
MUTATIONS SPONTANÉES OU INDUITES ?

Jean LEFORT
Irem de Strasbourg

C'est au début des années 1940 que des expériences démontrèrent définitivement que les mutations apparaissent spontanément et de façon aléatoire lors de la division cellulaire et ne sont en aucune façon liées à un changement environnemental ou à une pression de l'environnement.

Mais au delà des expériences elles-mêmes, c'est la façon dont elles ont été interprétées avec le travail théorique qui a suivi qui a permis de conclure de façon certaine que les mutations apparaissent de façon aléatoire, ce qui est devenu la pierre angulaire de toute la théorie de l'évolution : l'environnement intervient dans un deuxième temps en favorisant telle ou telle mutation.

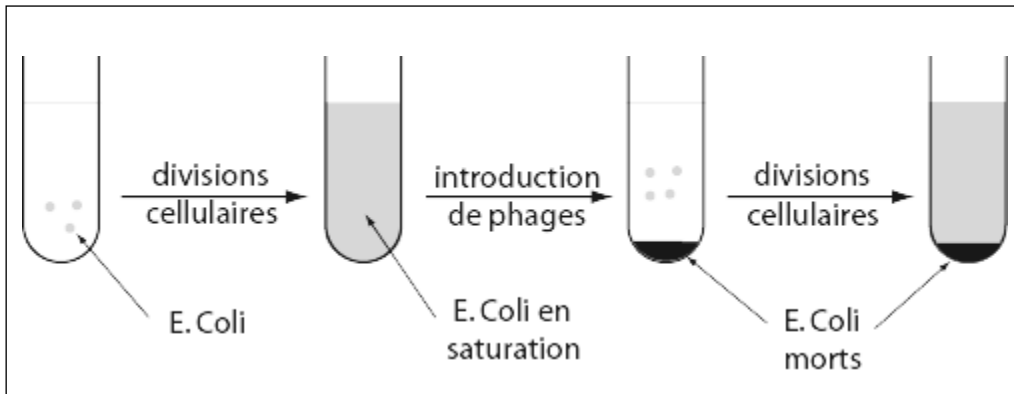
C'est aux chercheurs Salvador Luria (pour la partie pratique) et Max Delbrück (pour la partie théorique) que l'on doit la première

démonstration de ce fait, publiée en 1943 [1]. Pour ces travaux et d'autres, ils reçurent en 1969, avec Alfred Hershey, le prix Nobel de physiologie ou médecine. C'est une étude simplifiée de leur travail qui est proposée ici.

Les expériences initiales

Les expériences font intervenir des bactéries, en l'occurrence *Escherichia Coli*, une bactérie commensale de l'intestin humain, bactérie à tout faire des biologistes en raison, entre autres choses, de la rapidité de sa division cellulaire (environ 20 minutes à 37° dans un milieu riche dont différents types ont été testés). Face à ces bactéries on dispose de bactériophages (ou phages) qui, comme leur nom l'indique sont des virus qui attaquent les bactéries en les pénétrant, en s'y multipliant et en les détruisant.

MUTATIONS SPONTANÉES
OU INDUITES ?



Dans un milieu nutritif idoine on place quelques bactéries *E. Coli* qu'on laisse se multiplier. Cette multiplication se traduit par une opacité progressive du milieu. Quand la population de bactéries est suffisamment dense on ajoute des bactériophages. Rapidement le milieu redevient transparent car les bactéries mortes sédimentent au fond. Cependant, malgré la présence des virus, le milieu redevient trouble puis opaque au bout de quelques jours, preuve que certaines bactéries ont non seulement survécues mais qu'elles sont résistantes à l'attaque des virus toujours présents dans le milieu et surtout que cette résistance est un caractère acquis qui se transmet à la descendance des bactéries qui ont cette capacité. En effet si on prélève une bactérie résistante et qu'on recommence l'expérience précédente on constate que les bactéries ne meurent pas quand on introduit les phages.

Deux interprétations possibles

Il y a essentiellement deux interprétations possibles de ce phénomène.

1°) Hypothèse de mutations spontanées : Lors de chaque division cellulaire, il y a une pro-

babilité p qu'il se produise une mutation de la bactérie qui la rende résistante au phage, cette mutation se transmettant à tous ses descendants.

2°) Hypothèse d'acquisition de l'immunité : Lors de l'attaque par les phages, il y a une probabilité p' qu'une bactérie survive ce qui lui confère alors une immunité qui se transmet à tous ses descendants.

Ceci est une vision assez simple de toutes les interprétations possibles.

Dans la première hypothèse, on ne voit pas pourquoi il ne pourrait pas y avoir de mutation inverse, c'est-à-dire qu'une bactérie immunisée devienne sensible. En fait cette probabilité de mutation inverse devrait *a priori* être du même ordre de grandeur que la probabilité de la mutation directe. Nous verrons que l'on peut alors négliger cet aspect.

Dans la deuxième hypothèse on peut également se demander pourquoi certaines bactéries résistent : est-ce en raison de l'endroit où le virus s'introduit ou bien est-ce en raison de prédispositions dues à des variations

individuelles, prédispositions qui deviendraient héréditaires après l'attaque par les bactériophages ? Mais il n'était pas question de trancher entre ces diverses raisons, tout au moins dans un premier temps.

Dans les deux hypothèses, on suppose que la probabilité qui apparaît est indépendante du temps. C'est une supposition crédible si les conditions des expériences sont identiques d'une fois à l'autre ce qui est d'autant plus facile à assurer que l'on peut mener de nombreuses expériences en parallèle et que celles-ci durent deux ou trois jours au maximum.

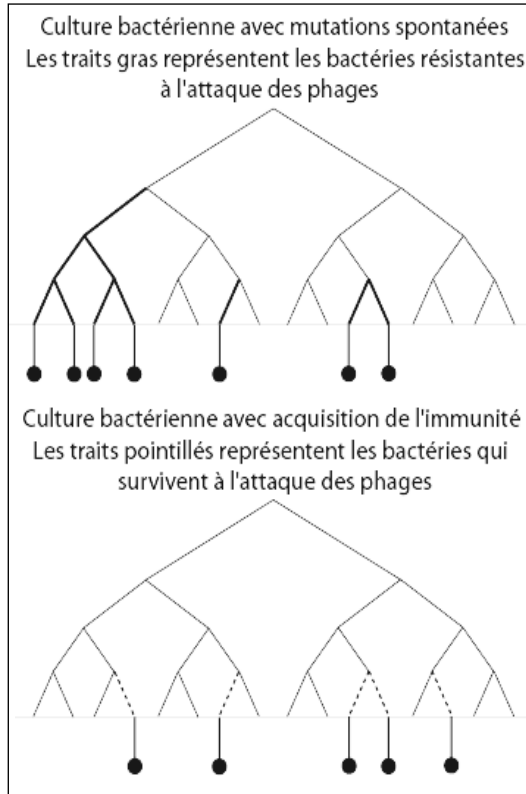
La question est alors de trouver une méthode pour déterminer laquelle des deux hypothèses est la bonne.

Comment trancher entre les interprétations ?

Une première idée :

Dans les deux hypothèses, il faut tenir compte du fait que les descendants d'une bactérie résistante le sont également. Or il faut bien comprendre que ces descendants partagent avec leur ancêtre des caractères communs.

Dans le cadre de la première hypothèse de mutations spontanées, la mutation a pu avoir lieu à n'importe quelle génération et par suite si on peut regrouper les bactéries survivantes en fonction de leurs caractères communs, on doit trouver des groupes de taille très variée tandis que dans la deuxième hypothèse de mutations dirigées par l'attaque des virus, on doit trouver des groupes de taille voisine. Malheureusement ce type d'étude est infaisable, d'une part en raison des difficultés de manipulation des bactéries une à une et d'autre part de la très faible proportion de bactéries résistantes.



Une deuxième idée :

Dans le cadre de l'hypothèse de mutations spontanées, la proportion de bactéries résistantes devrait s'accroître avec le temps car de nouveaux mutants s'ajoutent constamment au fur et à mesure que la culture se développe. Au contraire, dans la seconde hypothèse on doit s'attendre à un taux constant de bactéries résistantes, du moins tant que les conditions physiologique de la culture ne changent pas.

Pour tester ce point, des déterminations précises de la proportion de bactéries résis-

MUTATIONS SPONTANÉES
OU INDUITES ?

tantes dans les cultures furent entreprises. Curieusement on trouva de très grandes variations de cette proportion à tel point que l'on se demanda si les conditions de l'expérience étaient réellement reproductibles d'un jour à l'autre ce qui aurait ruiné définitivement toute tentative d'explication.

En fait les auteurs réalisèrent que ces fluctuations n'étaient pas dues à l'existence d'un paramètre échappant à leur contrôle mais étaient au contraire la conséquence du fait que les mutations avaient lieu de façon spontanée ce qui accréditait la première hypothèse.

Comment compter les bactéries ?

Quand il y a très peu de bactéries, il est facile de les compter sous microscope.

Sinon on prend un échantillon de la culture, un centième ou un millième ou... sur lequel la procédure précédente de comptage sous microscope est possible et on multiplie le résultat par cent ou mille ou... C'est ainsi que les cultures de bactéries se font sur un milieu nutritif en partant d'un nombre connu de 50

à 500 bactéries. Le nombre de bactéries dans la culture au moment de l'introduction des phages est de l'ordre de 10^8 à 5×10^9 par cm^3 . La proportion de bactéries résistantes est de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-5} .

Quand on cultive des bactéries résistantes et qu'on les met en contact avec des phages, il n'y a aucune augmentation de la quantité de phage ce qui implique que le taux de mutation inverse est nul ou du moins insignifiant.

On peut vérifier que cette façon de compter à partir d'un échantillon est valable en prenant une dizaine d'échantillons dans la même culture et en comparant les résultats. *A priori*, cet échantillonnage repose sur une loi binomiale. Si N est le nombre total de bactéries et p la probabilité de présence d'une bactérie mutée, la moyenne (ou l'espérance) vaudra Np et la variance $Np(1-p)$. Étant donné la petitesse de p on peut considérer qu'espérance et variance sont identiques (ce qui revient à remplacer la loi binomiale par une loi de Poisson). C'est effectivement ce que l'on obtient comme le montre le tableau ci-dessous.

Échantillon n°	Nombre de bactéries résistantes		
	Expérience n° 10a	Expérience n° 11a	Expérience n° 3
1	14	46	4
2	15	56	2
3	13	52	2
4	21	48	1
5	15	65	5
6	14	44	2
7	26	49	4
8	16	51	2
9	20	56	4
10	13	47	7
Moyenne	16,7	51,4	3,3
Variance	16,4	34,8	3,0

Une étude statistique plus poussée montre que même l'échantillonnage de l'expérience n° 11a entre dans la variabilité attendue et que l'on peut estimer que moyenne (espérance) et variance sont égales aux approximations statistiques près.

Un peu de théorie

Partons d'un nombre N_0 de bactéries et supposons, pour simplifier, que les générations se succèdent à intervalle régulier de t minutes que nous prendrons comme unité de temps, ce qui permet d'identifier le temps t avec la génération t , t étant un naturel. A chaque génération le nombre total de bactéries double et par suite, en désignant par $N(t)$ ce nombre total, nous avons $N(t) = N_0 2^t$. Nous supposons que l'expérience s'arrête à l'instant (ou à la génération) T .

Voyons alors ce qui se passe si on se place dans le cadre de la deuxième hypothèse, à savoir que l'immunité s'acquière au contact des bactériophages et que cette immunité concerne une proportion de p' individus. Alors les $R(t)$ bactéries survivantes au temps t forment un échantillon aléatoire auquel nous pouvons appliquer la loi binomiale. Nous aurons donc pour l'espérance et la variance :

$$E(R(t)) = N(t) p'$$

$$V(R(t)) = N(t) p' (1 - p') = N(t) p' = E(R(t)),$$

car $p' \ll 1$. Ceci est valable pour tout t et en particulier pour T .

Plaçons-nous ensuite dans le cadre de la première hypothèse, à savoir que des mutations spontanées ont lieu lors de la division cellulaire, avec une probabilité p à chaque génération, mutations donnant une immunité face aux bactériophages. Notons $X(t)$ le nombre de mutation qui ont lieu à l'instant t . Ces nou-

velles mutations s'appliquent à l'ensemble des bactéries qui n'ont pas muté et dont le nombre n'est pas tout à fait $N(t)$, mais comme p est très petit, on peut identifier ce nombre à $N(t)$. Ces mutations suivent une loi binomiale et par suite :

$$E(X(t)) = N(t) p = 2^t N_0 p$$

$$V(X(t)) = N(t) p (1-p)$$

Considérons maintenant la quantité $Y_T(t)$ qui est le nombre de mutants issus de la génération t et qui sont présents à l'instant T , c'est-à-dire à la fin de l'expérience. On a clairement :

$$Y_T(t) = 2^{T-t} X(t)$$

$$E(Y_T(t)) = 2^{T-t} E(X(t))$$

$$V(Y_T(t)) = 2^{2(T-t)} V(X(t))$$

Il est naturel de faire l'hypothèse d'indépendance de ces variables pour deux valeurs distinctes de t . Moyennant quoi la variance de la somme de deux telles variables sera la somme des variances. Si on note $Z(T)$ le nombre final de mutants on a alors :

$$Z(T) = \sum_{t=1}^T Y_T(t) = \sum_{t=1}^T 2^{T-t} X(t)$$

$$\begin{aligned} E(Z(T)) &= \sum_{t=1}^T E(Y_T(t)) = \sum_{t=1}^T 2^{T-t} E(X(t)) = \\ &= \sum_{t=1}^T 2^T N_0 p = T N(T) p \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} V(Z(T)) &= \sum_{t=1}^T V(Y_T(t)) = \sum_{t=1}^T 2^{2(T-t)} V(X(t)) = \\ &= \sum_{t=1}^T 2^{2(T-t)} N_0 2^t p(1-p) \\ &= \sum_{t=1}^T 2^{2T} N_0 2^{-t} p(1-p) = 2^{2T} N_0 p(1-p) \sum_{t=1}^T 2^{-t} \\ &= 2^T N(T) p(1-p) \left(1 - \frac{1}{2^T}\right) = (2^T - 1) N(T) p(1-p) \end{aligned}$$

Il est alors facile de trancher entre les deux hypothèses en étudiant le rapport entre la variance et l'espérance. Dans la deuxième hypothèse de mutations induites par la présence des phages ce rapport est voisin de 1 tandis que dans la première hypothèse de mutations spontanées au cours de la division cellulaire ce rapport vaut $\frac{2^T-1}{T}(1-p)$ qui est largement supérieur à 1.

Au vu de ces résultats, nous comprenons pourquoi espérance et variance du nombre de bactéries mutantes varient tellement d'une expérience à l'autre. Ces deux quantités dépendent directement du nombre T de générations au cours desquelles il y a des mutations spontanées. Il est vraisemblable qu'au départ, lors des premières générations de bactéries, elles sont trop peu nombreuses pour qu'on y observe des mutations. On peut estimer, *a posteriori*, qu'il faut commencer à compter quand le produit $N(t)p \geq 1$. Ceci montre que la quantité T n'est pas directement accessible et surtout varie beaucoup d'une expérience à l'autre puisque cela dépend de l'instant de la première mutation.

La théorie que nous venons d'élaborer n'est pas celle de Delbrück. C'est une simplification reprise de [2]. Supposer que les bactéries se divisent en cadence toutes en même temps nous permet de travailler avec des probabilités discrètes. On trouvera dans l'article original de Luria et Delbrück [1] les éléments essentiels de leur théorie qui utilise des probabilités continues. La conclusion est cependant rigoureusement la même :

In the beginning of this theoretical discussion we pointed out that the hypothesis of acquired immunity leads to the prediction of a distribution of the number of resistant bacte-

*ria according to Poisson's law, and therefore to the prediction of a variance equal to the average. On the other hand, [...] equation [...] shows that the likely ratio between variance and average is much greater than unity on the hypothesis of mutation if [...] the total number of mutations which occurred in our cultures [...] is large compared to unity!*¹

Les résultats

Nous donnons ci-contre quelques résultats extraits de [1] ; il s'agit de compter le nombre de bactéries résistantes dans chaque échantillon de culture.

La moyenne par culture est obtenue en multipliant la moyenne par échantillon par le rapport entre les volumes de la culture et celui de l'échantillon. Il est clair que la taille de l'échantillon influe sur la précision et sur le calcul de la variance. On peut démontrer que cela n'influe en rien sur la conclusion finale.

Évaluation du taux de mutation

Le calcul simplifié que nous avons fait un peu plus haut ne peut donner qu'un ordre de grandeur du taux de mutation si nous connaissons la moyenne et la variance pour un nombre suffisamment grand d'expériences. Luria et Delbrück ont effectivement fait plusieurs centaines d'expériences. Quelques unes d'entre

¹ Au début de cette discussion théorique, nous avons noté que l'hypothèse d'une immunité acquise conduit à prévoir que la distribution du nombre de bactéries résistantes suit une loi de Poisson et par suite à prévoir que la variance est égale à la moyenne. D'un autre côté, dans le cadre de l'hypothèse des mutations [spontanées], l'équation [...] montre que le rapport probable entre la variance et la moyenne est beaucoup plus grand que 1 dès que le nombre total de mutations qui ont lieu dans nos cultures l'est aussi.

Expérience n°	1	10	11	15	17
Nombre de cultures	9	8	10	10	12
Volume des cultures (cm ³)	10	10	10	10	0,2
Volume des échantillons (cm ³)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,08
Culture n°.					
1	10	29	30	6	1
2	18	41	10	5	0
3	125	17	40	10	0
4	10	20	45	8	7
5	14	31	183	24	0
6	27	30	12	13	303
7	3	7	173	165	0
8	17	17	23	15	0
9	17		57	6	3
10			51	10	48
11					1
12					4
Moyenne par échantillon	26,8	24	62,4	27,2	30,5
Variance	1245	100	3563	2116	6919
Moyenne par culture	5360	4800	12480	5440	76

elles sont regroupées dans le tableau ci-après avec les résultats obtenus. Il y est donné le taux de mutation (la probabilité de mutation à chaque génération) tel qu'il a été calculé par les auteurs dans le cadre de la théorie qu'ils ont développée.

Si nous utilisons la théorie simplifiée, il est facile d'utiliser les données ci-après (tableau de la page suivante) pour trouver une valeur de la probabilité p de mutation. Cela conduit au système suivant pour l'expérience n° 22 :

$$E(Z) = T N(T) p \Rightarrow 2,8 \times 10^8 T p = 40,48$$

$$V(Z) = (2^T - 1) N(T) p (1 - p) \Rightarrow$$

$$2,8 \times 10^8 (2^T - 1) p (1 - p) = 6270 .$$

Ce qui conduit à l'équation en p :

$$2^{\frac{14,46 \times 10^{-8}}{p}} - 1 = \frac{2239,3 \times 10^{-8}}{p(1-p)}$$

dont une solution est voisine de $1,35 \times 10^{-8}$. Un calcul analogue effectué à partir des données de l'expérience n° 23 conduit à une valeur de p voisine de $1,05 \times 10^{-8}$.

Ces résultats sont sensiblement moitié des valeurs calculées à l'aide d'une théorie plus sophistiquée et qui sont données par les auteurs de la recherche.

MUTATIONS SPONTANÉES
OU INDUITES ?

Expérience n°	22	23		
Nombre de cultures	100	87		
Volume des cultures (cm ³)	0,2	0,2		
Volume des échantillons (cm ³)	0,05	0,2		
	<i>Nombre de bactéries résistantes</i>	<i>Nombre de cultures</i>	<i>Nombre de bactéries résistantes</i>	<i>Nombre de cultures</i>
	0	57	0	29
	1	20	1	17
	2	5	2	4
	3	2	3	3
	4	3	4	3
	5	1	5	2
	6-10	7	6-10	5
	11-20	2	11-20	6
	21-50	2	21-50	7
	51-100	0	51-100	5
	101-200	0	101-200	2
	201-500	0	201-500	4
	501-1000	1	501-1000	0
Moyenne par échantillon	10,12		28,6	
Variance corrigée	6270		6431	
Moyenne par culture	40,48		28,6	
Nombre de bactéries par culture	$2,8 \times 10^8$		$2,4 \times 10^8$	
Taux de mutation	$2,3 \times 10^{-8}$		$2,37 \times 10^{-8}$	

Conclusion

Le but de cet article était de montrer que des calculs élémentaires (pratiquement de niveau lycée) permettaient de comprendre la façon dont avait été conduite une recherche qui devait aboutir à une découverte remarquable ayant valu le prix Nobel à leurs auteurs. Il n'était pas question, dans ce cadre, d'évaluer les

erreurs commises et d'obtenir la précision qui fut celle des chercheurs. Il suffit, à ce niveau, de voir que les ordres de grandeurs sont respectés, ce qui est le cas. Dans le même esprit, le détail exact des protocoles utilisés n'a pas été présenté. Ces protocoles exigent une rigueur de tout instant et sont des classiques des laboratoires.

Bibliographie :

- [1] S. Luria et M. Delbrück, Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus résistance, *Genetics* 28 (1943), 491–511. (Téléchargeable sur le site <http://www.genetics.org>).
- [2] Ellen Baake, The Luria-Delbrück experiment : are mutations spontaneous or directed ? *Newsletter of Europ. Math. Soc.* 69 (sept 2008), 17–20.