6	Réactions non présentes dans BRENDA . . . . .	26
7	Flux des voies métaboliques . . . . .	27
8	Pourcentage de production d'acétyl-CoA produit par les voies métaboliques . . . . .	27
9	Correspondance entre les noms des réactions et les enzymes . . . . .	28

# 1 Introduction

## 1.1 La calpaïnopathie et la calpaïne 3

La calpaïnopathie aussi appelée LGMDR1 pour pour Limb Girdle Muscular Dystrophy Recessive 1, est une dystrophie musculaire caractérisée par une atrophie et une faiblesse des muscles proximaux des membres [1]. C'est une maladie génétique autosomique [2] dont les premiers symptômes apparaissent généralement entre 20 et 30 ans. La progression de la maladie est lente mais entraîne une perte de mobilité après une à deux décennies [3]. Cette dystrophie musculaire se différencie des autres car elle n'est pas causée par une mutation d'un gène codant pour une protéine structurale du cytosquelette mais par une mutation d'un gène codant une protéase dépendante du calcium : la calpaïne 3 (CAPN3). Il existe plus de 200 mutations différentes du gène codant pour cette protéase, mais pour lesquelles aucun lien direct entre génotype et phénotype n'a pu être mis en évidence. Les symptômes connus de la calpaïnopathie sont les dégâts causés par stress oxydants, une dérégulation du calcium, l'apoptose des cellules musculaires, des altérations au niveau de la mitochondrie, une adaptation anormale des muscles lors d'exercices, une régénération musculaire affaiblie et une désorganisation des sarcomères [4]

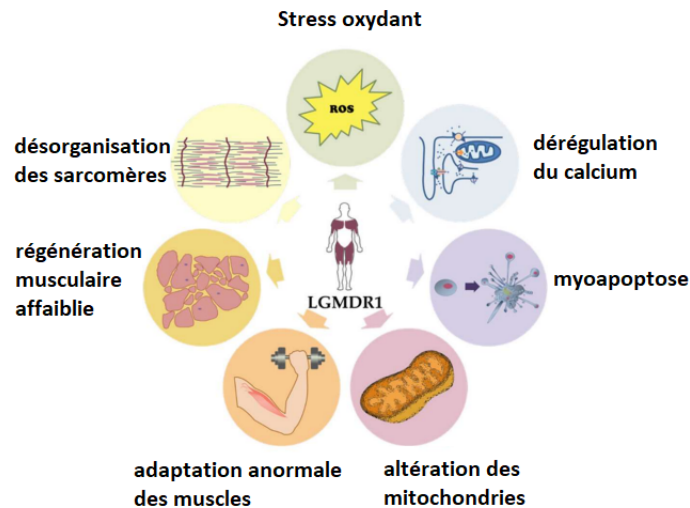


FIGURE 1 – Schéma représentant les différents symptômes de la calpaïnopathie [4].

La CAPN3 possède plusieurs variants provenant d'épissages alternatifs. Cependant ces variants s'expriment principalement dans le cœur, le cerveau, les poumons et la rétine, mais pas dans le muscle. Seule la forme «p94» de la CAPN3 a la particularité de s'exprimer dans les muscles squelettiques [5] et de subir une autolyse extrêmement rapide en présence d'une faible concentration intracellulaire de calcium, comme observé lors de lésions des membranes des cellules musculaires, ce qui conduit à son activation [6].

La CAPN3 peut interagir avec plusieurs protéines intramusculaires telles que la titine [7] et la dysferline [8]. Il existe un suppresseur de l'activité de CAPN3 nommé "PLEIAD" qui fut découvert

grâce aux techniques d'interactions protéiques [9]. La calmoduline, elle, est une protéine kinase modulatrice de l'activité de CAPN3 [10]. La CAPN3 possède plusieurs substrats connus *in vitro* [6], cependant aucun de ces substrats n'a été vérifié dans des conditions physiologiques. Ainsi, en cas d'absence d'expression de la CAPN3, de nombreux processus musculaires sont altérés, avec notamment une désorganisation des sarcomères, une régénération musculaire affaiblie, une dérégulation des flux calciques intramusculaires, des altérations mitochondriales conduisant à du stress oxydant et finalement, par accumulation, à l'apoptose des cellules musculaires.

De manière intéressante, de nombreuses altérations induites par la mutation du gène CAPN3 conduisent à une perturbation des composants cytosquelettiques des fibres musculaires des molécules impliquées dans la traduction d'autres protéines et à la filière énergétique glycolytique. CAPN3 possède plusieurs substrats connus *in vitro* [6]. Cependant aucun de ces substrats n'a été vérifié dans des conditions physiologiques. On peut tout de même noter que tous les candidats sont soit des composants de fibres musculaires soit des molécules impliquées dans la traduction de protéine et la glycolyse.

Les mutations du gène CAPN3 peuvent induire la calpainopathie. Il en existe plus de 200. Et la majorité de ces mutations induisent la calpainopathie. Il n'y a donc pas de lien direct entre génotype et phénotype pour gène de la calpaïne 3.

Un modèle de souris avec une mutation complète de CAPN3 (CAPN3-KO) a été généré et a permis de mieux comprendre le rôle de la protéine dans les cellules et les processus sous-jacents à la calpainopathie. Il a été notamment montré que les muscles des souris CAPN3-KO n'activent pas les voies de signalisations permettant d'exprimer les gènes impliqués dans le métabolisme mitochondrial, les myofibrilles et l'oxydation des lipides [11]. En plus de ces défauts, les souris CAPN3-KO montrent une réduction de l'endurance à l'exercice par rapport aux souris contrôles du même âge, suggérant une sensibilité accrue des muscles atteints par la calpainopathie à l'exercice.

Afin de mieux comprendre la pathologie, il semble donc important d'étudier avec précision les défauts qu'elle provoque sur le métabolisme énergétique, élément clé de la fonction et de la survie des cellules musculaires.

## 1.2 Le métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est central au fonctionnement des cellules puisqu'il permet de produire de l'ATP, la source principale d'énergie des cellules pour assurer le fonctionnement des processus cellulaires vitaux tels que la communication cellulaire, la motilité, etc. Les cellules musculaires sont très énergivores lors de leurs contractions et utilisent l'ATP pour produire des mouvements par transfert de l'énergie chimique contenue dans les molécules d'ATP en énergie mécanique grâce aux protéines contractiles du muscle.

Dans les muscles, il y a trois voies principales d'alimentation du métabolisme énergétique qui permettent la production d'ATP.

La première, la glycolyse, est la voie cytoplasmique permettant la production de 2 pyruvates et 2 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose à travers 11 réactions enzymatiques consécutives [12]. Le pyruvate formé pourra ensuite être transformé soit en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase, soit en lactate par la lactate déshydrogénase.

La seconde, l'oxydation des acides gras, permet la transformation de chaînes d'acides gras en acetyl-CoA. Cela passe par une scission des chaînes d'acides gras pour former plusieurs molécules d'acetyl-CoA à travers 4 réactions enzymatiques qui tournent en boucle. Cette étape est appelée bêta-oxydation.

Enfin pour la troisième voie, les acides aminés peuvent être métabolisés soit par conversions en métabolites permettant la production de glucose par la néoglucogénèse, on parle alors d'acides aminés glucogéniques, soit par conversion en acetyl-CoA ou acetoacetate., on parle alors d'acides aminés ketogéniques [13].

Ces trois voies métaboliques convergent vers l'acetyl-CoA qui est le précurseur du cycle de l'acide citrique (TCA), aussi nommé cycle de Krebs au niveau de la matrice mitochondriale et qui permet, à travers 10 réactions enzymatiques, de produire 3 NADHH+, 1 FADHH+, 2 CO<sub>2</sub> et 1 ATP [14]. Les molécules de NADHH+ et FADHH+ vont ensuite être pris en charge par les complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie pour former de l'ATP à partir d'un gradient de protons [15]. On parle alors de respiration cellulaire car la cellule a besoin d'oxygène pour faire tourner sa chaîne respiratoire et éliminer les électrons amenés par les NADHH+ et FADHH+ [16].

Enfin, les muscles ont la capacité d'autophagie dans des conditions de famine ou de restriction énergétique drastique. Cette fonction cellulaire permet la production de nutriments (glucose, acides gras, acides aminés) à partir de la dégradation de composants cellulaires [17], ce qui va permettre de réalimenter les voies énergétiques présentées précédemment.

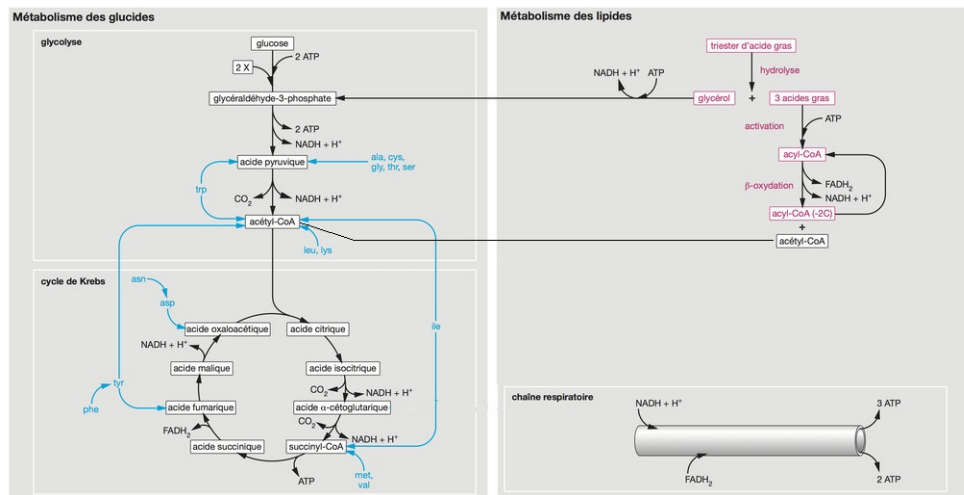


FIGURE 2 – Schéma simplifié des principales voies métaboliques aboutissant à la production d'ATP [18]

Le métabolisme ne se limite pas qu'aux voies décrites précédemment et n'est pas aussi simple. Toutes les voies cellulaires sont interconnectées par plusieurs métabolites. Chaque réaction est régulée par son environnement et par des cofacteurs pouvant provenir d'autres processus cellulaires. Ainsi, la compréhension des différents flux de métabolites en est d'autant plus complexe. La modélisation du métabolisme énergétique semble donc primordial afin de tenter de

simplifier son étude et de prédire son comportement dans différentes conditions.

### 1.3 Modélisation du métabolisme

La modélisation de réactions chimiques peut être effectuée à l'aide d'équations différentielles. Ces méthodes permettent de calculer et de prédire l'évolution de la concentration de plusieurs métabolites dans un système au cours du temps. Cependant, les équations différentielles nécessitent beaucoup de données scientifiques quantifiées des efficacités de réactions qui ne sont pas forcément disponibles, notamment les constantes réactionnelles des enzymes ( $v_{max}$ ,  $k_{cat}$ , etc...). Lorsque l'on étudie des réseaux métaboliques de grandes tailles, on utilise des méthodes à bases de contraintes qui permettent de déterminer, seulement à partir de la topologie, les voies métaboliques possibles. Ces méthodes utilisent des solveurs d'optimisation et sont peu coûteuses en terme de calcul.

Ainsi, les modèles à base de contraintes montrent un plus grand intérêt dans ce contexte car reposent sur une matrice de stœchiométrie (nommé  $S$ ) qui représente les réactions enzymatique du modèle dans ses colonnes (notées  $i$ ) et les métabolites sur les lignes. Si un métabolite n'intervient pas dans une réaction  $i$  : l'élément correspondant dans la matrice de stœchiométrie sera un 0. À l'inverse si le métabolite intervient dans la réaction  $i$  alors l'élément correspondant aura pour valeur la nombre de métabolites intervenant dans  $i$ . Si le métabolite est consommé lors de la réaction  $i$  alors ce nombre sera négatif. S'il est produit par la réaction  $i$  alors ce nombre sera positif. On peut donc représenter un réseau métabolique en une simple matrice de taille  $\mathbf{m} \times \mathbf{n}$ , avec  $\mathbf{m}$  le nombre de métabolites et  $\mathbf{n}$  le nombre de réactions. Enfin, on appelle  $v$  le vecteur de taille  $\mathbf{n}$  qui représente la distribution de flux des  $\mathbf{n}$  réactions.

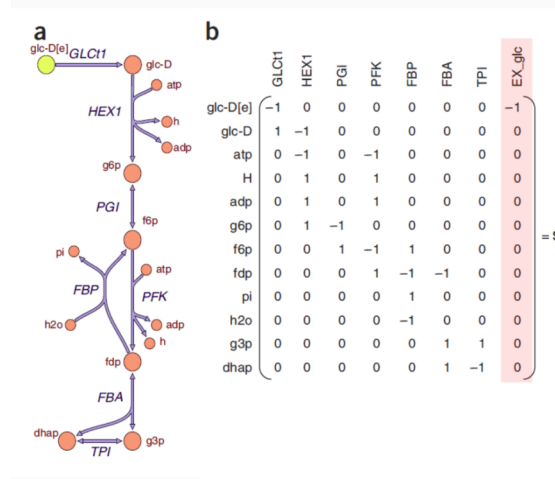


FIGURE 3 – A : schéma de 4 étapes du métabolisme de la glycolyse. B : matrice de stœchiométrie des 4 étapes représenté en A. Source : Beicker, S.A.A.M, et al 2007

Ce type de modélisation est basée sur plusieurs types de contraintes : les concentrations des métabolites (notées  $x$ ), la direction des réactions (unidirectionnelle ou bidirectionnelle) et sur les



bornes supérieures et inférieures des flux autorisés pour le réseau métabolique.

On considère que le modèle est dans un état stationnaire. C'est à dire que les variations de concentrations des métabolites sont nulles et constantes. Donc chaque métabolite est totalement consommé par une réaction, il n'y a pas d'accumulation de métabolites à l'intérieur du système. Dans un système différentiel, l'évolution des concentrations des métabolites est notée :

$$dx(t)/dt = SV \quad (1)$$

Or à l'état stationnaire, la variation des concentrations de métabolites est nulle. On a :

$$dx(t)/dt = 0. \quad (2)$$

donc :

$$Sv = 0 \quad (3)$$

De plus, chaque réaction est contrainte par sa direction. Même si la réaction est réversible, elle ne peut avoir lieu que dans un des deux sens dans le modèle (figure : 8).

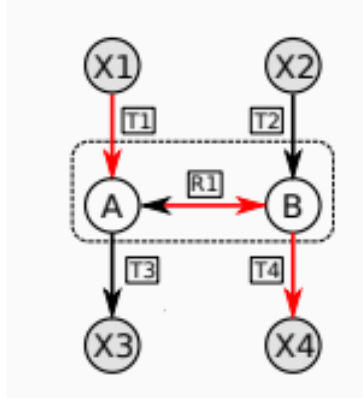


FIGURE 4 – Exemple de modèle représentant un réseau métabolique simple. Ce modèle respecte les deux principales contraintes. La réaction R1, bien que réversible n'a lieu que dans le sens A vers B dans le modèle. Chaque métabolite à l'intérieur du système (A et B) est entièrement consommé par une réaction, de telle sorte qu'aucun métabolite ne subsiste dans le système.

Chaque réaction  $i$  du vecteur  $v$  limite le flux la traversant par des bornes supérieures ( $a$ ) et inférieures ( $b$ ), notées  $a_i$  et  $b_i$  ou  $a(i)$  et  $b(i)$  ).

$$a_i < v_i < b_i \quad (4)$$

Les équations 3 et 4 sont des contraintes linéaires ; ainsi l'espace de solution du vecteur  $v$  est un cône convexe polyédrique. La résolution du vecteur  $v$  peut se calculer avec un solveur de programmation linéaire.

Une fois établie la matrice de stœchiométrie et les contraintes d'un modèle, l'espace de solution, c'est à dire l'ensemble des vecteur  $v$  respectant les équations (2) et (4) pour ce modèle est une cône polyédrique.

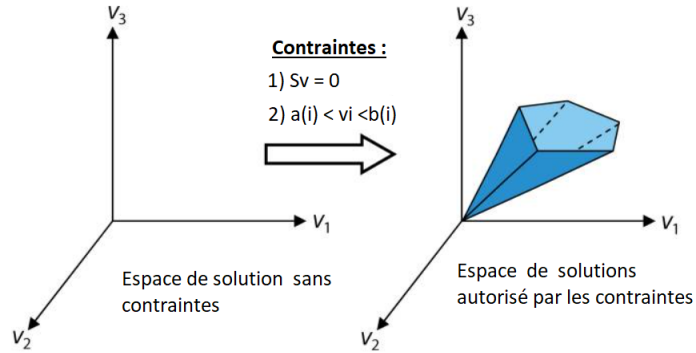


FIGURE 5 – Représentation schématique d'un cône polyédrique décrivant l'espace de solution de la matrice. Ici, le modèle ne possède que 3 réactions. source : [19]

Une fois le modèle ainsi construit, il faut calculer les flux des métabolites traversant ce modèle. Pour cela nous utilisons une approche mathématique nommée Flux Balance Analysis (FBA).

## 1.4 Flux Balance Analysis

La Flux Balance Analysis (FBA) est une approche mathématique qui permet de calculer les distributions de flux de métabolites au sein d'un modèle à base de contraintes. On parle de méthode d'optimisation. Cette analyse nécessite une fonction «objectif» notée  $Z$  qui sera maximisée. Cette fonction objectif est une combinaison linéaire de toutes les réactions du modèle avec un vecteur de poids  $c$  indiquant l'importance de chaque réaction du modèle pour la fonction objectif (5).

$$Z = c^T * V \quad (5)$$

Si l'on souhaite que la fonction objectif soit une seule réaction du modèle alors son poids dans le vecteur  $c$  sera de 1 et les poids des autres réactions seront de 0 (fig : 6).

$$Z = \begin{matrix} c^T (1 \times n) \\ \boxed{1} \quad 0 \quad \dots \quad 0 \end{matrix} * \begin{matrix} v (n \times 1) \\ v_1 \\ v_2 \\ \dots \\ v_n \end{matrix}$$

la fonction 1 est la seule fonction impactant la fonction objectif

FIGURE 6 – Définition d'une fonction objectif qui sera maximisée par une FBA. source : [19]

La FBA maximise ensuite la production de cette fonction «objectif» en respectant les contraintes du modèle définies dans les équations (3) et (4) tout en calculant des valeurs de flux pour chacune des réactions.

Le problème d'optimisation que l'on cherche à résoudre est :

$$\max(Z) \quad (6)$$

sous contraintes :

$$\begin{aligned} Sv &= 0 \\ a_i < v_i < b_i \end{aligned}$$

Chercher à maximiser  $\mathbf{Z}$  revient à trouver un point spécifique du cône polyédrique présent sur le bord de l'espace de solution (figure : 7). Ce processus est un problème NP-complet[20] et les problèmes de type FBA sont résolus à l'aide de solveurs d'optimisation tels que GLPK [?] et cplex [?]. Ces solveurs de contraintes utilisent de la programmation linéaire afin de résoudre une FBA.

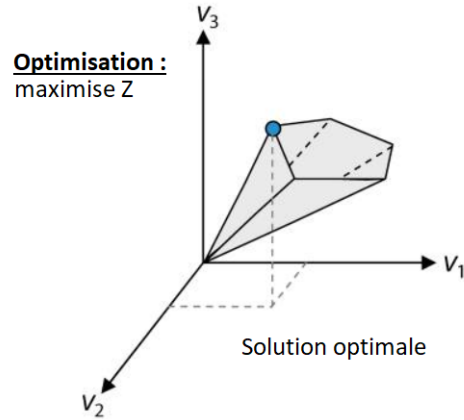


FIGURE 7 – *solution optimale d'un modèle cherchant à optimiser la production de la réaction  $v_3$ .*  
source : [19]

En sortie de FBA, nous avons donc une valeur de production de la fonction «objectif» ainsi qu'un flux calculé pour chaque réaction du modèle. Ce qui nous permet d'analyser les différentes voies cellulaires empruntées par les métabolites et d'observer l'impact de modifications d'un modèle sur sa production de métabolites clés et sur les flux de métabolite.

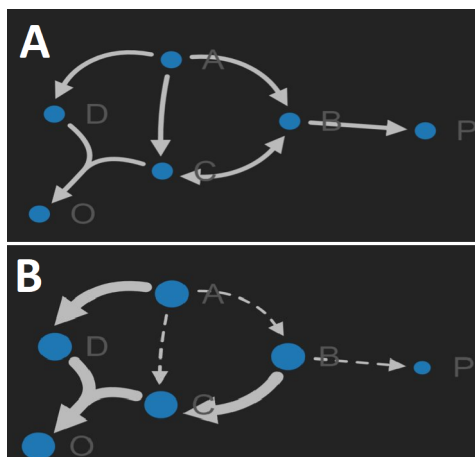


FIGURE 8 – A : modèle simple d'un réseau métabolique. B : FBA sur le modèle simple. La fonction objectif est la production du métabolite "O". L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la valeur de flux de la réaction. La taille des points est proportionnelle à la quantité de métabolite utilisé dans le model.

## 1.5 Objectifs du stage

A ce jour, il n'existe pas de modèle mathématique représentant le métabolisme énergétique de muscles squelettiques atteints par la calpainopathie. Or, la modélisation d'une telle maladie représente une approche essentielle à la meilleure compréhension de sa physiopathologie, mais aussi au développement de thérapies d'avenir ciblant le métabolisme énergétique. L'objectif de mon stage est donc de produire un modèle du métabolisme énergétique de cellules de muscles squelettiques atteints par la calpainopathie chez la souris et chez l'homme. Pour répondre à cet objectif, j'utiliserai des modèles FBA afin de pouvoir modéliser le métabolisme dans son entièreté et d'être en mesure de prédire des ajustements fins liées à la maladie.

Pour cela il faut trouver un modèle du métabolisme énergétique cellulaire validé dans des conditions saines et l'adapter au muscles squelettiques de la souris et de l'homme. Puis, je les testerai dans différentes conditions simulant des demandes énérgétiques élevées, exercice physique à différentes intensités, afin de vérifier la pertinence des résultats produits au regard de la bibliographie. Une fois validés, j'adapterai ces modèles à la condition pathologique de la calpainopathie et j'évaluerai les conséquences métaboliques de la maladie.

Enfin, ces modèles pourront être utilisés pour trouver des voies importantes et des biomarqueurs du métabolisme. Qui pourront ensuite être étudiées à l'aide d'expériences en laboratoire. Ces expériences apporteront de nouvelles données qui affineront les modèles. Ce qui créera un cycle d'échange entre les prédictions du modèle et les résultats des expériences.

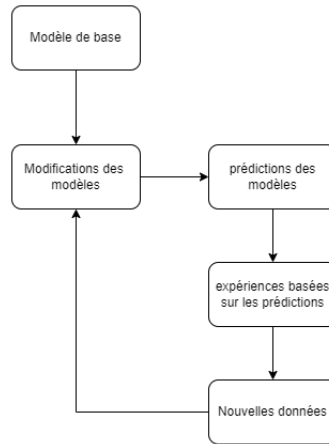


FIGURE 9 – Workflow représentant l'approche menée au cours du stage pour répondre à l'objectif posé

## 2 Matériel et Méthode

### 2.1 Modèles métabolique sains

Afin de construire des modèles métaboliques pouvant être adaptés suivant plusieurs conditions, il a fallu choisir des modèles validés. Après une recherche bibliographique, deux modèles FBA ont été choisis. Le modèle iMM1415 [21], un modèle à grande échelle du métabolisme de la souris basée sur le modèle humain Recon1 réunissant presque 4000 réactions et le modèle Mitocore [22], un modèle à plus petite échelle, centré sur le métabolisme de la mitochondrie d'une cellule cardiaque humaine réunissant environ 500 réactions.

Ces modèles sont décrits sous le format SBML (System Biology Markup Language), basé sur le XML. Le SBML est un standard de description qui est pris en compte par un grand nombre de logiciels. Ces modèles sont reconstruits de façon automatique à partir du génome et demandent des curations manuelles pour être pertinents.

### 2.2 Base de données

Afin d'adapter les modèles au besoin de modélisation du métabolisme énergétique dans des souris et chez l'Homme, deux bases de données ont été utilisées.

Chaque réaction des modèles est associée à un ID KEGG. La base de données KEGG Enzyme est une sous-partie de la base de données KEGG [24] regroupant un grand nombre d'enzymes. Les "enzyme-nomenclature number" (EC-number) ont été récupérés sur cette base de données via son API REST. Le traitement et l'envoi des requêtes ont été envoyés avec python et le module request [? ].

La base de données BRENDA[25] a été utilisée afin de vérifier si une enzyme décrite chez l'Homme est aussi présente chez la souris. Cette base de données regroupe des informations sur les enzymes et peut être questionnée en utilisant l'EC-number de chaque enzyme.

La base de données BRENDA ne possédant pas d'API permettant de faire cette recherche, elle a été téléchargée et accédée de manière manuelle en utilisant python. Le téléchargement de cette base de données s'effectue sur le site : <https://www.brenda-enzymes.org/>

## 2.3 Environnement de travail

### 2.3.1 Outils

Tout le travail effectué lors de ce stage a été fait dans un environnement conda [23] dédié. Le langage Python a été utilisé pour toutes les étapes de la mission et cela via plusieurs notebooks jupyter [24]. Le fichier d'environnement conda ainsi que les différents notebooks développés sont disponibles en annexes et sur github :

([https://github.com/Ilchaffurin/Cobrapy\\_analysis\\_internship/](https://github.com/Ilchaffurin/Cobrapy_analysis_internship/)).

## 3 Résultats

### 3.1 Adaptations des modèles

Les modèles métaboliques sains, Mitocore et IMM1415, ont besoin d'être adaptés de manière à répondre au questionnement scientifique de l'équipe de recherche, à savoir accès la modélisation sur le métabolisme énergétique de production d'ATP, représentant les grandes filières énergétiques afin d'anticiper les adaptations métaboliques en réponse à un exercice physique d'intensité variable et à la calpaïnopathie.

Tout d'abord, Mitocore est un modèle représentant le métabolisme d'une cellule cardiaque humaine. Etant donné que les expériences effectuées en laboratoire seront réalisés sur des souris modèles de la maladie, il est important d'y apporter des ajustements afin de représenter au mieux le métabolisme énergétique d'une souris.

L'ensemble des modifications et analyses sont faites à l'aide d'un module python "Utils-cobrapy.py" que j'ai créé qui contient des fonctions permettant des modifications et analyses rapides des modèles. Ce module contient une dizaine de fonctions pour le moment. Il sera aussi rendu avec le reste des résultats du stage et disponible sur github : ([https://github.com/Ilchaffurin/Cobrapy\\_analysis\\_internship/blob/main/Python/Utils\\_Cobrapy.py](https://github.com/Ilchaffurin/Cobrapy_analysis_internship/blob/main/Python/Utils_Cobrapy.py)).

#### 3.1.1 Modifications de mitocore pour représenter la souris

Pour effectuer la transformation du modèle mitocore, j'ai vérifié pour chacune des réactions du modèle si elle existe chez la souris. Cette vérification s'effectue en récupérant l'ID KEGG de la réaction dans le modèle, puis en récupérant l'EC-number de l'enzyme catalysant la réaction et enfin en vérifiant dans la base de donnée BRENDA si l'enzyme existe chez la souris.

Parmi l'ensemble des réactions vérifiées, 7 n'ont pas d'entrée dans BRENDA, et après vérification manuelle une à une dans la littérature, les enzymes catalysant ces réactions sont bien présentes chez la souris.

De plus, selon BRENDA, 39 enzymes n'existent pas chez la souris. Après vérification manuelle, seulement une d'entre elles n'a pas de preuve soutenant son existence chez la souris : la 4-acetamidobutyrate déacetylase. La réaction associée à cette enzyme a donc été retirée du modèle. La liste des réactions n'existant pas dans la souris selon BRENDA est disponible en annexe (tableau : 6).

### 3.1.2 Modifications des modèles pour représenter un muscle squelettique

Les modèles ont donc d'abord été modifiés pour représenter une cellule de muscle squelettique au repos (upperbound 25%) ou à l'exercice d'intensité modérée (upperbound 65%) ou à l'exercice à haute intensité (upperbound 85%). Ces modifications ont été réalisées par une recherche dans la littérature des entrées de métabolites et de leurs concentrations dans une cellule musculaire squelettique saine de souris (Table : 1) et d'Homme (Table : 2). À cela s'ajoute la recherche de valeurs de production de métabolites clés comme l'ATP, afin de vérifier la pertinence des modifications effectuées et le respect des conditions physiologiques par les modèles. Enfin, les valeurs d'entrées de métabolites qui n'ont pas été trouvées dans la littérature ont été choisies arbitrairement en adaptant les valeurs pour correspondre à la production d'ATP d'un muscle squelettique sain et en respectant les proportions de base du modèle. Ce type d'approche par détermination arbitraire a déjà été réalisé dans le cadre de la création des modèles Mitocore et IMM1415 initiaux et sont nécessaires pour faire fonctionner les modèles et les rapprocher au plus des conditions réelles [22] [21]. Ces modifications ont été faites avec la fonction `define_boundary_and_run_model()` du module `Utils_Cobrapy`.

métabolite	upperbound 25%	upperbound 65%	upperbound 85%
Glucose	0.01463	0.1419513123	0.3401475
Acide gras	0.11837	0.1679386877	0.1133825
Oxygène	7.3	7.3	7.3
Lactate	0	0	0
acétoacétate	0.05	0.05	0.05
3-hydroxybutanoate	0.02791	0.02791	0.02791

TABLE 1 – *Tableau d'entrée des métabolites principaux dans un muscle squelettique de souris. Les unités sont :  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{gDW}^{-1}$  (gDW=gramme de poids sec)*

métabolite	upperbound 25%	upperbound 65%	upperbound 85%
Glucose	0.028677	0.27824591817	0.66674025
Acide gras	0.232023	0.32918508183	0.22224675
Oxygène	8.29304	8.29304	8.29304
Lactate	0	0	0
acétoacétate	0	0	0
3-hydroxybutanoate	0.	0	0

TABLE 2 – *Tableau d'entrée des métabolites principaux dans un muscle squelettique humain. Les unités sont :  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{gDW}^{-1}$  (gDW=gramme de poids sec)*

### 3.1.3 Modification du modèle pour représenter la calpaïnopathie

Enfin, sur la base de ces modèles Mitocore\_souris et IMM1415 avec des fonctionnements représentant un cellule au repos ou à différentes intensité d'exercice, j'ai dû adapter ces modèles à la calpaïnopathie en fonction des altérations métaboliques connues et démontrées dans la littérature. En effet, un ensemble d'expériences, sur patients et sur modèles animaux ont permis de mettre en évidence une série de défauts métaboliques que j'ai compilé afin de les intégrer directement dans les modèles. Pour se faire, j'ai contraint le fonctionnement de certaines enzymes en venant modifier les valeurs maximales de flux autorisées à travers une réaction afin de mimer les altérations pathologiques observées. La valeur de flux de chaque réaction connue pour être altérée par la maladie est d'abord calculé sur le modèle sain, puis cette valeur est relevée, modifiée par application d'un facteur déterminé soit à l'aide de la littérature, soit arbitrairement pour coller aux défauts mesurés. Cette nouvelle valeur de flux obtenue est considérée comme le flux pathologique maximale et devient la valeur maximale de flux autorisé à travers la réaction dans le modèle malade. Un total de 14 réactions ont été modifiées dans les modèles basés sur MitoCore et 21 réactions ont été modifiées dans les modèles basés sur iMM1415. La liste totale des réactions modifiées ainsi que les facteurs utilisés pour chacune des réactions est disponible sur github à l'adresse : ([https://github.com/Ilchaffurin/Cobrapy\\_analysis\\_internship/blob/main/Python/model\\_conversion.csv](https://github.com/Ilchaffurin/Cobrapy_analysis_internship/blob/main/Python/model_conversion.csv)).

Ce procédé est réalisé en condition de repos, en condition d'exercice d'intensité modérée et de haute intensité. Ces nouveaux modèles Mitocore\_souris\_CAPN3 et iMM1415\_CAPN3 reposent donc sur une modulation spécifique des flux dans différentes conditions d'activité cellulaire ce qui permettra de valider la véracité de ces modèles, d'identifier les mécanismes de compensation et/ou les conséquences de ces limitations.

Ces modifications sont effectuées avec la fonction `run_model_calpainopathy()` du module `Utils_cobrapy`.



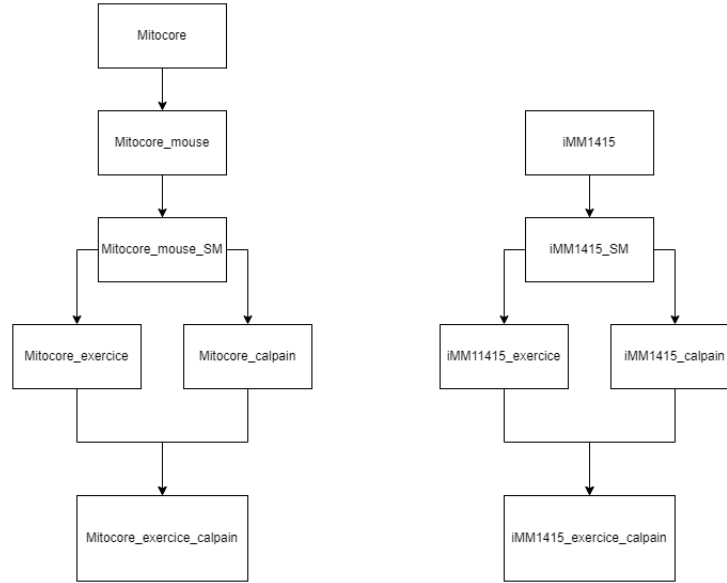


FIGURE 10 – *workflow* résumant les étapes des modifications des modèles de base. *SM* : *Skeletal muscle*

## 3.2 Analyse des modèles

Du fait que le laboratoire n'ait pas été en mesure de réaliser des expériences sur le métabolisme énergétique dans la calpainopathie, et que les données d'entrées des métabolites sont plus fiables chez l'humain, les analyses présentées ici ont été menées en utilisant le modèle humain basé sur le modèle MitoCore. Sur chacun des modèles une FBA visant à maximiser la fonction objectif représentant la production d'ATP de la cellule a été appliquée.

### 3.2.1 Analyse des différentes voies métaboliques

Pour analyser les modèles, et surtout les différentes voies métaboliques utilisées pour produire de l'ATP, je récupère les valeurs de flux de chaque voie métabolique intéressante en sélectionnant une réaction au sein de cette voie métabolique. La récupération de ces valeurs permettent ensuite les comparaisons et représentations nécessaires aux analyses.

Cette analyse s'effectue avec la fonction `define_boundary_and_run_model()` combinée avec `plot_voie_metabolique_ou_accoa()`.

Voie métabolique	réaction correspondante mitochondre	enzyme
glycolysis	PGM	phosphoglycerate mutase 1
béta-oxydation	ACADLC16	acyl-coa déhydrogénase
Corps cétoniques	BDHm	3-hydroxybutyrate déhydrogénase
dégradation isoleucine	ILETAm	transaminase acide aminée 1
dégradation leucine	LEUTAm	transaminase acide aminée 2

TABLE 3 – Tableau des différentes voies métaboliques analysées, la réaction associée pour chaque voie métabolique et l'enzyme catalysant la réaction.

Nous pouvons donc comparer les flux traversant les différentes voies métaboliques entre le modèle humain sain et le modèle pathologique :

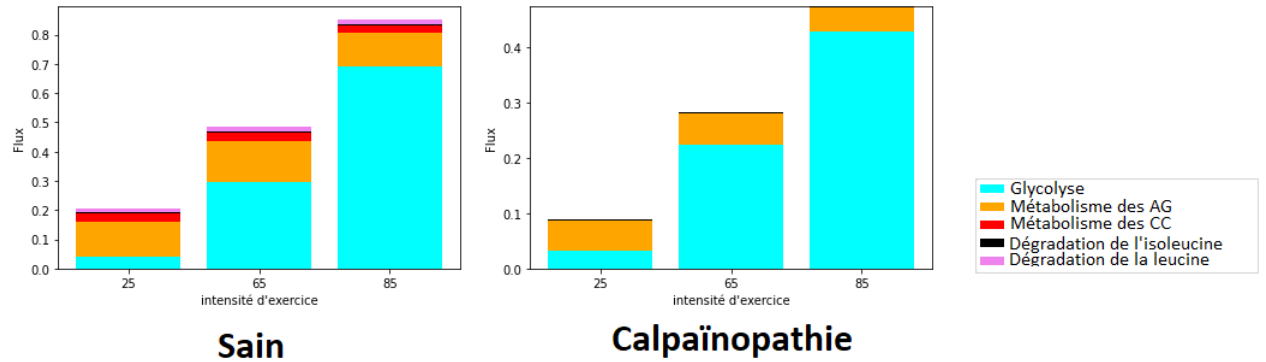


FIGURE 11 – Diagramme montrant les flux traversant les différentes voies métaboliques du métabolisme énergétique d'un muscle squelettique humain sain et atteint par la calpaïnopathie. Unité de flux :  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gDW}^{-1}$  (gDW=gramme de poids sec). AG= Acides Gras. CC = Corps Cétoniques. Valeurs disponibles en annexe Table : 7

Dans le modèle représentant un muscle sain au repos, le flux traversant les voies métaboliques de la leucine et isoleucine sont les plus faibles car inférieurs à  $0.02 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gDW}^{-1}$ . Ceux de la glycolyse et de la voie métaboliques des corps cétoniques sont proches de 0.03. Tandis que ceux traversant la voie des acides gras sont de 0.11 environ. La voie des acides gras est donc favorisée dans ce modèle.

On observe un changement pour le modèle d'un muscle sain en exercice de moyenne intensité puisque la glycolyse avec un flux proche de 0.3 devient la voie métabolique avec le flux le plus important. Une légère hausse est visible pour la béta-oxydation puisque son flux est de 0.14. Les flux des voies des acides aminés et corps cétoniques restent identiques.

Enfin dans le modèle représentant un muscle sain en exercice de haute intensité, la glycolyse reste la voie majoritaire avec un flux de 0.69 tandis que la béta-oxydation a son flux qui diminue par rapport à un exercice de moyenne intensité puisqu'il descend à environ 0.11.

Pour les modèles malades, la dynamique que les modèles sains se retrouve.

Le métabolisme des acides gras est majoritaire seulement au repos avec un flux de 0.05  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gDW}^{-1}$  puis son flux augmente légèrement lors d'un exercice de moyenne intensité pour atteindre environ 0.06. Lors d'un exercice de haute intensité, son flux diminue jusqu'à 0.043. Le flux de la glycolyse augmente lorsque l'intensité de l'exercice augmente, allant de 0.03 au repos jusqu'à 0.42 lors d'exercice à haute intensité en passant par 0.22 pour un exercice de moyenne intensité. Le flux du métabolisme de l'isoleucine est constant quel que soit l'intensité de l'exercice est vaut 0.002 environ. On remarque l'absence de flux pour le métabolisme de la leucine et des corps cétoniques.

### 3.2.2 Analyse de l'origine de l'acétyl-CoA

Le TCA étant la partie commune à toutes les voies métaboliques du métabolisme énergétique aérobie, il apparaît essentiel de cibler l'analyse sur l'acétyl-CoA, le précurseur d'entrée du TCA. Regarder l'origine de l'acétyl-CoA est donc aussi un indicateur de l'impact et du rôle des différentes voies métaboliques cellulaires et de leur équilibre respectifs sur la production d'ATP par la mitochondrie.

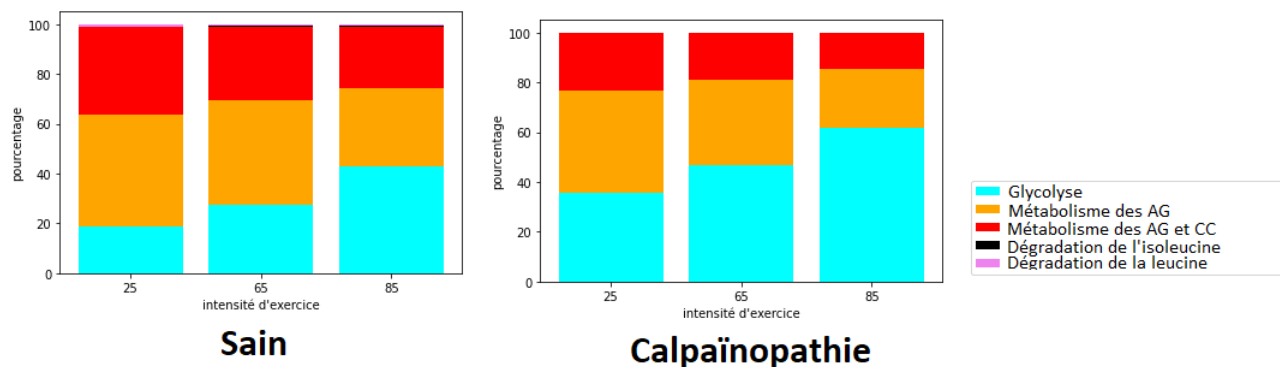


FIGURE 12 – *Diagramme comparant les pourcentages d'origine de l'acétyl-CoA d'un muscle squelettique humain sain et atteint par la calpaïnopathie. AG = Acides Gras. CC= Corps Cétoniques. Valeurs disponibles en annexe Table : 8*

Dans le modèle représentant un muscle sain au repos, l'acétyl-CoA est majoritairement produit par le métabolisme des acides gras, puis par une réaction commune au métabolisme des acides gras et des corps cétoniques. La glycolyse est la 3ème voie métabolique produisant le plus d'acétyl-CoA. Enfin la dégradation de la leucine et de l'isoleucine participent légèrement à la production d'acétyl-CoA.

La même répartition se retrouve dans un exercice de moyenne intensité, cependant la glycolyse prend une part plus importante de la production d'acétyl-CoA. Lors d'un exercice à haute intensité, la glycolyse devient la voie métabolique produisant le plus d'acétyl-CoA.

La même dynamique se retrouve entre les modèles malades, cependant la glycolyse devient la voie majoritaire dès lors que l'exercice est de moyenne intensité. On observe aussi la disparition

des voies de la leucine et de l'isoleucine.

Si l'on observe un part d'acétyl-CoA produit par une réaction commune au métabolisme des acides gras et des corps cétoniques, c'est uniquement grâce à la participation des acides gras. Les corps cétoniques ne produisent pas d'acétyl-CoA dans les modèles malades.

### 3.2.3 Comparaison des flux

Une analyse plus fine est possible en comparant l'évolution des flux de chaque réaction du modèle dans les différentes conditions.

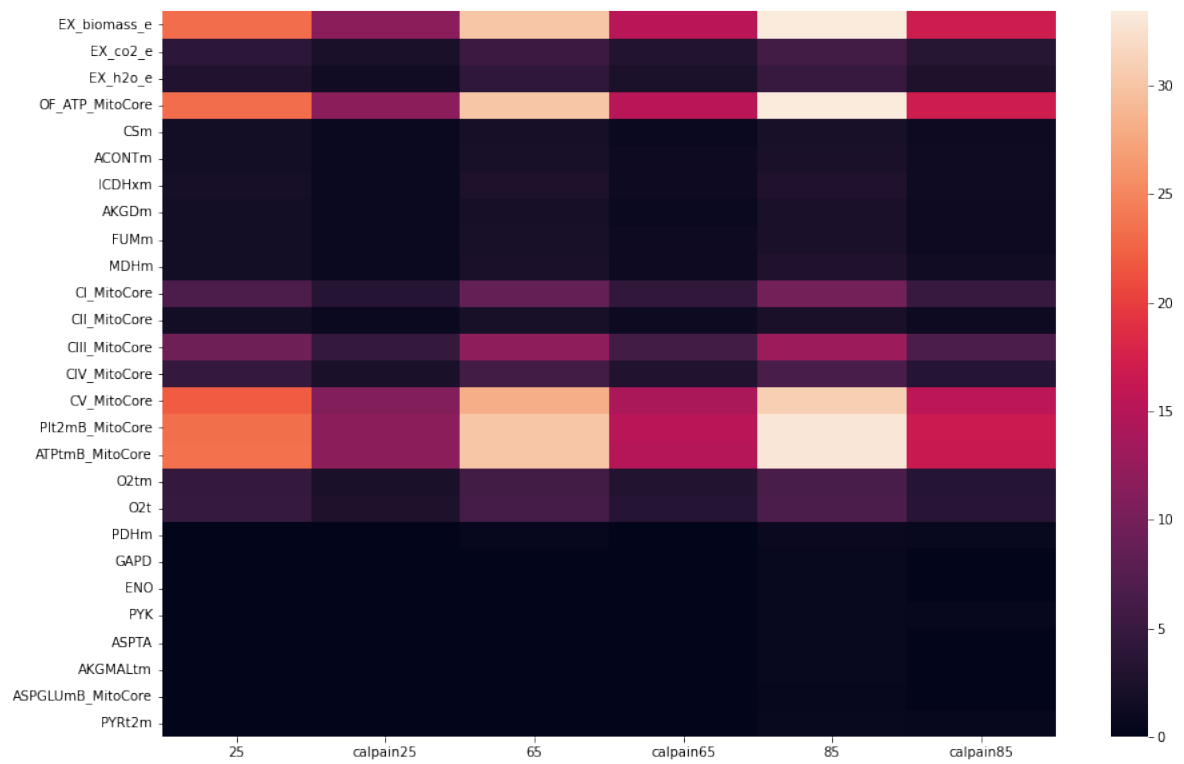


FIGURE 13 – Heatmap des flux des réactions du Mitocore dans les différentes conditions. Seules les réactions avec un flux supérieur à 0.5 sont affichées. La correspondance entre les noms des réactions et les enzymes sont disponibles dans l'annexe table 9

Sur cette heatmap, nous pouvons voir les flux les plus importants des modèles. Les plus gros flux sont ceux de la fonction objectif, de la production de biomasse et de l'ATP synthase. On remarque que les flux augmentent lorsque l'intensité de l'effort physique augmente. Et que pour chaque intensité d'exercice, les flux du modèle représentant un muscle malade sont toujours inférieurs aux flux du modèle d'un muscle sain.

### 3.2.4 Quotient respiratoire

Le quotient respiratoire (QR) est défini comme le rapport entre le volume de Co2 rejeté et le volume d'O2 consommé par un individu [25]. Ce rapport est un indicateur de l'équilibre entre la glycolyse et la bêta-oxydation chez un individu. En effet, un QR de 0.7 signifie que le métabolisme énergétique n'utilise que la voie des acides gras et un QR de 1 signifie qu'il n'utilise que la voie métabolique de la glycolyse.

Il est possible de calculer le QR de chaque modèle après une FBA à l'aide de la fonction `get_mitocore_respiratory_exchange_ratio()` du module `Utils_Cobrapy`.

(S) 25% intensité	(S) 65% intensité	(S) 85% intensité
0.84969	0.85487	0.89710
(C) 25% intensité	(C) 65% intensité	(C) 85% intensité
0.90729	0.92247	0.95791

TABLE 4 – Tableau des valeurs des quotients respiratoires de chaque modèle. (S) = sain. (C) = calpainopathie

Pour les modèles sains, on observe une hausse du quotient respiratoire lorsque l'effort physique augmente en intensité. La même hausse est visible pour les modèles atteints de la calpainopathie, cependant le QR de chaque modèle malade est toujours plus élevé que son équivalent sain.

### 3.2.5 Production d'atp

La production d'ATP étant la fonction objectif qui à été maximisée sur les modèles, il est pertinent de comparer le flux de cette fonction dans les différents modèles.

(S) 25% intensité	(S) 65% intensité	(S) 85% intensité
23.17697	30.05315	33.40776
(C) 25% intensité	(C) 65% intensité	(C) 85% intensité
11.72036	15.23802	16.92452

TABLE 5 – Tableau des valeurs de production d'ATP de chaque modèle. Les unités sont  $\mu\text{mol.min}^{-1}.\text{gDW}^{-1}$ . (S) = sain. (C) = calpainopathie. gDW=gramme de poids sec.

Pour les modèles représentant un muscle sain, la production d'ATP augmente avec l'intensité de l'exercice. Ce même comportement est observable pour les modèles de muscles malades. Cependant la production d'ATP des modèles de cellules musculaires atteintes par la calpainopathie produisent envrion deux fois moins d'ATP que leur équivalent sain.

## 4 Discussion

### 4.1 Contrôle de la qualité des modèles

Une étape importante pour toute modélisation est la vérification de la pertinence des modèles. Dans le cas présent, le comportement du métabolisme énergétique soumis à différentes intensités d'exercices est très étudié et nous permet donc de vérifier si les modèles sains sont robustes.

#### 4.1.1 Contribution des voies métaboliques pendant l'exercice

La contribution des différentes voies du métabolisme énergétique lors d'exercice est connue, particulièrement au niveau de la contribution des sucres et des acides gras. D'après un article paru dans *nature metabolism* [26] la bêta-oxydation contribue le plus au métabolisme énergétique à faible intensité. Puis sa contribution diminue lorsque l'intensité de l'exercice augmente, laissant place à la glycolyse. Ce comportement se retrouve dans tous les modèles présentés ici et se retrouve dans la figure 11 et 12 ainsi qu'au niveau des quotients respiratoires présentés dans le tableau 4.

Pour les modèles représentant un muscle atteint de la calpainopathie, le même comportement est observable avec une accentuation de la glycolyse encore plus élevée. Cela laisse penser que la calpainopathie n'est pas une maladie affectant l'organisation globale du métabolisme énergétique mais qui affecte seulement certaines voies métaboliques. Dans le cas présent, et en connaissant certaines propriétés de la calpainopathie, on peut penser que la hausse de l'activité de la glycolyse est un mécanisme compensatoire des défauts de la voie des acides gras[11].

#### 4.1.2 Production d'ATP

La production d'ATP d'un muscle sain sous différente intensité d'exercice est connue [27] et fluctue entre 22.5 et 25  $\mu\text{mol}$  d'ATP par minute par gramme de poids sec de muscle ( $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gDW}^{-1}$ ). Cependant cette valeur représente l'ATP qui n'est pas consommé par le muscle, pour obtenir la valeur de la production totale d'ATP, il faut lui ajouter la quantité d'ATP consommée par le muscle. Le muscle consomme 6.2 et 17.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gDW}^{-1}$  d'ATP. Ce qui signifie que la quantité totale d'ATP produite par un muscle est comprise entre 28.7 et 42.3  $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gDW}^{-1}$ . D'après le tableau 5, le modèle sain soumis à un exercice de faible intensité effectue une sous-production d'ATP par rapport à ce qui est attendue. Cela peut être due à deux choses, soit la valeur attendue de production d'ATP est erronée, par exemple à cause d'incompatibilité entre les articles choisis pour calculer cette valeur, soit les valeurs d'entrées de métabolites du modèle à faible intensité sont trop faibles. Dans les deux cas une recherche bibliographique approfondie devrait résoudre ce problème.

### 4.2 Entrées des métabolites et limites des modèles

Le lactate est une molécule produite par les cellules musculaires [30]. Cependant, les modèles présentés ici ne produisent pas de lactate. Il est cependant possible de modifier les modèles afin qu'il produise du lactate. En effet, si l'oxygène est le facteur limitant de la production d'ATP, alors les modèles produisent du lactate. Il est possible de rendre l'oxygène le facteur limitant en diminuant son entrée ou en augmentant les entrées des autres métabolites. La capacité à objectiver cette production de lactate est donc encore une fois limitée par les valeurs d'entrées de

métabolites qu'il faut ajuster plus finement. Ces observations sont essentielles pour comprendre les adaptations métaboliques observées dans des conditions pathologiques pour lesquelles des défauts de production d'énergie sont accompagnées par une élévation de la production de lactate pour compenser.

La recherche des valeurs d'entrées des métabolites dans la littérature est un processus qui prend beaucoup de temps et qui n'est pas toujours fructueux. Les informations cherchées n'existent pas toujours dans les conditions précises que sont les muscles squelettiques d'humain et/ou souris soumis à différentes intensités d'exercices. La majorité des limites des modèles présentés ici sont donc dues aux entrées de métabolites qui ne représentent pas correctement la physiologie. Les valeurs d'entrées des métabolites pourraient être améliorées à l'aide de recherches complémentaires dans la bibliographie, voir à l'aide d'expériences dédiées au laboratoire afin de calculer précisément les valeurs manquantes dans le modèle et en affiner leur fonctionnement.

### 4.3 Acétyl-CoA et flux des voies métaboliques

Regarder l'origine de l'acétyl-CoA en même temps que les flux des différentes voies métaboliques permettent d'affiner les analyses. Tout d'abord, l'ATP ne provient pas uniquement du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Par exemple, la glycolyse produit de l'ATP sans passer par le cycle de Krebs. De fait, l'étude des flux seul ou de l'acétyl-CoA seul ne sont pas des indicateurs suffisants pour expliquer la totalité de la production d'ATP. La comparaison du flux glycolytique avec l'origine de production de l'acétyl-CoA aide grandement à la compréhension des mécanismes aboutissant à la production d'ATP suivant le voie anaérobie vs aérobie à partir de glucose. Enfin, regarder l'origine de l'acétyl-CoA permet de se rendre compte de l'efficacité des voies métaboliques. Le métabolisme des lipides, même s'il a un flux plus faible que la glycolyse peut aboutir à plus d'acétyl-CoA de par son rendement plus élevé et/ou l'utilisation privilégiée des acides aminés

Dans ces modèles, il n'y a pas de production de lactate donc l'entièreté de la glycolyse alimente le TCA. On peut voir que même si les flux de la glycolyse sont bien plus élevés dans les modèles sains, la part d'acétyl-CoA produite par la glycolyse reste plus faible que la part produite par les acides gras et corps cétoniques combinés. De part son efficacité plus faible, la glycolyse a donc un impact plus faible qu'attendue en regardant les flux bruts sur la production d'ATP.

### 4.4 Impact de la calpaïnopathie sur le métabolisme énergétique

Si on s'intéresse tout d'abord aux flux de chaque modèle, on remarque que pour chaque intensité d'exercice, toutes les réactions du modèle malade ont toujours des flux plus faibles que les réactions dans le modèle sain (fig : 13). Cette baisse de flux induit donc une production d'ATP environ deux fois plus faible dans les modèles malades par rapport aux modèles sains. Cette baisse globale de flux et de production d'ATP est un phénomène attendu dans la calpaïnopathie, démontrant que nos modèles sont en partie cohérents [11].

Si on regarde les flux des différentes voies métaboliques des modèles (fig 11), on peut voir que la glycolyse a une part plus importante parmi les voies métaboliques dans les modèles malades que dans les modèles sains. Cependant les flux restent quand même plus élevés dans les modèles sains.

Cette hausse de l'importance de la glycolyse se retrouve aussi dans la figure 12. On observe que la glycolyse prend une part plus importante de la production de l'acétyl-CoA dans les modèles calpainopathie que dans les modèles sains pour toutes les intensités d'exercice. Elle se retrouve aussi dans la différence entre les quotient respiratoire des modèles sains et malades (tableau : 4) Cette hausse de l'activité de la glycolyse est attendue dans la calpainopathie puisqu'elle permet de compenser les défauts du métabolismes des lipides provoqués par la maladie [11].

Enfin, on observe que les voies des corps cétoniques et des acides aminés ont totalement disparues des modèles malades. Une théorie pouvant expliquer cela est que les nouvelles limites imposées par la calpainopathie sur les réactions communes à toutes les voies métaboliques ont forcées les modèles à choisir les voies métaboliques les plus efficaces pour la production d'ATP. Ces voies sont donc la glycolyse et la bêta-oxydation. Pour le moment, aucune étude n'a été faite sur l'impact de la calpainopathie sur le métabolisme des acides gras et des corps cétoniques. Il pourrait donc être intéressant de préparer des études visant spécifiquement ces deux voies métaboliques et d'observer leur niveau d'activité chez un individu atteint de la calpainopathie.

## 4.5 Adaptation du modèle à d'autres maladies

Enfin, il est possible d'adapter tous les travaux effectués lors de ce stage pour d'autres maladies. Pour une maladie affectant les muscles squelettiques, il suffit de modifier le fichier modifications.csv décrit dans la partie 3.1.3 afin qu'il représente les modifications induites par une autre maladie sur le métabolisme énergétique pour qu'il soit directement modélisé. Ainsi, ce travail a permis de mettre au point des outils et une approche transposables, montrant des perspectives d'avenir dans l'étude de maladies rares pour lesquelles peu d'expériences scientifiques peuvent être menées, soit par manque de modèle ou d'études. Cependant, pour une maladie affectant un autre type de cellule que le muscle squelettique, il faudra auparavant modifier les entrées des métabolites du modèle afin qu'elles représentent cet autre type cellulaire en utilisant la fonction dédiée que j'ai développée.

## 5 Conclusion et perspectives

En conclusion, un module python a été développé afin de faciliter l'utilisation, la modification et l'analyse de modèle par une FBA. Ce module informatique a pour objectif de rendre accessible la FBA à des personnes sans compétences de programmation avancées. À l'aide de ce module, des modèles du métabolisme énergétique affecté par la calpainopathie ont bien été créés. Ces modèles représentent plusieurs intensités d'exercices ce qui permet de vérifier qu'ils simulent bien le comportement attendu d'un métabolisme énergétique soumis à différentes intensités d'exercices. Ces modèles soutiennent l'hypothèse d'une hausse de l'activité de la glycolyse pour un métabolisme affecté par la calpainopathie. De plus les modèles montrent une forte baisse voire une disparition du métabolisme des acides gras et des corps cétoniques qu'il faudra démontrer expérimentalement ou invalider. Dans les deux cas, cela permettra de renforcer avec des données expérimentales les modèles.



Les modèles peuvent cependant être améliorés afin que la production d'ATP et de lactate soit bien respectée dans toutes les conditions d'exercices. Cela passe par une recherche approfondie dans la littérature de valeurs d'entrées de métabolites plus fines et cohérentes entre elles, ou bien par la mise en place d'expériences permettant de générer ces données manquantes si elles n'existent pas dans la littérature. Enfin, une modélisation au cours du temps du métabolisme énergétique sera possible en effectuant une Dynamic-FBA (DFBA) [28], ce qui permet d'observer l'évolution des flux des modèles au cours du temps. La DFBA permettra une analyse plus fine du métabolisme et de mieux observer l'évolution des voies métaboliques dans différentes conditions. Il sera par exemple possible de simuler le métabolisme effectuant un exercice augmentant progressivement en intensité et de visualiser le changement de voie métabolique contribuant le plus au métabolisme énergétique. Des outils d'analyse et de représentation d'une DFBA pourront être développés et implémentés au sein d'un module python comme cela a été fait pour l'analyse d'une FBA.

Pour finir, tous ces travaux peuvent être adaptés pour créer d'autres modèles représentant d'autres maladies.

## 6 Annexe

Nom de la réaction	EC-number associé
RPI	5.3.1.6
RPE	5.1.3.1
FUMm	4.2.1.2
CI_MitoCore	1.6.5.9
FUM	4.2.1.2
r0682	1.3.1.10
r0763	1.3.1.10
r0765	1.3.1.10
r0767	1.3.1.10
r0712	1.3.1.10
r0771	1.3.1.10
r0773	1.3.1.10
HMGLm	4.1.3.4
MGCHrm	4.2.1.18
3HBCOAHLM	3.2.1.4
MMSAD1m	1.2.1.27
MMEEm	5.1.99.1
THRD_L	4.3.1.19
r0645	1.2.1.32
SACCD3m	1.5.1.8
r0525	1.5.1.9
GLU5Km	2.7.2.11
AGMTm	3.5.3.11
4aabutn_MitoCore	3.5.1.63
GLUNm	1.4.1.13
GLUN_MitoCore	1.4.1.13
PSERT	2.6.1.52
FTCD	4.3.1.4
AOBUTDsm	1.1.1.381
LDH_Dm_MitoCore	1.1.1.28
r0129	3.4.19.13
DHPR	1.5.1.34
34HPPOR	3.4.19.13
URCN	4.2.1.49
IZPN	4.2.1.49
IZPN	3.5.2.7
PGPPTm	2.7.8.5
PGPP_hsm_MitoCore	3.1.3.27
CYTK1m	2.7.4.14

TABLE 6 – *Tableau des réactions non présentes dans BRENDA et leur EC-number.*

voie métabolique	(S) 25% intensité	(S) 65% intensité	(S) 85% intensité
glycolyse	0.03926	0.2939	0.6903
beta-oxydation	0.11962	0.14320	0.11463
corps cétonique	0.02791	0.02791	0.02791
dégradation isoleucine	0.016	0.016	0.016
dégradation leucine	0.004	0.004	0.004
voie métabolique	(C) 25% intensité	(C) 65% intensité	(C) 85% intensité
glycolyse	0.03194	0.22293	0.42848
beta-oxydation	0.05444	0.05828	0.04307
corps cétonique	0	0	0
dégradation isoleucine	0	0	0
dégradation leucine	0	0	0

TABLE 7 – *Tableau des flux des voies métaboliques étudiées dans les modèles.*

voie métabolique	(S) 25% intensité	(S) 65% intensité	(S) 85% intensité
glycolyse	18.98	27.28	43.12
beta-oxydation	44.82	42.0	31.08
corps cétonique et acide gras	35.02	29.74	24.9
dégradation isoleucine	0.25	0.2	0.18
dégradation leucine	1.0	0.78	0.72
voie métabolique	(C) 25% intensité	(C) 65% intensité	(C) 85% intensité
glycolyse	35.88	46.78	61.81
beta-oxydation	40.8	34.2	23.34
corps cétonique et acide gras	23.08	18.83	14.65
dégradation isoleucine	0	0	0
dégradation leucine	0	0	0

TABLE 8 – *Tableau des pourcentages d'acétyl-CoA produit par les différentes voies métaboliques.*

Nom de la réaction	nom de l'enzyme associée
EX_biomass_e	production de biomasse
Ex_co2_e	sortie de Co2
Ex_h2o_e	sortie d'eau
OF_ATP_MitoCore	production d'ATP
CSm	citrate synthase
ACONTm	aconitase hydratase
ICDHxm	isocitrate déhydrogénase
AKGDm	2-oxoglutarate déhydrogénase
FUMm	fumarate hydratase
MDHm	malate déhydrogénase
CI_MitoCore	Complexe 1 de la chaîne respiratoire
CII_MitoCore	Complexe 2 de la chaîne respiratoire
CIII_MitoCore	Complexe 3 de la chaîne respiratoire
CIV_MitoCore	Complexe 4 de la chaîne respiratoire
CV_MitoCore	ATP synthase
PIt2mB_MitoCore	transporteur phosphate
ATPmB_MitoCore	transporteur ATP
O2tm_L	transporteur d'oxygène
O2t	entrée d'oxygène
PDHm	pyruvate déhydrogénase
GAPD	glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase
ENO	énolase
PYK	pyruvate kinase
ASPTA	glutamique-oxaloacétique transaminase
AKGMALtm	transporteur malate-oxoglutarate
ASPGLUmB_MitoCore	transporteur glutamate aspartate (antiport)
PYRt2m	transporteur pyruvate

TABLE 9 – Correspondance entre les noms des réactions et les enzymes

## Références

- [1] M. Fardeau, D. Hillaire, C. Mignard, N. Feingold, J. Feingold, D. Mignard, B. De Ubeda, H. Collin, F. M.S. Tomé, I. Richard, and J. Beckmann. Juvenile limb-girdle muscular dystrophy. clinical, histopathological and genetic data from a small community living in the reunion island. *Brain : a journal of neurology*, 119 ( Pt 1 :295–308, 1996.
- [2] Oihane Jaka, Margarita Azpitarte, Coro Paisán-Ruiz, Miren Zulaika, Leire Casas-Fraile, Raúl Sanz, Nathalie Trevisiol, Nicolas Levy, Marc Bartoli, Martin Krahn, Adolfo López de Munain, and Amets Sáenz. Entire capn3 gene deletion in a patient with limb-girdle muscular dystrophy type 2a. *Muscle Nerve*, 50 :448–453, 9 2014.
- [3] Sridhar Selvaraj, Neha R. Dhoke, James Kiley, Alba Judith Mateos-Aierdi, Sudheer Tungtur, Ricardo Mondragon-Gonzalez, Grace Killeen, Vanessa K.P. Oliveira, Adolfo López

- de Munain, and Rita C.R. Perlingeiro. Gene correction of lgmd2a patient-specific ipscs for the development of targeted autologous cell therapy. *Molecular Therapy*, 27 :2147–2157, 2019.
- [4] Jaione Lasa-Elgarresta, Laura Mosqueira-Martín, Neia Naldaiz-Gastesi, Amets Sáenz, Adolfo López de Munain, and Ainara Vallejo-Illarramendi. Calcium mechanisms in limb-girdle muscular dystrophy with capn3 mutations. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 :1–22, 2019.
- [5] H. Sorimachi, S. Imajoh-Ohmi, Y. Emori, H. Kawasaki, S. Ohno, Y. Minami, and K. Suzuki. Molecular cloning of a novel mammalian calcium-dependent protease distinct from both m- and mu-types. specific expression of the mrna in skeletal muscle. *The Journal of biological chemistry*, 264 :20106–20111, 1989.
- [6] Yasuko Ono, Koichi Ojima, Fumiko Shinkai-Ouchi, Shoji Hata, and Hiroyuki Sorimachi. An eccentric calpain, capn3/p94/calpain-3. *Biochimie*, 122 :169–187, 2016.
- [7] Chikako Hayashi, Yasuko Ono, Naoko Doi, Fujiko Kitamura, Mai Tagami, Reiko Mineki, Takao Arai, Hayao Taguchi, Mitsuaki Yanagida, Stephanie Hirner, Dietmar Labeit, Siegfried Labeit, and Hiroyuki Sorimachi. Multiple molecular interactions implicate the connectin/titin n2a region as a modulating scaffold for p94/calpain 3 activity in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 283 :14801–14814, 5 2008.
- [8] Louise V.B. Anderson, Ruth M. Harrison, Robert Pogue, Elizabeth Vafiadaki, Christine Pollitt, Keith Davison, Jennifer A. Moss, Sharon Keers, Angela Pyle, Pamela J. Shaw, Ibrahim Mahjneh, Zohar Argov, Cheryl R. Greenberg, Klaus Wrogemann, Tulio Bertorini, Hans H. Goebel, Jacques S. Beckmann, Rumaisa Bashir, and Kate M.D. Bushby. Secondary reduction in calpain 3 expression in patients with limb girdle muscular dystrophy type 2b and miyoshi myopathy (primary dysferlinopathies). *Neuromuscular Disorders*, 10 :553–559, 12 2000.
- [9] Yasuko Ono, Shun Ichiro Iemura, Stefanie M. Novak, Naoko Doi, Fujiko Kitamura, Tohru Natsume, Carol C. Gregorio, and Hiroyuki Sorimachi. Pleiad/simc1/c5orf25, a novel autolysis regulator for a skeletal-muscle-specific calpain, capn3, scaffolds a capn3 substrate, ctbp1. *Journal of Molecular Biology*, 425 :2955–2972, 8 2013.
- [10] Natalia Ermolova, Irina Kramerova, and Melissa J. Spencer. Autolytic activation of calpain 3 proteinase is facilitated by calmodulin protein. *Journal of Biological Chemistry*, 290 :996–1004, 2015.
- [11] Irina Kramerova, Natalia Ermolova, Ascia Eskin, Andrea Hevener, Oswald Quehenberger, Aaron M. Armando, Ronald Haller, Nadine Romain, Stanley F. Nelson, and Melissa J. Spencer. Failure to up-regulate transcription of genes necessary for muscle adaptation underlies limb girdle muscular dystrophy 2a (calpainopathy). *Human Molecular Genetics*, 25 :2194–2207, 2016.
- [12] Xue Bing Li, Jun Dong Gu, and Qing Hua Zhou. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes – new targets for lung cancer therapy. *Thoracic Cancer*, 6 :17, 1 2015.
- [13] Amino acid metabolism | fundamentals of biochemistry : Medical course step 1 review | accesspharmacy | mcgraw hill medical.

- [14] Asha Kumari. Citric acid cycle. *Sweet Biochemistry*, pages 7–11, 2018.
- [15] F. Melin, A. Nikolaev, and P. Hellwig. Redox activity of cytochromes from the respiratory chain. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry : Surface Science and Electrochemistry*, pages 451–469, 1 2018.
- [16] David G. Whitehouse, Benjamin May, and Anthony L. Moore. Respiratory chain and atp synthase. *Reference Module in Biomedical Sciences*, 1 2019.
- [17] Qianghua Xia, Xubo Huang, Jieru Huang, Yongfeng Zheng, Michael E. March, Jin Li, and Yongjie Wei. The role of autophagy in skeletal muscle diseases. *Frontiers in Physiology*, 12 :291, 3 2021.
- [18] Chimie pour l’inhalothérapie | ccdmd.
- [19] Jeffrey D. Orth, Ines Thiele, and Bernhard O. Palsson. What is flux balance analysis? *Nature biotechnology*, 28 :245, 3 2010.
- [20] Jakob L. Andersen, Christoph Flamm, Daniel Merkle, and Peter F. Stadler. Maximizing output and recognizing autocatalysis in chemical reaction networks is np-complete. *Journal of Systems Chemistry*, 3 :1–9, 1 2012.
- [21] Martin I. Sigurdsson, Neema Jamshidi, Eiríkur Steingrímsson, Ines Thiele, and Bernhard T. Palsson. A detailed genome-wide reconstruction of mouse metabolism based on human recon 1. *BMC Systems Biology*, 4 :1–13, 10 2010.
- [22] Anthony C. Smith, Filmon Eyassu, Jean Pierre Mazat, and Alan J. Robinson. Mitocore : A curated constraint-based model for simulating human central metabolism. *BMC Systems Biology*, 11 :1–13, 11 2017.
- [23] Anaconda software distribution, 2020.
- [24] Thomas Kluyver, Benjamin Ragan-Kelley, Fernando Pérez, Brian Granger, Matthias Bussonnier, Jonathan Frederic, Kyle Kelley, Jessica Hamrick, Jason Grout, Sylvain Corlay, Paul Ivanov, Damián Avila, Safia Abdalla, and Carol Willing. Jupyter notebooks – a publishing format for reproducible computational workflows. In F. Loizides and B. Schmidt, editors, *Positioning and Power in Academic Publishing : Players, Agents and Agendas*, pages 87 – 90. IOS Press, 2016.
- [25] K Schmidt-Nielsen. Chapter 5 energy metabolism, 1997.
- [26] Mark Hargreaves and Lawrence L. Spriet. Skeletal muscle energy metabolism during exercise. *Nature Metabolism* 2020 2 :9, 2 :817–828, 8 2020.
- [27] Jens Bangsbo. Muscle oxygen uptake in humans at onset of and during intense exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, 168 :457–464, 4 2000.
- [28] Radhakrishnan Mahadevan, Jeremy S. Edwards, and Francis J. Doyle. Dynamic flux balance analysis of diauxic growth in escherichia coli. *Biophysical Journal*, 83 :1331, 2002.