

# **Étude de mécanismes biochimiques pouvant implémenter des portes logiques**

Master 2 AMI2B – Bioinformatique et Biostatistiques

Université Paris Saclay

Martin DAVY

Année 2018/2019

Unité mixte de Recherche Sys2Diag

Encadrant : Patrick AMAR

Co-encadrant : Franck MOLINA



## **Remerciement**

---

## Table des matières

---

1.	Présentation du lieu de stage .....	6
2.	Introduction .....	7
3.	Matériels et Méthodes .....	10
3.1	Environnement de développement .....	10
3.2	Base de données des réactions .....	10
3.3	L'extraction des réactions .....	11
3.3.1	Méthode 1 : Le service Web .....	11
3.3.2	Méthode 2 : Utilisation de la version texte .....	12
3.4	Silicell Maker .....	12
3.4.1	NetDraw .....	12
3.4.2	NetGate .....	13
3.4.3	NetBuild .....	13
3.4.4	HSIM .....	14
3.5	Les Bibliothèques C++ .....	15
4.	Résultats .....	16
4.1	Extraction des réactions de BRENDA .....	16
4.1.1	Format des données extraites .....	16
4.1.2	Méthode 1 - SOAP .....	16
4.1.3	Méthode 2 – TEXTE .....	17
4.1.4	Comparaison du contenu des tables .....	17
4.2	Conception de BrendaXplorer .....	18
4.2.1	Sélection des réactions .....	18
4.2.2	Connexion des entrées et sorties .....	19
4.3	Evaluation de BrendaXplorer .....	20
4.3.1	Taux de réussite de connexion .....	20
4.3.2	Temps de calcul .....	20
4.4	Interface Graphique .....	22
5.	Discussions .....	24
6.	Bibliographie .....	25
7.	Annexes .....	26

## Table des figures

---

Figure 1: Organigramme de l'unité mixte de recherche Sys2Diag .....	6
Figure 2: Schéma du fonctionnement de Silicell Maker .....	8
Figure 3: Exemple de réseau métabolique édité avec Silicell Maker .....	12
Figure 4: Implémentation d'une expression logique avec NetBuild .....	13
Figure 5: Implémentation de l'expression logique avec les constantes catalytiques .....	14
Figure 6 : Simulation avec HSIM de l'exemple d'implémentation .....	15
Figure 7: Capture d'écran de BRENDA montrant un exemple d'erreur d'annotation manuelle .....	17
Figure 8 : Schéma de la recherche de réactions .....	19
Figure 9 : Illustration des comparaisons à faire pour chaque profondeur .....	19
Figure 10: Diagrammes quantile-quantile pour chaque profondeur .....	21
Figure 11 : Distribution du temps en fonction de la profondeur des réseaux .....	22
Figure 12 : Différents éléments décrivant l'interface graphique de BrendaXplorer .....	22

# 1. Présentation du lieu de stage

J'ai eu l'opportunité de réaliser mon stage dans l'unité mixte de recherche Sys2Diag du CNRS (Centre National de la Recherche Scientifique). Cette unité de recherche a été cofondée avec la société ALCEDIAG, une filiale de l'entreprise ALCEN.

ALCEN est une entreprise qui se développe autour de cinq grands axes :

- Défense & Sécurité
- Energie
- Médical & Santé
- Aéronautique & Spatial
- Grands Instruments Scientifiques

ALCEDIAG s'inscrit dans le domaine du médical et de la santé avec le développement de nouvelles méthodes de diagnostics de maladies principalement psychiatrique. Ses méthodes de diagnostics médicaux se basent sur la détection de biomarqueurs de maladies. Sys2Diag partage les mêmes objectifs et évolue en parallèle de ALCEDIAG.

Créée en 2015, elle est basée dans l'hôtel d'entreprise d'euromédecine à Montpellier, au 1682 rue de la Valsière. Aujourd'hui, Sys2Diag emploie plus de 20 personnes et recrute de nombreux stagiaires. L'unité mixte est dirigée par Franck Molina et Dinah Weissmann. L'ensemble des équipes est décrit dans la Figure 1.

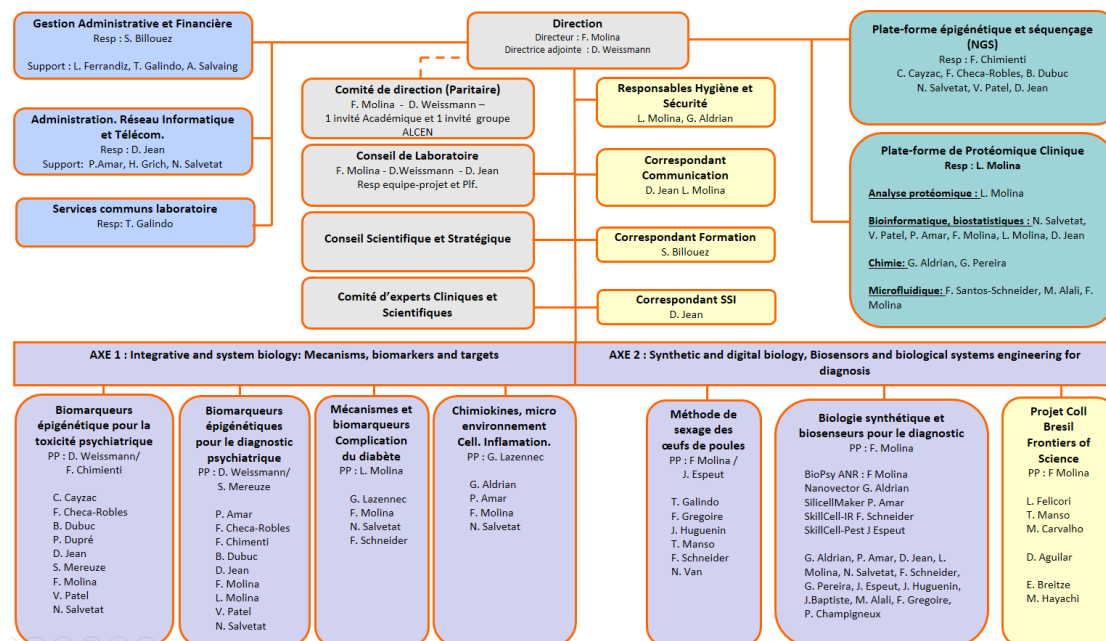


Figure 1: Organigramme de l'unité mixte de recherche Sys2Diag  
Source : Sys2Diag

L'unité de recherche Sys2Diag a l'avantage d'être multidisciplinaire, sur la Figure 1 l'ensemble des activités est décrite. Deux grands axes de recherche sont mis en avant. Le premier est basé sur la biologie intégrative et l'étude de biomarqueurs et mécanismes biologiques impliqués dans des maladies psychiatriques, les complications du diabète et les inflammations cellulaires. Le second s'appuie sur la biologie synthétique pour le développement de biosenseur, pour le sexage des œufs ainsi que de nouvelles méthodes de diagnostics médicaux.

Mon stage s'inscrit dans l'axe 2 : l'utilisation de biosenseur pour le développement de nouvelles méthodes de diagnostic.

## 2. Introduction

---

L'avancé des diagnostics médicaux est un véritable enjeu dans notre monde, et ce depuis plusieurs siècles. En effet les premières traces de diagnostic ont été retrouvées en 300 avant JC, Hippocrate préconisait l'analyse de l'urine pour diagnostiquer des maladies. Durant les siècles qui suivirent jusqu'à la fin 17ème siècle, l'uroscopie était une méthode très populaire pour faire de nombreux diagnostics.

L'uroscopie avait donc une part très importante dans la médecine, mais après la publication du livre « Pisse Prophet », au 17ème siècle, de Thomas Brian cette science et ceux qui la pratiquaient furent tourné au ridicule. Dans le même siècle la température et le rythme cardiaque commencèrent à être utilisé pour analyser l'état de santé des patients.

Les diagnostics médicaux ont pu être amélioré grâce à des inventions tel que le stéthoscope, toujours utilisé aujourd'hui.

C'est à la deuxième moitié du 18ème siècle que voit le jour de nombreux tests pour diagnostiquer des maladies comme la tuberculose, le cholera ou encore la diphtérie sans que des traitements soient développés. A la fin de cette même période et même au début du 19ème siècle les diagnostics devinrent de plus en plus rigoureux et précis.

De plus une volonté de définir la normalité du fonctionnement du corps Humain s'installe au début du 19ème siècle. Cette « normalité » a pour but de faciliter l'identification de symptômes sortant de celle-ci et signalant donc la potentielle présence d'une maladie [].

A ces bonnes pratiques s'ajoutent des avancées techniques qui permettent de réaliser des tests de plus en plus précis notamment dans l'analyse de l'urine et du sang. C'est au 20ème siècle que va être développé un grand nombre de méthodes pour diagnostiquer et traiter de nombreuses maladies et ce grâce à un arsenal d'outils comme par exemple les scanners et la radiographie [].

L'inconvénient de ces méthodes est qu'elles nécessitent de plus en plus de connaissances pour interpréter les données produites et surtout un équipement lourd en termes de quantité et surtout de prix. Néanmoins ces diagnostics ont un impact conséquent sur les décisions qui concernent la santé []. C'est pour cette raison qu'aujourd'hui de nouvelles méthodes de diagnostics moins coûteuses voient le jour. Certaines se font en utilisant un simple smartphone auquel est ajouté ou non des extensions pour prendre les mesures []. D'autres méthodes destinées aux pays en voie de développement, comme celles basées sur la micro-fluidique, ont pour but, avec leur coût réduit, d'améliorer drastiquement les soins de santé [].

En plus de s'inscrire dans le contexte du diagnostic médical, mon stage se positionne aussi dans le domaine de la biologie synthétique. La découverte d'implémentation de portes logiques dans la régulation de gènes [] ouvre la voie à cette science qui aujourd'hui est en plein développement []. La biologie synthétique se définit par le fait de modifier des organismes ou de concevoir des systèmes synthétiques pour répondre à des tâches précises.

La biologie synthétique nous promet de révolutionner le monde actuel avec de multiples applications dans de vastes domaines. Allant de la production de carburant vert [] à la production moins onéreuse de médicaments [] en passant par de nouvelles méthodes de diagnostics médicaux [], cette science permettra sans doute de faire de grandes avancées.

Grace à la biologie synthétique le développement de biosenseur est facilité. Un biosenseur est un outil d'analyse et de mesure de composé biologique (molécule, ADN, ARN par exemple) dans un milieu donné. Par définition il se compose d'un senseur, élément pouvant interagir d'une manière ou d'une autre avec le composé cible, il peut s'agir d'une enzyme, d'une bactérie

ou encore d'anticorps monoclonaux par exemple. Le second composant est un transducteur, qui permet de convertir le signal induit par le senseur en information mesurable. Il en existe plusieurs types : électriques, optique, calorimétrique et piézoélectrique en sont les principaux

Les composés cibles à analyser sont appelés des biomarqueurs. Par définition un biomarqueur est un état biologique caractéristique d'une activité normale ou pathologique du patient. Cet état peut correspondre à des concentrations, comme la glycémie, ou à la présence/absence de composé. Pour la suite du rapport nous considérerons un biomarqueur comme étant une espèce biochimique utilisée dans le diagnostic de maladie.

Pour le développer de nouvelles méthodes de diagnostics médicaux à l'aide de biosenseurs il faut partir d'une maladie dont un certain nombre de biomarqueurs ont déjà été identifiés. Puis une fonction logique est établie, définissant l'état du patient (sain ou malade) en fonction de la présence/absence des biomarqueurs. Ensuite avec le logiciel Silicell Maker des implémentations de la fonction logique sont construites, *in silico*, avec des réactions enzymatiques issues d'un réseau métabolique de référence. Ces implémentations sont ensuite assemblées dans des vésicules à l'aide de la microfluidique [Alexis Courbet]. Enfin ces vésicules sont testées dans les conditions voulues, par exemple dans l'urine pour tester la concentration d'un biomarqueur. De manière générale les réactions enzymatiques réalisées dans les vésicules vont produire un composé, un révélateur, qui va colorer le milieu, dans le cas où la concentration du/des biomarqueurs dépasse le seuil établi, afin d'établir le diagnostic. Ce type de biosenseur peut également être considéré comme un microréacteur cellulaire car un réseau enzymatique synthétique est intégré dans une vésicule.

Silicell Maker est un logiciel développé depuis 2015. Sys2Diag a pour but de faire de ce logiciel un outil indispensable pour la conception de microréacteur cellulaire. Les travaux de Marc BOUFFARD durant sa thèse [1] au LRI (Laboratoire de Recherche en Informatique) et à Sys2Diag ont abouti à la création de deux plugins pour Silicell Maker : NetGate et NetBuild. Ils permettent d'extraire des portes logiques du réseau enzymatique de référence et ensuite de les assembler pour construire les implémentations de la fonction logique. Son fonctionnement est détaillé sur la Figure 2.

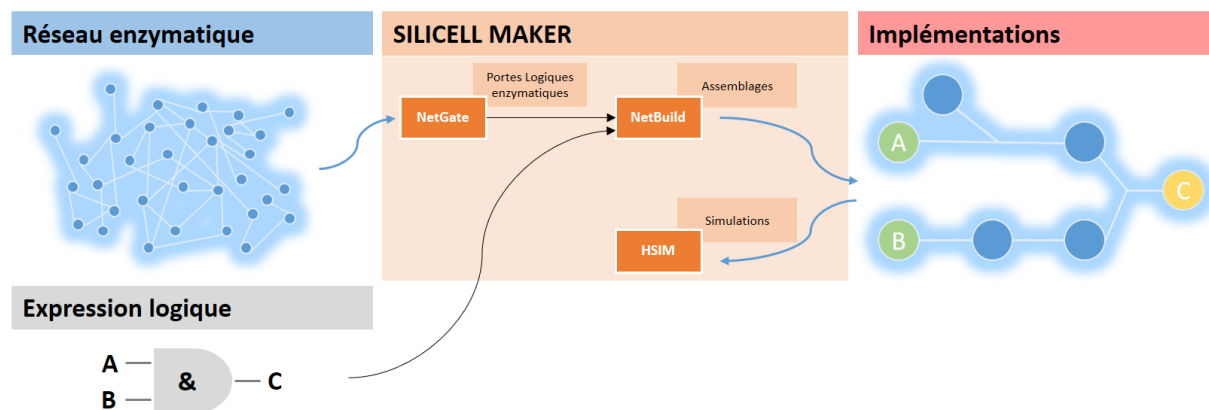


Figure 2: Schéma du fonctionnement de Silicell Maker

SiliCell Maker prend en entrée un réseau enzymatique et une expression logique. NetGate extrait les portes logiques enzymatiques du réseau et NetBuild les assemble pour construire des implémentations de l'expression logique. HSIM permet de simuler ces implémentations. Les éléments « A » et « B » sont des biomarqueurs et « C » est un révélateur.

Une des problématiques liées à Silicell Maker et que le réseau enzymatique de référence ne peut pas contenir l'ensemble de toutes les réactions connues pour des raisons évidentes de temps de calcul. De plus pour le moment le réseau utilisé ne contient pas plus de 35 réactions, ce qui limite grandement les applications possibles. Pour rendre Silicell Maker plus flexible aux contextes d'études dans lesquels il est amené à être utilisé il faudrait pouvoir construire des réseaux enzymatiques de référence spécifiques à ce même contexte.



Mon stage se positionne donc dans cette problématique de construction de réseaux enzymatique de référence. Pour l'élaboration de ces réseaux il faut extraire un grand nombre de réactions d'une base de données. L'intérêt d'utiliser une base de données est qu'il est possible d'extraire des paramètres liés à ces réactions comme les constantes de réactions ou le PH favorable par exemple. Cela peut grandement faciliter l'étape de simulation et surtout cela permettra de construire des réseaux les plus adaptés possible aux conditions souhaitées.

Durant mon stage j'ai dû répondre à deux problématiques :

« Comment extraire un grand nombre de réactions et leurs constantes et de quelle manière les stocker ? »

« A partir de ces réactions comment construire des réseaux enzymatiques de référence spécifiques d'un contexte d'étude ? »

Pour la première question, nous avons décidé de nous tourner vers la base de données BRENDA ([www.brenda-enzymes.org](http://www.brenda-enzymes.org)) qui offre un grand nombre de réactions annotées manuellement et associées à un nombre tout aussi grand de constantes. Cette base de données offre un accès total à son contenu même dans le cas d'un usage commercial. Le principe est donc d'extraire avec la méthode la plus optimale possible l'ensemble des informations désirées. Ensuite il faut stocker ces informations dans un format simple à comprendre pour un humain et simple à lire pour un programme.

Pour la seconde problématique, il faut prendre en compte le contexte de l'étude, c'est-à-dire quels sont les biomarqueurs cibles, quel doit être la molécule mesurable de sortie, un révélateur, et surtout dans quelles conditions doivent se dérouler les réactions. Il faut donc mettre au point un algorithme capable de sélectionner parmi les réactions extraites de BRENDA celles qui correspondent aux critères de recherche. L'autre point important est qu'il faut pouvoir extraire suffisamment de réactions pour pouvoir connecter les biomarqueurs aux révélateurs.

### 3. Matériels et Méthodes

---

#### 3.1 Environnement de développement

Lors de ce stage j'ai dû me former à la programmation en C++, durant la première semaine j'ai donc suivi le cours de C++ proposé par le site OpenClassRoom []. Cela était nécessaire pour que l'application que j'ai développée soit compatible et facilement intégrable à Silicell Maker, développé avec le même langage.

J'ai aussi travaillé avec le système d'exploitation Windows 10 par choix, pour me familiariser avec le terminale PowerShell et surtout dans le but d'avoir une expérience de développement dans cette environnement.

Pour la compilation de mes programmes en C++ j'ai utilisé g++.exe (i686-w64-mingw32-g++.exe) et make.exe (mingw32-make.exe) inclut dans l'environnement de développement MinGW version 8.1.0 [].

#### 3.2 Base de données des réactions

Nous avons choisi d'extraire les réactions de BRENDA[site]. Cette base de données fut créée en 1987 sous la forme d'une série de livre. Ce n'est qu'à partir de 1998 que le site web voit le jour. BRENDA était financée initialement par l'Allemagne par l'intermédiaire du BMBF (Ministère fédéral de l'Éducation et de la Recherche – Allemagne) et du MWK (Ministère de la Science et de la Culture de Basse-Saxe – Allemagne). Aujourd'hui ce projet est aussi financé par la commission Européenne et l'Union Européenne.

Elle vise à regrouper l'ensemble des connaissances liées aux protéines afin de faciliter la compréhension des informations génétiques mais aussi l'application des protéines dans des projets comme l'agriculture, le médical, la biologie des systèmes par exemple.

L'apport d'information se fait en grande partie grâce à la littérature. Les réactions *in vivo* y sont décrites mais aussi celle faites dans des conditions expérimentales. L'avantage est d'avoir un ensemble quasiment exhaustif des réactions enzymatiques connues actuellement. Plusieurs bases de données ont contribué à cet apport d'information : UniProt[web], MetaCyc[web], KEGG[web], PDB[web] et ChEBI[web]. Enfin un travail de « text mining » est fait pour extraire encore plus d'information de la littérature notamment sur la localisation des enzymes, les maladies liées et les cinétiques. Ces informations sont comprises dans 4 modules de BRENDA :

- KENDA : les cinétiques extraites à partir de plus de 2.2 millions de résumés de publications de PubMed.
- DRENDA : toujours issus de PubMed cette fois ces informations concerne les maladies liées aux enzymes.
- FRENDA : toutes les références PubMed contenant les combinaisons de nom d'enzymes et d'organismes.
- AMENDA : Sous ensemble de FRENDA, décrivant entre autres les informations sur la localisation subcellulaire des enzymes.

L'autre avantage de cette base de données est de regrouper le plus grand ensemble de réaction au sein d'une même base de données. BRENDA décrit à elle seule près de 60.000 réactions uniques avec plus de 45.000 qui lui sont exclusives [article BRENDA 2019]. Cela représente un ensemble très large comparé à d'autres bases de données tels que MetaCyc [web], KEGG [web] et SabioRK [web].

Les informations contenues dans BRENDA ne se limitent pas à la description de réactions. En effet cette base de données regroupe pour chaque enzyme des informations sur : les réactions qu'elle catalyse, ses inhibiteurs, ses constantes catalytiques ( $K_M$ , et  $K_{cat}$ ), celles de ses inhibiteurs ( $K_i$ ,  $IC_{50}$ ), son  $pH$  et sa température optimum entre autres.

Pour la classification des enzymes dans BRENDA la nomenclature proposée en 1961 par Dixon et Webb est utilisée [1]. Cette nomenclature est aujourd'hui maintenue par IUBMB (Union internationale de biochimie et de biologie moléculaire). Elle se compose de 4 chiffres séparés par un point : w.x.y.z, avec « w » définissant la classe et par extension le type de réaction, « x » et « y » les sous-classes et sous-sous-classes et « z » qui permet d'avoir le numéro de série complet de l'enzyme. Depuis août 2018 [2] cette nomenclature permet de trier les enzymes en 7 classes :

- |                    |   |
|--------------------|---|
| 1. Oxydoréductases | Réaction d'oxydoréduction                                     |
| 2. Transférases    | Transfère de groupement fonctionnel                           |
| 3. Hydrolases      | Hydrolyse de liaisons   |
| 4. Lyases          | Rupture des liaisons autrement que par hydrolyse et oxydation |
| 5. Isomérases      | Réactions d'isomérisations de molécules                       |
| 6. Ligases         | Création de liaison covalentes entre deux molécules           |
| 7. Translocases    | Déplacement d'ions et molécules à travers une membrane        |

Il faut cependant prendre en compte que toutes ces réactions sont annotées à la main et des erreurs sont inévitables.

Enfin BRENDA est une base de donnée toujours maintenue à jour. Des mises à jour de BRENDA sont faites tous les six mois environ, aux alentours de début janvier et de début juillet. Pour la comparaison des deux méthodes la version mise à jours le 20 décembre 2018 a été utilisées

### 3.3 L'extraction des réactions

L'extraction des réactions est une étape primordiale dans le déroulement du stage. De plus les informations nécessaires ne se limite pas aux substrats et produits pour chaque enzyme. Il faut en plus extraire le nom de l'enzyme, ses inhibiteurs, la réversibilité de chaque réaction et les constantes de réactions :

- $K_M$  qui définit l'affinité entre le substrat et l'enzyme
- $K_{cat}$  correspondant au nombre de molécule produites par seconde pour 1 mole de substrat
- $K_i$ , la constante d'inhibition définissant l'affinité entre l'inhibiteur et l'enzyme
- $IC_{50}$ , la quantité d'inhibiteur nécessaire pour inhiber de moitié la réaction
- L'intervalle de  $pH$  dans lequel l'enzyme reste fonctionnelle.

Deux méthodes ont pu être mises en places pour réaliser cette étape. La première consiste à utiliser un service web proposé par la base de données directement. La seconde étant de télécharger la base de données BRENDA directement au format texte.

Le résultat des deux méthodes est ensuite comparé à l'aide de R, version 3.5.1. L'objectif est de déterminer si le contenu de l'extraction diffère beaucoup en fonction de la méthode.

#### 3.3.1 Méthode 1 : Le service Web

Cette méthode se base donc sur l'utilisation du service web SOAP proposé par BRENDA. C'est une solution pour accéder à un contenu spécifique de la base de données. SOAP (« Simple Object Access Protocol ») est un protocole d'échange d'information utilisant du XML (langage informatique de balisage) qui a pour but de permettre à un utilisateur d'envoyer une requête à

la base de données et de recevoir une réponse contenant les informations désirées. L'un des principaux avantages est qu'il ne dépend pas du langage et le défaut à prendre en compte est que l'échange d'information peut vite s'avérer très lourd du fait de la base XML des informations.

### 3.3.2 Méthode 2 : Utilisation de la version texte

La seconde façon de faire est de simplement utiliser la version texte téléchargeable sur BRENDA. Elle ne représente que 50Mo compressée et 220Mo une fois décompressée. Dans ce fichier les enzymes sont décrites les unes après les autres, ce format est semblable à celui utilisé par Uniprot.

Le contenu de chaque ligne est décrit par un marqueur de deux à trois lettres au début. Le contenu et le marqueur sont séparé par une tabulation, si le marqueur d'une ligne est vide alors cela signifie que la ligne est la suite de la précédente.

Parmi les 45 marqueurs, seuls ceux décrivant les informations d'intérêt, cités ci-dessus, ont été pris en compte. Par exemple pour l'extraction des substrats et des produits il faut prendre en compte deux marqueurs ; SP et NSP signifiant respectivement « Substrats and Products » et « Natural Substrats and Product ».

## 3.4 Silicell Maker

Silicell Maker est un logiciel multiplateforme développé en C++, utilisant la bibliothèque FLTK version 1.3.2 pour l'interface graphique. Ce logiciel est destiné à la conception théorique de cellule synthétique. Silicell Maker se compose de plusieurs programmes servant à la conception de ces cellules. De plus il se constitue d'un ensemble d'outils.

### 3.4.1 NetDraw

Grâce à ce programme il est possible d'afficher et d'éditer des réseaux métaboliques au format SBML de niveau 2 ou au format Metatool. En plus de pouvoir représenter les réactions avec les enzymes, substrats et les produits il est possible de dessiner des membranes séparant deux milieux. Un grand nombre de type interaction peut être décrit, par exemple une molécule peut être substrat, produit, activateur ou inhibiteur d'une réaction.

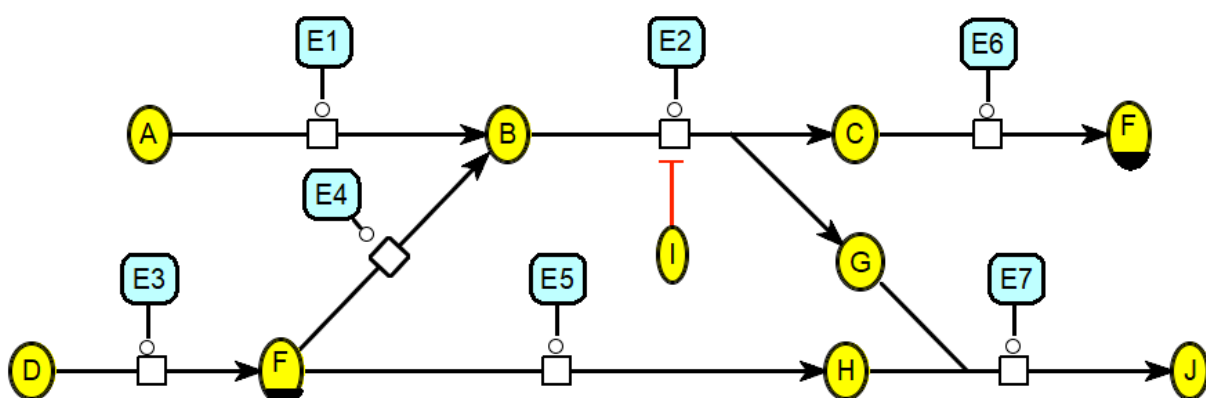


Figure 3: Exemple de réseau métabolique édité avec Silicell Maker

Les carrés avec la flèche représentent les réactions et les carrés et les carrés arrondie liés au réaction correspondent aux enzymes catalysant ces réactions. Les ovales jaunes sont des métabolites qui placés en amont d'une réaction sont des substrats, ceux en aval (après la flèche) ce sont les produits et ceux liés directement aux réactions par un trait d'inhibition (en « T ») sont des inhibiteurs)

La Figure 3 nous montre un exemple de réseaux métabolique édité avec Silicell Maker. Sur cette exemple 4 types d'interactions sont représentés :

- Les enzymes catalysent des réactions
- Consommation des substrats
- Production des produits
- Inhibitions de réactions par une molécule (la molécule « I » dans cette exemple)

La molécule « F » est soulignée car elle s'affiche à deux endroits dans ce réseau, cela permet de ne pas afficher une liaison qui chevaucherait plusieurs traits. Ainsi l'affichage est plus aéré et cela facilite la compréhension.

### 3.4.2 NetGate

C'est l'un des plugins de Silicell Maker développé par Marc BOUFFARD durant sa thèse []. Ce programme permet d'extraire à partir d'un réseau métabolique un ensemble de porte logique à une ou deux entrées (cf annexes 1 et 2).

A titre d'exemple : Netgate a pu extraire du réseau présenté sur la Figure 3, 67 portes logiques enzymatiques avec 28 portes YES, 5 portes NOT, 8 portes AND, 9 portes OR, 1 porte ORNOT et 16 portes ANDNOT.

### 3.4.3 NetBuild

C'est le second plugin développé par Marc BOUFFARD, NetBuild, permettant d'assembler les portes logiques enzymatiques extraites par Netgate pour construire un réseau répondant à une expression logique.

Par exemple avec les 67 portes logiques extraites avec NetGate et l'expression logique  $J = A \cdot D$ , NetBuild doit construire un réseau nécessitant la présence de « A » ET « D » pour produire « J ». L'implémentation ainsi assemblée est présentée sur la Figure 4.

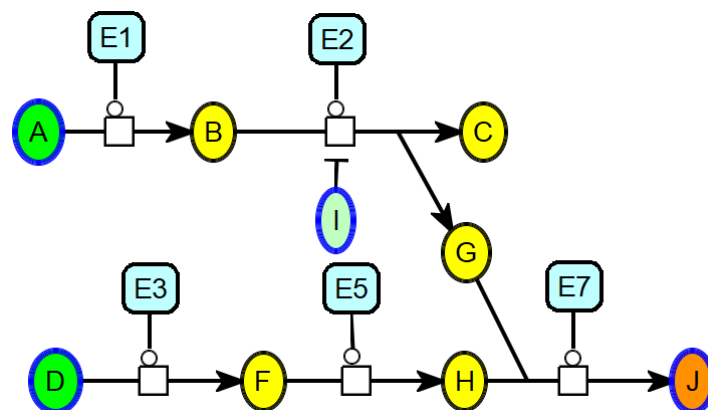


Figure 4: Implémentation d'une expression logique avec NetBuild

En plus du code de couleurs et de formes de la Figure 3, il faut rajouter les ovales verts correspondant aux éléments d'entrées, ainsi que les oranges désignant les éléments de sorties. Les éléments d'entrées et de sorties seront aussi appelés respectivement biomarqueurs et révélateurs dans ce rapport.

NetBuild doit respecter 2 contraintes pour que les implémentations fonctionnent. La contrainte de connexion impose que le produit d'une porte soit le substrat de la porte suivante pour que l'information puisse être transportée. La seconde contrainte agit sur l'unicité, elle interdit au produit d'une porte à être le substrat d'une autre porte que celle qui suit afin d'éviter un phénomène semblable à celui d'un court-circuit en électronique. Lors de l'assemblage des réseaux métaboliques il est donc nécessaire de suivre ces règles afin de détecter au mieux les biomarqueurs.

### 3.4.4 HSIM

HSIM signifiant « Hyperstructure SIMulator » est un logiciel de simulation hybride entre la simulation stochastique et l'entité-centrée. Pour faire les simulations il faut définir des règles d'association et de dissociation entre métabolite et enzyme et de transformation des métabolites par les enzymes.

La méthode de simulation stochastique se base sur l'algorithme de Gillespie, en définissant des probabilités de rencontre des enzymes. La méthode entité-centrée quant à elle va faire entrer en jeu l'aspect spatial, en simulant le mouvement des molécules dans le milieu en fonction de la vitesse de diffusion et la viscosité du milieu par exemple.

La force de HSIM et de pouvoir gérer les molécules de différentes façons pour un même modèle. Par exemple les éléments présents en très grand nombre seront simulés de manière global, sans aspect spatial, tandis que ceux plus concentrés seront simulés avec la méthode entité-centrée car elle nécessite plus de ressources de calcul.

Au moment de l'assemblage des portes, Silicell Maker attribut des valeurs pour les Kcat et Km afin de faire des simulations facilement. Ces valeurs n'ont pas de valeur biologique mais ont pour intérêt de tester comment va évoluer le système en fonction des conditions initiales.

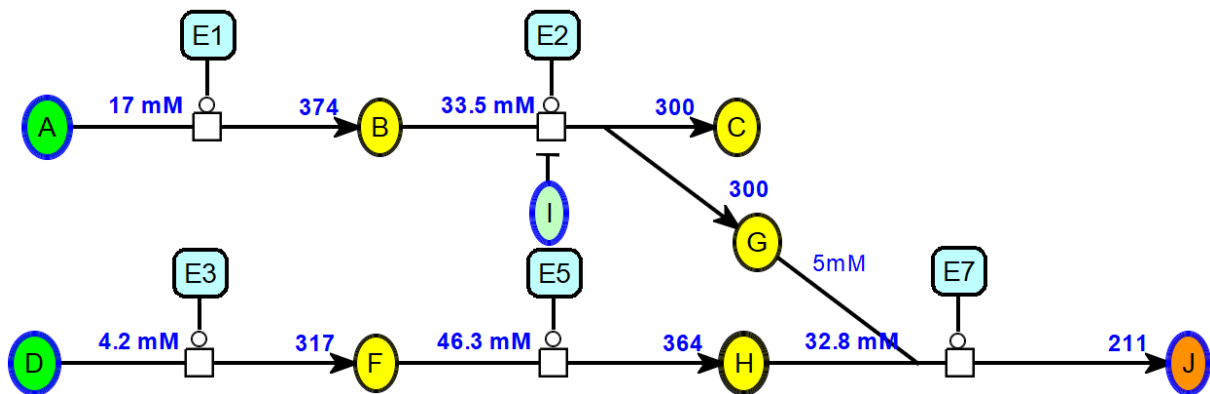


Figure 5: Implémentation de l'expression logique avec les constantes catalytiques

Les concentrations initiales ne s'affiche pas mais chaque enzyme à 50 copies dans le milieu, « A » à une concentration de 0.5mM et celle de « D » est soit de 0mM soit de 0.5mM en fonction des conditions.

La Figure 5 présente la même implémentation mais cette fois avec les constantes affichées. Les concentrations initiales sont données par l'utilisateur.

Il est ensuite possible de tester ce réseau directement dans Silicell Maker. La Figure 6 présente l'évolution du réseau au cours du temps dans deux conditions. Sur la Figure 6.A, il n'y a pas de production de « J » car « D » n'est pas présent. Cependant sur la Figure 6.B « J » est bien produit car le milieu contient bien du « A » ET du « D ». Cette simulation est donc en accord avec l'expression donnée au départ :  $J = A \cdot D$ .

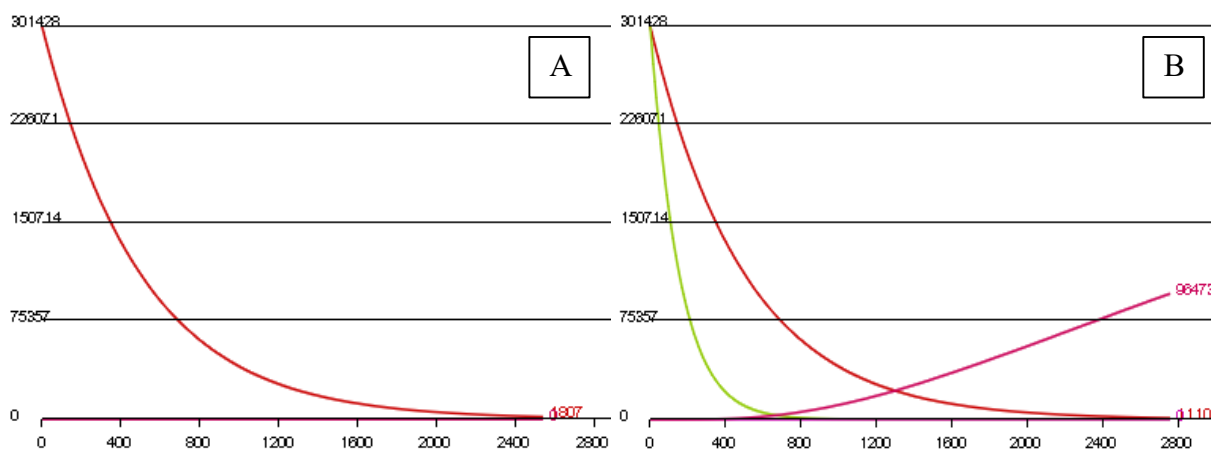


Figure 6 : Simulation avec HSIM de l'exemple d'implémentation

L'abscisse représente le temps de la simulation en seconde et l'ordonnée le nombre de molécule.

En rouge le nombre de molécule « A », En jaune le nombre de « D » et en rose le nombre de « J »

A : Cas ou « D » n'est pas présent

B : Cas ou « A » et « D » sont présent

### 3.5 Les Bibliothèques C++

Le développement de l'application a nécessité l'utilisation de deux bibliothèques, Zlib [] et FLTK [].

Zlib est une bibliothèque destinée à la compression et décompression de données. Ecrite par M. Jean-loup Gailly pour la partie compression et M. Mark Adler pour la décompression, elle permet la compression non destructive des données, grâce à l'algorithme « deflate ». Cet algorithme cherche les chaînes de caractères dupliquées et les remplace par un pointeur vers la première occurrence de ces mots. Les mots non dupliqués sont remplacés par une séquence d'octets.

La version de Zlib utilisée est la version 1.2.5 car elle est intégrée à FLTK, cependant la version 1.2.11 a été testé et est aussi compatible avec le programme.

La version 1.3.0 de FLTK est utilisée. La version 1.3.5 plus récente est déjà mise en ligne cependant, Silicell Maker est développé avec la version 1.3.0 et n'est pas compatible avec la dernière version. Le développement du programme doit donc se faire avec cette version pour faciliter la compatibilité avec Silicell Maker.

FLTK, « The Fast Light Tool Kit » est une bibliothèque destinée au développement d'interface graphique multiplateforme pour LINUX, MacOS et Windows. Développer initialement par M. Bill Spitzak cette bibliothèque est aujourd'hui mise à jour par un petit groupe de développeurs.



## 4. Résultats

### 4.1 Extraction des réactions de BRENDA

#### 4.1.1 Format des données extraites

Indépendamment de la méthode d'extraction il a été décidé de stocker l'information extraite dans deux fichiers CSV (Comma-Separated Values) compressés au format gzip. La structure des fichiers est présentée dans le Tableau 1 et le Tableau 2. Le stockage dans deux fichiers est nécessaire car pour une même enzyme il existe plusieurs réactions catalysées et plusieurs inhibiteurs.

Tableau 1 : Représentation de la structure du fichier stockant les réactions extraites

EC	Nom	Organisme	Substrats	Produits	Reversibilité	KM	KCAT	PH
1.1.1.1	alcohol dehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	ethanol-+-NAD <sup>+</sup>	acetaldehyde-+-NADH	r	0.049;0.013	0.7;0.717	8-10.5

Tableau 2 : Représentation de la structure du fichier stockant les inhibiteurs extraits

EC	Organisme	Inhibiteur	Ki	IC50
7.6.2.2	<i>Homo sapiens</i>	ADP	0.53	?

Les substrats pour une enzyme sont séparés par « +- » car un « + » simple porterait à confusion avec les éléments chargés comme « H<sup>+</sup> ». De même pour les produits. Dans la colonne Réversibilité il peut y avoir 3 valeurs : « r » pour réversible, « ir » pour irréversible et « ? » quand ce n'est pas décrit. Les constantes KM et KCAT sont séparées par un « ; » et sont associées respectivement dans l'ordre aux substrats. Enfin le PH décrit l'intervalle dans lequel l'enzyme est active. Pour les cas où l'information est inconnue, « ? » est mis à la place comme par exemple dans le Tableau 2 pour l'IC50 de l'ADP pour l'enzyme 7.6.2.2.

#### 4.1.2 Méthode 1 - SOAP

Pour rappel, la première méthode d'extraction de réaction utilise un client SOAP pour envoyer des requêtes à BRENDA et avoir en retour les informations désirées. Cette méthode a pour inconvénient de ne pas être stable en C++, information confirmée par l'équipe d'assistance de BRENDA. Il a donc fallu faire le programme d'extraction en python 2.7.16 en utilisant la bibliothèque SOAPpy – version 0.12.22 – à la place. L'algorithme du programme est décrit dans l'Algorithme 1.

```

1  Fonction ExtractionReactionSOAP(Fichier fichierReactions)
2      Liste listeEC = requete(« obtenir la liste des codes EC »)
3      Pour tous les CodeEC ec de listeEC faire
4          Dictionnaire dicoKM = requete(« obtenir le KM des substrats de ec »)
5          Dictionnaire dicoKcat = requete(« obtenir le Kcat des substrats de ec »)
6          Liste reactions = requete(« obtenir les informations sur les réactions »)
7          Pour toutes les Reaction reaction de reactions faire
8              ecrireReaction(reaction, dicoKM, dicoKcat, fichierReactions)
9          Fin
10     Fin
11 Fin

```

Algorithme 1 : Algorithme simplifié de l'extraction des réactions avec le service SOAP

Les informations extraites à la ligne 6 correspondent aux substrats et produits de la réaction mais aussi de l'organisme et de la réversibilité.



L'algorithme pour l'extraction des inhibiteurs étant sensiblement le même il ne sera pas présenté dans le rapport.

De plus les informations reçues se sont révélées compliquées à traiter dû au fait que certains caractères étaient encodés différemment. Par exemple la Figure 7 présente une des erreurs d'annotations manuelles retrouvée. Le prime de « 5'-phosphate » de la première ligne n'est pas le même que celui de la seconde ligne, cela provoquerait des problèmes dans la recherche de substrats ou de produits. Ce n'est qu'un exemple parmi d'autres des erreurs

ATP + thymidine 5'-phosphate	ADP + thymidine diphosphate
ATP + trifluoromethylthymidine	ADP + trifluoromethylthymidine 5'-phosphate

Figure 7: Capture d'écran de BRENDA montrant un exemple d'erreur d'annotation manuelle

Cette capture d'écran du site de BRENDA met en avant une erreur d'annotation. Le prime du « 5'-phosphate » de la première ligne n'est pas le même que celui de la seconde ligne.

Les colonnes de ce tableau correspondent aux substrats et produits de la thymidine kinase – EC 2.7.1.21

d'annotations.

Sachant que plus de 250000 réactions sont extraites il est difficile de gérer tous ces cas et d'être sûr qu'ils soient tous corrigés. A ça il faut ajouter la conversion des caractères en HTML, au format &xxx, à faire.

Enfin l'un des inconvénients majeurs est le temps d'exécution. Plus de 6500 code EC sont décrits dans BRENDA et 3 requêtes sont nécessaires par EC, soit environs 20000 requêtes, le temps d'exécution est donc très long (plus de 10 heures) cela en fait le plus grand inconvénient pour cette méthode.

Néanmoins cette méthode a l'avantage d'extraire les dernières informations mises à jour.

#### 4.1.3 Méthode 2 – TEXTE

Cette méthode, plus simple en théorie, consiste à extraire les informations à partir du fichier texte contenant toutes les informations de BRENDA téléchargeable sur le site ([https://www.brenda-enzymes.org/download\\_brenda\\_without\\_registration.php](https://www.brenda-enzymes.org/download_brenda_without_registration.php)).

L'inconvénient est de devoir télécharger de nouveau le fichier pour pouvoir mettre à jour les deux fichiers CSV. De plus l'écriture du programme fut longue pour extraire les informations nécessaires de ce fichier. De plus le problème de caractère mal annoté doit aussi être géré dans ce cas.

Cependant, le fichier étant déjà au format texte il n'y a pas besoins de faire des conversions de caractère spécifique du format HTML ce qui garantit une plus grande fiabilité des informations. L'avantage majeur est le temps d'extraction qui, pour cette méthode, ne dure que 2-3min. Enfin cette méthode se résumant à la lecture d'un fichier texte il a été possible de le coder en C++ ce qui rend la méthode plus intéressante car elle pourra être facilement intégrable à Silicell Maker.

#### 4.1.4 Comparaison du contenu des tables

Pour la table des réactions, 256142 sont décrites dans celle de la méthode SOAP contre 283753 pour la méthode TEXTE. A priori il y aurait plus de réaction décrite pour la méthode TEXTE. Cependant étant donné que BRENDA est annoté manuellement, la répétition de réaction est envisageable.

En regardant la redondance stricte des réactions, c'est à dire la répétition de ligne strictement identique, pour la première méthode 10 sont trouvées contre 0 pour la second. Mais en supposant qu'une réaction est définie uniquement par son enzyme, son organisme, ses substrats et ses produits, il est possible de trier et supprimer les réactions décrivant le même mécanisme biochimique. Après cette suppression de ces réactions répétées 221340 réactions sont conservées sur 256142 pour la méthode SOAP et 216301 sur 283753 le sont pour la méthode TEXTE.

175129 réactions sont communes aux deux tables filtrées. Il y a donc environs 80% de réactions communes entre les deux tables

Pour une raison évidente de temps c'est la seconde méthode qui est utilisée pour le reste de l'étude. De plus ce temps plus court a permis d'améliorer cette méthode et de s'assurer que les informations sont correctement extraites contrairement à la première méthode.

Pour la table des inhibiteurs la même méthode de comparaison a été appliquée, 220481 inhibiteurs uniques sont trouvés avec la méthode SOAP et 244654 pour la méthode TEXTE. 156322 sont communs aux deux.

## 4.2 Conception de BrendaXplorer

A partir des réactions extraites de BRENDA, il faut construire un réseau d'une certaine profondeur maximale pouvant connecter des molécules d'entrées, les biomarqueurs, et des molécules de sorties, des révélateurs.

La profondeur définit la distance entre les entrées et les sorties en termes de réactions. Par exemple un réseau de profondeur maximale égale à deux signifie que dans ce réseau il n'y aura au maximum que 2 réactions séparant les entrées et les sorties.

BrendaXplorer se décompose donc en deux parties, une partie permettant de sélectionner parmi les réactions extraites celles qui permettront potentiellement de connecter les entrées et les sorties et la seconde qui a pour but de les connecter en assemblant les réactions sélectionnées.

### 4.2.1 Sélection des réactions

BrendaXplorer a obligatoirement besoin d'avoir en paramètre les molécules d'entrées et de sorties ainsi que les fichiers contenant les réactions et les inhibiteurs de BRENDA. Le logiciel construira avec ces paramètres un réseau enzymatique sur mesure prenant en compte les éléments d'entrées et de sorties.

Il est aussi possible de faire une recherche avancée avec des paramètres optionnels :

- Les enzymes pouvant être utilisées
- Les organismes où interviennent les réactions
- Les inhibiteurs pouvant inhiber les réactions
- Faire la recherche en fonction des constantes de réactions
- La réversibilité des réactions
- Profondeur du réseau

Pour la construction d'un réseau d'une profondeur d'une ou deux réactions il suffit de chercher les réactions qui transforment les molécules d'entrées, ce sont les réactions d'entrées de niveau 1, et celles qui produisent les molécules de sorties, les réactions de sorties de niveau 1. Cependant pour les réseaux de profondeur trois ou quatre, il est nécessaire de refaire une recherche. Il faut trouver les réactions transformant les produits des réactions d'entrées de

niveau 1 et les réactions produisant les substrats des réactions de sorties de niveau 1. Tous ces niveaux de réaction sont illustrés sur la Figure 8.

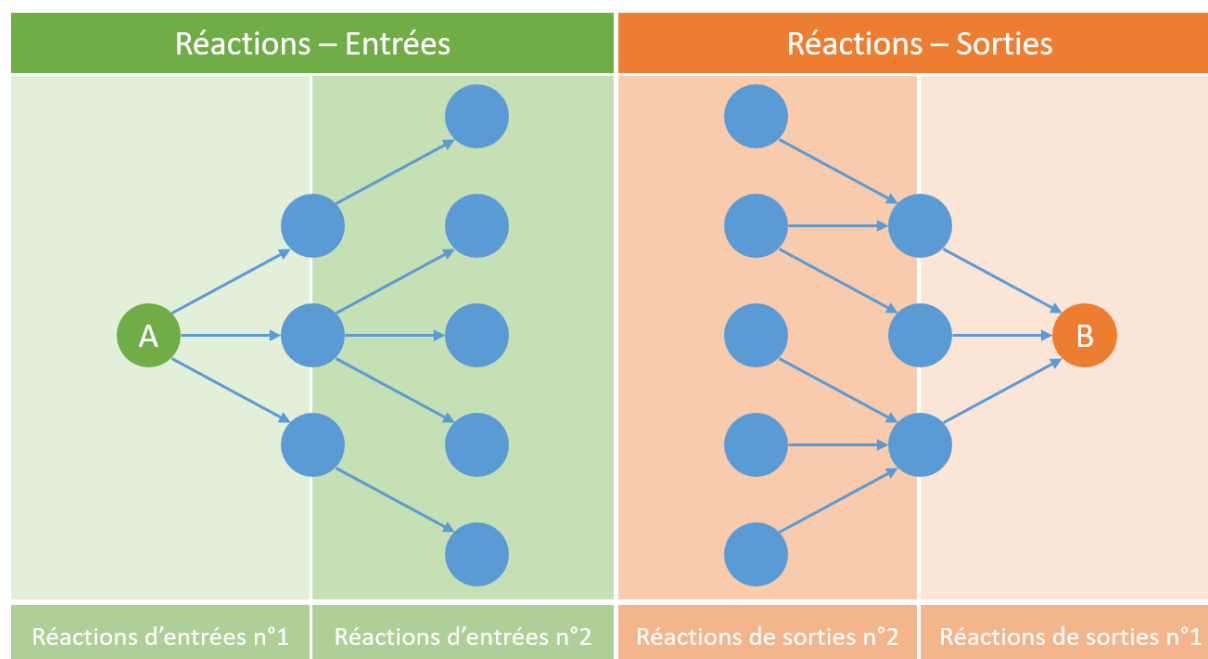


Figure 8 : Schéma de la recherche de réactions

Les sommets (les disques de couleur vert bleu et orange) correspondent à des métabolites de réactions, les arêtes qui les relient représentent les réactions. Le disque vert symbolise les métabolites d'entrées, les biomarqueurs et le disque orange indique les métabolites de sorties, les révélateurs.

#### 4.2.2 Connexion des entrées et sorties

Pour faire la connexion entre les biomarqueurs et les révélateurs, il est nécessaire de comparer les produits et les substrats des réactions trouvées. Sur la Figure 9 les comparaisons nécessaires à faire pour construire les réseaux des différentes profondeurs sont illustrées.

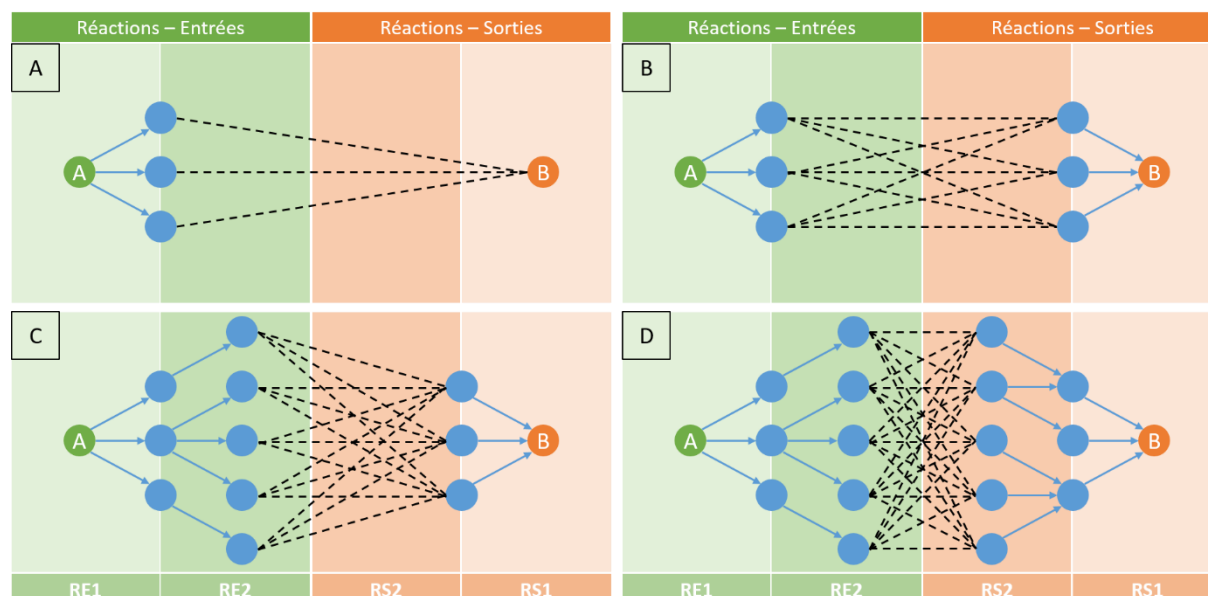


Figure 9 : Illustration des comparaisons à faire pour chaque profondeur

Chaque graphe illustre les comparaisons à faire pour assembler un réseau. Les graphes A, B, C et D correspondent respectivement aux profondeurs 1, 2, 3 et 4. L'élément « A » en vert correspond aux biomarqueurs tandis que les révélateurs sont représentés par « B » en orange. Les disques bleus symbolisent tous les métabolites intermédiaires. Les tirets noirs mettent en avant tous les comparaisons à faire pour assembler les réseaux métaboliques. RE1 = réaction d'entrées de niveau 1, RE2 = réactions d'entrées de niveau 2, RS1 = réactions de sorties de niveau 2 et RS2 = réactions de sorties de niveau 1.

L'assemblage des réseaux de profondeur 1 se font en regardant simplement si les RE1 (cf Figure 9-A) produisent des révélateurs. Les réseaux de profondeur 2 se font en cherchant les RE1 produisant des substrats de RS1 (cf Figure 9-B). Les RE1 et RS1 ainsi trouvées forment le réseau de profondeur 2.

Les réseaux de profondeur 3 et 4 se construisent de la même façon en cherchant à connecter respectivement les RE2 et les RS1 pour des réseaux de profondeur 3 (cf Figure 9-C) et les RE2 et les RS2 pour les réseaux de profondeur 4 (cf Figure 9-D). Cependant il faut ensuite chercher les réactions de niveau 1 pouvant connecter celle de niveau 2 aux entrées et/ou sortie.

La construction des réseaux de profondeur 1 ou 2 se fait très rapidement mais offre que très peu de chance, pour ne pas dire aucune, de connecter les entrées et les sorties. Alors que les réseaux plus profond seront plus long à assembler mais offrirons plus de chance de lier les entrées et les sorties.

### 4.3 Evaluation de BrendaXplorer

Pour évaluer BrendaXplorer, les taux de connexion entrée/sortie et le temps de calcul vont être analysés. Pour se faire, 500 couples de métabolites d'entrées et de sorties ont été tirés aléatoirement. Pour chaque couple des réseaux de profondeur 1, 2, 3 et 4 ont été assemblés. 2000 réseaux sont donc construits au total. Un couple se compose d'un élément d'entrée, tiré aléatoirement parmi tous les substrats des réactions de BRENDA, et un élément de sortie, tiré aléatoirement parmi tous les produits.

#### 4.3.1 Taux de réussite de connexion

Par «taux de connexion» il faut comprendre le pourcentage de réseau assemblé connectant les métabolites d'entrées et ceux de sorties. Dans cette étude, ce taux sera évalué aux différentes profondeurs des réseaux.

Tableau 3 : Taux de réussite de connexion en fonction de la profondeur du réseaux

La profondeur désigne le nombre de réaction entre les métabolites d'entrées et de sorties.

Profondeur	1	2	3	4
Taux de réussite	0%	2.6%	27.6%	47%

Plus le réseau est profond et plus il y a de chance de pouvoir connecter les entrées et les sorties. En effet, d'après le Tableau 3, sur les 500 couples, 0% ont pu être connectés pour une profondeur de 1. Cette valeur monte seulement à 2.6% pour une profondeur de 2. Pour les réseaux de profondeur 3 et 4 il y a respectivement 27.6% et 47% des couples qui ont pu être connectés. Un réel gap est franchi entre une profondeur de 2 et de 3. Cela s'explique par le fait que le nombre de réactions de niveau 2 est bien plus grand que celui des réactions de niveau 1. Les réactions de niveau 1 sont limitées à quelques substrats/produits de départs (ce sont les biomarqueurs et révélateurs), un seul dans notre cas. Alors que les réactions de niveau 2 ont comme point de départ l'ensemble des métabolites issus des réactions de niveau 1. Il y a donc plus de possibilités pour connecter les entrées et les sorties.

#### 4.3.2 Temps de calcul

Le temps de calcul pour l'assemblage de chaque réseau pour chaque profondeur a été enregistré. Avant de faire une comparaison il faut regarder si ces temps suivent bien une loi normale.

Un test de normalité de Shapiro-Wilk est donc réalisé. Pour les quatre différentes profondeurs, la p-valeur trouvée est bien inférieure à 0.05, nous pouvons donc supposer que les valeurs ne suivent pas une loi normale. Cependant comme le jeu de donnée est grand, 500 observations pour chaque profondeur, il est aussi préférable de regarder graphiquement si les variables ne suivent pas une loi normale.

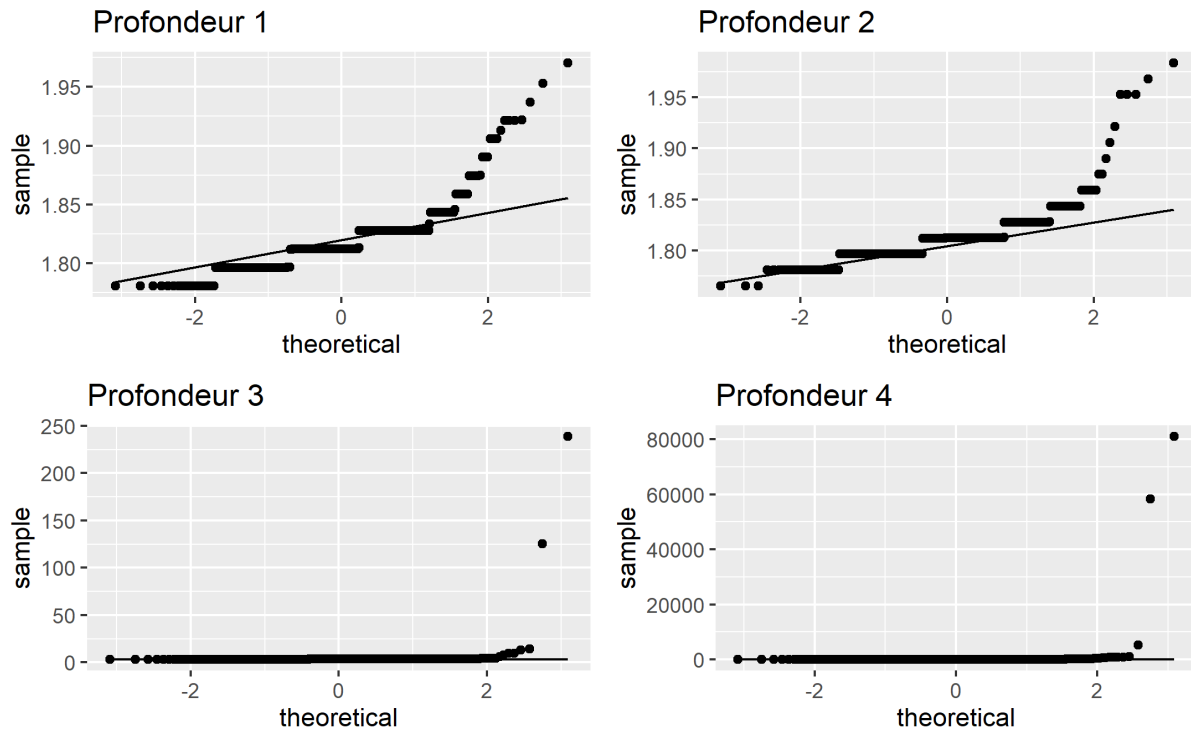


Figure 10: Diagrammes quantile-quantile pour chaque profondeur

La figure présente 4 diagramme quantile-quantile pour les quatre profondeurs. Ces diagrammes opposent les valeurs théoriques de la loi normale au valeur des échantillons, cela permet de voir si le jeu de données suit une loi normale. La ligne continue correspond aux valeur théoriques et les points désignent les valeurs de notre échantillon

D'après la Figure 10, l'hypothèse de normalité pour les temps de calcul de chaque profondeur n'est pas acceptable. En effet les valeurs extrêmes s'éloignent de la courbe théorique. Pour la comparaison des variables il faut donc passer par un test non-paramétrique, un test ne se basant pas sur une distribution statistique.

Un test de Wilcoxon est donc réalisé entre chaque profondeur pour les comparer. Sur la Figure 11, nous pouvons observer que toutes variables de temps sont différentes. En effet pour chaque comparaison on trouve une p-valeur inférieure au seuil de 0.05. De plus sur cette figure il faut noter la présence de valeurs atypiques justifiant l'échelle logarithmique pour l'axe du temps (en ordonnée). Enfin il faut noter que certains calculs ont duré plusieurs heures, le plus long a un temps de calcul de 22h30 environs.

*A développer :*

*Ces très grandes différences de temps peuvent être dues à des métabolites impliqués dans un très grand nombre de réaction ... Donner des exemples de métabolites*

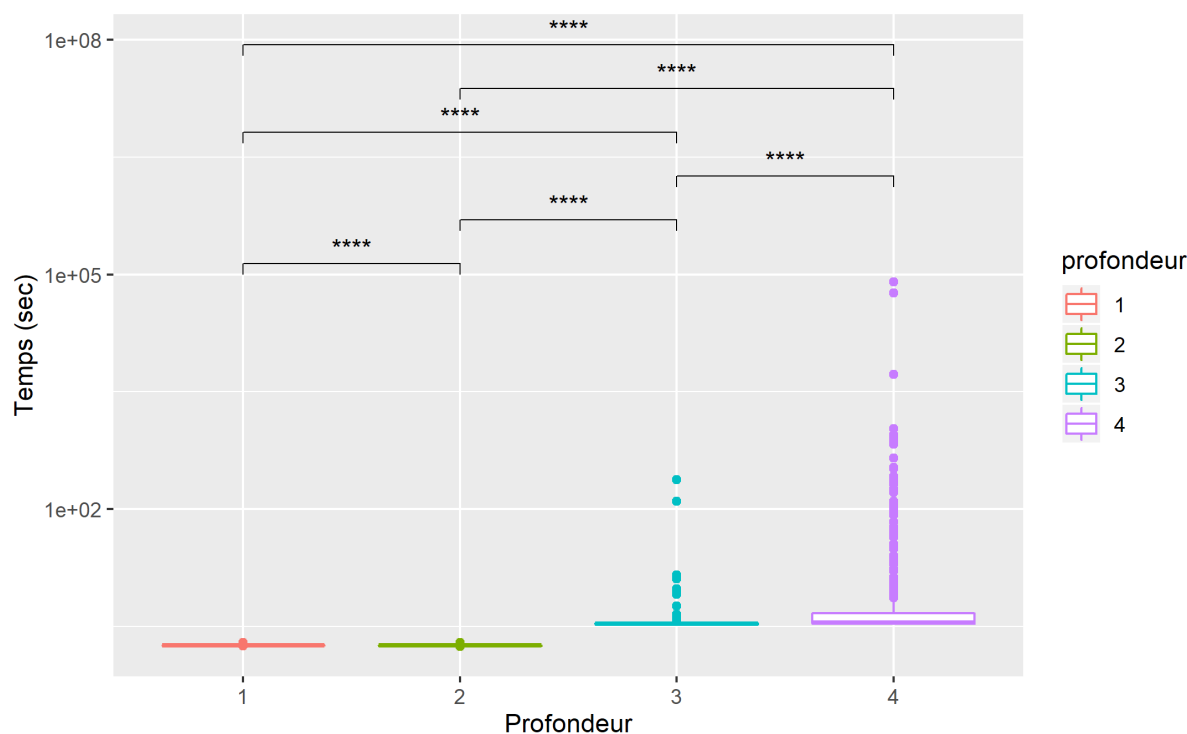


Figure 11 : Distribution du temps en fonction de la profondeur des réseaux

La figure représente les distributions du temps sous forme de boîtes à moustaches. Les comparaisons des variables apparaissent en haut du graphe. « \*\*\*\* » signifie que la p-value est inférieure à 0.0001. L'axe des abscisses correspond à la profondeur et celui des ordonnées au temps en seconde sur une échelle logarithmique.

#### 4.4 Interface Graphique

La Figure 12-A présente l'interface graphique développée avec FLTK. Plusieurs éléments sont présents. Les éléments « INPUT » et « OUTPUT » sont des zones de texte où l'utilisateur peut écrire les entrées et les sorties du réseau. Les deux zones en-dessous sont des listes contenant respectivement toutes les entrées et toutes les sorties. Si l'utilisateur souhaite supprimer un des éléments de la liste il lui suffit de cliquer dessus. Le bouton « Réinitialiser »

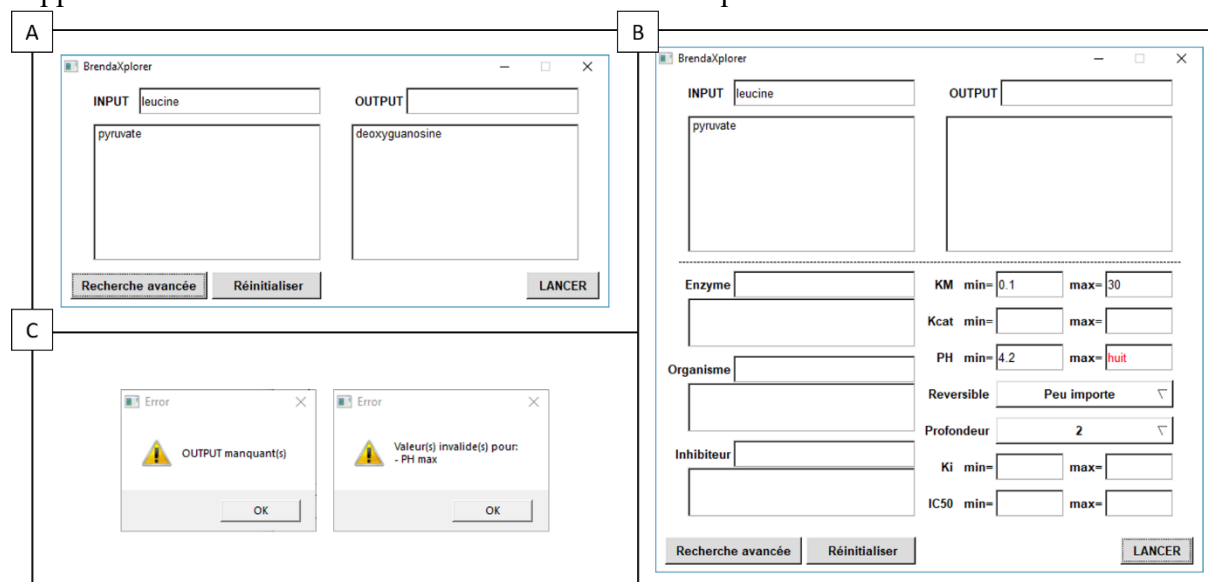


Figure 12 : Différents éléments décrivant l'interface graphique de BrendaXplorer

La figure A montre la fenêtre de base de BrendaXplorer avec deux champs pour entrer les biomarqueurs (INPUT) et les révélateurs (OUTPUT) ainsi que deux listes en-dessous pour les stocker. En B se trouve la fenêtre pour la recherche avancée avec des champs pour les enzymes, les organismes, les inhibiteurs et pour les constantes associées ainsi qu'un élément pour choisir la réversibilité des réactions (réversible, non-réversible ou les deux) et un autre pour le choix de la profondeur du réseau à construire (entre 1 et 4). Enfin deux exemples de « popup d'erreur » sont présentés sur la figure 2.

permet de remettre tous les champs vides et le bouton « Lancer » permet de lancer l'assemblage du réseau.

Le bouton « Recherche avancée » affiche de nouveaux champs qui permettent d'affiner la recherche. La Figure 12-B nous montre l'interface graphique pour la recherche avancée. Plusieurs éléments apparaissent afin de rendre la recherche plus spécifique. L'utilisateur est donc capable de rechercher des réactions en fonction d'une liste d'enzymes (code EC et/ou nom), d'une liste d'organismes ou d'inhibiteurs.

La recherche peut aussi se faire en fonction d'un intervalle pour chaque constante. Ces constantes sont : le  $K_M$ , le  $K_{cat}$ , le  $pH$  pour les réactions et le  $K_I$  et  $L'IC_{50}$  pour les inhibiteurs. Pour ces champs le texte devient rouge si l'utilisateur n'écrit pas une valeur numérique, lui signalant ainsi l'erreur.

Concernant la gestion des erreurs, pour le moment l'interface graphique est capable de détecter si une variable est incorrecte après avoir cliqué sur « Lancer ». Une fenêtre s'affichera pour indiquer les erreurs, cela peut concerner les constantes si elles ne sont pas bien notées ou si l'utilisateur n'a pas rentré d'Input ou d'Output comme sur les deux exemples de la Figure 12-C.

## 5. Discussions

---

Le développement de BrendaXplorer se positionne dans une branche de la biologie synthétique qui se développe fortement depuis ces dernières années. La conception de bioréacteur enzymatique pourrait avoir un fort impact sur de nombreux domaines et notamment dans le diagnostic médical facilité.

L'ensemble des réactions provenant de BRENDA ainsi que des informations associées représentent une source de données plus que nécessaire pour BrendaXplorer. Néanmoins, malgré les problèmes liés à cette base de données (erreurs d'annotations, répétitions de réaction entre autres) elle offre un ensemble très large de réactions avec la description des constantes, qui sont indispensables pour faire des simulations. Pour le futur de BrendaXplorer il faudra donc prendre en compte plus de paramètres, en priorité la température optimale de la réaction ou encore le point isoélectrique. De plus, une grande quantité d'information se « cache » dans les commentaires. Ces commentaires, présents pour chaque champs (réactions, inhibiteurs, constantes), donnent des renseignements très précis notamment pour le pourcentage d'inhibition ou si l'information concerne une souche sauvage ou mutante par exemple.

Un des problèmes qui n'est pas encore pris en charge est la gestion des synonymes de métabolites qui fausse grandement la recherche. Par exemple si un utilisateur entre comme biomarqueur la leucine, BrendaXplorer ne cherchera que les réactions qui prennent en substrat la leucine. Il faudra définir une table ou un dictionnaire d'équivalence de nom pour que dans l'exemple précédent BrendaXplorer cherche aussi les substrats « leu » sachant que cela ne s'applique pas uniquement aux acides aminés bien évidemment.

Le temps de calcul de BrendaXplorer peut être amélioré en gérant certains métabolites différemment. Ces métabolites sont ceux qui interviennent dans un très grand nombre de réaction. A titre d'exemple « H<sub>2</sub>O » intervient dans plus de 50% des réactions de BRENDA, ce métabolite ne devrait pas être pris en compte car les réactions se déroulent déjà dans l'eau.

Durant ce stage je n'ai pas pu faire tester le programme à beaucoup de biologistes concernés par ce domaine, pour ne pas dire aucun en ce qui concerne la dernière version. L'interface doit obligatoirement être testée pour pouvoir la perfectionner et la rendre la plus intuitive possible pour l'utilisateur. Ces tests sont aussi le meilleur moyen de mettre en avant des problèmes de fonctionnement ou des fonctionnalités à rajouter.

Enfin il faut encore intégrer BrendaXplorer à Silicell Maker. Ce plugin offrira donc l'avantage de pouvoir concevoir des algorithmes enzymatiques sans avoir de réseau métabolique initial.



## **6. Bibliographie**

---

## 7. Annexes

---

*Annexe 1: Tableau des portes logiques à une entrée*

Entrée A	PORTES	
	YES	NO
0	F	V
1	V	F

*Annexe 2 : Tableau des portes logiques à deux entrées*

Entrées		PORTES							
A	B	AND	OR	NOT-AND	AND-NOT	NOT-OR	OR-NOT	NAND	NOR
0	0	F	F	F	F	V	V	V	V
1	0	F	V	F	V	F	V	V	F
0	1	F	V	V	F	V	F	V	F
1	1	V	V	F	F	V	V	F	F