

# Approche, logique, bio-informatique et expérimentale de la dynamique d'un réseau de régulation chez *Pseudomonas aeruginosa*.

**J.F. Guespin-Michel<sup>2</sup>.**

D. Filopon<sup>1</sup>, A. Mérieau<sup>2</sup>, G. Bernot<sup>3</sup>, J.P. Comet<sup>3</sup>, B. Polack<sup>1</sup>,

1 GREPI EA 2938 Université Joseph Fourier Grenoble 1, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble cedex 9, France

2 Laboratoire de microbiologie du froid, EA 2123, Université de Rouen, F-76 821 Mt St Aignan, France (e-mail: janine.guespin@univ-rouen.fr)

3 Maison Genopole des sciences de la complexité programme Epigenomique 93, rue Henri Rochefort F-91000 Evry France

# Résumé de la démarche

- **Hypothèse** : L'acquisition de phénotypes stables par *P. aeruginosa* lors d'un séjour dans les poumons de malades atteints de mucoviscidose est-elle de nature épigénétique?

2) **Modèle**: par analyse logique généralisée

3) **Test du modèle et de l'hypothèse** par une méthode informatique (CTL) pour en connaître la cohérence

4) Suggestion informatique d'expérimentation pour **valider l'hypothèse**.

5) **Expériences**

## L'état de la question

Lorsque la bactérie opportuniste *Pseudomonas aeruginosa* pénètre dans les poumons d'un malade atteint de mucoviscidose, elle peut subir deux modifications phénotypiques indépendantes (mucoïdie et cytotoxicité), qui contribuent à en faire la cause principale de mortalité de cette maladie.

**La cytotoxicité** résulte de l'expression d'un système de sécrétion (dit de type III) qui permet aux bactéries de contourner les défenses de l'hôte en injectant des toxines létales dans les macrophages notamment.

**La mucoïdie** désigne l'acquisition par ces bactéries de la capacité de produire un épais mucus (biofilm) qui augmente leurs résistances aux antibiotiques et aggrave les déficiences respiratoires du malade.

**Les bactéries issues de l'environnement ne présentent généralement aucun de ces deux phénotypes. Les bactéries isolées des poumons des malades présentent, de façon stable l'un ou l'autre phénotype, et souvent les deux.**

L'acquisition d'un phénotype nouveau et stable chez une bactérie peut résulter de **mutations** (ou autre remaniement chromosomique) ou d'une **modification épigénétique**;

Une modification épigénétique est un événement dynamique au cours duquel la bactérie passe d'un état stationnaire à un autre état stationnaire, comme par l'effet d'un commutateur (epigenetic switch). Le système dynamique correspondant est donc multistationnaire.

De telles modifications épigénétiques ont été mises en évidence chez *E.coli* , dans le cas de l'opéron lactose (1957, 2004), du phage lambda (1974, 1998), de la piliation pap (2003).

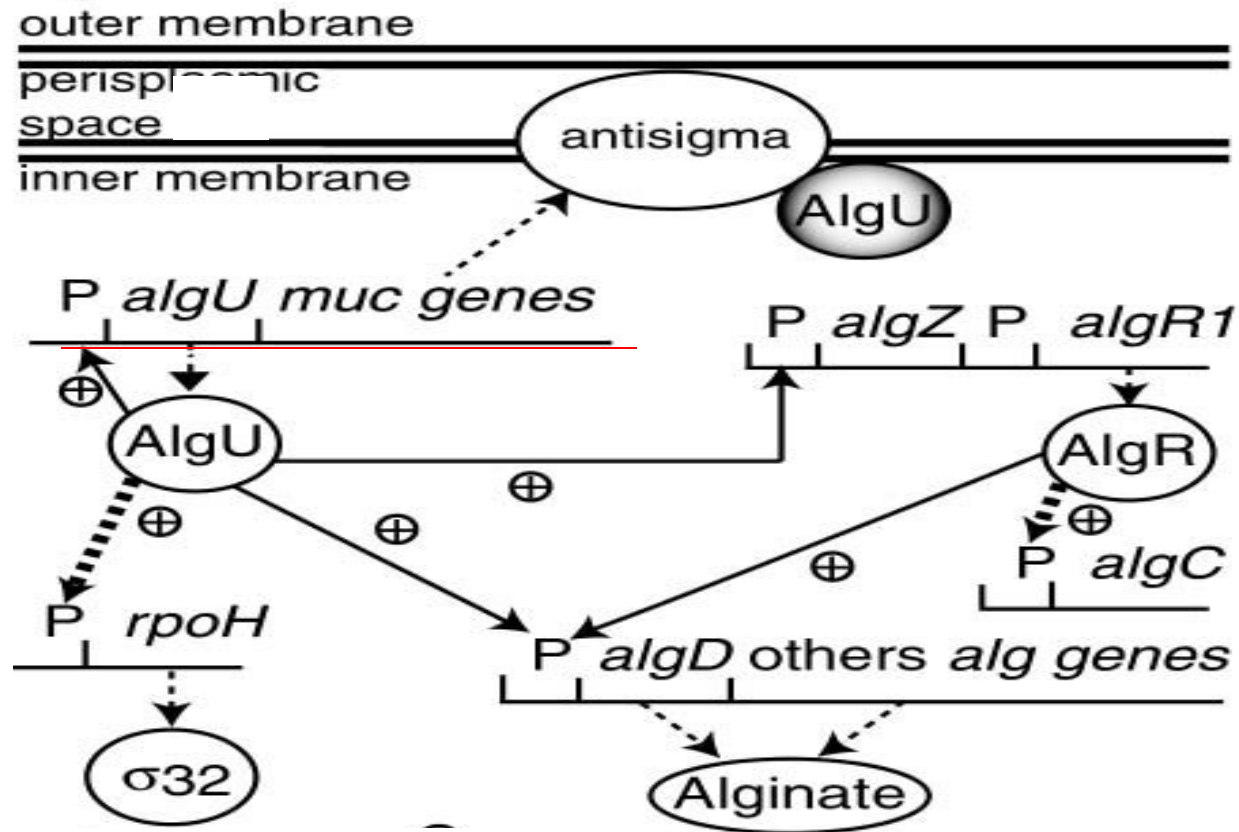
Dans tous ces cas, elles résultent du fonctionnement d'un **circuit de rétroaction positif**, au niveau du réseau de régulation du processus en cause, ce qui avait été prévu et théorisé dès 1981 par R.Thomas.

Il a été conjecturé (1), puis démontré mathématiquement (2) que **l'existence d'un circuit de régulation positive dans un système d'interactions non linéaires est une condition nécessaire** (quoique non suffisante) de **multistationnarité**, tandis qu'un circuit de rétroaction négatif est une condition nécessaire d'homéostasie avec ou sans oscillations. .

1) Thomas, R. (1981) On the relation between the logical structure of systems and their ability to generate multiple steady states or sustained oscillations. Springer Series in Synergies 9 : 180-193

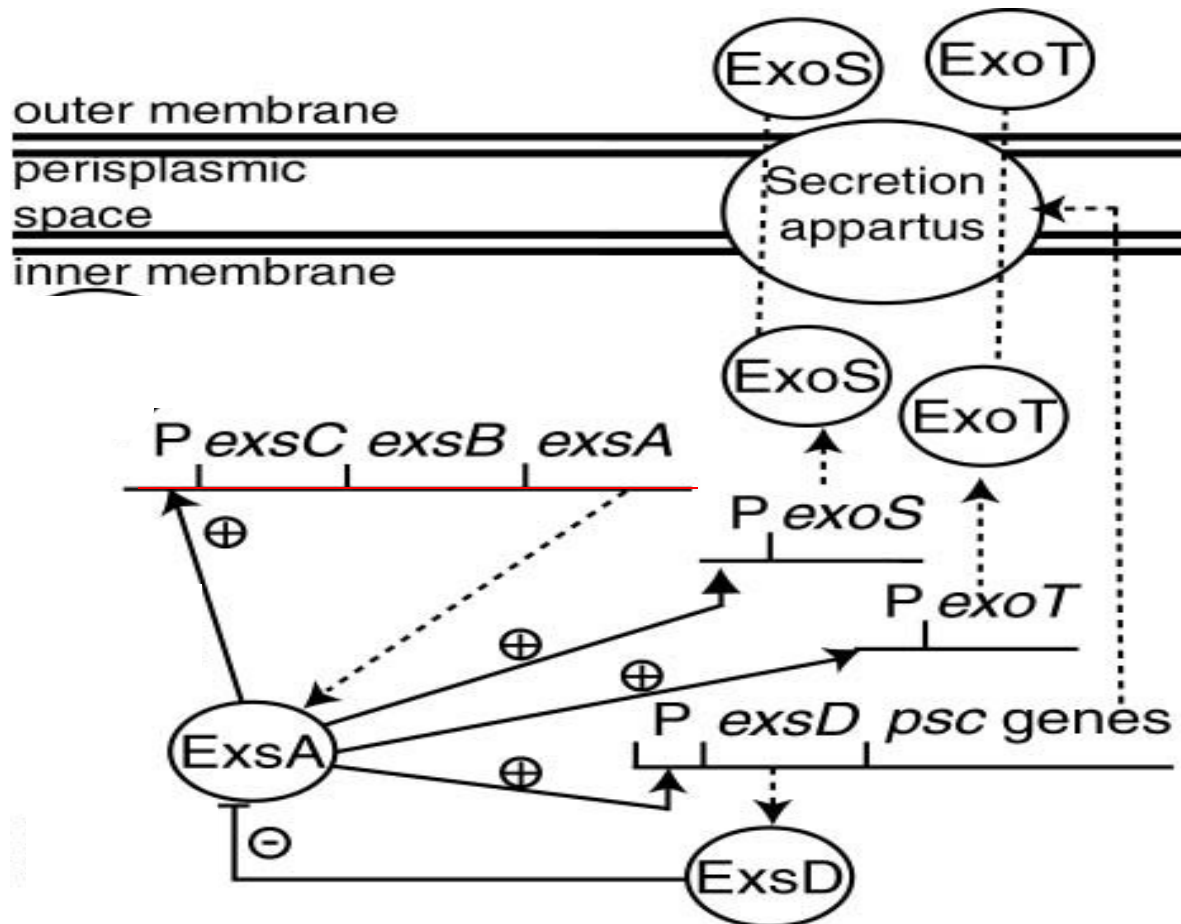
2) Plahte, E., Mestl T., & Omholt S.W. (1995). *J Biol Syst* 3, 409-413 ; Snoussi, E. H. (1998). *J Biol Syst* 6, 3-9 ; Cinquin, O., and Demongeot, J. (2001). *J. Theor. Biol.* 216, 229 ; **Soulé, C. (2003) Graphic requirements for multistationarity. *Complex/Us* 1:123-133**

# Le réseau de régulation transcriptionnelle qui contrôle la mucoidie chez *P.aeruginosa*



# Le réseau de régulation transcriptionnelle qui régule la synthèse du sécréton III

La sécrétion des toxines et la formation de l'appareil de sécrétion requièrent le contact avec la cellule hôte qui peut être remplacé par une déplétion calcique du milieu (DC).

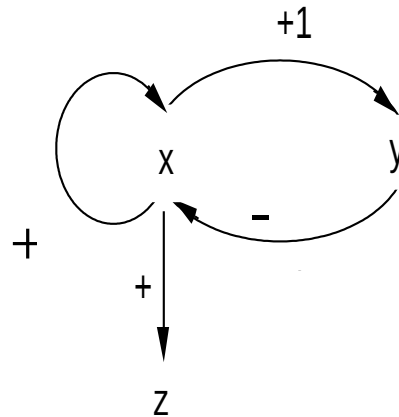


Dans les deux cas, l'étude du réseau de régulation des gènes impliqués, montre la présence d'une boucle de régulation positive (autorégulation) qui permet, en s'appuyant sur le théorème de multistationnarité de René Thomas, de poser l'hypothèse de la nature épigénétique de ces modifications.

X= AlgU

Y = antisigma Muc  
ABD

Z-= production de  
mucus



X= ExsA

Y = ExsD

Z-= sectréton III et  
toxines

On peut tracer, en simplifiant au maximum, dans les deux cas le même graphe formel du réseau de régulation représentant ce circuit positif, et un circuit négatif qui lui est lié



Cette hypothèse, qui, dans le cas de la mucoïdie, va à l'encontre de l'hypothèse admise (mutation), **doit cependant être prise en considération car si elle est vérifiée elle permettrait d'envisager une stratégie thérapeutique nouvelle**, ce qui est très important si on se souvient que cette bactérie est la principale cause de mortalité de la mucoviscidose, à cause de sa résistance aux antibiotiques.

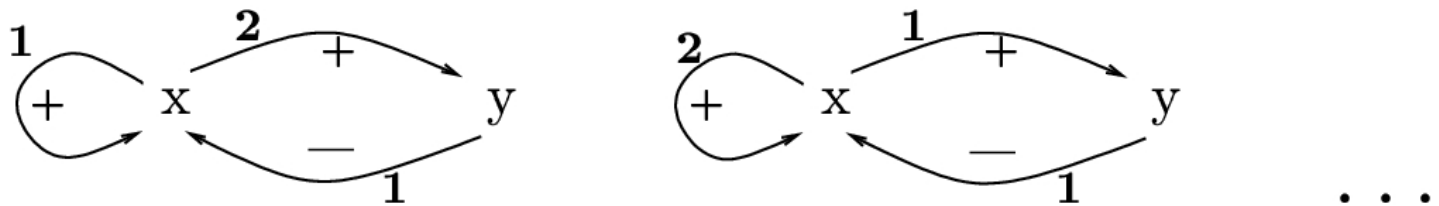
**Il est donc extrêmement important d'être capable de valider cette hypothèse en s'entourant du maximum de garanties.**

**Tel est le sens de la collaboration avec l'équipe de bioinformatique**

# Modèles *et* Formules

- Des connaissances et/ou des hypothèses biologiques on extrait :

- **des schémas de modèles :**



- **des propriétés :**

« *Sans stimuli, si  $x$  est à son niveau basal, il  $y$  reste* » .

- **Vérifier** ces connaissances et/ou ces hypothèses de manière assistée par ordinateur  $\Rightarrow$  **formaliser** les modèles et les propriétés.
- Utiliser une *logique formelle*, avec des ensembles de formules  $\Phi$

- Les *propriétés* comportementales ( $\Phi$ ) sont aussi importantes que les modèles (M)
- La modélisation n'a de sens qu'accompagnée de l'*atteignabilité* et de l'*observabilité* considérées
- Plus elles permettent d'explorer le modèle, plus le risque de *réfutation* est grand et plus la modélisation a d'intérêt (Popper)
- Rasoir d'*Occam* : en conséquence plus le modèle est simple (peu de paramètres non observables), plus il a d'intérêt

Les **méthodes formelles** (*syntaxe/sémantique/preuves*) facilitent l'abstraction et donc la simplification des modèles

- Elles assurent la *cohérence* de la modélisation
- Elles permettent d'instrumentaliser la *validation* des modèles
- Elles bénéficient d'un corpus de 30 ans de recherche en informatique

# Les 2 questions à traiter

$$\Phi = \{\varphi_1, \varphi_2, \dots, \varphi_n\} \quad \text{et} \quad M = \begin{array}{c} \text{1} \\ \text{+} \\ \text{x} \xrightarrow{\text{2}} \text{y} \xrightarrow{\text{1}} \text{x} \\ \text{-} \\ \text{1} \end{array} \dots$$

- **Est-il possible que  $\Phi$  et  $M$  ?**

**Cohérence** des connaissances et des hypothèses.

Construire des modèles issus des schémas précédents

satisfaisant  $\Phi$ . ( $\exists ? M \in \mathbf{M} \mid M \models \varphi$ )

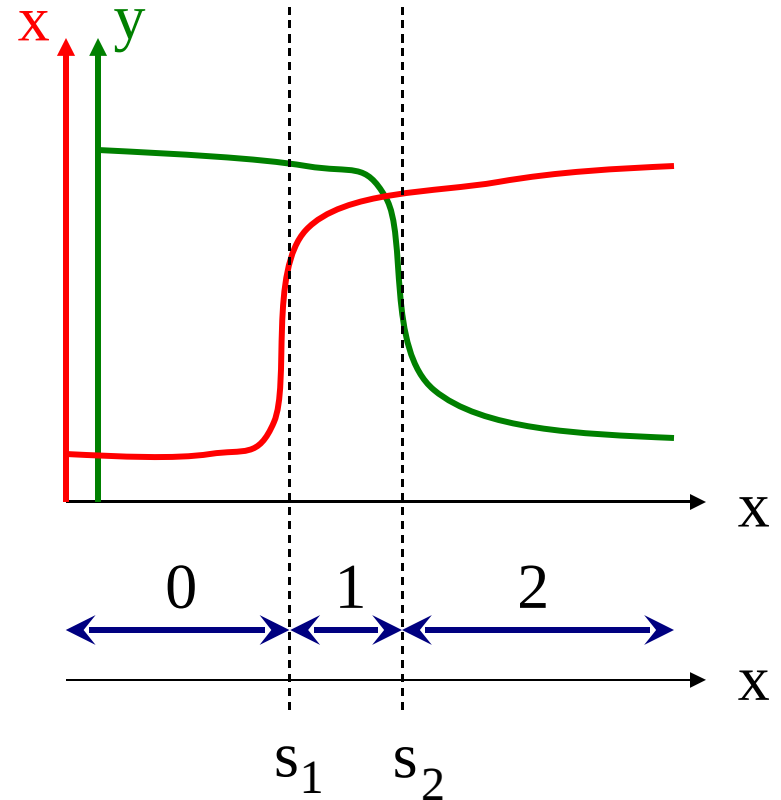
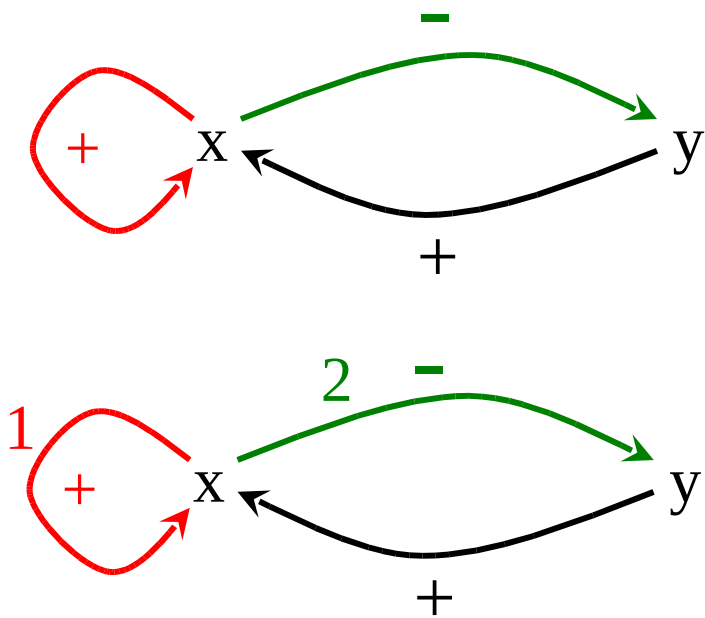
- **Si oui, est-il vrai *in vivo* que  $\Phi$  et  $M$  ?**

Compatibilité d'un des modèles trouvés avec l'objet biologique.

Proposer des plans d'expériences pour le **valider**/tester.

***Preuve et Validation*  $\Rightarrow$  peuvent être assistées par ordinateur**

# Graphe de régulation multivalué



# Formule = Lien modèles-expériences

Les formules ainsi construites sont valides ou invalides par rapport à un ensemble de traces donné partant d'un état donné

Elles peuvent être confrontées à l'ensemble des traces possibles du modèle théorique

Elles peuvent être confrontées à l'ensemble des expériences connues

*Elles font donc le lien entre modèles et objets biologiques*

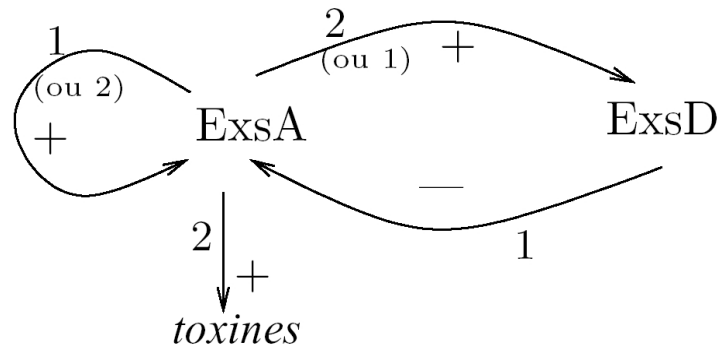
# Méthode par model checking et test

- Tracer tous les **réseaux de régulations** avec toutes les combinaisons de seuils possibles
- Formaliser en CTL les **propriétés** comportementales connues et les **hypothèses** (boucles fonctionnelles...)
- Engendrer automatiquement tous les graphes de régulation possibles (K...)
- Les **confronter** par **model checking** – retenir les modèles rescapés
- S'il n'en reste aucun alors remettre en cause les hypothèses

S'il en reste passer à la question 2 : chercher les conséquences révélatrices qui peuvent donner lieu à des **expériences**

Actuellement, limitation : détermination des paramètres K qui mènent à des modèles cohérents avec les propriétés

# Cohérence de l'hypothèse épigénétique



- Les 2 états stables :

$$(ExsA = 2) \Rightarrow AX AF (ExsA=2)$$

$$(ExsA = 0) \Rightarrow AG (\neg(ExsA=2))$$

**Question 1, cohérence** : prouvée par **Model Checking**

→ 8 modèles parmi 648, extraits par notre logiciel dédié  
SMBioNet

**Question 2, et *in vivo* ? ...**



# Validation de l'hypothèse épigénétique

Question 2 = valider *in vivo* la stabilité des deux états

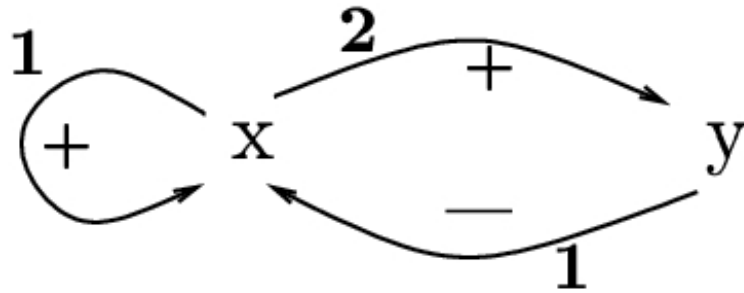
Etat non cytotoxique :  $(EXsA = 0) \Rightarrow AG (\neg(ExsA=2))$

*Une bactérie ayant son niveau basal de ExsA ne deviendra pas cytotoxique spontanément : validé au quotidien*

Etat cytotoxique :  $(EXsA = 2) \Rightarrow AX AF (ExsA=2)$

On peut générer les plans d'expérience automatiquement

# Réseau de régulation



Niveau basal :  $K_x$

X aide :  $K_{x,x}$

Y absent aide :  $K_{x,y}$

Les deux :  $K_{x,xy}$

$K_y$

$Y_{y,x}$

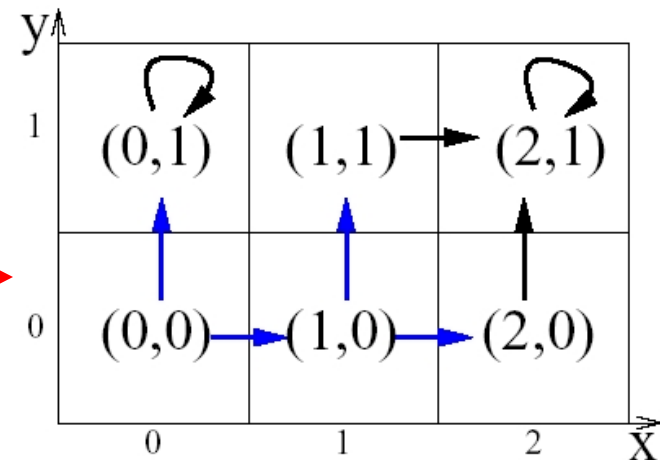
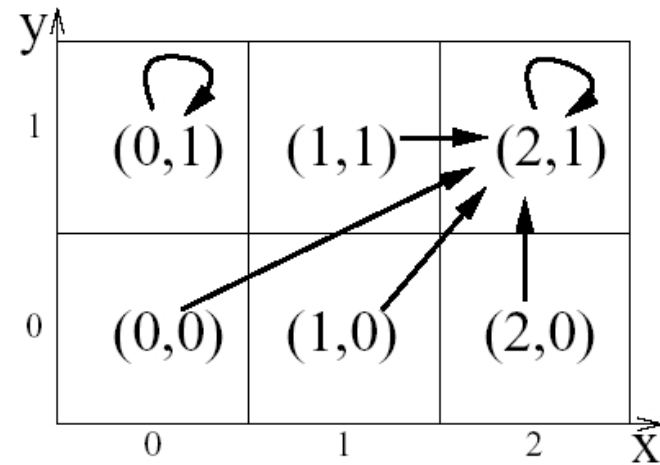
(x,y)	Attracteur
(0,0)	$(K_{x,y}^S, K_y)$
(0,1)	$(K_x, K_y)$
(1,0)	$(K_{x,xy}, K_y)$
(1,1)	$(K_{x,x}, K_y)$
(2,0)	$(K_{x,xy}, K_{y,x})$
(2,1)	$(K_{x,x}, K_{y,x})$

En tenant compte des deux graphes, il y a **648** modèles différents pour toutes les combinaisons de K possibles.

# Réseau de régulation → graphe d'états

Soit un des 648 cas possibles

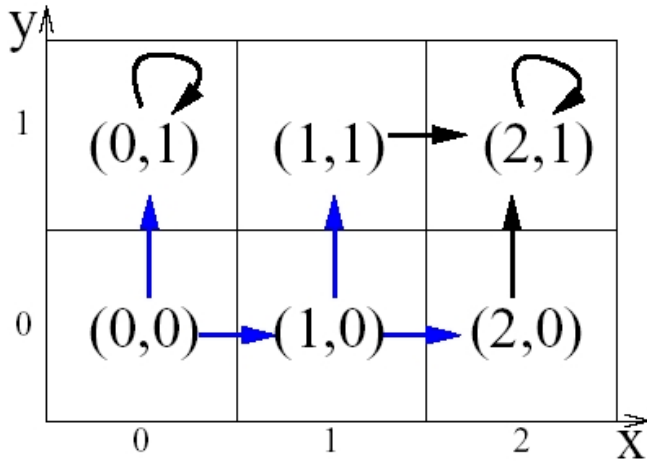
(x,y)	Attracteurs
(0,0)	$(K_{x,y}, K_y) = (2, 1)$
(0,1)	$(K_x, K_y) = (0, 1)$
(1,0)	$(K_{x,xy}, K_y) = (2, 1)$
(1,1)	$(K_{x,x}, K_y) = (2, 1)$
(2,0)	$(K_{x,xy}, K_{y,x}) = (2, 1)$
(2,1)	$(K_{x,x}, K_{y,x}) = (2, 1)$



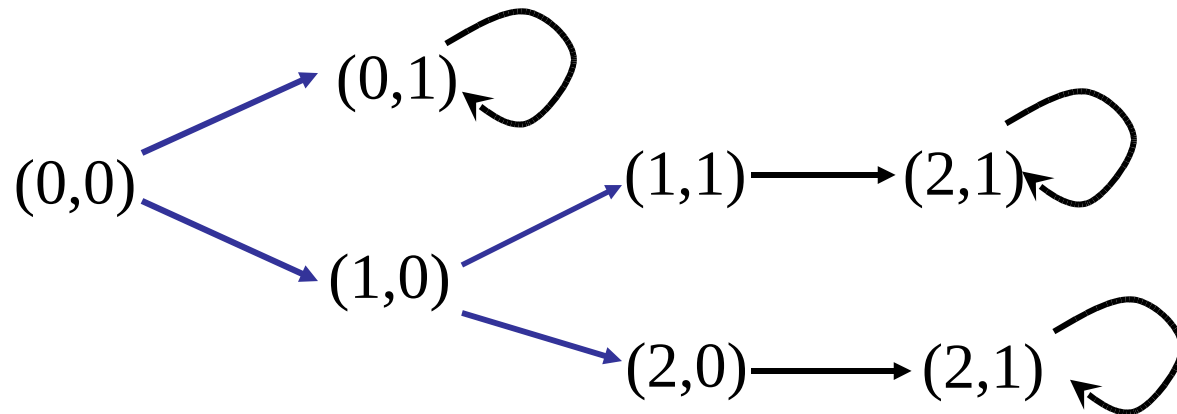
« **Désynchronisation** »  
Par unités de distance Manhattan

Arbre des traces.

# Arbre des traces



A partir d'un état initial :



# Formule = Lien modèles-expériences

Les formules ainsi construites sont valides ou invalides par rapport à un ensemble de traces donné partant d'un état donné

Elles peuvent être confrontées à l'ensemble des traces possibles du modèle théorique

Elles peuvent être confrontées à l'ensemble des expériences connues

*Elles font donc le lien entre modèles et objets biologiques*

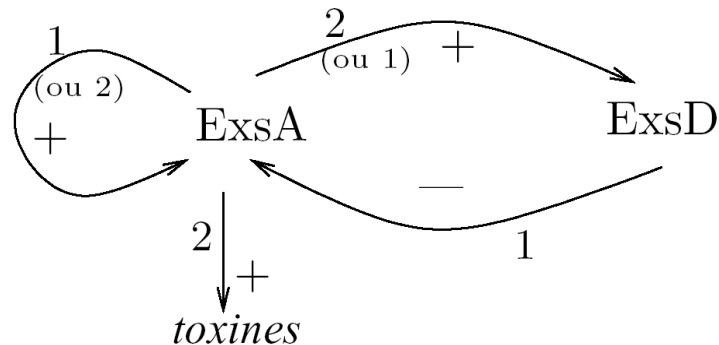
# Méthode par model checking et test

- Tracer tous les réseaux de régulations avec toutes les combinaisons de seuils possibles
- Formaliser en CTL les propriétés comportementales connues et les hypothèses (boucles fonctionnelles...)
- Engendrer automatiquement tous les graphes de régulation possibles (K...)
- Les confronter par model checking – retenir les modèles rescapés
- S'il n'en reste aucun alors remettre en cause les hypothèses

S'il en reste passer à la question 2 : chercher les conséquences révélatrices qui peuvent donner lieu à des expériences

Actuellement, limitation : détermination des paramètres K qui mènent à des modèles cohérents avec les propriétés

# Cohérence de l'hypothèse épigénétique



- Les 2 états stables :

$$(ExsA = 2) \Rightarrow AX AF (ExsA=2)$$

$$(ExsA = 0) \Rightarrow AG (\neg(ExsA=2))$$

**Question 1, cohérence** : prouvée par **Model Checking**

→ 8 modèles parmi 648, extraits par notre logiciel dédié  
SMBioNet

**Question 2, et *in vivo* ? ...**

# Validation de l'hypothèse épigénétique

Question 2 = valider *in vivo* la stabilité des deux états

Etat non cytotoxique :  $(EXsA = 0) \Rightarrow AG (\neg(ExsA=2))$

*Une bactérie ayant son niveau basal de ExsA ne deviendra pas cytotoxique spontanément : validé au quotidien*

Etat cytotoxique :  $(EXsA = 2) \Rightarrow AX AF (ExsA=2)$

On peut générer les plans d'expérience automatiquement



$(\text{ExsA}=2) \Rightarrow \text{AX AF (toxines}=1)$

$A \Rightarrow B$	<i>Vrai</i>	<i>Faux</i>
<i>Vrai</i>	Vrai	Faux
<i>Faux</i>	Vrai	Vrai

**Karl Popper :**

Valider = tenter de réfuter

*Donc A faux ne sert à rien*

Donc commencer par un pulse

Le pulse permet d'atteindre l'état initial  $\text{ExsA}=2$ .

Sinon, il aurait fallu établir un **lemme** :

$(\text{ExsA}=2) \Leftrightarrow (\text{qqchose contrôlable})$

Forme générale d'un test:

$(\text{qqchose } \underline{\text{atteignable}}) \Rightarrow (\text{qqchose } \underline{\text{observable}})$

L'expérience a pu être réalisée, et a donné des résultats conformes à l'hypothèse (résultats soumis pour publication).

L'utilisation de cette méthode bio-informatique permet de poser le concept de **similitude dynamique** pour comparer des réseaux de régulation du point de vue du nombre et de la nature des états stables fonctionnels qu'ils sont susceptibles de générer.

Ceci suppose trois étapes.

- 1) Déceler l'existence d'un **motif** comprenant un circuit de rétroaction positif dans un sous-réseau de régulation, qui permet de poser l'hypothèse d'une dynamique multistationnaire..
- 2) Chercher le **modèle minimum** correspondant, et **calculer**, (quelle que soit la méthode, mais la méthode informatique proposée ici est parfaitement adaptée) s'il existe des paramètres correspondants à l'hypothèse dynamique .
- 3) proposer, puis réaliser une **expérimentation** permettant de valider l'hypothèse.

La méthode formelle proposée ici permet aussi d'aider à formuler une telle proposition d'expérience.

# L'atelier observabilité du *programme Epigénomique* du génopole d'Evry

Avec la participation de

Marcelline Kaufman, **ULB**

Gilles Bernot, Jean-Paul Comet, et Adrien Richard **LaMI, CNRS**  
**UMR 8042, Université d'Évry-Val-d'Essonne,**

Et

Annabelle Mérieau, Janine Guespin-Michel, **Laboratoire de**  
**microbiologie du Froid, faculté des sciences de Rouen**

Benoît Polack et Didier Filopon **GREPI EA 2938 Université Joseph**  
**Fourier Laboratoire d'Hématologie, CHU de Grenoble,**

Christian Hullen **Laboratoire de biologie Université de Cergy Pontoise**