



HAL
open science

Dissection moléculaire du site de fixation de l'antigène d'une molécule d'histocompatibilité de classe II et modélisation stochastique des interactions macromoléculaires au sein de la cellule vivante

Jean Peccoud

► **To cite this version:**

Jean Peccoud. Dissection moléculaire du site de fixation de l'antigène d'une molécule d'histocompatibilité de classe II et modélisation stochastique des interactions macromoléculaires au sein de la cellule vivante. Modélisation et simulation. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1991. Français. NNT: . tel-00339133

HAL Id: tel-00339133

<https://theses.hal.science/tel-00339133>

Submitted on 17 Nov 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse

présentée par

Jean PECCOUD

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Joseph Fourier - Grenoble

(Arrêté ministériel du 5 Juillet 1984)

Spécialité : Biologie

Dissection moléculaire du site de fixation de l'anti-
gène d'une molécule d'histocompatibilité de classe II
et
modélisation stochastique des interactions macromolé-
culaires au sein de la cellule vivante.

Thèse soutenue le 9 Janvier 1991, à l'Alpe d'Huez (38)

devant un jury composé de : **Jacques DEMONGEOT** *Président*

Grégoire NICOLIS *Rapporteurs*

René THOMAS

René THOM *Examineurs*

Christophe BENOIST

Christine JACOB

Dino MORAS

Thèse préparée au sein du Laboratoire de Génétique Moléculaire des Eucaryotes (CNRS, Strasbourg)
puis au sein du laboratoire IMAG > TIM3 > TIMB

"Un livre, même fragmentaire, a un centre qui l'attire : centre non pas fixe, mais qui se déplace par la pression du livre et les circonstances de sa composition. Centre fixe aussi, qui se déplace, s'il est véritable, en restant le même et en devenant toujours plus central, plus dérobé, plus incertain et plus impérieux. Celui qui écrit le livre, l'écrit par désir, par ignorance de ce centre."

Blanchot

Remerciements

Ce manuscrit m'apparaît comme le terme d'une longue formation. Il marque la fin d'une initiation scientifique qui a débuté bien avant ma première inscription en troisième cycle universitaire. Qu'il me soit permis ici d'évoquer le nom des hommes dont la rencontre me semble avoir revêtu une importance particulière et dont je sais distinguer la trace dans les pages écrites ces derniers mois.

Le Père Bellon a été mon professeur de mathématiques en terminale au Lycée Boisfleury à Grenoble. Il m'a laissé deviner que le raisonnement mathématiques était avant tout un raisonnement et, qu'à ce titre, il pouvait trouver une expression en français, expression par rapport à laquelle l'emploi de symboles plus ou moins ésotériques devait demeurer second. Il savait lui-même dire ses cours dans un langage toujours simple au début. Enfin, le soin qu'il mettait à rédiger la correction de chaque copie fournissait une démonstration hebdomadaire de sa conviction que chaque travail d'élève en dépit d'une forme mathématique tout à fait impersonnelle, était une prise de parole personnelle digne d'une réponse propre. Son exigence rédaction vis à vis de lui-même au moment de la correction des copies était celle-là même qu'il attendait de nous au moment de la résolution des problèmes.

Je crois que, sur le plan scientifique, mon passage à l'école Sainte Geneviève a surtout été marqué par la rencontre d'une équipe de professeurs de biologie exceptionnelle. Que celle qui était alors Mademoiselle Chantal de Juvigny, que Dominique Duval, Monsieur Tanchou, Maître Favard et Monsieur Vogel voient dans ces lignes l'expression d'une reconnaissance qui ne trouve pas de mots pour se dire. J'ai compris, après avoir quitté Versailles, la richesse de l'enseignement reçu de cette équipe au sein de laquelle chacun avait des compétences propres et qui parvenait pourtant à construire un enseignement cohérent des sciences naturelles s'étendant de la géologie à la biologie moléculaire en passant par la botanique, la zoologie, la physiologie, etc... Il me semble aujourd'hui, qu'en dépit de la nature assez classique et académique des connaissances dispensées dans le cadre d'une préparation à un concours, il y avait dans ce travail de recherche de cohérence un effort qui sortait d'un cadre strictement pédagogique et qui, je crois, pouvait être tenu pour véritablement scientifique.

J'ai connu Alain Toppan lors de mon stage de DEA dans le centre de recherche de Sanofi à Labège. Nous avons découvert les techniques de manipulation de l'ADN ensemble. Lui était issu de la physiologie végétale et je sortais d'école. Il était arrivé au laboratoire quelques mois avant moi. Il avait donc, outre sa longue expérience du travail de laboratoire, une petite avance sur moi dans le domaine de la biologie moléculaire. Il avait ouvert la voie et m'a toujours fait généreusement bénéficier de ses acquis. Il fut quotidiennement mon guide. Il m'a aussi appris les bases du travail expérimental. J'ai été infiniment touché par son accueil et sa disponibilité peu communs. Il compte aujourd'hui parmi mes amis.

Je remercie Diane Mathis et Christophe Benoist de la confiance dont ils ont fait preuve à mon égard en m'accueillant dans leur laboratoire. Ce séjour a été pour moi une occasion unique d'ouverture à la dimension internationale de la recherche et à la nécessaire compétitivité qui lui est liée. J'ai été initié chez eux à l'expérimentation sur des systèmes complexes mettant en jeu des techniques puissantes et variées. Enfin, du fait de leur exigence et leur présence constante à mes côtés, je garde de cette période le souvenir d'un moment très intense, un peu comparable à l'époque à l'époque au cours de laquelle je préparais les concours. Je crois que tant sur le plan humain que scientifique, il marque une étape importante de ma vie.

Je remercie la compagnie Roussel-Uclaf et le CNRS d'avoir généreusement accepté de financer un travail dans lequel je ne me serais certainement pas engagé sans leur soutien matériel. La sécurité qu'ils m'ont assurée m'a permis de me consacrer pleinement à la recherche.

Jacques Demongeot m'a ménagé dans son laboratoire un extraordinaire espace de liberté. Il a guidé mon travail sans jamais m'imposer aucune direction. Par le simple rappel de quelques points de repères bien choisis, il m'évitait de m'égarer sans cependant me contraindre. Cette manière d'encadrer la recherche lui est très personnelle. Je n'ai jamais eu le sentiment qu'il tenait à me voir réaliser une tâche précise et je me suis pourtant très souvent demandé après-coup, si l'objectif que j'avais atteint n'était pas précisément le lieu où il m'attendait sans jamais l'avoir dit. Cette pédagogie souple m'a permis de parcourir un véritable itinéraire intellectuel. Lorsqu'au terme des 18 mois passés chez lui, je me souviens de notre premier entretien et que je le compare à mes interrogations d'aujourd'hui, je prends la mesure du grand voyage que j'ai fait chez lui.

Mais sans Christine Jacob les horizons indiqués par Jacques me seraient restés inaccessibles. C'est Christine qui m'a permis d'écrire. J'ai dû faire appel à une langue qui me restera sans doute toujours étrangère pour écrire ces lignes. J'ai bégayé à chaque mot. C'est avec une patience sans limites qu'elle m'a lu, repris et corrigé inlassablement.

Enfin, ce travail doit aussi beaucoup à mon père. Les innombrables heures qu'il a passées à m'écouter parler d'un sujet sans aucun rapport avec ses préoccupations professionnelles et les questions naïves qu'il a pu formuler, ont été autant d'occasions d'affiner un peu ma réflexion. Aux heures les plus noires, il a trouvé les mots qui m'ont permis de me remettre au travail. De plus, il se trouve, sans l'avoir sans doute réalisé, ou en l'ayant oublié, à l'origine de mon souci de modélisation. Je crois que c'est vers la fin de l'année 85 que nous avons discuté, suite à ma lecture de l'ouvrage d'Hofstadter intitulé "Gödel, Escher et Bach", de la possibilité de modéliser les systèmes décrits par la biologie moléculaire à l'aide de langages formels. Cinq années plus tard les langages formels sont devenus des processus stochastiques mais le rêve demeure le même...

Première partie

Dissection moléculaire
du site fonctionnel
d'un antigène d'histocompatibilité
de classe II

Travail réalisé, entre Novembre 87 et Juin 89, sous la direction de Christophe Benoist et Diane Mathis, dans le département d'immunologie du Laboratoire de Génétique moléculaire des Eucaryotes à Strasbourg.

Table des chapitres

Chapitre 1 Introduction

1. Description générale du CMH	15
1.1. Rappels historiques	
1.2. Le CMH à l'origine de la réponse immunitaire spécifique T dépendante	
1.2.1. Reconnaissance de l'antigène par les cellules T	
1.2.2. La restriction au CMH	
1.2.3. La réponse immunitaire : une collaboration cellulaire orientée par les produits du CMH	
1.3. Les bases moléculaires de la présentation	
1.3.1. Le complexe Ia-Antigène	
1.3.2. La maturation de l'antigène	
2. Les molécules du CMH	20
2.1. Généralités	
2.2. Structure de HLA-A2	
2.2.1. Structure d'ensemble	
2.2.2. Structure de α_3 et de la β_2m	
2.2.3. Structure de α_1 et α_2	
2.2.4. Contacts entre les domaines	
2.3. Structure du site de fixation de l'antigène	
2.3.1. Site de HLA-A2	
2.3.2. Structure hypothétique du site de fixation de l'antigène des molécules de classe II	
3. Le pont : l'étude des relations structure fonction des molécules de classe II	25
3.1. Les outils	
3.1.1. Le transfert de gènes	
3.1.2. La recombinaison <i>in vitro</i>	
3.2. Principaux résultats	
3.2.1. Remarques préliminaires	
3.2.2. Analyse du mutant A _{β} m12	

- 3.2.3. Description des mutants de A_α
- 3.2.4. Analyse des mutants
- 3.2.5. Etude de A_β
- 3.3. Conclusion
- 4. Validité du test de présentation de l'antigène 31
 - 4.1. Les deux modes de fixation de l'antigène par les molécules de classe II
 - 4.1.1. Etude par radiomarquage
 - 4.1.2. Etude par activation de clones T
 - 4.2. La circulation des molécules Ia
 - 4.3. La maturation des peptides antigéniques
 - 4.4. Conclusion et conséquences

Chapitre 2

Travail expérimental

- 1. Mutagenèse de la région en hélice 35
 - 1.1. Objectifs du projet
 - 1.2. Détermination de la région à muter
 - 1.3. Détermination des mutations
 - 1.4. Choix d'une méthode de mutagenèse
- 2. Analyse du site de fixation de l'antigène 39
 - 2.1. Par "*epitope mapping*"
 - 2.1.1. Objectifs
 - 2.1.2. Résultats
 - 2.1.3. Interprétation
 - 2.1.4. Conclusion
 - 2.2. Par présentation d'un peptide immunogénique à des hybridomes T
 - 2.2.1. Objectifs
 - 2.2.2. Résultats
 - 2.2.3. Interprétation
- 3. Analyse du site de fixation du SEB 43
 - 3.1. Introduction, objectifs et méthodes
 - 3.2. Résultats
 - 3.3. Interprétation

Chapitre 3

Discussion

0. Préliminaires	45
1. Validation expérimentale du modèle de Brown	45
1.1. Par étude du marquage par des anticorps monoclonaux	
1.2. Par étude de la capacité de présentation	
2. Interaction des superantigènes avec les molécules de classe II	46
2.1. Deux modes de présentations différents	
2.1.1. Rappel des objectifs	
2.1.2. Validité de l'interprétation	
2.1.3. Confirmation par compétition	
2.1.4. Une intuition jusqu'ici non démontrée	
2.2. Signification biologique	
3. Dissection du site de fixation de l'antigène peptidique	49
3.1. Résidus impliqués dans la fixation de l'antigène	
3.1.1. Résidu 66	
3.1.2. Résidu 69	
3.1.3. Résidu 62	
3.1.4. Résidu 76	
3.2. A propos de l'unicité conformationnelle du complexe Ia-Ag	
3.2.1. Critère de travail initial	
3.2.2. Interprétation du phénomène de reconnaissance de l'Ag par les molécules de classe II	
3.2.3. Quelle reconnaissance de la molécule présentatrice pour l'antigène ?	

Conclusion

Références	59
-------------------	----

Liste des figures

Figure 1A Structure d'ensemble de HLA-A2	21b
Figure 1B Site de fixation de l'antigène selon le modèle de Brown	23b
Table 1 Reconnaissance des lignées APC par 4 anticorps monoclonaux	39b
Figure 2 Orientation des résidus sur une hélice α théorique de période 3,5	40b
Table 2 Efficacité de présentation à divers hybridomes T	41b
Figure 3 Résidus A_{α}^k importants pour la présentation du HEL46-61 et pour celle de la SEB	45b

Principales abréviations utilisées

CMH ou MHC	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice de l'antigène
mAb	Anticorps monoclonal
Ag	Antigène
Ia	Molécule du CMH
TcR	Récepteur de la cellule T
HEL 46-61	Peptide 46-61 du lysozyme de poule
BI	Insuline de bœuf
PI	Insuline de porc
SEB	Staphylococcal enterotoxin B
TT	Toxine tétanique
EBV	Ebstein Barr Virus
ahvI, II, III	Régions alléliques hypervariables I, II et III
Th	Cellule T auxiliaire

Chapitre I

Introduction

1. Description générale du CMH

1.1. Rappels historiques

Si l'étude du CMH se pose aujourd'hui essentiellement en termes de reconnaissance moléculaire, il n'en a pas toujours été ainsi (Shreffler, 1988). En effet, c'est de 1901 que datent les premiers travaux sur la transplantation de tumeurs. La sensibilité à la transplantation de tumeur est apparue être un caractère héritable, bien que non mendélien. Un raisonnement génétique ainsi que des données expérimentales permirent d'associer à ce caractère plusieurs gènes non liés, ayant chacun la capacité d'entraîner le rejet de la tumeur.

Dans les années 30, alors que se poursuivait l'étude génétique du phénomène, son support physiologique restait mal compris. C'est J.B.S. Haldane, généticien anglais, qui émit en 1933 l'hypothèse que le rejet pouvait être attribué à une réaction immunologique dirigée contre des alloantigènes. La production d'"alloanticorps" constatée lors du rejet de tumeur vint étayer cette hypothèse. Enfin, les gènes du rejet de tumeur et ceux des alloantigènes se révélèrent liés. Ce complexe fut appelé plus tard, chez la souris, H-2.

Au début des années 40, les fondements immunologiques du rejet des greffes de tissus normaux étaient inconnus. Un outil précieux a été alors développé en vue d'éclaircir cette question, le rejet de greffe de peau chez la souris. Une mémoire immunologique ainsi que des réponses secondaires chez des animaux ayant déjà été greffés, ont été décrits. Les connaissances en immunologie cellulaire étaient rares et ce rejet était imputé aux anticorps qui étaient fréquemment trouvés dans le sérum des animaux ayant rejeté une greffe. Ce n'est qu'en 1954 que Mitchinson montra que le rejet est médié par des cellules. Pour cela, il injecta à un hôte des lymphocytes provenant d'un donneur ayant rejeté une greffe. Cette injection transféra l'aptitude au rejet.

(Assez curieusement d'ailleurs, rétrospectivement cette expérience n'éliminait pas l'hypothèse humorale.)

A la même époque, fut entreprise la création d'une collection de lignées de souris différant les unes des autres par un seul des loci pouvant entraîner le rejet de greffe. La technique employée fut le schéma de création de lignées par hybridation et rétro-croisements pendant plusieurs générations. Un de ces loci se révéla complexe et très polymorphe, le locus H-2. La recherche de nouveaux recombinants ainsi que le développement des techniques sérologiques permirent de cartographier précisément ce locus et d'en caractériser sérologiquement les différents allèles. Enfin, a été définie la notion d'haplo-type qui correspond à une combinaison particulière d'allèles aux différents loci.

Parallèlement, les gènes Ir (pour Immune response) ont été découverts dans les années 60 par Benacerraf et McDevitt entre autre sur la base de sensibilité à certains antigènes variable d'une lignée de souris à l'autre. Ce n'est que secondairement que les loci déterminant la réponse immune ont pu être localisés au sein du MHC.

1.2. Le CMH à l'origine de la réponse immunitaire spécifique T dépendante

La découverte du CMH et sa dissection ont eu pour base les études de rejet de greffe. Il convient toutefois de remarquer que le rejet de greffe, c'est à dire la réaction immunitaire dirigée contre des tissus n'appartenant pas au greffé, ne correspond pas à une réaction très physiologique. Une greffe n'a rien de "naturel", il s'agit d'une situation totalement artificielle. Alors que ce phénomène d'alloréactivité est très bien décrit, il reste néanmoins fort mal compris (Sredni 81). Le rôle du CMH dans la réponse immunitaire n'est donc pas à envisager en terme d'histocompatibilité.

1.2.1. Reconnaissance de l'antigène par les cellules T

L'analyse de clones de cellules T a établi l'existence d'une spécificité des clones T pour l'antigène. Mais cette spécificité n'est pas identique à celle des anticorps.

Les cellules T helper et T cytotoxiques ne lient pas l'antigène libre : elles ne le reconnaissent qu'en association avec les produits du CMH exprimés à la surface de certaines cellules. Ce phénomène qui est plus complexe que la simple liaison antigène-anticorps, a donné lieu à de nombreuses hypothèses. La plus féconde fut de considérer que le récepteur des cellules T pour l'anti-

gène était en réalité spécifique d'une association entre l'antigène et une molécule du CMH.

1.2.2. La restriction par le CMH

Si un produit du CMH est nécessaire à la reconnaissance de l'antigène par les cellules T, un clone T donné ne peut se satisfaire de n'importe quelle protéine du CMH pour assurer cette reconnaissance. Seul un petit nombre de ces produits pourra remplir cette fonction.

Ainsi, par exemple, les clones T porteurs du marqueur membranaire CD8, ne reconnaîtront l'antigène qu'en présence d'un produit de classe I alors que les clones T porteurs du marqueur CD4 reconnaîtront l'antigène en présence d'une molécule de classe II. De même à l'intérieur d'une classe, un clone T ne reconnaîtra l'antigène qu'en présence d'un des produits de cette classe (A ou E par exemple pour les classes II de la souris).

Mais l'ensemble des molécules du CMH capables de permettre la reconnaissance de l'antigène est plus étroit encore. En effet, il convient que la molécule du CMH soit aussi d'un haplotype précis pour que la reconnaissance soit possible. En effet, les clones T provenant d'une lignée de souris ne reconnaîtront généralement pas l'antigène associé au bon produit du CMH exprimé par une cellule provenant d'une autre lignée de souris.

Le fait qu'une cellule T ne puisse reconnaître un antigène qu'essentiellement en présence d'une molécule très précise du CMH qui lui est spécifique, est appelé reconnaissance de l'antigène restreinte par le CMH ou plus rapidement, restriction par le CMH. Elle porte donc sur deux niveaux : la restriction à un produit particulier du CMH et à un haplotype donné de ce produit. Une notation concise permet d'exprimer cette restriction. Un clone est, par exemple, restreint par I-A^k (I-A indique le produit et k en exposant l'haplotype).

1.2.3. La réponse immunitaire : une collaboration cellulaire orientée par les produits du CMH

- Les produits de classe I et la défense anti-virale

Les produits de classe I sont exprimés par la totalité des cellules nucléées de l'organisme. Lorsque l'une de ces cellules est infectée par un virus, elle présente des antigènes viraux à sa surface en association avec les molécules de classe I. Les cellules T CD8⁺ ayant un récepteur spécifique pour l'association de l'antigène viral et du produit du CMH vont reconnaître la cellule infectée

et la tuer. Cette reconnaissance stimule ces cellules T et entraînent leur prolifération ainsi que la production d'un certain nombre de lymphokines et cytokines.

• Les produits de classe II

Leur expression est beaucoup plus spécifique que celle des classe I. Ils ne sont exprimés que par un nombre restreint de cellules très différenciées, parfois même à un stade très particulier de leur développement. Une vue schématique de l'organisation de la réponse contre un antigène étranger peut être la suivante.

Les cellules présentatrices de l'antigène (CPA) se trouvent dans la zone périphérique (cellules de Langerhans de la peau, macrophages) ou dans le système lymphatique (cellules dendritiques des ganglions), voire même dans le système circulatoire (macrophages circulants, monocytes). Elles ne possèdent pas de récepteur spécifique d'un antigène et assurent une mission de surveillance en présentant à leur surface toutes sortes d'antigènes. Lors de leur circulation, principalement dans les ganglions, elles seront reconnues par des cellules Th ayant une spécificité pour l'association entre les produits de classe II exprimés par les CPA et un antigène étranger. La reconnaissance de cette association active la cellule Th qui prolifère en émettant des lymphokines.

Les cellules B sont aussi présentatrices de l'antigène (Lassila 88 ; Ashwell 88). Elles présenteront, en association avec le CMH, l'antigène contre lequel est dirigé leur récepteur membranaire de l'antigène, un anticorps membranaire. Les cellules Th activées vont reconnaître une nouvelle fois à la surface des cellules B, l'association antigène-CMH qui leur est spécifique. Il réagiront en produisant d'autres lymphokines (γ -IFN, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6) qui entraîneront successivement une expansion du clone B reconnu et sa différenciation en plasmocyte, cellule productrice d'anticorps solubles.

1.3. Les bases moléculaires de la présentation

1.3.1. Le complexe Ia-antigène

En première approximation, une image de l'association entre l'antigène et la molécule du CMH à la surface de la cellule peut être donnée par l'association antigène-anticorps. Si cette dernière procède d'une reconnaissance de forme complémentaires (liaisons de Van der Waals) lorsque l'antigène et l'anticorps ont des tailles comparables (Amit 86 ; Sheriff 87), en revanche, pour des

petits antigènes (haptènes, peptides), le modèle le plus évocateur est celui de la clef dans une serrure, l'antigène venant combler une cavité de l'anticorps. La nécessaire association entre un produit du CMH et un antigène à la reconnaissance par les cellules T, et le fait que les antigènes présentés étaient sélectionnés par la molécule du CMH, ont laissé supposer que son rôle était de fixer d'une manière spécifique l'antigène à présenter et que ce complexe serait la cible du récepteur des cellules T à l'antigène. (Benaceraff 78 ; Rosenthal 78). Cette hypothèse fut d'abord confirmée en montrant que des antigènes pouvaient entrer en compétition au niveau de la présentation par des CPA (Wederlin 82 ; Rock 83 ; Buus 86a)

La caractérisation biochimique du complexe Ia-antigène fut difficile. Il est apparu que l'antigène, avant de se fixer, devait être traité d'une manière obscure par la CPA. Puis le phénomène fut décrit expérimentalement. Une digestion protéolytique d'un antigène engendre des peptides qui peuvent être reconnus par des cellules T restreintes par la, sans aucune autre modification, après avoir été incubés en présence de CPA fixées ou de membranes plannes contenant des molécules Ia (Shimokevitz 83 ; Watts 84). Ces données établissent un solide support à l'idée qu'une digestion protéolytique intracellulaire est requise avant la présentation de l'antigène.

L'utilisation de peptides ne nécessitant pas cette étape de maturation a permis l'étude des interactions entre les molécules Ia et l'antigène. La fixation du peptide par les molécules Ia fut montrée de plusieurs manières par dialyse à l'équilibre (Babitt 85), par photomarquage (Phillips 86) et par filtration sur gel (Buus 86b). Cette dernière méthode permet, en outre, de montrer que le complexe peptide ovalbumine-I-A^d une fois formé, était très stable ($K_d \approx 3 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), mais que la vitesse de formation est aussi très lente ($K_a \approx 1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). De ces constantes cinétiques résulte la constante d'équilibre $\approx 2 \cdot 10^{-6}$.

La démonstration de la fixation d'un peptide par les molécules de classe I est beaucoup plus récente (Chen 1989 ; Bouillot 89).

1.3.2. La maturation de l'antigène

La maturation de l'antigène demeure un phénomène mal compris. Les peptides dérivés de protéines synthétisées intracellulairement stimulent préférentiellement les clones T restreints par les classe I tandis que les antigènes exogènes ayant été internalisés stimulent plutôt les clones T restreints par les classe II (Germain 86b). Il existe cependant des exceptions à cette affirmation. Des cellules T restreintes par les classe II sont stimulées

par des antigènes endogènes (Jacobson 84) tandis que des peptides dérivés d'antigènes solubles peuvent être fixés par des molécules de classe I et stimuler des clones restreints par les classe I (Staertz 87).

Les mécanismes moléculaires du trafic intracellulaire et de la maturation de l'antigène restent largement à découvrir. Les molécules de classe I et de classe II usent de voies différentes pour leur transport vers la surface membranaire ce qui pourrait expliquer leur préférence pour les antigènes internes et internalisés, respectivement (Morrison 86). Il a été montré que des fibroblastes transfectés et exprimant fortement une molécule de classe II peuvent présenter l'antigène à des cellules T. Cependant, il se révéla que leur capacité de présentation n'est pas totale et qu'ils sont incapables de présenter certains antigènes à moins qu'ils ne soit fournis en très grande quantité ou sous forme peptidique (Norcross 84 ; Malissen 84 ; Austin 85 ; Shastri 85 ; Blackman 88 ; Marrack 88). Les molécules de classe II ne sont donc pas suffisantes à faire une bonne CPA. Or, les molécules la sont associées dans le cytoplasme à une chaîne invariante non polymorphique Ii qui semble jouer un rôle important dans la maturation de l'antigène (Stockinger 89). De son absence dans certaines cellules transfectées pourrait résulter des déficiences dans la fonction présentatrice. Ceci est avancé avec prudence car il existe des doutes quant à l'exactitude des données rapportées dans ce papier.

Un rôle important a pu être aussi attribué aux protéases intracellulaires. Il confirme ainsi les hypothèses formulées à la suite de la découverte que des peptides issus de la digestion protéolytique de l'antigène pouvaient être présentés tels quels par les molécules la (Blum 1988).

2. Les molécules du CMH

2.1. Généralités

Les deux classes de produits du CMH diffèrent quant à leur structure. Les molécules de classe I sont constituées d'une chaîne lourde d'environ 45 Kd dont il existe de nombreuses variations alléliques. Celle-ci est glycosylée et traverse la membrane. Elle est associée de manière non covalente à une chaîne légère de 12 Kd, non polymorphe et non glycosylée, la β_2 -microglobuline qui n'est pas codée par le CMH. Les molécules de classe II sont constituées de deux chaînes α et β qui traversent la membrane. Elles présentent généralement un polymorphisme allélique prononcé. Mais certaines cependant font exception comme E_α ou DR_α .

Les premières études biochimiques de digestion par des protéases suggèrent que la chaîne lourde des classe I est composée de 3 domaines structuraux alors que les deux chaînes des classe II n'en comportent que deux chacune. Cette opinion fut confortée par la correspondance entre les exons des gènes codant pour ces molécules et ces domaines. C'est au sein des domaines α_1 et α_2 des molécules de classe I et au sein des domaines α_1 et β_1 des molécules de classe II que se trouve concentré l'essentiel de la variabilité. Les autres domaines ont une certaine ressemblance avec la région constante des immunoglobulines. Ceci permet de ranger sans ambiguïté les molécules du CMH dans la super-famille de gènes des immunoglobulines (Williams 88).

2.2. Structure de HLA-A2

2.2.1. Structure d'ensemble

A ce jour, une seule structure cristalline d'une molécule du CMH est disponible, celle de HLA-A2 (Bjorkman 87a). Elle est constituée de deux paires de domaines similaires du point de vue structural. α_1 a la même conformation que α_2 tandis que α_3 a la même conformation que la β_2m . Ces deux derniers domaines sont proximaux par rapport à la membrane tandis que les deux premiers forment le sommet de la molécule. La surface d'une coupe transversale du sommet de la molécule a les dimensions suivantes : $40\text{\AA} \times 50\text{\AA}$. Et la molécule fait environ 70\AA de long.

2.2.2. Structure de α_3 et de la β_2m

Les domaines α_3 et β_2m ont une structure composée de deux feuillets β anti-parallèles reliés par un pont disulphure. Cette structure est communément connue sous le nom de domaine Ig, même dans le cas de molécules n'ayant aucun rapport avec le système immunitaire comme la superoxyde dismutase, car elle avait été décrite pour la région constante des immunoglobulines (Marquart 82 ; Amzel 79). Elle était attendue du fait de l'homologie de séquence entre α_3 , β_2m et les régions constantes (Orr 79 a et b ; Tragardh 79). La structure de la β_2m humaine liée à HLA-A2 est, par ailleurs, similaire à celle du monomère libre de β_2m bovine (Becker 85).

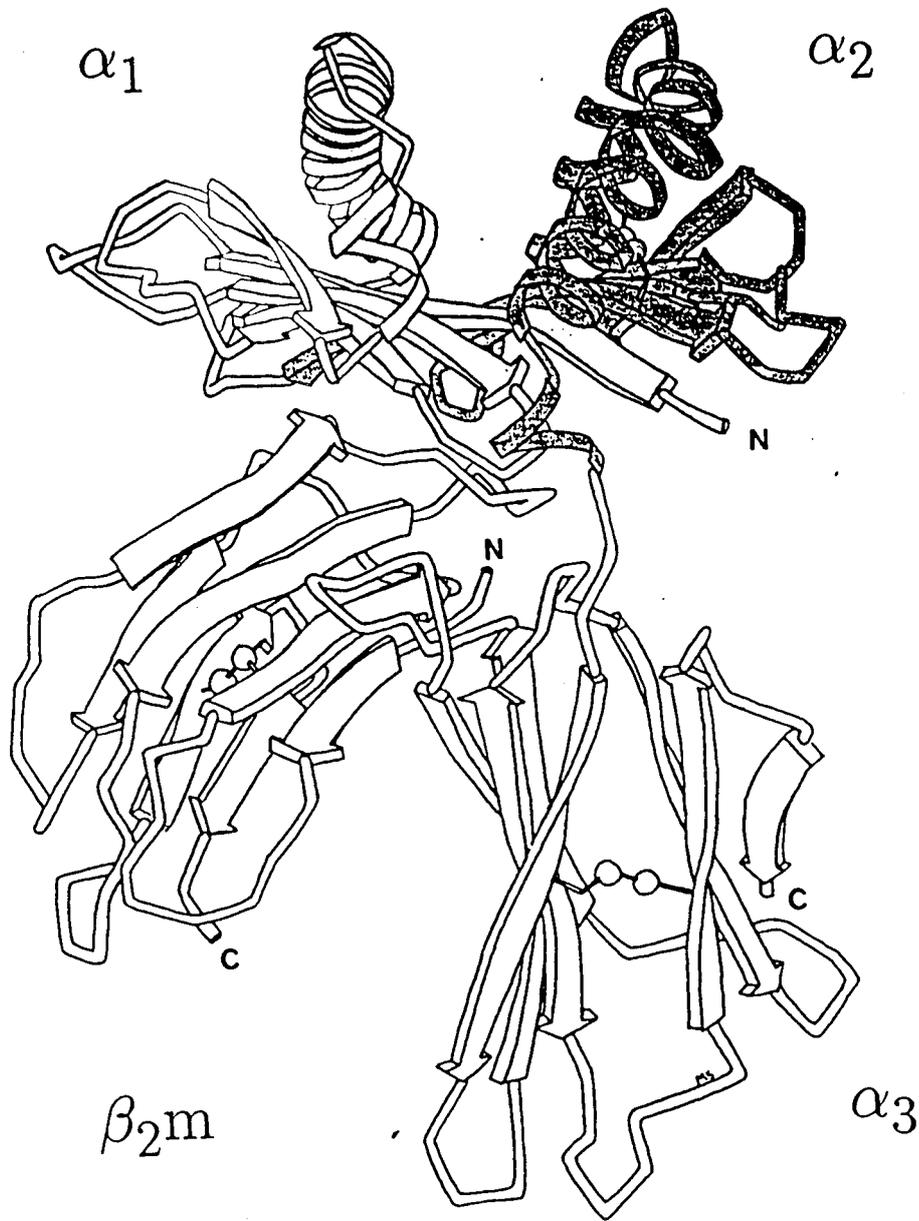


Figure 1 A : Structure d'ensemble de HLA-A2

Les quatre domaines de la molécule sont particulièrement bien visibles dans cette vue de profil. La membrane de la cellule présentatrice se situe vers le bas du schéma tandis que le site de fixation en occupe le haut. Cette orientation permet de distinguer particulièrement clairement les deux hélices des domaines α_1 et α_2 . La fosse de Bjorkman, site de fixation de l'antigène, apparaît entre les deux hélices.

2.2.3. Structure de α_1 et α_2

Les domaines α_1 et α_2 sont tous les deux constitués d'un feuillet β antiparallèle traversé par une longue région en hélice qui est C-terminale par rapport aux quatre brins β du feuillet. Dans la région en hélice α_1 , une courte hélice (50-55) précède une hélice incurvée plus longue (58-84). Ces deux hélices sont presque à angle droit ($\approx 110^\circ$). En α_2 , une courte hélice (138-148) précède une hélice plus longue (151-173) avec, entre les deux, un angle d'environ 130° . Cette hélice subit une déformation en 162. Une troisième petite hélice (177-181) relie α_2 à α_3 . Enfin, un pont disulfure relie au sein de α_2 , le résidu 101 dans le feuillet β au résidu 164 dans la longue hélice.

2.2.4. Contacts entre les domaines

Le contact entre α_3 et la β_2m se fait comme pour les immunoglobulines au niveau des feuillets β à quatre brins. Cependant, la géométrie de la liaison n'est pas la même.

Le contact entre les domaines α_1 et α_2 se fait à l'intérieur d'un vaste feuillet β constitué de 8 brins. Ce type de contact symétrique qui avait déjà été observé à l'intérieur d'une molécule, est appelé dimérisation intramoléculaire (McLachlan 1980). Mais ce type de structure a aussi été observée dans des dimères intermoléculaires, ce qui laisse penser qu'elle pourrait être conservée dans la structure des molécules de classe II (Reeke 75 ; Krause 87 ; Eklund 76)

2.3. Structure du site de fixation de l'antigène

2.3.1. Site de HLA-A2 (Bjorkman 87b)

- Position du site et description générale

Le site de fixation de l'antigène est constitué par le fossé formé par les deux régions en hélice des domaines α_1 et α_2 qui en délimitent les bords, et le plateau en feuillet β . Sa position au sommet de la molécule, sa taille et sa forme sont cohérentes avec sa fonction de fixation d'un antigène processé, comme un peptide par exemple. De plus, dans le cristal de HLA-A2, ce site contient une ou plusieurs molécules inconnues qui pourraient être un antigène peptidique. Enfin, la quasi totalité des acides aminés polymorphes se situent dans cette région.

Les acides aminés de cette région peuvent être classés en fonction de leur rôle probable. Les acides aminés au centre du plateau en feuillet β ainsi que ceux des hélices qui sont dirigés vers la poche, sont des ligands potentiels pour l'antigène. Les résidus qui sont dirigés vers le haut, interagiraient directement avec le récepteur de la cellule T. Cependant, les substitutions de ces résidus dans d'autres formes alléliques pourraient en changer l'orientation et leur donner un rôle dans la fixation de l'antigène. Enfin, les résidus accessibles au solvant dirigés vers l'extérieur n'ont sans doute aucune influence sur la fixation de l'antigène mais pourraient établir des contacts avec le récepteur T.

- Fixation du peptide

La forme du site de fixation du peptide de HLA-A2 laisse penser qu'un peptide fixé serait en contact avec la molécule sur trois de ses faces (le fond et les deux bords) plutôt que sur une seule. Le site contient un certain nombre de résidus polaires ou chargés ainsi que d'autres non chargés. De ce fait une stricte amphipaticité ne paraît pas requise pour la fixation. Suivant sa conformation, un peptides de 8 à 20 acides aminés de long aurait la place de se loger dans le site.

Une des extrémités du site est ouverte et pourrait laisser s'étendre vers l'extérieur des antigènes plus longs. L'autre extrémité a des résidus conservés qui pourraient permettre la reconnaissances de déterminants communs à tous les peptides pouvant être fixés par la molécule.

2.3.2. Structure hypothétique du site de fixation de l'antigène des molécules de classe II (Brown 88)

- Structure générale

Une analogie d'ensemble entre les structures des molécules de classe I et de classe II est suggérée par une similarité dans l'organisation génomique et en domaine (Kaufman 84), par une grande similarité des séquences du domaine C-terminale (Travers 84) et le fait qu'il existe des récepteurs T capables de reconnaître des molécules des deux classes (Rupp 85 ; Murrack 86). De plus, l'association des résidus N-terminaux des domaines α_1 et β_1 déduite des expériences de "hemi-exons shuffling" (Braunstein 87 ; Sant 87) est cohérente avec l'association des domaines α_1 et α_2 en dimère intramoléculaire observée dans la structure cristallographique de HLA-A2. Tout comme la molécule de classe I, cette molécule aurait un sillon à son sommet, situé

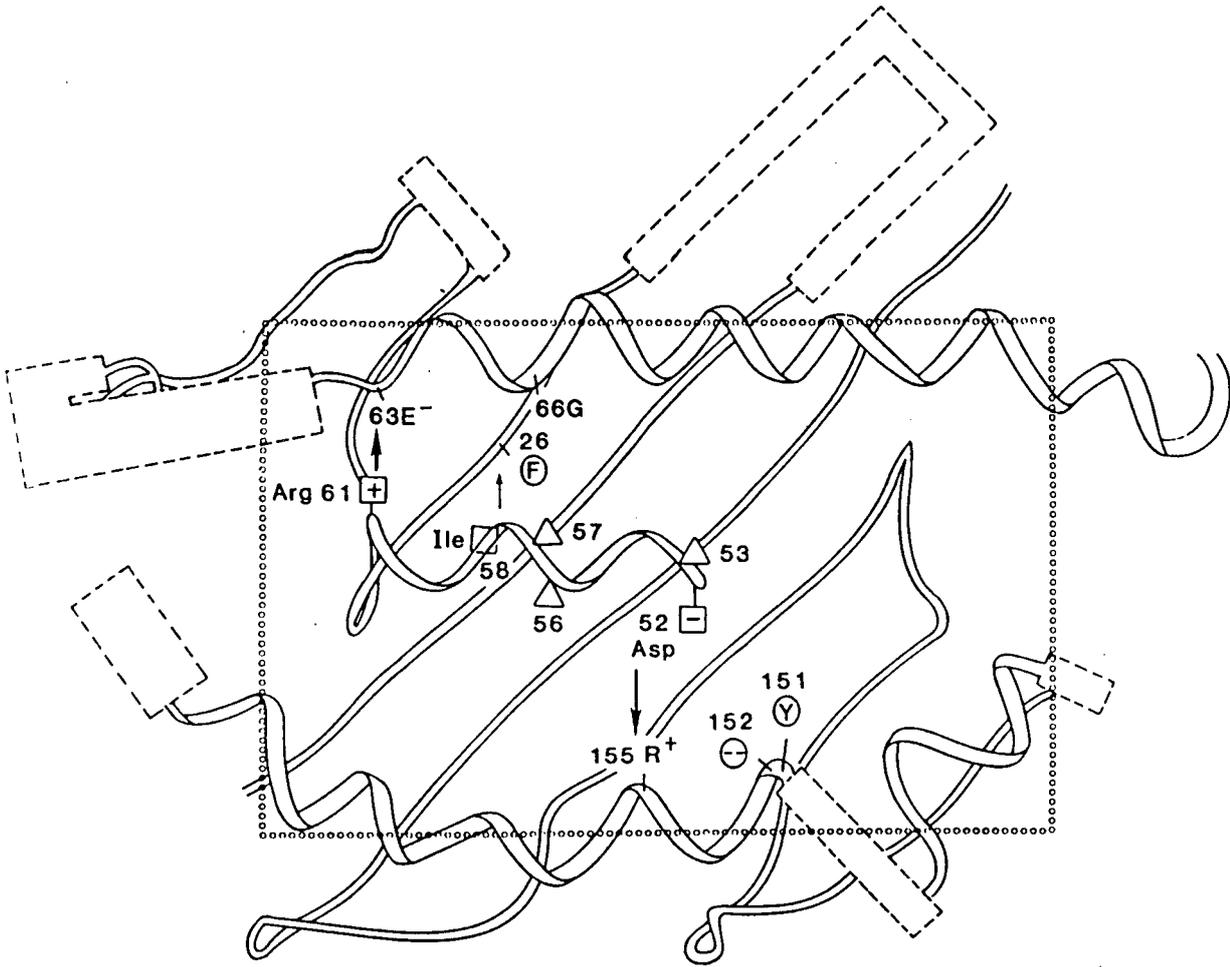


Figure 1B : Site de fixation de l'antigène selon le modèle de Brown.

Modèle de Brown pour le site fonctionnel de I-A^k vu de haut. La structure générale est celle de HLA-A2 qui disparaît derrière des rectangles en pointillés lorsqu'une différence de structure est attendue. Le peptide HEL52-61 est représenté dans le site dans une des conformations hélicoïdales possibles et compatibles avec le modèle proposé par Allen. Les acides aminés du peptide sont indiqués par des carrés lorsqu'ils interagissent avec la molécule de classe II et par des triangles lorsqu'ils forment des contacts avec le récepteur T. Le grand rectangle qui couvre l'ensemble a la taille de la surface de contact entre un anticorps et un antigène.

entre les deux hélices formées par la partie C-terminale des domaines α_1 et β_1 qui elles-même reposeraient sur un plateau en feuillet β constitué par les parties N-terminales de ces même domaines.

- Alignement des séquences

Il n'y pas d'homologie de séquence suffisamment significative entre les molécules de classe I et celles de classe II pour pouvoir établir une correspondance entre les premiers domaines de chacune des molécules. Le choix d'établir une correspondance entre les domaines α_1 des classes I et α_1 des classe II et entre β_1 et α_2 est tout d'abord fondé sur l'alignement des régions alléliques hypervariables. Il est de plus, favorisé par la présence du site glycosylation (Asn-X-Ser/Thr) en 86 (numérotation HLA-A2) qui est totalement conservé dans les séquences α_1 des classe I et II, et par la présence d'un pont disulphure entre les cystéines 101 et 164 qui se retrouve dans toute les séquences α_2 et β_1 .

- Hélices α

La présence d'hélices homogues à celles de HLA-A2 peut être déduite de la distribution des acides aminés conservés. Dans les régions en hélice de toutes les séquences de classe I, ils apparaissent tous les trois ou quatre résidus (α_1 : 68, 72, 75, 78, 84 et α_2 : 148, 153, 154, 157, 158, 161, 164, 165, 168) et forment une face des deux hélices α_1 et α_2 . Ces positions sont conservées dans les séquences α_1 et β_1 des classes II. Entre les positions conservées, se trouvent la majorité des résidus polymorphes des classe I. Cette répartition se retrouve dans les séquences de classe II. Cette homologie structurale est encore supportée par la conservation du pont salin $i, i+4$ (Arg157-Acide161) qui stabilise l'hélice et des Trp147 et Leu78 (numérotation HLA-A2).

- Régions β

Là encore, il est possible d'aligner la distribution des résidus polymorphes entre les séquences de classe I et celles de classe II. La période 1 sur 2 de cette distribution est celle que l'on peut attendre d'un feuillet β où les résidus alternent de part et d'autre du plan. Les deux ponts salins His3-Asp29 et Arg111-Asp129 sont aussi conservés dans toutes les séquences de classe I

et de classe II et se trouvent dans les deux cas à la même distance du premier résidu polymorphe.

3. Le pont : l'étude des relations structure-fonction des molécules de classe II

Il existe plusieurs revues récentes sur ce sujet (McKean 89 ; Germain 86 ; Kourilsky 89 ; Glimcher 87)

3.1. Les outils

3.1.1. Le transfert de gène

Le clonage des gènes de classe II a permis l'analyse des relations structure-fonction. Auparavant, très peu d'information était disponible sur ce sujet. Le plus gros obstacle à cette étude était la difficulté à obtenir une quantité suffisamment importante de protéine purifiée en vue d'une étude biochimique conventionnelle.

En 1983, plusieurs équipes rendirent compte de la transfection et de l'expression stable des gènes de classe II humains ou murins, dans des cellules L murines ou dans des lymphome B murins portant d'haplotypes incompatibles (Germain 83 ; Rabourdin-Combe 83 ; Folsom 84 ; Malissen 83). Les chaînes α et β (clones génomiques ou cDNA) ainsi qu'un gène codant pour un marqueur de sélection (thymidine kinase, xanthine-guanine phosphoribosyl transferase) sont transfectés dans la cellule-cible par précipitation au phosphate de calcium ou par fusion de sphéroplast. Les transformants sont isolés en cultivant les cellules dans un milieu sélectif approprié. L'expression de surface requiert la transfection des deux gènes α et β , mais est indépendante de la transfection de la chaîne li. La population obtenue après sélection a un niveau d'expression faible. Celui-ci peut être notablement augmenté grâce à des tris successifs par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter).

Analysées selon des critères biochimiques et sérologiques, les molécules exprimées se sont révélées normales. Les cellules L se sont en outre, révélées capables de présenter l'antigène aux cellules T bien que certaines lacunes, imputables à des défauts de maturation ou à l'absence de molécules accessoires, aient pu être observées (Malissen 84 ; Lechler 85).

3.1.2. La recombinaison *in vitro*

Il n'existe qu'un seul mutant spontané des molécules de classe II murines, le mutant bm12. Ses caractéristiques de reconnaissance par des anticorps ou par des cellules T sont significativement altérées. Le séquençage de bm12 montra que la mutation consiste en la substitution de trois résidus, (67, 70, 71), sur la chaîne A_{β}^b .

Les techniques de la mutagénèse chimique furent employées. Elles consistent à traiter des cellules de lymphome B avec de l'éthylméthane sulfonate. Une sélection négative est faite en marquant ces cellules avec un anticorps plus complément ; elle est suivie d'une étape de sélection positive par marquage avec un autre anticorps dirigé contre un autre épitope. Cette technique, si elle représente un indiscutable progrès par rapport à l'étude des mutants spontanés, a des limites (faible nombre de mutants obtenus, répartition aléatoire des sites de substitutions, sélection sur des critères sérologiques). Les techniques de l'ADN recombinant sont certainement l'outil le plus puissant que l'on puisse imaginer en vue de la création de mutants. Ils permettent de produire deux grandes catégories de mutants. Il est possible, d'une part, d'échanger entre deux molécules des fragments homologues (expérience d'*exon* ou *hemi-exon shuffling*). L'autre catégorie de mutations est obtenue par mutagénèse dirigée. Un codon d'un gène est remplacé par un autre codon que l'on trouve dans un autre haplotype de la molécule ou par tout autre codon. Par cette technique, il est possible de créer des ensembles cohérents et importants de mutant permettant une analyse systématique. Ainsi, par exemple, tous les résidus différents d'un haplotype à l'autre peuvent être interchangeés systématiquement (Landais 86). Ou bien encore, à une position particulièrement critique, les 20 acides aminés peuvent y être placés afin de mieux apprécier les caractères physico-chimiques du résidu responsable de l'effet (Landais 88).

3.2. Principaux résultats

3.2.1. Remarques préliminaires

Avant de rentrer dans le détails des résultats, il convient de faire quelques remarques préliminaires. La maîtrise croissante des techniques de recombinaison *in vitro* permet une production massive de mutants. Bien que le nombre d'équipes maîtrisant ces techniques soit restreint, bien que les mutations aient été majoritairement faites sur deux molécules (I-A et I-E), le nombre des données publiées est impressionnant.

En effet, outre le fait que le nombre des mutants ayant été produits en trois ans commence à être conséquent, il faut remarquer qu'un même mutant peut être analysé de plusieurs manières.

Une première analyse est le marquage par des anticorps. Une deuxième analyse consiste à tester la capacité de la molécule mutée à présenter l'antigène à des hybridomes ou des clones T. Ici, une grande abondance de données peut être obtenue en utilisant différents antigènes et plusieurs récepteurs T par antigène. Enfin, une troisième manière de tester les mutants est de mesurer leur capacité à stimuler des clones T alloréactifs.

3.2.2. Analyse du mutant A_{β}^{m12}

La lignée B6.C-H2^{bm12} possède une mutation naturelle sur le gène de la chaîne A_{β} . Elle est constituée de trois substitutions en position 67, 70, et 71. Cette mutation a des effet sur le niveau d'expression en surface de la molécule. Le mutant s'exprime moins abondamment que la molécule A^b . Les caractéristiques sérologiques et les capacités de présentation sont aussi affectées par la mutation.

En vue de déterminer les résidus responsables de ces changement un ensemble de mutants ponctuels a été construit (Ronchese 87). Toutes les permutations entre les trois acides aminés ont été réalisées.

L'étude du niveau de transcription des gènes transfectés a permis de montrer qu'à niveau de transcription égale, le mutant est moins exprimé en surface. La mutation a donc un effet sur l'assemblage de la molécule ou sur son transport vers la membrane.

C'est la mutation en position 70 qui est responsable du changement des caractéristiques de marquage par les anticorps monoclonaux.

Des présentations à des hybridomes T dirigés contre divers antigènes dans un contexte A^b ont été effectuées. 3 hybridomes sur 6 ne présentent aucune réactivité contre aucun mutant. Pour les trois autres les résidus 67 et 70 semblent d'égale importance. Un hybridome dirigé contre l'ovalbumine et qui n'est stimulé par aucun mutant, présente toutefois une forte alloréactivité lorsque les mutants possède un résidu b en 70 et bm en 71.

3.2.3. Description des mutants de A_{α}

Le séquençage de chaînes A_{α} d'haplotypes différents (Landais 85), il est apparu que le polymorphisme était concentré dans 3 régions hypervariables.

Landais a construits des chaînes A_α chimériques qui possèdent des régions hypervariables d'haplotype k ou b. Les 8 chimères correspondant aux 8 combinaisons possibles ont été réalisées (Landais 86).

Ultérieurement, sur une chaîne d'haplotype k, il a été procédé à des substitutions ponctuelles dans les régions hypervariables II et III. Dans ces deux régions, chacun des résidus différant entre k et b, a été remplacé par le résidu de l'haplotype b (Pierres 89).

L'importance du résidu 75 a conduit à poursuivre les substitutions à cette position de manière à tester une quinzaine d'acides aminés (Landais 88).

3.2.4. Analyses des mutants de A_α

Ces mutants ont été analysés de trois manières différentes.

- par marquage avec des anticorps monoclonaux

Les anticorps monoclonaux (mAb) ont été un outil particulièrement précieux dans les premières études des relations structure-fonction des molécules Ia. Ils sont capables de bloquer de manière sélective la réponse Th, ils ont permis de montrer que certains antigènes étaient présentés par I-A ou par I-E, que les deux chaînes α et β étaient impliquées dans la restriction et que les cellules Th peuvent distinguer plusieurs épitopes sur les molécules Ia. L'analyse par des mAbs de mutants doit permettre une description plus fine des épitopes résultant du polymorphisme.

Les chaînes A_α chimériques ont été analysées par deux groupes de mAbs, une dirigées contre A_α^k et une contre A_α^b , nommés G_k et G_b respectivement. De là, il ressort que ahvIII détermine la reconnaissance par les membres du groupe G_k . De même, les anticorps de G_b réagissent contre une structure déterminée par ahvII.

Cette analyse a été complétée par celle des mutants K57[S], K75[G], B57[R], B75[E]. Il a pu être montré que G_k reconnaît uniquement le Glu75 puisque k n'est pas reconnu alors que B est reconnu normalement. En revanche, seul un anticorps sur six de G_b perd sa réactivité contre B57[R] sans toutefois en gagner une contre K57[S]. Les cinq autres ne sont pratiquement pas affectés par les mutations ponctuelles en 57 ou 75.

- par présentation de l'antigène

Présentation du HEL

Les molécules chimériques ont été testées pour leur capacité à présenter le HEL à 13 hybridomes T (Rosloniec 89). Ces hybridomes reconnaissent différents peptides (35-45, 46-61, 76-96, digest tryptique, HEL natif processé par l'APC) dans un contexte A^k . Aucun ne présente une réaction détectable dans un contexte b ou avec $A_\alpha^b A_\beta^k$ et $A_\alpha^k A_\beta^b$.

L'intégrité de la région ahvIII est nécessaire à la présentation. Réciproquement, la présence seule de cette troisième région d'haplotype k, suffit parfois à restaurer une faible réponse dans un contexte b. Les mutations affectant les deux premières régions ont des effets très variables selon les clones T. Certains ont leur réponse totalement éteinte alors que d'autres seront non affectés.

Présentation de l'insuline

L'insuline bovine (BI) a été présentée à des hybridomes T obtenus après immunisation de souris F1(B.10xB10.BR) avec la BI. Trois de ces hybridomes réagissent aussi à un analogue de la BI, la PI (insuline de porc). Il a pu être montré que la présentation est effectuée par la molécule d'haplotype mixte $A_\alpha^b A_\beta^k$, mais pas par A^k ou A^b .

Deux hybridomes réagissent à toutes les molécules chimériques comme si la présence de résidus b dans l'une quelconque des trois régions était suffisante à la reconnaissance.

Mais un troisième hybridome, en réagissant différemment, laisse penser que la réponse dépend des résidus b dans chacune des deux régions ahvII et III. Ceci tend à être confirmé par l'étude de la présentation par les mutants ponctuels de ahvII. B56[A] est une très mauvaise présentatrice tandis que les mutations en position 53 et 57 n'ont pas d'effet sur la présentation (Reske-Kunz 89).

Conclusion

Le schéma permettant l'interprétation idéale serait que, pour un antigène donné, certaines mutations affectent la présentation à tous les hybridomes, tandis que d'autres mutations n'auraient d'effet qu'avec certains hybridomes. Les premières mutations impliqueraient des résidus participant aux interactions responsables de la fixation du peptide, alors que les secondes affecteraient des interactions spécifiques de la fixation d'un TcR.

La diversité des résultats obtenus par Reske-Kunz ne permet aucune inter-

prétation globale plus fine que l'importance des deux régions ahvII et III pour la présentation. Les résultats de Rosloniec laissent penser que ahvIII est responsable de la fixation de l'antigène. Ce résultat, s'il est confirmé par une étude biochimique de la fixation de l'antigène, aurait une certaine portée puisqu'il paraît s'appliquer à tous les peptides antigéniques HEL testés dans cette expérience.

3.2.5. Etude de A_{β}

D'une manière comparable à ce qui a été fait sur la chaîne α , une étude des résidus polymorphes de la chaîne A_{β} a été menée (Buerstedde 88). Des mutants de A_{β}^k ont été réalisés qui portent les résidus de l'haplotype d sur 14 acides aminés polymorphes. Les mutations en positions 63 et 65-67 abolissent toute reconnaissance par des mAbs A_{β}^k spécifiques. Deux anticorps A_{β}^d spécifiques reconnaissent un mutant qui ne porte un résidu d qu'en position 40. Les autres positions n'avaient pas d'influence sur la reconnaissance par les anticorps testés.

3.3 Conclusion

De ceci il ressort plusieurs points. Tout d'abord, la reconnaissance par les anticorps des différents mutants montre qu'un résidu unique joue un rôle central, les autres n'ayant qu'une influence secondaire. Elle ne donne donc qu'une image simpliste de la reconnaissance par la cellule T. Celle-ci est beaucoup plus complexe puisque toutes les ahv ont une importance non négligeable et que la restauration de réactivité est exceptionnellement observée. La complexité des résultats obtenus en alloréactivité n'a rien à envier à celle des résultats de présentation conventionnelle. Il n'est généralement pas possible de dégager pour l'une ou l'autre des régions une fonction de fixation de l'antigène. L'étude des mutants ponctuels donne des résultats compatibles avec ceux des chaînes chimériques. Certains résidus ont cependant des importances très variées, les plus importants étant 56, 59, 69, 70. Enfin, le résidu 75, essentiel pour la reconnaissance par les anticorps, n'affecte en rien, ou presque, celle par les cellules T, soulignant ainsi la grande différence entre ces deux phénomènes.

4. Validité du test de présentation de l'antigène

4.1. Les deux modes de fixation de l'antigène par les molécules de classe II

4.1.1. Etude par radiomarquage

La fixation de l'antigène sous forme peptidique par les molécules de classe II a été mise en évidence à l'aide de molécules solubilisées et purifiées (Babbit 85, Buus 86b, Guillet 87, Watts 86, Luescher 88). Jusqu'à une date récente, il n'avait pas été possible de montrer biochimiquement la fixation d'un peptide à un antigène de classe II sur des cellules vivantes. Cette démonstration n'avait été qu'indirecte par la capacité des CPA à présenter l'antigène de manière spécifique à des cellules T.

La fixation d'un peptide radiomarké (matrice du virus de l'influenza 17-29) au produit de classe II humain HLA-DR porté par une lignée de cellule B vivante a été décrite récemment (Ceppellini 89). Ce type de fixation s'est révélé sensiblement différent de la fixation à des molécules en solution. L'affinité de cette fixation n'a pas pu être déterminée avec précision mais semble comparable à celle décrite pour les molécules en solution. En revanche, la cinétique du phénomène est beaucoup plus rapide puisque le maximum de la fixation est atteint après 45 min d'exposition à l'antigène. La fixation de ce peptide aux mêmes cellules ayant subi une fixation par le glutaraldehyde s'effectue en 18 heures, atteignant ainsi des valeurs connues. Il a pu aussi être montré lors de ce travail, que la fixation de ce peptide n'est pas spécifique de sa molécule de restriction DR1. Les molécules HLA-DR de tous les haplotypes fixent le peptide, mais DR1 le fixe mieux que les autres.

4.1.2. Etude par activation de clones T

Une étude du même genre que la précédente avait déjà été conduite (Roosnek 88). Une étude cinétique précise de la formation du complexe Ia-Ag avait pu être menée en prenant comme test de formation la concentration intracellulaire de Ca^{2+} des cellules T excitées au contact des CPA. Le système antigénique choisi était la présentation de la toxine tétanique (TT) et les cellules présentatrices choisies étaient des clones B anti-TT immortalisés par transformation par l'EBV. L'antigène a été présenté sous deux formes, native et peptidique. Dans le cas de la présentation sous forme native de l'antigène, un temps de latence d'une heure environ est observé avant que l'excitation des cellules T puisse être détectée. Dans le cas de la présenta-

tion sous forme peptidique, l'excitation est immédiate.

Une remarque doit être faite. Le temps de latence ne dépend pas de la concentration d'antigène utilisée et le taux de réponse des clones T est aussi relativement indépendant de cette concentration dans le cas d'une présentation d'antigène sous forme native. Au contraire, la cinétique de fixation du peptide est étroitement liée à sa concentration et aucune réponse ne peut être observée lors d'une présentation de peptide si la molarité de celui-ci est équivalente à celle utilisée lors d'une présentation de l'antigène sous forme native.

4.2. La circulation des molécules Ia

Une étude détaillée des molécules Ia intracellulaires a été publiée récemment (Harding 89). Deux types de CPA ont été étudiés, TA3, un hybridome B et des macrophages péritonéaux notés PEC. Dans les deux cas, entre 20 et 40% des molécules Ia sont intracellulaires et ce taux ne dépend pas de la synthèse des protéines. Cependant, lorsque que les PEC sont adhérents ce taux chute entre 2 et 11%.

La maturation du HEL induit un temps de latence de 15-20 min. pour les PEC et de 30-40 min. pour TA3. Afin de savoir si les molécules I-A nouvellement synthétisées ont un rôle particulier dans la maturation, les cellules ont été traitées au cycloheximide avant la présentation. Ce traitement n'a aucune influence sur la capacité de présentation de TA3 mais est tout à fait critique pour celle des PEC adhérents.

Une internalisation des molécules I-A de surface a pu être mise en évidence. Des cellules sont marquées par un anticorps iodé anti-I-A à 4°C. Puis, après avoir été placées à 37°C, elles sont lavées dans un tampon acide après des temps variables. Une mesure de la radioactivité résiduelle donne une indication du taux de molécules ayant subi une internalisation. Les deux types de cellules se comportent de la même manière, l'internalisation commence à être détectable après 3 min. et atteint une phase en plateau après 10 min. avec une valeur située entre 15 et 35% des anticorps totaux ayant été fixés sur les cellules. Une fractionnement des organites subcellulaires sur gradient de Percoll a montré que ces molécules se trouvent dans un compartiment vésiculaire qui se comporte comme les endosomes légers où se trouve la transferrine.

4.3. La maturation des peptides antigéniques

L'opinion courante concernant la maturation de l'antigène est qu'elle consiste en la dégradation sous forme peptidique de protéines natives. En conséquence, si le peptide reconnu par les cellules T peut être identifié grâce au critère de présentabilité par des CPA fixées, il est considéré comme la forme mûre et parfois même minimale de l'antigène et il est admis qu'il ne subira pas de transformation intracellulaire. Or, il semble que les faits ne soient pas si simples (Fox 88).

Le peptide 93-103 du cytochrome c de pigeon peut être présenté sans maturation à des cellules T dans un contexte $E_{\alpha}^k E_{\beta}^k$ ou dans un contexte $E_{\alpha}^k E_{\beta}^b$. Deux analogues de ce peptides différant à la position 95 ont été étudiés et sont notés 95I et 95Y. En utilisant comme CPA des cellules spléniques vivantes 95I s'est révélé être mieux présenté que 95Y dans le premier contexte et inversement dans le second où 95Y s'est révélé meilleur. Si la même expérience est menée en utilisant les mêmes CPA préalablement traitées au paraformaldehyde, 95I se révèle mieux présenté dans les deux contextes. Sans qu'il ait été possible de préciser la modification à l'origine de ce curieux phénomène, il est clair que ces peptides ont subi une étape de maturation avant d'être présentés par les CPA vivantes.

4.4. Conclusion et conséquences

Bien que la fixation des peptides sur des molécules purifiées ou sur des cellules fixées soit reconnue comme modèle du phénomène biologique, les quelques observations citées dans les paragraphes précédents ne peuvent qu'inviter à la prudence et à la méfiance. Le chargement des molécules de classe II dans une situation biologique normale est considérablement plus rapide et plus efficace que le chargement biochimique largement étudié jusqu'ici. Il se pourrait qu'il ait lieu dans un compartiment intracellulaire et non pas en surface. Il est impossible aujourd'hui d'expliquer la différence entre ces deux phénomènes. Elle pourrait résulter simplement des conditions physico-chimiques dans lesquelles la fixation s'effectue ou de phénomènes originaux non encore décrits permettant un chargement actif. Il est difficile ici, de ne pas se souvenir de la chaîne invariante dont l'importance cruciale a pu être mise en évidence, que l'on sait physiquement associée aux molécules de classe II intracellulaires mais dont la fonction reste encore totalement inconnue.

Ainsi, bien que l'étude de la fixation biochimique de peptides aux molécules de classe II ait donné des résultats très cohérents avec des observations

biologiques, il faut souligner la distance qui sépare ce phénomène de la fixation *in vivo*. Il s'agit en quelque sorte d'un forcing thermodynamique qui dans certains cas se révèle n'être qu'un aspect du phénomène biologique qui, lui, commence à peine à être décrit et pris en considération.

Les transformations intracellulaires de l'antigène sont généralement appelée maturation et par extension est appelé maturation tout ce qui se passe spécifiquement dans la cellule vivante. Il peut être bon de noter que cette extension pourrait être abusive et induire en erreur. Ainsi les observations de Fox furent attribuées au processus de maturation. Peut-être indiquent-elles plutôt l'effet du chargement *in vivo* de la molécule la ?

Chapitre II

Travail expérimental

1. Mutagénèse de la région en hélice

1.1. Objectif du projet

Fin 87, la situation était la suivante. Les résidus polymorphes avaient été étudiés individuellement, presque exhaustivement. Des résultats très esthétiques avaient été obtenus à l'aide des anticorps monoclonaux puisque pour un certain nombre d'entre eux dont la spécificité résidait en Glu75, des pertes totales et des gains de réactivité avaient pu être obtenus en ne substituant que le résidu 75 (Landais 86). En revanche, l'étude de la reconnaissance par le récepteur T était moins avancée. Les premiers résultats laissaient néanmoins apparaître un degré de complexité supérieur. En particulier, il devenait clair qu'il ne serait pas possible d'attribuer tel ou tel type de réactivité à une portion étroite de la molécule. Au contraire, la reconnaissance apparaissait comme un phénomène impliquant l'ensemble des deux régions polymorphes ahVII et III ; et à l'intérieur de celles-ci, les acides aminés avaient des importances très différentes les unes des autres.

La publication, fin octobre, de la structure de HLA-A2 éclaira d'un jour nouveau ces études (Bjorkman 87a et b). Elle permettait de donner une interprétation partielle des données précédentes. Les résidus formant la région en hélice pouvaient être classés en deux catégories. Certains dirigés vers la poche devaient interagir avec le peptide fixé et les autres pointant vers l'extérieur de la molécule devaient former des contacts avec le récepteur T. La complexité de la présentation pouvait résulter du fait que, lors d'une présentation, beaucoup plus de résidus sont impliqués puisque participent au phénomène à la fois ceux qui sont responsables de la fixation du peptide et ceux responsables des interactions avec le TcR. Lors de la reconnaissance par un mAb, il est vraisemblable que seuls les derniers ont de l'importance, les premiers étant peu accessibles.

Mais surtout, une approche tout à fait nouvelle de la question des relations

structure-fonction devenait possible. Jusque là, seul le polymorphisme qui avait une importance fonctionnelle établie, avait servi de ligne directrice. Or, il devenait clair qu'à lui seul, le polymorphisme ne rendait pas totalement compte de la fonctionnalité de la molécule. En faisant l'hypothèse que la structure de HLA-A2 était grossièrement exportable aux molécules de classe II, il devenait possible de donner un fondement structural à ce type d'études. Puisqu'il se révélait vain de chercher à attribuer à un ou deux résidus polymorphes une réactivité T, une exploration systématique d'une région structurale pouvait être entreprise. Elle devait permettre d'infirmer, ou de valider, voire de préciser le modèle fonctionnel proposé par Bjorkman.

Le travail qui va être décrit a été commencé début novembre 87, immédiatement après la publication de la structure de HLA-A2. Son objectif initial fut de fournir un support expérimental au modèle fonctionnel proposé par Bjorkman. La série des 30 mutants qui va être décrite, a été développée sur la base d'un modèle structural. Aujourd'hui encore, elle demeure unique de ce point de vue. Elle s'est révélée, depuis, un outil précieux puisqu'elle a permis de répondre à une question importante surgie récemment dans le débat immunologique.

1.2. Détermination de la région à muter

Par un raisonnement identique à celui exposé par Brown six mois plus tard (Brown 88), une correspondance entre les domaines α_1 de HLA-A2 et de I-A* avait été établie. A l'intérieur de ce dernier, la région en hélice est la structure qui a la plus grande importance fonctionnelle. L'extrémité C-terminale est assez facile à déterminer du fait du site de glycosylation (Asn81-Ser82-Thr83). Les résidus basiques Lys79-Arg80 qui sont bien conservés parmi les molécules de classe II et qui marquent statistiquement la fin d'une hélice (Chou 74, Richardson 88), viennent confirmer cette hypothèse. L'extrémité N-terminale est moins "visible". La rupture introduite par la Pro50 pouvait la préciser. Elle pouvait marquer le repliement qui permet de passer des feuillets β à l'hélice α . Pro-Glu constitue aussi un très bon début d'hélice mais que cette séquence soit précédée d'une Leu est statistiquement peu probable au début d'une hélice (Richardson 88). Bien qu'incertaine, cette limite permettait d'inclure les deux régions ahvII et III dans la zone en hélice ce qui était assez logique du point de vue fonctionnel. Par ailleurs, entre 50 et 79, il y a trente résidus et leur mutation successive commence à devenir une entreprise d'une taille sérieuse qu'il était sage de ne pas exagérer.

Cette extrapolation de la structure de HLA-A2 à celle de A^k a été, ultérieurement, abondamment détaillée sur la base d'autres arguments (Brown 88).

1.3. Détermination des mutations

Après avoir délimité la probable région en hélice de α_1 , une réflexion sur la manière la plus juste de procéder à son exploration systématique s'imposait. La méthode qui semble la plus naturelle est de substituer tour à tour chacun des acides aminés de la région en tentant de conserver la conformation de la structure. L'hypothèse de travail lors d'une étude des relations entre structure et fonction est : si une réactivité est altérée, sachant que la structure est conservée, l'altération est imputable à la destruction d'une liaison essentielle à la réaction. Cette hypothèse sera discutée plus loin.

A ce stade, un obstacle majeur apparaît, le manque de connaissance des phénomènes déterminant la structure des protéines. Même pour la structure secondaire la plus simple, et sans doute la mieux décrite (Barlow 88), il n'existe aucune règle permettant d'assurer que telle séquence adopte une structure en hélice α . Rien ne prouve d'ailleurs qu'une telle règle existe (Kabsh 84 ; Wilson 85). Les modèles de prédiction de structure atteignent avec peine des scores de 60% de succès de prédiction et ce chiffre semble devoir plafonner pendant de nombreuses années encore du fait du trop petit nombre de structures connues (Rooman 88). Il n'est donc pas possible de vérifier par le calcul que les mutations envisagées préservent la structure en hélice.

Cependant, il semble la structure en hélice est, en quelque sorte, la plus naturelle de celle que peut adopter une chaîne polypeptidique en contact avec l'eau (Bierzynski 82 ; Kim 84 ; Jimenez 87 ; Shoemaker 87). C'est une structure dont la cohésion semble fortement influencée par les résidus situés à ses extrémités (Presta 88 ; Richardson 88). En conséquence, il paraît très probable de parvenir à conserver la structure en hélice en substituant les acides aminés par un résidu aussi neutre que possible, n'ayant aucune propriété particulière autre que celle d'être un acide aminé. L'acide aminé répondant le mieux à ces critères est l'Ala. C'est d'ailleurs statistiquement un des plus abondants dans les hélices α (Chou 74 ; Richardson 88 ; Argos 87). Des données récentes viennent toutefois jeter quelques doutes sur ce point. Il n'est plus tout à fait certain que l'Ala soit l'acide aminé le plus adapté à la formation des hélices (Padmanabhan 90). Lorsque l'acide aminé à substituer était déjà une Ala dans la séquence de A_α^k (en 53 et 68), il a été rem-

placé par une Val, l'acide aminé répondant le mieux aux critères énoncés après l'Ala.

1.4. Choix d'une méthode de mutagénèse

Les critères qui présidèrent au choix de la technique de mutagénèse furent la fiabilité, la rapidité et le coût. La fiabilité consiste dans ce cas à éviter toutes les techniques susceptibles d'introduire des mutations en dehors de la zone de travail. Pour cela, il est préférable d'éviter l'emploi d'ADN simple brin (Hutchinson 78) dont le doublement peut toujours introduire des erreurs. Une technique dérivée de la mutagénèse par cassette est plus sûre car elle limite au maximum les manipulations sur l'ADN et que toutes les manipulations portent sur une zone restreinte du plasmide. Il est donc possible de vérifier le plasmide muté avant emploi en le séquençant sur toute la région manipulée.

La mutagénèse par cassette (Wells 85) permet une procédure rapide car le nombre des opérations est petit (une ligation-transfection, une "miniprep" de plasmide, un séquençage). Le nombre de sites de restriction uniques dans la zone de travail et leur position auraient rendu possible la mutagénèse par cassette. Un rapide calcul montre cependant, qu'en dépit de la rapidité et de la simplicité qui aurait résulté du choix de cette technique, son coût aurait été prohibitif car elle aurait nécessité la synthèse de 60 oligonucléotides de longueur importante.

La "Shot gun gene synthesis" est une alternative qui consiste à découper le fragment entre les deux sites de restriction utilisés en une série d'oligonucléotides chevauchant dont l'assemblage permet de reconstituer la séquence de la molécule non mutée (Grundström 85). La mutation s'introduit en remplaçant une paire d'oligonucléotides par une autre paire portant elle, la mutation. La ligation de tous ces oligonucléotides et du vecteur est évidemment beaucoup plus délicate que celle d'une paire d'oligonucléotides à un vecteur. Mais l'économie qu'elle permet de réaliser est appréciable.

2. Analyse du site de fixation de l'antigène

2.1. Par "*epitope mapping*"

2.1.1. Objectifs

Cette expérience poursuit deux objectifs. Tout d'abord elle consitue le seul contrôle que la chaîne A_α n'a pas subi de déformations majeures du fait des mutations introduites. Si tel est le cas, les pertes de réactivité des mAbs doivent être localisées et spécifiques de l'anticorps. Trois groupes d'anticorps ont été utilisés : deux anticorps anti- A_β (F35 et 40B), des anticorps anti- A_α dont la fixation est profondément altérée par une mutation en position 44 (2A2 ; 1E9 ; 3G2 ; 3F12) (nommés par la suite anti44) et enfin des anticorps sensibles à la mutation Glu->Gly en 75 (H116-32 ; 39J ; 39C) (nommés par la suite anti75). Tous ces anticorps ont déjà été utilisés par Landais pour l'analyse des mutants ponctuels en position 75 (Landais 88). Les anticorps du premier groupe ne devraient logiquement pas être affectés par les mutations introduites. Ceux du troisième groupe ne devraient être affectés que par des mutations autour de 75. Quant à ceux du second groupe, il n'est pas possible de prédire quel sera leur comportement. Ils pourraient être totalement insensibles aux mutations introduites ou bien avoir une réactivité modifiée lorsque les mutations affectent des résidus spatialement proches de 44.

Outre le contrôle, la reconnaissance de cette série de mutants par des mAbs pouvait être riche d'information sur la structure fine des épitopes reconnus. La structure révélée pouvaient, en sus, apporter localement des confirmations de la structure en hélice de cette région de la molécule.

2.1.2. Résultats

Détaillés dans (Peccoud, sous presse), il est possible de les rappeler succinctement.

Aucun changement de réactivité n'a pu être observé pour les deux anticorps anti- A_β (F35 et 40B).

2A2 donne des résultats assez subtiles et compliqués, marqués par deux gains de réactivité en 58 et 68. Trois mutations provoquent une baisse sensible de réactivité : 61, 65, 71. Il est à noter enfin qu'aucune mutation n'entraîne d'absence totale de réactivité. Les autres anticorps du même groupe donnent des résultats similaires (données non figurées).

Le profil des résultats obtenus avec les anti75 est nettement plus simple. La mutation en 75 provoque une perte totale de réactivité pour les trois anticorps. En 79, une forte diminution est mise en évidence pour les trois membres du groupe. H116-32 est aussi sensible à la mutation en position 61. Enfin, 39C est fortement sensible à la mutation en 78.

2.1.3. Interprétation

- Figure

La figure 2 correspond à la représentation idéalisée d'une hélice α de périodicité 3,5. Une telle hélice permet de définir 7 secteurs d'orientation. Sur ceux-ci, les résidus de la zone hélicoïdale, de 59 à 79, du modèle de Brown ont été placés.

- Marquage par les anti- A_{β}

La non sensibilité de ces anticorps aux mutations pouvait être attendue. Elle indique que les mutations introduites n'empêchent pas l'expression de surface des molécules de classe II transfectées et que la chaîne β ne subit pas de changements de conformation globaux dans les molécules mutantes.

- Marquage par les anti75

La perte de réactivité en 75 est cohérente avec les résultats déjà publiés (Landais 86 ; Landais 88). Dans la mesure où les profils de réactivité obtenus avec les trois anticorps ne sont pas strictement identiques, il faut en déduire que leurs épitopes sont localement différents. Néanmoins, 75 et 79 participent aux trois épitopes. Ceci paraît cohérent avec le modèle de Brown puisque ces deux résidus se trouvent dans la même orientation, pointant vers le haut et donc très accessibles.

L'effet de 61 est assez remarquable puisque, bien que situé à grande distance de 75, il joue un rôle actif dans la reconnaissance par H116-32. La figure qui représente l'hélice permet de constater qu'il se trouve dans la même orientation que 75. Quant à 78, il est le seul dans son orientation à avoir un rôle notable. Selon la figure 2, il pointe vers l'extérieur de la molécule et demeure donc, accessible.

Face supérieure accessible

Face inaccessible
Fosse de Bjorkman

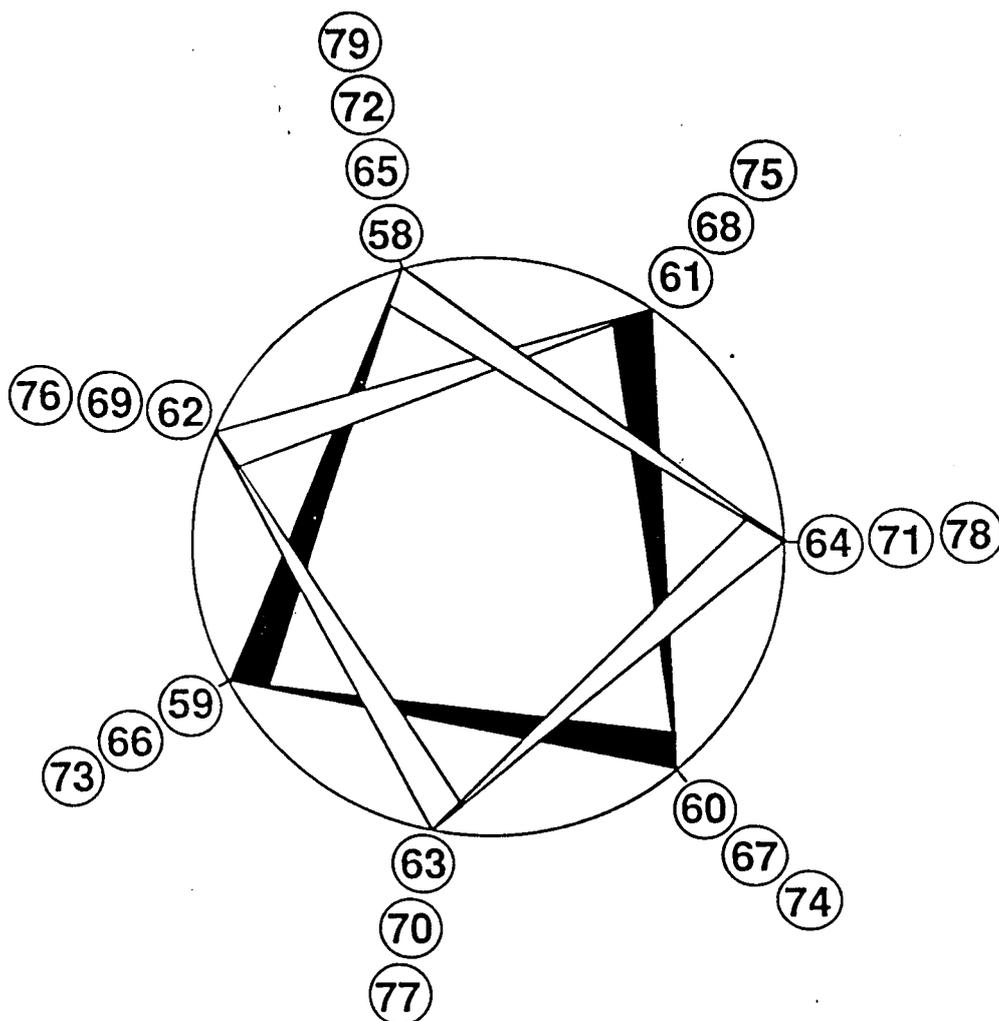


Figure 2 : Orientation des résidus sur une hélice α théorique de période 3,5.

Une hélice α dont la période est considérée approximativement égale à 3,5, sept secteurs d'orientation sont définis. Sur ceux-ci ont été reportés les numéros des résidus dont la structure secondaire est une hélice dans le modèle de Brown (58-79). Le modèle de Brown confirmé par les expériences d'"epitope mapping" permettent de situer approximativement ces différents secteurs par rapport à la fosse de Bjorkman.

Il est évidemment difficile de donner un sens bien défini au gain de réactivités et donc de faire la différence entre pertes et gains de réactivité. Quatre des 5 résidus qui affectent le marquage par 2A2 se trouvent dans les secteurs de 75 et 79. Seul 71 se démarque. Il se trouve cependant dans le même secteur que 78.

2.1.4. Conclusion

Deux conclusions se dégagent de cette première expérience. Les mutations introduites n'ont pas dramatiquement perturbé la géométrie de la protéine. Le fait que les anticorps dirigés contre A_β ne soient pas affectés ainsi que la localisation précise des résidus qui affectent la réactivité des anti- A_α en témoigne. Par ailleurs, il est très frappant de constater à quel point le modèle de l'hélice α ainsi que les orientations proposées par Brown donnent une grande cohérence aux observations. Les résidus importants se trouvent sans exception dans des positions accessibles. Ils pointent majoritairement vers la partie supérieure de la molécule. Deux d'entre eux cependant sont dirigés vers l'extérieur.

Ainsi donc, jusqu'ici tout se passe pour le mieux puisque toutes nos hypothèses de travail paraissent vérifier. L'analyse du modèle fonctionnel peut donc se dérouler dans les meilleures conditions.

2.2. Par présentation d'un peptide immunogénique à des hybridomes T

2.2.1. Objectifs

Ce test doit permettre de préciser les interactions dans lesquelles les résidus 50-79 sont engagés. Il convenait de choisir un système antigénique déjà bien décrit. Or, dans un contexte A^k , c'est indubitablement le peptide tryptique 46-61 du lysozyme de poule (HEL46-61) qui a fait l'objet de l'étude la plus complète (Babbitt 86 ; Allen 85 ; Allen 87).

2.2.2. Résultats

Les données expérimentales figurent sur la table 1.
Les points importants à noter sont :

Table 2 : Efficacités de présentation à divers hybridomes T

APC	Hybridomes des présentations de HEL46-61				Présentation de superantigènes à 3A9		
	Kly11.10	Kly4.10	3A9	2A11	SEB	SEC1	Toxine exfoliatrice
WT	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	++	++
50P	0,5	0,4	0,3	0,3	0,5	++	+
51E	0,8	0,8	0,6	0,5	0,7	++	+
52F	0,03	0,03	0,04	0,2	0,2	ND	ND
53A	0,2	0,4	0,05	0,1	0,2	+	+
54Q	0,8	0,3	0,3	0,4	0,6	+	+
55L	0,8	0,7	0,03	0,1	0,5	+	+
56R	<0,001	<0,004	0,04	<0,004	1,1	+	++
57R	0,6	0,8	0,4	0,2	1,6	+	++
58F	0,1	0,03	0,5	0,002	0,8	++	+
59E	0,002	0,5	0,004	1,4	0,6	+	+
60P	0,9	0,5	0,03	0,01	ND	ND	ND
61Q	0,07	1,4	0,04	5,0	14,2	++	+
62G	<0,001	2,5	<0,001	0,004	1,0	+	+
63G	0,9	2,5	0,8	0,006	2,5	++	++
64L	0,4	0,5	0,03	0,06	0,2	+	<0,1
65Q	0,06	<0,004	<0,001	<0,004	0,8	+	+
66N	<0,001	<0,004	<0,001	<0,004	0,4	+	+
67I	0,1	0,06	0,05	ND	0,2	+	<0,1
68A	<0,001	<0,004	<0,001	0,3	0,3	++	+
69T	<0,001	0,08	<0,001	<0,004	1,1	++	++
70G	0,6	0,7	0,3	0,5	0,6	++	++
71K	0,1	0,05	0,002	0,3	100	+++	++
72H	<0,001	1,0	0,5	1,6	3,3	+++	++
73N	0,02	0,6	0,3	0,5	1,0	+	ND
74L	0,1	0,06	0,06	0,04	0,3	+	<0,1
75E	3,0	2,0	1,1	1,0	2,5	++	++
76I	0,3	0,3	0,6	0,3	0,3	++	+
77L	0,3	0,3	0,3	0,5	0,8	++	+
78T	2,0	0,4	0,8	0,5	2,5	++	++
79K	0,2	0,4	0,3	0,3	0,6	ND	ND

Table 2 : Les mutants 50 à 79 portant une Ala à la place des acides aminés signalés, sauf 53 et 68 qui ont une Val à la place de l'Ala de A^k. Ces données ont été obtenues à partir des courbes dose/réponse. Si W est la concentration d'antigène permettant d'obtenir la moitié de la réponse maximale en utilisant la molécule non mutée comme présentatrice et si M est la quantité d'antigène permettant d'obtenir pour le mutant le même niveau de réponse alors le rapport W/M est l'efficacité de présentation du mutant. C'est la donnée qui figure dans la table. Les chiffres présentés sont des moyennes de quatre à six répétitions de l'expérience. Les résultats précédés du signe < signifient que les courbes de réponses étaient à peu près totalement plates. ND : non déterminé. Pour la toxine exfoliatrice et SEC1 les résultats ne sont que semi-quantitatifs car à cause du prix élevé des ces antigène une seule expérience a été effectuée.

- Chaque hybridome présente un profil de réactivité aux différentes mutations qui lui est propre.
- Un bon tiers des mutations n'a pratiquement pas d'effet. La réduction de réactivité qu'elles provoquent n'est pas supérieure à un facteur 5.
- D'autres ont une influence sensible. Elles ont un effet marqué sur la présentation à l'un ou l'autre des hybridomes mais aucun effet sur les autres présentations. Il est remarquable que, dans ce groupe, se trouvent les acides aminés 58F, 61Q, 64L, 71K et 74L qui sont conservés au sein de toutes les molécules de classe II.
- Certaines mutations enfin, ont des effets radicaux. Elles éliminent pratiquement toute réactivité à 3 des 4 hybridomes et ont un effet sévère sur le quatrième. Se trouvent dans ce groupe les mutations aux positions 56, 62, 65, 66, 68, 69.

D'une manière plus générale, il convient d'observer que les quatre hybridomes présentent des différences de sensibilité à l'antigène. A l'exception de KLy4.10, ils sont tous pleinement stimulés par des doses de l'ordre de 50 ng/ml. Pour KLy4.10, il faut des concentrations 25 fois supérieures pour atteindre le même niveau de réponse. Pour cet hybridome, il n'y a que 4 résidus critiques (c'est moins que les 6 ou 7 nécessaires aux autres hybridomes). En particulier, 69 n'a qu'un effet modéré alors qu'il est essentiel à la présentation aux trois autres hybridomes.

2.2.3. Interprétation

La logique faisait espérer un résultat qui aurait eu la forme suivante. L'altération de certains résidus aurait eu un effet commun sur tous les hybridomes, celle de certains autres n'aurait eu d'effet que sur quelques hybridomes et enfin, pour les derniers résidus aucun effet n'aurait pu être observé. Dans le cas idéal, de plus, le premier groupe aurait pointé vers la poche et le second vers le haut et vers l'extérieur. Auraient pu être définis ainsi, les résidus interagissant avec le TcR et ceux impliqués dans la fixation du peptide.

Force est de constater qu'il ne sera pas possible de parvenir tout à fait à cette conclusion avec ces données. Seul le résidu 66 qui est d'ailleurs dirigé vers la poche, a une importance capitale dans la présentation aux 4 hybridomes anti-HEL46-61. En ce qui concerne les autres résidus, en particulier

ceux qui paraissent orientés vers le sillon (59, 62, 66, 69), le fait que leur importance soit variable suivant les hybridomes invite à la prudence dans l'interprétation.

Quant aux résidus n'ayant aucun effet, il est possible de remarquer qu'ils ont tendance à se trouver aux deux extrémités de l'hélice. Les deux régions 50-55 et 74-79 paraissent avoir, dans le cas du HEL46-61, peu d'importance fonctionnelle. Hors de ces deux zones, il est impossible de caractériser par une orientation commune les résidus n'ayant pas d'influence puisque 57 pointe vers la poche, 61 vers le haut et 70 vers les feuilletts β .

Ces résultats feront l'objet d'une discussion approfondie dans le troisième chapitre.

3. Analyse du site de fixation du SEB

3.1. Introduction, objectifs et méthode

Certains antigènes, récemment regroupés sous la dénomination commune de superantigènes (White 89), ont des propriétés immunogéniques particulièrement remarquables. Ils sont reconnus, en association avec des produits de classe II du CMH, par tous les clones T utilisant une certaine région V_{β} dans leur récepteur. Par ailleurs la reconnaissance de ces antigènes par les cellules T peut s'effectuer dans des contextes différents de celui de développement de la cellule T. Il a aussi été montré que le SEB pouvait être présenté sans maturation (Yagi 90 ; Fleischer 88 ; Carlsson 88) et qu'une digestion protéolytique empêchait la présentation (Fraser 89). Ces observations ont laissé penser qu'il était possible que ces superantigènes ne se comportent pas comme des antigènes conventionnels et, en particulier, que leur site de fixation ne soit pas à l'intérieur de la poche de Bjorkman. La présentation du SEB à un hybridome T par les différents mutants devaient permettre de tester cette hypothèse.

Cette expérience a été conduite en utilisant l'hybridome 3A9 qui possède une double réactivité puisqu'il réagit au SEB et au HEL46-61. Avec un seul hybridome, il est possible de comparer directement la présentation d'un antigène conventionnel à la présentation du superantigène.

Une deuxième expérience a été conduite en parallèle pour confirmer les résultats obtenus par la première. Il s'agit d'une compétition entre l'antigène cible (HEL46-61 ou SEB) et un antigène qui ne stimule pas 3A9, le HEL34-45.

3.2. Résultats

L'observation la plus immédiate est la différence entre la sévérité des effets dans les deux systèmes antigéniques. De légères altérations peuvent être observées avec le SEB (ainsi que de fortes augmentations de réactivité) alors qu'avec HEL46-61 des effets très forts, allant jusqu'à l'absence totale de réactivité, sont mis en évidence. Sur les deux figures N et P ont été répertoriés les résidus ayant la plus grande importance dans chacun des deux systèmes. La différence de leurs orientations est marquante. Dans le cas du lysozyme, ils pointent vers le haut ou vers la fosse tandis que dans le cas du SEB ils pointent vers le haut ou vers l'extérieur. Ces résultats ont pu être reproduits en utilisant d'autres hybridomes anti-SEB et d'autres superantigènes (Exfoliating Toxine, SEC1).

L'expérience de compétition donne des résultats limpides. La présentation du SEB n'est pas inhibée par l'apport du peptide compétiteur alors que celle du HEL46-61 l'est fortement.

3.3. Interprétation

Ces deux expériences montrent clairement que les superantigènes se fixent aux molécules de classe II d'une manière différente de celle des antigènes conventionnels. Certaines données avaient déjà fait penser que cet antigène ne se fixait pas dans la fosse. Nos résultats le prouvent. Ils ne permettent cependant pas de préciser son site de fixation.

Chapitre III

Discussion

0. Préliminaires

Avant de procéder à une discussion approfondie des résultats obtenus, il convient de faire une remarque d'ordre général concernant la validité de l'approche choisie. Il est certain qu'il est difficile d'exclure avec certitude la possibilité qu'une partie des effets observés soient liés à des déformations de la structure secondaire de la protéine provoquées par les mutations introduites. Rappelons cependant que :

- l'alanine a été choisie car elle est connue pour n'avoir que peu d'influence sur les structures secondaires, en particulier, sur les structures en hélice (Chou 78),

- le polymorphisme qui sépare HLA-A2 de HLA-Aw68 introduit des changements de séquences beaucoup plus sévères que les substitutions par l'Ala que nous avons introduites et, pourtant, les structures de ces deux protéines ne varient que très localement de quelques dixièmes d'angströms (Garret 89),

- un des anticorps anti-A_α reconnaît très correctement 28 des 30 mutants,

- chacun des 30 mutants est reconnu correctement par au moins un anticorps et un hybridome T.

L'ensemble de ces arguments laisse penser que les résultats obtenus ont un fondement solide.

1. Validation expérimentale du modèle de Brown

1.1. Par étude du marquage par les anticorps monoclonaux

Comme il a déjà été mentionné au chapitre 2, les observations correspondent à une structure en hélice α . Les positions ayant les effets les plus marquant

sont 58, 61, 65, 68, 71, 75, 79. Leur répartition correspond trop bien à la périodicité d'une hélice α pour n'être que l'expression du hasard. Si une telle hélice existe vraiment, alors cette série de résidus doit se situer sur une face extérieure à la fosse de Bjorkman car les anticorps de la famille de H116-32 et de celle de 2A2 ne bloquent pas la fixation de peptides par des molécules A^k isolées en solution (Rosloniec 89b). Sur la figure 3 les données issues de ce type d'expériences, ont été reportées sur le modèle de Brown et la cohérence est frappante.

1.2. Par étude de la capacité de présentation

Dans les expériences de présentation, il est possible de parvenir à la même conclusion. Toujours sur la figure 3, il apparaît clairement que les résidus important pour la présentation pointent soit vers le haut de la molécule soit vers la fosse. C'est particulièrement visible pour Kly11.10. De plus, il peut être établi que quatre des résidus pointant vers la fosse sont des points de contact pour l'antigène (Voir §3 de ce chapitre).

La différence de sensibilité aux mutations des 4 hybridomes anti-HEL46-61 est frappante. En ce qui concerne les résidus orientés vers le haut de l'hélice, cette diversité s'interprète assez facilement. Chaque récepteur T reconnaît d'une manière qui lui serait propre le complexe Ia-Ag. Certains comme 2A11 par exemple, reconnaîtraient plutôt des résidus dans la zone aminoterminal de l'hélice (résidus 58, 65 et peut être 63) alors que d'autres comme 3A9 reconnaîtraient l'autre extrémité de l'hélice (65, 68, 71). Il existe cependant une zone de chevauchement reconnue par tous (résidus 68 et 65). Cette variabilité est donc assez cohérente avec les modèles du complexe trimoléculaire MHC-Ag-TcR qui ont pu être proposés récemment (Davis 88 ; Chothia 88 ; Claverie 89).

2. Interactions des superantigènes avec les molécules de classe II

2.1. Deux modes de présentation différents

2.1.1. Rappel des objectifs

L'objectif de l'expérience était de déterminer si les superantigènes sont présentés aux cellules T de la même manière que les peptides. Les résultats obtenus permettent de conclure sans ambiguïté que tel n'est pas le cas. Le

principal argument réside dans le fait que certaines des mutations introduites ont un effet très marqué sur la présentation du peptide HEL46-61 aux quatre hybridomes testés. Cet effet n'est pas spécifique à ce peptide puisqu'il a pu être observé pour d'autres antigènes. Au contraire, aucune des mutations n'a d'effet très sensible sur la présentation du SEB ou d'autres superantigènes testés.

2.1.2. Validité de l'interprétation

La validité du modèle de Brown permet de proposer une interprétation. A la différence des peptides, les superantigènes ne se fixent dans la fosse de Bjorkman. Cette vue peut toutefois, soulever deux réserves.

Une partie de la molécule de SEB pourrait se fixer dans la fosse mais n'établir de liaisons importantes qu'avec des résidus de la chaîne β . Cette éventualité semble peu probable car des cellules exprimant $A_{\alpha}^d:A_{\beta}^k$ et $A_{\alpha}^b:A_{\beta}^k$ ne sont pas capables de présenter le SEB à certains hybridomes alors $A_{\alpha}^k:A_{\beta}^k$ y parvient. Ceci laisse penser que les deux chaînes participent à la liaison ou qu'au moins A_{α} en est un élément indispensable. De plus, il a été montré que deux autres superantigènes, Mls-1a et la toxine du syndrome de choc toxique, interagissent de manière préférentielle avec la chaîne α des complexes qui les présentent (Anderson 89 ; communication personnelle de D. Karp et E. Long).

La seconde objection possible est de penser que la molécule établit de nombreux contacts avec des résidus orientés vers la fosse, mais qu'aucun de ces contacts n'est essentiel à lui seul. La faible affinité du SEB pour A^k ne semble pas cependant pouvoir soutenir une telle hypothèse (Marrack 90).

2.1.3. Confirmation par compétition

Afin d'établir définitivement la différence des sites de fixation de ces deux types d'antigènes, des expériences de compétitions ont été conduites. Il a été observé qu'un peptide ayant une bonne affinité pour A^k entre en compétition avec HEL46-61 mais pas avec le SEB pour la présentation. Il est très peu vraisemblable que cela puisse être dû à une trop grande affinité du SEB pour A^k . Il faut en effet, 25 fois plus de SEB que de HEL46-61, en termes de molarité, pour obtenir des réponses de même niveau de l'hybridome 3A9.

2.1.4. Une intuition jusqu'ici non encore démontrée

La différence des modes de présentation de ces deux types d'antigènes avait déjà été suggérée par certains auteurs. Des expériences de présentation sur des cellules fixées ainsi que des présentations de produits de digestion protéolytique avaient permis d'établir que, non seulement le SEB pouvait être présenté sans maturation intracellulaire, mais que de plus, il devait être intact pour pouvoir être présenté (Fleischer 88 ; Carlsson 88 ; Janeway 88 et 89 ; Fraser 89 ; Yagi 90 ; observations personnelles non publiées). Ces expériences avaient déjà laissé penser que le SEB pouvait être fixé hors du site de fixation des peptides. Mais des antigènes conventionnels de grande taille comme le fibrinogène sont aussi présentés intacts et semblent insérer des segments flexibles dans la fosse (Allen 87). Notre travail établit directement une différence très nette entre les modes de fixation des antigènes conventionnels d'une part et des superantigènes d'autre part.

2.2. Signification biologique

L'effet spectaculaire et simple des superantigènes internes (B-cell unknown product reconnu par $V_{\beta 17a}$, Mls-1^a et -2^a) sur le répertoire des cellules T en a fait des outils attrayant, et largement utilisés, pour l'étude des mécanismes de la tolérance (Kappler 87 ; Kappler 88 ; Marrack 88 ; McDonald 88 ; Pullen 88). Nos résultats soulignent la particularité du système antigénique qui commençait à s'imposer comme système modèle d'étude de la sélection thymique et ne peut qu'inviter à s'interroger sur la pertinence du choix d'un tel système comme modèle. Peut-être convient-il de ne pas s'abuser sur la généralité des résultats obtenus à l'aide d'un système aussi peu conventionnel ? D'autres mécanismes d'induction de la tolérance, très différents, ont été décrits pour les cellules B à l'aide d'un système plus proche, sans doute, de la réalité biologique (Goodnow 88). Toutefois, l'anergie clonale a aussi été décrite récemment pour un système impliquant Mls-1 (Rammensee 89). Aucune conclusion quant à la valeur de ce modèle ne peut être tirée. Mais tant que la question de la signification biologique d'un système ayant une telle influence sur le répertoire T tout en n'ayant pas grand-chose de comparable à un antigène classique, reste totalement ouverte, il convient d'être extrêmement prudent et, sans doute d'éviter, toute généralisation hâtive. Une dernière question peut difficilement être évitée. Quel sens biologique peuvent avoir de tels antigènes ? Il semble bien qu'elle soit encore totalement ouverte.

3. Dissection du site de fixation de l'antigène peptidique

3.1. Résidus impliqués dans la fixation de l'antigène

L'intérêt majeur de cette expérience est que les mutations ont porté sur l'ensemble des acides aminés entre 50 et 79. Dans cette zone, les données collectées permettent donc de dresser une image précise des zones d'interaction avec l'antigène ou le récepteur de la cellule T. Quelques résidus ont une importance capitale : 56, 62, 65, 66, 68 et 69. Elle ne se limite pas au peptide HEL46-61 puisqu'elle se trouve confirmée lors de présentation de RNase 41-61 (Peccoud, sous presse), de la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) (non publié), de peptides de l'influenza 48-67 et 120-139 (Warren, soumis). Les acides aminés 65 et 69 sont sans doute impliqués dans la reconnaissance par le récepteur T d'après l'effet des mutations sur le marquage par les anticorps. Mais les résidus 62, 66, 69 et 76 sont vraisemblablement des points de liaison avec l'antigène.

3.1.1. Résidu 66

Le fait que K66 soit le seul mutant qui ne présente HEL46-61 à aucun des quatre hybridomes testés constitue la première indication. Mais des expériences complémentaires ont étayé cette conclusion. Elles sont rapportées dans (Peccoud, sous presse). Le mutant K66 est capable de présenter deux analogues du peptide RNase 43-56 qui ne sont pas présentés par A^k. Ceci est particulièrement intéressant car il a été montré tant *in vivo* qu'*in vitro* que le résidu 51 de ce peptide est un point de contact avec la molécule de classe II (Lorenz 89). De plus, la position 66 est la plus sensible au raccourcissement du peptide.

L'interprétation la plus simple de cet ensemble d'indications est que le résidu 66 est un point de contact avec l'antigène.

3.1.2. Résidu 69

Comme le mutant K66, le mutant K69 est sévèrement affecté dans sa capacité de présentation du HEL46-61. Seul Kly4.10, l'hybridome qui a besoin de doses 25 fois plus fortes d'antigène, présente encore une faible réactivité face à ce mutant.

Curieusement, K69 suscite une alloréactivité de l'hybridome R28. Celui-ci est connu pour sa réaction aux peptides de la RNase. Or, R28 réagit à K69

sans apport d'aucun peptide. Cela peut s'interpréter comme la capacité de K69 à fixer un nouveau peptide et de susciter ainsi une réactivité croisée du récepteur de R28. Ce fait s'intègre donc assez bien au sein d'une représentation défendue récemment par différents auteurs sur la base d'arguments variés (Eckels 88 ; Ajitkumar 88 ; Vogel 88 ; Heath 89 ; Pierres 89 ; Buerstedde 89 ; Santos-Aguado 89 ; Hogan 89 ; Lombardi 89a et b).

Enfin, la présentation de RNase 43-56 par K69 peut être restaurée par la substitution d'un seul acide aminé sur le peptide.

L'explication la plus naturelle de cette série de constatations est d'attribuer à au résidu 69 un rôle dans la fixation de l'antigène.

3.1.3. Résidu 62

Le mutant K62 présente un profil de présentation du HEL46-61 analogue à celui de K69.

Des expériences conduites par Warren et al. laissent penser que le résidu 62 joue un rôle dans la fixation de l'antigène. Les cellules KK exprimant une molécule A^k non mutée peuvent présenter le peptide HA1 48-67 de l'hémagglutinine du virus de l'influenza. Mais KK ne présente pas un analogue (54N->S) de cet antigène que l'on trouve chez un mutant naturel du virus. K62 au contraire est capable de présenter les deux variants de cet antigène.

Enfin, K62 est, après K66, le plus sensible des mutants à la taille du peptide.

3.1.3. Résidu 76

Son rôle dans la fixation de l'antigène se déduit de la présentation des analogues du peptide RNase 43-56.

Ainsi, bien que les indications soient plus ou moins fortes selon les résidus, l'ensemble des observations tend à démontrer le rôle des résidus 62, 66, 69 et 76 dans la fixation de l'antigène.

3.2. A propos de l'unicité conformationnelle du complexe Ia-Ag

3.1. Critère de travail initial

La présentation à de nombreux hybridomes avait pour objectif de mettre en évidence que les substitutions de certains résidus ont un effet commun sur tous les hybridomes alors que les substitutions de certains autres n'ont que des effets spécifiques à tel ou tel hybridome. Le premier groupe de résidus est considéré comme interagissant probablement avec le peptide (effet com-

mun à tous les hybridomes) et le second comme établissant des contacts avec les différents récepteurs T. Cette interprétation aurait pu faire l'objet d'une confirmation par des études de compétition, voire même par des études de fixation sur molécules purifiées.

Ce critère d'analyse fait implicitement référence à une hypothèse très forte. Elle suppose en effet, que tous les hybridomes spécifiques d'un Ag dans un certain contexte reconnaissent un complexe Ag-la identique. Les différents récepteurs T sont vus comme différents anticorps dirigés contre un même antigène, chacun reconnaissant la cible sous un angle qui lui est propre, chacun ayant son propre épitope au sein de la cible. Le complexe Ag-la est supposé quant à lui unique tant du point de vue biochimique (association de trois chaînes peptidiques α , β et l'Ag) que du point de vue conformationnel. Ainsi, le mode d'association du peptide et de la molécule de classe II est supposé unique.

3.2.2. Interprétations du phénomène de reconnaissance de l'antigène par les molécules de classe II

- Reconnaissance antigénique et reconnaissance de formes

L'étude de la reconnaissance antigénique est certainement profondément marquée par les connaissances avancées du phénomène de reconnaissance de l'antigène par les immunoglobulines qui procède essentiellement par la mise en contact de deux surfaces de Van der Waals complémentaires et par associations de charges opposées permettant l'établissement de liaisons hydrogènes (Amit 86 ; Sheriff 87 ; Coleman 87). Même si le phénomène de la reconnaissance de l'antigène par les molécules du CMH est connu pour être profondément différent, il semble que l'esprit de l'approche qui en est faite soit considérablement, et inconsciemment, influencée par les connaissances sur le complexe Ag-anticorps. La spécificité lâche de la reconnaissance la-Ag tend à être justifiée par une hypothétique structure spatiale ou séquentielle commune à tous les peptides se fixant sur la même molécule (Sette 87 ; Sette 88 ; Allen 87). Un antigène serait reconnaissable par une molécule la s'il peut adopter une certaine conformation complémentaire de celle de cette molécule.

Il est cependant bien établi que la reconnaissance par un anticorps est très mal adaptée à la fixation de déterminants ne possédant pas une structure spatiale déterminée. Les peptides sont très mal reconnus par les anticorps.

Si certaines corrélations ont pu être mises en évidence et si certaines structures ont pu être proposées, aucune affirmation fermement établie n'a pu être formulée à ce jour, aucune règle un peu générale permettant par exemple de prédire tous les peptides reconnaissables par une molécule la donnée n'a encore été énoncée, et ce en dépit du nombre assez important des données produites sur ce sujet.

Il convient par ailleurs de bien saisir la portée limitée des quelques résultats qui ont été obtenus. Ainsi par exemple, une expérience, très proche de la nôtre dans son principe, visant à déterminer les résidus en contact avec le récepteur T et ceux en contact avec la molécule I-A a été conduite en substituant chacun des résidus du peptide HEL52-61 par une alanine (Allen 87). Chacun de ces analogues a été présenté à un unique hybridome T afin de déterminer les positions n'ayant aucune influence sur la présentation. Puis, une compétition a permis de classer les résidus critiques en deux catégories, ceux entrant en contact avec I-A et ceux entrant en contact avec le TcR. Ces résultats ont permis de proposer une structure en hélice pour le peptide fixé à la molécule I-A. Bien que cette conclusion puisse impressionner, il est difficile de ne pas rapprocher la méthode qui y a conduit à celle que nous avons suivie. Peut-on raisonnablement penser qu'une conclusion aussi claire aurait pu être tirée d'une expérience dans laquelle les différents analogues auraient été d'abord présentés à une série de plusieurs hybridomes T plutôt qu'à l'unique hybridome qui a été employé ?

• Réfutation de l'hypothèse d'unicité conformationnelle

L'hypothèse d'une conformation unique pour le complexe Ag-Ia semble plus relever d'un *a priori* culturel que d'une vérité démontrée. Cela est sans doute l'image la plus simple, compte tenu des connaissances sur la reconnaissance moléculaire, qu'il était possible d'imaginer pour représenter les interactions au sein de ce complexe. Mais cette image ne permet ni de rendre compte des résultats complexes obtenus lors de la présentation du HEL46-61 à différents hybridomes T par nos 30 mutants, ni de tous ceux qui avaient déjà été obtenus lors de l'analyse de la capacité de présentation des différents mutants ponctuels étudiés précédemment. La diversité des sensibilités aux mutations affectant des résidus orientés vers la fosse est assez frappante. En particulier la différence des profils de réactivité de Kly4.10 et de Kly11.10 est tout à fait significative et problématique dans une conception classique de la liaison Ia-Ag

Si au contraire, un même peptide peut s'associer à I-A en adoptant différentes conformations, la complexité des résultats de présentation devient logique et inévitable. Cette hypothèse n'est à ce jour contredite par aucune observation. En particulier, la compétition observée lors de la fixation des peptides ne s'oppose pas à cette vue. Il est évident que, quelques soient la ou les conformations adoptées par le peptide dans le site de fixation, sa présence à cet endroit peut empêcher la fixation d'un autre peptide dans le même site.

Cette représentation s'accomode en outre mieux de certaines observations troublantes qui s'intègrent assez mal dans le cadre rigide de la première hypothèse (Mills 88). Il a été montré que deux peptides immunogéniques, restreints tous deux à I-A^k, n'entraient pas en compétition lors de la présentation à deux clones T. Au sein de l'hémagglutinine du virus de l'influenza (HA) deux épitopes T ont été définis à l'aide de peptides synthétiques HA48-68 et HA118-138. Le clone T 13.10 reconnaît 48-68 et le clone 12T1 est spécifique de 118-138. La réponse de 10.13, préalablement pulsé par 48-68, n'est pas diminuée par l'apport de quantités croissantes de 118-138, alors qu'elle est inhibée par une gamme de concentration d'un analogue structural non reconnu par 10.13 de 48-68. Réciproquement, la réponse de 12T1, préalablement pulsé par 118-138, n'est pas modifiée par l'apport de 48-68 en quantités croissantes.

Cette observation tendrait à prouver que le site de fixation de A^k n'est pas unique, ne peut être considérée dans une vue classique qu'en tant que curiosité dérangement et peu logique. Bien que cette observation ne soit pas la première de ce type (Shimonkevitz 84 ; Guillet 87), elle demeure marginale comparée à la majorité des cas où la compétition a pu être mise en évidence. La marginalité de ce second site de fixation est problématique. Pour que deux peptides de 20 acides aminés de long n'entrent pas en compétition pour une fixation dans la fosse, il faut qu'ils adoptent une disposition très particulière. Or, la probabilité de la détecter est sans doute plus grande si elle est spécifique d'un récepteur T que si elle est spécifique d'un antigène puisque pour chaque antigène de nombreux clones T sont connus.

Il est très regrettable que l'auteur n'ait pas pris la peine de préciser si cette non compétition s'appliquait à tous les clones T anti48-68 en sa possession. Si tel n'était pas le cas, cela constituerait la démonstration formelle que les récepteurs T peuvent reconnaître des complexes Ia-Ag ayant des conformations différentes en dépit de l'identité de leur composition biochimique.

3.2.3 Quelle reconnaissance de la molécule présentatrice pour l'antigène ?

Le chargement des molécules a vraisemblablement lieu dans un compartiment intracellulaire. L'antigène extérieur étant "processé" dans les vésicules d'endocytose dans lesquelles recirculent les molécules de classe II, il est vraisemblable que c'est dans ce compartiment que les molécules sont chargées. Le pH bas de ces vésicules pourrait faciliter l'échange (Adonini 90). Il pourrait être le fait d'un phénomène complexe impliquant d'autres protéines. La molécule de classe II, circulante ou nouvellement synthétisée, pourrait même peut-être subir une légère dénaturation qui élargirait les bords du site de fixation pour les refermer sur un peptide antigénique. Le fait qu'il ait été impossible d'obtenir une molécule de classe II dans une conformation correcte à partir des deux chaînes solubles peut même laisser penser à un repliement de l'ensemble autour d'un peptide qui serait alors partie intégrante de l'ensemble ainsi formé. Il n'y aurait plus dans ce cas de molécules de classe II, récepteur de l'antigène, mais un déterminant antigénique ternaire ayant deux chaînes constantes. Cette hypothèse semble cependant plus pertinente pour les molécules de classe I. En effet, elles présentent des éléments sans doute rencontrés très tôt dans le réticulum endoplasmique ou le Golgi. Le fait que les molécules de classe II voient l'antigène plus tard, après exposition à la surface et endocytose donne peut-être moins d'assise à cette hypothèse pour ces dernières molécules que pour les classe I.

S'il se révèle par ailleurs exact qu'il est possible d'avoir plusieurs conformations pour un même ensemble de trois composants, plusieurs déterminants antigéniques pourraient être générés grâce à un même peptide. La cohésion du complexe serait assurée, non pas par stricte complémentarité de formes, mais par hydrophobicité, le peptide ayant pour fonction de remplir la fosse de Bjorkman en empêchant ainsi l'eau de pénétrer loin à l'intérieur de la molécule. Une simple compatibilité géométrique serait alors suffisante à permettre la fixation du peptide par les molécules de classe II. Cette hypothèse pourrait en particulier, rendre de compte de la spécificité très lâche de la fixation de l'antigène par les produits du CMH.

Une question importante s'il se confirme que le complexe Ia-Ag n'a pas de conformation unique, sera de parvenir à déterminer les relations qui unissent ces différentes conformations. Il est possible d'imaginer que chacune des conformations soit stable, chacune correspondant à un puit de potentiel bien individualisé, le choix entre l'une ou l'autre se ferait alors au moment de la formation du complexe. Ou bien, il est possible qu'il existe un phénomène de résonance entre les différentes conformations.

Un dernier point doit être souligné. La cristallographie est très généralement

source d'une information riche. Il serait légitime d'attendre d'elle des précisions sur la nature des relations la peptide. La flexibilité de cette liaison doit peut-être contribuer à remettre en cause cette attente. Il est d'une part possible qu'elle empêche toute cristallisation, ou au moins, d'atteindre une résolution très fine. Il est aussi vraisemblable que si une structure précise parvenait à être proposée, elle traduirait mal la réalité biologique. Elle offrirait des apparences de simplicité trompeuse car elle donnerait de la molécule une image figée dans une conformation parmi d'autres. Cette structure risquerait donc de mal rendre compte des résultats d'expériences *in vivo* comme les nôtres.

Conclusion

La collection de 30 mutants qui a été construite a permis d'établir plusieurs résultats majeurs. Le modèle structural proposé par Brown sur la base de la structure des molécules de classe I pour les molécules de classe II est généralement juste et pertinent. Par ailleurs, la présentation d'un représentant du groupe des superantigènes, le SEB, a été étudiée. Il a pu être montré qu'il ne se fixe pas à l'intérieur de la fosse de Bjorkman et cette observation permet d'amorcer une explication du comportement peu ordinaire de ce type d'antigène.

De plus, une étude approfondie des résultats obtenus lors des présentations d'antigènes peptidiques ont permis de préciser sensiblement la nature de la liaison Ia-Ag. Contrairement à une hypothèse qui avait été émise, tout laisse penser que le complexe Ia-Ag n'a pas de conformation unique pour un antigène donné. Cette flexibilité tend à donner aux résultats des tests fonctionnels une complexité inattendue et contraint à une collecte de données abondante. Néanmoins, en dépit de cette difficulté et sur la base d'expériences variées (présentations de différents antigènes, études de la présentation d'analogues de peptides antigéniques etc...), il a été possible de déterminer quatre résidus 62, 66, 69, 76 qui jouent un rôle essentiel dans la fixation du peptide antigénique.

Ces résultats sont d'autant plus précieux que la souplesse de la liaison Ag-Ia invite à une certaine réserve concernant les résultats que les méthodes cristallographiques pourront fournir sur la structure du complexe Ia-Ag. Les méthodes de mutagenèse dirigée, du fait même des données qu'elles ont permis d'obtenir, semblent s'imposer comme des outils de choix pour l'étude de la structure à un niveau de résolution très fin de ce complexe antigénique.

Grenoble, le 28 juin 1989.

Corrigé à Strasbourg, le 5 Octobre 90.

Références

[Abastado 87]

Abastado, J.P., Jaulin, C., Schutze, M.P., Langlade-Demoyen, P., Plata, F., Ozato, K., Kourilsky, P. (1987)

Fine mapping of epitopes by intradomain Kd/Dd recombinants
J. Exp. Med. 166, 327-340

[Abastado sous presse]

Abastado, J.P., Kourilsky, P.
Immunol. Today

[Ajitkumar 88]

Ajitkumar, P., Geier, S.S., Kesari, K.V., Borriello, F., Nakagawa, M., Bluestone, J.A., Saper, M.A., Wiley, D.C., Nathenson, S.G. (1988)

Cell 54, 47-56

[Allen 85]

Allen, P.M., Matsueda, G.R., Haber, E., Unanue, E.R. (1985)

Specificity of the T cell receptor : two different determinants are generated by the peptide and the I-A^K molecule

J. Immunol. 135, 368-373

[Allen 87]

Allen, P.M., Matsueda, G.R., Evans, R.J., Dunbar, J.B., Marshall, G.R., Unanue, E.R. (1987)

Identification of the T-cell an Ia contact residues of a T-cell antigenic epitope

Nature 327, 713-715

[Amit 86]

Amit, A.G., Mariuzza, R.A., Phillips, S.E.V., and Poljak, R.J. (1986)

Three dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution
Science 233,747-753

[Amzel 79]

Amzel, L.M., and Poljack, R.J. (1979)

A. Rev. Biochem. 48, 961- 977

[Argos 87]

Argos, P. (1987)

An analysis of sequence-similar pentapeptides in unrelated protein tertiary structures

J. Mol. Biol. 197, 331-348

[Ashwell 88]

Ashwell, J.D. (1988)

Are B lymphocytes the principal antigen-presenting cell in vivo ?

J. Immunol. 140, 3697-3700

[Austin 85]

Austin, P., Trowsdale, J., Rudd, C., Bodmer, W., Feldmann, M., and Lamb, J. (1985)

Functional expression of HLA-DP genes transfected into mouse fibroblasts

Nature 313, 61-64

[Babbit 85]

Babbit, B., Allen, P., Matsueda, G., Haber, E., Unanue, E. (1985)

Nature 317, 359-361

[Babbit 86]

Babbit, B.P., Matsueda, G., Haber, E., Unanue, E.R., Allen, P.M. (1986)

Antigenic competition at the level of peptide-Ia binding.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4509-4513

[Barlow 88]

Barlow, D.J., and Thornton, J.M. (1988)

Helix geometry in proteins

J. Mol. Biol. 201, 601-619

[Becker 85]

Becker, J.W., and Reeke, G.N. (1985)

Three dimensional structure of β_2 -microglobulin

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4225-4229

[Benacerraf 78]

Benacerraf, B. (1978)

A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I-region-specific Ir genes in macrophages and B lymphocytes

J. Immunol. 120, 1809-1812

[Bierzynski 82]

Bierzynski, A., Kim, P.S., Baldwin, R.L. (1982)

A salt bridge stabilizes the helix formed by isolated C peptide of RNase A.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 2470

[Bjorkman 87a]

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Benett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1987)

Structure of a human class I histocompatibility antigen, HLA-A2

Nature 329, 506-512

[Bjorkman 87b]

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987)

The foreign antigen binding site and T cells recognition regions of class I histocompatibility antigens
Nature 329, 512-518

[Blackman 88]

Blackman, M.A., Kappler, J.W., and Marrack, P. (1988)

T cell specificity and repertoire
Immunol. Rev. 101, 5-19

[Blum 88]

Blum, J.S. and Cresswell, P. (1988)

Role for intracellular proteases in the processing and transport of class II HLA antigens
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 3975-3979

[Bouillot 89]

Bouillot, M., Choppin, J., Cornille, F., Martinon, F., Papo, T., Gomard, E., Fournie-Zaluski, M.P., Levy, J.P. (1989)

Physical association between MHC class I molecules and immunogenic peptides
Nature 339, 473-476

[Braunstein 87]

Braunstein, N.S. and Germain, R.N. (1987)

Allele specific control of Ia molecules surface expression and conformation : implications for a general model of Ia structure function relationships.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 2921-2925

[Brown 88]

Brown, J.H., Jadetzky, T., Saper, M.A., Samraoui, B., Bjorkman, P.J., and Wiley, D.C. (1988)

A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules
Nature 332, 845-850

[Buerstedde 88]

Buerstedde, J.M., Pease, L.R., Bell, M.P., Nilson, A.E., Buerstedde, G., Murphy, D., McKean, D.J. (1988)

Identification of an immunodominant region on the I-A_β chain using site directed mutagenesis and DNA mediated gene transfer
J. Exp. Med. 167, 473-487

[Buus 86]

Buus, S., and Werdelin, O. (1986)

Oligopeptides antigens of the angiotensin lineage compete for presentation by paraformaldehyde-treated accessory cells to T cells.
J. Immunol. 136,459-465

[Buus 86]

Buus, S., Sette, A., Colon, S.M., Jenis, D.M., and Grey, H.M. (1986)
Isolation and characterization of antigen-Ia complexes involved in T cell recognition
Cell 47,1071-1077

[Carlsson 88]

Carlsson, R., Fischer, H., and Sjörgen, H.O. (1988)
Binding of a staphylococcal enterotoxin to accessory cells is a requirement for its ability to activate human T cells.
J. Immunol. 140, 2484-2488

[Ceppellini 89]

Ceppellini, R., Frumento, G., Ferrara, G.B., Tosi, R., Chersi, A., Pernis, B. (1989)
Binding of labelled influenza matrix peptide to HLA-DR in living B lymphoid cells
Nature 339, 392-394

[Chen 89]

Chen, B.P., Parham, P. (1989)
Direct binding of influenza peptides to class I HLA molecules
Nature 337, 743-745

[Chothia 74]

Chothia, C. (1974)
Hydrophobic bonding and accessible surface area in proteins
Nature 248, 338-339

[Chothia 75]

Chothia, C. (1975)
The nature of accessible and buried surfaces in proteins
J. Mol. Biol. 105, 1-14

[Chothia 88]

Chothia, C., Boswell, D.R., Lesk, A.M. (1988)
The outline structure of the T-cell $\alpha\beta$ receptor
EMBO J. 7, 3745-3755

[Chou 74]

Chou, P.Y., Fasman, G.D. (1974)
Empirical predictions of protein conformation
Annu. Rev. Biochem., 47, 251-270

[Claverie 89]

Claverie, J.M., Prochnika-Chalufour, A., Bougueleret, L. (1989)
Immunol. Today 10, 10-13

[Colman 87]

Colman, P.M., Laver, W.G., Varghese, J.N., Baker, A.T., Tulloch, P.A., Air, G.M., Webster, R.G. (1987)

Three dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase
Nature 326, 358-363

[Davis 88]

Davis, M.M., Bjorkman, P.J. (1988)

T-cell antigen genes and T-cell recognition
Nature 334, 395-402

[Eckels 88]

Eckels, D.D., Gorski, J., Rothbard, J., Lamb, J.R. (1988)

Peptide mediated modulation of T-cell allorecognition
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8191-8195

[Eklund 76]

Eklund, H. et al. (1976)

Three dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution.
J. Molec. Biol. 102, 27-59

[Fleischer 88]

Fleischer, B., and Shrezenmeier, H. (1988)

T cell stimulation by staphylococcal enterotoxins
J. Exp. Med. 167, 1697-1701

[Folsom 84]

Folsom, V., Gold, D.P., White, J., Marrack, P., Kappler, J., Tonegawa, S. (1984)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2045

[Fox 88]

Fox, B.S., Carbone, F.R., Germain, R.N., Paterson, Y., Schwartz, R.H. (1988)

Processing of a minimal antigenic peptide alters its interaction with MHC molecules
Nature 331, 538-540

[Fraser 89]

Fraser, J.D. (1989)

High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR
Nature 339, 221-223

[Garrett 89]

Garrett, T.P.J., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1989)

Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68
Nature 342, 692-695

[Germain 83]

Germain, R.N., Norcross, M.A., Margulies, D.H. (1983)

Nature 306, 190

[Germain 86]

Germain, R.N. (1986)

Analysis of the expression and function of class -II major histocompatibility complex-encoded molecules by DNA mediated gene transfer
An. Rev. Immunol. 4, 281-315

[Germain 86]

Germain, R.N. (1986)

The ins and outs of antigen processing and presentation
Nature 322, 687-689

[Getzoff 87]

Getzoff, E.D., Geysen, H.M., Rodda, S.J., Alexander, H., Tainer, J.A., Lerner, R.A. (1987)

Mechanism of antibody binding to a protein
Science 235, 1191-1196

[Goodnow 88]

Goodnow, C.C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T.B., Smith-Gill, S.J., Brink, R.A., Pritchard-Briscoe, R.A., Wotherspoon, J.S., Loblay, R.H., Raphael, C., Trent, R.J., Basten, A. (1988)
Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice
Nature 334, 676-682

[Grundström 85]

Grundström, T., Zenke, W.M., Wintzerith, M., Matthes, H.W.D., Staub, A., Chambon, P. (1985)
Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis
Nucleic Acids Res. 13, 3305-3316

[Guillet 87]

Guillet, J.G., Lai, M.Z., Briner, T.J., Smith, J.A., Gefter, M.L. (1987)

Nature 324, 260-262

[Harding 89]

Harding, C.V., Unanue, E.R. (1989)

Antigen processing and intracellular Ia
J. Immunol. 142, 12-19

[Heath 89]

Heath, W.R., Hurd, M.E., Carbone, F.R., Sherman, L.A. (1989)

Peptide dependant recognition of H2-K^b by alloreactive cytotoxic T lymphocytes
Nature 341, 749-751

[Hogan 89]

Hogan, K.T., Clayberg, C., Bernhard, E.J., Walk, S.F., Ridge, J.P., Prahm, P., Krensky, A.M., Engelhard, V.H. (1989)

J. Immunol. 142, 2097-2101

[Hutchinson 78]

Hutchinson et al. (1978)

J. Biol. Chem., 253, 6551-6560

[Jacobson 84]

Jacobson, S., Richert, J.R., Biddison, W.E., Satinsky, A., Hartzman, R.J., McFarland, H.F. (1984)

Measles virus specific T4+ human cytotoxic T cell clones are restricted by class II HLA antigens

J. Immunol. 133, 754-757

[Janeway 88]

Janeway, Chalupny, J., Conrad, P.J., Buxser, S. (1988)

An external stimulus that mimics Mls locus response

J. Immunol. 15, 161-166

[Janeway 89]

Janeway, C.A., Yagi, J. Jr., Conrad, P.J., Katz, M.E., Jones, B., Vroegop, S. Buxser, S. (1989)

T cells responses to Mls and to bacterial proteins that mimic its behavior.

Immunol. Rev. 107, 61-65

[Jimenez 87]

Jimenez, M.A., Nietto, J.L., Herranz, J., Rico, M., Santor, J. (1987)

FEBS Lett. 221, 320

[Kabsch 84]

Kabsch, W., Sander, C. (1984)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1075

[Kappler 87]

Kappler, J.W., Roehm, N., Marrack, P. (1987)

T cell tolerance by clonal elimination in the thymus

Cell 49, 273-280

[Kappler 88]

Kappler, J.W., Staerz, U.D., White, J., Marrack, P. (1988)

Self tolerance eliminates T cells specific for Mls-modified products of the major histocompatibility complex

Nature 332, 35-40

[Kaufman 84]

Kaufman, J.F., Auffray, C., Korman, A.J., Shackelford, D.A. and Strominger, J.L. (1984)

Cell 36, 1-13

[Kim 84]

Kim, P.S. and Baldwin, R.L. (1984)

Nature 307, 329

[Kourilsky sous presse]

Kourilsky, P. and Claverie, J.M. (1989)

MHC-Antigen interaction : what does the T cell receptor see ?

Current Topics in Immunology

[Krause 87]

Krause, K.L., Volz, K.W., and Lipscomb, W.N. (1987)

J. Molec. Biol. 193, 527-553

[Landais 85]

Landais, D., Matthes, H., Benoist, C., Mathis, D. (1985)

A molecular basis for the Ia.2 and Ia.19 antigenic determinants

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 2930-2934

[Landais 86]

Landais, D., Waltzinger, C., North Beck, B., Staub, A., McKean, D., Benoist, C., Mathis, D. (1986)

Functional sites on Ia molecules : a molecular dissection of A_{α} immunogenicity

Cell, 47, 173-181

[Landais 88]

Landais, D., Marchetto, D., Waltzinger, C., Pierres, M., Benoist, C., Mathis, D. (1988)

Slot-machine mutagenesis of a polymorphic residue on the A_{α}^k chain

J. Immunol. 141, 667-671

[Lassila 88]

Lassila, O., Vainio, O., Matzinger, P. (1988)

Can B cells turn on virgin T cells ?

Nature 334, 253-255

[Lechler 85]

Lechler, R.I., Norcross, M.A., Germain, R.N. (1985)

Qualitative and quantitative studies of antigens presenting cell function by I-A expressing cells

J. Immunol. 135, 2914

[Lombardi 89]

Lombardi, G., Sidhu, S., Lamb, J.R., Batchelor, J.R., Lechler, R.I. (1989)

Coregulation of endogenous antigens with HLA-DR1 by alloreactive human T cell clones

J. Immunol. 142, 753-757

[Lorenz 89]

Lorenz, R.G., Tyler, A.N., Allen, P.M. (1989)

Reconstruction of the immunogenic peptide RNase (43-56) by identification and transfer of the critical residues into an unrelated peptide backbone.

J. Exp. Med 170, 203-207

[Luescher 88]

Luescher, I.F., Allen, P.M., Unanue, E.R. (1988)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 871-874

[Malissen 83]

Malissen, B., Steimetz, M., McMillan, M., Pierres, M., Hood, L. (1983)
Nature 305, 440

[Malissen 84]

Malissen, B., Peele Price, M., Goverman, J.M., McMillan, M., White, J., Kappler, J., Marrack, P., Pierres, A., Pierres, M., and Hood, L. (1984)

Gene transfer of H-2 class II genes : antigen presentation by mouse fibroblasts an hamster B cell line

Cell 36, 319-327

[Marquart 82]

Marquart, M. and Deisenhofer, J. (1982)

Immun. Today 3, 160

[Marrack 86]

Marrack, P. and Kappler, F (1986)

Adv. Immun. 38, 1-30

[Marrack 88]

Marrack, P., Kappler, J.W. (1988)

T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types

Nature 332, 840-843

[Marrack 90]

Marrack, P., Blackman, M., Kushnir, E., Kappler, J. (1990)

The toxicity of staphylococcal enterotoxin B in mice is mediated by T cells.

J. Exp. Med. 171, 455-459

[Matsumura 88]

Matsumura, M., Bekctel, W.J., Matthews, B.W. (1988)

Hydrophobic stabilization in T4 lysozyme determined directly by multiple substitutions of Ile 3.

Nature 334, 406-410

[McDonald 88]

MacDonald, H.R., Schneider, R., Lees, R.K., Howes, R.C., Acha-Orbea, H., Festenstein, H., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. (1988)

T-cell receptor V_{β} use predicts reactivity and tolerance to Mlsa-encoded antigens

Nature 332, 40-45

[McKean 89]

McKean, D.J. (1989)

Structural requirements for class II molecules recognition by antibodies and T cell antigen receptor "Antigenic determinants & immune regulation" Progress in Allergy, in press

[McLachlan 80]

McLachlan, A.D. (1980)
Protein folding (Elsevier, North Holland)
79-99

[Mills 88]

Mills, K.H.G., Burt, D.S., Skehel, J.J., Thomas, B.D. (1988)
Fine specificity of murine class II restricted T cell clones for synthetic peptides of influenza virus hemagglutinin
J.Immunol. 140, 4083-4090

[Morrison 86]

Morrison, L.A., Lukacher, A.E., Braciale, V.L., Fan, D.P., Braciale, T.J. (1986)
Differences in antigen presentation to MHC class I and class II restricted influenza virus specific cytolytic T lymphocytes clones
J. Exp. Med. 163, 903-921

[Norcross 84]

Norcross, M.A., Bentley, D.M., Margulies, D.H., and Germain, R.N. (1984)
Membrane Ia expression and antigen presenting accessory cell function of L cells transfected with class II major histocompatibility complex genes
J. Exp. Med. 160, 1316-1337

[Orr 79a]

Orr, H.T., Lancet, D., Robb, R.J., Lopez de Castro, J.A., and Strominger, J. (1979)
Nature 282, 266-270

[Orr 79b]

Orr, H.T., Lopez de Castro, J.A., Lancet, D., and Strominger, J. (1979)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 5839-5842

[Padmanabhan 90]

Padmanabhan, S., Marqusee, S., Ridgeway, T., Laue, T.M., Baldwin, R.L. (1990)
Relative helix-forming tendencies of non polar amino-acids
Nature 344, 268-270

[Parham 87]

Parham, P. (1987)
Immun. Res. 6, 153-178

[Peccoud sous presse]

Peccoud, J., Dellabona, P., Allen, P., Benoist, C., Mathis, D.
Delineation of antigen contact residues of an MHC class II molecule
EMBO J. sous presse.

[Phillips 86]

Phillips, M.L., Yip, C.C., Shevach, E.M., and Delovitch, T.L. (1986)

Photoaffinity labeling demonstrates binding between Ia molecules and nominal antigen on antigen presenting cells

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 5634-5638

[Pierres 89]

Pierres, M., Marchetto, S., Naquet, P., Landais, D., Peccoud, J., Benoist, C., Mathis, D. (1989)

Ia-A_α polymorphic residues that determine alloreactive T cell recognition

J. Exp. Med. 169, 1655-1659

[Presta 88]

Presta, L.G. and Rose, G.D. (1988)

Helix signals in proteins

Science 240, 1632-1641

[Pullen 88]

Pullen, A.M., Marrack, P., Kappler, J.W. (1988)

The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens

Nature 335, 796-801

[Rabourdin-Combe 83]

Rabourdin-Combe, C., Mach, B. (1983)

Nature 303, 670

[Rammensee 89]

Rammensee, H.G., Kroschewski, R., Frangoulis, B. (1989)

Clonal anergy induced in mature V_β6+ T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls 1a expressing cells

Nature 339, 541-544

[Reeke 75]

Reeke, G.N., Becker, J.W., and Edelman, G.M. (1975)

J. Biol. Chem. 250, 1525-1545

[Reske-Kunz]

Reske-Kunz, A.B., Landais, D., Peccoud, J., Benoist, C., Mathis, D. ()

Functional sites on the A_α chain : polymorphic residues involved in antigen presentation to insulin

specific A_α^b:A_β^k-restricted T cells

J. Immunol., 143, 1472-1476

[Richardson 88]

Richardson, J.S. and Richardson, D.C. (1988)

Amino acid preferences for specific locations at the ends of a helices

Science 240, 1648-1652

[Rock 83]

Rock, K.L., and Benacerraf, B. (1983)

Inhibition of antigen-specific T lymphocyte activation by structurally related Ir gene controlled polymers. Evidence of specific competition for accessory cell antigen presentation
J. Exp. Med. 157, 1618-1634

[Ronchese 87]

Ronchese, F., Brown, M.A., Germain, R.N.

Structure function analysis of the A_βm12 mutation using site directed mutagenesis and DNA mediated gene transfer.

J. Immunol. 139, 629-638

[Rooman 88]

Rooman, M.J., Wodak, S.J. (1988)

Identification of predictive sequence motifs limited by protein structure data base size
Nature 335, 45-49

[Roosnek 88]

Roosnek, E., Demotz, S., Corradin, G., Lanzavecchia, A. (1988)

Kinetics of MHC-Antigen complex formation on antigen-presenting cells

J. Immunol. 140, 4079-4082

[Rosenthal 78]

Rosenthal, A.S. (1978)

Determinant selection and macrophage function in genetic control of the immune response

Immunol. Rev. 40, 136-152

[Rosloniec 89a]

Rosloniec, E.F., Vitez, L.J., Buerstedde, J.M., McKean, D.J., Landais, D., Mathis, D., Benoist, C., Freed, J.H. (1989)

I-A^k polymorphism defines a functionally dominant region of the presentation hen egg lysozyme peptides

J. Immunol. 143, 50-54

[Rosloniec 89b]

Rosloniec, E.F., Gay, D., Freed, J.H. (1989)

Epitope analysis by anti-I-A^k monoclonal antibodies of I-A^k restricted presentation of lysozyme peptides.

J. Immunol. 142, 4176-4180

[Rupp 85]

Rupp, F., Acha-Orbea, H., Hengartner, H., Zinkernagel, R. and Joho, R. (1985)

Identical V beta T-cell receptor genes used in alloreactive cytotoxic and antigen plus I-A specific helper T-cells.

Nature 315, 425-427

[Sant 87]

Sant, A.J., Braunstein, N.S. and Germain, R.N. (1987)
Predominant role of amino-terminal sequences in dictating efficiency of class II major histocompatibility complex $\alpha\beta$ dimer expression
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8065-8069

[Santos-Aguado 89]

Santos-Aguado J., Crimmins, M.A.V., Mentzer, S.J., Burakoff, S.J., Strominger, J.L. (1989)
Alloreactivity studied with mutants of HLA-A2
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8936-8940

[Sette 87]

Sette, A., Buus, S., Colon, S., Smith, J.A., Miles, C, Grey, H.M. (1987)
Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells.
Nature 328, 395-399

[Sette 88]

Sette, A., Buus, S., Colon, S., Miles, C., Grey, H.M. (1988)
I-Ad binding peptides derived from unrelated proteins antigens share a common structural motif
J. Immunol. 141, 45-48

[Shastri 85]

Shastri, N., Malissen, B., and Hood, L. (1985)
Ia-transfected L-cells fibroblasts present a lysozyme peptide but not the native protein to lysozyme specific T cells
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 5885-5889

[Sheriff 87]

Sheriff, S., Siverton, E., Padlan, E.A., Cohen, G.H., Smith-Gill, S.J., Finzel, B.C., Davies, D.R. (1987)
Three dimensional structure of an antibody-antigen complex
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8075-8079

[Shimonkevitz 83]

Shimonkevitz, R., Kappler, J., Marrack, P., and Grey, H. (1983)
Antigen recognition by H-2 restricted T cells : cell free antigen processing
J. Exp. Med. 158, 303-316

[Shimonkevitz 84]

Shimonkevitz, R., Colon, S., Kappler, J.W., Marrack, P., Grey, H.M. (1984)
Antigen recognition by H2 restricted T cells
J. Immun. 133, 2067-2074

[Shoemaker 87]

Shoemaker, K.R., Kim, P.S., York, E.J., Stewart, J.M., Baldwin, R.L. (1987)
Nature 326, 563

[Sredni 81]

Sredni, B., Schwartz, R.H.

Immunol. Rev. 54, 187-223

[Staerz 87]

Staerz, U.D., Kasasuyama, H. and Garner, A.M. (1987)

Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein

Nature 329, 449-451

[Stokinger 89]

Stokinger, B., Pessara, U., Lin, R. H., Habicht, J., Grez, M., Koch, N., (1989)

A role of Ia-associated invariant chains in antigen processing and presentation

Cell 56, 683-689

[Tragardh 79]

Tragardh, L., Rask, L., Wiman, K., Fohlman, J., and Peterson, P.A. (1979)

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 5839-5842

[Travers 84]

Travers, P., Blundell, T.L., Sternberg, M.J. and Bodmer, W. (1984)

Nature, 310, 235-238

[Vogel 88]

Vogel, J.M., Davis, A.C., McKinney, D.M., McMillan, M., Martin, W.J., Goodenow, R.S. (1988)

J. Exp. Med. 168, 1781-1785

[Watts 84]

Watts, T.H., Brian, A.A., Kappler, J.W., Marrack, P., and McConnell, H.M. (1984)

Antigen presentation by supported planar membranes containing affinity purified I-A^d

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7564-7568

[Watts 86]

Watts, T.H., McConnell, H.M. (1986)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9660-9664

[Wells 85]

Wells et al. (1985)

Gene 34, 315-323

[Werdelin 82]

Wederlin, O. (1982)

Chemically related antigens compete for presentation by accessory cell to T cells

J. Immunol. 129, 1883-1891

[White 89]

White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R., Kappler, J.W., Marrack, P. (1989)

The Wb-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B : stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice

Cell 56, 27-35

[Williams 88]

Williams, A.F., and Barclay, A.N. (1988)

The immunoglobulin superfamily : domains for cell recognition

Ann. Rev. Immunol. 6, 381-406

[Wilson 85]

Wilson, I.A., Haft, D.H., Getzoff, E.D., Tainer, J.A., Lerner, R.A., Brenner, S. (1985)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 5255-5259

[Yagi 90]

Yagi, J., Baron, S., Buxser, S. and Janeway Jr, C.A (1990)

Bacterial protein that mediate the association of a defined subset of T cell receptor : CD4 complexes with class II MHC

J. Immunol. 144, 892-897

Deuxième partie

Modélisation stochastique
des interactions macromoléculaires
au sein de la cellule vivante

*Travail réalisé, entre septembre 89 et septembre 90, dans le
Département de Mathématiques de la Faculté de Médecine de
Grenoble, sous la responsabilité de Jacques Demongeot.*

Table des chapitres

Introduction

1. "Qu'est-ce que la vie ?" selon E. Schrödinger	87
2. 45 ans plus tard : la réponse de l'Histoire à E. Schrödinger	90
2.1. Une interrogation toujours vivante	
2.2. Des molécules en petits nombres	
2.3. Les molécules biologiques n'échappent pas aux jeux du hasard	
2.4. L'ordre biologique en dépit du désordre moléculaire	
3. Le déterminisme des lois physiques	95
3.1. Le théorème central-limite	
3.2. Application en physique et en chimie	
4. Etat des lieux, esprit et nature des travaux entrepris	97
4.1. La chimie stochastique	
4.2. Un travail de forme nécessaire	
4.3. Trois étapes	
4.4. Bilan et prolongements	

Chapitre 1

Stœchiométrie :

La structure algébrique des processus réactionnels

0. Introduction	103
1. Principales notions de stœchiométrie	104
1.1. Matrices réactive, produit et stœchiométrique	
1.2. Indépendance des réactions et espace stœchiométrique	
1.3. Stœchiométrie non atomique	
2. Stœchiométrie de quelques processus biologiques	108
2.1. Deux exemples triviaux	
2.1.1. La fixation de l'antigène par l'anticorps	
2.1.2. La catalyse enzymatique	
2.2. L'opéron lactose	

- 2.2.0. Avertissement
- 2.2.1. Description du système physiologique
- 2.2.2. Description algébrique du processus
- 2.2.3. Description des mécanismes de contrôle positif par le glucose
- 2.2.4. Etude algébrique de l'opéron lactose doublement contrôlé
- 2.3. Le phage λ
 - 2.3.1. Description physiologique
 - 2.3.2. Construction du processus 4 et étude algébrique
- 2.4. Un phage λ affiné
 - 2.4.1. La compétition entre CI et Cro
 - 2.4.2. Le rôle déterminant de CII
 - 2.4.3. Le contrôle positif par antitermination
 - 2.4.4. Analyse algébrique du processus 4'
- 2.5. Le contrôle de la réplication du plasmide ColE1
 - 2.5.1. Description physiologique
 - 2.5.2. Construction et analyse algébrique du processus 5

3. Conclusion : les apports de la stœchiométrie à l'étude des processus biochimiques

- 3.1. Précisions
 - 3.1.1. Définitions
 - 3.1.2. Principaux espaces
 - 3.1.3. Orbites et états d'un processus
- 3.2. Application à l'étude des phénomènes biochimiques
 - 3.2.1. Réversibilité
 - 3.2.1.1. Définition
 - 3.2.1.2. Critère
 - 3.2.1.3. Recherche des interactions irréversibles dans les processus étudiés
 - 3.2.2. Recherche des réactions élémentaires et d'une base canonique de \mathcal{Y}
 - 3.2.3. Détermination de la dimension de l'espace \mathcal{Y} par résolution du système des contraintes
- 3.3. Résumé
 - 3.3.1. Caractéristiques des processus étudiés
 - 3.3.2. Traitement algébrique des processus réactionnels
 - 3.3.3. Problèmes ouverts et remarques diverses

Chapitre 2

Modélisation des interactions macromoléculaires

0. Introduction	135
1. Analyse critique des méthodes de la chimie stochastique	136
1.1. La construction du modèle de Gillepsie	
1.1.1. Notations utilisées par Gillepsie	
1.1.2. L'hypothèse fondamentale	
1.1.3. Calcul de la densité de probabilité de réaction	
1.2. Analyse du raisonnement de Gillepsie	
1.2.1. Intérêt du travail	
1.2.2. Les faiblesses du raisonnement	
1.3. Autres formulations des hypothèses de la chimie stochastique	
1.4. Conclusion personnelle	
 2. Principales notions relatives aux processus markoviens	 144
Introduction	
2.1. Chaînes de Markov	
2.1.1. Discrétisation de l'échelle temporelle	
2.1.2. Définitions	
2.1.3. Loi et construction du processus	
2.2. Les processus de saut markoviens	
2.2.1. Définition	
2.2.2. Propriétés fondamentales	
2.2.2.1. Temps d'arrêt	
2.2.2.2. Existence d'une intensité et conséquences	
2.2.2.3. Matrice de transition	
2.2.2.4. Probabilités de transition et caractéristiques locales	
2.3. Comportement dynamique	
2.3.1. Cas des chaînes dénombrables	
2.3.1.1. Classification des états	
2.3.1.2. Partitionnement de l'espace des états	
2.3.1.3. Théorème limite pour les chaînes récurrentes irréductibles	
2.3.2. Cas des processus de saut à espace d'états dénombrables	
 3. Construction du processus chimique	 158
3.1. Hypothèses et justification du modèle	
3.1.1. Un petit système chimique comme processus de saut markovien	
3.1.2. Validation intuitive du modèle	

3.2. Calcul des caractéristiques locales	
3.2.1. Calcul de la matrice de transition	
3.2.2. Calcul de l'intensité	
3.2.3. Résumé	
4. Signification chimique de quelques résultats mathématiques	165
Introduction	
4.1. Description statique	
4.1.1. Une simplification des fondements	
4.1.2. Notion d'intensité comme vitesse de réaction stochastique	
4.1.3. La matrice de transition	
4.2. Description dynamique	
4.2.1. Réversibilité et irréductibilité	
4.2.2. La synthèse protéique est récurrente	
4.2.3. Fondements de la simulation	
5. Aux limites de l'hypothèse : problèmes ouverts	171
5.1. Limites de l'hypothèse de saut	
5.1.1. Limite en taille	
5.1.2. Limite en temps de réaction	
5.1.3. Limite en déterminisme	
5.2. Les questions d'ordres de grandeur	
5.2.1. Les mécanismes rapides	
5.2.3. Les événements presque-certains	
5.3. Questions de frontières	
5.3.1. Les limites de l'espace des états	
5.3.2. Temps moyen de premier passage	
5.4. Multistabilité, multimodalité etc...	

Chapitre 3

Des modèles plus complets

0. Introduction	179
1. Une prise en compte du milieu physique	180
1.1. Un exemple non biologique : le mouvement du neutron	
1.2. Notations	
1.3. Construction du processus de transport avec saut	
1.3.1. Hypothèses de régularité	
1.3.2. Les éléments de la construction	
1.3.3. Le modèle et sa dynamique	

1.3.4. Commentaires et significations biologiques

1.3.5. Problèmes ouverts

2. Vers le traitement stochastique de populations cellulaires	185
2.1. Nature de la question	
2.2. Les processus de transport avec branchement et saut	
2.3. Critiques	

Conclusion

1. Bilan	189
1.1. Analyse stœchiométrique des processus biologiques	
1.2. Approche stochastique des interactions macromoléculaires	
2. Questions en suspens	193
3. En quête d'observations	194
3.1. Modalité ?	
3.2. Urgence ?	
4. De la biologie avant toute chose	197

Références	201
-------------------	-----

Annexe	205
---------------	-----

Liste des figures

Figure 1	L'opéron lactose	111b
Figure 2	Graphe de Vol'pert du processus 3	112b
Figure 3	Graphe de Vol'pert du processus 3'	113b
Figure 4	Les étapes précoces du développement du phage λ	115b
Figure 5	Graphe de Vol'pert du processus 4	117b
Figure 6	Graphe de Vol'pert du processus 4'	122b
Figure 7	Graphe de Vol'pert du processus 5	124b
Figure 8	Graphe de Vol'pert des processus 1, 1', 2	128b
Figure 9	Projection d'un processus de transport avec saut dans le plan de ses paramètres	184b
Figure 10	Représentation vectorielle de processus réactionnels de rang 3	192b

Table des notations les plus courantes

ssi	si et seulement si
\mathcal{R}	processus réactionnel $R = \{R^p / p = 1, \dots, r\}$
R^p	réaction chimique
Ψ_i	$i^{\text{ème}}$ espèce moléculaire d'un processus réactionnel
γ	matrice stœchiométrique
γ^p	vecteur colonne d'une matrice stœchiométrique
γ_i^p	élément de γ
v	matrice réactive
μ	matrice produit
v^p	vecteur colonne de v
μ^p	vecteur colonne de μ
v_i^p	coefficient stœchiométrique de Ψ_i en tant que réactif dans R^p
μ_i^p	coefficient stœchiométrique de Ψ_i en tant que produit dans R^p
m	vecteur de masse
\mathbf{R}	ensemble des nombres réels
\mathbf{N}	ensemble des nombres entiers naturels
Ψ_i^0	nombre initial de molécules Ψ_i
(...)	dans une équation chimique, représente dans le membre de droite, la totalité des termes du membre de gauche
$\mathcal{M}_{M,r}$	espace des matrices $M \times r$
\equiv	égale par définition
\mathcal{S}	espace stœchiométrique
S_X	espace affine passant par le point X et de direction \mathcal{S}
$(X_i)_{i \geq 0}$	orbite d'un processus réactionnel
α_p	coefficient de γ^p dans une combinaison linéaire
x	état d'un processus réactionnel
\emptyset	$(0, \dots, 0)$ le zéro dans une équation chimique
V	Volume
S_i	$i^{\text{ème}}$ espèce moléculaire
α_i	nombre courant de molécules S_i présentes dans V
R_μ	$\mu = 1, \dots, M$ $\mu^{\text{ème}}$ réaction
c_μ	paramètre cinétique stochastique de R_μ

- k_μ constante cinétique usuelle de R_μ
 h_μ nombre de combinaisons de molécules réactives pour R_μ
 $P(\tau, \mu)$ densité de probabilité de réaction
 $a_\mu = c_\mu \cdot h_\mu$
 l^p ordre de R^p
 $P_0(\tau)$ probabilité qu'aucune réaction n'ait lieu dans l'intervalle $[t, t+\tau[$
 (\mathcal{F}_n) ou $(\mathcal{F}_{n \in \mathbb{N}})$ filtration d'un processus à temps discret
 $P(\ /)$ probabilité conditionnelle
 $E(\ /)$ espérance conditionnelle
 $(X_n)_{n \in \mathbb{N}}$ chaîne de Markov
 Π loi de probabilité initiale
 P matrice de transition d'une chaîne de Markov
 $P(x, y)$ élément d'une matrice de transition P
 E espace d'états
 \mathfrak{E} tribu sur E
 $\sigma(X)$ tribu engendrée par la variable aléatoire X
 $(\mathcal{F}_t)_{t \in \mathbb{R}}$ filtration naturelle d'un processus de saut
 $P_t, P_{s,t}$ probabilités de transition
 1_A fonction indicatrice de l'ensemble A
 τ_n $n^{\text{ième}}$ instant de saut
 T temps d'arrêt
 P_Π loi d'un processus conditionnellement à une loi initiale Π
 P_X loi d'un processus conditionnellement à une loi initiale de Dirac en X
 δ_x loi de Dirac en x
 \mathbb{R}_+ ensemble des réels positifs ou nuls
 λ intensité d'un processus de saut
 m mesure invariante par une matrice de transition
 $[X_t]_{t \in \mathbb{R}}$ processus de saut markovien
 A_t^p fonction indicatrice de l'occurrence de R^p en t
 $\Gamma_{x,y}$ ensemble des réactions conduisant de x à y
 $b^p(x) = P(x, y)$
 $\delta_{x,y}$ symbole de Kronecker
 $F_x(t)$ fonction de répartition de τ_1 conditionnellement à $X(0)=x$
 τ_1^p instant de première occurrence de la réaction R^p

$F_x^p(t)$ fonction de répartition de la variable τ_1^p conditionnellement à $X(0) = x$

λ^p intensité marginale de R^p

$c^p = c_\mu$

Φ_t milieu physique

$((\Phi_t, X_t))$ processus de transport avec saut

Introduction

*"J'écris pour moi, pour quelques amis, et pour adoucir le temps."
Borges*

1. "Qu'est-ce que la vie ? " selon E. Schrödinger

En 1944, alors qu'Avery mettait en évidence le pouvoir transformant de l'ADN, Erwin Schrödinger commençait un petit ouvrage prophétique par ces lignes (1) :

"Comment peut-on expliquer à l'aide de la physique et de la chimie les événements qui se produisent dans l'espace et dans le temps, dans les limites spatiales d'un organisme vivant ?

La réponse préliminaire que ce petit livre s'efforcera de développer et de démontrer peut être condensée comme suit :

L'incapacité évidente de la physique et de la chimie actuelle de rendre compte de pareils événements n'est nullement une raison pour douter de la possibilité pour ces deux sciences d'en donner un jour l'explication."

Si une bonne part des développements de l'ouvrage ont aujourd'hui une valeur essentiellement historique, si beaucoup de spéculations ont aujourd'hui acquis une valeur de vérité suite à leur confrontation au fait expérimental, l'entreprise reste actuelle tant le but est encore loin d'être atteint. La lecture de quelques pages du dernier chapitre permet de s'imprégner de l'esprit qui animait l'auteur (2).

"Ce que je désire mettre en lumière dans ce dernier chapitre c'est, en abrégé, que tout ce que nous avons appris au sujet de la matière vivante doit nous préparer à la voir fonctionner d'une manière irréductible aux lois ordinaires de la physique. Et cela n'est pas dû à l'existence d'une 'nouvelle force' ou autre invention qui réglerait le comportement des atomes isolés au sein d'un organisme vivant, mais parce que la construction est différente de tout ce que nous avons examiné jusqu'ici dans les laboratoires de physique. Pour l'exprimer simplement, imaginons un ingénieur qui serait familiarisé uniquement avec les machines à vapeur. Après avoir inspecté la construction d'un moteur électrique, il sera disposé à admettre que ce dernier fonctionne d'après des principes qu'il ne connaît pas encore. Il constatera que le cuivre qu'il rencontre dans les chaudières est utilisé ici sous la forme de fils très longs et enroulés en bobines ; le fer qui lui est familier dans les leviers, dans les barres et les cylindres à vapeur, remplit ici l'intérieur de ces bobines de fil de cuivre. Il sera

convaincu que c'est le même cuivre et le même fer, qu'ils sont soumis aux mêmes lois de la nature ; et il ne se trompera pas en cela. La différence de construction est suffisante pour lui faire présumer que le fonctionnement est entièrement autre. Il n'imaginera pas que le moteur électrique est actionné par un démon parce que l'on peut le mettre en marche simplement en tournant un conjoncteur, sans qu'il ait ni chaudière, ni vapeur.

Le développement des événements dans le cycle vital d'un organisme témoigne d'une régularité et d'un ordre admirables, qui ne sont égalés par rien de tout ce que nous rencontrons dans la matière inanimée. Nous constatons qu'il est contrôlé par un groupe d'atomes, en ordre parfait, et qui ne représente qu'une toute petite fraction de la somme totale dans chaque cellule. En outre, si nous partons de la conception que nous avons admise pour le mécanisme de la mutation, nous concluons que la dislocation de quelques rares atomes appartenant au groupe des 'atomes directeurs' de la cellule germinative suffit à produire un changement bien défini dans les macro-caractères héréditaires de l'organisme.

Ces faits sont certainement les plus intéressants que la science nous ait révélés de nos jours. Somme toute nous pouvons incliner à ne pas les trouver complètement inacceptables. La faculté étonnante que possède un organisme de pouvoir concentrer sur lui-même un 'courant d'ordre' et d'échapper ainsi à la chute dans le chaos atomique -de s'abreuver d'ordre aux dépens d'un environnement approprié, semble être en rapport avec la présence des 'solides aperiodiques', les molécules chromosomiques qui représentent certainement le degré le plus élevé d'association atomique bien ordonnée que nous connaissions -et notamment beaucoup plus élevé que le cristal périodique ordinaire- en vertu du rôle individuel que joue ici chaque atome et chaque radical.

En bref, nous sommes témoin de l'événement que l'ordre existant exhibe la faculté de se maintenir par lui-même et de produire des événements ordonnés. Cela paraît assez plausible, mais en le trouvant plausible, nous nous basons sûrement sur notre expérience de l'organisation sociale et d'autres événements impliquant l'activité d'organismes. Et ainsi, il pourrait paraître que nous tournions dans un cercle vicieux.

Quoiqu'il en soit, le point sur lequel il faut insister encore et toujours, c'est que, pour le physicien, cet état de choses n'est nullement plausible ; tout au contraire, il est extrêmement passionnant parce qu'il est sans précédent. Contrairement à la croyance commune, le cours normal des événements gouverné par les lois de la physique, n'est jamais la conséquence d'une configuration bien ordonnée d'atomes - à moins que cette configuration d'atomes se répète un grand nombre de fois, soit comme dans le cristal périodique ou comme dans un liquide ou un gaz composé d'un grand nombre de molécules identiques.

Mais quand le chimiste manie *in vitro* une molécule très compliquée, il a toujours affaire à un nombre énorme de molécules semblables. C'est à celles-ci que ces lois sont applicables. Il vous dira, par exemple, qu'une minute après avoir mis en marche une certaine réaction, la moitié des molécules auront réagi, et qu'après une seconde minute, les trois quarts d'entre elles auront fait de même; mais quant à prédire si une molécule particulière, en supposant qu'on puisse suivre son cours, sera parmi celles qui auront réagi ou parmi celles qui sont encore inchangées, il en est incapable. C'est là une pure affaire de hasard.

Ceci n'est pas une supposition purement théorique. Ce n'est pas que nous ne puissions jamais observer le sort d'un seul petit groupe d'atomes ou même d'un seul atome. Nous le pouvons occasionnellement. Chaque fois qu'il en est ainsi nous observons une irrégularité complète, coopérant à la production d'une régularité mais pour la moyenne seulement. Nous avons traité un exemple dans le pre-

mier chapitre. Le mouvement brownien d'une petite particule suspendue dans un liquide est complètement irrégulier, mais s'il y a beaucoup de particules similaires, elles donneront naissance par leur mouvement irrégulier, au phénomène régulier de la diffusion.

La désintégration d'un seul atome radioactif est observable grâce à l'émission d'un projectile qui produit une scintillation sur un écran fluorescent ; mais si l'on pouvait vous donner un seul atome radioactif, sa survie probable serait beaucoup moins assurée que celle d'un moineau en bonne santé. En effet on ne peut rien dire de plus que ceci : aussi longtemps que cet atome vivra (et cela peut durer des milliers d'années), sa probabilité, fût-elle grande ou faible, d'exploser pendant la prochaine seconde reste la même. Ce manque absolu de détermination individuelle se traduit néanmoins par la loi exponentielle exacte de désintégration d'un grand nombre d'atomes radioactifs de la même espèce.

En biologie nous nous trouvons dans une situation entièrement différente. Un seul groupe d'atomes n'existant qu'en un seul exemplaire produit des événements ordonnés et merveilleusement harmonisés l'un avec l'autre ainsi qu'avec le milieu environnant, et cela grâce à des lois extraordinairement subtiles. J'ai dit qu'il n'existait qu'en un seul exemplaire, car, somme toute, nous avons l'exemple de l'oeuf et de l'organisme unicellulaire. Au cours des stades suivants d'un organisme supérieur, les exemplaires sont multipliés, il est vrai.

Mais à quel point ? Si je ne m'abuse, quelque chose comme 10^{14} chez un mammifère adulte. Qu'est-ce que cela ? Moins d'un millionième du nombre de molécules se trouvant dans un centimètre cube d'air. Quoique nos groupes d'atomes soient bien plus volumineux que les molécules d'air, ils ne forment en se soudant intimement qu'une seule petite goutte de liquide. Et notez la façon dont ils sont réellement répartis. Chaque cellule contient tout juste un seul d'entre eux, ou deux si nous tenons compte de la diploïdie. Sachant quelle puissance ces minuscules bureaux centraux exercent dans les cellules isolées, ne font-elles pas penser à des sièges de gouvernement local, répartis au travers du corps et communiquant aisément l'un avec l'autre, grâce au code qui leur est commun à tous ?

Cela peut sembler être une description fantastique, convenant peut-être moins à un savant qu'à un poète. Pourtant il n'est nul besoin d'imagination poétique mais seulement de réflexion scientifique, claire et nette, pour reconnaître que nous nous trouvons évidemment en face d'événements dont le développement régulier et bien ordonné est dirigé par un 'mécanisme' entièrement différent du 'mécanisme de probabilité' de la physique. Car c'est simplement un fait d'observation que le principe directeur contenu dans chaque cellule est incorporé en une seule association atomique n'existant qu'en un seul exemplaire, ou parfois deux, et c'est encore un fait d'observation que le résultat est la production d'événements qui sont un modèle d'ordre. Que nous soyons stupéfaits ou que nous trouvions tout à fait plausible qu'un petit groupe d'atomes, supérieurement organisé, puisse se comporter de cette manière, la situation est sans précédent: elle n'est rencontrée que dans la matière vivante. Le physicien et le chimiste, en explorant la matière inanimée, n'ont jamais été témoin de phénomènes qu'il leur fallût interpréter de cette façon. Le cas ne s'étant pas présenté, n'a pas été prévu par notre théorie, notre magnifique théorie statistique !"

2. 45 ans plus tard : la réponse de l'Histoire à E. Schrödinger

2.1. Une interrogation toujours vivante

La position vigoureusement affirmée par Schrödinger constitue aujourd'hui une précieuse base de réflexion. A l'aube d'une révolution scientifique, il s'interrogeait sur les obscures relations qu'entretiennent les sciences de la vie et les sciences de la matière. Depuis, la biologie est devenue moléculaire. La connaissance et la maîtrise de phénomènes chimiques ont assuré son triomphe et sa gloire. La dissection de la matière vivante au niveau atomique s'est révélée une entreprise féconde. Ce succès permet-il de donner une réponse à la question proposée par le grand physicien : La physique et la chimie expliquent-elles la vie ?

Le débat n'est pas mort et cela constitue sans doute le grand paradoxe de la biologie contemporaine. Bien que la description de phénomènes chimiques originaux aie assuré son succès, il ne se trouvera sans doute aucun biologiste digne de ce nom pour affirmer que la chimie explique la vie. Les objets vivants sont le siège de nombreux et complexes phénomènes chimiques mais aucun d'entre eux ne rend compte de la vie, ne la justifie. L'apport de la physique à la biologie est nettement moins significatif que celui de la chimie. Très indirect, il s'est surtout manifesté par le développement de nouvelles techniques d'étude. Force est de reconnaître cependant que la plasticité de l'objet vivant s'accommode mal du cadre assez rigide dans lequel évoluent les théories physiques.

La vie garde donc tout son mystère ; à ce jour, elle n'a pas été expliquée par la physique et la chimie. La réponse à la question du physicien reste en suspens. Si des opinions sont parfois exprimées, il s'agit plus souvent de professions de Foi que de discours solidement étayés. Parmi les biologistes deux thèses sont principalement avancées. Certains tendent à penser que la connaissance actuelle est encore beaucoup trop imparfaite pour permettre la moindre explication : c'est la version moderne de la thèse de Schrödinger. D'autres sont convaincus que les processus biologiques sont beaucoup trop compliqués pour trouver une quelconque explication, opinion fortement teintée de vitalisme, d'autant plus étrange qu'elle condamne celui qui la formule à une désespérante quête du Graal.

L'interrogation n'a donc rien perdu de son actualité ; elle se formule aujourd'hui dans un cadre historique différent. Il convient de noter en passant que la valeur "explicative" des théories scientifiques prête à discussion.

Cette dissertation n'est pas le lieu d'un tel débat. En première approche, «explication» peut être entendu comme l'établissement d'une relation biunivoque, ou non équivoque, entre deux discours dotés chacun d'autonomie. Quelques hypothèses fondatrices délimitent un domaine qui sera exploré par le riche et lent dialogue entre le modèle et l'expérience, entre la théorie et la pratique. Une «explication» de l'observation peut aussi en être un modèle, "une description que, d'une part il est impossible de tenir pour vraie au sens tout à fait rigoureux du terme -car certains faits la contredisent- mais qui, d'autre part synthétise rationnellement une partie de notre expérience et qui pour cette raison peut être dite jouir d'une sorte de «vérité faible» ou de «vérité au second degré»" (3). L'absence de sens, ou le non-sens, qui résulte de l'application des théories physiques et chimiques au phénomène vivant traduit le fait que le domaine de validité des hypothèses de ces deux sciences ne contient pas celui dans lequel se développent les processus biochimiques. L'inclusion est plutôt vérifiée dans l'autre sens. S'il est possible de trouver des phénomènes biochimiques se situant à l'intérieur du cadre délimité par les hypothèses fondatrices de ces deux sciences, il en est d'autres qui s'en démarquent. Ils participent au caractère inédit du phénomène vivant. Ainsi, la vaine tentative d'explication du vivant à laquelle la physique et la chimie pourraient prétendre ne serait sans doute guère plus qu'une triste projection d'un espace sur un espace de dimension inférieure

2.2. Des molécules en petits nombres

La connaissance présente des mécanismes biochimiques qui se déroulent au sein de la cellule permet de s'abandonner à l'émerveillement de Schrödinger face à l'originalité de cet édifice moléculaire dont le comportement bien ordonné repose sur des molécules présentes en tout petit nombre. Ce point mérite d'être approfondi. Si le rôle déterminant d'une unique molécule chromosomique de "cristal aperiodique" a été confirmé, les nombres moyens par cellule de nombreuses autres molécules tout aussi importantes au bon déroulement des événements, ont pu être estimés et les chiffres sont impressionnants. Ainsi, par exemple, les récepteurs cytoplasmiques des hormones stéroïdes comme les œstrogènes, sont présents à environ $3 \cdot 10^4$ molécules par cellule (noté m/ç par la suite) tandis qu'il y a 10^4 m/ç de récepteurs membranaires de l'insuline (4). Une des protéines les plus abondantes d'E. Coli, le facteur d'élongation de la synthèse protéique EF-Tu est présente à 10^5 m/ç (5). Le nombre de molécules de β -galactosidase varie entre 3 et 3000 m/ç et le nombre d'ARN_m qui codent pour cet enzyme

varie lui, entre 0 et 50 m/ç (5). Enfin, des protéines ayant une fonction de régulation de la transcription sont elles aussi présentes en petite quantité. La quantité du répresseur de l'opéron lactose est estimée à 10-20 m/ç et celle du répresseur du phage λ à 100-200 m/ç (6).

Le nombre des molécules critiques (acides nucléiques et protéines) peut être considéré comme généralement petit à l'intérieur d'une cellule. Cette constatation est encore plus percutante si l'on prend en compte l'état physique de ces molécules. Bon nombre d'entre elles ne sont fonctionnelles que complexées à d'autres et leur signification biologique est fonction de l'état dans lequel elles se trouvent. Ainsi, le répresseur de l'opéron *lac* peut-il être complexé ou non à l'ADN. C'est probablement l'ADN qui, du fait du grand nombre de molécules pouvant entrer en interaction avec lui, a le plus grand nombre d'états possibles. Cette remarque permet de constater que, d'un point de vue fonctionnel, le nombre de molécules par cellule n'est pas celui qui est énoncé dans le paragraphe précédent mais qu'il est encore inférieur puisque celui-ci, obtenu par analyse biochimique, correspond au nombre de ces molécules dans tous les états possibles.

La petitesse du nombre de molécules par cellule peut être encore soulignée en constatant que la majorité des populations de cellules manipulées au laboratoire sont plus importantes que le nombre des molécules de chaque espèce moléculaire à l'intérieur de chacune des cellules ; 10^6 cellules eucaryotes sont cultivées dans un flacon de quelques dizaines de millilitres et une culture d'*E. Coli* atteint facilement des concentrations de l'ordre de 10^9 ç/ml. L'ordre de grandeur du nombre de cellules constituant un organisme métazoaire est, bien sûr, encore plus important, environ 10^{12} à 10^{14} .

2.3. Les molécules biologiques n'échappent pas aux jeux du hasard

Face au paradoxe d'une régularité biologique reposant sur de petits ensembles de molécules au comportement imprévisible, Schrödinger conclut qu'il convient de chercher un "mécanisme" non probabiliste pour lever le paradoxe. Cette pirouette est-elle vraiment nécessaire ? Est-il seulement possible de la justifier ? Est-elle aussi conforme à l'observation que l'auteur le prétend ? Rien n'est moins sûr.

Un certain nombre de phénomènes biologiques majeurs ont été très tôt considérés comme des phénomènes aléatoires. Leur étude à l'échelle moléculaire n'a pas infirmé cette vue. Elle a généralement dévoilé que le phénomène en question n'était que la conséquence à l'échelle de l'organisme d'un événement ou d'une combinaison d'événements moléculaires aléatoires.

Ainsi, l'acte de naissance de la génétique a été la reconnaissance de la disjonction aléatoire des caractères, suite à une observation statistique. L'observation cytologique du processus méiotique révéla l'appariement des chromosomes homologues de part et d'autre du plan équatorial lors de la métaphase I et leur séparation lors de l'anaphase.

Un peu plus tard, une dépendance statistique entre certains caractères fut constatée. Cette violation de la première loi de Mendel fut réintégrée au sein de la théorie par Morgan, en supposant une répartition linéaire des gènes le long des chromosomes et en supposant un échange possible entre les chromosomes de brins homologues. La probabilité de l'échange vérifiait une loi de densité plus ou moins uniforme tout au long du chromosome. L'observation cytologique de la méiose permit de proposer un échange de chromatides entre chromosomes homologues au cours d'un processus appelé *crossing-over*, sans toutefois parvenir à proposer un mécanisme satisfaisant de cet échange. L'étude moléculaire démontra qu'il s'agissait d'une facette particulière d'un phénomène plus général, la recombinaison homologue. Il semble que les altérations locales de l'ADN, *breaks* et *gaps*, résultant de l'action délétère de rayons X ou ultraviolets ou de produits chimiques mutagènes soient les lieux d'initiation du processus (7) qui se trouve ainsi fondé sur un événement aléatoire advenant à la molécule d'ADN.

L'analyse génétique à laquelle procéda Barbara McClintock dans les années 40 lui permit d'annoncer en 1951 que certains "éléments de contrôle" n'avaient pas de position fixe dans le génome mais pouvaient éventuellement changer de position (8). Au niveau moléculaire, ce phénomène est appelé transposition. C'est un événement rare dont la fréquence est de l'ordre de 1 pour 10^6 divisions cellulaires chez E.Coli ; le lieu d'insertion de la séquence mobile, le transposon, semble lui aussi aléatoire (9).

De même, l'analyse statistique des fréquences de mort par cancer en fonction de l'âge des individus présente une allure non linéaire. L'interprétation la plus naturelle fut de considérer que la cancérogenèse résulte de la conjonction d'événements rares et indépendants (10). En effet, supposons que chacune des variables x_1, \dots, x_n associées à ces événements ait une loi de densité constante sur un intervalle de temps $[0, T]$ alors :

$$P(\{x_1 \leq t\} \cap \dots \cap \{x_n \leq t\}) = \prod_{i=1}^n \int_0^t a_i ds = \left(\prod_{i=1}^n a_i \right) t^n ; t \in [0, T[; T < +\infty$$

ce qui justifie l'allure de la courbe. L'étude moléculaire du phénomène, trop complexe pour être résumée en quelques lignes, a largement confirmé cette vue des choses.

Un dernier exemple enfin, le phage λ est un phage tempéré dont le

développement peut évoluer selon deux directions : lytique et il se multiplie à l'intérieur de la cellule hôte qu'il finit par tuer, lysogénique et il s'insère à l'intérieur du chromosome de la bactérie, l'expression de ses gènes étant abolie du fait de l'action de son propre répresseur. Au moment d'une infection, le choix d'une voie est l'objet d'une régulation subtile dans laquelle l'état physiologique général de la cellule hôte semble jouer un rôle important. L'infection de bactéries cultivées en conditions optimales révèle une proportion 1/2 pour chacune des voies (11). Ce comportement probabiliste trouve sa justification dans l'étude du mécanisme moléculaire sous-jacent qui est une compétition à l'issue incertaine entre les protéines CII et Cro dont les actions sont opposées. Ce phénomène sera repris et détaillé ultérieurement. Un phage lysogénique peut, de manière réversible, entrer dans un cycle lytique à condition que la répression soit levée. Ceci résulte des variations des conditions physiques du milieu par un mécanisme trivial ou non. L'induction du prophage peut, par exemple, résulter d'une hausse de la température dans le cas d'un mutant thermosensible. Mais elle peut aussi être la conséquence d'un phénomène physiologique important, l'induction des gènes SOS de réparation de l'ADN. De l'ADN simple-brin s'attache à la protéine RecA et active sa fonction protéase. LexA, le répresseur des gènes SOS, est sensible à cette activité protéolytique qui permet une dérégulation de ces gènes. Il en est de même pour le répresseur CI de λ . L'induction du prophage apparaît donc comme une réaction à des conditions physiques hostiles comme l'exposition à des radiations ionisantes ou à des agents chimiques mutagènes.

2.4. L'ordre biologique en dépit du désordre moléculaire

Ces quelques exemples illustrent la part que joue le hasard dans certains phénomènes biologiques, aléas du milieu, défaillance d'un système de correction des erreurs, compétition à l'issue incertaine ou encore loterie chromosomique. Chaque instant dans la vie de la cellule peut apparaître comme un tirage au sort. Certains phénomènes macroscopiques l'ont laissé deviner, ont permis d'attribuer à ce tirage le statut d'hypothèse explicative ; la description moléculaire met en relation cette loterie physiologique avec l'indétermination fondamentale que revêt le comportement d'une toute petite population de molécules qualifiées, pour la circonstance, d'«importantes». Contrairement à l'opinion émise par Schrödinger, il semble que le hasard ait aussi son rôle à jouer dans la vie moléculaire de la cellule et que les molécules biologiques essentielles soient elles aussi sujettes à ce "mécanisme de probabilité" à la base de la physique et de la chimie statistique.

La prudence invite à clarifier autant que possible le sens que l'on accorde à cette prise de position afin d'éviter tout malentendu. Il serait regrettable qu'elle soit interprétée comme "une glorification outrageuse du hasard" ou comme le signe d'une fascination de l'aléatoire qui témoignerait d'une attitude anti-scientifique par excellence" (58). Elle n'est pas non plus de nature philosophique. Le statut ontologique du hasard est sans rapport avec le contenu du présent travail. Admettre comme hypothèse de travail le caractère stochastique de l'évolution individuelle des molécules a deux justifications. C'est une hypothèse qui minimise la rupture par rapport à la chimie statistique. Si l'on doit renoncer au déterminisme statistique, ce n'est pas à cause d'hypothèses nouvelles, c'est simplement l'expression de l'originalité des conditions de travail non celle des hypothèses de travail. Il n'y a donc rien de révolutionnaire dans cette approche qui est en fin de compte la plus cohérente avec la chimie conventionnelle. De plus, il faut peut-être rappeler que la possibilité d'un déterminisme n'est pas exclue dans un raisonnement probabiliste. Cette hypothèse est donc aussi la moins restrictive.

Le paradoxe d'un comportement ordonné reposant sur des populations moléculaires au comportement indéterminé est donc plus actuel que jamais. Il se présente cependant aujourd'hui sous une forme moins crue, moins provoquante, plus subtile. Si les molécules biologiques sont l'objet, comme toute autre molécule de comportements non déterministes, il est cependant évident que le désordre d'une petite population de molécules d'hydrogène et celui d'une solution protéique en conditions physiologiques n'ont rien de comparables. La grande finesse des interactions biochimiques, finesse de réponse au milieu, finesse de reconnaissance, affinité etc... peuvent donner l'illusion qu'elles répondent à une loi déterministe.

Le point ultime, le cadre et la source d'inspiration du biochimiste contemporain est un hasard omniprésent au sein de la cellule, mais un hasard malin, malicieux, fortement biaisé ! Un hasard si orienté qu'il passerait volontiers inaperçu. Une tâche importante consiste à tenter de distinguer les lieux où il se maquille en déterminisme de ceux où il convient de le traiter comme aléatoire.

3. Le déterminisme des lois physiques

3.1. Le théorème central-limite

Il existe de nombreux théorèmes de convergence probabilistes qu'il serait

incongru de rappeler exhaustivement. [Voir par exemple, pour un exposé plus exhaustif (12, 13).] Un des plus puissants porte le nom de théorème central-limite. Il peut s'énoncer ainsi :

Soit une suite de variables aléatoires réelles (X_n) indépendantes de mêmes lois d'espérance m et de variance s^2 et soit la suite de variables aléatoires

$$Y_n = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \text{ alors } \sqrt{n} \cdot Y_n \xrightarrow[n \rightarrow +\infty]{\text{loi}} N(m; s^2). \quad n^{1/2} Y_n \text{ converge en loi vers la loi normale de}$$

centre m et de variance s^2 . Il est facile de remarquer que la variance de Y_n tend vers 0 lorsque n augmente.

Ce résultat est fondamental ; il tend d'une part à offrir une base empirique à la notion de probabilité en rendant celle-ci "observable" par la répétition d'un grand nombre de mesures, il justifie d'autre part la présence dominante des distributions normales dans les sciences de la nature et, en particulier, en biologie. Par exemple un phénotype lié à l'action cumulative d'un grand nombre de causes indépendantes (nombreux gènes, effet du climat etc...) aura une distribution normale.

3.2. Application en physique et en chimie

Soit un intervalle de temps $I=[0, T]$ au cours duquel un atome radioactif a une probabilité p de se désintégrer. Si la population d'atomes observée est constituée d'un atome unique, il est tout à fait impossible de prédire avec certitude dans quel état elle se trouvera au temps T , l'atome pouvant être désintégré ou non. Si maintenant au temps 0, la population contient N atomes, le nombre k de désintégrations qu'elle va subir pendant l'intervalle I suit la loi binomiale $b(k, N, p)$. A chaque k , correspond un état d'arrivée de la population et certains états extrêmes ont des probabilités très faibles qui les rendent inobservables.

Si, enfin, le nombre N tend vers l'infini alors la fraction de la population ayant réagi reste aléatoire mais obéit à une loi proche de la loi normale de moyenne p et de variance $p(1-p)/N$. Ce nombre est rapidement plus petit que l'erreur due à l'instrument de mesure si bien que cette fraction est pratiquement considérée comme déterminée.

L'exemple choisi est bien entendu trivial, mais il illustre le raisonnement par lequel le physicien passe d'un phénomène aléatoire à l'échelle atomique à un phénomène déterministe à l'échelle macroscopique. Un autre exemple pourrait être celui de la température d'un gaz. L'énergie cinétique à un instant donné est totalement aléatoire pour chacun des atomes mais la

température apparaît déterminée à l'échelle de la population des atomes. Il convient cependant de bien saisir qu'à la base de ces résultats il y a une hypothèse d'indépendance qui ne doit pas être négligée lorsque sont considérés des systèmes chimiques. Là, les molécules n'évoluent pas, *a priori*, indépendamment les unes des autres puisque ce sont justement leurs interactions qui sont prises en compte. Il se trouve que l'indépendance est souvent vérifiée dans la pratique, mais elle ne peut pas être posée comme hypothèse. En particulier, lorsque les systèmes réactionnels comportent des nombres petits de molécules, l'indépendance est manifestement violée. Une analyse exacte des processus aléatoires correspondants conduit à des résultats inattendus qui vont à l'encontre de certaines idées reçues. Le modèle déterministe de la réaction chimique se révèle dans beaucoup de cas n'apporter aucune information sur le comportement du système lorsque le nombre de molécules devient petit.

4. Etat des lieux, esprit et nature des travaux entrepris

4.1. La chimie stochastique

La question des rapports de la biologie à la chimie se pose aujourd'hui en ces termes. La biologie moléculaire a bien mis en évidence le rôle central tenu au sein de l'édifice cellulaire par des macromolécules présentes en petits nombres. Elle a aussi établi que les molécules biologiques n'échappent pas aux jeux du hasard, contrairement à une hypothèse qui avait pu être formulée. Au contraire, il est apparu que certains événements moléculaires aléatoires pouvaient engendrer un comportement bien identifié de la cellule dans son ensemble, voire de l'organisme lui-même. Ainsi, bien malgré elle, la biologie a soulevé le saisissant paradoxe d'un ordre macroscopique résultant du comportement plus ou moins indéterminé de petites populations moléculaires. Certains chimistes se sont penchés sur la question du comportement de petits systèmes réactionnels. Pour eux il s'agissait avant tout d'un problème assez théorique : préciser les limites au-delà desquelles l'approximation thermodynamique est valable. La chimie conventionnelle est pratiquement incapable d'isoler et de manipuler des systèmes nécessitant un traitement probabiliste. La préoccupation de ces chimistes étant assez limitée, puisqu'un unique aspect de la question les intéressait, la méthode employée a été assez pragmatique, essentiellement orientée vers le calcul de lois de probabilité, des moments de certaines variables, etc... Le formalisme mathé-

matique a été réduit à la portion congrue, est resté très simple au point que certaines étapes des calculs ou certains arguments au cours des raisonnements apparaissent mathématiquement mal étayés, voire même parfois discutables. L'option de résolution analytique s'est révélée conduire à des calculs qui sont devenus rapidement très lourds et insolubles dès que les réactions considérées ont gagné en complexité. L'emploi de méthodes d'approximation ne permet pas une généralisation du calcul stochastique à des ensembles de systèmes plus larges. La voie suivie par ces chimistes ne semblait donc guère prometteuse dans une perspective biologique.

4.2. Un travail de forme nécessaire

L'objectif poursuivi ici sera sensiblement plus large que celui des chimistes. Il s'agit avant toute autre chose d'un travail de forme, de la recherche d'une technique descriptive plus adaptée aux besoins de la biologie que la langue naturelle qui reste exclusivement utilisée par la biologie moléculaire, complétée il est vrai, par de nombreux schémas plus ou moins conventionnels qui aident à la compréhension du texte. Aucun schéma, aussi bien pensé soit-il, ne parvient à rendre compte de la dynamique complexe qu'il évoque ; de même la structure nécessairement linéaire d'un texte traduit mal la simultanéité des possibilités au sein d'un système chimique. Par ailleurs, l'importance relative des différentes réactions ne sont traduites qu'au moyen de notions de "force" sommaires. "Or, de ces techniques descriptives nous n'en avons pas tellement ; à tout prendre, il n'y en a guère que deux : la langue naturelle et le formalisme mathématique" (14). L'utilisation d'un langage plus symbolique, adapté à la nature probabiliste des phénomènes observés peut laisser espérer une description beaucoup plus compacte des systèmes biochimiques et, donc, une meilleure compréhension de ceux-ci. Il est clair que la contrepartie d'une telle perspective sera une abstraction accrue des concepts manipulés par un tel langage. Les limites de la langue naturelle étant connue, ce nouveau langage aura été reconnu ; il est mathématique.

Les pages qui suivent ne sont animées que par cet unique souci : tenter de dire autrement, mieux si possible, ce qui est connu de tous les biologistes, donner une autre forme au discours de la biologie moléculaire et tenter d'estimer les apports possibles de l'entreprise ainsi que, bien sûr, les difficultés qu'elle risque de rencontrer. Leur point de vue mathématique est donc marqué. La rigueur du formalisme et des notions employées sera privilégiée par rapport à la recherche de solutions numériques ou analytiques à des problèmes particuliers. La compréhension des notions mathématiques ainsi que les hypothèses qui conditionnent leur pertinence dans un contexte biochimique

que seront détaillées. En revanche, les techniques mathématiques qui permettent la manipulation de ces notions sont presque systématiquement ignorées. Elles existent, il est possible d'y faire appel ultérieurement en cas de nécessité. Au stade préliminaire qui est celui de ce travail, elles n'auraient qu'alourdi le discours et obscurci l'essentiel. Des remarques identiques doivent être formulées à propos des parties biologiques du texte. Là non plus, il ne peut être question de rapporter les protocoles expérimentaux qui ont conduit aux résultats mentionnés. Les systèmes décrits le seront aussi succinctement qu'il est possible de le faire sans les trahir. Un aspect particulier de leur dynamique est mis en avant et le niveau du détail ne sera jamais exagérément fin.

Ainsi, le centre de ce travail est la superposition de deux discours pris chacun à un niveau assez simple, approximativement celui accessible à un étudiant en maîtrise. Il vise à préciser les hypothèses sous lesquelles ils peuvent être mis en correspondance, la richesse qui en résulte, ainsi que les questions que l'opération soulève inévitablement.

4.3. Trois étapes

Tout au long du travail il est fait usage de l'expression petit système chimique. Il convient de préciser ici le vocable sans toutefois en donner une définition. Il semblerait que le passage d'un petit système chimique à un système de plus grande taille se fasse progressivement et que l'étude de cette expansion puisse faire l'objet d'une réflexion qu'une définition trop stricte risquerait de masquer. Seules quelques caractéristiques de ces systèmes vont donc être énoncées. "Petit" est un adjectif qui qualifie la taille des populations moléculaires impliquée. Pour qu'un système soit petit il suffit qu'une des populations de molécules soit petite. Une population de molécules est petite si ses états possibles doivent être considérés comme discrets. La conséquence de cette nécessité est le caractère *a priori* stochastique de la dynamique. Par exemple, tous les systèmes biologiques comportant des séquences d'ADN doivent donc être considérés comme des petits systèmes chimiques.

Plus précisément, le travail est conduit en trois temps qui, chacun, correspondent à un chapitre.

La première question qui peut sembler triviale de prime abord, est la traduction sous forme d'équations chimiques de la description de trois grands processus biologiques. L'opéron lactose a été choisi pour deux raisons. Il est particulièrement simple et le nombre des réactions qu'il implique reste limité. Toutefois il a déjà les principales caractéristiques des systèmes régulés, il est en particulier difficilement concevable sans le milieu physi-

que externe avec lequel il entretient des relations. Enfin, le répresseur est présent en très faible quantité. L'opéron lactose présente donc le paradoxe d'un comportement déterministe reposant sur une toute petite population moléculaire. Au contraire, le phage λ a été choisi en fonction du caractère aléatoire de son comportement. L'instabilité de la phase transitoire que sont les stades précoces de l'infection peut être considéré comme l'archétype des phénomènes de développement au sens large. L'incertitude qui entoure l'issue de l'épreuve permet d'espérer qu'un traitement stochastique soit particulièrement pertinent.

La réplication des plasmides de la famille ColE1 a fait l'objet d'un modèle déterministe à espace des phases continu. Ce système relevait d'une sorte de défi. Une quantité de plasmides appelait bien évidemment un modèle discret et stochastique. Cependant, une des clefs de la dynamique observée est la constante expansion du volume cellulaire entrecoupée de périodiques divisions par deux. Les probabilités des réactions chimiques évoluent dans le temps en fonction du volume. Ce type d'évolution est intraduisible dans les modèles ordinaires de la chimie stochastique. Le modèle introduit dans le chapitre 3 pourra en revanche exprimer des dynamiques de ce type et le défi sera relevé avec succès.

Cette opération de rédaction sous forme d'équations chimiques n'est généralement pas systématiquement conduite car elle suppose l'écriture de très nombreuses réactions. Après avoir précisé les réactions qui constituent ces systèmes, une analyse algébrique des espaces qu'elles décrivent a été menée très systématiquement. Elle permet de préciser le nombre de variables nécessaires à la description de l'état du système, le nombre de réactions irréversibles, etc... Ce travail préliminaire à toute modélisation chimique relève d'une branche de cette discipline, la stœchiométrie. La seconde étape se concentre sur la dynamique qui anime les populations de macromolécules au sein de la cellule vivante. A ce stade, sont analysés en détail les résultats obtenus par la chimie stochastique. Placée dans la perspective biologique mentionnée plus haut, cette analyse rend nécessaire la reconstruction du modèle cinétique des petits systèmes réactionnels. Les hypothèses physiques sont de nouveau énoncées et le formalisme employé est celui en usage dans la théorie des processus de saut markoviens. Les propriétés de ce modèle, ses limites et les questions qu'il soulève sont discutées.

Le défaut majeur du modèle étudié dans le chapitre 2 est son incapacité radicale à prendre en compte les interactions du système de macromolécules avec le milieu physique et chimique dans lequel il évolue. Cette incapacité donne au modèle peu d'aptitudes à traduire de manière satisfaisante la grande majorité des processus régulés. Cette constatation rend indispensable

une prospection plus avancée afin de déterminer jusqu'à quel point il est possible d'exprimer dans une forme mathématique les grandes caractéristiques communes à tous les systèmes biologiques. Dans le chapitre 3, deux types nouveaux de processus sont proposés et leur signification biologique discutée. Le processus de transport avec saut est construit. Il apparaît qu'il traduit remarquablement bien l'idée qu'a le biologiste des relations entretenues entre un système biochimique et le milieu qui l'environne. Par ailleurs, les pierres fondatrices d'un processus de transport avec saut et branchement sont rassemblées. Il semble toutefois que le processus qu'elles permettraient de bâtir serait beaucoup plus riche que la connaissance actuelle au niveau moléculaire des systèmes biologiques qu'il pourrait traduire.

4.4. Bilan et prolongements

Le résultat principal de l'ensemble de ce travail est qu'il est possible de traduire dans un formalisme mathématiquement satisfaisant bon nombre des systèmes décrits par la biologie moléculaire tout en tenant compte d'un trait caractéristique qui les unit dès qu'ils évoluent au sein de ce minuscule espace confiné qu'est la cellule vivante, la très petite taille des populations moléculaires en jeu. A la différence des travaux antérieurs, aucune hypothèse obscure ou purement technique n'a été nécessaire. L'ensemble du modèle repose sur trois hypothèses dont le sens physique est limpide et qui, de ce fait peuvent faire l'objet d'une réelle discussion. Alors qu'elles offraient au regard l'aspect monolithique que partagent dogmes et axiomes, elles se sont assouplies. En acquérant un sens physique, elles ont permis au modèle de s'enraciner dans l'observation. La priorité a été donnée à l'estimation des fruits possibles de cette mathématisation. Aussi a-t-elle été conduite au aussi loin que possible. Des questions nouvelles tant mathématiques que biologiques surgissent. Elles découlent de la discussion des hypothèses fondatrices et du regard neuf sur les systèmes biologiques qu'il est nécessaire d'adopter à la lumière de ces modèles. Certaines ont été clairement exprimées, aucune ne semble particulièrement simple si bien qu'une réflexion les ayant pour objet constituerait une tâche passablement lourde. La puissance d'évocation certaine des processus stochastiques définis dans ce travail permet de penser que nos efforts futurs pourraient être orientés vers cette tâche .

Chapitre 1

Stœchiométrie : la structure algébrique des processus réactionnels

*Paradoxe : "Tout ce qui est rigoureux est insignifiant.
Ce qui limite le vrai n'est pas le faux, c'est l'insignifiant."*

René Thom

0. Introduction

La stœchiométrie, initialement discipline chimique s'intéressant aux proportions dans lesquelles les corps réagissent, apparaît aujourd'hui plutôt comme la première étape du traitement mathématique des réactions chimiques. Elle permet de mettre en place un véritable cadre, une armature algébrique et géométrique sur laquelle pourront prendre appui tous les efforts de modélisation ultérieurs. Le travail des chimistes est dans ce domaine particulièrement précieux au biologiste puisqu'il lui donne un moyen extrêmement élégant de définir les systèmes réactionnels complexes sur lesquels son attention est concentrée.

Les principales notions seront d'abord introduites telles qu'elles sont habituellement présentées. Les manières dont les différents auteurs font appel à ces notions sont très variables. Certains sont très pragmatiques (15) alors que d'autres visent l'établissement d'une théorie mieux assise (16).

Dans le paragraphe 2 ces notions sont appliquées à des processus biologiques complexes, essentiellement l'opéron lactose, le phage λ et le système de réplication du plasmide ColE1. Plusieurs modèles sont construits pour les deux premiers exemples afin de montrer qu'il est possible d'aller assez loin dans les détails de la description. La complexité de ces systèmes pousse à l'imagination. Un changement de base original est introduit empiriquement à ce niveau, il permet une représentation plus synthétique des systèmes étudiés. Dans un dernier temps des notions de stœchiométrie nouvelles sont proposées comme celle d'orbite et l'aspect théorique est développé. Il

permettra une transition plus facile avec le chapitre 2. En particulier un critère d'irréversibilité est avancé, la méthode de changement de base est détaillée et une méthode originale de détermination de la dimension de l'espace stœchiométrique est exposée.

1. Principales notions de stœchiométrie

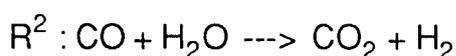
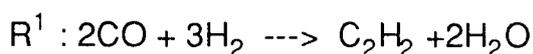
1.1. Matrices réactive, produit et stœchiométrique

Un processus réactionnel est un ensemble de réactions élémentaires.

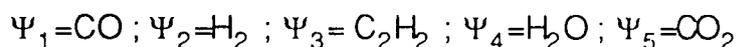
$$\mathcal{R} = \{R^p / p=1, \dots, r\}$$

Le terme de réaction complexe est parfois utilisé dans la littérature ; , la démarche entreprise étant purement formelle, il sera ici évité afin de ne pas créer de référence artificielle dans la terminologie à la chimie physique. Il est aussi parfois fait appel au terme de système de réactions couplées. Le nom de processus réactionnel est tout à fait dépourvu de connotation dynamique. Il ne doit pas être confondu avec le terme de processus chimique qui est introduit au chapitre deux. Lui au contraire désigne le processus stochastique qui modélise le comportement de petites populations de molécules. C'est un processus réactionnel qui a été probabilisé. Cette similitude dans la terminologie qui peut apparaître trompeuse, est en partie justifiée par le fait qu'en dépit d'une nature différente, les liens entre ces deux objets sont intimes.

Soit, par exemple, le processus réactionnel suivant :



Dans ce processus sont impliquées 5 espèces moléculaires notées Ψ_i . Leur indexation est arbitraire et ainsi par exemple :

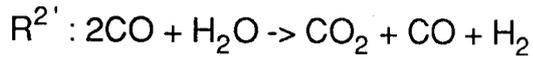
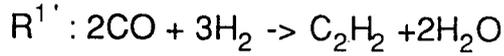


La structure des réactions élémentaires peut être exprimée très simplement

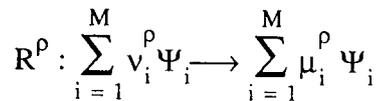
sous forme matricielle : $\gamma = \begin{bmatrix} -2 & -1 \\ -3 & 1 \\ 1 & 0 \\ 2 & -1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix}$ les réactions apparaissant en colonnes et

les espèces moléculaires en lignes. La matrice γ est appelée matrice stœchiométrique du processus. Son terme général γ_i^j est égal à la somme algébrique des coefficients stœchiométriques de l'espèce Ψ_i dans la réaction j affectés du signe -1 lorsqu'il est réactif et du signe +1 lorsqu'il est produit.

Il convient de noter cependant que la matrice stœchiométrique d'un processus est unique mais qu'elle n'est pas suffisante à le définir, car dans les équations chimiques les catalyseurs ne se simplifient pas ! La matrice γ ci-dessus est aussi la matrice du processus suivant à supposer qu'il ait un sens chimique :



La forme générale d'une réaction élémentaire est :



Dans cette expression, les coefficients v_i^p et μ_i^p sont des coefficients stœchiométriques conventionnels. Pour chaque réaction R^p , ils permettent de définir les vecteurs réactifs v^p et produits μ^p . Ces vecteurs permettent à leur tour de définir deux matrices $M \times r$, v et μ , les matrices réactive et produit. Il apparaît immédiatement que :

$$\gamma = \mu - v$$

L'ordre d'une réaction élémentaire, facteur déterminant puisque de lui dépend la linéarité ou la non-linéarité de la cinétique du système, se définit par :

$$\sum_{i=1}^M v_i^p = l^p$$

On parle de stœchiométrie à support atomique lorsque les réactions sont supposées vérifier une règle de conservation atomique. Chaque molécule est une combinaison originale d'atomes. Le bilan atomique de chaque réaction élémentaire R^p doit être nul. Cela peut s'exprimer mathématiquement par l'existence d'une matrice dite matrice atomique, notée Z , telle que $Z \cdot \gamma = 0$.

En stœchiométrie conventionnelle, ou encore stœchiométrie à support atomique, les ordres des réactions élémentaires sont généralement 1 ou 2, parfois 3. En stœchiométrie non-atomique, des ordres 0 ou supérieur à trois sont envisageables puisque la réalité physique s'éloigne et que c'est elle qui rend négligeable en probabilité les réactions d'ordre supérieur à trois ou qui ne permet pas de donner un sens à des réactions d'ordre 0.

Exemple :

Les matrices μ et ν du processus du début de paragraphe sont :

$$\nu = \begin{bmatrix} 2 & 1 \\ 3 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 1 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \text{ et } \mu = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \\ 1 & 0 \\ 2 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ et bien évidemment : } \mu - \nu = \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & 1 \\ 1 & 0 \\ 2 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} - \begin{bmatrix} 2 & 1 \\ 3 & 0 \\ 0 & 0 \\ 0 & 1 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -2 & -1 \\ -3 & 1 \\ 1 & 0 \\ 2 & -1 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} = \gamma$$

1.2. Indépendance des réactions et espace stœchiométrique

L'indépendance d'un ensemble de réactions élémentaires s'entend ici au sens de l'algèbre linéaire. Un ensemble de réactions élémentaires est dit indépendant si aucun des vecteurs γ^p n'est combinaison linéaire des autres. Il existe un critère simple d'indépendance :

Propriété :

Un processus réactionnel $\mathfrak{R} = \{R^p / p = 1, \dots, r\}$ est indépendant si et seulement si le rang de la matrice stœchiométrique est égale au nombre des réactions élémentaires. Ceci se note : $\text{rg}(\gamma) = r$

Une remarque s'impose immédiatement. Tout processus comprenant au moins un équilibre est linéairement dépendant. En effet, ce qui est considéré habituellement comme un équilibre chimique, est un ensemble de deux réactions élémentaires :

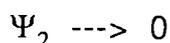
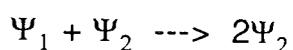
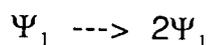
$$\{A \leftrightarrow B\} = \{R^{+p}; R^{-p}\} \text{ avec : } \mu^{+p} = \nu^{-p} \text{ et } \mu^{-p} = \nu^{+p}$$

Il est convenu d'appeler rang d'un processus réactionnel, celui de sa matrice γ . Le rang d'une matrice γ est le plus grand entier d , tel qu'il existe une matrice carrée inversible (de déterminant non nul) d'ordre d extraite de γ . Ce théorème donne un critère d'indépendance simple.

Ces notions, qui peuvent paraître un peu gratuites, sont en réalité particulièrement riches puisqu'elles permettent de déterminer la dimension de l'espace à l'intérieur duquel évolue le processus, ou espace stœchiométrique. L'espace stœchiométrique d'un processus est un sous-espace de son espace d'état passant par son état initial et dont la dimension est le rang du processus.

1.3. La stœchiométrie non atomique

Tout ce qui a été exposé dans les deux paragraphes précédents est directement issu de la stœchiométrie des réactions obéissant à la loi de conservation atomique. Mais la stœchiométrie s'étend aussi à des réactions beaucoup plus complexes dans lesquelles les compositions des molécules peuvent être inconnues (c'est souvent le cas en biologie dès que sont prises en considération des protéines), voire même dans le cas où les réactions écrites sont purement formelles et modélisent des réactions fictives ou des phénomènes qui n'ont aucun fondement chimique comme le modèle de Lotka-Volterra (17) dont le sens premier était écologique :



Une question surgit très vite dès que ce genre de système est examiné de près ; conservent-ils ou non la "masse" ? Plus précisément sont définies les notions suivantes :

Une réaction R^p est dite *conservative* s'il existe un vecteur de masse m à composantes strictement positives orthogonal à γ^p :

$$m \cdot \gamma^p = 0$$

De même, une réaction élémentaire est dite *surconservative* ou *sous-conservative* s'il existe un vecteur de masse m à coordonnées strictement positives qui vérifie respectivement pour tout p de $\{1, \dots, r\}$:

$$m \cdot \gamma^p \geq 0 \text{ ou } m \cdot \gamma^p \leq 0$$

Il semble clair que ces deux dernières notions traduisent la création et la perte de masse. A chaque réaction élémentaire, il est possible de reconnaître un caractère conservatif, sous ou surconservatif. Un processus est dit conservatif, sur ou sous-conservatif selon que toutes ses réactions vérifient l'une de ces propriétés. La grande majorité des processus ne possède aucune de ces 3 propriétés car ils sont bâtis sur un ensemble de réactions élémentaires dont certaines sont surconservatives alors que d'autres sont sous-conservatives.

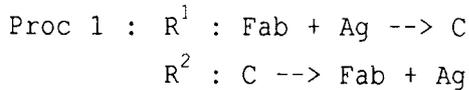
2. Stœchiométrie de quelques processus biologiques

2.1. Deux exemples triviaux

Afin de les mettre en pratique avant d'aborder quelques exemples plus complexes, ces notions vont être passées en revue dans deux exemples particulièrement simples et universels, le modèle de la liaison antigène-anticorps et celui de la catalyse enzymatique de Michaelis-Menten.

2.1.1. La fixation de l'antigène par l'anticorps

Soit un système contenant des quantités supposées constantes dans le temps d'un fragment Fab et d'un antigène (Ag) fixé par ce fragment. Le processus est un équilibre chimique classique, constitué de deux réactions élémentaires qui conduisent réversiblement à la formation d'un complexe (C) :



Il convient de noter sur un exemple, aussi simple que celui-ci, qu'il se place déjà dans le cadre de la stœchiométrie non-atomique dans laquelle les molécules ont déjà la valeur symbolique de leur fonctionnalité.

Le processus comporte trois espèces moléculaires :

$\Psi_1 = \text{Fab}$; $\Psi_2 = \text{Ag}$; $\Psi_3 = \text{C}$, d'où il découle que l'espace des phases du processus est \mathbf{R}^3 .

L'écriture des matrices réactive et produit est immédiate :

$$v = \begin{bmatrix} 1 & 0 \\ 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{bmatrix} \text{ et } \mu = \begin{bmatrix} 0 & 1 \\ 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{bmatrix} \text{ d'où : } \gamma = \begin{bmatrix} -1 & 1 \\ -1 & 1 \\ 1 & -1 \end{bmatrix}$$

Il est clair que $\text{rg}(\gamma) = 1$ puisque $\gamma^1 = -\gamma^2$. De ce fait, la dimension de l'espace stœchiométrique est 1 alors que le processus implique 3 espèces moléculaires. Le processus se déplace donc sur une droite totalement déterminée par la donnée de l'état initial dont l'équation est :

$$\psi_1 + \psi_2 + 2\psi_3 = \psi_1^o + \psi_2^o + 2\psi_3^o$$

$$\psi_1 - \psi_2 = \psi_1^o - \psi_2^o$$

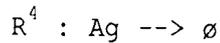
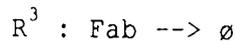
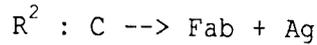
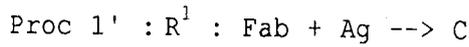
ψ_i (resp. ψ_i^o) indique les quantités (resp. quantités initiales) des différentes espèces. On note avec les minuscules $(\psi_i)_{1 \leq i \leq 3}$ les coordonnées de l'état du système dans la base $(\Psi_i)_{1 \leq i \leq 3}$. La première équation traduit le caractère conservatif du processus et la seconde l'égalité des participations de Ψ_1 et

Ψ_2 dans la formation de Ψ_3 .

Enfin, le système est conservatif puisque $m = (1, 1, 2)$ est tel que :

$$m \cdot \gamma^1 = m \cdot \gamma^2 = 0$$

Dans l'hypothèse où les protéines ne sont pas parfaitement stables, ce qui est expérimentalement plus raisonnable, alors il convient d'exprimer deux nouvelles réactions et le processus devient le suivant :



On procède aux mêmes opérations :

les espèces moléculaires n'ont pas changé, pas plus que l'espace des phases,

$$\text{mais } v = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \end{bmatrix}; \mu = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 \end{bmatrix}; \gamma = \begin{bmatrix} -1 & 1 & -1 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & -1 \\ 1 & -1 & 0 & 0 \end{bmatrix}$$

Maintenant le rang de γ est 3 puisqu'il est possible de calculer un déterminant d'ordre 3 non nul :

$$\begin{vmatrix} 1 & -1 & 0 \\ 1 & 0 & -1 \\ -1 & 0 & 0 \end{vmatrix} = -1$$

Ce déterminant indique que les trois vecteurs γ^1 , γ^3 et γ^4 forment une base de l'espace stœchiométrique. Il est possible de donner une expression canonique γ' de la matrice γ dans cette nouvelle base qui se trouve être nettement plus simple que la précédente.

$$\gamma' = \begin{bmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

Remarque

Cette nouvelle matrice vérifie l'égalité : $\gamma = [\gamma^1 \ \gamma^2 \ \gamma^3] \cdot \gamma'$ dans laquelle on reconnaît l'équation typique d'un changement de base.

Enfin, le processus est devenu sous-conservatif puisque, avec le même vecteur de masse que précédemment, on a toujours : $m \cdot \gamma^1 = 0$; $m \cdot \gamma^2 = 0$; mais $m \cdot \gamma^3 = -1$ et $m \cdot \gamma^4 = -1$

Il est donc montré que la droite ne constitue plus un support suffisant pour décrire le mouvement de ce processus, il faut effectivement travailler dans un espace de dimensions 3. Mais tous les points de N^3 ne sont cependant pas

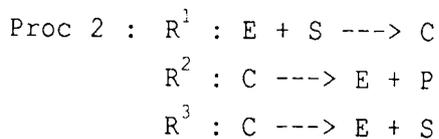
accessibles au processus : seuls seront atteignables les points de masse totale inférieure ou égale à la masse du point de départ. (Cette remarque est une première intuition de l'irréversibilité du processus qui, dans ce cas est particulièrement évidente. Cet aspect est abordé de manière systématique dans le paragraphe 3.2. de ce chapitre. En particulier, les notions de réversibilité y sont formalisées. Simplement, elles traduisent le fait qu'un processus irréversible ne peut pas revenir en arrière. Il est possible d'avoir l'intuition qu'un processus qui ne peut atteindre que des points de masse inférieure ne peut pas revenir en arrière.)

Remarque

Il aurait été possible de pousser l'exemple un peu plus loin en ne prenant plus un fragment Fab mais un anticorps avec deux sites de fixation. Etc... Etc...

2.1.2. La catalyse enzymatique

Le classique modèle de la catalyse enzymatique michaelienne est le suivant :



$\Psi_1 = E ; \Psi_2 = S ; \Psi_3 = C ; \Psi_4 = P ;$ d'où :

$$v = \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{bmatrix} ; \mu = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 1 \\ 0 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix} ; \gamma = \begin{bmatrix} -1 & 1 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ 1 & -1 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

Il apparaît que $\gamma^1 = -\gamma^3$

Le rang de γ est donc au plus 2 ; est-il possible de trouver un déterminant d'ordre 2 non nul ? Oui :

$$\begin{vmatrix} -1 & 1 \\ -1 & 0 \end{vmatrix} = +1$$

γ trouve une expression simple γ' dans la base γ^1, γ^2 :

$$\gamma = \begin{bmatrix} 1 & 0 & -1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

Tout comme précédemment : $\gamma = [\gamma^1 \ \gamma^2] \cdot \gamma'$

La position du point initial étant donnée, deux variables permettront de caractériser le mouvement.

$m = (1, 1, 2, 1)$ permet d'attribuer au processus un caractère conservatif.

2.2. L'opéron lactose

2.2.0. Avertissement

Il peut sembler prudent de bien préciser ici une fois encore, l'esprit dans lequel se situe la partie biologique de ce travail. Il est évident qu'elle ne prétend nullement se situer à la pointe de la recherche en matière de régulation de l'expression génétique. Tout au contraire ont été choisis des exemples bien connus pour lesquels une information assez complète et bien stabilisée est disponible. Il semble que, dans les systèmes les plus simples, une grande majorité des mécanismes élémentaires de régulation soient déjà présents. L'objet du travail étant plutôt de mettre en évidence les apports possibles de formalismes issus d'autres disciplines à cette question biologique, il a paru plus judicieux de choisir une description unifiée des systèmes étudiés, si possible facilement accessible et rassemblée au sein d'un nombre minimum de documents. Dans la majorité des cas, "Molecular Biology of the Gene" (18) aura servi de référence.

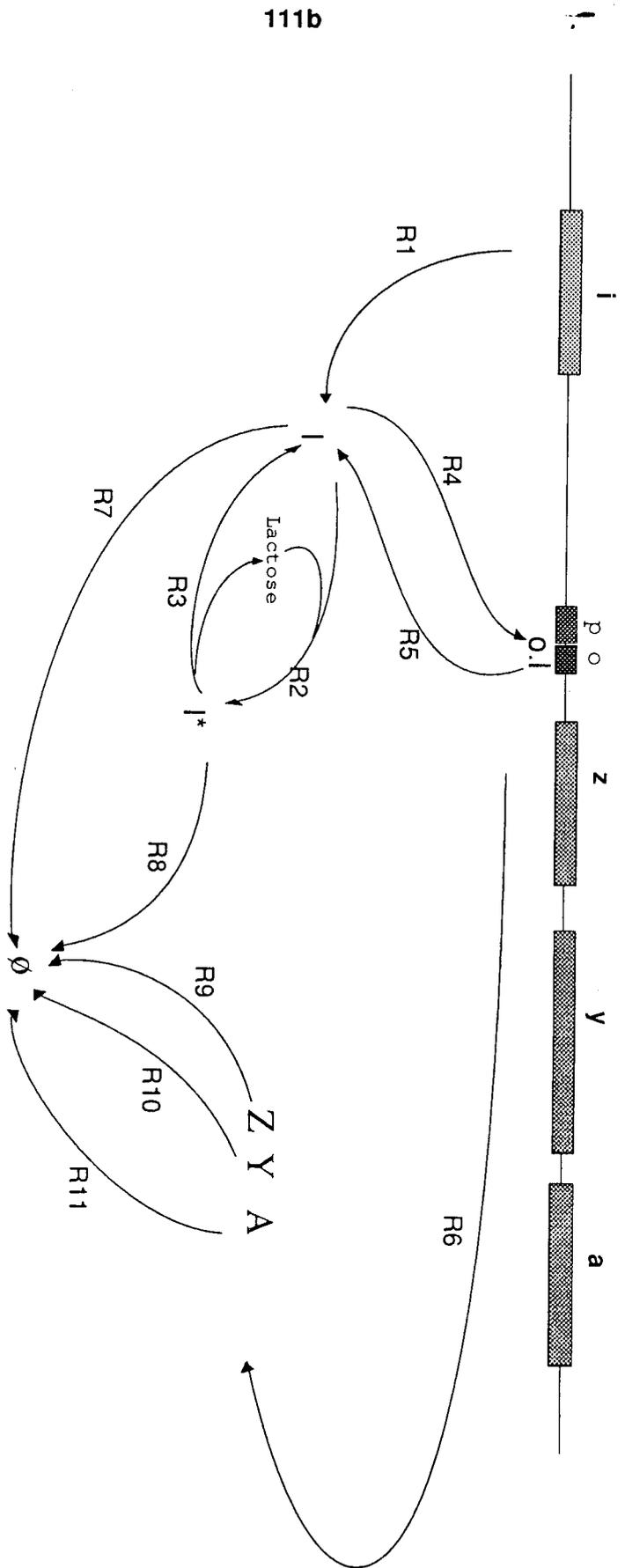
2.2.1. Description physiologique du système

La régulation de l'expression des gènes de l'opéron lactose permettant le métabolisme des β -galactosides chez *E. Coli* est l'exemple le plus académique de régulation de l'expression génétique, il est donc aisé d'en trouver des descriptions détaillées (19).

Sur le site d'initiation de la transcription des gènes *z*, *y* et *a* se trouve une séquence de 21 nucléotides (AATTGTGAGCGGATAACAATT), appelée opérateur et notée "o", capable de fixer le répresseur *lac*, noté "I". La présence de cette protéine à cet endroit empêche la transcription, si bien que les gènes en aval ne sont pas exprimés. La protéine I existe sous deux formes dans la cellule, l'active, I, et l'inactive, I*. Seule la forme I a une affinité significative pour O. C'est la forme complexée à un β -galactoside (lactose ou allolactose) de I qui est inactive. Le gène *i* qui code pour I a une expression constitutive, i.e. non régulée.

Bien que cela ne soit généralement pas explicité, il est évident que le système suppose que la durée de vie des protéines dans la cellule n'est pas éternelle, sinon il y aurait une dangereuse accumulation. Il convient donc d'ajouter cinq réactions implicites, dans lesquelles le symbole \emptyset est le 0 de Z^M .

Ces réactions expriment la disparition de la molécule du membre de gauche (cf. les réactions R^7 à R^{11} ci-dessous).



111b

Figure 1 : L'opéron lactose

i, *z*, *a* et *y* gènes codant pour les protéines I, répresseur, Z, Y et A, enzymes du métabolisme du lactose. *I** forme inactivée du répresseur complexé au lactose ; *o*, *o*.1 complexe inhibiteur de la transcription ; *p*, promoteur de l'opéron ; \emptyset , absence de molécule

2.2.2. Caractéristiques algébriques du processus

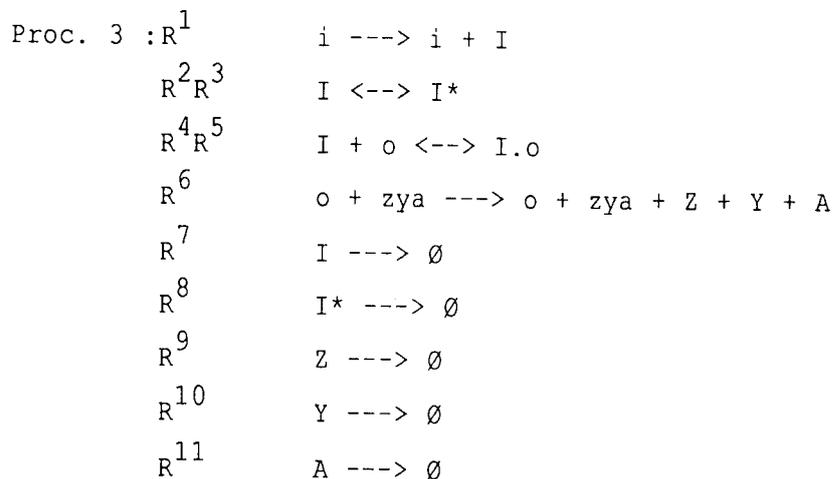
Notation :

La notation suivante est parfois utilisée dans l'écriture des équations chimiques :



Elle signifie que R^p est dans le sens $A \rightarrow B$ et R^{p+1} dans le sens contraire.

Peut donc être défini le processus 3 :



$$\Psi_1 = i ; \Psi_2 = o ; \Psi_3 = I.o ; \Psi_4 = zya ; \Psi_5 = I ; \Psi_6 = I^* ; \Psi_7 = Z ; \Psi_8 = Y ; \Psi_9 = A$$

Les matrices caractéristiques du processus figurent sur la table Proc. 3 en annexe.

L'étude du rang de γ est aisée. γ^1 à γ^3 peuvent s'obtenir comme combinaisons linéaires de γ^7 et γ^8 , γ^4 et γ^5 sont opposés l'un à l'autre et γ^6 s'obtient par combinaison à partir de γ^9 à γ^{11} . En conclusion, l'espace stœchiométrique est généré, par exemple, par la famille de vecteurs $\{\gamma^5 ; \gamma^7 ; \gamma^8 ; \gamma^9 ; \gamma^{10} ; \gamma^{11}\}$; il est donc de dimension 6. Il est possible de rapporter l'espace stœchiométrique à cette nouvelle base afin d'obtenir une expression γ plus simple de la matrice qui caractérise les trajectoires possibles du système.

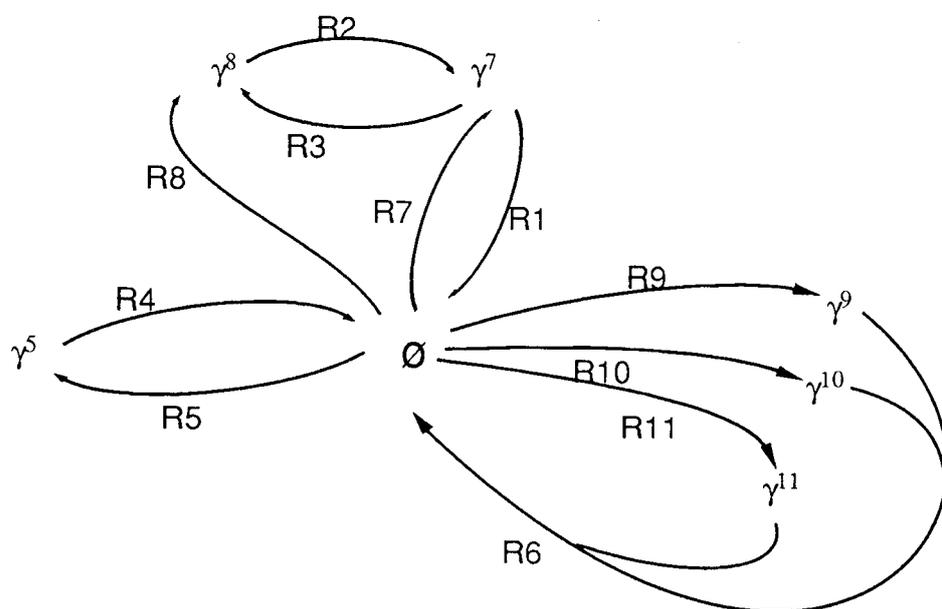


Figure 2 : Graphe de Vol'pert du Proc. 3 rapporté à une base canonique de son espace stœchiométrique.

	γ^1	γ^2	γ^3	γ^4	γ^6	γ^5	γ^7	γ^8	γ^9	γ^{10}	γ^{11}
γ^5				- 1		1					
γ^7	- 1	1	- 1				1				
γ^8		- 1	1					1			
γ^9					- 1				1		
γ^{10}					- 1					1	
γ^{11}					- 1						1

Il peut être intéressant de visualiser graphiquement le système chimique que traduit cette nouvelle matrice au moyen d'un graphe de Vol'pert.

2.2.3. Description des mécanismes de contrôle positif par le glucose

Dans la réalité l'expression de l'opéron lactose est aussi sous le contrôle de la présence de glucose dans la cellule (19). L'opéron ne fonctionne qu'en absence de glucose. Cette régulation qui est très générale au catabolisme de tous les sucres composés, est le fait d'un mécanisme en plusieurs étapes. Le cAMP est un métabolite dont la concentration décroît lorsque la concentration de glucose augmente. En présence de cAMP, la CAP* (*catabolite gene activator protein*) sous sa forme complexée, acquiert la capacité de se fixer sur une séquence spécifique en amont du promoteur de l'opéron, le CAP *binding site*. Lorsque la CAP* est attachée à l'ADN, elle favorise l'initiation de la transcription en renforçant les interactions entre la RNA polymérase et le promoteur.

2.2.4. Etude algébrique de l'opéron lactose doublement contrôlé

Le fonctionnement de l'opéron tel qu'il apparaît lorsque ce deuxième contrôle est pris en compte nous présente le promoteur, ou plus exactement sa région, dans trois états possibles, à chacun correspondant une intensité de transcription différente. Comme les deux sites de fixation se situent de part et d'autre du promoteur, la notation suivante permet de traduire aussi agréablement que possible les différents états, le + indiquant la présence d'une protéine attachée à la séquence cible et le - l'absence de protéine sur le site :

$$\text{CAP*} \cdot \text{Promoteur} \cdot \text{I} = [+p+]$$

$$-\text{Promoteur} \cdot \text{I} = [-p+]$$

$$\text{CAP*} \cdot \text{Promoteur} \cdot - = [+p-]$$

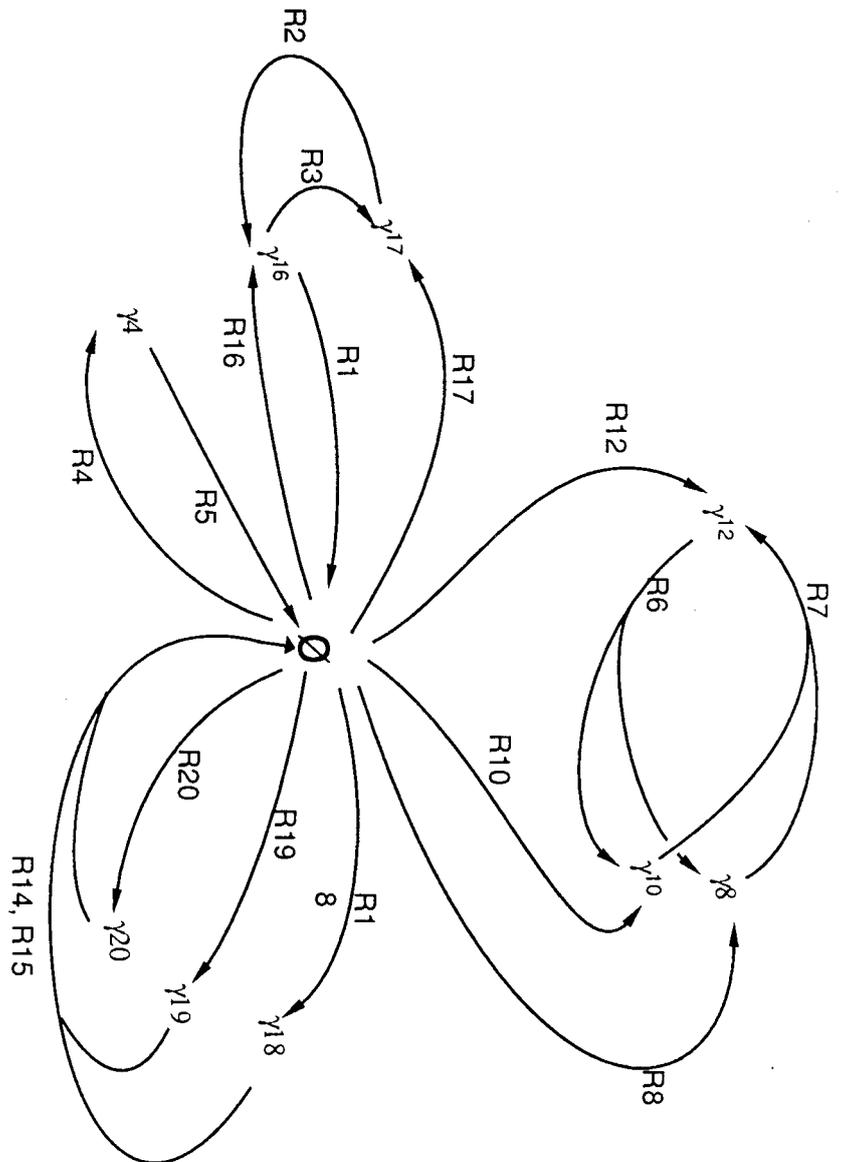
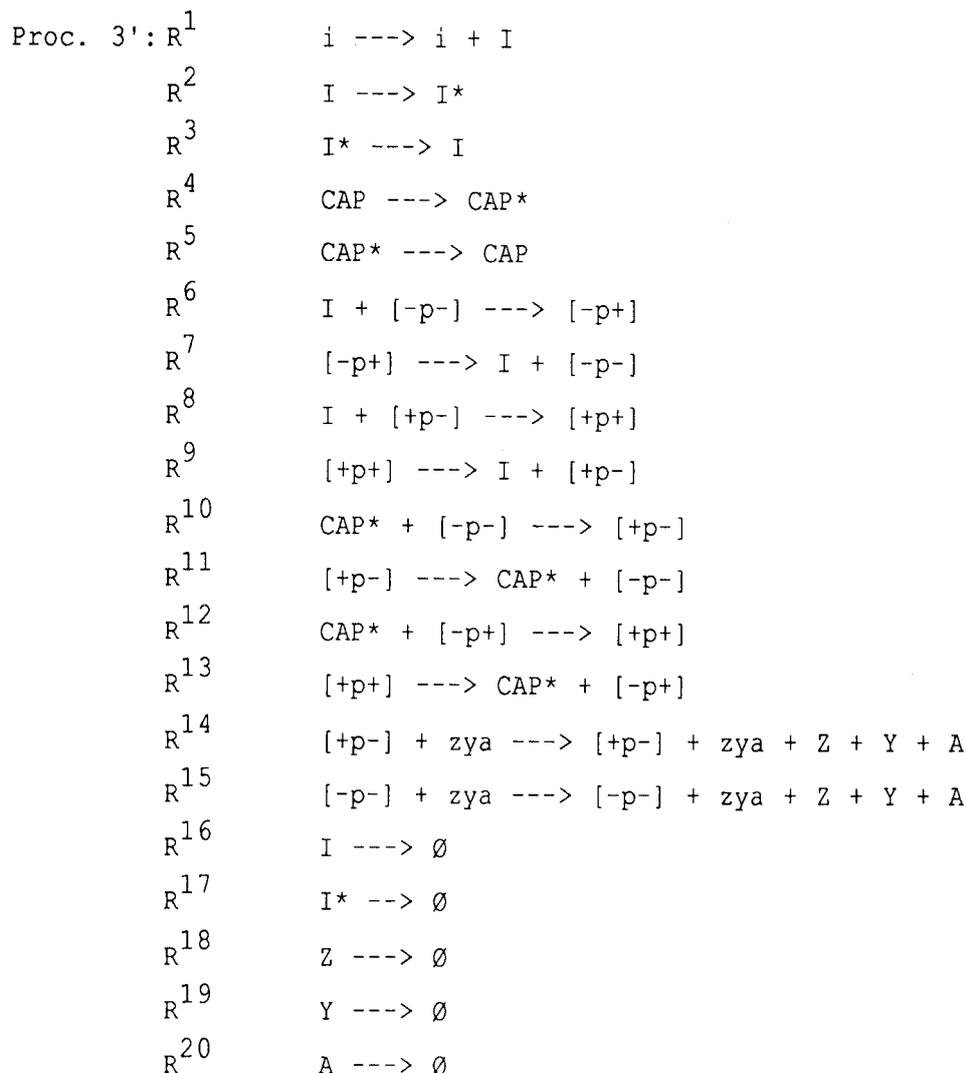


Figure 3 : L'opéron lactose doublement contrôlé (Proc 3') restreint à son espace stœchiométrique rapporté à une base canonique.

-Promoteur- = [-p-]

Puisque la description du contrôle par la CAP ignore sa synthèse et sa dégradation, le modèle qui suit fait de même. Cela revient à supposer que le niveau de présence de ce facteur de régulation est indépendant des facteurs auxquels la synthèse de Z est soumise.

Le processus est maintenant défini par l'ensemble de réactions suivant :



$\Psi_1 = i$; $\Psi_2 = [-p-]$; $\Psi_3 = [+p-]$; $\Psi_4 = [-p+]$; $\Psi_5 = [+p+]$; $\Psi_6 = zya$; $\Psi_7 = I$; $\Psi_8 = I^*$; $\Psi_9 = CAP$; $\Psi_{10} = CAP^*$; $\Psi_{11} = Z$; $\Psi_{12} = Y$; $\Psi_{13} = A$

Les matrices de ce processus figurent sur la table Proc 3' en annexe.

La dimension de l'espace stœchiométrique est déterminée par une analyse de la famille de vecteurs composant la matrice stœchiométrique.

Du fait des équilibres, l'étude peut être restreinte à la famille :

$\{\gamma^1 ; \gamma^2 ; \gamma^4 ; \gamma^6 ; \gamma^8 ; \gamma^{10} ; \gamma^{12} ; \gamma^{14} ; \gamma^{15} ; \gamma^{16} ; \gamma^{17} ; \gamma^{18} ; \gamma^{19} ; \gamma^{20}\}$

On a par ailleurs :

$$\gamma^1 = -\gamma^{16} \text{ et } \gamma^{14} = \gamma^{15} = -(\gamma^{18} + \gamma^{19} + \gamma^{20})$$

$$\gamma^2 = \gamma^{16} - \gamma^{17}$$

$$\gamma^6 = \gamma^8 + \gamma^{10} - \gamma^{12}$$

La base de l'espace stœchiométrique se trouve donc être la famille de vecteurs suivante : $\{ \gamma^4 ; \gamma^8 ; \gamma^{10} ; \gamma^{12} ; \gamma^{16} ; \gamma^{17} ; \gamma^{18} ; \gamma^{19} ; \gamma^{20} \}$ Ceci est vérifié par le fait qu'il est possible d'extraire un déterminant non nul d'ordre 9 de ces vecteurs.

L'espace stœchiométrique peut être rapportée à cette nouvelle base dans laquelle la matrice γ trouve une expression γ' beaucoup plus simple.

2.3. Le phage λ

2.3.1. Description physiologique

Il s'agit, une fois encore d'un exemple connu de tous et considéré comme le plus élémentaire des phénomènes de développement. Les descriptions plus ou moins détaillées abondent (11).

La description qui suit commente la figure 4 à laquelle il est indispensable de se référer.

Lors de l'infection d'une bactérie par un phage, celui-ci peut suivre deux voies possibles, s'acheminer vers la lysogénie ou vers la lyse de la cellule hôte après s'être multiplié en son sein. Ce sont des événements précoces qui déterminent ceux qui suivront.

Les deux voies commencent lorsque l'ARN polymérase se fixe sur les deux promoteurs précoces p_L et p_R et transcrit les gènes n et cro en aval (étape 1). La protéine N , codée par n , est un antiterminateur qui permet aux transcrits de s'allonger à gauche et à droite des gènes n et cro de sorte que ceux-ci s'étendent à l'ensemble des gènes précoces (étape 2). A droite, se trouvent les gènes o et p dont les produits permettent la réplication de l'ADN du phage, tandis qu'à gauche se trouve q dont le produit active les gènes tardifs dont les produits permettent la lyse. Il faut un certain temps pour que Q s'accumule suffisamment pour avoir une action notable. A gauche, l'effet de N est nettement moins simple. Il permet d'allonger la transcription mais génère un transcrit instable tel que Int ne peut être traduit. L'effet quantitatif de N sur sa propre transcription-traduction ne paraît pas forcément très clair. Ces deux raisons invitent à ignorer l'effet de N à gauche.

Pendant cette phase, s'accumulent aussi les protéines Cro et CII dont les actions vont en sens opposé l'une de l'autre. CII agit sur les promoteurs p_{RE} et p_I qui commandent le fonctionnement des gènes cl et int respectivement (étape 3). Ce dernier code pour l'intégrase, tandis que le premier code pour la

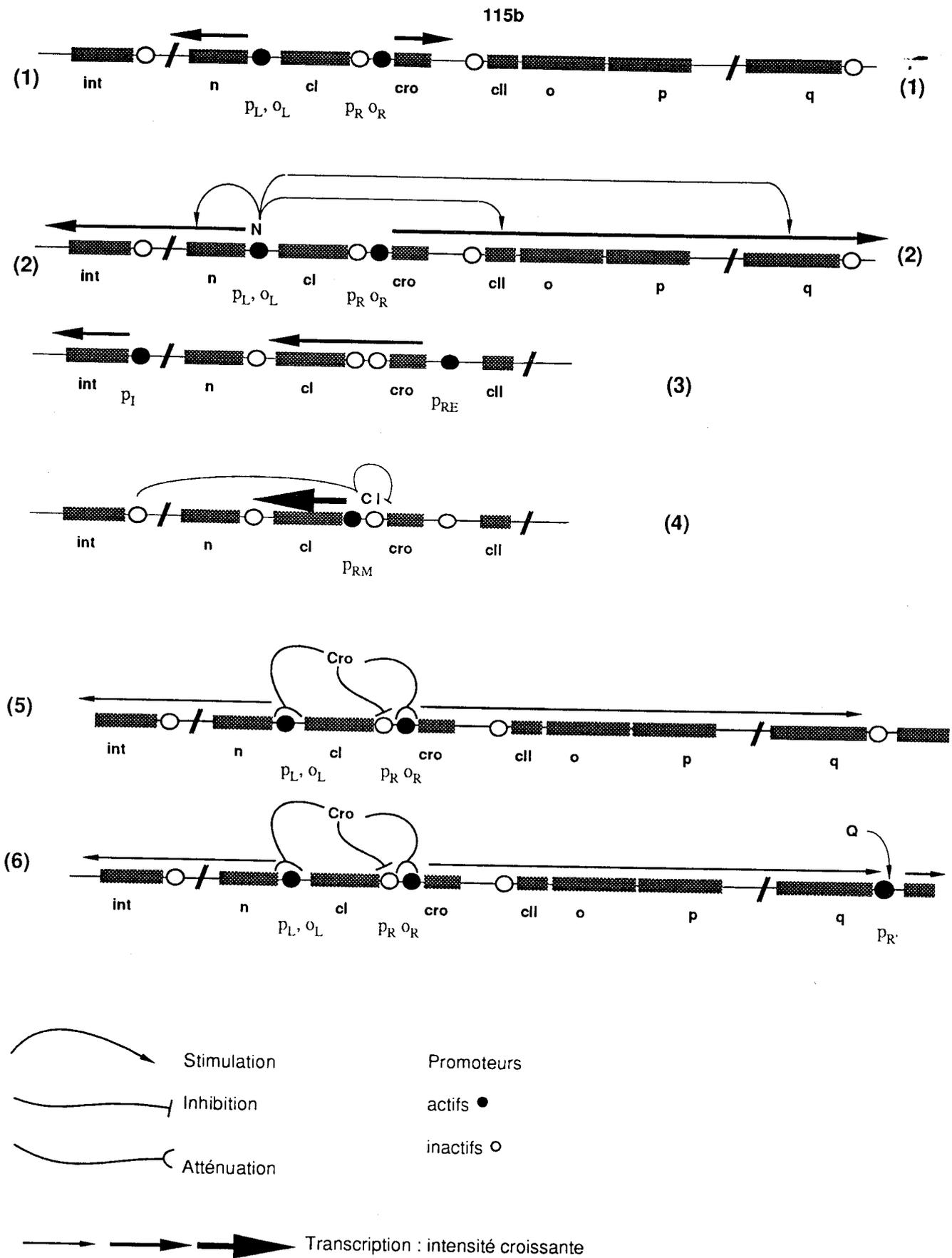


Figure 4 : Les stades précoces du développement du phage lambda :

Les étapes 1 et 2 correspondent aux phénomènes qui ont lieu aux moments les plus précoces de l'infection. Une alternative fait suite à la deuxième étape. Si les étapes 3 et 4 sont suivies, alors le phage devient lysogénique et s'intègre dans le génome bactérien. Si au contraire sont suivies les étapes 5 et 6, alors, celles-ci s'achevant sur la transcription des gènes tardifs sous le contrôle de Q, l'infection est lytique.

protéine CI, connue sous le nom de répresseur λ . Elle se fixe sur les opérateurs o_L et o_R et bloque le fonctionnement des gènes précoces qui en dépendent, comme q par exemple (étape 4). Elle stimule aussi sa propre synthèse par action sur le promoteur p_{RM} . Cro pour sa part agit "en douceur". Elle bloque le promoteur p_{RM} et se fixe sur les opérateurs o_L et o_R . Ceci bloque la synthèse de CI et atténue seulement celle de CII, O, P et Q (étape 5). Bien que leur synthèse soit ralentie, ces protéines s'accumulent jusqu'à ce qu'elles soient suffisamment présentes pour provoquer la phase lytique (étape 6).

Ainsi c'est de l'issue de la compétition que se livrent CI et Cro pour l'occupation des sites o_L et o_R que dépend l'avenir de la cellule infectée.

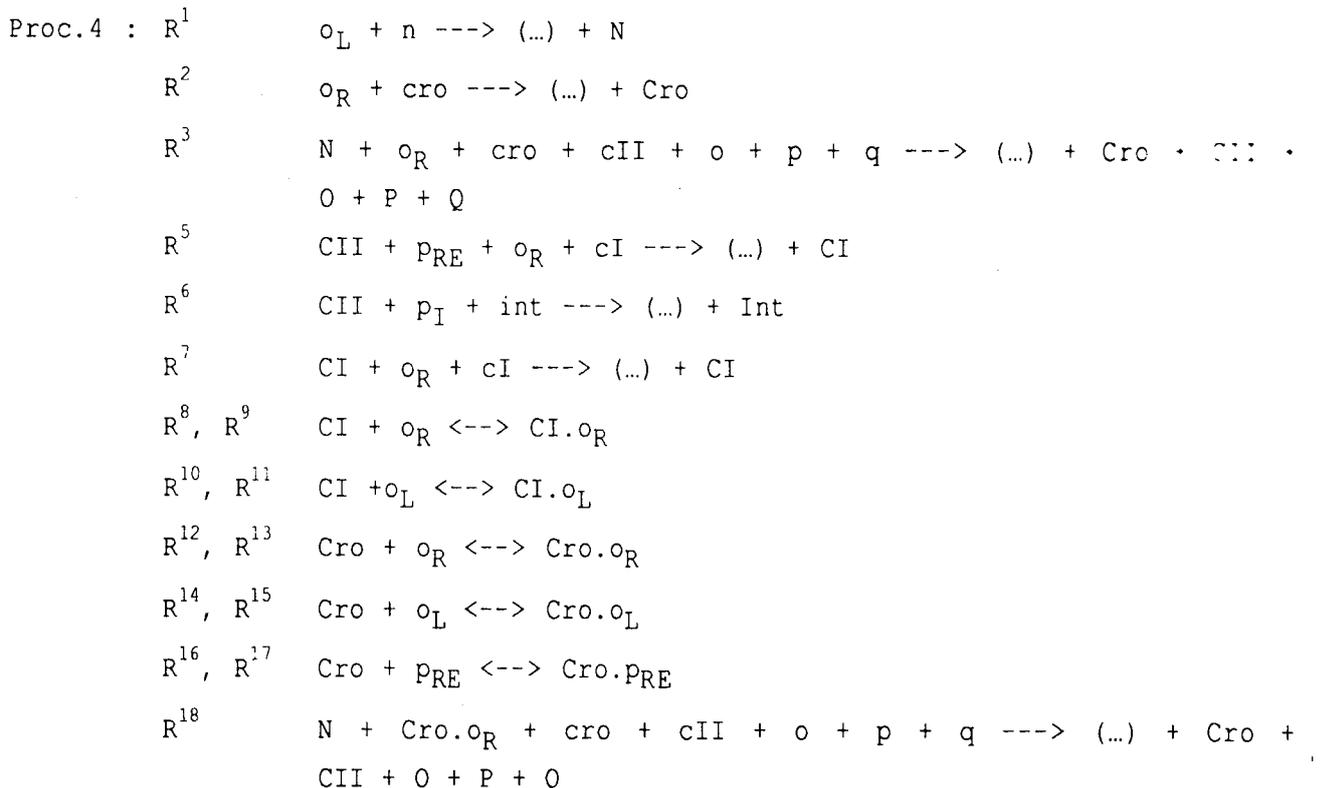
2.3.2. Construction du processus et étude algébrique

Notation

Le symbole (...) dans le second membre des équations correspond à l'ensemble des termes du premier membre. Cette notation est commode dans les réactions traduisant une synthèse protéique.

Remarque

L'indice 4 n'a pas été utilisé au cours de la rédaction. La réaction R4 n'est donc pas manquante. Son absence n'est pas une erreur de rédaction du processus, c'est simplement une erreur d'indexation au moment de la rédaction.



R^{19}	Cro.o _L + n ----> (...) + N
R^{20}	Q + k ----> (...) + D
R^{21}	N ----> \emptyset
R^{22}	O ----> \emptyset
R^{23}	P ----> \emptyset
R^{24}	Q ----> \emptyset
R^{25}	Int ----> \emptyset
R^{26}	Cro ----> \emptyset
R^{27}	CII ----> \emptyset
R^{28}	CI ----> \emptyset

Les espèces moléculaires sont indicées ainsi : $\Psi_1 = k$; $\Psi_2 = n$; $\Psi_3 = \text{cro}$; $\Psi_4 = o$; $\Psi_5 = p$; $\Psi_6 = q$; $\Psi_7 = \text{cl}$; $\Psi_8 = \text{cII}$; $\Psi_9 = \text{int}$; $\Psi_{10} = \text{pl}$; $\Psi_{11} = o_R$; $\Psi_{12} = o_L$; $\Psi_{13} = p_{FE}$; $\Psi_{14} = \text{Cl.o}_R$; $\Psi_{15} = \text{Cl.o}_L$; $\Psi_{16} = \text{Cro.o}_R$; $\Psi_{17} = \text{Cro.o}_L$; $\Psi_{18} = \text{Cro.p}_{FE}$; $\Psi_{19} = N$; $\Psi_{20} = O$; $\Psi_{21} = P$; $\Psi_{22} = Q$; $\Psi_{23} = \text{Int}$; $\Psi_{24} = \text{Cro}$; $\Psi_{25} = \text{CII}$; $\Psi_{26} = \text{CI}$; $\Psi_{27} = D$;

k symbolise l'ensemble des gènes tardifs et D la reproduction du phage et la mort par lyse de la cellule hôte. Les matrices du processus 4 figurent sur les tables Proc 4 en annexe. La dépendance des vecteurs de la matrice stœchiométrique s'étudie assez simplement puisque les égalités suivantes viennent rapidement :

$$\begin{aligned} \gamma^1 &= \gamma^{19} = -\gamma^{21} \\ \gamma^2 &= -\gamma^{26} \\ \gamma^3 &= -(\gamma^{22} + \gamma^{23} + \gamma^{24} + \gamma^{26} + \gamma^{27}) \\ \gamma^5 &= \gamma^7 = -\gamma^{28} \\ \gamma^6 &= -\gamma^{25} ; \gamma^9 = -\gamma^8 ; \gamma^{11} = -\gamma^{10} \\ \gamma^{13} &= -\gamma^{12} \\ \gamma^{15} &= -\gamma^{14} \\ \gamma^{17} &= -\gamma^{16} \\ \gamma^{18} &= -(\gamma^{22} + \gamma^{23} + \gamma^{24} + \gamma^{26} + \gamma^{27}) \end{aligned}$$

Sont notés en gras, les vecteurs qui seront éliminés de la nouvelle base. Est libre la famille de vecteurs : $\{\gamma^8, \gamma^{10}, \gamma^{12}, \gamma^{14}, \gamma^{16}, \gamma^{20}, \gamma^{21}, \gamma^{22}, \gamma^{23}, \gamma^{24}, \gamma^{25}, \gamma^{26}, \gamma^{27}, \gamma^{28}\}$ Il est possible d'en extraire un déterminant d'ordre 14 non nul. Le graphe de Volpert de ce processus restreint à son espace stœchiométrique rapporté à cette base canonique se trouve en figure 5.

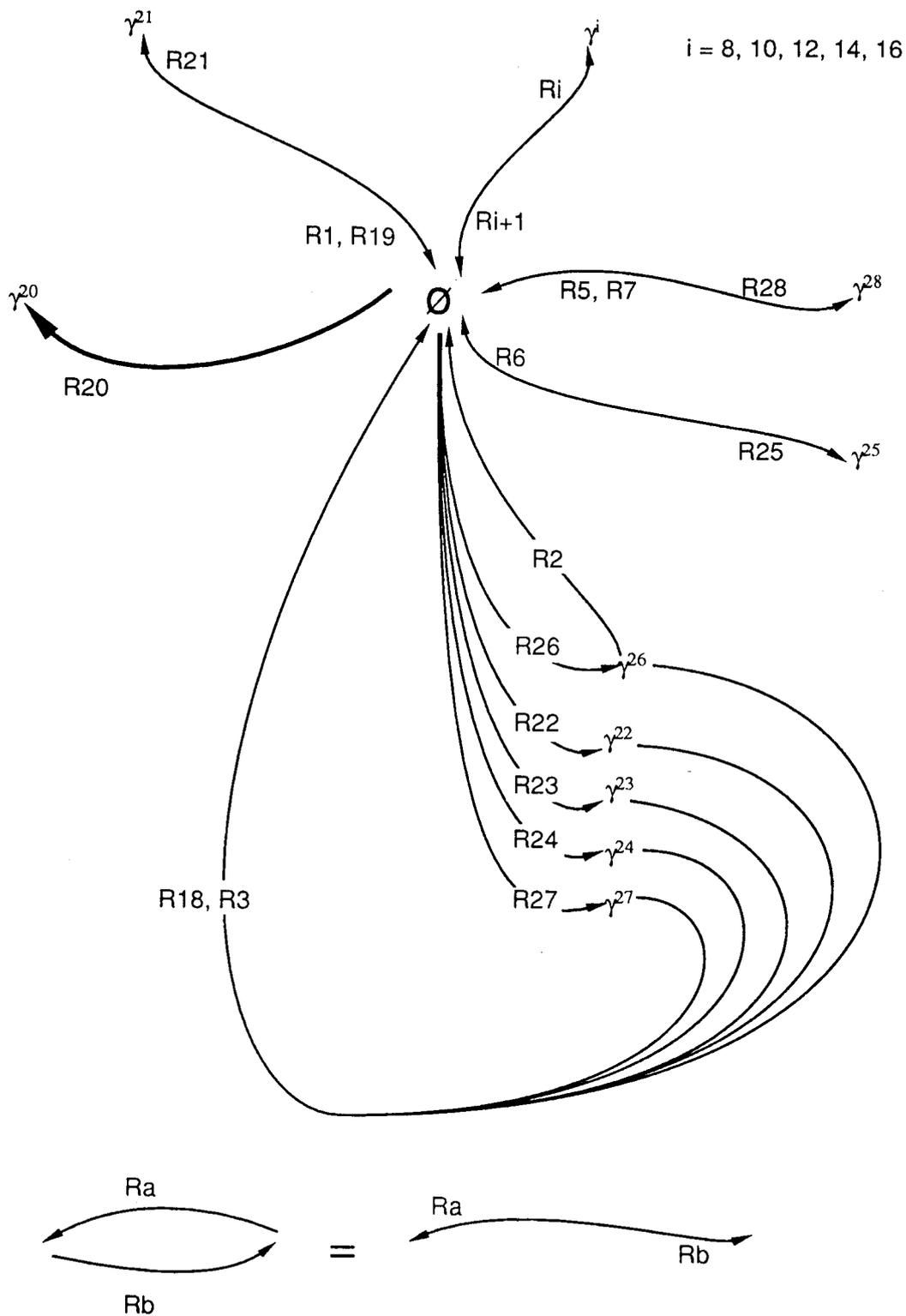


Figure 5 : graphe de Vol'pert du processus 4 (phage λ) restreint à son espace stœchiométrique rapporté à une base canonique.

2.4. Un phage λ affiné

Le processus 4 traduit les interactions qui se trouvent exposées dans une description très générale de l'infection par le phage. La biologie moléculaire est allée beaucoup plus loin dans la dissection des interactions. Dans une perspective de modélisation, il n'est pas sans intérêt de pousser l'effort un peu plus loin afin de "voir" jusqu'où il est possible de suivre la voie choisie. L'autre intérêt de l'étude d'une description approfondie est :

- soit de vérifier que deux descriptions plus ou moins détaillées sont équivalentes d'un point de vue dynamique
- soit encore de constater qu'elles ne le sont pas
- soit enfin de préciser dans quelles conditions l'équivalence peut être établie.

2.4.1. La compétition entre CI et Cro

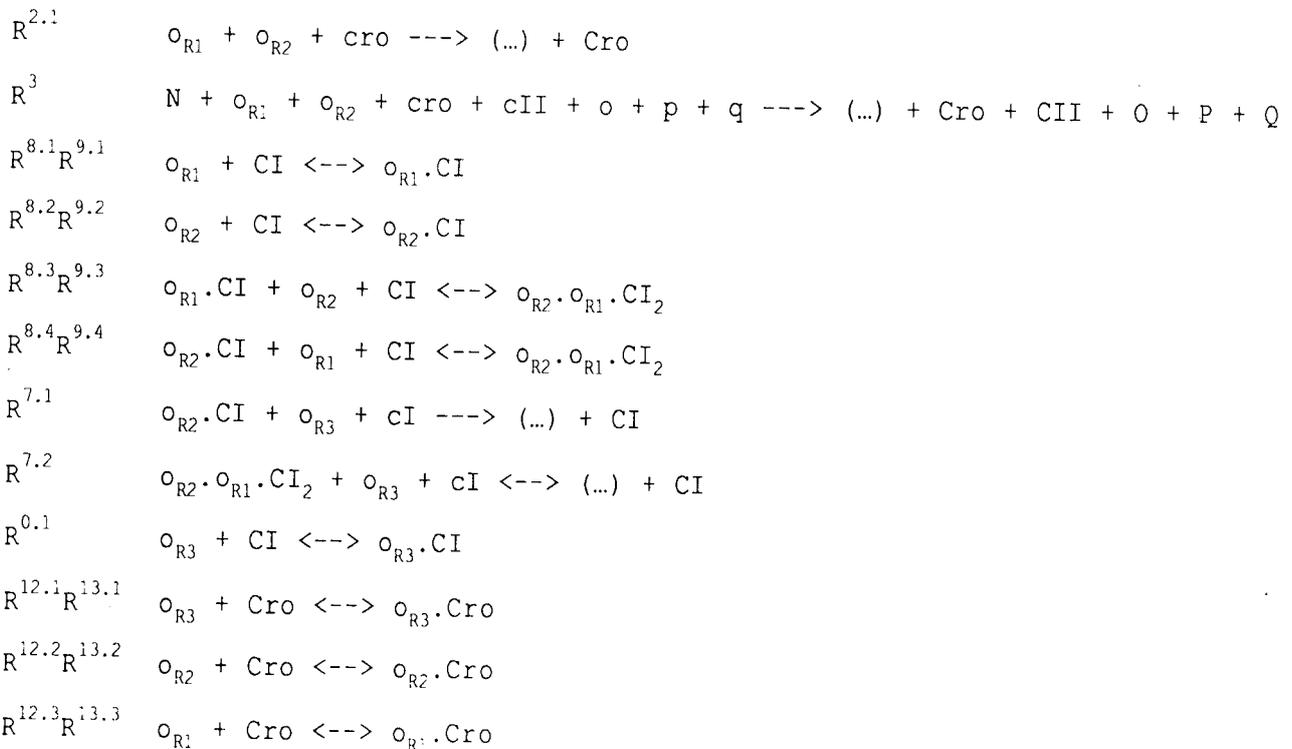
Le fait que ces deux protéines se fixent sur les mêmes sites en ayant des actions opposées est étonnant, voire même un peu paradoxal au premier abord, si bien que le détail de leur action mérite d'être éclairci. Les promoteurs-opérateurs p_R et p_{RM} sont contigus. Trois sous-opérateurs identifiables par symétries et consensus de séquences se trouvent à cet endroit, o_{R1} , o_{R2} et o_{R3} . Il apparaît que p_R est constitué par o_{R1} et o_{R2} tandis que p_{RM} est constitué par o_{R3} et o_{R2} . Les deux protéines sont capables de se fixer sur chacun de ces sites mais avec une affinité différente pour chacun.

Lorsque les trois sous-opérateurs sont libres, l'ARN polymérase se fixe sur p_R mais pas sur p_{RM} et transcrit les gènes de droite, dont *cro*. Lorsque le répresseur CI est abondant, il se fixe sur o_{R1} et o_{R2} et donc bloque la transcription à partir de p_R . Il est à noter que les deux molécules de CI fixées sur ces deux séquences sont en contact, non seulement avec l'ADN mais aussi entre elles de sorte que leur fixation à l'ADN est coopérative ; elles stabilisent leur propre fixation : deux fixées sont plus stables qu'une seule. Cette coopérativité est très favorable à une répression efficace. La molécule fixée sur o_{R2} a un deuxième effet important, celui de permettre à la RNA polymérase de se fixer sur o_{R3} . Ainsi, le promoteur fonctionnel p_{RM} est constitué par o_{R3} , o_{R2} -CI. Cette autocatalyse de CI explique qu'il ne soit pas synthétisé par p_{RM} dans les premiers moments de l'infection.

Enfin, à forte concentration, CI se fixe aussi sur o_{R3} régulant aussi négativement sa synthèse.

Quant à Cro, son affinité la plus grande est pour o_{R3} sur lequel, à faible concentration, il commence par se fixer en bloquant ainsi p_{RM} . A plus forte concentration, il occupe aussi o_{R1} et o_{R2} de manière intermittente. Il convient aussi de remarquer que le fait d'avoir décomposé o_R en trois régions fonctionnellement distinctes permet de supprimer R^{18} qui n'est plus nécessaire. Il n'existe pas de coopérativité entre les molécules fixées sur ces deux sites, si bien que Cro agit comme un atténuateur : il ne réprime pas complètement le fonctionnement de p_R .

Tout ceci peut être traduit en équations chimiques. Ces nouvelles équations viennent se substituer à d'autres équations qui se trouvaient déjà dans le processus 4. La numérotation de ces nouvelles équations fait référence à celles des réactions auxquelles elles viennent se substituer.



Remarque :

L'indice 0 a été réservé aux réactions nouvelles sans analogue apparent dans le Proc 4.

2.4.2. Le rôle déterminant de CII

La quantité de CII atteinte lors des stades précoces de l'infection semble déterminer l'évolution ultérieure du système. Elle dépend étroitement de son taux de dégradation, c'est à dire de sa sensibilité aux protéases cellulaires.

Par un mécanisme inconnu, l'activité de ces enzymes est régulée en fonction de l'état physiologique général de la cellule indiqué par la concentration d'AMPc. Ainsi par exemple, la présence abondante de glucose abaissant le niveau d'AMPc entraîne une forte dégradation de CII et provoque une réponse lytique.

Cette sensibilité aux conditions du milieu s'exprime à travers une réaction dont le paramétrage en fonction des conditions du milieu méritera une très grande attention et qui traduit la dégradation de CII :

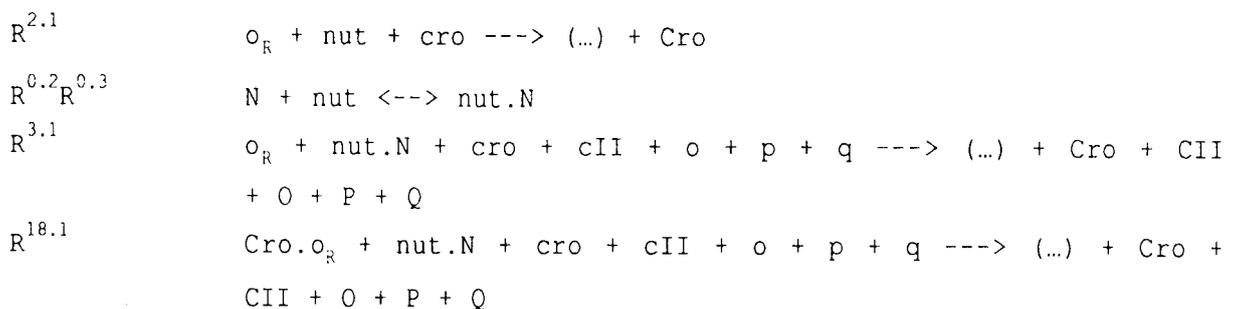


Si cette remarque ne nécessite aucun prolongement stœchiométrique, la description approfondie du fonctionnement physiologique du bactériophage paraissait être une bonne occasion de mettre en évidence un phénomène qui relève sans doute plus de l'analyse des deuxième et troisième chapitres.

2.4.3. Le contrôle positif par antiterminaison

C'est sur le phage λ que ce type de régulation a été mis en évidence pour la première fois. L'absence de l'antiterminateur N autorise la transcription du segment contenant *cro*, compris entre p_R et la séquence terminatrice t_{R1} (non représentée sur la figure 4). N agit en se complexant à une séquence nommée "nut" située en amont du terminateur. La présence de N à cet endroit au moment du passage de l'ARN polymérase lui permet de continuer au delà de la séquence terminatrice.

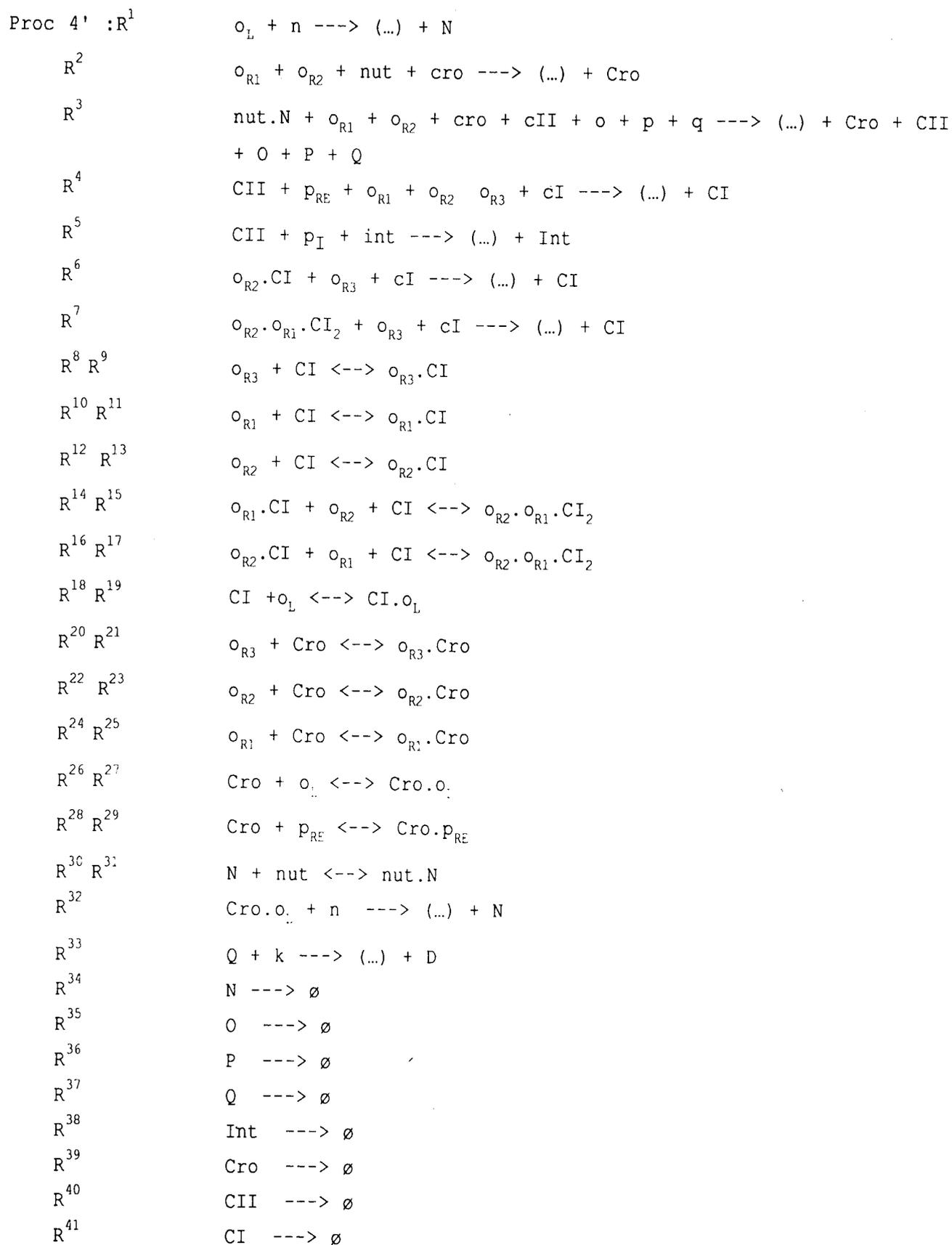
Bien que, d'une certaine manière, ce détail de fonctionnement n'apporte aucun changement à la logique du système, il est possible de transformer les réactions 2, 3 et 18 du Proc 4 de manière à mieux les ajuster à la réalité du phénomène. En utilisant la même indexation des réactions on obtient :



2.4.4. Analyse algébrique du processus 4'

En dépit de la taille respectable des matrices qui vont être obtenues, il est difficile de résister à la tentation d'analyser un processus 4', analogue au 4, mais dont le détail des mécanismes est pris en compte de la manière exposée dans les trois paragraphes précédents. Au delà du caractère un tantinet ludi-

que de la démarche, son intérêt viendra de la comparaison des tailles des espaces stœchiométriques. Dans quelle mesure le nombre important des nouvelles variables introduites va-t-il enrichir la taille de l'espace stœchiométrique ?



Remarque :

Afin d'éviter une notation trop lourde les réactions ont fait l'objet d'une nouvelle indexation. L'analogie avec le processus 4 est peut-être de ce fait moins facile à établir, mais l'ensemble gagne probablement en clarté.

Les matrices du processus 4' figurent en annexe sur les tables Proc4'.

Les relations de dépendances linéaires évidentes sont les suivantes :

$$\gamma^1 = \gamma^{32} = -\gamma^{34}$$

$$\gamma^2 = -\gamma^{39}$$

$$\gamma^3 = -(\gamma^{35} + \gamma^{36} + \gamma^{37} + \gamma^{39} + \gamma^{40})$$

$$\gamma^4 = \gamma^6 = \gamma^7 = -\gamma^{41}$$

$$\gamma^5 = -\gamma^{38}$$

$$\gamma^9 = -\gamma^8$$

$$\gamma^{11} = -\gamma^{10}$$

$$\gamma^{13} = -\gamma^{12}$$

$$\gamma^{15} = -\gamma^{14}$$

etc...

Il y a une dernière relation qui n'est pas tout à fait aussi évidente :

$$\gamma^{10} = -\gamma^{14} + \gamma^{12} + \gamma^{16}$$

Ces relations permettent d'exprimer de manière canonique la matrice stœchiométrique.

La figure 6 est le graphe de Vol'pert de ce processus restreint à son espace stœchiométrique rapporté à cette base canonique.

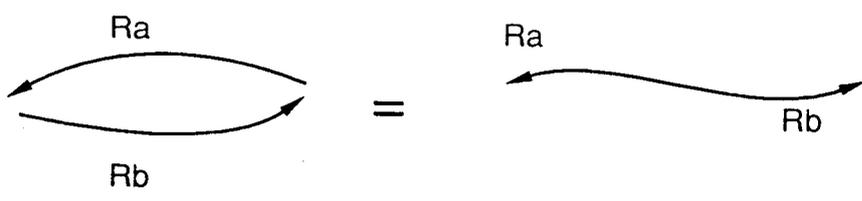
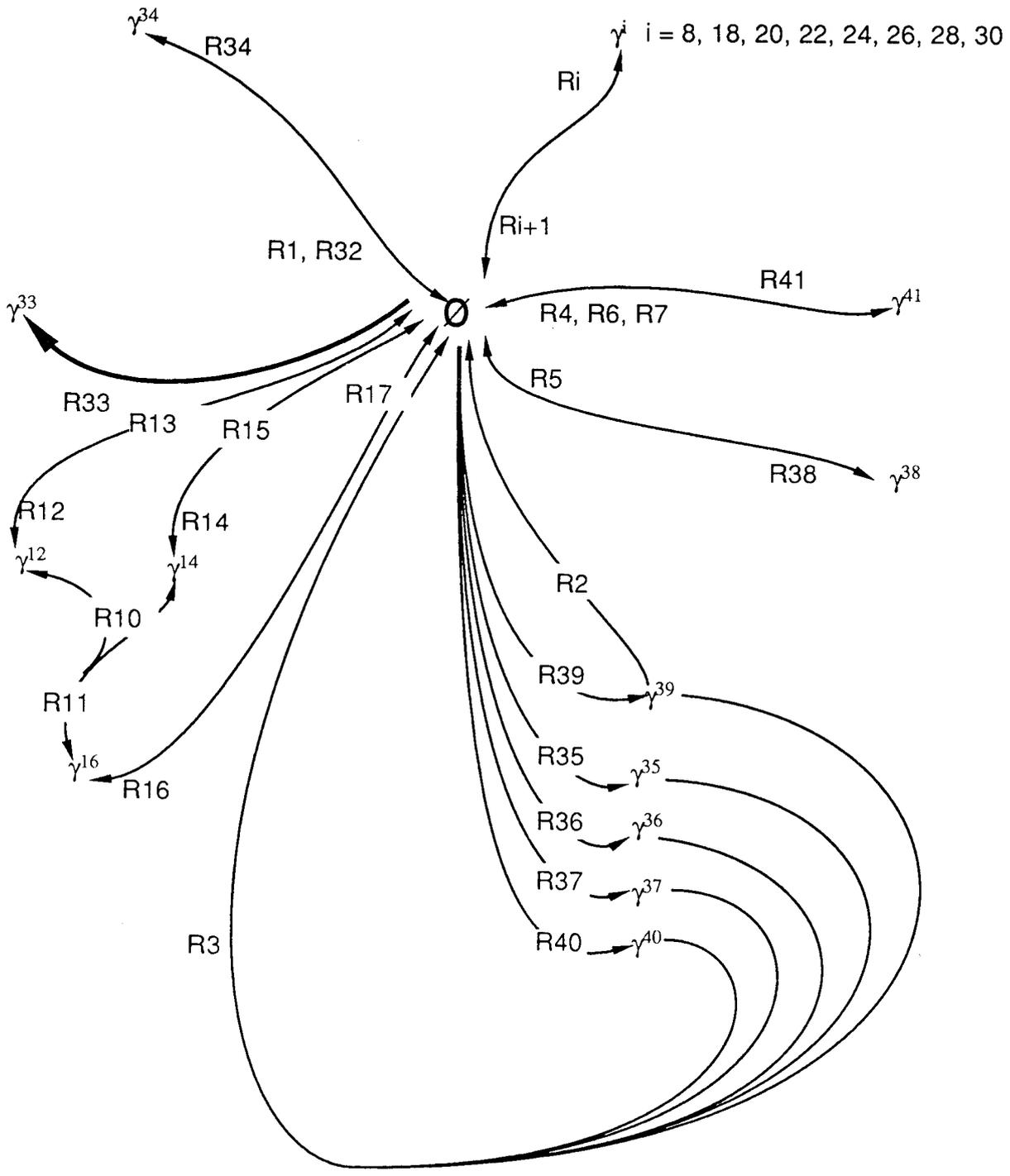


Figure 6 : graphe de Vol'pert du processus 4' (phage λ affiné) restreint à son espace stœchiométrique rapporté à une base canonique.

2.5. Le contrôle de la réplication du plasmide ColE1

2.5.1. Description physiologique

Perelson et Brendel ont conduit un important travail de modélisation de ce système (20, 21). Ces deux documents contiennent une description biologique assez détaillée de son fonctionnement.

La région environnant l'origine de réplication code pour deux transcrits, les RNA I et II. La majorité des transcrits RNAII forme un complexe stable avec la matrice ADN qui couvre l'origine de réplication. La coupure de cet ARN hybridé par la RNase H constitue une amorce au processus de réplication lui-même. Le RNAI est complémentaire de la région 5' du RNAII et permet donc la formation d'un complexe RNAI-RNAII. La formation de ce complexe déstabilise l'hybridation ADN-RNAII et donc empêche la formation de l'amorce de réplication. Enfin, la formation du complexe RNAI-RNAII suit un mécanisme en deux étapes. Un complexe transitoire est tout d'abord formé, sa stabilisation est catalysée par la protéine Rom.

Par ailleurs, le volume cellulaire est soumis à une expansion exponentielle et lorsque le volume a doublé, il se divise instantanément par deux.

2.5.2. Construction du processus

Les notations des différentes espèces moléculaires sont les suivantes, conformément à celles adoptées dans la littérature mentionnée :

- D: Plasmide libre
- D_{II} : Plasmide complexé à un RNAII
- D_p : Plasmide muni d'une amorce de réplication
- D_c^* : Complexe instable de RNAI et de RNAII attaché au plasmide
- D_c : Complexe stable de plasmide-RNAI-RNAII
- D_M : Complexe quaternaire RNAI-RNAII-Plasmide-Rom
- R_I : RNAI libre
- M: Protéine Rom libre.

Ces molécules sont reliées par les réactions suivantes :

Proc 5 :	
$R^1 R^2$	$D \leftrightarrow D_{II}$
$R^3 R^4$	$D_{II} + R_I \leftrightarrow D_C^*$
$R^5 R^6$	$D_C^* + M \leftrightarrow D_M$
$R^7 R^8$	$D_C^* \leftrightarrow D_C$
R^9	$D_M \dashrightarrow D_C + M$
R^{10}	$D_C \dashrightarrow D$
R^{11}	$D_{II} \dashrightarrow D_p$
R^{12}	$D_p \dashrightarrow 2 D$
$R^{13} R^{14}$	$\emptyset \leftrightarrow M$
$R^{15} R^{16}$	$\emptyset \leftrightarrow R_I$

Les matrices du processus 5 figurent sur la table Proc5 en annexe.

L'analyse algébrique de ce système laisse apparaître un espace stœchiométrique de dimension 8. Les variables de l'espace des phases forment donc déjà une base de l'espace stœchiométrique, mais un changement de base permet de donner une expression plus simple à la matrice stœchiométrique. Une nouvelle base est la famille de vecteurs $\{\gamma^1, \gamma^6, \gamma^8, \gamma^{10}, \gamma^{11}, \gamma^{12}, \gamma^{14}, \gamma^{16}\}$. Hormis les relations de dépendance dues aux équilibres, les deux relations suivantes peuvent être remarquées :

$$\gamma^3 = \gamma^{16} + \gamma^8 - \gamma^{10} - \gamma^1$$

$$\gamma^9 = \gamma^6 - \gamma^8$$

Le nouveau graphe de Vol'pert du processus 5 est tracé sur la figure 7. Il n'est pas sans intérêt de le comparer à celui des articles de Brendel et Perelson. Sa simplification est évidente. Par ailleurs, le changement de base permet de tracer correctement le graphe en dépit de la présence d'un terme de la matrice stœchiométrique supérieur à un.

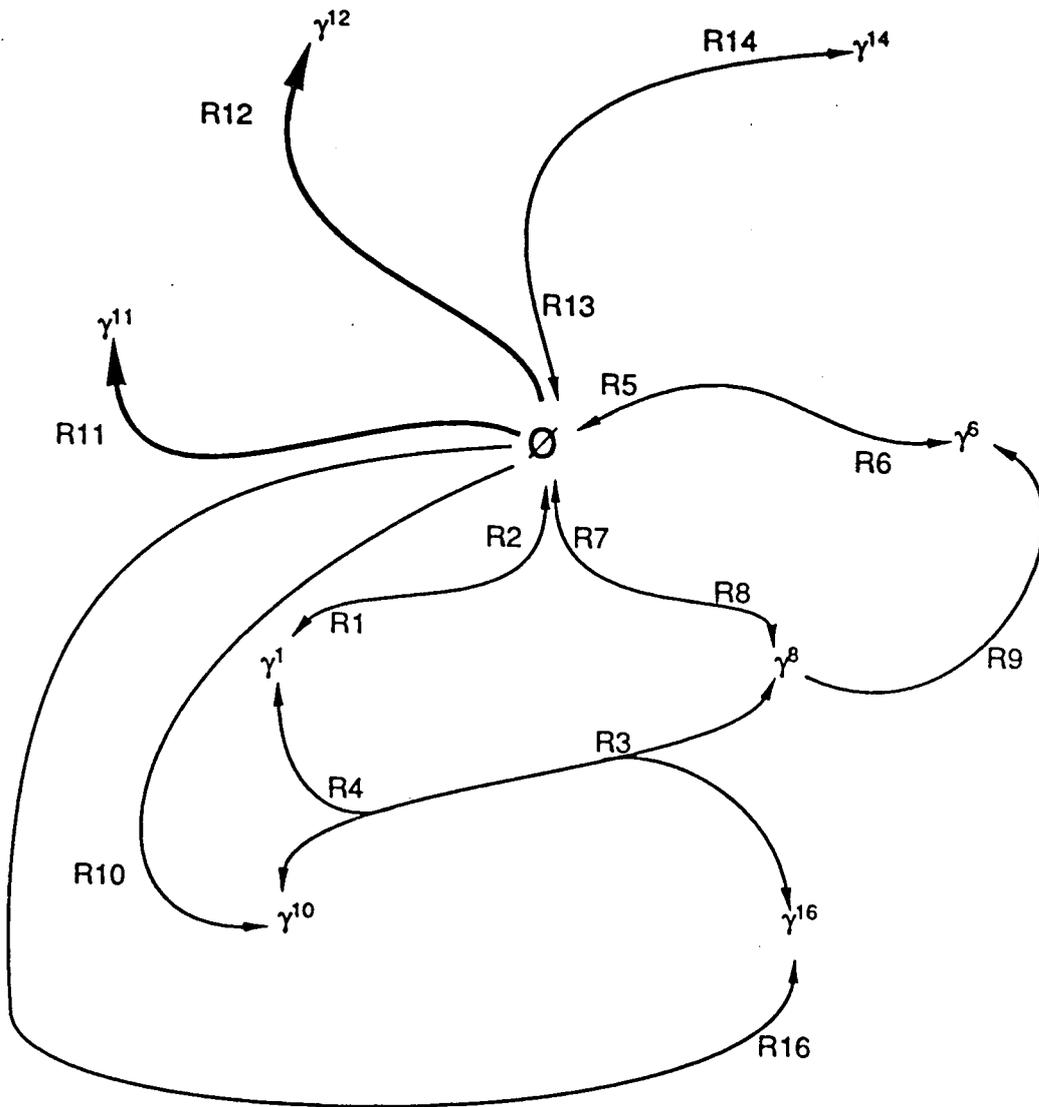


Figure 7 : graphe de Vol'pert du processus 5 (Réplication des plasmides ColE1) restreint à son espace stœchiométrique rapporté à une base canonique.

3. Conclusion : les apports de la stœchiométrie à l'étude des processus biochimiques

Avant de clore ce chapitre introductif, il est tentant de donner quelques grandes lignes directrices selon lesquelles ce travail pourrait se poursuivre. Avec des méthodes très empiriques, il a été possible d'aboutir à des résultats qui ne sont pas dénués d'intérêts puisqu'il a été possible de préciser le nombre de variables suffisant à déterminer l'état des différents processus définis. En conclusion, il va être montré qu'avec un fondement théorique à peine plus épais, il est possible d'aller encore beaucoup plus loin et de clarifier sensiblement l'étude préliminaire de ces processus aux réactions et variables si nombreuses. Ce qui suit semble original puisque cela ne figure dans aucune des références bibliographiques en notre possession. Cela n'est d'ailleurs pas sans surprendre puisque la difficulté mathématique de l'exposé est minime. La simplicité des notions en jeu autorise un style rapide qui allège l'exposé.

3.1. Précisions

Certaines notions auxquelles il a été fait référence dans les premiers paragraphes du chapitre méritent d'être un peu mieux définies ou même revues. Il est important de noter la différence entre les espaces vectoriels et les espaces de points. La notion d'orbite qui était jusqu'ici sous-jacente, est formalisée. Elle ne correspond à ce stade qu'à une approximation grossière d'une dynamique chimique. Il ne faut donc pas chercher à la discuter chimiquement, elle n'est introduite que pour des raisons techniques. Elle englobe les trajectoires qui seront étudiées dans le deuxième chapitre et qui, elles, seront discutées en détail.

3.1.1. Définition

Soit \mathcal{R} un processus réactionnel tel qu'il a été défini au paragraphe 1.1. :

$$\mathcal{R} = \{R^p / p=1, \dots, r\} \Leftrightarrow \mathcal{R} = (v, \mu) \in \mathcal{M}_{M,r}^2$$

Est notée γ , la matrice stœchiométrique associée :

$$\gamma \equiv \mu - v$$

3.1.2. Principaux espaces

L'espace des phases du processus est l'espace vectoriel de dimension M , \mathbf{R}^M .
L'espace stœchiométrique \mathcal{S} est le sous-espace vectoriel généré par les vecteurs colonne de la matrice γ .

Enfin, S_x est l'espace affine passant par le point x et de direction \mathcal{S} .

3.1.3. Orbite et états d'un processus

La notion d'orbite d'un processus réactionnel peut être définie ainsi :

Définition : Soit $(x_i)_{i \geq 0}$ une suite de points de l'espace des phases. $(x_i)_{i \geq 0}$ est une orbite du processus \mathcal{R} si et seulement si :

$$x_0 \in \mathbf{N}^M, \forall i \in \mathbf{N}, \exists p \in \{1, \dots, r\} \quad \vec{Ox}_{i+1} = \vec{Ox}_i + \vec{\gamma}^p$$

ce qui se note plus simplement lorsque aucune confusion n'est risquée :

$$x_{i+1} = x_i + \gamma^p$$

x_0 est une condition initiale ou état initial du processus.

Définition : un point x est un état du processus \mathcal{R} s'il existe une orbite $(x_i)_{i \geq 0}$ et i , un entier positif ou nul tel que $x_i = x$.

• Conséquence immédiate :

x est un état du processus \mathcal{R} dans l'état initial x_0 ssi :

$$\forall p \in \{1, \dots, r\}, \exists \alpha_p \in \mathbf{N} ; x = x_0 + \sum_{p=1}^r \alpha_p \gamma^p ; \alpha_p \in \mathbf{N}$$

•• Conséquence immédiate :

x est un état du processus \mathcal{R} dans l'état initial x_0 alors $x \in S_{x_0}$

••• Conséquence immédiate :

Si E_{x_0} est l'ensemble des états du processus \mathcal{R} dans l'état initial x_0 alors

$$E_{x_0} \subseteq S_{x_0} \cap \mathbf{N}^M$$

Il est possible d'étendre cette idée aux états d'un processus relativement à un ensemble de conditions initiales $\vartheta \in \mathcal{P}(\mathbf{N}^M)$, l'ensemble des parties de \mathbf{N}^M :

$$E_{\vartheta} \subseteq \left[\bigcup_{x_0 \in \vartheta} S_{x_0} \right] \cap \mathbf{N}^M$$

3.2. Application à l'étude des phénomènes biochimiques

3.2.1. Réversibilité

3.2.1.1. Définitions

Définitions :

a/ Une orbite $(x_i)_{i \geq 0}$ est dite faiblement réversible ssi :

$$\forall i \geq 0, \forall p > 0, \exists (y_i)_{i \geq 0}, \exists j, q : x_{i+p} = y_j \text{ et } x_i = y_{j+q}$$

b/ Une orbite $(x_i)_{i \geq 0}$ est dite réversible ssi :

$$\exists (y_i)_{i \geq 0}, \forall i \geq 0, \forall p \geq 0, \exists j, q : x_{i+p} = y_j \text{ et } x_i = y_{j+q} \text{ et de plus } \bigcup_i x_i = \bigcup_j y_j$$

c/ Une orbite $(x_i)_{i \geq 0}$ est dite fortement réversible ssi :

$$\exists (y_i)_{i \geq 0}, \forall i \geq 0, \exists j : x_{i+1} = y_j \text{ et } x_i = y_{j+1}$$

Ces trois notions sont de plus en plus restrictives. La réversibilité faible signifie qu'il est possible de parcourir une orbite dans les deux sens, mais le parcours en sens inverse peut nécessiter des écarts par rapport à l'orbite initiale. La réversibilité simple indique que de tout point d'une orbite, et que pour tout point qu'il lui est antérieur, il existe une seconde orbite qui permet de retourner à l'antérieur sans qu'il soit nécessaire de sortir des points de la première orbite. Enfin, la dernière définition indique qu'une orbite fortement réversible peut être strictement parcourue dans les deux sens en inversant l'ordre de parcours point par point.

Un processus réactionnel est dit faiblement réversible, réversible ou fortement réversible si toutes ses orbites le sont.

3.2.1.2. Critère

Propriété : Un processus est faiblement réversible si et seulement si :

$$\forall \rho \in \{1, \dots, r\} \exists \{\alpha_\rho : \rho = 1, \dots, r\} ; -\gamma^\rho = \sum_1^r \alpha_\rho \gamma^\rho, \alpha_\rho \in \mathbb{N}$$

Démonstration

\Rightarrow : Soit \mathcal{R} un processus réactionnel faiblement réversible et $(x_i)_{i \geq 0}$ une orbite

de \mathcal{R} . Soit $\rho_0 \in \{1, \dots, r\}$ et soit i tel que $x_{i+1} = x_i + \gamma^{\rho_0}$

Le processus étant faiblement réversible,

$$\exists (y_i)_{i \geq 0}, \exists j, q : x_{i+1} = y_j \text{ et } x_i = y_{j+q}$$

En soustrayant ces deux égalités membre à membre et par définition de ρ_0 on obtient la double égalité suivante :

$$\gamma^{\rho_0} = x_{i+1} - x_i = - (y_{j+q} - y_j)$$

$(y_j)_{j \geq 0}$ étant une orbite, il existe deux familles d'entiers positifs ou nuls $(\alpha_\rho^{(j)})_{\rho \in \{1, \dots, r\}}$, $(\alpha_\rho^{(j+q)})_{\rho \in \{1, \dots, r\}}$ telles que :

$$\forall \rho \in \{1, \dots, r\}, \alpha_\rho^{(j)} \leq \alpha_\rho^{(j+q)}$$

$$y_i = y_0 + \sum_{\rho=1}^r \alpha_\rho^{(j)} \gamma^\rho$$

$$y_{i+q} = y_0 + \sum_{\rho=1}^r \alpha_\rho^{(j+q)} \gamma^\rho$$

d'où :

$$\gamma^{\rho_0} = - \left[\sum_{\rho=1}^r \alpha_\rho \gamma^\rho \right]$$

avec

$$\alpha_\rho \equiv \alpha_\rho^{(j+q)} - \alpha_\rho^{(j)}$$

\Leftarrow : Soit un processus \mathcal{R} qui vérifie le critère : $\forall \rho_0 \in \{1, \dots, r\}, \exists (\alpha_\rho)_{\rho \in \{1, \dots, r\}}$:

$$\gamma^{\rho_0} = - \sum_{\rho=1}^r \alpha_\rho \gamma^\rho$$

Soit $(x_i)_{i \geq 0}$ une orbite de \mathcal{R} ; pour tout i , on pose : $x_i = y_{j+q}$ et $x_{i+1} = y_j$

Puisque $(x_i)_{i \geq 0}$ est une orbite, la double égalité suivante est vérifiée :

$$x_{i+1} - x_i = \gamma^{\rho_i} = - (y_{j+q} - y_j)$$

d'où il découle que :

en posant $q = \sum_{\rho=1}^r \alpha_\rho^{(\rho)}$ alors $(y_i)_{i \geq 0}$ est une orbite de \mathcal{R} et donc \mathcal{R} est réversible

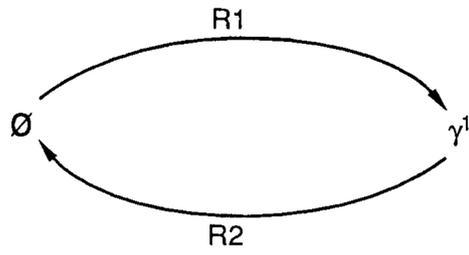
faiblement.

3.2.1.3. Recherche des interactions irréversibles dans les processus étudiés

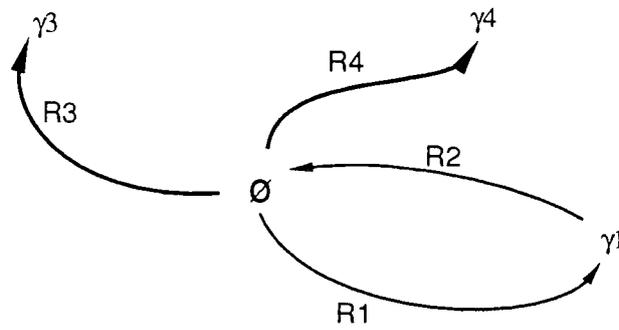
Le processus 1 est un équilibre simple, il est donc totalement réversible. Il l'est même fortement.

Le processus 1' comporte deux réactions irréversibles, R^3 et R^4 . Ceci se voit

Proc 1



Proc 1'



Proc 1''

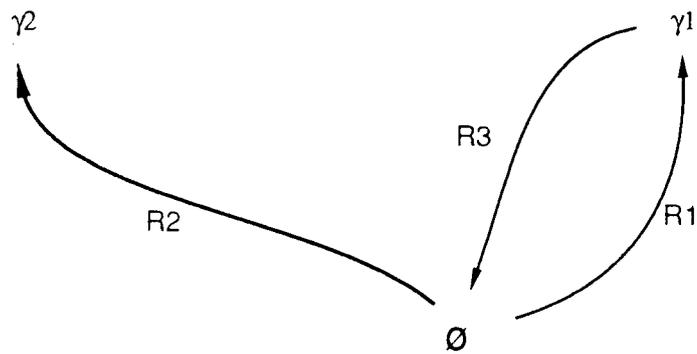


Figure 8 : graphes de Vol'pert des trois processus élémentaires du paragraphe 2.1.

particulièrement bien sur la forme canonique de la matrice γ .

Le processus 2 comporte un équilibre et une réaction irréversible.

Les processus 3 et 3' n'ont aucune réaction irréversible puisque l'on a dans le processus 3:

$$\gamma^1 = -\gamma^7$$

$$\gamma^j = -\gamma^{j+1} \text{ pour } i=2, 4$$

$$\gamma^8 = -[\gamma^1 + \gamma^2]$$

$\gamma^6 = -[\gamma^9 + \gamma^{10} + \gamma^{11}]$, égalité de laquelle est il est possible de tirer la réversibilité de γ^9 , γ^{10} et de γ^{11} .

Dans le processus 3', les égalités suivantes sont vérifiées :

$$\gamma^j = -\gamma^{j+1} \text{ pour } i=2, 4, 6, 8, 10, 12$$

$$\gamma^1 = -\gamma^{16}$$

$\gamma^{14} = \gamma^{15} = -[\gamma^{18} + \gamma^{19} + \gamma^{20}]$ d'où sont tirées les égalités pour γ^{18} , γ^{19} et γ^{20}

$$\gamma^{17} = -[\gamma^1 + \gamma^2]$$

Dans le processus 4, la réaction 20 est irréversible puisque l'on a :

$$\gamma^1 = \gamma^{19} = -\gamma^{21}$$

$$\gamma^2 = -\gamma^{26}$$

$\gamma^3 = -[\gamma^{22} + \gamma^{23} + \gamma^{24} + \gamma^{26} + \gamma^{27}]$ d'où les égalités pour γ^{22} , γ^{23} , γ^{24} et γ^{27}

$$\gamma^{18} = -[\gamma^{22} + \gamma^{23} + \gamma^{24} + \gamma^{26}]$$

$$\gamma^5 = \gamma^7 = -\gamma^{28}$$

$$\gamma^j = -\gamma^{j+1} \text{ pour } i=8, 10, 12, 14, 16$$

$$\gamma^6 = -\gamma^{25}$$

Dans le processus 4' est irréversible la réaction 33, qui est l'analogie de la réaction 20 du Proc 4, puisque :

$$\gamma^j = -\gamma^{j+1} \text{ pour } i=8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30$$

$$\gamma^1 = \gamma^{32} = -\gamma^{34}$$

$$\gamma^4 = \gamma^6 = \gamma^7 = -\gamma^{41}$$

$$\gamma^5 = -\gamma^{38}$$

$$\gamma^{39} = -\gamma^2$$

$\gamma^3 = -[\gamma^{35} + \gamma^{36} + \gamma^{37} + \gamma^{39} + \gamma^{40}]$ d'où les égalités pour γ^{35} , γ^{36} , γ^{37} , γ^{39} et γ^{40}

Dans le processus 5 sont irréversibles les réactions 11 et 12 puisque :

$$\gamma^j = -\gamma^{j+1} \text{ pour } i=1, 3, 5, 7, 13, \text{ et } 15$$

$$\gamma^9 = -[\gamma^5 + \gamma^8]$$

$$\gamma^{10} = -[\gamma^3 + \gamma^8 + \gamma^2 + \gamma^{16}]$$

3.2.2. Recherche des réactions élémentaires et d'une base canonique de \mathcal{S}

Si $\text{rg}(\gamma) < r$ alors il peut être cherchée une base de l'espace stœchiométrique parmi les vecteurs colonnes de γ . Il apparaît très souvent qu'il est possible d'extraire de γ une famille libre et génératrice de \mathcal{S} telle que les autres vecteurs de γ soient combinaisons linéaires à coefficients entiers des vecteurs de cette famille. Les réactions représentées par les vecteurs de cette base de \mathcal{S} peuvent représenter des réactions élémentaires pour le processus (puisque les autres sont des combinaisons linéaires à coefficients entiers positifs de celles-ci). Pour choisir une nouvelle base pour l'espace \mathcal{S} , la procédure suivante peut être suivie :

- Recherche des termes de fuite $\Psi_i \rightarrow \emptyset$ qui sont de norme 1 et orthogonaux deux à deux.
- Recherche d'autres termes orthogonaux
- La base est complétée par des termes non orthogonaux de norme minimum. Dans les équilibres sera choisi le sens qui minimise l'angle avec les termes de fuite (Produit scalaire positif.)
- Vérification de l'indépendance de la famille par calcul du déterminant et recherche des coordonnées des autres vecteurs de γ dans cette base.
- Dans le cas où ces coordonnées sont toutes ± 1 alors il peut être intéressant de dresser le graphe de Vol'pert du processus réactionnel. Son centre sera \emptyset autour duquel seront disposés autant de nœuds que \mathcal{S} a de dimensions. Aux vecteurs de la nouvelle base correspondront des flèches partant du centre et joignant chacun des nœuds. Les autres réactions seront représentées par des connexions joignant les nœuds correspondant aux coordonnées -1 à ceux correspondant aux coordonnées +1.

Si le graphe de Vol'pert est tel qu'il n'est possible de joindre un nœud à un autre qu'en passant par le centre \emptyset alors le processus pourra être modélisé par un processus de naissance et de mort ayant autant de dimensions que l'espace stœchiométrique.

3.2.3. Détermination de la dimension de l'espace \mathcal{S} par résolution du système des contraintes

Pour tout processus, il est assez facile de remarquer que :

$$\dim \mathcal{S} \leq \text{Inf} (M, r)$$

Dans le cas où $\dim \mathcal{S} = \text{Inf} (M, r)$ alors le processus "occupe tout l'espace à sa disposition", il ne se cantonne pas à un sous-espace. Le plus souvent, au moins dans le cas des processus biologiques complexes dont le nombre r de réactions est élevé $n = \text{Inf} (M, r) = M$. Si $\dim \mathcal{S} = M$, cela signifie que les réactions du processus ont autant de degrés de libertés que l'espace des phases a de dimensions. Les quantités de chacune des molécules peuvent varier. Dans le cas contraire, il existe des contraintes comme par exemple des équations de conservation de certains *pools*. Ces contraintes sont les équations de l'espace \mathcal{S} (Ceci serait sans doute à montrer). La résolution de ce système à p équations (nombre de *pools*) et à M inconnues est un autre moyen de déterminer la dimension de l'espace stœchiométrique.

d est le rang du système (taille de la plus grande matrice inversible extraite de la matrice du système)

Cas 1 : $d=p$

La dimension de l'espace contenant les solutions est $n-d$. La résolution du système permet de donner une expression plus évocatrice de l'équation de l'espace stœchiométrique.

Cas 2 : $d < p$

Le système n'a de solution que si tous les déterminants caractéristiques sont nuls. S'il a des solutions on les obtient comme en 1.

Cela d'après le théorème de Rouché.

Application au processus 3' :

Il y a deux *pools*, celui du promoteur et celui de la CAP. Le système des contraintes :

$$\psi_1 = \psi_6 = 1$$

$$\psi_2 + \psi_3 + \psi_4 + \psi_5 = 1$$

$$\psi_3 + \psi_5 + \psi_9 + \psi_{10} = Q$$

Comme dans le paragraphe 2.1.1. les minuscules ψ_i indique les coordonnées des points dans la bases $(\Psi_i)_{1 \leq i \leq M}$

Les tableaux ci-joints montrent que les deux inconnues principales sont ψ_2 et ψ_3 .

On peut donc exprimer l'équation de l'espace stœchiométrique sous la forme :

$$\psi_2 = f(\psi_i, i \neq 2, 3)$$

$$\psi_3 = g(\psi_i, i \neq 2, 3)$$

3.3. Résumé

3.3.1. Caractéristiques des processus étudiés

Processus	1	1'	2	3	3'	4	4'	5
Espace des phases	3	3	4	9	13	27	36	8
Rang	1	3	2	6	9	14	20	8
Nbre de réactions	2	4	4	11	20	28	41	16
dont fortement réversibles	2	2	4	7	13	20	36	12
dont irréversibles	0	2	1	0	0	1	1	2

3.3.2. Traitement algébrique des processus réactionnels

Face à un système biologique décrit en termes moléculaires, il est possible d'envisager le traitement suivant.

La première étape est l'écriture des équations chimiques (à valeurs plus ou moins logiques) du système. Il faudrait prendre la peine de vérifier que les mécanismes décrits par la biologie moléculaire sont tous exprimables en termes d'équations chimiques. Ce n'est pas évident a priori mais cela pourrait être un excellent prétexte à une réflexion de fond sur les types d'interactions décrits, à leur recension et leur analogie avec les réactions chimiques conventionnelles. Les principales difficultés risquent de provenir de la structure séquentielle de l'ADN et des molécules dérivées. Par ailleurs, à ce stade, il faut donner aux variables des noms adéquats, il faut surtout parvenir à voir les réactions qui sont en jeu et les écrire correctement sans fausser la logique de ce qui est exposé en langage naturel. Il y a dans cette opération une conversion d'un langage à un autre qui est très comparable à celle qui permet d'écrire un programme informatique. Cette étape paraît nécessaire. Les équations chimiques sont beaucoup plus simples à interpréter que les matrices car elles sont plus proches de notre propre langage. Elles ont une structure très logique.

Il faut ensuite parvenir à une écriture matricielle de cet ensemble de réactions. Pour cela il faut d'abord recenser toutes les espèces moléculaires en jeu et les indiquer. (Il serait nécessaire de se pencher sur la question de convention de numérotation si ces méthodes devaient être employées à une

plus grande échelle.) Il est alors possible d'obtenir les deux matrices v et μ et d'en déduire γ par soustraction de l'une à l'autre.

A ce stade deux méthodes sont utilisables pour déterminer la dimension de l'espace stœchiométrique. Il paraît prudent de les utiliser simultanément. Les équations de contrainte traduisent une certaine compréhension du système décrit, elles expriment une perception globale de la mécanique ; il serait dommage de la négliger. Il faut donc s'assurer que cette compréhension se retrouve dans les réactions qui ont été écrites. Par ailleurs, il est possible de chercher une base de l'espace stœchiométrique au sein de la famille des vecteurs colonnes de γ . Enfin, il est possible de redonner une nouvelle expression γ' de γ dans cette nouvelle base et le cas échéant d'en tracer le graphe de Vol'pert.

Une recherche d'éventuelles réactions irréversibles achèvera l'étude algébrique du processus réactionnel mis en place.

3.3.3. Problèmes ouverts et remarques diverses

- Conservativité et réversibilité : Il semble exister un lien entre la sous conservativité, la surconservativité et l'irréversibilité. En effet dans la mesure où l'évolution de la masse le long des trajectoires de ce type de processus est monotone, il semble difficile d'imaginer que les trajectoires puissent être parcourues dans les deux sens avec la même évolution dans chaque sens. Existe-t-il des relations plus subtiles entre les notions de conservativité et de réversibilité des processus ?

- Géométrie : les vecteurs stœchiométriques d'un processus conservatif sont tous orthogonaux à un vecteur de masse. D'où il découle que la dimension de l'espace stœchiométrique est au plus égale à la dimension de l'espace des phases moins un.

Les droites engendrées par les vecteurs stœchiométriques d'un processus sous-conservatif font un angle α avec celle engendrée par le vecteur de masse et $\pi \geq \alpha \geq \pi/2$. Si le processus est surconservatif alors $\pi/2 \geq \alpha \geq 0$. D'où il découle que l'évolution de ce type de processus est limitée à un des demi-espaces délimités par l'hyperplan passant par la position initiale et normal au vecteur de masse.

- Théorie des graphes : un lien entre l'analyse stœchiométrique et la théorie des graphes a été développé (59). Cette relation mériterait d'être examinée en détail dans une perspective biologique.

Chapitre 2

Modélisation des interactions macromoléculaires

*"Les thèmes ne sont rien, le contenu nous est donné par grâce.
Quant à la forme, c'est une grâce conquise au comble du travail."
Ludwig Hohl.*

0. Introduction

Comme il a déjà été signalé dans l'introduction générale du travail, un modèle de la dynamique des réactions impliquant des macromolécules au sein de la cellule vivante doit respecter le caractère discret des états atteints et le caractère aléatoire du mouvement. Ces deux traits sont en fait une caractéristique générale des petits systèmes chimiques. Les chimistes ont déjà abordé ce type particulier de systèmes. Les motivations à la base de ces travaux sont très théoriques puisque, pratiquement, la chimie non biologique est incapable de mener une expérimentation sur d'aussi petits systèmes. En revanche, un enjeu possible de ces travaux est de parvenir à préciser les limites du domaine de validité de l'approximation thermodynamique.

Dans la perspective qui est celle de la présente étude, il semble judicieux de procéder en trois étapes : une analyse des hypothèses et méthodes de la chimie stochastique, la construction sur des bases et dans un formalisme mathématiquement plus rigoureux d'un modèle analogue à ceux qui ont déjà été développés, et enfin l'examen de ses limites et des problèmes qu'il soulève.

1. Analyse critique des méthodes de la chimie stochastique

Là encore, l'ouvrage de Erdi et Toth (22) constitue une base bibliographique précieuse, mais dans, la généralité à laquelle il prétend, il a un peu tendance à omettre une discussion détaillée de la manière dont ont été élaborés les modèles. C'est pourquoi il paraît plus judicieux de suivre les différentes étapes du raisonnement d'un auteur représentatif, puis d'apporter quelques compléments sur la manière dont d'autres auteurs ont procédé.

1.1. La construction du modèle de Gillespie

Gillespie a commencé à travailler sur ce sujet dans la seconde moitié des années 70. Sa contribution à la discipline fut surtout numérique : il a conçu, implémenté et étudié systématiquement un algorithme de simulation de l'évolution stochastique d'un système chimique. Les premiers travaux de chimie stochastique avaient alors bientôt 40 ans et le sujet n'était déjà plus neuf, de nombreux points avaient pu être discutés et les fondements s'étaient stabilisés. Dans son premier papier, Gillespie les expose de manière détaillée (23).

1.1.1. Notations utilisées par Gillespie

Les notations utilisées tout au long du paragraphe 1. sont exactement celles de Gillespie. Ce changement de notations en cours de route risque d'être pénible pour le lecteur. Il se trouve cependant justifié que le lecteur qui irait consulter les articles originaux de Gillespie retrouverait dans ceux-ci les notations employées ici. Par ailleurs, comme certaines notions utilisées par cet auteur sont proches sans être tout à fait identiques à celles employées dans ce travail, des notations trop similaires auraient présenté le risque d'une confusion conceptuelle plus pénible qu'un changement de notation. Chaque fois qu'une notation différente désignant une notion identique sera introduite par la suite, cela sera bien entendu signalé.

V : volume du milieu réactionnel, supposé constant

S_i ($i = 1, 2, \dots, N$) : la $i^{\text{ième}}$ espèce moléculaire notée Ψ_i ($i=1, \dots, M$) par nous.

X_i : le nombre courant de molécules de la $i^{\text{ième}}$ espèce présente dans le volume V noté ψ_i dans le travail. On note par ailleurs X le vecteur (X_1, \dots, X_N) qui est l'état du système.

R_μ ($\mu = 1, 2, \dots, M$) : la μ -ième réaction chimique notée R^ρ ($\rho = 1, \dots, r$) par nous

c_μ : paramètre cinétique de la μ -ième réaction

k_μ : la constante cinétique usuelle de la μ -ième réaction

h_μ : fonction d'état du système. Elle donne le nombre de combinaisons de molécules de réactifs de la μ -ième réaction. Elle est définie réaction par réaction sans qu'une forme générale valable pour toute réaction ne soit proposée.

$P(\tau, \mu)$: densité de probabilité de réaction *i.e.*, $P(\tau, \mu).d\tau :=$ probabilité au temps t que la prochaine réaction dans le volume V ait lieu dans l'intervalle de temps différentiel $[t+\tau, t+\tau+d\tau]$ et qu'elle sera une réaction R_μ ; notons que $P(\tau, \mu)$ est supposée indépendante de t .

a_μ : $c_\mu \cdot h_\mu$

1.1.2. L'hypothèse fondamentale

Il existe un paramètre c_μ qui caractérise la cinétique de la réaction R_μ défini par :

$c_\mu \cdot \delta t :=$ probabilité moyenne, au premier ordre en δt , pour qu'une combinaison particulière de réactifs de R_μ réagisse dans le prochain intervalle de longueur δt .

Par exemple, si R_μ est du type $X_i + X_j \rightarrow$ "produits" alors la moyenne sur toutes les paires de molécules $X_i - X_j$ des probabilités qu'une paire particulière de molécules $X_i - X_j$ réagisse selon R_μ est $c_\mu \delta t + o(\delta t)$

L'existence de ce paramètre a fait l'objet d'une discussion assez vive entre physiciens. Cette manière d'aborder la modélisation de la réaction chimique a rencontré des résistances assez fortes. Comment justifier l'attribution à chaque molécule d'une probabilité de réaction indépendante de sa proximité des autres molécules de réactifs et indépendante du nombre de ces molécules ? Il n'y a pas lieu de rendre compte de ce débat ici, d'autant moins qu'il est clos aujourd'hui. Gillespie s'est cependant senti obligé de justifier l'existence de ce coefficient au moyen d'un raisonnement statistique (24). Intuitivement, il est possible de parvenir au même résultat que lui en raisonnant par analogie entre le modèle déterministe et le modèle stochastique de la

cinétique chimique. La relation entre k_μ et c_μ est ensuite discutée et il apparaît que :

$$k_\mu = V^{l-1} \cdot c_\mu$$

Dans cette expression, l est l'ordre de la réaction R_μ .

1.1.3. Calcul de la densité de probabilité de réaction

Du fait que les molécules sont supposées réagir à des instants différents (il y a au plus une réaction possible dans un intervalle de durée δt), il est possible de sommer leur probabilité de réactions individuelles. Il calcule le coefficient h_μ pour chacun des types de réactions d'ordre 0, 1, 2 et 3 et pose l'égalité :

$$h_\mu \cdot c_\mu \cdot \delta t = \text{probabilité au premier ordre en } \delta t \text{ pour qu'une réaction } R_\mu \text{ ait lieu dans l'intervalle } [t, t+\delta t[\text{ conditionnellement à l'état } X.$$

$$P_0(\tau) := \text{la probabilité qu'à l'instant } t, \text{ aucune réaction n'ait lieu dans l'intervalle } [t, t+\tau] \text{ conditionnellement à l'état } X.$$

Maintenant, la loi du processus peut-être déterminée si la densité $P(\tau, \mu)$ est calculée comme produit des deux probabilités précédentes. Elle est en effet, la probabilité de l'intersection des deux événements indépendants conditionnellement à «en t , les nombres de molécules de réactants sont X_1, \dots, X_n » : «aucune réaction n'a lieu dans $[t, t+\tau]$ » et «la réaction R_μ a lieu dans l'intervalle $[t+\tau, t+\tau+d\tau]$ ».

D'où les égalités :

$$\begin{aligned} P(\tau, \mu) \cdot d\tau &= P(R_\mu \text{ dans } [t+\tau, t+\tau+d\tau] / \text{pas de réaction dans } [t, t+\tau] \text{ et } X_1, \dots, X_n \text{ en } t) \cdot P(\text{pas de réaction dans } [t, t+\tau] / X_1, \dots, X_n \text{ en } t) \\ &= P(R_\mu \text{ dans } [t+\tau, t+\tau+d\tau] / X_1, \dots, X_n \text{ en } t) \cdot P(\text{pas de réaction dans } [t, t+\tau] / X_1, \dots, X_n \text{ en } t) \\ &= P_0(\tau) \cdot h_\mu \cdot c_\mu \cdot d\tau \end{aligned}$$

Reste à calculer $P_0(\tau)$. La méthode qu'il emploie dans un autre de ses articles (25) est un peu plus simple que celle exposée dans (23) :

$$P_0(\tau + d\tau) = P_0(\tau) \cdot P(\text{pas de réaction dans } [t+\tau, t+\tau+d\tau])$$

d'où :

$$P_0(\tau+d\tau) = P_0(\tau) \cdot \left(1 - P \left[\bigcup_{\mu} \{R_{\mu} \text{ dans } (t+\tau, t+\tau+d\tau)\} \right] \right)$$

$$P_0(\tau+d\tau) = P_0(\tau) \cdot \left(1 - \sum_{\mu} P[\{R_{\mu} \text{ dans } (t+\tau, t+\tau+d\tau)\}] \right) = P_0(\tau) \cdot \left(1 - \sum_{\mu} a_{\mu} d\tau \right)$$

d'où :

$$dP_0(\tau) = - \sum_{\mu} a_{\mu} d\tau$$

$$P_0(\tau) = e^{- \sum_{\mu=1}^M h_{\mu} c_{\mu} \tau}$$

Ce qui conduit à :

$$P(\tau, \mu) = h_{\mu} c_{\mu} e^{- \sum_{v=1}^M h_v c_v \tau}$$

1.2. Analyse du raisonnement de Gillepsie

1.2.1. Intérêt du travail

Il n'est jamais agréable de se livrer à la critique du travail de ceux qui nous ont précédé ; aussi, avant tout autre commentaire, convient-il de souligner la dette que nous avons envers eux puisqu'ils nous ont offert une précieuse base de discussion et de réflexion personnelle.

Le travail de Gillepsie a pour mérite principal d'avoir innové dans une discipline où, jusque là, les auteurs avaient essentiellement cherché à résoudre analytiquement l'équation maîtresse ou à calculer les premiers moments de certaines variables. Très vite les calculs s'alourdissaient, si bien que le raisonnement stochastique ne semblait pas pouvoir s'étendre au-delà de cas particulièrement simples. Gillepsie a ouvert la voie du calcul numérique qui permet d'élargir le champ de l'étude à celui des systèmes complexes. Un point important qu'il ne faut pas négliger est l'exactitude de l'algorithme. La fonction de répartition d'une loi exponentielle ayant une fonction inverse dont l'expression analytique est simple, il est possible d'obtenir, à partir d'un générateur uniforme de nombres aléatoires, une série de nombres distribués selon une loi réellement exponentielle. Par ailleurs, à la différence des algorithmes de résolution d'équations différentielles, il n'est pas nécessaire d'approximer des incréments infinitésimaux dt par des petits intervalles de

longueur Δt . Une autre qualité est la très petite taille des fichiers manipulés. Pour un système impliquant N espèces moléculaires et M réactions, il n'y a que $N + 2M + 1$ variables stockées. Ce nombre est en particulier indépendant du nombre de molécules dans le système et varie linéairement avec le nombre de réactions. Il est donc envisageable d'utiliser cette procédure pour simuler des ensembles de réactions très complexes et comportant un grand nombre de réactions différentes.

Cet ensemble de caractères permet de voir dans cet algorithme une voie alternative possible dans l'analyse numérique des systèmes chimiques. Il donne même une représentation beaucoup plus physique du comportement des systèmes. Les fluctuations font partie intégrante du modèle qu'il n'est pas nécessaire de "bruitier" pour rendre réaliste. Cette simulation stochastique sera donc particulièrement adéquate pour juger du comportement des systèmes au voisinage de leurs orbites stationnaires instables, au voisinage de la frontière des bassins d'attraction et au voisinage des bifurcations. Lorsqu'il existe des états stationnaires stables, ce protocole fournit les moyens d'une estimation des distributions stationnaires. Les quelques cas dans lesquels une expression analytique des deux premiers moments de ces distributions existe, ont montré que les résultats des simulations étaient en parfait accord avec elle.

Différentes variantes du modèle de Lotka, ainsi que du Brusselator et de l'Oregonator, sont étudiées dans (25). La réaction de Schlögl est traitée dans (26).

1.2.2. Les faiblesses du raisonnement

La manière dont Gillespie aborde la question est très physique. Sa principale préoccupation est de montrer que le coefficient c_μ qu'il définit mathématiquement a un sens physique. Dans le cas d'un modèle réactionnel très simple, il parvient à le calculer à l'aide d'un raisonnement de physique statistique. Il établit même que cette grandeur donne sans doute une meilleure expression de la réactivité des molécules que la constante cinétique déterministe puisqu'elle peut être dérivée de l'analyse de la réaction chimique au niveau microscopique alors que son analogue déterministe n'a d'autre fondement qu'empirique.

Toutes les hypothèses probabilistes sur lesquelles s'appuient son modèle et les résultats mathématiques qui lui permettent de progresser dans son raisonnement sont souvent omis. Ses conclusions peuvent donc sembler reposer sur une assise fragile.

En effet, l'hypothèse fondamentale qui définit la probabilité de réaction

comme proportionnelle à δt est loin d'être évidente. D'un point de vue mathématique, rien ne la justifie *a priori* et, d'un point de vue physique, son sens est loin d'être immédiat. Sa seule justification est le fait qu'elle permet un calcul dont le résultat donne une relation entre c et k qui paraît raisonnable. La fin justifie-t-elle les moyens ?

Au milieu de la page 413 de (23), Gillespie affirme que la probabilité d'avoir plus d'une réaction dans l'intervalle $[t+\tau, t+\tau+d\tau[$ est un $o(d\tau)$. Qu'est-ce qui lui permet de justifier cette hypothèse ? Des nécessités techniques ou une réalité physique ? Tout laisse penser qu'elle a été adoptée pour les simplifications qu'elle entraîne puisque dans un autre article (25) à l'égalité (17a), cette hypothèse a très sensiblement changé pour devenir $P(\text{plus d'une réaction dans l'intervalle } [t+\tau, t+\tau+d\tau[) = 0$. Ceci est beaucoup plus difficile à admettre que la première formulation. L'évolution d'un système qui vérifierait une telle égalité serait trop contrainte. Cette hypothèse forte ne compromet pas le résultat de ce calcul qui pouvait être atteint en considérant la probabilité de cet événement comme un $o(d\tau)$.

Les expressions que Gillespie donne de $P_0(\tau)$, comme celle de $P(\tau, \mu)$, sont indépendantes de t . Cette hypothèse, car il s'agit bien d'une hypothèse, est celle de l'homogénéité temporelle du processus.

Les changements d'états sont instantanés. Il est surprenant que cela ne soit pas mentionné car, s'il est bien évident que cela est implicite, la signification physique de cette hypothèse est au moins aussi limpide que celle de l'homogénéité spatiale.

Enfin, toutes sortes d'indépendances entre divers événements pouvant avoir lieu dans le milieu réactionnel sont postulées sans hésitation. Ainsi en est-il dans le calcul de $P_0(\tau)$ qui aboutit à l'égalité (16) de (23) :

$P(\text{pas de réaction dans } [t, t+\varepsilon]) =$

$$P\left(\bigcap_{\mu} \{\text{pas } R_{\mu} \text{ dans } [t, t+\varepsilon]\}\right) = \prod_{\mu} P(\{\text{pas } R_{\mu} \text{ dans } [t, t+\varepsilon]\}) = \prod_{\mu} (1 - a_{\mu}\varepsilon + o(\varepsilon))$$

Ici, est supposée l'indépendance des absences de réaction entre elles ce qui est d'ailleurs en contradiction avec l'hypothèse de disjonction des complémentaires de ces éléments postulée et utilisée dans le paragraphe 1.1.3. ci-dessus. (Rappelons que des événements disjoints sont dépendants et que leur complémentaires le sont donc aussi.) Puis :

$$P_0(\tau) = P(\{\text{pas de réaction dans } [t, t+\varepsilon]\} \cap \{\text{pas de réaction dans } [t+\varepsilon, t+2\varepsilon]\} \cap \dots)$$

$$P_0(\tau) = \prod_{i=0}^{K-1} P(\{\text{pas de réaction dans } [t+i\varepsilon, t+(i+1)\varepsilon]\})$$

Ici, il est supposé que les absences de réaction sont indépendantes d'un intervalle à l'autre.

Enfin, l'égalité (15) : $P(\tau, \mu).d\tau = P_0(\tau).h_\mu.c_\mu.d\tau$ suppose l'indépendance du temps d'attente de la première réaction et du choix de la nature de la réaction parmi toutes les réactions possibles ; cela, à défaut d'être montré mathématiquement, est une hypothèse chimique difficilement vérifiable expérimentalement, bien que non absurde.

1.3. Autres formulations des hypothèses de la chimie stochastique

On peut observer que, suivant l'objectif que les auteurs se fixent, ils sont amenés à formuler les hypothèses de manière plus ou moins large. Tous postulent que la probabilité d'avoir deux réactions dans l'intervalle de longueur h est $o(h)$. Les réactions sont instantanées pour tous, bien qu'aucun ne prenne la peine de discuter ce point. Tous supposent l'homogénéité dans le temps et le caractère markovien.

Certains, comme Mc Quarrie par exemple (27, 28), supposent, à la manière de Gillespie, que la probabilité de réagir dans l'intervalle $(t, t+h)$ vérifie $k.x.h + o(h)$, expression dans laquelle k est une constante et x , le nombre de combinaisons de molécules réactives. La présentation que font de cette théorie Erdi et Toth est aux antipodes de celle-ci (29). Eux préfèrent admettre *a priori* toutes les hypothèses. Le temps est continu, les états sont discrets. La réaction chimique est modélisable par un processus de saut Markovien homogène. La probabilité d'avoir plus d'une réaction dans un intervalle de temps de longueur h est un $o(h)$. Enfin, ils définissent une matrice de transition, qu'ils postulent être celle du processus auquel ils s'intéressent. Et il faut remonter trois pages plus haut jusqu'à un paragraphe très général sur les processus de saut, pour remarquer que dans des conditions "douces" (mild conditions) non précisées, un processus de saut admet une intensité, le terme n'est d'ailleurs pas mentionné. Mais, lors du traitement stochastique de la réaction chimique, cette propriété importante est oubliée. Ces deux auteurs vont donc un pas plus loin dans la représentation stochastique de la réaction chimique. Ils mentionnent les processus de saut et les notions qui sont reliées à ce type de processus. Toutefois, ce modèle est plus postulé que réellement établi. De plus, il ne semble pas que cette avancée ait vraiment renouvelé la perspective. Le modèle posé, la seule étude possible est la résolution analytique des équations qui donnent les lois de probabilités ou les moments des différentes variables.

1.4. Conclusion personnelle

Cette rapide revue invite à une très grande prudence. Il est certain que tous ces auteurs finissent plus ou moins par retomber sur les mêmes résultats et sur les mêmes lois de probabilité. Mais chacun voit la difficulté à des endroits différents, chacun ajoute, ici ou là, une ou deux hypothèses qui lui facilitent le travail. Enfin, pour qui a un peu étudié mathématiquement les processus de saut, il apparaît clairement que certaines hypothèses sont redondantes. En particulier, l'idée mentionnée par tous les auteurs que la probabilité de deux réactions dans un intervalle de longueur h est négligeable par rapport à h est parfaitement inutile : cela est vrai pour tout processus de saut markovien homogène. C'est une conséquence de la forme exponentielle de la loi de probabilité du temps d'attente du premier saut.

Toutes ces remarques montrent assez clairement que les fondements théoriques de la discipline reposent sur des bases fragiles. Pour cette raison, nous formulerons à notre tour nos propres hypothèses. Avant de procéder à cette opération, il paraît bon de rappeler rapidement quelques notions relatives aux processus stochastiques.

2. Principales notions relatives aux processus markoviens

Introduction

Ce paragraphe ne peut certainement pas constituer une introduction à la théorie des processus markoviens, ni même à celle plus restreinte des processus de saut. Un bon nombre des notions élémentaires ne n'est pas rappelé. Sa raison d'être est d'ailleurs nullement didactique. De très bons manuels existent sur le sujet (30, 31, 32, 33). L'objectif poursuivi est double. Tout d'abord, ce rappel des grandes notions est l'occasion d'introduire le formalisme à l'intérieur duquel sera développé notre travail de chimie. Ensuite, il est l'occasion de garder une trace d'une partie ingrate, très austère mais non négligeable de l'ensemble de ce travail, l'assimilation par un biologiste de ces notions, parfois un peu abstraites. En effet, le choix des définitions et résultats présentés ou mentionnés a bien entendu été très largement guidé par l'utilisation qui en est faite dans la suite, mais aussi parfois en fonction du jalonnement qu'ils ont constitué le long de cette partie préliminaire du travail.

[Les notations de Gillespie sont ici abandonnées. Celles utilisées tout au long du travail sont reprises.]

2.1. Chaînes de Markov

2.1.1. Discrétisation de l'échelle temporelle

Le temps d'un processus peut être traité discrètement, lorsque l'occurrence de l'événement aléatoire qui détermine l'évolution du système est déterminée dans le temps. Les cas les plus fréquents sont ceux de phénomènes réguliers observés après chaque période. Sont aussi traités de manière discrète tous les systèmes pour lesquels aucune information temporelle n'est disponible ou prise en considération, si bien que leur évolution est rapportée à un ensemble d'indices temporels entre lesquels "il se passe ou peut se passer quelque chose". La signification et la validité de l'opération de discrétisation du temps physique pourrait être discutée. Les chaînes à temps discret sont traitées ici en premier, indépendamment de leur signification physique, puisqu'elles permettent d'introduire plus facilement les principales notions et que les processus à temps continu ont des propriétés dynamiques analogues dans certaines conditions. (Voir la remarque du paragraphe 2.3.2.)

2.1.2. Définitions

Il existe trois définitions équivalentes d'une chaîne de Markov :

On note (\mathcal{F}_n) la filtration naturelle du processus avec $\mathcal{F}_n = \sigma\{X_k ; k \leq n\}$ et la tribu $\mathcal{G}_n = \sigma\{X_k ; k \geq n\}$ (où $\sigma\{X_k\}$ désigne la tribu engendrée par les X_k)

Définition 1 : Un processus discret $X_0, X_1, \dots, X_n, \dots$, défini sur l'espace probabilisé filtré $(\Omega, \mathcal{F}, (\mathcal{F}_n)_{n \in \mathbb{N}}, P)$, à valeurs dans (E, \mathcal{E}) , est une chaîne de Markov ssi :

$$\forall A \in \mathcal{E} ; \forall n \geq 0, P(X_{n+1} \in A / X_0, \dots, X_n) = P(X_{n+1} \in A / X_n), P \text{ p.s.}$$

Définition 2 : $(X_n)_{n \in \mathbb{N}}$ est une chaîne de Markov, ssi :

$$\forall C \in \mathcal{G}_n : P(C / \mathcal{F}_n) = P(C / X_n), P \text{ p.s.}$$

ou encore :

$$\forall Y \mathcal{G}_{n-1} \text{-mesurable} : E(Y / \mathcal{F}_n) = E(Y / X_n), P \text{ p.s.}$$

Définition 3 : $(X_n)_{n \in \mathbb{N}}$ est une chaîne de Markov, ssi les tribus \mathcal{F}_n et \mathcal{G}_n sont conditionnellement indépendantes sachant X_n :

$$\forall Y \mathcal{G}_n \text{-mesurable} ; \forall Z \mathcal{F}_n \text{-mesurable}, E(YZ / X_n) = E(Y / X_n) E(Z / X_n), P \text{ p.s.}$$

La définition 1 signifie que la loi de X_{n+1} ne dépend que du dernier état visité; la définition 2 que le passé du processus ne conditionne son avenir qu'à travers l'état présent (ce qui signifie la même chose que la définition 1). Enfin la définition 3 établit une symétrie entre le passé et l'avenir du processus qui sont indépendants conditionnellement au présent. L'équivalence de ces trois définitions peut être établie. Ces trois définitions sont données en vue de bien mettre en avant le caractère markovien qui a des facettes multiples.

2.1.3. Loi et construction du processus

Les notations suivantes se révèlent d'usage commode :

$$P(X_m = y / X_n = x) = P_{n,m}(x, y) \text{ avec } m > n \text{ et}$$

$$P(X_{n+1} = y / X_n = x) = P_n(x, y)$$

Dans le cas où P_n est indépendante de n , le processus ne "vieillit" pas, la chaîne est dite homogène. La probabilité de transition P_n , n'étant alors plus fonction de n , est simplement notée P .

Dans le cas qui nous intéresse, où E est un espace dénombrable, $P(x, \cdot)$ est,

pour chaque x , une loi de probabilité sur E ; on a donc : $\sum_{y \in E} P(x,y) = 1$.

L'ensemble de ces lois de probabilité, lorsque x parcourt E , permet de définir la matrice de transition de la chaîne. Ses termes sont :

$$P_{ij} = P(x_i, x_j)$$

La somme des termes de chaque ligne vaut 1. Une matrice qui a une telle propriété est dite stochastique.

La matrice de transition détermine la probabilité de toute trajectoire car :

$$P(X_1=x_1, \dots, X_n=x_n / X_0=x_0) = P(x_0, x_1) P(x_1, x_2) \dots P(x_{n-1}, x_n)$$

Si, de plus, est donnée la loi initiale Π de X_0 , alors la loi du processus est entièrement déterminée, puisque la loi de X_n est la mesure ΠP^n avec les conventions habituelles sur la définition du produit des matrices.

Ainsi, la loi d'une chaîne de Markov homogène peut s'exprimer à l'aide d'une loi initiale et d'une matrice stochastique. Réciproquement, la donnée d'une loi initiale sur E et d'une matrice stochastique définissent une unique chaîne qui vérifie : $P_\Pi(X_n) = \Pi P^n$ (où $P_\Pi(X_n)$ est la loi de X conditionnellement à une loi initiale Π). Ceci est essentiel, car, le plus souvent, c'est la donnée de la "règle du jeu" qui sera la base de construction de la chaîne.

2.2. Les processus de saut markoviens

2.2.1. Définitions

Il s'agit de processus de Markov à temps continu. Dans ce cas, les changements d'états se font de manière aléatoire dans le temps, à des instants "isolés", dénombrables ; entre deux changements d'états, il y a une attente de durée aléatoire. Le qualificatif de markovien indique que le prochain état visité ne dépend que de l'état présent du système, pas de son passé plus lointain.

Soit la filtration (\mathcal{F}_t) telle que $\mathcal{F}_t = \sigma\{X_s ; s \leq t\}$

Définition 1 : Un processus $[X(t)]_{t \geq 0}$ défini sur l'espace probabilisé filtré $(\Omega, \mathcal{F}, (\mathcal{F}_t)_{t \in \mathbb{R}_+}, P)$, à valeurs dans (E, \mathcal{E}) , est markovien, ssi :

$$\forall t, u \geq 0 ; \forall A \in \mathcal{E}, P[X(t+u) \in A / \mathcal{F}_t] = P[X(t+u) \in A / X(t)]$$

Dans le cas où E est dénombrable, il est possible de poser :

$$P_{s,t}(x, y) = P[X(t)=y / X(s)=x], \text{ si } P[X(s)=x] \neq 0$$

$P_{s,t}(x, y) = \mathbf{1}_{\{x=y\}}$ sinon.

Ainsi définies, les matrices $P_{s,t}$ sont des matrices stochastiques qui vérifient la relation de Chapman-Kolmogorov :

$$P_{s,u} = P_{s,t} P_{t,u}$$

L'homogénéité du processus se traduit par : $\forall s, t \in \mathbf{R}_+; t \geq s, P_{s,t} = P_{0,t-s} \equiv P_{t-s}$

La relation de Chapman-Kolmogorov donne à la famille des matrices (P_t) la structure de semi-groupe, puisque : $P_t P_s = P_{t+s}$

Tout ceci généralise de manière assez immédiate les notions abordées en temps discret.

Définition 2 : Etant donné un semi-groupe de transition (P_t) d'un espace mesurable (E, \mathcal{E}) dans lui-même, un processus de Markov admettant (P_t) comme semi-groupe de transition est appelé processus de saut markovien homogène si, pour toute probabilité initiale Π , presque toutes les trajectoires sont continues à droite et constantes sauf en des instants "isolés", c'est à dire dénombrables.

Ceci peut aussi être dit de manière plus formelle :

Définition 3: Soit $[X(t)]_{t \geq 0}$ un processus de Markov homogène à valeurs dans (E, \mathcal{E}) . Soit $\tau_0 = 0, \tau_1, \dots, \tau_n, \dots$ une suite croissante d'instants de changements d'états et X_0, \dots, X_n, \dots une suite d'états telles que :

$$\forall t \geq 0; \tau_n \leq t < \tau_{n+1} \Rightarrow X(t) = X_n$$

Dans la mesure où le processus n'est pas explosif ($\lim_{n \rightarrow \infty} \tau_n = \infty$), la donnée de ces deux suites détermine complètement le processus de saut. C'est une chaîne de Markov à temps continu (si $\lim_{n \rightarrow \infty} \tau_n = \tau < \infty$, alors les deux suites (X_n) et (τ_n) ne déterminent $X(t)$ que pour $0 \leq t \leq \tau$).

2.2.2. Propriétés fondamentales

Soit $[X(t)]_{t \geq 0}$ un processus de saut markovien homogène à valeurs dans (E, \mathcal{E}) .

2.2.2.1. Temps d'arrêt

Définition : Soit $(\mathcal{F}_t)_{t \geq 0}$ une filtration, toute application T de Ω dans \mathbf{R}_+ qui

vérifie $\forall t \in \mathbf{R}_+ \{T \leq t\} \in \mathcal{F}_t$ est un \mathcal{F}_t -temps d'arrêt.

Proposition 1 : $[X(t)]_{t \geq 0}$ est un processus fortement markovien, c'est à dire que pour tout temps d'arrêt T relativement à la filtration $(\mathcal{F}_t)_{t \geq 0}$ et $\forall A \in \mathcal{E}^{\mathbf{R}_+}$ on a :

$$P[\{X_{+T} \in A\} \cap \{T < \infty\} / \mathcal{F}_T] = 1_{\{T < \infty\}} P_{X_T}\{X \in A\} \quad P \text{ p.s.}$$

où : $P_{x_T} = P_{\Pi}$, $\Pi = \delta_{x_T}$ δ_x étant la probabilité de Dirac au point x .

Cette propriété résulte de la continuité à droite des trajectoires. Elle est rarement complètement démontrée. Une démonstration se trouve toutefois dans (34).

Soit τ_1 l'instant du premier saut : $\tau_1 = \inf \{t ; X(t) \neq X(0)\}$

Proposition 2 : τ_1 est un (\mathcal{F}_t) - temps d'arrêt.

Voir (35) pour la démonstration de cette propriété.

2.2.2.2. Existence d'une intensité et conséquences

Nous noterons P_{Π} , la loi du processus conditionnée par la loi initiale Π et P_x cette même loi lorsque $\Pi = \delta_x$ qui est la masse de Dirac au point x .

Théorème 1 :

(i) Sous la loi P_x , les variables aléatoires τ_1 et $X(\tau_1)$ sont indépendantes

(ii) Il existe une fonction $\lambda(x)$, de E dans \mathbf{R}_+ telle que :

$$P_x(\tau_1 > t) = e^{-\lambda(x)t} = 1 - F_x(t), \quad \forall t \geq 0, x \in E$$

où $F_x(t)$ est la fonction de répartition de la loi de τ_1 .

(iii) $\forall u \in \mathbf{R}_+, P(\tau_{n+1} - \tau_n > t / \tau_n = u, X_n = x) = P(\tau_{n+1} - \tau_n > t / X_n = x) = 1 - F_x(t)$

(iv) (X_n) est une chaîne de Markov homogène

Démonstration :

- La première assertion est une application du caractère fortement markovien des processus de saut (36, 37)

- Par ailleurs, $X(t)$ est markovien homogène ssi :

$$P_x(\tau_1 > s+t / \tau_1 > s) = P_x(\tau_1 > t)$$

Soit $F_x(t) = P_x(\tau_1 \leq t)$, l'égalité précédente implique :

$$1 - F_x(t+s) = [1 - F_x(s)] \cdot [1 - F_x(t)]$$

Or F_x est croissante au sens large, et $F_x(0) = 0$ d'où il résulte qu'il existe une constante non négative $\lambda(x)$ telle que $1 - F_x(t) = e^{-\lambda(x)t}$.

• Les deux dernières propriétés sont des conséquences du caractère markovien et de l'homogénéité du processus $X(t)$.

Remarque :

$\lambda(x) = 0$: le processus est alors immobilisé, puisque, pour tout t , $F_x(t) = 0$; x est un état absorbant. Ceci apparaît encore plus clairement, en remarquant que $E(\tau_1) = 1/\lambda(x)$ et donc, dans le cas d'un x tel que $\lambda(x) = 0$, $E(\tau_1) = +\infty$.

Il résulte de ce théorème que la loi F_x du premier instant de saut partant de x est donnée sur \mathbf{R}_+ par la densité : $f_x(t) = dF_x(t)/dt = \lambda(x) \cdot e^{-\lambda(x)t}$

Proposition 1 : Soient τ_1 et τ_2 les instants des premier et second sauts, alors :

- $P_x(\tau_1 \leq t) = \lambda(x)t + o(t)$
- $P_x(\tau_n \leq t) = o(t) \quad \forall n \geq 2$

où $o(t)/t$ converge uniformément en x vers 0 lorsque t tend vers 0, si $\lambda(x)$ est bornée.

Ces résultats sont essentiels dans une perspective chimique. Il paraît donc opportun d'en donner une démonstration.

Démonstration :

•

$$P_x(\tau_1 \leq t) = F_x(t) = 1 - e^{-\lambda(x)t}$$

expression qui peut-être développée selon la formule de Taylor :

$$= 1 - \left[1 - \lambda(x)t + \frac{t^2}{2} \lambda(x)^2 \cdot e^{-\lambda(x)\tilde{t}} \right] ; 0 < \tilde{t} < t$$

$$\Rightarrow P_x(\tau_1 \leq t) = \lambda(x) \cdot t + o(t)$$

••

$$P_x(\{\tau_2 \leq t\}) \leq P_x(\{\tau_1 \leq t\} \cap \{\tau_2 - \tau_1 \leq t\})$$

$$P_x(\{\tau_1 \leq t\} \cap \{\tau_2 - \tau_1 \leq t\}) = E_x \left[1_{\{\tau_1 \leq t\}} E_x \left[1_{\{\tau_2 - \tau_1 \leq t\}} / \mathcal{F}_{\tau_1} \right] \right]$$

du fait de l'indépendance de τ_1 et $\tau_2 - \tau_1$, or, le processus étant fortement markovien, on a aussi :

$$E_x \left[1_{\{\tau_2 - \tau_1 \leq t\}} / \mathcal{F}_{\tau_1} \right] = 1 - e^{-\lambda(X(\tau_1)) \cdot t}$$

si bien que :

$$P_x(\{\tau_2 \leq t\}) = E_x[1_{\{\tau_1 \leq t\}} \cdot (1 - e^{-\lambda(X(\tau_1)) \cdot t})]$$

Or l'intensité du processus est bornée par $\|\lambda\|_\infty$, par hypothèse. D'où il découle que :

$$P_x(\{\tau_2 \leq t\}) \leq E_x[1_{\{\tau_1 \leq t\}}] \cdot (1 - e^{-\|\lambda\|_\infty \cdot t})$$

$$E_x[1_{\{\tau_1 \leq t\}}] \cdot (1 - e^{-\|\lambda\|_\infty \cdot t}) = (1 - e^{-\lambda(x) \cdot t}) \cdot (1 - e^{-\|\lambda\|_\infty \cdot t})$$

Le premier facteur du produit du second membre est lui aussi majoré.

$$P_x(\{\tau_2 \leq t\}) \leq (1 - e^{-\|\lambda\|_\infty \cdot t})^2 \approx t^2 = o(t)$$

On définit la matrice $P(x,y)$, pour tout x et y éléments de E , par :

$$\forall y \in E, \quad \lambda(x) \neq 0 \Rightarrow P(x,y) = P_x(X(\tau_1)=y)$$

$$\lambda(x) = 0 \Rightarrow P(x,y) = \delta_{xy}$$

P est donc la matrice de transition de la chaîne de Markov homogène (X_n) associée au processus $X(t)$. Il convient aussi de remarquer que, par définition de τ_1 qui est un instant de changement d'état, il découle que, pour tout x non absorbant, $P(x, x) = 0$. Cette matrice stochastique a donc la particularité d'être creuse sur la diagonale.

2.2.2.4. Probabilités de transition et caractéristiques locales

P et λ sont appelées les caractéristiques locales du processus de saut, elles déterminent entièrement la probabilité de transition. En effet, la loi du processus est déterminée par la loi $P(X(t_1)=x_1, X(t_2)=x_2, \dots, X(t_n)=x_n)$ de tout n -uplet dans lesquels les t_i sont n instants croissants pris au hasard sur la demi-droite des réels positifs.

$X(t)$ étant markovien homogène, cette probabilité se décompose comme suit :

$$P(X(t_1)=x_1, X(t_2)=x_2, \dots, X(t_n)=x_n) =$$

$$P(X(t_1)=x_1) \cdot P_{t_2-t_1}(x_1, x_2) \dots P_{t_n-t_{n-1}}(x_{n-1}, x_n)$$

avec : $P(X(t_1)=x_1) = \int_E P_{t_1}(x, x_1) \cdot \Pi(x) \cdot dx$ où $\Pi(x)$ est la probabilité initiale.

Le calcul de la loi de tout n -uplet se ramène donc à celui de toute matrice $P_t(x,y)$ pour tout t positif ou nul et pour tout x et y quelconques de E . Deux cas sont à distinguer, selon que $x=y$ ou non.

$$P_t(x,y) = \delta_{xy} [1 - F_x(t)] + (1 - \delta_{xy}) F_x(t) P(x,y) + o(t)$$

En utilisant le point \dots de la proposition 1 page 53, pour t petit, le $o(t)$ traduit le fait que la probabilité de sauter deux fois est négligeable.

$$P_t(x,y) = \delta_{xy} [1 - \lambda(x)t] + (1 - \delta_{xy}) \lambda(x) \cdot t \cdot P(x,y) + o(t)$$

Il est aussi établi que les probabilités de transition $P_t(x,y)$ sont solutions des deux systèmes d'équations différentielles, dites respectivement équations de Kolmogorov progressive et rétrograde :

$$\frac{\partial P_t(x, y)}{\partial t} = \sum_{z \in E} P_t(x, z) q(z, y) \quad \text{et} \quad \frac{\partial P_t(x, y)}{\partial t} = \sum_{z \in E} q(x, z) \cdot P_t(z, y) \quad \text{avec}$$

$q(x, y) = \lambda(x) \cdot [P(x, y) - \delta_{x,y}]$ où $\delta_{x,y}$ vaut 1 si $x = y$ et 0 sinon.
(voir (38) pour l'établissement de ces équations)

Ainsi, la connaissance de l'intensité $\lambda(x)$, de la matrice de transition $P(x,y)$ et de la distribution initiale $\Pi(x)$ détermine complètement le processus.

Il est enfin à noter que les physiciens et chimistes ont plutôt l'habitude de travailler sur un système d'équations différentielles qu'ils appellent "équation maîtresse" (master equation) et qui n'est jamais mentionnée dans la littérature mathématique sous ce nom. L'équation maîtresse est une équation bilan qui s'énonce ainsi :

$$\frac{\partial P\{X(t)=x\}}{\partial t} = \sum_{y \in E} [W(y, x)P\{X(t)=y\} - W(x, y)P\{X(t)=x\}]$$

$W(x,y)dt$ étant la probabilité de transition de x en t à y en $t+dt$

Cette équation est obtenue de la manière suivante :

$$P\{X(t+h)=x\} = \sum_{y \in E} P\{X(t+h)=x \mid X(t)=y\} \cdot P\{X(t)=y\}$$

Ces probabilités s'expriment simplement à l'aide de l'intensité et de la matrice de transition :

$$P\{X(t+h)=x\} = \sum_{\substack{y \in E \\ y \neq x}} (\lambda(y) \cdot h + o(h)) \cdot P(y, x) \cdot P\{X(t)=y\} + (1 - \lambda(x)h - o(h)) \cdot P\{X(t)=x\}$$

Comme $P(x,x)=0$ et que $\sum_{y \in E} P(x,y)=1$, il vient :

$$\frac{P\{X(t+h)=x\} - P\{X(t)=x\}}{h} = \sum_{y \in E} \lambda(y)P(y, x) \cdot P\{X(t)=y\} - \lambda(x) \cdot P\{X(t)=x\} \cdot \sum_{y \in E} P(x, y) + \frac{o(h)}{h}$$

En passant à la limite en faisant tendre h vers 0, on obtient la dérivée recherchée :

$$\frac{\partial P\{X(t)=x\}}{\partial t} = \sum_{y \in E} \lambda(y) \cdot P(x, y)P\{X(t)=y\} - \lambda(x) \cdot P(x, y) \cdot P\{X(t)=x\}.$$

2.3. Comportement dynamique

2.3.1. Cas des chaînes dénombrables

L'essentiel de ce paragraphe est inspiré de (39).

2.3.1.1. Classification des états

Intuitivement, il est possible de distinguer deux types possibles d'états. Ceux pour lesquels il y a une quasi certitude de passer plusieurs fois et ceux pour lesquels la probabilité d'y retourner, une fois qu'on s'y trouve, est inférieure à un. Assez naturellement, les premiers seront dits récurrents alors que les seconds seront dits transitoires.

De manière plus formelle ces idées s'expriment ainsi :

Soit T_y , le temps d'atteinte de y :

$$\forall y \in E, T_y \equiv \text{Inf}\{n > 0, X_n = y\}$$

Définitions :

Un élément y de E est dit récurrent ssi :

$$P_y(T_y < \infty) = 1$$

y est dit transitoire ssi il n'est pas récurrent, i.e. :

$$P_y(T_y < \infty) < 1$$

Parmi les états récurrents, il est possible de distinguer les états récurrents positifs et les états récurrents nuls.

Définitions :

Soit y un état de E récurrent pour la chaîne (X_n) :

y est dit récurrent positif si :

$$E_y(T_y) < \infty$$

y est récurrent nul sinon :

$$E_y(T_y) = \infty$$

La conséquence assez immédiate de cette définition est qu'un état récurrent est visité une infinité de fois par la chaîne. En effet, le processus revenu une première fois en y se comporte comme initialement. Donc le processus $X_{T_y}, X_{T_y+1}, \dots$ retourne en y dans un temps fini p.s. etc... Or, le premier retour de ce processus en y est le second passage du processus.

Soit N_y le nombre de passages de la chaîne en y :
$$N_y \equiv \sum_{n \in \mathbb{N}} 1_{\{X_n=y\}}$$

Le raisonnement précédent laisse penser que l'on a :

$$\forall n \in \mathbf{N}, N_y \geq n \quad P_y \text{ p.s.}$$

Si maintenant y est transitoire, la question est celle de la variable N_y .

Proposition : Soit (X_n) une chaîne de Markov telle que $X_0=y$ alors :

- Si y est récurrent, la chaîne visite y une infinité de fois P_y -p.s. :

$$P_y(N_y = +\infty) = 1$$

- Si y est transitoire, le nombre N_y de passage en y suit une loi géométrique :

$$P_y(N_y = k) = (1 - \eta_y) \eta_y^{k-1}, \quad k \geq 1$$

avec : $\eta_y = P_y(T_y < +\infty) = P_y(N_y > 1)$,

si bien que N_y est fini P_y -p.s. et d'espérance finie.

Il est à noter que :

$$E_y(N_y) = \lim_{n \rightarrow +\infty} \sum_{i=0}^n P^i(y, y) \equiv G(y, y)$$

2.3.1.2. Partitionnement de l'espace des états

Définition :

Soit F , une partie de E . F est dite absorbante pour la chaîne (X_n) à valeur dans (E, \mathfrak{E}) si :

$$\forall y \in F, P_y(\{\forall n \in \mathbf{N}, X_n \in F\}) = 1$$

F est donc absorbante si, partant de $y \in F$, la chaîne y reste P_y -p.s.

Définition :

La même partie F de E est irréductible, si elle est absorbante et qu'elle ne peut s'écrire comme réunion de deux ensembles disjoints non vides.

Il est possible de montrer que, partant d'un état récurrent y , l'ensemble E est décomposable en deux sous-ensembles disjoints C_y^c et C_y ; C_y^c est constitué des états jamais atteints par la chaîne et les états atteints une infinité de fois forment C_y (ces états sont récurrents).

$$x \in C_y \Leftrightarrow P_y(N_x = +\infty) = 1$$

L'appartenance à C_y définit une relation d'équivalence parmi les états récurrents de la chaîne :

$$x \in C_y \Leftrightarrow x \sim y$$

La démonstration de ces différentes considérations permet d'énoncer le théorème qui suit :

Théorème :

- L'espace des états E d'une chaîne (X_n) se décompose en une partition :

$$E = E_t \cup E_r$$

E_t ensemble des états transitoires et E_r des états récurrents.

- E_r se décompose lui-même en une partition finie ou dénombrable de sous-ensembles absorbants irréductibles C_i :

$$E_r = \bigcup_i C_i$$

Les C_i sont les classes d'équivalence de la relation \sim définie par :

$$x \sim y \Leftrightarrow P_y(T_x < \infty) = 1$$

Un ensemble E fini a au moins un état récurrent positif.

2.3.1.3. Théorème limite pour les chaînes récurrentes irréductibles

Définition :

Une chaîne (X_n) à valeurs dans (E, \mathfrak{E}) est dite périodique de période p s'il existe une partition de E ayant p éléments :

$$E = \bigcup_{i=1}^p E_i ; E_i \cap E_j = \emptyset \text{ si } i \neq j$$

telle que :

$$P_x(\{X_n \in E_{n \bmod p}\}) = 1$$

Définition :

Une chaîne (X_n) à valeurs dans (E, \mathfrak{E}) est dite récurrente irréductible si E n'est constitué que d'une unique classe récurrente.

Théorème :

Soit une chaîne récurrente irréductible, alors il existe une mesure m σ -finie, strictement positive, unique à une constante multiplicative près, invariante par la matrice de transition P :

$$\begin{aligned} \forall x \in E, m(x) > 0 \\ mP = m \end{aligned}$$

m est une probabilité si la chaîne est récurrente positive.

Dans la mesure où la chaîne n'est pas périodique, la probabilité m est la limite quand n tend vers l'infini de la loi de X_n . La loi asymptotique d'une chaîne irréductible positive apériodique se révèle donc indépendante de la distribution initiale (40).

Soit N_y^x le nombre de passage de la chaîne en x avant le premier passage en y , i.e. :

$$N_y^x = \sum_{n=1}^{T_y} 1_{\{X_n=x\}}$$

La mesure m invariante par la matrice P donne accès à l'espérance de cette variable, en effet :

$$E_y(N_y^x) = \frac{m(x)}{m(y)}$$

soit,

$$\lim_{n \rightarrow +\infty} \frac{\frac{1}{n} \sum_{k=0}^n 1_{\{X_k=x\}}}{\frac{1}{n} \sum_{k=0}^n 1_{\{X_k=y\}}} = \frac{m(x)}{m(y)}$$

2.3.2. Cas des processus de saut à espace d'états dénombrable

Le retour sur les chaînes de Markov est justifié par la grande analogie qui existe entre le comportement d'un processus de saut et celui de la chaîne définie par sa matrice de transition. Un processus de saut n'est jamais qu'une chaîne dont on a randomisé les instants de saut. Deux difficultés peuvent cependant surgir. Un état peut être absorbant pour le processus $[X(t)]_{t \geq 0}$ sans l'être pour la chaîne sous-jacente si $\lambda(x) = 0$ et $P(x,x) = 0$. Un processus peut être explosif, si bien qu'il saute une infinité de fois dans un temps fini. En écartant ces deux cas un peu délicats, la similarité des comportements des deux processus est forte. C'est ce qu'énonce les théorèmes suivants (41).

Soit $[X(t)]_{t \geq 0}$ un processus de saut markovien à valeurs dans (E, \mathcal{E}) d'intensité λ , de matrice de transition P et de probabilité de transition P_t .

Théorème :

Si $\lambda > 0$ et si la chaîne (X_n) définie par la matrice de transition P est récurrente irréductible de mesure invariante m , alors il existe une mesure positive σ -finie unique à une constante multiplicative près, μ invariante par le semi-groupe P_t :

$$\forall t \geq 0, \mu P_t = \mu$$

De plus, μ vérifie :

$$\forall x \in E, \mu(x) = \frac{m(x)}{\lambda(x)}$$

Quand la chaîne (X_n) est récurrente positive, alors il existe, comme pour les chaînes, un théorème de convergence :

Proposition :

Sous les hypothèses du théorème précédent, si λ est bornée, si la matrice P est celle d'une chaîne récurrente irréductible positive apériodique, alors il existe une unique probabilité μ invariante par le semi-groupe P_t et μ vérifie :

$$\forall x, y \in E, \lim_{t \uparrow +\infty} P_t(x, y) = \mu(y)$$

Ceci signifie que, indépendamment de la loi initiale, la loi du processus tend asymptotiquement vers l'unique probabilité invariante. Le processus est dit ergodique. En particulier tout processus à espace d'état fini dont l'intensité est bornée est ergodique.

3. Construction du processus chimique

3.1. Hypothèses et choix du modèle

3.1.1. Un petit système chimique comme processus de saut markovien

Trois hypothèses fondamentales sont formulées :

- Le caractère markovien de la dynamique. C'est souvent une hypothèse de base en physique et en chimie. Ou, plus exactement, c'est la version stochastique de la dynamique qui veut que le mouvement d'un mobile soit entièrement déterminé par la connaissance de sa position à un instant donné et de sa vitesse. C'est aussi la version stochastique d'un mouvement d'un mobile sans inertie.
- L'homogénéité dans le temps du processus : cette hypothèse est sensiblement plus restrictive que la précédente. Elle suppose que le processus ne "vieillit" pas ; d'une certaine manière elle le coupe de toute histoire, de toute capacité d'apprentissage. Elle interdit tout aléa temporel portant sur les probabilités des réactions. Dans les systèmes biologiques simples, il semble que l'hypothèse d'homogénéité temporelle puisse largement être vérifiée par le contrôle du milieu physique dans lequel évolue le système. Sa parfaite stabilité assure, semble-t-il assez bien, une réactivité constante dans le temps aux molécules composant le système. Il sera aussi vu ultérieurement que l'homogénéité d'un système peut être obtenue par un choix adapté de variables.
- Le caractère sauteur du processus : c'est bien évidemment l'hypothèse la plus discutable. Elle l'est même tellement que sa discussion devra être approfondie. Pour le moment, elle peut être considérée comme avant tout technique et au moins non absurde dans les cas les plus simples. Sa signification physique est claire. Elle suppose que le temps d'une réaction est négligeable devant le temps d'attente entre deux réactions. Pour un système chimique ordinaire dans lequel les réactifs sont agités par un mouvement brownien qui occasionne des chocs dont une fraction déclenche un mécanisme très rapide conduisant aux produits de la réaction, l'hypothèse semble raisonnable tant que le nombre de molécules reste petit.

Moyennant ces trois hypothèses, le système chimique se trouve représenté par un processus de saut markovien homogène dont il convient de préciser les caractéristiques locales en fonction des paramètres connus de la cinétique chimique déterministe.

3.1.2. Validation intuitive du modèle

Par mesure de prudence, il convient de vérifier que le modèle choisi n'est pas en contradiction flagrante avec l'idée que l'on se fait d'un petit système chimique. Pour cela, quelques uns des principaux résultats sur les processus de saut sont examinés tour à tour et leur cohérence avec la chimie rapidement vérifiée.

La chaîne sous-jacente (X_n) est markovienne homogène.

$P(X_{n+1}=y/X_n=x, X_{n-1}=z, \dots) = P(X_{n+1}=y/X_n=x)$. La $n+1$ -ème réaction ne dépend que du $n^{\text{ième}}$ état, pas de l'histoire antérieure. C'est très généralement vérifié et admis ; d'autre part $P(X_{n+1}=y/X_n=x) = P(X_1=y/X_0=x) = P(x, y)$: la réactivité des molécules ne dépend pas du nombre de réactions ayant déjà eu lieu.

L'indépendance de τ_1 , instant de la première réaction, et de $X(\tau_1)=X_1$ est moins intuitif car le chimiste n'a pas vraiment l'habitude de discrétiser les temps de réaction. Cependant, en considérant le système molécule par molécule, s'il n'y en a pas trop, cela est possible ; il est raisonnable de penser que cela traduit le fait que la molécule erre en attendant la rencontre d'un partenaire et que le partenaire qu'elle va rencontrer est indépendant des errances qui ont permis la rencontre. Ce n'est pas immédiat, mais certainement pas contradictoire avec notre connaissance des systèmes réactionnels.

Enfin, le temps d'attente de la $n^{\text{ième}}$ réaction ne dépend que de l'état où se trouve le système et donc est indépendant du temps d'attente de la $n-1$ -ème réaction. La difficulté est du même type que pour la remarque précédente. Ce n'est ni immédiat, ni absurde *a priori*.

3.2. Calcul des caractéristiques locales

3.2.1. Calcul de la matrice de transition

Cas 1 : $\lambda(x) = 0$

alors, comme pour tout processus de saut

$$P(x,y) = \delta_{xy},$$

x est un état absorbant pour le processus de saut comme pour la chaîne.

Cas 2 : $\lambda(x) \neq 0$

Cas 2.1. Il n'y a pas dans l'ensemble des réactions deux réactions ayant les mêmes vecteurs stœchiométriques.

$$\rho \neq \rho' \Rightarrow \gamma^\rho \neq \gamma^{\rho'}$$

Alors :

$$P(x, y) = P(\{X_{n+1}=y\} / \{X_n=x\})$$

Si $\forall \rho \in \{1, \dots, r\}$, $\gamma^\rho \neq y-x$ alors $P(x, y) = 0$

sinon $\exists! \rho \in \{1, \dots, r\}$ tel que

$$\begin{aligned} P(x, y) &= P(\{R_{n+1}=R^\rho\} / \{X_n=x\}) \\ &= P_x(\{X(\tau_1)=y\}) \\ &= \int dP_x(\{X(\tau_1)=y\} \cap \{\tau_1=\tau\}) \\ &= \int P(\{X(\tau_1)=y\} / \{\tau_1=\tau, X(0)=x\}) dP_x(\tau_1=\tau) \\ &= \int P(\{X(\tau)=y\} / \{X(t)=x \neq X(\tau), \forall t \in [0, \tau[\}) dP_x(\tau_1=\tau) \\ &= \int P(\{A_\tau^\rho = 1\} / \{X(t)=x \neq X(\tau), \forall t \in [0, \tau[\}) dP_x(\tau_1=\tau) , \end{aligned}$$

expression dans laquelle $A_\tau^\rho(\omega)$ est une variable discrète à valeur dans $\{0, 1\}$; c'est la fonction indicatrice de l'apparition de la réaction ρ à l'instant τ .

$$A_\tau^\rho = 1_{\{X(\tau) - \lim_{t \uparrow \tau} X(t) = \gamma^\rho\}}$$

Le caractère markovien du processus justifie l'égalité suivante :

$$P(X_{\tau_1}=y) = \int P(\{A_\tau^\rho = 1\} / \{\lim_{t \uparrow \tau} X(t) = x \neq X(\tau)\}) dP_x(\tau_1=\tau)$$

Notation : $t \uparrow \tau \Leftrightarrow \{t \rightarrow \tau\} \cap \{t < \tau\}$

Le processus étant homogène en τ :

$$P(X_{\tau_1}=y) = P(\{A_\tau^\rho = 1\} / \{\lim_{t \uparrow \tau} X(t) = x \neq X(\tau)\}) dP_x(\tau_1=\tau)$$

Le premier facteur ne dépend que de x et de ρ et l'intégrale vaut 1, ce qui implique que :

$$P(x, y) = P(\{A_\tau^\rho = 1\} / \{\lim_{t \uparrow \tau} X(t) = x \neq X(\tau)\}) \equiv b^\rho(x)$$

Cas 2.2. : cas général :

Les vecteurs stœchiométriques ne sont pas nécessairement uniques. L'égalité $P(x, y) = b^\rho(x)$ n'est donc pas nécessairement vérifiée dans tous les systèmes. Il peut y avoir plusieurs réactions qui conduisent de x à y , par exemple si une réaction peut se dérouler en présence ou en l'absence de catalyseur. C'est le

cas des réactions 3 et 18 du processus 4. La relation entre la matrice de transition et les b^p est donc un peu moins simple :

Si l'on définit Γ_{xy} , le sous-ensemble des réactions qui conduisent de x à y :

$$\Gamma_{xy} \subseteq \{R^p / p = 1, \dots, r\}$$

$$\Gamma_{xy} = \{R^p / y-x = \gamma^p\}$$

$$P(x, y) = P\left(\bigcup_{\rho \in \{p/R^p \in \Gamma_{xy}\}} \{A_\tau^\rho = 1\} / \left\{ \lim_{t \uparrow \tau} X(t) = x \neq X(\tau) \right\} \right)$$

Or ces événements sont disjoints. C'est une hypothèse implicite dans la formulation même de la matrice de transition. Lorsque l'on écrit $P(X_{n+1}=y/X_n=x)$, l'indexation des états successifs suppose que deux sauts ne peuvent pas être simultanés. Cette hypothèse ne doit pas être confondue le fait que la probabilité d'avoir deux sauts dans un intervalle de longueur h est un $o(h)$. La disjonction permet d'écrire :

$$P(x, y) = \sum_{\rho \in \{p/R^p \in \Gamma_{xy}\}} b^p(x)$$

Remarque 1 :

τ_1 , instant d'apparition de la 1^{ère} réaction est une variable continue et donc :

$\forall t, P_x(\tau_1=t) = 0$. Au contraire, si $A_t = \sum_{\rho=1}^r A_t^\rho$, A_t est une variable discrète à

valeurs dans $\{0, 1\}$ si bien que :

$$\forall t, P_x(A_t=0) + P_x(A_t=1) = 1$$

Les réactions étant supposées arriver à un ensemble dénombrable d'instants, celui-ci est de mesure de Lebesgue λ nulle si bien que pour λ presque tout t , $A_t=0$.

Ceci se généralise d'ailleurs à l'intervalle en posant :

$$A_{[0, \tau]} = 1 \left\{ \exists t \in [0, \tau] : A_t = 1 \right\} ;$$

il apparaît que :

$$\forall t, P_x(A_{[0, t]}=0) + P_x(A_{[0, t]}=1) = 1$$

Mais ces τ_1 et $A_{[0, t]}$ ne sont cependant pas sans lien, puisque :

$$\forall t, P_x(A_{[0, t]}=0) = P_x(\tau_1 > t) = 1 - F_x(t)$$

on a de même :

$$\forall t, P_x(A_{[0, t]}^\rho=0) = P_x(\tau_1^\rho > t) = 1 - F_x^\rho(t) ,$$

en notant τ_1^ρ l'instant d'apparition de la première réaction ρ et $F_x^\rho(t)$, la fonction de répartition de cette variable conditionnellement à $X(0)=x$.

Remarque 2 :

Il est prudent de vérifier que la matrice de transition telle qu'elle vient d'être construite est bien stochastique.

Pour x donné, les Γ_{xy} sont deux à deux disjoints et leur réunion est incluse au sens large dans l'ensemble total des réactions.

$$y \neq z \Rightarrow \Gamma_{xy} \cap \Gamma_{xz} = \emptyset; \quad \bigcup_{y \in E \setminus \{x\}} \Gamma_{xy} \subseteq \{R^p / p=1, \dots, r\}$$

En effet, x peut être tel que certaines réactions ne soient pas définies à partir de x :

$$x + \gamma^p \notin E,$$

mais alors : $b^p(x) = 0$

L'égalité suivante apparaît donc exacte :

$$\begin{aligned} \sum_{y \in E} P(x, y) &= \sum_{y \neq x} \sum_{\rho \in \{R^p \in \Gamma_{xy}\}} P(x, y) + P(x, x) \\ \sum_{y \in E} P(x, y) &= \sum_{y \neq x} P(x, y) + P(x, x) = \sum_{\rho \in \{1, \dots, r\}} b^p(x) + P(x, x) = 1 \end{aligned}$$

or $P(x, x) = 1$, si x est absorbant, et 0 sinon, d'où $\sum_p b^p(x) = 1$ pour tout x non absorbant et 0 sinon. Ce qui est finalement assez logique.

3.2.2. Calcul de l'intensité du processus

$$P_x(\{\tau_1^p \in [0, dt[)\}) = P_x(\{\tau_1 \in [0, dt[) \cap \{X_{\tau_1} = y\}) + P_x(\{\tau_1 \in [0, \tau_1^p[) \cap \{\tau_1^p \in [0, dt[)\})$$

En vertu de la proposition 1 du paragraphe 2.2.2.2. et de l'indépendance de $X(\tau_1)$ et de τ_1 , il est possible d'écrire :

$$P_x(\{\tau_1^p \in [0, dt[)\}) = P_x(\{\tau_1 \in [0, dt[)\}) \cdot b^p(x) + o(dt)$$

Un développement de Taylor à l'ordre 1 de cette égalité implique :

$$P_x(\{\tau_1^p \in [0, dt[)\}) = b^p(x) \cdot \lambda(x) \cdot dt + o(dt)$$

car :

$$P_x(\{\tau_1 \in [0, \tau_1^p[) \cap \{\tau_1^p \in [0, dt[)\}) \leq P_x(\{\tau_2 \in [0, dt[)\}) = o(dt)$$

En convenant que :

$$\lambda^p(x) \equiv \lambda(x) \cdot b^p(x),$$

on obtient :

$$P_x(\{\tau_1^p \in [0, dt[)\}) = \lambda^p(x) \cdot dt + o(dt)$$

Si bien que λ^p apparaît comme l'"intensité marginale" de la réaction R^p . Cette expression est une image, cette notion n'étant pas d'usage courant.

En sommant sur p on obtient :

$$\sum_p \lambda^p(x) = \lambda(x)$$

Il est temps alors de se pencher sur le sens de λ^p . C'est une grandeur cinétique. Les λ^p sont les "observations" sur lesquelles il est possible de construire le processus. Dans le cas d'un système ne comportant qu'une unique réaction, λ^p est l'intensité du processus. λ^p est la vitesse stochastique de la réaction R^p . Si l'on se souvient que $1/\lambda$ est l'espérance du temps d'attente du premier saut dans le cas d'une réaction chimique, ce résultat permet de donner une unité à $1/\lambda$: c'est un nombre de seconde par réaction, si bien que λ s'exprime en réaction par seconde.

Or une vitesse de réaction, et cela est universel dans tous les modèles de cinétique chimique, est proportionnel au nombre de combinaisons de molécules réactives présentes dans le système et à une constante cinétique qui indique la réactivité des combinaisons de molécules (42). Ainsi :

$$\lambda^p(x) = h^p(x) \cdot c^p$$

avec :

$$h^p(x) = \prod_{i=1}^M \binom{x_i}{v_i^p} \quad \binom{n}{p} = \frac{n!}{(n-p)!p!} \text{ si } 0 \leq p \leq n \text{ et } \binom{n}{p} = 0 \text{ sinon.}$$

Quant à c^p , de manière la plus générale, c'est une constante fonction des paramètres du milieu physique Φ dans lequel évolue le système. Comme Gillespie l'a montré, c^p étant l'analogie de son c_μ (23) :

$$c^p(V) = k^p \cdot V^{-(l^p-1)}$$

expression dans laquelle k^p est la constante cinétique déterministe et l^p , l'ordre de la réaction R^p .

3.2.3. Résumé

La démarche suivie peut être résumée afin de bien la mettre en évidence. Moyennant trois hypothèses fondamentales relatives à la dépendance des réactions par rapport au passé, à la stabilité temporelle des réactivités et la durée des réactions, il a été envisagé de traiter un petit système chimique comme un processus de saut markovien $X(t)$ dont les caractéristiques devaient alors être calculées. Pour cela, les deux caractéristiques locales du processus ont été en quelque sorte démontées jusqu'à ce qu'apparaissent une donnée "observable" λ^p , qui est une vitesse de réaction. C'est une grandeur locale qui peut faire l'objet d'une étude hors du contexte global du processus

composé de nombreuses réactions. En particulier, une équivalence avec la vitesse de réaction d'un modèle déterministe peut être établie. Comme toute vitesse de réaction, elle se décompose en un produit de deux termes dont l'un indique le nombre de combinaisons de réactifs présentes dans le système et le second est une constante qui exprime la réactivité des molécules.

La détermination des caractéristiques du processus à partir des vitesses des réactions qui le composent se fait au moyen de quelques relations très simples :

$$\lambda = \sum_{\rho} \lambda^{\rho} = \sum_{\rho} h^{\rho} c^{\rho}$$

$$\text{si } \lambda(x) = 0 : P(x, y) = \delta_{x, y}$$

$$\text{si } \lambda(x) \neq 0 :$$

$$P(x, y) = \frac{\sum_{\rho \in \{\rho/R^{\rho} \in \Gamma_{xy}\}} \lambda^{\rho}(x)}{\lambda(x)}$$

Il se trouve donc que la seule connaissance des conditions initiales du système est nécessaire pour finir d'établir la loi de son évolution dans le temps. Il est à noter que les conditions initiales sont introduites dans ce type de modèle sous la forme d'une distribution, d'une loi de probabilité qui permet d'exprimer toute forme de connaissance de ces conditions initiales. Entre une distribution uniforme sur tout l'espace d'état et une masse de Dirac concentrée en un point unique, tous les intermédiaires sont possibles.

4. Signification chimique de quelques résultats mathématiques

Introduction

Ce deuxième chapitre a une tonalité assez originale par rapport à la manière assez pragmatique dont l'approche stochastique de la modélisation de la réaction chimique est conduite habituellement. L'objectif des chimistes qui se sont penchés sur cette question résidait dans la résolution analytique des principales équations qui décrivent le comportement des processus. L'étude des processus n'est pas sans poser des problèmes de calculabilité. L'équation maîtresse ou les équations de Kolmogorov sont généralement insolubles. Seules sont accessibles les solutions stationnaires et encore, dans les cas les plus simples. L'accent est donc mis sur les techniques d'approximation. L'exemple le plus frappant est l'approximation d'un processus de saut par un processus de diffusion régi par une équation aux dérivées partielles, l'équation de Fokker-Planck, plus facile à traiter.

L'option calcul avait été adoptée depuis suffisamment longtemps pour ne pas permettre d'espérer une avancée très significative. Les trois premiers paragraphes de ce deuxième chapitre ont visé à porter la réflexion sur un autre terrain que celui qui avait déjà été exploré. Tout a été mis en œuvre pour transformer en un problème mathématiquement bien posé, la question biologique de l'évolution temporelle des populations de macromolécules décrites par la biologie moléculaire. Cette méthode est l'unique moyen d'élargir le débat, c'est même son seul objectif. Quels peuvent être les enjeux d'une généralisation de ce type ?

- unifier les différents travaux qui ont trait à des questions proches de celle étudiée. Comment se débarrasser des formalismes d'auteurs si ce n'est en les rassemblant au sein du plus général des formalismes ? Ce travail d'unification est aussi le moyen d'un regard critique sur ces travaux qui deviennent comparables puisqu'exprimés dans le même langage.

- pouvoir bénéficier, dans des cas concrets, de résultats généraux dont la portée dépasse très nettement la perspective biologique dans laquelle telle ou telle question a pu être formulée. L'expérience des chimistes en matière de modélisation stochastique montre clairement qu'il est difficile de résoudre chaque système particulièrement. Procéder en sens inverse, examiner le sens biologique de résultats généraux, peut apporter un complément d'information précieux.

••• bénéficier des méthodes de travail des mathématiciens. Il n'est pas dit que tout problème chimique formulé par les biologistes ait aujourd'hui sa solution mathématique. Il est même vraisemblable que bon nombre d'entre ceux qui sont déjà d'actualité, soit sans solution. Cette constatation n'hypothèque en rien l'effort initié dans ce travail. Il est normal que des questions complexes, et personne ne conteste la complexité des questions biologiques, soient un temps sans réponse. Cependant, il semble que la science n'ait jusqu'à présent guère d'autres moyens de faire face à la complexité qu'en usant de l'abstraction mathématique.

Le point • suppose un travail assez considérable du fait de la masse de littérature à traduire, tout à fait hors de portée dans le présent travail. Il est toutefois illustré par la discussion des hypothèses de la chimie stochastique conduite dans le paragraphe 1 de ce chapitre. C'est l'avenir qui dira si le point ••• est pertinent mais la vraisemblance qu'il ne le soit pas reste très faible. Le point •• semble donc le plus susceptible de mettre en évidence l'intérêt à moyen terme de la démarche poursuivie. L'objectif étant de permettre l'ouverture que constitue ce deuxième point, celui-ci est par nature le prolongement de ce travail. Seules quelques lignes directrices sont indiquées. Elles permettront d'assurer la transition entre ce premier travail de définition et de construction de modèles et un travail éventuel qui lui ferait suite. Elles se veulent donc autant d'invitations au voyage.

4.1. Description statique

4.1.1. Une simplification des fondements

Assez curieusement, le souci d'une formulation mathématique correcte du modèle simplifie considérablement ses fondements. Le nombre d'hypothèses s'est sensiblement réduit et surtout, les trois hypothèses qui permettent de traiter un système chimique comme un processus de saut markovien ont un sens physique explicite. L'hypothèse, jadis universelle, d'une probabilité négligeable d'avoir plus d'un saut dans un petit intervalle de temps n'est plus nécessaire. Elle apparaît maintenant comme une conséquence du fait que les événements réactionnels sont supposés instantanés. Si cette hypothèse n'est pas forcément vérifiée, elle a un sens physique qui se prête beaucoup mieux à la discussion (Voir §5).

Il ne faut pas masquer la difficulté qui est liée à la taille de cette matrice. Si elle est d'un emploi commode dans le cas des systèmes ayant un espace d'états réduit, ce n'est absolument pas le cas des systèmes chimiques. Il est important de l'avoir définie, mais elle ne paraît pas pouvoir être directement utilisable.

4.2. Description dynamique

4.2.1. Réversibilité et irréductibilité

La notion algébrique de réversibilité faible telle qu'elle a été définie dans le chapitre 1 ne semble pas sans lien avec la notion probabiliste d'irréductibilité d'une chaîne de Markov. Les trajectoires du processus de saut se développent le long des orbites algébriques qui ont été définies au premier chapitre. Il n'y a pas toutefois d'équivalence entre les orbites algébriques et les orbites du processus stochastique puisque certaines orbites du processus réactionnel peuvent être de probabilité nulle pour le processus chimique. Cependant, dans le cas particulièrement simple dans lequel l'espace d'état $E \subseteq \mathbb{N}^M$ est fini quelques remarques peuvent être formulées. Pour tout $x, y \in E$ si la chaîne est irréductible alors $P_t(x, y) > 0$ d'où il découle qu'il existe une orbite dont x et y soient deux éléments. Si la chaîne est irréductible, on a aussi $P_t(y, x) > 0$ donc il existe une orbite qui, à partir de y permet de rejoindre x . Il doit être possible de construire autour de ces indications une démonstration de l'affirmation : si un processus chimique à espace d'états fini est irréductible, alors le processus réactionnel sous-jacent est faiblement réversible. La contraposée serait probablement assez commode d'usage : si un processus réactionnel n'est pas faiblement réversible alors le processus chimique correspondant n'est pas irréductible. Enfin, cette affirmation doit pouvoir s'étendre lorsque l'espace d'état n'est pas fini.

4.2.2. La synthèse protéique est récurrente

La question abordée ici est assez générale ; c'est celle du comportement de l'équilibre :



qui est l'équation typique de la synthèse et de la dégradation d'une protéine au sein d'une cellule. Est-il possible de trouver des conditions sur les constantes cinétiques qui permettent au processus une croissance infinie ou bien ce processus atteindra-t-il toujours un équilibre ?

Recherche d'une probabilité invariante m par la matrice de transition P :

$$\lambda(x) = \lambda^1(x) + \lambda^2(x) = c^1 + c^2 \cdot x$$

$$P(x, x+1) = \frac{\lambda^1(x)}{\lambda^1(x) + \lambda^2(x)} = \frac{c^1}{c^1 + c^2 \cdot x}$$

$$P(x, x-1) = \frac{\lambda^2(x)}{\lambda^1(x) + \lambda^2(x)} = \frac{c^2 \cdot x}{c^1 + c^2 \cdot x}$$

Le processus ainsi défini est manifestement un processus de naissance et de mort. Le calcul de sa probabilité invariante est un calcul classique.

La chaîne de Markov du processus chimique est irréductible puisque :

$$\forall x, \forall m > 0 \quad P(X_{n+m} = x+m / X_n = x) \geq \sum_{i=1}^{m-1} P(X_{n+m-i} = x+m-i / X_{n+m-(i+1)} = x+m-(i+1)) > 0$$

Par ailleurs, toute probabilité invariante m vérifie $mP = m$

il suffit pour cela que :

$$\forall x, y \in E : m(x) \cdot P(x, y) = m(y) \cdot P(y, x)$$

Telle que P est définie dans le cas présent, cette égalité devient, pour chacun des x :

$$\forall x \in E : m(x) \cdot P(x, x+1) = m(x+1) \cdot P(x+1, x)$$

d'où il vient, pour tout $x > 0$:

$$m(x) = m(0) \cdot \frac{P(0,1) \dots P(x-1,x)}{P(1,0) \dots P(x,x-1)}$$

$$m(x) = m(0) \cdot \frac{(c^1)^x \cdot \prod_{i=1}^x \lambda(i)}{\prod_{i=0}^{x-1} \lambda(i) \prod_{i=1}^x i \cdot c^2}$$

$$m(x) = m(0) \cdot \frac{(c^1)^x}{x!} \cdot \frac{c^{1+x} \cdot c^2}{c^1}$$

si $c^1 / c^2 = \rho$, nous avons pour tout $x > 0$:

$$m(x) = m(0) \cdot \left[\frac{(\rho)^x}{x!} + \frac{(\rho)^{x-1}}{(x-1)!} \right]$$

$m(x)$ apparaît donc définie à $m(0)$ près. Comme :

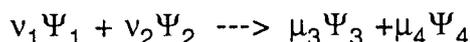
$$m(E) = \sum_{x \in E} m(x) = m(0) + m(0) \cdot \left[\sum_{x=1}^{+\infty} \frac{(\rho)^x}{x!} + \sum_{x=1}^{+\infty} \frac{(\rho)^{x-1}}{(x-1)!} \right]$$

si m existe alors $m(E) = 1$ si bien que :

$$m(E) = \sum_{x=0}^{+\infty} m(x) = 2 \cdot m(0) \cdot e^{\rho} = 1$$

4.1.2. Notion d'intensité comme vitesse de réaction stochastique

Il semble que ce soit la première fois que la notion d'intensité soit appliquée à la modélisation de la réaction chimique. Il est d'ailleurs surprenant, après coup, que les nombreux travaux de chimie stochastique n'aient pas fait quelque tentative de définition d'une grandeur cinétique adaptée à ces modèles. L'intensité qui a été calculée dans le paragraphe précédent ne pouvait mieux correspondre à la définition déterministe de la vitesse de réaction (42). Il convient de rappeler que la vitesse de réaction $v(t)$ de la réaction :



est définie par :

$$v(t) = -\frac{1}{v_1} \frac{\partial c_{\Psi_1}}{\partial t} = -\frac{1}{v_2} \frac{\partial c_{\Psi_2}}{\partial t} = +\frac{1}{\mu_3} \frac{\partial c_{\Psi_3}}{\partial t} = +\frac{1}{\mu_4} \frac{\partial c_{\Psi_4}}{\partial t}$$

dans cette expression les c_{Ψ_i} désignent les concentrations des espèces Ψ_i

En quoi diffèrent-elles ? Le volume intervient dans c^p , car le modèle stochastique traite des nombres de molécules alors que les modèles déterministes portent sur les concentrations. Quant à la définition combinatoire de h^p , elle résulte de l'approximation $x(x-1) \approx x^2$ si x est grand. Ces deux remarques permettent de retrouver sans difficulté la loi d'action de masse dans l'expression de l'intensité λ^p d'une réaction. Enfin, comme il a déjà été signalé, l'espérance du temps d'attente du premier saut :

$$E_x(\tau_1) = \frac{1}{\lambda(x)},$$

montre que l'intensité a la dimension de secondes⁻¹. La vitesse déterministe d'une réaction, $v(t)$, a exactement la même dimension.

Qui plus est, l'intensité du processus constitué de plusieurs réactions traduit une vitesse réactionnelle à l'échelle du processus.

4.1.3. La matrice de transition

C'est elle qui donne l'ensemble des trajectoires possibles avec leur probabilité respective. Il existe un lien très fort entre les équations chimiques telles qu'elles sont écrites habituellement et la structure de la matrice de transition qui intègre en plus les différentes constantes cinétiques des réactions, pour parvenir à quantifier l'importance respective des différentes trajectoires.

si ρ est fini, c'est à dire si $c^2 \neq 0$, si la dégradation est possible alors, $m(0)$ est déterminée. La chaîne définie par la matrice P est alors récurrente positive et, pour toute distribution initiale Π_0 , on a :

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} \Pi_0 P_t = m$$

4.2.3. Fondements de la simulation

Ces résultats théoriques peuvent paraître parfois bien généraux et de peu d'utilité dans une perspective pratique. Cette impression est trompeuse. Ils sont très précieux, car ils peuvent donner à une simulation une portée à laquelle elle n'aurait pas pu prétendre sans soubassement théorique solide. Ainsi, par exemple, dans l'optique d'estimer le comportement asymptotique d'un processus dont il a pu être montré qu'il converge vers une probabilité stationnaire unique, il est inutile de partir de nombreuses conditions initiales, puisque toute condition initiale conduit à la distribution asymptotique. De plus, celle-ci peut être estimée en enregistrant les fréquences de passage dans chacun des états. Etc... La simulation d'un processus ergodique de ce type passe par le suivi d'une trajectoire particulière sur une période longue et non par l'exploration de nombreuses trajectoires sur des échelles de temps plus courtes.

5. Aux limites de l'hypothèse : problèmes ouverts

Il est courant que la modélisation concentre ses efforts à la caractérisation dynamique du modèle de tel ou tel objet (21, 43). C'est parfois regrettable car la discussion de la relation du modèle à son objet est féconde. Elle peut éviter l'emploi hors de son domaine de validité d'un type de modèle, elle peut aussi éclairer d'un jour nouveau l'objet modélisé. L'incapacité du modèle à traduire une part de l'objet modifie la perspective.

Cette discussion ne peut être qu'ébauchée. Elle est signalée comme une frontière à explorer. Il n'est pas satisfaisant de ne pas pouvoir s'attarder plus, mais aucun des problèmes que soulève cette discussion des hypothèses fondatrices du modèle n'est simple. Ici, ils resteront des problèmes ouverts. Certains ont d'ailleurs fait l'objet d'une analyse dans d'autres disciplines qui est alors citée voire résumée rapidement.

5.1. Limite de l'hypothèse de saut

Des trois hypothèses à l'origine du modèle, c'est celle qu'il est le plus facile de remettre en cause. Il y a au moins deux voies pour sortir de son domaine de vraisemblance : en augmentant la taille du système et en introduisant des réactions complexes et lentes de ce fait.

5.1.1. Limite en taille

La représentation du mouvement du processus par des trajectoires constantes, sauf en des instants dénombrables, est une idéalisation qui est permise, si le temps de la réaction τ (l'intervalle de temps nécessaire au déroulement d'un événement réactionnel) est "négligeable" devant le temps d'attente entre deux sauts. Plus précisément, τ peut être considéré comme une constante caractéristique de la réaction. Elle dépend de la rapidité du mécanisme réactionnel. Négligeable a ici un sens physique (très petit devant) qui n'a pas du tout le même sens qu'en mathématique. Il exprime un arrondi, la précision maximale que l'on souhaite atteindre ou qu'il est possible d'atteindre compte-tenu des appareils de mesure. τ est négligeable devant l à 10^{-n} près si $\tau/l \leq 10^{-n}$. Pour que la réaction chimique puisse être représentée par un processus de saut, il est nécessaire que τ , la durée du saut, le temps nécessaire pour changer d'état, soit négligeable devant le temps qui sépare deux changements d'états τ . Le temps qui sépare deux changements d'états est une variable aléatoire qui suit une loi géométrique. Il est possible d'imaginer deux

sens un peu différents l'un de l'autre de la condition : $\tau \ll \tau$.

$$(1) \tau < 10^{-n} \cdot E(\tau)$$

ou bien :

$$(2) P[\tau < 10^{-n} \cdot \tau] > \alpha$$

qui est un certain niveau de confiance

Dans le premier cas on se contente d'une condition qui est vraie en espérance; dans le second on cherche à vérifier la condition avec une probabilité maximale.

Comme l'intensité d'une réaction est le produit de deux termes

$$\lambda^p(x) = h^p(x)c^p$$

Une condition de type (1) ou (2) permet de délimiter un domaine \mathcal{D} de l'espace des phases à l'intérieur duquel elle est vérifiée, et l'équation de sa frontière est du type $h^p(x) = \text{constante}$.

C'est ainsi que :

$$\mathcal{D}_1 = \{x \in E / (1) \text{ est vérifiée}\}$$

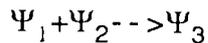
est caractérisé par la propriété d'appartenance :

$$x \in \mathcal{D}_1 \Leftrightarrow \lambda(x) < \frac{10^{-n}}{\tau} \Leftrightarrow h(x) < \frac{10^{-n}}{c}$$

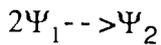
d'où il découle que :

$$\mathcal{D}_1 = \left\{ x \in E / h(x) < \frac{1}{c \cdot 10^n} \right\}$$

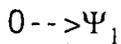
La définition de la fonction h (formulée §3.2.2. de ce chapitre) permet d'exprimer cette inégalité dans le cas de réactions particulières :



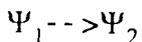
$$\Psi_1 \Psi_2 < \frac{10^{-n}}{c}$$



$$\Psi_1(\Psi_1 - 1)/2 < \frac{10^{-n}}{c}$$



indépendant de l'état du système



$$\Psi_1 < \frac{10^{-n}}{c}$$

$$\mathcal{D}_2 = \{x \in E / (2) \text{ est vérifiée}\}$$

est quant à lui, caractérisé par :

$$P[\tau > \tau \cdot 10^n] = e^{-\lambda(x) \cdot \tau \cdot 10^n} > \alpha$$

Pour que (2) soit vérifiée avec une probabilité supérieure à α , nous devons avoir :

$$-\lambda(x) \cdot \tau \cdot 10^n > \ln(\alpha)$$

c'est à dire :

$$h(x) < \frac{-\ln(\alpha)}{c \cdot \tau \cdot 10^n}$$

d'où :

$$\mathcal{D}_2 = \left\{ x \in E / h(x) < \frac{-\ln(\alpha)}{c \cdot \tau \cdot 10^n} \right\}$$

Remarque :

Bien que les conditions (1) et (2) aient été exprimées de manière très différente l'une de l'autre, il se trouve que \mathcal{D}_1 est identique à \mathcal{D}_2 pour $\alpha = 1/e \approx 0,37$

(2) est beaucoup plus sévère que (1), mais c'est sans doute la condition qui a le le sens le plus physique.

Dans le cas d'un système complexe composé de plusieurs réactions, les intensités étant additives $\lambda(x) = \sum_1^r \lambda^p(x)$, la question du domaine de définition du processus se ramène simplement à celle du domaine de chacune d'entre elles prise séparément, en prenant le plus grand des τ^p comme minorant.

Enfin, il est à noter que le problème de la taille maximale que peut prendre un processus chimique n'est pas sans lien avec les limites de validité de l'hypothèse du caractère discret de l'espace des phases. Lorsque la taille du système augmente, le processus de saut converge, sous certaines conditions vers un processus de diffusion. Cette question est traitée dans (44).

5.1.2. Limite en temps de réaction

C'est la même question considérée sous un autre angle. Etant donné un domaine défini, quelle est la lenteur maximale autorisée pour rester dans les limites de l'hypothèse. Les égalités sont les mêmes mais, au lieu de porter sur un domaine géométrique, elles portent sur τ . Il n'y a d'ailleurs pas besoin de savants calculs, ni même d'aucun calcul, pour constater que bon nombre de réactions constituant les processus du chapitre 1 violent cette hypothèse d'instantanéité des sauts. Le métabolisme de l'ARN que l'on retrouve dans toutes les réactions exprimant une synthèse protéique en est l'exemple le plus flagrant. Alors qu'une extrémité n'est pas encore transcrite, l'autre est déjà dégradée tandis qu'au centre une batterie de ribosomes le traduit. C'est un bel exemple de contradiction avec le théorème qui prétend que deux réactions n'ont lieu simultanément qu'avec une probabilité négligeable. Il serait de ce point de vue intéressant de définir un processus évoluant progressivement d'un état à un autre et d'examiner quelle est la qualité de l'approximation par un processus de saut (le fait qu'un événement réactionnel est 'en cours' ne doit pas empêcher une autre réaction de s'initier et de se développer simultanément. Cette simultanéité possible rend un tel processus particulièrement complexe).

5.1.3. Limite en déterminisme

Le mécanisme des réactions chimiques les plus simples peut être considéré comme une étape unique pour laquelle aucun intermédiaire réactionnel ne peut être mis en évidence. Il n'en est rien des mécanismes impliquant les macromolécules biologiques. Un exemple suffit pour illustrer ce point de manière fracassante. Aussi bien dans les modèles de l'opéron lactose que dans ceux du phage λ , des réactions ont été écrites qui symbolisent des synthèses protéiques. Or il y a au moins deux étapes qui sont la transcription et la traduction. Chacune de ces étapes peut à son tour être décomposée en réactions plus simples etc... Dans la mesure où une option stochastique a été prise à un niveau supérieur, il n'y a aucune raison de ne pas la prendre ici. La durée d'une réaction τ apparaît donc comme une donnée éminemment aléatoire. Comment y faire face, comment la traiter, comment la simplifier ? Autant de questions qui n'ont rien de facultatif. Dans certaines conditions elles doivent pouvoir se ramener au problème de l'élimination des variables rapides (Cf. § 5.2.1.).

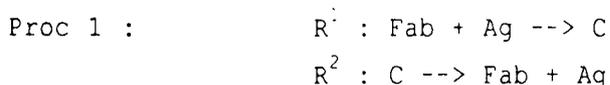
5.2. Les questions d'ordres de grandeurs

5.2.1. Les mécanismes rapides

Dans une même cellule, dans un même phénomène, des réactions rapides et des réactions lentes se côtoient. Les réactions rapides posent la question de leur éventuelle simplification. Elles atteignent très vite leur régime stationnaire, si bien qu'une remise en cause du traitement de leur transitoire est naturelle. Là encore, l'élimination des variables rapides n'est pas une question toujours très simple, bien qu'elle ait été résolue formellement (45, 46).

5.2.2. Les événements presque-certains

La question soulevée ici est celle des probabilités proches de 1 ou de 0. Un exemple pour fixer les idées : celui de la liaison antigène anticorps.



On a très généralement $c^1 \gg c^2$. La quantité d'antigène à fixer est supposée faible devant la quantité d'anticorps. Dans une très grande partie de l'ensemble d'états dans laquelle il reste de l'antigène libre, $\lambda^1(x) \gg \lambda^2(x)$ et, par là même, $b^1(x) \approx 1$ et $b^2(x) \approx 0$. Comment l'état stationnaire doit-il être considéré

? Est-ce qu'un anticorps qui a une grande affinité pour sa cible peut parvenir à immobiliser le système ? Une fois toutes les molécules fixées, la probabilité de les voir se séparer de leur ligand est si faible que le fait est inobservable. C'est l'idée que se font du phénomène les biologistes. Et pourtant, telle que ces probabilités sont définies, elles ne seront jamais nulles.

Plus généralement, il est fréquent que dans une région de l'espace d'états un équilibre soit tellement déplacé qu'il apparaisse pratiquement irréversible. Cette notion serait essentielle à préciser dans une forme mathématique propre. Les protocoles qui font appel à un composant "en excès" sont innombrables, l'objectif est toujours de se placer dans des conditions qui déséquilibrent suffisamment un équilibre pour pouvoir le considérer comme irréversible. Le choix par le phage λ de l'une des deux voies de développement est un phénomène de ce type.

Plus généralement, pour qu'une réaction dont la probabilité est quasi-nulle soit négligeable, il faut que le processus chimique vérifie localement certaines propriétés de stabilité. Mais l'analyse de la stabilité des systèmes chimiques modélisés à l'aide des processus de sauts se heurte à de sérieuses difficultés et limitations (60).

5.3. Questions de frontière

5.3.1. Les limites de l'espace des états

Tel que le modèle a été construit, puisque la possibilité de réactions d'ordre 0 a été admise ($\emptyset \rightarrow X$), l'espace d'état est infini par hypothèse. Or une telle hypothèse est peu probable, peu réaliste. Une cellule est finie. Cette contradiction doit être levée ou élucidée. Deux voies sont envisageables à cette fin.

- Arbitraire : l'espace des phases est limité selon chacun de ses axes, il est considéré comme un volume fini. Le processus est assigné à résidence. Le procédé est simple, il suffit de placer des barrières sur chacune des dimensions. Elles pourront être choisies absorbantes ou réfléchissantes. Le choix d'une telle solution n'est guidé que par des motivations techniques. Sa signification biologique demeure assez rustique. Cela correspond au cas où, pour chaque dimension, il est possible de donner un intervalle à l'intérieur duquel se trouve généralement le processus. Il est alors possible de placer des barrières qui permettent de larges fluctuations de part et d'autre des minima et maxima ordinaires. Cependant placer les barrières "trop loin" surdimensionne l'espace. Les placer "trop près" des extrêmes moyens engendre

des effets de bords non négligeables et artéfactuels en interdisant au système toute fluctuation à l'extérieur des barrières. Cette solution apparaît donc n'avoir qu'un intérêt limité si le volume délimité est trop grand, ou être trop contraignante si le volume est restreint.

- Biologique : la procédure proposée ici est une conjecture. Si un système biologique reste de taille raisonnable ce n'est pas à cause d'une de quelconques barrières qui limitent son expansion, mais plutôt en raison de la structure chimique du processus dont l'évolution est cantonnée à une région de l'espace des phases. Il doit donc être possible de trouver une région D de l'espace E telle que la probabilité de sortir de D (i.e. d'aller dans le complémentaire de D sachant que l'on est dans D) soit presque nulle, $P(D^c/D) \approx 0$ D^c étant l'extérieur de D . Il serait bon de parvenir à trouver le domaine minimum vérifiant cette propriété. Ou encore, plus exactement, il doit exister un confineur tel que l'évolution du système soit asymptotiquement contenue dedans avec une probabilité de $1-\varepsilon$. Il doit être possible et probablement considérablement plus simple de le majorer par le "rectangle" défini par l'examen de chaque dimension de l'espace prise séparément. Le processus peut être projeté sur chacun des axes et une valeur maximale trouvée au-delà de laquelle une évolution est peu probable.

Il est à noter que la "frontière" ainsi délimitée aurait le statut de barrière réfléchissante. Le calcul du domaine probable d'évolution du processus pourrait constituer la première étape de la validation du modèle d'un système biologique. Le domaine probable calculé aurait-il une taille raisonnable, compatible avec les connaissances et la description expérimentale qui est faite du système ?

Remarque 1 :

Le rectangle auquel la délimitation du domaine aboutit ici n'est pas le même que dans le cas de la procédure arbitraire. Dans cette seconde méthode, c'est le plus petit rectangle contenant D qui serait obtenu alors que, dans la première, il n'y a rien qui permette d'affirmer que le parallélépipède obtenu correspond à un domaine d'évolution probable pour le système.

Remarque 2 :

Comme au § 5.2.2., la question au centre de ce paragraphe est celle de la possibilité d'une approximation des petites probabilités. Cette approximation n'est envisageable que si les événements de faible probabilité qui sont ignorés dans l'approximation restent sans grandes conséquences sur l'avenir du système. Cette approximation n'est donc possible que si certaines conditions de stabilité sont remplies (Cf. § 5.4.)

5.3.2. Temps moyen de premier passage

Voici encore une question dont l'intérêt pratique est important. Il s'agit de calculer le temps moyen mis par le système pour atteindre pour la première fois une région de l'espace d'état partant d'un état initial donné. Dans un mélange antigène anticorps, il peut être intéressant de calculer le temps moyen de fixation de 90% de la quantité initiale d'antigène libre ; le calcul du temps moyen d'induction de l'opéron lactose relève du même type de question, ou bien encore le temps moyen de doublement du nombre de plasmides dans le modèle de réplication.

Un calcul explicite du temps moyen d'absorption est proposé dans (47) dans le cas d'un processus de naissance et de mort en dimension 1 avec une barrière réfléchissante et une barrière absorbante.

Dans le cas où b est absorbant et a réfléchissant avec $a < b$, $T(x)$ est le temps moyen d'absorption en b partant de x , en notant :

$$\varphi(x) \equiv \prod_{z=a+1}^x \frac{P(z,z-1)}{P(z,z+1)}$$

alors :

$$T(x) = \sum_{y=x}^b \varphi(y) \sum_{z=a}^y \frac{1}{\lambda(z) \cdot P(z,z+1) \cdot \varphi(z)}$$

En dépit d'hypothèses sévères, cette formule est sans doute plus intéressante qu'il n'y paraît. En effet, il est toujours possible de se ramener à un processus encadré d'une barrière réfléchissante et d'une barrière absorbante. La construction rigoureuse d'un tel processus tué est détaillée dans (48). Comme, par ailleurs, les lois marginales des processus chimiques sont assez généralement des processus de naissance et de mort, le temps moyen d'atteinte de zones aux contours simples doit pouvoir assez fréquemment être calculé par cette formule (noter cependant la lourdeur des calculs qu'elle représente dès que le nombre d'états entre a et b est important et la difficulté d'obtention des lois marginales).

5.4. Multistabilité, multimodalité, etc...

Voilà une autre question centrale. Il s'agit des relations entre les états stationnaires des modèles déterministes et la forme des distributions asymptotiques des modèles stochastiques équivalents. Même un simple résumé de cet aspect du sujet nécessiterait des développements qui sortiraient du cadre théorique dans lequel ce travail s'est cantonné jusqu'ici. En effet, ce sujet a essentiellement été abordé à propos des processus de diffusion (Voir (49))

pour une revue détaillée). Dans le cas d'espaces d'états discrets les développements sont plus limités (50).

Un mot toutefois. C'est probablement ce point qui justifie le mieux le traitement stochastique discret des systèmes biochimiques *in vivo*. L'intuition la plus courante et la plus naturelle des relations entre les états d'équilibre d'un système dynamique et les distributions asymptotiques d'un processus stochastique "équivalent" se résume par trois affirmations :

- le nombre de points d'équilibre stables d'un modèle déterministe est le même que le nombre des pics de la distribution stationnaire,
- les points d'équilibre stables coïncident avec les sommets de la distribution stationnaire,
- les états d'équilibre stables sont situés aux maxima de la distribution stationnaire, tandis que les instables se trouvent aux minima.

Ces trois affirmations sont fausses dans le cas des petits systèmes (systèmes à états finis et discrets). Aucune relation simple n'existe *a priori* entre les modèles déterministes et stochastiques. Le modèle déterministe n'indique donc rien sur le comportement d'un petit système. En revanche lorsque la taille du petit système augmente, lorsque le volume augmente et lorsque le nombre de molécules tend vers l'infini et donc que l'espace d'états tend à devenir continu, alors et alors seulement son comportement tendra vers celui du modèle déterministe. (Cela correspond ni plus ni moins au domaine de validité de la notion de concentration.) La notion de confineur (51, 52) permet d'exprimer cela plus simplement. Les confineurs d'un petit système convergent vers les attracteurs du modèle déterministe lorsque la taille du système augmente. Cependant, il n'existe aucune relation simple entre la topologie des confineurs d'un petit système et celle des attracteurs du modèle différentiel. Le modèle déterministe ne constitue qu'une limite en taille d'un modèle stochastique ; ce n'est nullement une limite dans le temps.

Chapitre 3

Des modèles plus complets

"Chaque fois qu'il faisait une citation, il demandait qu'on veuille bien lui pardonner son manque d'originalité. Voilà qui est bien suspect..."
Mambrino

0. Introduction

A trop vouloir formaliser, on prend le risque de s'enfermer dans un véritable carcan, aussi rigide et étroit qu'une idéologie qui, pour mieux imposer sa vérité, nie ou ignore tout ce dont elle ne peut rendre compte. Il est temps de passer à la critique. Elle est d'ailleurs facile. Si le modèle étudié jusqu'ici donne une image assez bonne de systèmes triviaux comme la formation du complexe antigène-anticorps, il est très insuffisant dès qu'il aborde le domaine des systèmes complexes pourvus de régulations. Ainsi en est-il de l'opéron lactose qui ne peut qu'adopter une position d'équilibre pour une concentration en lactose et en glucose donnée. Or, la raison d'être de ce processus est de permettre une dégradation de lactose en glucose. Le modèle étudié devient paradoxal face à cette constatation. Il serait absurde d'intégrer ces deux sucres comme des variables discrètes. Ce ne serait pas plus satisfaisant que de parler de la concentration d'un plasmide. Cette possibilité est donc écartée. Quant à ce cantonnement au paramétrage des probabilités de transition, il limite l'intérêt du modèle à la situation très artificielle où les concentrations en sucre sont maintenues constantes. Dans ce cas l'essentiel est perdu. L'enzyme sera synthétisée ou non selon les conditions. Il faudrait pouvoir rétablir dans le modèle, le dialogue entre le système vivant et son environnement, ce B-A-BA de la biologie, l'aptitude du système vivant à réagir aux variations de son milieu et aussi sa capacité à modifier ce milieu. A plus long terme, il serait bon de pouvoir traiter des populations de systèmes partageant le même milieu, s'échangeant des signaux etc...

Si l'effort entrepris jusqu'ici doit se limiter au domaine dans lequel il se cantonne, s'il est impuissant à s'ouvrir à ces réalités fondamentales de la

biologie, alors il est vain. Ou plus exactement, il aurait été plus juste de l'orienter différemment, de le guider vers la résolution pratique des quelques cas à sa portée et de renoncer à une trop grande généralité. En revanche, s'il se révèle qu'il est possible de traduire dans le même esprit, avec les mêmes mots, ces interactions complexes, alors sans doute cela vaudra-t-il la peine de revenir sur les questions abandonnées en cours de route. La perspective dans laquelle elles s'inséreront alors sera la justification du travail que leur solution suppose.

Les pages qui suivent sont encore une fois assez mathématiques. Il s'agit surtout de présenter et de construire deux types nouveaux de processus stochastiques, les processus de transport avec saut et les processus de transport avec branchement. L'exposé qui en est fait est très fortement inspiré de (56). Un commentaire sur leur possible sens biologique suit leur présentation.

1. Une prise en compte du milieu physique

1.1. Un exemple non biologique : le mouvement du neutron

Le cas trivial est celui d'un processus qui viserait à décrire l'état d'un neutron. Celui-ci se propage en ligne droite avec une vitesse v constante sauf au moment de chocs avec d'autres particules. La vitesse change brutalement en fonction du choc et la représentation habituelle qui est donnée de ce changement est le saut. L'état de ce système est déterminé par la connaissance à tout instant t de deux vecteurs de \mathbf{R}^3 , la position (X_t) qui varie de manière continue en fonction de la vitesse (Y_t) qui, elle, saute en fonction des chocs.

L'évolution du neutron est donc totalement décrite par le processus (X_t, Y_t) à valeur dans $\mathbf{R}^3 \times \mathbf{R}^3$. L'évolution de (X_t) est une fonction déterministe de (Y_t) puisque, connaissant x_0 , la position initiale et la relation f_t qui lie $\frac{dX_t}{dt}$ à X_t alors x_t est totalement déterminé. Or :

$$\frac{dX_t}{dt} = Y_t$$

(Y_t) est un processus de saut de probabilité de transition P_t .

Le problème de la prise en compte du milieu physique dans le cas des systèmes biologiques est une généralisation de ce type de processus. Le milieu subit une évolution déterministe et continue, fonction de l'état macromoléculaire du système. Celui-ci évolue selon un processus de saut

dont les caractéristiques locales sont fonctions de l'état du milieu.

1.2. Notations

X_t : demeure l'état macromoléculaire du système à l'instant t . Macromolécule s'entend ici au sens de variable d'état discrète (protéines en petits nombres, acides nucléiques). X_t était noté $X(t)$ dans le chapitre 2. Cette notation plus légère est adoptée car dans ce nouveau chapitre, il n'y a pas de risque de confusion entre le processus de saut et la chaîne sous-jacente.

$$\forall t \geq 0, X_t \in \mathbf{N}^M$$

Φ_t : état du milieu physique. Milieu s'entend au sens large, ensemble des variables d'état continues. Dans les exemples vus précédemment, se trouvent dans cette catégorie les sucres, l'AMPC, voire même le volume dans lequel évolue le système.

$$\forall t \geq 0, \Phi_t \in \mathbf{R}^F$$

P_t : probabilité de transition du processus $[X_t]_{t \geq 0}$ dont les caractéristiques locales demeurent λ et P

τ_n : instant du $n^{\text{ième}}$ saut.

1.3. Construction du processus de transport avec saut

Sont donnés par hypothèse, une application b de $\mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M \rightarrow \mathbf{R}^F$ qui caractérise la partie déterministe de l'évolution, et un ensemble de réactions entre macromolécules qui détermine un processus $[X_t]_{t \geq 0}$ de caractéristiques λ et P .

1.3.1. Hypothèses de régularité

• H1 : L'application définie par :

$$b : (\phi, x) \in \mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M \rightarrow b(\phi, x) \in \mathbf{R}^F$$

est supposée mesurable, lipschitzienne en ϕ , uniformément en x , i.e. :

$$\exists k \in \mathbf{R}_+; \forall \phi_1, \phi_2, x : \|b(\phi_1, x) - b(\phi_2, x)\| \leq k \cdot \|\phi_1 - \phi_2\|$$

• H2 : L'application λ définie par :

$$\lambda : (\phi, x) \in \mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M \rightarrow \lambda(\phi, x) \in \mathbf{R}_+$$

est une fonction positive, mesurable et bornée.

• H3 : $P(\phi, x ; y)$ avec $\phi \in \mathbf{R}^F ; x, y \in \mathbf{N}^M$ vérifie :

i- pour tout y donné, l'application $(\phi, x) \mapsto P(\phi, x ; y)$ est une application mesurable de $\mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M$ dans $[0, 1]$

ii- pour tout ϕ donné, $P(\phi, x ; y)$ est une matrice stochastique creuse sur la diagonale :

$$\forall (\phi, x) \in \mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M, \sum_{y \in \mathbf{N}^M} P(\phi, x ; y) = 1 ; P(\phi, x ; x) = 0$$

1.3.2. Les éléments de la construction

Il s'agit de construire le processus à deux composantes $((\Phi_t, X_t))$ à valeurs dans $\mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M$ qui satisfait l'équation différentielle :

$$\frac{d\Phi_t}{dt} = b(\Phi_t, X_t)$$

Les éléments de cette construction sont :

• la fonction qui vérifie :

$$\forall (\phi, x) \in \mathbf{R}^F \times \mathbf{N}^M ; \forall t \in \mathbf{R}_+ ; \zeta : t \rightarrow \zeta_t^{\phi, x} \in \mathbf{R}^F$$

$$\frac{d\zeta_t^{\phi, x}}{dt} = b(\zeta_t^{\phi, x}, x) ; \zeta_0^{\phi, x} = \phi$$

Cette fonction, qui est une trajectoire dans \mathbf{R}^F , est continue par définition.

• deux familles de champs aléatoires auxiliaires :

$$a- Z_n(\phi, x) \in \mathbf{N}^M ; n \in \mathbf{N}$$

Cette famille de champs vérifie :

$Z_n(\cdot, \cdot)$ est mesurable par rapport à (ϕ, x, ω) ;

pour tout n , pour tout couple (ϕ, x) , la variable aléatoire $Z_n(\phi, x)$ a pour loi $P(\phi, x ; y)$

$$b- T_n(\phi, x) \in \mathbf{R}_+ ; n \in \mathbf{N}$$

$T_n(\cdot, \cdot)$ est mesurable par rapport à (ϕ, x, ω)

$$\forall n, \forall (\phi, x), \forall t \geq 0 : P[T_n(\phi, x) > t] = \exp \left[- \int_0^t \lambda(\zeta_s^{\phi, x}, x) ds \right]$$

Enfin les éléments de ces deux familles sont supposés indépendants.

1.3.3. Le modèle et sa dynamique

Le processus $Z_n(\phi, x)$ donnent la valeur de X_t au $n^{\text{ième}}$ saut sachant que l'état de $((\Phi_t, X_t))$ précédant le saut est (ϕ, x) ; de même $T_n(\phi, x)$ donnera la durée du

temps entre le $n^{\text{ième}}$ et le $(n+1)^{\text{ième}}$ saut sachant que l'état de $((\Phi_t, X_t))$ en τ_n est (ϕ, x) .

L'évolution du processus partant de (ϕ, x) est celle qui vérifie les égalités :

•

$$\Phi_0 = \phi ; X_0 = x$$

• •

$$t \in [0, \tau_1[, \tau_1 = T_0(\phi, x) : \left(\left(\phi_t = \zeta_t^{\phi, x}, X_t = x \right) \right)$$

• • •

$$t = \tau_1 : \left(\left(\phi_{\tau_1} = \zeta_{\tau_1}^{\phi, x}, X_{\tau_1} = Z_1(\phi_{\tau_1}, x) \right) \right)$$

• ... •

$$t \in [\tau_{n-1}, \tau_n[, \tau_n = \tau_{n-1} + T_{n-1}(\phi_{\tau_{n-1}}, x_{\tau_{n-1}}) : \left(\left(\phi_t = \zeta_t^{\phi_{\tau_{n-1}}, x_{\tau_{n-1}}}, X_t = x_{\tau_{n-1}} \right) \right)$$

• ... •

$$t = \tau_n : \left(\left(\phi_{\tau_n} = \zeta_{\tau_n}^{\phi_{\tau_{n-1}}, x_{\tau_{n-1}}}, X_{\tau_n} = Z_n(\phi_{\tau_n}, x_{\tau_{n-1}}) \right) \right)$$

λ étant bornée, le processus n'est pas explosif :

$$\lim_{n \rightarrow +\infty} \tau_n = +\infty$$

Le processus $((\Phi_t, X_t))$ est un processus de Markov homogène. A nouveau le point essentiel est le fait que les temps d'attente des sauts suivent des lois exponentielles. La loi de ce processus conditionnellement à l'état initial (ϕ, x) est notée $P_{\phi x}$. Pour arriver à cette conclusion, il n'est pas nécessaire de supposer *a priori* que $[X_t]_{t \geq 0}$ est markovien homogène. De plus par construction, ce processus est à trajectoire continues à droite, pourvues de limites à gauche.

1.3.4. Commentaires et significations biologiques

Il est assez clair que le processus $[X_t]_{t \geq 0}$ est le même que celui étudié au chapitre précédent. Ses caractéristiques locales λ et P sont identiques à ϕ constant. Dans le chapitre 2, $[X_t]_{t \geq 0}$ était un processus de saut pur dont la probabilité de transition était "paramétrée" en fonction des conditions physiques dans lesquelles se déroulaient les réactions de X . Dans le nouveau modèle proposé ici, ces paramètres jusqu'ici extérieurs au modèle sont intégrés, si bien qu'à la place de $\lambda(x)$ et $P(x,y)$ il devient possible d'écrire $\lambda(\phi, x)$ et $P(\phi, x ; y)$.

$$\lambda^P(\phi, x) = h^P(x) \cdot c^P(\phi)$$

$$\lambda(\phi, x) = \sum_{p=1}^r \lambda^P(\phi, x)$$

$$P(\phi, x; y) = \frac{\sum_{\rho \in \{\rho/R^p \in \Gamma_{xy}\}} \lambda^\rho(\phi, x)}{\lambda(\phi, x)}$$

Maintenant le milieu Φ_t peut varier, intensité et matrice de transition suivront. Elles sont beaucoup plus souples.

Mais le progrès ne s'arrête pas là ! Les variations de Φ_t peuvent être orientées par des facteurs tout à fait extérieurs au processus biochimique X_t , il serait regrettable de ne pas pouvoir traduire l'action puissante que le processus macromoléculaire peut exercer sur le milieu qui l'environne. Or le modèle qui vient d'être construit permet d'exprimer cette action par le moyen d'une famille de systèmes d'équations différentielles. A chaque état macromoléculaire x , est associé une évolution différente du milieu physique Φ .

Enfin, il paraît difficile de ne pas penser que, jusque dans la forme elle-même, un pas a été franchi. Si réunir dans un modèle des espèces moléculaires de nature aussi différente que des plasmides, des promoteurs, des sucres et des enzymes sous la forme exclusive de variables continues à évolution déterministe ne peut être qu'un pis-aller, séparer les grosses molécules des petites est aussi arbitraire et guère plus enthousiasmant. Le processus de transport avec saut est une voie qui laisse espérer une réunion possible des deux types de démarches. Il permet de séparer ce qui est incomparable et dispense d'assimilations abusives ; il permet aussi de rassembler au sein d'une même dynamique ce qu'il sépare. Les deux composantes du modèle travaillent différemment mais de concert.

1.3.5. Problèmes ouverts

Un outil d'homogénéisation :

Le modèle cinétique de Brendel et Perelson (20) est absolument intraduisible en termes de processus de saut purs. Une des clefs de sa cinétique est l'expansion de la cellule en volume. Le volume augmentant, les concentrations diminuent. Comment intégrer dans le modèle du chapitre 2 des grandeurs du type $c^p[V(t)]$? Cela ne semble guère envisageable sans sortir du cadre un peu étroit de ce modèle. Le modèle stochastique qui traduirait le système d'équations différentielles de Perelson ne serait pas homogène.

En revanche, dans la perspective d'un processus de transport avec saut ce type d'évolution est des plus élémentaires. De plus, ce processus est homogène. Il y a là une curieuse pirouette qui, en intégrant dans le modèle les variations temporelles des probabilités de transition, lui rend son homogé-

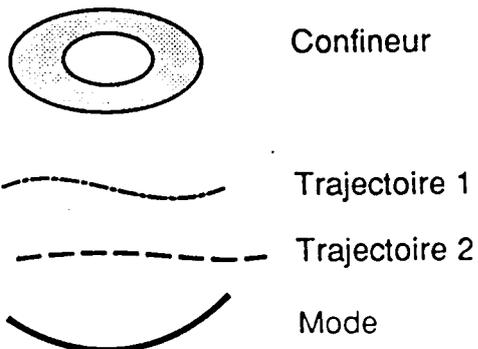
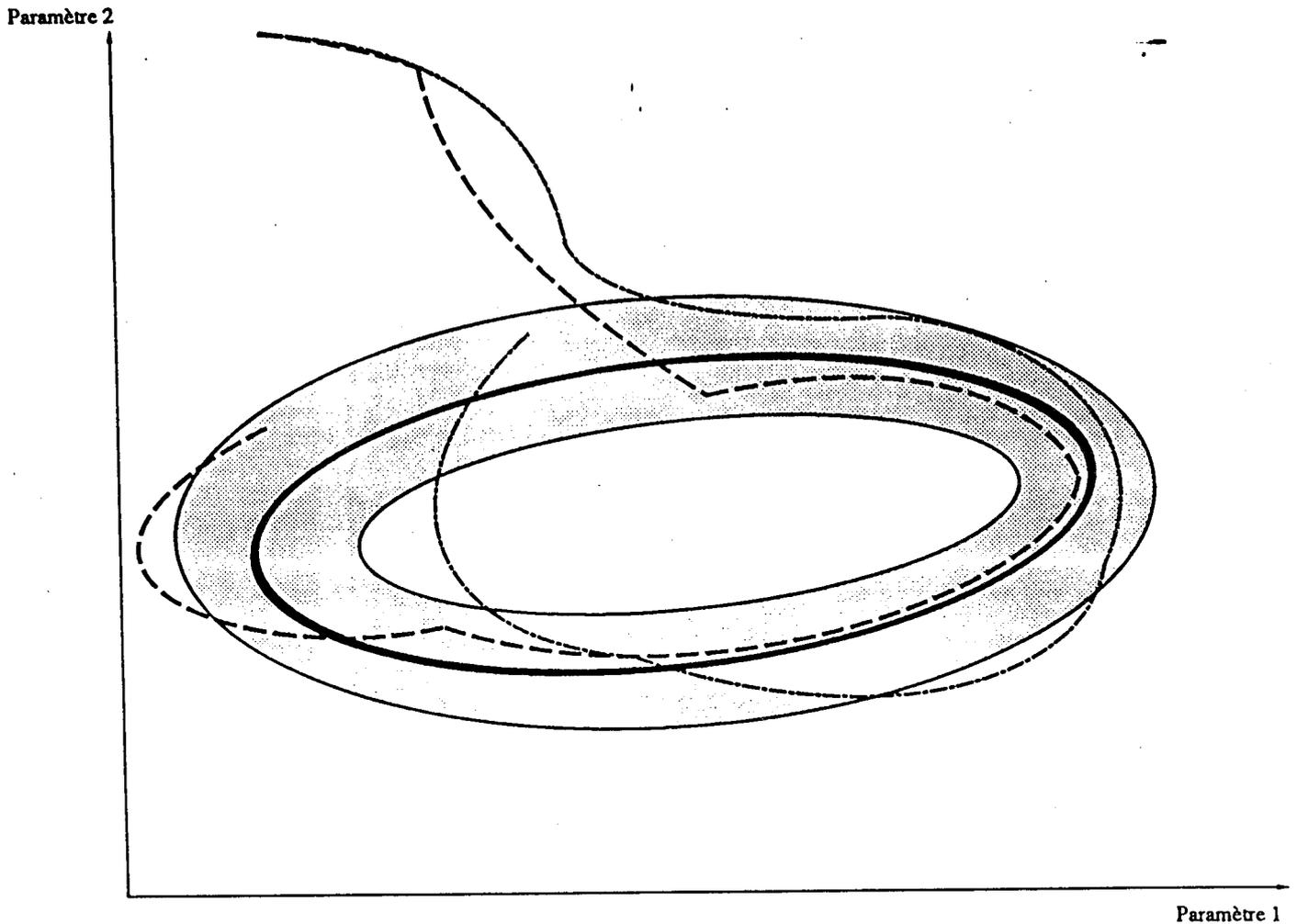


Figure 9 : Projection d'un processus de transport avec saut sur le plan de ses paramètres.

Ce dessin représente la dynamique d'un processus chimique hypothétique qui comporterait deux paramètres continus. Projetées sur le plan de ces paramètres, les trajectoires sont continues mais irrégulières. Chaque irrégularité correspond à un saut. Deux trajectoires issues du même point sont représentées. Elles sont superposées jusqu'au moment du premier saut de l'une d'elles. En gris est figuré un confineur du système et au "centr"e de celui-ci le mode. Cette figure est spéculative, elle n'est issue d'aucun calcul.

néité. Il est à noter que la division instantanée du volume lors de la division cellulaire n'entre cependant pas dans le cadre dans lequel le modèle est bâti.

Réduction de la complexité :

Dans le cas de l'opéron lactose, il est probable que la projection du processus sur le plan des paramètres du milieu (lactose, glucose) soit suffisante à rendre compte des traits essentiels du comportement du système. Les orbites du processus projetées sur ce plan sont continues avec des irrégularités marquant les sauts du processus $[X_t]_{t \geq 0}$. La figure 9 est une esquisse de ce à quoi pourrait ressembler le portrait de phase. L'intérêt d'une telle représentation réside d'une part dans sa continuité plus facile à appréhender qu'un nuage de points discrets et d'autre part dans la dimension réduite qui justement, permet une représentation graphique et mentale.

2. Vers le traitement stochastique de populations cellulaires

2.1. Nature de la question

Quels sont les phénomènes dont le modèle d'un transport avec saut ne peut pas rendre compte ? Certains phénomènes multicellulaires bien sûr. Deux types de phénomènes multicellulaires peuvent être distingués selon que les cellules sont indépendantes ou non au sens probabiliste du mot. Le traitement d'une population de cellules indépendantes est assez simple du fait de la loi forte des grands nombres et autres résultats du même genre. Il est possible de construire un processus moyen avec une estimation de l'erreur. Il est même possible de traiter des systèmes ayant plusieurs types cellulaires dont la proportion reste constante dans le temps. Il convient à cette fin de construire un processus ayant autant de classes irréductibles que de types cellulaires et d'introduire la proportion de chacun au niveau de la distribution initiale. (Noter cependant que l'indépendance de cellules partageant le même milieu n'est peut-être pas tout à fait aussi simple qu'il n'y paraît de prime abord. Il y a ici toutes sortes de confusions possibles selon le processus considéré. Un point qui mériterait sans doute que l'on s'y arrête, est la question de savoir si le sens de la dépendance de cellules qui n'agissent entre elles que par l'intermédiaire d'un signal relâché par l'une d'elles dans le milieu partagé par toutes, et celui de cellules qui agissent l'une sur l'autre par un contact physique -neurones, cellules immunitaires- est identique ou pas.)

Les choses se compliquent sensiblement si l'indépendance n'est plus vérifiée ou si le nombre des cellules varie. Envisager ce type de situations est franchir un grand pas vers une plus grande complexité. Tout le monde s'accorde à penser qu'il s'agit de la situation biologique naturelle la plus courante, en tout cas la plus intéressante. Néanmoins, entre cette vision des grands systèmes biologiques et la maîtrise expérimentale actuelle, il y a une distance immense. Le système endocrine ou le système immunitaire sont les exemples les plus typiques de populations de tailles variables de cellules non indépendantes qui fonctionnent au sein d'un processus unique. Mais, au-delà de ces considérations générales, voici des exemples pratiques susceptibles de vérifier ces conditions :

- l'induction de l'opéron lactose et le métabolisme du sucre dans un milieu fini par une population bactérienne en croissance. Les cellules sont indépendantes et identiques mais l'évolution du milieu dépend de la taille de la population.
- l'infection d'une culture par un phage.
- le système de répllication des plasmides de Perelson.

2.2. Les processus de transport avec branchement et saut

Il ne s'agit pas ici de construire rigoureusement ce type de processus, qui est encore nettement plus complexe que le précédent, mais plutôt de donner une idée générale de la manière dont il fonctionne et donc, de ce qu'il peut traduire. Ce paragraphe est en partie inspiré de (57) qui traite des processus de transport avec branchement. Il a été adapté en fonction d'une perspective biologique.

Une particularité de ce processus est qu'il se développe dans un espace d'états variable avec le nombre de cellules.

Il conserve deux composantes $((\Phi_t, X_t))$ et, comme précédemment, $\Phi_t \in \mathbb{R}^F$. En revanche :

$$X_t \in (\mathbb{N}^M)^{N_t}; N_t \in \mathbb{N}$$

$$X_t = (X_t^1; X_t^2; \dots; X_t^{N_t}); X_t^i \in \mathbb{N}^M$$

N_t est une fonction constante sur des intervalles de temps aléatoires et finis :

$$N_t = \sum_{k=0}^{\infty} N_k 1_{\{t \in [t_k, t_{k+1}]\}}$$

Sur ces intervalles, l'évolution de Φ_t reste déterministe, continue et déterminée par l'équation différentielle :

$$\frac{d\Phi_t}{dt} = b(\Phi_t, X_t)$$

Il y a deux séries d'instants aléatoires à considérer, les instants de branchement η_i et les instants de saut τ_i .

La loi des branchements est déterminée par deux caractéristiques qui sont l'intensité et la matrice de transition. L'intensité est une application mesurable définie sur S , à valeurs réelles positives.

$$S = \bigcup_{p=0}^{\infty} (\mathbb{N}^M)^p$$

La matrice de transition des branchements est du type :

$P(\phi, x ; y)$ avec $x \in (\mathbb{N}^M)^p; y \in (\mathbb{N}^M)^q$ et en particulier

$P(\phi, x ; y) = 0$ si $x \in (\mathbb{N}^M)^p; y \in (\mathbb{N}^M)^p$

La loi des sauts est déterminée normalement, comme dans le processus de transport avec saut. Il est raisonnable de supposer que les (X_i^j) sont indépendants les uns des autres (ils ne peuvent communiquer que par l'intermédiaire du milieu) et que la loi de chacun d'eux est connue.

Ces remarques sont bien sûr un peu floues mais elles pourraient guider la construction du processus si besoin était.

2.3. Critique

Le besoin s'en fait-il réellement sentir ? Rien n'est moins sûr ! Autant il paraît justifié de chercher à mettre sous une forme stochastique un système de réactions chimiques bien décrit, autant les phénomènes en jeu ici ne sont chimiques que de manière lointaine. Leur description moléculaire est loin d'être complète. Un modèle probabiliste tel que ceux élaborés dans ce travail supposerait l'écriture d'un grand nombre de réactions traduisant des mécanismes biologiques beaucoup plus compliqués encore que ceux mis en jeu dans l'expression d'un gène. Les réticences justifiées et exprimées à propos de l'expression d'un gène sont encore plus pertinentes ici.

Certes, il est toujours possible de proposer un modèle de ce genre pour étudier ces processus biologiques évolués et les résultats de ce travail pourraient même être satisfaisants. Mais une telle étude serait fondée sur des hypothèses beaucoup plus larges que celles formulées dans le chapitre 2. Conduire un tel travail serait plus de l'ordre de la "logique stochastique" que de celui de la chimie stochastique.

Le seul cas dans lequel un modèle aussi compliqué pourrait apporter un complément d'information intéressant est celui du modèle de réplication de Perelson. Au lieu de supposer une division cellulaire déterministe et périodique, un branchement aléatoire pourrait offrir une vision plus juste de l'ensemble, au prix d'une complexité supplémentaire certaine.

Conclusion

"Les objets deviendraient signifiants à partir du langage et non pas le langage à partir des objets donnés à la pensée et que désigneraient les mots fonctionnant comme simples signes"

Levinas

1. Bilan

1.1. Analyse stœchiométrique des processus biologiques

Marginal par rapport à nos préoccupations essentielles, le contenu du premier chapitre s'est imposé pour des raisons pratiques. Après avoir mis en équations l'opéron lactose, le phage λ et le processus de réplication des plasmides ColE1, il était naturel de se demander comment faire face à ces nombreuses réactions. Leur représentation sous la forme de tableaux est finalement la plus intuitive. Il suffit alors de remarquer qu'un tableau est une matrice et tout s'enchaîne assez naturellement : recherche du nombre de réactions indépendantes, changement de base, etc... Il s'est avéré qu'une part de ces idées avaient déjà été formulées et en partie formalisées par des chimistes. Il a été commode de prendre leur suite et de choisir une terminologie. En dehors des avantages "pratiques" de la représentation matricielle, elle a permis de mieux décrire et comprendre la structure des processus réactionnels étudiés et, ainsi, d'en évaluer la complexité.

Le point capital était évidemment la détermination du nombre de variables nécessaires pour préciser l'état de ces systèmes. Si la rédaction des équations traduisant les réactions chimiques invite spontanément à ne pas intégrer les gènes et tous les autres catalyseurs en quantités constantes comme dimension de l'espace des états, l'investigation méritait d'être systématisée. Deux méthodes sont disponibles qui se complètent bien.

Chacune apporte une certaine perspective sur le processus étudié. L'enjeu principal de la détermination de la dimension de l'espace stœchiométrique est la détermination du nombre des états possibles pour le système. Il faut ici être attentif. Dans la mesure où les systèmes biologiques présentent des

réactions d'ordre 0 qui expriment des créations de molécules (et non des transformations), leur espace d'états, selon ces dimensions, ne peut pas être *a priori* borné. Les systèmes biologiques ne sont pas fermés. En théorie donc, la plupart des processus, c'est-à-dire tous ceux ayant des réactions d'ordre 0, auront des espaces d'états dont le cardinal sera celui de N . La situation change radicalement si, d'une manière ou d'une autre, il est possible de borner l'espace des états selon chacune de ses dimensions. Une dimension de plus ou de moins peut modifier considérablement le cardinal de l'ensemble des états selon la borne de cette dimension.

Le changement de base proposé permet de choisir un système d'axes tel qu'il soit possible de se déplacer de +1 selon chacun des axes. Il met ainsi en évidence une structure des processus étudiés très proche de celle d'un processus de naissance et de mort. Les réactions qui permettent des déplacements transversaux (non parallèles à l'un des axes) sont en définitive peu nombreuses et probablement caractéristiques. Dans la même optique, ce changement de base permet une analyse beaucoup plus simple de la réversibilité des réactions.

La question suivante est celle d'une représentation de la structure mise en évidence. L'idéal serait de pouvoir dessiner les vecteurs stœchiométriques eux-mêmes. Les grandes dimensions des espaces en jeu rend cette solution non envisageable. Il a été proposé une représentation à l'aide de graphes qui, en dépit de défauts manifestes, s'est révélée suffisante dans les cas qui ont été abordés dans ce travail. Cette méthode ne prétend pas être plus que ce qu'elle est, une piste de recherche. Le problème d'une représentation graphique d'une famille de vecteurs de l'espace stœchiométrique sur l'espace à deux dimensions d'une feuille de papier reste à explorer systématiquement.

1.2. Approche stochastique des interactions macromoléculaires

La mise en place du modèle probabiliste dont la construction s'étend au long des chapitres 2 et 3 était, en revanche, le centre de notre projet. En achevant ce travail, il est légitime de s'interroger sur les résultats obtenus.

La question n'a pas de réponse évidente. La biologie, science de la nature, ne peut avoir de résultat qu'expérimental. Un travail théorique a pour unique résultat possible une prédiction que l'expérience permet de vérifier. Cette conception assez classique de la théorie est directement issue du déterminisme laplacien que nous a légué le 19^{ème} siècle. Elle est progressivement est battue en brèche en physique et en chimie et l'on sait les réticences que cette remise en cause suscite au sein de ces disciplines moins jeunes que la biologie.

La conception laplacienne de la théorie en biologie est problématique.

D'une part, les rares esquisses de théories largement reconnues par l'ensemble de la communauté des biologistes n'ont aucune capacité de prédiction. Tel est, par exemple, le cas des théories de l'évolution. Même le dogme central de la biologie moléculaire, qui décrit le mécanisme élémentaire de l'expression d'un gène par les étapes de transcription et traduction et qui est sans doute une des théories les plus opérationnelles de la biologie, ne permet guère d'autre prédiction que "entre une protéine et le gène qui la code, il y a un ARN messenger". Elle se trouve pourtant, bien souvent incapable de dire lequel.

D'autre part, de manière assez curieuse, le biologiste ne voit qu'une unique justification possible d'une théorie : son éventuelle capacité de prédiction. La remarque précédente permet de conclure assez rapidement que cette conception du travail théorique revient à sa condamnation.

Or, tant le darwinisme que le dogme central de la biologie moléculaire (et l'on pourrait citer de nombreuses autres théories dans le même cas) ont une influence capitale sur la pratique expérimentale et ce, tout à fait indépendamment de leur capacité ou incapacité à en prédire l'issue. Tous ces discours théoriques forment la grille de lecture du fait expérimental. Ce travail n'est certainement pas le lieu de tels développements épistémologiques, il paraît toutefois important de ne pas se méprendre sur le but qu'il se proposait d'atteindre. En effet, si le travail exposé dans les pages qui précèdent doit être jugé sur sa capacité prédictive, il semble clair qu'il n'a strictement aucun résultat à offrir aujourd'hui. Il n'est validé par aucune expérience, il n'en propose aucune, et, qui plus est, il s'est refusé à formuler la moindre prédiction fondée sur des simulations par exemple.

Si, cependant, la théorie est vue comme la voie par laquelle la nature devient intelligible, alors, sans doute, peut-on penser qu'un certain résultat a été atteint. Pour s'en convaincre, il suffit d'imaginer l'absence de sens, ou au moins l'incrédulité, qu'aurait provoqué une affirmation péremptoire telle que: l'expression génétique et ses mécanismes de régulation se comportent comme un processus de transport avec saut. Les pages qui précèdent se veulent une démonstration et discussion de cette affirmation qui, de ce fait, apparaît comme le résultat essentiel de ce travail.

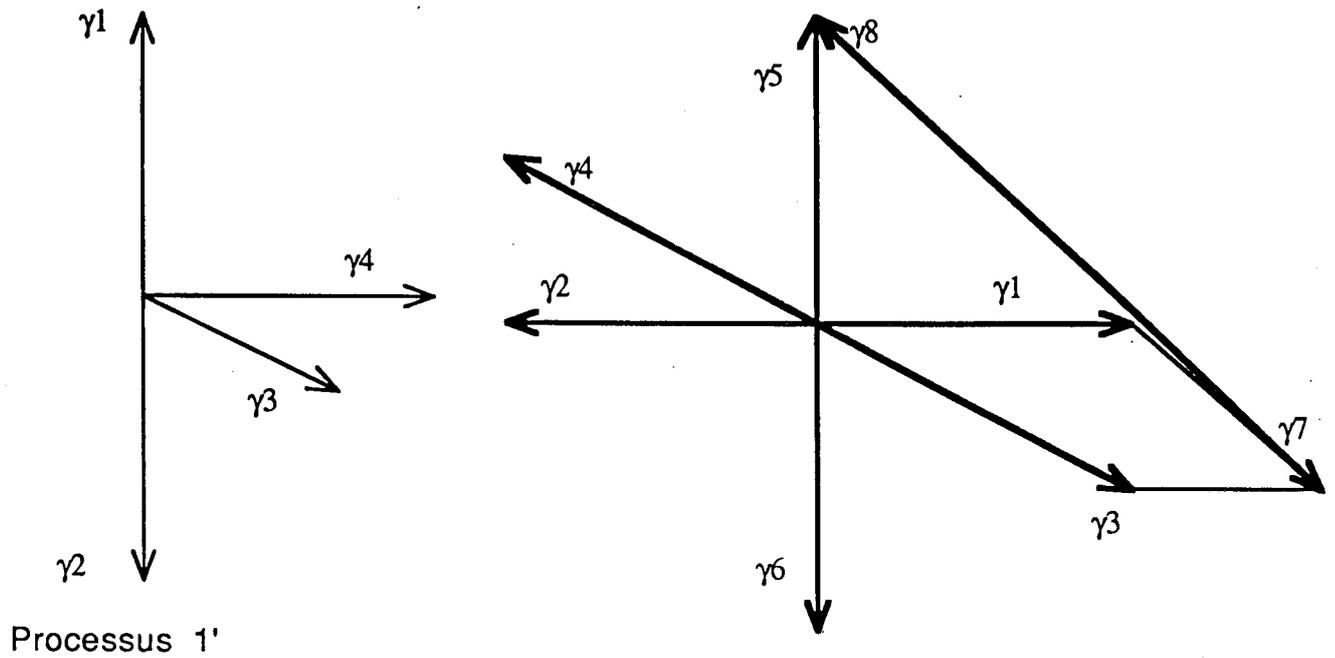
Mais quelques interrogations encore méritent d'être formulées. Quelle intelligibilité peut être espérée de l'étude de dynamiques se développant dans des espaces de dimensions 6, 9, 14 ou 20 ? L'accumulation de faits a été remplacée par une accumulation de dimensions très au-delà de nos capacités

conceptuelles. Pourtant, toutes ces dimensions ne sont pas strictement équivalentes. Une intuition des phénomènes étudiés plus qu'un raisonnement formel, laisse penser que certaines dimensions sont beaucoup plus significatives que d'autres. Dans le cas de l'opéron lactose par exemple, l'évolution conjointe des trois paramètres que sont l'enzyme Z, les concentrations en lactose et en glucose traduit notre perception du phénomène. Toutes les autres réactions ne sont que le mécanisme sur lequel le phénomène est bâti et prend appui.

Pour tenter de mieux faire comprendre cette intuition, une comparaison peut être tentée. L'état d'une horlogerie est idéalement déterminée par la position de chacun des engrenages qui la composent. Pourtant, tout le sens de l'horlogerie réside dans la position des trois aiguilles et les engrenages ne sont, de la montre, que le mécanisme pourvoyeur de sens. Dans le cas des processus de transport avec saut, la situation n'est pas aussi limpide. L'orbite parcourue par le système d'horlogerie est périodique. Il ne serait pas difficile de montrer que la position des trois aiguilles détermine entièrement l'état du système (pour peu que le mouvement des aiguilles soit supposé continu). En ne considérant que les trois aiguilles, on ne perd aucune information. Lorsque l'on procède à une projection de ce type avec l'opéron lactose, le point qui représente le système dans l'espace à 3 dimensions ne traduit que partiellement l'état du système. C'est pourtant, probablement, une des représentations les plus riches de sens que l'on puisse en donner.

Dans le cas du système de réplication des plasmides de la famille Col E1, une seule dimension est suffisante à donner une bonne image de la dynamique. Lors de l'étude de ce système, le point critique est la connaissance du nombre de plasmides par cellule. La variable significative est donc la somme de plusieurs variables de l'espace des états : $D + D_{II} + D_p + D_c + D_c + D_M$. Enfin, pour le bactériophage, la représentation du système dans le plan (Cl, Cro) devrait permettre de rendre compte de l'essentiel du phénomène modélisé, c'est-à-dire l'engagement dans l'une des deux voies alternatives.

Il semble donc possible, sur la base de la compréhension biologique des phénomènes, de déterminer des axes particulièrement porteurs de sens, même dans le cas des processus les plus complexes que l'on a définis dans ce travail. Il reste cependant à analyser l'opération qui conduit au choix de ces axes. Une théorie des variables significatives demeure à construire.



Autre processus défini : par :

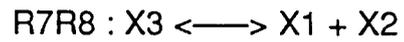
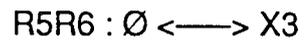
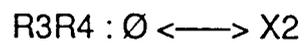
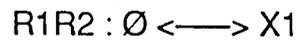


Figure 10 : Représentation vectorielle des processus réactionnels de rang 3.

2. Questions en suspens

Parmi les questions qui ont pu être formulées au cours de ce travail, il est possible d'en rassembler certaines au sein de deux groupes, celles qui ont trait à la continuité et celles qui sont relatives à la stabilité des processus. Le problème de la continuité est celui de fondement du modèle ; celui de la stabilité a surtout une importance pratique.

Le caractère discret de l'espace des phases des processus chimiques définis peut être posé en principe, il ne dispense pas d'une réflexion sur son sens. Il est évident que rien n'est discret, sans discrétisation. Une représentation discrète d'un phénomène ne peut être qu'une idéalisation, une vue de l'esprit. La nature est quant à elle fondamentalement continue. Lors d'une réaction chimique, les molécules passent continûment d'un état à un autre. La vitesse le long du parcours qui conduit de l'état initial à l'état final n'est pas uniforme, certaines sections du trajet sont parcourues avec des vitesses qui peuvent différer de plusieurs ordres de grandeurs mais qui, cependant, demeurent finies. La nature déterministe ou stochastique de l'évolution au cours d'une réaction devrait aussi être discutée. Le fait qu'aient été incorporées dans le modèle des réactions, telles que l'expression d'une protéine qui violent de manière manifeste le principe d'instantanéité, rend nécessaire l'étude de la discrétisation. Qu'il soit bien entendu que l'essentiel n'est pas de fournir une quelconque description des évolutions d'une molécule au cours du parcours d'un mécanisme réactionnel, mais plutôt de tenter de préciser la nature même de l'opération menée lors de la discrétisation, ainsi que les "erreurs" qu'elle peut entraîner.

Le deuxième aspect de ces questions de continuité concerne la distinction des variables d'états qui doivent être intégrées au sein du modèle comme variables discrètes de celles qui peuvent être intégrées comme paramètres continus à évolution déterministe. Outre la nécessité pratique de parvenir à séparer ces deux types de variables lors de l'écriture d'un modèle particulier, l'enjeu de cette question est l'établissement d'un critère de validité de l'approche stochastique. Enfin, dans le même ordre d'idées, il serait utile de vérifier si certaines variables ne devraient pas faire l'objet d'une modélisation stochastique à évolution continue. Il faudrait alors compléter le modèle et y introduire un terme de diffusion.

Les interactions entre protéines sont parfois si fortes qu'elles peuvent être considérées dans la pratique comme irréversibles tant que sont maintenues constantes les conditions dans lesquelles elles restent très déplacées. Cette approximation ne se justifie que dans la mesure où, par ailleurs, le système est stable. Il ne faut pas que des événements de probabilité presque nulle

puissent entraîner le processus vers un autre attracteur. Une recherche des critères auxquels un événement doit répondre pour pouvoir être négligé paraît indispensable. Une plus grande simplicité des processus modélisés en découlerait. Elle serait aussi l'occasion d'une réflexion sur la validité de cette opération mentale souvent pratiquée par le biologiste en face de problèmes concrets.

Le phage λ est l'occasion de poser, sous une autre forme, la question de la stabilité. Aucune réaction irréversible ne sépare les états lytiques des états lysogéniques. L'état lytique constitue donc une classe absorbante dont la probabilité d'absorption est 1. L'état lysogénique est donc, en toute rigueur, transitoire et sa stabilité apparente n'est qu'une métastabilité. Cette métastabilité est pourtant importante, il serait bon de pouvoir la chiffrer.

3. En quête d'observations

Dans une perspective à moyen terme, un éventuel retour au laboratoire tient une place centrale. Il soulève deux questions, celle de sa modalité et celle de son urgence.

3.1. Modalité ?

Quelles expériences envisager ? Il aurait été plaisant de pouvoir dresser les grandes lignes d'un protocole. Seul un cadre général à l'intérieur duquel devra se situer l'expérimentation peut être établi aujourd'hui ; il donnera la mesure de la difficulté à la fois technique et conceptuelle qui devra être surmontée pour la mise en place de cette expérimentation.

Un constat doit être formulé au préalable : les cinétiques des réactions mises en évidence par la biologie moléculaire sont très généralement ignorées. Des constantes cinétiques sont observées, publiées et le plus souvent issues d'expériences biochimiques *in vitro*. Quelles soient les qualités des expériences faites dans les tubes à essais, il serait assez risqué de fonder une prédiction quantitative quant à la dynamique de la cellule, sur la seule base de ces expériences.

Par ailleurs, les petites populations moléculaires sont, avant tout, le fait de la cellule. Une expérience biochimique en tube, vise essentiellement à augmenter les quantités manipulées en vue de répondre à des nécessités techniques évidentes. Mais, pour obtenir des quantités de molécules suffisantes à une étude chimique, il est nécessaire d'extraire ces molécules de populations cellulaires importantes. Un tel acte établit des conditions nécessairement éloignées de celles dans lesquelles un comportement original dû à la petite

taille de la population pourrait être mis en évidence. Considérée d'un point de vue probabiliste, cette pratique est aussi paradoxale que celle qui consisterait à commencer par fermer un système dissipatif pour en étudier plus facilement la thermodynamique.

Ensuite, sans doute est-il prudent de le rappeler, le biologiste manipule souvent des populations de cellules plus grandes que les populations de molécules que ces cellules contiennent. Cette réalité est une des justifications de la démarche probabiliste en biologie moléculaire. Le résultat d'une expérience stochastique est une loi de probabilité sur l'espace des phases de la cellule. Par observation d'un grand nombre de cellules et du fait de la loi forte des grands nombres, il sera possible de formuler une estimation des lois probabilités expérimentales. Pour expérimenter, il faut donc disposer d'un instrument de mesure des populations moléculaires au niveau cellulaire. Or, ces moyens restent encore peu nombreux. Il en existe pourtant, comme la cytométrie de flux ou la microscopie. Il faudrait examiner en détail quelles sont les données qui sont accessibles à ces instruments avant d'envisager la mise au point d'un protocole. (Une mise en garde : la cytométrie en flux est essentiellement un outil d'étude des protéines membranaires. L'interface qu'est la membrane ne peut être intégrée sans une discussion préalable au sein des modèles développés.) Une autre stratégie de mesure pourrait consister à enregistrer les fréquences d'événements moléculaires pouvant être caractérisés macroscopiquement. La bactériologie fournit de nombreux phénomènes de ce type ; dans une transformation, le nombre de colonies obtenues correspond au nombre de bactéries pour lesquelles le processus moléculaire qui permet l'intégration du plasmide au sein de la cellule a été parcouru avec succès. Une plage de lyse correspond aussi à une expression macroscopique d'un événement moléculaire à l'échelle de la cellule (ce sont des événements complexes qui correspondent au passage d'une région à une autre de l'espace d'états).

Un autre trait caractéristique d'une expérimentation stochastique sera l'évaluation et la prise en compte de l'erreur expérimentale éventuelle.

Lorsqu'auront été réunis des moyens d'observation permettant de pratiquer une biologie moléculaire au niveau cellulaire, alors devra être cherché l'objet à mesurer, la réalité matérielle mettant en évidence le bien fondé d'une démarche probabiliste dans l'étude des phénomènes moléculaires au sein de la cellule.

Il n'est pas question de prétendre à la prédiction quantitative qui ne serait pas suffisante à justifier l'emploi d'un modèle probabiliste. Il suffit de pouvoir rendre compte des instabilités et des discontinuités de la dynamique. Deux méthodes peuvent être envisagées : l'observation d'une distribution

asymptotique, ou, mieux, la mise en évidence d'une bifurcation par action sur les paramètres du milieu. Dans les deux cas, il faut déterminer un système dont le comportement stochastique diffère notablement de son comportement différentiel.

A ce stade, le calcul numérique et la simulation auront un rôle essentiel dans le choix du modèle expérimental. Quel que soit l'intérêt de transposer certains théorèmes mathématiques dans le domaine biologique, cette démarche ne pourra être exclusivement poursuivie dans le long terme. Elle butera sur une insuffisance de théorèmes. En dehors de cas très simples dont certains ont été rappelés dans les pages qui précèdent, le comportement des processus aléatoires reste très mal caractérisé. Le problème est encore beaucoup plus vif que dans le champ des équations différentielles. Le recours à la simulation, compromis répondant à une nécessité pratique, est donc inévitable. Avant de "passer à la paillasse", il aura fallu passer derrière une console et avoir déterminé un modèle d'étude dont le comportement aura présenté une certaine robustesse quant à l'incertitude qui entoure les paramètres cinétiques. En d'autres mots, il faudra choisir un modèle dont le comportement soit indépendant de notre ignorance de ses constantes cinétiques. En retour, après que l'approche stochastique ait trouvé sa justification dans les faits, il est possible de penser que l'observation d'un comportement aux dépens des autres, pourra donner des indications sur la valeur de certains paramètres cinétiques *in vivo*.

3.2. Urgence ?

Quelle est, enfin, l'urgence de cette démarche expérimentale ? Les récentes prises de position de René Thom à propos de la "méthode expérimentale" (53, 54, 55), fournissent une base de réflexion. Les faits expérimentaux se caractérisent par leur abondance. Un souci d'économie de nos efforts et de nos budgets peut conduire, dans un premier temps, à un travail de lecture et d'interprétation. Dans la très grande masse des observations publiées, il doit en être qui sont susceptibles de constituer une base de travail. Cet espoir est justifié par le fait que le travail présenté ici n'apporte aucun élément de théorie biologique nouveau. Il n'est qu'un travail de modélisation, de mise en forme d'une théorie déjà universellement répandue parmi les gens qui étudient les phénomènes moléculaires au sein des organismes vivants.

4. De la biologie avant toute chose

Une méprise guette ici. Ce travail est un travail de biologie. De sa forme assez inhabituelle dans la discipline, il est possible qu'il lui soit fait grief. Certains y verront peut-être un travail de chimie ou même de mathématiques appliquées ; qu'ils soient assurés qu'il n'en est rien, au moins dans l'esprit de l'auteur. Sa seule préoccupation a été la recherche de moyens d'expression plus performants que le langage naturel pour traduire les phénomènes biochimiques se déroulant au sein de la cellule vivante et plus particulièrement ceux impliqués dans la régulation de l'expression génétique. Si l'ensemble du travail fait très largement référence à la chimie stochastique et à la théorie mathématique des processus stochastiques, il ne faut pas interpréter ce fait comme le fruit d'un quelconque parti pris mais plutôt comme celui de la résolution à aller chercher aussi loin que nécessaire des éléments de réponse aux questions qu'un enseignement de biologie moléculaire avaient fait surgir très tôt et qu'une pratique expérimentale ultérieure a fait mûrir au point de rendre problématique sa poursuite.

L'objectif du travail n'était pas de démontrer la toute puissance des mathématiques à traiter certaines questions biologiques, mais plutôt de promouvoir l'idée d'un autre langage possible pour la biologie. Aussi, la mise en forme a été privilégiée par rapport au calcul, la discussion des hypothèses par rapport à l'étude de cas. C'est une invitation à porter un regard neuf sur une réalité connue depuis longtemps. Aucun résultat essentiel sans doute, mais peut-être une perspective inédite qui en porte les germes. De nombreuses questions ont émergé au sein du discours biologique du fait de sa mathématisation. Parmi celles-ci, il est possible de rappeler :

- la notion d'espace stœchiométrique et la recherche de sa caractérisation,
- la recherche d'une forme canonique des processus réactionnels,
- la réversibilité de ces processus,
- la recherche de grandeurs cinétiques stochastiques,
- le problème de l'évolution asymptotique des processus chimiques,
- la séparation des variables d'état continues et des variables d'état discrètes,
- la problématique discrétisation des événements réactionnels.

Certaines de ces questions ont trouvé des réponses satisfaisantes, mais pour d'autres, il n'a été possible de donner que des réponses partielles. Certaines encore, ont pu n'être que formulées. Mais c'est sans doute là, l'essentiel. Chacune à sa manière exprime la nouveauté de la perspective et les quelques résultats qui ont été obtenus peuvent laisser penser qu'elle peut être féconde.

Le champ d'action du biologiste n'est-il pas sensiblement plus large qu'il n'a tendance à le considérer ? S'il ne pousse pas la description du vivant qu'il observe jusqu'à sa mathématisation, personne ne le fera à sa place. Or, curieusement, il semble souvent s'arrêter à quelques pas du but. Il observe jusqu'à un niveau de détail très fin, mais il ne prend pas la peine de "bien dire" ses observations. Les quelques dizaines de pages qui précèdent établissent assez clairement que la distance entre le discours pragmatique de l'observateur et le discours mathématique est bien moindre qu'il n'y paraissait de prime abord.

Je voudrais finir en soulignant la dangereuse ambiguïté qui plane sur l'opération de traduction en langage mathématique d'une observation. Cette opération tend à l'universalité. La difficulté consiste à ne pas se leurrer sur le sens de cette universalité. Ce n'est pas l'énoncé lui-même qui devient universel. Le fait rapporté, quelle que soit la manière dont il est exprimé, ne peut avoir d'autre portée que celle de la mesure dont il est issu. En revanche, l'énonciation de l'observation lorsqu'elle se fait à l'aide du langage mathématique acquiert un caractère d'universalité. (Il y a, dans cette nuance, une tentation permanente de glissement de sens. Elle se manifeste sans doute par le fait que certains scientifiques tendent à donner des interprétations excessivement larges de leurs résultats.) Une bonne traduction se doit de préserver le sens. L'enjeu de la mathématisation n'est donc pas au niveau de la signification qui est strictement biologique, mais au niveau de son accessibilité.

Une comparaison peut aider à saisir ce point. Après avoir observé, il convient de faire part de l'observation et, si possible, d'être compris. Ainsi, le choix d'une langue est, au moment de la publication, un point important qui conditionne l'universalité de la publication. Le choix de l'anglais est un moyen de s'affranchir, lors de la rédaction d'un article, du contexte géographique et linguistique dans lequel l'expérience a été conduite. Mais, la localité d'une observation n'est pas simplement géographique. Elle est aussi conceptuelle. La régionalisation des champs du savoir se traduit par la prolifération des concepts et langages locaux qui finissent par n'avoir guère plus de portée que les dialectes et patois dans lesquels s'expriment les hommes qui n'ont pas accès aux outils de communication moderne.

Donner à un énoncé scientifique une expression mathématique est un moyen de le libérer des particularismes locaux. L'accessibilité de la signification doit-elle passer par la recherche d'un auditoire aussi nombreux que possible ? La mathématique doit-elle être vue comme une sorte d'espéranto interdisciplinaire, langage unique permettant aux spécialistes de disciplines variées de se comprendre ? Je ne le pense pas. Cette conception serait à mon sens, beaucoup trop utopique pour justifier l'effort de mathématisation. Il me

paraît plus réaliste de concevoir la mathématisation comme une volonté de renoncer aux concepts locaux, comme une volonté de rattacher l'objet de son étude à quelque chose de connu, de pousser aussi loin que possible l'exposé de ses traits généraux pour qu'apparaisse, comme noyau irréductible de l'universalisation, le lieu de sa spécificité. Le risque de l'opération est grand. Elle ne peut être conduite sans une angoisse permanente de voir disparaître brutalement de son champ d'étude toute spécificité. Elle ne peut pas non plus être conduite sans une angoisse plus profonde encore : celle de ne parvenir qu'à atteindre les limites de ses propres forces, de sa propre capacité d'abstraction et, de ce fait, de demeurer face à une insaisissable originalité.

Références

"Si tu savais ce que je jette, tu admirerais ce que je garde."
Valéry

1. E. Schrödinger, in *Qu'est-ce que la vie ?* (Christian Bourgois Editeur, 1986), pp. 40.
2. Ibid. pp. 181-187.
3. B. d'Espagnat, in *Penser la science ou les enjeux du savoir* (Dunod, Paris, 1990), pp. 112.
4. J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner, in *Molecular Biology of the Gene* (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Menlo Park, Ca, 1987), pp. 59.
5. Ibid. pp. 466.
6. Ibid. pp. 467.
7. Ibid. pp. 316.
8. Ibid. pp. 22.
9. Ibid. pp. 332.
10. Ibid. pp. 1060.
11. Ibid. pp. 518-526.
12. W. Feller, in *An Introduction to Probability Theory and its Applications* (John Wiley & Sons, Inc., New-York, 1957), pp. 229.
13. Y. Caumel, in *Probabilités : théorie et application* (Eyrolles, Paris, 1988), pp. 73.
14. R. Thom, in *La querelle du déterminisme* K. Pomian, Eds. (Gallimard, 1990), pp. 64.
15. C. W. Gardiner, in *Handbook of Stochastic Methods for Physics, Chemistry and Natural Sciences* (Springer-Verlag, Berlin, 1990), pp. 262-263.
16. P. Erdi, J. Toth, in *Mathematical Models of Chemical Reactions* (Manchester University Press, Manchester, 1989), pp. 21-32.
17. V. Volterra, *Leçon sur la lutte pour la vie* (Gauthier-Villars, Paris, 1931).
18. J. D. Watson et al., Op. Cit.

19. Ibid. pp. 473-480.
20. V. Brendel, A. S. Perelson, *J. Mol. Biol.* **Submitted**, (1990).
21. A. S. Perelson, V. Brendel, *J. Mol. Biol.* **208**, 245-255 (1989).
22. P. Erdi, J. Toth, Op. Cit.
23. D. T. Gillespie, *J. Comp. Phys.* **22**, 403-434 (1976).
24. D. T. Gillespie, *J. Stat. Phys.* **16**, 311-318 (1977).
25. D. T. Gillespie, *J. Phys. Chem.* **81**, 2340-2361 (1977).
26. D. T. Gillespie, *Physica* **95**, 69-103 (1979).
27. D. A. McQuarrie, *J. Chem. Phys.* **38**, 433-436 (1963).
28. D. A. McQuarrie, C. J. Jachimowski, M. E. Russer, *J. Chem. Phys.* **40**, 2914-2921 (1964).
29. P. Erdi, J. Toth Op. Cit. pp. 101-105.
30. M. Métivier, in *Probabilités : 10 leçons d'introduction* Cours de l'Ecole Polytechnique (Ellipses, Paris, 1987), pp. 123-140.
31. W. Feller Op. Cit. pp. 338-434.
32. N. Bouleau, *Processus stochastiques et application* (Hermann, Paris, 1988).
33. Y. Caumel Op. Cit. pp. 159-215.
34. E. B. Dynkin, in *Théorie des processus markoviens* (Dunod, Paris, 1963), pp. 122.
35. N. Bouleau, Op. Cit. pp. 92.
36. R. Dautray, et al., in *Méthodes probabilistes pour les équations de la physique* R. Dautray, Eds. (Eyrolles, Paris, 1989), pp. 187.
37. Ibid. pp. 212.
38. W. Feller, Op. Cit. pp. 423-428.
39. N. Bouleau, Op. Cit. pp. 55-62.
40. W. Feller, Op. Cit. pp. 357.
41. N. Bouleau, Op. Cit. pp. 99-101.
42. P. Erdi, J. Toth, Op. Cit. pp. 1-13.
43. G. Nicolis, I. Prigogine, in *Self-Organization in Nonequilibrium Systems* (John Wiley & Sons,

- Inc., New-York, 1977), pp. 387-402.
44. C. W. Gardiner, *Op. Cit.* pp. 246.
 45. R. F. Gragg, *Chem. Phys.*, **1 2 3**, 43-49 (1988).
 46. C. W. Gardiner, *Op. Cit.* pp. 195-210.
 47. *Ibid.*, pp. 259-262.
 48. R. Dautray, *et al.*, *Op. Cit.* pp. 142-148.
 49. C. W. Gardiner, *Op. Cit.* pp. 342-372.
 50. P. Erdi, J. Toth, *Op. Cit.*, pp. 138-146.
 51. J. Demongeot, M. Cosnard, C. Jacob, in *Dynamical systems : a renewal of mechanisms* Diners et al., Eds. (World Science Publishing, Singapour, 1986), pp. 30-37.
 52. J. Demongeot, C. Jacob, *C.R. Acad. Sci.* **5 6**, 206-210 (1989).
 53. R. Thom, in *Apologie du logos* (Hachette, 1990), pp. 606-617.
 54. *Ibid.* pp. 618-626.
 55. *Ibid.* pp. 626-637.
 56. Dautray *Op. Cit.* pp. 221-225.
 57. *Ibid.* pp. 257-261.
 58. R. Thom, in *La querelle du déterminisme* K. Pomian, Eds. (Gallimard, 1990), pp. 62
 59. F. Horn, *Proc. Roy. Soc. , London, SerA*, **3 3 4**, 299-312 (1973).
 F. Horn, *Proc. Roy. Soc. , London, SerA*, **3 3 4**, 313-330 (1973).
 F. Horn, *Proc. Roy. Soc. , London, SerA*, **3 3 4**, 331-342 (1973).
 F. Horn, *Arch. Rati. Mech. Anal.*, **4 9**, 172-186 (1973).
 60. G. Nicolis, *Op. cit.* pp. 272.

Matrice réactive

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
i	1										
o				1		1					
l.o					1						
zya						1					
l		1		1			1				
l*			1					1			
Z									1		
Y										1	
A											1

Matrice produit

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
i	1										
o					1	1					
l.o				1							
zya						1					
l	1		1		1						
l*		1									
Z							1				
Y								1			
A									1		

Matrice stœchiométrique :

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
i											
o				-1	1						
l.o				1	-1						
zya											
l	1	-1	1	-1	1		-1				
l*		1	-1					-1			
Z						1			-1		
Y							1			-1	
A								1			-1

Expression canonique de la matrice stœchiométrique :

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11
g5				-1	1						
g7	-1	1	-1				1				
g8		-1	1					1			
g9					-1				1		
g10					-1					1	
g11					-1						1

Matrices du processus 3'

Matrice réactive :

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	
i	1																				
[-p-]						1				1					1						
[+p-]								1			1			1							
[-p+]							1					1									
[+p+]									1				1								
zya														1	1						
i		1					1														
i*			1					1										1			
CAP				1																1	
CAP*					1					1		1									
Z																				1	
Y																					1
A																					1

Matrice produit :

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20
i	1																			
[-p-]							1				1				1					
[+p-]									1	1				1						
[-p+]						1							1							
[+p+]								1				1								
zya														1	1					
i	1		1					1		1										
i*		1																		
CAP					1															
CAP*						1					1		1							
Z														1	1					
Y														1	1					
A														1	1					

Matrice stœchiométrique :

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	
i																					
[-p-]							-1	1					-1	1							
[+p-]									-1	1	1	-1									
[-p+]						1	-1						-1	1							
[+p+]								1	-1			1	-1								
zya																					
i	1	-1	1			-1	1	-1	1								-1				
i*		1	-1																-1		
CAP				-1	1																
CAP*				1	-1					-1	1	-1	1								
Z														1	1					-1	
Y														1	1						-1
A														1	1						-1

Matrice stœchiométrique "expression canonique"

	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12	R13	R14	R15	R16	R17	R18	R19	R20	
g4				1	-1																
g8						1	-1	1	-1												
g10						1	-1			1	-1										
g12						-1	1					1	-1								
g16	-1	1	-1														1				
g17		-1	1															1			
g18														-1	-1				1		
g19														-1	-1					1	
g20														-1	-1						1

Matrice réactive :

	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
k	1																											
n																												
cro																												
o																												
p																												
q																												
cl																												
cil																												
Int																												
pl																												
dr																												
PRE																												
ClOR																												
ClOL																												
CoOR																												
CoOL																												
CoPRE																												
N																												
O																												
P																												
Q																												
Int																												
Cro																												
Cil																												
Cl																												
D																												

Matrice produit :

	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	
k	1																											
n		1	1																									
cro				1	1																							
o				1	1																							
p				1	1																							
q				1	1																							
cl				1	1																							
cil				1	1																							
int						1																						
pl																												
dr																												
dl	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pRE																												
ClAR																												
ClAd																												
CroAR																												
CroAl																												
CroPRE																												
N	1			1	1																							
O				1	1																							
P				1	1																							
Q				1	1																							
Int				1	1																							
Cro				1	1																							
Cil				1	1																							
Cl				1	1																							
D				1	1	2		1	1	1																		

Expression canonique de la matrice stochiométrique :

	18	3	9	8	11	10	13	12	15	14	17	16	20	1	19	21	22	23	24	6	25	26	2	27	28	5	7	
G8																												
G10			-1	1																								
G12					-1	1																						
G14							-1	1																				
G16									-1	1																		
G20													1															
G21														-1	-1	1												
G22																	1											
G23																		1										
G24																			1									
G25																					-1	1						
G26																						1	-1					
G27																							1					
G28																								1	-1	-1		

Application numérique au processus de réplication des plasmides ColE1

Introduction

Ont été présentés à la demande de Monsieur René Thomas au cours de la soutenance, les résultats de quelques simulations à titre d'illustration. Le système qui a été choisi comme exemple est le processus de réplication des plasmides ColE1. Plusieurs critères ont orienté ce choix : ce processus est un des plus simples qui ait été étudié dans le chapitre 1 ; une approche discrète semble particulièrement adaptée à la modélisation de populations de plasmides, molécules de grands poids moléculaires et présentes, de ce fait, en nombres petits dans les cellules ; la relative simplicité de la dynamique attendue. Une population de plasmides doit en effet, se trouver dans des conditions telles qu'elle double approximativement au cours du cycle cellulaire. Enfin, le travail de Brendel et Perelson fournit une solide base de travail (20). L'ensemble des constantes cinétiques nécessaires à l'élaboration du modèle y a été rassemblé, leur origine (détermination expérimentale ou estimation) y est précisée. Le comportement du système différentiel qui y est décrit permet de jeter les premières bases d'une comparaison des deux types d'approches.

Les simulations rapportées sont de deux types. La première est la simulation d'un processus de saut pur. La seconde résulte d'un processus de transport avec saut qui permet de prendre en compte l'expansion du volume cytoplasmique au cours du cycle cellulaire.

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels

Les calculs ont été effectués sur un micro-ordinateur Apple Macintosh II fx pourvu de 8 Mo de mémoire vive.

Le langage de programmation utilisé est Mathematica de Wolfram Research Inc.

1.2. Méthodes

1.2.1. Processus de saut pur

L'algorithme utilisé est approximativement celui décrit par Gillespie (23). Toutefois, au lieu d'imprimer à intervalle de temps régulier l'état du système celui-ci est gardé dans un fichier de travail nommé orbite[]. Plus précisément, afin de réduire la taille des fichiers manipulés, le programme comporte deux boucles emboîtées. Sa structure générale est la suivante :

Initialisations

vecteur d'état

chronomètre

Boucles emboîtées

Tant que chronomètre < Fin de simulation faire

 Pour j=1 à 10

 détermination de l'instant de saut et d'une réaction

 actualisation du chronomètre

 actualisation du vecteur d'état

 j suivant

 orbite[i] = (chronomètre, état)

 i = i+1

Dans le fichier orbite[] l'état du système est donc enregistré tous les dix événements moléculaires.

A la fin du calcul ce fichier est transféré sur disque dur et, ultérieurement, il est analysé, essentiellement à l'aide des fonctions graphiques du langage.

1.2.2. Processus de transport avec saut

Pour prendre en compte l'expansion du volume cellulaire, il est nécessaire de changer les lois de probabilités. Il convient tout d'abord de déterminer l'instant du prochain saut puis, la réaction.

L'évolution du volume est donnée par V_t qui est une fonction croissante du temps

$$V_t = V_0 \cdot \text{Exp}(\mu t)$$

Deux cas se présentent selon l'ordre de la réaction :

$$R^p \text{ d'ordre 1 } \lambda^p(x) = k^p \cdot h^p(x)$$

$$R^p \text{ d'ordre 2 } \lambda^p(x) = \frac{k^p}{V_t} \cdot h^p(x)$$

Ainsi, si le processus est défini comme un processus de saut pur, sa loi de probabilité est non homogène dans le temps. C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier le processus $((V_t, X_t))$; X_t étant l'état macromoléculaire du système biochimique.

La loi d'évolution du volume étant déterministe, le processus évolue de la manière suivante :

$$V_0 = 1 ; X_0 = x$$

•

$$\tau_1 = T_0(1, x) ; t \in [0, \tau_1[: ((V_t = e^{\mu t}, X_t = x))$$

• •

$$t = \tau_1 : ((V_{\tau_1} = e^{\mu \tau_1}, X_{\tau_1} = Z_1[v_{\tau_1}, x]))$$

• • •

$$\tau_2 = \tau_1 + T_1(v_{\tau_1}, x) ; t \in [\tau_1, \tau_2[: ((V_t = e^{\mu t}, X_t = x_{\tau_1}))$$

etc...

La loi de T_1 est donnée par :

$$P(T_n(v_{\tau_{n-1}}, x) > t) = \text{Exp} \left[- \int_0^t \lambda(v_{\tau_{n-1}}, e^{\mu s}, x) ds \right] = \text{Exp} \left[- \sum_p \int_0^t \lambda^p(v_{\tau_{n-1}}, e^{\mu s}, x) ds \right]$$

Pour une réaction d'ordre 1

$$\int_0^t \lambda^p(v_{\tau_{n-1}}, e^{\mu s}, x) ds = \int_0^t k^p h^p(x) ds = k^p \cdot h^p(x) \cdot t$$

Pour une réaction d'ordre 2

$$\int_0^t \lambda^p(v_{\tau_{n-1}}, e^{\mu s}, x) ds = \int_0^t \frac{k^p}{v_{\tau_{n-1}} e^{\mu s}} h^p(x) ds = \frac{k^p \cdot h^p(x)}{v_{\tau_{n-1}}} \int_0^t e^{-\mu s} ds$$

si bien que :
$$\int_0^t \lambda^p(v_{\tau_{b-1}}, x) ds = \frac{k^p}{v_{\tau_{b-1}} \mu} \cdot h^p(x) \cdot [1 - e^{-\mu t}] = \frac{k^p}{v_{\tau_{b-1}}} \cdot h^p(x) \cdot t + o(t)$$

Quant à la loi de Z_1 , elle est donnée par :

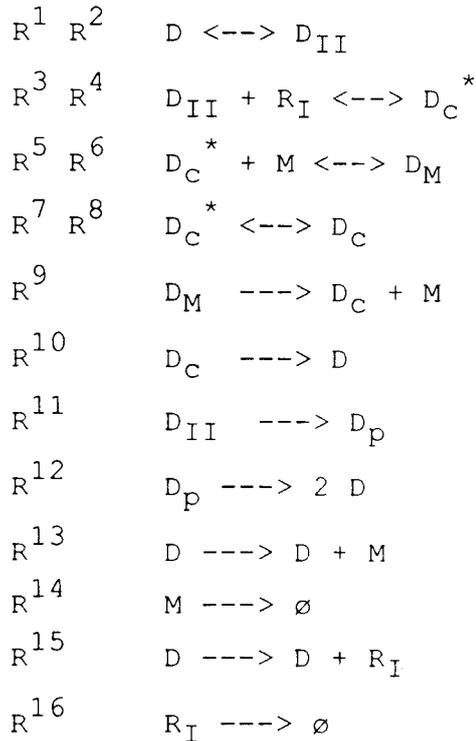
$$P[Z_1(V_i = v, X_i = x) = y] = \frac{\lambda^p(v, x)}{\sum_p \lambda^p(v, x)}$$

2. Résultats

2.1. Etude du processus de saut pur

2.1.1. Rappel du processus biochimique

L'ensemble des réactions chimiques est rappelé ci-dessous ; il est à noter que les réactions 13 et 15 ont été modifiées par rapport à celles du processus 5 défini dans le chapitre 1. Il apparaît en effet que M et R_I sont synthétisées à partir de séquences du plasmide si bien qu'il est nécessaire de donner à celui-ci le statut de catalyseur de ces réactions.



Notations des espèces moléculaires

D : plasmide libre ; M : Protéine Rom ; R_I ARN_I libre ; D_M : Complexe RNAI-RNAII-Plasmide-Rom ; D_c : Complexe ternaire stable RNAI-RNAII-Plasmide ; D_c^* : Complexe ternaire instable RNAI-RNAII-Plasmide ; D_p : Plasmide amorcé ; D_{II} : Complexe RNAII-Plasmide

Constantes cinétiques

$k^1 = 10$; $k^2 = 150$; $k^3 = 18$; $k^4 = 1700$; $k^5 = 20$; $k^6 = 6$; $k^7 = 1550$; $k^8 = 3$; $k^9 = 1200$; $k^{10} = 1000$; $k^{11} = 200$; $k^{12} = 300$; $k^{13} = 1000$; $k^{14} = 4$; $k^{15} = 63$; $k^{16} = 21$; toutes ces constantes sont exprimées en h^{-1} à l'exception des k^{13} et k^{15} qui sont exprimées en $(\text{molécules/volume cytoplasmique})^{-1}h^{-1}$ le volume cytoplasmique de référence étant fixé à $5 \cdot 10^{-16}$ litres.

$\mu = 2.1$ (croissance cellulaire : doublement du volume en 20 minutes)

2.1.2. Simulations et figures réalisées

4 trajectoires ont été réalisées. Les trajectoires 1 et 2 ont pour conditions initiales 1 molécule D et aucune autre molécule. Les trajectoires 3 et 4 ont pour état de départ 10 molécules D et 2500 molécules M et 40 RNA_I . Les quatre trajectoires sont calculées pour des temps supérieurs à 0,3 heures. De ces données il a été tiré trois graphiques donnant respectivement l'évolution en fonction du temps exprimé en heures des populations de plasmides (tous états confondus), de protéine Rom et de RNA_I .

2.1.3. Observations

Les trajectoires 1 et 2 se distinguent nettement. Il ne se passe aucune répllication au cours de la trajectoire 1 alors que la trajectoire 2 atteint le nombre de 6 plasmides dans le même temps. Les deux autres populations moléculaires marquent nettement cette différence. Au contraire les trajectoires 3 et 4 ne sont pas sensiblement différentes puisque seul un léger retard de l'une par rapport à l'autre permet de les distinguer sur le premier graphiques. Sur les deux autres graphiques, la même similitude est observée mais les positions respectives des deux courbes sur chacun des graphiques n'est pas nécessairement identique. Ainsi par exemple, si le nombre des plasmides le long de la trajectoire 3 est toujours inférieure ou égale à celui observé sur la trajectoire 4, il est remarquable de constater que ces deux trajectoires ont au moins deux points d'intersection lorsque c'est

l'évolution de Rom qui est observée.

L'autre constatation qu'il est possible de formuler à propos de ces quatre trajectoires est la différence des fluctuations en fonction de la taille des populations. Les tailles des populations de ces trois espèces moléculaires diffèrent presque d'un facteur 10. La population de Rom présente une évolution assez lisse en apparence alors que celle de RNAI présente des fluctuations marquées. En ce qui concerne la population de plasmides, il est plus difficile de parler de fluctuations puisque ce processus est un processus de Poisson. (Le seul aléa concernant les trajectoires sur le plan du graphique 1 porte sur l'instant des sauts.)

2.2. Etude du processus de transport avec saut

Une seule trajectoire a été calculée dans ce cas-ci. L'état initial était 9 plasmides dans l'état D et aucune autre molécules. Le système a été simulé jusqu'à ce que le chronomètre atteigne 0,333 heures soit 20 minutes, temps d'une génération cellulaire. A ce stade, le nombre de molécules présentes dans la cellule est divisé par deux pour chaque espèce moléculaires et la simulation continue jusqu'à la division suivante, 20 minutes plus tard.

Le calcul des quatre premières générations laisse entrevoir un caractère aléatoire certain. Cela se voit au fait que, par exemple, le nombre de réplifications au cours d'une génération est 15, 8, 10 et 17 pour les quatre premières soit un facteur 2 entre le maximum et le minimum.

3. Discussion

L'étude des quatre trajectoires obtenues par le processus de saut pur montre assez clairement des différences de comportement des populations selon les espèces moléculaires. Même si la réalité biologique du phénomène modélisé peut être discutée puisque l'évolution du volume n'est pas prise en compte, ces exemples permettent de prendre la mesure du pas qui est franchi lorsque l'on passe de la chimie stochastique à la biochimie stochastique. Certains événements comme la répllication des plasmides sont extrêmement rares et responsables de fluctuations importantes. Il s'agit d'un aspect de la chimie stochastique nouveau et qu'il conviendrait de tenter de préciser.

L'étude de la trajectoire obtenue par le processus de transport avec saut doit être comparée avec celle obtenue par le système différentiel équivalent. Le point le plus remarquable est le fait que le processus stochastique ne conduit pas à un comportement très déterminé. Il présente un profil aléatoire qui, de manière empirique et à posteriori, apporte une justification supplémentaire

de l'approche stochastique. Cependant, si les détails des évolutions du processus sont aléatoires, les nombres des plasmides obtenus par ce modèle ne sont pas sans rapport avec ceux obtenus avec le modèle différentiel.

En conclusion, la signification des trajectoires obtenues par simulations de processus stochastiques ne doit pas être surestimée. Seules importent les lois de probabilités qui sont, en fait, l'objet que la simulation doit tenter de cerner. Donc, les résultats d'une simulation doivent s'exprimer en termes de probabilités de présence conditionnellement à un état initial donné. Obtenir ce genre d'estimation avec une précision suffisante pose des problèmes calculatoires importants du fait du grand nombre d'états possibles pour le système. Si l'on tente de délimiter l'espace à l'intérieur duquel évolue le processus de réplication, les estimations suivantes peuvent fournir une première base.

Plasmides : $50 * 6$ états

RNA₁ : 200

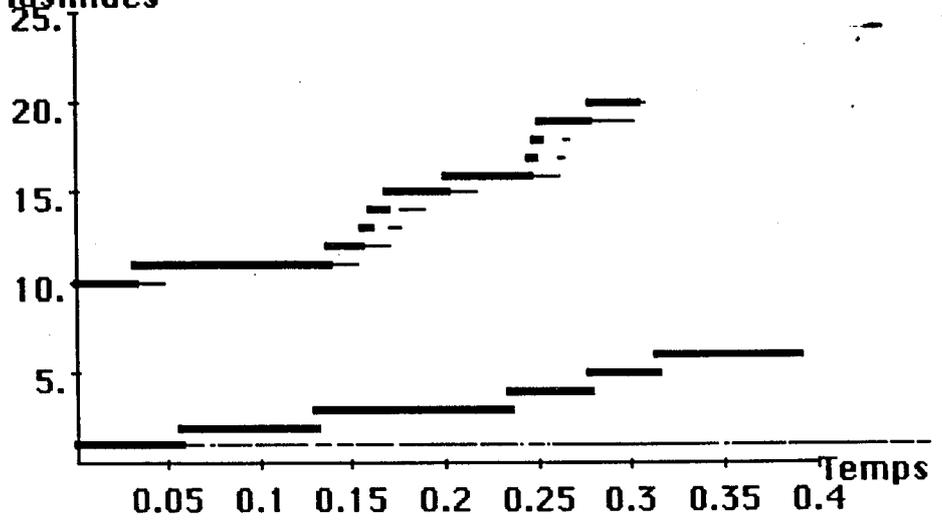
Rom : 12500

temps : 10^2 /heure (dépend essentiellement de la finesse désirée)

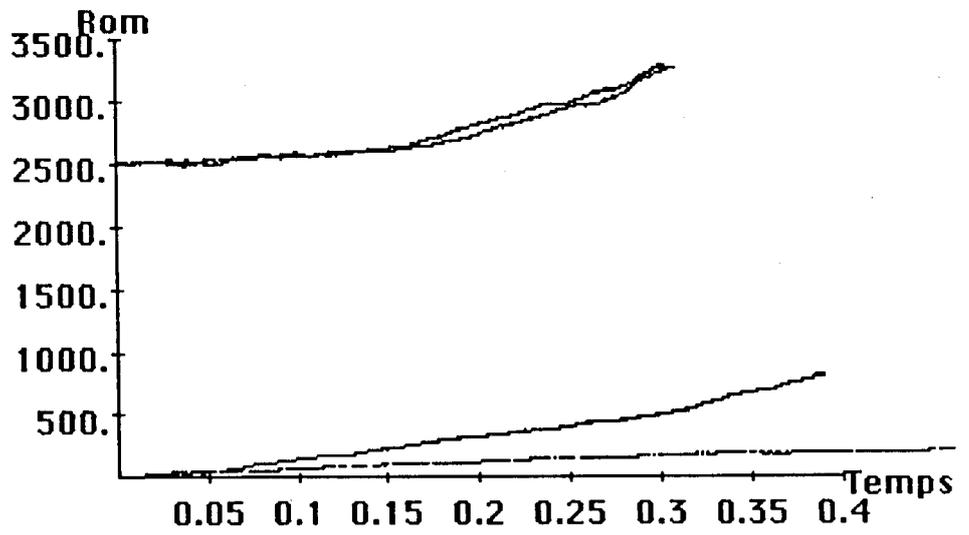
soit un tableau comportant $7.5 * 10^{10}$ éléments auxquels il faut attribuer une probabilité. Sa taille démesurée est le signe de la difficulté de ce problème de simulation.

L'autre aspect de ce problème découle du grand nombre de variables d'états. Quelle représentation donner des résultats de ces simulations. Quelle analyse envisager des chiffres obtenus par simulation ? Quels sont par exemple les apports possibles d'une analyse statistique de ces résultats ?

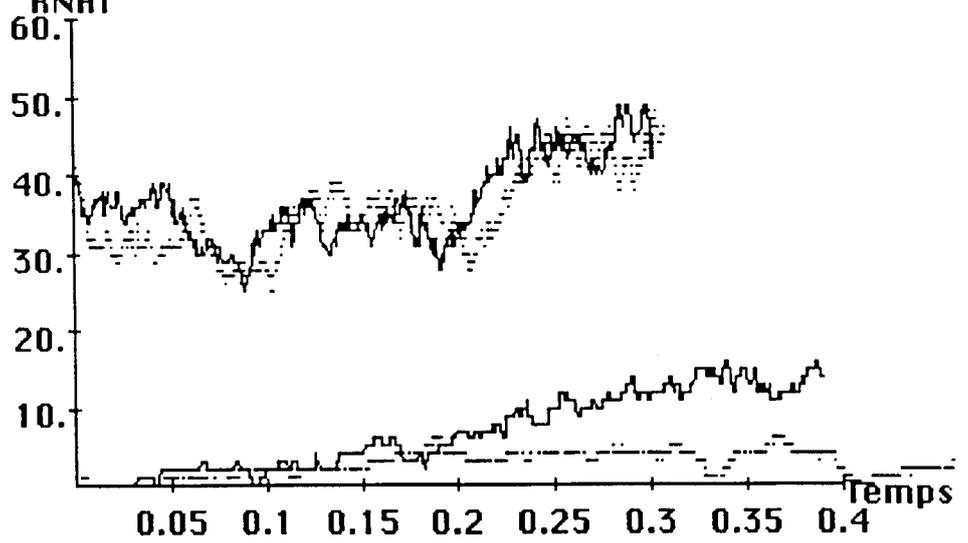
Plasmides



Rom

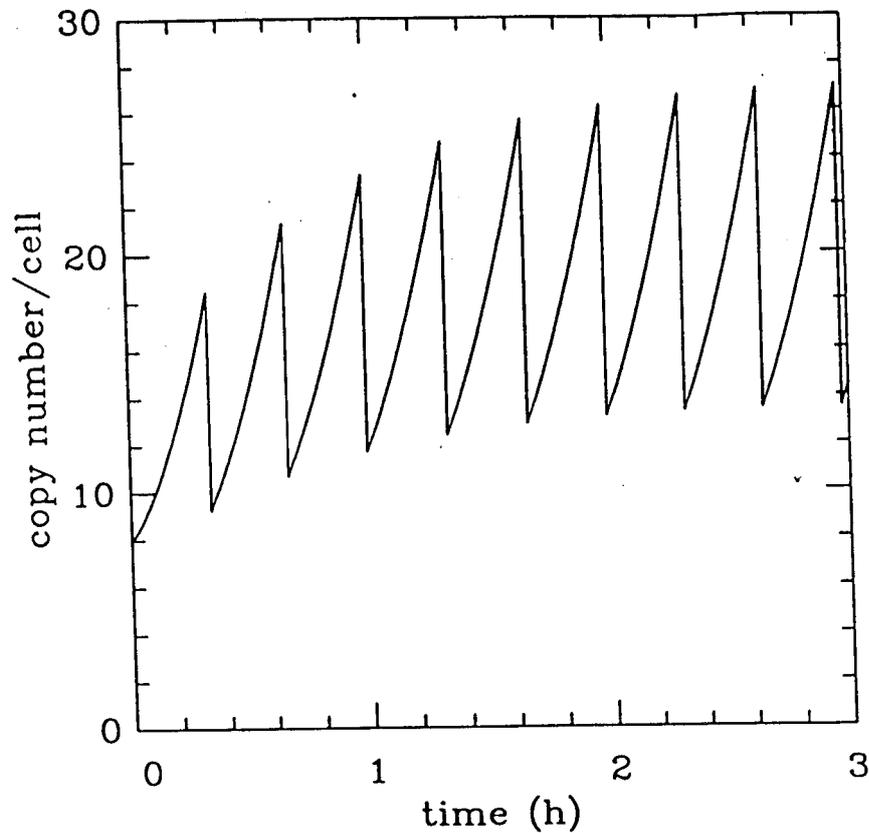


RNAI

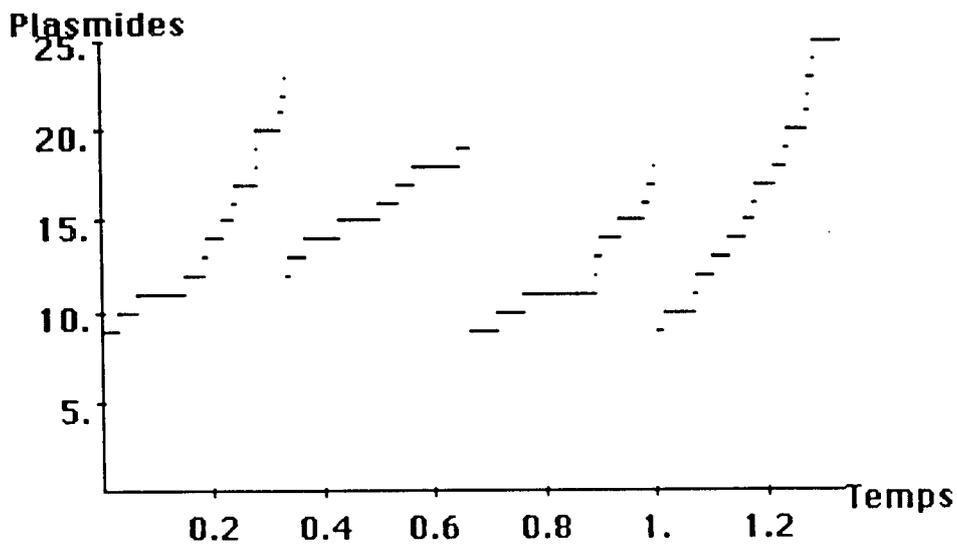


60984 81800

a/



b/



Evolution du nombre de plasmides dans une cellule.

Unités : temps en heures, plasmides en nombres de molécules par cellules.

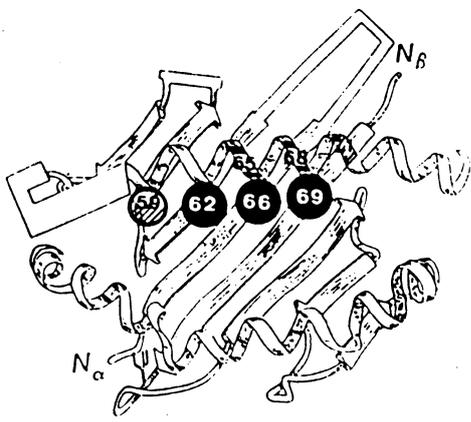
Etat de départ : 9 plasmides, aucune autre molécule.

Génération : toutes les 20 minutes division par 2 du nombre de chacune des molécules présentes.

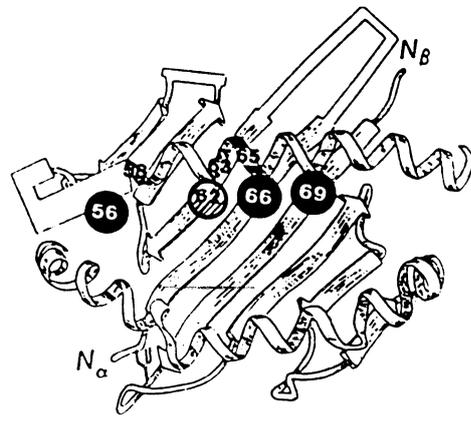
L'expansion volumique de la cellule est prise en compte dans la dynamique.

a/ Modélisation différentielle (d'après Brendel et Perelson)

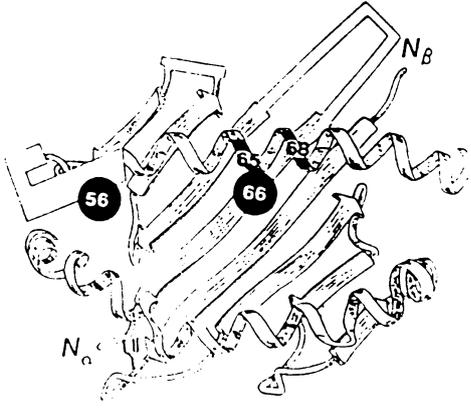
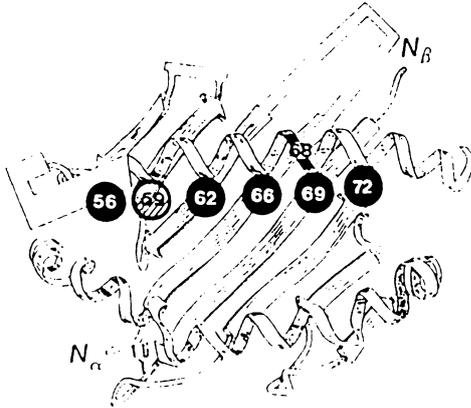
b/ Modélisation stochastique au moyen d'un processus de transport avec saut.



11.10
HEL



4.10
HEL



B.

3A9
SEB

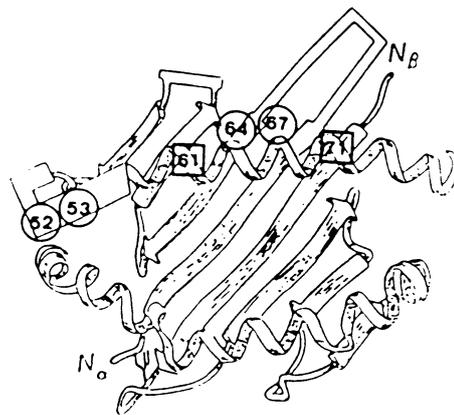


Figure 3 : Résidus de A_{α}^k importants pour la présentation du HEL46-61 et pour celle de la SEB.

Les résultats de la table II sont reportés sur le modèle proposé par Brown.

A/ Les résidus notés en noirs ont perdu toute capacité de présentation. Les résidus hachurés provoquent une perte de réactivité d'un facteur 100.

B/ Reconnaissance du SEB par l'hybridome 3A9. Les résidus marqués d'un carré correspondent à un gain de réactivité supérieur à un facteur 10 tandis que les cercles traduisent une perte de réactivité supérieure à 5 fois.

Il est important de bien remarquer l'échelle de la figure relative au SEB est très différente de celle du HEL. Les effets les plus marquant rapportés sur cette figure restent négligeables comparés à ceux mis en évidence avec le peptide.