

> expériences avaient montré que si l'inducteur était donné à haute concentration, les bactéries synthétisaient vite la β -galactosidase à son taux maximal. Elles avaient aussi révélé que deux processus indépendants étaient impliqués dans l'induction de la synthèse de l'enzyme. D'une part, la concentration de l'inducteur dans les bactéries déterminait la vitesse de production de l'enzyme. D'autre part, la synthèse de la perméase, elle aussi induite par le TMG, augmentait considérablement la concentration de l'inducteur dans les bactéries.

Toutefois, que se passait-il quand l'inducteur était donné à faible concentration? C'est à cette question que Novick et Weiner ont cherché à répondre. On pourrait penser que la production de β -galactosidase croît avec le temps, parce que la concentration interne de l'inducteur augmente au fur et à mesure de la synthèse de la perméase. Or, par des expériences de dilution et de dosage, Novick et Weiner ont constaté qu'une population de bactéries croissant avec une forte concentration d'inducteur est composée de cellules qui soit synthétisent la β -galactosidase à son taux maximum, soit ne synthétisent rien du tout. En d'autres termes, les bactéries sont induites ou non, sans intermédiaire.

LE RÔLE CLÉ DE LA PERMÉASE

Leur explication est la suivante: quand l'inducteur est ajouté au milieu de culture, une bactérie a une probabilité donnée de produire une première molécule de perméase, probabilité peut-être dépendante de la concentration de l'inducteur. Cette perméase entraîne l'augmentation de la concentration interne de l'inducteur. La probabilité de synthèse de la deuxième molécule de perméase devient donc plus élevée. L'induction de la perméase adopte alors un comportement autocatalytique (elle s'autoaccélère) et, peu de temps après la synthèse de la première perméase, la bactérie devient ainsi complètement induite. La transition est si rapide qu'on ne peut trouver de bactéries intermédiaires.

Par ailleurs, la perméase est une protéine membranaire. Ainsi, quand une bactérie induite se divise, les deux cellules filles se partagent les molécules de perméase avec la membrane et restent donc induites. Si l'inducteur disparaît du milieu de culture, l'autocatalyse s'arrête. Comme les bactéries induites croissent plus lentement que celles non induites, elles se diluent dans la culture. De plus, à chaque génération, les perméases membranaires diminuent en nombre jusqu'à disparaître.

L'induction de la β -galactosidase apparaît donc comme un phénomène en tout ou rien, déclenché par un processus aléatoire. La formation de la première molécule de perméase serait l'étape critique: le passage à l'état induit



Un unique événement moléculaire aléatoire détermine le phénotype d'une cellule

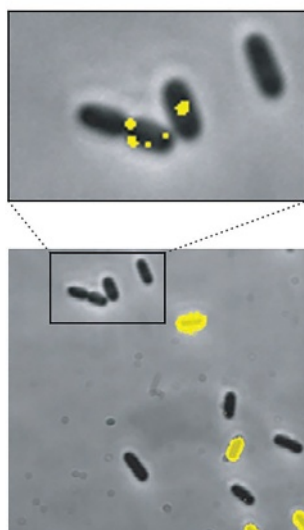
serait la conséquence d'un unique événement aléatoire. Une fois la bactérie induite, toute sa descendance le reste si la concentration de l'inducteur reste à son taux de maintien.

UNE SEULE PERMÉASE SUFFIT-ELLE ?

Cependant, il restait une difficulté de taille pour valider le modèle de Novick et Weiner. Toute cette connaissance sur l'expression du gène reposait sur des études de génétique et de biochimie conduites sur de grandes populations de cellules et de molécules purifiées, qui cachaient la nature de l'expression génique d'une seule molécule. Or celle-ci dépend de l'action de macromolécules qui transcrivent l'ADN en ARN messager, lesquelles sont elles-mêmes soumises aux lois du hasard, ce qui signifie que les cellules ne sont pas synchrones. Il est donc indispensable de faire des observations en temps réel dans des cellules isolées.

Pour ce faire, il a fallu attendre la mise au point d'une technique de microscopie offrant la possibilité de détecter une seule protéine dans une cellule unique. Ainsi, ce n'est qu'en 2006 que Sunney Xie, de l'université Harvard, et ses collègues ont repris les études préliminaires de Novick et Weiner. Chez *E. coli*, l'équipe a rendu fluorescente la perméase en fusionnant le gène *LacY* avec celui d'une protéine fluorescente jaune et utilisé une technique lui permettant de détecter et localiser une seule perméase fluorescente. Comme prévu, les chercheurs ont détecté deux phénotypes chez les cellules cultivées avec une concentration élevée d'inducteur. Des cellules – les cellules induites – présentaient des membranes complètement fluorescentes, c'est-à-dire avec un grand nombre de perméases. Les autres étaient celles non induites. Or au lieu de ne porter aucune perméase, plusieurs en présentaient un petit nombre!

Les cellules non induites avaient de zéro à dix molécules, avec une probabilité indépendante de la concentration de l'inducteur. L'hypothèse de Novick et Weiner était-elle

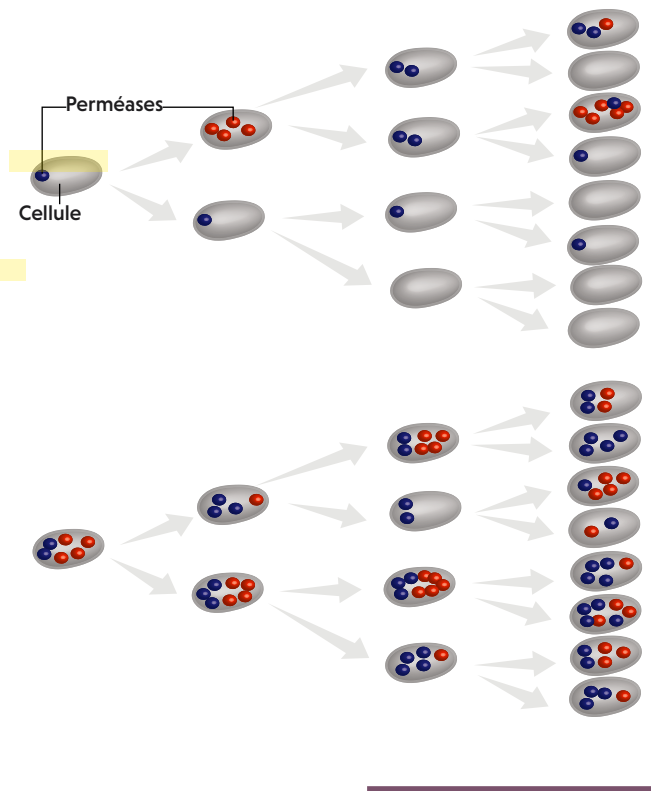


Les techniques actuelles de microscopie permettent de détecter une seule molécule fluorescente dans une cellule. L'équipe de Sunney Xie, à l'université Harvard, a ainsi montré qu'en présence de lactose même des bactéries non induites, c'est-à-dire où l'opéron lactose ne s'est pas exprimé pleinement, portent quelques molécules de l'enzyme perméase (les points jaunes sur le zoom), alors que celles induites en ont produit massivement (cellules toutes jaunes).

UN ÉVÉNEMENT ALÉATOIRE, DEUX RÉGIMES

Le modèle de Sunney Xie et ses collègues pour décrire l'expression aléatoire du gène de la perméase et son effet de seuil sur l'induction des bactéries (*ci-contre*) est très similaire au « test de fluctuation », un outil théorique issu de la mécanique quantique où l'aléatoire est important : de nouvelles molécules de perméase (*en rouge*) sont produites par saccades et s'ajoutent à celles déjà présentes (*en bleu*), tandis que chaque division cellulaire dilue leur nombre total. Quand l'opéron lactose est réprimé, la probabilité de production de nouvelle perméase est faible et les bactéries restent globalement non induites (*en haut*), et inversement (*en bas*). En 1943, le biophysicien Max Delbrück avait utilisé un test de fluctuation similaire pour modéliser des expériences du microbiologiste Salvador Luria visant à trancher entre deux hypothèses sur l'origine des mutations chez les bactéries *E. coli* : étaient-elles induites par le milieu de culture ou spontanées ?

Ce n'est pas le seul parallèle entre les phénomènes d'induction enzymatique et de mutation. Comme Aaron Novick et Milton Weiner l'ont constaté dès 1957, chaque cellule a seulement deux états possibles (induit ou non induit/muté ou non muté). De plus, dans les deux cas, la descendance d'une cellule est dans le même état qu'elle ; enfin, la transition vers l'état induit comme muté est le résultat d'un événement unique aléatoire. Avec une différence majeure, cependant : au contraire de la mutation, l'induction est réversible, car elle nécessite la présence continue de l'inducteur dans le milieu de culture.



mauvaise ? Pour le savoir, l'équipe de Sunney Xie a repris l'ensemble de leur raisonnement, mais en élevant le seuil, c'est-à-dire le nombre de molécules de perméase nécessaires pour passer de l'état non induit à l'état induit. Toutefois, comment déterminer ce seuil, tant il est difficile de saisir les rares événements de passage d'un état à un autre ? L'astuce a consisté à partir d'une population de cellules couvrant un large éventail du nombre de perméases. Pour ce faire, l'équipe a induit des bactéries en culture, puis éliminé l'inducteur du milieu. Elle a ensuite attendu six générations, pendant lesquelles les perméases se sont réparties entre les cellules filles au fil des divisions. Puis elle a introduit à nouveau l'inducteur dans le milieu de culture. Résultat : la fluorescence des cellules comportant peu de perméases a continué à décroître. En revanche, celle des bactéries dotées de plus de trois cents molécules s'est mise à augmenter, signe que ces cellules étaient à nouveau induites. Le véritable seuil était donc de trois cents molécules.

LE MYSTÈRE DES VAGUELETTES

Avec un tel seuil, cependant, un autre problème émergeait. Comment expliquer à la fois une importante vague d'expression du gène *LacY* pour atteindre le seuil de l'induction, mais aussi des vaguelettes d'une petite dizaine de molécules chez les bactéries non induites ? Pour cela, il a fallu faire appel à toutes les connaissances sur le fonctionnement de l'opéron lactose. Notamment au fait que le

répresseur se fixe non pas à un, mais à deux opérateurs parmi trois, formant une boucle d'ADN (*voir l'encadré pages 52-53*).

Le raisonnement est alors le suivant. Les vaguelettes seraient le résultat de la dissociation partielle du répresseur et de l'ADN : le répresseur se serait dissocié d'un seul des deux opérateurs. Étant toujours lié à l'autre, le répresseur rétablit rapidement un lien avec celui qu'il a quitté. Par conséquent, la durée de la transcription de l'opéron est brève et peu de perméases sont synthétisées. Au contraire, la dissociation complète du répresseur et de l'ADN serait un événement rare qui déclencherait une importante vague d'expression du gène *LacY*. Le seuil serait alors atteint et la bactérie induite. En effet, un répresseur ayant complètement quitté la molécule d'ADN met beaucoup de temps à rencontrer de nouveau les sites des opérateurs au gré de sa diffusion aléatoire dans la cellule – son « mouvement brownien », puis son glissement le long de l'ADN –, ce qui augmente considérablement la durée de transcription.

Ainsi, un unique événement moléculaire aléatoire détermine le phénotype d'une cellule. La dissociation partielle du répresseur conduit à de petites vagues d'expression de protéines, tandis que de rares dissociations complètes conduisent à de grandes vagues d'expression de l'opéron. Dans ce modèle, la complète dissociation du répresseur serait l'événement moléculaire aléatoire entraînant le changement de phénotype.