

*Les documents sont autorisés ;
ordinateurs, téléphones portables et autres moyens de communication sont interdits.*

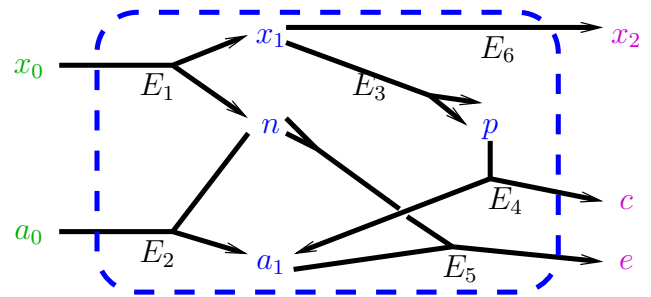
Cet énoncé contient 2 parties.

Rédigez sur **feuilles séparées chacune des parties.**

1 Modélisation avec FBA et HSIM

En 2013, les auteurs de [1] ont proposé une nouvelle technique de fermentation afin d'extraire du bio-fuel (éthanol) à partir de biomasse cellulosique. Un prétraitement extrait de cette biomasse du *xylose* et de l'*acide acétique* ; il s'agit alors de contourner l'habituelle inefficacité de la fermentation du xylose et la toxicité de l'acide acétique. Pour ce faire, ils choisissent une *levure* à laquelle ils ajoutent les gènes d'une catalyse capable de convertir le xylose en xylulose, le xylulose étant ensuite partiellement métabolisé par les classiques voies des pentoses phosphates et la glycolyse. L'avantage de la levure est alors qu'elle possède déjà une voie de réduction de l'acide acétique, qui de plus consomme l'excès de NADH produit par la conversion de xylose en xylulose.

Le schéma ci-contre représente le réseau métabolique obtenu, dans lequel on ne prend en compte que les flux supplémentaires, ajoutés aux métabolisme sauvage de la levure. E_1 représente la catalyse qui transforme une molécule de xylose (x_0) en une molécule de xylulose (x_1) tout en produisant une molécule de NADH (n) ; E_2 représente la transformation d'une molécule d'acide acétique (a_0) en une molécule d'acétaldéhyde (a_1) avec consommation d'une molécule de NADH ; E_3 est un gros raccourci pour représenter la voie des pentoses phosphates suivie de la glycolyse et consomme une molécule de xylulose pour produire deux molécules de pyruvate (p) ; E_4 représente l'action de la pyruvate décarboxylase qui transforme chaque molécule de pyruvate en une molécule d'acétaldéhyde avec excretion de CO_2 (c) ; E_5 représente l'action de l'enzyme ADH qui transforme une molécule d'acétaldéhyde en une molécule d'éthanol (e) excretée et consomme deux molécules de NADH. Par ailleurs, le métabolisme ainsi construit ne consomme malheureusement pas toutes les molécules de xylulose produites et la levure excrete le surplus avec E_6 (et x_2 représente x_1 excreté).



La première préoccupation est d'éviter que ce métabolisme supplémentaire ne provoque une accumulation de métabolites internes, et par conséquent d'assurer les contraintes d'état d'équilibre.

Exercice 1 : Écrivez les 6 réactions décrites ci-dessus avec leur stœchiométrie, puis construisez la matrice de stœchiométrie correspondante en respectant l'ordre des E_i et pour les métabolites, l'ordre « vertical » du dessin : $x_0, a_0, x_1, n, a_1, p, x_2, c$ et e .

Exercice 2 : Écrivez les contraintes d'état d'équilibre sur les vitesses v_1 à v_6 des E_i qui rendent constantes les quantités de métabolites internes. En déduire les valeurs de v_3 à v_6 en fonction des vitesses d'entrée v_1 et v_2 .
INDICATION : vous pouvez commencer par v_5 , puis v_4, v_3 et enfin v_6 .

Exercice 3 : Dans l'hypothèse où l'on ne souhaite produire aucun CO_2 additionnel, quelle est le rapport de vitesses entre les consommations de xylose et d'acide acétique ? Dans cette hypothèse, quelle est l'utilité de la voie des pentoses phosphates et de la glycolyse pour produire le surplus d'éthanol ? et quelle est alors l'utilité du xylose ?

Les exercices précédents montrent que pour exploiter raisonnablement le xylulose, il faut malheureusement excréter du CO_2 additionnel. On va donc maintenant s'autoriser une légère production additionnelle de CO_2 . Par ailleurs, l'acide acétique étant toxique, sa conversion en acétaldéhyde doit être assez active. Les vitesses contraignantes seront donc *a priori* v_2 et v_4 (pour des raisons opposées).

Exercice 4 : Au bilan, on va considérer que les plages de vitesses possibles (dans une unité arbitraire) sont les suivantes : $0 \leq v_1 \leq 22$, $4 \leq v_2 \leq 22$, $0 \leq v_3 \leq 22$, $0 \leq v_4 \leq 2$, $0 \leq v_5 \leq 22$ et $0 \leq v_6 \leq 22$.
Quel choix de vitesses maximise la production d'éthanol ?

1. Wei, N., Quarterman, J., Kim, S. et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. Nat Commun 4, 2580 (2013).

Faute de temps on ne modélisera pas entièrement ce réseau métabolique en HSIM et l'on se focalise sur E_1 et E_5 , sans gérer les déclarations initiales, ni les vitesses de diffusion, ni les initialisations, *etc.* On suppose donc entre autres déjà déclarées les « molécules » $E_1, E_5, x_0, x_1, n, a_1$ et e , ainsi que leurs vitesses de diffusion.

Pour les deux exercices suivants, on ne modélisera pas les probabilités d'application des règles, ni les règles inverses de détachement des substrats une fois liés à leur enzyme.

Exercice 5 : Écrivez en HSIM les règles qui modélisent les actions de E_1 . Écrivez ensuite les déclarations `maxlinks` associées (en ignorant les autres réactions du réseau métabolique).

Exercice 6 : Écrivez de même les règles pour modéliser les actions de E_5 et complétez en conséquence les déclarations `maxlinks`. On considérera que E_5 est nécessaire au substrat a_1 pour toutes captures de n lui permettant de se transformer en son produit e .

2 Modélisation par réseau de Petri

Dans cette partie, on se place dans l'hypothèse où l'on ne souhaite produire aucun CO_2 additionnel. Dans ce cas là l'étude précédente nous montre que l'on peut considérer que les réactions E_4 et E_3 sont inutiles dans le modèle. On les supprimera donc du réseau métabolique.

Exercice 7 : Tracez le réseau de Petri représentant les connaissances précédentes, prenant en compte les 4 réactions E_1, E_2, E_5 et E_6 . On ne représentera pas de manière explicite les enzymes et les noms des transitions seront les noms des enzymes.

Exercice 8 : Construisez la matrice d'incidence en respectant l'ordre $x_0, a_0, x_1, n, a_1, x_2, e$ ainsi que E_1, E_2, E_5 et E_6 .

Exercice 9 : Calculez les invariants de places. Montrez qu'il n'y en a pas d'autres en construisant une matrice obtenue par combinaison linéaire des lignes de la matrice d'incidence (à coefficients positifs) dont les trois dernières lignes sont nulles et dont les premières colonnes de la partie supérieure (sans ces 3 lignes nulles) constitue une sous-matrice triangulaire supérieure.

Comment peut-on interpréter ces invariants de places ?

Exercice 10 : On s'intéresse maintenant aux propriétés dynamiques de ce réseau de Petri.

1. Exprimez en CTL la propriété suivante : *lorsque dans l'état initial il n'y a pas d'éthanol ni d'acétaldéhyde, qu'il y a k molécules d'acide acétique, et qu'il y a l molécules de xylose avec $l \geq k$, alors on est certain que le système va arriver à un état où il y aura k molécules d'éthanol, nombre qui restera alors constant.*
2. Cette propriété est-elle satisfaite par le système ? Justifiez votre réponse.
Si la formule n'est pas satisfaite, proposez une modification pour qu'elle devienne vraie.

Exercice 11 : On complexifie le système en imaginant qu'il y a un robot qui chaque fois qu'il y a de l'éthanol (e) et du xylulose (x_2) à l'extérieur des cellules, enlève trois molécules de xylulose et une molécule d'éthanol et rajoute à l'environnement trois molécules de xylose (x_0) et une molécule d'acide acétique (a_0).

1. Dessinez le nouveau réseau de Petri.
2. Calculer les invariants de transitions. Interprétez.

Exercice 12 : On s'intéresse maintenant aux propriétés dynamiques de ce deuxième réseau de Petri (qui contient la transition due au robot).

Exprimez en CTL la propriété suivante : *lorsque dans l'état initial il n'y a pas d'éthanol ni d'acétaldéhyde, qu'il y a au moins une molécule d'acide acétique, et qu'il y a au moins 3 molécules de xylose, alors à partir de tout état atteignable, il existera toujours un chemin menant à un état où la transition E_5 est franchissable.* On dit alors que la transition E_5 est vivante.