

Un exemple en génétique bactérienne.

Janine Guespin-Michel

Ce texte est basé sur mes recherches en microbiologie et montre comment la pensée réductionniste à l'œuvre en microbiologie arrive à un certain point de connaissances, très précises, mais statiques et comment l'utilisation de concepts de la pensée du complexe (notamment les boucles de rétroaction positives) permet d'aller plus loin et de mettre en évidence des comportements inattendus et importants résultant de la dynamique du système.

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie dite ubiquitaire car on la trouve dans un très grand nombre de milieux et conditions différents. Généralement inoffensive pour les êtres humains, elle peut néanmoins devenir pathogène et même dangereuse dans certaines conditions. Ainsi, si elle pénètre et se maintient dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose elle devient la principale cause de mortalité. Sous l'influence des conditions présentes dans leurs poumons, ces bactéries s'entourent d'un épais mucus qui les protège des antibiotiques et participe à l'engorgement des poumons du malade ce qui peut entraîner sa mort. Mais pour ce faire, il faut d'abord qu'elles aient réussi à s'implanter en nombre suffisant dans le poumon du malade, en dépit des défenses de l'organisme, et notamment des macrophages, cellules dont le rôle est justement de détruire les bactéries invasives. Le danger représenté par ces bactéries a évidemment entraîné une étude approfondie non seulement des mécanismes permettant la production du mucus, mais aussi de ceux qui rendent possible l'implantation de ces bactéries.

Dans un premier temps, donc, les bactéries qui arrivent avec l'air dans les poumons malades acquièrent la capacité de neutraliser les défenses de l'hôte en détruisant les macrophages à l'aide de toxines. Elles acquièrent dans les conditions spécifiques des poumons malades en particulier, la capacité de fabriquer des toxines et des assemblages protéiques sophistiqués rappelant une seringue, qui traversent leurs enveloppes et leur permettent d'injecter (secréter) ces toxines directement dans les cellules des macrophages qui sont tuées (cyto-toxicité). Ces bactéries, sont alors capables de se multiplier à haute densité dans les poumons des malades. Certaines d'entre elles y subissent une autre transformation et produisent cet épais mucus (alginate), cause de leur dangerosité.

Si on cultive ces bactéries en laboratoire, elles ne produisent ni toxines, ni seringue de sécrétion : les conditions présentes dans les poumons malades permettent l'apparition de cette cyto-toxicité : on dit qu'elles l'induisent. Pour étudier les mécanismes permettant la cytotoxicité, il était nécessaire de trouver des conditions permettant leur induction en laboratoire, c'est la carence en calcium qui a présenté cette propriété. Ces bactéries ont donc été très intensivement étudiées, par les techniques de la biologie moléculaire, pour savoir comment se produisent les transformations permettant la cytotoxicité. Cela signifie qu'on a recherché les gènes impliqués dans ce mécanisme. La majorité d'entre eux permettent la synthèse des toxines et des protéines dont l'assemblage constitue la seringue de sécrétion. Mais deux gènes ont un rôle particulier dit de régulation et sont impliqués dans le fait que la cytotoxicité ne se produit pas dans les conditions habituelles, mais seulement dans les poumons des malades (ou en carence en calcium). L'un (gène inducteur) permet de synthétiser une protéine « inductrice » clef, dont l'activation par les conditions du milieu entraîne ('induit') l'activation de tous les autres gènes (y compris lui-même), et donc la synthèse de toutes les protéines du système. L'autre, qui fait partie des gènes induits par la protéine régulatrice majeure, est dit « répresseur » parce que la protéine dont il permet la synthèse empêche (réprime) la synthèse de la protéine inductrice. L'activité de celle-ci est donc activée par les conditions de milieu et sa synthèse est activée par elle-même et réprimée par le répresseur dont la synthèse est elle aussi activée par la protéine régulatrice. (L'encarté 1 présente le réseau de régulation transcriptionnelle simplifié, pour ceux qui sont habitués à ce type de représentation). La situation vue par la pensée réductionniste est la suivante : hors des poumons les cellules ne produisent pas de toxines elles sont non induites. Certaines d'entre elles commencent à produire des toxines en

arrivant dans les poumons d'un malade (elles sont induites par les conditions de milieu qui activent la protéine régulatrice, et la présence du répresseur implique une régulation fine des productions), ce qui leur permet de s'y installer, (et elles, ou d'autres, sont alors induites à produire du mucus).

Pour la pensée réductionniste, les choses s'arrêtent là.

On trouve aussi dans l'environnement des bactéries qui ne sont pas indutibles pour la cytotoxicité, même dans un milieu dépourvu de calcium (et dans les poumons de souris malades¹). La pensée réductionniste n'a aucun doute, ces bactéries résultent d'une mutation dans un gène, ce qui les empêche de produire les toxines. Certes, aucune mutation n'a été décelée à ce jour, mais les biologistes moléculaires pensent qu'il y a une mutation dans un gène encore non analysé, et ne s'intéressent tout simplement pas à ces bactéries. Ils ont utilisé une souche inductible pour découvrir le réseau de régulation transcriptionnelle de la figure de l'encarté 1.

Pourtant, lorsque l'on regarde de près ce réseau de régulation **avec un point de vue du complexe** (dynamique des systèmes non linéaires), on prend en considération le fait que la synthèse des deux protéines régulatrices est à la fois induite par elle-même (autorégulation, ou boucle de rétroaction positive) et réprimée par une protéine dont la synthèse est induite par la protéine régulatrice elle-même (boucle de rétroaction négative). (fig 1).

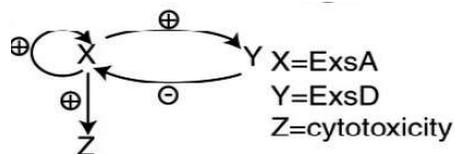


figure 1 Les réseaux très compliqués de l'encarté 1 sont ici résumés en un micro-réseau comprenant une boucle de rétroaction positive liée à une induction et une boucle de rétroaction négative liée à une répression. La protéine inductrice X (ExsA) active le fonctionnement du gène qui la code, des gènes qui codent toutes les fonctions de regroupées par Z (cytotoxicité) (rétroaction action positive) et du gène y qui permet la synthèse de la protéine inhibitrice (ExsD) Y qui régule négativement (réprime) l'activité du gène inducteur x, donc la synthèse de la protéine inductrice (action inhibitrice) ; les arcs de ces réseaux représentent les actions des protéines et les signes + ou – signifient respectivement activation et répression.

Cette configuration n'a aucune signification particulière pour la biologie moléculaire réductionniste. En revanche elle est susceptible d'en avoir une très importante si on raisonne en terme de dynamique non linéaire.

En effet, il a été montré que la présence d'une boucle de rétroaction positive dans un système dynamique non linéaire (comme l'est tout système où des protéines régulent des gènes), est une condition nécessaire de multistationnarité². Ce n'est pas une condition suffisante, mais elle vaut assurément d'être scrutée. Que signifierait, biologiquement, la présence d'une telle multistationnarité ?

Reprenons le schéma de la figure 1. Un examen « intuitif » est possible. Si la protéine inductrice ExsA cesse d'être activée par les conditions de milieu, elle cesse de s'auto-amplifier et d'activer la synthèse de son represser. Mais si les conditions activatrices reviennent, il faut pour que le système démarre qu'un petit peu (niveau de base) de protéine inductrice soit resté présent dans les cellules. S'il n'y en a pas, ou trop peu, le système ne redémarrera pas. Cette absence de protéine inductrice « de base » peut être évidemment due à une mutation dans le gène correspondant, (mais on n'en a pas trouvé). Mais elle peut aussi être due au fait que la quantité de chaque protéine varie d'une

¹Bien sûr, il est hors des de question de contaminer des malades, aussi les expériences *in vivo* se font chez les souris

² Un système dynamique est dit multistationnaire si, selon les conditions où la dynamique commence, il arrive dans l'un de plusieurs états stationnaires possibles, un peu comme une boule de roulette peut se stabiliser dans l'un des nombreux emplacements possibles. Dans le cas présent, le schéma de la figure 1 suggère qu'il pourrait y avoir deux états stables possibles du système.

bactérie à l'autre de façon aléatoire³, et certaines bactéries peuvent avoir un niveau de base de la protéine inductrice trop faible pour pouvoir s'auto-induire dans les conditions activatrices. Elles, et ses descendantes, se comporteront comme si le gène de la protéine inductrice était muté, aussi longtemps que le niveau de cette protéine restera bas. Or comme sa synthèse n'est pas activée, cela peut durer un très grand nombre de générations, jusqu'à un avènement aléatoire à nouveau, par exemple qui concentrera dans une des deux cellules filles résultant d'une division cellulaire le peu de protéine restant. Autrement dit il peut y avoir des bactéries qui sont incapables de sécréter des toxines dans le poumon des malades, alors qu'elles ont tout le matériel génétique intact pour ce faire, uniquement parce que le niveau de base de la protéine inductrice est tombé trop bas, par suite d'une fluctuation aléatoire⁴. En termes biologiques, on peut parler d'une modification phénotypique, qui n'est pas due à une modification de gènes mais qui se transmet au cours des générations.

Mais tout cela repose pour le moment sur deux suppositions. L'une c'est que le micro-réseau de la figure 1 - un schéma privilégiant les boucles de rétroaction dans un réseau beaucoup plus large - est significatif. L'autre est que la boucle de rétroaction positive, qui est une condition nécessaire mais non suffisante à une multistationnarité, soit effectivement « active ». Plus, évidemment, un point de vue nouveau, celui donnant crédit à l'hypothèse issue de la dynamique des systèmes non linéaires étudiés principalement en physique. Il y a donc à ce stade, une présomption, pas une preuve

Comment le savoir ? Dans un premier temps nous avons parcouru la littérature, et notamment les publications médicales ou d'écologie microbienne, étudiant les souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'environnement ou les malades. Les résultats ne sont pas faciles à comparer car les expériences reportées sont faites dans des conditions différentes. Mais nous avons trouvé mention de souches bactériennes incapables d'être induites par la carence en calcium, bien que dépourvues des mutations connues. Ces études, bien qu'encourageantes, ne sont pas conclusives notamment parce que des mutations dans d'autres gènes non explorés pourraient être responsables des modifications de phénotypes mis en évidence.

Nous avons alors fait un modèle mathématique correspondant au réseau simplifié de la figure 1 qui nous a confirmé de façon rigoureuse qu'une multistationnarité était possible à partir de ce réseau. En collaboration avec des informaticiens, nous avons trouvé que deux des modèles que ces réseaux permettent de construire (en fonction des différentes pondérations des interactions), étaient compatibles avec l'hypothèse de deux états stationnaires stables possibles donc possédaient deux bassins d'attraction, correspondant l'un à une situation de non-inductibilité de la cytotoxicité, l'autre à une situation d'inductibilité. Dans les deux cas, on a pu aussi démontrer de façon rigoureuse, qu'il n'y a pas d'autre moyen pour passer d'un bassin d'attraction à l'autre, que de jouer sur la concentration de la protéine inductrice⁵. Ces modèles, qui montrent que l'hypothèse de multistationnarité est plausible, sont bâtis à partir d'un micro-réseau extrait du réseau global en ne considérant que les boucles de rétroaction. En montrant qu'on peut passer d'un bassin d'attraction à l'autre en jouant sur la concentration de protéine inductrice, ils ont fournis les moyens de les tester expérimentalement sur les bactéries vivantes. (encadré 2)

Nous avons montré que la présence de la protéine régulatrice pendant un temps très court dans une souche « non-inductible », a suffi à la rendre inductible pendant plusieurs générations, c'est à dire héréditairement inductible. Les bactéries sont passées de l'état non-inductible (taux de base de la

³On a pu le démontrer expérimentalement avec des marqueurs fluorescents permettant d'évaluer la quantité d'une protéine donnée dans les bactéries individuelles au microscope, et cela peut provenir notamment du fait que la RNA polymérase, première étape de la synthèse d'une protéine est en quantité limitante dans les cellules.

⁴ En termes de la théorie des systèmes dynamiques, il y a deux bassins d'attraction pour le même système génétique, le bassin d'attraction où les bactéries sont inductibles par les conditions du poumon (ou les conditions expérimentales d'induction) et le bassin d'attraction où elles ne le sont pas

⁵ Ce qui montre notamment qu'il ne serait inutile de diminuer l'expression du gène répresseur chez une souche non-inductible pour la rendre inductible, contrairement à ce qu'une approche 'intuitive' aurait sans doute suggéré.

protéine régulatrice trop faible de façon permanente), à l'état inductible (taux de base normal de la protéine régulatrice de façon permanente) **sans qu'il y ait eu une mutation dans un gène**. Cette conclusion, pour irréfutable soit elle, heurte complètement les conceptions réductionnistes.

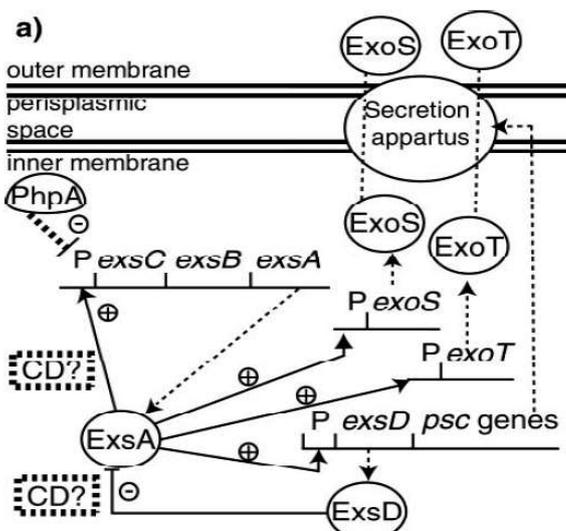
Cette démonstration a-t-elle une importance pour la santé, ou n'est-ce qu'une curiosité biologique ? Elle signifie que, dans la nature, il y a deux types de souches de *Pseudomonas aeruginosa*, qui ne diffèrent pas par leur génotype, mais par leur phénotype concernant la capacité à produire des toxines, donc leur dangerosité.. Les unes sont inductibles par la carence en calcium (et par les poumons de malades) les autres non (ou plus difficilement). Comme le système de sécrétion des toxines est la première étape de l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*, une piste pour empêcher ces bactéries de nuire pourrait être de rechercher des conditions qui maintiennent ces souches dans l'état non inductible même dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose. Ceci permettrait de délivrer à ces patients un médicament préventif, permettant d'avoir une action plus efficace que les antibiotiques, donnés lorsque l'infection est déjà constatée, et qui s'avèrent peu efficaces lorsque les bactéries s'installent dans les poumons et y produisent un mucus qui est à la fois dangereux pour les malades et une protection contre les antibiotiques.

Bien que cette démonstration ait été faite en 2006, **la pensée réductionniste dominante encore actuellement n'a pas accepté ces résultats qui reposent sur des hypothèses et des expériences liées aux comportements dynamiques non linéaires des interactions biologiques**. Ce refus amène non pas à nier les résultats présentés ici (les méthodes de biologie moléculaire sont les mêmes pour une pensée réductionniste et pour la pensée du complexe), mais à nier l'existence de la question. Les souches ne pouvant pas être induites par la carence en calcium pour produire des toxines et ne différant pas génétiquement des souches dites « sauvages » (« normales »), étaient suspectées depuis longtemps, mais non explicables par des mécanismes compréhensibles par une pensée statique, et linéaire (comme des mutations). On a donc tout simplement oblitéré l'existence de ces souches, et toutes les questions pouvant s'y rapporter.

Dans cet exemple, la pensée du complexe n'a pas utilisé une approche systémique, mais une approche de dynamique non linéaire, mais la pensée réductionniste dominante refuse de prendre en considération des faits pourtant avérés, dont l'explication n'est pas conforme au dogme. Pourtant les idées de multistationnarité (ou bistabilité), commencent à être évoquées aussi dans d'autres domaines de la biologie, concernant l'évolution des cancers, la rupture de tolérance au soi et la curation d'autoimmunité, et il faut espérer que le domaine de la microbiologie s'ouvre aussi vers ces hypothèses après tant de temps perdu

Encadré 1 réseaux de régulation de la synthèse de la cytotoxicité recopié de :

EPIGENESIS AND DYNAMIC SIMILARITY IN TWO REGULATORY NETWORKS IN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* Janine F. Guespin-Michell¹, Gilles Bernot², Jean Paul Comet², Annabelle Méricau¹, Adrien Richard², Christian Hulen³ and Benoit Polack⁴. *Acta Biotheoretica* 52: 379–390, 2004



Réseau de régulation pour la cytotoxicité. Diagramme moléculaire schématisant les étapes principales de la régulation. L'inducteur principal ExsA contrôle tous les opérons impliqués dans la cytotoxicité y compris son propre opéron et celui comprenant le gène pour le répresseur

ExsD de ExsA, La cible de l'induction par la carence en Calcium n'est pas complètement élucidée pour le moment.

Encadré 2 Epigenetic acquisition of inducibility of type III cytotoxicity in *P.*

aeruginosa. Didier Filopon¹, Annabelle Mérieau², Gilles Bernot³, Jean-Paul Comet³, Rozenne LeBerre⁴, Benoit Guery⁴, Benoit Polack*¹ and Janine Guespin-Michel² *BMC Bioinformatics* 2006, 7:272

Nous sommes partis d'une souche A incapable de produire des toxines même en carence en calcium. Nos témoins étaient une souche B largement étudiée par les biologistes moléculaires, capable de produire de toxines dans les conditions de carence en calcium, et ne différant génétiquement pas (dans la mesure de nos connaissances) de la souche A et une souche C, non inductible parce que mutée dans le gène de régulation (*exsA*). L'expérience (de biologie moléculaire) consiste à modifier ces 3 souches -notées par le signe ') en introduisant une copie supplémentaire du gène régulateur, dans une construction qui fait que ce gène est exprimé donc la protéine régulatrice est produite seulement si il y a dans le milieu une molécule tout à fait étrangère au système (le gène est exprimé sous le contrôle d'un autre système de régulation celui de l'opéron lactose de la bactérie *Escherichia coli* inductible par l'IPTG). On teste la production de toxines dans un milieu carencé en calcium. En absence d'IPTG, seule la souche B' en produit. En présence de cette molécule, les trois souches modifiées en produisent. La construction n'est donc pas dommageable pour les bactéries et la production de toxine est bien régulée par la protéine de la construction.

Maintenant, (roulement de tambours) on laisse l'IPTG 20 minutes seulement dans le milieu de culture des bactéries, puis on transfère chaque souche dans un milieu qui est dépourvu et est carencé en calcium. La souche A' qui a eu un pulse de la protéine régulatrice pendant un temps court (1/3 de génération), produit des toxines, pendant au moins 5 générations après l'expérience. La souche C', (qui n'a pas le gène endogène de la protéine régulatrice), n'en produit pas. Ceci montre que le gène introduit ne produit la protéine régulatrice que en présence d'IPTG, ce qui est insuffisant pour que la souche C' produise des toxines, mais suffisant pour que le gène *exsA* de la souche A' soit induit par la présence de la protéine régulatrice exogène produite pendant ce temps court (et nous avons montré par des expériences chez les souris que cette propriété reste vraie dans les poumons des souris malades, où les souches non inductibles deviennent inductible beaucoup plus tard.) CQFD.