



Réseaux métaboliques *de Daniel Kahn*

Virginie J & Simon B.G.

8 octobre 2015

Table des matières

1	Introduction sur le métabolisme & remise à niveau en enzymologie	2
1.1	Qu'est-ce que le métabolisme ?	2
1.2	Méthodes pour étudier le métabolisme	5
1.3	Cinétique enzymatique : Michaelis-Menten	6
2	Introduction à la théorie du contrôle métabolique	10
3	Titre de section du cours 3	11

1 Introduction sur le métabolisme & remise à niveau en enzymologie

Objectif général de ce cours

- Comprendre le comportement général des systèmes métaboliques
- Aptitude à modéliser leurs dynamiques
- Exprimer comment les propriétés cinétiques des enzymes affecte les concentrations en métabolites et les flux
- Examiner comment les données expérimentales peuvent être utilisées pour identifier un modèle métabolique
- Interpréter ces comportements en terme de régulation biologique
- Généraliser au réseau de transcription des signaux

Pré-requis

- Connaissance sur la cinétique enzymatique
- Algèbre linéaire :
 - Analyse de rang matriciel, diagonalisation, etc ...
 - Être familier avec les packages mathématiques comme Scilab, Maple, R ou Matlab
- Système Dynamique
 - Jacobienne
 - Analyse de stabilité

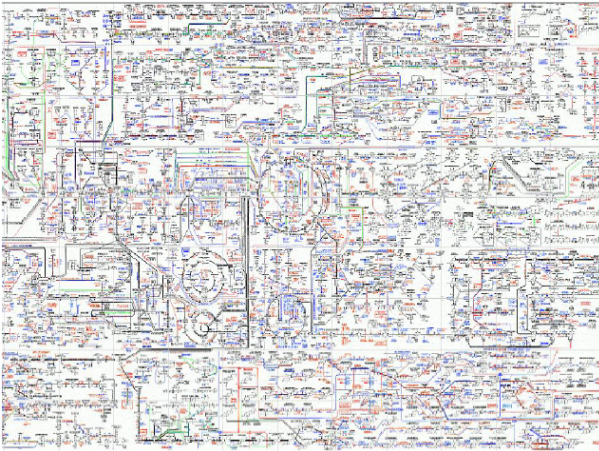
Outline

1. Introduction sur le métabolisme
2. Méthode pour étudier le métabolisme
3. Remise à niveau en cinétique enzymatique

1.1 Qu'est-ce que le métabolisme ?

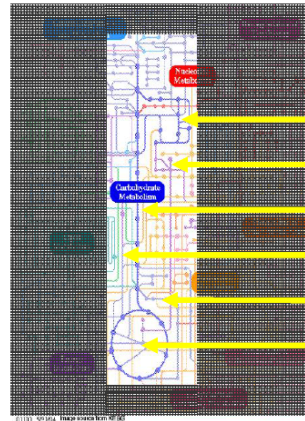
- Usine du vivant de produits chimiques : typiquement plusieurs centaines de réactions impliquant de petites molécules
- Balances
 - Nutriments et produits
 - Energie
 - Produit du pouvoir réducteur (redox)
- Turn-over rapide
- Les réactions chimiques souvent catalysées par des enzymes

Le cycle de Krebs : gradient de protons accumulé et dissipé par une ATPase = couplage respiratoire



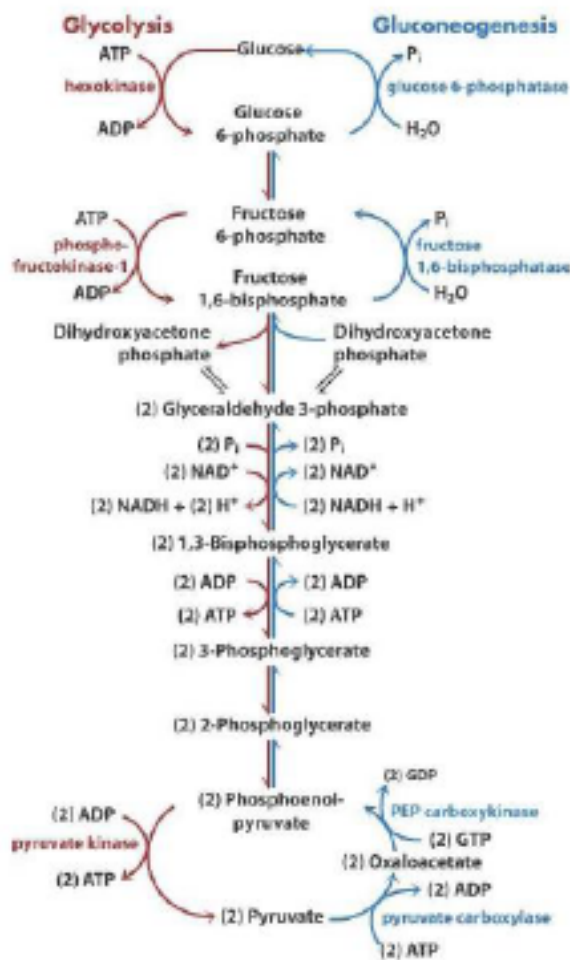
Métabolisme

Central C metabolism subnetwork

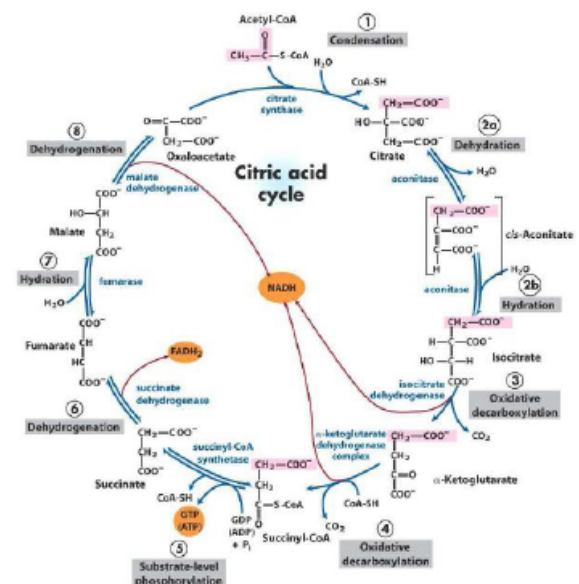


Pentose Phosphates
Entner-Doudoroff
Glycolysis/Gluconeogenesis
Methylglyoxal
Acetate
TCA

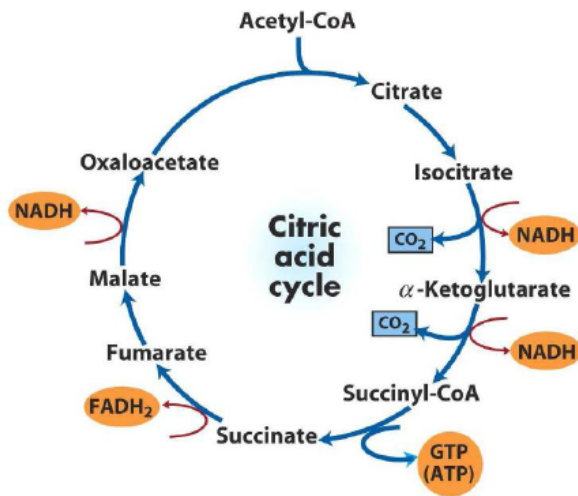
Central C metabolism subnetwork



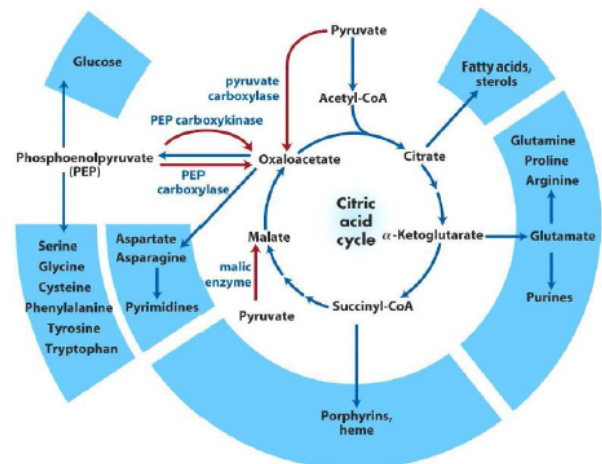
Glycolyse et néoglucogénèse



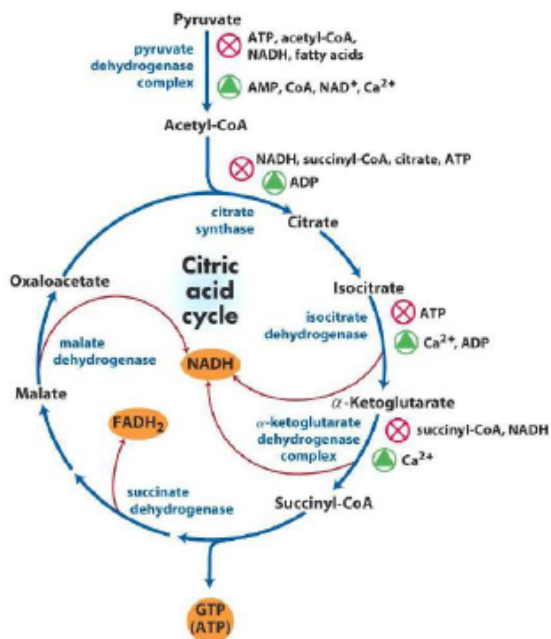
TCA cycle



TCA cycle



Anaplerosis



Régulation

cf Wikipédia

Réaction anaplérotique : qualifie une réaction chimique qui produit un métabolite, c'est-à-dire une espèce chimique intermédiaire d'une voie métabolique.

Anaplérose : consiste à rétablir la concentration des métabolites au sein du milieu mitochondrial afin qu'elle demeure constante et n'interrompe pas le cycle de Krebs malgré la consommation de ses métabolites par différentes biosynthèses ; élément essentiel de l'homéostasie cellulaire.

Réaction anaplérotiques majeures :

- Pyruvate -(pyruvate carboxylase)-> Oxaloacétate
- Aspartate -(aspartate transaminase)-> Oxaloacétate
- Glutamate -(glutamate DH)-> α -cétoglutarate
- β -oxydation des acides gras -(méthylmalonyl-CoA mutase)-> Succinyl-CoA

De nombreuses enzymes sont régulées d'une manière allostériques, effecteur en lien avec la charge.

1.2 Méthodes pour étudier le métabolisme

- Métabolomique : identification et quantification des métabolites
- Fluxomics : inférence ou prédiction du taux de réactions métaboliques dans les systèmes biologiques (cf Wikipedia)
- Outils analytiques basés sur :
 - Résonance magnétique nucléaire (NMR)
 - Spectrométrie de masse (MS)
 - Chromatographie liquide (LC)

Méthode de flux métabolique : vitesse réactionnelle lorsqu'il opère à l'état stationnaire

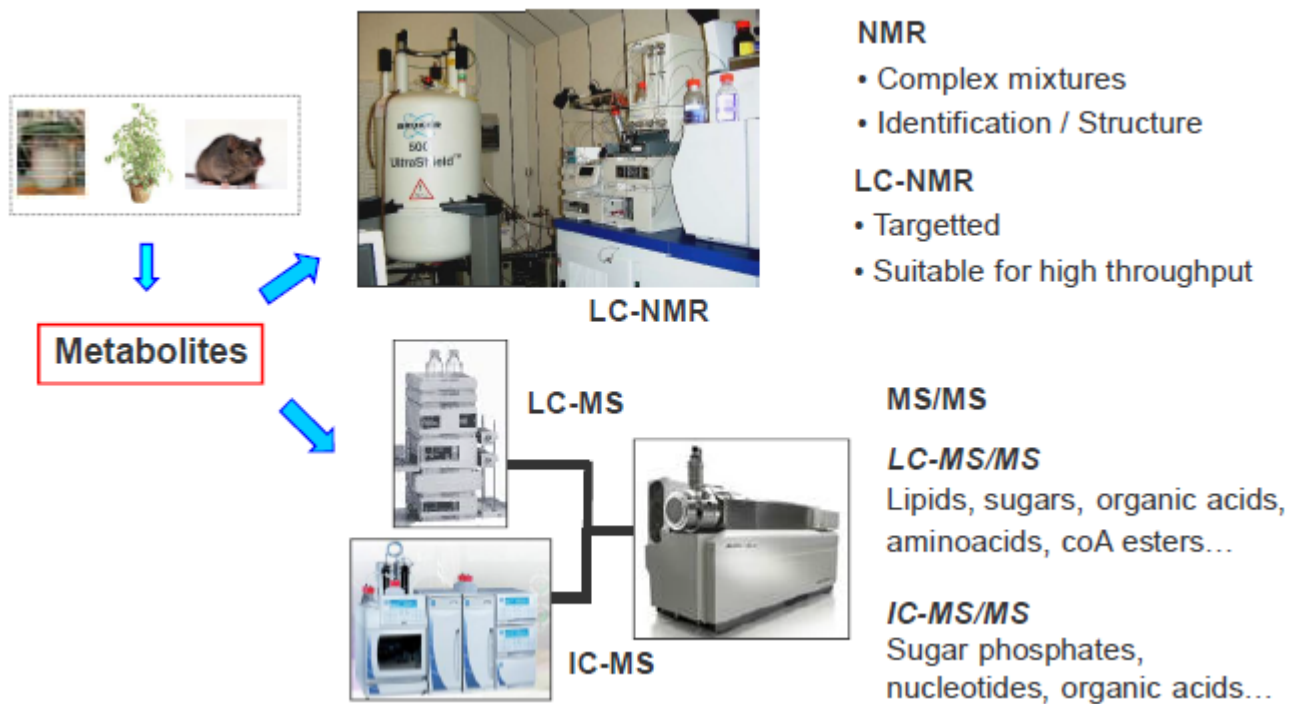


FIGURE 1 – Métabolomique

La résonance magnétique nucléaire (NMR) permet une analyse structurale. C'est une méthode peu

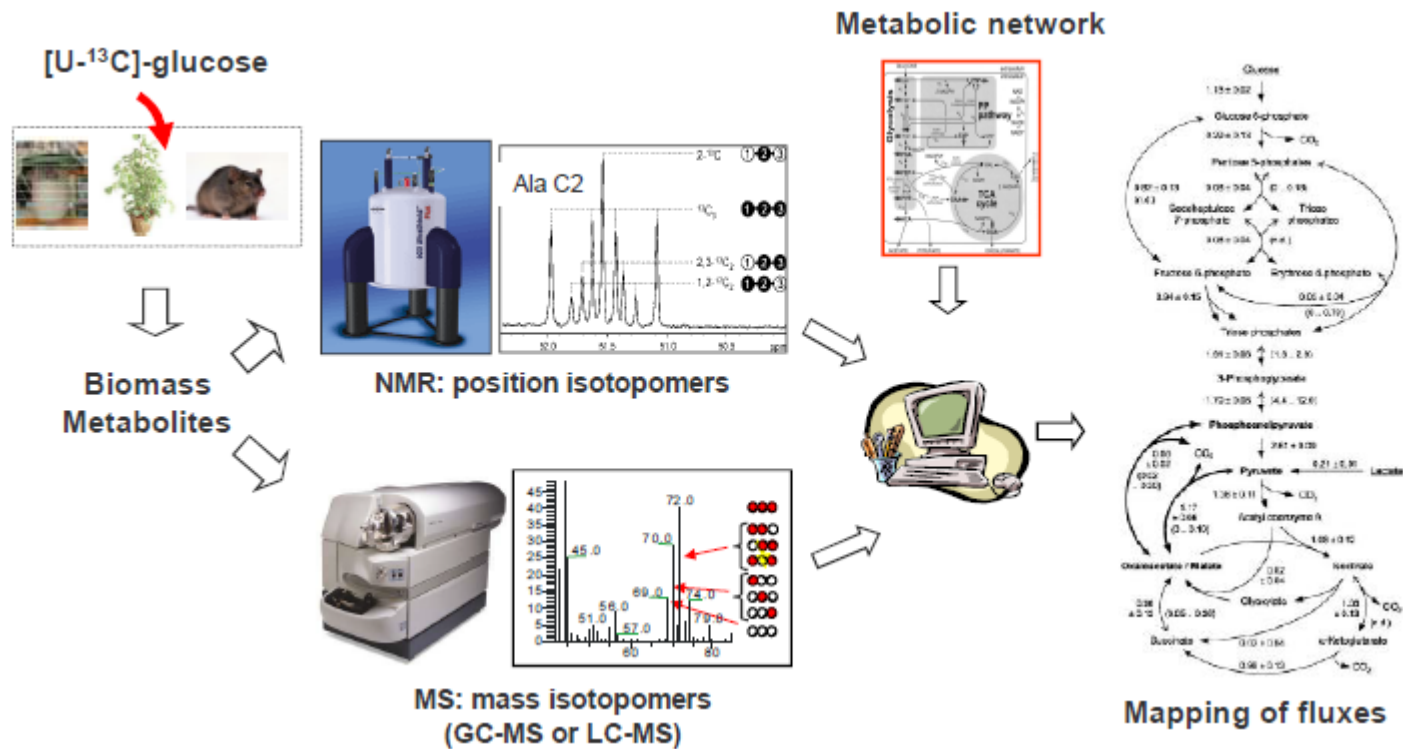


FIGURE 2 – Flux measurements

sensible : molarité > mm , il ne détecte que les métabolites présents en grande quantités.
MS/MS : sépare selon la masse et permet d'identifier les produits de fragmentation.

Il est plus difficile de chercher à mesurer les flux internes. La méthode de marquage des molécules (¹³C, ¹⁵N) peut être utilisée. ⇒ mesure la distribution des isotopomères des métabolites = distribution d'un marquage ⇒ modèle

Exemple :

Glucose marqué ⇒ acide aminé marqué ⇒ voie de biosynthèse connus

↔ modèle ⇒ à partir de la distribution des isotopomères on peut représenter les flux

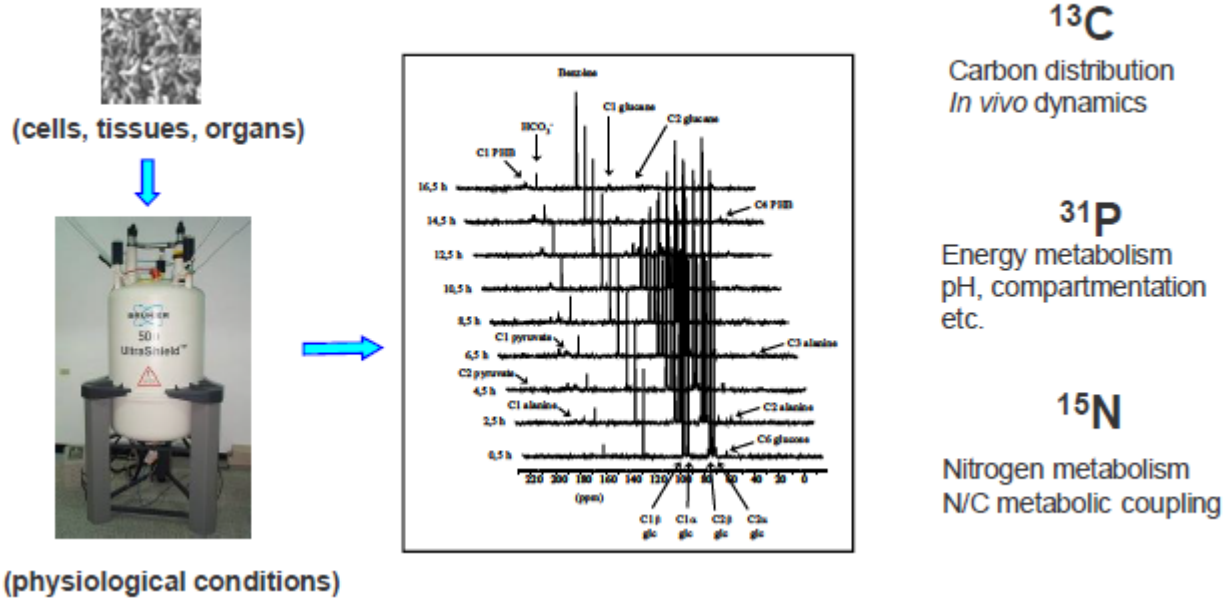
Isotopomères : Chacun des isomères qui ont le même nombre d'atomes isotopiquement distincts mais qui diffèrent par la position de ces atomes. Ex : CH₃-CDO et CH₂D-CHO.

NMR peut être utilisé *in vivo* uniquement si la molécule est majoritairement détectée. ³¹P : très utile pour mesurer la charge énergétique, le pH

1.3 Cinétique enzymatique : Michaelis-Menten

Une **enzyme** est une protéine catalysant une réaction, elle facilite la réaction avec aucun changement de conformation.




 FIGURE 3 – *in vivo* NMR

Action cinétique de la masse (Mass action kinetics) :

$$v_1 = k_1 E \cdot S - k_{-1} E S$$

$$v_2 = k_2 E S$$

Quasi steady-state :

$$v_1 = v_2 = v$$

$$E + E S = E_0$$

$$v = E_0 \frac{k_E S}{1 + \frac{S}{K_m}} \text{ taux de réaction } (M \cdot s^{-1})$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_{cat}}{k_1} \text{ Constance de Michaelis } (M)$$

$$k_E = \frac{k_{cat}}{K_m} \text{ efficience catalytique } (M^{-1} \cdot s^{-1})$$

$$k_{cat} \text{ est le taux de turn-over maximal } (s^{-1})$$

Michaelis-Menten Réversible



$$v = E_0 \frac{k_+ S - k_- P}{1 + \frac{S}{K_S} + \frac{P}{K_P}}$$

Il s'agit de l'expression par défaut pour la modélisation cinétique, équivalent quand $k_- = 0$, parce qu'il explique le phénomène de competitive product inhibition.

Inhibition compétitive



$$v = E_0 \frac{k_+ S - k_- P}{1 + \frac{1}{K_S} + \frac{P}{K_P} + \frac{I}{K_{Ic}}}$$

Autres inhibitions

Non-compétitive (plus efficace à forte concentration en substrat)

$$v = E_0 \frac{k_+ S - k_- P}{1 + (\frac{S}{K_S} + \frac{P}{K_P})(1 + \frac{I}{K_{Iu}})}$$

$$\text{Mixed } v = E_0 \frac{k_+ S - k_- P}{1 + (\frac{S}{K_S} + \frac{P}{K_P})(1 + \frac{I}{K_{Iu}}) + \frac{I}{K_{Ic}}}$$

Multiples substrats et produits Si les substrats et les produits se lient indépendamment et dans un ordre aléatoire :

$$v = E_0 \frac{k_{cat}^+ \prod_i \frac{S_i}{K_{S_i}} - k_{cat}^- \prod_j \frac{P_j}{K_{P_j}}}{\prod_i (1 + \frac{S_i}{K_{S_i}}) + \prod_j (1 + \frac{P_j}{K_{P_j}}) - 1}$$

source : 'Convenience kinetics' Liebermeister & Klipp, 2006, Theoret. Biol. Med. Mod. 3:41

Relation de Haldane La contrainte de l'équilibre :

$$K_{eq} = \frac{k_{cat}^+ \prod_j K_{P_j}}{k_{cat}^- \prod_i K_{S_i}}$$

Cinétique enzymatique & Thermodynamique Si on appelle Γ le rapport de l'action de masse (mass action ratio) :

$$\Gamma = \frac{\prod_j P_j}{\prod_i S_i} = K_{eq} \exp(\Delta G' / RT)$$

La cinétique enzymatique peut être divisée en 3 termes :

$$v = k_{cat}^+ E_0 \cdot f(S_i, P_j) \cdot (1 - \Gamma / K_{eq})$$

- 1^{er} terme : $k_{cat}^+ E_0$ correspond à la capacité enzymatique
- 2nd terme : $0 < f(S_i, P_j) < 1$ est le terme de saturation enzymatique. *Comme un exercice, écrire ce terme pour la cinétique de Michaelis-Menten réversible.*
- 3^{ème} terme : terme purement thermodynamique, il est indépendant des propriétés enzymatiques $\frac{1 - \Gamma}{K_{eq}} = 1 - \exp(\Delta G' / RT)$

Cooperativity ? Equation de Hill :

$$v = E_0 \frac{k_{cat}(S/K_{0.5})^h}{1 + (S/K_{0.5})^h}$$

h est le coefficient de Hill. Typiquement : $0.5 < h < 4$. Cette équation est purement empirique (actuellement erroné pour $S \ll K_{0.5}$). $K_{0.5}$ est une constante phénoménologique (pas un K_m !).

2-site cooperative binding Equation d'Adair :

$$v = 2E_0k_{cat} \frac{S/K_1 + S^2/K_1K_2}{1 + 2S/K_1 + S^2/K_1K_2}$$

reastically captures site dependencies.

Saturation $E + S \rightleftharpoons ES$ $E + ES = E_0$ $\frac{E.S}{ES} = \frac{k_{-1}}{k_1} = k_d$ $Y = \frac{ES}{E_0} = \frac{S/K_d}{1 + S/K_d}$

Pour aller plus loin ...

- *Understanding the Control of Metabolism*, by David Fell, Portland Press, London, 1997
- *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, by Athel Cornish-Bowden, Portland Press, London, 2004

Pour les TP :

- The practical course will rely heavily on the theoretical course
- Familiarize yourself with the COPASI modeling environment <http://www.copasi.org> (COPASI handbook)
- Refresh your course in linear algebra
- Be prepared to use your favourite mathematical package such as Octave, Scilab, Maple, R or Matlab
- You will be evaluated on the practical course

2 Introduction à la théorie du contrôle métabolique

3 Titre de section du cours 3