

UNIVERSITÉ BORDEAUX 1

MOCELL

Qualitative et quantitative modeling in biology system

PETIT Alexandre
RIQUELME Thomas

supervisé par
B. Beauvoit

16 janvier 2017

1 Introduction

Le sujet de notre étude se porte sur les réactions métaboliques présentes dans notre organisme. Ces réactions sont couplées à d'autres espèces telles que les enzymes ou des co-facteurs qui vont influencer positivement ou négativement les flux des composés entrant ou sortant. Ces réactions sont également influencées par des facteurs propres aux enzymes telles que les constantes d'affinités (K_{eq} , K_m , ...) ou des paramètres attribués au début des tests (durée, v_{max} , concentration initiale, ...). Il est intéressant d'étudier ces réactions afin de mieux comprendre leur fonctionnement. L'analyse *in-silico* est une bonne alternative à l'expérimentation classique car elle permet de lancer sans contrainte de multiples simulations. Nous avons utilisé le logiciel Copasi. Copasi est un logiciel renommé de simulation et d'analyse des réseaux métaboliques même très étendus.

Le but du projet est d'implémenter via ce logiciel des réactions métaboliques couplées aux réactions enzymatiques pour l'étude et l'analyse de trois flux de synthèse : le malate, le citrate et le carbohydrate.

2 Intégrations des données

La section suivante correspond aux entrées des différentes variables qui serviront à définir notre réseau. Les unités de base de notre modèle seront la minute, le micro Molaire et le millilitre.

2.1 Paramétrage des métabolites et des réactions

#	Name	Compartment	Type
1	ADP	compartment	fixed
2	ATP	compartment	fixed
3	PG	compartment	reactions
4	dPG	compartment	reactions
5	DHAP	compartment	reactions
6	F16bP	compartment	reactions
7	GAP	compartment	reactions
8	PEP	compartment	reactions
9	Pyr	compartment	reactions
10	CO2	compartment	fixed
11	OAA	compartment	reactions
12	Pi	compartment	fixed
13	AccoA	compartment	reactions
14	NAD	compartment	fixed
15	NADH	compartment	fixed
16	coA	compartment	fixed
17	Mal	compartment	reactions
18	Cit	compartment	reactions

Dans un premier temps, on rentre les différentes réactions. Les différents métabolites impliqués dans ces réactions sont directement détectés par le logiciel et nous n'avons pas besoin de les rentrer dans la catégorie "espèces de réaction". Il suffit ensuite d'indiquer si les valeurs expérimentales liées à ces espèces seront fixées ou bien seront dépendantes des réactions. A la fin des saisies, on dénombre trente-quatre métabolites différents dont dix-sept avec des valeurs fixes. On définit les réactions comme étant réversibles. Les Km sont initiés à 1 mM (0.1 mM par défaut). Enfin pour chaque enzyme, on annote les Vmax ainsi que les Keq.

2.2 Entrées et sortie

L'objectif de notre projet est d'observer les entrées et sorties de quatre différents métabolites à travers notre réseau : l'entrée de glucose, le stockage de malate, le stockage de citrate et la synthèses de lipides.

3 Système d'équations différentielles

Parmi le système d'équations différentielles découlant de notre modèle, nous avons sélectionné l'équation différentielle du Fructose-1,6-bisPhosphate(F16bP) pour illustrer son fonctionnement.

$$\frac{d([F16bP] \cdot V_{\text{compartment}})}{dt} = -V_{\text{compartment}} \cdot \left(\frac{1.25 \cdot ([F16bP] \cdot \frac{[DHAP] \cdot [GAP]}{0.00034})}{1 \cdot \left(1 + \frac{[F16bP]}{1} + \frac{[DHAP] \cdot [GAP]}{1} \right)} \right) + V_{\text{compartment}} \cdot \left(\frac{0.0798 \cdot ([ATP] \cdot [F6P] \cdot \frac{[ADP] \cdot [F16bP]}{421})}{1 \cdot \left(1 + \frac{[ATP] \cdot [F6P]}{1} + \frac{[ADP] \cdot [F16bP]}{1} \right)} \right)$$

Le F16bP est présent dans deux réactions :

F16bP = DHAP + GAP

ATP + F6P = ADP + F16bP

L'équation signifie que la concentration en F16bP en fonction du temps dépend de sa dégradation en DHAP et GAP (ce qu'on soustrait à droite de l'équation), et de sa production via ajout d'un Phosphate sur le Fructose6Phosphate par l'ATP (ce qu'on additionne à droite de l'équation).

D'autre part, les constantes utilisées sont les valeurs de Vmax et Keq des deux réactions correspondantes et la formule de l'équation suit celle des templates d'équations fournis en fonction du nombre de substrats et de produits.

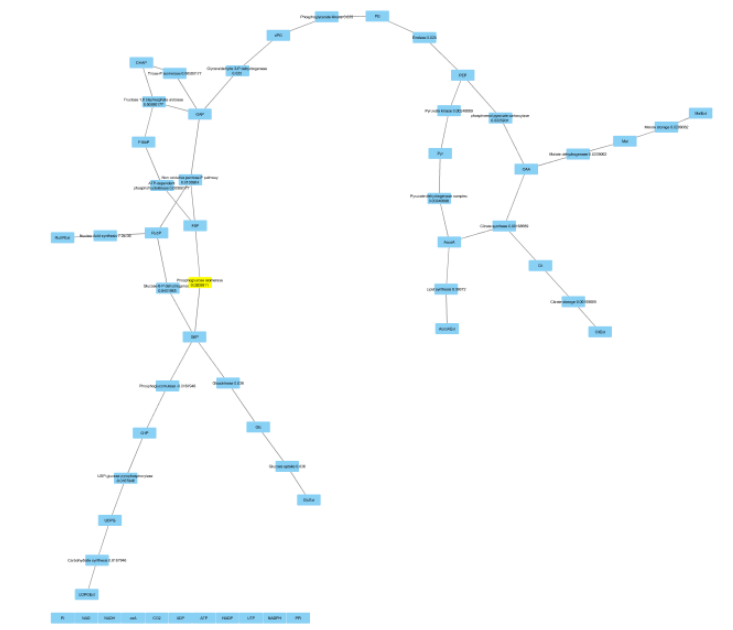
L'état stationnaire de notre modèle correspond au moment où cette concentration est proche ou égale à zéro. C'est à dire pour cet exemple, lorsque la concentration de F16bP dégradé est égale à la concentration de F16bP formé. On peut avoir une idée des différentes concentrations à l'équilibre en se basant sur l'outil "steady state".

	Name	Type	Concentration (μmol/ml)	Rate (μmol/(ml*min))	Transition Time (min)
1	F6P	reactions	0,255414	6,64216e-18	9,53553
2	OAA	reactions	1,31874e-06	1,66054e-18	0,00010856
3	GAP	reactions	0,0201051	1,23046e-15	0,80373
4	DHAP	reactions	0,183472	-1,22797e-15	31,5731
5	UDPG	reactions	0,16789	0	10
6	Mal	reactions	2,94685e-06	0	10
7	dPG	reactions	0,0235397	0	0,941032
8	Cit	reactions	0,121472	-1,66054e-18	10
9	PEP	reactions	0,0247479	3,32108e-18	0,98933
10	AccoA	reactions	871540	5,0854e-18	6,77332e+07
11	Glc	reactions	0,338499	0	9,40274
12	G6P	reactions	0,498676	-6,64216e-18	8,75262
13	PG	reactions	0,0862596	-3,32108e-18	3,44834
14	G1P	reactions	0,0102898	0	0,612889
15	F16bP	reactions	10,9046	0	1876,53
16	Pyr	reactions	230,243	-6,64216e-18	17893,7
17	Ru5P	reactions	0,513295	0	12,7732

On constate que dans la colonne "Rate" ci-dessus, toutes les valeurs tendent vers zéro, montrant que les réactions sont à un état stationnaire quasi parfait.

4 Carte de flux

Nous avons exporté nos données réactionnelles au format xml afin de les importer dans le logiciel Cytoscape. Nous avons obtenu le réseau ci-dessous.



A son entrée, le glucose est assimilé à un flux de 0.036 micromol/min, puis la glucokinase va le transformer en G6P à un rythme équivalent (même flux de 0.036) ce qui est normal car il n'y a pas d'embranchement.

En revanche au niveau du G6P, il y a 3 embranchements :

- soit le G6P va former du G1P puis de l'UDP-Glucose en vue d'une synthèse de sucres (saccharose et paroi cellulaire) avec un flux de 0.0168 (dans nos données la réaction $G1P = G6P$ a un flux négatif de -0.0168, ce qui veut dire que cette réaction réversible tend vers la formation de G1P avec un flux positif de 0.0168) ;
- soit le G6P va suivre la voie de la glycolyse et va être transformé en F6P par la Phosphoglucose isomerase avec un flux de 0.0209 ;
- soit le G6P va suivre la voie des pentoses-Phosphate et va être transformé en Ru5P par la G6P déshydrogénase avec un flux de 0.04.

On remarque que le partage des flux au niveau de cet embranchement n'est pas juste :
 $+0.036 - 0.016 = 0.020 + 0.040$ } relation fautive il y a un déséquilibre.

En effet, si on soustrait un flux de 0.016 de la voie des sucres, aux 0.036 de la voie d'entrée du glucose, il reste un flux sortant de 0.020 pour les voies de la glycolyse et des pentoses phosphates. Or, il y a bien un flux de 0.020 pour la glycolyse, mais le flux d'entrée de glucose ne suffit pas à expliquer le flux sortant de 0.040 vers la voie des pentoses-phosphate.

Ensuite, concernant la voie des pentoses-phosphate, le Ru5P va servir de façon minoritaire à la synthèse d'acide nucléique avec un flux de 7.2×10^{-6} et majoritairement à rejoindre la glycolyse en reformant du F6P et de la GAP avec un flux de 0.0134.

Concernant la suite de la glycolyse, le F6P est formé par l'arrivée de 2 flux : l'un par transformation du G6P avec comme valeur 0.020 et l'autre par transformation du Ru5P avec comme valeur 0.0134, ce qui donne un flux résultant de production de F6P d'une valeur de 0.0334.

Le F6P va ensuite former du F16bP avec un flux plus faible de 0.0058. Ce F16bP va être clivé en DHAP et GAP avec un même flux de 0.0058 et la DHAP va redonner du GAP aussi avec ce même flux de 0.0058, ce qui donne un flux résultant vers la formation de GAP de $0.0058 \times 2 = 0.0116$.

Cependant le GAP n'est pas issu que de la glycolyse avec ce flux de 0.0116, il provient aussi de la voie des pentoses phosphate avec un flux de 0.0133, ce qui donne un flux résultant de formation de GAP

de 0.0249. Ce qui coïncide avec le flux de transformation de la GAP en diP-Glycerate qui est de 0.025. Ensuite, il n'y a pas d'embranchement donc la transformation du diPG en PG, puis du PG en PEP se fait au même rythme avec des flux de 0.025.

Ensuite, au PEP il y a un embranchement :

- un flux plus important de 0.0226 vers une transformation en OAA ;
- un flux plus faible vers une transformation en pyruvate puis en AcCoA d'une valeur de 0.0024 (soit un flux 10 fois plus faible que l'autre alternative).

L'OAA est majoritairement retransformé en malate avec un flux de 0.0209 et dans un moindre mesure il sera combiné avec de AcCoA pour former de la Citrate avec un flux de 0.00168. Ce flux de formation du citrate est 10 fois plus faible que celui de formation de malate mais il est du même ordre de grandeur que le faible flux de formation de l'AcCoA qui doit être combiné à OAA pour faire de la citrate. Enfin, l'AcCoA peut aussi participer à la synthèse des lipides avec un très faible flux de 0.00072.

5 Coefficients de contrôle

L'outil "metabolic control analysis" permet de calculer les coefficients de contrôle des différentes réactions du réseau. Une valeur est attribuée à chaque étape suivant si celle-ci a une influence ou non sur le processus métabolique étudié. Plus une case est colorée en rouge, plus les valeurs sont négatives et donc plus cette étape a un impact négatif sur l'entrée/sortie des métabolites. À l'inverse, plus une case est colorée en vert, plus les valeurs sont positives et donc plus cette étape a un impact positif. On constate également que la somme des coefficients de contrôle exercés par toutes les étapes est égale à un.

On détermine ensuite les étapes qui contrôlent de manière significative les différents flux de sortie. Sont considérés comme significatifs les étages ayant un coefficient C supérieur à 0.2 ou inférieur à -0.2.

5.1 Flux de synthèse de malate

Concernant les étapes ayant un impact **positif**, on trouve :

- le phosphoglycérate avec une valeur de 0.179
- la phosphoenol pyruvate carboxylase avec une valeur de 1.029
- la malate déshydrogénase avec une valeur de 0.999
- la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase avec une valeur de 0.48
- la glucose-6-phosphate déshydrogénase avec une valeur de 0.46
- l'entrée de glucose avec une valeur de 1.87

Concernant les étapes ayant un impact **négatif**, on trouve :

- la pyruvate kinase avec une valeur de -0.37.
- la pyruvate déshydrogénase complexe avec une valeur de -1.027
- la citrate synthase avec une valeur de -2.02
- la phosphoglucomutase avec une valeur de -0.51
- l'UDP-glucose pyrophosphorylase avec une valeur de -0.18
- la synthèse de carbohydrate avec une valeur de -0.18

5.2 Flux de synthèse de citrate

Concernant les étapes ayant un impact **positif**, on trouve :

- la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase avec une valeur de 0.20
- l'ATP dépendant phosphofructokinase avec une valeur de 0.2
- la glucose-6-P déshydrogénase avec une valeur de 0.19
- l'entrée de glucose avec une valeur de 0.77

Concernant les étapes ayant un impact **négatif**, on trouve :

- la phosphoglucomutase avec une valeur de -0.21.

5.3 Flux de synthèse des carbohydrates

Concernant les étapes ayant un impact **positif**, on trouve :

- la phosphoglucomutase avec une valeur de 0.26
- l'entrée de glucose avec une valeur de 1.19

Concernant les étapes ayant un impact **négatif**, on trouve :

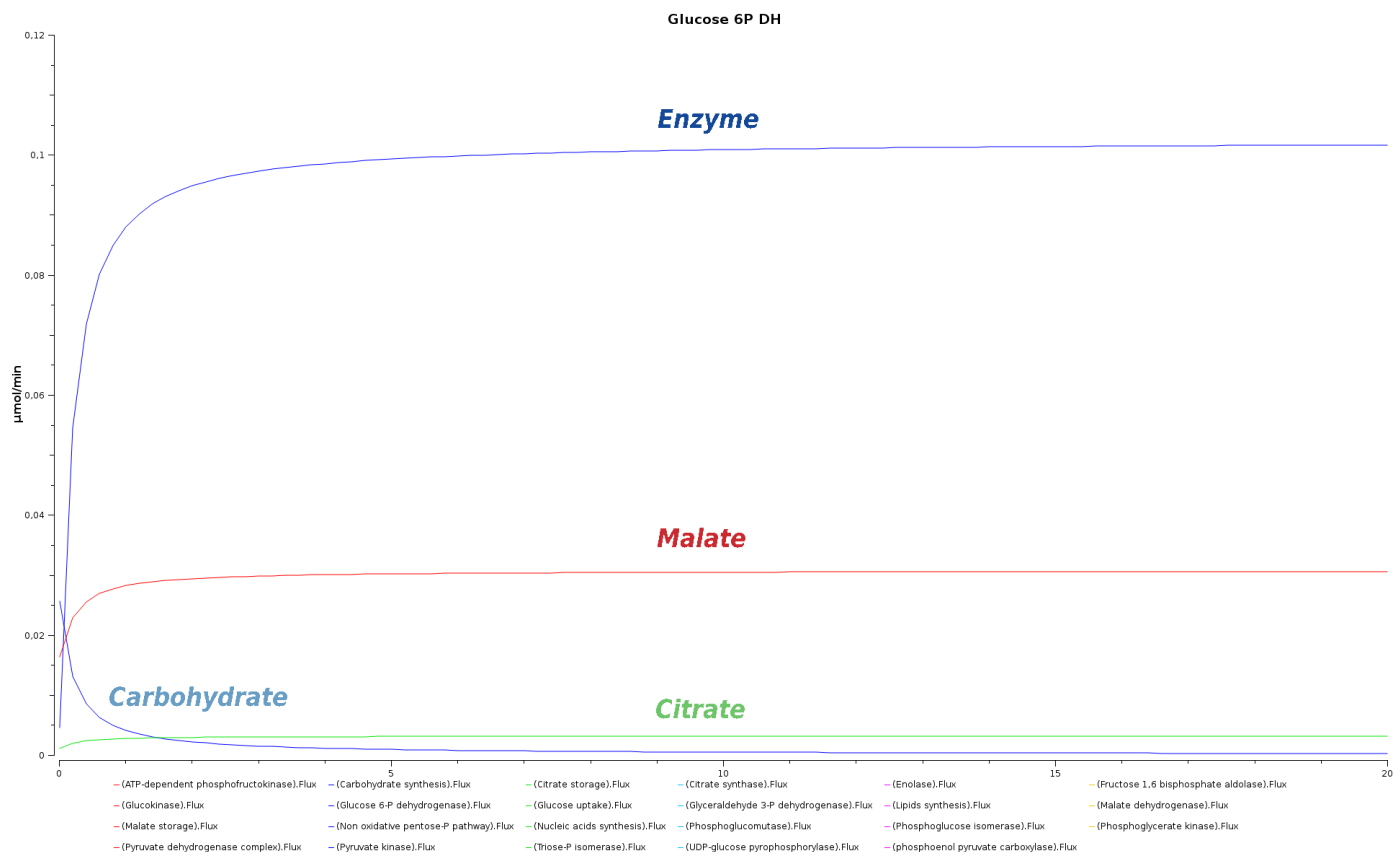
- la glucose-6-P-déshydrogénase avec une valeur de -0.21.

Il serait intéressant en terme de manipulations génétiques d'augmenter ou de diminuer la synthèse des enzymes qui régulent les étapes importantes du métabolisme. Ceci permettrait d'augmenter un ou plusieurs des flux afin d'en étudier leur régulation. Il est possible d'augmenter à la fois plusieurs de ces flux en augmentant la quantité d'une enzyme commune à plusieurs flux. Par exemple la concentration de glucose-6-phosphate-déshydrogénase, enzyme ayant un impact positif sur le flux de citrate et de malate.

6 Résultats expérience In-Silico

Nous avons testé l'influence de deux enzymes sur les flux de sortie : la PEP carboxylase et la pyruvate kinase. Ce sont des enzymes très impliqués dans notre réseau. Étant donné que nous avons déjà au préalable défini l'impact de ces enzymes sur les flux, nous devons normalement retrouver via les expériences in-silico des tendances de courbes similaires à nos prévisions.

6.1 Influence de la glucose-6-phospho-deshydrogénase



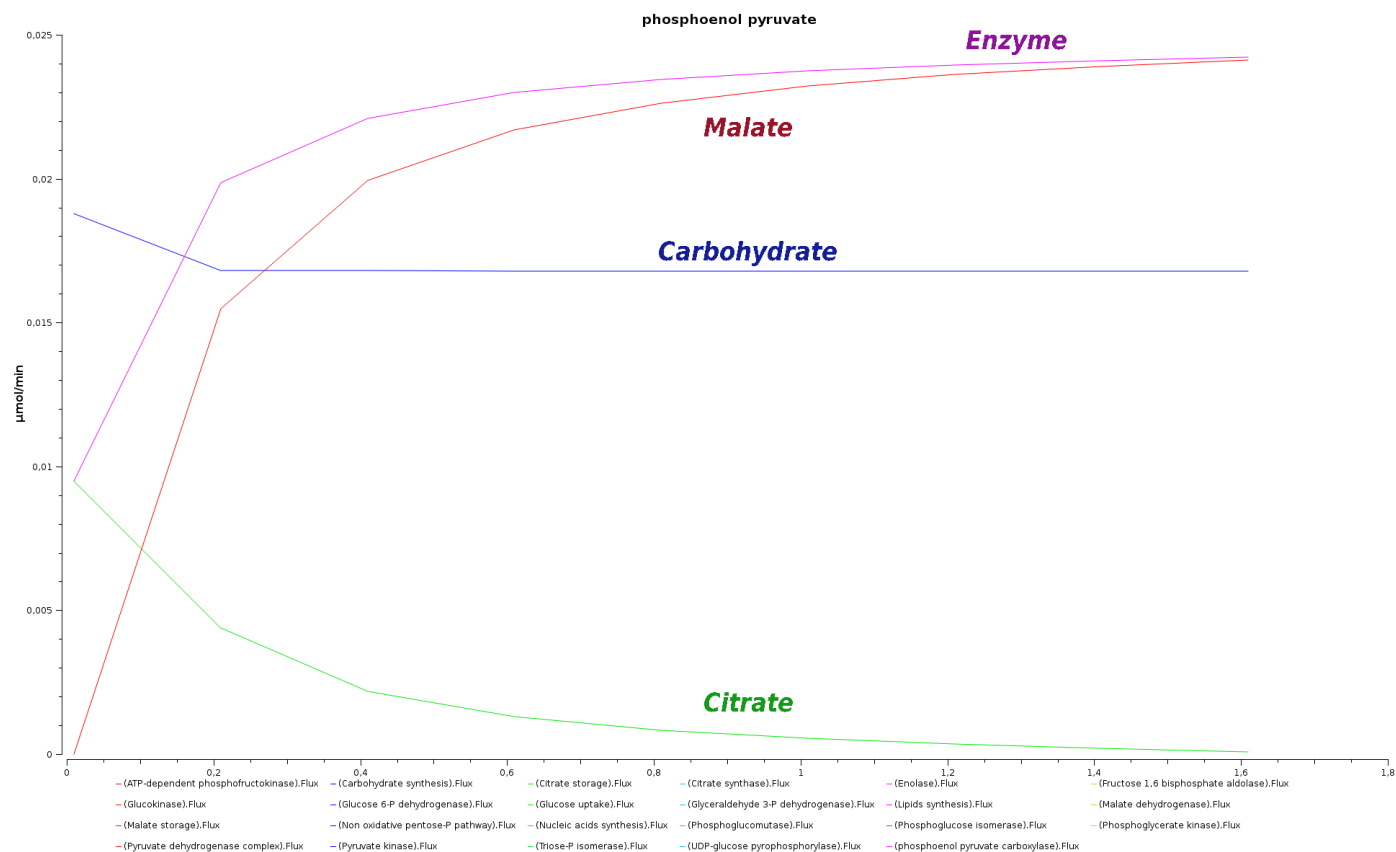
On constate que plus la concentration de Glc-6-PDH (courbe bleu supérieur) augmente

— plus le flux de malate (courbe rouge) augmente. Ceci correspond à nos attentes car nous avons établis que cette enzyme avait un effet positif sur le flux de malate.

— plus le flux en carbohydrate diminue (courbe bleu inférieur) augmente. Ceci correspond à nos attentes car nous avons établis que cette enzyme avait un effet négatif sur le flux de carbohydrate.

La courbe représentant le flux citrate augmente également car dépendante de cet enzyme mais l'augmentation est plus modérée que pour le malate. Ceci est justifié par l'écart entre les valeurs des deux flux (malate : 0.46 et citrate : 0.19). La glc6PDH a donc bien une plus grande influence sur le malate que le citrate.

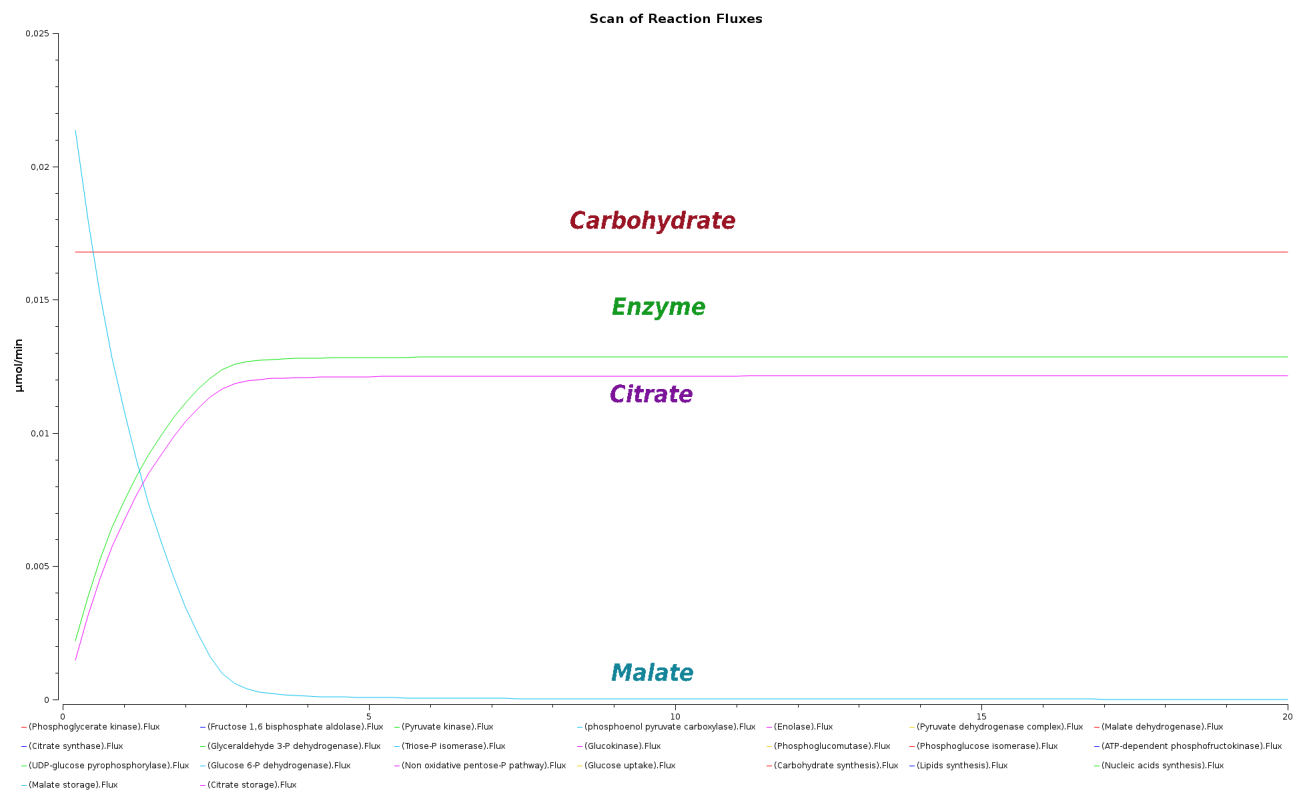
6.2 Influence de la PEP Carboxilase



On constate que plus la concentration de PEP-carboxylase (courbe violette) augmente

- plus le flux de malate (courbe rouge) augmente. Ceci correspond à nos attentes car nous avons établis que cette enzyme avait un effet positif sur le flux de malate.
- plus le flux en malate diminue (courbe verte) .Ceci ne correspond à nos attentes car nous avons établis que cette enzyme avait un effet négatif sur le flux du malate.
- plus le flux en carbohydrate diminue (courbe bleu) .Ceci correspond à nos attentes car nous avons établis que cette enzyme avait un effet négatif sur le flux des carbohydrate.

6.3 Influence de la glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogenase



On constate que plus la concentration de glycéraldéhyde-3-phosphate deshydrogenase (courbe verte) augmente

- plus le flux de citrate (courbe violette) augmente. Ceci correspond à nos attentes car nous avons établis que cette enzyme avait un effet positif sur le flux de citrate. L'augmentation est très importante ce qui est en adéquation avec la valeur récupéré plus haut (1.029).
- plus le flux du stockage du malate diminue (courbe verte)

La courbe des carbohydrate reste inchangé soulignant que l'enzyme n'a pas ou très peu d'effet sur ce flux.

7 Sensitivité

La sensibilité est un module présente dans le logiciel Copasi permettant de connaître qu'elle sont les enzymes influençant le réseau métabolique. De la même manière que les coefficients de contrôle, une case coloré en vert ou rouge indique que l'enzyme correspondante à un effet plus ou moins important dans les différentes réactions. De plus, dans le cas de la sensibilité, plus une case est coloré plus cela indique que l'enzyme à influencé ces dernières.

Sensitivities Result				
unscaled scaled summarized				
Rows (effect) Target functions, Concentration Fluxes of Reactions				
Columns (cause) Variables 1, All Parameter Values				
	(Phosphoglucumutase).Vmax	(Phosphoglucumutase).Keq	(Phosphoglucumutase).Kms	(Phosphoglucumutase).Kmp
(Phosphoglycerate ki...	-0,00294898	0,00043443	0,00506953	-0,00168557
(Fructose 1,6 bisphos...	-0,000426351	6,28007e-05	0,000732867	-0,000243685
(Pyruvate kinase).Flux	-0,00147445	0,000217209	0,00253469	-0,000842759
(phosphoenol pyruva...	-0,00147453	0,000217222	0,00253484	-0,000842808
(Enolase).Flux	-0,00294898	0,00043443	0,00506953	-0,00168557
(Pyruvate dehydroge...	-0,00147445	0,000217209	0,00253469	-0,000842759
(Malate dehydrogena...	-8,67142e-08	1,27832e-08	1,49145e-07	-4,95723e-08
(Citrate synthase).Flux	-0,00147445	0,000217209	0,00253469	-0,000842759
(Glyceraldehyde 3-P ...	-0,00294898	0,00043443	0,00506953	-0,00168557
(Triose-P isomerase)...	-0,000426351	6,28007e-05	0,000732867	-0,000243685
(Glucokinase).Flux	0	0	6,93889e-15	0
(Phosphoglucumutase...	-0,00252263	0,00037163	0,00433666	-0,00144188
(Phosphoglucose iso...	-0,00376621	0,000554857	0,00647472	-0,00215271
(ATP-dependent pho...	-0,000426351	6,28007e-05	0,000732867	-0,000243685
(UDP-glucose pyroph...	-0,00252263	0,00037163	0,00433666	-0,00144188
(Glucose 6-P dehydro...	-0,00628884	0,000926487	0,0108114	-0,00359459
(Non oxidative pento...	-0,00209628	0,000308829	0,00360379	-0,0011982

Dans ce tableau, pour chaque enzyme sont regroupés les différents valeurs des KM, des Keq, des KMS et des Vmax. Pour illustrer la sensibilité, nous avons choisis de prendre la phosphoglucumutase. On constate que toutes les cases sont très colorées montrant ainsi que le réseau est très sensible aux valeurs des constantes de cette enzyme.

Les valeurs des constantes ont été attribuées au début de l'analyse de manière arbitraire, ce qui a pu causer cette forte sensibilité. Il faut donc attribuer à chaque enzymes des valeurs spécifiques afin d'obtenir une sensibilité moins importante.

8 Conclusion

Nous avons réussi à implémenter notre réseau métabolique en y incluant les 3 flux d'intérêt(malate, citrate et carbohydate). Pour chaque métabolite du réseau, une équation différentielle à été établi permettant de modéliser la variation de leur quantités au fil du temps. La résolution de ce système d'équations différentielles a permis de quantifier les flux à l'état stationnaire.

Nous avons ensuite observer l'influence de plusieurs enzymes sur les flux du malate, du citrate et des carbohydates. Nous avons pu ainsi déterminer que les enzymes ayant le plus d'influence sur le stockage du malate sont la PEPc(positivement) et la PDH(négativement). De meme pour le citrate avec l'enzymes G3P(+) et PGM(-). Et les enzymes PGM(+) et G6PDH(-) pour les carbohydates.

Enfin, par le biais d'expérience In-Silico, nous avons pu faire varier les paramètres expérimentaux afin d'observer les variations sur notre modèle.