# Expression stochastique des gènes, différenciation cellulaire et cancer

Jean-Jacques Kupiec
Centre Cavaillès, ENS-Paris

**Institut Bordet**
**23/04/2016**

# Plan de l’exposé

**1) Pointer une des limites du réductionnisme en biologie**

**2) Exposer un modèle de différenciation cellulaire basé sur l’expression stochastique des gènes**

**3) Montrer des résultats de simulations numériques de ce modèle qui suggèrent une nouvelle manière d’envisager le cancer**

*Flux d'information génétique unidirectionnel allant de l'ADN vers le phénotype*

**ADN**

↓

**Protéines**

↓

**Interactions protéiques**

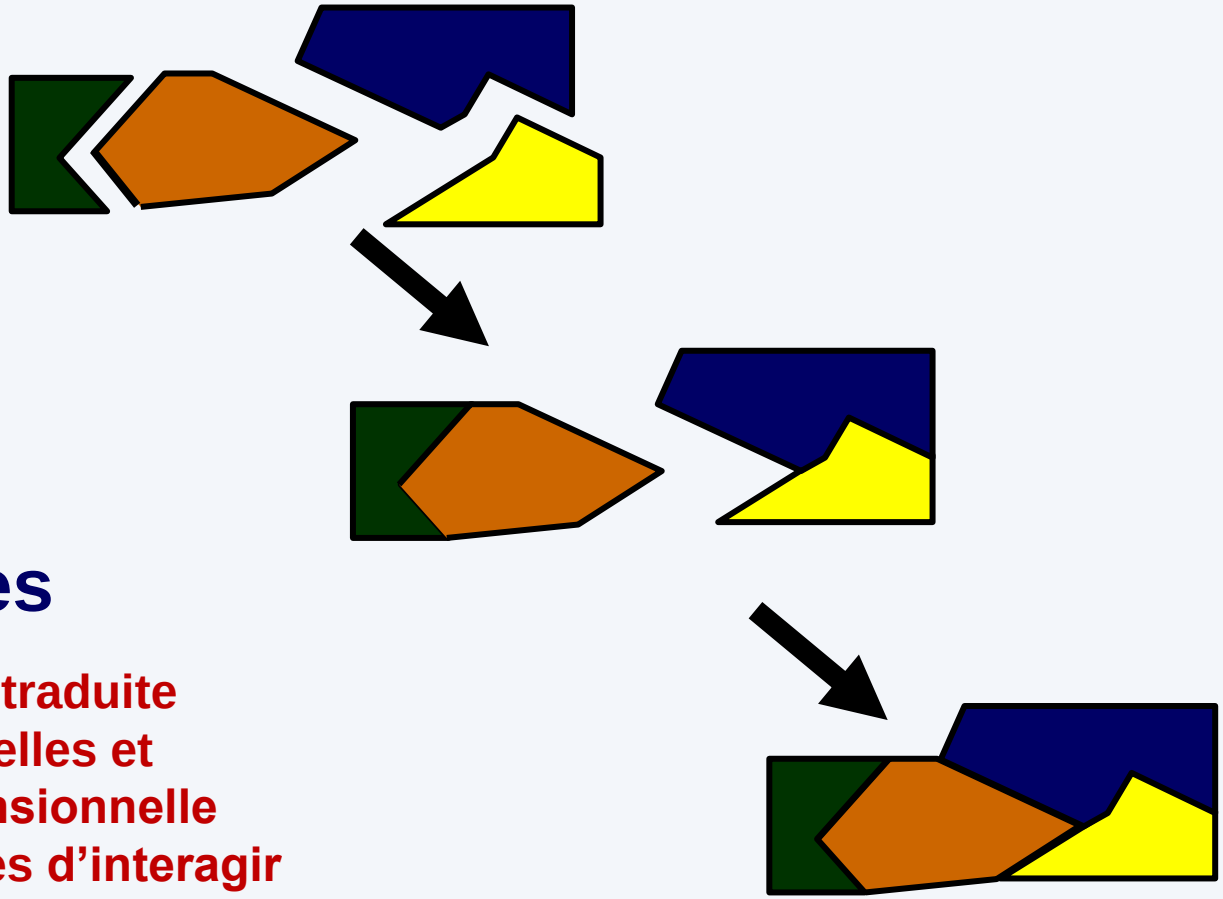
↓

**Phénomènes cellulaires et tissulaires**

# Paradigme réductionniste

**(Crick, 1957; Monod, 1970)**

# Comment l'information génétique est-elle transformée en structures et processus matériels qui constituent les êtres vivants et qui mettent en jeu des protéines ?



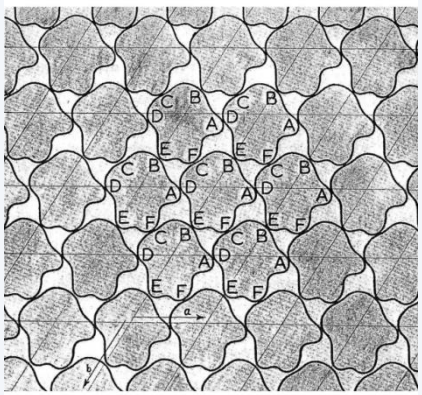
## interactions stéréospécifiques

**l'information génétique est traduite en protéines tridimensionnelles et c'est leur structure tridimensionnelle qui permettent aux protéines d'interagir spécifiquement, de manière déterminée selon l'information génétique, en excluant le hasard.**

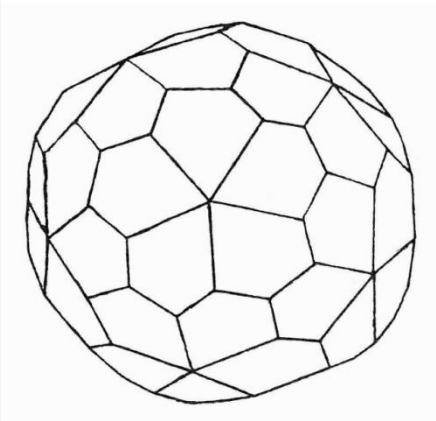
# Auto-assemblage stéréospécifique

(Caspar et Klug, 1962)

A




B



# Généralisation à l'ensemble des processus cellulaires dont l'expression des gènes et la signalisation (Monod et Jacob, 1961)

***Un gène est activé ou réprimé selon qu'une protéine activatrice ou répressive interagit spécifiquement avec son promoteur***

**La propriété de stéréospécificité des protéines est fondamentale parce que c'est elle qui permet le fonctionnement du programme génétique**

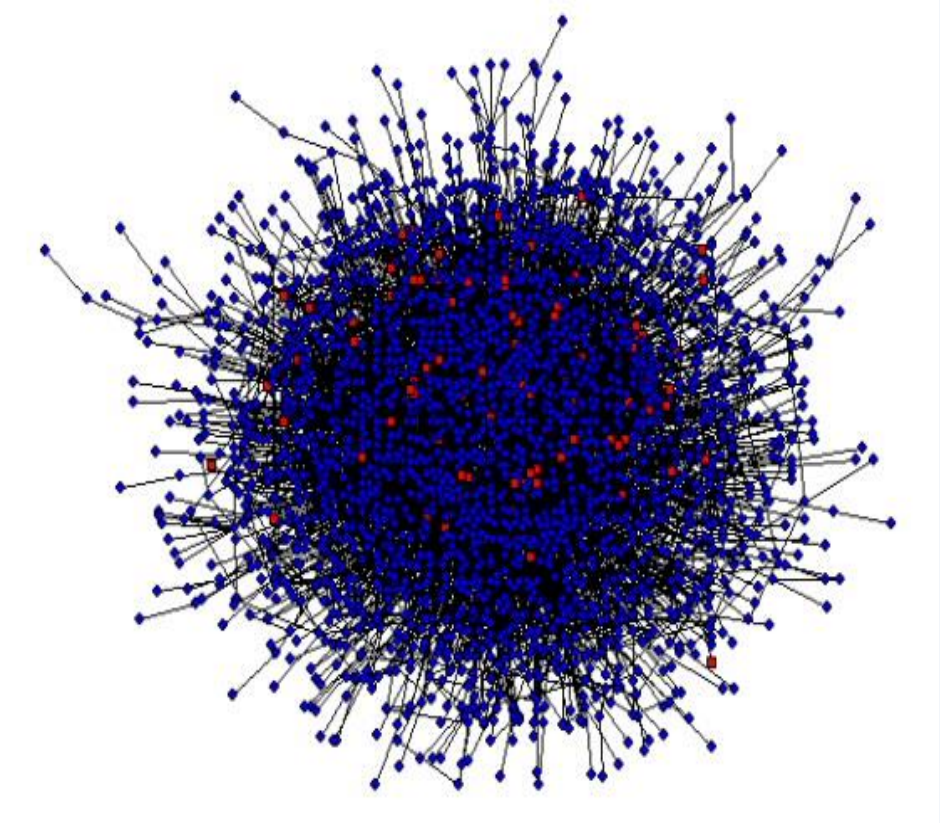
**Les réseaux de gènes et de protéines (programme génétique) contrôlent le fonctionnement des cellules**

## Conséquence pour un programme de recherche :

***Pour expliquer un phénomène il faut établir la carte des interactions moléculaires sous-jacentes correspondant à ces réseaux***

**Mais, contrairement à ce qui était prédit par la théorie, les protéines ne sont pas spécifiques**

# Non spécificité des interactions moléculaires



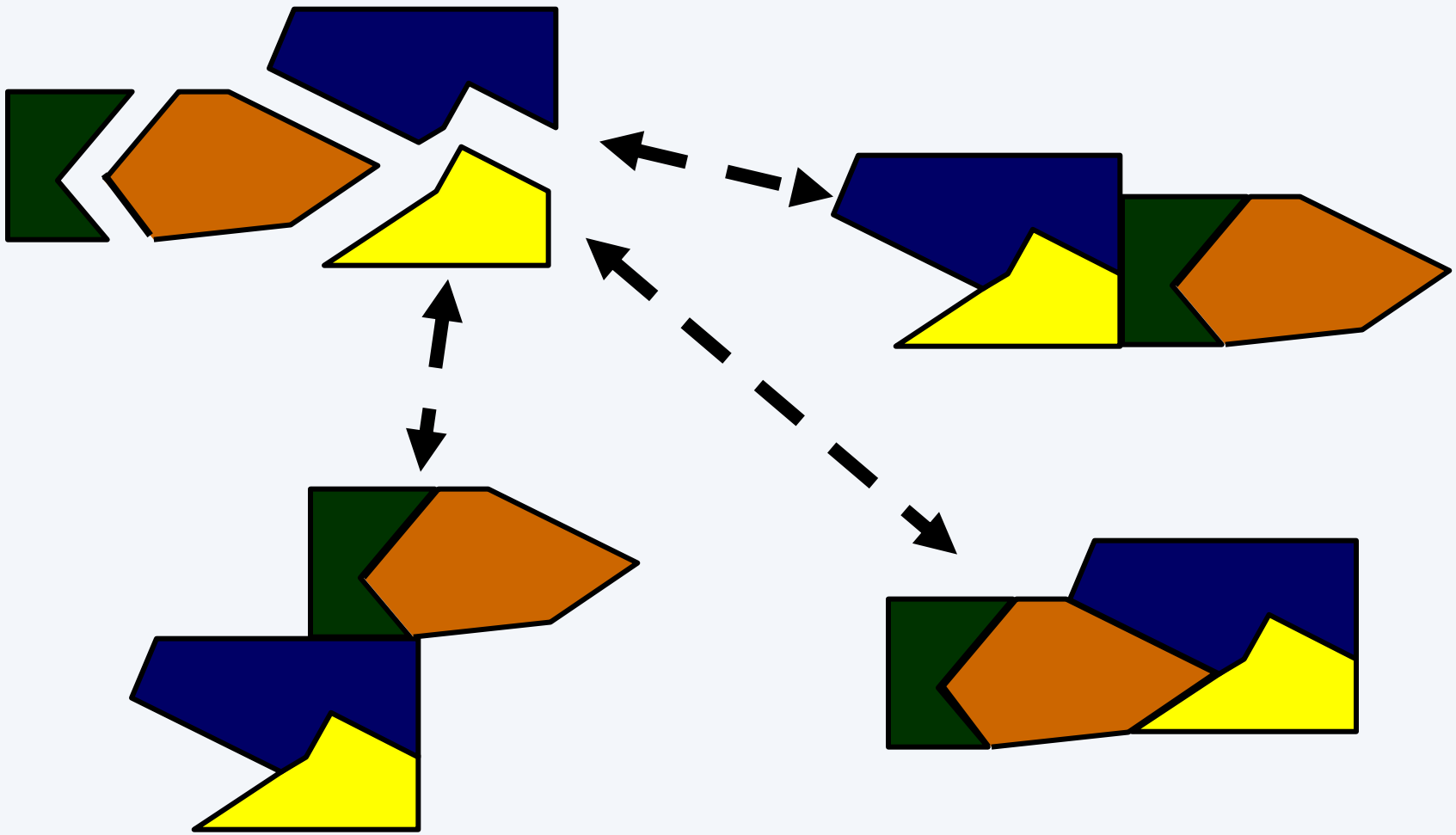
**Connectivité des réseaux de protéines :**
**10% des protéines interagissent avec 100 partenaires ou plus.**
**Connectivité moyenne = 7-8.**

**Conséquence: Immense combinatoire d'interactions possibles. Toutes les voies de signalisation sont interconnectées avec de nombreux points de contact (Bork et al., 2004; Barabasi et Oltvai, 2004; Albert, 2005).**

**La vision d'un ordre macroscopique expliqué par un ordre microscopique est contredite : La structure des réseaux de protéines n'explique pas l'état macroscopique d'une cellule. Ils doivent eux-mêmes être soumis à une régulation ou à une contrainte qui limite la combinatoire moléculaire.**

**L’absence de spécificité des interactions protéiques pose un problème à l’approche réductionniste et amène à repenser les modèles théoriques de la biologie.**

**On peut notamment prédire l’existence de phénomènes probabilistes.**



**Plusieurs combinaisons d’interactions possibles**

**à partir d’un ensemble de molécules:**

**compétition moléculaire, stochasticité**

**Cette prédiction est conforme à certains aspects de la physiologie cellulaire.**
**Un grand nombre d'études démontrent l'existence d'une variabilité dans la différenciation cellulaire.**

## La cinétique d'expression ou d'association de marqueurs de différenciation s'accorde avec des modèles probabilistes :

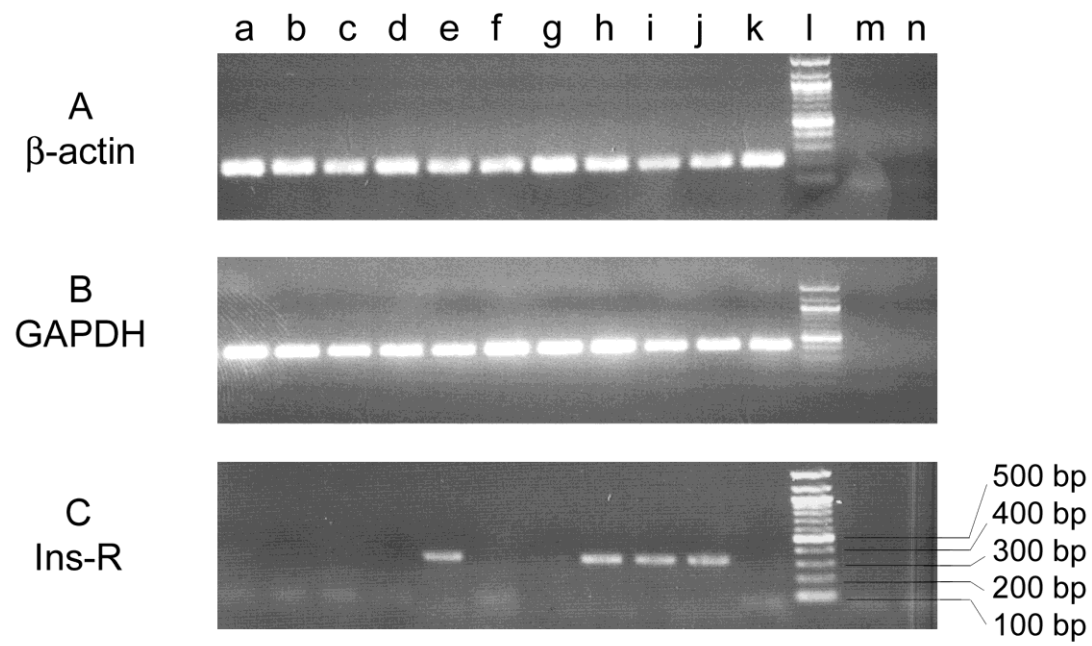
| modèles expérimentaux | marqueurs |
|---|---|
| - cellules hématopoiétiques, Till et coll. 1964 | Colony Forming Cell |
| - cellules de mélanomes, Bennett 1983 | mélanine |
| - hépatocytes, van Roon et coll. 1989 | carbamoylphosphate synthetase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, arginase |
| - crête neurale, Barrofio et Blot 1992 | tyrosine hydroxylase, neurofilament protein, Schwann myelin protein, HNK1, melanin, cartilage |
| - lymphocytes T, Davis et coll. 1993 | TCRs, CD4, CD8 |
| - myoblastes, Lin et coll. 1994 | desmin, $\alpha$-actin, troponin, MyHC, zeugmatin, titin, nebulin |
| - C. elegans (AC,VU), Greenwald et Rubin 1994 | *lin-12* (VU) |

**liste non exhaustive**

# stochastic gene expression is a fact

**N1E-115 cell line**
**(rat neuroblastoma)**

**TPEA-PCR**




**(Heams and Kupiec, 2003)**

**random transcriptional variability among isogenic single cells in constant environment**

# Demonstration of stochastic gene expression

- first theoretical models: Spudish and Koshland, 1976; Kupiec, 1983

- random expression variability of reporter genes among single cells:

  lacZ

  - NFAT-1 activator element (IL2 promoter), Fiering et al. 1990
  - steroid hormones target sequences, Ko et al. 1990
  - LTR-HIV, Ross et al. 1994
  - actin, troponin I, HMG-CoA réductase promotors, Newlands et al. 1998

  luciférase

  - promoteurs HIV-LTR, cytomegalovirus, White et coll. 1995
  - prolactine, Takasuka et coll. 1995

- mono or hétéroallelic transcription: *in situ* analysis shows that different alleles are expressed on the two chromosomes of the same pair for:

  - olfactive receptors, Chess et coll. 1994
  - globin, Wijgerde et coll. 1995
  - IL-2, Höllander et coll. 1998
  - IL-4, Rivière et coll. 1998
  - Igf2, H19, Jouvenot et al. 1999

- Elowitz al. 2002: the expression of 2 reporter genes placed in strictly identical genetic contexts undergo major stochastic variations in *E. coli*.

# Evidence for stochastic gene expression during cell differentiation

- Cell type determination of photoreceptor cells in *Drosophila* retina, *spineless* (Wernet et al, 2006)

- Haematopoietic progenitor cell differentiation, *sca-1* (Chang et al., 2008)

- Stem cell reprogramming, 48 genes, including genes involved in chromatin-remodeling, signal transduction, cell-cycle regulation and a variety of pluripotency marker genes (Buganim et al., 2012)

- Mouse blastocysts, *cdx2*, *nanog* (Dietrich and Hiiragi 2007)

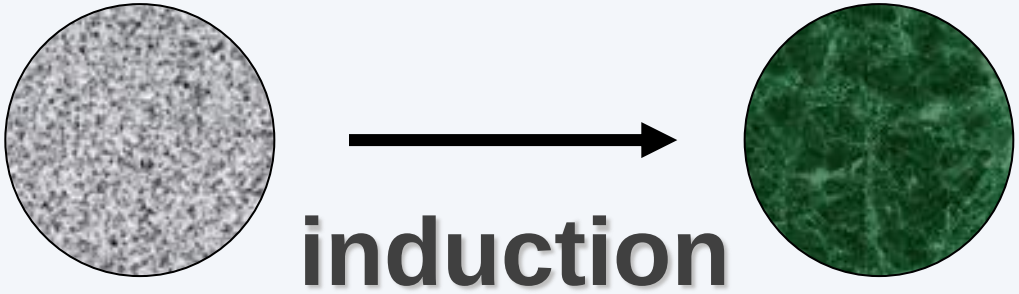
- segregation of the epiblast and the primitive endoderm, *nanog, gata6 and pdgfra* (Plusa et al. 2008, Chazaud et al. 2006)

- **absence de spécificité des protéines**
- **variabilité de la différenciation cellulaire**
- **expression stochastique des gènes**

**L’ensemble de ces données permet de reconsidérer la vision déterministe de la différenciation cellulaire**

# Deterministic model

**Since Spemann ‘s work embryogenesis is understood as a determinist process in which cells exchange information that determines them to differentiate into a particular cell type**



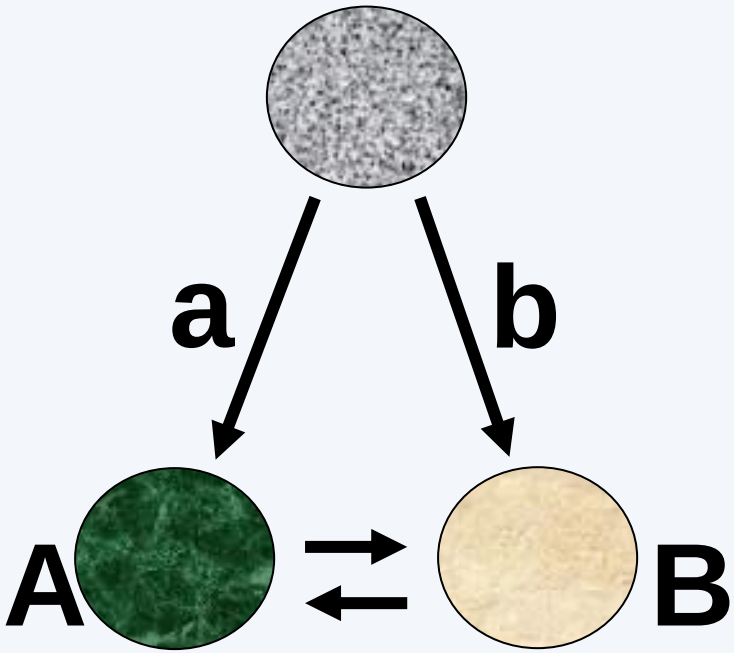
**induction**

**(information, instruction, signal)**

- *must presuppose cellular heterogeneity*
- *needs protein specificity to ensure signal specificity*
- *does not predict molecular and cellular random variability*

# Darwinian (chance-selection) model

**(Kupiec, 1983, 1997)**

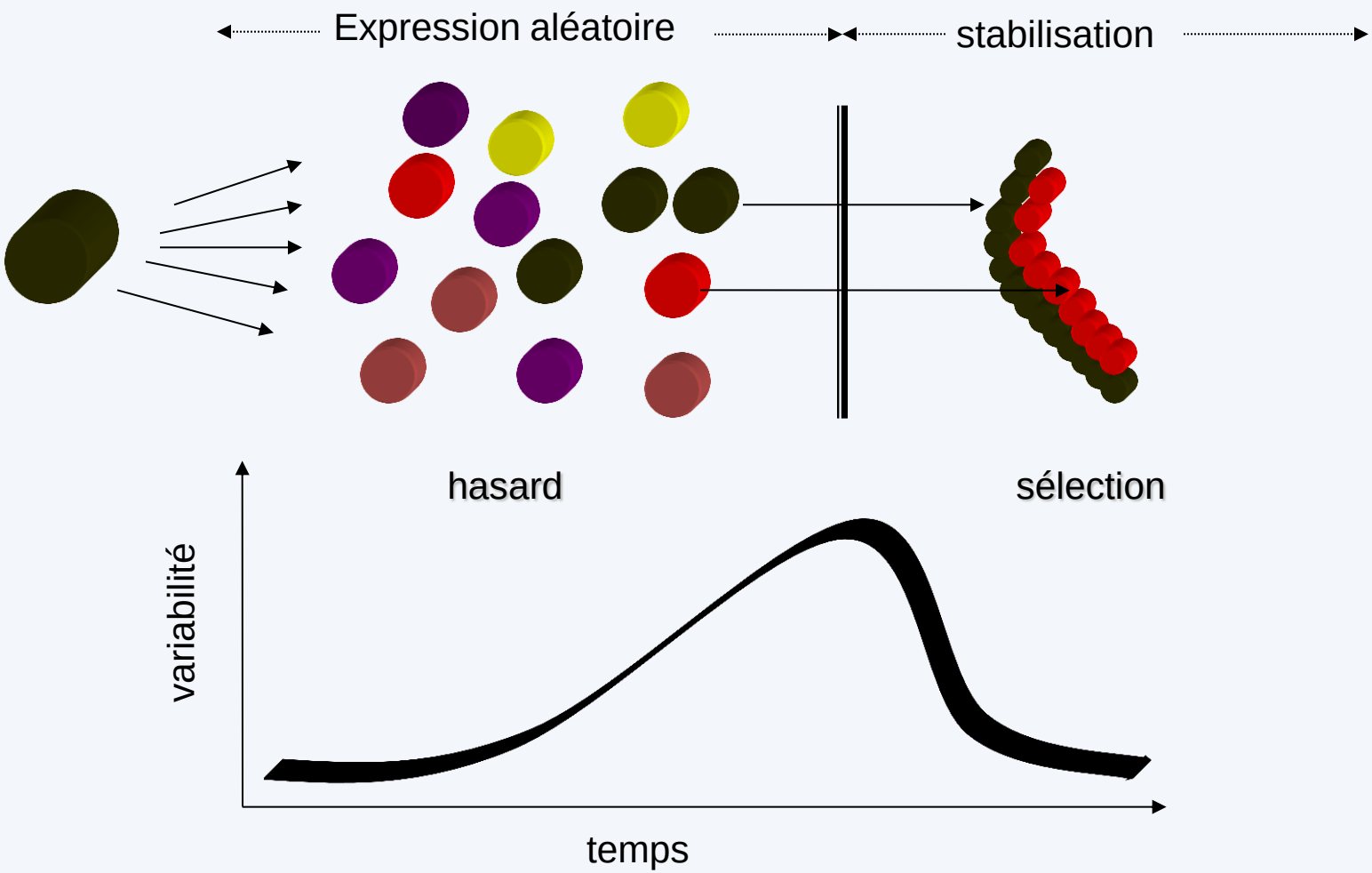



**stabilization**

**by means of chromatin epigenetic modifications controlled by signalization pathways and/or metabolism**

- *does not presuppose cellular heterogeneity*
- *does not need stereospecific proteins*
- *based on molecular and cellular variability*

**Prédiction: au cours de la différenciation on s'attend à un pic de variabilité, puis à sa diminution**




**Test: quantifier la variabilité transcriptionnelle intercellulaire et la corréler avec la différenciation**

# Predictions of the model

- because differentiation is a stabilization of randomly variable gene expression patterns, it must correlates with restriction of stochastic gene expression.

- a disruption of cell interactions must either release stochastic gene expression or strengthen its stabilization

# Evidence

- gene expression is stochastic during the early phase of cellular reprograming but becomes stabilized in the later phase (Buganim et al. 2012).

- prolactin expression is homogeneous in pituitary tissue, but variable when pituitary cells are dissociated by enzymatic means (Harper et al. 2010).

- CDX2 protein expression is random in early mouse cloned embryos deficient in cell number. If a normal number of cells is restored by aggregating several embryos, thus restoring a normal level of cell interactions, CDX2 expression is stabilized (Balbach et al. 2010).

- to be continued … (Stochagene consortium with Olivier Gandrillon, Andras Paldi, Guillaume Beslon) …

# Computer simulation of the chance–selection model

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

Progress in Biophysics and Molecular Biology 89 (2005) 93–120

Progress in Biophysics & Molecular Biology

www.elsevier.com/locate/pbiomolbio

Review

## Modeling embryogenesis and cancer: an approach based on an equilibrium between the autostabilization of stochastic gene expression and the interdependence of cells for proliferation

Bertrand Laforge[a], David Guez[a], Michael Martinez[b], Jean-Jacques Kupiec[c,*]

[a]*Laboratoire de Physique Nucléaire et des Hautes Energies (LPNHE), Université Paris VI-Pierre et Marie Curie, Bureau 227, Tour 33RdC, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 5, France*

[b]*Laboratoire de Physique Théorique des Liquides (LPTL), Université Paris VI-Pierre et Marie Curie, Tour 24 2eme étage, Boite 121, 4 Place Jussieu, 75252, Paris Cedex 5, France*

[c]*Centre Cavaillès et INSERM, Ecole Normale Supérieure, 29 rue d'Ulm, 75005 Paris, France*

Available online 23 December 2004

# Simulation goal

- To evaluate the relevance of the chance-selection model as a theoretical framework for cell differentiation

# Questions to be answered

- Can the chance-selection model generate organization?

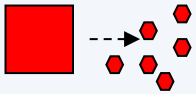
- What would be the properties of a cell population obeying to its rules?

# Methodology

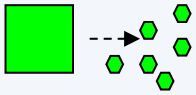
- We want to test the intrinsic properties of the chance-selection model.

- We are not modelizing a real system, we use cellular automata and we start with the simplest possible model

**a cell is a square that can multiply in a 2-dimensional matrix**



**red cells synthesise red molecules**

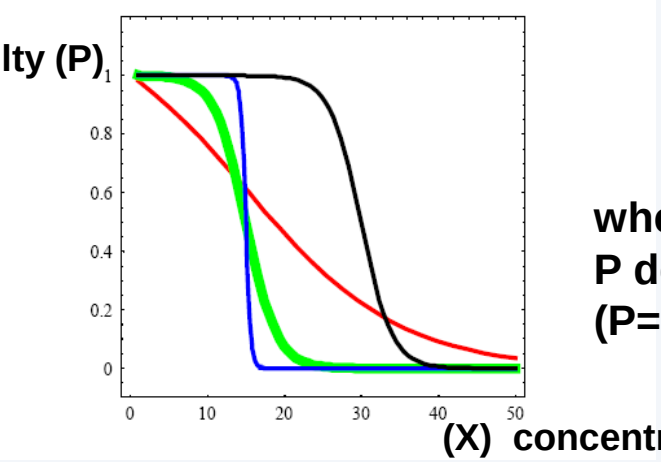


**green cells synthesise green molecules**

**molecules diffuse in the environment (ie the matrix)**

**cells change type with a probabity P depending on red and green molecules concentrations**

**phenotype switching probabilty (P)**




$$F(x)= \frac{1+e^{-\beta Co)}}{1+e^{\beta(x-Co)}}$$

autostabilization

**when x increases, due to cell activity, P decreases untill cells are stabilized (P=0)**

**(X) concentration of red or green molecules**

**red cells metabolize green molecules to survive and proliferate**

selection

**(interdependence of cells for proliferation)**

**green cells metabolize red molecules to survive and proliferate**

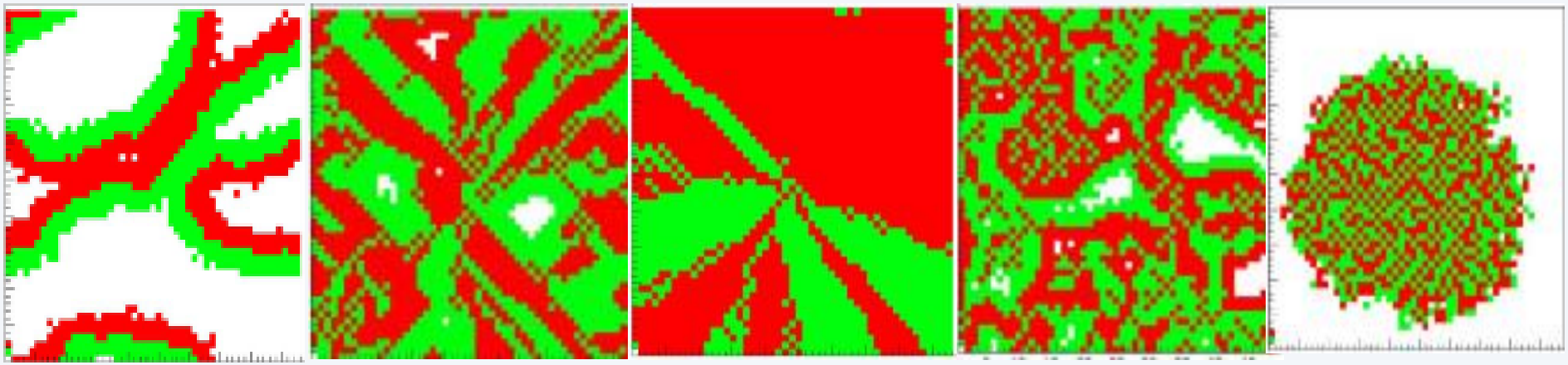
# Model parameters

Summary of simulation parameters

| Parameters | Definition | Units |
|---|---|---|
| Rs | Rate of S molecules synthesis | Molecules/time simulation step |
| $\sigma$Rs | Standard deviation of Rs Gaussian distribution | Molecules/time simulation step |
| Rd | Rate of S molecules degradation | % of molecules/time simulation step |
| $L$ | Mean free path of S molecules | Distance per time simulation step |
| $q_{auto}$ | Ratio of autostabilization | — |
| $q_{inter}$ | Ratio of interstabilization | — |
| $C_0$ | Inflexion of the Fermi–Dirac-like function (concentration of S molecules for which the phenotype switching probability is $\approx 1/2$) | Number of molecules/square |
| $\beta$ | Slope of the Fermi–Dirac-like function | $\beta C_0$ is dimensionless |
| Cs | Average quantity of S molecules consumed by a cell during one simulation step | Number of molecules/square |
| $\sigma$Cs | Standard deviation of Cs Gaussian distribution | Number of molecules/square |
| Cp | Average quantity of S molecules for a cell to enter mitosis | Number of molecules/square |
| $\sigma$Cp | Standard deviation of Cp Gaussian distribution | Number of molecules/square |

**The model parameters control molecules turn-over, diffusion, cell division, cell death, probability of cell type switching**

# A variety of cell patterns are produced by varying the quantitative values of the parameters



# A variety of cell patterns are produced by varying the quantitative values of the parameters

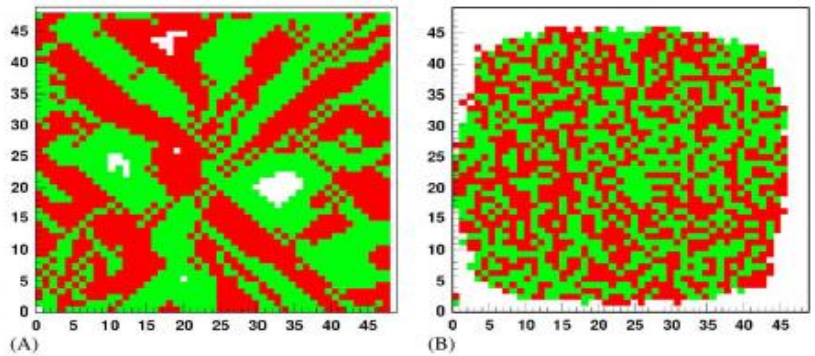
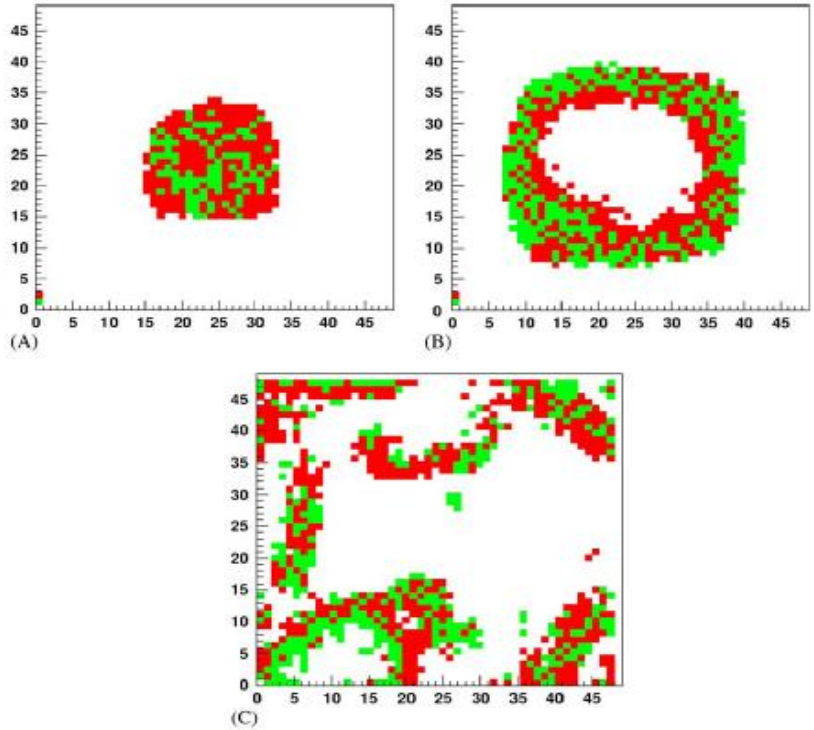


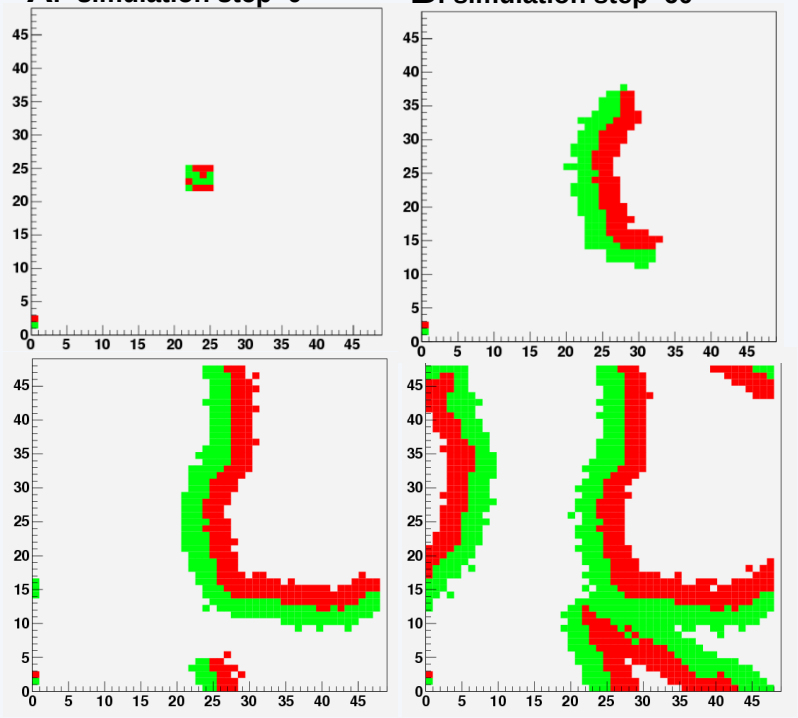

Fig. 9. Influence of autostabilization. Standard parameters except (A) $C_0 = 1$ and (B) $\beta = 0.01$.



## cell bi-layer formation

**A**: simulation step=0

**B**: simulation step=60

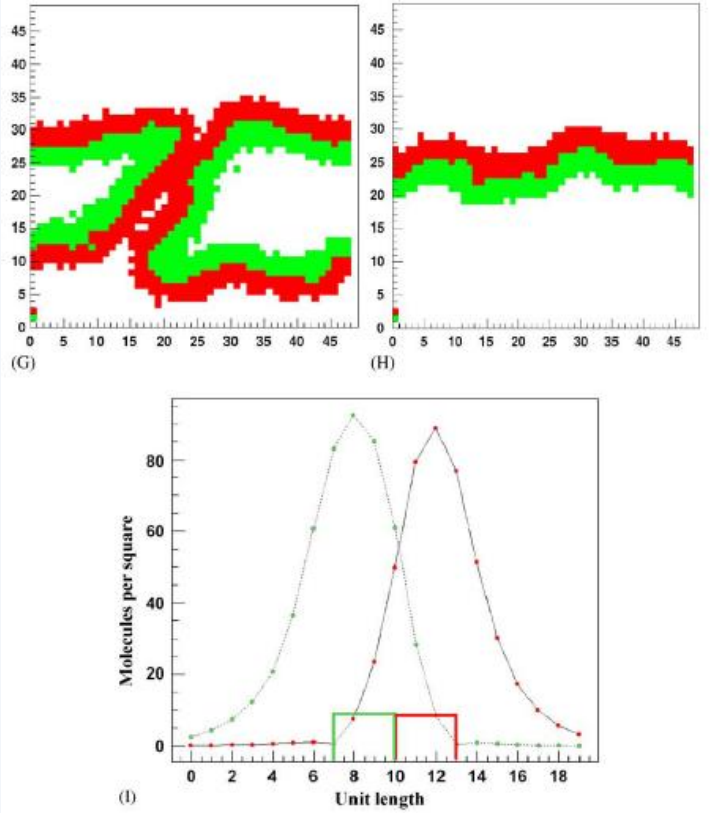


**C**: simulation step=160

**D**: simulation step=400

**Rs=14, sRs=0.1, Rd=0.08 , L=0.6, Co=15, b=0.5, Cs=2.4, sCs=0.05, Cp=6, sCp=0.15**

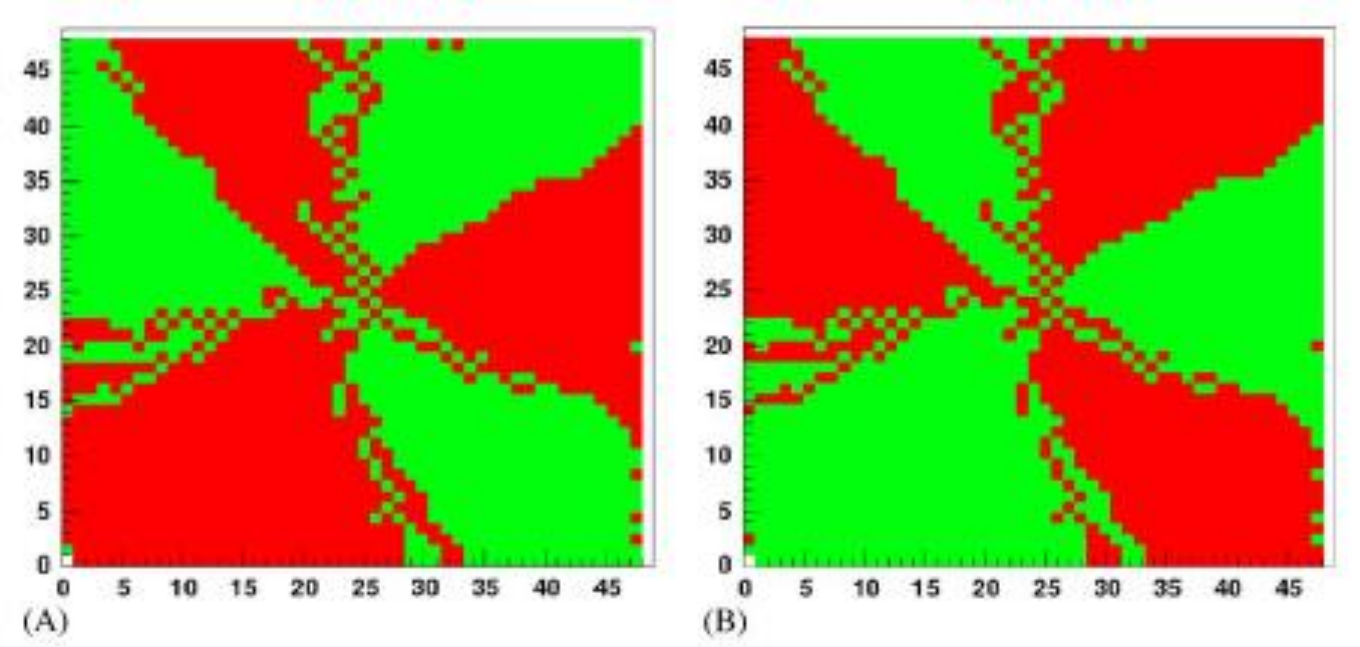
## other simulations runs




## molecular gradients

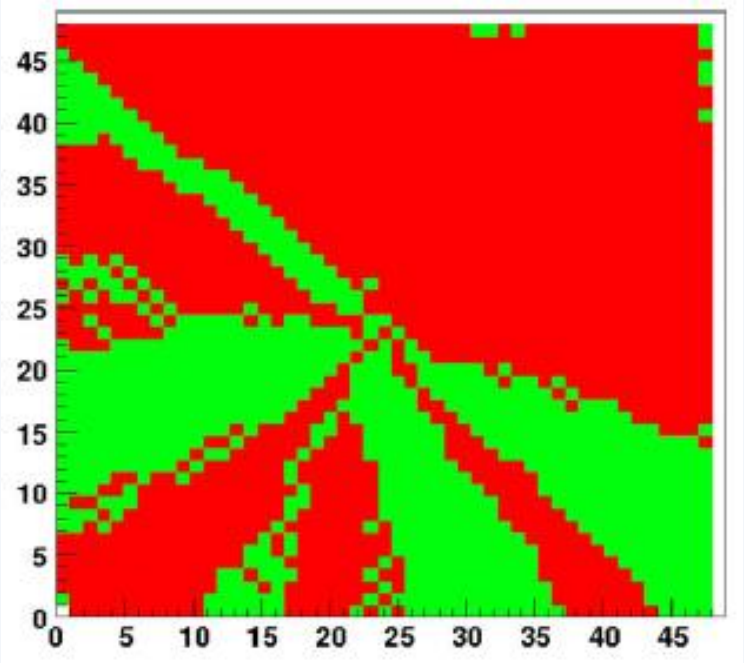
**the chance-selection model is able to generate a tissue-like reproducible cell structure whose growth is finite**

# Suppression de l’autostabilisation




**Perte des propriétés d’organisation et d’arrêt de croissance**

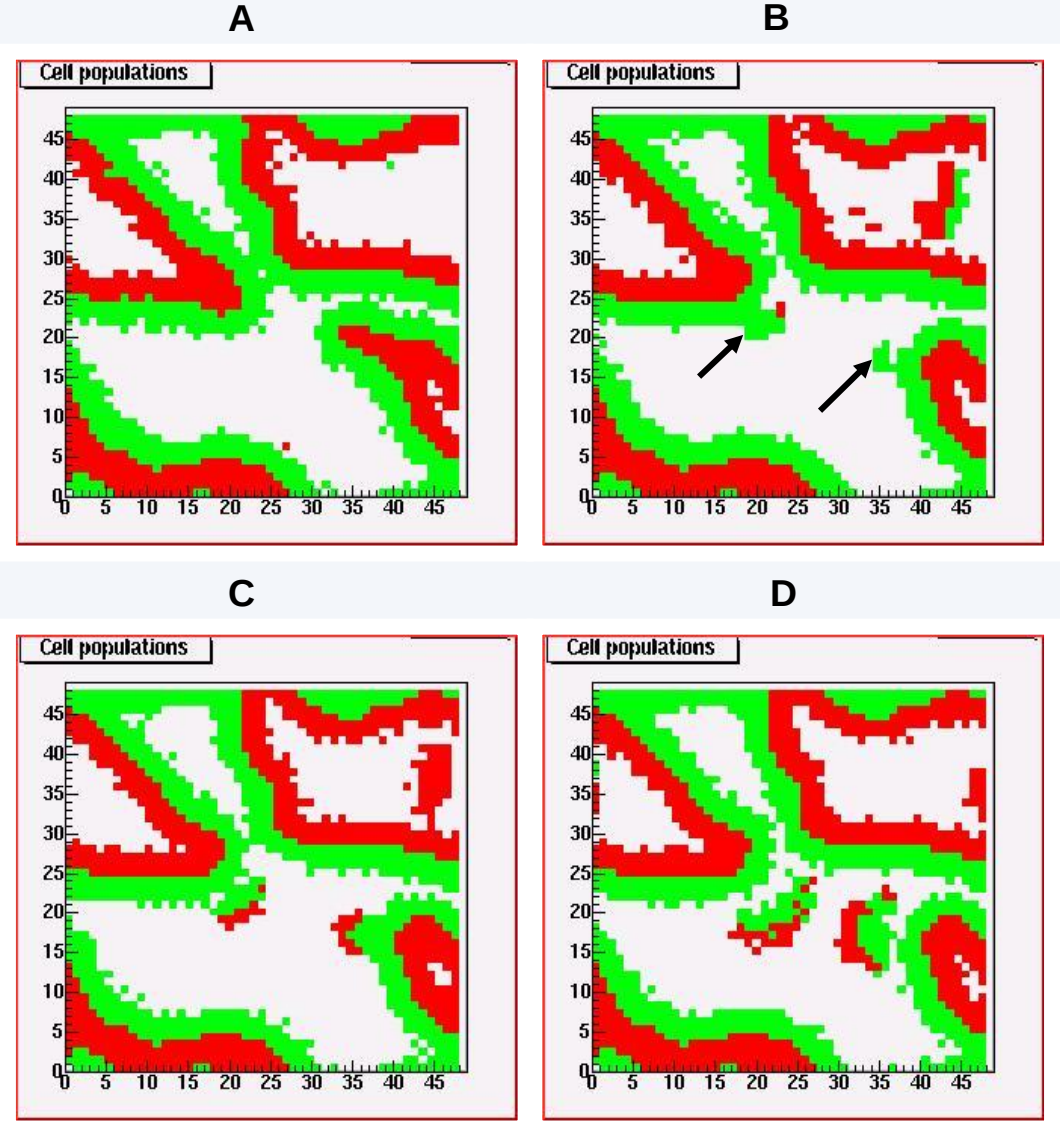
# Suppression de l'interdépendance pour la prolifération




**Perte des propriétés d'organisation et d'arrêt de croissance**

**Les propriété d’organisation et le contrôle de la prolifération cellulaire proviennent d’un équilibre entre les valeurs quantitatives des paramètres du modèle.**

# tissue-like organization and cell proliferation control depend on an equilibrium between the quantitative values of the model parameters



FormationStructurePuisCancerAutoStab.avi

# Conclusion

- **Il y a des raisons sérieuses de remettre en cause le paradigme réductionniste et déterministe. Il y a aussi des arguments expérimentaux et théoriques montrant que le modèle de hasard-sélection est pertinent pour expliquer la différenciation cellulaire. Il offre une nouvelle approche et il a des propriétés intéressantes pour comprendre le cancer.**

- **Travail en cours qui ouvre un nouveau programme de recherche …**

# Merci de votre attention