

Titre: Modélisation métabolique pour l'étude des voies de régulation
énergétiques : un enjeu dans la maladie de Parkinson

Auteur: Pierre Olivier Poliquin
Author:

Date: 2012

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Poliquin, P. O. (2012). Modélisation métabolique pour l'étude des voies de
régulation énergétiques : un enjeu dans la maladie de Parkinson [Master's thesis,
École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/1057/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/1057/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Mario Jolicoeur, & Mathieu Cloutier
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**MODÉLISATION MÉTABOLIQUE POUR L'ÉTUDE DES VOIES DE
RÉGULATION ÉNERGÉTIQUES : UN ENJEU DANS
LA MALADIE DE PARKINSON**

PIERRE OLIVIER POLIQUIN

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES

(GÉNIE CHIMIQUE)

DÉCEMBRE 2012

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

MODÉLISATION MÉTABOLIQUE POUR L'ÉTUDE DES VOIES DE RÉGULATION
ÉNERGÉTIQUES : UN ENJEU DANS LA MALADIE DE PARKINSON

présenté par : POLIQUEIN, Pierre Olivier

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. VIRGILIO, Nick, Ph. D., président

M. JOLICOEUR, Mario, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. CLOUTIER, Mathieu, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. PERRIER, Michel, Ph. D., membre

DÉDICACE

À Sylvie – de l'autre côté de la clôture

REMERCIEMENTS

À Andrée pour ton soutien, ta patience et puis ton empressement;

À François pour tes encouragements et conseils;

À Mario pour m'avoir permis d'innover et me projeter;

À Mathieu pour ton ambition et enthousiasme;

À Michel pour nos discussions;

À Peter pour ta vision et sagesse;

À André pour ta rigueur et ton fou;

À mes enseignants pour leur vocation;

À mes amis;

À mes confrères de Polytechnique, de BIOP2 et de l'UDM, aux professeurs, aux techniciens, et au personnel de soutien dont:

Alexandre, Anne, Anne-Marie, Atefeh, Benoit, Carol, Chantal, Chantal, Charles, Cyril, Damiana, Daniel, Étienne, Éric, François, Frédéric, Gino, Gregory, Huguette, Ines, Jean, Jingkui, Lionel, Louis, Louise, Louise, Louis-Éric, Madeleine, Martine, Massinissa, Marie-Josée, Mourad, Nick, Olivier, Pascal, Patrice, Robert, Roxane, Samantha, Xavier, Yuan, Yoann, Zahra

pour votre collaboration et surtout vos sourires.

RÉSUMÉ

La motivation de ce mémoire est l'étude des processus de régulation énergétique impliqués dans la maladie de Parkinson. Profitant du savoir-faire de développement d'outils pour l'analyse du métabolisme cellulaire, un modèle d'équations différentielles pour simulations dynamiques fut premièrement établi grâce à la littérature sur les voies et les cinétiques des flux métaboliques.

Une plateforme d'expérience utilisant une source d'éléments biologiques primaires fut choisie puisqu'elle offre des avantages importants tels que son risque faible de biais biologique. Suivant la création et l'adaptation spécifiques de protocoles visant l'analyse de concentrations de molécules biologiquement actives, des expériences sur des extraits de tranches de cerveau de souris modifiées génétiquement ou affectées temporairement d'un découplage mitochondrial, furent réalisées entres autres grâce à la collaboration de professeur L-É. Trudeau de l'Université de Montréal, du département de pharmacologie.

Grâce aux analyses métabolomiques par chromatographie en phase liquide suivie de spectroscopie de masse et la mesure de concentrations de molécules de l'environnement extracellulaire, il fut possible d'adapter les voies métaboliques du modèle et de calibrer ce dernier en ajustant ses paramètres, afin de reproduire les comportements dynamiques du tissu cérébral.

Grâce à des simulations, il fut possible de décrire entre autre des flux réactionnels non mesurables, provenant de réponses cellulaires des tranches de cerveau d'individus ayant subi l'extinction d'un gène impliqué dans la maladie de Parkinson (*PARK 2*) ou d'individus sains à qui l'ajout d'un ionophore mitochondrial (CCCP) a été prodigué.

Ainsi, par analyse comparative face à l'organisme inaffecté, il fut possible d'énoncer qu'une exposition à un agent de stress environnemental peut causer une diminution marquée et soutenue des navettes énergétiques assurant le bon fonctionnement de la cellule. De plus, il fut possible de démontrer que dans le test de stress de type génétique, les processus de régulation métabolique sont suffisamment robustes pour empêcher des changements au niveau des métabolites. En effet, grâce aux simulations, il fut possible de constater que des mécanismes d'adaptation des voies métaboliques et des flux enzymatiques existent.

L'accomplissement final des travaux est leur soumission pour publication dans un journal scientifique avec comité de révision : *Public Library of Science, Computational Biology*.

ABSTRACT

This project's main objective is to study the implications of energy regulated pathways in Parkinson's Disease. As a first step, this goal is achieved by the development of a literature based ODE model as a cellular metabolism analysis tool.

Development of various experimental platforms revealed that extraction, perturbation and analysis of fresh brain tissue slices had less measurement bias. After new protocol development or adaptation, metabolomic extracts and analysis resulted in measurements of PD related gene knock-out and mitochondrial decoupling pulse stress. This was performed on a mice model provided through collaboration with Professor Trudeau of the Université de Montréal, department of pharmacology. These UPLCMS and extracellular data were used to adapt and calibrate the original ODE model and curve fit the observed dynamics.

By comparing the different variations of the measurement corroborated model, it was possible to describe the variations of unmeasured cellular process involved in the mitochondrial CCCP-ionophore and *PARK-2* gene knock-out stresses. While a strong effect is observed following the CCCP stress as the energetic level decreases drastically, no effect is observed for the genetic PD model from a metabolite concentration point of view. In fact, it is only by simulations' flux analysis that one can realise that this is possible as the cell performed naturally a rebalancing of fluxes, suggesting a robust energy regulation.

As a final achievement, this work was submitted for publication in a peer reviewed scientific journal: *Public Library of Science, Computational Biology*.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT	VI
TABLE DES MATIÈRES	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES FIGURES.....	XII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XIII
LISTE DES ANNEXES.....	XVIII
AVANT-PROPOS	XIX
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique et hypothèse	1
1.2 Objectif général	2
1.3 Méthodologie et organisation.....	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	3
2.1 Maladie de Parkinson	4
2.1.1 De la société aux corps d'inclusion cellulaire	5
2.1.2 Les facteurs de risque.....	5
2.1.3 Métabolisme de l' α -synucléine et les corps de Lewy	8
2.1.4 Les zones cérébrales touchées.....	9
2.2 Métabolisme cellulaire	10
2.2.1 Survol cellulaire	11
2.2.2 Variations phénotypiques.....	12
2.2.3 Métabolisme cellulaire	13
2.2.4 Métabolisme énergétique	14
2.2.5 Métabolisme central	16

2.2.6	Métabolisme périphérique et spécifique	23
2.2.7	Régulation métaboliques	29
2.3	Modèle in-silico du métabolisme	36
2.3.1	État des lieux en modélisation.....	37
2.3.2	Modélisation statique des flux métaboliques	38
2.3.3	Modélisation dynamique du métabolisme.....	38
2.3.4	Outils de modélisation et d'analyse	41
2.4	Approche système	42
2.5	Objectifs spécifiques	43
CHAPITRE 3	MÉTHODOLOGIE.....	43
3.1	Plan expérimental.....	44
3.1.1	Expériences sur les tranches de cerveau	45
3.1.2	Modèle génétique	45
3.1.3	Modèle toxicologique.....	46
3.2	Dissection de l'animal et tranches de cerveau	46
3.2.1	Préparation du milieu de survie.....	47
3.3	Préparation de l'extrait	47
3.3.1	Homogénéisation des tranches	48
3.3.2	Extraction de l'échantillon	48
3.4	Quantification des nucléotides	49
3.5	Quantification des sucres phosphatés et des acides organiques	49
3.5.1	Notes sur la quantification LCMS.....	50
3.6	Quantification des espèces extracellulaires.....	50

CHAPITRE 4	METABOLOMICS AND IN-SILICO ANALYSIS REVEAL CRITICAL ENERGY DEREGLATIONS IN ANIMAL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE	51
4.1	Présentation de l'article « <i>Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease</i> »	51
4.2	Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease	52
4.3	Abstract	53
4.4	Keywords	53
4.5	Introduction	53
4.5.1	Background and energy deregulation in PD	53
4.5.2	Environmental toxins	54
4.5.3	Genetic causes	54
4.5.4	Aging	54
4.5.5	Approach and models	55
4.5.6	Layout of the article	56
4.6	Methods and models	57
4.6.1	Experimental methods	57
4.6.2	Models	61
4.7	Results and discussion	66
4.7.1	Exposure to toxins induce severe energy deregulation	67
4.7.2	Energy robustness under genetic perturbation condition	71
4.8	Conclusions	74
4.9	Acknowledgments	75
4.10	Supplementary material	75

4.11	References	83
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE	86
CONCLUSION		87
RECOMMANDATIONS		88
BIBLIOGRAPHIE		89
ANNEXES		99

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Dénominations et abréviations des ribonucléotides	15
Tableau 2 : Signification des variables et paramètres de l'Équation 1	31
Tableau 3 : Signification des variables et paramètres de l'Équation 2	32
Tableau 4 : Modèles cinétiques à deux paramètres.....	33
Tableau 5 : Modèles cinétiques à plus de deux paramètres	34
Tableau 6 : Signification des variables et paramètres utilisés dans le Tableau 4 et le Tableau 5 ..	34
Tableau 7 : Résumé des objectifs de modélisation de procédés d'un point de vue médical.....	37
Tableau 8 : Description des symboles utilisés l'Équation 3.....	37
Tableau 9 : Composition de l'ACSF.	47
Tableau 10 : State ODE description (sum of fluxes)	75
Tableau 11 : Fluxes' description	76
Tableau 12 : Description of fluxes' functions	79
Tableau 13 : Données expérimentales.....	151
Tableau 14 : Données simulées	156

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du cerveau humain	9
Figure 1 : Structure d'une cellule animale	11
Figure 2 : Schéma de la glycolyse.....	17
Figure 3 : Schéma du cycle des acides tricarboxyliques	19
Figure 4 : Schéma de la voie des pentoses phosphates	20
Figure 5 : Variation d'énergie des molécules impliquées dans le transport d'électrons de la PhOx.....	21
Figure 6 : Schéma de la phosphorylation oxydative	22
Figure 7 : Schéma de la voie cyclique de glutamate et glutamine	28
Figure 8 : Schématisation de contrôle en modélisation.....	37
Figure 11 : Energy metabolism model for the cerebral tissue.....	62
Figure 12: Effect of toxin exposure on energy dynamics	68
Figure 13 : Basal marker for WT and CCCP stressed models	69
Figure 14: Effect of genetic perturbation condition on energy dynamics.....	72
Figure 15: Comparison of fluxes and ratios	73

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Composés

2PG	2-phosphoglycérate
3PG	3-phosphoglycérate
ACA	Acétyl CoA
AKG	α -ketoglutarate
AMP / ADP / ATP	Adénosine mono / di / tri phosphate
ANP / ANPs	Adénosine phosphate / en état stressé
cAMP	Adénosine monophosphate cyclique
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CIT	Citrate
CMP / CDP / CTP	Cytidine mono / di / tri phosphate
CoA	Coenzyme A
Cr / PCr	Créatine / P-créatine
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DPG	1,3-diphosphoglycérate
F6P	Fructose-6-phosphateP
FBP	Fructose-biphosphate-P
G3P	Glycéraldéhyde-3-phosphate-P
G6P	Glucose-6-phosphate
GLC	Glucose
GLN	Glutamine
GLT	Glutamate
GLY	Glycogène
GMP / GDP / GTP	Guanosine mono / di / tri phosphate
IMP / IDP / ITP	Inosine mono / di / tri phosphate
LAC	Lactate
NAD (NADH)	Nicotinamide adénine dinucléotide (réduit)
NADP (NADPH)	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (réduit)
O ₂	Oxygène
P	Phosphate

PEP	Phosphoénolpyruvate
PYR	Pyruvate
R5P	Ribulose-5-phosphate
Ro5P	Ribose-5-phosphate
TMP / TDP / TTP	Thymidine mono / di / tri phosphate
UMP / UDP / UTP	Uridine mono / di / tri phosphate
XMP / XDP / XTP	Xanthosine mono / di / tri phosphate

Indices

X _e	Composé « X » extracellulaire
----------------	-------------------------------

Enzymes et flux

AK	Adénylate kinase
ATPase	Processus de consommation d'ATP
CDH	Citrate déshydrogénase
CK	Créatine kinase
CS	Citrate synthase
DESTRESS	Recouvrement du stress du métabolisme énergétique
FAI	Fructose-6-phosphate aldolase et isomérase
FBP	Fructose bi-phosphatase
FH	Fumarate hydrogénase
G6D	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GNS	Glutamine synthase
GTD	Glutamate déshydronénase
GYP	Glycogène phosphorylase
GYS	Glycogène synthase
HK	Glucose hexokinase
ISO	Glucose-6-phosphate isomérase
KDH	α -ketoglutarate déshydrogénase
LDH	Lactate déshydrogénase
LEAK	Fuites mitochondriales
MDH	Malate deshydrogenase
OP	Phosphorylation oxydative

OS	Stress oxydatif
PC	Pyruvate carboxylase
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PFK	Phosphofructokinase
PGK	Phosphoglyceraldéhyde kinase
GAPDH	Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
ENO	Phosphopyruvate hydratase (énolase)
FDA	Fructose-diphosphate aldolase
TPI	Triose-phosphate isomérase
PGM	Phosphoglycérate mutase
PK	Pyruvate kinase
PPP	<i>Pentose phosphate pathway</i> (voies des pentoses phosphatés)
SDH	Succinate deshydrogénase
STRESS	Stress du métabolisme énergétique

Bases et indices

C_i	Concentration par évaporation du composé « i »
T_i	Transport transmembranaire du composé « i »
V_i	Réaction catalysée par l'enzyme « i »
X_T	Quantité totale des composé dérivés « X »

Paramètres usuels

$A_{p\ i}$	Amplitude de la perturbation sur le flux « i »
$F_{p\ on\ i}$	Rapidité de perturbation d'action / d'arrêt sur le flux « i »
$K_{i\ f} / K_{i\ r}$	Constante de masse du flux « i » (sens - <i>forward</i> / anti-sens - <i>reverse</i>)
$K_{m\ i\ j}$	Constante de type MM de l'enzyme « i » pour le composé « j »
$n_{i\ j}$	Coefficient stœchiométrique du composé « j » pour le flux « i »
$T_{p\ on\ i} / T_{p\ off\ i}$	Temps d'action / d'arrêt de la perturbation sur le flux « i »
$V_{max\ i}$	Valeur maximale du flux « i »

Symboles

Barre oblique (/)	Note une liste d'items semblables
Circonflexe (X^i)	« X » est à la puissance « i »

dX/dt	Équation différentielle temporelle du composé « X »
Ratio (X/Y)	Ratio de « X » sur « Y »
Tiret bas (X _i)	Annonce que le terme « i » est l'indice de « X »
$\alpha / \beta / \gamma$	1 ^{er} / 2 ^e / 3 ^e phosphate proximal lié à la molécule d'adénosine

Cinétiques

HILL	Cinétique d'activation ou d'inhibition de type Hill
MM (H.M.M.)	Cinétique de type Michaelis-Menten (Henri-Michaelis-Menten)
PMM	Cinétique de puissance de type Michaelis-Menten
Pulse	Cinétique de perturbation créneau adouci
Ratio	Ratio pondérant le flux concerné
RMM	Cinétique réversible de type Michaelis-Menten
Switch	Cinétique d'activation ou d'inhibition par changement d'état graduel
TMM	Cinétique de transport de type Michaelis-Menten

Extensions

X.m	Fichier exécutable de MATLAB
X.mat	Fichier d'espace mathématique de MATLAB

Acronymes

BIOCYC	Base de données internet de type ontologique (Biology Cyc)
BRENDA	Base de données internet (BRaunschweig ENzyme DAtabase)
CCCP	Cyanure de carbonyle m-chlorophénylhydrazone
EC#	Classification enzymatique de la « Commission des enzymes »
HPLCMS / UPLCMS	LCMS à haute pression / ultra-haute pression
LB / LBs	Corps de Lewy (Lewy Body / Bodies)
LCMS	Chromatographie liquide suivie de spectrométrie de masse (Liquid Chromatography, Mass Spectromerty)
MATLAB®	Logiciel appartenant à Matworks
Matlab	Langage de programmation (Matrix laboratory)
MCL	Système meso-cortico-limbique
MP	Maladie de Parkinson
MPTP	1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine

Nss	Système nigrostrié
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
SBPD	Boite à outils pour MATLAB (Systems Biology Project Design)
SBT2	Boite à outils pour MATLAB (Systems Biology Toolbox 2)
SNC / SNP	Système nerveux central / périphérique
SNCA ou α -syn	Alpha-synucléine
SNpc	Substance noire partiellement compactée
UPP	Voie de dégradation de protéines par le protéasome suit à l'ubiquitination (Ubiquitine-Proteasome Pathway)
VTa	Aire tegmentale ventrale (Ventral tegmental area)

LISTE DES ANNEXES

A	GÉNÉTIQUE DE LA MALADIE DE PARKINSON	101
B	STRUCTURE CHIMIQUE DE COMPOSÉS MENANT À LA MP ET MOLÉCULES SIMILAIRES	102
C	MÉTABOLISME DE L'A-SYNUCLÉINE ET DES CORPS DE LEWY	103
D	VOIES RÉACTIONNELLES IMPLIQUANT LA DOPAMINE	109
E	LES EFFETS, SYMPTÔMES ET DIAGNOSTIQUE	110
F	TRAITEMENTS ET PALLIATIFS	112
G	RÔLES DES NAVETTES ÉNERGÉTIQUES NUCLÉOTIDIQUES	114
H	COMMISSION DES ENZYMES	118
I	REPRÉSENTATION DES STRUCTURES PROTÉIQUES	119
J	PRÉSENTATION DES TRAVAUX : AFFICHES.....	121
K	PRÉSENTATIONS DES TRAVAUX : DIAPORAMAS.....	148
L	DONNÉES EXPÉRIMENTALES	151
M	DONNÉES SIMULÉES	156

AVANT-PROPOS

On peut remonter jusqu'au mésolithique, soit il y a environ 7 000 ans, pour trouver des preuves de la trépanation parmi les formes primitives de chirurgie. Elle n'était pas effectuée pour immoler, mais comme une intervention *guérissante*. Que ce soit pour libérer les mauvais esprits ou pour ouvrir la voie du troisième œil, la chirurgie réalisée autrefois avec un silex était pratiquée sur les sujets victimes de fractures crâniennes, de convulsions, ou encore de troubles mentaux. Même si l'on doit supposer une compréhension limitée des diverses fonctions du cerveau, il n'en reste pas moins, comme l'enseignent les historiens, que cette intervention était le premier signe que les hominidés considéraient le cerveau comme un organe vital.

Dans la Grèce antique, de nombreuses théories sur le rôle du cerveau furent élaborées par Hippocrate, Aristote et d'autres. Subséquemment, sous l'Empire romain, les connaissances du système nerveux se sont élargies grâce aux observations de Galien, médecin de gladiateur, qui a constaté les effets de différentes blessures sur les capacités de l'homme. Sa théorie se basait sur l'importance des quatre humeurs et considérait entre autres erreurs, que les nerfs étaient des canaux analogues aux vaisseaux sanguins.

Il faut ensuite attendre la Renaissance pour voir apparaître quelques théories qui seront éventuellement rejetées par les scientifiques du XVII^e siècle. Ces derniers se sont davantage intéressés à la matière elle-même, la divisant en deux substances (blanche et grise), ainsi qu'à ses différentes structures anatomiques reliées aux diverses fonctions du corps.

C'est au XVIII^e siècle que l'on propose l'existence de différents lobes cérébraux ayant différentes fonctions, ainsi que le rôle des nerfs assurant le transit de l'information entre ces sous-régions et le corps. Toutefois ce n'est qu'à compter du XIX^e siècle que les connaissances sur le système nerveux progressent réellement : on reconnaît que le système nerveux est électrique, qu'il est effectivement constitué de lobes fonctionnels spécifiques, qu'il est le fruit de l'évolution et que son unité constituante fondamentale est le neurone.

Au XX-XXI^e siècles, la somme des connaissances sur le système nerveux s'accroîtra de façon considérable. L'intervention neurochirurgicale est devenue un domaine spécifique d'expertise. On a écrit des articles, ouvrages et manuels sur le sujet. C'est un domaine où la recherche a explosé et continue de prendre de l'importance. Les études sur le cerveau humain se poursuivent en faisant

appel à une approche multidisciplinaire et en mettant à profit les plus récents acquis des différents domaines de recherche.

Malgré que l'époque, les moyens et les outils aient changé au fil des siècles, le moteur de tous les questionnements est resté le même : la curiosité et le désir de comprendre. C'est avec cette même curiosité et ce même désir qu'est rédigé le présent mémoire, espérant pouvoir ajouter une contribution utile à la compréhension du fonctionnement du cerveau humain.

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Au lendemain de la seconde guerre mondiale, le boom démographique a permis aux sociétés de se relever de la catastrophe. La pyramide démographique s'en est trouvée affectée et maintenant, quelques soixante ans plus tard, vient s'ajouter un nouveau facteur, celui du vieillissement de la population. En effet, grâce entre autres aux progrès de la science, on a réussi à allonger l'espérance de vie. Ces facteurs combinés font en sorte que le pourcentage de décès par maladies gériatriques augmente. Cette augmentation de la population gériatrique fait naître une nouvelle demande d'outils thérapeutiques dont la faisabilité semble acquise eut égard à la croissance phénoménale des nouveaux moyens technologiques. Pour combler ces besoins et ces attentes, la recherche se préoccupe davantage des affections des personnes âgées et tente de fournir des outils d'intervention.

Dans le cadre de la présente étude, nous nous pencherons sur une de ces affections : la maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson (MP) est une affection neurodégénérative pernicieuse affaiblissant graduellement les habiletés cognitives et motrices d'approximativement 1% des personnes de plus de 50 ans. Les facteurs biologiques et physiologiques à la base de cette maladie étant dorénavant mieux identifiés, des études plus spécifiques sont maintenant possibles et le métabolisme énergétique est considéré comme un facteur méritant une telle attention.

1.1 Problématique et hypothèse

Le métabolisme énergétique de toute cellule lui permet sa fonction et son maintien. Les mécanismes de consommation et de production d'énergie sont régis par des processus enzymatiques complexes étroitement liés à la gestion de métabolites primaires et secondaires. Alors que certains processus sont connus, la compréhension globale du métabolisme énergétique cellulaire requiert encore beaucoup de recherche.

L'hypothèse globale du projet est que les processus de régulation énergétiques jouent un rôle clé dans l'apparition et la progression de la MP, et qu'il sera possible d'étudier ces processus à l'aide d'une plateforme *in silico*, développée et validée par un ensemble de mesures extracellulaires et

intracellulaires à partir d'extraits de cerveau de souris. Par plateforme *in silico*, on entend une modélisation des voies métaboliques combinant un système d'équations différentielles ordinaires.

Alors que la MP est cliniquement reconnue par l'observation des signes et symptômes soutenus provoqués par la mort d'environ 50 % des neurones dopaminergiques de la région du mésencéphale nommée *substantia nigra pars compacta* et la perte de 80 % de la dopamine du striatum (Marsden, 1990), les raisons de la mort de ces cellules ne sont pas clairement déterminées. L'agrégation protéique anormale de l'alpha-synucléine (α -syn) en corps d'inclusion intracellulaire, nommé corps de Lewy (LB), est un biomarqueur particulier des synucléopathies comme la MP (Foulds, Mann, Mitchell, & Allsop, 2010). Malgré qu'ils ne soient pas entièrement décryptés, les processus de gestion de l' α -syn (production, utilisation, mutation, agrégation et dégradation) sont suffisamment connus pour en comprendre les effets globaux sur le métabolisme cellulaire (Uversky, 2007).

Étant donné que la population généralement affectée par la maladie de Parkinson subit les particularités liées au phénomène de vieillissement comme les carences énergétiques, le ralentissement enzymatique et la diminution de l'efficacité de ces dernières (Shringarpure & Davies, 2002; Stadtman, 2006), il sera pertinent d'étudier les implications de la régulation énergétique cellulaire comme étant une cause de l'apparition de la MP.

D'un point de vue où de petites irrégularités fréquentes perturberaient le système énergétique de manière éventuellement irréversible, il sera approprié d'étudier les dynamiques rapides du métabolisme à l'aide d'extraits de tissus vivant, afin d'obtenir des réponses dans une échelle de temps intéressante d'un point de vue expérimental (i.e. des heures au lieu d'années, voire de décennies). Conséquemment, une rationalisation des résultats par la modélisation des voies majeures du métabolisme énergétique permettra de combler certaines lacunes inhérentes à toute approche expérimentale, notamment en ce qui concerne l'extrapolation des résultats sur une échelle de temps plus grande.

1.2 Objectif général

Dans le but de faire progresser les connaissances sur les liens entre la MP et le métabolisme énergétique des cellules du cerveau, il a été jugé essentiel dans ces travaux de maîtrise d'effectuer une étude comparative des comportements métaboliques de cellules de cerveaux sains et

pathologiques. Des approches expérimentales, avec la quantification du métabolome dans le temps, et *in silico*, par la mise au point d'un modèle cinétique-métabolique, ont été sélectionnées. À plus long terme, les résultats de cette étude pourraient permettre d'améliorer notre compréhension des différences entre des comportements sains et pathologiques, et éventuellement pouvoir diagnostiquer de manière hâtive l'initiation de l'apparition de la maladie et d'identifier des cibles pour guider la recherche pharmaceutique.

1.3 Méthodologie et organisation

Le corps de ce mémoire est séparé en cinq (5) chapitres. Le Chapitre 2 présente une revue de littérature ; elle comporte trois (3) parties. Dans l'ordre, la première partie aborde la MP, la seconde partie effectue un survol du métabolisme cellulaire et la troisième partie expose les différents outils de modélisation métabolique développés à ce jour.

Ensuite, le Chapitre 3 expose les méthodologies importantes mises de l'avant au cours de la maîtrise. On expose d'abord les différentes plateformes expérimentales et analytiques couplées considérées, puis on dresse une méthodologie pour la conception de la plateforme *in silico* et sa calibration sur les données expérimentales.

Enfin, le Chapitre 4 présente le cœur du projet, soit un manuscrit présentant l'essentiel des résultats obtenus et analysés dans le cadre de cette maîtrise : « *Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease* ». Cet article a été soumis pour publication au journal « *PLOS Computational Biology* ».

Finalement, le Chapitre 5 offre un regard critique général sur ce mémoire.

Le présent document comporte aussi une conclusion suivie de recommandations et d'annexes où sont regroupées des informations complémentaires à la description des travaux réalisés.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans ce chapitre, une substruction est élaborée afin d'assurer la compréhension du sujet.

Ainsi, le contexte particulier de l'étude de la maladie de Parkinson sera exposé en premier lieu. La pathologie sera d'abord brièvement examinée aux niveaux social, individuel et cellulaire, puis les facteurs de risques seront présentés. Par la suite, la biochimie derrière la maladie sera discutée puis les zones cérébrales touchées seront aussi décrites.

Étant donné les implications métaboliques de la maladie, la physiologie cellulaire du type animal et ses variations phénotypiques seront d'abord explorées pour ensuite focaliser sur le métabolisme cellulaire, ses voies centrales et périphériques, et les régulations enzymatiques en vue d'explicitier leurs implications particulières pour le Parkinson.

Le métabolisme et ses régulations étant au centre de l'étude, leur modélisation par le biais d'une plateforme cybernétique sera présentée en troisième lieu. Les caractéristiques de la modélisation dynamique seront mises en lumière afin de montrer en quoi elle est intéressante pour le projet, autant d'un point de vue utilitaire actuel que de la portée éventuelle d'un tel modèle mathématique vers le diagnostic hâtif de la maladie de Parkinson.

Enfin, après la description de l'état de l'art dans ces différents domaines, l'approche système sera présentée et les objectifs spécifiques seront présentés.

2.1 Maladie de Parkinson

Un médecin de Londres, James Parkinson a écrit : « An Essay on the Shaking Palsy » (Parkinson, 1817) dans lequel il faisait état de symptômes visibles particuliers.

Malgré ces travaux hâtifs, ces symptômes ne furent associés à des modifications de certaines zones motrices du cerveau uniquement vers la fin du 19^e siècle, alors que le système nerveux était dorénavant mieux compris. La nomination effective fut grâce à Jean Martin Charcot qui utilisa le terme « Parkinson » une soixantaine d'années plus tard pour ses propres observations. Il constata aussi que les observations de J. Parkinson décrivaient en fait deux maladies distinctes : l'éponyme et la sclérose en plaques disséminée; il prit soin de différencier les deux pathologies (Charcot., 1880; Hafler, 2004; Illinois Homeopathic Medical Association, 1882).

Toutefois, tel que décrit par Abbott, il fallut attendre les années soixante et la publication des travaux de Arvid Carlsson portant sur la dopamine de la substance noire du cerveau avant de pouvoir poser des bases biochimiques aux symptômes¹, pour ensuite tenter de traiter les symptômes de la maladie de Parkinson avec une nouvelle molécule, la levodopa (L-dopa)

¹ Alors que la sécrétion d'acétylcholine provoque la contraction musculaire, la dopamine la réduit. Les symptômes de Parkinson apparaissent quand l'effet de la dopamine est inférieur à celle de l'acétylcholine.

(Abbott, 2007; Carlsson, Lindqvist, & Magnusson, 1957). Aujourd'hui, malgré les années de recherche effectuée sur la MP, la L-dopa est encore la substance qui a le plus haut taux de réussite et elle est la substance de référence pour contrer le Parkinson (Wellstead, 2008).

2.1.1 De la société aux corps d'inclusion cellulaire

Étant donné les différences en termes environnemental, culturel et industriel d'un pays à l'autre, une prévalence globale ou par genre est ardue à définir. Une revue étoffée de la prévalence est présentée sur le site web de Viartis (Viaris, 2009). Toutefois, certains avancent que la probabilité de développer au cours de sa vie cette maladie neurodégénérative est de l'ordre de 2% (Polymeropoulos et al., 1997). C'est la seconde maladie neurodégénérative la plus commune après l'Alzheimer, elle est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)², et elle est répertoriée dans le *Diagnostic and Statistical Manual – Revision 4* (DSM-IV)³. Elle touche de 1 à 2% des personnes de 65 ans et plus et augmente à près de 4% pour les personnes de plus de 85 ans (Nuytemans, Theuns, Cruts, & Van Broeckhoven, 2010). Enfin, des études de prévalence effectuées sur les pays les plus peuplés au monde rapporte que le nombre de personnes de plus de 50 ans était entre 4.1 et 4.6 millions en 2005, et doublera à environ entre 8.7 et 9.3 millions de personnes d'ici à 2030, ce qui démontre l'urgence de comprendre la maladie en profondeur (Dorsey et al., 2007). Il apparaît évident qu'avec la modification de la pyramide démographique, le nombre de cas rapportés ne peut qu'augmenter la charge sociale, médicale et économique pour la société.

2.1.2 Les facteurs de risque

Bien qu'il existe un bon nombre de causes identifiées pour la maladie de Parkinson, la majorité des personnes touchées souffrent d'un Parkinson idiopathique, soit pour lequel les causes ne sont

² La MP est reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé et répertoriée dans sa *Classification statistique internationale des maladies et des problèmes de santé connexes* (ICD-10-CM-332). (World Health Organization, 1993)

³ La démence liée à la maladie de Parkinson est classifiée dans le *DSM-IV*, publié par l'Association Américaine de psychiatrie, sous l'axe III : conditions médicale aiguë et désordre physique. Elle est aux côtés des maladies d'Alzheimer, d'Huntington et de Pick. (A.P.A., 2000)

pas connues. Or, pour les causes connues, elles regroupent principalement le patrimoine génétique de la personne et l'environnement dans lequel elle vit.

2.1.2.1 Causes génétiques

Bien que des mutations génétiques soient connues, rare sont les cas confirmés de type familial (~5%) (Dawson & Dawson, 2003; Fahn & Sulzer, 2004). Certaines recherches affirmant qu'il existe un lien clair entre le développement de la maladie et l'historique familial ne permettent de proposer des implications héréditaires qu'uniquement dans 15 à 20% du nombre total de cas répertoriés (Nuytemans et al., 2010). Enfin, selon plus d'une dizaine d'études, les membres d'une famille ayant un parent qui a développé la MP ont un risque de 3 à 14 fois plus élevé qu'une personne dont la famille au premier degré ne comporte pas de cas de personne atteinte (Pankratz et al., 2008). Ces cas héréditaires impliquent aussi des mutations génétiques qui peuvent sauter une génération.

Globalement, sept (7) gènes sont associés à l'apparition de la MP. Dans le document de Pankratz, Wojcieszek et Foroud, on retrouve ces gènes divisés en deux (2) sous-classes, en fonction de leur caractère héréditaire. Ces classes autosomaux dominants (PARK 1, 3, 5, 8) et récessifs (PARK 2, 6, 7) sont respectivement présentés aux tables de l'annexe A. Brièvement, les protéines produites par l'expression de ces gènes sont impliqués dans la neurotransmission (PARK 1), la reconnaissance de protéines à dégrader (PARK 2 et PARK 5), la production d'acides aminés importants pour la synthèse de la dopamine (PARK 3), gestion de période énergétiquement stressantes (PARK 6), gestion du stress oxydatif (PARK 7) et les interactions protéine-protéine et le cytosquelette (PARK 8) (National Library of Medicine, 2011).

Malgré le bas taux de Parkinson familial, un effort important est porté dans cette branche puisque les dysfonctions élucidées par ces études peuvent aussi se retrouver dans les cas apparemment idiopathiques. De plus, pour palier aux mécanismes affectés par ces mutations, la cellule puise pour chacune dans la même source d'énergie cellulaire, expliquant le risque métabolique accru.

2.1.2.2 Causes environnementales

Un milieu de vie toxique est aussi reconnu comme étant une cause d'apparition du parkinsonisme. En effet, les gens vivant à proximité de sources de toxines agricoles comme le Paraquat⁴ (herbicide), la Roténone⁵ (pesticide) et le Maneb⁶ (fongicide) développent les symptômes parkinsoniens spécifiques (Halbach, Schober, & Krieglstein, 2004). Ces toxines inhibent les complexes 1 (Paraquat et Rotenone) ou 3 (Maneb) de la respiration mitochondriale. Cette voie métabolique est décrite à la section 2.2.5.4.

Aussi des solvants comme le toluène et le n-hexane, et le disulfide de carbone, utilisé autant dans les solvants ou pesticides, sont depuis longtemps identifiées en tant qu'origine à la mort cellulaire par dommages mitochondriaux (Viartis, 2009).

Enfin, lors de la préparation erronée d'une drogue récréative (1-méthyl 4-phényl 4-propionoxypiperidine, MPPP⁷), il est possible de synthétiser par inadvertance du 1-méthyle 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine (MPTP⁸) qui mène en quelques jours à l'apparition de la MP (Fermaglich, 1996; Langston, Ballard, Tetrad, & Irwin, 1983; Miller, 2007).

Les structures chimiques de ces composés sont présentés en l'annexe B.

2.1.2.3 Les causes probables

D'autres facteurs comme les stress énergétiques, nutritionnels et autres, ou encore une combinaison de ces stress seraient vraisemblablement autant de causes vers l'apparition de la MP. Étant donné les besoins énergétiques important des neurones en vue d'assurer leurs fonctions, en cas d'inefficacités métaboliques ou de carence énergétique, ces dernières concentreront leur potentiel d'action hors des voies secondaires pour le rediriger davantage vers des voies essentielles à leur survie. D'ailleurs il semblerait que les neurones les moins efficaces (faiblement myélinisée) ou dont les besoins énergétiques sont majeurs (axones largement déployés) soient les

⁴ Paraquat : 1,1-diméthyl-4,4-bipyridinium; Maneb (Manganese ethylene-bis-dithiocarbamate)

⁵ Rotenone : 1,2,12,12a-tétrahydro-8,9-diméthoxy-2-(1-méthyléthényl)-(1) benzopyrano (2,4-b) furo (2,3-h) (1)-benzopyran-6 (6H)-one

⁶ Maneb : manganèse éthylène-1,2-bisdithiocarbamate

⁷ Le MPPP est une drogue opiacée analogue au mépéridine (Démérol) et à l'héroïne.

⁸ Les herbicide Paraquat et Cyperquat (MPP+) proviennent du MPTP.

plus touchées (Braak, Rüb, Gai, & Del Tredici, 2003). Aussi, des études nutritionnelles ont mis en lumière une relation entre les besoins trophiques des cellules et la neurodégénération (Wellstead, 2008).

Finalement, malgré l'identification de facteurs plausibles, pour la majorité des cas, la science actuelle ne permet pas d'établir de manière significative une causalité directe ; la maladie demeure généralement sporadique. Or, dans tous les cas de Parkinson, il semble que les facteurs sous-tendus permettent invariablement l'accumulation de protéines usées à des niveaux toxiques, menant à la mort cellulaire des neurones dopaminergiques situées dans le mésencéphale.

2.1.3 Métabolisme de l' α -synucléine et les corps de Lewy

Afin de comprendre les impacts métaboliques de l'agrégation de la protéine d'alpha-synucléine (α -syn), il est important de décrire ses voies de gestion. Les liens entre ses processus de formation, d'endommagement, de dégradation et d'agrégation, et le phénomène d'inhibition par les agrégats d'un processus important de dégradation de l' α -syn sont expliqués dans le document détaillé présenté à l'Annexe C afin de faire ressortir l'aspect dégénératif.

Un modèle métabolique cinétique de l'énergétique cellulaire et de la gestion protéique de l' α -syn vers entre autre l'agrégation et l'apparition des corps de Lewy (LB) a été mis au point lors d'un stage de recherche en Irlande au Hamilton Institute. Ces travaux réalisés grâce au financement de la *Science Foundation of Ireland* ont d'ailleurs été présentés à trois (3) conférences :

- 2nd International Workshop on Systems Biology :
 - Maynooth (Co.Kildare, Irlande) du 17 au 20 août 2008;
- 8th World Congress of Chemical Engineering :
 - Montréal (Québec, Canada) du 23 au 27 août 2009
- Foundations Of System's Biology Engineering 2009 :
 - Denver (Colorado, É.-U.A.) du 9 au 12 août 2009.

Alors que la description complète des voies de gestion de l' α -syn est présentée en annexe C, la description des travaux présentés à ces ateliers et congrès sont annexés en J.a, J.b et J.c.

2.1.4 Les zones cérébrales touchées

La majorité des neurones du système nerveux central (SNC) sécrétant de la dopamine en guise de neurotransmetteur proviennent tous du même site embryonnaire localisé dans la région médiale du cerveau, voir la Figure 1 (Arias-Carrión, 2010). Ces neurones mésoencéphaliques projettent leurs axones dans des régions spécifiques. Deux systèmes dopaminergique peuvent être différenciés en fonction de leur provenance et leurs projections; le système mésocorticolimbique (MCL) qui provient de l'aire tegmentale ventrale (VTA), et le système nigrostrié (NSS) qui origine de la *substantia nigra pars compacta* (SNpc). Alors que les prolongations du MCL aboutissent dans le lobe frontal du cerveau, celles du NS innervent le noyau caudal et le putamen du striatum. Malgré qu'ils possèdent des rôles différents, respectivement de motivateur de l'apprentissage et d'initiateur des mouvements volontaires, ces régions sont si près l'une de l'autre que les pathologies provenant de leur dysfonctions se chevauchent souvent (Bear, Connors, & Paradiso, 2007; Wise, 2004).

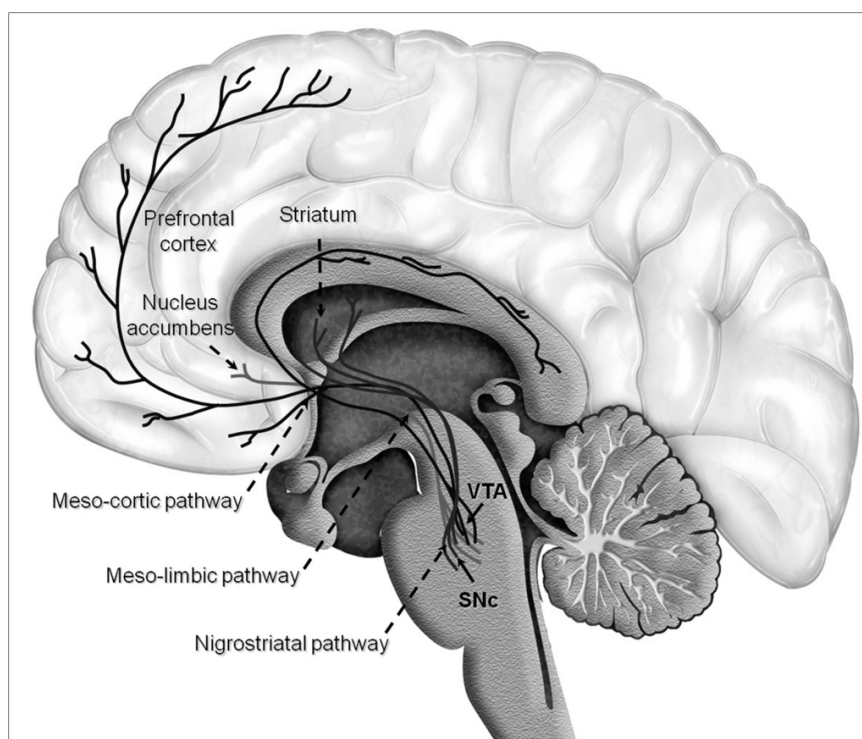


Figure 1 : Structure du cerveau humain

Malgré les symptômes moteurs particuliers de la maladie de Parkinson, d'autres désordres courants proviennent de cette même région cérébrale, tels les troubles d'attention avec/ou sans hyperactivité et la schizophrénie (Eells, 2003).

Les zones cérébrales impliquées dans l'évolution de la MP sont abordées ci-haut puisqu'elles sont des facteurs limitants d'un point de vue méthodologique, plus particulièrement dans le choix des zones cérébrales lors de l'amplification cellulaire *in vitro*.

Une telle avenue a été explorée dans le cadre de ce projet, toutefois étant donné le degré de difficulté expérimental pour l'isolation, la trituration, la mise en flasque et surtout la faible reproductibilité lors de l'amplification et l'extraction rapide du métabolisme de ces cellules adhérentes, les résultats issus de ces manipulations ne seront pas présentés dans ce mémoire.

Dans le but de compléter l'étude de la maladie de Parkinson, les voies réactionnelles impliquant le neurotransmetteur déficient (la dopamine) sont présentées à l'annexe D. De plus, les effets, les symptômes et le diagnostic de la maladie de Parkinson sont présentés à titre informatif à l'annexe E. Enfin, les différents traitements et palliatifs sont présentés rapidement à l'annexe F.

2.2 Métabolisme cellulaire

Tous les phénomènes liés au Parkinson et à l' α -syn décrits dans l'annexe C ne sont qu'une fraction des opérations qui ont lieu sur le plancher cellulaire, le cytosol. En effet, une complexe machinerie enzymatique assure le transit des nutriments et des détritux, ainsi que le maintien des voies anaplerotiques et de biosynthèse.

Le métabolisme cellulaire est le résultat final d'une longue suite d'évènements interdépendants. Les liens causaux entre ces occurrences sont indissociables au point où ils sont à la base d'un paradoxe fondamental à toute la biologie ; de l'ordre *de la poule et de l'œuf*. En effet, afin de produire une enzyme, soit une chaîne de polypeptides, la cellule requiert de l'information sur cette protéine qui est inscrite par codage dans l'ADN, soit une chaîne de polynucléotides ; toutefois afin de produire ce code génétique, cette même cellule requiert que ces premières enzymes soient actives. La solution du paradoxe *de l'ADN et des protéines* mystifie essentiellement ceux qui s'y aventurent sans aborder les concepts de l'évolution.

Dans cette seconde sous-section, un survol de la physiologie cellulaire animale est effectué afin d'approfondir par la suite le métabolisme cellulaire central puis périphérique, le tout dans le but

de choisir de manière éclairée les voies métaboliques que l'on doit mesurer et modéliser pour pouvoir enfin mieux comprendre les implications de la régulation énergétique sur l'apparition de la MP.

2.2.1 Survol cellulaire

Alors que les formes et les fonctions des différents types de cellules animales soient grandement diversifiées (rétinienne, épithéliale, cérébrale, musculaire, immunitaire, etc.), les cellules animales ont une organisation particulière commune, de type eucaryote.

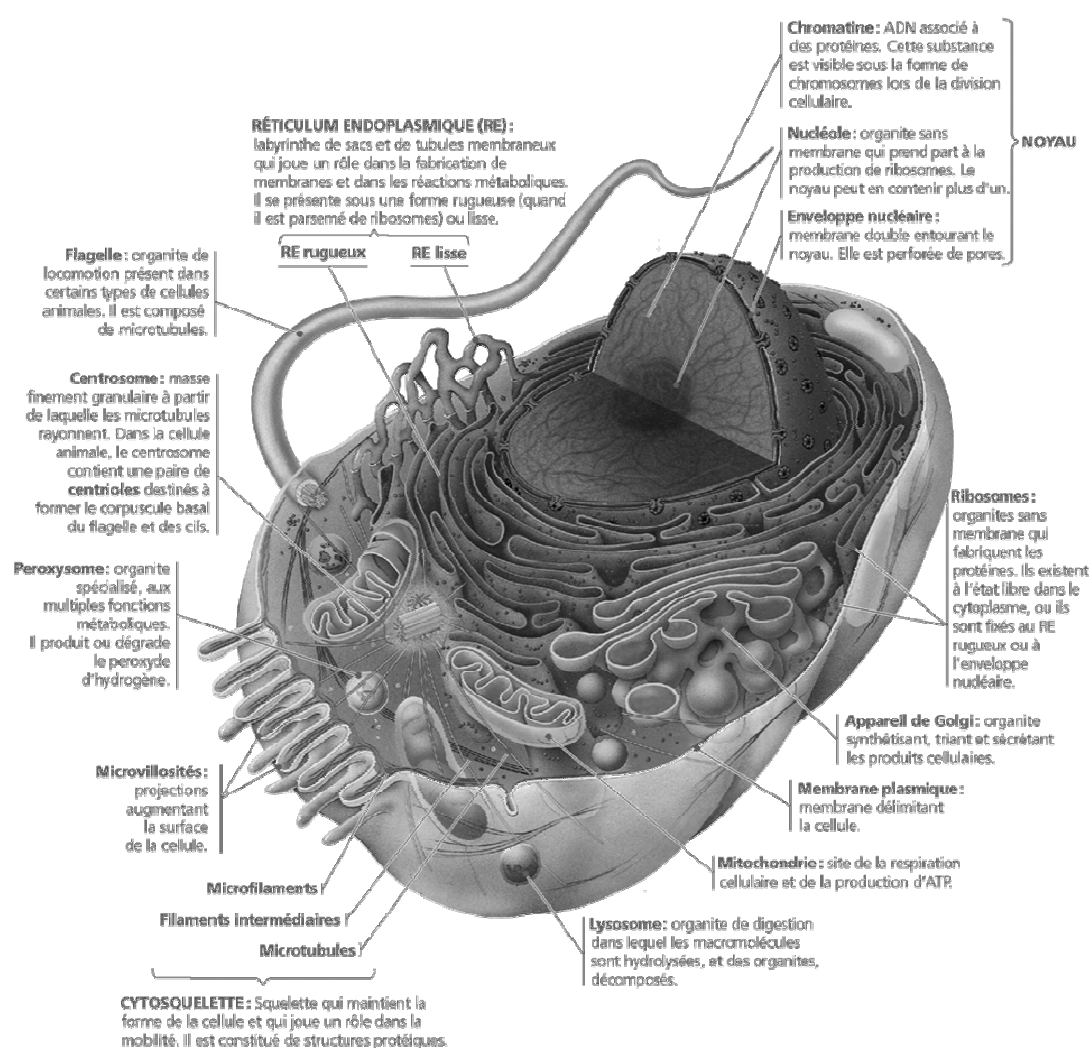


Figure 2 : Structure d'une cellule animale

Ce type de cellules a un avantage notable comparativement aux procaryotes qui sont rudimentaires, puisque ces premières sont compartimentées. En effet, par l'usage de compartiments distincts en leur sein, ces cellules plus évoluées permettent la réalisation d'un grand nombre de réactions biochimiques nécessitant différentes conditions, de manière simultanée et sélective. De plus l'usage de membranes internes permet la création de gradients de concentration ioniques agissant en potentiels ; en énergie qui leur permet d'effectuer un travail. La **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** représente une cellule animale type avec ses différents organites usuels. L'ensemble de leurs particularités et fonctions est décrit dans la majorité des livres de biologie de base (Campbell, 1995).

Il est important de noter l'existence de certains organites présents généralement chez les cellules animales, comme le noyau contenant le bagage génétique, les mitochondries produisant la majorité de l'énergie utile de la cellule, le réticulum endoplasmique permettant la production de protéines, et aussi les lysosomes décomposant les structures et molécules désuètes.

2.2.2 Variations phénotypiques

Les différences phénotypiques entre les variétés de cellules eucaryotes sont dues à leur processus de différenciation cellulaire. Alors que toutes les cellules du corps humain ont le même patrimoine génétique, grâce à l'expression différentielle, elles n'expriment pas toutes les mêmes gènes. Par exemple, les cellules musculaires et épithéliales sont issues de la même cellule mère, mais leur fonction primaire respective de mouvement et de protection diffèrent grandement en fonction des gènes qu'elles ont exprimés.

Au cerveau, on retrouve différents types de cellules tels les neurones, les astroglies, les microglies et les oligodendrocytes. Ces cellules ont respectivement les rôles de transmission et d'analyse d'information, de régulation nutritionnelle et d'intégration d'information, de système immunitaire cérébral, et finalement de support métabolique et de soutien structurel.

Ce phénomène d'expression différentielle est la résultante de contributions qui favorisent et inhibent l'expression de gènes spécifiques pour chaque type de cellule. Parmi ces effecteurs, les facteurs de croissance comme les vitamines, les hormones, les cytokines et certains peptides sont les plus importants. Par exemple, la reconnaissance par une cellule souche de la protéine *facteur*

neurotrophe dérivé de la glie (GDNF pour *Glial cell line Derived Neurotrophic Factor*) favorise la différenciation et la survie de gliocytes.

La voie de recherche sur les facteurs de croissance et de différenciation a réussi des percées importantes⁹, mais nécessite encore beaucoup de travail afin :

- de décrire tous les effecteurs et leurs conséquences sur la cellule;
- d'en déduire les interactions et implications par et sur son microenvironnement;
- de les utiliser comme outils vers un diagnostic hâtif et de guérison de maladies.

Toutefois, grâce à l'ensemble des sciences de l'étude des cellules usuellement dénommées « -omiques », tel la génomique, la transcriptomique, la protéomique, la métabolomique et la réactomique, la réalisation de cet exploit de caractérisation complète des impacts métaboliques réels est dorénavant crédible.

2.2.3 Métabolisme cellulaire

Le métabolisme cellulaire est l'ensemble des processus de transformation des substances présentes dans le cytosol par des réactions biochimiques catalysées. Le métabolisme de toutes les cellules lutte contre les déséquilibres entre les processus d'approvisionnement et d'utilisation d'énergie, dans le but d'atteindre une homéostasie dynamique.

2.2.3.1 Catabolisme

Ces premières voies cataboliques consistent en la transformation de l'énergie présente dans différents nutriments et sucres complexes en éléments intermédiaires qui sont utilisées par la suite par les voies anaboliques. Ces étapes de digestion dégagent de la chaleur et convertissent, entre autres, de l'énergie provenant de sources diverses¹⁰ en énergie simple à utiliser pour la cellule. En

⁹ Slevin et ses collègues ont démontré des effets anti-parkinsoniens du GDNF. En effet, lors de leur étude clinique limitée, les fonctions bilatérales des patients traités furent améliorées de manière soutenue suite au traitement d'infusion de GDNF à l'intérieur du putamen (Slevin et al., 2005).

¹⁰ Les aliments sont des protéines, des glucides et des lipides qui sont composés respectivement des acides aminés, des glucoses et des acides gras.

effet, l'énergie chimique puisée dans les nutriments est convertie en une forme standard pouvant être utilisée par la majorité des enzymes.

2.2.3.2 Anabolisme

Les voies anaboliques utilisent cette dernière énergie chimique pour transformer ou lier diverses molécules vers la biosynthèse. Par exemple, les polypeptides nécessaires à la croissance ou la réparation de tissus sont le résultat de ligation énergivore de blocs-monomères, provenant d'une voie d'approvisionnement d'acide aminé, en longues chaînes polymériques. Aussi, les activations protéiques pour la transduction de signaux ou pour le maintien de gradients ionique nécessitent l'utilisation d'énergie récupérée par la voie d'approvisionnement.

2.2.4 Métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est le squelette sur lequel toutes les autres voies métaboliques reposent. En effet, ces dernières ne sont possibles que par l'approvisionnement continu en énergie métabolique. Il existe différentes métabolites ayant des rôles essentiellement énergétiques, soient les réserves-tampons et les navettes énergétiques. Agissant à des niveaux temporels et fonctionnels différents, ces premières peuvent varier grandement en quantité contrairement à ces dernières qui maintiennent un niveau relativement constant.

Ainsi, alors que les réserves tampons servent de stockage à moyen terme d'énergie en cas de surplus et par la suite de ressource en cas de besoin, les navettes énergétiques effectuent tout transfert d'énergie à court terme, tant lors de l'utilisation de l'énergie métabolique que lors de la recharge des réserves-tampons. Enfin, alors que les types de réserves-tampons comme le glycogène et la phospho-créatine varient d'un type de cellule à l'autre, les navettes sont retrouvées généralement dans tous les types cellulaires.

2.2.4.1 Navettes énergétiques ribonucléotidiques

Les nucléosides sont les molécules servant de navette énergétique¹¹. Pouvant être phosphorylées jusqu'à trois (3) reprises, ces molécules stockent l'énergie des nutriments par l'attachement

¹¹ Ils ont aussi un rôle important dans l'expression protéique. En effet, ces ribo-nucléotides permettent la traduction de l'ADN vers les protéines par la chaîne d'ARN qu'ils composent.

réversible du second et dernier groupement phosphate, respectivement phosphate β et γ ^{12, 13}. La dénomination des nucléosides varie par la présence de ces groupements phosphates ; ainsi on retrouve les nucléosides mono-, di-, et tri-phosphates (NMP, NDP et NTP). Il existe autant de types de navettes énergétiques que de nucléoside cytosolique ; ainsi, on retrouve sur le plancher cellulaire l'adénosine, le cytidine, le guanosine et l'uridine¹⁴. Le Tableau 1 présente la dénomination et abréviations des possibilités de ces navettes énergétiques (à lire selon l'ordre : colonne - ligne).

Tableau 1: Dénominations et abréviations des ribonucléotides

	adénosine-	cytidine-	guanosine-	uridine-	nucléoside-
monophosphate	AMP	CMP	GMP	UMP	NMP
diphosphate	ADP	CDP	GDP	UDP	NDP
triphosphate	ATP	CTP	GTP	UTP	NTP
multiple phosphate	ANP	CNP	GNP	UNP	NNP

Les quantités de ces molécules et leurs ratios dépendent fortement de l'activité du métabolisme central, généralement catabolique, et du métabolisme périphérique, généralement anabolique. Une description des rôles respectifs de ces navettes nucléotidiques est présentée à l'annexe G.

De cette description se dégage que l'ATP et la GTP sont des acteurs de changements rapides dans le cytosol, contrairement à l'UTP et la CTP qui sont plutôt des facilitateurs et agents intermédiaires de modifications.

La charge énergétique élevée de la GTP, l'UTP et la CTP, due à leur triplet phosphate, est créée par une molécule d'ATP qui a transféré un phosphate énergétique à leur analogue biphosphaté.

¹² Le premier phosphate inorganique est ajouté au cœur de la molécule lors de sa création, permettant l'ajout successif d'un second et troisième groupement réellement énergétiques puisqu'ils peuvent être détachés et libérer leur énergie.

¹³ L'appellation greque des groupements phosphates est en fonction de la distance de ceux-ci par rapport au centre de la molécule, de proximal à distal : α , β puis γ .

¹⁴ D'autres espèces nucléotidiques similaires existent aussi ; comme la xanthanine (XNP), inosine (INP) et la thymidine (TNP) qui ont entre autres des rôles intermédiaires vers la production des quatres nucléotides usuels.

L'équilibre entre les différents types triphosphatés est régit par les nombreuses kinases de la voie de récupération des ribonucléotides. La provenance ultime des ribonucléotides est légèrement différente pour chacune en raison de leur base azotée. Regroupées sous purines et pyrimidines, ces étapes menant à la formation des ribonucléotides sont présentées en détails sur le meta-site métabolique de HumanCyc.org (Caspi et al., 2010).

Ultimement, la biosynthèse des ribonucléotides provient globalement de sucres, des lipides et des acides aminés, spécifiquement le ribose-5-phosphate (R5P), les acides gras et le glycérol, et la glutamine. Cette synthèse requiert aussi de l'énergie provenant d'une molécule d'ATP qui a subi l'action de pyrophosphokinases et la libération de diphosphates. Cette même énergie provient aussi des processus d'approvisionnement d'énergie du métabolisme central.

2.2.5 Métabolisme central

À part quelques exceptions, le métabolisme cellulaire central de toute cellule se résume en la gestion de l'approvisionnement d'énergie par trois (3) voies métaboliques reliées mais considérées distinctes : la voie d'Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), le cycle de Szent-Györgyi et Krebs (SGK) et la voie de Warburg-Dickens-Horecker (WDH), mieux connues respectivement sous les noms : glycolyse, cycle des acides tricarboxyliques et voie des pentoses phosphatés.

2.2.5.1 Glycolyse

Entrée principale de substrats carbonés, la glycolyse est une des voies métaboliques les plus anciennes et aussi une des plus importantes ; elle est utilisée dans la presque totalité des organismes vivants. Pouvant être complètement anaérobie, cette chaîne de dix (10) réactions cytosolique permet la dégradation partielle du glucose, la principale source d'énergie pour la cellule provenant d'hydrocarbures simples et complexes digérés, sans toutefois consommer de dioxygène (O_2) et sans produire de dioxyde de carbone (CO_2).

En fait, en termes de ratios stoechiométriques, par l'entremise d'autant d'enzymes particulières que de réactions, la glycolyse transforme une (1) molécule de glucose (GLC) composé de six (6) carbones liés en cycle (un aldohexose), en deux (2) molécules de pyruvate (PYR) composés de trois (3) carbones (des α -cétoacides). L'énergie libérée par les bris de liens covalents est récupérée indirectement par l'ajout d'un groupement phosphate inorganique (P_i) à des ADP pour produire des ATP.

Spécifiquement, au schéma présenté à la Figure 3^{15,16}, on peut distinguer trois (3) colonnes, correspondant aux trois (3) étapes métaboliques importantes de la glycolyse. Dans les étapes préparatoires de gauche deux (2) ATP sont utilisées, respectivement avec les enzymes hexokinase (HK) et phosphofructokinase (PGK), afin de rendre le sucre plus réactif. Par la suite, dans la partie représentée au centre, le fructose biphosphate (FBP) est clivé en deux sous-parties similaires par l'aldolase lyase (FDA¹⁷), doublant les substrats pour la suite. Finalement, dans les étapes de droite, deux (2) étapes assurent un retour énergétique des étapes préparatoires en permettant la création d'un (1) ATP chacun, respectivement la phosphoglycérate kinase (PGK) et la pyruvate kinase (PK). En fait, étant donné que les substrats sont doublés quatre (4) ATP sont générés, or globalement la voie aboutie en la charge de deux (2) ATP.

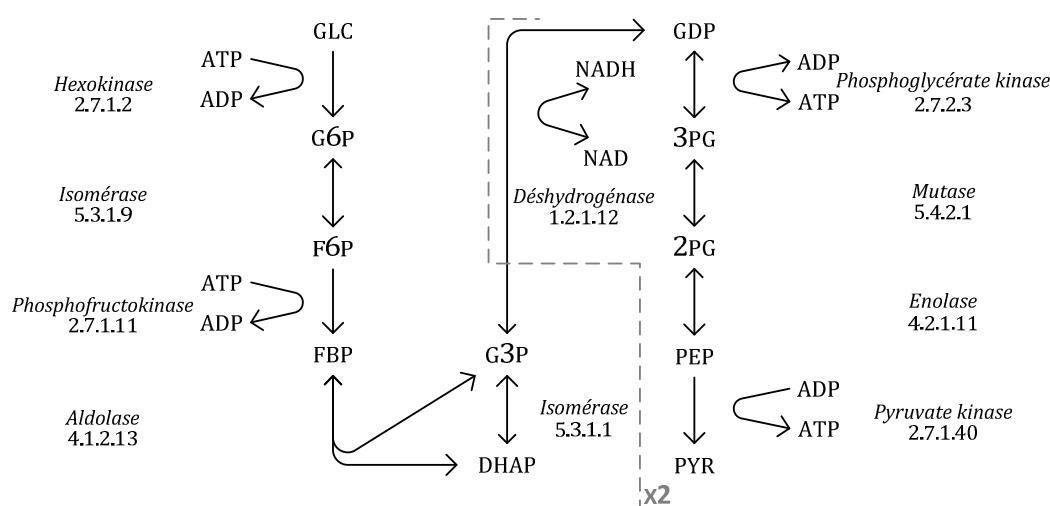


Figure 3 : Schéma de la glycolyse

Cette voie métabolique produit globalement aussi deux (2) molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) à partir de nicotinamide adénine dinucléotide oxydé (NAD). Tout

¹⁵ Les abréviations utilisées sont explicitées dans la Nomenclature en préface à la page xii.

¹⁶ Les identifiants numériques inscrits sous les noms d'enzymes proviennent de la nomenclature de la Commission des enzymes (EC#, pour *Enzyme Commission*) qui répertorie les enzymes en fonction des réactions qu'elles catalysent. Un bref descriptif de cette liste est présenté à l'annexe H.

¹⁷ L'acronyme FDA est mis pour : Fructo-Diphosphate Aldolase.

comme l'ATP, le NADH est une navette énergétique. Elle agit toutefois à un niveau différent ; son pouvoir énergétique se découple lors de la phosphorylation oxydative, détaillée à la section 2.2.5.4.

Il est important de noter que la plupart des enzymes qui constituent cette voie métabolique de dégradation permettent aussi un fonctionnement inverse. Ainsi, en plus d'être approvisionnés dans le sens habituel, sous certaines conditions le phénomène de gluconéogenèse permet de fournir des substrats à des voies embranchées tôt dans la glycolyse à partir du pyruvate comme l'accumulation de sucres sous forme de glycogène (GLY) à partir du glucose-6-phosphate (G6P).

Plusieurs voies axiales proviennent des substrats carbonés de la glycolyse, par exemple le G6P permet entre autres l'embranchement de la voie des pentoses phosphates qui se reconnecte aussi éventuellement à la glycolyse ; cette voie est expliquée à la section 2.2.5.3. Finalement la glycolyse débouche aussi vers des voies très importantes comme la fermentation lactique et surtout vers le cycle de Szent-Györgyi et Krebs, aussi décrites aux respectivement aux paragraphes 2.2.6.3 et 2.2.5.2.

2.2.5.2 Cycle des acides tricarboxyliques

Mieux connue sous le nom de « cycle de Krebs », cette voie métabolique constitue non seulement l'aboutissant de la dégradation des sucres (voie d'EMP), de la dégradation des lipides (bêta-oxydation), et des protéines, mais aussi le lieu de départ de la biosynthèse, soit de la production d'acides aminés et d'acides gras.

En plus de ces fonctions secondaires, le cycle de SGK favorise la libération de deux molécules de CO_2 et, surtout, le chargement de navettes énergétiques. En effet, pour que ce cycle en soit un, il faut que les substrats initiaux soient régénérés lors de la passe suivante. Tel que présenté à la Figure 4, ce cycle métabolique permet ce phénomène cyclique par l'ajout constant de substrat, de pyruvate¹⁸.

¹⁸ Sur la figure, certaines réactions (flèches) sont représentées avec un trait pointillé ; elles permettent de distinguer des réactions qui s'effectuent en étapes multiples, impliquant d'autres intervenants (substrats et enzymes) que ceux présentés.

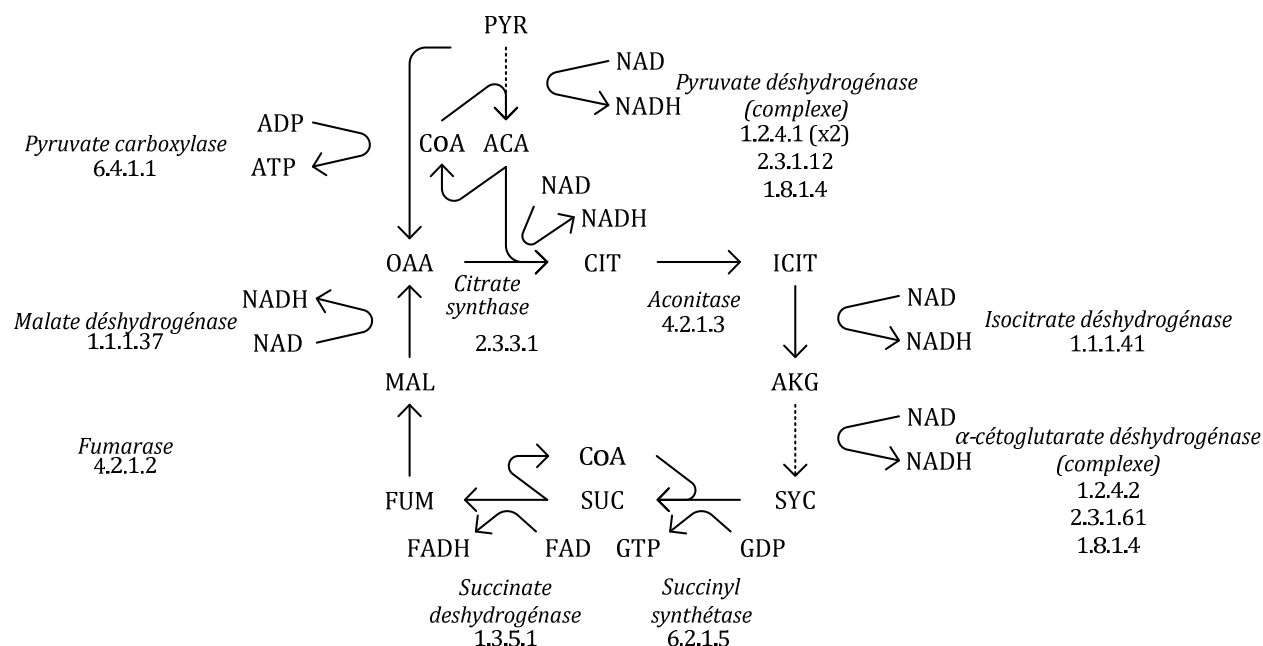


Figure 4 : Schéma du cycle des acides tricarboxyliques

Le pyruvate (PYR) est d'abord supplémenté d'un groupement Co-A pour le rendre plus réactif, puis il est lié à l'oxaloacétate (OAA) vers la synthèse du citrate (CIT). Par la suite, la molécule subit de nombreuses transformations au cours desquelles elle perd des dioxydes de carbone (CO_2) et permet de manière parfois indirecte la phosphorylation de l'ADP vers l'ATP et la réduction respective des NAD et FAD en NADH et FADH. Ces dernières navettes énergétiques transféreront l'énergie ainsi accumulée dans la même voie que les molécules créées lors de la glycolyse : soit la phosphorylation oxydative, présentée aux paragraphes 2.2.5.4.

Aussi, en plus d'assurer un taux élevé de génération de navettes nucléotidiques réduites ou phosphatées, le cycle de SGK assure des niveaux stables d'intermédiaires dans le but de maintenir l'approvisionnement interne du cycle et externe vers les nombreuses avenues de biosynthèse provenant du cycle.

2.2.5.3 Voie des pentoses phosphates

La voie axiale la plus importante de la glycolyse est celle des pentoses phosphates (WDH, PP). Effectivement, une bonne quantité de sucres ayant subi la première étape de la glycolyse quitte cette dernière au nœud du G6P pour alimenter cette autre voie, celle-ci agissant en deux temps.

Tel que représenté à la Figure 5, la première partie de la voie des PP est dite oxydative puisqu'elle permet la réduction de la molécule de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en sa forme réduite NADP⁺. Après cette réduction doublée, le sucre initial a entre autre perdu un (1) atome de carbone et est devenu le ribulose-5-phosphate (R5P).

À partir de ce métabolite, la voie dite « non-oxydative » forme par le biais d'associations variées de molécules intermédiaires, le glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) et le fructose-6-phosphate (F6P). Stoechiométriquement, pour trois (3) sucres entrants dans la voie des PP, deux (2) F6P et un (1) G3P sont formés.

Les F6P et G3P formés peuvent être utilisées vers des voies de biosynthèse et de gestion du stress oxydatif, tel que respectivement décrites aux sections 2.2.6.1 et 2.2.6.7 (et à l'Annexe C.b), ou se voient modifiés ensuite par la voie glycolytique où leur finalité sera plutôt énergétique.

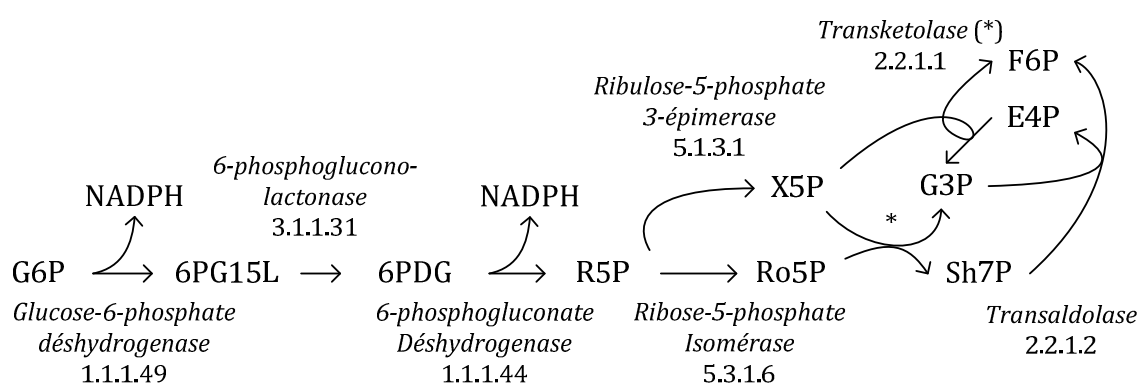


Figure 5 : Schéma de la voie des pentoses phosphates

2.2.5.4 Phosphorylation oxydative

L'étape ultime de la conversion énergétique des sucres en énergie standard à la cellule est la phosphorylation oxydative (PhOx). Contrairement aux voies EMP et WDH qui ont lieu dans le cytosol et celle de SGK qui a lieu à l'intérieur de la mitochondrie, cette voie-ci se déroule essentiellement dans la membrane interne de la mitochondrie, là où ses enzymes sont situées. Effectivement, les enzymes responsables de cette voie utilisent la double membrane de la mitochondrie pour créer un gradient de concentration important, gradient qui sera ensuite utilisé pour recharger les navettes énergétiques.

En fait, la chaîne respiratoire complète peut être scindée en deux (2) phases en fonction du sens des transferts de protons : la première utilisant l'énergie de navettes énergétiques secondaires pour établir un gradient d'ions protoniques, et la seconde phase utilisant cette différence de potentiel ionique pour reconstituer l'énergie cellulaire, constituée d'un (1) seul complexe. Ainsi, on retrouve respectivement quatre (4) complexes pour la première phase, les complexes I à IV, et un (1) seul pour la seconde, le complexe V.

La première phase se caractérise par des échanges d'électrons entre plusieurs couples oxydo-réducteurs qui forcent le passage de protons vers l'espace inter-membranaire de la mitochondrie.

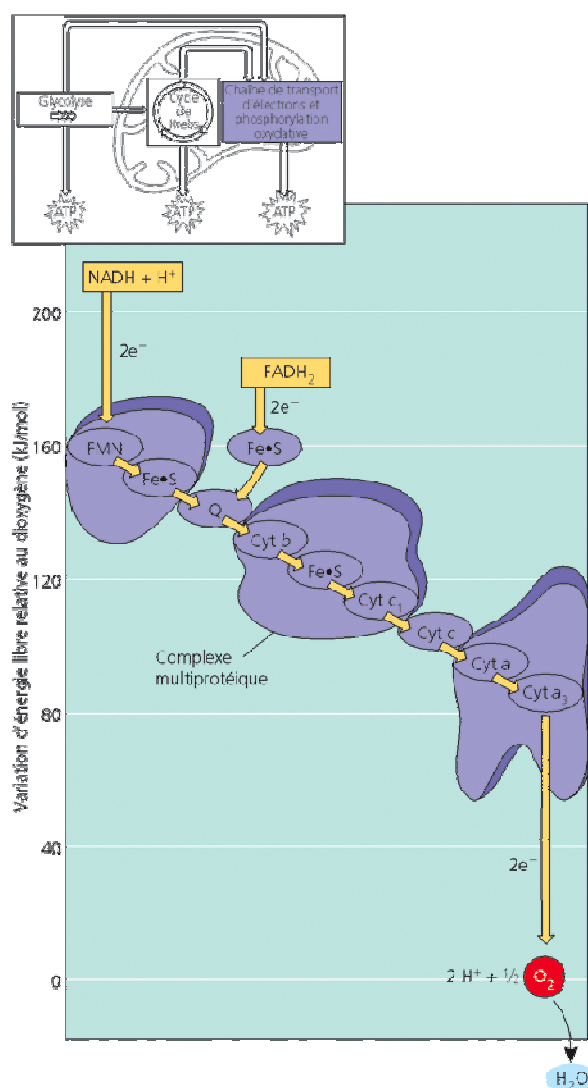


Figure 6 : Variation d'énergie des molécules impliquées dans le transport d'électrons de la PhOX

Parmi ces couples présentés à la Figure 6, notons l'ubiquinone oxydé, le coenzyme Q_{10} (Q), et l'ubiquinol réduit (QH_2), et le cytochrome c oxydé (CcO) et le cytochrome c réduit (CcR). Alors que ce premier est le transporteur principal à l'intérieur même de la membrane mitochondriale interne, séparant la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire, le cytochrome c est le transporteur principal pour l'espace inter-membranaire. L'accepteur terminal d'électrons de la chaîne de PhOx est l' O_2 . Étant un fort agent oxydant, la réaction de sa réduction produit des intermédiaires réactionnels nocifs, des espèces réactives oxygénées (ROS)¹⁹.

La Figure 7 présente brièvement les échanges majeurs ayant lieu au sein de cette voie.

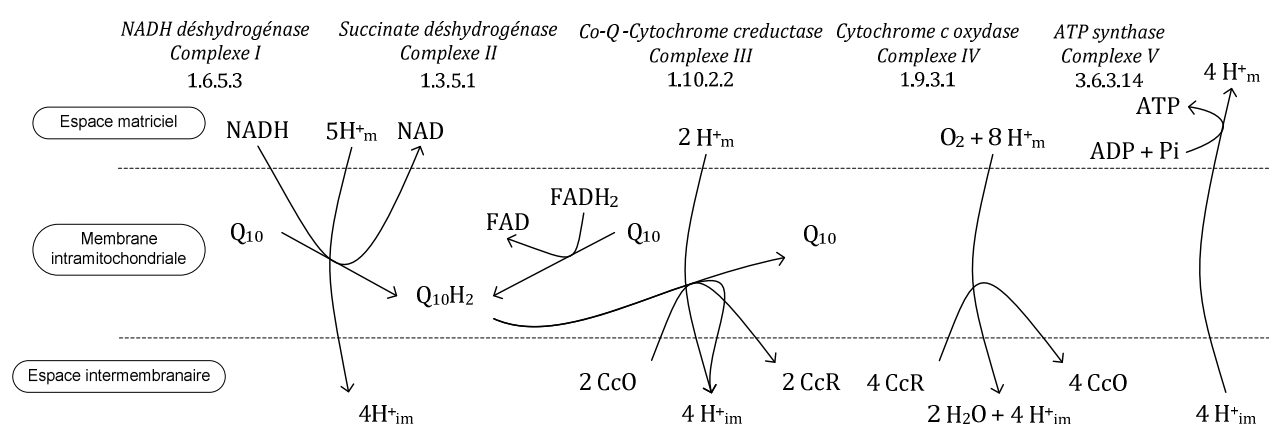


Figure 7 : Schéma de la phosphorylation oxydative

Le gradient de protons est créé grâce aux complexes I, III et IV. En effet, malgré la formation de l'ubiquinol par réduction, la transformation du $FADH_2$ en FAD par le complexe II n'entraîne pas de protons vers l'espace inter-membranaire. De plus, les stœchiométries réactionnelles sont ici importantes ; proportionnellement à une molécule de QH_2 , le nombre de protons acheminés dans l'espace inter-membranaire par le complexe IV est en fait uniquement de deux (2), malgré la représentation utilisant une molécule complète de dioxygène (O_2).

Finalement, notons que le l'ATP-synthase, le complexe V, est l'unique voie de retour des protons ainsi pompés, permettant la génération d'ATP.

¹⁹ ROS est l'acronyme de *reactive oxydative species*.

Ainsi, par la PhOx, une molécule de NADH consommée crée un gradient de dix (10) protons et peut produire l'équivalent de deux molécules et demi (2.5) d'ATP, contrairement au FADH₂ qui ne permet la création d'un gradient d'uniquement six (6) protons et donc une production d'uniquement une molécule et demi (1.5) d'ATP²⁰.

La machinerie enzymatique assurant la voie de PhOx est cruciale pour la cellule puisqu'elle assure un retour énergétique important des réactions préliminaires. Sans créer de l'énergie, cette voie permet à la cellule de minimiser les pertes nutritionnelles, d'assimiler toute l'énergie disponible de ces substrats. La recharge des navettes énergétiques par ces complexes mitochondriaux oxydatifs élève non-seulement le niveau énergétique de la cellule, mais aussi le flux d'approvisionnement énergétique. Le niveau énergétique et son taux de régénération permet finalement la réalisation de réactions énergétiquement exigeantes.

2.2.6 Métabolisme périphérique et spécifique

En plus du métabolisme central décrit ci-haut qui est principalement énergétique, un nombre plus important de voies réactionnelles existent en sa périphérie. Effectivement, le métabolisme périphérique comporte différentes fonctions de soutien direct et indirect du métabolisme central vers un équilibre cellulaire et vers la biosynthèse.

Dans cette sous-section, quelques voies estimées importantes en terme de flux métabolique et de rôle dans le cadre de la MP seront décrites brièvement ; en voici l'énumération : la Biosynthèse et croissance, les Tampons énergétiques, la Voie lactatique, les Cycles futiles, le Découplage mitochondrial, le Cycle de glutamate et glutamine et le Cycle du glutathion.

2.2.6.1 Biosynthèse et croissance

Typiquement, la biosynthèse est l'ensemble des réactions aux nombreuses étapes qui permettent la formation et transformation de monomères simples et complexes en vue de composer des polymères ayant des structures tridimensionnelles encore plus complexes telles que les protéines, les acides gras et les vitamines qui assurent ultimement le maintien et la croissance de cellules, tissus et organes.

²⁰ La notion de « demi » molécule est utilisée à des fins de démonstration d'équivalence de conversion.

Par exemple, la production des protéines requiert un éventail de vingt (20) acides aminés. Or, les humains requièrent des apports constants de neuf (9) acides aminés dits « essentiels », soit des acides aminés qui ne peuvent pas être formés *de novo* ; les onze (11) autres étant formés de manière dérivée par transformations diverses. Ainsi, une fois ces peptides formés, une succession d'étapes en quatre (4) phases est nécessaire afin de créer une molécule bioactive.

Tel que présenté à l'annexe I, ils sont premièrement liés entre eux de manière précise par une machinerie protéique, le ribosome, dans le but de former une chaîne de polypeptides (A). Cette chaîne se repliera ensuite naturellement sur elle-même afin de créer une structure secondaire stable grâce à ses ponts hydrogènes (B). Par la suite une structure tertiaire est réalisée parfois naturellement grâce à des interactions hydro-philés/phobes, ponts disulfures et ponts hydrogènes, et/ou parfois avec l'aide de protéines chaperons qui effectue des modifications post-traductionnelles et leur donne leur conformation fonctionnelle (C). Dans certains cas, les protéines fusionnent entre elles grâce à des liens secondaires (ponts disulfures et hydrogènes) et forment des structures quaternaires (D). Par exemple, l'insuline et le protéasome sont des protéines à sous-unités multiples, respectivement six (6) et vingt huit (28) sous-unités. La protéine ainsi formée peut avoir une fonction de structure, de transport, de régulation, de signalisation, de mouvement ou de protection immunitaire.

De même pour les autres voies de la biosynthèse qui sont tout aussi variées, elles requièrent les substrats principaux et les co-substrats énergétiques afin de réaliser leur synthèse. Alors que les co-substrats énergétiques sont rechargés directement par le métabolisme central, les substrats principaux peuvent provenir directement de l'environnement cellulaire ou suite à des transformations mineures ou élaborées réalisées par le métabolisme central. En effet de nombreux monomères de biosynthèse proviennent des voies d'EMP, SGK, ou WDH, pour la formation d'hexoses structuraux, d'acides aminés et acides gras.

2.2.6.2 Tampons énergétiques

Les tampons énergétiques sont des outils de régulation énergétique importants pour la cellule. La principale caractéristique d'un tel tampon est qu'il permet de stocker de manière temporaire un élément, pour le rendre ensuite disponible en cas de besoin. Deux types de tampons sont présentés ici : le tampon de glycogène et celui de la phosphocréatine.

2.2.6.2.1 *Tampon de glycogène*

Le glycogène (GLY) est un des polymères dont le monomère provient de la voie d'EMP ; effectivement, son substrat principal est le G6P. Grâce à la phosphoglucomutase (PGM), celui-ci passe par un état intermédiaire biphosphaté, puis retrouve son groupement phosphate transloqué de la position 6 à la position 1 pour donner le G1P. Ensuite, grâce à l'enzyme UDP glucose-pyrophosphorylase, le G1P devient le UDP-glucose (UDPGlc). Par la suite, la réaction de polymérisation est initiée par l'enzyme glycogénin qui formera en deux (2) étapes le cœur de ce qui deviendra une macromolécule. Effectivement, grâce à ce point de nucléation, le glycogène synthase (GYS) réalise l'élongation en ajoutant successivement des molécules d'UDPGlc au noyau formé.

C'est par sa propriété réversible que la formation d'une telle macromolécule prend son sens. En effet, grâce à la glycogène-phosphorylase (GYP), le GLY peut perdre des molécules d'UDPGlc et rendre ainsi disponible ce monomère pour la glycolyse.

2.2.6.2.2 *Tampon de phosphocréatine*

Le tampon de phosphocréatine (PCr) agit dans le même optique que le tampon de glycogène, toutefois il est bien plus en aval de la chaîne d'approvisionnement d'énergie ; il stocke plutôt de l'énergie prête à être utilisée, l'ATP. En effet, contrairement au GLY qui fournit des nutriments en amont de la voie d'EMP, ce tampon de PCr fournit plutôt des liens covalents, le même lien présent entre la molécule d'ADP et son phosphate inorganique (P). Aussi, contrairement au type macromoléculaire du GLY, le stockage PCr est unitaire, permettant une disponibilité plus rapide en cas de nécessité.

En période énergétiquement favorables, l'enzyme créatine kinase (CK) charge simplement les molécules de créatine (Cr) en effectuant le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP à la Cr, produisant ainsi de la PCr et de l'ADP. Inversement, lorsque les flux d'apports énergétiques sont plus faibles que ceux de demande, la CK rééquilibre le niveau d'ATP en diminuant le tampon de PCr.

2.2.6.3 **Voie lactatique**

Bien qu'il n'ait pas la désignation réelle de « tampon », lors de périodes d'hypoxie ou d'anoxie le lactate produit en grande quantité par fermentation homolactique du pyruvate (PYR), constitue

aussi un substrat intéressant pour une application de ce type. Différentiellement au cycle de « Cori »²¹, la cellule peut produire ce lactate en période aérobique, l'excréter à l'extracellulaire, et le réabsorber une fois le flux d'oxygène rétablit, ou l'utiliser comme navette.

2.2.6.3.1 Navette lactatique

La navette de lactate (ANLS²²) est une hypothèse métabolique sur le fonctionnement spécifique des astrocytes et neurones en période d'activité neuronale. Contrairement au savoir conventionnel qui propose une production de lactate par les deux types cellulaires suite à l'absorption principale de glucose et l'élimination de lactate suivant l'activité neuronale, l'hypothèse de ANLS propose que ce soit principalement l'astrocyte qui digère le glucose de manière anaérobique et que le lactate produit soit excrété dans l'environnement extracellulaire avant d'être absorbé comme nutriment principal par le neurone.

Évidemment, la réalité est une nuance des deux (2) approches. En terme de lactate astrocytaire consommé par les neurones, certains avancent que le ANLS ne représente qu'un maximum de quinze pourcents (15%) du PYR neuronal généré (Cloutier, Bolger, Lowry, & Wellstead, 2009).

2.2.6.4 Cycles futiles

Dans l'ensemble, la cellule réalise le passage de substrats par ses différentes voies métaboliques de manière efficace. Or certaines réactions se produisent non seulement en sens inverse, mais diminuent le niveau énergétique de la cellule. Ainsi, certains cycles métaboliques dits « futiles » ralentissent de manière apparente le flux métabolique de la voie. Notons principalement la présence de l'enzyme fructose-biphosphatase qui détache un groupement phosphate du FBP sans toutefois en récupérer l'énergie ; cette enzyme favorise tout simplement la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur. Par la suite, la PFK récupère le F6P, consomme un (1) ATP et régénère le FBP.

²¹ Le cycle de Cori propose entre autre la glucogéonèse par le foie du lactate transporté de manière circulatoire provenant des muscles, et sa réassimilations par les muscles sous forme de glucose aussi transporté par le sang.

²² ANLS est l'abréviation de *astrocyte-neuron lactate shuttle*, pour navette de lactate entre l'astrocyte et le neurone.

Ainsi, afin d'avoir un niveau favorable de FBP pour les réactions suivantes, le cycle doit être débalancé vers sa production, le flux de PFK doit être le plus important.

Malgré l'apparence néfaste de réactions comme celle catalysée par la fructose-biphosphatase, elles ont un rôle important dans la régulation des voies métaboliques. Quand elles sont bien ajustées, elles permettent de maintenir les voies métaboliques sous contrôle ; certains présentent ces cycles futiles comme étant un prix cellulaire juste à payer pour une régulation précise (Aishwarya, Rachana, & Prakash, 2005; Qian & Beard, 2006). En effet, tel que résumé par Aishwarya, la régulation d'un système tendu et combatif est atteinte plus rapidement en agissant simultanément et inversement sur les protagonistes qu'en agissant doublement sur une (1) seule voie. D'un point de vue métabolique, une telle régulation double est plus aisée à réaliser puisque cette dernière est habituellement déclenchée par une concentration métabolique.

2.2.6.5 Découplage mitochondrial

Il semblerait qu'un cinquième ($\frac{1}{5}$) du taux métabolique standard est désigné dans la création de chaleur, la thermogénèse basale ; provenant essentiellement des cycles futiles et du découplage mitochondrial.

Contrairement aux cycles futiles, le découplage mitochondrial par des protéines-canal, nommées UCP²³, a pour principal but de générer de la chaleur en augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale séparant la matrice de l'espace inter-membranal ; raison pour laquelle ce phénomène est parfois simplement nommé : fuites mitochondriales. Au lieu d'être couplés et convertis en énergie grâce à l'ATPase tel que décrit à la section 2.2.5.4, les protons descendent le gradient électrochimique et transitent par la thermogénine, une UCP principalement présente dans les tissus adipeux bruns.

2.2.6.6 Cycle de glutamate et glutamine

En plus d'être utilisées à des fins protéiques, certains acides aminés, le glutamate (GLT) et la glutamine (GLN), sont utilisées par la cellule pour une fonction particulière au cerveau ; ils maintiennent la neurotransmission. (Pellerin & Magistretti, 1994)

²³ UPC est la contraction de *uncoupling protein*, pour protéine de découplage.

Le cycle est initié par le neurone. En fait, le GLT est d'abord chargé dans les vésicules synaptiques par un transporteur vésiculaire spécifique pour le glutamate (VGLUT). Lors de l'activité neuronale le GLT est relargué dans la synapse. Celui-ci est par la suite recapté par l'astrocyte grâce à ses transporteurs transmembranaires spécifiques (GLAST²⁴). La cellule gliale transforme ensuite la GLT en GLN grâce à la glutamine synthase, puis cette GLN est relarguée dans l'espace extracellulaire. Par la suite, le neurone recapture la GLN pour boucler le cycle en la transformant à son tour en glutamate grâce à la glutaminase. Présenté à la Figure 8, ce cycle est important surtout puisqu'il assure un approvisionnement soutenu en glutamate pour le neurone, puisqu'une telle consommation épuiserait rapidement les ressources aminées du système si ce glutamate provenait uniquement de la voie de SGK, par l'enzyme glutamate deshydrogénase (GTD).

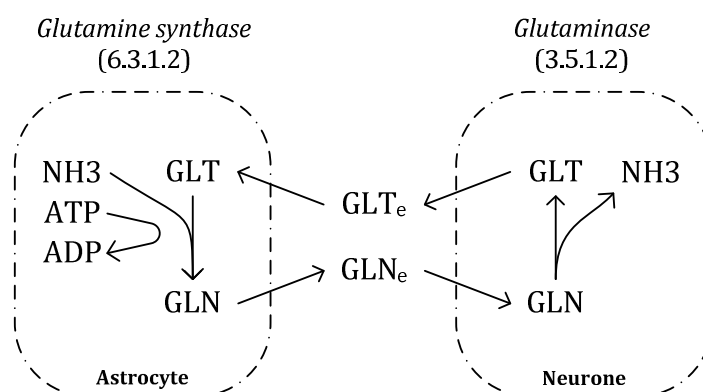


Figure 8 : Schéma de la voie cyclique de glutamate et glutamine

2.2.6.7 Cycle du glutathion

Tel qu'énoncé à la section sur la 2.2.5.4, la phosphorylation oxydative mène à la création de ROS. Ceux-ci sont générés lorsque l'oxygène est réduit prématurément ou de manière incomplète (près de un pourcent (1%) de l'oxygène consommée par la PhOx), créant ainsi des composés fortement réactifs dus à leurs électrons surnuméraires non-appariés, comme des anions superoxydes (O_2^-). En conditions saine, le corps maintient le niveau oxydatif bas grâce à quelques systèmes enzymatiques dont le glutathion. Toutefois, quand les processus de gestion de ROS sont saturés, la

²⁴ GLAST est l'acronyme de *glutamate aspartate transporter*, pour transporteur de glutamate et d'aspartate.

cellule tombe en situation de stress oxydatif, état dans lequel les radicaux libres attaquent les protéines et peuvent mener à une mort cellulaire incontrôlable, la nécrose, tel que lors de plusieurs maladies neuro-dégénératives dont la MP.

Ainsi, le glutathion (GSH) permet de réduire la quantité d'espèces oxydatives. L'oxydation de ces derniers réduit l'environnement cellulaire. C'est la glutathion peroxydase qui couple à l'aide de la création d'un pont sulfide deux (2) de ces tripeptide ; cet état couplé est dénommé glutathion oxydé (GSSG). Par la suite, la glutathion réductase (GR) sépare les contreparties grâce à une molécule de NADPH pour boucler le cycle. La navette énergétique est cruciale à la régénération du réactif, et donc la réduction de ROS supplémentaires.

Ce cycle est essentiel au bon fonctionnement de toute cellule puisque la PhOx produit en permanence des espèces oxydatives. Ainsi, une diminution marquée de ce mécanisme de régulation du stress oxydatif est liée à une réduction de la quantité de GSH, tel qu'a été découvert dans le cerveau des personnes atteintes de la MP. (Sian et al., 1994)

2.2.7 Régulation métaboliques

L'ensemble des réactions du métabolisme central et périphérique sont réalisées dans un certain temps, à une certaine vitesse. La cinétique de chaque réaction est affectée par de nombreux facteurs comme la concentration de substrats et co-substrats, de produits et co-produits et d'activateurs et inhibiteurs, la température, et l'acidité ; chaque interaction peut théoriquement être mesurée expérimentalement.

Le méta-site web *Brenda-Enzymes.org* répertorie une somme d'informations sur les enzymes tirés d'articles de journaux. Chaque enzyme y est répertoriée par son numéro désigné par la Commission des Enzymes (EC#) ; par exemple la glutathion réductase (GR) a le numéro 1.8.1.7.²⁵

Grâce aux enzymologistes qui ont étudiés des enzymes provenant de différentes espèces du vivant, les interactions de la majorité de celles-ci avec les molécules environnantes sont identifiées et quantifiées. Ainsi, pour la GR, exprimée par les *homos sapiens*, il est possible de retrouver qu'elle a comme substrats naturels uniquement le GSSG et le NADPH, et a comme

²⁵ Voir en Annexe H pour une description simple de la numérotation.

produits naturels le GSH et le NADP⁺. Pour cette protéine, on retrouve quelques activateurs métalliques comme les citrates et phosphates de sodium, et quelques activateurs organiques tel la clindamycine et mélatonine. On retrouve aussi quelques inhibiteurs métalliques tel le cadmium et le zinc, et plusieurs inhibiteurs organiques comme le nitrofurantoïne et la morphine. Par la suite, le site web répertorie les constantes d'affinités de chaque interaction ; soit une valeur de constante d'inhibition (K_i) de cette enzyme de l'ordre de 0.0165 mM pour la morphine (Senturk, Kufrevioglu, & Ciftci, 2009), et ainsi de suite. Cette meta-base de données permet donc d'obtenir le portrait global des données obtenues pour chaque enzyme.

2.2.7.1 Exemples de régulation détaillée

Les régulations par substrat, produit, activateur et inhibiteur sont variées. La diversité de types de régulation est singulière, tout comme la forme de leur représentation mathématique. Deux exemples de telles descriptions mathématiques sont présentés aux points suivants, respectivement pour la diffusion facilitée du glucose au niveau du cerveau à travers la membrane cellulaire à l'aide du transporteur de glucose pour astrocytes (GLUT1) et la phosphorylation de ce glucose intracellulaire par l'hexokinase (HK); soit les deux premières étapes d'approvisionnement de nutriment sucré de ces gliocytes.

2.2.7.1.1 Cinétique de la GLUT1

L'expression de la cinétique réactionnelle de la GLUT1 présentée à l'Équation 1 provient d'une simplification de Cleland effectuée par Duarte à partir de l'équation de King, permettant de remplacer des constantes de flux par des paramètres cinétiques moins important (Cleland, 1963; Duarte, Morgenthaler, Lei, Poitry-Yamate, & Gruetter, 2009; King & Altman, 1956). Aussi, l'expression utilise l'hypothèse que l'isomérisation du transporteur découplé est très rapide ; que le temps requis par l'enzyme pour se rendre disponible à l'extracellulaire pour acheminer le glucose vers l'intérieur de la cellule est suffisamment rapide pour en négliger la cinétique, bref que celle-ci n'est pas limitante.

$$v = V_{max} * \frac{G_{out} - \frac{G_{in}}{K_{eq}}}{K_M^{G_{out}} * \left(1 + \frac{G_{in}}{K_M^{G_{in}}}\right) + G_{out} * \left(1 + \frac{G_{in}}{K_{ii}}\right)}$$

Équation 1 : Représentation mathématique de la cinétique du transporteur de glucose (GLUT1).

La signification des symboles utilisés dans l'Équation 1 est présentée dans le Tableau 2.

V_{max}	Taux apparent maximal de transport
G_{in} et G_{out}	Concentrations intracellulaire et extracellulaire de GLC
K_{eq}	Constante d'équilibre réactionnel
$K_M^{G_{in}}$ et $K_M^{G_{out}}$	Constante d'affinité de type <i>Michaelis-Menten</i> pour le G_{in} et G_{out}
K_{ii}	Constante d'iso-inhibition par le G_{in}

Tableau 2 : Signification des variables et paramètres de l'Équation 1

2.2.7.1.2 Cinétique de la HK

Un modèle de cinétique pour l'hexokinase des érythrocytes est présenté à l'Équation 2. Lors de l'établissement de la relation, Gerber a considéré que la HK opérait par équilibres aléatoires rapides avec une abondance de substrats sucrés (Gerber, Preissler, Heinrich, & Rapoport, 1974). Aussi, il a négligé les différentes cinétiques de formation de complexes substrat-enzyme pour ne conserver uniquement les dissociations des complexes enzymatiques, considérées étapes limitantes et déterminantes de la cinétique enzymatique.

$$v = \frac{V_1 \left(\frac{[MgATP]}{K_{MgATP}} \right) + V_2 \left(\frac{[MgATP][Mg]}{K_{MgATP}K_{MgATP,Mg}} \right)}{1 + \frac{[MgATP]}{K_{MgATP}} + \frac{[Mg]}{K_{mg}} + \frac{[MgATP][Mg]}{K_{MgATP}K_{MgATP,Mg}} + \left(\frac{[G6P]}{K_{Glc,G6P}} + \frac{[BPG]}{K_{Glc,BPG}} \right) \left(1 + \frac{[Mg]}{K_{Mg}} \right) + \frac{[BPG]}{K_{BPG}} + \frac{[Mg][BPG]}{K_{Mg}K_{Mg,BPG}}}$$

Équation 2 : Description de la cinétique enzymatique de l'hexokinase.

La signification des variables utilisées dans l'Équation 2 est présentée dans le Tableau 3.

Les exemples des deux (2) derniers points comportent plusieurs constantes à déterminer. L'identification de ces paramètres est une discipline en soit ; habituellement réalisé par lissage du modèle simulé contre des données expérimentales. Ainsi, elles sont trouvées par estimations assistées par ordinateur ; le groupe de paramètres choisi est donc celui qui permet de représenter le mieux les données expérimentales.

Toutefois, l'identification d'un tel nombre de paramètres pour chaque composante interagissant avec chacune des enzymes est une tâche colossale. Or, il est possible de décrire avec une erreur jugée acceptable toutes les enzymes considérées dans le cadre de ce projet grâce à une forme mathématique simplifiée, soit la cinétique de type Henri-Michaelis-Menten.

V_1	Taux apparent maximal avec saturation de MgATP et GLC à concentration nulle de Mg
V_2	Taux extrapolé maximal par activation de Mg
$[Mg]$	Concentration de complexes enzyme-Mg
$[MgATP]$	Concentration de complexes enzyme-MgATP
$[G6P]$	Concentration de complexes enzyme-G6P
$[BPG]$	Concentration de complexes enzyme-(2,3) biphosphoglycérate (BPG)
$K_{Glc,G6P}$	Constante de dissociation du complexe enzyme-GLC-G6P
$K_{Glc,BPG}$	Constante de dissociation du complexe enzyme-GLC-BPG
K_{Mg}	Constante de dissociation du complexe enzyme-Mg
K_{BPG}	Constante de dissociation du complexe enzyme-BPG
$K_{Mg,BPG}$	Constante de dissociation du complexe enzyme-Mg-BPG
K_{MgATP}	Constante de dissociation du complexe enzyme-MgATP
$K_{MgATP,Mg}$	Constante de dissociation du complexe enzyme-MgATP-Mg

Tableau 3 : Signification des variables et paramètres de l'Équation 2

2.2.7.2 Régulation simplifiée

En plus des cinétiques d'ordre zéro et proportionnelles à la concentration de substrat, la cinétique de type Henri-Michaelis-Menten (H.M.M.) est beaucoup plus stable et rapide à résoudre. De forme identique à la cinétique de Briggs-Haldane (B.H.)²⁶, celle-ci permet de décrire les interactions entre la majorité des enzymes et leur substrat. Des cinétiques dérivées de cette première ont été établies au fil du temps afin de décrire les cinétiques de croissance de microorganismes en fonction de la concentration de substrat. Ainsi, le modèle cinétique décrivant la cinétique enzymatique de H.M.M. et ceux décrivant le taux de croissance de microorganismes de Monod, Contois, Moser, Tessier et Blackman sont présentés au Tableau 6.

²⁶ Malgré qu'elles considèrent un même schéma réactionnel et une quantité constante d'enzymes, l'hypothèse de rédaction des cinétiques de B.H. et H.M.M. sont différentes. En effet alors que B.H. ont considérés une variation temporelle nulle du complexe (soit un état quasi-stationnaire), H.M.M. ont pour leur part considéré une variation temporelle nulle des réactions d'association et de dissociation du complexe (soit un équilibre instantané).

Modèle de Henri-Michaelis-Menten	$v = v_m \left(\frac{S}{K_{a-S} + S} \right)$
Modèle de Monod	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_{a-S} + S} \right)$
Modèle de Comptois	$\mu = \mu_m \left(\frac{S}{K_{a-SX} + S} \right)$
Modèle de Moser	$\mu = \mu_m \left(\frac{S^n}{K_{a-S} + S^n} \right)$
Modèle de Tessier	$\mu = \mu_m \left(1 - \exp \left(- \frac{S}{K_{a-S}} \right) \right)$
Modèle de Blackman	$\mu = \mu_m \quad \text{pour } S \geq 2K_{a-S}$ $\mu = \mu_m \left(\frac{S}{2K_{a-S}} \right) \text{ pour } S < 2K_{a-S}$

Tableau 4 : Modèles cinétiques à deux paramètres

Différents autres modèles cinétiques ont été proposés afin de décrire avec la plus grande fidélité aussi les phénomènes biologiques d'inhibition. Ainsi des modèles enzymatiques comme celui de Hill et les nombreuses possibilités d'inhibition mathématiquement démontrables, tel le modèle d'Andrews²⁷, sont présentés au Tableau 5. Dans ce tableau on retrouve aussi une équation sinusoïdale utilisée en modélisation permettant une inhibition, une activation ou un changement d'état plus ou moins brusque autour de la valeur critique.

Modèle de Hill ²⁸	$\mu = \mu_m \left(\frac{S^n}{(K_{a-S})^n + S^n} \right)$
Modèle d'inhibition compétitive par C	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_{a-S} \left(1 + C/K_{i-C} \right) + S}$
Modèle d'inhibition in-compétitive par C	$\mu = \mu_m \frac{S}{\left(\frac{K_{a-S}}{\left(1 + C/K_{i-C} \right)} + S \right) \left(1 + C/K_{i-C} \right)}$

²⁷ Le modèle d'Andrews est une simplification particulière d'une inhibition non-compétitive par le substrat.

²⁸ La cinétique est coopérative négative si n est inférieur à 1, n'est pas coopérative avec n vaut 1 et coopérative positive si n est supérieur à 1.

Modèle d'inhibition non-compétitive par C^{29}	$\mu = \mu_m / \left(\left(1 + K_{a-s}/S \right) \left(1 + C/K_{i-c} \right) \right)$
Modèle d'Andrews	$\mu = \mu_m \frac{S}{K_{a-s} + S + S^2/K_{i-s}}$
Sinusoïdale	$v = v_m / \left(1 + EXP(-n(S - S^*)) \right)$

Tableau 5 : Modèles cinétiques à plus de deux paramètres

La signification des variables utilisées dans le Tableau 4 et le Tableau 5 est présentée dans le Tableau 6 ci-dessous.

v ou μ	Taux enzymatique ou de croissance
v_m ou μ_m	Taux maximal apparent enzymatique ou de croissance
S ou S^*	Concentration en substrat ou critique en substrat
X	Concentration en biomasse
C	Concentration en composé C
K_{a-x}	Constante d'affinité de l'enzyme ou microorganisme avec le composé x
K_{i-x}	Constante d'inhibition de l'enzyme ou microorganisme avec le composé x
n	Puissance de la cinétique, coefficient de Hill ou intensité de la variation

Tableau 6 : Signification des variables et paramètres utilisés dans le Tableau 4 et le Tableau 5

La modélisation permet de mieux comprendre l'organisme comme étant un système où les événements métaboliques sont habituellement fortement inter-reliés.

Typiquement, en culture de cellules, une telle modélisation permet de prévoir l'alimentation du substrat principal, le retrait d'un produit ou le contrôle d'une toxine afin de maintenir l'organisme dans un état optimal. Aussi une telle modélisation permet d'envisager des pistes de contournement et de régulation de ces points critiques inhibés afin d'en diminuer l'impact, ou d'utiliser ce phénomène pour bloquer une voie moins utile et collimater les substrats vers d'autres voies importantes.

²⁹ Lorsque $K_{i-s} \gg K_{a-s}$, on retrouve le modèle de Andrews.

2.2.7.3 Régulation énergétiques

Alors que certaines régulations ont un rôle d'ajustement fin pour certaines voies, d'autres ont un rôle majeur dont les impacts se répercutent sur de nombreuses enzymes. C'est par les voies qu'elles contrôlent et la portée des impacts métaboliques que l'on détermine l'importance relative de certaines régulations ; les régulations du métabolisme central sont donc cruciales.

Dans les prochaines sous-sections, certains points principaux de contrôle seront exposés. Dans l'ordre, les régulations de la voie d'EMP par ses deux premières kinases (HK et PFK) et de la voie de PhOx par son potentiel seront exposées.

2.2.7.3.1 Régulation de la voie d'EMP par ses kinases

Dans des conditions normales, la glycolyse est contrôlée par ses premières kinases. Elles assurent un juste approvisionnement par différents moyens de contrôle.

En plus de la présence pondérée de transporteurs de glucose en surface de la cellule qui régulent l'entrée de substrat à la cellule, l'enzyme hexokinase agit comme une valve de contrôle en entrée, se fermant graduellement afin d'éviter tout débordement en glucose phosphaté. En effet, l'HK diminue son activité graduellement en fonction de la concentration de G6P ; lorsque cette concentration augmente, le flux maximal est réduit jusqu'à sa demie (50%). Ceci évite la consommation d'ATP pour phosphoryler davantage de GLC vers la formation de G6P lorsque ce n'est pas nécessaire, forçant alors indirectement une augmentation du glucose intracellulaire et un ralentissement inévitable du transport de glucose vers la cellule. Le type d'inhibition sigmoïdal est utilisé entre autre avec succès par Leduc (Leduc, Tikhomiroff, Cloutier, Perrier, & Jolicoeur, 2006).

Par la suite, l'enzyme phosphofructokinase (PFK) est pour sa part inhibée de manière allostérique par un co-substrat lorsque celui-ci est à une concentration trop élevée. Effectivement, lorsque l'ATP est à une concentration trop élevée, le G6P n'est pas converti en FBP, mais est plutôt disponible pour la voie de WDH et la glycogénèse.

Enfin, il est important de noter qu'il existe aussi des contrôles d'activation d'enzymes en aval par des composés en amont. Par exemple, dans le foie, la pyruvate kinase (PK) est activée par le fructose-1,6-biphosphate, empêchant ainsi l'accumulation de métabolites intermédiaires. Aussi, la PK est inhibée par phosphorylation due à une diminution du taux sanguin de sucre.

2.2.7.3.2 Régulation de la voie de PhOx par son potentiel

Enfin, pour n'expliciter qu'une parcelle des régulations présents dans la voie de phosphorylation oxydative, le signal régulateur le plus fort est celui du ratio de concentration d'ATP sur ADP. Ce ratio contrôle premièrement le transport de nucléotides à recharger vers l'intérieur de la mitochondrie (inversement pour les nucléotides chargés). En effet, l'adénosine translocatase (ANT) permet une diffusion facilitée du cytosol vers la mitochondrie en échangeant un ADP cytosolique pour un ATP mitochondrial. En cas de surcharge cytosolique ou de ralentissement de la PhOx, elle permet aussi l'échange inverse, soit d'ATP cytosolique pour un ADP mitochondrial.

Aussi, l'activité des complexes décrits à la section 2.2.5.4 est régulée par le potentiel électrochimique transmembranaire agissant sur les flux de production d'ATP et de consommation de NADH.

2.3 Modèle in-silico du métabolisme

Le nombre de flux réactionnels composant le métabolisme complet est régit par un nombre similaire de concentrations en métabolites et d'effets environnementaux. Une description absolue du métabolisme doit présenter chacune des interactions présentées à la section 2.2 de manière qualitative et quantitative. De plus, une description temporelle du métabolisme doit tenir compte de tous ces facteurs et les interconnexions de manière simultanée³⁰.

Décrire et calculer en vue de reproduire et prédire un tel système est une tâche imposante ; les modèles sont alors grandement simplifiés. Or, depuis l'arrivée d'ordinateurs performants, la rédaction de modèles de plus en plus complexes, impliquant par ailleurs les régulations métaboliques de la sous-section 2.2.7 est dorénavant imaginable (Aubert & Costalat, 2005; Garfinkel, 1966; Nazaret, Heiske, Thurley, & Mazat, 2009; Palsson, Price, & Papin, 2003; Pellerin & Magistretti, 1994; Raichur, Vali, & Gorin, 2006; Vali et al., 2007).

³⁰ Par interactions, on distingue ici le fait que les produits générés par une réaction alimentent la réaction suivante et que certains composés régulent à la hausse ou à la baisse, l'activité des enzymes en amont et/ou en aval.

2.3.1 État des lieux en modélisation

Effectivement, depuis l'arrivée d'ordinateurs, les limites du calcul mathématique ont été repoussées graduellement, au point où la modélisation est maintenant un domaine de toute discipline permettant d'expliquer le passé, de représenter la réalité et de prédire l'avenir. En modélisation métabolique, les avenues sont identiques. Tel que présenté au Tableau 7, soutenu par la Figure 9, un tel outil de modélisation construit sur les mêmes bases que tout outil de contrôle de type Entrées/Sorties pourra éventuellement effectuer un diagnostic hâtif de maladies comme la MP.

<i>Objectif</i>	<i>Moyen</i>	<i>Correspondance médicale</i>	<i>Connus</i>	<i>Inconnus</i>
Comprendre	Synthèse	Maladie de Parkinson	E / S	P
Prédire	Analyse	Diagnostic hâtif	E/ P	S
Contrôler	Instrumentation	Thérapie	P / S	E

Tableau 7 : Résumé des objectifs de modélisation de procédés d'un point de vue médical

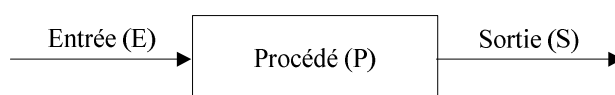


Figure 9 : Schématisation de contrôle en modélisation

La représentation courante d'un tel procédé métabolique est décrite par l'Équation 3 ci bas³¹. Les symboles présents dans cette équation sont présentés au Tableau 8.

$$\partial S / \partial t = M \cdot v - \mu \cdot S$$

Équation 3 : Représentation mathématique de base de modélisations métaboliques

$\partial S / \partial t$	Dérivée de S par rapport au temps.
M	Matrice stœchiométrique des flux métaboliques
v	Vecteur des flux réactionnels
μ	Taux de croissance
S	Vecteur de concentrations de métabolites

Tableau 8 : Description des symboles utilisés l'Équation 3

³¹ Pour ces travaux, le taux de croissance est considéré nul et les variations spatiales sont négligées pour ne conserver que les variations temporelles.

2.3.2 Modélisation statique des flux métaboliques

Différentes approches nécessitant différentes hypothèses sont actuellement employées pour résoudre cette équation. Parmi celles-ci, la plus courante est l'analyse de l'équilibre de flux réactionnels (FBA)³². Cette méthode est intéressante pour les systèmes stables puisqu'elle requiert que les variations biologiques soient considérées nulles. Cette hypothèse d'équilibre quasi-stationnaire est nécessaire afin d'effectuer l'analyse des flux réactionnels. En effet, la mathématique derrière l'analyse repose sur l'idée que l'Équation 3 soit nulle (que la variation temporelle des substrats soit nulle). La résolution de l'équation ainsi simplifiée est possible, toutefois plus le schéma métabolique sera embranché, plus la quantité d'informations supplémentaire requise sera grande afin de boucler le bilan.

Enfin, par définition, cette analyse ne parviendra jamais à capter les variations et dynamiques de systèmes métaboliques comme celui de la neuro-dégénérescence étudiée dans ce projet. De telles dynamiques requièrent l'accumulation et/ou l'épuisement de métabolites, ce qui n'est pas possible en négligeant les variations temporelles.

2.3.3 Modélisation dynamique du métabolisme

Ainsi, le modèle présenté dans ce mémoire permet de telles variations afin de permettre une description transitoire, soit pouvant agir et réagir de manière dynamique à des perturbations et des événements stressants. Or, une description plus adéquate des systèmes évolutifs augmente le nombre d'informations requises pour résoudre l'Équation 3.

Grâce à ce type de modélisation, il est possible d'évaluer des variations temporelles comme des vitesses d'épuisement et d'accumulation de métabolites. Une telle situation d'accumulation est d'ailleurs présentée en Annexe J.c ; l' α -syn forme des agrégats puis des LB dans les zones du VTA et du SNpc au cerveau menant à l'apparition de la maladie de Parkinson.

2.3.3.1 Observation de dynamiques

Naturellement, les organismes peuvent présenter une grande variété de dynamiques. Pour n'en nommer que quelques-unes, la gluconymie varie en fonction de l'apport en nourriture (entre les

³² L'acronyme FBA est mis pour *Flux Balance Analysis*,

périodes de satiété et de jeûne), l'osmolarité varie en fonction de l'apport en eau (entre les périodes de soif et d'hydratation), l'activité neuronale en fonction de l'état fonctionnel du cerveau (entre les périodes d'éveil, de sommeil lent et de sommeil paradoxal). Ce type de réponses dynamiques est le fruit de l'évolution, en réponse à des variations répétées ou ponctuelles, soit internes ou externes.

Tel que présenté dans l'introduction, une des hypothèses globales du projet est basée sur l'hypothèse que des systèmes similaires peuvent répondre différemment à une même perturbation ; soit par exemple qu'un organisme sain et un autre identique et affecté de modifications génétiques ou modification par découplage énergétique peuvent présenter des comportements différents.

Dans le but de cerner les implications de la MP, ces perturbations devront être observées et mesurées d'un point de vue métabolique. Ainsi, ces perturbations ont été réalisées en laboratoire pour détecter la présence de variations fonctionnelles chez de tels couples d'individus. Alors que le choix de perturbations est expliqué au Chapitre 3, la forme des perturbations imposées et la forme des réponses attendues est présentée ici.

2.3.3.2 Type de perturbation

Différentes perturbations de systèmes sont typiquement utilisées en analyse de signaux afin d'étudier la réponse d'un système, soit l'impulsion, l'échelon, le créneau, et la pente. Ces perturbations typiques présentées à la Figure 10 ont été créées afin de permettre d'étudier le comportement de systèmes libérés, sans stabilité artificielle et observateur. Un système de contrôle adéquat permet de récupérer de telles perturbations en effectuant le ou les changements qui s'imposent.

Étant donné les hypothèses du projet, les perturbations de type créneau sont utilisées pour évaluer la réponse du système en réaction à un découplage mitochondrial puisqu'elles sont jugées plus réalisables d'un point de vue expérimental et qu'elles permettent un retour à l'état initial. Or, pour la perturbation génétique, la modification est permanente et ne peut donc pas être adéquatement représentée par un schéma de perturbation typique. La perturbation se rapprochant le plus d'une telle situation est la représentation de l'échelon du passé, soit antérieur aux données que l'on peut acquiesionner.

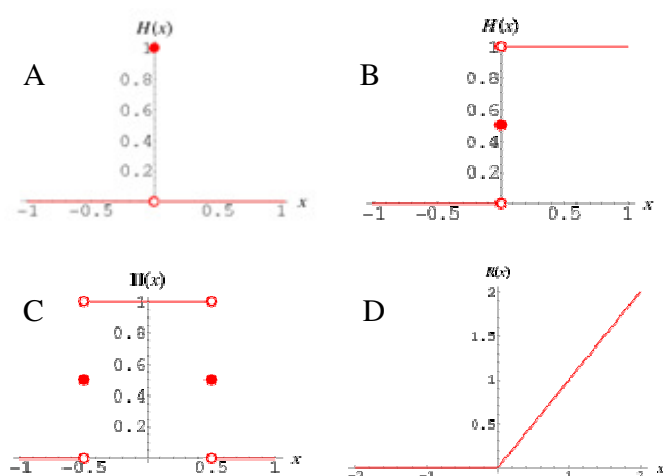


Figure 10 : Représentation de perturbations typiques :
Impulsion (A), Échelon (B), Créneau (C) et la Rampe (D)

Dans les deux cas, par différentes mesures, il sera possible d'effectuer un suivi de contrôle en temps réel ou à posteriori des cellules qui tenteront de récupérer l'homéostasie.

2.3.3.3 Variantes de réponses attendues

Différents cas de figure habituels sont possibles ; l'ensemble de ceux-ci peut être synthétisé en une figure qui regroupe les différentes possibilités et variations, tel que présenté à la Figure 11.

Les moments 1 et 2 sont respectivement les moments de début et de fin de perturbation. Les étiquettes identifient les variations possibles plus ou moins importantes ; soient θ : l'intensité de la descente durant le stress, δ_A : le niveau le plus bas atteint durant le stress, δ_T : le décalage temporel avant la remontée suite au stress, ϕ : l'intensité de remontée après le stress, ε : le décalage du niveau stable après rétablissement, et τ : le temps requis pour recouvrer le niveau stabilisé.

Alors que ces variantes sont habituellement couplées dans les systèmes biologiques, la description de chacune peut permettre de mieux discerner les impacts de différents types de stressseurs sur un système, permettant d'en augmenter la compréhension.

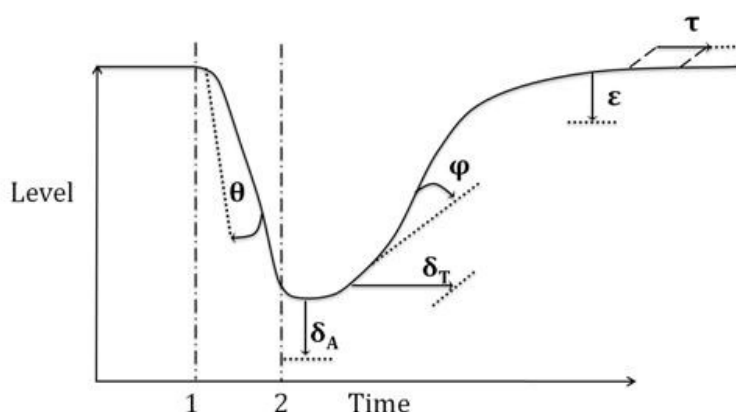


Figure 11 : Représentation des possibilités et variations d'un système de contrôle suite à une perturbation de type créneau.

2.3.4 Outils de modélisation et d'analyse

Il existe différents outils de modélisation permettant de représenter un tel comportement dynamique en tenant compte des interactions métaboliques. Un des plus fréquemment utilisé est la résolution d'équations différentielles ordinaires, telle que celle présentée à l'Équation 3. Différentes méthodes de résolutions du système d'équations sont développées et de nombreux logiciels permettent leur utilisation. La résolution du système d'équations différentielles présenté dans cet ouvrage est numérique.

Le logiciel utilisé dans le cadre de ce projet provient de la société *The MathWorks* : *Matlab*[®]. Cet outil est choisi puisqu'il permet la manipulation d'équations sous forme matricielle, l'affichage de courbes et de données, la rédaction d'algorithmes et surtout l'utilisation de boîtes à outils telle que le *Systems Biology Toolbox*.

2.3.4.1 Boîtes à outils de modélisation

Le *Systems Biology Toolbox 2* est la seconde itération d'une boîte à outils à code source ouvert créée pour *Matlab* par Herning Schmidt (Schmidt & Jirstrand, 2006). Elle permet la construction de modèles métaboliques en un seul fichier de format texte « .txt » qui est simulable comme un tout, dispensant alors les algorithmes de mise en équations différentielles, d'appel de fichiers et de simulations dans de nombreux fichiers interconnectés. Ainsi, les équations différentielles, les

états initiaux, les cinétiques, les variables, les paramètres et les évènements sont tous rédigés de manière intuitive l'un à la suite de l'autre, offrant une vue d'ensemble.

La boîte contient aussi des fonctions d'affichages de résultats de modélisation conjointement à des mesures expérimentales et aussi des outils d'analyses statistiques. Par son compilateur rapide, la boîte permet une diminution du temps de calcul requis. Finalement, la boîte à outils permet d'effectuer grâce à différents solveurs une estimation de paramètres cinétiques par itérations en comparant les trajectoires de métabolites choisies et en modifiant les valeurs des paramètres selon un plan défini, dans le but de représenter le mieux possible les courbes temporelles produites en laboratoire. Or une telle implémentation mathématique ne peut devenir réellement significative et appliquée uniquement si elle est adaptée et calibrée à l'aide de données biologiques.

2.4 Approche système

Ayant effectué une revue rapide de l'état de l'art dans ces différents domaines, il est possible de dresser sous forme synthétique l'approche de ce projet.

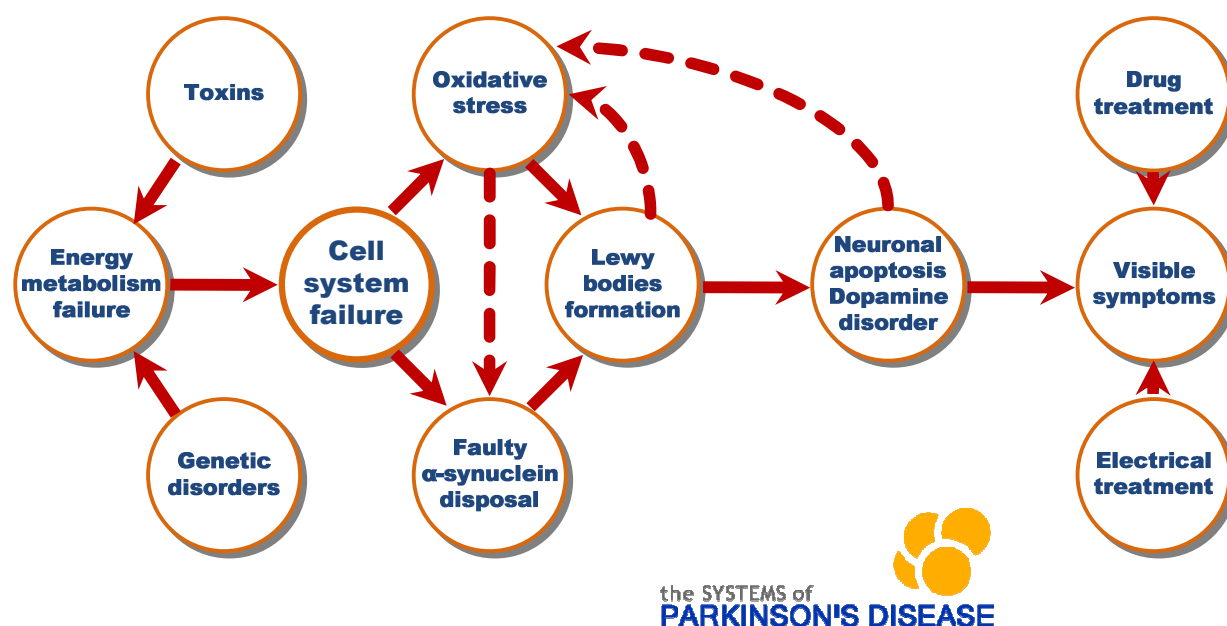


Figure 12 : Approche système de la maladie de Parkinson.

Tel que présenté à la Figure 12, un stress toxicologique et génétique est à l'origine de défaillances du métabolisme énergétique qui mène à une dérégulation cellulaire. Par l'augmentation du stress oxydatif et la détérioration des processus de gestion de l'alpha-synucléine endommagée, cette

dernière mène de manière dégénérative à la formation de corps de Lewy qui mène éventuellement à la mort cellulaire et l'apparition de symptômes.

2.5 Objectifs spécifiques

Dans le contexte d'une maîtrise effectuée dans un groupe de recherche sur le développement d'outils en génie métabolique, les objectifs spécifiques étaient de :

- Concevoir un modèle cinétique d'équations différentielles ordinaires décrivant la dynamique des métabolites des cellules d'intérêt;
- Mesurer la dynamique du métabolisme de cellules cérébrales (saines et pathologiques) *in vitro*, à l'aide d'approches analytiques intégratives (métabolome), suite à des perturbations permanentes (génétique) ou temporaires (toxicologique);
- Calibrer le modèle mathématique aux données expérimentales obtenues;
- Identifier les implications de stress liés à la pathologie sur les voies métaboliques décrites dans le modèle;

En réalisant une partie ou l'ensemble de ces objectifs, ce projet résultera en des données et outils de modélisation nouveaux, utiles à la recherche sur les implications de l'énergétique cellulaire de la maladie de Parkinson.

CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

Ce chapitre présente les principales méthodes nécessaires pour générer les résultats expérimentaux présentés dans ce mémoire. Une série d'étapes de traitement ont été requises pour obtenir les données sous une forme utile. Dans le présent travail de recherche sur la maladie de Parkinson, l'étude de *cellules cérébrales* a été jugée essentielle.

Tout comme la médecine utilise autant des techniques d'imageries non destructrices que des techniques chirurgicales très invasives permettant de quantifier et d'observer des variations temporelles, le génie métabolique possède des outils similaires.

Dans les laboratoires disponibles dans le cadre de ce projet, de tels outils de mesure non-invasifs et destructeurs étaient présents. En effet, une fois optimisées, des techniques de quantification comme la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire peuvent être couplées à des systèmes de perfusion de milieu de culture pour bioréacteur permettant de mesurer la concentration de différentes molécules présentes à l'intérieur de tissus et cellules sans les

endommager. (Ben-Tchavtchavadze, Chen, Perrier, & Jolicoeur, 2009; Ben-Tchavtchavadze, Perrier, & Jolicoeur, 2007; Gmati, Chen, & Jolicoeur, 2005). Cette méthode nécessite toutefois un nombre d'éléments vivants demeurant dans la zone de lecture de l'appareil.

D'autres techniques plus précises couplant la spectroscopie de masse à la chromatographie liquide permettent non seulement de déterminer la présence de molécules mais aussi d'en quantifier la concentration. Cette méthode est toutefois destructive puisqu'elle requiert un extrait exempt de protéines, nécessitant une rupture complète de toutes les membranes plasmiques.

Dans ces deux cas, un nombre élevé de cellules doit être obtenu. L'obtention d'un bassin utile de cellules provient soit de cellules cultivées in-vitro ou de tissus récoltés ex-vivo, nécessitant dans les deux cas rigueur et minutie.

Dans ce mémoire, les méthodes reliées à :

- la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire couplée à un bioréacteur perfusé avec du milieu conditionné, garni de PET biocompatible tissé et d'un lit de pièces de tranches de tissus cérébral,
- l'amplification en flasques de cellules primaires adhérentes provenant de la zone mésencéphaliques et triturées pour extraction et analyse par chromatographie et spectroscopie (tel qu'annoncé à la sous-section 2.1.4 - Les zones cérébrales touchées),

ne seront pas présentées ici puisque leur reproductibilité était faible et les défis manipulatoires trop élevés. Par contre les expériences effectuées sur les tranches fraîches complètes de cerveau de souris extraites ex-situ et analysées in-vitro en chromatographie liquide couplée à une spectroscopie de masse (LCMS) seront détaillées.

3.1 Plan expérimental

Dans le but de comparer la régulation énergétique de modèles parkinsoniens, il sera nécessaire de générer des données fiables provenant des deux (2) facteurs identifiés comme étant les causes hypothétiques de la dérégulation énergétique, soit un désordre génétique ou un désordre causé par une exposition à un stresser toxicologique.

Des expériences avec contrôle biologique parallèle seront réalisées en triplicatas pour les deux (2) facteurs. Ainsi, il faut identifier un désordre génétique et un stresser toxicologique intéressants à réaliser d'un point de vue expérimental dans le cadre d'une maîtrise.

3.1.1 Expériences sur les tranches de cerveau

L'option d'effectuer des mesures sur des tranches fraîches de cerveau de souris n'était pas l'avenue initiale. Toutefois, l'opportunité d'une collaboration avec un professeur titulaire du Département de Pharmacologie de la Faculté de Médecine de l'Université de Montréal, Groupe de Recherche sur le Système nerveux Central, dont l'axe de recherche est la neuropharmacologie a élargi les possibilités.

Grâce à sa collaboration, il fut possible d'effectuer les travaux expérimentaux avec des éléments biologiques plus représentatifs que s'ils avaient été réalisés sur une lignée immortelle de cellules cultivées en suspension. Malgré les défis supplémentaires, l'usage de cellules primaires est une avenue intéressante puisqu'elle ne biaise pas le phénotype comme le fait une lignée cellulaire.

Aussi, son laboratoire bien équipé, et son personnel expérimenté ont permis de réaliser ces expériences sans optimisation requise. Aussi, puisque ses protocoles sont complètement développés et reconnus par l'Université de Montréal, le Comité universitaire d'éthique de la recherche (CUER), et le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA), et sous recommandations du Conseil canadien de protection des animaux (CCPA), il fut possible de procéder rapidement.

3.1.2 Modèle génétique

La dopamine au cœur de l'axe de recherche de M. Trudeau, la maladie de Parkinson se retrouve aussi rapidement au centre des neuropathies qu'il étudie. Il détient des colonies de souris normales (WT, pour *wild-type*, à l'état sauvage), et deux (2) colonies de souris ayant subi un traitement de mutagenèse ciblée (KO, pour *Knock-Out*, invalidation génique). Les lignées de souris sont invalidées sur des gènes codant pour des protéines impliquées dans la maladie de Parkinson, soit les gènes de PARK 2 ou PARK 7 codant respectivement pour les protéines Parkin et de DJ-1. Tel que présentés brièvement à la section 2.1.2.1 et en détails en annexe A.b, ces deux gènes sont de type récessif ; ainsi un phénotypage est requis pour l'identification des individus homo- ou hétéro-zygotes.

Parkin assure l'identification de l'alpha-synucléine par une grappe d'ubiquitines dans le but de dégrader cette α -syn, son invalidation force l'accumulation cette dernière et mène théoriquement vers la formation éventuelle des corps de Lewy et la neuro-dégénérescence. Ce type de mutation est parmi les plus courants chez les patients souffrant de parkinsonisme autosomal récessif précoce (Itier et al., 2003).

Pour sa part, la protéine DJ-1 agit comme protéine chaperon et est aussi responsable d'une part de la gestion du stress oxydatif au niveau du cerveau.

Ayant développé un modèle d'agrégation de protéines menant à la MP, le premier type (Parkin KO) est plus intéressant pour le projet de recherche global, au delà de cette maîtrise.

3.1.3 Modèle toxicologique

Aussi, dans le cadre de ses activités de recherche, M. Trudeau utilise un ionophore, soit le CCCP (*carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone*). À cause de ses caractéristiques physico-chimiques, cet ionophore est un découpleur important du complexe 1 de la Phox, réduisant de manière constante le gradient électrochimique existant de part et d'autre de la membrane mitochondriale. Affectant l'énergétique cellulaire de cellules dont les neurones dopaminergiques, cette molécule est donc choisie comme stresser toxicologique.

3.2 Dissection de l'animal et tranches de cerveau

L'animal adulte est premièrement endormi dans une cloche en verre avec du 2-bromo-2-chloro-1,1,1-trifluoroéthane (*Sigma Aldrich*® #B4388). Lorsque sa respiration cesse, la tête est coupée à l'aide d'une paire de ciseaux chirurgicaux. Le scalp et le crâne sont retirés par la suite à l'aide d'une paire de petits ciseaux et de forceps pointus. Le cerveau à découvert, il est aspergé de fluide cébrospinal artificiel (ACSF, mis pour *Artificial Cerebro-Spinal Fluid*) à l'aide d'un flacon laveur et est retiré délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur en passant sous l'encéphale afin de le détacher de la moelle épinière, et est immédiatement déposé dans un bécher d'ACSF à 4°C pour quelques secondes.

Une fois refroidi, l'organe est déposé sur une planche de dissection et à l'aide d'une lame de rasoir neuve, le bulbe olfactif et le cervelet sont retirés. Par la suite, à l'aide de colle contact, il est fixé à l'aide de forceps sur la plaque de coupe du microtome de manière à faire des coupes

frontales. Les tranches d'une épaisseur de 300 μm sont coupées à l'aide d'un microtome vibrant (Leica VT1000S). Durant l'opération, l'organe baigne dans le bassin de coupe rempli d'ACSF oxygéné à 4°C. Chaque tranche réalisée est recueillie rapidement, à l'aide d'un pinceau synthétique et est déposée dans un vase de Pétri rempli d'ACSF oxygéné au fond duquel un filtre est placé afin de prévenir l'adhésion des tranches au vase.

3.2.1 Préparation du milieu de survie

Étant l'environnement de remplacement du cerveau, le milieu de culture se doit d'être bien dosé. Sa composition en sels et en sucre, et son osmolarité (300 mOsm) se doivent d'être précis. La composition de l'ACSF, soit la concentration des composés et leur identifiant Sigma Aldrich® (fournisseur), est présentée au Tableau 9 :

Product	Sigma Aldrich	Concentration (mM)
NaCl	S9625	125
KCl	P45-4	2.5
KH ₂ PO ₄	P5379	0.3
NaHCO ₃	S5761	26
CaCl ₂	C4901	2.4
GLC	G7021	10
MgSO ₄	M7506	1.3

Tableau 9 : Composition de l'ACSF.

L'ACSF doit être utilisé rapidement, son osmolarité variant. Il doit être préparé 30 minutes avant son utilisation par saturation oxygène avec 5% de gaz carbonique.

3.3 Préparation de l'extrait

La préparation de l'extrait à analyser en chromatographie et spectrographie est réalisée en deux temps. Dans un premier temps, au laboratoire de pharmacologie de l'Université de Montréal, les tranches sont homogénéisées et leur métabolisme est arrêté. Par la suite, au laboratoire de génie métabolique de l'École Polytechnique de Montréal, les métabolites à quantifier sont extraites de l'échantillon et l'extrait est filtré en vue d'analyses. Ces deux premières phases sont présentées en détail ci-dessous.

3.3.1 Homogénéisation des tranches

Baignant dans ce vase de Pétri, deux (2) tranches de chaque extrait sont transférées à l'aide d'un pinceau synthétique vers un tube à centrifuger. Après une centrifugation rapide d'une (1) minute à 4°C, l'ACSF surnageant est retiré par vide à l'aide d'une pipette Pasteur en verre amincie sous flamme. Les tubes de centrifugation pré-pesés sont par la suite repesés afin d'en déduire la masse de l'échantillon cérébral.

Après l'addition de 200 µL d'une solution refroidie sur glace sèche de 80% volume de méthanol et eau, une homogénéisation est réalisée directement dans le tube à l'aide d'un pilon motorisé. Par la suite, une étape de mélange en vortex et de sonication en bain sont effectuées, puis ces premières étapes sont réalisées de nouveau.

Ces étapes permettent de rompre les membranes cellulaires et de précipiter les protéines, forçant l'arrêt du réactome. Ces échantillons de métabolisme cellulaire sont stockées à -80°C jusqu'à la prochaine étape, l'extraction.

3.3.2 Extraction de l'échantillon

À chaque tube est ajouté 0.2 g de sable permettant une meilleure homogénéisation. L'échantillon est resuspendu par mélangeur vortex et est micro-centrifugé à 21 000 G pour une durée de 7 minutes à 4°C. Le premier extrait est le surnageant contenant les métabolites, il est donc transféré à un second tube.

Par la suite, 0.2 ml d'une solution de 50% volume de méthanol et eau froid est ajouté au culot. Le contenu du tube est ensuite soumis à trois rondes de resuspension et vortex, sonication froide puis refroidissement. Le tube est encore micro-centrifugé à 21 000 G pour une durée de 5 minutes à 4°C. Le surnageant constitue le second extrait et sera à son tour ajouté au premier.

Une troisième et dernière extraction est effectuée par l'ajout de 0.2 mL d'eau glacée au culot. Le culot est resuspendu dans l'eau et micro-centrifugé à 21 000 G pour 3 minutes à 4°C dans le but de produire le troisième extrait qui est ajouté au deux premiers.

Finalement, le tube contenant le triple extrait est à son tour micro-centrifugé à 21 000 G pour 5 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite aspiré avec une seringue, un filtre de 0.2 µm lui est vissé et le liquide est filtré et injecté dans un flacon de verre comportant un couvercle vissable à

septum. Cet extrait est par la suite rapidement stocké à -80°C jusqu'à sa dilution éventuelle (si requise) avec une solution de 50% volume de méthanol et eau, et son analyse par méthodes LCMS.

3.4 Quantification des nucléotides

Avant l'analyse par LCMS, les échantillons sont dégelés et remélangés par vortex. Les échantillons sont gardés à une température de 4°C durant la période d'auto-échantillonnage par injection. Étant donné que les métabolites ne sont pas stables et se dégradent naturellement, et plus rapidement à température plus élevée, les cabarets d'auto-échantillonnages sont donc remplis de manière minimale afin de réduire la décomposition des métabolites durant l'analyse. Par la suite, ces échantillons sont re-stockés à -80°C.

Tel que réalisée avec succès par Hammami et al. (Hammami, Chen, Bronte, DeCrescenzo, & Jolicoeur, 2012), la quantification des nucléotides est réalisée avec un système composé d'un chromatogramme en phase liquide à ultra-haute pression de type 1290 couplé à un spectromètre de masse à triple quadripôles de type 6460 (Agilent Technologies®). Les nucléotides sont premièrement séparés en utilisant une méthode de pairage d'ions grâce à une colonne Symmetry C18 (Waters®) protégée par une colonne Security C18 (Waters®). Le DMHA (N,N-dimethylhexylanine, Sigma®) est utilisé comme agent de pairage d'ions et pour améliorer le ratio « signal sur bruit » en mode d'ionisation positif. La phase mobile est composée de deux tampons (A et B). Alors que le tampon A est composé de 10 mM d'acétate d'ammonium et de 15 mM de DMHA (pH 7.0), le tampon B 50/50% (v/v) est composé d'acétonitrile avec 20 mM de NH₄OAc (pH 7.0).

Le débit de la phase mobile est réglé à 0.3 mL/min et les plateaux et gradients linéaires de B suivants sont appliqués : 0 à 10 min à 10%, de 10 à 20 min de 10 à 30%, de 20 à 21 min de 30 à 60%, de 21 à 26 min à 60%, de 26 à 27 min de 60 à 10% et finalement de 27 à 35 min à 10% de B.

3.5 Quantification des sucres phosphatés et des acides organiques

Similairement, et tel que réalisé par Hammami (Hammami et al., 2012), les sucres phosphatés et acides organiques sont analysés avec le même système d'UPLC-MS en utilisant une pré-colonne et une colonne Hypercarb® (Thermo Fisher®). Pour cette analyse, la phase mobile est composée

de deux tampons (C et D). Les tampons sont respectivement composés de 20 mM d'acétate d'ammonium (pH 7.5) (C) et de 10% (v/v) de méthanol dans l'eau (D). Le débit de la phase mobile est le même et les plateaux et gradients linéaires suivants de C sont appliqués : de 0 to 5 min à 10%, 5 à 10 min de 10% à 20%, de 10 à 20 min de 20% à 100% of A, de 20 à 30 min à 100% A, de 30 à 32 min de 100% à 10% et finalement de 32 à 40 min à 10% de C.

3.5.1 Notes sur la quantification LCMS

La méthode de quantification repose sur la somme intégrale de l'aire sous la courbe du chromatogramme. Ensuite, en utilisant une courbe linéaire standard, on peut associer cette valeur à une concentration, celle de l'extrait. Enfin en utilisant le poids mouillé de la tranche, il est possible de calculer des concentrations spécifiques.

Puisqu'au-delà du domaine de la courbe standard celle-ci sature, dans le cas où une valeur d'aire soit à l'extérieur du domaine jugé standard, l'extrapolation est jugée inacceptable et une réanalyse diluée de l'échantillon est requise. Dans ce cas, la dilution est effectuée avec une solution de 50% (v/v) de méthanol et eau.

Ces méthodes de quantification de concentrations sont basées sur l'homogénéisation complète de tout l'échantillon biologique de tissus, soit que tous les composés et volumes s'y retrouvent additionnés. Ainsi, étant donné cette limite de la méthode d'extraction, le modèle d'équations différentielles doit considérer que toutes les réactions et interactions se produisent dans un seul volume moyen.

3.6 Quantification des espèces extracellulaires

Pour la quantification des composés extracellulaires, des échantillons de l'ACSF sont pris directement dans le vase de Pétri. Les quatre (4) composés majeurs (glucose, lactate, glutamine et glutamate) sont mesurés par des instruments usuellement utilisés pour analyser le sang (YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer®). Cette machine permet, entre autre, de mesurer en un échantillon deux (2) composés. Ainsi, deux (2) de ces machines étaient disponibles et on été utilisées en parallèle pour mesurer simultanément le glucose et le lactate, ainsi que la glutamine et le glutamate.

CHAPITRE 4 METABOLOMICS AND IN-SILICO ANALYSIS REVEAL CRITICAL ENERGY DEREGULATIONS IN ANIMAL MODELS OF PARKINSON'S DISEASE

4.1 Présentation de l'article « *Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease* »

Cette section reprend l'article intitulé « *Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease* ». Cet article a été soumis pour publication au journal « *PLOS Computational Biology* ».

Ce manuscrit présente un modèle dynamique novateur des voies métaboliques énergétiques cellulaires de cellules cérébrales pour l'étude de la maladie de Parkinson. Ce modèle a été développé et validé grâce à des données expérimentales provenant d'analyses du métabolome extrait de tranches fraîches de cerveaux de souris.

Deux (2) expériences sont présentées en les comparants avec des souris saines (WT, wild-type). Le premier cas à l'étude est la réalisation d'un stress avec un ionophore découplant la chaîne de transport d'électrons de la respiration oxydative sur les cellules WT. Le second cas à l'étude est composé de souris ayant subi une extinction sur le gène (*parkin-2*) responsable de l'identification de l' α -syn par de l'ubiquitine pour sa reconnaissance par le système de dégradation des protéines du protéasome.

Les observations majeures de ce travail sont doubles :

- Le modèle démontre, appuyé de données expérimentales, que les mécanismes biochimiques de régulation du métabolisme énergétique réussissent à s'adapter à un stress génétique soutenu;
- Le modèle démontre, appuyé de données expérimentales, que le métabolisme ne réussit pas à s'adapter à une dérégulation profonde de l'énergétique cellulaire suite à l'exposition du tissu à une toxine environnementale.

En effet, une réduction irréversible du niveau des navettes énergétiques est observée suite à un stress mitochondrial majeur. Malgré que les expériences et les simulations ne soient réalisées que

sur une fenêtre temporelle restreinte, les résultats permettent de proposer des principes de dérégulation énergétique rapide suite à un stress environnemental fort.

Similairement aux travaux présentés aux Annexes J, hypothétiquement, une fenêtre temporelle plus large nous permettrait sûrement d'observer une certaine adaptation métabolique. Aussi, durant la période d'adaptation, une quantité importante de toxines cellulaires (agrégats et ROS) serait générée, affectant de manière irréversible les tissus tel que réalisé précédemment (Cloutier & Wellstead, 2012). De telles hypothèses sont supportées par les travaux de modélisation intégrative liés à la maladie de Parkinson démontrant ces effets irréversibles induits sur de courts délais (Cloutier, Middleton, & Wellstead, 2012), le tout étant cohérent avec les cas de parkinsonisme induit par des drogues récréatives tel que décrit par Langston (Langston & Palfreman, 1995).

4.2 Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease

Running title : Metabolomics and In-silico Analysis of PD animal models

Pierre O. Poliquin¹, Mathieu Cloutier², Louis-Éric Trudeau³, Mario Jolicoeur^{1§}

1 Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC, Canada.

2 GERAD and Department of Chemical Engineering, École Polytechnique de Montréal, Montréal, QC, Canada.

3 Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

§Corresponding author: Dr M. Jolicoeur

Chemical Engineering Department

École Polytechnique de Montréal

Montréal, Canada, H3T 1J4

mario.jolicoeur@polymtl.ca

4.3 Abstract

Parkinson's disease (PD) develops in the human brain from a variety of factors. Although age is the principal risk factor, other etiological mechanisms have been identified, including genes and exposure to toxins. Deregulation of energy metabolism, mostly through the loss of Complex I efficiency, is involved in the disease progression in both the genetic and sporadic forms of the disease. Our objective in this study is to investigate energy deregulation in the cerebral tissue of animal models (genetic and toxin induced) of PD using an approach that combines metabolomics and mathematical modelling. In a first step, quantitative measurements of energy related metabolites in mouse brain slices revealed which pathways are affected by PD stress factors. In that regard, a genetic model of PD (parkin 2 defect) and a toxin induced (CCCP) model of PD were compared to control conditions (wild type animals). The results revealed a significant and sustained drop in ATP after toxin exposure, but not in the genetic model. In order to improve data analysis, a mathematical model of the relevant metabolic pathways was developed and calibrated with the experimental data, showing that a short-term stress response in nucleotides scavenging is most probably induced by the toxin exposure. In turn, the robustness of energy related pathways in the model explains how genetic perturbations, at least in young animals, are not sufficient to induce significant changes in terms of metabolite levels.

4.4 Keywords

Parkinson's Disease, Mathematical Modelling, Energy Metabolism, Feedback Regulation

4.5 Introduction

4.5.1 Background and energy deregulation in PD

Parkinson's disease is a pernicious neurodegenerative disease for which no cure exists. The main cellular hallmark of this lethal dementia is the formation cellular of inclusions named Lewy Bodies (Goedert, 2001; Uversky, 2007). These bodies are results of a degenerative metabolic process of alpha-synuclein protein aggregation involving failures in energy demanding systems such as protein disposal. Expression of this synucleinopathy's related symptoms stems from sufficient brain damage, mainly death of dopaminergic neurons (Rinne, Rummukainen, Paljarvi, & Rinne, 1989). Since the disease arises from different causes: environmental toxicity, genetic mutations, and brain aging, general disease prevalence is hard to define (Bergareche et al., 2004).

4.5.2 Environmental toxins

Farming toxins such as Paraquat (herbicide), Rotenone (pesticide) and Maneb (fungicide) are known to induce specific PD symptoms in animal models (Halbach et al., 2004). These toxins inhibit complexes 1 (Paraquat and Rotenone) and 3 (Maneb) of mitochondrial cellular respiration. Also, solvents like toluene and n-hexane, and carbon disulfide used in solvents and pesticides, are identified as cause of neuronal death by mitochondrial damage (Viartis, 2009). MPTP, inadvertently obtained in the incomplete synthesis of recreational drug MPPP, leads to PD apparition in days (Fermaglich, 1996; Langston et al., 1983; Miller, 2007). Similarly to other ionophores, MPTP uncouples cell respiration and leads to a complete shutdown of mitochondrial and further cellular processes.

4.5.3 Genetic causes

Genetic mutations concerns seven (7) different genes: PARK1, 3, 5, 8 (dominant) and PARK2, 6, 7 (recessive). Their protein counterpart are involved in neurotransmission (PARK1), recognition proteins to degrade (PARK2 and PARK5), production of dopamine synthesis' crucial amino acid (PARK3), management of stressful events (PARK6), management of oxidative stress (PARK7), and cycloskeleton and protein-protein interactions (PARK8) (NLoM, 2011). Even though familial Parkinson is not frequent (maximum of 20% of all PD cases), its research is important since elucidation of related dysfunctions could help to identify the root causes of idiopathic cases (Dawson & Dawson, 2003; Fahn & Sulzer, 2004; Nuytemans et al., 2010). Furthermore, the metabolic effect of such mutations is potentially important since, as for the environmental toxins, energy producing or energy demanding cellular processes are affected.

4.5.4 Aging

Cellular dysfunctions linking PD to aging are not completely identified, however it is known that the latter involves reduced availability of metabolic energy and increases amounts of cellular debris. Therefore, it is possible to affirm that this third factor is also linked to the energy control processes.

4.5.5 Approach and models

Fundamental to all biological systems, metabolic energy homeostasis is critical in highly consuming cells and tissues such as the brain. In order to measure the effects of PD related endo- and exogenous modifications to a healthy animal system, metabolites measurements will be performed on the two (2) following animal (mouse) models: the genetic (PARK2 knockout) model and the toxin induced (CCCP ionophore) model.

4.5.5.1 Genetic model

The genetic model of Parkinson's disease is chosen with PARK2 gene knockout. This gene situated on locus 6q25.2-q27 (Matsumine et al., 1997) and coding for protein E3-ubiquitin protein ligase, is usually named *parkin* (Kitada et al., 1998). Being a recessive gene, a heterozygote mice colony can be maintained, thus allowing sustained experiments. The parkin protein is part of the polyubiquitination process; it attaches the destruction signal marker (bundle of ubiquitine) on the targeted damaged protein. The impact of *parkin* gene knockout on the mice model induces small changes to the organism but strong modification for the cell metabolism to identify damaged protein such as unfolded alpha-synuclein to degradation by the Ubiquitine Proteasome System (UPS) (Itier et al., 2003). Without proper protein degradation systems, the cell accumulates damaged alpha-synuclein in LB aggregates and needs *de-novo* synthesis of all amino-acids contained in these proteins that could be reused by the cell, hence consuming a tremendous amount of cell energy. Furthermore, the presence of such aggregates was proven to competitively inhibit proteasomal activity and to allow aggregation's acceleration (Chen, Thorpe, & Keller, 2005).

4.5.5.2 Toxin model

Since the impact of MPTP on mice is not known, a similar toxin which its action on the cellular respiration is well known, CCCP (*carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone*) is used. Because of its physical chemistry, this ionophore is very powerful to uncouple the mitochondria's complex 1. The action of this mobile carrier results in a successive discharge of the pH gradient across the mitochondrial membrane, one proton at the time. If the mitochondria can't maintain the gradient, the following complete discharge of the mitochondria has a decisive impact on the

cell's state; without this proton gradient, the cell cannot regenerate sufficient amounts of highly energetic substrates required for cell's persistence (Weber & Senior, 2003).

4.5.5.3 Mathematical modelling in PD research

By definition, energy production pathways are extremely robust because of multiple feedback interactions which in turn induce emergent properties such as homeostasis (Cloutier & Wellstead, 2010). These regulatory properties are extremely important in PD but are also extremely hard to investigate with experimental data alone (Wellstead & Cloutier, 2010). In this context, Ordinary Differential Equation (ODE) modelling can complement experimental studies (Haefner, 1996; Tyson, Chen, & Novak, 2003).

To evaluate the relative implications of the measured ex-vivo data, in-silico simulations are used to rationally integrate the dataset in a coherent whole and give a clear picture of the metabolomics' state of the cells. With identified precursors and causes for the apparition of PD, it is possible to discuss relative importance of autosomal genetic modification of parkin gene to mitochondrial complex 1 toxic stress from an energetic cell metabolism point of view. Hence to assess the dynamics of the metabolic events involved in this phenomenon, an ODE model describing an average brain tissue as a cell would help studying the metabolic pathways regulation in that context.

The current study thus presents an ODE model of energy metabolism pathways that will describe the dynamics of energy related metabolites after a PD inducing perturbation, i.e. exposure to CCCP. The model's parameters can also account for genetic factors, such as a reduction of mitochondrial efficiency induced by parkin mutations.

4.5.6 Layout of the article

In the next section, slice preparation, stress and control groups, intracellular extract preparation, sample analysis and other considerations are presented as part of the material and methods. Then mathematical model's scope, parameters estimation and stress implementation are described. Finally, the experimental and simulation results of the CCCP toxin stress exposure and *parkin 2* genetic stress are successively compared to the control group and discussed.

4.6 Methods and models

4.6.1 Experimental methods

Experimental methods consist in the preparation and short-term cultivation of mouse brain slices in Petri dishes, followed by sampling of two (2) slices each 20 minutes (for a total of eight (8) time points) and homogenisation in an alcohol extractor to arrest the cellular metabolism. In two (2) experiments, a control group (wild type mouse) was compared to either the genetic model or the toxin induced model.

4.6.1.1 Slice preparation

After the adult mouse is put to sleep, the head is cut using surgical scissors and the scalp and skull are cut and plied away using small scissors and pointed forceps. The exposed brain is then splashed with Artificial Cerebro-Spinal Fluid (ACSF: NaCl, 125 mM; KCl, 2.5 mM; KH_2PO_4 , 0.3 mM; NaHCO_3 , 26 mM; CaCl_2 , 2.4; GLC, 10 mM; MgSO_4 , 1.3mM; at 300mOsm), removed from the skull cavity and immersed in 4°C ACSF to stabilise and cool-off. The olfactory bulb and cerebellum are then discarded. After being glued on the cutting plaque, the cerebrum is then sliced using a vibrating microtome (Leica VT1000S[®]) in order to make 300 μm thick frontal slices.³³ During the cutting operation, the organ is immersed in continuously sparged (95% O_2 , 5% CO_2) 4°C ACSF. Each slice is delicately taken with a fine synthetic brush and transferred to a continuously oxygenated ACSF filled Petri dish, filter prepared to prevent slice adhesion at its bottom (Caiazzo et al., 2011).

After preparing a second mouse, both mice slices rest for about thirty (30) minutes in a Petri dish to rest following slicing procedure.

4.6.1.1.1 Stress and control groups

Based on knowledge from experiments in electrophysiology (unpublished data), we used the smallest dose of CCCP creating a visible response: 10 μM . Also, based on the slicing rate, and

³³ As an optimum, slices of 300 μm thick were thin enough to enable sufficient diffusion to the slices' core and resulted in only about one sixth (1/6th) of potentially greatly damaged cells.

ACSF maintained slices' life, together with the desired data size and quality, the preparation and extraction of two (2) brains were considered for these experiments. Finally, a double extract (a control and a test sample) rate was optimised at one (1) per ten (10) minutes for a total of about 70 minutes.

The randomised slices are then separated into two (2) groups: the control and test groups. The single (1) control and two (2) test groups are detailed below:

- Charles River Wild Type (WT) C57bl/6ncrl *black-6* mice brain slices resting in continuously oxygenated ACSF filled Petri dish consists in the control group;
- Parkin knockout (KO) *black-6* mice previously modified by Itier, Ibáñez and al. 2003 presenting mitochondrial efficiency reduction were used as a genetically predisposed Parkinson model;
- WT 10 μ M CCCP ionophore stressed mice slices were used as a toxin induced Parkinson type. For this test assay, the two animal's brain slices were pooled and randomly separated in two (2) equal slice number groups. The stress is initiated on one (1) group from the third (3rd) sample, fifteen (15) minutes following the first (1st) extractions. After collection of two (2) samples during stress, the remaining stressed slices were transferred to an unaltered ACSF Petri dish, identical to the control group.

4.6.1.2 Intracellular extracts preparation

Complete understanding of the metabolic activity of cells during the stresses requires simultaneous study of many components of the cellular metabolic network. Metabolite analysis can be done using extraction and analysis of compounds of interest from the biological sample. Several extraction methods have been reported. Based on reported results (Faijes, Mars, & Smid, 2007; Luo, Groenke, Takors, Wandrey, & Oldiges, 2007; Ritter, Genzel, & Reichl, 2008) and our studies, a modified procedure using cold methanol is the most appropriate for metabolism studies since it combines mild extraction strength conditions and high enzymatic inactivation.

The two (2) slices selected for each extract were brush transferred from the Petri dish to a centrifuge tube, which was then fast centrifuged at 4°C for one (1) minute to able ACSF supernatant vacuum discard using a flame-pulled Pasteur pipette. The pre-weighted centrifuge vial was then reweighted to deduct the collected fresh brain mass. After, two (2) additions of

200 μ L of dry-ice-cooled 80% v/v methanol/water solution were performed. A motorised pillar homogenisation, vortex mixing and sonication was performed between these additions. These latter steps disrupt the cell's membranes, precipitate all proteins and arrest metabolic reactions. The immobilised cellular metabolism samples were maintained at -80°C until triple metabolome extract completion.

The sample was vortex-suspended after 0.2 g of sand addition for better homogenisation, and micro-centrifuged at 21 000 G for 7 min at 4°C. As a first (1st) extract, the metabolite charged supernatant is transferred to an extract centrifuge vial. After the addition of 0.2 ml ice-cold 50% v/v methanol/water to the pellet, the vial undergoes three (3) rounds of vortex-mixing, ice-water bath cooled down and sonication. The vial is then micro-centrifuged at 21 000 G and 4°C for 5 min to produce the second (2nd) extract; the latter is added to the first. Then, 0.2 mL ice-cold water is added to the pellet, the vial is vortex-suspended and micro-centrifuged at 21 000 G and 4°C for 3 min to give the third (3rd) extract. Finally, the extract vial is micro-centrifuged at 21 000 G and 4°C for 5 min. It is then aspirated in a syringe with a 0.2 μ m filter (Millipore®) and stored at -80°C until LCMS analysis.

4.6.1.3 Sample analysis

The samples were thawed and vortex mixed before analysis. Samples were kept at 4°C during LCMS autosampling. Minimal LCMS autosampling loading was performed since it has been reported that metabolites degrade faster at higher temperatures, compared to -80°C.

Nucleotide and organic acids together with sugar phosphates quantification was performed as done by Hammami (Hammami et al., 2012). Refer to that paper for further informations.

Quantification of metabolites (nucleotides and organic acids) was performed by integrating peak areas and using standard linear calibration curves. Extraction specific concentrations in metabolites were calculated by normalizing the quantity of metabolites in the slice extracts to the fresh weight of the extracted slices. When the peak area integration lead to extrapolation from the linear standard calibration curve, proper dilution was executed using 50% (v/v) methanol in water and reanalysis was performed.

These concentration quantification methods are based on whole biological sample homogenisation; compartments' components and volumes are summed in global concentrations

values. Based on this extraction method's limits, the ODE model must consider all reactions to happen in a single volume.

4.6.1.3.1 Nucleotides quantification

Nucleotides in extracts were analyzed using a 1290 UPLC system coupled to a 6460 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies®). Nucleotides were separated by a Symmetry C18 column (Waters®) equipped with a Security C18 guard-column (Waters®) using ion-pair method. DMHA (N,N-dimethylhexylamine, Sigma®) was used as an ion-pair reagent to improve the signal-to-noise ratio with positive ionization mode.

4.6.1.3.2 Sugar phosphates and organic acids quantification

Organic acids and phosphate sugars concentrations were assessed using the aforementioned UPLC-MS/MS system using a Hypercarb® column and a Hypercarb pre-column (Thermo Fisher®).

4.6.1.3.3 Extracellular components

Cellular environment samples were taken directly from the Petri dish. The four (4) major extracellular components (glucose, lactate, glutamine and glutamate) are measured with blood analysers (YSI 2700 Select Biochemistry Analyzer®). Two (2) machines were used in parallel; glucose and lactate are measured simultaneously on an analyser, while another measured glutamine and glutamate simultaneously.

4.6.1.3.4 Statistical Analysis

Data are shown as mean $\pm$ SEM (standard error of mean) of $n = 3$ independent experiments from three (3) mice brain slice extractions sequences. Outliers were removed using box-plot analysis.

4.6.1.4 Other experimental considerations

4.6.1.4.1 Parkin knockout

Although PD emerges from a specific brain zone in the mesencephalon, the substantia nigra pars compacta, the gene silencing accomplished on the parkin knockout mice modified the transcriptome of all cells in the mouse, thus reducing their ability to identify misfolded alpha-

synuclein-like damaged protein that would lead to further UPS degradation. From this global knockout concept arises the assumption that all tissue's cells would exhibit a different phenotype and would react in a different manner to a stress when being compared to a WT mouse.

4.6.1.4.2 Slice choice for samples

Since distinction between cell types (neurons, astrocytes, oligodendrocytes, microglia, etc.) is impossible (as a result of the choice of extraction method that requires entire tissue homogenisation), measurements are averaged on the whole slice volume. Considering the cell type distribution in the brain is not identical in all frontal distances the slices were chosen so each control and test samples were matched to reduce variability in terms of specific cerebrum location. The choice was made on the base of the slice's size, corresponding to different distances between the discarded olfactory bulb and cerebellum.

4.6.2 Models

4.6.2.1 Software

The metabolic pathways investigated in this study are presented in Figure 13. Details concerning the model (ODEs, parameters etc.) are provided in the Supplementary Material (SM). The model was implemented in Matlab[®] (The Mathworks, Inc.[®]) using the Systems Biology Toolbox[®] (SBT) (Schmidt & Jirstrand, 2006).

4.6.2.2 Scope of the model

The model accounts for biochemical reactions occurring in all brain cells, mostly neurons and astrocytes and is constructed not to represent a specific cerebral region. We thus use concentrations units (μM) for the metabolites and limit the modelling to a generic set of reactions that are known to occur in both cell types. This is to ensure a physiologically realistic model that could eventually be adapted to other experimental investigations.

Most of the molecules involved in the model are present in relatively large amounts implying hundreds of thousands (or more) of each molecule for a typical neuron. From a modelling perspective, this means that the overall reaction system can be meaningfully modelled within a deterministic ODE framework. Other PD-related modeling efforts also successfully used this

approach (Cloutier et al., 2009; Qi, Miller, & Voit, 2009; Sneppen, Lizana, Jensen, Pigolotti, & Otzen, 2009; Vali et al., 2007).

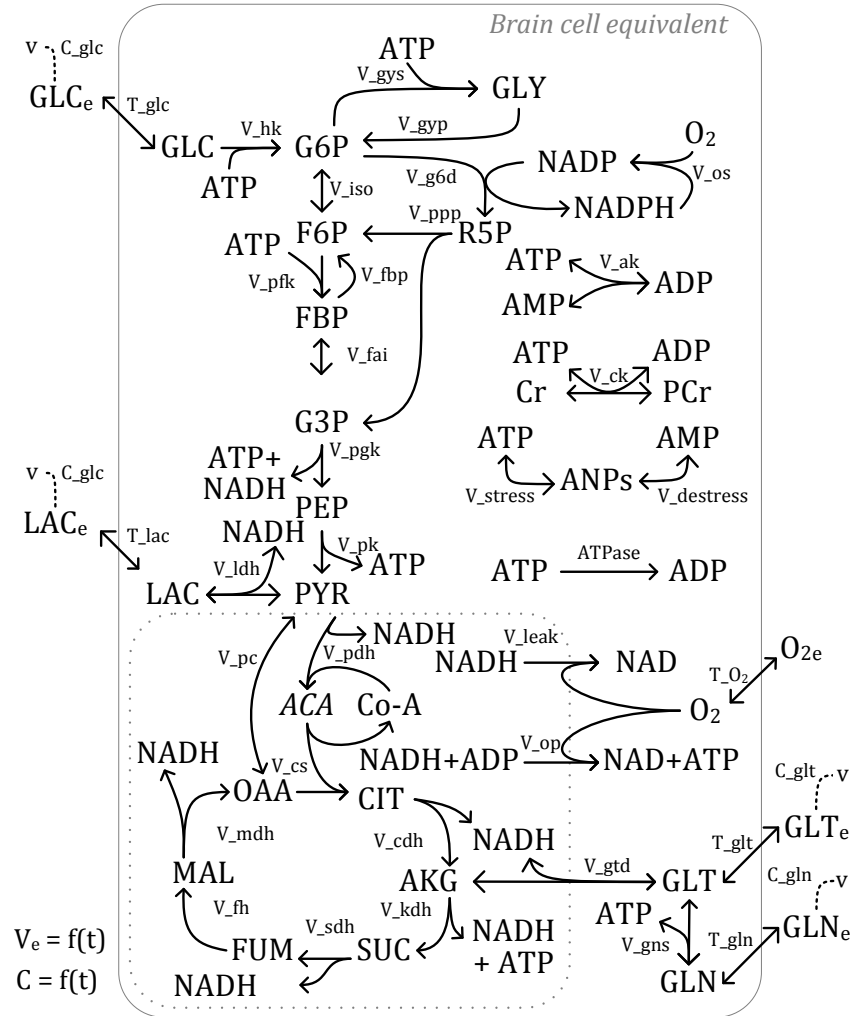


Figure 13 : Energy metabolism model for the cerebral tissue

The states of the model (in capital letters) are defined as follows: GLC, glucose; G6P, glucose-6-phosphate; F6P, fructose-6-phosphate; FBP, fructose-biphosphate; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; PYR, pyruvate; GLY, glycogen; R5P, ribose-5-phosphate; Cr (PCr), creatine (phosphocreatine); LAC, lactate; ACA, acetyl-coenzyme-A; CIT, citrate; AKG, α -ketoglutarate; SUC, succinate; FUM, fumarate; MAL, malate; OAA, oxaloacetate; GLT, glutamate; GLN, glutamine; NAD (NADH), nicotniamide adenine dinucleotide (reduced); NADP (NADPH), phosphorylated nicotniamide adenine dinucleotide (reduced); ATP, adenosine-triphosphate; ADP, adenosine-diphosphate; AMP, adenosine-

monophosphate; O₂, oxygen; ANPs, unavailable (stressed) adenosine-“n”phosphate nucleotide; V_e, extracellular volume; subscript “e”, extracellular. Reactions (in italic) are defined in the SM.

4.6.2.3 Pathways considered

Pathways represented in the model originate from a database of aggregated information from literature in a comprehensive graphical representation and textual description, the web-database *BioCyc.org* (Caspi et al., 2010). The model considers molecular transport across the cellular membrane (identified with prefix “T”, as *T_{glc}* for the transport of GLC). As the main influx, glycolysis is described with a high level of detail. The modelling is focused on highly controlled enzymatic reactions (e.g. *V_{pfk}* for flux of phosphofructokinase) and important branch points. The pentose phosphate pathway, which is the major pathway for anti-oxidative action, is represented with the two (2) glycolytic branching points. Even if the latter pathway is extensively simplified to a single state, the by-products stoichiometry (regeneration of 2 NADPH for each GLC cycling through PPP) is consistent with the full pathway. Pyruvate from the glycolytic pathway is either converted to lactate through reversible lactate dehydrogenase or transferred to the mitochondria and consumed in the TCA cycle. While some intermediates (such as AKG) can be used as branch point to amino acids (GLT) consumption/production the cycle's main function is to perform reduction of NAD shuttles to NADH. This in turn allows ATP regeneration from ADP by oxydative phosphorylation in the matrix of the mitochondria. Although this pathway involves many enzymatic complexes and sub-compartments, a simple one-step reaction with parallel proton leakage is considered here.

The two major energetic buffers are considered: phosphocreatine and glycogen. Creatine kinase transfers the high energy phosphate link from ATP to Cr and the resulting molecule PCr, can in turn be used to directly regenerate ATP during high demand periods. Glycogen is considered as a single state with a reversible reaction from G6P. Although energy is used to fix G6P, the glycogen can in turn be used temporarily if GLC transport becomes limiting during high energy demand periods, thus creating a buffer effect between low and high energy demand periods (Cloutier et al., 2009).

4.6.2.3.1 Consideration on states

Most of the model's states are determined as a distinct differential equation with a rate of change equal to the difference between production and consumption fluxes. Alternatively, moiety conservation is used to reduce the number of differential equations, when possible. For example, the sum of PCr and Cr is constant and Cr can be expressed as " $Cr = PCr_{TOT} - PCr$ ". In those cases, the only assumption is that the total metabolite pool is constant over the time frame of the experiment. This approach reduces the number of differential equations and computing time.

In energy metabolism, some enzymes form an extremely rapid equilibrium and this can also be used to reduce the number of differential equations, while still describing the associated state variables with algebraic equations. As an example, even if uridine-triphosphate (UTP) is necessary for glycogen storage, the enzyme *nucleoside diphosphate kinase* covers immediately the use and stabilise the UTP pool with ATP. In the model, we thus only represent ATP as the global energy currency and its dynamics will be representative of the overall energetic state.

4.6.2.4 Parameters estimation

Although the model presented here could eventually be used to estimate confidence intervals on the parameters, it is not the immediate objective of this work. Our objective here is rather to develop the model, compare it to experimental data and retrieve any useful information (i.e. fluxes, sensitivity etc.) with regard to energetic regulation during the early event of PD pathogenesis. The parameters of the model will thus be first estimated from the available literature, as detailed below, and then calibrated in order to minimize the error between the simulations and experimental data (curve-fitting). The measured rate of GLC intake by the brain tissue will also be used to estimate the reaction rates, when possible.

Most of the enzymatic reactions are described using simple Michaelis-Menten saturation type kinetics. Being globally accepted in the scientific community as a satisfactory mathematical abstraction for substrate-protein interactions, quantification of the apparent affinity of proteins to their different substrates is common. Furthermore the massive work accomplished throughout years of research is gathered and organised in comprehensive shared web-databases like *brenda-enzymes.info* (Scheer et al., 2011).

4.6.2.4.1 K_M apparent affinity

Protein-substrate interactions affinity has not been measured for all organisms or cell types. In this work we thus gathered the most relevant values from the databases. When possible, the affinity values are taken for mice brain protein. Otherwise, the values come from mammalian cells or from an average of many different eukaryotic cells. However, these values are only used as reasonable first estimates and are latter adjusted during the curve-fitting process.

4.6.2.4.2 Feedback regulation

In addition to multi-substrate and reversible Michaelis-Menten flux expression, for specific enzymes or pathways, the mathematical description needs complementary feedback expressions to improve its robustness and fidelity with regard to commonly seen responses such as energy homeostasis. Hill inhibition kinetics on the phosphofructokinase, threshold activation and inhibition glycogen on the glycogen buffer pathway, and ADP to ATP ratio-controlled oxidative phosphorylation are examples of feedback regulation mechanisms that were implemented.

4.6.2.4.3 V_M maximal flux rates

The maximum rate of the model's fluxes, especially the glycolytic fluxes, can be estimated from the basal (i.e. before perturbation) glucose uptake rate and LAC excretion rate, as measured from the extracellular GLC and LAC concentrations. The rate of GLC intake imposes a global limit on the glycolytic fluxes and also on the branchpoints; the sum of fluxes at a branchpoint has to balance when in the 'baseline' steady-state. The rate of LAC excretion indicates, indirectly, the proportion of GLC that underwent full oxidation, which in turn is an estimate for the TCA fluxes.

Thus, with known values for the K_M and other kinetic parameters (see SM, Model 1), if we have an estimate of the flux and measurements for all the concentrations, the kinetic equation can be solved with V_M as the only unknown. This gives a realistic estimate for these parameters, at least for the 'baseline'.

Afterwards, model fine tuning was done both manually and with computational optimisation routines included in the SBT. As presented in section 4.7, the model could benefit from further optimisation for specific experimental cases. However in the scope of this work, it is sufficient to achieve a satisfactory overall fit with one set of parameters for all the experimental conditions.

4.6.2.5 Stress implementation

Another addition was also made to the model to allow a sudden change linked to the addition of CCCP to the media (or in our case, the transfer of slices in a CCCP prepared ACSF). Because this ionophore uncouples the respiration chain as it increases proton leakage across the membrane barrier, the stress is represented as an increase of the natural mitochondrial leakage process. As the proton gradient has a direct link to the efficacy of the oxidative phosphorylation pathway, and considering pH gradients are not represented in the model, the leakage is modeled as oxydizing directly NADH to NAD without ADP phosphorylation to ATP.

As the stress is done as a pulse, such a mathematical description is added to the model as couple of sinusoids. Since the toxin diffuses easily into the brain slice, a fast acting sinusoid is imposed in the opening pulse function. Finally, since the CCCP affected slices release their toxin in a slower manner, where the gradient is passive (or less aggressive), a slow acting sinusoid is written for the pulse function closing term.

4.7 Results and discussion

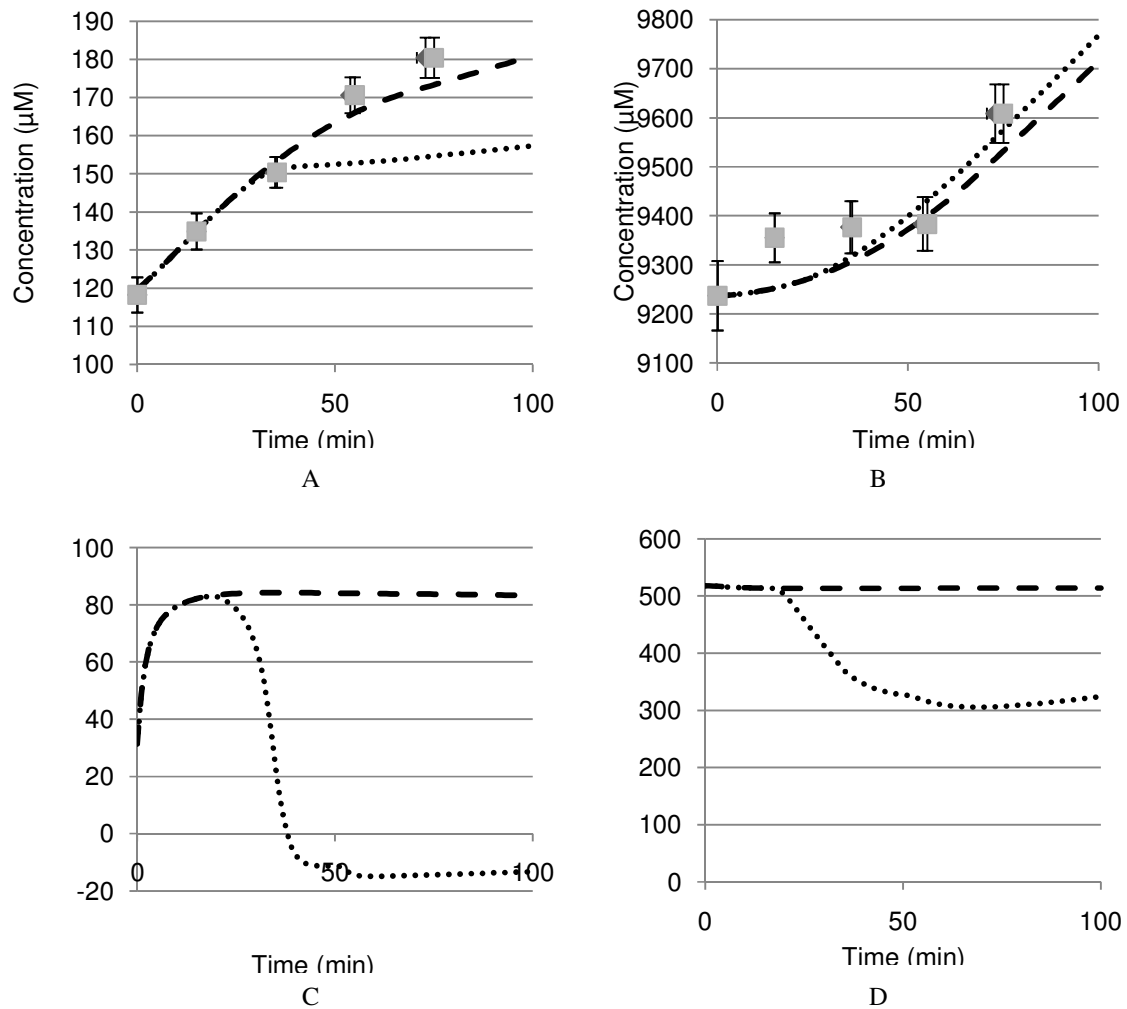
The complete model has forty-one (41) fluxes, thirty-eight (38) states, eighty-two (82) literature constants, twenty-eight (28) simulation related parameters, five (5) *in-vitro* calculated values and forty-six (46) *in-silico* defined parameters. The model considers two (2) zones, the cellular compartment with its interior volumes (cytosol with mitochondria) and the extracellular medium, which includes the extracellular matrix space. The model structure and parameters value calibration was performed using the experimental data and literature.

In addition to simple weight measures, blood analysers and LCMS methods allowed for the qualification of seventeen (17) compounds, such as GLC, LAC, GLN, GLT, ATP, ADP, AMP, NADPH, PYR, MAL, SUC, FUM, AKG, G6P, R5P, F6P and PEP. Only the most significant data are presented in the following, together with in-silico simulations; the remaining material is being illustrated in the SM.

In the following sub-sections, *ex-vivo* measured values from wet-lab experimentations are presented with corresponding in-silico results from computer simulations. The comparison of controlled conditions to toxin exposure and PARK 2 genetic modification are presented successively.

4.7.1 Exposure to toxins induce severe energy deregulation

As can be seen (Figure 14), in the wild-type case, model simulations are in accordance with extracellular measurements. This indicates that the overall consumption/production rates in the model are in accordance with the experimental system.



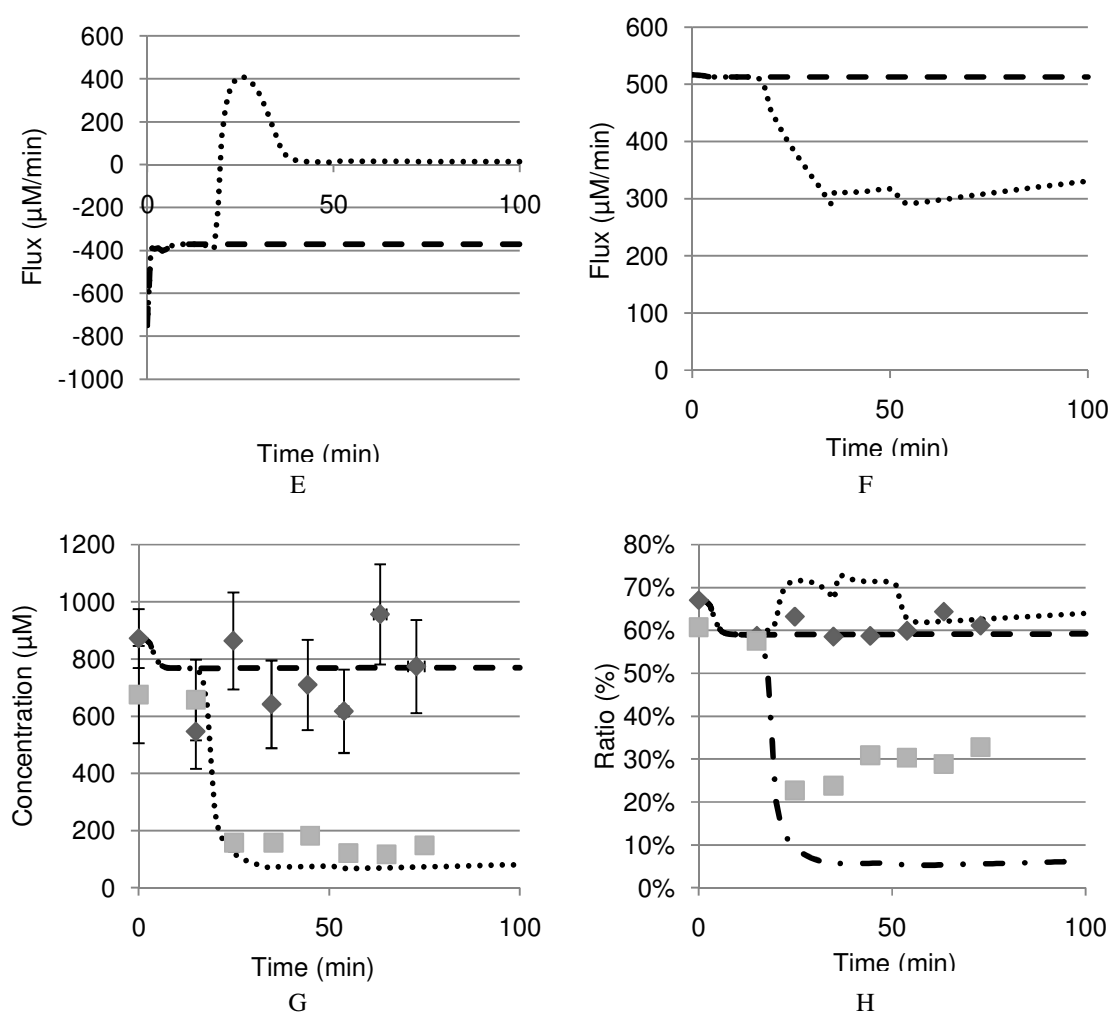


Figure 14: Effect of toxin exposure on energy dynamics

For all graphs, concentration is in μM and time scale is in minutes. Also, the control and ionophore stressed experimental data are respectively presented with diamond ($\blacklozenge$) and grey square ($\blacksquare$) markers. Furthermore, the simulated control and ionophore stressed values are presented respectively with dashed (-) and dotted (·) lines. A: LACe, B: GLCe, C: LACe to LAC transport, D: GLCe to GLC transport, E: LAC production (V_{ldh}), F: GLC consumption (V_{hk}), G: ATP, H: ATP-to-ANP ratio. The third dot-dashed (·-) line of plot H considers ANPs' contribution in the ratio against ATP such as: $ATP / (ATP + ADP + AMP + ANPs)$.

The observed increase in GLC (+3% over 75 min.) is not due to GLC excretion from brain slices. The Petri dish being open to environment and sparged with dry gases, significant evaporation happened during experiment time. The real metabolites' flow is then corrected accounting for

water evaporation, and analysis of simulated fluxes shows that the effect of evaporation is slightly stronger than the GLC consumption by the slices.

On the other hand, in the case of LAC, the increase is much higher (+50% in 75 min.) and most of the increase is due to LAC excretion by the slices. This suggests an imbalance between glycolysis and oxidative phosphorylation, which is coherent with other works on brain physiology. Furthermore, the basal unstressed consumption ratio of oxygen-to-glucose marker, as calculated by Equation 4 and presented in Figure 15, is within the 3.5 to 5.5 range of physiologically observed conditions (Cloutier et al., 2009). This shows that the slicing process and diffusion within the slice limits may not have important effect on the overall metabolic rate. A severe diffusional problem would most result in a lower O₂-to-GLC consumption ratio.

$$\frac{O_{2consumption}}{Glucoseconsumption} = \frac{6*(Glucoseconsumption - 1/2*Lactateproduction)}{Glucoseconsumption} \quad \text{Equation 4}$$

Equation 4 : O₂ to Glucose consumption indicator description.

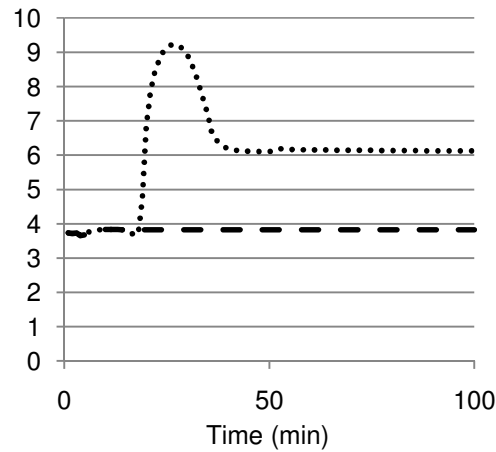


Figure 15 : Basal marker for WT and CCCP stressed models

The simulated control and ionophore stressed values of the oxygen-to-glucose-consumption ratios are presented respectively with dashed (-) and dotted (·) lines.

Results show that ATP profile for the wild-type case does not exhibit any clear trend and the measurement noise dominates. In the model, a consistent result (i.e. no specific trend) is achieved because the negative feedback on various steps of energy metabolism, which produces a homeostatic response in terms of ATP. More specifically, as described by hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase enzymes are activated when ATP is low, and oxidative phosphorylation is inhibited when ATP is high (Cloutier et al., 2009) (refer to section 3.2 and

reactions 26 (V_{hk}), 36 (V_{pfk}), 38 (V_{pk}) and the ADP-on-ATP ratio as considered in reaction 32 (V_{op}) in Table 2 of SM).

The short-term dynamic response during and following exposure to toxins reveals a rapid and significant drop in ATP concentration that remains until the end of the measurement period. This dynamic response is reproduced in the model by different means. The uncoupling of oxidative phosphorylation by CCCP causes the initial drop in energy. In this new state of low energy, the metabolic regulation for nucleotides scavenging is initiated (Heinrich & Schuster, 1996) as described in equations 5 and 41, respectively from Table 1 and Table 2 of the SM. As the recovery from this stress (nucleotide regeneration) is slow (reaction 16 of table 2 in SM), the system remains in the low energetic state for the duration of the experiment.

Although the experimental observations are on a relatively short timescale, it is clear that the exposure to environmental toxins can induce rapid and permanent changes in energy metabolism. In our experimental system, ATP levels after exposure are reduced to 25% of their initial levels without causing immediate tissue death. The latter observation comes from visual observation of the slices and also from the measured changes in extracellular GLC and LAC, showing sustained metabolic activity after exposure. This result supports a clear metabolic robustness even after strong perturbations. It is possible that exposure to CCCP-like toxins such as MPTP (as observed in humans) could be as severe, with a significant drop in ATP, but not to result to immediate cell death. In the longer term (days or week), the lack of complete recovery would however certainly lead to necrosis and loss of dopaminergic neurons, which is coherent with the literature on MPTP usage (Langston et al., 1983).

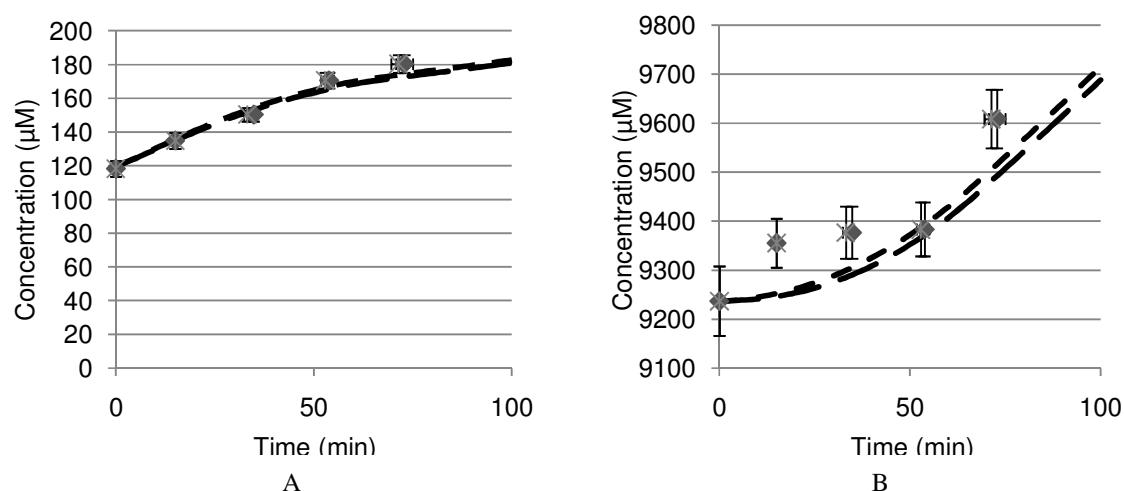
The only discrepancy between the modelling and experimental data is the slower LAC increase in the simulation with toxin (Figure 16-A). This suggests that the model, with decoupled energy production, tends re-uptake LACe to refill the unbalanced TCA. The principal cause for this unbalancing is that the model considers the NADH as the proton gradient. This leads to strong reduction of NADH instead of proton leak and further over availability of NAD. As a consequence NADH production by all NAD single co-substrate consuming enzymes, such as both PYR dehydrogenase (V_{pdh}) and CIT dehydrogenase (V_{cdh}) from TCA, are up-regulated. Hence, the global unbalancing of the TCA could be described in a more complete way if all connected pathways were considered. However, based on the measurements of extracellular

lactate, its rate of production after 60 minutes is not significant. Thus, the model is in accordance with our observations (Figure 16-E).

Furthermore, the NADH reduction allows a highly active mode for the overall metabolism as seen in Figure 15 where the oxygen-to-glucose consumption marker increases to a high value of 6 after a higher transient response. Although stable for the considered timescale, such an operating mode would eventually lead to higher oxidative stress induced damage and loss of extracellular LAC.

4.7.2 Energy robustness under genetic perturbation condition

Figure 16 shows similar accordance of the simulation with extracellular measurements. Similarly to the WT case, KO model has overall consumption/production rates in accordance with the experimental system.



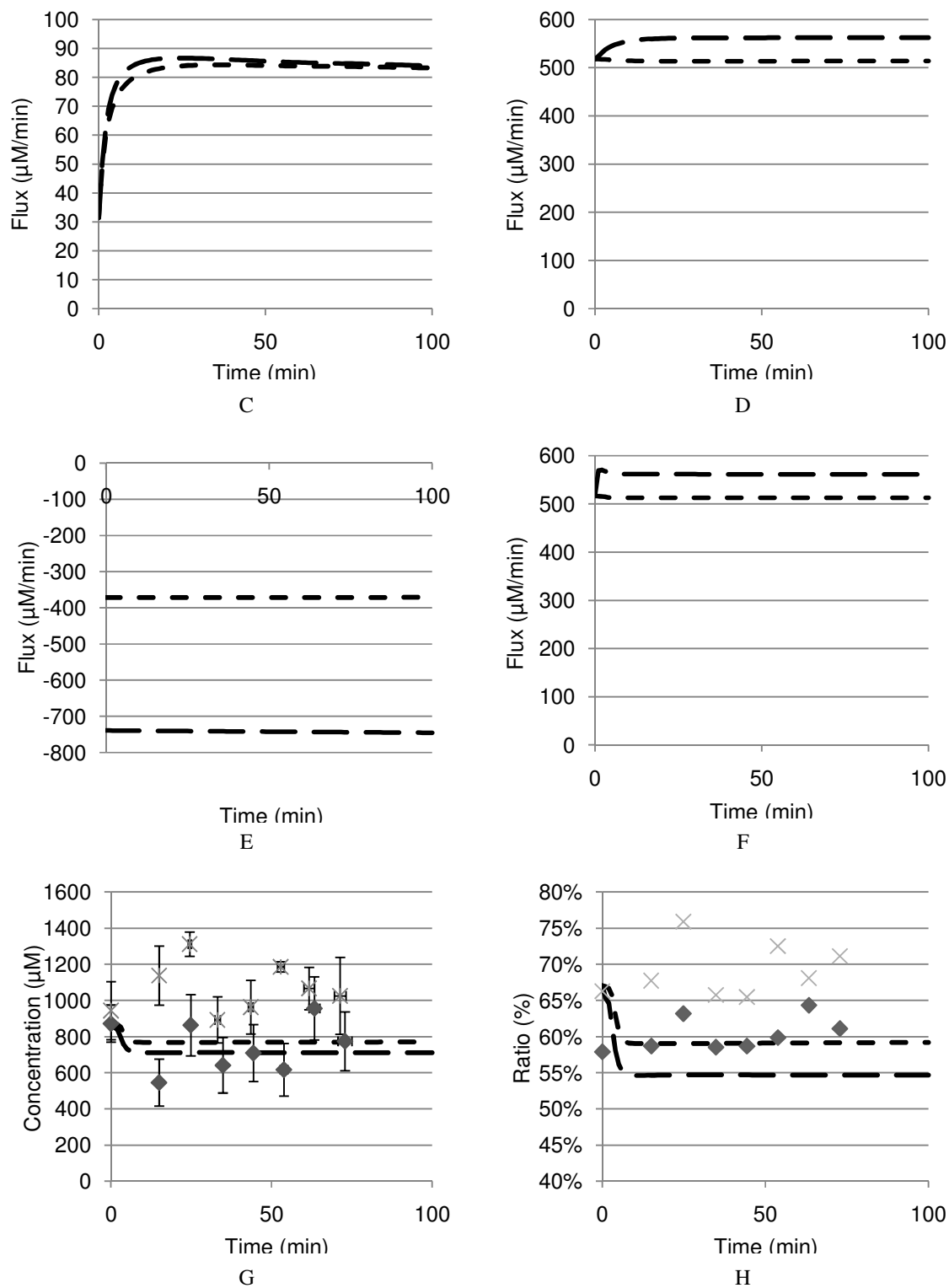


Figure 16: Effect of genetic perturbation condition on energy dynamics

For all graphs, the control and parkin knockout experimental data are respectively presented with diamond ($\blacklozenge$) and cross ($\times$) markers. Furthermore, the simulated control and genetically stressed values are presented respectively with regular dashed (-) and grey continuous lines. A: LACe, B: GLCe, C: LACe to LAC transport, D: GLCe to GLC transport, E: LAC production (V_{ldh}), F: GLC consumption (V_{hk}), G: ATP, H: ATP-to-ANP ratio.

Although all profiles are generally similar to the genetically unaltered model, a slight adaptation can be observed. While lactate production is still positive, as the flux of lactate dehydrogenase (V_{ldh}) is negative, the reaction rate is approximately doubled. This result is probably a metabolic adaptation caused by the studied genetic modification. In fact, knockout of *parkin 2* allows accumulation of misfolded alpha-synuclein, a phenomenon leading to an increased oxidative stress as described by Cloutier and Wellstead (Cloutier & Wellstead, 2012). The affected pathway of the model for this genetically induced oxidative stress is the pentose phosphate pathway since its important cofactor NADPH turnover allows regeneration (reduction) of GSSH to GSH of the glutathione oxidative stress reducing pathway (with glutathione reductase) (Owen & Butterfield, 2010).

Although the magnitude of the oxidative stress generation is multiplied by ten (10) in this case, the energetic metabolic regulations are able to compensate to such a stress and allow cells persistence and survival.

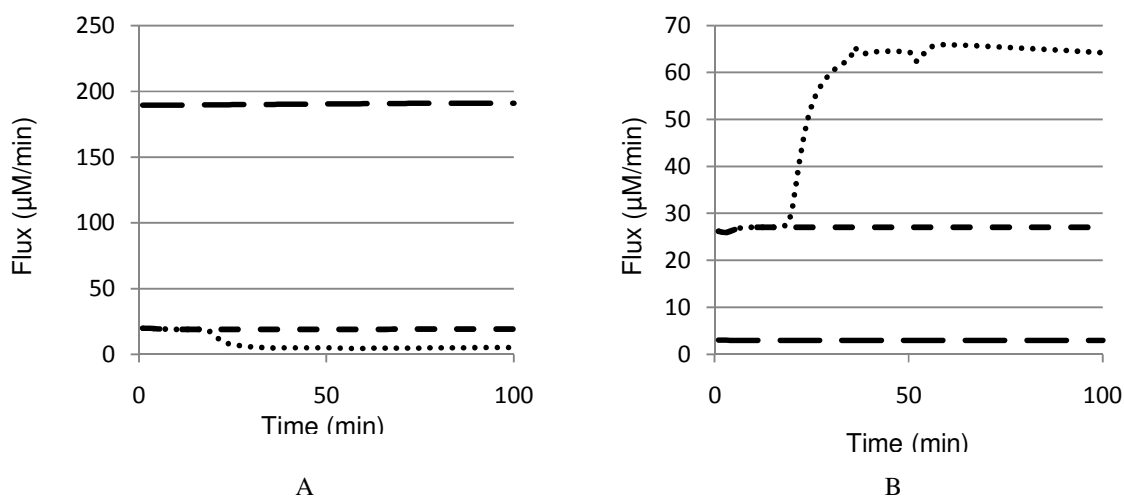


Figure 17: Comparison of fluxes and ratios

Simulated control, CCCP stress and genetic stress values are presented respectively with regular dashed (-), dotted (·) and grey continuous lines. A: Pentose phosphate pathway flux (V_{ppp}), B: Ratio of glucose consumption (V_{hk}) over A.

Interestingly, the evolution of the ratio of pentose phosphate over glycolysis demonstrates a variation of the genetically stressed model compared to both control and CCCP stressed model where simple energy regulation leads to a global systems adaptation at another possible operating point (Figure 17).

The use of the model allows detailed description of the fluxes, invisible from an experimental level. In this case, the KO mice exhibit identical molecular concentrations, but increased reaction rates allowing a sustainable metabolism.

4.8 Conclusions

A mathematical model for brain energy metabolism in the context of PD related stresses has been developed and validated using experimental data. The major observation from this work is that environmental exposure to toxin is a severe stress, which results in the deregulation of energy metabolism (i.e. CCCP exposure), and that a response is initiated where ATP levels are irreversibly reduced.

In the case of a genetic defect, model simulations, supported by experimental evidence, shows that the biochemical regulation mechanisms of energy metabolism increases the metabolic flows, without affecting the metabolites concentration and thus coping with a certain level of stress.

Although the experiments and simulations are on a relatively short timescale, results show how cell energetics can be rapidly deregulated by strong environmental PD stresses. In the long term, a certain level of adaptation could certainly occur, but some sub-products from metabolic damage (i.e. protein misfolding or oxidative stress) would accumulate in the meantime (Cloutier & Wellstead, 2012). Other integrative modelling efforts also show that irreversible effects could be rapidly induced in PD [38] (Cloutier et al., 2012), which is perfectly coherent with the case of the 'frozen addicts' (Langston & Palfreman, 1995).

4.9 Acknowledgments

This work was supported by an NSERC Discovery grant to MJ, the Canadian Foundation for Innovation (MJ) and the Canada Research Chair program (MJ). We wish to thank Jingkui Chen (École Polytechnique Montréal) for UPLCMS analyses and Daminana Leo (Université de Montréal) for mice brain harvesting.

4.10 Supplementary material

Tableau 10 : State ODE description (sum of fluxes)

ODE	State description
1	$\frac{d(ACA)}{dt} = +V_{pdh} - V_{cs}$
2	$\frac{d(AKG)}{dt} = +V_{cdh} - V_{kdh} + V_{gtd}$
3	$\frac{d(AMP)}{dt} = -V_{ak} + V_{destress}$
4	$\frac{d(ANPs)}{dt} = +V_{stress} - V_{destress}$
5	$\frac{d(ATP)}{dt} = -V_{hk} - V_{pfk} + V_{pgk} + V_{pk} - V_{pc} + V_{kdh} - V_{gns} - V_{gys} - V_{ck} + Eta_{op} * n_{opatp} * V_{op} - V_{atpase} - V_{ak} - V_{stress}$
6	$\frac{d(CIT)}{dt} = +V_{cs} - V_{cdh}$
7	$\frac{d(F6P)}{dt} = +V_{iso} - V_{pfk} + n_{pppf6p} * V_{ppp} + V_{fbp}$
8	$\frac{d(FBP)}{dt} = +V_{pfk} - V_{fai} - V_{fbp}$
9	$\frac{d(FUM)}{dt} = +V_{sdh} - V_{fh}$
10	$\frac{d(G3P)}{dt} = +n_{fai_{g3p}} * V_{fai} - V_{pgk} + V_{ppp}$
11	$\frac{d(G6P)}{dt} = +V_{hk} - V_{iso} - n_{pppg3p} * V_{g6d} - V_{gys} + V_{gyp}$
12	$\frac{d(GLC)}{dt} = +T_{glc} - V_{hk}$
13	$\frac{d(GLCe)}{dt} = -R_{volume} * T_{glc} + C_{glc}$
14	$\frac{d(GLN)}{dt} = -T_{gln} + V_{gns}$
15	$\frac{d(GLNe)}{dt} = +R_{volume} * T_{gln} + C_{gln}$
16	$\frac{d(GLT)}{dt} = -T_{glt} - V_{gtd} - V_{gns}$

16	$\frac{d(GLTe)}{dt} = +R_{volume} * T_{glt} + C_{glt}$
17	$\frac{d(GLY)}{dt} = +V_{gys} - V_{gyp}$
18	$\frac{d(LAC)}{dt} = -T_{lac} - V_{ldh}$
19	$\frac{d(LACe)}{dt} = +R_{volume} * T_{lac} + C_{lac}$
20	$\frac{d(MAL)}{dt} = +V_{fh} - V_{mdh}$
21	$\frac{d(NADH)}{dt} = +V_{pgk} + V_{ldh} + V_{pdh} + V_{cdh} + V_{kdh} + n_{sdh_{nadh}} * V_{sdh} + V_{mdh} + V_{gtd} - V_{leak} - V_{op}$
22	$\frac{d(NADPH)}{dt} = +n_{g6d_{nadph}} * V_{g6d} - V_{os}$
23	$\frac{d(O2)}{dt} = +T_{o2} - n_{op_{o2}} * V_{op} - n_{leak_{o2}} * V_{leak}$
24	$\frac{d(O2e)}{dt} = +T_{o2e}$
25	$\frac{d(OAA)}{dt} = +V_{mdh} - V_{cs} + V_{pc}$
26	$\frac{d(PCr)}{dt} = +V_{ck}$
27	$\frac{d(PEP)}{dt} = +V_{pgk} - V_{pk}$
28	$\frac{d(PYR)}{dt} = +V_{pk} - V_{pdh} - V_{pc} + V_{ldh}$
29	$\frac{d(R5P)}{dt} = +V_{g6d} - V_{ppp}$
30	$\frac{d(SUC)}{dt} = +V_{kdh} - V_{sdh}$
31	$\frac{d(V)}{dt} = -V_{evap}$

Tableau 11 : Fluxes' description

Flux	Description
1	$C_{glc} = EVAP(K_{evap}, GLCe, V)$
2	$C_{gln} = EVAP(K_{evap}, GLNe, V)$
3	$C_{glt} = EVAP(K_{evap}, GLTe, V)$
4	$C_{lac} = EVAP(K_{evap}, LACe, V)$
5	$T_{glc} = TMM(Vm_{t_{glc}}, Km_{t_{glc}}, GLCe, GLC)$
6	$T_{gln} = TMM(Vm_{t_{gln}}, Km_{t_{gln}}, GLN, GLNe)$

7	$T_{glt} = TMM(Vm_{t_{glt}}, Km_{t_{glt}}, GLT, GLTe)$
8	$T_{lac} = TMM(Vm_{t_{lac}}, Km_{t_{lac}}, LAC, LACe)$
9	$T_{o2} = K_{t_{o2}} * DIFF(O2e, O2)$
10	$T_{o2e} = 1 - PULSE(A_{p_{o2}}, time, T_{p_{on_{o2}}}, F_{p_{on_{o2}}}, P_{p_{on_{o2}}}, T_{p_{off_{o2}}}, F_{p_{off_{o2}}}, P_{p_{off_{o2}}})$
11	$V_{ak} = RMM\left(\begin{matrix} Vm_{ak_f}, Km_{ak_{atp}}, ATP, Km_{ak_{amp}}, AMP, 0,1, \\ Vm_{ak_r}, Km_{ak_{adp}}, ADP, 0,1,0,1 \end{matrix}\right)$
12	$V_{atpase} =$ $Vm_{atpase} * MM(Km_{atpase_{atp}}, ATP) * \\ PULSE\left(\begin{matrix} A_{p_{atpase}}, time, T_{p_{on_{atpase}}}, F_{p_{on_{atpase}}}, P_{p_{on_{atpase}}}, \\ T_{p_{off_{atpase}}}, F_{p_{off_{atpase}}}, P_{p_{off_{atpase}}} \end{matrix}\right)$
13	$V_{cdh} = Vm_{cdh} * MM(Km_{cdh_{cit}}, CIT) * MM(Km_{cdh_{nad}}, NAD)$
14	$V_{ck} = RMM\left(\begin{matrix} Vm_{ck_f}, Km_{ck_{cr}}, Cr, Km_{ck_{atp}}, ATP, 0,1, \\ Vm_{ck_r}, Km_{ck_{pcr}}, PCr, Km_{ck_{adp}}, ADP, 0,1 \end{matrix}\right)$
15	$V_{cs} = Vm_{cs} * MM(Km_{cs_{aca}}, ACA) * MM(Km_{cs_{oaa}}, OAA)$
16	$V_{destress} = Vm_{destress} * MM(Km_{destress_{anps}}, ANPs)$
17	$V_{evap} = K_{evap}$
18	$V_{fai} = RMM(Vm_{fai_f}, Km_{fai_{fbp}}, FBP, 0,1,0,1, Vm_{fai_r}, Km_{fai_{g3p}}, G3P, 0,1,0,1)$
19	$V_{fbp} = Vm_{fbp} * MM(Km_{fbp_{fbp}}, FBP)$
20	$V_{fh} = Vm_{fh} * MM(Km_{fh_{fum}}, FUM)$
21	$V_{g6d} = Vm_{g6d} * MM(Km_{g6d_{g6p}}, G6P) * MM(Km_{g6d_{nadp}}, NADP)$
22	$V_{gns} = RMM(Vm_{gns_f}, Km_{gns_{glt}}, GLT, 0,1,0,1, Vm_{gns_r}, Km_{gns_{gln}}, GLN, 0,1,0,1)$
23	$V_{gtd} = RMM\left(\begin{matrix} Vm_{gtd_f}, Km_{gtd_{glt}}, GLT, Km_{gtd_{nad}}, NAD, 0,1, \\ Vm_{gtd_r}, Km_{gtd_{akg}}, AKG, Km_{gtd_{nadh}}, NADH, 0,1 \end{matrix}\right)$
24	$V_{gyp} = Vm_{gyp} * MM(Km_{gyp_{gly}}, GLY)$
25	$V_{gys} =$ $Vm_{gys} * MM(Km_{gys_{g6p}}, G6P) * MM(Km_{gys_{atp}}, ATP) * \\ SWITCH_I(GLY, TRH_{i_{gys_{gly}}}, F_{i_{gys_{gly}}})$
26	$V_{hk} =$

	$Vm_{hk} * MM(Km_{hk_{glc}}, GLC) * MM(Km_{hk_{atp}}, ATP) *$ $SWITCH_I(G6P, TRH_{i_{hk_{g6p}}}, F_{i_{hk_{g6p}}})$
27	$V_{iso} = RMM(Vm_{iso_f}, Km_{iso_{g6p}}, G6P, 0, 1, 0, 1, Vm_{iso_r}, Km_{iso_{f6p}}, F6P, 0, 1, 0, 1)$
28	$V_{kdh} =$ $Vm_{kdh} * MM(Km_{kdh_{akg}}, AKG) * MM(Km_{kdh_{adp}}, ADP) *$ $MM(Km_{kdh_{nad}}, NAD)$
29	$V_{ldh} = RMM\left(\frac{Vm_{ldh_f}, Km_{ldh_{lac}}, LAC, Km_{ldh_{nad}}, NAD, 0, 1,}{Vm_{ldh_r}, Km_{ldh_{pyr}}, PYR, Km_{ldh_{nadh}}, NADH, 0, 1,}\right)$
30	$V_{leak} =$ $Vm_{leak} * MM(Km_{leak_{nadh}}, NADH) *$ $PULSE(A_{pleak}, time, T_{pon_{leak}}, F_{pon_{leak}}, P_{pon_{leak}}, T_{poff_{leak}}, F_{poff_{leak}}, P_{poff_{leak}})$
31	$V_{mdh} = Vm_{mdh} * MM(Km_{mdh_{mal}}, MAL) * MM(Km_{mdh_{nad}}, NAD)$
32	$V_{op} = Vm_{op} * MM(Km_{op_{nadh}}, NADH) * MM(Km_{op_{adp}}, ADP) * MM(Km_{op_{o2}}, O2) *$ $RATIO(ADP, ATP)$
33	$V_{os} =$ $V_{op} * (1 - Eta_{op}) *$ $PULSE(A_{pos}, time, T_{pon_{os}}, F_{pon_{os}}, P_{pon_{os}}, T_{poff_{os}}, F_{poff_{os}}, P_{poff_{os}})$
34	$V_{pc} = Vm_{pc} * MM(Km_{pc_{pyr}}, PYR) * MM(Km_{pc_{atp}}, ATP)$
35	$V_{pdh} =$ $Vm_{pdh} * MM(Km_{pdh_{pyr}}, PYR) * MM(Km_{pdh_{nad}}, NAD) *$ $MM(Km_{pdh_{coa}}, CoA)$
36	$V_{pfk} =$ $Vm_{pfk} * MM(Km_{pfk_{f6p}}, F6P) * MM(Km_{pfk_{atp}}, ATP) *$ $HILL(Ki_{pfk_{atp}}, ATP, nH_{pfk})$
37	$V_{pgk} = Vm_{pgk} * MM(Km_{pgk_{g3p}}, G3P) * MM(Km_{pgk_{adp}}, ADP)$
38	$V_{pk} = Vm_{pk} * MM(Km_{pk_{pep}}, PEP) * MM(Km_{pk_{adp}}, ADP)$
39	$V_{ppp} = Vm_{ppp} * MM(Km_{ppp_{r5p}}, R5P)$

40	$V_{sdh} = Vm_{sdh} * MM(Km_{sdh_{suc}}, SUC) * MM(Km_{sdh_{nad}}, NAD)$
41	$V_{stress} =$ $Vm_{stress} * MM(Km_{stress_{atp}}, ATP) *$ $\left(1 - SWITCH_I(ATP, TRH_{i_{stress_{atp}}}, F_{i_{stress_{atp}}}) \right) *$ $\left(-1 + PULSE \left(\begin{matrix} A_{pleak}, time, T_{ponleak}, F_{ponleak}, P_{ponleak} \\ T_{poffleak}, F_{poffleak}, P_{poffleak} \end{matrix} \right) \right)$

Tableau 12 : Description of fluxes' functions

Function	Description
1	$MM(K, S) = \left(\frac{S}{K + S} \right)$
2	$TMM(Vm, Km, Si, Se) = \left(Vm * \left(\frac{Si}{Si + Km} - \frac{Se}{Se + Km} \right) \right)$
3	$RMM \left(\begin{matrix} Vmf, Km f1, Sf1, Km f2, Sf2, Km f3, Sf3, \\ Vmr, Kmr1, Sr1, Kmr2, Sr2, Kmr3, Sr3 \end{matrix} \right) =$ $\left(\begin{matrix} Vmf * \left(\frac{Sf1}{Sf1 + Km f1} \right) * \left(\frac{Sf2}{Sf2 + Km f2} \right) * \left(\frac{Sf3}{Sf3 + Km f3} \right) - \\ Vmr * \left(\frac{Sr1}{Sr1 + Kmr1} \right) * \left(\frac{Sr2}{Sr2 + Kmr2} \right) * \left(\frac{Sr3}{Sr3 + Kmr3} \right) \end{matrix} \right)$
4	$RMA(Kf, Sf1, Sf2, Sf3, Kr, Sr1, Sr2, Sr3) =$ $(Kf * Sf1 * Sf2 * Sf3 - Kr * Sr1 * Sr2 * Sr3)$
5	$DIFF(Se, Si) = (Se - Si)$
6	$PMM(Km, S, n) = \left(\frac{S^n}{Km^n + S^n} \right)$
7	$EVAP(K_{evap}, Se, V) = \left(K_{evap} * \frac{Se}{V} \right)$
8	$RATIO(UPPER, LOWER) = \left(\frac{UPPER}{LOWER} \right)$
9	$HILL(Ki, S, n) = \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{S}{Ki} \right)^n} \right)$
10	$SWITCH_I(S, St, a) = \left(1 - \frac{1}{1 + \exp(-a * (S - St))} \right)$
11	$SWITCH_A(S, St, a) = \left(\frac{1}{1 + \exp(-a * (S - St))} \right)$
12	$PULSE(A, t, t1, a1, p1, t2, a2, p2) = \left(\left(1 + unitpulseSB(time, t1, t2) * A * \right. \right.$

$$\left(\frac{1}{1 + \left(\frac{1-p_1}{p_1} \right) * \exp(-a_1 * (t - t_1))} - \frac{1}{1 + \left(\frac{1-p_2}{p_2} \right) * \exp(-a_2 * (t - t_2))} \right)$$

Model 1 : WT model (with indications for variations)

***** MODEL NAME

WT - Control

***** MODEL NOTES

+ UNITS

- Time : minutes (min)
- Concentration : micromolar (uM)
- Volume : liters (L)

For the KO model, change Eta_op to 0.9.

For the CCCP stress, change A_p_leak to 20.

***** MODEL STATES

ODE's as described in Tableau 10

ACA(0) = 74.5	GLC(0) = 1000	NADPH(0) = 65.08
AKG(0) = 596	GLCe(0) = 9237	O2(0) = 1234.1
AMP(0) = 254	GLN(0) = 20	O2e(0) = 1235
ANPs(0) = 0	GLNe(0) = 4	OAA(0) = 5.39
ATP(0) = 872	GLT(0) = 200	PCr(0) = 1826.3
CIT(0) = 290	GLTe(0) = 18	PEP(0) = 6.3
F6P(0) = 130	GLY(0) = 2635.5	PYR(0) = 49
FBP(0) = 18.65	LAC(0) = 400	R5P(0) = 21.5
FUM(0) = 11.36	LACe(0) = 120	SUC(0) = 500
G3P(0) = 14.89	MAL(0) = 596	V(0) = 0.04
G6P(0) = 644.95	NADH(0) = 230	

***** MODEL PARAMETERS

A_p_atpase = 0	Km_ck_atp = 635	Km_ldh_lac = 1790
A_p_leak = 0	Km_ck_cr = 7500	Km_ldh_nad = 1100
A_p_o2 = 0	Km_ck_pcr = 510	Km_ldh_nadh = 6
A_p_os = 0	Km_cs_aca = 220	Km_ldh_pyr = 214
Cells_0 = 0.000548	Km_cs_oaa = 5.9	Km_leak_nadh = 200
Cells_min = 0.000069	Km_destress_anps = 300	Km_mdh_mal = 500
Eta_op = 0.99	Km_fai_fbp = 13.25	Km_mdh_nad = 140
F_i_gys_gly = 0.02	Km_fai_g3p = 383.33	Km_op_adp = 1.0735
F_i_hk_g6p = 0.02	Km_fbp_fbp = 1.67	Km_op_nadh = 2.75
F_i_stress_atp = 0.02	Km_fh_fum = 13	Km_op_o2 = 2.9658
F_p_off_atpase = 1	Km_g6d_g6p = 168.8	Km_pc_atp = 235
F_p_off_leak = 1	Km_g6d_nadp = 10.035	Km_pc_pyr = 162.5
F_p_off_o2 = 1	Km_gns_adp = 612.3125	Km_pdh_coa = 1
F_p_off_os = 1	Km_gns_atp = 2000	Km_pdh_nad = 280
F_p_on_atpase = 1	Km_gns_gln = 22772	Km_pdh_pyr = 36.9
F_p_on_leak = 1	Km_gns_glt = 1200	Km_pfk_atp = 120
F_p_on_o2 = 1	Km_gtd_akg = 1416	Km_pfk_f6p = 113.5
F_p_on_os = 1	Km_gtd_glt = 5298	Km_pgk_adp = 142
K_evap = 0.000032	Km_gtd_nad = 502.5	Km_pgk_g3p = 70
K_L_o2 = 500	Km_gtd_nadh = 75	Km_pk_adp = 340
K_os = 0.08	Km_gyp_gly = 1003	Km_pk_pep = 20
K_sampling = 0.000007	Km_gys_atp = 74	Km_ppp_r5p = 250
K_t_o2 = 2644	Km_gys_g6p = 500	Km_sdh_nad = 193.583
Ki_pfk_atp = 759.49	Km_hk_atp = 592	Km_sdh_suc = 371.13
Km_ak_adp = 153	Km_hk_glc = 0.0775	Km_stress_atp = 300
Km_ak_amp = 276	Km_iso_f6p = 0.06078	Km_t_glc = 4340.485
Km_ak_atp = 148	Km_iso_g6p = 423.75	Km_t_gln = 434
Km_atpase_atp = 500	Km_kdh_adp = 125.9	Km_t_glt = 12
Km_cdh_cit = 275	Km_kdh_akg = 13	Km_t_lac = 439.348
Km_cdh_nad = 74.333333	Km_kdh_nad = 280	Km_t_o2 = 0.3515
Km_ck_adp = 40	Km_kdh_nadh = 61	n_fai_g3p = 2

n_g6d_nadph = 2	T_p_on_o2 = 15	Vm_gys = 3.27
n_leak_o2 = 0.5	T_p_on_os = 15	Vm_hk = 3000
n_op_atp = 3.33	TRH_i_gys_gly = 4200	Vm_iso_f = 2500
n_op_o2 = 0.5	TRH_i_hk_g6p = 600	Vm_iso_r = 1000
n_ppp_f6p = 0.666667	TRH_i_stress_atp = 300	Vm_kdh = 7549
n_ppp_g3p = 0.333333	Vm_ak_f = 1300	Vm_ldh_f = 2000
n_sdh_nadh = 0.666667	Vm_ak_r = 1000	Vm_ldh_r = 5000
nH_pfk = 4	Vm_atpase = 23500	Vm_leak = 1200
O2e_0 = 1235	Vm_cdh = 1824	Vm_mdh = 2890
P_p_off_atpase = 0.01	Vm_ck_f = 6000	Vm_op = 20000
P_p_off_leak = 0.01	Vm_ck_r = 450	Vm_pc = 28
P_p_off_o2 = 0.01	Vm_cs = 2636	Vm_pdh = 2700
P_p_off_os = 0.01	Vm_destress = 0.5	Vm_pfk = 3000
P_p_on_atpase = 0.01	Vm_fai_f = 900	Vm_pgk = 3000
P_p_on_leak = 0.01	Vm_fai_r = 100	Vm_pk = 10000
P_p_on_o2 = 0.01	Vm_fbp = 0	Vm_ppp = 250
P_p_on_os = 0.01	Vm_fh = 2404	Vm_sdh = 2000
T_p_off_atpase = 35	Vm_g6d = 300	Vm_stress = 100
T_p_off_leak = 35	Vm_gns_f = 10	Vm_t_glc = 1050
T_p_off_o2 = 35	Vm_gns_r = 20	Vm_t_gln = 40
T_p_off_os = 35	Vm_gtd_f = 20	Vm_t_glt = 22
T_p_on_atpase = 15	Vm_gtd_r = 41	Vm_t_lac = 120
T_p_on_leak = 15	Vm_gyp = 2.337	

ANP_T = 1300.76

Cr_T = 2500

NADP_T = 66

CoA_T = 76.3

NAD_T = 1070

***** MODEL VARIABLES

ADP = ANP_T - ATP - AMP - ANPs

CoA = CoA_T - ACA

ANP = ANP_T - ANPs

Cr = Cr_T - PCr

Cells = max(Cells_0 - K_sampling * time,
Cells_min)

NAD = NAD_T - NADH

NADP = NADP_T - NADPH

ATP_ANP_T = ATP/ANP_T

NADH_NAD = NADH/NAD

NADH_NAD_T = NADH/NAD_T

NADPH_NADP = NADPH/NADP

NADPH_NADP_T = NADPH/NADP_T

PCR_Cr_T = PCr/Cr_T

R_volume = Cells/V

***** MODEL REACTIONS

Fluxes as described in Tableau 11.

***** MODEL FUNCTIONS

Functions as described in Tableau 12.

***** MODEL EVENTS

N/A

***** MODEL MATLAB FUNCTIONS

N/A

4.11 References

- Bergareche, A., Puente, E., López de Munain, A., Sarasqueta, C., Arce, A., Poza, J. J., et al. (2004). Prevalence of Parkinson's disease and other types of Parkinsonism. *Journal of Neurology*, 251(3), 340-345.
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), 224-227.
- Caspi, R., Altman, T., Dale, J., Dreher, K., Fulcher, C., Gilham, F., et al. (2010). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases (Publication.:
- Chen, Q., Thorpe, J., & Keller, J. N. (2005). A-Synuclein Alters Proteasome Function, Protein Synthesis, and Stationary Phase Viability. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30009-30017.
- Cloutier, M., Bolger, F., Lowry, J., & Wellstead, P. (2009). An integrative dynamic model of brain energy metabolism using *in vivo* neurochemical measurements. *Journal*, ONLINE

First, 24. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s10827-009-0152-8>.
doi:10.1007/s10827-009-0152-8

- Cloutier, M., Middleton, R., & Wellstead, P. (2012). A feedback motif for the pathogenesis of Parkinson's disease. *The Institution of Engineering and Technology, Systems Biology*, 6(3), 86-93.
- Cloutier, M., & Wellstead, P. (2010). The control systems structures of energy metabolism. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(45), 651- 665.
- Cloutier, M., & Wellstead, P. (2012). Dynamic modelling of protein and oxidative metabolisms simulates the pathogenesis of Parkinson's disease. *IET Systems Biology*, 6(3), 65-72.
- Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2003). Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science*, 302(5646), 819-822.
- Fahn, S., & Sulzer, D. (2004). Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), 139-154.
- Faijes, M., Mars, A. E., & Smid, E. J. (2007). Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories*, 6(27), 1-8.
- Fermaglich, J. (1996). The Case of the Frozen Addicts. *The Journal of the American Medical Association*, 275(5), 407-408.
- Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(7), 492-501.
- Haefner, J. W. (1996). *Modeling biological systems : principles and applications*. New York [u.a.]: Capman & Hall [u.a.].
- Halbach, O. v. B. u., Schober, A., & Krieglstein, K. (2004). Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 73(3), 151-177.
- Hammami, I., Chen, J., Bronte, V., DeCrescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). l-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4), 724-729.
- Heinrich, R., & Schuster, S. (1996). *The Regulation of Cellular Systems*: Springer.
- Itier, J.-M., Ibáñez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., et al. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 12(18), 2277-2291.

- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. . *Science*, 219, 979-980.
- Langston, J. W., & Palfreman, J. (1995). *The case of the frozen addicts*. New York: Pantheon Books.
- Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C., & Oldiges, M. (2007). Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography & mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 153-164.
- Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., et al. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *The American Journal of Human Genetics*, 60(3), 588–596.
- Miller, G. W. (2007). Paraquat: The Red Herring of Parkinson's Disease Research. *Toxicological Sciences*, 100(1), 1-2.
- NLoM, N. L. o. M. (2011). Genetics Home Reference. Retrieved 14/06/2011, 2011, from <http://ghr.nlm.nih.gov/>
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Human Mutation*, 31(7), 763-780.
- Owen, J. B., & Butterfield, D. A. (2010). Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. *Methods in Molecular Biology*, 648(2), 267-277.
- Qi, Z., Miller, G. W., & Voit, E. O. (2009). Computational analysis of determinants of dopamine (DA) dysfunction in DA nerve terminals. *Synapse*, 63(12), 1133-1142.
- Rinne, J., Rummukainen, J., Paljarvi, L., & Rinne, U. (1989). Dementia in Parkinson's disease is related to neuronal loss in the medial substantia nigra. *Annals of Neurology*, 26, 47-50.
- Ritter, J. B., Genzel, Y., & Reichl, U. (2008). Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design. *Analytical Biochemistry*, 373(2), 349-369.

- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., et al. (2011). BRENDA, the enzyme information system (Database issue) (Publication.:
- Schmidt, H., & Jirstrand, M. (2006). Systems Biology Toolbox for MATLAB: A computational platform for research in Systems Biology. *Bioinformatics*, 22(4), 514-515.
- Sneppen, K., Lizana, L., Jensen, M. H., Pigolotti, S., & Otzen, D. (2009). Modeling proteasome dynamics in Parkinson's disease. *Physical Biology*, 6(3), 036005.
- Tyson, J. J., Chen, K. C., & Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 221-231.
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 17-37.
- Vali, S., Mythri, R. B., Jagatha, B., Padiadpu, J., Ramanujan, K. S., Andersen, J. K., et al. (2007). Integrating glutathione metabolism and mitochondrial dysfunction with implications for Parkinson's disease: A dynamic model. *Neuroscience*, 149(4), 917-930.
- Viartis. (2009). Parkinson's Disease. from <http://viartis.net/parkinsons.disease/>
- Weber, J., & Senior, A. E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Letters*, 545(1), 61-70.
- Wellstead, P., & Cloutier, M. (2010). An energy systems approach to Parkinson's disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(1), 1-6.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux réalisés dans le cadre de cette maîtrise ont permis d'acquérir des connaissances de bases utiles à l'étude de la maladie de Parkinson, par le développement d'assises expérimentales et de modélisation métabolique. En effet, la mesure de l'énergétique cellulaire et du métabolisme central de cellules provenant de tranches fraîches de souris, et le développement et la calibration d'un modèle métabolique cinétique sont originales à ce sujet.

La mesure du métabolisme de cerveaux sains a permis de calibrer le modèle *in silico*. Par la suite, la mesure transitoire suite à un stress mitochondrial de type toxique (CCCP) a permis l'établissement d'un modèle avec perturbation énergétique majeure expliquant la dérégulation profonde de l'énergétique cellulaire qui mènerait à une mort cellulaire éventuelle. La chute

importante et simultanée des concentrations en ATP et de ses analogues moins énergétiques (ADP et AMP) a requis de modifier de manière inattendue le schéma métabolique pour représenter adéquatement les données expérimentales.

Grâce au modèle, il fut possible de décrire l'état métabolique des tissus par un marqueur biologique clé : le ratio de la consommation en oxygène relativement à celle du glucose. En fait par une réduction très importante de la concentration en NADH, il a été possible de constater que le ratio augmente au delà de sa limite physiologique (stœchiométrique) de 6, et force la réabsorption du lactate vers le tissu après l'exposition au CCCP. Malgré qu'il semble stable dans cette simulation court-terme, ce mode intense n'est pas durable ni viable et mènera à d'importants dommages métaboliques induits par un stress oxydatif ainsi exacerbé. Ce dernier phénomène est en accord avec le cas des « frozen addicts » tel que décrit par Langston (Langston & Palfreman, 1995) où il a été observé qu'un stress transitoire peut mener rapidement à des dommages permanents importants.

La mesure du métabolisme de cerveaux génétiquement modifiés par extinction du gène PARK 2, impliqué dans l'apparition de la MP, a permis d'établir que l'effet métabolique en termes de concentrations pour les intermédiaires métaboliques est négligeable. Toutefois, grâce au modèle, il est possible de détailler des hypothèses quant aux processus et mécanismes d'adaptation nécessaires, selon l'analyse de l'évolution des flux réactionnels dans le temps. En effet, même si le stress génétique cause un stress oxydatif d'une intensité dix (10) fois plus forte, grâce à la régulation explicitée dans le modèle, il semble possible pour le tissu de conserver sa stabilité en évoluant vers un autre point de consigne de flux métaboliques sans compromettre les niveaux de métabolites.

CONCLUSION

Le présent mémoire proposait le développement d'une modélisation métabolique cinétique comme outil d'analyse du métabolisme énergétique de tissus affectés par des modifications liées à l'apparition de la maladie de Parkinson.

Pour ce faire, quatre (4) objectifs furent réalisés. Premièrement, un modèle d'équations différentielles ordinaires pour les cellules d'intérêt a été construit dans l'environnement Matlab grâce au SBT2. Deuxièmement, des plateformes expérimentale et analytique ont été couplées

afin de mesurer la dynamique du métabolisme de ces cellules cérébrales suite à différents stress liés à la maladie de Parkinson. Troisièmement, le modèle mathématique a été calibré sur les données expérimentales afin de représenter les niveaux d'intermédiaires métaboliques et d'en extraire les flux métaboliques. Finalement, grâce à cet outil d'analyse, il fut possible d'identifier des implications métaboliques à des stress liés à la pathologie et d'en proposer une description.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette maîtrise ont mené à un manuscrit, nommé : « *Metabolomics and In-Silico Analysis Reveal Critical Energy Deregulations in Animal Models of Parkinson's Disease* », soumis pour publication au journal « *PLOS Computational Biology* ».

Étant simple à utiliser et à modifier, le modèle mathématique peut être utilisé pour diverses autres applications et études telles que toute autre maladie ou processus où l'énergétique cellulaire est au centre des interactions; par exemple toute autre maladie neurodégénérative comme la maladie d'Alzheimer.

RECOMMANDATIONS

Suite à la rédaction du manuscrit, il nous a semblé évident que le modèle pourrait gagner en concision s'il était réduit à ses réactions enzymatiques et voies limitantes. Toutefois, une analyse de sensibilité des paramètres cinétiques est requise afin de ne pas perdre d'information au détriment de la concision.

Étant donné la rapidité de la dynamique de dérégulation de l'énergétique cellulaire suite au stress mitochondrial, une étude utilisant une gamme de concentrations réduites en CCCP permettrait peut-être d'identifier un stress observable mais plus lent. Ainsi, en continuation avec ce travail d'étude des stress génétiques et environnementaux distincts, une étude ultérieure pourrait se pencher sur les effets couplés de ces deux (2) stress en utilisant un niveau de stress mitochondrial plus faible, permettant peut-être d'observer des dynamiques différentes pendant et après l'application du stress ponctuel. Aussi, l'étude de modèles KO similaires permettrait de dresser un portrait plus large des effets métaboliques des modifications génétiques usuelles liées à l'apparition de la maladie de Parkinson.

Étant donné que l'apparition de la maladie de Parkinson est habituellement liée aux processus de vieillissement, des études similaires sur des souris vieillissantes permettraient de quantifier l'apport du temps; probablement en termes de ralentissement de flux métabolique ou diminution

de niveau de concentrations en métabolites. Conséquemment, il serait intéressant de mesurer ou d'estimer l'accumulation d'alpha-synucléine en corps de Lewy et aussi de quantifier leur effet sur le métabolisme et les processus de régulations. Finalement, une extrapolation du modèle métabolique pourrait servir d'intrant pour une étude exhaustive du modèle d'agrégation et de ses implications.

Tel que constaté lors de l'analyse des résultats, l'ajout d'une description intracellulaire compartimentée aurait permis de ralentir certaines dynamiques simulées comme étant rapides. Ainsi, sans complexifier les méthodes analogues, il serait possible de proposer des sous-descriptions des événements métaboliques par compartiment (minimalement le cytosol et les mitochondries), et d'identifier avec plus de confiance les flux affectés de manière importante par des stress liés à l'apparition de la MP.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, A. (2007). Neuroscience: The molecular wake-up call. *Nature*, 447(7143), 368-370.
- Abeliovich, A., Schmitz, Y., Farinas, I., Choi-Lundberg, D., Ho, W.-H., Castillo, P. E., et al. (2000). Mice Lacking alpha-Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron*, 25(1), 239-252.
- Aishwarya, K., Rachana, K., & Prakash, E. S. (2005). "Futile cycling" in physiologic control systems: A price paid for fine control. *Advances in Physiology Education*, 29(2), 132-135.
- Andreopoulos, C., Zhang, H., Joseph, J., Kalivendi, S., & Kalyanaraman, B. (2004). Bicarbonate enhances alpha-synuclein oligomerization and nitration: intermediacy of carbonate radical anion and nitrogen dioxide radical. *Biochemical Journal*, 378, 435-447.
- Arias-Carrión, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E., Menéndez-González, M. & Pöppel, E., (2010). Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine*, 3:24, 1-6.
- Association, A. P. (2000). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (4th ed., Text Revision)*. Washington, DC.
- Aubert, A., & Costalat, R. (2005). Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab*, 25(11), 1476-1490.

- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P. H., Tomita, T., Nakaya, K., Lee, V. M., et al. (1998). Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *The American Journal of Pathology*, 152(4), 879–884.
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2007). *Neuroscience: exploring the brain*: Lippincott Williams & Wilkins.
- Ben-Tchavtchavadze, M., Chen, J., Perrier, M., & Jolicœur, M. (2009). A noninvasive technique for the measurement of the energetic state of free-suspension mammalian cells. *Biotechnology Progress*, 9999(9999), NA.
- Ben-Tchavtchavadze, M., Perrier, M., & Jolicœur, M. (2007). Small Scale Bioreactor Platform for Bioprocess Optimisation. *Pharmaceutical Engineering*, 27(4), 1-10.
- Bergareche, A., Puente, E., López de Munain, A., Sarasqueta, C., Arce, A., Poza, J. J., et al. (2004). Prevalence of Parkinson's disease and other types of Parkinsonism. *Journal of Neurology*, 251(3), 340-345.
- Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*, 110(5), 517-536.
- Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, 476(7359), 224-227.
- Campbell, N. A. (1995). *Biologie* (1 ed.). St-Laurent: Cummings.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., & Magnusson, T. O. R. (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*, 180(4596), 1200-1200.
- Caspi, R., Altman, T., Dale, J., Dreher, K., Fulcher, C., Gilham, F., et al. (2010). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases (Publication.:
- Charcot., J. M. (1880). *Leçons sur les maladies du système nerveux faites à la Salpêtrière: Recueillies et publiées par Bourneville*. Unpublished manuscript, Paris.
- Chen, Q., Thorpe, J., & Keller, J. N. (2005). A-Synuclein Alters Proteasome Function, Protein Synthesis, and Stationary Phase Viability. *Journal of Biological Chemistry*, 280(34), 30009-30017.

- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *European Molecular Biology Organization Journal*, 17, 7151-7160.
- Cleland, W. W. (1963). The kinetics of enzyme-catalyzed reactions with two or more substrates or products: I. Nomenclature and rate equations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 67(0), 104-137.
- Cloutier, M., Bolger, F., Lowry, J., & Wellstead, P. (2009). An integrative dynamic model of brain energy metabolism using *in vivo* neurochemical measurements. *Journal, ONLINE First*, 24. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s10827-009-0152-8>. doi:10.1007/s10827-009-0152-8
- Cloutier, M., Middleton, R., & Wellstead, P. (2012). A feedback motif for the pathogenesis of Parkinson's disease. *The Institution of Engineering and Technology, Systems Biology*, 6(3), 86-93.
- Cloutier, M., & Wellstead, P. (2010). The control systems structures of energy metabolism. *Journal of the Royal Society Interface*, 7(45), 651- 665.
- Cloutier, M., & Wellstead, P. (2012). Dynamic modelling of protein and oxidative metabolisms simulates the pathogenesis of Parkinson's disease. *IET Systems Biology*, 6(3), 65-72.
- Contestabile, A., Monti, B., Contestabile, A., & Ciani, E. (2003). Brain nitric oxide and its dual role in neurodegeneration/neuroprotection: understanding molecular mechanisms to devise drug approaches. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 2147–2174.
- Davidson, W. S., Jonas, A., Clayton, D. F., & George, J. M. (1998). Stabilization of alpha-Synuclein Secondary Structure upon Binding to Synthetic Membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 273(16), 9443-9449.
- Davies, K. J. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895-9901.
- Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2003). Molecular Pathways of Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Science*, 302(5646), 819-822.
- Dorsey, E. R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K. M., Holloway, R. G., Kieburtz, K., et al. (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68(5), 384-386.

- Duarte, J. M., Morgenthaler, F. D., Lei, H., Poitry-Yamate, C., & Gruetter, R. (2009). Steady-state brain glucose transport kinetics re-evaluated with a four-state conformational model. *Frontiers in neuroenergetics*, 1, 6.
- Eells, J. B. (2003). The Control of Dopamine Neuron Development, Function and Survival: Insights From Transgenic Mice and The Relevance to Human Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 10(10), 857-870.
- Elkon, H., Melamed, E., & Offen, D. (2001). 6-Hydroxydopamine increases ubiquitin-conjugates and protein degradation: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 21(6), 771-781.
- Emerit, J., Edeas, M., & Bricaire, F. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 58(1), 39-46.
- Engelender, S., Kaminsky, Z., Guo, X., Sharp, A., Amaravi, R., Kleiderlein, J., et al. (1999). Synphilin-1 associates with alpha-synuclein and promotes the formation of cytosolic inclusions. *Nat Genet.*, 1, 110-114.
- Fahn, S., & Sulzer, D. (2004). Neurodegeneration and Neuroprotection in Parkinson Disease. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(1), 139-154.
- Faijes, M., Mars, A. E., & Smid, E. J. (2007). Comparison of quenching and extraction methodologies for metabolome analysis of *Lactobacillus plantarum*. *Microbial Cell Factories*, 6(27), 1-8.
- Fermaglich, J. (1996). The Case of the Frozen Addicts. *The Journal of the American Medical Association*, 275(5), 407-408.
- Foulds, P., Mann, D. M. A., Mitchell, J. D., & Allsop, D. (2010). Parkinson disease: Progress towards a molecular biomarker for Parkinson disease. *Nat Rev Neurol*, 6(7), 359-361.
- Foundation, P. s. D. (2011). Symptoms. *Understanding Parkinson's* Retrieved 2011/06/06, 2011, from <http://www.pdf.org/en/symptoms>
- Garfinkel, D. (1966). A simulation study of the metabolism and compartmentation in brain of glutamate, aspartate, the krebs cycle, and related metabolites. *The journal of biological chemistry*, 241(17), 12.
- Gerber, G., Preissler, H., Heinrich, R., & Rapoport, S. M. (1974). Hexokinase of Human Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*, 45(1), 39-52.

- Gmati, D., Chen, J., & Jolicoeur, M. (2005). Development of a small-scale bioreactor: Application to in vivo NMR measurement. *Biotechnology and Bioengineering*, 89(2), 138-147.
- Goedert, M. (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews. Neuroscience*, 2(7), 492-501.
- Haefner, J. W. (1996). *Modeling biological systems : principles and applications*. New York [u.a.]: Capman & Hall [u.a.].
- Hafler, D. A. (2004). Multiple sclerosis. *The Journal of Clinical Investigation*, 113(6), 788-794.
- Halbach, O. v. B. u., Schober, A., & Krieglstein, K. (2004). Genes, proteins, and neurotoxins involved in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 73(3), 151-177.
- Hammami, I., Chen, J., Bronte, V., DeCrescenzo, G., & Jolicoeur, M. (2012). l-glutamine is a key parameter in the immunosuppression phenomenon. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 425(4), 724-729.
- Heinrich, R., & Schuster, S. (1996). *The Regulation of Cellular Systems*: Springer.
- I.H.M.A. (1882). *The Clinique* (Vol. 3). Chicago: Authoroty of The Hospital Board.
- Ischiropoulos, H. (2003). Oxidative Modifications of α -Synuclein. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 991(1), 93-100.
- Itier, J.-M., Ibáñez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., et al. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 12(18), 2277-2291.
- Kageyama, T., Nakamura, M., Matsuo, A., Yamasaki, Y., Takakura, Y., Hashida, M., et al. (2000). The 4F2hc/LAT1 complex transports -DOPA across the blood-brain barrier. *Brain Research*, 879(1-2), 115-121.
- King, E. L., & Altman, C. (1956). A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme-Catalyzed Reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 60(10), 1375-1378.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., et al. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. . *Science*, 219, 979-980.

- Langston, J. W., & Palfreman, J. (1995). *The case of the frozen addicts*. New York: Pantheon Books.
- Leduc, M., Tikhomiroff, C., Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2006). Development of a kinetic metabolic model: application to *Catharanthus roseus* hairy root. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 28(5), 295-313.
- Lee, H.-J., Khoshaghideh, F., Patel, S., & Lee, S.-J. (2004). Clearance of α -Synuclein Oligomeric Intermediates via the Lysosomal Degradation Pathway. *Journal of Neuroscience*, 24, 1888-1896.
- Liu, S., Ninan, I., Antonova, I., Battaglia, F., Trinchese, F., Narasanna, A., et al. (2004). α -Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release. *EMBO Journal*, 23(22), 4506-4516.
- Luo, B., Groenke, K., Takors, R., Wandrey, C., & Oldiges, M. (2007). Simultaneous determination of multiple intracellular metabolites in glycolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle by liquid chromatography & mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1147(2), 153-164.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., & Scheller, R. H. (1988). Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J. Neurosci.*, 8(8), 2804-2815.
- Marsden, C. D. (1990). Parkinson's Disease. *Lancet*, 335, 948-952.
- Matsumine, H., Saito, M., Shimoda-Matsubayashi, S., Tanaka, H., Ishikawa, A., Nakagawa-Hattori, Y., et al. (1997). Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *The American Journal of Human Genetics*, 60(3), 588-596.
- McIntyre, C., Savasta, M., Walter, B., & Vitek, J. (2004). How does deep brain stimulation work? Present understanding and future questions. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 21, 40-50.
- McKeith, I. G., Galasko, D., Kosaka, K., Perry, E. K., Dickson, D. W., Hansen, L. A., et al. (1996). Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB). *Neurology*, 47(5), 1113-1124.
- Miller, G. W. (2007). Paraquat: The Red Herring of Parkinson's Disease Research. *Toxicological Sciences*, 100(1), 1-2.

- Nazaret, C., Heiske, M., Thurley, K., & Mazat, J.-P. (2009). Mitochondrial energetic metabolism: A simplified model of TCA cycle with ATP production. *Journal of Theoretical Biology*, 258(3), 455-464.
- NC-IUBMB, N. C. o. t. I. U. o. B. a. M. B. (2011, 2011-01-01). Enzyme Nomenclature. *Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse* Retrieved 2011-01-01, 2011, from <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- NLoM, N. L. o. M. (2011). Genetics Home Reference. Retrieved 14/06/2011, 2011, from <http://ghr.nlm.nih.gov/>
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Human Mutation*, 31(7), 763-780.
- Organization, W. H. (1993). *The ICD-10 classification of mental and behavioural disorders : diagnostic criteria for research*. Geneva.
- Osaka, H., Wang, Y.-L., Takada, K., Takizawa, S., Setsuie, R., Li, H., et al. (2003). Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Human Molecular Genetics*, 12(16), 1945-1958.
- Owen, J. B., & Butterfield, D. A. (2010). Measurement of Oxidized/Reduced Glutathione Ratio. *Methods in Molecular Biology*, 648(2), 267-277.
- Palsson, B. O., Price, N. D., & Papin, J. A. (2003). Development of network-based pathway definitions: the need to analyze real metabolic networks. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 195-198.
- Pankratz, N., Wilk, J. B., Latourelle, J. C., DeStefano, A. L., Halter, C., Pugh, E. W., et al. (2008). Genomewide association study for susceptibility genes contributing to familial Parkinson disease. *Human genetics*(124), 593–605.
- Parkinson, J. (1817). *An Essay on the Shaking Palsy*. Unpublished manuscript.
- Paxinou, E., Chen, Q., Weisse, M., Giasson, B. I., Norris, E. H., Rueter, S. M., et al. (2001). Induction of alpha-Synuclein Aggregation by Intracellular Nitritative Insult. *The Journal of Neuroscience*, 21(20), 8053-8061.

- Pellerin, L., & Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (22), 10625-10629.
- Perrin, R. J., Woods, W. S., Clayton, D. F., & George, J. M. (2000). Interaction of Human α -Synuclein and Parkinson's Disease Variants with Phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 275(44), 34393-34398.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., et al. (1997). Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047.
- Powell, S. R., & Divald, A. (2010). The ubiquitin-proteasome system in myocardial ischaemia and preconditioning. *Cardiovascular Research*, 85(2), 303-311.
- Pronin, A. N., Morris, A. J., Surguchov, A., & Benovic, J. L. (2000). Synucleins Are a Novel Class of Substrates for G Protein-coupled Receptor Kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(34), 26515-26522.
- Qi, Z., Miller, G. W., & Voit, E. O. (2009). Computational analysis of determinants of dopamine (DA) dysfunction in DA nerve terminals. *Synapse*, 63(12), 1133-1142.
- Qian, H., & Beard, D. A. (2006). Metabolic futile cycles and their functions: A systems analysis of energy and control. *IEE Proceedings: Systems Biology*, 153(4), 192-200.
- Raichur, A., Vali, S., & Gorin, F. (2006). Dynamic modeling of alpha-synuclein aggregation for the sporadic and genetic forms of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 142(3), 859-870.
- Rinne, J., Rummukainen, J., Paljarvi, L., & Rinne, U. (1989). Dementia in Parkinson's disease is related to neuronal loss in the medial substantia nigra. *Annals of Neurology*, 26, 47-50.
- Ritter, J. B., Genzel, Y., & Reichl, U. (2008). Simultaneous extraction of several metabolites of energy metabolism and related substances in mammalian cells: Optimization using experimental design. *Analytical Biochemistry*, 373(2), 349-369.
- Sankarapandi, S., & Zweier, J. L. (1999). Evidence against the Generation of Free Hydroxyl Radicals from the Interaction of Copper,Zinc-Superoxide Dismutase and Hydrogen Peroxide. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 34576-34583.
- Scheer, M., Grote, A., Chang, A., Schomburg, I., Munaretto, C., Rother, M., et al. (2011). BRENDA, the enzyme information system (Database issue) (Publication.:

- Schmidt, H., & Jirstrand, M. (2006). Systems Biology Toolbox for MATLAB: A computational platform for research in Systems Biology. *Bioinformatics*, 22(4), 514-515.
- Schulz, J. B., Lindenau, J., Seyfried, J., & Dichgans, J. (2000). Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry*, 267, 4904-4911.
- Senturk, M., Kufrevioglu, O. I., & Ciftci, M. (2009). Effects of some analgesic anaesthetic drugs on human erythrocyte glutathione reductase: an in vitro study. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2), 420-424.
- Shringarpure, R., & Davies, K. J. A. (2002). Protein turnover by the proteasome in aging and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(11), 1084-1089.
- Sian, J., Dexter, D. T., Lees, A. J., Daniel, S., Agid, Y., Javoy-Agid, F., et al. (1994). Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Annals of neurology*, 36(3), 348 to 355.
- Slevin, J. T., Gerhardt, G. A., Smith, C. D., Gash, D. M., Kryscio, R., & Young, B. (2005). Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputaminial infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Journal of Neurosurgery*, 102(2), 216-222.
- Sneppen, K., Lizana, L., Jensen, M. H., Pigolotti, S., & Otzen, D. (2009). Modeling proteasome dynamics in Parkinson's disease. *Physical Biology*, 6(3), 036005.
- Snyder, H., Mensah, K., Hsu, C., Hashimoto, M., Surgucheva, I., Festoff, B., et al. (2005). beta-Synuclein reduces proteasomal inhibition by alpha-synuclein but not gamma-synuclein. . *Journal of Biological Chemistry*, 280, 7562-7569.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., Jakes, R., Hasegawa, M., & Goedert, M. (1998). Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(11), 6469-6473.
- Spillantini, M. G., & Goedert, M. (2000). The α -Synucleinopathies: Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies, and Multiple System Atrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*(920), 16–27.
- Spina, M. B., & Cohen, G. (1989). Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 1398-1400.

- Stadtman, E. R. (2006). Protein oxidation and aging. *Free Radical Research*, 40(12), 1250-1258.
- Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P., & Holzhutter, H. (2000). Kinetic evidences for facilitation of peptide channeling by the proteasome activator PA28. *European Journal of Biochemistry*, 267, 6221-6230.
- Talati, R., Reinhart, K., Baker, W., White, C. M., & Coleman, C. I. (2009). Pharmacologic treatment of advanced Parkinson's disease: A meta-analysis of COMT inhibitors and MAO-B inhibitors. *Parkinsonism & Related Disorders*, 15(7), 500-505.
- Tyson, J. J., Chen, K. C., & Novak, B. (2003). Sniffers, buzzers, toggles and blinkers: dynamics of regulatory and signaling pathways in the cell. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(2), 221-231.
- Ulmer, T. S., Bax, A., Cole, N. B., & Nussbaum, R. L. (2005). Structure and Dynamics of Micelle-bound Human α -Synuclein. *Journal of Biological Chemistry*, 280(10), 9595-9603.
- Uversky, V. N. (2007). Neuropathology, biochemistry, and biophysics of α -synuclein aggregation. *Journal of Neurochemistry*, 103(1), 17-37.
- Vali, S., Mythri, R. B., Jagatha, B., Padiadpu, J., Ramanujan, K. S., Andersen, J. K., et al. (2007). Integrating glutathione metabolism and mitochondrial dysfunction with implications for Parkinson's disease: A dynamic model. *Neuroscience*, 149(4), 917-930.
- Viartis. (2009). Parkinson's Disease. from <http://viartis.net/parkinsons.disease/>
- Weber, J., & Senior, A. E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Letters*, 545(1), 61-70.
- Wellstead, P. (2008). A Systems Approach to Parkinson's Disease. Unpublished Working Draft. Hamilton Institute - Systems Biology.
- Wellstead, P., & Cloutier, M. (2010). An energy systems approach to Parkinson's disease. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 3(1), 1-6.
- Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*, 5(6), 483-494.

ANNEXES

Cet appendice est une compilation des documents supplémentaire dont le but est de compléter le mémoire sans toutefois alourdir le corps du texte. Ainsi, ces annexes regroupent l'ensemble des schémas, listes, textes, etc. qui sont requis pour une compréhension plus complète du processus scientifique poursuivi durant cette maîtrise.

DÉTAIL DE LA TABLE DES ANNEXES

A	GÉNÉTIQUE DE LA MALADIE DE PARKINSON	101
A.a.	Gènes autosomaux dominants.....	101
A.b.	Gènes autosomaux récessifs.....	101
B	STRUCTURE CHIMIQUE DE COMPOSÉS MENANT À LA MP ET MOLÉCULES SIMILAIRES.....	102
C	MÉTABOLISME DE L'α-SYNUCLÉINE ET DES CORPS DE LEWY	103
C.a.	L'α-syn et ses fonctions usuelles.....	103
C.b.	Voies d'endommagement de l'α-syn	104
C.b.a.	Génération de radicaux libres à partir du NO ₂ :.....	104
C.b.b.	Génération d'ions bicarbonate (HCO ₃ ⁻)	104
C.b.c.	Formation de radicaux libres par la réaction de Fenton	105
C.c.	Voies de gestion des espèces oxydatives-réactives.....	105
C.d.	Voies de gestion de l'α-syn endommagé	106
C.d.a.	UPP	106
C.d.b.	Voie lysosomale	106
C.d.c.	Agrégation vers la production de LB	107
C.d.a.	Dégradation des polymères et dégénérescence	107
C.d.b.	Corps de Lewy.....	108
D	VOIES RÉACTIONNELLES IMPLIQUANT LA DOPAMINE	109
E	LES EFFETS, SYMPTÔMES ET DIAGNOSTIQUE.....	110

F	TRAITEMENTS ET PALLIATIFS	112
F.a.	Traitements pharmaceutiques.....	112
F.a.a.	Traitements dopaminergiques.....	112
F.a.b.	Les inhibiteurs retardateurs	113
F.b.	Traitements électriques	113
G	RÔLES DES NAVETTES ÉNERGÉTIQUES NUCLÉOTIDIQUES	114
G.a.	Adénosine triphosphate	115
G.b.	Guanosine triphosphate	115
G.c.	Uridine triphosphate	116
G.d.	Cystidine triphosphate.....	116
H	COMMISSION DES ENZYMES	118
I	REPRÉSENTATION DES STRUCTURES PROTÉIQUES	119
J	PRÉSENTATION DES TRAVAUX : AFFICHES.....	121
J.a.	2 nd International Workshop on Systems Biology	121
J.b.	8 th World Congress of Chemical Engineering	124
J.c.	Fondations Of System's Biology Engineering 2009.....	129
J.d.	Computer Applications in Biotechnology.....	137
K	PRÉSENTATIONS DES TRAVAUX : DIAPORAMAS.....	148
K.a.	Ontario-Quebec Meeting of the Biotechnology Division of the Canadian Society of Chemical Engineering 2009	148
K.b.	Réunion Québec-Ontario de la division biotechnologique de la Société Canadienne de Génie Chimique 2010	148
K.c.	Pharmaqam 2010.....	149
K.d.	1 st Symposium on Systems Approaches to Parkinson's Disease.....	150
L	DONNÉES EXPÉRIMENTALES	151

A Génétique de la maladie de Parkinson

Cette annexe présente les tables regroupant les informations sur les causes courantes et moins courantes de la MP. Alors que le premier tableau présente les gènes autosomaux dominants, le second présente les gènes autosomaux récessifs.

A.a. Gènes autosomaux dominants

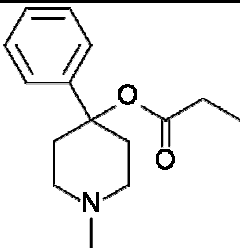
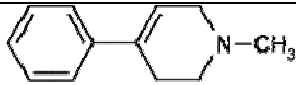
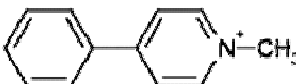
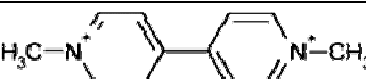
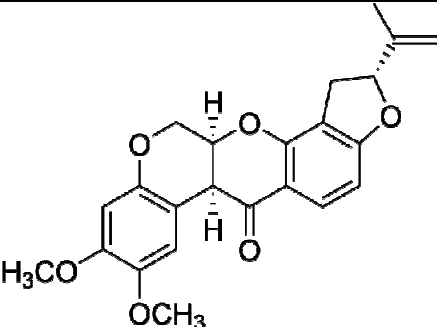
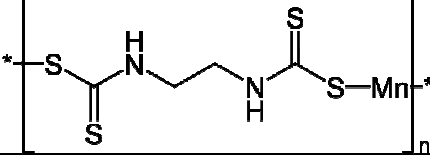
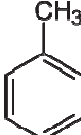
<i>Nom du locus</i>	<i>% de la pop. atteinte par la MP</i>	<i>Origine</i>	<i>Symbole</i>	<i>Locus</i>	<i>Protéine produite</i>	<i>Références</i>
PARK1	Rare	Italie, Grèce, Allemagne	<i>SNCA</i>	4q21	Alpha-synucléine	Polymeropoulos et al [1997]
PARK3	Inconnue	Europe	—	2p13	—	Gasser et al [1998]
PARK5	Rare	Allemagne	<i>UCHL1</i>	4p14	<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1</i>	Leroy et al [1998]
PARK8	2%-7%	Japon	<i>LRRK2</i>	12q12	<i>Leucine-rich repeat serine/threonine-protein kinase 2</i>	Funayama et al [2002] , Paisan-Ruiz et al [2004] , Zimprich et al [2004]

A.b. Gènes autosomaux récessifs

<i>Nom du locus</i>	<i>% de la pop. atteinte par la MP</i>	<i>Origine</i>	<i>Symbole</i>	<i>Locus</i>	<i>Protéine produite</i>	<i>Références</i>
PARK2	50% (récessif)	Japon	<i>PARK2</i>	6q25.2-q27	E3 ubiquitin protéin ligase (parkin)	Kitada et al [1998]
PARK6	Inconnue	Europe	<i>PINK1</i>	1p36	<i>PTEN induced putative kinase 1</i>	Valente et al [2001] , Valente et al [2004]
PARK7	Inconnue		<i>PARK7</i>	1p36	Protein DJ-1	van Duijn et al [2001]

B Structure chimique de composés menant à la MP et molécules similaires

Cette annexe présente les structures chimiques de différents composés menant à la MP et certaines molécules similaires³⁴

MPPP	
MPTP	
MPP ⁺	
Paraquat	
Roténone	
Maneb	
Toluène	
N-hexane	
Disulfide de carbone	$S=C=S$

³⁴ Provenant en partie de Miller (2007).

C Métabolisme de l' α -synucléine et des corps de Lewy

Cette annexe est un texte qui décrit dans un premier temps la protéine d'intérêt et ses fonctions usuelles. Les voies d'endommagement de la protéine sont ensuite mises de l'avant en détail. Par la suite, les mécanismes de gestion du stress oxydatif et de l' α -synucléine dénaturée seront abordés. Finalement les conséquences importantes de l'accumulation de cette protéine en agrégats et en corps d'inclusion cellulaire sur la gestion de l' α -synucléine seront discutées pour mettre l'accent sur le fait que ce sont ces dernières qui mènent à l'apparition des symptômes liés à la maladie de Parkinson.

C.a. L' α -syn et ses fonctions usuelles

La protéine d' α -synucléine est un polypeptide *acide* composé de 140 acides aminés présent sur le chromosome 4q21. (Spillantini & Goedert, 2000) Sa structure tridimensionnelle comporte deux hélices alpha superposables reliées par un court coude et suivies d'un prolongement en C-terminal – figure ci-contre. (Ulmer, Bax, Cole, & Nussbaum, 2005)



L' α -synucléine est présente aussi sous une forme désordonnée. Malgré qu'en conditions normales, cette première, stable et soluble dans sa conformation hélicoïdale, retrouvée généralement associée aux membranes, soit prédominante, elle existe aussi sous une autre isoforme désordonnée, fibrillaire, cytosolique et insoluble. (Lee et al., 2002)

Son nom provient de sa localisation apparente sur les terminaisons nerveuses présynaptiques et l'enveloppe nucléaire lors de son premier séquençage. (Maroteaux, Campanelli, & Scheller, 1988) À tort pour la seconde partie, l' α -syn a toutefois conservé son appellation.

Malgré que certaines expériences aient démontré qu'elle se lie aux membranes lipidiques, il semblerait que sa phosphorylation par des récepteurs kinases couplés à des protéines-G réduirait sa propension à interagir avec les membranes phospholipidiques. (Perrin, Woods, Clayton, & George, 2000; Pronin, Morris, Surguchov, & Benovic, 2000) Toutefois, il semblerait que la synphilin-1 serait une molécule-adaptatrice qui permettrait à l' α -syn de se lier aux membranes lipidiques, permettant finalement à cette dernière d'avoir un rôle dans la plasticité synaptique vers la récupération de la dopamine relarguée.

Enfin, malgré que l'on ait des raisons de croire que l' α -syn a un rôle lié à la plasticité des vésicules des terminaisons présynaptiques, leurs fonctions physiologiques comme celle découverte par Liu sont toutefois toujours indéterminées ou faiblement comprises (Abeliovich et al., 2000; Davidson, Jonas, Clayton, & George, 1998; Engelender et al., 1999; Goedert, 2001; Liu et al., 2004).

C.b. Voies d'endommagement de l' α -syn

Tel que rapporté par Davies, les protéines sont naturellement sensibles aux radicaux oxydatifs. Une modification oxydative implique une segmentation directe ou une dénaturation de la protéine, menant à sa dégradation, protéolyse (Davies, 1987).

De la même manière, l' α -syn se retrouve en conformation dénaturée, dépliée, sous l'action de différentes voies générant ces radicaux oxydatifs, regroupées sous la dénomination de stress oxydatif. Tel que décrit par Raichur, on trouve dans ce groupe l'oxyde nitrique synthétase (NOS) et la superoxyde dismutase (SOD). Les quatre composés impliqués vers l'agrégation de la protéine sont les radicaux libres de dioxyde d'azote ($\text{NO}_2^\cdot$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le bicarbonate (HCO_3^-) et le fer (Fe^{+2}) (Raichur et al., 2006).

Les prochaines sous sections sont adaptées de l'ouvrage de Raichur, Vali et Gorin.

C.b.a. Génération de radicaux libres à partir du NO_2 :

Le processus de génération de radicaux libres à partir du NO_2 passe par l'oxydation d'acides aminés grâce à l'enzyme NOS. Provenant de la perte d'électron du dioxygène ou des réactions catalysées par la xanthine oxydase et la cyclooxygenase, les ions superoxyde ($\text{O}_2^\cdot$) présents réagissent avec les oxydes nitriques (NO) générés par la NOS pour générer du peroxynitrate (ONOO^-). Ce complexe se dégrade ensuite naturellement et donne naissance à ces radicaux libres d'oxyde nitriques ($\text{NO}_2^\cdot$) qui peuvent ensuite endommager l' α -syn par nitrosylation des tyrosines présents dans sa chaîne polypeptidique. (Contestabile, Monti, Contestabile, & Ciani, 2003).

C.b.b. Génération d'ions bicarbonate (HCO_3^-)

Le dioxyde de carbone présent dans nos fluides corporels est en équilibre avec les ions biocarbonate. Ce dernier favorise l'activité peroxidase de la superoxyde dismutase vers l'oxydation, la nitrification et l'agrégation de l' α -syn.

Réagissant ensemble, le CO_2 et le peroxy-nitrate (ONOO^-) forment un complexe peroxy-nitrosocarbonate (ONOOCO_2^-) qui se décompose pour générer des radicaux libres : $\text{NO}_2^\cdot$ et $\text{CO}_3^\cdot$ (Andreopoulos, Zhang, Joseph, Kalivendi, & Kalyanaraman, 2004).

C.b.c. Formation de radicaux libres par la réaction de Fenton

Alors que les ressources en fer sont habituellement sous forme insoluble dans le cerveau, le vieillissement et l'augmentation des composés oxydants réactifs provoque le relargage d'ions ferriques solubles dans la *substantia nigra* par la neuromélanine (Hentze et al., 2004). En plus, puisque les niveaux de fer présent dans cette région sont en effet plus élevé chez les individus affectés par la MP, comparativement à des individus contrôle, des radicaux libres $\text{OH}^\cdot$ sont créés par la réaction Fenton, entre ces ions et le peroxyde d'hydrogène (Caltagirone et al., 2001).

Ce peroxyde d'hydrogène est produit soit par la combinaison l'état oxydoréductif des ions métalliques à l'oxydation du superoxyde ($\text{O}_2^\cdot$) par la superoxyde dismutase, par la dégradation de la dopamine par la monoamine oxydase (MAO), ou par la formation de dioxygène ionique ($\text{O}_2^\cdot$) par la xanthine oxydase. Malgré qu'il soit dégradé par l'enzyme catalase ou par la glutathion peroxidase impliquant par la suite le cycle de glutathion (GSH et GSSG), ce peroxyde est un agent oxydant important vers l'endommagement de l' α -syn (Sankarapandi & Zweier, 1999; Schulz, Lindenau, Seyfried, & Dichgans, 2000; Spina & Cohen, 1989).

En plus, même à faible concentration (100 μM), les ions de fer interagissent avec de nombreux acides aminés; par exemple ils forment un complexe avec une tyrosine (53e acide aminé) de l' α -synucléine provoquant l'agrégation lors de l'absence d'autres oxydants (Wolozin and Golts, 2002).

C.c. Voies de gestion des espèces oxydatives-réactives

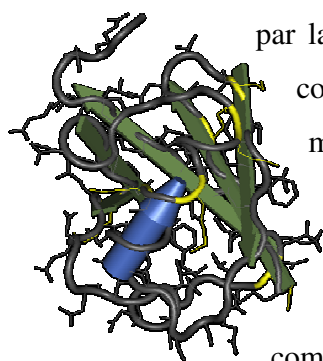
Les niveaux habituellement élevés de radicaux libres sont gérés par des enzymes anti-oxydatives comme le cycle de glutathion (GSH-GSSG), le SOD, le GPX et la catalase, ainsi que par d'autres substrats non-enzymatiques tels la vitamine C et l' α -tocopherol (Emerit, Edeas, & Bricaire, 2004). Il a été découvert que des baisses du système de gestion des espèces oxydatives-réactives sont associées à des baisses du GSH chez les personnes atteintes de la MP.

C.d. Voies de gestion de l' α -syn endommagé

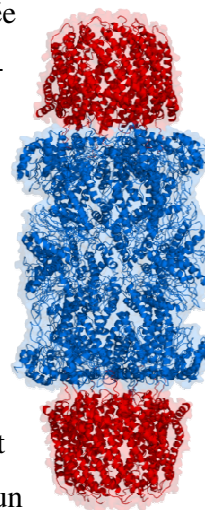
Une fois l' α -synucléine endommagée, la cellule doit gérer ces déchets afin d'en diminuer la toxicité. Ainsi, le métabolisme profite de la voie du protéasome et du lysosome qui sont les voies de dégradation usuelle des polypeptides (Stohwasser, Salzmann, Giesebrecht, Kloetzel, & Holzhtter, 2000), or il existe une voie d'agrégation qui peut devenir pathologique lorsqu'elle mène à la formation de corps d'inclusion.

C.d.a. UPP

L'ubiquitination et la dégradation par la voie du protéasome est la voie de recyclage des acides aminés. Une fois en fin de vie ou dans un état dénaturé, la protéine est identifiée



par la protéine *parkin* qui lui attache un ubiquitine (illustré ci-contre à gauche), identifiant la cible. Par la suite, la molécule subit une cascade d'ajouts par des lygases d'identifiants ubiquitine, quatre (4) au total, et peut enfin être reconnue par le protéasome. Présenté à la figure ci-contre à droite, ce dernier est un complexe protéique composé de différentes sous-unités (ici : 26S, soit 11S-20S-



11S). Alors que la chambre peptidases est la sous-unitée S20, la 11S est activatrice et la 19S est régulatrice (non représentée). Il est donc possible qu'un protéasome s'assemble de manière hybride avec ces trois complexes distincts avec l'unité 20S au centre, formant un élément 30S (Elkon, Melamed, & Offen, 2001; Powell & Divald, 2010).

Une fois la protéine dégradée, des enzymes hydrolases nommées « ubiquitin C-terminal hydrolase » (UCH-L1), détachent les ubiquitines présent et permettent de régénérer leur pool libre. (Ciechanover, 1998; Osaka et al., 2003; Snyder et al., 2005; Stohwasser, Salzmann, Giesebrecht, Kloetzel, & Holzhtter, 2000).

C.d.b. Voie lysosomale

Aussi, plus simplement, l' α -syn dénaturé peut être ingéré et digéré par les protéases contenues dans le lysosome. En effet, tel que démontré par Lee, bloquer cette voie métabolique cause l'accumulation d'agrégats et mène à la mort cellulaire. Il propose donc que l'augmentation de

cette voie lysosomale puisse ralentir ou même prévenir l'apparition de la maladie et d'autres maladies du même type (Lee, Khoshaghideh, Patel, & Lee, 2004).

C.d.c. Agrégation vers la production de LB

Enfin, l'agrégation de l' α -synucléine en corps de Lewy (LB, *Lewy bodies*) qui est une caractéristique de la MP, apparait suite à de nombreux différents facteurs. En effet, ces facteurs incluent la nitrosylation, la phosphorylation et les coupures polypeptidiques de la forme soluble de la protéine (Uversky, 2007). Son agrégation en corps d'inclusion est complexe et implique quelques étapes d'oligomérisation.

La nitrosilation et l'oxydation de l' α -synucléine native par radicaux libres carbonates et ferriques favorisent la formation de dimères (Paxinou et al., 2001). En plus, ces phénomènes sont plus accentués pour α -syn muté, résultant de mutations et de surexpression génétiques, puisque les taux de fibrillation sont plus élevés. (Ischiropoulos, 2003). Cette protéine dérégulée forme donc des dimères, couramment nommées « *seeds* », pour germes. C'est à partir de ces germes que le processus d'oligomérisation, de croissance, débute. Les oligomères sont des bases de croissance menant aux protofibrils et éventuellement aux inclusions fibrillés formés d' α -synucléine agrégé.

Bref, lors de la saturation des voies de dégradation régulières, le polypeptide suit une voie d'agrégation, il forme des dimères et polymères, protofibrils, agrégats et finalement corps d'inclusions.

C.d.a. Dégradation des polymères et dégénérescence

Alors que les dimères peuvent être dégradés par l'UPP et que les oligomères peuvent l'être par le lysosome, les agrégats ne peuvent pas être dégradés et ceux-ci diminuent par inhibition, la capacité du protéasome à gérer ces germes. Ainsi, les personnes atteintes de la maladie de Parkinson sont en déséquilibre entre les processus de production et de dégradation d'agrégats d' α -synucléine ; ce déséquilibre favorise l'accumulation.

Puisque l'accumulation d' α -synucléine inhibe de manière compétitive le protéasome, l'agrégation protéique vers la formation des corps de Lewy ne peut qu'accélérer³⁵ ; d'où une partie du

³⁵ Sous des conditions cellulaires où le taux de production d' α -synucléine ne diminue pas.

processus dégénératif (Baba et al., 1998; Chen et al., 2005; Spillantini, Crowther, Jakes, Hasegawa, & Goedert, 1998).

C.d.b. Corps de Lewy

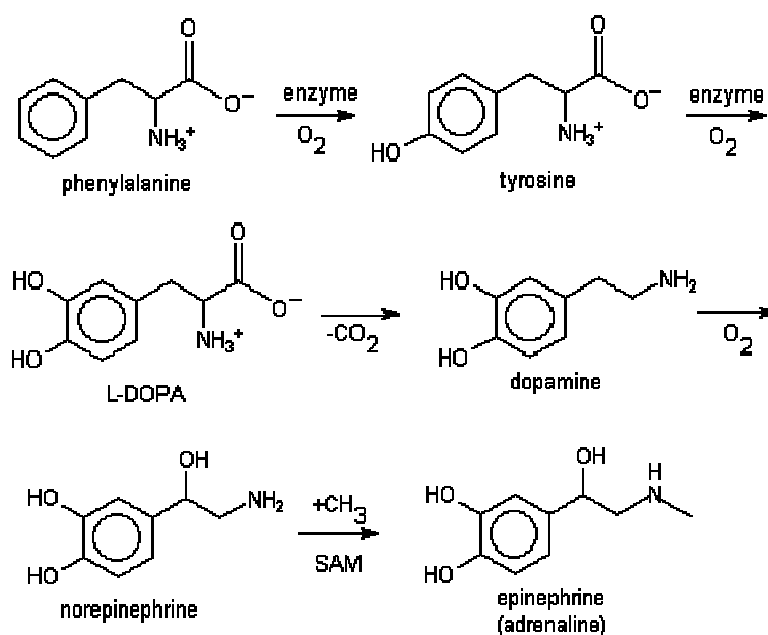
Découverts en 1912 par James Lewy, les corps éponymes (corps de Lewy, Lewy bodies - LB) sont les biomarqueurs importants de la maladie de Parkinson. Une telle accumulation d'alpha synucléine est parfois associée à d'autres maladies neurodégénérative comme la démence avec corps de Lewy, l'Alzheimer, le syndrome de Down et de Hallervorden-Spatz et l'atrophie systémique multiple.(Spillantini & Goedert, 2000).

Tel que mentionné par Uversky, il est toutefois important de se rappeler que malgré les défauts génétiques et les expositions à des toxines environnementales exceptionnelles, les théories pathologiques actuelles proposent une combinaison de susceptibilité génétique couplée à des facteurs de risques environnementaux ; que dans la majorité des cas, cette susceptibilité génétique modulerait les effets potentiels des facteurs environnementaux. (Uversky, 2007)

Enfin, dans une tentative de représenter la majorité des ces évènements de manière succincte, nous avons mis sur pied une description des voies métaboliques de la gestion de la protéine α -syn menant à la formation des LB, biomarqueur de la maladie dégénérative.

D Voies réactionnelles impliquant la dopamine

Cette annexe est un schéma réactionnel regroupant les voies qui concernent la production de dopamine à partir de L-DOPA. D'autres réactions ont aussi été ajoutées à des fins de compréhension globale.



E Les effets, symptômes et diagnostique

Les symptômes visibles sont frappants ; en voici une liste non exhaustive :

Tremblements, lenteur, problèmes d'équilibre, rigidité musculaire, fatigue, lente élocution, difficulté à écrire, posture voûtée, constipation, troubles du sommeil, état dépressif, problèmes sexuels, dysphagie, changements cognitifs, etc. (Parkinson's Disease Foundation, 2011).

Indubitablement, ces symptômes n'apparaissent pas tous de manière simultanée et certains peuvent ne pas être exprimés. Ainsi, l'évolution du parkinsonisme est découpée en cinq stades :

Stade 1	Les symptômes sont unilatéraux et comprennent au moins deux des trois symptômes suivants : tremblement de repos, raideur et akinésie.
Stade 2	Les symptômes commencent à devenir bilatéraux et peuvent alors inclure des problèmes d'élocution, une posture déformée et des difficultés à marcher.
Stade 3	Les symptômes bilatéraux s'aggravent et des problèmes d'équilibre peuvent apparaître. L'autonomie de la personne n'est généralement pas affectée.
Stade 4	L'invalidité est présente, mais l'autonomie de la personne n'est généralement pas affectée. La bradykinésie est plus prononcée de même que les fluctuations, si elles sont présentes.
Stade 5	La personne est confinée à un fauteuil roulant ou doit rester alitée.

Étant donné que plusieurs autres maladies présentent des symptômes similaires, il est important que la personne souffrante soit évaluée par un médecin traitant suite à l'apparition soutenue de symptômes. Le médecin évalue donc les critères ayant une valeur prédictive positive comme le tremblement, l'asymétrie des symptômes, le syndrome akinéto-rigide. Une réponse pharmacologique positive³⁶ sur un délai de près de 5 ans est un élément majeur vers le diagnostique de la MP. Après une dizaine d'années d'évolution, si l'exactitude de la réponse pharmacologique est assurée, le diagnostique est proposé. Habituellement, à ce stade, de nouvelles dyskinésies et fluctuations motrices refont surface et le traitement pharmacologique doit être adapté.

³⁶ Amélioration des symptômes de plus de 50% après un traitement dopaminergique à doses satisfaisantes.

Il n'existe aucun test diagnostique pour confirmer l'apparition de la MP. En outre que les analyses de sang actuelles ne permettent pas de détecter des niveaux particuliers d'hormones, de cytokines ou d'autres protéines pour la MP, les examens par imagerie³⁷ sont tout aussi incapables de relever les changements liés à la maladie. Ainsi, le médecin traitant doit se baser sur l'historique familial, les stades de développement de la maladie et les informations neurologiques à partir d'examens physiologiques afin d'établir le diagnostic. Autrement, la confirmation de la MP se fait de manière posthume (McKeith et al., 1996).

³⁷ Tel l'électroencéphalographie (EEG), la magnétoencéphalographie (MEG), l'imagerie par résonnance magnétique nucléaire (IRM), la tomographie axiale commandé par ordinateur (CAT) et la tomographie à émission de positrons (TEP).

F Traitements et palliatifs

Actuellement, la mP est une maladie irréversible; les traitements sont en vue de ralentir sa progression et d'améliorer la qualité de vie des personnes touchées. Bien que les fondements des recherches sur les traitements datent des années soixante, l'armementarium de la maladie est plutôt restreint. Or, il comporte des traitements pharmaceutiques et électriques.

F.a. Traitements pharmaceutiques

Les traitements pharmaceutiques utilisent différentes molécules dont les buts sont variés. Il y a les précurseurs de la dopamine et les agonistes dopaminergiques, les inhibiteurs spécifiques, puis les antioxydants et autres traitements symptomatiques.

F.a.a. Traitements dopaminergiques

Différentes molécules ont été conçues sur le modèle de la molécule même qui fait défaut au cerveau dans le cas de la mP, soit la dopamine. De par son efficacité et son innovation même, la molécule la plus connue est la L-DOPA, 3,4-dihydroxyphénylalanine. Cette molécule est naturellement synthétisée dans le cytosol par la l'enzyme tyrosine hydroxylase (EC# 1.14.16.2) à partir de la l-tyrosine, un acide aminé. Tel qu'illustré à l'annexe D, cette L-DOPA peut ensuite être décarboxylée en une étape pour donner la dopamine (EC# 4.1.1.28)³⁸. Alors que certains voudraient tout simplement prescrire de la dopamine prête à être utilisée, cette dernière ne parvient pas à se rendre à la cible. Toutefois, contrairement à la dopamine, la L-DOPA réussie à traverser la barrière hématoencéphalique grâce au complexe 4f2hc/lat1 (Kageyama et al., 2000), faisant ainsi de la L-DOPA un produit intéressant pour palier aux baisses de dopamine rencontrées chez les personnes souffrant de la maladie de Parkinson.

Ainsi, *Roche* a commercialisé la L-DOPA préparée avec un inhibiteur de la dopadécarboxylase (bensérazide) sous le nom de *Malopar* en juillet 1973 en Suisse. En effet, le traitement avec la L-DOPA seule ne permettait qu'un soulagement de moyenne durée ; après quelques années, on remarqua une recrudescence des tremblements, une augmentation de la rigidité et une

³⁸ Cette dernière peut par la suite être modifiée pour donner des catécholamines comme la norépinephrine et l'épinephrine.

accentuation du ralentissement global des patients. Ces inhibiteurs sont présentés à la sous-section F.a.b.

D'autres agonistes dopaminergiques comme la bromocriptine, le lisuride, le piribédil et le ropinirole sont utilisés avec de moindres complications, mais ne sont pas aussi efficaces que les traitements à base de L-DOPA.

F.a.b. Les inhibiteurs retardateurs

De nombreux produits couplant les effets sont disponibles ; par exemple, il y a le Prolopa (Lévodopa-Bensérazide par Roche®), Parcopa® (Lévodopa-Carbidopa par Azur Pharma®), le Stalevo® (Lévodopa-Carbidopa-Entacapone par Orion®), le Sinemet (Lévodopa-Carbidopa par DuPont-Merck®), etc.

Ces produits utilisent une combinaison de Lévodopa et d'inhibiteurs des enzymes mono-amine-oxydases (MAO) et les inhibiteurs des enzymes catéchol-o-méthyl-transférases (COMT) dont le but est de ralentir la dégradation respective de la dopamine et de la levodopa. (Talati, Reinhart, Baker, White, & Coleman, 2009).

Il existe aussi d'autres traitements retardateurs ou traitement symptomatiques utilisant seuls ou en combinaison des antioxydants, l'amantadine, les anticholinergiques, la sélégiline, etc.

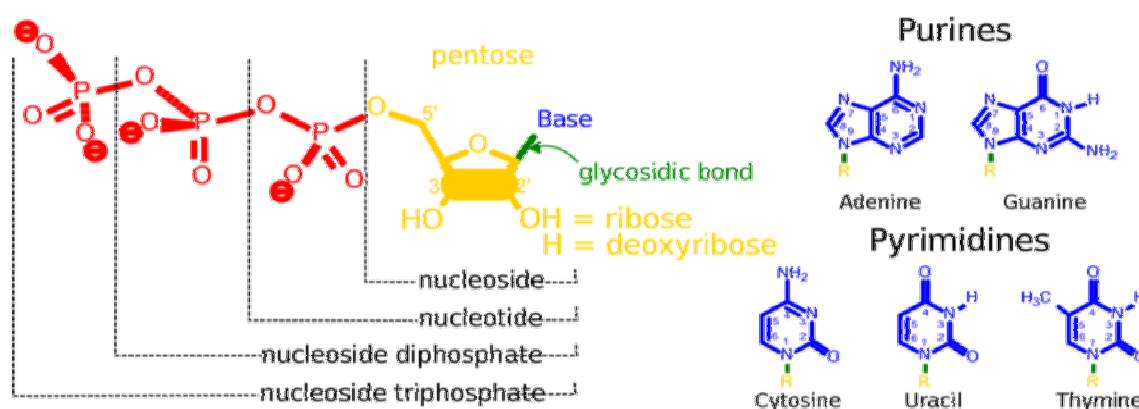
F.b. Traitements électriques

Malgré que son fonctionnement réel soit inconnu, l'électro-stimulation profonde du cerveau dans des zones sub-thalamiques (DBS pour « *deep brain stimulation* ») semble aider de manière draconienne à calmer (voir annuler) les symptômes principalement moteurs. Ce traitement est récent son effet à long terme reste à définir. DBS est typiquement pratiqué chez des patients qui se procurent des traitements chimiques; elle n'est pas vue comme un remplacement de ce traitement moléculaire.

Utilisées non uniquement pour la maladie de Parkinson, il semblerait que les électro-stimulations aient un effet relaxant sur la circuiterie électrique neuronale défaillante des patients. Dépendamment de la sensibilité des patients aux impulsions, ceux-ci ajustent la fréquence de stimulation pour identifier celle qui calme leurs symptômes moteurs (McIntyre, Savasta, Walter, & Vitek, 2004).

G Rôles des navettes énergétiques nucléotidiques

Dans cette annexe³⁹, les rôles cellulaires usuels des quatre types de nucléotides sont présentés en commençant par les purines (adénine et guanosine), puis les pyrimidines (cytidine et uridine). La figure suivante présente les différentes conformations chimiques des nucléotides. La structure chimique similaire est à remarquer : leur structure est composée de groupements phosphatés, d'un pentose et d'une base azotée alternante.



Leurs rôles les plus connus sont au niveau du stockage et du transit d'information cellulaire formant l'ADN (Acide Désoxyribo-Nucléique) et d'ARN (Acide Ribo-Nucléique). Alors qu'au niveau du noyau cellulaire, l'adénine, la guanine, la thymine et la cytosine sont retrouvés à l'intérieur de l'ADN, au niveau du cytosol la thymine est remplacée par l'uracil dans la formation de l'ARN. L'appariement des bases, leur codage vers l'expression protéique et leurs rôles génétiques sont largement détaillés dans les livres biologiques de base ; ces aspects ne seront pas abordés ici.

Malgré la grande importance de leur disponibilité lors de croissance cellulaire, un regard tourné vers le métabolisme fonctionnel avec un code génétique et une expression protéique relativement stable est plutôt choisit. Aussi, malgré qu'il existe aussi des formes cycliques de l'AMP et de la

³⁹ Cette partie est partiellement une adaptation contrevérifiée d'une discussion provenant du site web de « Protocol Online ; Your lab's reference book – 1999-2011 » (www.protocol-online.org) tenu à jour par Dr. Long-Cheng Li.

GMP servant de molécule signal⁴⁰, uniquement les formes usuelles triphosphatées seront abordées dans le but de déterminer leur importance relative pour le métabolisme énergétique cellulaire actif et réactif.

G.a. Adénosine triphosphate

L'adénosine est le nucléotide le plus utilisé dans la cellule puisqu'elle joue de nombreux rôles. Effectivement, elle peut être utilisée comme une source d'énergie et une source de phosphate. Ainsi, les ATPases, les enzymes qui hydrolysent le lien phosphate-phosphate, utilisent cette source d'énergie pour effectuer à leur tour des rôles très variés dans la cellule ; comme l'activation des myosines assurant les contractions ciliaires et musculaires, l'approvisionnement énergétique des canaux transmembranaires forçant des gradients ioniques, ou encore le chargement énergétique des autres nucléotides.

Aussi, les kinases, les enzymes qui utilisent le groupement phosphate disponible sur l'ATP, modifient des protéines et molécules en leur ajoutant ce groupement phosphate. Cette modification active certains enzymes alors qu'elle inhibe l'activité d'une autre, afin de contrôler le métabolisme. L'ATP est utilisée lors de la marche et de la régulation du métabolisme.

G.b. Guanosine triphosphate

Étant aussi une purine, la guanosine a des fonctions similaires à l'adénosine. En effet la GTP est utilisée comme substrat pour des réactions hydrolytiques où le troisième phosphate du GTP est transféré à l'enzyme tubuline pour permettre l'élongation des microtubules, les éléments forts du squelette cellulaire. Aussi, la GTP est requise pour la transduction de signaux cellulaires. Un type de GTPase, les protéines couplées à des récepteurs de type G, dénommées protéines-G, interagit avec de nombreuses voies enzymatiques tel Ras et Rab, grâce à son affinité pour la GTP qui active cette première. Ainsi des neurotransmetteurs et hormones présents dans l'environnement extracellulaire ont des répercussions internes avec ces protéines-G qui sont régulées par liage de la GTP.

⁴⁰ Ces molécules signal servent de second messenger dans lors d'activation cascades comme l'activation de la glycolyse par le glucagon par l'AMPC et l'activation de la kinase GMPC dépendante qui permet entre autre la relaxation des muscles lisses par la GMPC.

G.c. Uridine triphosphate

L'uridine est généralement utilisée comme molécule facilitatrice vers le stockage d'énergie par la production de macromolécules sucrées. Chez l'humain, ce stockage est temporaire, comparativement aux plantes qui stockent de manière permanente des sucres structuraux sous forme de cellulose. Ainsi pour l'homme, dans le cas de la production de polysaccharides de réserve, la cellule utilise l'UTP comme navette pour remplir les bassins énergétiques afin de prévenir les temps plus contraignant. Étant énergétiquement chargé, quand il se lie à un glucose phosphaté libre en cédant un groupement phosphate, l'UTP rend ce sucre plus réactif. Lorsque ce complexe est ensuite ajouté au glycogène en élongation, le lien UDP-glucose sera transposé entre le glycogène et le glucose, permettant à ce dernier de s'y lier et de stocker cette énergie temporairement, jusqu'à ce que la cellule soit en demande énergétique.

G.d. Cystidine triphosphate

Tout comme l'uridine, la cytidine est utilisée comme molécule facilitatrice, toutefois celle-ci est utilisée vers la production de phosphoglycérides et vers la modification de molécules actives. Premièrement, les phospholipides créés avec l'utilisation de la CTP ont un rôle de second messenger comme c'est le cas avec l'acide phosphatidique, ou un rôle structural de fluidifiant pour les doubles membranes phospholipidiques formant les cellules comme c'est le cas avec la lécithine. Enfin, la CTP est utilisée à des fins de glycosylation. En effet lors de la modification posttraductionnelle des protéines, l'ajout de différents sucres à la protéine requiert l'action de la CTP. Celle-ci est un substrat dans la formation du complexe sucre-nucléotide qui sera à son tour nécessaire à la formation des oligosaccharides greffés aux protéines⁴¹.

⁴¹ Par exemple, tout comme pour la formation du glycogène, l'UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransférase (E.C.# : 2.7.7.9) utilise une UTP et la lie au glucose-1-phosphate, créant un complexe UDP-glucose-phosphate. Par la suite, ce dernier sera par la suite transformé en UDP-galactose-1-phosphate par l'enzyme galactose-1-phosphate uridylyltransférase (E.C.# : 2.7.7.12). Enfin le galactose seul sera ajouté à une protéine grâce à une galactosyltransferase; la glycosylation avec un galactose est terminée.

Bref, il semble que les pyrimidines (UTP et CTP) soient des molécules davantage « facilitatrices » que les purines (ATP et GTP). Toutefois ces dernières semblent plus réactives et des meilleures candidates pour des réactions nécessitant des co-enzymes rapides.

Enfin bien que ces nucléotides aient des rôles préférés par la cellule, ces différentes molécules sont relativement interchangeables. Ainsi en cas de déficit d'une espèce, une autre peut servir de substrat à sa place ; toutefois la cinétique de réaction en sera affectée, elle sera réduite.

H Commission des enzymes

La commission des enzymes a établi une classification numérique des enzymes basée sur la réaction qu'elles catalysent. Selon cette nomenclature, chaque enzyme a son matricule unique à quatre (4) numéros⁴². L'arborescence les répertorie en trois couches. Dans l'ordre, le nombre primaire indique le type de la réaction catalysée, le nombre secondaire indique le substrat général de la réaction et le nombre tertiaire indique le substrat spécifique de la réaction. Le dernier nombre est le numéro de série de l'enzyme de cette catégorie tertiaire.

La classification complète est disponible à la page internet de la Commission (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) au lien : chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/ (NC-IUBMB, 2011). Pour de fins de clareté, le premier niveau d'identifiants est présenté ici. Les réactions sont classifiées selon les six (6) familles suivantes :

1. Oxydo-réductases

Ces enzymes catalysent les réactions du même type sur vingt-trois (23) accepteurs et donneurs.

2. Transférases

Ces protéines permettent le transfert de groupements fonctionnels de dix (10) types.

3. Hydrolases

Ces polypeptides hydrolysent treize (13) types de liens covalants.

4. Lyases

Ces protides brisent des liens par des procédés différents de l'hydrolyse et l'oxydation de sept (7) types de liaisons covalantes.

5. Isomérases

Ces protides permettent la transformation intrinsèque de six (6) types de molécules.

6. Ligases

Ces protéides joignent deux molécules par six (6) différents types de liaisons covalentes.

⁴² La classification recommande aussi un nom unique pour chaque enzyme.

I Représentation des structures protéiques

Cette annexe présente en images les structures des protéines en quatre temps. Dans l'ordre, les figures pises de l'ouvrage de Cambell présentent respectivement les structures primaires, secondaires, tertiaires et quaternaires (Campbell, 1995).



Figure A : Représentation de la structure primaire d'une protéine

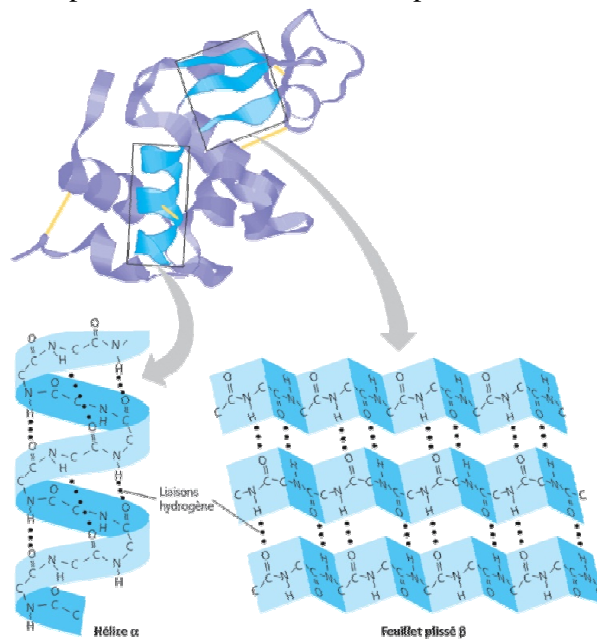


Figure B : Représentation de la structure secondaire d'une protéine

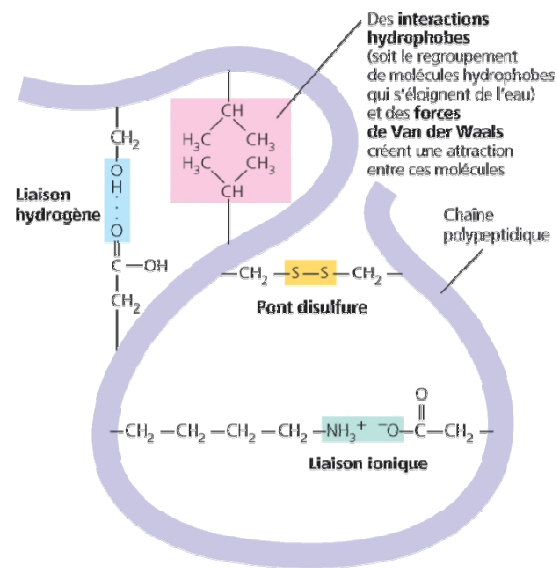


Figure C : Représentation de la structure tertiaire d'une protéine

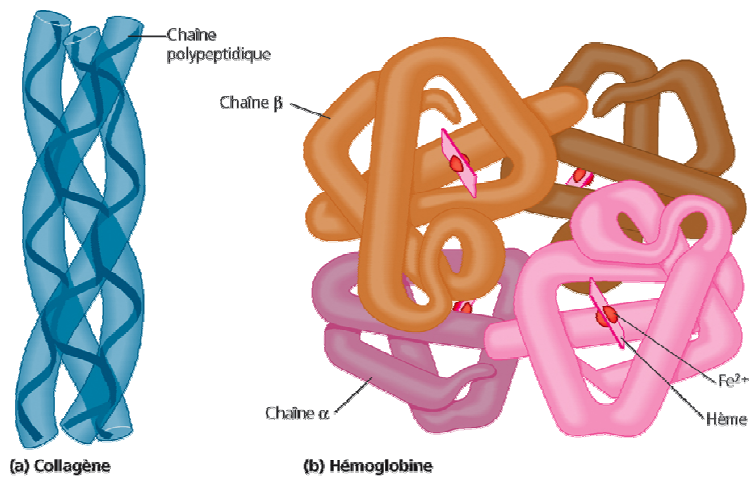


Figure D : Représentation de la structure quaternaire d'une protéine

J Présentation des travaux : Affiches

L'annexe H contient les documents soumis et acceptés ainsi qu'une version réduite de l'affiche présentée à divers ateliers et congrès.

Annexe J.a :	2 nd International Workshop on Systems Biology, page :	121
Annexe J.b :	8 th World Congress of Chemical Engineering, page :	124
Annexe J.c :	Fondations Of System's Biology Engineering 2009,	page 129
Annexe J.d :	Computer Applications in Biotechnology,	page 137

J.a. 2nd International Workshop on Systems Biology

L'annexe J.a est un document accepté pour une présentation d'une affiche au 2nd International Workshop on Systems Biology à Maynooth (Co. Kildare, Irlande) du 17 au 20 août 2008. Les travaux ont été présentés par le premier auteur.

CIT : Poliquin, P. O., Cloutier & Wellstead, P. (2009). *Dynamic Modeling of Parkinson's Disease Development*. Poster presented at the 2nd International Workshop on Systems Biology (Co. Kildare, Ireland).

DYNAMIC MODELLING OF PARKINSON'S DISEASE DEVELOPMENT

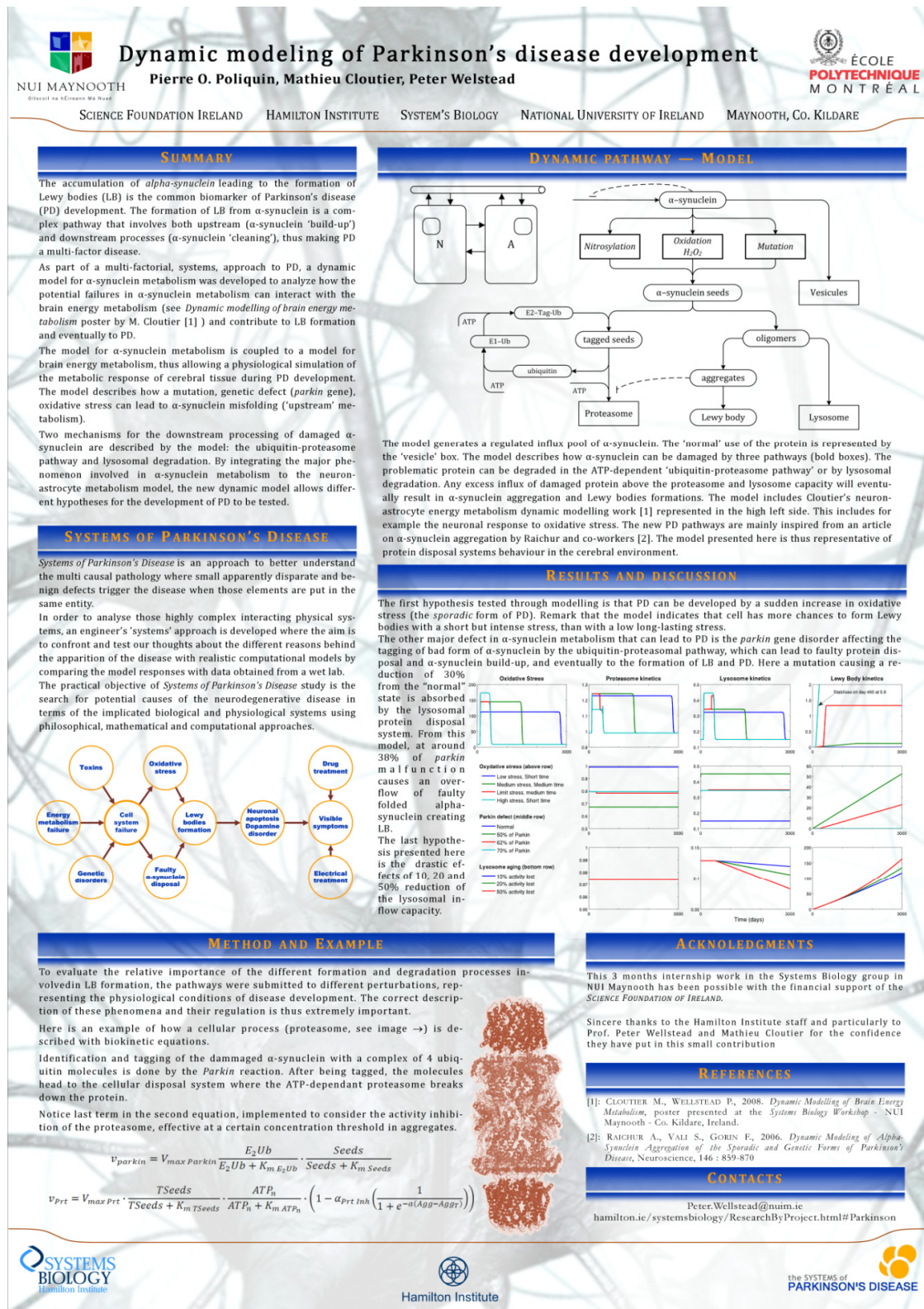
Pierre Olivier Poliquin, Mathieu Cloutier, Peter Wellstead

Abstract

The accumulation of α -synuclein leading to the formation of Lewy bodies (LB) is the common biomarker of Parkinson's disease (PD) development. The formation of LB from α -synuclein is a complex pathway that involves both upstream (α -synuclein 'buildup') and downstream processes (α -synuclein 'cleaning'), thus making PD a multi-factor disease. As part of a multi-factorial, systems, approach to PD, a dynamic model for α -synuclein metabolism was developed to analyze how the potential failures in α -synuclein metabolism can interact with the brain energy metabolism (see *Dynamic modelling of brain energy metabolism* poster by M. Cloutier) and contribute to LB formation and eventually to PD. The model for α -synuclein metabolism is coupled to a model for brain energy metabolism, thus allowing a physiological simulation of the metabolic response of cerebral tissue during PD development. The model describes how a mutation, genetic defect (*parkin* gene), oxidative stress can lead to α -synuclein misfolding ('upstream' metabolism).

Two mechanisms for the downstream processing of damaged α -synuclein are described by the model: the ubiquitin-proteasome pathway and lysosomal degradation. By integrating the major phenomenon involved in α -synuclein metabolism to the neuron-astrocyte metabolism model, the new dynamic model allows different hypotheses for the development of PD to be tested. A first hypothesis is that PD can be developed by a sudden increase in oxidative stress (the sporadic form of PD). Simulation results show that the oxidative stress, depending on its strength, can effectively destabilize the α -synuclein metabolism from its 'healthy' steady-state and to induce the formation of LB. The other major defect in α -synuclein metabolism that can lead to PD is the *parkin* gene disorder affecting the ubiquitin-proteasomal pathway, which can lead to faulty protein disposal and α -synuclein build-up, and eventually to the formation of LB and PD. This mechanism is also correctly predicted by the model. Moreover, the model can show that a combination of factors, oxidative stress and *parkin* defect, can increase the susceptibility of the cerebral tissue to PD development.

Affiche réduite



J.b. 8th World Congress of Chemical Engineering

L'annexe J.b est un document accepté pour une présentation d'une affiche au 8th World Congress of Chemical Engineering à Montréal (Québec, Canada) ayant lieu du 23 au 27 août 2009. Les travaux ont été présentés par le premier auteur.

CIT : Poliquin, P. O., Cloutier, M., Jolicoeur, M., Perrier, M., & Wellstead, P. (2009). *Dynamic modeling of Parkinson's Disease development*. Paper presented at the 8th World Conference of Chemical Engineering, (Montreal, Qc., Canada)

DYNAMIC MODELING OF PARKINSON'S DISEASE DEVELOPMENT

Pierre O. Poliquin^{1*}, Mathieu Cloutier.^{1,2}, Mario Joplicoeur¹, Michel Perrier^{1,3}, Peter Wellstead²

1-Département de génie chimique, École Polytechnique de Montréal, Montréal, Canada

2-Systems Biology, Hamilton Institute, National University of Ireland, Maynooth, Ireland

3-Institut de Robòtica i Informàtica, Parc Tecnològic de Barcelona, Barcelona, Spain

Abstract

The accumulation of alpha-synuclein leading to the formation of Lewy bodies (LB) is the common biomarker of Parkinson's disease (PD) development. The formation of LB from α -synuclein is a complex pathway that involves both upstream (α -synuclein 'build-up') and downstream processes (α -synuclein 'cleaning'), thus making PD a multi-factor disease.

As part of a multi-factorial, systems, approach to PD, a dynamic model for α -synuclein metabolism was developed to analyze how the potential failures in α -synuclein metabolism can interact with the brain energy metabolism and contribute to LB formation and eventually to PD.

The model for α -synuclein metabolism is coupled to a model for brain energy metabolism, thus allowing a physiological simulation of the metabolic response of cerebral tissue during PD development. The model describes how a mutation, genetic defect (parkin gene), oxidative stress can lead to α -synuclein misfolding ('upstream' metabolism).

Two mechanisms for the downstream processing of damaged α -synuclein are described by the model: the ubiquitin-proteasome pathway and lysosomal degradation. By integrating the major phenomenon involved in α -synuclein metabolism to the neuron-astrocyte metabolism model, the new dynamic model allows different hypotheses for the development of PD to be tested.

Keywords

Parkinson's disease, dynamic modeling, neuron-astrocyte metabolism, α -synuclein, Lewy body formation.

* To whom all correspondence should be addressed: pierre-olivier.poliquin@polymtl.ca

1. Systems of Parkinson's disease

Systems of Parkinson's disease is an approach to better understand the multi causal pathology where small apparently disparate and benign defects trigger the disease when those elements are put in the same entity.

In order to analyse those highly complex interacting physical systems, an engineer's 'systems' approach is developed where the aim is to confront and test our thoughts about the different reasons behind the apparition of the disease with realistic computational models by comparing the model responses with data obtained from a wet lab. The practical objective of Systems of Parkinson's Disease study is the search for potential causes of the neurodegenerative disease in terms of the implicated biological and physiological systems using philosophical, mathematical and computational approaches.

As expressed in *Figure 1*, the analysis of the complex build-up and cleaning processes of unfolded α -synuclein is the core element in this study as it induces cell system failure. This usually benign unfolded protein becomes problematic as the pathways of its generation befall disorganised. It is created by genetic disorders as the parkin gene is wrongfully expressed, by general energy metabolism failure where the ATP is not produced enough for the cell's maintenance needs, and by accumulation of toxins originating from a faulty glutathione turnover. Then this cell system failure induces oxidative stress and ubiquitine-proteasome protein disposal pathway disfunction. In the end, considering the augmentation of inflow and diminution of outflow of this badly folded protein, it aggregates and forms inclusion bodies, named Lewy bodies. Symptomatically, these cell failures result in neuronal apoptosis and dopamine disorder, creating visible symptoms as shaking palsy, which can be treated with specific drugs or electrical treatment like deep brain stimulation.

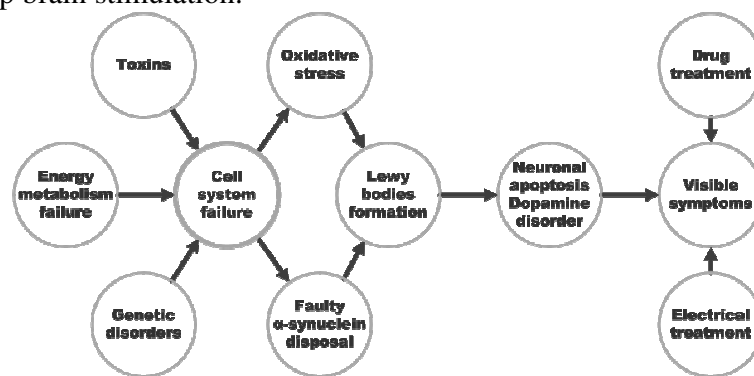


Figure 1: System's of Parkinson's disease

2. Dynamic pathway

The model (Figure 2) generates a regulated influx pool of α -synuclein. The 'normal' use of the protein is represented by the 'vesicles' box, as α -synuclein is used to help dopamine recuperation with vesicles in synapses. The model describes how α -synuclein can be damaged by three pathways (bold boxes). The problematic protein can be degraded in the ATP-dependent 'ubiquitin-proteasome pathway' or by lysosomal degradation. Any excess influx of damaged protein above the proteasome and lysosome capacity will eventually result in α -synuclein aggregation and Lewy bodies' formations. The model includes Cloutier's neuron-astrocyte energy metabolism dynamic modelling work [1] represented in the high left side. This includes

for example the neuronal response to oxidative stress. The new PD pathways are mainly inspired from an article on α -synuclein aggregation by Raichur and co-workers. The model presented here is thus representative of protein disposal systems behaviour in the cerebral environment.

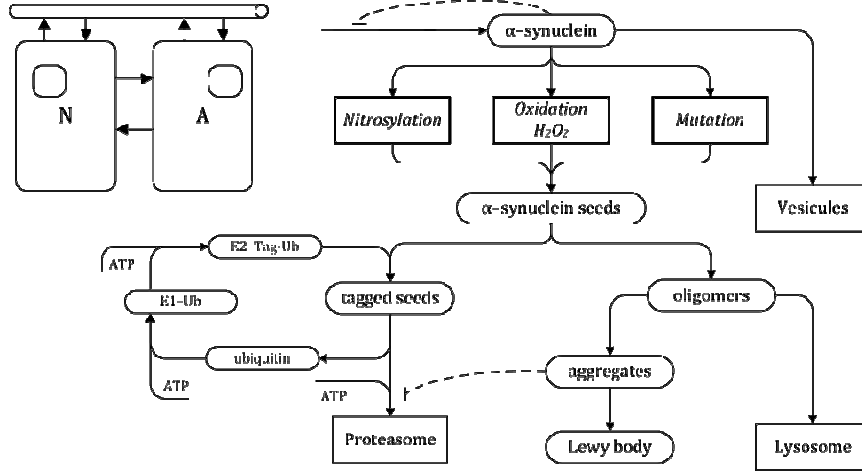


Figure 2: Dynamic α -synuclein metabolism pathway; the square boxes are processes and the round ones are chosen key species. Note that the $N \leftrightarrow A$ box represents the neuron-astrocyte model connected to a capillary of Cloutier, similar one of Aubert and Costalat.

To evaluate the relative importance of the different formation and degradation processes involved in LB formation, the pathways were submitted to different perturbations, representing the physiological conditions of disease development. The correct description of these phenomena and their regulation is thus extremely important.

The formulas 1 and 2 are examples of how a cellular process, i.e. α -synuclein tagging and proteasome, are described with biokinetic equations. Identification and tagging of the damaged α -synuclein with a complex of 4 ubiquitin molecules is done by the *Parkin* reaction. After being tagged, the molecules head to the cellular disposal system where the ATP-dependant proteasome breaks down the protein.

Notice the last term in the second equation, implemented to consider the inhibition activity of the complex, the latter effective only from a certain concentration threshold in aggregates, making sporadic Parkinson's disease degenerative from a certain threshold.

$$v_{parkin} = V_{max\ Parkin} \frac{E_2Ub}{E_2Ub + K_m\ E_2Ub} \cdot \frac{Seeds}{Seeds + K_m\ Seeds} \quad (1)$$

$$v_{prt} = V_{max\ Prt} \cdot \frac{TSeeds}{TSeeds + K_m\ TSeeds} \cdot \frac{ATP_n}{ATP_n + K_m\ ATP_n} \cdot \left(1 - \alpha_{prt\ inh} \left(\frac{1}{1 + e^{-\alpha(Agg - AggT)}} \right) \right) \quad (2)$$

Three main hypotheses were tested with this model; they are plotted in on Figure 3. The first hypothesis tested through modelling is that PD can be developed by a sudden increase in oxidative stress (the sporadic form of PD). Remark that the model indicates that cell has more chances to form Lewy bodies with a short but intense stress, than with a low long-lasting stress.

The other major defect in α -synuclein metabolism that can lead to PD is the parkin gene disorder affecting the tagging of bad form of α -synuclein by the ubiquitin-proteasomal pathway, which can lead to faulty protein disposal and α -synuclein build-up, and eventually to the formation of LB and PD. Here a mutation causing a reduction of 30% from the “normal” state is absorbed by the lysosomal protein disposal system. From this model, at around 38% of parkin malfunction causes an overflow of faulty folded alpha-synuclein creating LB.

The last hypothesis presented here is the drastic effects of 10, 20 and 50% reduction of the lysosomal inflow capacity.

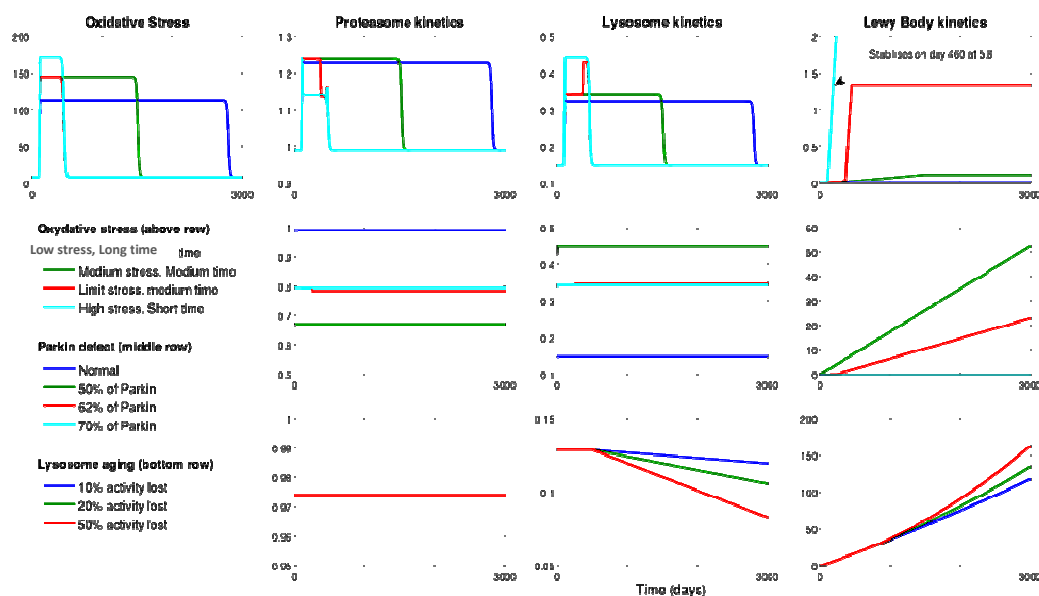


Figure 3: Selected response and kinetics of the dynamic model under certain conditions (left) for 3000 days.

Even though this model is up and running, a lot of work remains to be done to calibrate it and make it more realistic. Then the respective impacts of those metabolism failures will be quantitatively evaluated in terms of implications in the energetic mechanisms of neurons and astrocytes contributing to the formation of Lewy bodies and eventually to the development of Parkinson's disease.

References

- Aubert, A., Costalat, R., (2005). Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 25:1476-1490
- Raichur, A., Vali, S., Gorin, F. (2006). Dynamic modeling of alpha-synuclein aggregation for the sporadic and genetic forms of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 142: 859-870

Metabolic Modelling Approach for the Study of Energy Regulatory Pathways : Implications in Parkinson's Disease

PIERRE O. POLIQUIN^{1,2}, Mathieu Cloutier², Michel Perrier¹, Peter Wellstead², and Mario Jolicoeur^{1,*}

1-Department of chemical engineering, École Polytechnique de Montréal (CA)
2-Hamilton Institute, National University of Ireland - Maynooth (Ire)

METABOLICS BEHIND SNAKING PALS

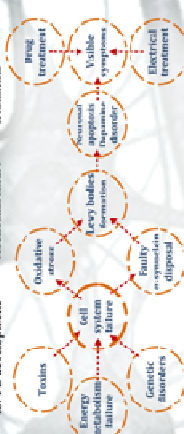
Idopathic Parkinson's disease (PD) is a profound neurodegenerative cognitive et motor disorder for which a single cause cannot be identified. The pathology is characterised by selective **loss of nigrostriatal dopaminergic neurons**, situated approximately in the center of the brain.

The accumulation of **alpha-synuclein** in the substantia nigra pars compacta leads inevitably to the production of cellular inclusions named **Lewy bodies (LB)**. This is a common biomarker for **Dementias with Lewy bodies** which also clinically overlaps with **Alzheimer's disease**.

Cellular metabolic management of those inclusion bodies from **alpha-synuclein** is a complex pathway that involves both upstream (**alpha-synuclein** build-up) and downstream processes (its-synuclein clearing), thus making **it a multi-factor disease**.

SYSTEMS OF PARKINSON'S DISEASE

Possible causes and factors for PB development	Mechanism of brain functional failure
Genetic factors Environmental factors Neurochemical factors Neuroanatomical factors Neurophysiological factors Neuroendocrine factors Neuroimmunological factors Neurovascular factors Neuroinfectious factors Neurotraumatic factors Neurodegenerative factors Neuroplastic factors Neuroregenerative factors Neuroprotective factors Neurorestorative factors Neurorehabilitative factors Neurotherapeutic factors Neuropharmacological factors Neurosurgical factors Neurological factors Neuropsychological factors Neurobehavioral factors Neurocognitive factors Neurodevelopmental factors Neurodegenerative factors Neuroplastic factors Neuroregenerative factors Neuroprotective factors Neurorestorative factors Neurorehabilitative factors Neurotherapeutic factors Neuropharmacological factors Neurosurgical factors Neurological factors Neuropsychological factors Neurobehavioral factors Neurocognitive factors Neurodevelopmental factors	Genetic factors Environmental factors Neurochemical factors Neuroanatomical factors Neurophysiological factors Neuroendocrine factors Neuroimmunological factors Neurovascular factors Neuroinfectious factors Neurotraumatic factors Neurodegenerative factors Neuroplastic factors Neuroregenerative factors Neuroprotective factors Neurorestorative factors Neurorehabilitative factors Neurotherapeutic factors Neuropharmacological factors Neurosurgical factors Neurological factors Neuropsychological factors Neurobehavioral factors Neurocognitive factors Neurodevelopmental factors



PROJECTS ENGINEERING

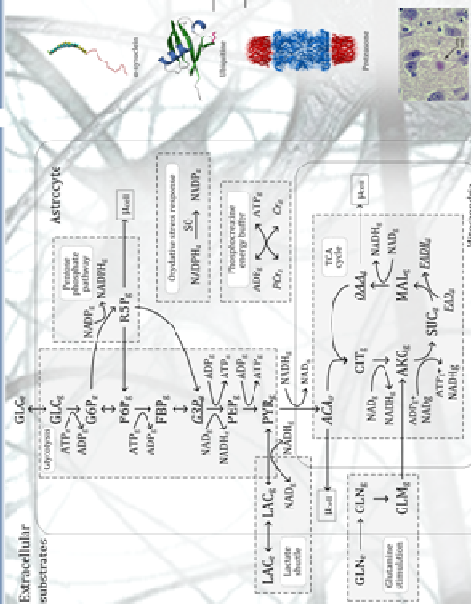


To	Problem	Medicines	Known	Unknown
Understand	Synthesis	Parkinson's Disease	1/0	P
Predict	Analysis	Early diagnostic	1/0	O
Control	Isact treatment of Lewy	Therapies	0/0	I

In order to analyse and understand those highly complex interacting physical systems, an **engineer's 'systems' approach** is developed where the aim is to create a realistic dynamic computational models with data obtained from a wetlab

With a control culture of brain cells, it is possible to implement in silico **differential equations** for each chosen metabolic substrate and product consisting in a sum of metabolic pathway step fluxes.

MODELING THE DYNAMICS OF BRAIN CELL ENERGETICS



REGULATION OF METABOLIC FLUXES

$$V_{gk} = \underbrace{+V_{gk} - V_{kso} - V_{gso}}_{\frac{d(GP_k)}{dt}} + \underbrace{REG(k, c)}_{\left(1.0 + \left(\frac{c}{k_{AT}}\right)^{-1}\right)} \cdot \underbrace{V_{gk}}_{V_{gk} + MM(K_{TR_{kso}}, GkC_k) + REG(K_{kso, AT} P_k)} \cdot \left(1 - TRU(GP_k, TRU_{kso}, F_{kso})\right)$$

DEFECTION

M. Cleuter, P.O. Poliquin, M. Jolicoeur, and P. Wellsted 2009, An integrative modelling approach for the modulation of energy metabolism in neurodegeneration, *Neurosci.* no. 24 IN PRESS.

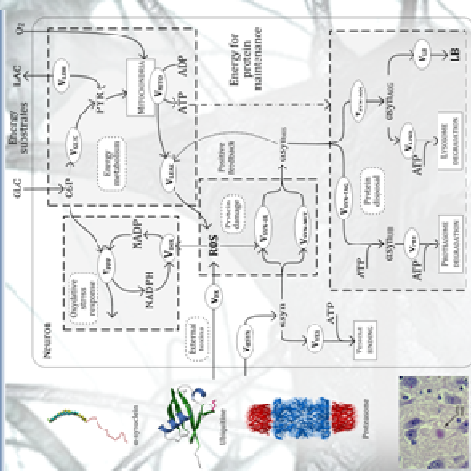
5

M. Clauser, B.H. Bolger, J.P. Lawry, P. Wellstead 2009. Integrative modelling of brain energy metabolism

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt678>

A. Eulicher, et al 2006, Dynamic modelling of alpha-amyloid aggregation for the sporadic and genetic

MODELLING PARKINSON'S DISEASE



UPCOMING TASKS AND STUDIES

A prototype of model for the astrocyte's energetic is implemented and is ready for calibration with experimental data.

Model simulations will then allow studying the respective impacts of metabolic failures, quantitatively, and characterizing the roles of the energetic mechanisms to the formation of LH and eventually to the development of PD.

Finally the relative importance in distinct pathways by metabolic control analysis will help identify pharmaceutical research targets for prevention of Parkinson's disease, in parallel with the development of useful nutritional and stimulation therapies.

ACKNOWLEDGEMENTS

NATURAL SCIENCES AND ENGINEERING RESEARCH COUNCIL OF CANADA
SCIENCE FOUNDATION OF IRELAND
CANADA RESEARCH CHAIR PROGRAM

J.c. Foundations Of System's Biology Engineering 2009

L'annexe J.c est un document révisé par les pairs et accepté pour la présentation d'une affiche au congrès de Foundations of Systems Biology in Engineering à Denver, USA, ayant lieu du 9 au 12 août 2009. Les travaux ont été présentés par le premier auteur.

CIT : Cloutier, M., Poliquin, P. O., Jolicoeur, M., & Wellstead, P. (2009). *An integrative modeling approach for the implications of energy metabolism in neurodegeneration*. Paper presented at the Foundations of Systems Biology in Engineering, Denver, CO., USA.

AN INTEGRATIVE MODELLING APPROACH FOR THE IMPLICATIONS OF ENERGY METABOLISM IN NEURODEGENERATION

Mathieu Cloutier¹, Pierre O. Poliquin², Mario Jolicoeur² and Peter Wellstead^{1*}

1-Hamilton Institute, National University of Ireland Maynooth, Ireland

2-Department of Chemical Eng., École Polytechnique de Montréal, Québec, Canada

Abstract

The misfolding, damage and accumulation of α -synuclein and subsequent formation of Lewy bodies (LB) in neurons is the common biomarker in Parkinson's disease (PD) development. As part of a multi-factorial, systems approach to PD, dynamic models of cellular subsystems involved in LB formation are presented. These include the possible damage to α -synuclein by oxidative stress or mutations, as well as cellular mechanisms for the removal of the damaged protein. In that regard, energy metabolism is important as these processes require ATP. Moreover, impairments in brain energy metabolism are reported in PD patients. Thus, a model of brain energy metabolism is used as a basis to build a physiological *in silico* environment to study interactions between dynamic energetic management and cellular processes involved in PD. Simulations results show that causal factors in PD development (toxins, age, genetic defects) can be reproduced through modelling. A key observation here was the destabilization of protein/oxidative metabolism by a positive feedback loop. This suggests that the multi-factorial dynamic nature of the disease is important and must be considered in future studies.

Keywords

Brain Energy Metabolism, Dynamic Modelling, Parkinson's Disease, Protein Metabolism

Introduction

Parkinson's disease is a neurodegenerative disease for which a single cause cannot be identified (Lotharius and Brundin, 2002). The major biomolecular mechanism in PD is known to be the accumulation of misfolded protein (α -synuclein) that eventually forms Lewy bodies (LB) and

* To whom all correspondence should be addressed: peter.wellstead@nuim.ie

cause neuronal death. Among the implied factors in the development of PD are environmental toxins, head trauma and genetic predispositions. Moreover, the development of PD is an extremely dynamic phenomenon. Symptoms are observed before motor disorders appear and impaired metabolic behaviour in the brain is also observed in the early stages (Braak et al., 2004), while the disease can develop over decades. The most striking example of the dynamic behaviour of PD development is its possible induction by MPTP (methyl-phenyl-tetrahydropyridine), a drug that induces oxidative stress in neurons. Upon injection of MPTP, PD symptoms can appear within a few days in humans, as was reported by accidental use of the drug (Stanley, 1996).

Thus, the actual reports show that PD is a multi-factorial, dynamic phenomenon that still resist to actual therapies. These observations show that research for a treatment for PD might benefit from the integrative, dynamic views that systems biology offers. This article will thus present an integrative modelling approach to study the mechanisms by which deregulations in α -synuclein metabolism can lead to LB accumulation. Of critical importance here will be the integration of energy metabolism to assess its importance in neurodegeneration.

Importance of energy metabolism

Energy is involved in most cellular processes for maintenance, which includes protein disposal mechanisms that are critical for neuroprotection. Also important for neurons is the response to oxidative stress through the pentose phosphate pathway (PPP) and the cellular anti-oxidant system. The PPP diverts glucose-6-P (G6P) from glycolysis and this shows potential interaction with energy metabolism (see Figure 1). Experimental studies also show links between oxidative stress and energy production (Vesce et al., 2005). Finally, the mitochondria are the major producers of reactive oxygen species (ROS) in cells. Low levels of ROS (≈ 0.1 - $1\mu\text{M}$) are important for cell function, but ROS accumulation in neurons can cause protein damage and induce PD. Thus, it seems that the mechanisms of PD development might imply an imbalance in energy metabolism and ROS regulation.

Modelling Disease Development

As the biomolecular mechanisms of PD development are known, it is possible to model these in an integrated framework. This modelling was achieved by Raichur et al. (2006), but with emphasis on protein aggregation. A modelling approach that integrates brain energy metabolism is thus proposed here (Figure 1) in order to study the possible interactions between protein disposal systems and energy metabolism. The model for energy production through glycolysis and mitochondria will not be presented in this article. It is based upon previous works by our group (Cloutier et al., 2009) and similar modelling is also found in Aubert and Costalat (2005).

The model is presented schematically in Figure 1 and Table 1-2 present the differential equations and kinetics for oxidative and protein metabolism. The model describes formation of ROS by an intrinsic pathway (v_{Leak}), describing the mitochondrial release of ROS, and by an extrinsic pathway (v_{OX}) describing the effect of external toxins (i.e. MPTP, pesticides...). In normal conditions, about 3% of the mitochondrial flux leaks to ROS production ($k_{\text{Leak}} = 0.03$ in Table 2). Oxidative stress is reduced by the anti-oxidative pathway (v_{DOX}) which is linked to the PPP (v_{PPP}) through NADPH. The glutathione buffer and the catalase reaction (which are both involved in oxidative stress response) are not modelled in this study.

Protein (α -syn) metabolism is considered with a constant production (v_{asyn}) and dynamic use for vesicle binding (v_{ves}). Damage to α -syn is induced by oxidative stress ($v_{\text{syn-ox}}$) or mutations ($v_{\text{syn-mut}}$). Other mechanisms are possible, such as nitrosylation, but not modelled here. The reactions were calibrated to have physiological α -syn concentration ($\approx 50\mu\text{M}$, Raichur et al., 2006) and protein turnover of 6-7 days with, under healthy conditions, 5% of the protein being damaged. This approach, even though simplistic, ensures that the overall balance of α -syn metabolism will remain within physiological range.

State	Differential equation
NADPH	$\partial \text{NADPH} / \partial t = 2 \cdot v_{\text{PPP}} - v_{\text{DOX}}$
ROS	$\partial \text{ROS} / \partial t = v_{\text{OX}} + v_{\text{leak}} - v_{\text{DOX}} - v_{\text{syn-ox}}$
α_{syn}	$\partial \alpha_{\text{syn}} / \partial t = v_{\alpha_{\text{syn}}} - v_{\text{ves}} - v_{\text{syn-ox}} - v_{\text{syn-mut}}$
$\alpha_{\text{syn-mis}}$	$\partial \alpha_{\text{syn-mis}} / \partial t = v_{\text{syn-ox}} + v_{\text{syn-mut}} - v_{\text{syn-tag}} - v_{\text{syn-agg}}$
$\alpha_{\text{syn-Ub}}$	$\partial \alpha_{\text{syn-Ub}} / \partial t = v_{\text{syn-tag}} - v_{\text{prt}}$
$\alpha_{\text{syn-agg}}$	$\partial \alpha_{\text{syn-agg}} / \partial t = v_{\text{syn-agg}} - v_{\text{lyso}} - v_{\text{LB}}$
LB	$\partial \text{LB} / \partial t = v_{\text{LB}}$

Table 2. Model reactions⁴³

Reaction	Kinetic equation
PPP	$v_{PPP} = k_{PPP} \cdot G6P \cdot NADP$
VDOX	$v_{DOX} = k_{DOX} \cdot ROS \cdot NADPH$
VOX	$v_{OX} = k_{OX} \cdot (1 + \delta)$
VLeak	$v_{Leak} = v_{mito} \cdot \left[k_{Leak} + \left(\frac{0.1}{1 + e^{-10 \cdot (\alpha SYN_{mis} - 1.5)}} \right) \right]$
V _{syn}	$v_{\alpha SYN} = k_{\alpha SYN}$
V _{ves}	$v_{VES} = k_{VES} \cdot \alpha SYN \cdot ATP$
V _{syn-ox}	$v_{SYN-ox} = k_{SYN-ox} \cdot ROS \cdot \alpha SYN$
V _{syn-mut}	$v_{SYN-mut} = k_{SYN-mut} \cdot \alpha SYN$
V _{syn-agg}	$v_{SYN-agg} = k_{SYN-agg} \cdot \alpha SYN_{mis}$
V _{tag}	$v_{SYN-tag} = k_{SYN-tag} \cdot \alpha SYN_{mis} \cdot ATP$
V _{prt}	$v_{Prt} = k_{Prt} \cdot \alpha SYN_{Ub} \cdot ATP$
V _{Lyso}	$v_{Lyso} = k_{Lyso} \cdot \alpha SYN_{agg} \cdot ATP$
V _{LB}	$v_{LB} = k_{LB} \cdot \alpha SYN_{agg}$

with NADPH+NADP = 0.25mM

 δ = user defined step $k_{Leak} = 0.03$ (default) to 0.25 (aged)if $\alpha SYN_{mis} \geq 1.5\mu M$ if $\alpha SYN_{agg} \geq 1.5\mu M$

After it is misfolded ($\alpha\text{-syn}_{mis}$), the protein can be recycled through two different pathways. First, the ubiquitin-proteasome pathway ($v_{syn-tag}$ and v_{prt}) can recycle the protein into small peptides that are reused. In case $\alpha\text{-syn}_{mis}$ accumulates over $1.5\mu M$, aggregates are formed ($\alpha\text{-syn}_{agg}$) and can be digested by the lysosomes (v_{Lyso}). If $\alpha\text{-syn}_{agg}$ is accumulated, Lewy bodies (LB) are formed (v_{LB}). An important mechanism here is the feedback effect of $\alpha\text{-syn}_{mis}$ on v_{Leak} . As reported by Parihar et al. (2008), the binding of mutated $\alpha\text{-syn}$ on mitochondria can increase the release of ROS. This effect is included in the model (right term in v_{Leak}). This mechanism is potentially destabilizing, as it induces positive feedback on $\alpha\text{-syn}$ oxidation. ATP, coming mainly from mitochondria (see Cloutier et al., 2009) is considered in the reactions known to consume energy (see Figure 1 and Table 2). Interestingly, the processes of normal protein usage and disposal consume energy, while the protein damage and accumulation of LB is the ‘path’ of least energy consumption.

Using this model, simulations were performed to analyze the relative (and quantitative) importance of neurodegenerative factors and dynamics of PD development. First, the process of aging and loss of mitochondrial efficacy will be studied, with a slow increase in k_{Leak} over 10 years. This is reproducing the effect of aging in PD, as loss of mitochondrial efficacy is reported (Powers et al., 2008). Another mechanism by which PD can develop is through the effect of a short but intense oxidative stress caused by toxins (MPTP), as mentioned previously. It will thus be important to confirm that the modelling proposed here can describe these experimental observations.

⁴³Mass action constants are as follows (units so that resulting fluxes are $mM \cdot hr^{-1}$) $k_{PPP} = 12.5$; $k_{DOX} = 0.1$; $k_{OX} = 4 \times 10^{-5}$; $k_{\alpha syn} = 3.5 \times 10^{-4}$; $k_{ves} = 6.7 \times 10^{-3}$; $k_{syn-ox} = 0.29$; $k_{syn-mut} = 2 \times 10^{-5}$; $k_{syn-tag} = 0.01$; $k_{prt} = 0.056$; $k_{Lyso} = 0.05$; $k_{LB} = 1.4$;

Simulation Results and Analysis

Effect of Aging

Figure 2 presents simulation results for 2 linear increases in ROS release (k_{Leak} increase over 10 years), from 3% to 15% of mitochondrial flux (grey lines) and from 3% to 25% of mitochondrial flux (black lines).

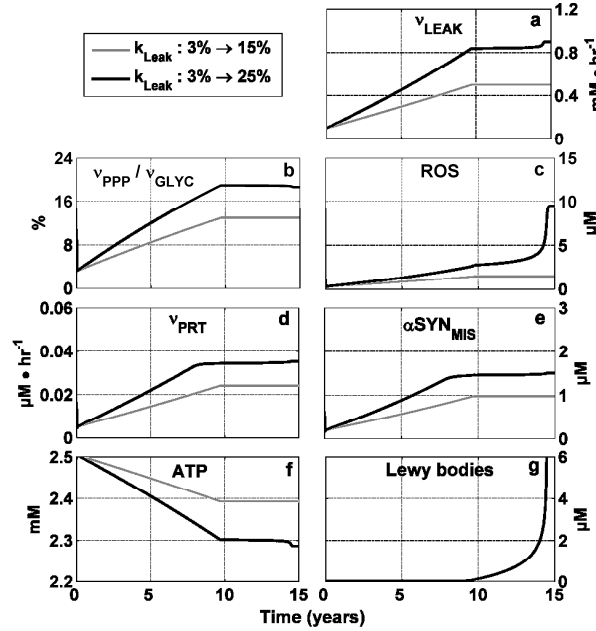


Figure 2 Effect of aging. Linear increase in k_{Leak} over 10 years.

First, we observe that the model can describe cases where oxidative stress is slightly increased without inducing disease. This is the case for grey lines in Figure 2, where LB are not accumulated. In that situation, the anti-oxidant system can control the ROS to acceptable levels ($\approx 2\mu\text{M}$; grey line in Figure 2b) and $\alpha\text{-syn}_{\text{mis}}$ is cleared by the proteasome pathway (Figure 2d). Even for a 25% ROS leak, many years are required before observing LB accumulation (Figure 2g). This simulation shows that a limit is reached, with a PPP flux equivalent to $\approx 20\%$ of the glycolytic pathway (Figure 2b, black line), a value similar to what is reported by Ben-Yoseph et al., (1995). The decrease in ATP concentration is also worse with higher mitochondrial leak (Figure 2f) and this adds up with the other effects to favour LB formation.

Effect of Toxins to Destabilize the System

As mentioned previously, it is possible to induce PD by a short but intense oxidative stress coming from an external source (here v_{OX}). Thus, three different simulations were performed to quantitatively analyze the dynamics of the system submitted to such stresses: 1-continuous, but low stress (Figure 3, light grey lines); 2-short stress pulse (5 days) of medium intensity (grey lines); 3-short stress pulse (5 days) of higher intensity (black lines).

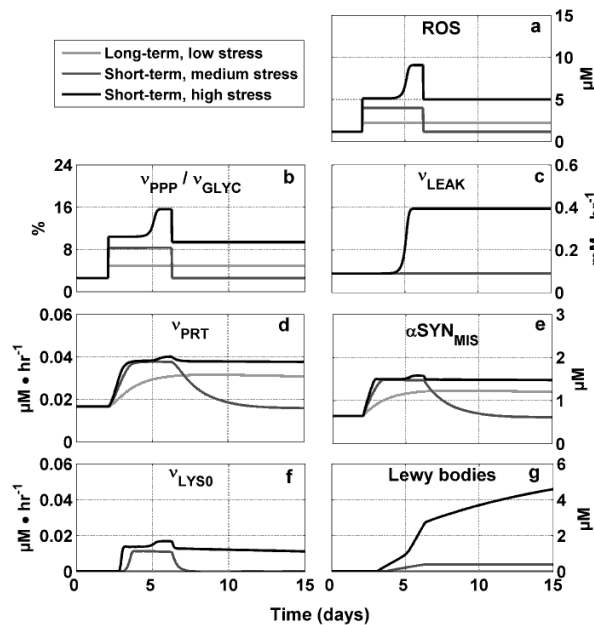


Figure 3 Effect of different oxidative stress profiles

Even though this simulation is on a different timescale (days instead of years), we observe that the modelling can still reproduce PD symptoms. Not surprisingly, simulations show that a prolonged but low intensity stress (light grey lines) is managed by the anti-oxidant system. The system can also recover from a short stress of medium intensity (grey lines) even though some damage is accumulated (see Figure 3g, grey line). A short but intense stress (black lines) can however destabilize the system enough so that damaged α -syn is accumulated up to a point where v_{Leak} is increased (Figure 3c, black line). This pushes the system in a new state where a high ROS concentration is maintained (Figure 3a, black lines). This induces a continuous increase in LB (Figure 3g) and PD symptoms would probably be visible rapidly, as the levels in Figure 3g are similar to those observed after years (Figure 2g). This is coherent with the reports on MPTP usage, where PD is induced within days (Stanley, 1996). This observation of unstable behaviour is also coherent with the current experimental reports on mitochondrial ROS release (Zorov et al., 2006).

Conclusion

An integrative dynamic modelling of PD was presented, with links to energy metabolism. Simulations results show that the modelling reproduces current observations on PD. A feedback mechanism in protein oxidation was showed to maintain the system in an unfavourable state. This destabilizing positive feedback loop could be important in the development of new therapies. Genetic factors were not studied here, but simulation results (not presented) show that PD related genetic defects (increase in $v_{\alpha syn}$ or decrease in $v_{syn-tag}$) can increase the susceptibility of developing the disease, especially if other stresses are present. In that regard, the modelling work presented here will be extremely useful in integrating knowledge on PD and providing a systems biology assessment of this disease.

Acknowledgments

This research is supported by the Science Foundation of Ireland.

References

- Aubert, A., Costalat, R. (2005). Interactions between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of energy metabolism. *J. Cereb. Bl. Flow Met.*, 25, 1476.
- Ben-Yoseph, O., Camp, D. M., Robinson, T. E., Ross, B. D. (1995). Dynamic Measurements of Cerebral PPP Activity In Vivo. *J of Neurochem.*, 64, 1336.
- Braak, H., Ghembremedhin, E., Rb, U., Bratzke, H., Tredici, K. (2004). Stages in the Development of Parkinson's Disease-Related Pathology. *Cell & Tiss. Res.*, 318, 121.
- Cloutier, M., Bolger, F. B., Lowry, J. P., Wellstead, P. (2009). An Integrative Dynamic Model of Brain Energy Metabolism Using In Vivo Neurochemical Measurements. *J. of Comp. Neurosc.* (In Press). DOI: 10.1007/s10827-009-0152-8.
- Lotharius, J., Brundin, P. (2002). Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Nature Reviews in Neuroscience*, 3, 932.
- Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hasimoto, M., Ghafourifar, P. (2008). Mitochondrial Association of α -Synuclein Causes Oxidative Stress. *Cell. Mol. Life Sc.*, 65, 1272.
- Powers, W. J., et al. (2008). Cerebral Mitochondrial Metabolism in Early Parkinson's Disease. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28, 1754.
- Raichur, A., Vali, S., Gorin, F. (2006). Dynamic Modeling of α -Synuclein Aggregation for the Sporadic and Genetic Forms of Parkinson's Disease. *Neuroscience*, 142, 859.
- Stanley, F. (1996). The Case of the Frozen Addicts. *The New England Journal of Medicine*, 335, 2002.
- Vesce, S., Jekabsons, M. B., Johnson-Cadwell, L. I., Nicholls, D. G. (2005). Acute Glutathione Depletion Restricts Mitochondrial ATP Export in Cerebellar Granule Neurons. *J. of Bio. Chem.*, 280, 38720.
- Zorov, D. B., Juhaszova, M., Sollott, S. J. (2006). Mitochondrial ROS-Induced ROS Release: An Update and Review. *Bioch et Biophys. Acta*, 1757, 509.



An integrative modelling approach for Parkinson's disease

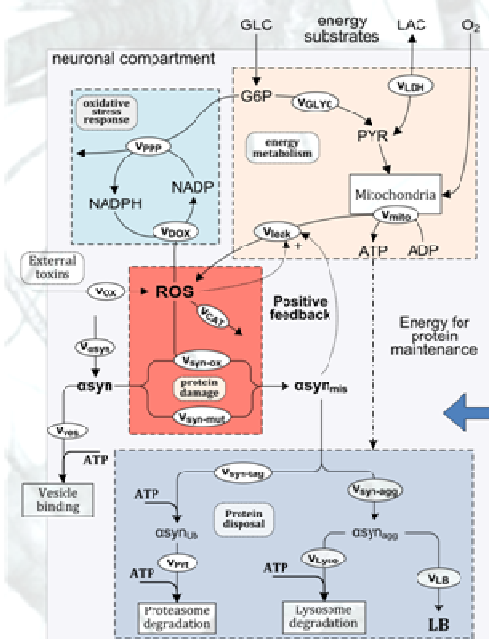


Mathieu Cloutier, Pierre O. Poliquin, Mario Jolicoeur and Peter Wellstead

Introduction

The misfolding, damage and accumulation of α -synuclein and subsequent formation of Lewy bodies (LB) in neurons is the common biomarker in Parkinson's disease (PD) development. As part of a systems approach to PD, dynamic models of cellular subsystems involved in LB formation are presented. These include the damage to α -synuclein by oxidative stress or mutations, and cellular mechanisms for the removal of the damaged protein. In that regard, energy metabolism is important as these processes require ATP. Simulations results show that causal factors in PD development (toxins, age, genetic defects) can be reproduced through modelling. A key observation here was the destabilization of protein/oxidative metabolism by a positive feedback loop. This suggests that the multi-factorial dynamic nature of the disease is important and must be considered in future studies.

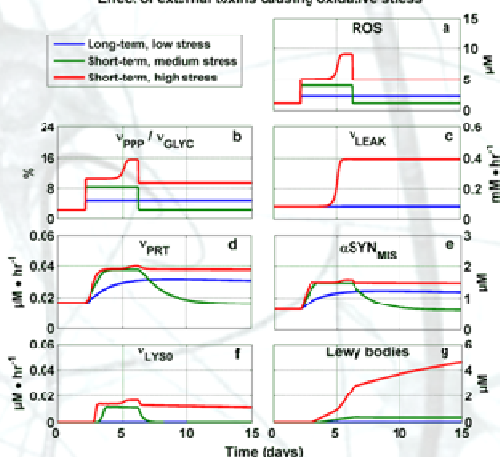
Modelling Parkinson's disease



- Energy metabolism is critical in normal cell function and protein disposal
- Interactions between protein metabolism, oxidative stress and energy are described
- The response to oxidative stress is a tradeoff with energy metabolism (v_{PPP} vs. v_{GLUC})
- The model can account for various stresses such as external toxins, aging, genetic predispositions...

Simulations results

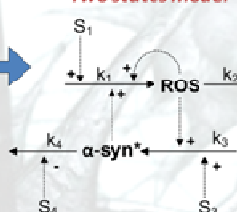
Effect of external toxins causing oxidative stress



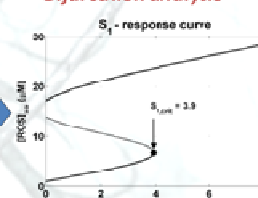
- System copes with low oxidative stress (blue lines)
- Brief but intense stress can induce deregulation in protein metabolism (red lines) and α -syn accumulation
- GLC is diverted from glycolysis under oxidative stress (V_{PPP}/V_{GLYC})

Extracting a central motif for PD

Two states model



Bifurcation analysis



- A simplified two states model (ROS and damaged α -syn) can be built from the analysis of the large scale model
- A positive feedback loop between ROS and α -syn* is identified as the critical factor in PD onset (i.e. destabilization of the system)
- The simplified model includes the major factors in PD such as oxidative stress (S_1), reduction in energy and anti-oxidative metabolism (S_2), and mutation in parkin gene (S_3) or α -syn gene (S_4).

Contact: Peter Wellstead
peter.wellstead@nuim.ie
www.systemsofparkinsons.org

SFI funding for this project is gratefully acknowledged



J.d. Computer Applications in Biotechnology

L'annexe J.d est un document révisé par les pairs et accepté pour présentation d'une affiche au 11th IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology à Leuven (Belgique) qui a eu lieu du 7 au 9 juillet 2010. Les travaux ont été présentés par le premier auteur.

CIT : Poliquin, P. O., Cloutier, M., Perrier, M., & Jolicoeur, M. (2010, July 7-9th). *An approach for the study of energy regulated pathway in Parkinson's disease*. Paper presented at the 11th IFAC Symposium on Computer Applications in Biotechnology, Leuven, Belgium.

AN APPROACH FOR THE STUDY OF ENERGY REGULATED PATHWAY IN PARKINSON'S DISEASE

Pierre O. Poliquin.* Mathieu Cloutier.** Michel Perrier.* Mario Jolicoeur*.

*École Polytechnique de Montréal, Montréal, Québec, H3C 3A7 Canada, (Tel: 514-340-4711 #4525; e-mail: mario.jolicoeur@polymtl.ca).

**Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, Québec, H4P 2R2 Canada, (e-mail: mathieu.cloutier@polymtl.ca)

Abstract

Parkinson's disease (PD) is a pernicious neurodegenerative disease for which no cure exists. Its main cellular hallmark is the formation of Lewy inclusion bodies by alpha-synuclein protein aggregation. Energy metabolism is deregulated by etiopathogenic factors of PD and this can have implications in disease onset and progression. However brain energy metabolism is not limited to neuronal metabolism as astrocytes provide metabolic support in the form of energy substrates trafficking. In that context, we propose an ordinary differential equations model to study astrocyte's metabolism and its deregulation by genetic factors of PD. The metabolic model is built on the main energy pathways: glycolysis, tricarboxylic acids cycle, and oxidative phosphorylation chain.

Keywords

System's Biology, Metabolic Modeling, Parkinson's disease, Mammalian Energetic Regulations, Bioinformatics Dynamics.

1. INTRODUCTION

1.1. Brain regions of interest

The majority of the dopamine neurotransmitter secreting cells within the central nervous system arises from the same embryonic cell group located in the median region of the brain. Those mesoencephalic neurons extend their axons throughout specific parts of the brain. Two different dopaminergic diffusive modulator systems can be distinguished from their projection regions: the mesocortico-limbic system (MCLs) from the ventral tegmental area (VTA), and the nigrostriatal system (NSs) from the substantia nigra pars compacta. While the MCLs' prolongations end in the frontal lobe of the brain; the NSs' ones innervate the caudate nucleus and the putamen of striatum. Even though they have different roles, respectively roles of motivation in learning, and of

voluntary movement initiation, those two regions are so near that the pathologies arising from their dysfunctions often overlap (Wise, 2004, Bear et al., 2007). The common disorders originating from this region are attention deficit hyperactivity disorder, schizophrenia, and Parkinson's disease (PD) (Eells, 2003).

1.2. Parkinson's Disease

The diagnostic of the latter is clinical; its idiopathic development time can take over 20 years (Apaydin et al., 2002). PD is a chronic disease weakening gradually the cognitive and motor skills of the suffering. PD's prevalence is increasing with age; 1% of population over 65 years old, to a maximum of 3.5% above 85 years old. Although important pharmacologic (levodopa, droxidopa and others, prescribed with additives like carbidopa, benserazide en/tolcapone, (Limousin et al., 1995, T.P.S.G., 2004)) and surgical treatments (deep brain stimulation, (Vingerhoets, 2002)) findings are used to improve tremor-like motor symptoms soothing combined with palliatives, no real cure exist yet.

1.3. Parkinson's biomarker

Cellular level hallmark of usual PD is Lewy bodies (LB). Those cellular inclusion bodies are formed by excessive accumulation of the mutated form of alpha-synuclein protein (SNCA) (Engelender, 2008). Current literature suggests that the actual role of this polypeptide in its normal conformation is a soluble protein molecular chaperone and that it acts as a binding protein for neurotransmitter vesicles (Chandra et al., 2005, Bonini and Giasson, 2005). Their turnover is carried out by a complex pathway in parallel to the main energy regulation pathways that involves both upstream (SNCA build-up) and downstream processes (SNCA cleaning), thus making LB formation a multi-factor process.

1.4. Understanding PD within the appropriate framework

As part of a multi-factorial, systems, approach to PD, a kinetic ODE model for α -synuclein metabolism (Cloutier et al., 2009b) was adapted from previous work (Raichur et al., 2006) to analyze how the potential failures in SNCA metabolism can interact with the brain energy metabolism (Cloutier et al., 2009a) and contribute to LB formation and lead eventually to PD.

In that context, astrocytes are involved in the overall regulation of energy metabolites trafficking in the cerebral tissue (Pellerin and Maggistretti, 1994), which implies a possible role in neurodegeneration. It will thus be of critical importance to improve our understanding of astrocytic metabolism deregulation in PD and an ODE model of the pathways will help in that regard.

To complete this energy regulated pathway model at cellular metabolism level, serious calibration must be addressed on the ODE model and parameters. In order to do so, great amount of datasets must be created. Although, this profound neurodegenerative cognitive and motor disorder cannot yet be studied in laboratories with full healthy brains for over 20 years; the main issue is that the brain does not grow on its own (Purves and Lichtman, 1986), a cell culture approach is considered. Even if the interactions between neurons and astrocytes affect both by induction (Hatten, 1985, Choi and Lapham, 1976), the present study will focus on astrocytes.

1.5. Modeling approach

To provide etiologies and pathogenesis of PD, a first step is to construct an *in-silico* kinetic ODE model to study the role of energy regulated pathways in PD.

2. KINETIC MODEL DESCRIPTION

2.1. Modeling toolbox

From a control point of view, in order to achieve early diagnostics and prevent symptoms' appearance, the multivariate biosystem must be better understood (Figure 1). The ODE model was implemented on both Systems Biology Toolbox 2 (SBT2) and Systems Biology Project Design (SBPD) for MATLAB (Schmidt and Jirstrand, 2006). Those toolboxes enable fast and intuitive model description, data fitting and sensitivity analysis. Models can also be exported by Systems Biology Markup Language (SBML) (Schmidt et al., 2007).

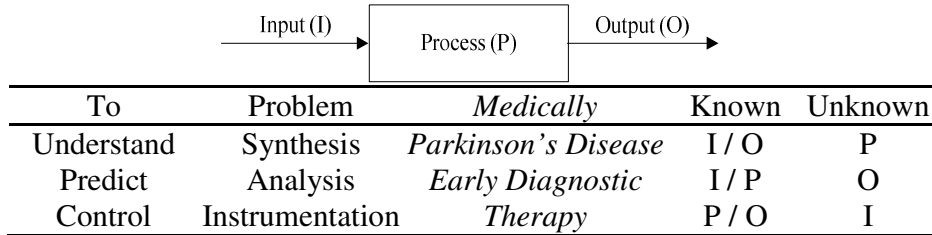


Figure 1. Control engineering's viewpoint on the goals of process modeling.

2.2. Modeled pathways

The pathways simulated consider two compartments, the extracellular medium and the cytosol. The extracellular metabolites are indexed 'e'. The simulations include trans-membrane metabolite transport, glycolysis, glycogen storage, futile cycling, pentose phosphate pathway (PPP), mitochondria tricarboxylic acids (TCA) cycle, lactate shuttling, glutamine cycling, respiratory chain, phosphocreatine buffer, oxidative stress, and cell growth. A schematic view of the model is presented (Figure 2).

2.3. Fluxes' kinetics

The model is an open pathway, where the sum of the considered metabolites is not constant, making anaplerotic and biosynthesis pathways possible. All considered metabolites are presented as:

$$\frac{dM}{dt} = S\Phi - \mu M \quad (1)$$

Where M is the vector of all metabolites' and nutriment's concentration, S is the stoichiometric matrix for Φ reaction fluxes' vector, and μ is the cellular growth.

The calibration of kinetic parameters for metabolic pathway regulation (reaction rates, affinity constant, regulation constants, etc.) has not been performed yet due to insufficient datasets. Most of the extra and intracellular molecules considered in the model will be measured for calibration for average time scale (hours to weeks). All fluxes in vector Φ are presented in the appendix.

2.3.1. Membrane transport

Glucose (GLC), lactate (LAC), glutamine (GLN), and glutamate (GLU) transmembrane transports are modeled by a reversible Michaelis-Menten kinetics (MMk).

$$TMM : V_m \left((c_1/(c_1 + k)) - (c_2/(c_2 + k)) \right) \quad (2)$$

Where V_m , c and k are respectively the maximum reaction flux, the concentrations, and the affinity kinetics, and where indexes are for the two distinctive extra- intra- metabolites.

2.3.2. Glycolysis

Glycolysis is here represented by 7 states. All energy regulations reactions and pathway branch points are taken into account. Reactions implicating adenosine triphosphate (*ATP*) degradation and adenosine diphosphate (*ADP*) phosphorylation, and nicotin-amide dinucleotide (*NAD*) reduction into *NADH* are described. Glucose (*GLC*) hexokinase (V_{hk}), fructose-6-phosphate (*F6P*) phosphofructokinase (V_{fpk}), lumped glyceraldehyde-3-phosphate (*G3P*) deshydrogenase and phosphoglycerate kinase (V_{pgk}) (as 1-3-diphosphateglycerate's dynamics are considered negligible) are present. Finally, because 3-phosphoglycerate and 2-phosphoglycerate's dynamics are considered negligible, their related enzymes are lumped with phosphoenolpyruvate (*PEP*) pyruvate kinase (V_{pk}).

The hexokinase is modeled using substrate MMk on *GLC* and product inhibition on *G6P* using a gradual zero-to-one switch function as shown in equation 3 and 4.

$$\text{MM ratios} : c/(c + k) \quad (3)$$

$$\text{Switch} : \left(1 + \exp(-a * (G6P - c_t))\right)^{-1} \quad (4)$$

Where a and c_t are respectively switch force and concentration threshold. The phosphofructokinase is modeled with using substrate MMk on *F6P* and *ATP* Hill inhibition zero-to-one function as shown in equation 5.

$$\text{Hill} : (1 + (ATP/k_i)^n)^{-1} \quad (5)$$

Where k_i and n are inhibition parameters.

As for the two other reactions, reversible glucose-6-phosphate (*G6P*) isomerase (V_{iso}) and lumped fructose-biphosphate (*FBP*) aldolase and triosephosphate isomerase (V_{fai}) (as dihydroxy-acetone phosphate's dynamics are considered negligible), they were first kept because they will be measured in the same sample, but also because of their buffers behavior as reversible reactions at important PPP branching points. They are modeled with reversible MMk shown in equation 6.

$$\text{RMM} : V_f * (c_1/c_1 + k_1) - V_b * (c_2/c_2 + k_2) \quad (6)$$

Where V_f and V_b are forward and backward maximum fluxes rate.

2.3.3 Pentose phosphate pathway

The PPP has an oxidative followed by a non-oxidative branch. The first part is the important one to consider for this model because it generates reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (*NADPH*). Its overall balance is an oxidation of 1 *G6P* to ribulose-5-phosphate (*R5P*) with reduction of 2 *NADP* into *NADPH* in a 3 step process. The second non-oxxydative part consists of isomerases, transketolases and transaldolases producing *F6P* and *G3P* (by 4 unmentioned sugars intermediates). Because only *R5P* is measurable using current technology, all reactions are lumped around the latter. The mathematical modeling is done using mass action kinetics for all sugars and MMk for *NADP*.

2.3.4 TCA cycle

TCA cycle's fast kinetics is modeled with 4 intermediates, acetyl-CoA (*ACA*), citrate (*CIT*), alpha-ketoglutarate (*AKG*), and oxaloacetate (*OAA*), based on literature (Nazaret et al., 2009, Cloutier, 2009). All others are considered to have negligible dynamics. Also, a constant sum of free and linked coenzyme-A is made in the first steps of the TCA, acting as a metabolic relief on mitochondrial process. All reactions are implemented as unidirectional MMk.

2.3.5 Glycogen storage

Astrocytal glycogen (*GLY*) is temporarily stored and broken down during, respectively, low and high energy demand in cells (Wiesinger et al., 1997, Brown and Ransom, 2007, Cloutier et al., 2009b). This buffer is implemented as a unique loop (glycogen synthase (V_{gs}) and glycogen phosphorylase (V_{gp})) branched on *G6P* as mass action kinetics with threshold switch function on V_{gs} for maximum glycogen accumulation.

2.3.6. Glutamine metabolism

The extracellular liberation of the glutamate neurotransmitter activates glycolysis of surrounding astrocytes (Pellerin and Magistretti, 1994, Loaiza et al., 2003). It is also reported that this glutamate (*GLM*) is transformed in glutamine (*GLN*) by astrocyte's glutamine synthase (V_{gns}), and can be externalized for neuron uptake for glutamate reconstitution with glutaminase, thus resulting in cycling (Sibson et al., 1998).

The model is ready for eventual cycling because astrocytes' pathways are present as reversible MMk. For adequate description of these dynamics, the reversible flux (V_{age}) between *AKG* and *GLN* with *GLU* is also implemented (Shank and Campbell, 1982, Shen et al., 1999).

2.3.7. Oxidative phosphorylation

Oxygen consumption modeling is crucial to describe the turnover rate in the mitochondrial respiration oxidative phosphorylation rate (V_{op}) insuring transformation of *NADH* to *ATP*. This consumption rate can be measured using the respirometer developed by our group (Lamboursain et al., 2002).

2.3.8. Lactate shuttling

Still not proven as a way to improve neuron's energy regulation by astrocyte's release, astrocyte-neuron lactate shuttling (ANLS) is commonly considered in modeling (Mangia et al., 2003, Aubert et al., 2005, Fillenz, 2005).

The current model is built for astrocyte culture, with lactate deshydrogenase (V_{ldh}) *PYR* and *LAC* exchange, but is flexible for ANLS adaptation for *LAC* co-cultures studies.

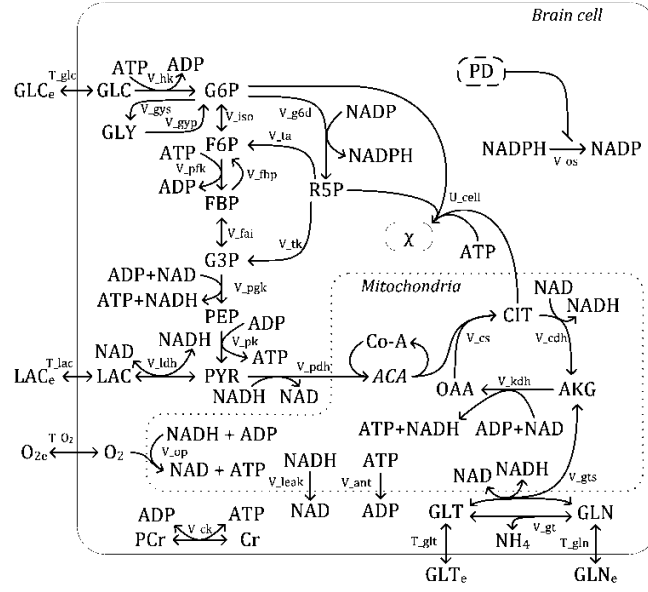


Figure 2. Modeled metabolic pathways' outline

2.3.9. Phosphocreatine buffer

As described by others, this energy buffer replenishes phosphocreatine's (*PCr*) pool via bidirectional creatine kinase (V_{ck}) in low energy demands. During events of high demand, creatine kinase works in reverse and decreases *PCr* to increase *ATP* concentration during explicit *ATP* consumption (Meyer et al., 1984, Ames, 2000). The latter's is modeled by mass action kinetics as presented by equation 7.

$$V_{ck} = k_{Cr} * Cr * ATP - k_{PCr} * PCr * ADP \quad (7)$$

2.3.10. Oxidative stress

Links between oxidative stress and energy metabolism are experimentally proved (Vesce et al., 2005). Oxidative stress decreases with PPP rise because *NADPH* reduces reactive oxygen species (*ROS*) as previously described by our group (Cloutier et al., 2009b).

2.3.11. Cellular growth

Although astrocytes do not grow significantly in a mature brain, the present model is adapted for astroglial cell culture. General cell growth requires nucleotides, fatty acids, glycoproteins, etc. These macromolecules are not modeled here, but their precursors are.

Cellular growth implemented as a Monod equation on *R5P*, *CIT*, *OAA*, and *ATP* is presented in equation 8.

$$\text{Growth : } V_m \left(\left(\frac{CIT^{n_i}}{CIT^{n_i} + k_{CIT}^{n_i}} \right) * \left(\frac{R5P^{n_j}}{R5P^{n_j} + k_{R5P}^{n_j}} \right) * \left(\frac{OAA^{n_k}}{OAA^{n_k} + k_{OAA}^{n_k}} \right) * \left(\frac{ATP^{n_l}}{ATP^{n_l} + k_{ATP}^{n_l}} \right) \right) \quad (8)$$

Where n_i , n_j , n_k and n_l are exponents for each relative importance in cell growth.

2.3.12. Futile Cycling

In a non-instantive way, futile cycling is beneficial for general cell metabolism. The continuous pathway progress waste by fructose-biphosphatase (V_{fbp}) on *FBP* and by mitochondrial

membrane leakage (V_{leak}), orders energy production to maintain metabolic state. A metabolic inertia is then initiated, to have better resistance to energy demand variations (Aishwarya et al., 2005).

2.3.13 Adenylate kinase

To consider the repartition of ATP, ADP, and AMP via the phosphotransferase adenylate kinase, an equilibrium constant and parameters were used. (Aubert and Costalat, 2005).

2.3.14. Constant sums

Although the pathways are considered opened, energy shuttles total amount are considered constant per cell. By doing so, the model can be smoothly simulated with those metabolic constraints, and helps to reduce the states number for shorter simulation time.

3. BASIC SIMULATIONS

Simple run simulations (fig. 3) were realized to show smooth ODE solving with reasonable mMol concentrations, kinetics and ratios over 400 time units.

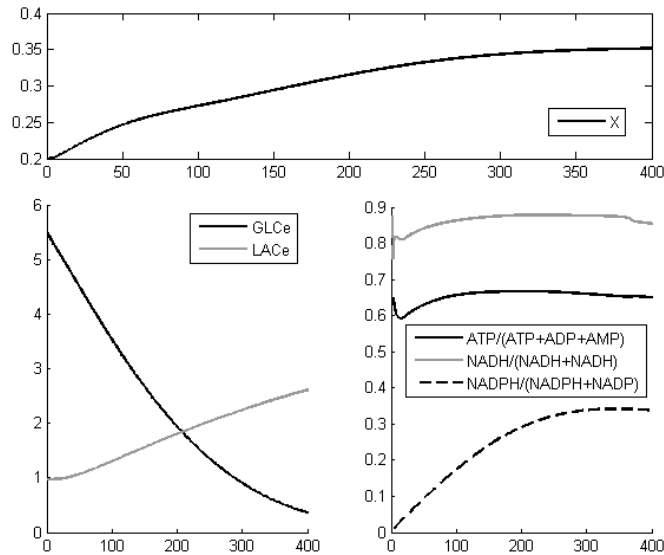


Figure 3. Basic simulations showing some dynamics (X are in million cells)

4. CONCLUSIONS

In a further step, the model experimental data calibration will be performed for real biological meaning. This part will be done with isolated primary astrocyte cultures of mesencephalic regions (VTA and NSs). Cell culture protocol will be optimized to get strong signals in analyticals to quantify concentrations of almost all presented metabolites. Analyticals will be blood-analyzers for extracellular quantification and *in-vivo* nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography coupled to mass spectroscopy for intracellular states.

5. APPENDIX: Biokinetic flux description

The full model contains 26 states, 6 semi-states connected together using 30 reactions parameterized by 105 constants. Here is presented the biokinetic reactions used.

$T_{glc} = TMM(Vm_{t_{glc}}, Km_{t_{glc}}, GLCe, GLC)$
$T_{lac} = TMM(Vm_{t_{lac}}, Km_{t_{lac}}, LACe, LAC)$
$T_{gln} = TMM(Vm_{t_{gln}}, Km_{t_{gln}}, GLNe, GLN)$
$T_{glt} = TMM(Vm_{t_{glt}}, Km_{t_{glt}}, GLTe, GLT)$
$T_{o2} = k_{o2} * (O2_e - O2)$
$V_{hk} = K_{hk} * ATP * MM(Km_{hk_{glc}}, GLC) * (1 - Switch(G6P, TRH_{hk_{g6p}}, F_{hk_{g6p}}))$
$V_{iso} = RMM(Vm_{iso_f}, Km_{iso_{g6p}}, G6P, Vm_{iso_r}, Km_{iso_{f6p}}, F6P)$
$V_{pfk} = K_{pfk} * ATP * MM(Km_{pfk_{f6p}}, F6P) * HILL(Ki_{pfk_{atp}}, ATP, nH_{pfk})$
$V_{fai} = RMM(Vm_{fai_f}, Km_{fai_{fbp}}, FBP, Vm_{fai_r}, Km_{fai_{g3p}}, G3P)$
$V_{pgk} = K_{pgk} * G3P * ADP * \frac{NAD}{NADH}$
$V_{pk} = K_{pk} * PEP * ADP$
$V_{fbp} = Vm_{fbp} * MM(Km_{fbp_{fbp}}, FBP)$
$V_{gys} = Vm_{gys} * MM(Km_{gys_{g6p}}, G6P) * (1 - Switch(GLY, TRH_{gys_{gly}}, F_{gys_{gly}}))$
$V_{gyp} = Vm_{gyp} * MM(Km_{gyp_{gly}}, GLY)$
$V_{g6d} = k_{g6d} * G6P * MM(Km_{g6d_{nadp}}, NADP)$
$V_{ta} = k_{ta} * R5P$
$V_{tk} = k_{tk} * R5P$
$V_{os} = Vm_{os} * NADPH$
$V_{pdh} = Vm_{pdh} * MM(Km_{pdh_{pyr}}, PYR) * NAD * MM(Km_{pdh_{coa}}, CoA)$
$V_{cs} = Vm_{cs} * MM(Km_{cs_{aca}}, ACA) * MM(Km_{cs_{oaa}}, OAA)$
$V_{cdh} = Vm_{cdh} * MM(Km_{cdh_{cit}}, CIT) * NAD$
$V_{kdh} = Vm_{kdh} * MM(Km_{kdh_{akg}}, AKG) * NAD * MM(Km_{kdh_{adp}}, ADP)$
$V_{ck} = k_{ck_{cr}} * Cr * ATP - k_{ck_{pcr}} * PCr * ADP$
$V_{ldh} = k_{ldh_{lac}} * LAC * NAD - k_{ldh_{pyr}} * PYR * NADH$
$V_{gt} = Vm_{gt} * (k_{gt_{gln}} * GLN - k_{gnd_{glt}} * GLT * NH4)$
$V_{gts} = Vm_{gts} * \left(\frac{k_{gts_{glt}} * GLT * NAD -}{k_{gts_{akg}} * AKG * NADH * GLN} \right)$
$V_{ant} = V_{ant_{base}} * MM(Km_{ant_{atp}}, ATP)$
$V_{leak} = Vm_{leak} * MM(Km_{leak_{nadh}}, NADH)$
$V_{op} = Vm_{op} * MM(Km_{op_{nadh}}, NADH) * R_{mito_{atp}} * ADP * MM(Km_{op_{o2}}, O2)$
$U_{cell} = V_m \left(\left(\frac{CIT^{n_i}}{CIT^{n_i} + k_{CIT}^{n_i}} \right) * \left(\frac{R5P^{n_j}}{R5P^{n_j} + k_{R5P}^{n_j}} \right) * \left(\frac{OAA^{n_k}}{OAA^{n_k} + k_{OAA}^{n_k}} \right) * \left(\frac{ATP^{n_l}}{ATP^{n_l} + k_{ATP}^{n_l}} \right) \right)$

5. REFERENCES

- AISHWARYA, K., RACHANA, K. & PRAKASH, E. S. (2005) "Futile cycling" in physiologic control systems: A price paid for fine control. *Advances in Physiology Education*, 29, 132-135.
- AMES, A. (2000) CNS energy metabolism as related to function. *Brain research reviews*, 34, 42-68.
- APAYDIN, H., AHLISKOG, J. E., PARISI, J. E., BOEVE, B. F. & DICKSON, D. W. (2002) Parkinson Disease Neuropathology: Later-Developing Dementia and Loss of the Levodopa Response. *Archives of Neurology*, 59, 102-112.
- AUBERT, A. & COSTALAT, R. (2005) Interaction between astrocytes and neurons studied using a mathematical model of compartmentalized energy metabolism. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25, 1476-1490.
- AUBERT, A., COSTALAT, R., MAGISTRETTI, P. J. & PELLERIN, L. (2005) Brain lactate kinetics: Modeling evidence for neuronal lactate uptake upon activation. *PNAS ; The National Academy of Sciences*, 102, 16448-16453.
- BEAR, M. F., CONNORS, B. W. & PARADISO, M. A. (2007) *Neuroscience: exploring the brain*, Lippincott Williams & Wilkins.
- BONINI, N. M. & GIASSEN, B. I. (2005) Snaring the Function of [alpha]-Synuclein. *Cell*, 123, 359-361.
- BROWN, A. M. & RANSOM, B. R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, 55, 1263-1271.
- CHANDRA, S., GALLARDO, G., FERNÁNDEZ-CHACÓN, R., SCHLÜTER, O. M. & SÜDHOF, T. C. (2005) [alpha]-Synuclein Cooperates with CSP[alpha] in Preventing Neurodegeneration. *Cell*, 123, 383-396.
- CHOI, B. H. & LAPHAM, L. W. (1976) Interactions of neurons and astrocytes during growth and development of human fetal brain in vitro. *Experimental and Molecular Pathology*, 24, 110-125.
- CLOUTIER, M. (2009) Mitochondrial metabolism - Unpublished. Montreal.
- CLOUTIER, M., BOLGER, F., LOWRY, J. & WELLSTEAD, P. (2009a) An integrative dynamic model of brain energy metabolism using *in vivo* neurochemical measurements. *Journal of Computational Neuroscience*. Maynooth, Co. Kildare, Ireland, Springer Netherlands.
- CLOUTIER, M., POLIQUIN, P. O., JOLICOEUR, M. & WELLSTEAD, P. (2009b) An integrative modelling approach for the implications of energy metabolism in neurodegeneration. *Foundations of Systems Biology in Engineering, Denver, USA, to appear*, 4.
- EELLS, J. B. (2003) The Control of Dopamine Neuron Development, Function and Survival: Insights From Transgenic Mice and The Relevance to Human Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 857-870.
- ENGELENDER, S., (2008) Ubiquitination of α -synuclein and autophagy in Parkinson's disease, *Autophagy*, 4, 372-374
- FILLENZ, M. (2005) The role of lactate in brain metabolism. *Neurochemistry International*, 47, 413-417.
- HATTEN, M. E. (1985) Neuronal regulation of astroglial morphology and proliferation in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 100, 384-396.
- LAMBOURSAIN, L., ST-ONGE, F. & JOLICOEUR, M. (2002) A Lab-Built Respirometer for Plant and Animal Cell Culture. *Biotechnology Progress*, 18, 1377-1386.
- LIMOUSIN, P., POLLAK, P., PFEFEN, J. P., TOURNIER-GERVASON, C. L., DUBUIS, R. & PERRET, J. E. (1995) Acute Administration of Levodopa-Benserazide and Tolcapone, a COMT Inhibitor, in Parkinson's Disease. *Clinical Neuropharmacology*, 18.

- LOAIZA, A., PORRAS, O. H. & BARROS, L. F. (2003) Glutamate Triggers Rapid Glucose Transport Stimulation in Astrocytes as Evidenced by Real-Time Confocal Microscopy. *Journal of Neuroscience*, 23, 7337-7342.
- MANGIA, S., GARREFFA, G., BIANCIARDI, M., GIOVE, F., DI SALLE, F. & MARAVIGLIA, B. (2003) The aerobic brain: lactate decrease at the onset of neural activity. *Neuroscience*, 118, 7-10.
- MEYER, R. A., SWEENEY, H. L. & KUSHMERICK, M. J. (1984) A simple analysis of the "phosphocreatine shuttle". *AJP - Cell Physiology*, 246, C365-377.
- NAZARET, C., HEISKE, M., THURLEY, K. & MAZAT, J.-P. (2009) Mitochondrial energetic metabolism: A simplified model of TCA cycle with ATP production. *Journal of Theoretical Biology*, 258, 455-464.
- PELLERIN, L. & MAGISTRETTI, P. J. (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 10625-10629.
- PURVES, D. & LICHTMAN, J. W. (1986) *Principles of neural development.*, Sunderland, Massachusetts.
- RAICHUR, A., VALI, S. & GORIN, F. (2006) Dynamic modeling of alpha-synuclein aggregation for the sporadic and genetic forms of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 142, 859-870.
- SCHMIDT, H., DREWS, G., VERA, J. & WOLKENHAUER, O. (2007) SBML export interface for the systems biology toolbox for MATLAB. *Bioinformatics*, 23, 1297-1298.
- SCHMIDT, H. & JIRSTRAND, M. (2006) Systems Biology Toolbox for MATLAB: A computational platform for research in Systems Biology. *Bioinformatics*, 22, 514-515.
- SHANK, R. P. & CAMPBELL, G. L. (1982) Glutamine and alpha-ketoglutarate uptake and metabolism by nerve terminal enriched material from mouse cerebellum. *Neurochemical Research*, 7, 601-616.
- SHEN, J., PETERSEN, K. F., BEHAR, K. L., BROWN, P., NIXON, T. W., MASON, G. F., PETROFF, O. A. C., SHULMAN, G. I., SHULMAN, R. G. & ROTHMAN, D. L. (1999) Determination of the rate of the glutamate/glutamine cycle in the human brain by in vivo ¹³C NMR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8235-8240.
- SIBSON, N. R., DHANKHAR, A., MASON, G. F., ROTHMAN, D. L., BEHAR, K. L. & SHULMAN, R. G. (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 316-321.
- THE PARKINSON STUDY GROUP. (2004) Levodopa and the Progression of Parkinson's Disease. *N Engl J Med*, 351, 2498-2508.
- VESCE, S., JEKABSONS, M. B., JOHNSON-CADWELL, L. I. & NICHOLLS, D. G. (2005) Acute Glutathione Depletion Restricts Mitochondrial ATP Export in Cerebellar Granule Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 38720-38728.
- VINGERHOETS, F. J. G., VILLEMURE, J. G., TEMPERLI, P., POLLO, C., PRALONG, E. & GHIKA, J. (2002) Subthalamic DBS replaces levodopa in Parkinson's disease: Two-year follow-up. *Neurology*, 58, 396-401.
- WIESINGER, H., HAMPRECHT, B. & DRINGEN, R. (1997) Metabolic pathways for glucose in astrocytes. *Glia*, 21, 22-34.
- WISE, R. A. (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat Rev Neurosci*, 5, 483-494.

K Présentations des travaux : Diaporamas

L'annexe K contient les documents soumis et acceptés pour présentation orale des travaux à divers colloques et congrès.

Annexe K.a : Ontario-Quebec Meeting of the Biotechnology Division of the Canadian Society of Chemical Engineering 2009, page 148

Annexe K.b : Réunion Québec-Ontario de la division biotechnologique de la Société Canadienne de Génie Chimique 2010, page 148

Annexe K.c : Pharmaqam 2010, page 149

Annexe K.d : 1st Symposium on Systems Approaches to Parkinson's Disease, page 150

K.a. Ontario-Quebec Meeting of the Biotechnology Division of the Canadian Society of Chemical Engineering 2009

L'annexe K.a est une présentation orale au Ontario-Quebec Meeting of the Biotechnology Division of the Canadian Society of Chemical Engineering 2009 à Waterloo, On., Canada, ayant lieu du 18 au 19 juin 2009. Les travaux ont été présentés par le premier auteur. Le document de soutien visuel est disponible sur dans les documents accompagnant le mémoire.

CIT : Poliquin, P. O., Jolicoeur, M., Cloutier, M., & Perrier, M. (2010). An approach for the study of energy regulated pathways in Parkinson's disease. In Ontario-Quebec Canadian Society of Chemical Engineering (11th Edition), *Biotechnology meeting*: University of Waterloo-Chemical Engineering Group.

K.b. Réunion Québec-Ontario de la division biotechnologique de la Société Canadienne de Génie Chimique 2010

L'annexe K.b est une présentation orale à la Réunion Québec-Ontario de la division biotechnologique de la Société Canadienne de Génie Chimique 2010 à Montréal, Qc., Canada, ayant lieu du 3 au 4 juin 2010. Les travaux ont été présentés par le premier auteur.

CIT : Poliquin, P. O., Jolicoeur, M., Cloutier, M., & Perrier, M. (2010). An approach for the study of energy regulated pathways in Parkinson's disease. In Ontario-Quebec Canadian Society

of Chemical Engineering (12th Edition), *Biotechnology meeting*: École Polytechnique de Montréal-Chemical Department.

K.c. Pharmaqam 2010

L'annexe K.c est un document accepté pour une présentation orale au 2^e colloque annuel de Pharmaqam 2010 à Montréal (Québec, Canada) ayant lieu le 11 juin 2010. Les travaux ont été présentés par le premier auteur.

CIT : Poliquin, P. O., Jolicoeur, M., Cloutier, M., & Perrier, M. (2010). An approach for the study of energy regulated pathway in Parkinson's disease. In Pharmaqam (2nd Edition), *Centre de recherche sur la conception, les mécanismes d'action et de vectorisation de médicaments*: Université du Québec à Montréal-Faculté des sciences.

Abstract :

An approach for the study of energy regulated pathways in Parkinson's disease Parkinson's disease is a pernicious neurodegenerative disease for which no cure exists. The main cellular hallmark of this lethal dementia is the formation of Lewy inclusion bodies by alpha-synuclein protein aggregation. To better the understanding of the metabolic events involved in this phenomenon, transient differential equation model describing brain cells has been recently proposed to study the metabolic pathways regulation within the brain cell network. As part of this work, a kinetic model is proposed here for astrocytes, the cells interacting with neurons, with the aim to study the role of cell energetics in Parkinson's disease. The kinetic metabolic model structure is presented and includes the main energy pathways: glycolysis, tricarboxylic acids cycle, and oxidative phosphorylation chain.

K.d. 1st Symposium on Systems Approaches to Parkinson's Disease

L'annexe K.d est un document accepté pour une présentation orale au 1st Symposium on Systems Approaches to Parkinson's Disease à Maynooth (Co.Kildare, Irlande) du 18 au 19 août 2010. Les travaux ont été présentés par le directeur du projet, Prof. Mario Jolicoeur. Un enregistrement de la présentation est disponible en ligne à l'adresse :

http://www.systemsofparkinsons.org/videos/show_video.php?video_id=9

CIT : Poliquin, P. O., Jolicoeur, M., Cloutier, M., & Perrier, M. (2010). An approach for the study of energy regulated pathway in Parkinson's disease: an experimental platform and a model. In *The Systems of Parkinson's Disease (1st Edition), Symposium on Systems Approaches to Parkinson's Disease*: Hamilton Institute-NUI Maynooth.

Abstract:

Parkinson's disease (PD) is a pernicious neurodegenerative disease for which no cure exists. Its main cellular hallmark is the formation of Lewy inclusion bodies by alpha-synuclein protein aggregation. Energy metabolism is deregulated by etiopathogenic factors of PD and this can have implications in disease onset and progression. However brain energy metabolism is not limited to neuronal metabolism as astrocytes provide metabolic support in the form of energy substrates trafficking.

In that context, we propose an ordinary differential equations model to study astrocyte's metabolism and its deregulation by genetic factors of PD. The metabolic model is built on the main energy pathways: glycolysis, tricarboxylic acids cycle, and oxidative phosphorylation chain. Model development is supported by an experimental platform allowing in vitro monitoring of the bioenergetic behaviour of living cells and tissues. Preliminary results will be presented as well as the state of development of the platform.

L Données expérimentales

B – Baseline, K – Knockout genetic stress, W – Wild type, C – Control, S – Stress, M – Mitochondria CCCP stress

Tableau 13 : Données expérimentales

Name	Time (min)	AMP (μM)	ADP (μM)	ATP (μM)	UDPgIc (μM)	GTP (μM)	CTP (μM)	UTP (μM)	NADPH (μM)	PYR (μM)	MAL (μM)	SUC (μM)	FUM (μM)	AKG (μM)	G6P (μM)	E4P (μM)	X5P (R5P) (μM)	F6P (μM)	G1P (μM)	PEP (μM)
BK_1C_1	0.000	157.829	383.512	757.319	52.616	291.073	33.832	60.703	100.003	86.819	218.966	125.629	64.207	4.226	2.722	0.330	1.318	1.010	0.979	0.550
BK_1C_2	0.021	221.408	133.361	170.557	5.597	101.238		54.421	100.220	24.478	117.943	137.547	74.460	0.433	2.214	0.656	2.952	0.946	0.693	1.659
BK_1C_3	0.042	121.622	111.634	499.585	10.953	219.971		54.655	122.945	32.385	149.922	111.912	63.973	1.629	1.281	0.574	0.948	0.569	0.487	1.431
BK_1C_4	0.063	117.500	128.729	572.377	15.773	241.369	28.857	51.221	90.519	50.298	133.392	99.680	56.823	1.330	1.212	0.324	0.758	0.434	1.139	0.972
BK_1C_5	0.083	103.082	154.850	1274.080	28.090	517.374	51.684	106.211	74.422	196.807	184.177	142.298	104.127	4.013	1.269	0.817	0.679	0.691	0.806	1.419
BK_1C_6	0.104	107.583	130.713	1580.352	44.826	488.924	56.132	117.729	67.752	119.679	207.304	136.890	64.361	4.744	1.350	0.586	0.806	0.577	0.721	1.053
BK_1C_7	0.125	59.617	108.707	1287.075	25.683	408.725	51.410	97.384	82.777	80.517	159.396	97.402	72.608	0.563	2.161	0.713	0.997	0.953	1.566	1.423
BW_1C_1	0.000	217.065	233.601	708.603	54.842	283.220	35.651	52.998	53.844	72.778	261.498	142.239	77.575	4.546	0.559	0.549	0.463	0.455	0.437	0.277
BW_1C_2	0.021	181.726	149.637	209.770		153.027		82.764	154.961	61.086	178.032	176.478	148.502	14.017	1.385	1.407	1.196	1.270	1.048	0.784
BW_1C_3	0.042	211.281	205.466	523.399	26.719	253.046	41.699	59.334	99.449	51.764	203.868	177.795	81.627	7.463	0.930	1.299	0.606	0.783	0.703	0.267
BW_1C_4	0.063	55.409	122.087	881.019	13.831	350.197	46.468	78.028	74.000	8.549	29.240	28.549	34.102	6.877	0.603	0.702	0.613	0.582	0.462	1.214
BW_1C_5	0.083	82.666	180.872	1313.653	46.304	477.413	52.688	107.816	101.254	79.717	211.346	155.088	79.871	4.272	0.264	0.607	0.465	0.560	0.387	0.565
BW_1C_6	0.104	70.344	204.099	1236.540	33.321	450.702	53.453	101.759	91.197	38.445	170.192	128.129	77.324	4.589	1.679	1.147	0.834	0.769	0.918	0.882
BW_1C_7	0.125	62.385	151.433	1538.210	39.637	493.127	58.667	113.006	97.138	114.504	205.756	137.321	66.729	6.592	1.373	0.374	0.715	0.431	0.947	0.757
MK_1C_1	0.000	181.389	221.618	1296.418	81.448	438.726	40.735	96.277	88.861	136.845	250.258	210.861	72.826	4.702	36.647	5.410	5.150	7.641	11.633	3.517
MK_1C_2	0.010	284.540	292.089	1036.518	32.793	334.471	37.776	71.217	54.043	314.237	256.018	231.952	107.087	8.697	39.849	9.059	6.535	6.723	12.749	0.733
MK_1C_3	0.017	311.448	154.394	1213.384	46.668	447.226	44.320	102.877	116.344	94.256	237.388	196.331	93.393	2.361	25.444	4.224	5.729	7.756	11.707	5.062
MK_1C_4	0.022	268.064	148.133	995.108	32.804	341.328	32.735	68.837	95.671	78.703	236.450	222.830	103.157	1.349	34.105	4.093	5.205	8.994	11.972	7.346
MK_1C_5	0.030	356.447	332.255	462.065	31.299	203.925	31.401	47.974	74.294	164.756	228.077	217.373	88.423	1.413	29.523	7.914	7.256	6.720	15.192	0.211
MK_1C_6	0.034	252.560	351.544	1069.867	32.216	352.295	41.690	85.103	56.646	288.978	233.532	232.036	104.787	1.604	0.482	0.911	0.483	0.456	0.486	0.261
MK_1C_7	0.039	274.308	293.788	1101.230	35.977	397.525	47.890	94.153	110.114	109.191	267.941	232.701	106.487	2.307	12.859	1.928	3.112	4.653	4.297	4.031

Name	Time (min)	AMP (μM)	ADP (μM)	ATP (μM)	UDPgIc (μM)	GTP (μM)	CTP (μM)	UTP (μM)	NADPH (μM)	PYR (μM)	MAL (μM)	SUC (μM)	FUM (μM)	AKG (μM)	G6P (μM)	E4P (μM)	X5P (R5P) (μM)	F6P (μM)	G1P (μM)	PEP (μM)
MK_1C_8	0.045	248.444	177.987	1253.749	49.774	338.738	33.409	71.726	64.723	156.033	224.806	200.890	95.987	1.537	12.116	1.955	2.258	3.142	6.497	3.408
MK_1S_1	0.000	237.269	118.827	961.718	42.687	338.524	27.813	57.460	70.750	255.025	232.922	206.673	60.721	5.457	32.071	5.145	4.828	6.119	11.307	0.167
MK_1S_2	0.010	553.875	258.246	355.629	29.392	183.096	44.448	52.031	99.420	75.220	298.263	305.937	82.490	7.369	49.534	9.513	8.029	8.974	24.098	0.760
MK_1S_3	0.017	607.723	170.973	149.545	23.218	115.312	47.506	49.148	136.128	118.848	232.947	285.358	76.650	3.011	14.580	5.990	6.705	9.442	4.212	1.835
MK_1S_4	0.022	378.556	158.415	142.844	3.948	101.911	48.179	45.701	78.868	62.242	181.284	248.531	67.156	1.012	16.265	3.550	6.697	8.163	10.290	0.246
MK_1S_5	0.030	342.201	191.010	178.788	20.976	123.811	32.668	39.465	86.728	79.049	213.083	273.512	71.464	0.434	17.539	2.982	6.467	11.136	16.577	0.700
MK_1S_6	0.034	176.449	118.262	142.836	11.357	86.753	32.488	34.969	65.407	69.324	189.650	262.150	79.692	1.312	14.050	3.590	6.060	12.206	16.236	0.280
MK_1S_7	0.039	325.116	136.639	99.982		82.632	39.965	42.790	91.910	49.621	200.834	253.349	74.903	2.396	15.017	4.271	6.229	6.365	13.648	6.062
MK_1S_8	0.045	228.069	141.883	181.838	7.255	115.486	32.439	38.051	68.189	51.877	178.450	224.503	69.969	2.602	13.379	3.812	4.820	9.924	17.401	0.550
MK_2C_1	0.000	576.205	237.263	450.383	56.456	224.628	41.356	55.716	146.255	80.604	305.850	323.126	90.668	13.415	0.320	0.673	0.640	0.573	0.541	0.370
MK_2C_2	0.010	240.150	245.588	997.548	57.124	405.301	60.940	96.075	138.129	128.186	325.502	256.661	131.843	17.778	0.493	0.726	0.863	0.921	0.743	0.488
MK_2C_3	0.017	361.617	232.740	1343.593	62.901	538.713	46.776	95.004	50.417	63.574	283.983	264.534	101.808	3.857	2.913	0.569	0.455	1.312	2.099	0.870
MK_2C_4	0.024	299.031	329.378	966.571	62.917	468.830	65.594	111.115	143.080	132.098	352.485	253.763	132.733	9.511	12.391	4.059	3.731	5.307	7.712	8.426
MK_2C_5	0.031	262.111	203.768	1165.717	44.294	577.229	69.832	116.667	85.235	117.809	310.755	275.271	148.047	3.923	4.338	0.621	1.831	2.786	3.636	2.648
MK_2C_6	0.038	338.904	259.364	1239.424	58.044	577.526	58.447	102.363	88.200	90.677	320.397	295.735	101.601	2.944	5.199	2.156	1.767	2.511	5.553	0.322
MK_2C_7	0.045	343.061	356.886	1604.885	73.759	554.220	53.165	113.221	99.182	222.223	292.494	287.409	92.296	2.908	10.514	0.342	2.331	3.561	10.185	0.301
MK_2C_8	0.052	201.358	338.822	1550.671	125.557	649.979	57.142	123.165	55.585	227.535	297.026	284.794	111.738	2.648	2.892	0.809	0.743	0.962	2.562	0.284
MK_2S_1	0.000	181.921	233.210	925.147	19.234	411.678	57.565	90.594	82.605	70.504	284.523	200.623	153.294	3.372	6.584	2.496	2.235	3.730	4.556	5.379
MK_2S_2	0.010	210.157	220.859	1053.427	12.424	498.302	51.287	89.419	98.000	95.112	272.809	244.299	154.608	6.320	0.527	0.953	0.694	0.662	0.731	0.376
MK_2S_3	0.017	484.433	160.814	128.060	8.072	85.581	37.750	39.380	42.721	53.685	195.356	246.753	75.097	5.853	4.344	2.707	2.175	3.887	3.800	1.806
MK_2S_4	0.024	335.237	162.520	149.569	2.701	98.009	34.283	35.628	68.556	43.014	178.972	198.851	70.479	3.175	4.742	2.322	1.918	4.149	5.041	0.306
MK_2S_5	0.031	404.988	179.371	136.704		114.705	50.898	51.741	108.389	82.996	246.443	239.354	85.020	12.327	4.616	2.376	2.357	5.687	5.695	1.689
MK_2S_6	0.038	438.005	142.511	165.761	21.614	104.769	33.856	35.527	92.782	61.277	230.636	236.634	69.839	4.765	4.542	2.306	2.473	5.665	6.635	0.212
MK_2S_7	0.045	378.840	178.112	249.416	28.261	125.006	27.167	31.033	115.513	127.300	188.466	198.359	50.376	2.495	0.211	0.436	0.425	0.343	0.335	0.179
MK_2S_8	0.052	266.256	145.344	224.744	17.732	135.696		39.123	123.963	99.655	222.002	225.071	83.418	4.194	0.843	0.478	0.473	0.957	1.757	0.285
MK_3C_1	0.000	105.701	157.390	751.841	20.452	310.444	43.499	73.146	124.466	15.532	35.178	32.495	45.688	12.654	0.365	0.964	0.595	0.830	0.519	0.326
MK_3C_2	0.010	380.288	311.116	501.277	34.532	235.687		65.631	147.624	135.161	239.235	288.436	111.644	14.145	0.409	0.882	0.596	0.661	0.591	0.337

Name	Time (min)	AMP (μ M)	ADP (μ M)	ATP (μ M)	UDPgIc (μ M)	GTP (μ M)	CTP (μ M)	UTP (μ M)	NADPH (μ M)	PYR (μ M)	MAL (μ M)	SUC (μ M)	FUM (μ M)	AKG (μ M)	G6P (μ M)	E4P (μ M)	X5P (R5P) (μ M)	F6P (μ M)	G1P (μ M)	PEP (μ M)
MK_3C_3	0.017	218.885	174.240	1419.173	62.859	519.072	62.819	110.036	104.107	134.358	273.534	218.179	96.335	7.031	0.349	0.610	0.586	0.597	0.521	0.461
MK_3C_4	0.024	125.493	206.275	772.203	26.966	328.336	37.837	65.677	96.707	67.557	192.939	179.545	71.925	6.214	0.273	0.792	0.493	0.526	0.579	0.937
MK_3C_5	0.031	104.770	272.337	1148.292	35.789	446.940	51.954	87.057	95.304	145.266	197.620	156.863	89.842	9.658	0.798	0.524	0.465	0.472	0.551	0.325
MK_3C_6	0.038	240.035	148.444	1229.471	49.243	523.111	56.396	102.553	132.046	149.746	284.450	236.531	97.299	10.464	0.587	0.592	0.527	0.646	0.531	0.276
MK_3C_7	0.045	120.848	176.651	784.774	11.745	367.098	54.187	83.701	162.532	102.322	218.332	174.910	112.558	23.215	0.755	0.968	0.721	0.793	0.714	1.743
MK_3C_8	0.052	110.690	243.255	998.659	14.564	393.909	54.579	83.189	115.241	75.085	171.520	173.779	92.729	20.426	0.998	1.467	0.910	0.822	0.680	0.302
MK_3S_1	0.000	140.409	116.769	907.175	27.733	383.992	56.252	86.089	102.969	63.661	301.709	235.307	136.064	13.995	0.390	1.237	0.692	0.790	0.615	0.991
MK_3S_2	0.010	273.822	209.710	851.092	39.085	280.140	39.575	65.976	131.740	184.527	354.478	388.789	124.849	10.152	0.280	0.689	0.499	0.464	0.445	0.854
MK_3S_3	0.017	434.892	169.276	160.813	21.739	92.777		47.897	81.806	85.956	215.866	236.915	91.216	10.847	0.742	0.689	0.727	0.797	0.550	0.903
MK_3S_4	0.024	499.666	137.660	107.901	27.875	79.866	34.750	40.430	89.057	71.892	202.565	253.870	81.487	11.784	0.303	0.532	0.577	0.512	0.441	0.704
MK_3S_5	0.031	272.665	196.207	189.637	28.629	106.691		33.076	107.412	134.247	192.809	181.337	69.048	15.138	0.243	0.362	0.383	0.428	0.341	0.464
MK_3S_6	0.038	143.373	128.085	121.560	19.278	72.310	25.867	30.003	88.871	76.141	197.832	180.093	73.948	8.886	0.213	0.523	0.377	0.460	0.339	0.513
MK_3S_7	0.045	139.990	102.700	107.808		75.364		46.485	70.467	104.556	158.287	128.350	100.520	19.922	0.383	0.506	0.636	0.644	0.548	0.360
MK_3S_8	0.052	192.787	121.242	129.005		73.111		58.073	111.475	62.453	174.569	149.213	100.992	31.953	0.474	1.022	0.942	0.779	0.750	1.370
MW_1C_1	0.000	151.147	143.413	877.702	39.388	278.683	58.639	91.360	87.635	78.721	348.028	271.428	144.100	21.781	0.493	1.130	0.819	0.775	0.654	0.408
MW_1C_2	0.010	111.679	165.619	345.035		188.289	107.684	120.751	197.531	207.627	356.602	265.586	290.155	43.499	0.918	2.332	1.477	1.456	1.355	2.310
MW_1C_3	0.017	121.846	116.160	967.168	33.339	327.770	56.161	90.870	150.740	115.241	255.556	180.565	126.719	27.962	0.447	0.658	0.746	0.776	0.703	0.454
MW_1C_4	0.025	202.764	206.781	507.046	4.272	221.622	51.235	72.502	109.642	54.508	202.237	201.940	109.067	13.920	0.388	0.981	0.721	0.677	0.713	0.331
MW_1C_5	0.031	286.285	225.254	369.888	16.386	165.084	41.164	54.554	73.427	63.144	212.774	217.353	91.701	18.145	0.333	0.748	0.555	0.535	0.532	0.570
MW_1C_6	0.038	201.509	240.493	392.897	20.765	142.390		43.131	47.015	145.400	183.655	205.084	69.340	8.522	0.258	0.425	0.476	0.489	0.381	0.244
MW_1C_7	0.045	177.174	311.725	1115.762	37.081	335.731	35.896	81.407	46.143	175.484	215.350	215.364	80.452	17.186	0.247	0.473	0.429	0.413	0.351	0.719
MW_1C_8	0.052	198.795	249.920	1198.764	39.742	341.903	35.003	85.559	58.373	205.203	210.464	218.053	74.602	12.021	0.213	0.261	0.366	0.402	0.366	0.455
MW_1S_1	0.000	139.469	177.467	719.419	63.587	368.710	98.981	96.412	87.383	115.848	325.220	214.348	165.190	52.607	2.691	2.022	1.638	1.631	2.044	0.540
MW_1S_2	0.010	189.137	296.651	786.759	115.257	459.381	95.397	95.575	76.466	188.091	346.023	271.659	152.011	33.815	4.843	0.946	1.951	2.241	3.328	0.693
MW_1S_3	0.017	393.087	168.655	103.485	74.013	140.268	101.993	90.387	114.962	226.963	266.976	249.875	171.362	26.047	3.670	1.690	2.221	1.766	2.610	2.515
MW_1S_4	0.025	436.678	164.708	121.914	27.591	104.004	55.823	57.544	93.324	136.805	203.616	261.664	117.220	17.070	2.668	1.057	2.188	2.007	2.876	0.591
MW_1S_5	0.031	252.336	118.987	175.264	1.999	118.402	41.771	44.513	246.626	43.685	192.358	224.974	70.340	14.905	0.267	0.501	0.436	0.547	0.424	0.572

Name	Time (min)	AMP (μM)	ADP (μM)	ATP (μM)	UDPgIc (μM)	GTP (μM)	CTP (μM)	UTP (μM)	NADPH (μM)	PYR (μM)	MAL (μM)	SUC (μM)	FUM (μM)	AKG (μM)	G6P (μM)	E4P (μM)	X5P (R5P) (μM)	F6P (μM)	G1P (μM)	PEP (μM)
MW_1S_6	0.038	229.352	85.637	76.355		52.848	43.388	44.460	90.201	93.446	152.390	212.375	87.004	27.272	0.390	0.725	0.659	0.596	0.531	0.350
MW_1S_7	0.045	153.689	81.883	67.864		63.283		46.764	70.046	67.186	154.836	182.002	86.002	25.627	0.393	0.776	0.638	0.718	0.677	0.773
MW_1S_8	0.052	168.911	98.322	174.951	1.233	129.464	39.855	42.639	209.002	47.743	153.635	248.606	76.140	16.272	0.273	0.376	0.478	0.492	0.440	0.235
MW_2C_1	0.000	41.903	224.460	503.153	59.888	191.169	73.422	102.076	378.982	63.943	10.192	108.533		6.348	30.342		10.192	13.037	21.226	8.192
MW_2C_2	0.010	144.909	193.544	310.132	77.861	154.373	87.219	78.423	59.714	39.673	9.072	55.583		2.710	21.967		9.072	14.586	17.198	6.213
MW_2C_3	0.017	254.735	300.126	447.455	135.468	315.080	131.900	126.368	208.191	58.903	18.569	129.656			51.576		18.569	24.837	24.969	19.967
MW_2C_4	0.024	394.579	225.025	279.924	174.124	220.394		113.704	168.304	24.103	17.310	133.966			31.397		17.310	19.569	24.941	10.586
MW_2C_5	0.031	247.652	253.953	373.947	129.666	230.460	119.682	104.951	127.360	53.664	18.179	102.288		1.374	41.854		18.179	19.469	23.910	14.834
MW_2C_6	0.038	240.203	272.453	363.505	159.864	235.226		109.162	165.717	35.992	17.176	91.412		2.718	51.385		17.176	23.681	23.983	10.169
MW_2C_7	0.045	267.957	188.216	263.923	178.250	219.955		131.085	247.358	25.478	20.352	170.199		3.109	53.900		20.352	22.500	27.725	13.591
MW_2C_8	0.052	253.421	256.575	315.470	178.838	179.602	79.323	83.813	141.849	6.787	12.280	107.082			35.352		12.280	14.393	20.140	8.131
MW_2S_1	0.000	193.168	222.110	361.864	130.887	192.764		70.081	102.587	123.119	12.398	114.852		19.410	40.284		12.398	18.098	26.972	7.654
MW_2S_2	0.010	240.774	262.328	375.862	174.983	188.615		74.892	159.833	66.600	12.887	185.589		6.441	49.356		12.887	18.103	25.047	9.257
MW_2S_3	0.017	402.844	170.160	164.153	230.256	158.023		100.845	252.897		17.555	176.193			35.654		17.555	17.525	21.304	10.576
MW_2S_4	0.024	348.819	165.912	155.562	230.731	144.697	103.525	89.841	167.709		13.785	148.720			26.896		13.785	16.348	19.349	9.663
MW_2S_5	0.031	198.352	163.380	164.999	135.499			94.134	94.016	22.385	15.638	127.556			25.241		15.638	24.844	26.003	13.632
MW_2S_6	0.038	21.757		114.270		140.212		70.404	60.217	24.442	11.411	108.444			20.848		11.411	22.807	21.606	10.276
MW_2S_7	0.045	84.666		148.757	87.180	132.234		75.848	156.591	22.695	12.976	137.832		0.290	21.491		12.976	19.987	23.285	4.899
MW_2S_8	0.052	143.582	108.619	122.957	91.525	113.053		58.876	144.834	16.798	10.187	102.144			19.261		10.187	17.158	20.951	3.761
MW_3C_1	0.000	214.576	196.614	617.178	169.276	290.312		88.145	248.361	86.347	13.972	122.230		7.047	54.409		13.972	17.642	25.774	3.286
MW_3C_2	0.010	220.538	289.569	627.495	186.222	252.130	56.646	74.749	253.117	47.956	12.519	88.328		4.401	50.966		12.519	17.592	22.816	7.125
MW_3C_3	0.017	138.066	216.738	712.778	154.273	235.970	47.923	73.808	157.119	156.541	9.861	96.056		6.902	42.994		9.861	13.380	21.420	2.057
MW_3C_4	0.024	197.129	228.622	497.742	151.540	263.452		103.792	292.532	44.346	15.089	138.593		4.203	45.590		15.089	20.101	25.421	10.041
MW_3C_5	0.031	222.023	251.064	490.862	184.371	350.465	128.931	123.008	279.523	70.252	18.985	136.246		9.627	47.000		18.985	23.056	24.409	13.280
MW_3C_6	0.038	201.847	256.385	595.626	170.000	298.339		113.650	280.139	42.650	15.800	86.391		10.517	48.839		15.800	19.975	23.063	13.150
MW_3C_7	0.045	181.670	266.685	872.170	165.942	312.803		102.895	210.616	48.878	11.385	94.181		5.152	41.356		11.385	16.298	25.713	3.109
MW_3C_8	0.052	295.694	347.436	1040.270	181.171	456.354	75.991	114.192	198.422	72.208	11.266	90.528		11.162	35.692		11.266	14.236	26.787	6.949

Name	Time (min)	AMP (μ M)	ADP (μ M)	ATP (μ M)	UDPgIc (μ M)	GTP (μ M)	CTP (μ M)	UTP (μ M)	NADPH (μ M)	PYR (μ M)	MAL (μ M)	SUC (μ M)	FUM (μ M)	AKG (μ M)	G6P (μ M)	E4P (μ M)	X5P (R5P) (μ M)	F6P (μ M)	G1P (μ M)	PEP (μ M)
MW_3S_1	0.000	241.835	335.750	946.190	217.075	410.154	62.837	105.245	191.637	153.853	11.306	122.095		11.334	43.105		11.306	15.084	22.258	2.831
MW_3S_2	0.010	178.544	286.726	808.831	196.497	356.938	64.942	94.961	233.300	81.509	10.396	83.832		8.195	43.137		10.396	14.104	20.521	2.585
MW_3S_3	0.017	215.095	263.975	206.031	167.730	147.486		61.172	202.038	47.392	10.298	112.514		6.722	22.732		10.298	13.411	18.541	2.941
MW_3S_4	0.024	221.238	177.537	196.131	109.169	191.558		93.071	198.354	0.814	13.085	71.241		8.213	20.985		13.085	19.308	17.604	9.065
MW_3S_5	0.031	286.873	202.279	206.170	162.717	175.645		80.039	245.507	52.674	16.152	140.364		5.599	30.930		16.152	26.312	28.275	4.275
MW_3S_6	0.038	211.677	164.139	173.739	124.241	158.449		76.723	239.920	8.239	11.943	103.185		4.639	23.114		11.943	18.073	21.500	11.152
MW_3S_7	0.045	244.827	170.368	133.249	165.846	112.391		56.107	240.040	8.386	10.846	116.581		2.269	27.329		10.846	12.452	16.587	7.040
MW_3S_8	0.052	223.040	169.966	146.886	146.254	117.738		50.358	233.864	24.416	11.273	117.165		3.855	25.482		11.273	19.132	22.119	8.586

M Données simulées

Tableau 14 : Données simulées

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ACA_sim_KO_c	7.45E+01	7.58E+01	7.58E+01	75.815	7.58E+01	7.58E+01	75.821	75.821	75.822	75.822	75.822	75.822
ACA_sim_KO_m	7.45E+01	7.58E+01	7.58E+01	7.15E+01	7.59E+01	7.58E+01	21.143	13.168	17.01	17.63	18.262	18.262
ACA_sim_WT_c	74.5	75.65	75.689	75.704	75.711	75.715	75.718	75.72	75.721	75.722	75.722	75.723
ACA_sim_WT_m	74.5	75.65	75.429	53.646	11.857	11.119	14.336	14.924	15.516	16.101	16.68	16.68
ADP_sim_KO_c	1.75E+02	2.35E+02	2.35E+02	234.51	2.35E+02	2.35E+02	234.6	234.63	234.66	234.67	234.68	234.68
ADP_sim_KO_m	1.75E+02	2.35E+02	9.03E+01	8.17E+00	5.50E+00	5.79E+00	6.211	6.8585	8.7383	9.1187	9.4911	9.4911
ADP_sim_WT_c	174.76	214.71	214.6	214.51	214.38	214.26	214.15	214.05	213.96	213.88	213.81	213.81
ADP_sim_WT_m	1.75E+02	2.15E+02	7.89E+01	7.4214	5.31E+00	5.71E+00	7.2907	7.6417	7.9881	8.3324	8.6747	8.6747
AKG_sim_KO_c	5.96E+02	2.72E+00	2.72E+00	2.7217	2.72E+00	2.72E+00	2.7239	2.7243	2.7247	2.7251	2.7255	2.7255
AKG_sim_KO_m	5.96E+02	2.72E+00	4.77E+00	1.21E+03	2.07E+03	1.97E+03	1817	460.86	12.294	12.123	12.014	12.014
AKG_sim_WT_c	596	2.8225	2.8247	2.8263	2.828	2.8296	2.831	2.8323	2.8334	2.8343	2.8352	2.8352
AKG_sim_WT_m	596	2.8225	5.3189	1189.2	1540.5	312.29	12.544	12.377	12.249	12.13	12.018	12.018
AMP_sim_KO_c	2.54E+02	3.55E+02	3.55E+02	354.62	3.55E+02	3.55E+02	354.78	354.84	354.89	354.92	354.93	354.93
AMP_sim_KO_m	2.54E+02	3.55E+02	2.58E+02	3.21E+01	2.35E+01	2.41E+01	25.079	27.916	39.348	40.084	40.662	40.662
AMP_sim_WT_c	254	317.83	318.37	318.21	318	317.79	317.6	317.42	317.27	317.13	317	317
AMP_sim_WT_m	2.54E+02	3.18E+02	2.14E+02	29.423	2.33E+01	2.47E+01	34.686	35.314	35.848	36.361	36.857	36.857
ANP_sim_KO_c	1.30E+03	1.30E+03	1.30E+03	1300.8	1.30E+03	1.30E+03	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8
ANP_sim_KO_m	1.30E+03	1.30E+03	7.58E+02	1.34E+02	1.07E+02	1.11E+02	114.59	118.58	122.57	126.55	130.53	130.53
ANP_sim_WT_c	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8	1300.8
ANP_sim_WT_m	1.30E+03	1.30E+03	7.36E+02	128.13	1.02E+02	1.06E+02	110.19	114.19	118.18	122.16	126.15	126.15
ANPs_sim_KO_c	0.00E+00	3.16E-18	3.11E-18	3.06E-18	3.01E-18	2.96E-18	2.91E-18	2.86E-18	2.81E-18	2.77E-18	2.72E-18	2.72E-18
ANPs_sim_KO_m	0.00E+00	3.16E-18	5.43E+02	1.17E+03	1.19E+03	1.19E+03	1186.2	1182.2	1178.2	1174.2	1170.2	1170.2
ANPs_sim_WT_c	0	-3.76E-19	-3.71E-19	-3.86E-19	-3.99E-19	-3.88E-19	-1.23E-18	5.32E-18	5.2E-18	5.12E-18	4.95E-18	4.95E-18
ANPs_sim_WT_m	0.00E+00	-3.77E-19	5.65E+02	1172.6	1.20E+03	1.19E+03	1190.6	1186.6	1182.6	1178.6	1174.6	1174.6
ATP_ANP_T_sim_KO_c	6.70E-01	5.46E-01	5.47E-01	0.54709	5.47E-01	5.47E-01	0.5469	0.54682	0.54677	0.54673	0.54672	0.54672

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ATP_ANP_T_sim_KO_m	6.70E-01	5.46E-01	3.15E-01	7.23E-02	5.97E-02	6.21E-02	0.064039	0.064427	0.057258	0.059463	0.06179	
ATP_ANP_T_sim_WT_c	0.67038	0.59059	0.59026	0.59045	0.59072	0.59097	0.5912	0.59141	0.5916	0.59177	0.59192	
ATP_ANP_T_sim_WT_m	6.70E-01	5.91E-01	3.40E-01	0.070177	5.66E-02	5.82E-02	0.052444	0.054761	0.057151	0.059558	0.06197	
ATP_sim_KO_c	8.72E+02	7.10E+02	7.11E+02	711.63	7.12E+02	7.12E+02	711.38	711.28	711.21	711.17	711.15	
ATP_sim_KO_m	8.72E+02	7.10E+02	4.09E+02	9.41E+01	7.76E+01	8.07E+01	83.299	83.804	74.479	77.346	80.377	
ATP_sim_WT_c	872	768.22	767.78	768.04	768.38	768.71	769.02	769.29	769.53	769.75	769.95	
ATP_sim_WT_m	8.72E+02	7.68E+02	4.43E+02	91.284	7.36E+01	7.58E+01	68.218	71.231	74.34	77.47	80.616	
C_glc_sim_KO_c	7.39E+00	7.45E+00	7.52E+00	7.5949	7.68E+00	7.78E+00	7.8932	8.0148	8.1434	8.2753	8.4106	
C_glc_sim_KO_m	7.39E+00	7.45E+00	7.52E+00	7.60E+00	7.70E+00	7.81E+00	7.9288	8.0559	8.1888	8.3252	8.4651	
C_glc_sim_WT_c	7.3896	7.4485	7.5223	7.6051	7.6973	7.7994	7.9117	8.0347	8.1644	8.2974	8.4339	
C_glc_sim_WT_m	7.39E+00	7.45E+00	7.52E+00	7.6087	7.71E+00	7.82E+00	7.9408	8.069	8.2026	8.3395	8.4798	
C_gln_sim_KO_c	3.20E-03	3.37E-03	3.53E-03	0.003643	3.73E-03	3.81E-03	0.003878	0.003948	0.004018	0.00409	0.004164	
C_gln_sim_KO_m	3.20E-03	3.37E-03	3.53E-03	3.64E-03	3.73E-03	3.82E-03	0.003908	0.003993	0.004073	0.004153	0.004231	
C_gln_sim_WT_c	0.0032	0.0033735	0.003529	0.003643	0.003731	0.003807	0.003878	0.003948	0.004018	0.00409	0.004164	
C_gln_sim_WT_m	3.20E-03	3.37E-03	3.53E-03	0.003643	3.73E-03	3.81E-03	0.003888	0.003959	0.004029	0.004102	0.004176	
C_glt_sim_KO_c	1.44E-02	1.53E-02	1.61E-02	0.016556	1.69E-02	1.71E-02	0.017408	0.017699	0.017999	0.018307	0.018623	
C_glt_sim_KO_m	1.44E-02	1.53E-02	1.61E-02	1.66E-02	1.70E-02	1.76E-02	0.0181	0.01854	0.018931	0.019293	0.019633	
C_glt_sim_WT_c	0.0144	0.015281	0.016062	0.016558	0.016856	0.017129	0.01741	0.017701	0.018001	0.018309	0.018625	
C_glt_sim_WT_m	1.44E-02	1.53E-02	1.61E-02	0.016583	1.70E-02	1.74E-02	0.017731	0.01803	0.018336	0.01865	0.018972	
C_lac_sim_KO_c	9.60E-02	1.04E-01	1.14E-01	0.12237	1.30E-01	1.37E-01	0.14225	0.14658	0.15043	0.15438	0.15845	
C_lac_sim_KO_m	9.60E-02	1.04E-01	1.14E-01	1.22E-01	1.30E-01	1.36E-01	0.13978	0.14213	0.14437	0.14663	0.14895	
C_lac_sim_WT_c	0.096	0.10364	0.11289	0.12142	0.129	0.13553	0.14096	0.14524	0.14905	0.15297	0.15699	
C_lac_sim_WT_m	9.60E-02	1.04E-01	1.13E-01	0.12103	1.25E-01	1.27E-01	0.12855	0.1304	0.13241	0.13448	0.13661	
Cells_sim_KO_c	5.48E-04	4.85E-04	4.15E-04	0.000345	2.75E-04	2.05E-04	0.000135	0.000069	0.000069	0.000069	0.000069	
Cells_sim_KO_m	5.48E-04	4.85E-04	4.15E-04	3.45E-04	2.75E-04	2.05E-04	0.000135	0.000069	0.000069	0.000069	0.000069	
Cells_sim_WT_c	0.000548	0.000485	0.000415	0.000345	0.000275	0.000205	0.000135	0.000069	0.000069	0.000069	0.000069	
Cells_sim_WT_m	5.48E-04	4.85E-04	4.15E-04	0.000345	2.75E-04	2.05E-04	0.000135	0.000069	0.000069	0.000069	0.000069	
CIT_sim_KO_c	2.90E+02	1.79E+02	1.79E+02	179.5	1.80E+02	1.80E+02	179.74	179.79	179.84	179.88	179.92	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
CIT_sim_KO_m	2.90E+02	1.79E+02	1.79E+02	1.67E+02	4.66E+01	4.92E+01	40.075	26.18	34.174	35.471	36.804	
CIT_sim_WT_c	290	178.8	179	179.12	179.21	179.29	179.35	179.41	179.45	179.5	179.54	
CIT_sim_WT_m	2.90E+02	1.79E+02	1.79E+02	121.97	2.35E+01	2.20E+01	28.608	29.825	31.056	32.277	33.488	
CoA_sim_KO_c	1.80E+00	5.08E-01	4.91E-01	0.48481	4.82E-01	4.80E-01	0.47947	0.47881	0.47835	0.47803	0.47781	
CoA_sim_KO_m	1.80E+00	5.08E-01	5.36E-01	4.81E+00	3.58E-01	5.45E-01	55.157	63.132	59.29	58.67	58.038	
CoA_sim_WT_c	1.8	0.64972	0.61051	0.59618	0.58902	0.58483	0.58214	0.58027	0.57894	0.57795	0.5772	
CoA_sim_WT_m	1.80E+00	6.50E-01	8.71E-01	22.654	6.44E+01	6.52E+01	61.964	61.376	60.784	60.199	59.62	
Cr_sim_KO_c	6.74E+02	7.64E+02	7.75E+02	774.39	7.74E+02	7.74E+02	774.51	774.58	774.63	774.66	774.68	
Cr_sim_KO_m	6.74E+02	7.64E+02	7.95E+02	7.30E+02	6.50E+02	5.86E+02	560.58	577.2	677.22	754.15	789.47	
Cr_sim_WT_c	673.7	728.58	737.75	737.79	737.59	737.38	737.18	737.01	736.85	736.71	736.58	
Cr_sim_WT_m	6.74E+02	7.29E+02	7.47E+02	682.76	6.17E+02	5.83E+02	651.43	708.55	736.53	749.36	754.52	
F6P_sim_KO_c	1.30E+02	8.24E+01	8.46E+01	85.386	8.57E+01	8.58E+01	85.866	85.875	85.873	85.869	85.868	
F6P_sim_KO_m	1.30E+02	8.24E+01	4.52E+01	5.13E+01	4.69E+01	4.72E+01	47.437	47.322	46.684	46.856	47.072	
F6P_sim_WT_c	130	78.761	78.563	78.648	78.764	78.878	78.982	79.076	79.16	79.236	79.304	
F6P_sim_WT_m	1.30E+02	7.88E+01	3.63E+01	43.908	4.30E+01	4.30E+01	42.501	42.714	42.904	43.041	43.125	
FBP_sim_KO_c	1.87E+01	3.36E+01	3.56E+01	36.386	3.67E+01	3.69E+01	37.008	37.054	37.078	37.091	37.097	
FBP_sim_KO_m	1.87E+01	3.36E+01	3.89E+01	1.71E+01	1.28E+01	1.34E+01	13.909	13.964	12.331	12.824	13.365	
FBP_sim_WT_c	18.65	19.863	19.84	19.841	19.843	19.845	19.847	19.849	19.851	19.852	19.853	
FBP_sim_WT_m	1.87E+01	1.99E+01	2.13E+01	13.602	1.11E+01	1.14E+01	10.336	10.793	11.261	11.721	12.171	
FUM_sim_KO_c	1.14E+01	5.05E+00	5.06E+00	5.0592	5.06E+00	5.06E+00	5.0647	5.066	5.0672	5.0682	5.069	
FUM_sim_KO_m	1.14E+01	5.05E+00	5.04E+00	2.37E+00	1.48E+00	1.56E+00	1.6835	1.8535	1.1061	1.1456	1.187	
FUM_sim_WT_c	11.36	5.044	5.0474	5.0494	5.0513	5.0531	5.0546	5.0559	5.0571	5.0581	5.059	
FUM_sim_WT_m	1.14E+01	5.04E+00	5.02E+00	2.1162	1.43E+00	1.50E+00	0.93069	0.96878	1.0075	1.0458	1.0838	
G3P_sim_KO_c	1.49E+01	2.02E+02	2.22E+02	229.08	2.32E+02	2.34E+02	234.95	235.36	235.56	235.66	235.71	
G3P_sim_KO_m	1.49E+01	2.02E+02	5.43E+02	8.68E+03	1.51E+04	2.16E+04	28106	34588	40475	46013	51682	
G3P_sim_WT_c	14.89	98.98	98.901	98.946	99.008	99.069	99.125	99.175	99.22	99.261	99.297	
G3P_sim_WT_m	1.49E+01	9.90E+01	2.61E+02	5853.2	1.12E+04	1.64E+04	21200	25766	30455	35260	40173	
G6P_sim_KO_c	6.45E+02	6.32E+02	6.32E+02	632.52	6.33E+02	6.33E+02	632.52	632.51	632.51	632.51	632.51	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
G6P_sim_KO_m	6.45E+02	6.32E+02	6.16E+02	4.98E+02	4.64E+02	4.70E+02	475.32	476.17	457.89	463.67	469.67	
G6P_sim_WT_c	644.95	641.73	641.71	641.72	641.73	641.75	641.76	641.77	641.78	641.78	641.78	641.79
G6P_sim_WT_m	6.45E+02	6.42E+02	6.26E+02	502.56	4.66E+02	4.70E+02	453.08	459.83	466.61	473.15	479.43	
GLC_sim_KO_c	1.00E+03	7.86E+02	7.48E+02	743.87	7.47E+02	7.52E+02	758.4	766.52	775.79	785.43	795.2	
GLC_sim_KO_m	1.00E+03	7.86E+02	7.82E+02	1.52E+03	2.21E+03	2.40E+03	2434.5	2445.1	2578.8	2649	2631.7	
GLC_sim_WT_c	1000	1020.8	1031	1035.8	1040.7	1046.8	1054.3	1063.4	1073.7	1084.5	1095.5	
GLC_sim_WT_m	1.00E+03	1.02E+03	1.06E+03	1682	2.33E+03	2.56E+03	2765.8	2846.8	2830	2775.8	2709.8	
GLCe_sim_KO_c	9.24E+03	9.24E+03	9.25E+03	9273.3	9.31E+03	9.35E+03	9400.8	9465.5	9536	9607.6	9680.6	
GLCe_sim_KO_m	9.24E+03	9.24E+03	9.25E+03	9.28E+03	9.32E+03	9.38E+03	9443.1	9514	9589	9665.5	9743.4	
GLCe_sim_WT_c	9237	9243.6	9260	9285.9	9321.5	9367	9422.8	9489	9560.5	9633.3	9707.4	
GLCe_sim_WT_m	9.24E+03	9.24E+03	9.26E+03	9290.2	9.34E+03	9.39E+03	9457.5	9529.5	9605.2	9682.1	9760.3	
GLN_sim_KO_c	2.00E+01	1.84E+01	1.44E+01	10.388	8.01E+00	6.99E+00	6.6054	6.4841	6.4686	6.4964	6.5423	
GLN_sim_KO_m	2.00E+01	1.84E+01	1.44E+01	1.05E+01	9.01E+00	1.06E+01	13.327	14.271	12.345	9.6811	8.0294	
GLN_sim_WT_c	20	18.422	14.399	10.398	8.0152	6.9923	6.6076	6.4858	6.4701	6.4979	6.5437	
GLN_sim_WT_m	2.00E+01	1.84E+01	1.44E+01	10.562	8.72E+00	7.97E+00	7.2122	6.7734	6.6155	6.585	6.6076	
GLNe_sim_KO_c	4.00E+00	4.19E+00	4.34E+00	4.4479	4.52E+00	4.57E+00	4.6186	4.6622	4.705	4.7485	4.7926	
GLNe_sim_KO_m	4.00E+00	4.19E+00	4.34E+00	4.45E+00	4.52E+00	4.59E+00	4.6541	4.7154	4.7699	4.8212	4.8696	
GLNe_sim_WT_c	4	4.1865	4.3439	4.4482	4.5179	4.5718	4.6189	4.6626	4.7054	4.7488	4.793	
GLNe_sim_WT_m	4.00E+00	4.19E+00	4.34E+00	4.4485	4.52E+00	4.58E+00	4.6304	4.6752	4.7184	4.7621	4.8065	
GLT_sim_KO_c	2.00E+02	1.24E+02	5.80E+01	25.571	2.00E+01	1.98E+01	19.87	20.02	20.177	20.337	20.499	
GLT_sim_KO_m	2.00E+02	1.24E+02	5.80E+01	3.33E+01	5.63E+01	1.03E+02	139.25	102.69	50.998	26.4	22.076	
GLT_sim_WT_c	200	124.01	58.154	25.629	20.052	19.763	19.881	20.031	20.188	20.348	20.511	
GLT_sim_WT_m	2.00E+02	1.24E+02	5.82E+01	33.382	3.63E+01	2.93E+01	21.22	20.478	20.573	20.734	20.902	
GLTe_sim_KO_c	1.80E+01	1.90E+01	1.98E+01	20.215	2.04E+01	2.06E+01	20.733	20.902	21.077	21.254	21.435	
GLTe_sim_KO_m	1.80E+01	1.90E+01	1.98E+01	2.02E+01	2.06E+01	2.11E+01	21.557	21.896	22.169	22.399	22.597	
GLTe_sim_WT_c	18	18.964	19.772	20.217	20.413	20.572	20.735	20.905	21.08	21.257	21.438	
GLTe_sim_WT_m	1.80E+01	1.90E+01	1.98E+01	20.248	2.06E+01	2.09E+01	21.118	21.294	21.471	21.652	21.836	
GLY_sim_KO_c	2.64E+03	2.64E+03	2.63E+03	2634.5	2.63E+03	2.63E+03	2633.4	2633	2632.6	2632.2	2631.8	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
GLY_sim_KO_m	2.64E+03	2.64E+03	2.63E+03	2.63E+03	2.62E+03	2.61E+03	2603.2	2594.8	2586	2577.1	2568.4	
GLY_sim_WT_c	2635.5	2635.4	2635.3	2635.1	2635	2634.8	2634.6	2634.5	2634.3	2634.2	2634	
GLY_sim_WT_m	2.64E+03	2.64E+03	2.64E+03	2629.6	2.62E+03	2.61E+03	2602.5	2593.2	2584.2	2575.4	2566.8	
LAC_sim_KO_c	4.00E+02	5.02E+03	1.11E+04	17352	2.38E+04	3.03E+04	36814	43383	49970	56570	63181	
LAC_sim_KO_m	4.00E+02	5.02E+03	1.12E+04	7.46E+03	4.28E+03	2.17E+03	338.87	106.29	79.269	81.487	84.785	
LAC_sim_WT_c	400	3256.9	6152.7	9030	11904	14779	17655	20531	23408	26286	29166	
LAC_sim_WT_m	4.00E+02	3.26E+03	6.15E+03	2142	1.23E+02	8.60E+01	67.825	70.053	72.887	75.867	78.994	
LACe_sim_KO_c	1.20E+02	1.29E+02	1.40E+02	149.41	1.58E+02	1.64E+02	169.42	173.11	176.15	179.24	182.37	
LACe_sim_KO_m	1.20E+02	1.29E+02	1.40E+02	1.49E+02	1.57E+02	1.63E+02	166.48	167.86	169.06	170.24	171.45	
LACe_sim_WT_c	120	128.62	138.97	148.25	156.21	162.77	167.89	171.53	174.54	177.59	180.7	
LACe_sim_WT_m	1.20E+02	1.29E+02	1.39E+02	147.78	1.52E+02	1.52E+02	153.1	154.01	155.06	156.13	157.23	
MAL_sim_KO_c	5.96E+02	1.79E+02	1.79E+02	179.01	1.79E+02	1.79E+02	179.2	179.25	179.28	179.32	179.35	
MAL_sim_KO_m	5.96E+02	1.79E+02	1.79E+02	8.69E+01	5.35E+01	5.64E+01	60.432	66.616	39.808	41.213	42.696	
MAL_sim_WT_c	596	178.53	178.65	178.72	178.79	178.85	178.91	178.95	178.99	179.03	179.06	
MAL_sim_WT_m	5.96E+02	1.79E+02	1.78E+02	77.543	5.14E+01	5.41E+01	33.514	34.876	36.266	37.64	39.001	
NAD_sim_KO_c	8.40E+02	1.07E+03	1.07E+03	1066.1	1.07E+03	1.07E+03	1066.1	1066.2	1066.2	1066.2	1066.2	
NAD_sim_KO_m	8.40E+02	1.07E+03	1.06E+03	1.06E+03	1.02E+03	1.01E+03	1033.6	1056.8	1067.2	1067.1	1066.9	
NAD_sim_WT_c	840	1064.1	1064.1	1064.1	1064	1064	1064	1064	1064	1063.9	1063.9	
NAD_sim_WT_m	8.40E+02	1.06E+03	1.05E+03	1059.1	1.06E+03	1.06E+03	1067.4	1067.3	1067.1	1067	1066.8	
NADH_NAD_sim_KO_c	2.74E-01	3.63E-03	3.64E-03	0.003632	3.63E-03	3.62E-03	0.003613	0.003609	0.003607	0.003605	0.003604	
NADH_NAD_sim_KO_m	2.74E-01	3.63E-03	6.28E-03	1.31E-02	5.38E-02	6.36E-02	0.035193	0.012533	0.002626	0.002753	0.00291	
NADH_NAD_sim_WT_c	0.27381	0.0055597	0.005563	0.005579	0.005601	0.005623	0.005642	0.00566	0.005676	0.00569	0.005703	
NADH_NAD_sim_WT_m	2.74E-01	5.56E-03	1.57E-02	0.010292	1.10E-02	9.20E-03	0.002396	0.002529	0.002682	0.002844	0.003017	
NADH_NAD_T_sim_KO_c	2.15E-01	3.61E-03	3.62E-03	0.003619	3.61E-03	3.61E-03	0.0036	0.003596	0.003594	0.003592	0.003591	
NADH_NAD_T_sim_KO_m	2.15E-01	3.61E-03	6.24E-03	1.29E-02	5.11E-02	5.98E-02	0.033997	0.012378	0.002619	0.002745	0.002902	
NADH_NAD_T_sim_WT_c	0.21495	0.005529	0.005532	0.005548	0.00557	0.005591	0.005611	0.005628	0.005644	0.005658	0.005671	
NADH_NAD_T_sim_WT_m	2.15E-01	5.53E-03	1.55E-02	0.010187	1.09E-02	9.12E-03	0.002391	0.002523	0.002675	0.002836	0.003008	
NADH_sim_KO_c	2.30E+02	3.87E+00	3.88E+00	3.8726	3.86E+00	3.86E+00	3.852	3.8479	3.8451	3.8434	3.8426	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
NADH_sim_KO_m	2.30E+02	3.87E+00	6.68E+00	1.38E+01	5.47E+01	6.40E+01	36.376	13.244	2.8021	2.9373	3.1051	
NADH_sim_WT_c	230	5.916	5.9189	5.9368	5.96	5.9827	6.0033	6.0219	6.0386	6.0538	6.0675	
NADH_sim_WT_m	2.30E+02	5.92E+00	1.65E+01	10.901	1.16E+01	9.76E+00	2.5578	2.6995	2.8619	3.0347	3.2181	
NADP_sim_KO_c	9.20E-01	4.35E+01	4.26E+01	42.273	4.21E+01	4.20E+01	41.938	41.9	41.877	41.863	41.856	
NADP_sim_KO_m	9.20E-01	4.35E+01	2.16E+01	4.01E+00	3.45E+00	3.57E+00	3.6442	3.5978	3.1687	3.2929	3.4219	
NADP_sim_WT_c	0.92	0.86952	0.86972	0.86987	0.87006	0.87024	0.87039	0.87053	0.87066	0.87077	0.87087	
NADP_sim_WT_m	9.20E-01	8.70E-01	6.87E-01	0.2596	2.26E-01	2.29E-01	0.2099	0.21716	0.22441	0.23151	0.23848	
NADPH_NADP_sim_KO_c	7.07E+01	5.17E-01	5.49E-01	0.56128	5.68E-01	5.71E-01	0.57374	0.57517	0.57604	0.57655	0.57682	
NADPH_NADP_sim_KO_m	7.07E+01	5.17E-01	2.06E+00	1.55E+01	1.81E+01	1.75E+01	17.111	17.344	19.829	19.043	18.288	
NADPH_NADP_sim_WT_c	70.739	74.904	74.886	74.873	74.857	74.842	74.828	74.815	74.805	74.795	74.786	
NADPH_NADP_sim_WT_m	7.07E+01	7.49E+01	9.51E+01	253.24	2.91E+02	2.87E+02	313.43	302.93	293.11	284.09	275.75	
NADPH_NADP_T_sim_KO_c	9.86E-01	3.41E-01	3.55E-01	0.3595	3.62E-01	3.64E-01	0.36457	0.36515	0.3655	0.36571	0.36581	
NADPH_NADP_T_sim_KO_m	9.86E-01	3.41E-01	6.73E-01	9.39E-01	9.48E-01	9.46E-01	0.94479	0.94549	0.95199	0.95011	0.94815	
NADPH_NADP_T_sim_WT_c	0.98606	0.98683	0.98682	0.98682	0.98682	0.98681	0.98681	0.98681	0.98681	0.98681	0.9868	
NADPH_NADP_T_sim_WT_m	9.86E-01	9.87E-01	9.90E-01	0.99607	9.97E-01	9.97E-01	0.99682	0.99671	0.9966	0.99649	0.99639	
NADPH_sim_KO_c	6.51E+01	2.25E+01	2.34E+01	23.727	2.39E+01	2.40E+01	24.062	24.1	24.123	24.137	24.144	
NADPH_sim_KO_m	6.51E+01	2.25E+01	4.44E+01	6.20E+01	6.26E+01	6.24E+01	62.356	62.402	62.831	62.707	62.578	
NADPH_sim_WT_c	65.08	65.13	65.13	65.13	65.13	65.13	65.13	65.129	65.129	65.129	65.129	
NADPH_sim_WT_m	6.51E+01	6.51E+01	6.53E+01	65.74	6.58E+01	6.58E+01	65.79	65.783	65.776	65.768	65.762	
O2_sim_KO_c	1.23E+03	1.23E+03	1.23E+03	1234.3	1.23E+03	1.23E+03	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	
O2_sim_KO_m	1.23E+03	1.23E+03	1.23E+03	1.23E+03	1.23E+03	1.23E+03	1234.7	1234.8	1234.8	1234.8	1234.8	
O2_sim_WT_c	1234.1	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	1234.3	
O2_sim_WT_m	1.23E+03	1.23E+03	1.23E+03	1234.5	1.23E+03	1.23E+03	1234.8	1234.8	1234.8	1234.8	1234.8	
O2e_sim_KO_c	1.24E+03	1.24E+03	1.24E+03	1235	1.24E+03	1.24E+03	1235	1235	1235	1235	1235	
O2e_sim_KO_m	1.24E+03	1.24E+03	1.24E+03	1.24E+03	1.24E+03	1.24E+03	1235	1235	1235	1235	1235	
O2e_sim_WT_c	1235	1235	1235	1235	1235	1235	1235	1235	1235	1235	1235	
O2e_sim_WT_m	1.24E+03	1.24E+03	1.24E+03	1235	1.24E+03	1.24E+03	1235	1235	1235	1235	1235	
OAA_sim_KO_c	5.39E+00	1.49E+03	1.66E+03	1840.2	2.02E+03	2.21E+03	2395.4	2583.3	2771.9	2961.1	3150.7	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
OAA_sim_KO_m	5.39E+00	1.49E+03	1.66E+03	7.07E+02	3.38E+00	3.65E+00	53.633	1379.8	1882.3	1880.3	1877.8	
OAA_sim_WT_c	5.39	1455.4	1564.9	1680.8	1800.1	1921.4	2044.2	2168	2292.5	2417.5	2543	
OAA_sim_WT_m	5.39E+00	1.46E+03	1.56E+03	691.09	4.70E+02	1.68E+03	2017.3	2014.8	2012.3	2009.9	2007.6	
PCR_Cr_T_sim_KO_c	7.31E-01	6.95E-01	6.90E-01	0.69024	6.90E-01	6.90E-01	0.6902	0.69017	0.69015	0.69014	0.69013	
PCR_Cr_T_sim_KO_m	7.31E-01	6.95E-01	6.82E-01	7.08E-01	7.40E-01	7.66E-01	0.77577	0.76912	0.72911	0.69834	0.68421	
PCR_Cr_T_sim_WT_c	0.73052	0.70857	0.7049	0.70488	0.70496	0.70505	0.70513	0.7052	0.70526	0.70532	0.70537	
PCR_Cr_T_sim_WT_m	7.31E-01	7.09E-01	7.01E-01	0.7269	7.53E-01	7.67E-01	0.73943	0.71658	0.70539	0.70025	0.69819	
PCr_sim_KO_c	1.83E+03	1.74E+03	1.73E+03	1725.6	1.73E+03	1.73E+03	1725.5	1725.4	1725.4	1725.3	1725.3	
PCr_sim_KO_m	1.83E+03	1.74E+03	1.70E+03	1.77E+03	1.85E+03	1.91E+03	1939.4	1922.8	1822.8	1745.8	1710.5	
PCr_sim_WT_c	1826.3	1771.4	1762.2	1762.2	1762.4	1762.6	1762.8	1763	1763.2	1763.3	1763.4	
PCr_sim_WT_m	1.83E+03	1.77E+03	1.75E+03	1817.2	1.88E+03	1.92E+03	1848.6	1791.5	1763.5	1750.6	1745.5	
PEP_sim_KO_c	6.30E+00	1.03E+01	1.07E+01	10.799	1.09E+01	1.09E+01	10.895	10.902	10.905	10.906	10.907	
PEP_sim_KO_m	6.30E+00	1.03E+01	1.91E+01	4.41E+01	4.65E+01	4.66E+01	46.503	46.164	45.134	44.953	44.774	
PEP_sim_WT_c	6.3	7.5203	7.518	7.521	7.525	7.5289	7.5325	7.5357	7.5385	7.5411	7.5435	
PEP_sim_WT_m	6.30E+00	7.52E+00	1.60E+01	43.899	4.64E+01	4.65E+01	45.71	45.599	45.466	45.319	45.164	
PYR_sim_KO_c	4.90E+01	5.19E+02	8.13E+02	1002.6	1.14E+03	1.23E+03	1305.4	1360.6	1403.1	1436.1	1461.8	
PYR_sim_KO_m	4.90E+01	5.19E+02	3.39E+02	2.10E+01	2.92E+01	1.96E+01	3.956	2.8018	3.6355	3.7717	3.9106	
PYR_sim_WT_c	49	145.76	179.64	197.12	207.46	214.19	218.86	222.26	224.81	226.78	228.34	
PYR_sim_WT_m	4.90E+01	1.46E+02	7.67E+01	12.196	2.48E+00	2.36E+00	3.0529	3.181	3.31	3.4378	3.5645	
R_volume_sim_KO_c	1.37E-02	1.22E-02	1.05E-02	0.00883	7.10E-03	5.33E-03	0.003542	0.001826	0.001841	0.001857	0.001873	
R_volume_sim_KO_m	1.37E-02	1.22E-02	1.05E-02	8.83E-03	7.10E-03	5.33E-03	0.003542	0.001826	0.001841	0.001857	0.001873	
R_volume_sim_WT_c	0.0137	0.012213	0.010535	0.00883	0.007096	0.005334	0.003542	0.001826	0.001841	0.001857	0.001873	
R_volume_sim_WT_m	1.37E-02	1.22E-02	1.05E-02	0.00883	7.10E-03	5.33E-03	0.003542	0.001826	0.001841	0.001857	0.001873	
R5P_sim_KO_c	2.15E+01	5.39E+02	6.79E+02	742.28	7.74E+02	7.91E+02	799.55	804.22	806.68	807.97	808.64	
R5P_sim_KO_m	2.15E+01	5.39E+02	6.54E+02	1.33E+02	7.17E+01	7.49E+01	77.282	75.986	66.654	68.956	71.874	
R5P_sim_WT_c	21.5	20.51	20.497	20.5	20.505	20.509	20.513	20.516	20.519	20.522	20.524	
R5P_sim_WT_m	2.15E+01	2.05E+01	1.85E+01	6.0816	4.95E+00	5.02E+00	4.5469	4.7176	4.8952	5.0696	5.2412	
SUC_sim_KO_c	5.00E+02	2.45E+02	2.45E+02	245.24	2.45E+02	2.45E+02	245.56	245.63	245.7	245.76	245.81	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
SUC_sim_KO_m	5.00E+02	2.45E+02	2.44E+02	1.04E+02	6.36E+01	6.74E+01	72.619	80.073	46.505	48.231	50.044	
SUC_sim_WT_c	500	244.48	244.67	244.79	244.91	245.01	245.1	245.18	245.24	245.3	245.36	
SUC_sim_WT_m	5.00E+02	2.44E+02	2.43E+02	92.165	6.10E+01	6.40E+01	38.899	40.544	42.221	43.883	45.534	
T_glc_sim_KO_c	5.18E+02	5.54E+02	5.60E+02	561.61	5.62E+02	5.62E+02	562.16	562.29	562.35	562.36	562.37	
T_glc_sim_KO_m	5.18E+02	5.54E+02	5.54E+02	4.44E+02	3.63E+02	3.43E+02	342.05	342.69	331.49	326.66	330.07	
T_glc_sim_WT_c	517.72	514.57	513.37	513.25	513.35	513.5	513.66	513.82	513.91	513.94	513.97	
T_glc_sim_WT_m	5.18E+02	5.15E+02	5.09E+02	422.39	3.50E+02	3.28E+02	311.03	305.52	308.79	315.43	323.21	
T_gln_sim_KO_c	1.40E+00	1.25E+00	8.87E-01	0.52921	3.13E-01	2.17E-01	0.17847	0.16369	0.15844	0.15701	0.15713	
T_gln_sim_KO_m	1.40E+00	1.25E+00	8.87E-01	5.42E-01	4.01E-01	5.39E-01	0.7673	0.84353	0.67148	0.43334	0.28277	
T_gln_sim_WT_c	1.3968	1.2466	0.88807	0.53013	0.31322	0.21726	0.17863	0.1638	0.15854	0.15711	0.15722	
T_gln_sim_WT_m	1.40E+00	1.25E+00	8.88E-01	0.54452	3.75E-01	3.04E-01	0.23159	0.18838	0.17037	0.1637	0.16172	
T_glt_sim_KO_c	7.55E+00	6.58E+00	4.54E+00	1.1682	-9.50E-02	-2.09E-01	-0.21838	-0.2212	-0.2233	-0.22524	-0.2272	
T_glt_sim_KO_m	7.55E+00	6.58E+00	4.54E+00	2.36E+00	4.22E+00	5.68E+00	6.1217	5.4866	3.5358	0.79981	-0.11674	
T_glt_sim_WT_c	7.5547	6.585	4.5461	1.1787	-0.091729	-0.20639	-0.21623	-0.21907	-0.22115	-0.22308	-0.22502	
T_glt_sim_WT_m	7.55E+00	6.59E+00	4.55E+00	2.3694	2.63E+00	1.63E+00	0.024464	-0.19917	-0.21747	-0.22016	-0.22166	
T_lac_sim_KO_c	3.14E+01	8.31E+01	8.64E+01	86.583	8.61E+01	8.56E+01	85.188	84.878	84.611	84.305	83.971	
T_lac_sim_KO_m	3.14E+01	8.31E+01	8.65E+01	8.29E+01	7.72E+01	6.73E+01	19.278	-9.7969	-15.003	-14.738	-14.272	
T_lac_sim_WT_c	31.443	78.561	83.167	84.156	84.253	84.096	83.909	83.791	83.671	83.484	83.248	
T_lac_sim_WT_m	3.14E+01	7.86E+01	8.32E+01	69.373	-4.62E+00	-1.13E+01	-14.963	-14.644	-14.228	-13.793	-13.339	
T_o2_sim_KO_c	2.38E+03	1.93E+03	1.93E+03	1925	1.92E+03	1.92E+03	1922.1	1921.8	1921.6	1921.5	1921.4	
T_o2_sim_KO_m	2.38E+03	1.93E+03	1.70E+03	1.45E+03	6.92E+02	7.24E+02	681.99	621.83	534.37	552.13	570.41	
T_o2_sim_WT_c	2379.6	1911.2	1911.6	1912	1912.4	1912.9	1913.2	1913.6	1913.9	1914.2	1914.4	
T_o2_sim_WT_m	2.38E+03	1.91E+03	1.88E+03	1217	5.17E+02	5.21E+02	455.42	472.84	490.37	507.62	524.6	
T_o2e_sim_KO_c	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	
T_o2e_sim_KO_m	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	
T_o2e_sim_WT_c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T_o2e_sim_WT_m	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	
Time_sim_KO_c	0	9	19	29	39	49	59	69	79	89	99	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Time_sim_KO_m		0	9	19	29	39	49	59	69	79	89	99
Time_sim_WT_c		0	9	19	29	39	49	59	69	79	89	99
Time_sim_WT_m		0	9	19	29	39	49	59	69	79	89	99
V_ak_sim_KO_c	-5.75E-01	-7.27E-01	5.72E-02	0.00695	-5.38E-03	-7.87E-03	-0.007299	-0.005696	-0.003878	-0.002184	-0.00074	
V_ak_sim_KO_m	-5.75E-01	-7.27E-01	9.05E+01	1.96E+00	3.58E-01	3.35E-01	-0.013188	0.26712	0.27516	0.33811	0.34188	
V_ak_sim_WT_c	-0.57497	-0.52344	0.009081	0.019808	0.02189	0.020262	0.018163	0.016357	0.014681	0.013228	0.011965	
V_ak_sim_WT_m	-5.75E-01	-5.23E-01	8.56E+01	1.5146	1.38E-03	2.52E-01	0.30723	0.34416	0.34666	0.34821	0.34929	
V_atpase_sim_KO_c	1.49E+04	1.38E+04	1.38E+04	13802	1.38E+04	1.38E+04	13800	13800	13799	13799	13798	
V_atpase_sim_KO_m	1.49E+04	1.38E+04	1.06E+04	3.72E+03	3.16E+03	3.27E+03	3356	3373.4	3046.7	3148.3	3254.5	
V_atpase_sim_WT_c	14936	14235	14232	14234	14236	14239	14241	14243	14245	14246	14248	
V_atpase_sim_WT_m	1.49E+04	1.42E+04	1.10E+04	3628	3.02E+03	3.09E+03	2821.3	2930.4	3041.7	3152.6	3262.9	
V_cdh_sim_KO_c	8.60E+02	6.73E+02	6.73E+02	673.42	6.74E+02	6.74E+02	673.96	674.08	674.19	674.28	674.37	
V_cdh_sim_KO_m	8.60E+02	6.73E+02	6.73E+02	6.43E+02	2.46E+02	2.58E+02	216.43	148.13	188.49	194.82	201.27	
V_cdh_sim_WT_c	860.1	671.74	672.2	672.48	672.68	672.85	672.99	673.12	673.23	673.32	673.41	
V_cdh_sim_WT_m	8.60E+02	6.72E+02	6.71E+02	523.66	1.34E+02	1.26E+02	160.68	166.84	173.03	179.12	185.11	
V_ck_sim_KO_c	-9.38E-02	-4.59E+00	-2.55E-02	0.011205	-3.90E-03	-7.74E-03	-0.007589	-0.006094	-0.004266	-0.002514	-0.001	
V_ck_sim_KO_m	-9.38E-02	-4.59E+00	-1.47E+01	9.46E+00	9.53E+00	4.06E+00	0.50126	-2.069	-10.878	-5.1306	-2.2745	
V_ck_sim_WT_c	-0.093795	-3.6903	-0.064395	0.01712	0.021707	0.020513	0.018488	0.016607	0.014906	0.013423	0.012132	
V_ck_sim_WT_m	-9.38E-02	-3.69E+00	-8.09E+00	7.9312	5.85E+00	1.75E+00	-7.8591	-3.9482	-1.8742	-0.81286	-0.2809	
V_cs_sim_KO_c	3.18E+02	6.73E+02	6.73E+02	673.43	6.74E+02	6.74E+02	673.96	674.09	674.19	674.29	674.37	
V_cs_sim_KO_m	3.18E+02	6.73E+02	6.73E+02	6.41E+02	2.46E+02	2.58E+02	208.22	148.23	188.59	194.95	201.41	
V_cs_sim_WT_c	318.35	671.77	672.22	672.49	672.69	672.86	673	673.12	673.23	673.33	673.41	
V_cs_sim_WT_m	3.18E+02	6.72E+02	6.70E+02	512.39	1.33E+02	1.26E+02	160.79	166.97	173.15	179.24	185.23	
V_destress_sim_KO_c	0.00E+00	5.27E-21	5.18E-21	5.1E-21	5.01E-21	4.93E-21	4.85E-21	4.77E-21	4.69E-21	4.61E-21	4.53E-21	
V_destress_sim_KO_m	0.00E+00	5.27E-21	3.22E-01	3.98E-01	4.00E-01	3.99E-01	0.39907	0.3988	0.39852	0.39825	0.39798	
V_destress_sim_WT_c	0	-6.2795E-22	-6.18E-22	-6.43E-22	-6.65E-22	-6.47E-22	-2.04E-21	8.86E-21	8.67E-21	8.53E-21	8.25E-21	
V_destress_sim_WT_m	0.00E+00	-6.28E-22	3.27E-01	0.39814	4.00E-01	4.00E-01	0.39937	0.3991	0.39883	0.39855	0.39828	
V_evap_sim_KO_c	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	0.000032	3.20E-05	3.20E-05	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
V_evap_sim_KO_m	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032
V_evap_sim_WT_c	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032
V_evap_sim_WT_m	3.20E-05	3.20E-05	3.20E-05	0.000032	3.20E-05	3.20E-05	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032	0.000032
V_fai_sim_KO_c	5.22E+02	6.11E+02	6.19E+02	622.34	6.24E+02	6.24E+02	624.72	624.9	624.99	625.04	625.07	
V_fai_sim_KO_m	5.22E+02	6.11E+02	6.13E+02	4.12E+02	3.45E+02	3.54E+02	362.26	362.9	334.77	343.48	352.68	
V_fai_sim_WT_c	522.44	519.35	519.11	519.11	519.13	519.14	519.15	519.16	519.17	519.18	519.19	
V_fai_sim_WT_m	5.22E+02	5.19E+02	5.15E+02	362.04	3.13E+02	3.19E+02	296.17	305.48	314.72	323.52	331.84	
V_fbp_sim_KO_c	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	0
V_fbp_sim_KO_m	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	0
V_fbp_sim_WT_c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V_fbp_sim_WT_m	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	0
V_fh_sim_KO_c	1.12E+03	6.73E+02	6.73E+02	673.47	6.74E+02	6.74E+02	673.99	674.12	674.23	674.33	674.41	
V_fh_sim_KO_m	1.12E+03	6.73E+02	6.71E+02	3.70E+02	2.46E+02	2.58E+02	275.63	299.98	188.51	194.7	201.14	
V_fh_sim_WT_c	1121.1	672.01	672.33	672.52	672.72	672.89	673.03	673.15	673.26	673.36	673.45	
V_fh_sim_WT_m	1.12E+03	6.72E+02	6.69E+02	336.55	2.39E+02	2.49E+02	160.61	166.73	172.91	179	184.99	
V_g6d_sim_KO_c	2.00E+01	1.92E+02	1.92E+02	191.37	1.91E+02	1.91E+02	191.08	191.05	191.03	191.02	191.01	
V_g6d_sim_KO_m	2.00E+01	1.92E+02	1.61E+02	6.40E+01	5.63E+01	5.79E+01	58.976	58.452	52.603	54.339	56.117	
V_g6d_sim_WT_c	19.968	18.94	18.944	18.947	18.951	18.954	18.958	18.96	18.963	18.965	18.967	
V_g6d_sim_WT_m	2.00E+01	1.89E+01	1.51E+01	5.6631	4.84E+00	4.93E+00	4.4781	4.6482	4.8187	4.9861	5.1506	
V_gns_sim_KO_c	1.41E+00	9.19E-01	4.48E-01	0.19953	1.57E-01	1.56E-01	0.15708	0.1584	0.15968	0.16094	0.16221	
V_gns_sim_KO_m	1.41E+00	9.19E-01	4.48E-01	2.61E-01	4.40E-01	7.81E-01	1.028	0.77575	0.39683	0.20677	0.17359	
V_gns_sim_WT_c	1.411	0.92048	0.44958	0.19998	0.15731	0.15589	0.15717	0.15849	0.15977	0.16103	0.16231	
V_gns_sim_WT_m	1.41E+00	9.20E-01	4.50E-01	0.26139	2.86E-01	2.31E-01	0.16743	0.16184	0.16275	0.16406	0.1654	
V_gtd_sim_KO_c	-8.69E+00	3.07E-01	1.43E-01	0.061444	4.74E-02	4.67E-02	0.046959	0.047344	0.047746	0.048155	0.048569	
V_gtd_sim_KO_m	-8.69E+00	3.07E-01	1.36E-01	-2.85E+00	-1.01E+01	-1.07E+01	-7.1564	-1.247	0.11698	0.05436	0.042767	
V_gtd_sim_WT_c	-8.6918	0.30476	0.14154	0.059433	0.045229	0.04447	0.044746	0.045107	0.045489	0.045881	0.04628	
V_gtd_sim_WT_m	-8.69E+00	3.05E-01	1.19E-01	-2.2799	-2.77E+00	-7.75E-01	0.042428	0.040069	0.039731	0.039521	0.039295	
V_gyp_sim_KO_c	1.69E+00	1.69E+00	1.69E+00	1.6925	1.69E+00	1.69E+00	1.6923	1.6922	1.6921	1.6921	1.692	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
V_gyp_sim_KO_m		1.69E+00	1.69E+00	1.69E+00	1.69E+00	1.69E+00	1.69E+00	1.6869	1.6854	1.6838	1.6822	1.6806
V_gyp_sim_WT_c		1.6927	1.6927	1.6926	1.6926	1.6926	1.6925	1.6925	1.6925	1.6925	1.6924	1.6924
V_gyp_sim_WT_m		1.69E+00	1.69E+00	1.69E+00	1.6916	1.69E+00	1.69E+00	1.6868	1.6851	1.6834	1.6818	1.6803
V_gys_sim_KO_c		1.70E+00	1.65E+00	1.65E+00	1.6543	1.65E+00	1.65E+00	1.6542	1.6542	1.6542	1.6542	1.6542
V_gys_sim_KO_m		1.70E+00	1.65E+00	1.53E+00	9.13E-01	8.06E-01	8.27E-01	0.84392	0.84709	0.78408	0.80407	0.82464
V_gys_sim_WT_c		1.6979	1.6765	1.6764	1.6764	1.6765	1.6766	1.6767	1.6767	1.6768	1.6768	1.6769
V_gys_sim_WT_m		1.70E+00	1.68E+00	1.56E+00	0.9053	7.86E-01	8.01E-01	0.74566	0.76835	0.79107	0.81316	0.83458
V_hk_sim_KO_c		5.17E+02	5.62E+02	5.62E+02	561.52	5.61E+02	5.61E+02	561.42	561.41	561.4	561.39	561.39
V_hk_sim_KO_m		5.17E+02	5.62E+02	5.18E+02	3.64E+02	3.26E+02	3.35E+02	341.81	343.17	316.77	325.36	333.97
V_hk_sim_WT_c		516.83	512.78	512.79	512.8	512.81	512.82	512.83	512.84	512.85	512.85	512.86
V_hk_sim_WT_m		5.17E+02	5.13E+02	4.79E+02	350.79	3.11E+02	3.17E+02	294.38	303.78	312.96	321.7	329.96
V_iso_sim_KO_c		5.09E+02	4.98E+02	4.98E+02	497.77	4.98E+02	4.98E+02	497.77	497.76	497.76	497.76	497.76
V_iso_sim_KO_m		5.09E+02	4.98E+02	4.82E+02	3.52E+02	3.08E+02	3.16E+02	322.97	324.1	299.7	307.52	315.53
V_iso_sim_WT_c		509.19	506.5	506.49	506.49	506.5	506.51	506.52	506.53	506.54	506.55	506.55
V_iso_sim_WT_m		5.09E+02	5.07E+02	4.92E+02	357.74	3.10E+02	3.16E+02	293.25	302.46	311.58	320.26	328.47
V_kdh_sim_KO_c		3.22E+03	6.73E+02	6.73E+02	673.48	6.74E+02	6.74E+02	674	674.13	674.24	674.33	674.42
V_kdh_sim_KO_m		3.22E+03	6.73E+02	6.70E+02	3.60E+02	2.46E+02	2.58E+02	277.27	299.85	188.64	194.88	201.33
V_kdh_sim_WT_c		3220.7	672.04	672.35	672.54	672.73	672.9	673.04	673.16	673.27	673.37	673.45
V_kdh_sim_WT_m		3.22E+03	6.72E+02	6.67E+02	328.76	2.40E+02	2.49E+02	160.75	166.9	173.08	179.17	185.16
V_ldh_sim_KO_c		-7.50E+02	-6.62E+02	-7.07E+02	-723.99	-7.33E+02	-7.38E+02	-740.87	-742.78	-744.04	-744.9	-745.5
V_ldh_sim_KO_m		-7.50E+02	-6.62E+02	-7.67E+02	4.79E+02	1.35E+02	1.40E+02	76.324	10.458	15.175	14.419	13.933
V_ldh_sim_WT_c		-749.71	-371.15	-371.36	-371.62	-371.66	-371.62	-371.55	-371.48	-371.4	-371.33	-371.26
V_ldh_sim_WT_m		-7.50E+02	-3.71E+02	-2.10E+02	360.57	2.51E+01	1.12E+01	14.94	14.369	13.937	13.488	13.019
V_leak_sim_KO_c		6.42E+02	2.28E+01	2.28E+01	22.794	2.27E+01	2.27E+01	22.676	22.652	22.636	22.626	22.621
V_leak_sim_KO_m		6.42E+02	2.28E+01	3.14E+02	1.63E+03	2.58E+02	2.91E+02	184.67	74.531	16.58	17.369	18.346
V_leak_sim_WT_c		641.86	34.476	34.493	34.594	34.725	34.854	34.97	35.075	35.17	35.256	35.333
V_leak_sim_WT_m		6.42E+02	3.45E+01	7.43E+02	1302.4	6.60E+01	5.58E+01	15.153	15.981	16.929	17.936	19.003
V_mdh_sim_KO_c		1.35E+03	6.73E+02	6.73E+02	673.46	6.74E+02	6.74E+02	673.99	674.12	674.23	674.32	674.41

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
V_mdh_sim_KO_m	1.35E+03	6.73E+02	6.72E+02	3.78E+02	2.45E+02	2.57E+02	274.46	300.03	188.41	194.55	200.99	
V_mdh_sim_WT_c	1347.1	672	672.33	672.52	672.71	672.88	673.02	673.15	673.26	673.36	673.45	
V_mdh_sim_WT_m	1.35E+03	6.72E+02	6.70E+02	342.72	2.38E+02	2.49E+02	160.49	166.59	172.77	178.86	184.85	
V_op_sim_KO_c	3.93E+03	3.85E+03	3.83E+03	3827.3	3.82E+03	3.82E+03	3821.6	3820.9	3820.5	3820.3	3820.2	
V_op_sim_KO_m	3.93E+03	3.85E+03	3.08E+03	1.28E+03	1.13E+03	1.16E+03	1179.3	1169.1	1052.2	1086.9	1122.5	
V_op_sim_WT_c	3927.3	3788	3788.8	3789.4	3790.1	3790.9	3791.5	3792.1	3792.6	3793.1	3793.5	
V_op_sim_WT_m	3.93E+03	3.79E+03	3.01E+03	1131.6	9.69E+02	9.86E+02	895.69	929.71	963.82	997.3	1030.2	
V_os_sim_KO_c	3.93E+02	3.85E+02	3.83E+02	382.73	3.82E+02	3.82E+02	382.16	382.09	382.05	382.03	382.02	
V_os_sim_KO_m	3.93E+02	3.85E+02	3.08E+02	1.28E+02	1.13E+02	1.16E+02	117.93	116.91	105.22	108.69	112.25	
V_os_sim_WT_c	39.273	37.88	37.888	37.894	37.901	37.909	37.915	37.921	37.926	37.931	37.935	
V_os_sim_WT_m	3.93E+01	3.79E+01	3.01E+01	11.316	9.69E+00	9.86E+00	8.9569	9.2971	9.6382	9.973	10.302	
V_pc_sim_KO_c	5.11E+00	1.60E+01	1.75E+01	18.113	1.84E+01	1.86E+01	18.717	18.801	18.861	18.906	18.94	
V_pc_sim_KO_m	5.11E+00	1.60E+01	1.20E+01	9.16E-01	1.06E+00	7.69E-01	0.17415	0.12476	0.14746	0.15728	0.1677	
V_pc_sim_WT_c	5.1099	10.138	11.256	11.752	12.024	12.194	12.308	12.39	12.45	12.497	12.533	
V_pc_sim_WT_m	5.11E+00	1.01E+01	5.86E+00	0.54686	1.01E-01	9.77E-02	0.11617	0.12504	0.13433	0.14382	0.15351	
V_pdh_sim_KO_c	7.43E+02	6.73E+02	6.73E+02	673.43	6.74E+02	6.74E+02	673.96	674.09	674.19	674.29	674.37	
V_pdh_sim_KO_m	7.43E+02	6.73E+02	6.73E+02	6.41E+02	2.46E+02	2.58E+02	202.05	148.28	188.65	195.01	201.47	
V_pdh_sim_WT_c	742.58	671.78	672.22	672.49	672.69	672.86	673.01	673.12	673.23	673.33	673.41	
V_pdh_sim_WT_m	7.43E+02	6.72E+02	6.70E+02	508.03	1.33E+02	1.26E+02	160.85	167.03	173.21	179.3	185.29	
V_pfk_sim_KO_c	5.14E+02	6.11E+02	6.19E+02	622.4	6.24E+02	6.24E+02	624.73	624.91	625	625.04	625.07	
V_pfk_sim_KO_m	5.14E+02	6.11E+02	6.09E+02	4.10E+02	3.45E+02	3.54E+02	362.26	362.94	334.81	343.53	352.73	
V_pfk_sim_WT_c	514.26	519.32	519.11	519.11	519.13	519.14	519.15	519.16	519.17	519.18	519.19	
V_pfk_sim_WT_m	5.14E+02	5.19E+02	5.13E+02	361.47	3.13E+02	3.19E+02	296.21	305.53	314.77	323.56	331.89	
V_pgk_sim_KO_c	2.90E+02	1.39E+03	1.42E+03	1431.2	1.44E+03	1.44E+03	1439.8	1440.5	1440.8	1441	1441.1	
V_pgk_sim_KO_m	2.90E+02	1.39E+03	1.03E+03	1.62E+02	1.11E+02	1.17E+02	125.41	137.94	173.61	180.75	187.7	
V_pgk_sim_WT_c	290.32	1057.7	1057.2	1057.2	1057.2	1057.2	1057.3	1057.3	1057.3	1057.3	1057.3	
V_pgk_sim_WT_m	2.90E+02	1.06E+03	8.45E+02	147.24	1.08E+02	1.15E+02	146.02	152.78	159.41	165.95	172.42	
V_pk_sim_KO_c	8.13E+02	1.39E+03	1.42E+03	1431.2	1.44E+03	1.44E+03	1439.8	1440.5	1440.8	1441	1441.1	

	Time	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
V_pk_sim_KO_m	8.13E+02	1.39E+03	1.03E+03	1.62E+02	1.11E+02	1.17E+02	125.45	137.96	173.63	180.77	187.72	
V_pk_sim_WT_c	813.25	1057.7	1057.2	1057.2	1057.2	1057.2	1057.3	1057.3	1057.3	1057.3	1057.3	
V_pk_sim_WT_m	8.13E+02	1.06E+03	8.36E+02	146.75	1.08E+02	1.15E+02	146.03	152.8	159.42	165.96	172.43	
V_ppp_sim_KO_c	1.98E+01	1.71E+02	1.83E+02	187.01	1.89E+02	1.90E+02	190.45	190.71	190.85	190.92	190.96	
V_ppp_sim_KO_m	1.98E+01	1.71E+02	1.81E+02	8.68E+01	5.57E+01	5.76E+01	59.033	58.274	52.624	54.048	55.825	
V_ppp_sim_WT_c	19.797	18.955	18.944	18.946	18.95	18.954	18.957	18.96	18.963	18.965	18.967	
V_ppp_sim_WT_m	1.98E+01	1.90E+01	1.72E+01	5.9372	4.85E+00	4.92E+00	4.4657	4.6303	4.8011	4.9688	5.1336	
V_sdh_sim_KO_c	9.33E+02	6.73E+02	6.73E+02	673.47	6.74E+02	6.74E+02	673.99	674.12	674.23	674.33	674.41	
V_sdh_sim_KO_m	9.33E+02	6.73E+02	6.71E+02	3.70E+02	2.46E+02	2.58E+02	275.67	299.98	188.51	194.7	201.14	
V_sdh_sim_WT_c	932.93	672.01	672.33	672.53	672.72	672.89	673.03	673.15	673.26	673.36	673.45	
V_sdh_sim_WT_m	9.33E+02	6.72E+02	6.69E+02	336.38	2.39E+02	2.49E+02	160.61	166.73	172.92	179	184.99	
V_sim_KO_c	4.00E-02	3.97E-02	3.94E-02	0.039072	3.88E-02	3.84E-02	0.038112	0.037792	0.037472	0.037152	0.036832	
V_sim_KO_m	4.00E-02	3.97E-02	3.94E-02	3.91E-02	3.88E-02	3.84E-02	0.038112	0.037792	0.037472	0.037152	0.036832	
V_sim_WT_c	0.04	0.039712	0.039392	0.039072	0.038752	0.038432	0.038112	0.037792	0.037472	0.037152	0.036832	
V_sim_WT_m	4.00E-02	3.97E-02	3.94E-02	0.039072	3.88E-02	3.84E-02	0.038112	0.037792	0.037472	0.037152	0.036832	
V_stress_sim_KO_c	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	
V_stress_sim_KO_m	0.00E+00	0.00E+00	3.69E+02	7.65E+00	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	
V_stress_sim_WT_c	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
V_stress_sim_WT_m	0.00E+00	0.00E+00	4.01E+02	7.0691	0.00E+00	0.00E+00	0	0	0	0	0	