



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**

*Mention : Biologie*

**Ecole doctorale Vie-Agro-Santé**

présentée par

**Floriane Nicol-Benoit**

Préparée à l'unité de recherche Inserm U1085 IRSET  
Institut de Recherche sur la Santé, l'Environnement et le Travail  
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

---

**Rétroactions  
positives et mémoire  
cellulaire : exemples  
dans l'expression  
génétique et le  
métabolisme cellulaire.**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 3 juillet 2013**

devant le jury composé de :

**Germain GILLET**

Professeur Université Lyon 1/ *rapporteur*

**Andràs PÁLDI**

Professeur École Pratique des Hautes Études et  
Génethon, Paris / *rapporteur*

**Dominique LAGADIC-GOSSMANN**

Directrice de recherche CNRS, Rennes 1/  
*examinatrice*

**Denis MICHEL**

Professeur d'Université, Rennes 1 / *directeur de  
thèse*



# Remerciements

---

Je remercie **Bernard Jégou**, directeur de l'INSERM U1085 IRSET et **Gilles Salbert**, directeur de l'ex UMR 6026 de m'avoir accueillie dans leurs laboratoires, ainsi que l'Université de Rennes 1 et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche d'avoir financé mes trois années de doctorat.

Un grand merci aux Pr. **Andràs Paldi** et **Germain Gillet** d'avoir jugé mon travail, pris le temps d'en faire des rapports et d'être venus assister à ma soutenance. Un grand merci également au Dr. **Dominique Lagadic-Gossmann** d'avoir examiné mon travail de thèse et présidé mon jury.

**Denis** et **Pascale**, je ne vous remercierai jamais assez pour votre encadrement. Merci à vous de m'avoir fait confiance, de m'avoir aiguillée tout en me laissant suivre mes pistes, merci pour votre disponibilité et votre implication dans mon projet de thèse et merci de m'avoir encouragée dans mes autres projets. Merci Denis pour ton enthousiasme illimité, ta vision récréative de la recherche, ta pédagogie et ton humour qui ne manque pas de piquant. Merci mille fois Pascale d'avoir fait avancer les manip pendant ma rédaction, de toujours garder la tête dans les étoiles mais les deux pieds sur terre, de ta franchise et de ton expertise en tous domaines. Vous êtes tous deux un tandem des plus équilibré et des plus agréables à vivre, c'était un plaisir que d'apprendre à vos côtés ; je souhaite à quiconque de vous avoir un jour comme encadrants.

Merci **Sylvain**, les deux **Catherine** et **Maud**, vous avez été mes premiers repères dans le labo et grâce à vous j'ai démarré (et continué !) sereinement mes manip, merci de votre aide, de vos soutiens et conseils toujours donnés avec le sourire ; à **Aurélien** (je me souviendrai longtemps de tes Sérandouettes) et **Antoine**, les « grands » que j'ai eu le plaisir de voir soutenir ; merci à **Charlotte** et **Fred**, vous avez fait de la salle de culture un sanctuaire où il fait vraiment bon travailler, tant par votre efficacité et votre rigueur que par votre bonne humeur à toute épreuve ; merci **Milène** qui s'est toujours décarcassée pour nous simplifier la vie ; **Michèle**, **Pierre** et **Valérie** je n'oublie pas que c'est grâce à vous que le labo tourne si bien pour nous. Merci **Yohann** pour ta patience, ta gentillesse et tes conseils microscopiques ; **Rémy** pour ton aide précieuse et ton travail remarquable sur la plateforme ImpacCell. Merci **Gilles (F)** pour avoir suivi de près mon travail, pour tes conseils pratiques et tes données de puces, ton enthousiasme et tes réflexions des plus pertinentes ; **Farzad** pour tes conseils, ton œil d'expert sur mon manuscrit et tes encouragements ; **Florence** pour ta disponibilité, ta gentillesse et ton empressement à nous aider quand l'occasion se présentait. Merci **Denis (H)** pour tes conseils et remarques qui appuient parfois où ça fait mal (mais qu'il vaut mieux avoir avant qu'après), pour l'analyse des puces que tu as partagé de bon cœur, pour tes blagues et ton sourire qui égayaient toujours le labo ; **Yves** pour tes remarques judicieuses et tes conseils avisés aussi bien pour la recherche que pour l'enseignement, et pour ta relecture critique de mes dossiers ; **Yann** pour avoir partagé mon bureau et ton expérience, pour les coups de main que tu as pu donner. Merci **Gilles (S)** de suivre avec un réel intérêt l'avancement des choses.

Merci **Nourredine**, **François**, **Christian**, **Thierry (B)**, et tout mon nouveau couloir de m'avoir accueillie au calme le temps de ma rédaction, votre gentillesse et votre sollicitude m'ont fait chaud au cœur quand le printemps tardait à venir.

Merci **Élise** et **Alexis** de prendre la relève avec fraîcheur, sympathie et une bonne dose de bonne humeur ! J'espère Élise que tu auras de bons retours sur investissements ; que le lutin des manip soit avec toi, tu le mérites bien. Alexis, je pense que tes blagues ne me manqueront pas ("non, j'déconne..."), mais ton entrain, tes coups d'éclat et tes schokobons, oui... Mil gracias **Tamara** y **Joël** por vuestro calor, encontrar a vosotros añadio un toque de locura en mi escritura. Tenemos que volver a verse (et vite !)... Merci **Marie-Pierre**, **Géraldine**, **Maryam**, **Antoine**, **Galaad**, **Meziane**... et tous les stagiaires qui ont laissé des souvenirs et ont fait avancer d'un pas plus ou moins grand la Recherche.

Merci **Christine**, **Justine**, **Gaëlle (B)** et **Gaëlle (P)**, **Thierry (M)**, **Stéphane**, **Raphaël**, **Mado**, **Elizabeth**, **Colette**, **Ariana**, **Olivier**, **Nadine**, **Johanna** et tous ceux qui ont partagé des pauses, des repas, des mots fléchés, des jeux pré-vacances, des conversations sur tout et n'importe quoi, la vie, l'enseignement, la recherche... bref qui ont fait passer ces trois ans à la vitesse de l'éclair.

Merci à **Maud** et **Gaëlla** pour les bons souvenirs que je garde des Doctoriales et des occasions qu'on a eues de se revoir.

Merci **Yonis**, cher compagnon de thèse par intermittence. Ta bonne humeur est contagieuse, c'est toujours un plaisir de t'avoir dans les parages (surtout depuis que tu ne prends plus mes pipettes). Je te souhaite le meilleur une fois ta soutenance passée, puisses-tu concrétiser tes projets et profiter (enfin !) de ta famille...

Un immense merci à toi **Gweneg** pour l'ami que j'ai trouvé caché derrière le collègue, et pour tout ce qu'on a partagé au labo et en dehors. Je te souhaite encore une fois toute la réussite que tu mérites plus quelques morceaux de bonheur, dans la recherche ou ailleurs...

Un merci particulier à tous les chanteurs, fredonneurs, siffleurs et rieurs du bâtiment qui m'ont donné chaque jour envie de me lever pour aller au labo. C'était un réel plaisir de travailler dans cette ambiance, stimulant et réconfortant quand les manips ne marchaient pas. J'entendrai encore longtemps résonner vos rires, certains peut être plus fort que d'autres, mais tous vous avez fait de mes années de thèse un excellent moment. Vous me manquerez.

Merci aux membres de mon comité de thèse **Christian Diot**, **Georges Baffet** et **Pascal Loyer** pour avoir suivi l'avancement de mes travaux avec intérêt, pour vos remarques judicieuses et vos encouragements.

**Laurence Kern**, **Frédérique Legay** et **Valérie Guillaume**, je vous remercie pour les TP, TD et oraux que vous m'avez permis d'assurer, pour les conseils que vous m'avez prodigués et pour la très bonne ambiance qui règne en enseignement de biochimie (merci également à **Réjane** et **Emmanuelle**, vous y êtes pour beaucoup). J'ai beaucoup affiné mon projet professionnel grâce à vous, merci encore.

Merci à mes amis doctorants, compagnons d'ici ou d'ailleurs, pour le partage de tuyaux, de joies, de galères, de soirées, de week-ends et d'encouragements. **Zouzou** (nos pauses café me manquent toujours un peu), **Hélène** et **Arturo** (toujours bref, mais intense !), **Nat'** (puisse-tu garder encore longtemps ta fraîcheur et ta spontanéité, à très bientôt sur Lyon et merci pour l'hébergement lors des congrès), **Anne** (à bientôt sur les planches ?), **Pau** (merci de nous avoir réunis lors de nos week-ends parisiens), **Jonas** (j'essaierai aussi de passer en Suisse avant que tu n'en partes), votre tour viendra bientôt et j'espère vous voir tous soutenir. Et merci aux amis en tout genre d'avoir égayé nombre de mes pauses, soirées, week-ends ou vacances : **Cam'**, **Clément**, **Coraline**, **Cricri**, **Filou**, **Jean-Christ**, **Jérôme**, **Ju'**, **Maude**, **Mélanie**, **Nicolas**, **Pierre**. Avec des mentions spéciales à **Aurélie** (la mise en scène d'Alice avec toi, en plus d'avoir été une vraie partie de plaisir, aura été mon autre grand projet mené à terme), à **G.**, qui m'a beaucoup fait marcher et pédaler (sous le soleil et les intempéries), qui a suivi pas mal de mes idées (pas toujours bonnes), et qui a supporté moult bavardages... Ainsi qu'à **Tim** (tu manques toujours autant à mon quotidien comme me le rappellent chaque année les pissenlits), avec qui j'espère passer encore de nombreuses vacances, avec ou sans chèvre.

Merci à mon père qui, sans jamais me mettre la pression, a toujours misé sur moi. Merci de ta patience et de ta curiosité à toute épreuve, merci d'avoir partagé toutes ces anecdotes historiques, scientifiques et humoristiques. J'en serais peut être là où j'en suis aujourd'hui sans toi, mais te rendre fier restera l'une des plus belles récompenses à tout ce travail. Un coucou à **Julie**, **Rémy** et **Anne-Laure**, je ne vous vois pas assez mais toujours avec grand plaisir. Continuez à construire et aimer votre vie chacun à votre manière (la meilleure chose que je puisse vous souhaiter tant que sœur). Merci mille fois **Sophie**, ma Grande Sœur Terrienne... Tu sais si bien partager la vie avec moi, peu importe la distance : toutes les broutilles, les joies, les peines, les espoirs et les doutes. Merci d'avoir toujours été perchée sur mon épaule à me regarder grandir, évoluer, à m'accompagner dans chacun de mes choix et à me motiver pour atteindre les objectifs que j'ai pu me fixer. Merci à mes belles familles d'avoir suivi pas à pas chaque étape depuis ma licence et jusqu'à ma fin de thèse, de toujours m'encourager et de me donner toute ma place parmi vous ; je suis heureuse d'être des vôtres.

Merci à mes deux chats de me faire partager au quotidien leur version toute relative de la vie : « Thèse ou pas thèse, là n'est pas la question. Lève-toi donc et remplis la gamelle ». Merci également pour vos comportements hautement reproductibles ; le vivant, parfois, est régi par des règles aussi simples que  $F(\text{gratouilles}) = \text{ronron}$ . C'est simple, efficace, et tellement reposant...

Enfin, merci **Gaël** pour ton amour qui me bonifie avec les années et me fait tourner la tête. Merci de soutenir et de suivre chacun de mes projets, de tout rendre simple, léger et rigolo. Merci d'avoir pris soin de moi sur ma fin de thèse (tu as été plus que parfait), d'avoir supporté de bon gré mes humeurs, mes absences, et l'essoreuse à chicon... Merci de remplir ma vie d'amour, la maison de rires et de joie et mon estomac de chocolat.



Au-delà de l'information génétique contenue dans la séquence de l'ADN des cellules, il existe une mémoire cellulaire, dite épigénétique comprenant l'ensemble des circuits génétiques avec rétroactions positives permettant d'amplifier ou de maintenir une réponse cellulaire dans le temps. Nous nous sommes intéressés, à travers deux exemples, aux boucles de rétrocontrôle positif comme élément de réponse à un signal, permettant de fixer, de manière à la fois dynamique et robuste, le comportement cellulaire.

Dans un premier temps, nous avons identifié une boucle d'auto-amplification dans la production de vitellogénine. Ce travail, réalisé sur la truite était destiné à expliquer des observations anciennes : les truites stimulées une première fois à l'œstradiol produisent plus de vitellogénine et plus rapidement que les truites n'ayant jamais été en contact avec celui-ci, alors même que le niveau de vitellogénine retombe à zéro entre les deux stimulations. Ce phénomène, appelé « effet mémoire de la vitellogénèse », suggère l'existence d'un mécanisme permettant cette réponse plus rapide et plus forte après un premier contact avec l'inducteur. Nous avons proposé un modèle impliquant un récepteur tronqué à l'œstradiol possédant une activité basale même en l'absence de son ligand. Celui-ci permet, après une première expression du récepteur tronqué en réponse à l'œstradiol, de maintenir la cellule dans un état d'aptitude à répondre sans pour autant produire de vitellogénine. Il fonctionne donc de manière différente des boucles de régulation précédemment décrites (arrêt de la réponse cellulaire quand le signal est ôté ou bien maintien de cette réponse à un maximum même en l'absence de signal).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à une des causes possibles provoquant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), responsable des métastases dans les cancers. L'EMT témoigne d'un état plus agressif des cellules tumorales et s'accompagne de nombreux changements (morphologiques, métaboliques et génétiques). Parmi ces modifications, il faut noter l'effet Warburg, qui est un changement du métabolisme des cellules cancéreuses, diminuant la part de la phosphorylation oxydative au profit de la glycolyse. L'effet Warburg favorise la progression du cancer en permettant aux cellules de survivre en conditions hypoxiques et d'optimiser la production de substrats pour leur croissance. Cela entraîne une baisse d'efficacité de la production d'ATP, obligeant les cellules à prélever davantage de nutriments dans leur milieu. Cette observation a suscité le développement de thérapies basées sur la privation de glucose et qui, *a priori*, nuisent principalement aux cellules cancéreuses.

Nous avons étudié les effets d'un faible contenu cellulaire en ATP sur la transformation cellulaire et mesuré la concentration en ATP de cellules cancéreuses avant ou après l'EMT. Nous avons ainsi observé qu'un traitement par le 2-déoxyglucose, un analogue non métabolisable du glucose, diminue drastiquement le contenu en ATP des cellules ayant passé l'EMT. De plus, le traitement de cellules par le 2-déoxyglucose induit des changements morphologiques et génétiques orientés vers le phénotype mésenchymateux. Enfin, la protéine MKL1, cofacteur de transcription dont l'activité est régulée par la polymérisation de l'actine, pourrait être un relais génétique entre l'état métabolique cellulaire et le maintien de l'EMT. Ces résultats suggèrent de fortes connections entre l'EMT et le niveau énergétique des cellules, faisant d'une privation d'énergie une cause possible au basculement des cellules vers le phénotype mésenchymateux et remettant en cause les bienfaits sur le long terme de thérapies visant à « affamer » les cellules tumorales.



## Liste des abréviations

---

2-DG : <b>2-déoxy-glucose</b>	FGF : <b>Fibroblast growth factor</b>
4-OHT : <b>4-hydroxytamoxifène</b>	G3P : <b>Glycéraldéhyde 3-phosphate</b>
ACL : <b>ATP citrate lyase</b>	GTP : <b>Guanosine triphosphate</b>
ADN : <b>Acide désoxyribonucléique</b>	HAT : <b>Histone acétyle-transférase</b>
ADP : <b>Adénosine 5' diphosphate</b>	HDAC : <b>Histone déacétylase</b>
AMP : <b>Adénosine 5' monophosphate</b>	HGF : <b>Hepatic growth factor</b>
AMPK : <b>Kinase sensible à l'AMP</b>	HIF : <b>Hypoxia inducible factor</b>
ARNm : <b>Acide ribonucléique messenger</b>	HK : <b>hexokinase</b>
ATP : <b>Adénosine 5' triphosphate</b>	HMT : <b>Histone méthyle-transférase</b>
bHLH : facteurs <b>basiques hélice-boucle (loop)-hélice</b>	LBD : <b>Ligand binding domain</b> (domaine de fixation au ligand)
CAF : <b>Fibroblastes associés au cancer</b>	LDH : <b>Lactate déshydrogénase</b>
CMV : <b>Cytomégalo virus</b>	MEC : <b>Matrice extracellulaire</b>
CO <sub>2</sub> : <b>Dioxyde de carbone</b>	MET : <b>Transition mésoenchymo-épithéliale</b>
COUP-TF : <b>Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor</b>	MKL1 : <b>Megakaryoblastic leukemia 1</b>
DBD : <b>DNA binding domain</b> (domaine de liaison à l'ADN)	MR : <b>Mismatch repair</b> (réparation des mésappariements)
DNMT : <b>ADN méthyle transférase</b>	NADH : <b>Nicotinamide adénine di-nucléotide (NAD<sup>+</sup>) réduit</b>
E <sub>2</sub> : <b>Œstadiol</b>	NADPH : <b>Nicotinamide adénine di-nucléotide phosphate (NAD<sup>+</sup>) réduit</b>
EGF : <b>Epidermic growth factor</b>	NLS : <b>Signal de localisation nucléaire</b>
EMT : <b>Transition épithélio-mésenchymateuse</b>	NuRD : <b>Remodelage du nucléosome et histone déacétylase</b>
ER : <b>Récepteur des œstrogènes</b>	OXPHOS : <b>Phosphorylation oxydative</b>
rtER : <b>Récepteur tronqué des œstrogènes</b>	PCNA : <b>Proliferating cell nuclear antigen</b>
ERE : <b>Éléments de réponse à l'œstradiol</b>	PEP : <b>Phosphoénolpyruvate</b>
FAD : <b>Flavine adénine dinucléotide</b>	PFK : <b>Phosphofructo-kinase</b>
FDG PET : <b><sup>18</sup>F-déoxyglucose tomographie par émission de positron</b>	P <sub>i</sub> : <b>Phosphate inorganique</b>

PI3K : **P**hosphoinositide **3**-kinase

PK : **P**yruvate kinase

Rho : **R**as **h**omolog gene family

RN : **R**écepteurs **n**ucléaires

ROS : **E**spèces **r**éactives de l'**o**xygène

SAM : **S**-adénosyl**m**éthionine

SRF : **F**acteur de **r**éponse au **s**érum

TAM : **M**acrophages **a**ssociés aux **t**umeurs

TCA : **A**cides **t**ricarboxyliques

TGF $\beta$  : **T**ransforming **g**rowth **f**actor  $\beta$

mTOR : **M**ammalian **T**arget **o**f **R**apamycin

Vg : **V**itellogénine

WE : **E**ffet **W**arburg

YAP : **P**rotéine **a**ssociée à **Y**es

## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Illustration des paysages épigénétiques de Waddington (d'après Waddington, 1957).....	4
<b>Figure 2</b> : Illustration par Waddington de sa théorie selon laquelle les gènes façonnent les paysages épigénétiques, (Waddington, 1957).....	5
<b>Figure 3</b> : Représentation d'un circuit de gène élémentaire.....	6
<b>Figure 4</b> : Représentation de $dx/dt$ en fonction de $x$ (la concentration de $F$ ).....	9
<b>Figure 5</b> : Représentation de $dx/dt$ et de son intégrale négative en fonction de la concentration de $F$ , symbolisant le paysage épigénétique de Waddington associé au circuit.....	10
<b>Figure 6</b> : Représentation d'un paysage de Waddington pour un circuit de deux gènes (d'après Wang et al., 2011).....	12
<b>Figure 7</b> : Schématisation des changements d'attracteurs : co-existence de la rareté et de la solidité dans la reprogrammation (d'après Huang, 2009).....	14
<b>Figure 8</b> : Schématisation de la propagation de marques chromatinienne favorisant la formation d'hétérochromatine.....	16
<b>Figure 9</b> : Représentation schématique de la vitellogénèse après une stimulation à l'œstradiol.....	22
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique de la structure modulaire de ER $\alpha$ et COUP-TF1.....	23
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique de la structure de la région N-terminale de ER $\alpha$ .....	24
<b>Figure 12</b> : La région C-terminale de ER $\alpha$ .....	26
<b>Figure 13</b> : Représentations schématiques du gène rtER, de ses transcrits et des protéines (d'après Pakdel et al., 2000).....	28
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique du renforcement de l'activation transcriptionnelle d'ER $\alpha$ par COUP-TF1.....	29
<b>Figure 15</b> : Représentation des systèmes permettant la création de cellules enregistreuses.....	57
<b>Figure 16</b> : Schématisation d'un épithélium sain.....	62
<b>Figure 17</b> : Schéma récapitulatif de l'EMT de type 3.....	64
<b>Figure 18</b> : Représentation schématique des étapes clé de l'EMT (d'après Micalizzi et al, 2010).....	65
<b>Figure 19</b> : Représentation schématique de la structure de MKL1.....	68
<b>Figure 20</b> : Schéma présentant la régulation de l'activité de MKL1 par la dynamique de l'actine.....	69

<b>Figure 21</b> : Exemple de circuit d'auto-amplification dans l'EMT (d'après Nieto, 2011).....	72
<b>Figure 22</b> : Les liaisons riches en énergie.....	73
<b>Figure 23</b> : La glycolyse.....	76
<b>Figure 24</b> : La fermentation du pyruvate.....	77
<b>Figure 25</b> : La décarboxylation oxydative du pyruvate.....	78
<b>Figure 26</b> : La carboxylation du pyruvate.....	79
<b>Figure 27</b> : Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de (Szent-Györgyi et) Krebs.....	81
<b>Figure 28</b> : La phosphorylation oxydative, couplage de la chaîne respiration et de la production d'ATP.....	83
<b>Figure 29</b> : Les acteurs du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire.....	84
<b>Figure 30</b> : L'ATP synthase et son mécanisme d'action.....	85
<b>Figure 31</b> : Résumé des voies cataboliques en lien avec la production d'ATP.....	86
<b>Figure 32</b> : La voie des pentoses phosphates.....	87
<b>Figure 33</b> : Récapitulatif du métabolisme du glucose des différents types de cellules.....	89
<b>Figure 34</b> : La kinase AMP-dépendante, senseur du niveau énergétique de la cellule (d'après Hardie, 2007).....	91
<b>Figure 35</b> : La glycolyse est activement favorisée dans les cellules tumorales (à droite) par rapport aux cellules normales (à gauche). (d'après Moreno-Sanchez <i>et al.</i> , 2007).....	93
<b>Figure 36</b> : Convergence de la glycolyse et du métabolisme de la glutamine favorisant la synthèse d'acides gras (d'après Zaidi <i>et al.</i> , 2012).....	94
<b>Figure 37</b> : Le cycle de Cori.....	96
<b>Figure 38</b> : Croisement de la voie PI3-kinase et de la signalisation « Warburg » (d'après Cellsignal.com).....	98
<b>Figure 39</b> : Représentation schématique du mode d'action du 2-DG.....	102
<b>Figure 40</b> : Les enzymes de remodelage de la chromatine comme senseurs du métabolisme cellulaire (Katada <i>et al.</i> , 2012).....	131
<b>Figure 41</b> : Représentation de $d[F]_{tot}/dt$ et du paysage de Waddington correspondant, en fonction de $[F]_{tot}$ tenant compte les formes monomériques et dimériques du facteur).....	168

**NB** : Une grande partie des figures présentées dans ce manuscrit a été réalisée grâce à la banque d'images médicales du site Servier (<http://www.servier.fr/servier-medical-art>).

# Table des matières

---

<b>Introduction générale : Mémoires épigénétiques</b> .....	1
I. Définitions.....	1
II. Les différentes épigénétiques.....	2
III. Les attracteurs et circuits dynamiques.....	3
A. Généralités.....	3
B. Modélisation d'un circuit à un seul gène.....	6
C. Représentation des paysages de Waddington.....	11
D. Pertinence biologique.....	13
1. Interprétations expérimentales.....	13
2. Changement d'attracteur.....	13
3. Attracteurs et cancers.....	14
IV. Attracteurs et marquages structuraux de la chromatine : deux approches complémentaires de la mémoire cellulaire.....	15
V. Objectifs des travaux de thèse.....	17
<b>Partie 1 : Mémoire et vitellogénèse</b> .....	21
I. L'effet mémoire de la vitellogénèse.....	21
A. La vitellogénèse.....	21
B. L'effet mémoire.....	21
II. Les acteurs impliqués dans cet effet mémoire.....	23
A. Les récepteurs aux œstrogènes.....	24
1. La région amino-terminale (domaines A/B).....	24
2. La région centrale (domaines C et D).....	25
3. La région carboxy-terminale (domaines E et F).....	25
4. La forme courte d'ER $\alpha$ .....	27
B. COUP-TF1.....	29
III. Un modèle dynamique d'empreinte transcriptionnelle dérivé de l'effet mémoire de la vitellogénèse (Article 1).....	30
IV. Application possible en écotoxicologie : création de cellules enregistreuses.....	56

<b>Partie 2 : Effet Warburg et maintien de l'état mésenchymateux.....</b>	<b>61</b>
I. La transition épithélio-mésenchymateuse.....	61
A. Définition.....	61
B. Classification des EMT.....	62
C. Caractéristiques.....	64
1. Perte de polarité cellulaire.....	65
2. Perte des jonctions cellulaires.....	65
3. Dégradation de la matrice extracellulaire.....	66
4. Changements morphologiques.....	66
5. Changements métaboliques.....	67
D. Programmes impliqués dans l'EMT.....	67
1. Voies de signalisation.....	67
2. Facteurs de transcription et coactivateurs.....	68
3. Marquages structuraux de la chromatine.....	70
E. Maintien de l'état mésenchymateux.....	71
II. Notions de métabolisme.....	72
A. L'ATP, « monnaie énergétique » de la cellule.....	72
B. Sources d'ATP.....	73
1. La glycolyse.....	74
2. La décarboxylation oxydative du pyruvate.....	77
3. La carboxylation du pyruvate.....	78
4. La $\beta$ -oxydation des acides gras.....	79
5. Le cycle des acides tricarboxyliques.....	81
6. La respiration ou phosphorylation oxydative.....	82
7. La voie des pentoses phosphates.....	87
III. Cancer et métabolisme.....	88
A. Le métabolisme du glucose des cellules cancéreuses.....	88
1. La glycolyse aérobie ou effet Warburg.....	88
2. Prélever plus pour consommer plus.....	89
3. Un métabolisme adapté à la croissance et la prolifération cellulaire.....	92
4. Le lactate, déchet abondant ou allié des tumeurs ?.....	95



B. Croisement des voies métaboliques et de la tumorigénèse.....	97
1. La voie PI3 kinase.....	97
2. Les enzymes métaboliques.....	97
3. Les tyrosine-kinases.....	98
4. Glutamine et <i>Myc</i> .....	99
5. P53.....	99
C. Glycolyse aérobie et hypoxie.....	99
D. Effet Warburg et thérapie.....	102
IV. Les effets oncogéniques d'une privation de glucose (Article 2, en soumission).....	103
V. Implication en santé : remise en question des traitements anti-angiogéniques.....	124
<b>Conclusions</b> .....	129
I. Synthèse.....	129
II. Discussion.....	129
A. Pour creuser le lien métabolisme / épigénétique.....	130
B. Sur l'EMT et les boucles de régulations positives.....	132
C. « Mémoires épigénétiques : marques structurales ou circuits actifs ? » (Article 3).....	133
<b>Annexe</b> : Modélisation plus détaillée d'un attracteur en fonction de la concentration totale de $F$ .....	165
<b>Références bibliographiques</b> .....	171



**Introduction générale :**

**Mémoires épigénétiques**



# Introduction générale : Mémoires épigénétiques

---

Les êtres vivants ont besoin, pour exister, s'adapter à leur environnement et se reproduire, de stocker et/ou de transmettre de nombreuses informations. La mémoire de l'espèce est portée par l'acide désoxyribonucléique (ADN), premier support identifié comme capable de mémoriser l'intégralité des caractéristiques potentielles propres à chaque espèce en vue de les exprimer. À l'échelle de la cellule, les phénomènes de mémoire (concernant principalement la différenciation cellulaire et l'adaptation à l'environnement) ne modifient pas l'information génétique contenue dans la séquence nucléotidique, c'est pourquoi ils sont dits épigénétiques.

## I. Définitions

Si deux cellules d'un même organisme partagent le même génome, elles peuvent pourtant être différentes d'un point de vue phénotypique et fonctionnel. Les cellules remplissant une même fonction doivent garder en mémoire cette fonction au cours du temps et des différentes mitoses qu'elles vont subir. De plus, des cellules partageant le même génome et le même stade de différenciation peuvent garder en mémoire certaines expériences de traitements ou d'expositions qui peuvent influencer leur réponse à des stimulations futures. Comme ces cellules partagent les mêmes informations génétiques, un autre niveau de mémorisation doit entrer en jeu, permettant l'expression d'un ensemble de gènes particuliers en fonction de facteurs environnementaux.

Waddington a été le premier à évoquer l'épigénétique (Waddington, 1942), qu'il définit comme l'étude des interactions entre les gènes et leurs produits, conduisant au phénotype. Aujourd'hui, l'épigénétique est souvent définie comme l'étude des modulations de l'expression génétique transmissibles sans modification de la séquence d'ADN, ce que l'on pourrait résumer aux informations permettant de déterminer si, quand et comment une information génétique en particulier va être exprimée.

Par ailleurs, les expériences de clonage (transfert de noyaux de cellules différenciées dans des œufs énucléés) ont montré que l'ADN contenu dans le noyau d'une cellule suffit à

redonner un individu entier. Cela signifie que la plupart des cellules somatiques, si elles gardent intactes les informations génétiques, peuvent perdre leur statut épigénétique, qui est donc effaçable.

Ainsi, les informations épigénétiques, transmissibles et réversibles, permettent de moduler l'expression génétique sans altération de la séquence nucléotidique.

## II. Les différentes épigénétiques

Initialement, l'épigénétique concernait toutes les régulations au-delà de la séquence d'ADN, mais dans la recherche expérimentale actuelle, l'épigénétique est très souvent limitée à l'étude des modifications structurelles de la chromatine. Ces marquages chromatinien comprennent des modifications chimiques covalentes (méthylation de l'ADN, ainsi que méthylations, acétylations, phosphorylations, sumoylations, ubiquitinations des histones), le remplacement d'histones classiques par des variants, la position sub-nucléaire de gènes, ou l'organisation tri-dimensionnelle du génome. Leur influence (positive ou négative) sur la transcription et donc sur les profils d'expression génétique a été largement décrite et leurs mécanismes d'action amplement étudiés. Cette vision de l'épigénétique repose sur une supposée stabilité des marquages chromatinien, qui agiraient comme des « marques-page » de l'expression génétique, figeant grâce à des marques covalentes les niveaux d'expression de gènes en fonction de signaux environnementaux.

Cette vision ne tient pas compte de la vision originelle de l'épigénétique, basée sur des réseaux d'interactions non linéaires, ni du caractère labile des modifications chromatinien (très dynamiques car toutes les enzymes antagonistes peuvent être exprimées dans la même cellule). Une seconde approche de l'épigénétique, admise depuis longtemps par les modélisateurs et émergente dans la biologie expérimentale, donne une place centrale aux attracteurs. Les attracteurs correspondent à des profils stables d'expression génétique résultant essentiellement de la configuration de réseaux de gènes et de la présence de circuits dynamiques (boucles de régulations).

S'il existe de nombreuses preuves expérimentales du rôle des marquages chromatinien dans la régulation de la transcription et donc de la mémoire cellulaire, l'impact sur ces dernières des boucles de rétroactions et des attracteurs, pouvant fonctionner indépendamment de tout marquage covalent, est encore, au vu du nombre de publications y faisant référence, trop souvent sous-estimé.

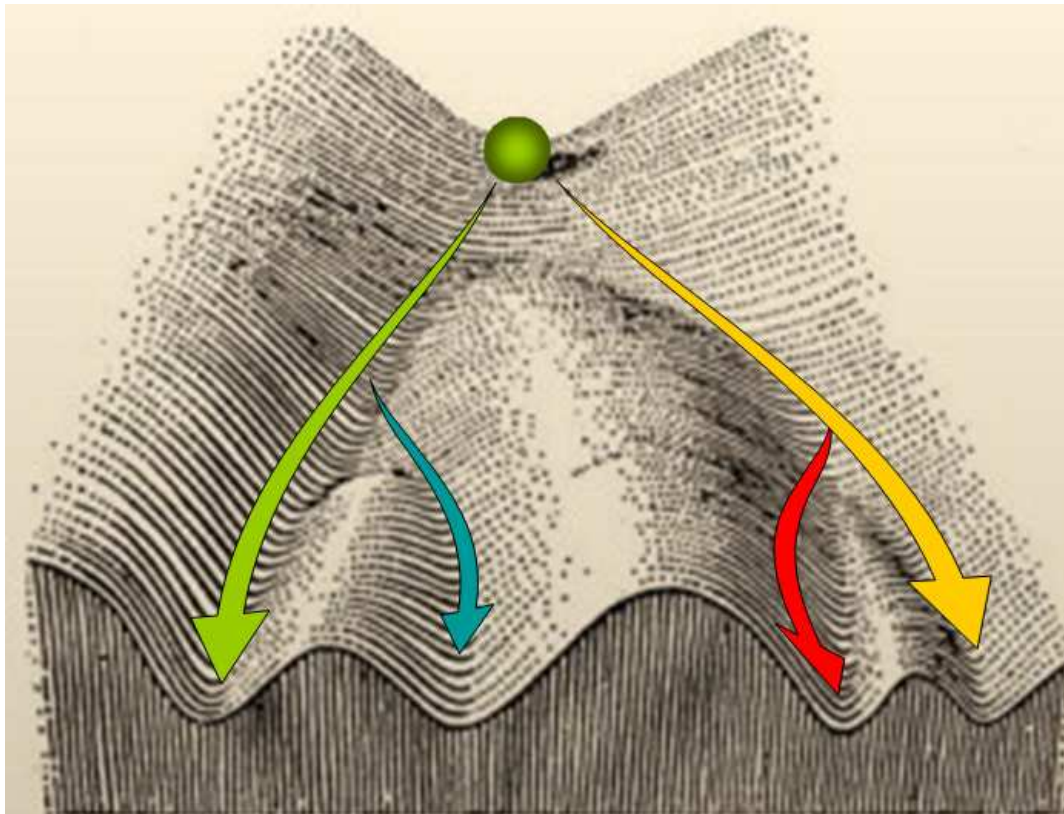
Afin d'introduire de manière générale les deux volets de nos travaux, nous détaillerons donc la notion d'attracteurs dans les mécanismes de mémoire épigénétique et replacerons la recherche sur les marques chromatinien dans ce contexte biologique.

### III. Les attracteurs et circuits dynamiques

#### A. Généralités

Un attracteur peut être défini comme une configuration de l'expression de réseaux de gènes aboutissant à un profil d'expression génétique stable (c'est-à-dire irréversible en l'absence de perturbation). Une première illustration des attracteurs a été faite par Waddington dans son livre *La stratégie du gène* de 1957 (Fig. 1). Elle représente ce que Waddington appelle des paysages épigénétiques, à savoir une surface définie dans un espace multidimensionnel représentant les états cellulaires stationnaires comme des bassins et les chenaux les reliant comme des vallées. Pour une collection de gènes donnée, dont certains en régulent d'autres directement ou indirectement, la combinaison ne peut pas prendre n'importe quelle valeur mais s'ajuste spontanément de manière à ce que les forces des interactions se compensent mutuellement. On appelle « attracteurs » ces jeux de valeurs compatibles.

Pour représenter ces attracteurs, il faudrait imaginer un espace pour lequel il existe un axe représentant la concentration de chaque substance dans la cellule (soit un espace à  $n$  dimensions pour  $n$  gènes). Ceci étant impossible à illustrer au-delà de deux gènes, les représentations existantes d'attracteurs ne peuvent être que des approximations permettant d'appréhender visuellement la notion d'attracteurs.



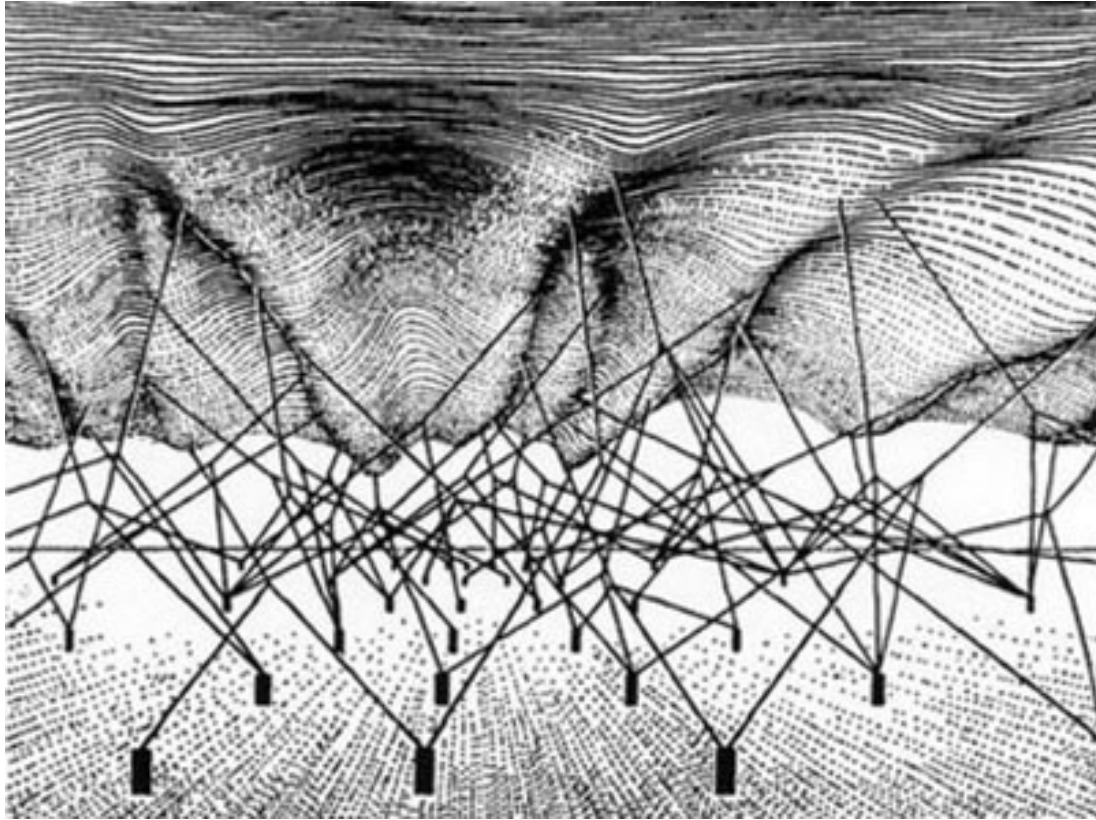
**Figure 1 : Illustration des paysages épigénétiques de Waddington (d'après Waddington, 1957)**

Les vallées représentent les trajectoires pouvant être empruntées par les cellules en fonction du contexte cellulaire. À chaque « embranchement », qui représente un choix binaire, chaque cellule prend une seule direction. Les pics et crêtes correspondent à des états instables dans lesquels la cellule ne peut rester, tandis que les vallées correspondent aux états stables dans laquelle elle peut stationner en absence de bruit ou de signaux.

Pour Waddington, ce sont les produits de gènes fonctionnant en réseau qui tirent les ficelles et façonnent le paysage, définissant ainsi les attracteurs (Fig. 2). Cette illustration, bien que pionnière à une époque où le flux génétique est supposé linéaire du gène vers la fonction, est cependant approximative, Waddington ne définissant pas ce que représente la surface sur laquelle roule la bille ni quelle est la force permettant à la cellule de « tomber » dans ces attracteurs.

Ces illustrations (Fig. 1 et 2), si elles sont erronées d'un point de vue conceptuel, permettent toutefois d'appréhender que plus la vallée est profonde, plus l'attracteur est fort, plus l'état de la cellule s'y trouvant est stable, et donc plus il faudra une intervention extérieure importante pour l'en sortir.





**Figure 2 : Illustration par Waddington de sa théorie selon laquelle les gènes façonnent les paysages épigénétiques, (Waddington, 1957).**

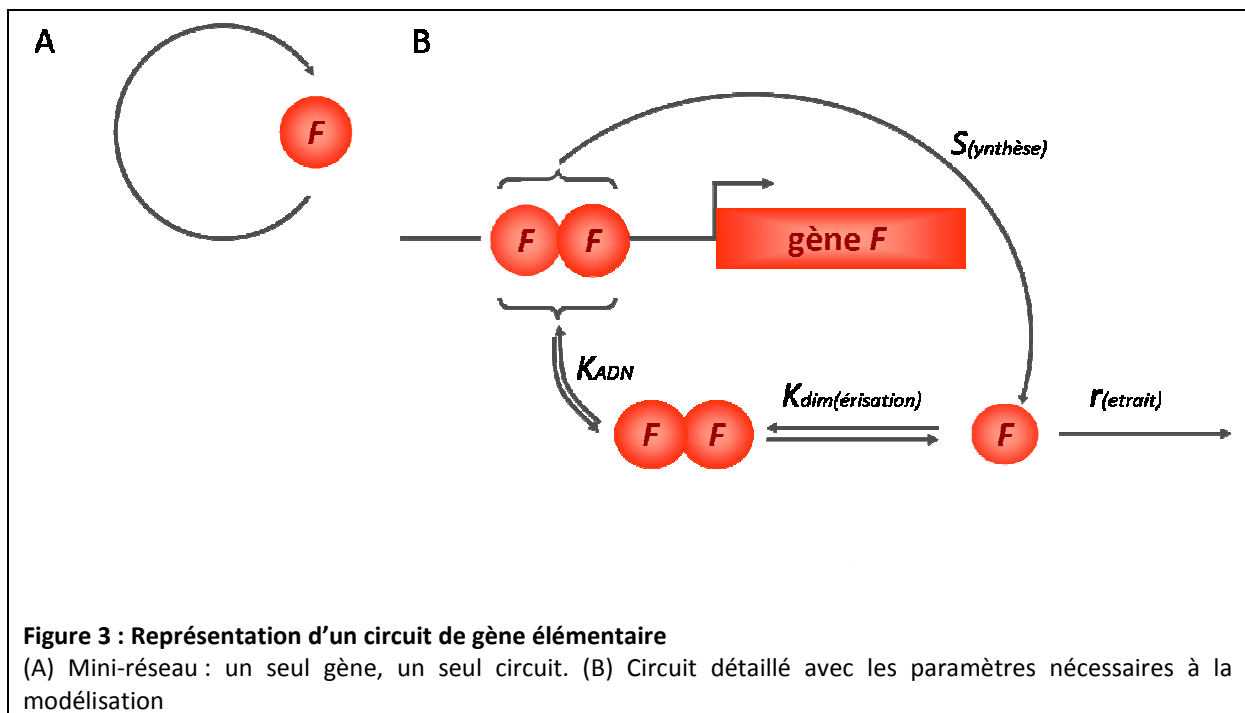
Notons bien que si le niveau d'expression des gènes définissent les attracteurs, cette représentation est fantaisiste car la surface en deux dimensions ici devrait en contenir une vingtaine correspondant à la vingtaine de gènes figurés par des piquets tirant les ficelles modelant le paysage.

Si les attracteurs sont des états stables, cela ne signifie pas pour autant que ce sont des réseaux d'interaction à l'équilibre, dans la mesure où les acteurs de ces états stables sont continuellement renouvelés. Ce sont des états stationnaires dans des systèmes dissipatifs, des apports continus de matière et d'énergie libre étant associés à une dissipation continue de chaleur.

Cela permet d'obtenir différents états stationnaires avec exactement les mêmes gènes si certaines conditions sont remplies, à savoir la présence de circuits auto-amplificateurs dans les réseaux et la non-linéarité (grâce aux phénomènes de coopérativité) des mécanismes déterministes (Cherry et Adler, 2000 ; Kaufman, 2004 ; Sobie, 2011).

## B. Modélisation d'un circuit à un seul gène

Afin de mieux comprendre la notion d'attracteurs, nous pouvons en modéliser un, étape par étape. Nous prendrons ici l'exemple le plus simple avec un réseau à un seul gène codant pour un facteur de transcription (noté  $F$ ), exerçant une rétroaction positive sur lui-même (Fig. 3).



Si la dynamique des interactions entre le facteur de transcription  $F$  et l'ADN est beaucoup plus rapide que celle de l'expression du gène, alors nous sommes autorisés à utiliser l'approximation de la "séparation des échelles de temps" (Michel, 2009) et à assimiler les constantes d'équilibre à des rapports de concentrations au sein d'un système dynamique. La constante de (quasi) équilibre de dissociation (entre  $F$  et l'ADN sur lequel il se fixe) dépend donc des concentrations en ADN et  $F$  et peut s'écrire :

$$K_{ADN} = \frac{[ADN / F_2]}{[ADN_0][F_2]} \quad (1a)$$

d'où

$$[ADN / F_2] = K_{ADN}[ADN_0][F_2] \quad (1b)$$

où  $ADN_0$  représente le promoteur non lié à  $F$  et  $F_2$  correspond au dimère de  $F$ .

La constante de (quasi) équilibre de dimérisation dépend des concentrations en  $F$  mono- ou dimérique et s'écrit

$$K_{\text{dim}} = \frac{[F_2]}{[F]^2} \quad (2a)$$

d'où

$$[F_2] = K_{\text{dim}} [F]^2 \quad (2b)$$

En remplaçant dans l'équation 1b  $[F_2]$  par sa valeur donnée dans l'équation 2b, on obtient

$$[ADN / F_2] = K_{ADN} K_{\text{dim}} [ADN_0] [F]^2 \quad (3)$$

On peut noter la constante de double-association  $Ka = K_{ADN} K_{\text{dim}}$  (exprimé en  $M^{-2}$ )

Le promoteur peut être dans deux états : libre ou occupé par un dimère de  $F$ , sachant qu'un monomère de  $F$  ne peut pas s'y fixer. On a donc  $[ADN_{\text{tot}}] = [ADN_0] + [ADN / F_2]$  et la fraction de temps où le promoteur est lié aux dimères de  $F$  s'appelle fraction d'occupation ( $Y$ ) et correspond à

$$Y = \frac{[ADN / F_2]}{[ADN_0] + [ADN / F_2]} = \frac{K_a [ADN_0] [F]^2}{[ADN_0] + K_a [ADN_0] [F]^2} = \frac{K_a [F]^2}{1 + K_a [F]^2} \quad (4)$$

Si on note  $K$  la constante de double dissociation avec  $K=1/K_a$ , on a donc

$$Y = \frac{[F]^2}{K + [F]^2} \quad (5)$$

qui est une fonction sigmoïdale de  $[F]$ .

Une fois définis ces différents paramètres, nous pouvons modéliser simplement le circuit de rétroaction positive présenté en Fig. 4. Appelons  $x$  le niveau d'expression de  $F$ . L'évolution

de  $x$  dans le temps ( $dx/dt$ ) dépend du rapport entre sa synthèse ( $S$ ) et son élimination ( $r$ ). Son taux de synthèse est la fréquence de transcription maximale «  $s$  » pondérée par la fraction de temps où le facteur est présent sur son promoteur (c'est-à-dire  $Y$ ). La disparition de  $x$  est simplement une fonction linéaire de la quantité, avec un taux constant  $r$  (pour *retrait*). On obtient alors

$$\frac{dx}{dt} = sY - rx \quad (6)$$

et donc

$$\frac{dx}{dt} = s \frac{x^2}{K + x^2} - rx \quad (7)$$

Sans résoudre cette équation différentielle, on peut déjà trouver les points stationnaire en résolvant  $dx/dt = 0$ , qui est une simple équation du second degré. Si on note  $R$  le rapport entre synthèse maximale ( $s$ ) et dégradation ( $r$ )

$R = s/r$ , l'équation est

$$-rx(x^2 - Rx + K) = 0 \quad (8)$$

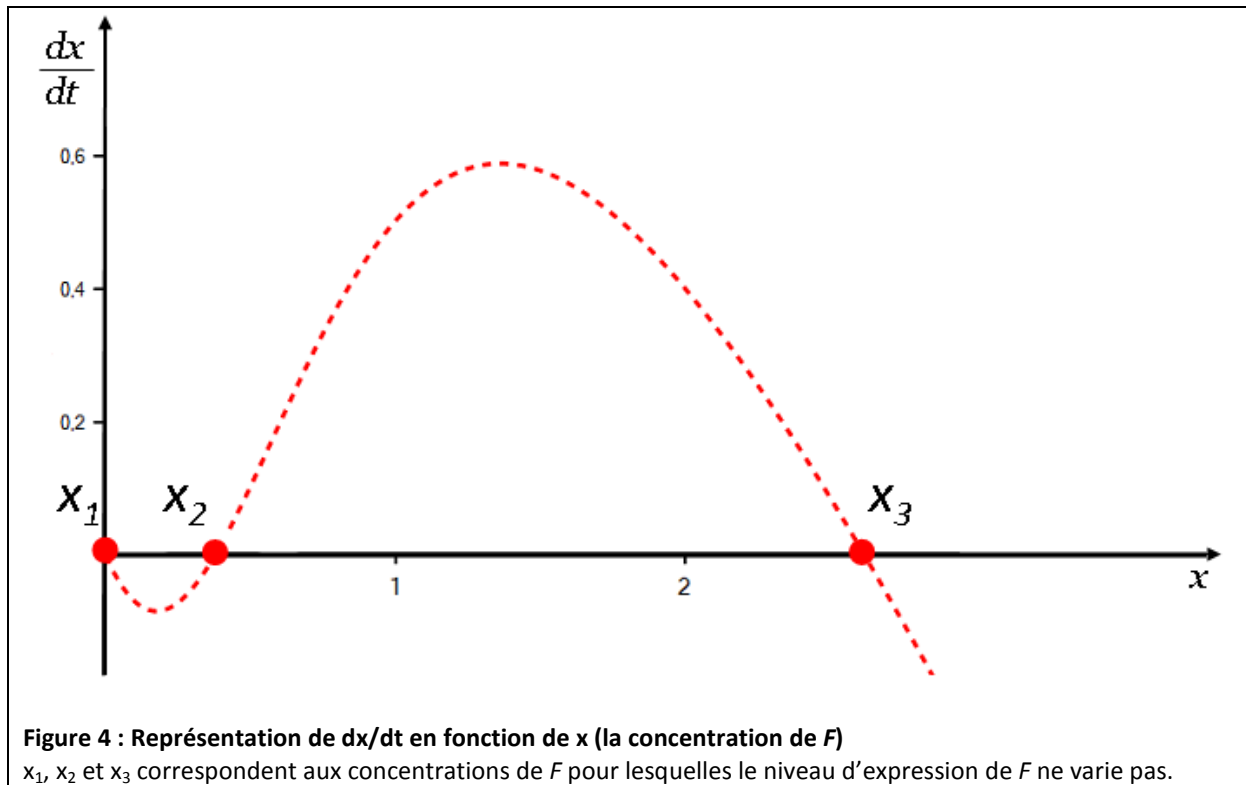
La première solution évidente  $x_1$  vaut 0 pour  $x = 0$ , les deux autres solutions  $x_2$  et  $x_3$  sont obtenues en résolvant

$$x^2 - Rx + K = 0 \quad (9)$$

Pour résoudre cette équation, rappelons-nous du discriminant (que l'on pose ici  $\Delta = R^2 - 4K$ ). S'il est positif, nous avons deux solutions à cette équation

$$x_2 = \frac{R - \sqrt{R^2 - 4K}}{2} \text{ et } x_3 = \frac{R + \sqrt{R^2 - 4K}}{2} \quad (10)$$

Afin de visualiser concrètement ce que cela représente, nous pouvons prendre par exemple  $K = 1$  et  $R = 3$ . Dans ce cas précis, ce sont les points d'intersection avec l'abscisse ( $x_1$ ,  $x_2$  et  $x_3$ ) de la courbe représentée sur la Fig. 4.

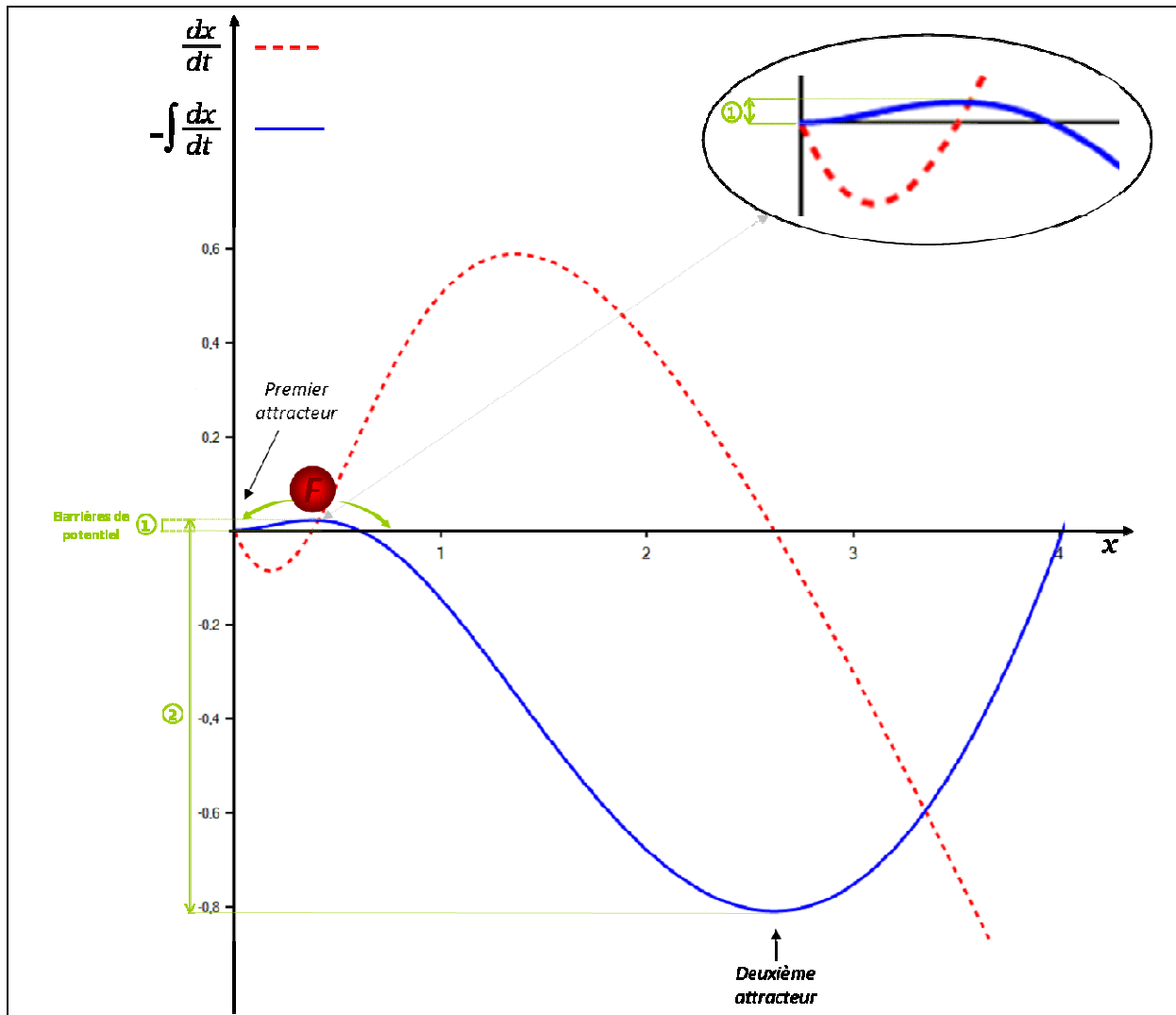


Par analogie avec les potentiels gravitationnels (si une vraie bille roulait le long d'une vallée grâce à la gravité, elle emmagasinerait de l'énergie potentielle lorsqu'elle serait en altitude pour la transformer en énergie cinétique lors de sa descente), on peut modéliser les paysages de Waddington correspondant aux attracteurs, par les intégrales négatives de  $\frac{dx}{dt}$  (comme l'a fait Einstein pour représenter le potentiel gravitationnel).

$$\Phi = -\int \left( s \frac{x^2}{K + x^2} - rx \right) dx \quad (11)$$

Soit dans le cas présent

$$-s \left( x - \sqrt{K} \arctan \frac{x}{\sqrt{K}} \right) - \frac{rx^2}{2} \quad (12)$$



**Figure 5 : Représentation de  $dx/dt$  et de son intégrale négative en fonction de la concentration de  $F$ , symbolisant le paysage épigénétique de Waddington associé au circuit.**

Lorsque  $[F] < x_1$ , la synthèse de  $F$  n'est pas possible (concentration ne permettant pas la dimérisation de  $F$ ). Lorsque  $[F] > x_1$ , la synthèse de  $F$  par lui-même est fortement favorisée (principe de la rétroaction positive d'un gène sur lui-même).

Sa représentation (courbe pleine bleue sur la Fig. 5) montre une petite barrière de potentiel (1 sur la Fig. 5) qui sépare deux attracteurs (que l'on voit sur la figure juste en dessous de la représentation de  $F$ , qui peut alors basculer dans un attracteur ou dans l'autre). On note alors que pour passer du premier attracteur au second, la synthèse d'une quantité suffisante de  $F$  est nécessaire (même si cette quantité peut être minime), tandis que le second attracteur est beaucoup plus « profond » que le premier : sans intervention extérieure (dégradation massive de  $F$  ou inhibition de la synthèse par un autre produit de gène par exemple), le système reste bloqué dans une configuration où la synthèse et la dégradation

de  $F$  sont maximales et s'équilibrent. La barrière de potentiel (2) sur la Fig. 5) pour sortir de cet attracteur et revenir vers le premier attracteur est beaucoup plus forte.

Comme  $dx/dt = 0$  pour  $x = 0$ , l'expression de  $x$  ne peut pas s'amorcer seule ; il y a nécessité, tout comme pour stopper le système, d'une intervention extérieure. On peut envisager que des fuites transcriptionnelles (ou « bruit ») lié au promoteur basal du gène (notamment la TATA box) soient responsables de l'amorçage de la transcription. Cela peut également être l'activation par un autre facteur de transcription, suite à un signal, et le second attracteur permettrait de mémoriser l'effet du signal même en l'absence de celui-ci.

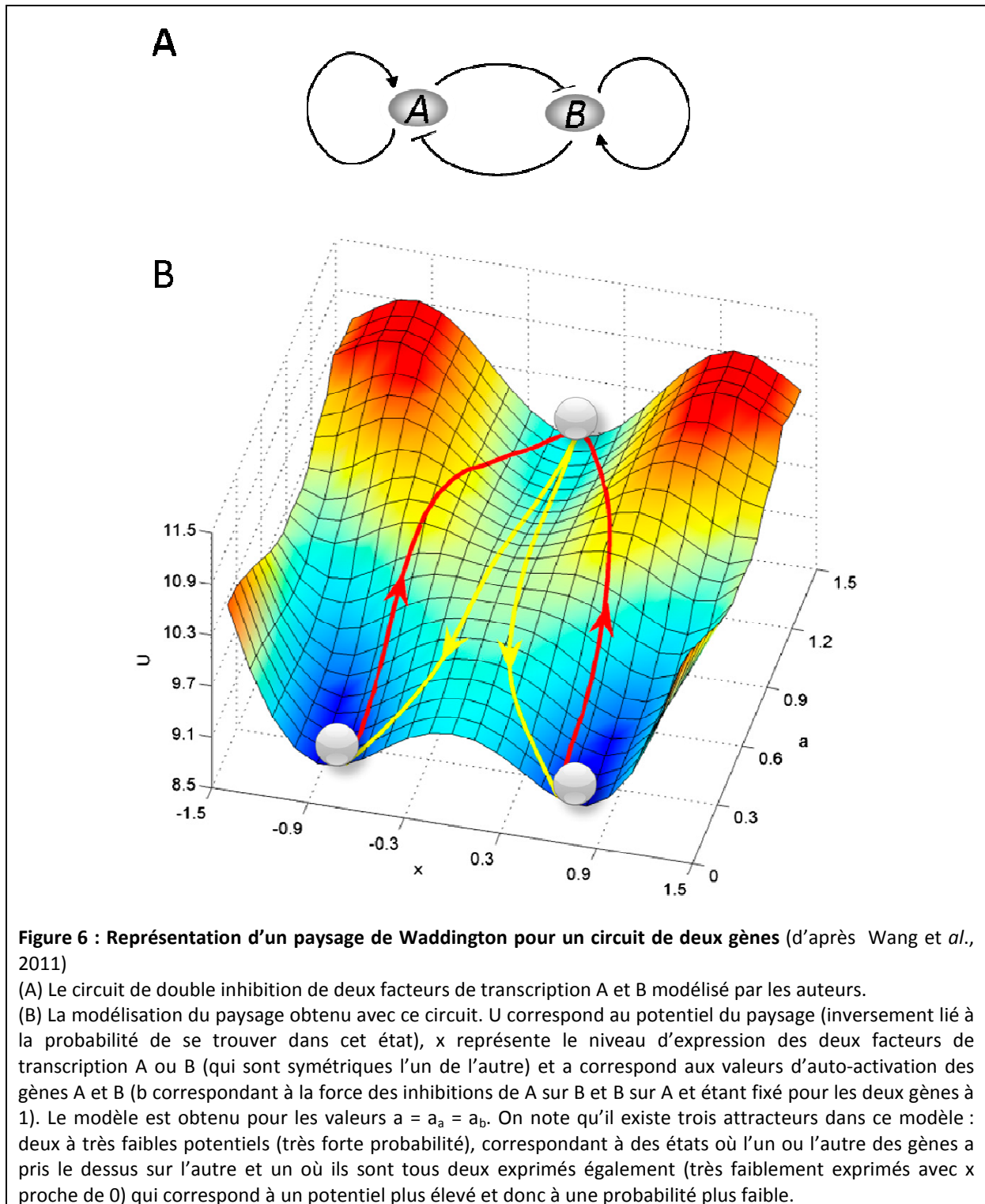
Enfin, il est très important de noter que la coopérativité (ici liée à la dimérisation de  $F$ ) est la condition de « non-linéarité » nécessaire à la multi-stabilité. En effet, l'absence du carré dans l'équation 7 n'aurait généré que deux solutions et donc une crête et un bassin (au lieu d'une crête et deux bassins), soit au final seul état d'expression du gène (monostabilité).

Ce développement simplifié est celui généralement utilisé dans la littérature pour un facteur de transcription dimérisable, dans le prolongement de l'étude précurseur de Keller (Keller, 1995). Il serait cependant plus exact de n'exprimer l'équation qu'en fonction de la concentration totale du facteur, comme présenté en annexe. Toutefois, comme on peut le constater, le schéma plus précis obtenu est comparable en terme de représentation d'attracteurs.

### C. Représentation des paysages de Waddington

Ce que l'on vient de voir pour un réseau simplifié à l'extrême (un seul gène) permet la régulation d'un gène par lui-même avec deux états stables, représentables par une simple courbe. Wang et son équipe (Wang et *al.*, 2011) ont calculé et modélisé ce que serait un attracteur pour deux gènes s'auto-activant et s'inhibant l'un l'autre (Fig. 6). Ils ont ainsi montré que les théories de Waddington pouvaient être soutenues par des cas concrets mais que la cellule, contrairement à ce que pensait Waddington, peut rester stationnaire dans des états indifférenciés (présence dans leur modèle d'un attracteur correspondant à un état

stable indéfini où A et B coexistent). La modélisation d'un circuit à deux gènes s'inhibant réciproquement et s'auto-stimulant est une surface incurvée incluant trois bassins.



À partir de là, on comprend aisément que les attracteurs ne peuvent pas être représentés graphiquement pour des circuits contenant plus de deux gènes (nous ne pouvons pas appréhender assez de dimensions pour rendre compte de ce que pourraient être des



attracteurs prenant en compte l'état du génome entier). Cependant, la notion même d'attracteurs comme états stationnaires dans laquelle se trouve une cellule en fonction du niveau d'expression de ses gènes devient plus claire. En effet, en augmentant le nombre de partenaires dans le réseau il est alors possible d'imaginer qu'il existe des paysages de Waddington beaucoup plus complexes (car multidimensionnels), avec un nombre d'attracteurs élevé et une régulation très fine des choix cellulaires en fonction de l'état des réseaux à un temps  $t$ . Ces paysages ne pourront donc être figurés que de manière partielle, les schémas en résultant étant plus des supports de réflexion qu'un reflet de ce que peut être un attracteur dans un circuit à plus de deux gènes.

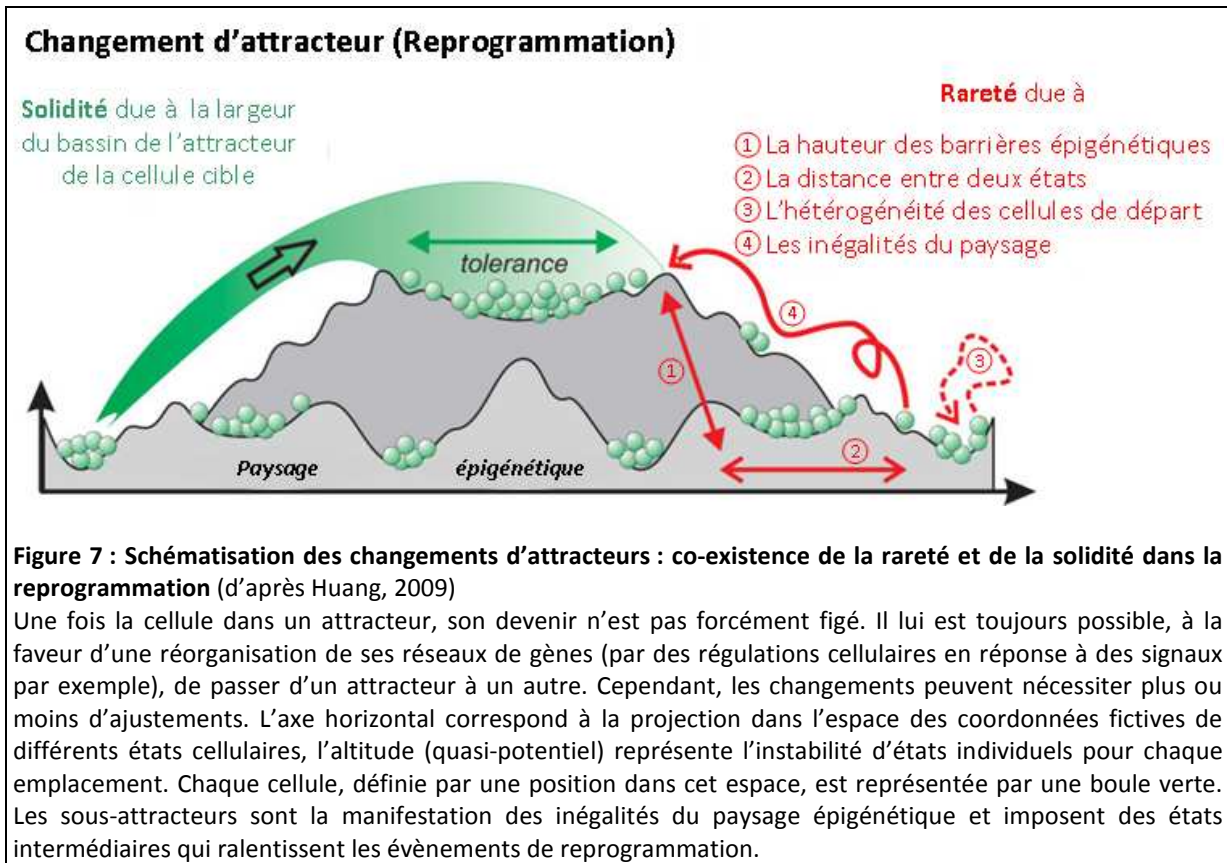
## D. Pertinence biologique

### *1. Interprétations expérimentales*

La connaissance des attracteurs en biologie peut apporter des nuances au travail expérimental. Ainsi, les effets observés à un temps  $t$  après un traitement ou autre ne sont peut être pas représentatifs de l'état stable final. Si on regarde « le chemin », il est probable que nous n'observons que des états intermédiaires, sans réelle pertinence biologique dans le sens où plusieurs « chemins » peuvent mener au même attracteur (Huang et *al.*, 2005-a) alors qu'un même « chemin » peut bifurquer de manière stochastique au dernier moment pour donner finalement deux états finaux différents.

### *2. Changement d'attracteur*

Si les paysages de Waddington représentent les différents états de différenciation cellulaire, les expériences de reprogrammation cellulaire ont montré qu'il était possible de passer d'un attracteur à un autre (Fig. 7). La stabilité des attracteurs peut être corrélée à leur « profondeur » (c'est-à-dire le potentiel le plus faible ou la probabilité la plus forte qu'a la cellule d'être dans cet état) et à leur « largeur » (reflétant la permissivité du bassin d'attraction, à savoir l'hétérogénéité des cellules du bassin, permettant le basculement vers un phénotype légèrement différent du même attracteur plutôt que le basculement vers un attracteur différent).



### 3. Attracteurs et cancers

Si on raisonne en terme d'attracteurs et pas seulement en terme de mutations ou de « marquages épigénétiques » (de la chromatine) dans l'étude des cancers, le phénotype mésenchymateux (avec des caractéristiques de migration et de prolifération rappelant les cellules embryonnaires) semble correspondre à un attracteur ancestral très robuste (Huang et Ingber, 2006). Cet attracteur pourrait être hérité directement d'organismes unicellulaires pour qui la migration ou la division active sont des activités normales. Le problème est alors que l'engagement accidentel de cellules dans cet attracteur pourrait être fortement stabilisé par des rétroactions positives (Iliopoulos et *al.*, 2009), empêchant les cellules métastatiques de revenir à un phénotype normal. La présence de mutations dans le génome permettrait également de stabiliser fortement l'attracteur, comme si le bassin le figurant était creusé du simple fait de la mutation, ce qui empêcherait le retour à un état normal des cellules mutées.

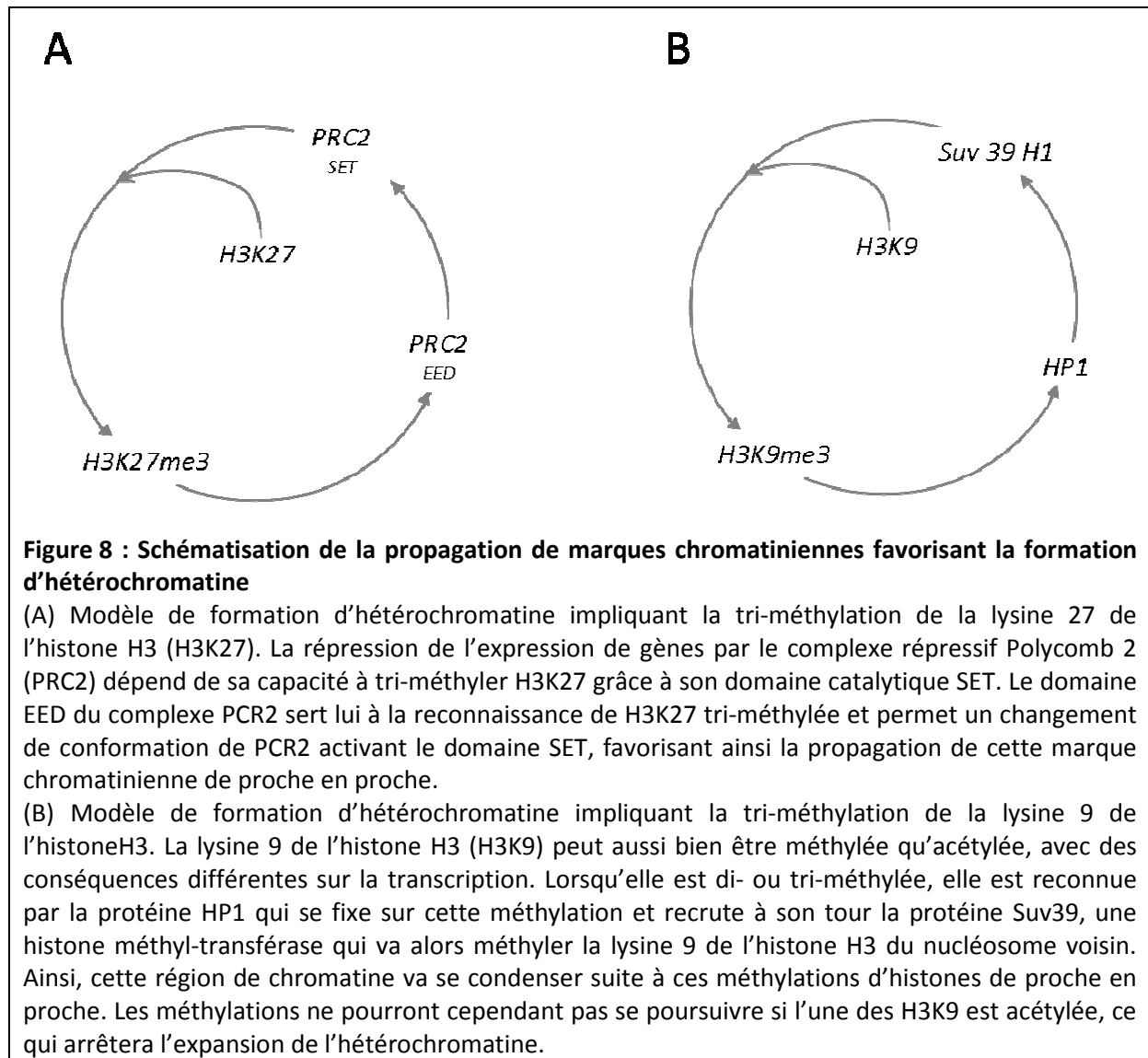
## IV. Attracteurs et marquages structuraux de la chromatine : deux approches complémentaires de la mémoire cellulaire

Concernant la place des différents acteurs de l'épigénétiques, les visions « attracteurs » et « marquages structuraux de la chromatine » n'ont pas lieu d'être en opposition ou exclusifs l'un de l'autre.

Si la formation d'attracteurs dans les réseaux régulateurs de gènes ne nécessite pas de marquage covalent des gènes, les marquages chromatiniens et plus généralement toutes les modifications post-traductionnelles peuvent cependant participer au façonnage d'un attracteur. En effet, en reprenant l'exemple du circuit à un gène précédemment construit, si la concentration de  $F$  est maximale et stable en dehors de toute intervention extérieure, les facteurs ayant un impact sur sa dégradation, ou sa synthèse (en favorisant / empêchant sa dimérisation ou en modifiant son affinité pour son promoteur ou l'accessibilité de celui-ci) vont pouvoir modifier l'attracteur initial et entraîner le système dans un nouvel attracteur. En envisageant les marques de la chromatine comme des phénomènes dynamiques et non comme une mémoire statique, figeant un comportement cellulaire (Kundu et Peterson, 2009), on conçoit très bien qu'elles soient capables de moduler ces paramètres, permettant de passer d'un attracteur à un autre et jouant effectivement un rôle important dans les phénomènes de mémoire.

De plus, la manière même dont sont copiées les modifications d'histones après la réplication lors des mitoses peut s'apparenter à des boucles d'auto-amplification (Fig. 8), renforçant ainsi l'idée qu'elles participent à la mise en place d'attracteurs. En effet, étant donné que la majorité des tétramères d'histones H3-H4 sont séparés de manière conservative lors de la réplication, le modèle le plus probable pour la copie des modifications d'histones pourrait être une propagation des marques en cis, par modifications de nucléosomes voisins et propagation de proche en proche (Zhu et Reinberg, 2011). Cette hypothèse a été proposée notamment pour la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (Hansen et *al.*, 2008 ; Margueron et *al.*, 2009), pour laquelle elle a été démontrée par Lewis et *al.*, en 2013, ainsi que pour la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 par Suv39H1 (Nakayama et *al.*, 2001).

Comme dans l'exemple de l'attracteur modélisé en Fig.5 où le facteur de transcription se fixe et se dissocie de l'ADN de manière très rapide, les boucles de rétroactions positives présentées ici sont concomitantes de modifications / démodifications très rapides de la chromatine.



Ainsi, les phénomènes de mémorisation cellulaire peuvent tout à fait s'envisager comme des attracteurs auxquels participent de manière dynamique les réseaux de gènes ou les modifications post-traductionnelles des protéines. Les fameuses « marques chromatinienne » ne seraient alors que des composants, comme beaucoup d'autres, des attracteurs dynamiques.

## V. Objectifs des travaux de thèse

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés sous la direction du Pr. Denis MICHEL et du Dr. Pascale LE GOFF, au sein de l'équipe TREC (Transcription, Environnement, Cancer) de l'IRSET (l'U1085 Inserm, Institut de Recherche en Santé, Environnement, Travail). L'équipe étudie actuellement les mécanismes transcriptionnels qui sous-tendent la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) tumorale et leurs origines environnementales, physiques ou chimiques. Elle s'intéresse notamment aux mécanismes épigénétiques, structuraux et dynamiques, impliqués dans la mémoire transcriptionnelle d'expositions environnementales. Mes travaux de thèse s'intègrent dans ces thématiques de recherche, notamment concernant les principes de régulation transcriptionnelle quantitative, les interrelations entre le cytosquelette et l'expression génétique ou encore les incidences de l'effet Warburg sur l'expression génétique.

Nos recherches ont été articulées autour de deux projets ayant chacun pour but d'élucider des phénomènes de mémoire cellulaires grâce à la mise en évidence de circuits génétiques dynamiques.

Ainsi, dans le premier volet de mes travaux de thèse, nous avons proposé un modèle basé sur des circuits dynamiques pour expliquer un mécanisme décrit depuis longtemps chez les vertébrés ovipares, appelé « effet mémoire de la vitellogénèse », mais jusqu'alors inexpliqué. Ce modèle, établi chez la truite et publié en 2011 dans *Biophysical Journal*, implique un récepteur tronqué à l'œstradiol décrit dans les hépatocytes de truite ainsi que le récepteur nucléaire orphelin COUP-TF1, qui joue ici le rôle de co-activateur du récepteur aux œstrogènes (ER). Ce modèle s'appuie sur des résultats plus anciens de l'équipe, qui s'intéresse depuis longtemps à ER et a notamment mis en évidence cette forme tronquée d'ER. Il est également au cœur de la recherche sur les mécanismes épigénétiques de la mémoire transcriptionnelle.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à l'EMT et aux interrelations entre l'état métabolique de la cellule, sa forme cellulaire, façonnée par le cytosquelette, son expression génétique et son phénotype mésenchymateux, soulignant son caractère agressif. Nous avons étudié les conséquences cellulaires d'une privation du glucose en utilisant un analogue non métabolisable de celui-ci, le 2-déoxy-glucose (2-DG) sur des cellules présentant différents phénotypes tumoraux, différenciés ou dédifférenciés.

Nos résultats suggèrent l'existence d'une boucle de régulation positive impliquant un changement dans le métabolisme cellulaire, un réarrangement du cytosquelette, des senseurs du cytosquelette capables d'adapter l'expression génétique, ayant pour effet un renforcement de l'état mésenchymateux des cellules à la suite d'une privation de glucose. Ils sont très importants à l'heure où le métabolisme cancéreux commence à être ciblé dans les traitements anti-tumoraux.

Chaque projet vous sera exposé dans une partie distincte, après une présentation des acteurs et mécanismes permettant d'appréhender les résultats.

## **Partie 1 :**

# **Mémoire et vitellogénèse**





Dans cette première partie, nous vous présenterons le modèle basé sur des circuits génétiques dynamiques et décrivant l'effet mémoire de la transcription de la vitellogénèse en réponse à l'œstradiol. Nous introduirons tout d'abord la vitellogénèse et ce qu'on appelle « l'effet mémoire de la vitellogénèse », ainsi que les facteurs intervenant dans ce phénomène, avant de présenter le modèle que nous avons publié en octobre 2011.

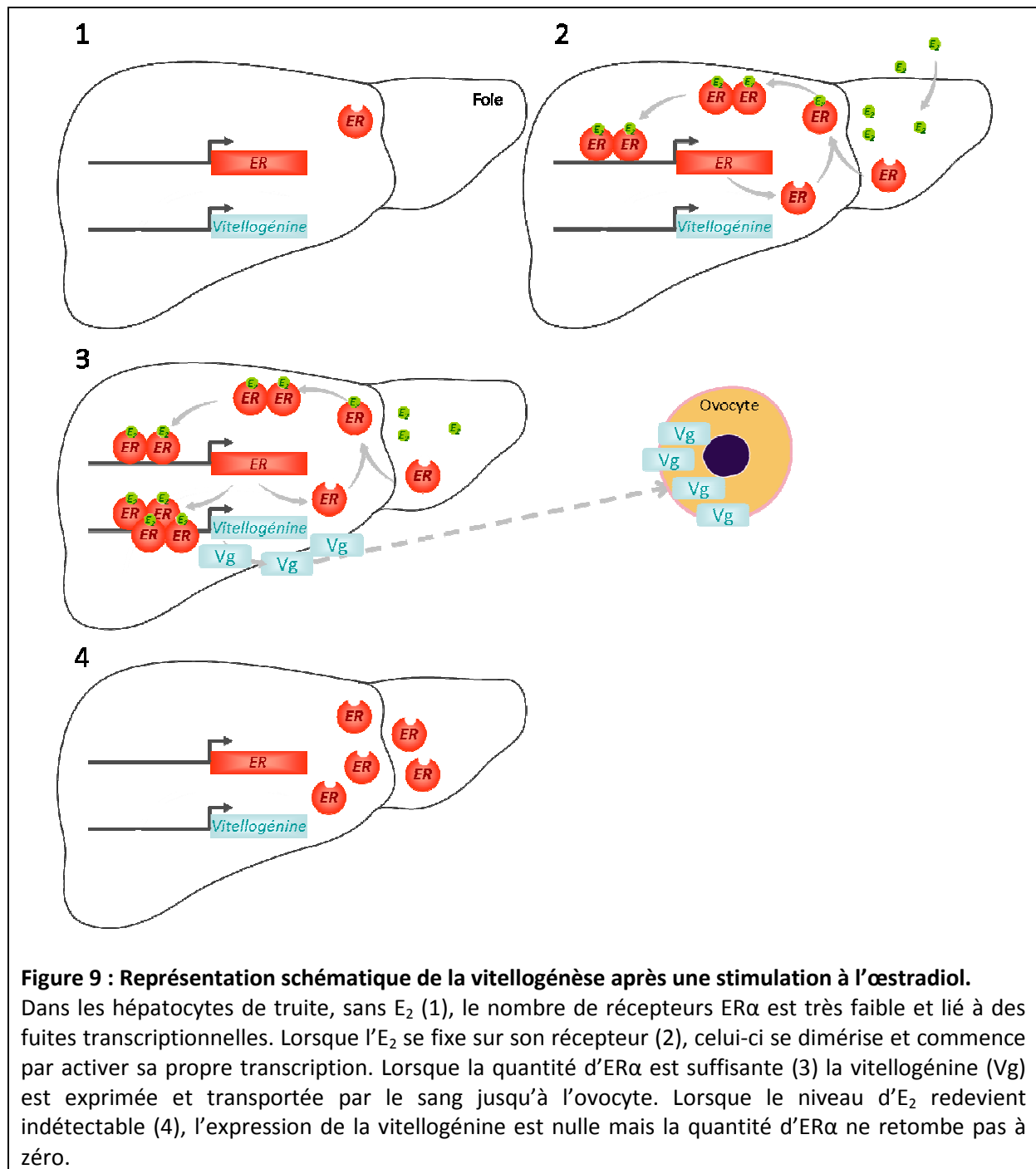
### I. L'effet mémoire de la vitellogénèse

#### A. La vitellogénèse

Chez les vertébrés ovipares, le vitellus constitue les réserves énergétiques de l'embryon. Il est produit par le foie, transporté par la circulation sanguine jusqu'aux ovocytes dans lesquels il est emmagasiné. Il est constitué de dérivés de la vitellogénine, une glyco-lipo-phospho-protéine précurseur synthétisée dans les hépatocytes des femelles au cours de la vitellogénèse sous le contrôle de l'œstradiol (Fig. 9). La synthèse de vitellogénine peut également être induite dans les cellules hépatiques du mâle s'il est exposé à des xéno-œstrogènes (Sumpter et Jobling, 1995 ; Brion et *al.*, 2002) ou directement par injections d'œstradiol, ce qui rend ce modèle très intéressant d'un point de vue expérimental car les interférences avec les hormones endogènes que l'on pourrait avoir avec des femelles sont évitées.

#### B. L'effet mémoire

Il a été observé chez le poulet (Beuving et Gruber, 1971), le xénope (Baker et Shapiro, 1978) ou la truite arc-en-ciel (Le Guellec et *al.*, 1988) que la production de vitellogénine (transcrit et protéine) était plus forte et plus rapide après une seconde stimulation à l'œstradiol qu'après la première stimulation.



**Figure 9 : Représentation schématique de la vitellogénèse après une stimulation à l'œstradiol.**

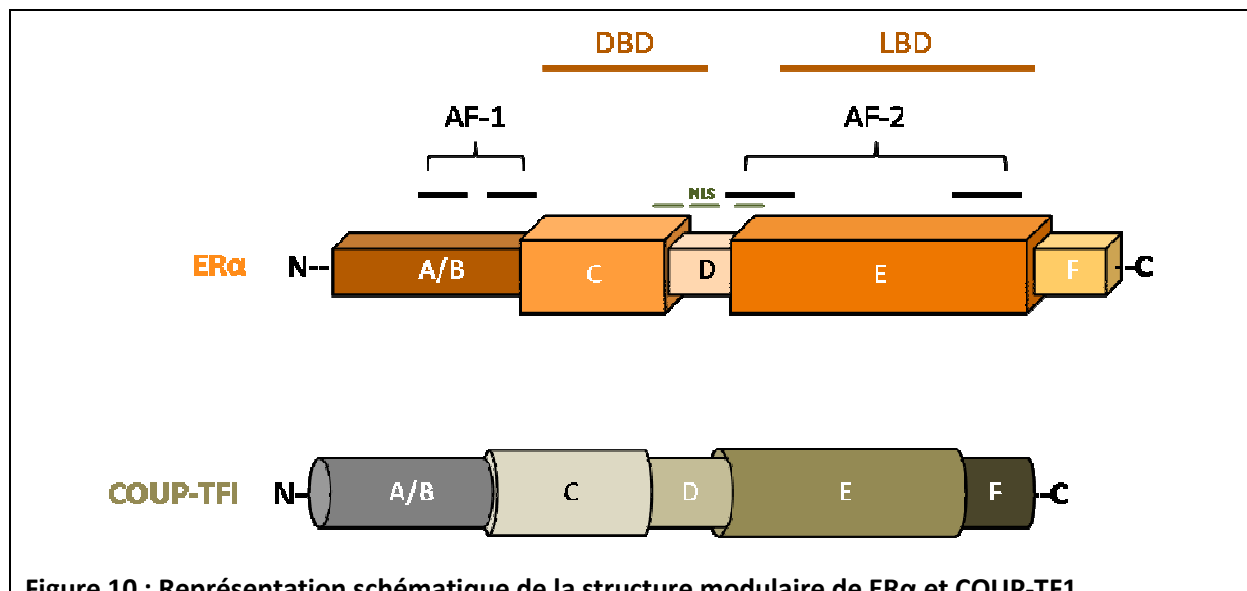
Dans les hépatocytes de truite, sans E<sub>2</sub> (1), le nombre de récepteurs ERα est très faible et lié à des fuites transcriptionnelles. Lorsque l'E<sub>2</sub> se fixe sur son récepteur (2), celui-ci se dimérise et commence par activer sa propre transcription. Lorsque la quantité d'ERα est suffisante (3) la vitellogénine (Vg) est exprimée et transportée par le sang jusqu'à l'ovocyte. Lorsque le niveau d'E<sub>2</sub> redevient indétectable (4), l'expression de la vitellogénine est nulle mais la quantité d'ERα ne retombe pas à zéro.

Ceci a été décrit comme « l'effet mémoire de la vitellogénèse » mais le mécanisme sous-jacent n'a pas encore été élucidé. En effet, Burchs et Evans ont étudié des marques chromatiniennes associées à la production de vitellogénine chez le poulet et constaté qu'au bout de sept semaines ces marques disparaissaient, sans pour autant que l'effet mémoire décrit ne soit affecté (Burchs et Evans, 1986). Ces modifications transitoires des marquages covalents de la chromatine ne peuvent donc pas être impliquées dans la mémoire à très long terme dont il est question pour la production de vitellogénine.

L'originalité de ce modèle d'étude tient dans le fait que ce n'est pas la production de vitellogénine en tant que telle qui est maintenue quand le signal (œstradiol) est ôté mais bien l'aptitude des hépatocytes à répondre à une stimulation œstrogénique. En effet, entre deux stimulations, la quantité de vitellogénine retombe à zéro, tandis que l'expression de la forme courte d'ER $\alpha$  (qui stimule l'expression de la vitellogénèse) reste élevée (Fig. 9) (Westley et Knowlan, 1979 ; Barton et Shapiro, 1988).

## II. Les acteurs impliqués dans cet effet mémoire

L'effet mémoire de la vitellogénine chez la truite repose sur la coopérativité entre le récepteur nucléaire orphelin COUP-TF1 et un récepteur tronqué à l'œstradiol (rtER) spécifiquement exprimé par les hépatocytes. Tous deux appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires (RN), décrits comme ayant une structure commune comprenant six domaines (A à F), l'action coordonnée de ces domaines permettant d'intégrer les différents signaux cellulaires et d'apporter une réponse biologique adaptée (Fig. 10).



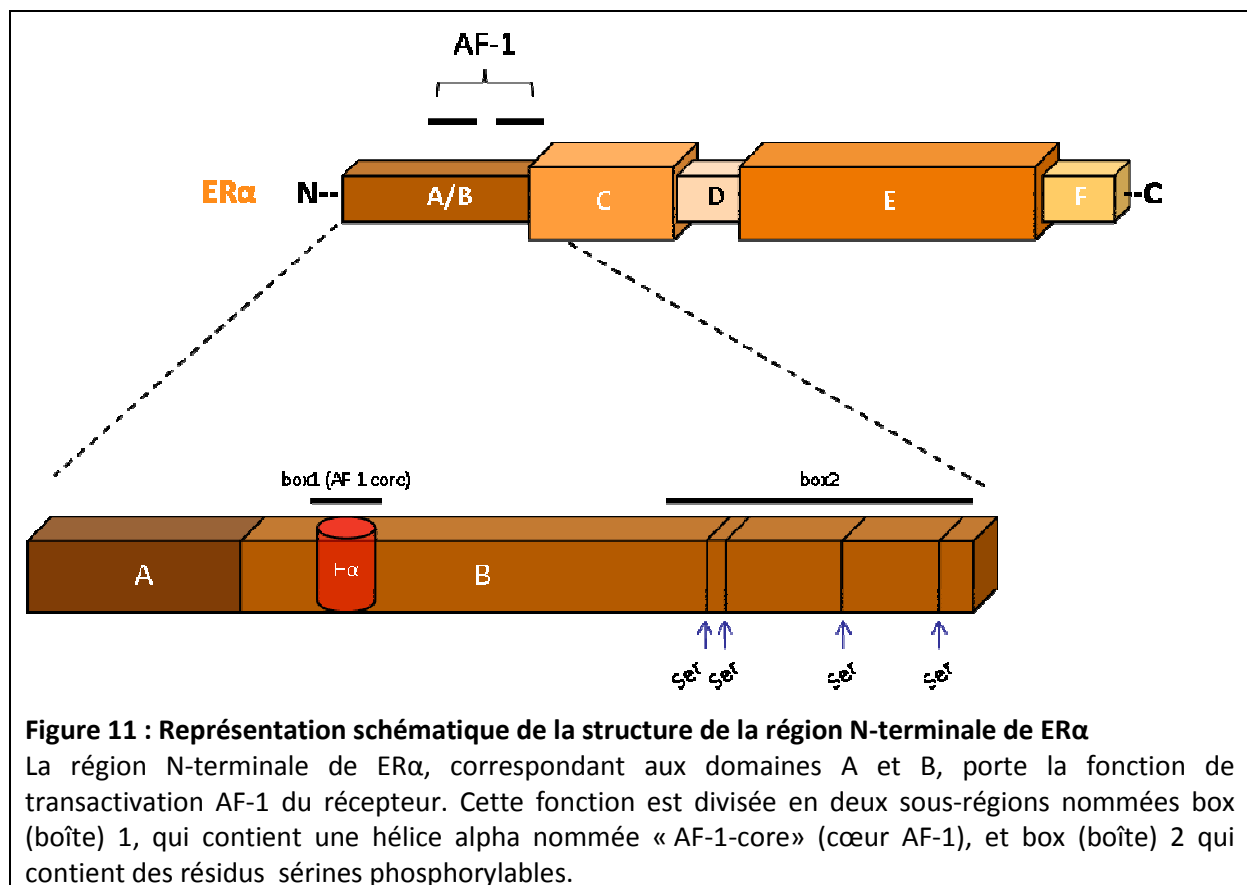
**Figure 10 : Représentation schématique de la structure modulaire de ER $\alpha$  et COUP-TF1**

ER $\alpha$  et COUP-TF1 sont des récepteurs nucléaires, ils présentent la structure modulaire conservée au cours de l'évolution de cette famille protéique. On distingue 6 domaines nommés de A à F. Le Ligand Binding Domain (LBD) est porté par le domaine E (même s'il n'existe pas de ligand connu pour COUP-TF1). le DNA Binding Domain (DBD) est porté par le domaine C. Les RN portent deux fonctions de trans-activation (AF-1 en position N-terminale et AF-2 en position C-terminale) chacun divisé en deux sous-domaines, ainsi que des signaux de localisation nucléaires (Nuclear Localization Signal ou NLS).

## A. Les récepteurs aux œstrogènes

### 1. La région amino-terminale (domaines A/B)

Le domaine A est une région très variable chez les RN, le domaine B est responsable de la fonction de transactivation indépendante du ligand (AF-1). Il possède une activité transcriptionnelle constitutive lorsqu'il est séparé du reste de la protéine (Lees, Fawel et Parker, 1989) mais, lorsqu'il est intégré dans le récepteur et en l'absence de ligand, son activité est réprimée par l'interaction entre le domaine A et la région C-terminale (activité AF-2) (Métivier et *al.*, 2000, 2002-b). Toutefois, des modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations peuvent restaurer une activation AF-1 constitutive (Kato et *al.*, 1995 ; Le Romancer et *al.*, 2011).



Deux sous-domaines distincts sont impliqués dans la fonction AF-1 : la « boîte 1 », composée d'une structure en hélice  $\alpha$  (appelée « cœur AF-1 ») a un rôle majeur dans l'interaction avec

certain co-régulateurs (Métivier et *al.*, 2000). La « boîte 2 » est riche en sérines qui peuvent être phosphorylées, contrôlant ainsi le recrutement de divers co-activateurs, et augmentant l'activité ligand-dépendante ou indépendante du récepteur (Ali et *al.*, 1993 ; Bunone et *al.*, 1996) (Fig. 11).

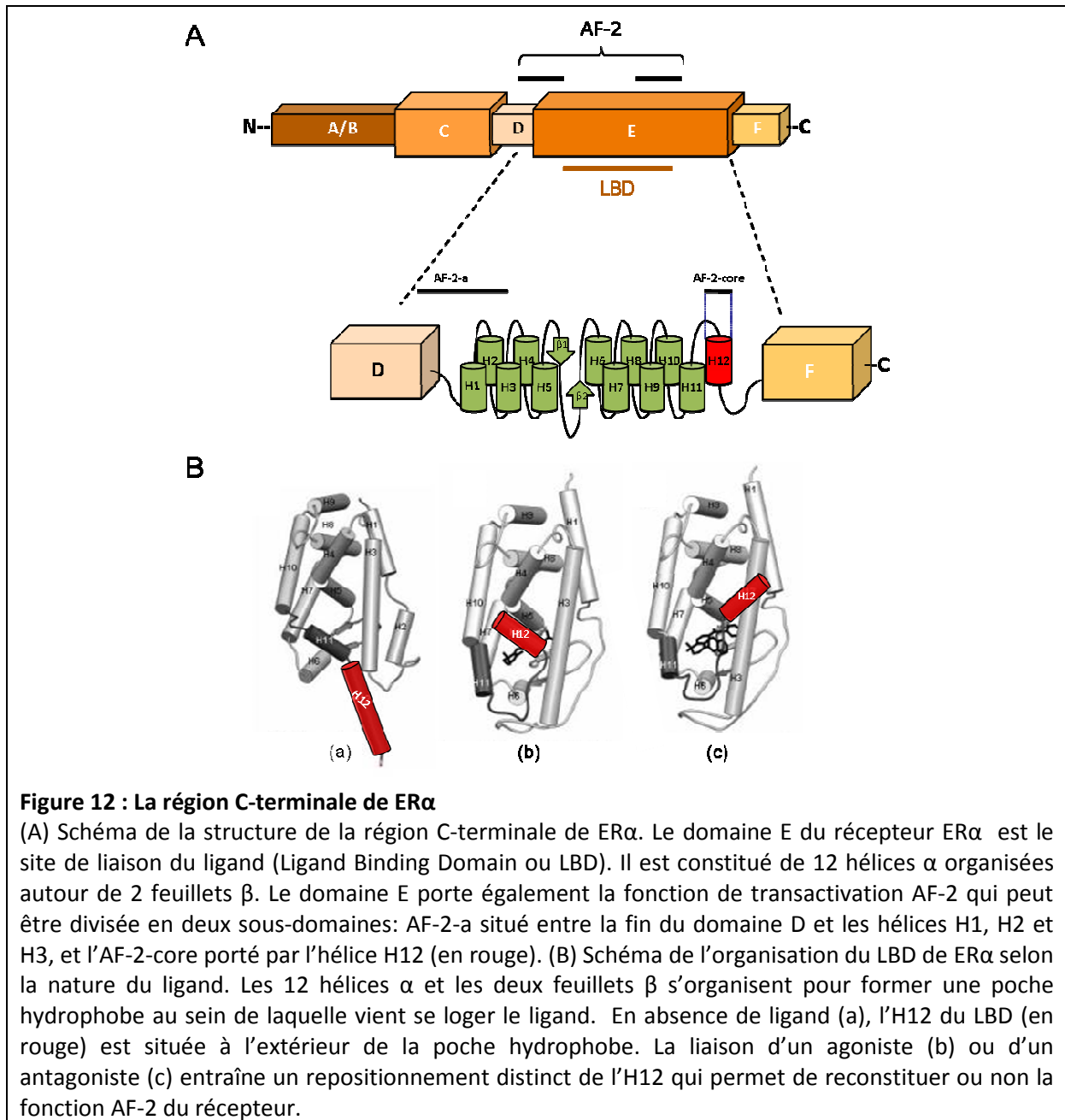
## 2. La région centrale (domaines C et D)

Le domaine C permet la liaison à l'ADN (DNA Binding Domain ou DBD) via deux « doigts de zinc » intervenant également dans la dimérisation du récepteur. Chaque doigt de zinc est constitué d'une « boîte-P » (proximale, responsable de la reconnaissance des éléments de réponse à l'œstradiol ou ERE) et la « boîte D » (distale, responsable de la dimérisation qu'elle permette la formation d'homo- ou d'hétéro-dimères). Le DBD contient également deux hélices  $\alpha$ , l'une interagissant avec le grand sillon de l'ADN et l'autre stabilisant le complexe (Bain et *al.*, 2007).

Le domaine D est une région intervenant dans les changements de conformation du récepteur ou l'interaction avec d'autres protéines. Elle comprend également un signal de localisation nucléaire (NLS). Des études récentes montrent que cette région est un peu plus qu'une simple « charnière » et participerait aux fonctions des autres domaines du récepteur (dimérisation, liaison à l'ADN) et pourrait subir des modifications post-traductionnelles (Sentis et *al.*, 2005 ; Subramanian et *al.*, 2008).

## 3. La région carboxy-terminale (domaines E et F)

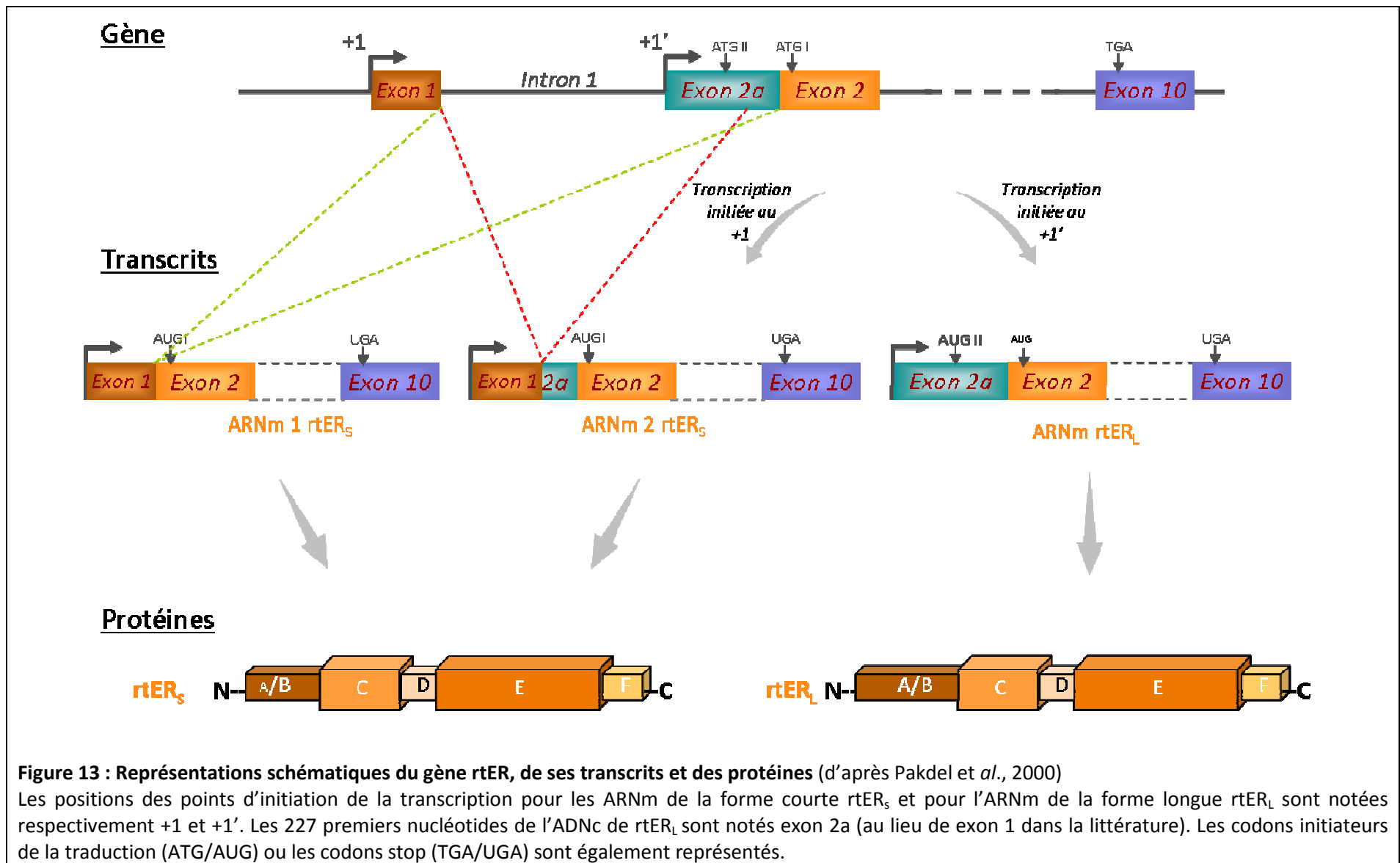
La région C-terminale contient le domaine de liaison au ligand (LBD, une poche hydrophobe) et le domaine de transactivation ligand-dépendant AF-2. Le LBD est constitué de deux feuillets  $\beta$  et de 12 hélices  $\alpha$  (H1 à H12) (Fig. 12A), qui peuvent également interagir avec des co-régulateurs (Bourguet, Germain et Gronemeyer, 2000). L'hélice 12 peut être orientée de différentes manières en fonction de la nature du ligand lié (Fig. 12B). Le basculement de l'hélice 12 permet d'exposer les surfaces d'interactions AF-2 / co-régulateurs. La fonction AF-2 est portée par la région AF-2 « core » (correspondant à l'hélice 12) et par la région AF-2a, située à la jonction des domaines D et E (Norris et *al.*, 1997).



Les fonctions AF-1 et AF-2 peuvent agir en synergie pour induire une transcription optimale de gènes-cibles (lorsqu'un agoniste et un co-activateur sont présents) (Tzuckerman et *al.*, 1994). C'est au niveau de la poche hydrophobe formée par les hélices qu'une hélice du domaine A de ER $\alpha$  se positionne pour réprimer l'activité AF-1 du récepteur (Métivier et *al.*, 2001).

#### 4. La forme courte d'ER $\alpha$

Chez la truite, le récepteur à l'œstradiol impliqué dans la régulation de la transcription du gène de la vitellogénine est une forme courte retrouvé spécifiquement dans les hépatocytes et noté rtER<sub>s</sub>. Il est obtenu par une initiation de la transcription en amont du site de la forme classique et épissage alternatif (Fig. 13), ce qui a pour effet de tronquer le domaine A (Pakdel et *al.*, 2000). La perte de cette partie N-terminale du récepteur empêche la répression de la fonction AF-1 en absence de ligand (Métivier et *al.*, 2000), ce qui signifie qu'en présence de coactivateurs, cet isoforme d'ER peut activer la transcription de gènes-cibles (et notamment celle de la vitellogénine), l'activité transcriptionnelle étant cependant maximale en présence d'œstradiol.

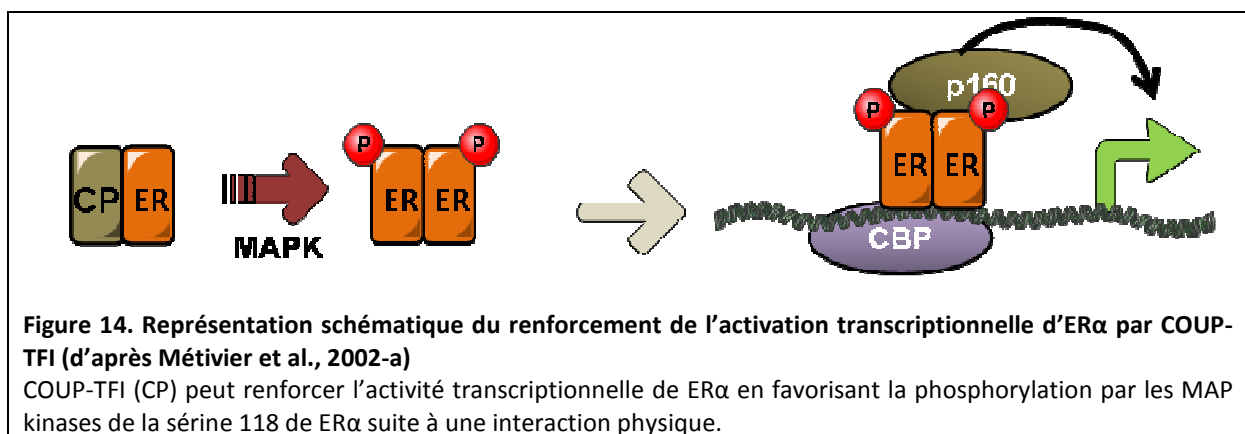




## B. COUP-TF1

COUP-TFI est un récepteur nucléaire orphelin ayant un rôle fondamental dans le développement du système nerveux, fonction conservée au cours de l'évolution (décrite chez la souris, le poisson zèbre et l'hydre) (Cooney et *al.*, 2001). Il joue un rôle important dans l'organogenèse du système nerveux central, du système cardio-vasculaire ou des organes reproducteurs. Il est également impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires comme la migration (Tripodi et *al.*, 2004), la prolifération ou la différenciation chez l'adulte (Pereira, Tsai et Tsai, 2000). Enfin, c'est un co-régulateur de l'activité transcriptionnelle d'autres récepteurs nucléaires, comme les ER (Pereira, Tsai et Tsai, 2000).

La structure modulaire de COUP-TF1 (Chicken Ovalbumin Upstream Promotor-Transcription Factor 1 ; EAR3 ; NR2F1) est la même que pour les autres récepteurs nucléaires et les fonctions associées sont les mêmes que ce qui a été décrit pour ER $\alpha$ . S'il n'a pas de ligand connu modulant son activité transcriptionnelle, celle-ci peut cependant être régulée au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel, comme c'est le cas pour d'autres facteurs de transcription. Ces récepteurs sont capables de se lier à l'ADN sous la forme d'homo- ou hétéro-dimères au niveau de leur séquence consensus et d'activer ou réprimer l'expression de gènes cibles. Ils peuvent également partager les sites de liaisons d'autres facteurs de transcription, dont notamment ER $\alpha$  (Park, Tsai et Tsai, 2003). Par ailleurs, et c'est un élément central du modèle que nous présentons, l'activité AF-1 de ER $\alpha$  est fortement augmentée par une phosphorylation sur la sérine 118, favorisée par l'interaction de ER $\alpha$  et le récepteur nucléaire orphelin COUP-TF1 (Fig. 14) (Métivier et *al.*, 2002a).



### III. Un modèle dynamique d’empreinte transcriptionnelle dérivé de l’effet mémoire de la vitellogénèse

Certains signaux transitoires peuvent imprimer dans les systèmes vivants une mémoire transcriptionnelle et influencer leur réactivité à la suite de stimulations répétées. Bien qu’ils soient classiquement attribués à des réarrangements de la structure chromatinienne chez les eucaryotes, de tels comportements peuvent également dépendre de circuits de mémoire dynamiques alimentés par des boucles d’auto-amplification. Cependant, ces phénomènes sont décrits comme soit limités dans le temps (s’arrêtant lorsque la cible du signal est retirée) soit associés au maintien de changements phénotypiques (systèmes bloqués dans leur nouvelle configuration). Nous proposons ici un mécanisme dans lequel seule la capacité de réponse du gène cible est durablement reparamétrée à la hausse après une première stimulation. Pour cela, nous avons utilisé le célèbre (quoique pas encore complètement élucidé) effet mémoire de la vitellogénèse. Les éléments de base de ce système sont :

- 1) Une autorégulation positive du gène du récepteur aux œstrogènes  $\alpha$ ,
- 2) Une activation de l’expression de la vitellogénèse par le récepteur aux œstrogènes de manière fortement coopérative,
- 3) Un isoforme du récepteur aux œstrogènes avec deux domaines d’activation de la transcription autonomes, l’un étant ligand-dépendant et l’autre ligand-indépendant.

Dans le modèle que nous proposons, l’activité ligand-indépendante du récepteur ne peut pas amorcer par elle-même une boucle d’auto-amplification mais pourrait maintenir le système au-dessus d’un certain seuil après une première stimulation, permettant à la réponse suivante d’être plus rapide et plus forte. Ce mécanisme de « cliquet transcriptionnel » pourrait avoir une importance dans le développement et l’écotoxicologie. Il pourrait également expliquer la mémoire sur le long terme, sans modifications persistantes de la chromatine, après des expositions à des substances n’ayant pas entraîné de changement phénotypique apparent mais qui pourrait être réactivée par une restimulation.

→ Article 1 : « A dynamic model of transcriptional imprinting derived from the vitellogenesis memory effect »

# **A dynamic model of transcriptional imprinting derived from the vitellogenesis memory effect**

**Floriane Nicol-Benoit<sup>†</sup>, Axelle Amon<sup>‡</sup>, Colette Vaillant<sup>†</sup>, Pascale le Goff<sup>†</sup>, Yves le Dréan<sup>†</sup>,  
Farzad Pakdel<sup>†</sup>, Gilles Flouriot<sup>†</sup>, Yves Valotaire<sup>†</sup> and Denis Michel<sup>†\*</sup>**

Université de Rennes1, <sup>†</sup>UMR6026 Interactions Cellulaires et Moléculaires IFR140 GFAS  
IRSET and <sup>‡</sup>UMR6251 Institut de physique de Rennes, France.

Running title: Transcriptional memory

\*Correspondence: [denis.michel@live.fr](mailto:denis.michel@live.fr)

## ABSTRACT

Transcriptional memory of transient signals can be imprinted on living systems and influence their reactivity to repeated stimulations. Although they are classically ascribed to structural chromatin rearrangements in eukaryotes, such behaviours can also rely on dynamic memory circuits with sustained self-amplification loops. However, these phenomena are either of finite duration, or conversely associated to sustained phenotypic changes. A mechanism is proposed, in which only the responsiveness of the target gene is durably reset at a higher level after primary stimulation, using the celebrated but still puzzling vitellogenesis memory effect. The basic ingredients of this system are: i) a positive autoregulation of the estrogen receptor alpha gene, ii) a strongly cooperative action of the estradiol receptor on vitellogenin expression and iii) a variant isoform of the estradiol receptor with two autonomous transcription-activating modules, one signal-independent and the other one signal-dependent. Realistic quantification supports the possibility of a multistationary situation in which ligand-independent activity is unable by itself to prime the amplification loop, but can click the system over a memory threshold after a primary stimulation. This ratchet transcriptional mechanism can have developmental and ecotoxicological importance and explain lifelong imprinting of past exposures without apparent phenotypic changes before restimulation and without need for persistent chromatin modifications.

Keywords: estrogen receptor, positive feedback, memory, vitellogenesis.

## Introduction

Transcriptional memory of eukaryotic cells is generally attributed to structural chromatin changes such as DNA methylation, histone methylation (Thomassin *et al.*, 2001), or sub-nuclear DNA localization (Brickner, 2010), but an alternative possible mechanism relies on dynamic circuits with positive feedbacks (Novick *et Weiner*, 1957 ; Smolen, Baxter *et Byrne*, 1998) which are capable of generating sustained responses after transient stimulations. However, these responses are either of limited duration, restricted to the lifetime of the signal-dependent target, such as permease for the lactose operon (Novick *et Weiner*, 1957) or indefinitely cycled at maximal level for autonomously active amplification target. In this case, the phenotype remains modified after signal withdrawal. A system is presented in the present study, in which the responsiveness of the target gene to future stimulations is readjusted in absence of visible phenotypic change. This phenomenon can be mediated by a ligand-dependent transcription factor (TF) and maintained after ligand removal, in a latent manner and without chromatin alteration. It has been derived from the famous vitellogenesis memory effect, which has long been established but remains puzzling. Estrogen-dependent vitellogenesis is a process allowing the massive accumulation of nutrient egg proteins for the future embryos in egg-laying vertebrates such as fishes, amphibians or birds. Before the identification of the estrogen receptor (ER) which mediates this response, it already appeared clear that vitellogenin (Vg) accumulates much more vigorously during secondary estrogen stimulation in chicken (Beuving *et Grubera*, 1971), *Xenopus laevis* (Baker *et Shapiro*), or the fish rainbow trout (Le Guellec *et al.*, 1988). This effect is striking since the level of Vg returns to zero between the successive stimulations. It has first been investigated at the level of the Vg gene structure; but if DNA demethylation and chromatin opening (as monitored by nuclease hypersensitivity), are indeed correlated with Vg expression, long term memory effect cannot be imputed to the maintenance of these modifications (Burch *et Evans*, 1986). An alternative explanation is proposed here, in which a single TF, a variant of ER, is sufficient for both recording and keeping alive transcriptional memory in the context of egg-laying vertebrate hepatocytes.

## Materials and Methods

### Quantification of molecule numbers

#### *ER and Vg mRNAs*

Total RNA samples were quantified, denatured, spotted and UV-crosslinked to transfer membrane. RNA dots were hybridized to radioactive ER or Vg cDNA. mRNA cell contents were then quantified as pg per  $\mu\text{g}$  of total RNA and converted into molecule copy number per cell, based on the molecular mass of the rER<sub>s</sub> and Vg mRNAs and on the average trout hepatocyte content in total RNA.

#### *ER protein cell content*

The ER protein number was estimated indirectly by counting the high affinity binding sites for estradiol in trout hepatocytes. Liver nuclear extracts were incubated with [<sup>3</sup>H]-17- $\beta$ -estradiol (Amersham), with or without 100 fold excess of cold hormone, to determine specific binding by subtraction. Free and bound hormone were separated by two successive treatments with charcoal/Dextran and radioactivity was measured by liquid scintillation.

### Rates estimations

#### *mRNA degradation rates*

RNAs were extracted from cell aliquots at different time periods after transcription block using actinomycin D, and ER and Vg mRNAs were quantified as described above.

#### *Nuclear run-on experiment*

Nuclei were isolated at 0°C from cultured hepatocytes and resuspended in transcription buffer containing ribonucleotides and [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-UTP. Transcription completion was then allowed to proceed for 30 min at 26°C. Radioactive RNAs were phenol-extracted, ethanol precipitated, redissolved and used as probes for hybridization to linear ER, Vg and actin cDNAs, previously fixed on nylon membranes.

### *Clearance of estradiol-17 $\beta$ in rainbow trout*

After injection of 17 $\beta$ -estradiol in a male trout, circulating estradiol was measured by radio-immunoassay.

## Transient expression assays

### *$\beta$ -galactosidase assays in budding yeast*

Yeast cells were stably transformed with the  $\beta$ -galactosidase reporter plasmid driven by the estrogen-responsive element of the rtER gene, with or without hCOUP-TF1 and with either rtERs or hER expression plasmids.  $\beta$ -galactosidase activity in response to the indicated treatments was determined by spectrophotometry.

### *Luciferase assays*

After plasmid transfection and transient expression, cells were harvested and the firefly luciferase (F-luc) activity was determined and normalized with  $\beta$ -galactosidase whose expression is driven by a  $\beta$ -actin-promoter. In the experiment of comparison of the transcriptional strengths of the fish ER gene promoter and the cytomegalovirus (CMV) promoter, these promoters directed the expression of F-luc and were measured by comparison with a thymidine kinase promoter-Renilla luciferase control expression plasmid, using the Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega).

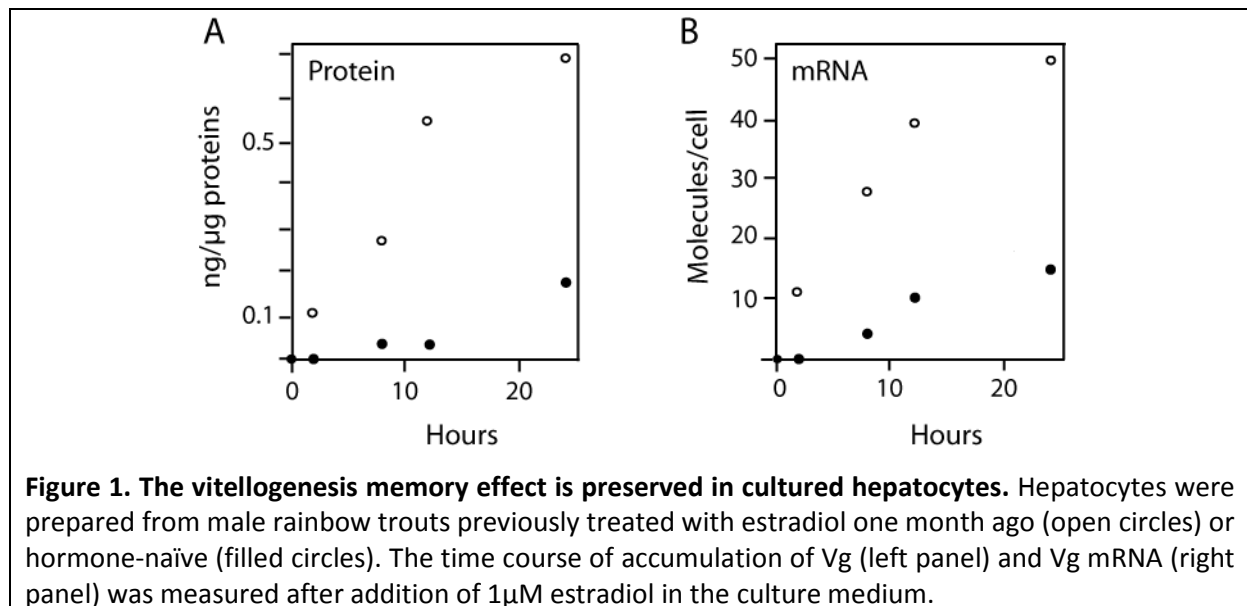
More detailed Materials and Methods and the parameter values used for numerical application, are available in the Supporting Material.

## Results

The model proposed to explain the vitellogenesis memory effect will be quantified using new and previously published data obtained with the fish rainbow trout, but it can apply to other oviparous vertebrates. Studies on vitellogenesis are facilitated by the capacity of male animals to undertake vitellogenesis in response to estrogen administration, making it possible to avoid interferences with endogenous hormones.

## The vitellogenesis memory effect is a cellular phenomenon

To establish if the vitellogenesis memory effect is a cellular level phenomenon, it was first necessary to determine if it can be evidenced in trout hepatocytes *ex vivo*. As primary cultures of trout hepatocytes do not divide and cannot be maintained for long periods, hepatocytes were prepared from male animals previously treated or not with estradiol one month ago. Once spread in monolayer in culture dishes, they were incubated with estradiol to compare the kinetics of Vg expression. As shown in Fig. 1, strong differences of the initial rates of accumulation were observed, depending on whether the cells were prepared from animals pretreated or not with estradiol. The effect is obvious for Vg as well as for Vg mRNA (Fig. 1). These observations indicate that the vitellogenesis memory effect is retained in cells separated from animals and does not require cross-talks with other organs such as the nervous system. In the monolayer culture conditions used here to allow the rapid hormone treatment after extraction, hepatocytes rapidly dedifferentiate and the expression of Vg progressively declines, as visible in Fig. 1. In the rest of the study, the primary hepatocytes were allowed to slowly organize tridimensionally into aggregates, to recover a more stable gene expression (Supporting Material).





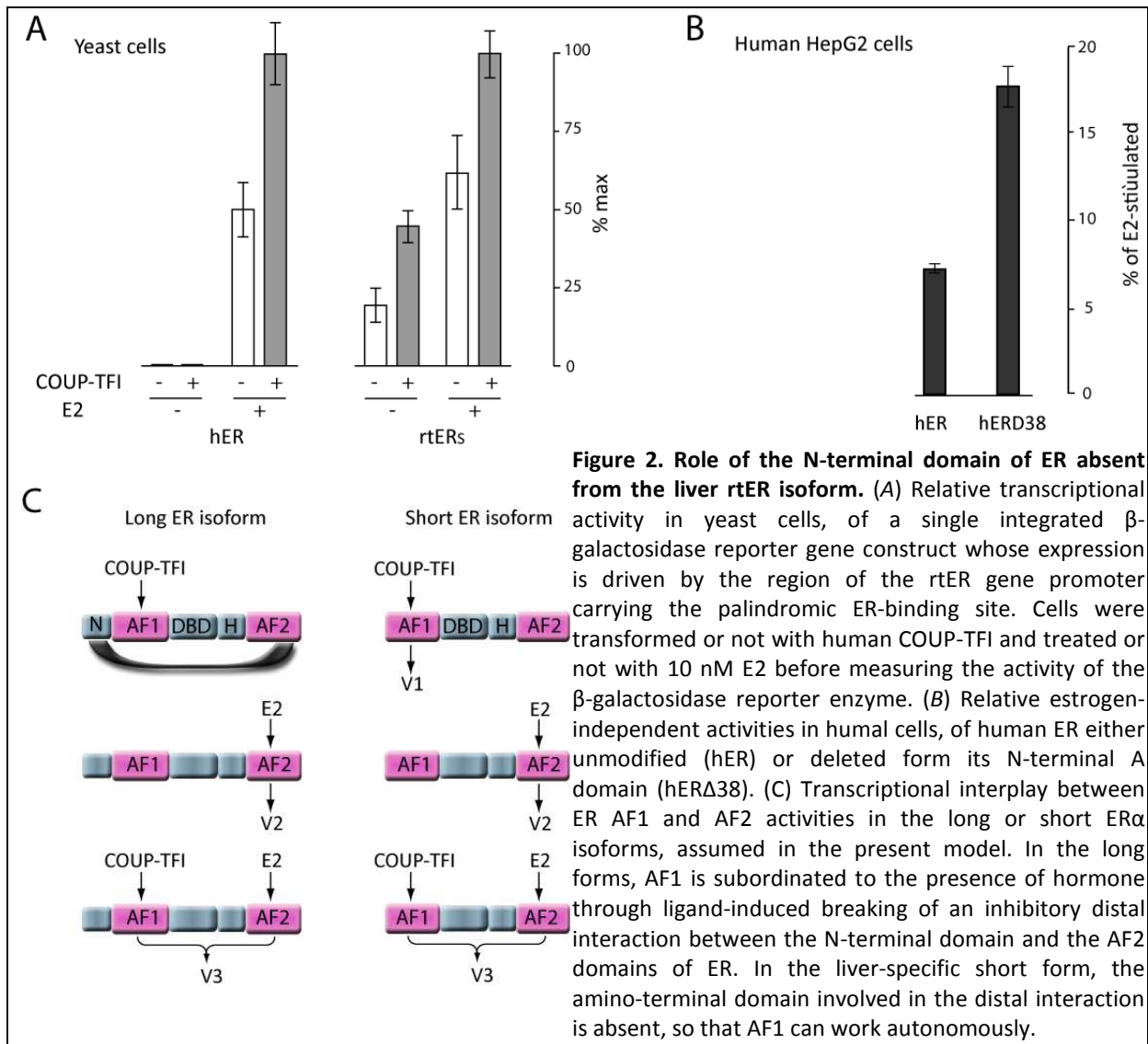
## Basis of the model

The model is built on four lines of observation: **i)** A general feature of vitellogenesis evidenced in chicken (Mester et Beaulieu, 1972), *X. laevis* (Perlman et al., 1984) and rainbow trout (Le Dréan et al., 1995), is the autoregulation of ER, mediated by a strong DNA-binding site for ER, present in the promoter of ER genes. This observation led to the admitted scenario in which estrogen treatment results in the upregulation of ER and that this receptor is rate-limiting in Vg gene transcription. **ii)** An interesting observation is that the expression of ER remains high after a single transient hormone administration, long after the arrest of Vg synthesis (Westley et Knowland, 1979 ; Barton et Shapiro, 1988). **iii)** A cooperative response of Vg to ER, preventing Vg expression at low levels of ER (present results). **iv)** Finally, an element essential for the present mechanism, is the existence in the liver of all egg-laying vertebrates tested so far, of a particular ER variant whose precise role is not yet understood, but which turns to be particularly well suited to explain the vitellogenesis memory effect.

## The central actor: a variant ER with two independent transactivation domains

Because Vg is expressed in an estrogen-dependent manner in the liver which contains a particular isoform of ER $\alpha$  named rtER<sub>5</sub> (Menuet et al., 2001), we reasoned that this isoform could be precisely involved in the intracellular recording of the memory effect. Interestingly, in birds whose eggs also include white, the yolk protein vitellogenin is still synthesized in the liver but the white egg protein gene ovalbumin expressed in the oviducts. Ovalbumin synthesis is also estrogen-dependent but not subject to memory effects and accordingly in chicken, liver contains the short ER isoform while the oviducts contain the long isoform (Griffin et al., 1999). The short ER $\alpha$  found in the liver of egg-laying vertebrate singularly lacks the N-terminus present in long ER $\alpha$  isoforms. This domain called A, coordinates the two transcription activating activities of ER called AF1 and AF2. AF2 is ligand-dependent and can be selectively poisoned by the partial antagonist 4-hydroxytamoxifen (4-OHT) (Metzger et al., 1992). The activity of AF1, observed only in certain cellular contexts and in certain gene

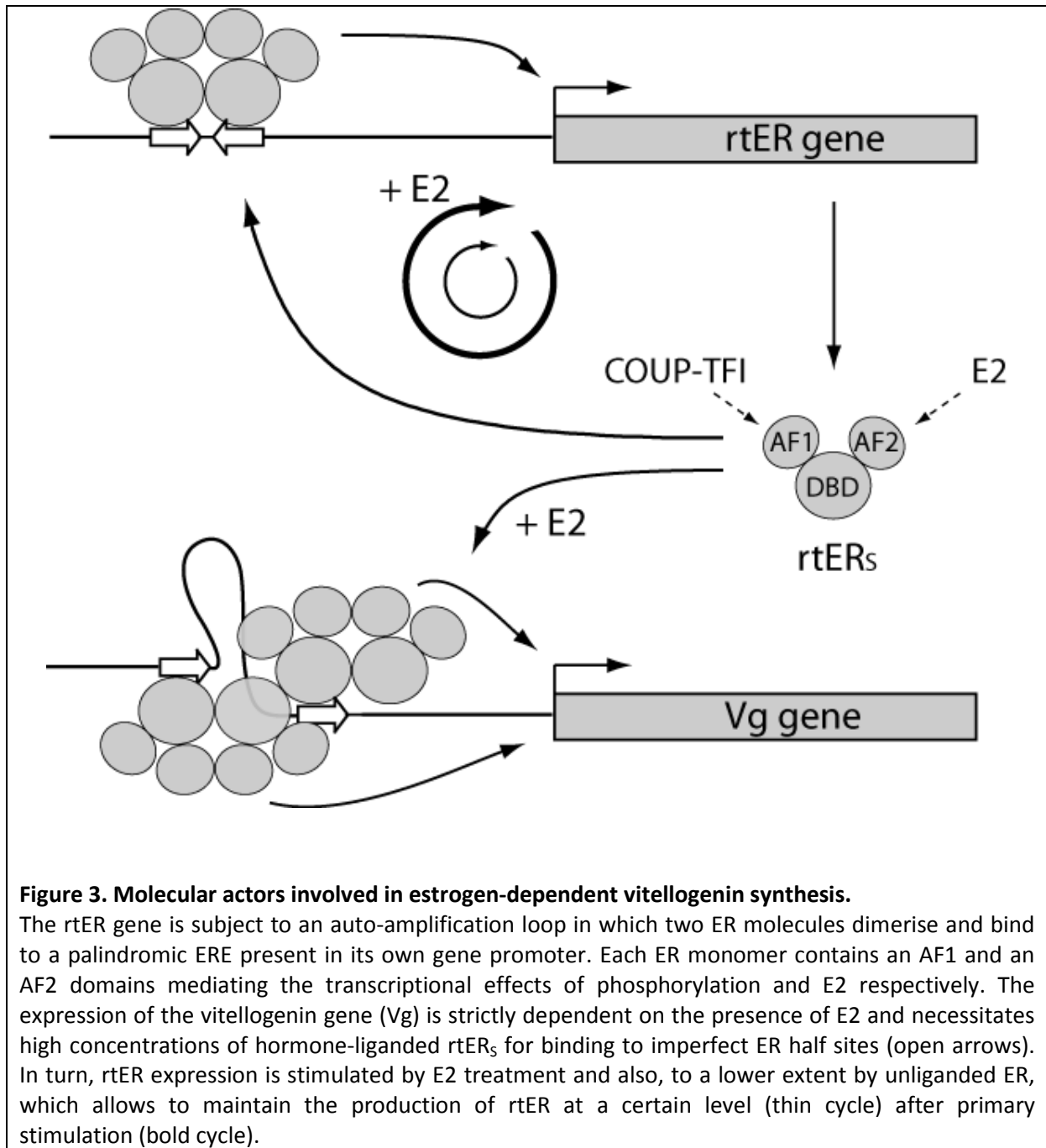
promoter configurations, has been shown strongly upregulated upon phosphorylation following interaction with the orphan nuclear receptor COUP-TFI (Métivier et al., 2002-a).



The hormone-dependence of AF1 is due to an inhibitory intramolecular interaction between the distal domains of the long ER isoform, which is broken upon ligand binding to AF2 (Métivier et al., 2000; Métivier et al., 2002-b). To compare the capacity of the short and long ER isoforms to stimulate transcription in absence of hormone, we transfected them together with COUP-TFI and a LacZ reporter gene driven by the estrogen-responsive element (ERE), into yeast cells. These cells were selected as a convenient tool because they are naturally devoid of nuclear receptors, but contain appropriate coactivators. As shown in Fig. 2A, an estrogen-independent activity is clearly obtained for the short isoform while for the long

one, the AF1 activity is subordinated to the presence of hormone and to AF2. To confirm that the high estrogen-independent activity of trout liver-specific ER isoform is due to its liver-specific N-terminal truncation, we verified that the estrogen-independent activity of human ER (hER) can be also increased after deletion of its N-terminal domain. As shown in Fig. 2B, in human HepG2 cells, this deletion ( $\Delta 38$ ) increases the basal transcriptional activity of hER from 7 to 18 % of its maximal hormone-stimulated activity. Based on the results obtained with yeast cells which do not contain COUP-TF1 contrary to human cell lines, three possible maximum transcription activities of ER, termed here  $V_1$ ,  $V_2$  and  $V_3$ , can be rationally defined depending on the cellular contexts and on the ER isoform (Fig. 2C).  $V_1$  is the maximum transcription initiation rate caused by AF1 alone (*i.e.* measured in AF1-permissive contexts in absence of hormone).  $V_2$  is the maximum transcription initiation rate caused by AF2 alone.  $V_3$  is the maximum transcription initiation rate expected from the synergistic action of AF1 and AF2 (*i.e.* measured in AF1-permissive contexts in presence of saturating hormone). AF1 and AF2 activities are roughly independent and additive in yeast (Fig. 2A), but have been shown to recruit cooperatively certain co-activators in mammalian cells (Benecke, Chambon et Gronemeyer, 2000; Métivier et al., 2001). Different modes of ER activity are observed with respect to the combination  $V_1$ ,  $V_2$  and  $V_3$ , including the two following ones:

- $V_1 = 0$  and  $V_3 \gg V_2$ . For the long isoform, the modification induced by COUP-TFI has only a potentializing role on hormone action, but no apparent effect in absence of hormone (Métivier et al., 2002-a). This synergistic action of COUP-TFI and estradiol clearly results from transactivation cooperativity since it is observed with reporter constructs containing a single ER-binding site (Métivier et al., 2002-a), ruling out the involvement of classical DNA-binding cooperativity.
- $V_3 \geq V_1 + V_2$ . rtER<sub>S</sub> can transactivate a promoter fragment of the trout ER $\alpha$  gene carrying an ERE (Le Dréan et al., 1995), suggesting that it can participate to the autoregulatory loop of ER in the liver. Given that rtER<sub>S</sub> can stimulate Vg expression exclusively in presence of E2, but can stimulate its own expression in both E2-dependent and independent manners, one can propose the system schematized in Fig. 3. In the phenomenon of dynamic memory based on this organisation, the primary estrogen stimulation triggers the ER loop, which could be maintained to a certain level after estrogen withdrawal by the AF1 activity alone. In turn, in absence of primary stimulation, AF1 is unable to prime the autoregulatory loop.



## Formulation

Rate equations are generally considered as no longer appropriate and are replaced by discrete stochastic treatments when thermal fluctuations affect certain molecules present in low copy number (such as the ER mRNA); but in the present study, deterministic differential equations were retained as an approximation because Vg is secreted by the liver and taken up by the ovaries, so that its global production is averaged at the tissue level. For the same

reason, biochemical techniques were preferred to single-cell approaches for the accurate determination of average kinetic parameters. In absence of precise data on certain points, several hypotheses were assumed:

1. Unmodified ER dimers are supposed to not reach DNA. Unliganded ER can bind to DNA in vitro, but in vivo, chromatin immunoprecipitation assays using ER-expressing cells, reproducibly showed a strong enrichment of the ER DNA-binding activity upon hormone stimulation (Lin et al., 2004), possibly related to the de-sequestration of ER from anchor proteins (heat shock proteins and others). In addition, the low amount of chromatin-bound unliganded ER can correspond to active phosphorylated ER (González et al., 2009).
2. The two partners of a given dimer are considered as symmetrically modified by either phosphorylation, hormone ligation, or both, considering that two tightly interacting protomers should be submitted to the same conformational modifications to share a common dimerisation surface.

The expression of Vg genes is strictly dependent on the presence of hormone. The trout Vg gene promoter contains imperfect ER-binding elements and multiple half-sites. This organization resembles that of *X. laevis* Vg B1 described in (Martinez et al., 1989), whose promoter includes two non-consensual sites with low affinity for ER. Assuming that ER equilibrates rapidly with DNA, compared to the slower dynamics of gene product fluctuations, a continuous equation in which the production is driven by the cooperative fixation of two liganded ER dimers, is

$$\frac{d[m_V]}{dt} = V_V \frac{(\beta_{V1} + \beta_{V2})[R_H]^2 + 2\beta_{V1}\beta_{V2}K_c[R_H]^4}{2(1 + (\beta_{V1} + \beta_{V2})[R_H]^2 + \beta_{V1}\beta_{V2}K_c[R_H]^4)} - r_{m_V}[m_V] \quad (1)$$

where  $R_H$  is the hormone-liganded ER;  $V_V$  is the maximal transcription initiation rate of the Vg gene,  $m_V$  is the Vg mRNA;  $r_{m_V}$  is its first-order rate of removal;  $\beta_v$  (concentration<sup>-2</sup>), are the products of DNA-binding and dimerization constants.  $K_c$  (unitless) is the cooperative enhancement factor of the affinity of ER for DNA once the first site is occupied. This type of equation can be extended to the cooperative fixation of more ER molecules and can be, depending on the parameters, approximated in the form of Hill functions.

The transcriptional activation of a reporter construct containing the ERE present in the ER gene promoter, by unliganded rtER<sub>s</sub> (Fig. 2A), could be related to the high affinity of ER for

this DNA target site, to which both hormone-bound and phosphorylated-only ER can bind, so that different sources of transcription activation are expected. The AF1 transcriptional activity of ER is activated by phosphorylation ( $P$ ), while AF2 is activated by the hormone ( $H$ ). The different forms of ER dimers should share time for interacting with this DNA target site (Michel, 2010). Hence,

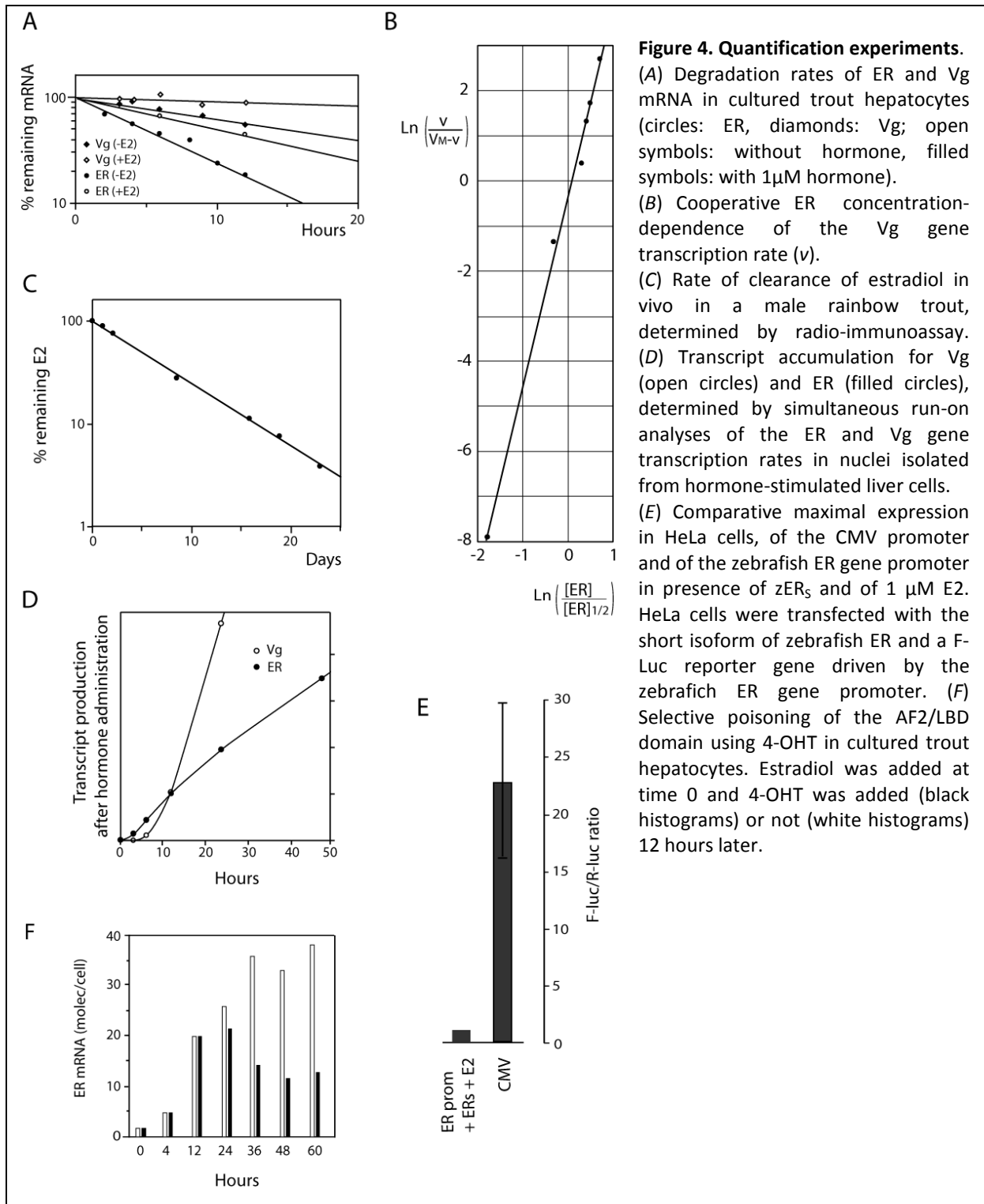
$$\frac{d[m_R]}{dt} = \frac{V_1\beta_{R1}[R_{P0}]^2 + V_2\beta_{R2}[R_{H0}]^2 + V_3\beta_{R3}[R_{PH}]^2}{1 + \beta_{R1}[R_{P0}]^2 + \beta_{R2}[R_{H0}]^2 + \beta_{R3}[R_{PH}]^2} - r_{m_R}[m_R] \quad (2)$$

where  $R_{P0}$  is phosphorylated only,  $R_{H0}$  is hormone-liganded only and  $R_{PH}$  is both phosphorylated and hormone-bound.  $r_{m_R}$  is the rate of removal of the ER mRNA  $m_R$ ,  $\beta_R$  are the products of dimerisation and DNA-binding constants of ER, which depend on its modification state and  $V_1, V_2, V_3$  are the rates defined earlier.

An additional level of complexity of the present model is that the mRNA degradation rates are not constant, but depend on estrogens (Brock et Shapiro, 1983). This ER mRNA stabilization during hormone stimulation, enhances the auto-amplification loop of ER gene expression. The lower stabilization of the ER mRNA relatively to that of Vg (Fig. 4A), could be physiologically related to the respective roles of the derived proteins, considering that Vg is a secreted end-product inactive in the cell, while ER is a signal sensor which should remain reactive to conditions changes. This atypical property complicates the treatment of the network and, given the poor knowledge of mRNA stabilization machineries, it obliges to use primary trout hepatocytes in spite of their technical inconvenience and forbids the possibility to convey the vitellogenesis memory effect into heterologous cellular contexts in a synthetic biology attempt. The mechanism proposed in the literature to underly Vg mRNA stabilization by E2 is the hormone-dependent synthesis of a shield RNA-binding protein named vigillin, preventing the action of a polysomal endo-RNase (Dodson et Shapiro, 1997). If the shield RNA-binding protein  $S$ , is abundant relatively to the Vg mRNA, one has

$$r_{m_V} = \frac{r_{m_V0} + r_{m_VH}\beta_{V3}[S]}{1 + \beta_{V3}[S]} \quad (3)$$

where  $\beta_{V3}$  is the affinity of  $S$  for the Vg mRNA ( $m_V$ ),  $r_{m_V0}$  and  $r_{m_VH}$  are the degradation rates of  $m_V$  in absence and presence of hormone respectively.



**Figure 4. Quantification experiments.**

(A) Degradation rates of ER and Vg mRNA in cultured trout hepatocytes (circles: ER, diamonds: Vg; open symbols: without hormone, filled symbols: with 1 $\mu$ M hormone).

(B) Cooperative ER concentration-dependence of the Vg gene transcription rate ( $v$ ).

(C) Rate of clearance of estradiol in vivo in a male rainbow trout, determined by radio-immunoassay.

(D) Transcript accumulation for Vg (open circles) and ER (filled circles), determined by simultaneous run-on analyses of the ER and Vg gene transcription rates in nuclei isolated from hormone-stimulated liver cells.

(E) Comparative maximal expression in HeLa cells, of the CMV promoter and of the zebrafish ER gene promoter in presence of zERs and of 1  $\mu$ M E2. HeLa cells were transfected with the short isoform of zebrafish ER and a F-Luc reporter gene driven by the zebrafish ER gene promoter.

(F) Selective poisoning of the AF2/LBD domain using 4-OHT in cultured trout hepatocytes. Estradiol was added at time 0 and 4-OHT was added (black histograms) or not (white histograms) 12 hours later.

In Eqs 1, 2, the concentrations of the different forms of ER are not directly measurable, but can be recovered from observable quantities in a probabilistic manner, under the quasi-

equilibrium assumption. Since the diffusing hormone is not limitative and equilibrates rapidly with ER, the proportion of hormone-bound ER in the cell,  $P_H$ , corresponds to

$$P_H = \frac{[RH]}{[R_T]} = \frac{[H]}{K_{dH} + [H]} \quad (4)$$

where  $K_{dH}$  is the dissociation equilibrium constant between hormone and ER. Similarly, let be  $P_P$  the fraction of phosphorylated ER band. If the modifications of ER by hormone binding and COUP-TFI-mediated phosphorylation are independent events, the concentrations of the different ER forms used in Eqs 1 and 2 can be all expressed as functions of total ER ( $R_T$ ), which will be itself expressed as a function of its mRNA.

$$[R_P] = P_P[R_T], \quad (5a)$$

$$[R_H] = P_H[R_T], \quad (5b)$$

$$[R_{P0}] = P_P(1 - P_H)[R_T], \quad (5c)$$

$$[R_{H0}] = P_H(1 - P_P)[R_T], \quad (5d)$$

$$[R_{PH}] = P_P P_H [R_T]. \quad (5e)$$

In all these formulations, the modification of ER, through phosphorylation or hormone binding, is assumed to precede dimerisation. The available data are unclear about the hierarchy of ER ligation and dimerisation, but in fact, these events could be inverted with the same quantitative results under the quasi-equilibrium assumption. The principle of microreversibility simplifies the hierarchy of coupled phenomena, which cannot be separated from a near-equilibrium perspective. ER ligation and dimerisation belong to a single pentagonal cycle defined by the following set of five equilibrium constants

$$K_1 = \frac{[RH]}{[R_F][H]}, \quad (6a)$$



$$K_2 = \frac{[(RH)_2]}{[RH]^2} , \quad (6b)$$

$$K_3 = \frac{[R_2]}{[RF]^2} , \quad (6c)$$

$$K_4 = \frac{[R_2H]}{[R_2][H]} , \quad (6d)$$

$$K_5 = \frac{[(RH)_2]}{[R_2H][H]} . \quad (6e)$$

where  $R$  is the ER monomer and  $R_F$  is the free monomer. In absence of free energy inputs, microscopic reversibility implies  $K_2K_1^2 = K_3K_4K_5$ . Hence, considering that dimerisation occurs before or after hormone ligation, is equivalent.

The total concentration of ER results from the translation/degradation balance:

$$\frac{d[R_T]}{dt} = t_R[m_R] - r_R[R_T] \quad (7)$$

where  $t_R$  and  $r_R$  are the mRNA translation and protein degradation rates respectively. The ratio  $t_R/r_R$  was found to be relatively constant in this system and will be thereafter written  $\alpha$ . It is quantified for better precision, as the steady-state concentration ratio between the ER protein and ER mRNA in presence of saturating hormone. We considered that while the hormone arrival is rapid, its decrease is slower, particularly in vivo, and could participate to some extent to the sustained level of ER observed after primary stimulation (13).

Indeed, when hormone production or administration stops,  $P_H$  does not abruptly fall to zero in vivo but becomes a logistic function of time:

$$P_H = \frac{[H]_0 e^{-ct}}{K_{dH} + [H]_0 e^{-ct}} \quad (8)$$

where  $[H]_0$  is the starting hormone concentration (considered lower than the capacity of steroid-binding plasma proteins),  $K_{dH}$  is the constant of dissociation between the hormone and the receptor and  $c$  is the first-order hormone clearance rate. To determine if the model is compatible with realistic parameters, we introduced in the equations the molecule numbers and interaction constants estimates described in the Supporting Material. They can be summarized as follows.

## Quantification

### *Counting molecules*

ER and Vg mRNA molecule numbers were deduced by comparison of linear hybridization signals to avoid possible biases due to non-linear amplification approaches and to reverse-transcription efficiency. While many techniques exist for quantifying mRNA, counting molecules is much more difficult for proteins. The classical immunoblotting experiments are at best useful in comparative approaches but a gap of knowledge exists with respect to the absolute protein numbers. Fortunately, a technical opportunity is offered in the present case of a steroid-binding protein, by the possibility to count the hormone-binding sites within the cell.

### *Rates determination*

The determination of degradation and production rates of mRNAs are technically facilitated in eukaryotic cells by the spatial separation between these processes, taking place in the cytoplasm and nucleus respectively. To determine the cytoplasmic mRNA degradation rate, the afflux of fresh mRNA molecules was prevented by the transcription inhibitor actinomycin D. Estradiol induced a strong stabilization of pre-synthesized Vg mRNA (half-life of 3.5 days; rate of  $0.2 \text{ day}^{-1}$ ) (Fig. 4A). The relative transcription initiation rates are measured in run-on experiments, cells were broken and nuclei were isolated and allowed to complete the transcriptions initiated in intact cells. Since no RNA degradation and no RNA synthesis initiations are possible in isolated nuclei (because of the non-renewal of components from the cytoplasm), only extensions of nascent transcripts freezed before the separation

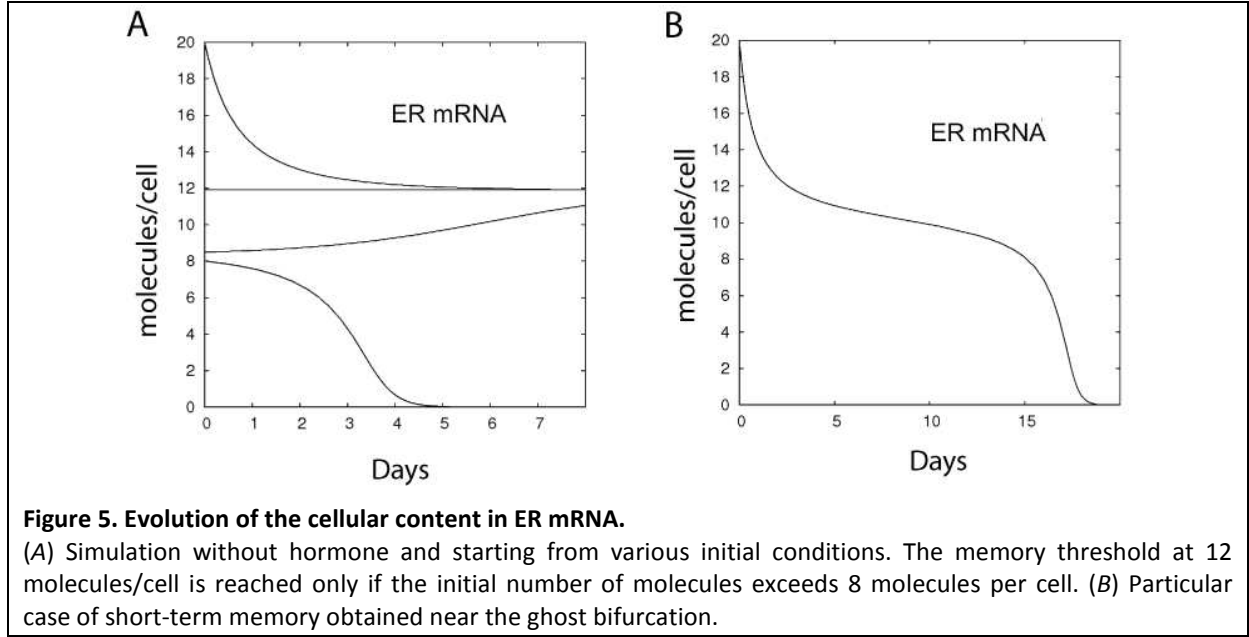
between nuclei and cytoplasm, are visualized. The results represent the density of active RNA polymerases on the considered genes, which directly reflects the transcription initiation rate (Smale, 2009)(Fig 4D). Based on the effect of 4-OHT which selectively inactivates AF2 (Fig. 4F) and on the activities of ER in yeast (Fig. 2A), we approximated that for  $rtER_s$ ,  $V_3 = V_1 + V_2$  and  $V_1 = V_2$ .

## Predicted evolutions

### *ER expression*

Positive autoregulatory loops can provide multiple stationary states which are reached when the production and destruction of given products compensate each other. These values are the roots of a quadratic equation resulting here from the conjugation of Eqs. 2 and 7 (APPENDIX A). The stationary values of  $[m_R]$  in absence of hormone, are shown in Fig. 5A. In absence of hormonal stimulation in naïve animals, parameters are such that the lower solution cannot be spontaneously reached when starting from low or noisy ER gene expression lower than a certain level, set at 8 molecules/cell based on our data. But after an initial rise of ER mRNA triggered by hormone pretreatment, this mRNA no longer disappears because of persistent loop maintained by unliganded ER. It decreases to the upper solution which can be envisioned as a memory threshold, and afterwards remains at this value through a ratchet-like mechanism.

Accordingly, as shown in Fig. 4F, if  $1\mu\text{M}$  4-OHT is added to E2-stimulated hepatocytes to inactivate AF2 after crossing this threshold, the following decrease of ER mRNA molecule number stabilizes at a higher level, in line with the 3.2 fold reduction of the number of ER proteins observed after 4-OHT treatment in *X. laevis* (Riegel et al., 1987).



Different behaviours are expected depending on the delicate balance between all the parameters. When the two solutions are close together, the risk of priming the auto-amplification loop in virgin animals is further diminished but the risk of memory loss is high. In turn, when the two solutions are far away enough, the memory is strongly stabilized and resistant to stochastic fluctuations of mRNA concentrations. Besides, undesirable priming of the positive feedback is prevented by the difference between the numbers of mRNA molecules, before stimulation (2.5 molecules/cell) and the threshold level (8 molecules/cell). A critical situation is obtained near the so-called "ghost bifurcation" (Strogatz, 1994). In this configuration, as shown in Fig. 5B, the level ER mRNA does not immediately drop and the vitellogenesis memory effect is programmed for a certain delay  $T$  (APPENDIX B) corresponding in this case to

$$T = \frac{\pi}{\sqrt{\delta r_{mR0} - \delta^2 / 2}} \quad (9)$$

where

$$\delta = \alpha P_P V_1 \sqrt{\beta_{R1}}$$

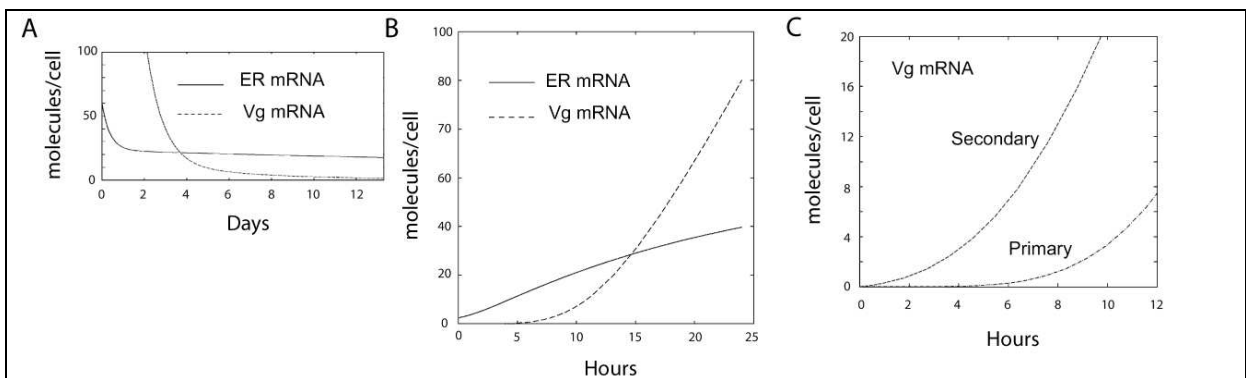
Such a situation could be obtained for example in case of insufficient phosphorylation of ER, just lower than

$$P_P = \frac{2r_{mR0}}{\alpha V_1 \sqrt{\beta_{R1}}} \quad (10)$$

For example with the numerical estimates used here, if the fraction of phosphorylated ER decreases from 10% to 9.8%, memory is lost after a delay of  $T \approx 9$  days. However, the slow hormone decrease observed *in vivo* (Fig. 4C), could prolong further the sustained level of ER after primary stimulation.

### *Vg expression*

Plotting the response of Vg to ER in Hill coordinates reveals a strong degree of cooperativity, with a Hill coefficient of 4.2 (Fig. 4B), suggesting that more than two ER dimers regulate Vg expression. This strong cooperativity, coupled to the relative destabilization of the Vg mRNA in absence of hormone, allows that this mRNA disappears between two stimulations. As shown in Fig. 6, the lower affinity and higher cooperativity of action of ER on the Vg gene, relatively to the ER gene, make the responses of these two genes not parallel, with a delay in the decrease (Fig. 6A) and the accumulation (Fig. 6B) of Vg transcripts. This delay is strongly shortened in pre-stimulated cells when starting from the memory level, of 12 molecules of ER mRNA per cell on average (Fig. 6C). Hence, a vitellogenesis memory effect can indeed be predicted using the present model.



**Figure 6. Comparative predicted evolutions of ER and Vg mRNA cell contents.**

(A) ER and Vg mRNA evolution following hormone withdrawal, with a clearance rate of 0.084/day and starting from the stationary plateau values of ER and Vg. (B) Evolution of ER and Vg mRNA following hormone addition and starting from 2.5 molecules/cell of ER mRNA. (C) Comparative kinetics of accumulation of the Vg mRNA in hormone-naïve cells (primary stimulation) and previously stimulated cells (secondary stimulation).

## Discussion

We propose a model of dynamic memory which can participate to the vitellogenesis memory effect, without recourse to structural chromatin rearrangements and which is possible with realistic kinetic parameters and molecule numbers. Chromatin modifications are associated to vitellogenin expression but could have helper rather than decisional roles, as suggested in (Burch et Evans, 1986). A pivotal aspect of the present model is the involvement of a positive feedback, whose importance has long been pointed in bacterial systems such as the lactose operon, in which the permease derived from this operon, accelerates the entry of the inducer, thereby increasing its own synthesis (Novick et Weiner, 1957). The induced state can tolerate dilution of permease and survive cell division or a transient decrease of the inducer concentration, but this kind of memory is restricted to the period of stability of the pre-synthesized permease. This founder model has then been extended to many cases of direct positive feedback situations in which a TF activates its own gene (Smolen, Baxter et Byrne, 1998; Becskei, Séraphin et Serrano, 2001; Maamar, Raj et Dubnau, 2007). But in eukaryotic cells, heritable structural chromatin modifications are always put forward to explain transcriptional memory. The idea that transcriptional memory should be structurally engraved in chromosomes is predominant, but in fact not really supported by recent observations showing that structural epigenetic modifications are unstable, continuously reconfigured, and thus poorly appropriate for long term memory at the scale of months or years.

Examples of positive feedbacks, associated to bistability, hysteresis and memory, strongly accumulate in gene network modeling studies, suggesting that they have fundamental roles in the structuration of biochemical systems. However, the case presented in this study has some distinctive original features:

- 1) it ensures the memory of gene responsiveness rather than the sustained expression of  $Vg$ ;
- 2) the same component,  $rtER_s$ , is involved both in sensing the signal and preserving its memory;
- 3) the system is largely controlled at the level of mRNA stability, while most reported feedback systems are tuned at the level of production (transcription and translation rates).

In this respect, the trout liver appears to contain very specific machineries because estrogen treatments generally lead to ER mRNA destabilisation in other cellular contexts. In hepatocytes, the inverse regulation by estradiol of the stability of vitellogenesis-related and unrelated mRNAs, could be interpreted as a mechanism redirecting liver expression machineries during the egg-production period. This essential regulation of ER and Vg mRNA stability allows that every mRNA molecule participates lastingly to the massive Vg synthesis and shortens the recovery from vitellogenesis after estrogen withdrawal. In addition to this accessory loop linking the stability of the ER mRNA to estrogen exposure, the minimal system described here can be embedded in a more densely reticulated circuitry, ensuring its robustness by coordinating the different values. For example, the degree of ER phosphorylation could be continuously readjusted through some unidentified fast negative loop to prevent the large effect shown above, caused by a slight modification of ER phosphorylation while keeping unchanged the other parameters.

Some cooperativity is necessary for positive feedback bistability (Cherry and Adler, 2000). The mechanism of cooperativity retained here is ER dimerization, which means that either the dimerization strength or the concentration of activated ER should be limiting enough. Additional mechanisms are involved in the strongly cooperative Vg gene expression. Although trout Vg expression is strictly and strongly estrogen-dependent, its gene is devoid of high-affinity ERE. We propose that this seemingly paradoxical situation is a condition to generate a non-hyperbolic response with a threshold effect. Given that weakness of the individual ER target sites present in the Vg gene promoter and the reported capacity of two ER dimers to interact and organize into a tetramer (Tanenbaum et al., 1998; Massaad et al., 1998), the mechanism of modulated self-assembly recently proposed to regulate transcription both precisely and flexibly (Vilar et Saiz, 2011), is a particularly good candidate for participating to the control of Vg gene expression. Such a strong cooperativity participates both to the delay of the Vg gene response to hormone and to the memory effect. The delayed response of Vg to estrogens, with respect to that of ER, allows that Vg expression starts only when the amplification of ER is unambiguously engaged. This property can be envisioned as a noise-reduction mechanism preventing inappropriate Vg expression upon unwanted bursts of hormone. With respect to stochastic behaviours, modeling dynamic memory using differential equations is questionable for systems containing low

copy number molecules, since averaging a collection of cells is not equivalent to a macroscopic system in case of threshold effects. The deterministic approach has however been used here as an approximation, in absence of strongly non-linear phenomena and because the memory concerns the accumulation of a secreted gene product whose blood concentration derives from a lot of cells. This situation could explain why Vg is not directly synthesized by oocytes, but taken up from a common pool, to avoid heterogeneous Vg contents between individual eggs.

The transcription rates calculated here can appear relatively low. One should however keep in mind that only productive transcription is retained in these results. Considering the high proportion of defective transcription elongation and transcript maturation, for example by defective splicing, the total number of initiations could be much higher. Noteworthy, the number of ER transcripts produced from the fish ER gene promoter is reached within one hour by the CMV promoter, as determined by single-cell imaging (Darzacq *et al.*, 2007). This difference is consistent with the relative strengths of the CMV viral promoter and the zebrafish ER gene promoter activated by zER<sub>5</sub> in presence of hormone, compared in transient expression assays (Fig. 4E). These infrequent transcription initiation events can forbid stochastic transcriptional bursts to occur, thereby preventing unintentional crossing of the memory threshold.

Many additional actors involved in the vitellogenesis memory effect are likely to lack in this study. For example, the basal ER mRNA content that we observed in absence of hormone is not predicted by the autoregulatory schemes used here. This low expression could be ensured by the proximal rtER gene promoter, which includes a TATA box capable of generating spontaneous transcriptional activity (Murphy *et al.*, 2010). Such a non-regulated activity could be useful for priming the amplification loop upon hormone addition. The minimal model can work using a combination of realistic parameters, which opens the possibility that in addition to DNA demethylation, dynamic mechanisms can also be involved. This model can have important biological roles, in addition to provide an alternative explanation of the vitellogenesis memory effect. Considering the generalized presence of two transactivation domains in nuclear receptors and the various splicing variants reported in the literature for this family of TFs, one cannot exclude that such mechanisms could



participate to the delayed effects of transient exposures to xenohormones. The present study provides an additional mechanism possibly underlying such phenomena, complementary to the classical explanation of structural chromosome marking.

## APPENDIX A : Bistability analysis in absence of hormone

The stationary states and their stability are particularly important in absence of estrogens and can be analysed by adimensionning the system if setting

$$u = \left( \alpha P_P \sqrt{\beta_{R1}} \right) [m_{R1}], \quad \tau = \left( \alpha P_P V_1 \sqrt{\beta_{R1}} \right) t$$

and

$$\mu = \frac{r_{mR0}}{\alpha P_P V_1 \sqrt{\beta_{R1}}},$$

the possible stationary states of the system should solve

$$\frac{u^2}{1 + u^2} - \mu u = 0 \tag{11a}$$

$u$  can be 0 or can be a root of

$$\mu(1 + u^2) - u = 0, \tag{11b}$$

Hence, there are 1 or 3 solutions depending on the value of  $\mu$ . If  $0 \leq \mu < 1/2$ , the 3 solutions are

$$u = 0$$

and

$$u = \frac{1}{2\mu} \pm \sqrt{\frac{1}{4\mu^2} - 1}$$

If  $\mu > 1/2$ ,  $u = 0$  is the unique solution.

To analyse the stability of the solutions through the linear approach, we consider a small perturbation  $\delta u$  of a stationary solution  $u^*$  (i.e.  $u = u^* + \delta u$ )

For the solution  $u^* = 0$ ,

$$\frac{d\delta u}{d\tau} = -\mu\delta u$$

Hence,  $\delta u$  decreases exponentially and consequently the solution  $u^* = 0$  is always stable for every positive  $u$ .

For the solution

$$u^* = \frac{1}{2\mu} + \sqrt{\frac{1}{4\mu^2} - 1},$$

$$\frac{d\delta u}{d\tau} = \left( \frac{2u^*}{(1+u^{*2})^2} - \mu \right) \delta u = 2\mu \left( \frac{\mu}{u^*} - \frac{1}{2} \right) \delta u \quad (12)$$

The right term is then always negative for  $0 \leq \mu < 1/2$  and the solution is stable in this range.

For the solution

$$u^* = \frac{1}{2\mu} - \sqrt{\frac{1}{4\mu^2} - 1},$$

the right term is positive and this solution is unstable for every  $\mu$  between  $0 \leq \mu < 1/2$ .

These results can be gathered in a bifurcation diagram showing the stationary states as a function of  $\mu$  (Supporting Material, Fig. S1) drawn with a plain line when stable and a dashed line when unstable. The bifurcation at  $\mu = 0.5$  is compatible with the estimated parameters listed in the supporting materials (Table S1), which give 11.9 ER mRNA molecules per cell.

## APPENDIX B : Ghost bifurcation

Dynamic memory to estrogen exposure through the model proposed here, can be of limited duration for given sets of parameters, which can be examined using the adimensioned parameters defined above. When  $\mu \geq 0.5$ , only the solution  $u^* = 0$  exists and is stable, nevertheless, around the value  $u = 1$ , the variation rate  $du = d\tau$  is close to 0 and the system spends some time in the vicinity of that value, before falling to the stationary solution  $u = 0$ .

The time spent near  $u = 1$  can be estimated (30), using a development of the second order on  $u$  and  $\mu = 1 + v$  and  $\mu = \frac{1}{2} + r^2$ .

$$\begin{aligned} \frac{dv}{d\tau} &= \frac{(1+v)^2}{1+(1+v)^2} - \left(\frac{1}{2} + r^2\right)(1+v) \\ &\simeq -\frac{v^2}{4} - r^2 \end{aligned} \quad (13)$$

Hence,

$$d\tau = -\frac{dv}{\frac{v^2}{4} + r^2} \quad (14)$$

The delay to reach  $u = 0$  when the initial condition is  $u \gg 1$ , can be estimated by integrating Eq. 14 between  $+\infty$  and 0

$$\begin{aligned} \tilde{T} &= -\int_{+\infty}^0 \frac{dv}{\frac{v^2}{4} + r^2} \\ &= \frac{1}{2} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{dv}{\frac{v^2}{4} + r^2} \\ &= \left[ \frac{1}{r} \arctan \frac{v}{2r} \right]_{-\infty}^{+\infty} \\ &= \frac{\pi}{r} \end{aligned} \quad (15)$$

Consequently, the time to reach the stationary state is about

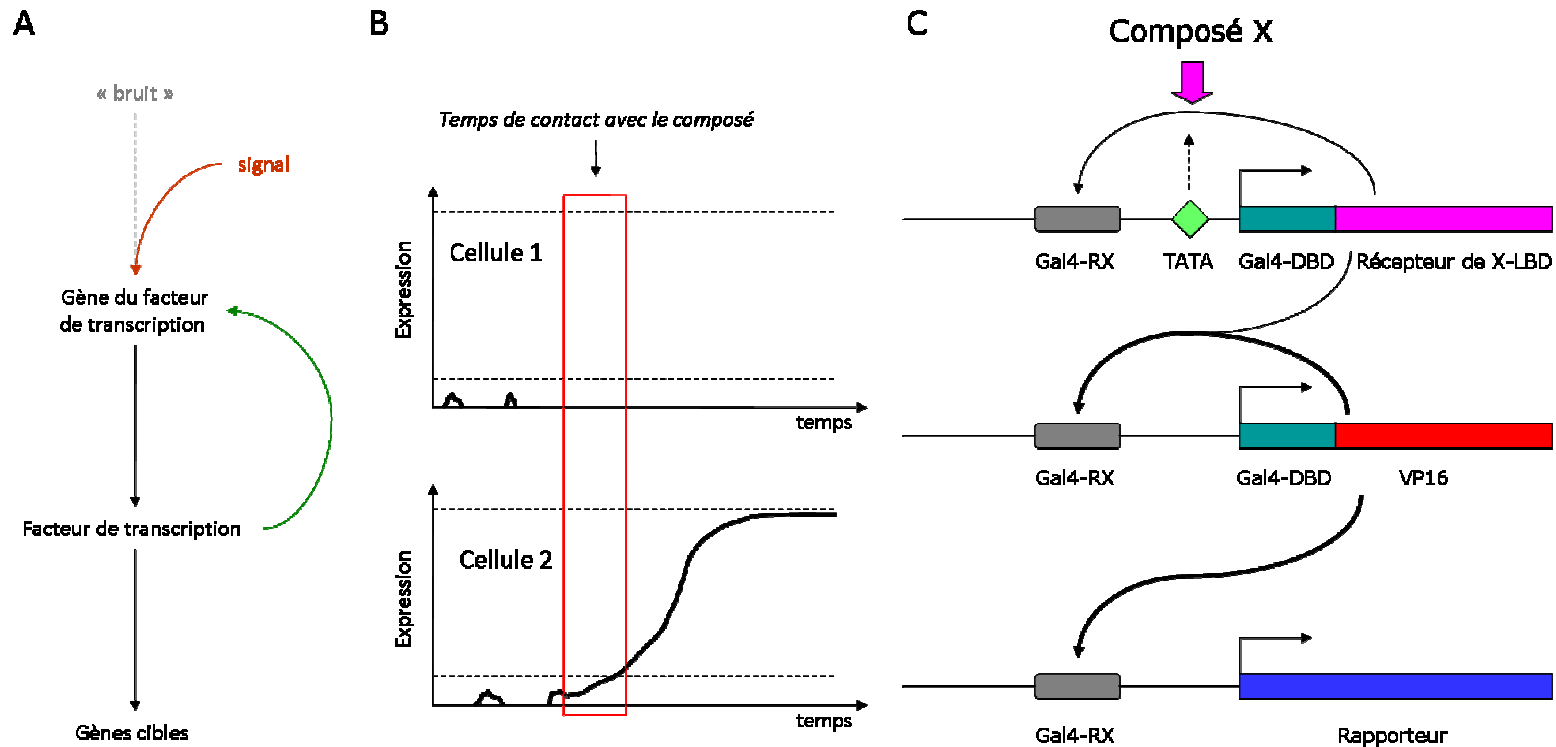
$$\tilde{T} \simeq \frac{\pi}{\sqrt{\mu - \frac{1}{2}}} \quad (16)$$

## Supporting Material

This work was supported by University of Rennes1, Action déficits scientifiques émergents. FNB is a fellowship of the French Ministère de la Recherche.

## IV. Application possible en écotoxicologie : création de cellules enregistreuses

Une application directe du rôle des boucles d'auto-amplification dans la mémoire cellulaire serait la création d'outils cellulaires capables de garder en mémoire l'effet d'une exposition à un xénobiotique donné, sur un modèle légèrement différent de ce que nous avons pu montrer dans le cadre de la vitellogénèse. Ainsi, avec un simple circuit comprenant un facteur de transcription sensible à un composé environnemental qui s'autorégule positivement via une dimérisation et un système de gènes rapporteurs, on pourrait être à même de savoir si une ou plusieurs cellules dans une population donnée ont été en présence du xénobiotique en question (Fig. 15). Ces cellules «enregistreuses», transfectées de manière stable avec les trois constructions, permettraient donc de rapporter la présence d'une substance cible dans le milieu, même à de faibles doses et de manière transitoire, ce qui pourrait avoir des débouchés en écotoxicologie notamment. La sensibilité du système viendrait du nombre de cellules exprimant le gène rapporteur, reflet du temps de contact entre la population cellulaire et le xénobiotique, ou de la concentration de celui-ci dans l'environnement. Ce genre de cellules intégrant des circuits rapporteurs vient par ailleurs d'être testé par l'équipe de Pamela Silver pour suivre le destin de cellules à la suite d'un stimulus induisant la différenciation (Burrill et *al.*, 2012).



**Figure 15 : Représentation des systèmes permettant la création de cellules enregistreuses**

(A) Circuit minimal permettant la mise en mémoire permanente de l'exposition à un signal. (B) Selon les conditions décrites en A et en fonction de l'expression basale du facteur liée au « bruit », les cellules ne seraient pas toutes en mesure de répondre au signal, mais celles qui le font garderaient l'expression du facteur même après le retrait du signal (cellule 2). (C) Constructions permettant de visualiser si oui ou non une cellule a été en contact avec le composé à tester. Le promoteur est commun aux trois constructions et contient des éléments de réponse au facteur de transcription de la levure Gal4 et au facteur régulé par X. Le facteur est une fusion entre le DBD de Gal4 et le LBD du récepteur à X. Cette fusion est capable de s'auto-stimuler. La TATA box n'est présente que sur la première construction, permettant d'avoir un bruit et donc de rendre certaines cellules sensibles à la présence de X. La deuxième construction est toujours le DBD de Gal4 fusionné à un promoteur non régulé par X, ici VP16. Ce facteur peut également s'auto-stimuler et activer la transcription d'un gène rapporteur, facilement identifiable.



## **Partie 2 :**

# **Effet Warburg et maintien de l'état mésenchymateux**





## Partie 2 : Effet Warburg et maintien de l'état mésenchymateux

---

Le second volet de ma thèse concerne l'EMT et ses conséquences pour la cellule tumorale, notamment les interrelations entre l'état métabolique de la cellule, sa forme cellulaire, façonnée par le cytosquelette, son expression génétique et son caractère mésenchymateux. En introduction, nous définirons tout d'abord l'EMT et donnerons ses principales caractéristiques. Nous nous attarderons ensuite sur une de ses conséquences, appelée « effet Warburg » qui consiste en un changement de régime métabolique de la cellule cancéreuse, diminuant son recours à la phosphorylation oxydative et augmentant son usage de la glycolyse, même en conditions aérobies. Pour cela, nous rappellerons quelques notions de métabolisme énergétique avant de décrire plus précisément l'effet Warburg et son implication dans le processus d'EMT.

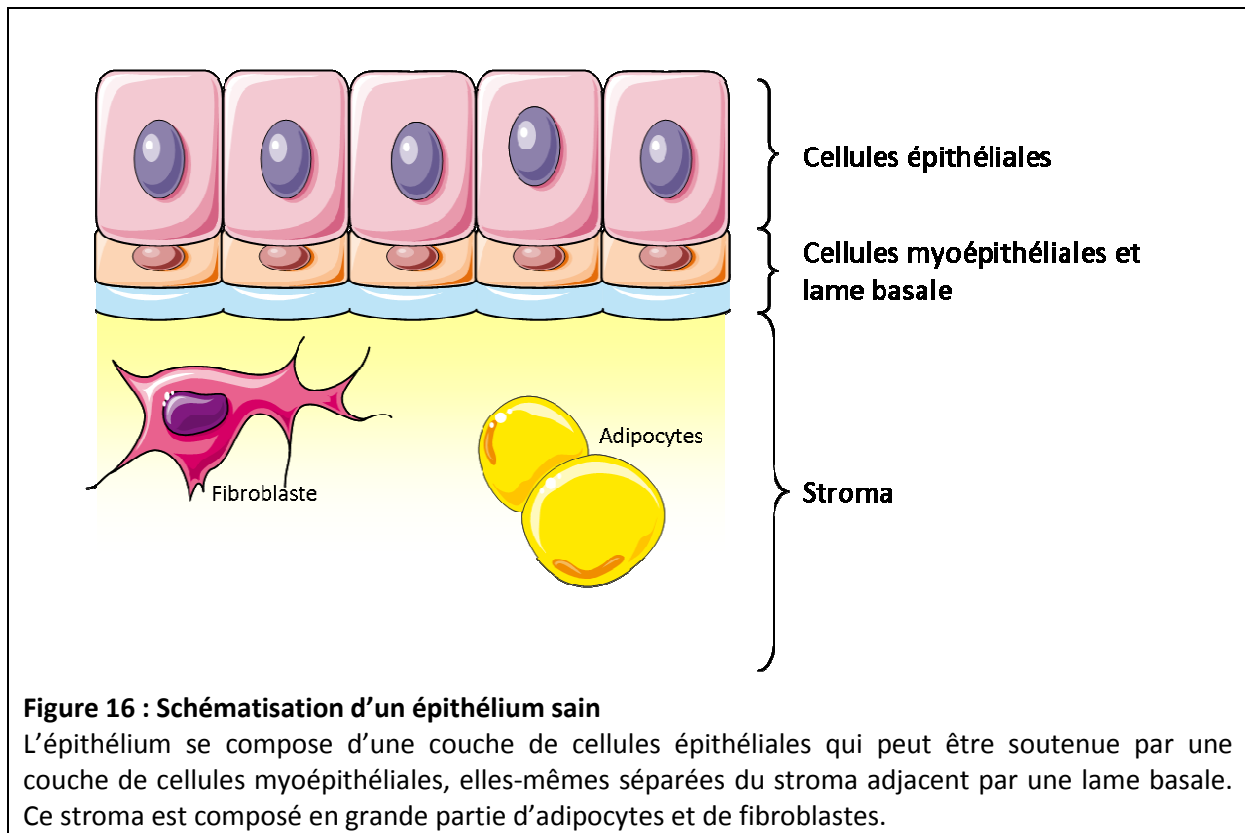
### I. La transition épithélio-mésenchymateuse

#### A. Définition

La transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est le processus biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée en contact avec la membrane basale (Fig. 16), de subir divers changements biochimiques aboutissant à l'adoption d'un phénotype mésenchymateux. Ce phénotype mésenchymateux inclut de plus grandes capacités migratoires, un pouvoir d'invasion, une meilleure résistance à l'apoptose, et une production accrue de composants de la matrice extracellulaire. L'EMT se caractérise par une rupture de la lame basale et la formation de cellules mésenchymateuses qui peuvent migrer loin de la couche épithéliale dont elles sont issues.

L'EMT est un processus crucial du développement embryonnaire, les tissus adultes étant constitués en grande partie de cellules qui ont migré à un stade embryonnaire avant de se fixer et d'effectuer la transition inverse (transition mésenchymo-épithéliale ou MET). Son implication dans l'invasion cancéreuse a été décrite pour la première fois en 1890 par

Ramon y Cajal, qui a observé dans des tumeurs mammaires au sein d'un épithélium des cellules avec un phénotype différent ayant la capacité d'envahir le stroma.



L'initiation et le déroulement de l'EMT sont accomplis par des processus moléculaires distincts, incluant l'activation de facteurs de transcription, l'expression de protéines de surface spécifiques, la réorganisation et l'expression de protéines du cytosquelette, la production d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire et les changements d'expression de certains microARNs. Ces facteurs peuvent être utilisés comme biomarqueurs permettant de diagnostiquer le passage de l'EMT par des cellules cancéreuses.

## B. Classification des EMT

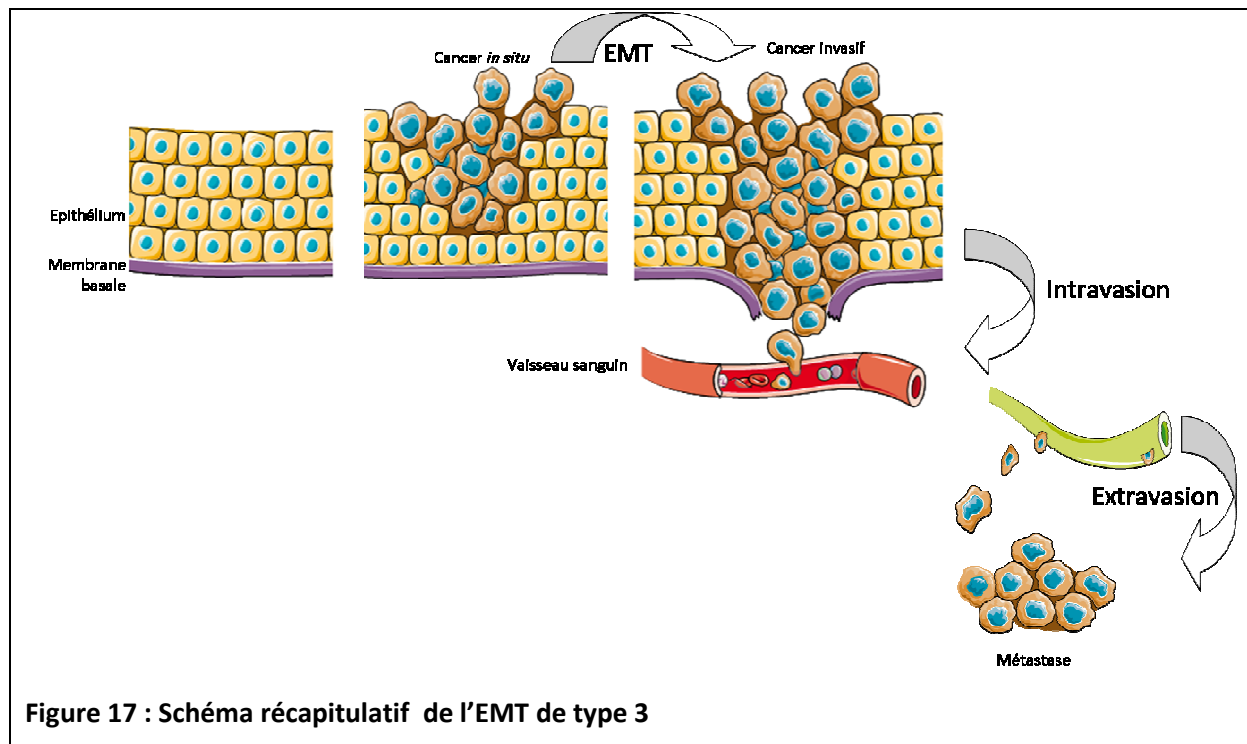
Kalluri et Weinberg (2009) décrivent trois types d'EMT intervenant dans des processus biologiques distincts, qui partagent des mécanismes communs mais présentent chacun des particularités.

L'EMT de type 1 a trait au développement embryonnaire et permet l'implantation de l'œuf, la formation de l'embryon, le développement des organes. Elle génère divers types de cellules du mésenchyme qui peuvent, après leur migration, subir la MET et former un épithélium secondaire sur le lieu de destination. Ce type d'EMT est guidé par un besoin de remodelage et de diversification des tissus. Elle permet une morphogénèse correcte et génère *in fine* un organisme fonctionnel.

L'EMT de type 2 se produit dans un contexte inflammatoire lors de lésions tissulaires et permet la cicatrisation ou la régénération tissulaire ; elle est également responsable de fibroses. L'EMT débute à la suite d'un traumatisme ou d'une blessure inflammatoire, lors de la réparation de l'organe et génère des fibroblastes ou myofibroblastes qui sécrètent d'importantes quantités de composants de la matrice extracellulaire (et notamment de collagènes) afin de reconstruire le tissu. Elle est associée à l'inflammation et cesse quand celle-ci diminue. Si le contexte inflammatoire perdure, une fibrose peut s'installer et entraîner, dans ses formes les plus sévères, la destruction de l'organe. La fibrose est donc une forme persistante de cicatrisation liée à une inflammation chronique.

L'EMT de type 3 se déroule dans un contexte de croissance et de progression tumorale, les cellules du front invasif de la tumeur prenant alors un phénotype mésenchymateux, avec des conséquences assez différentes de celles des deux autres types d'EMT. Ainsi les cellules qui subissent une EMT de type 3 peuvent envahir l'organisme en passant par la circulation sanguine ou lymphatique et former des métastases dans des tissus distants, menaçant ainsi le pronostic vital. Ce type d'EMT pourrait être dû à certaines altérations génétiques ou de marquages chromatinien acquis par les cellules cancéreuses et les rendant plus réceptives aux signaux inducteurs de l'EMT émis par le stroma associé aux tumeurs. La tendance de ces cellules à se différencier par la MET pour former des métastases pourrait dépendre du microenvironnement du tissu cible, pauvre en signaux pro-EMT ou riche en signaux inducteurs de différenciation (Fig. 17).

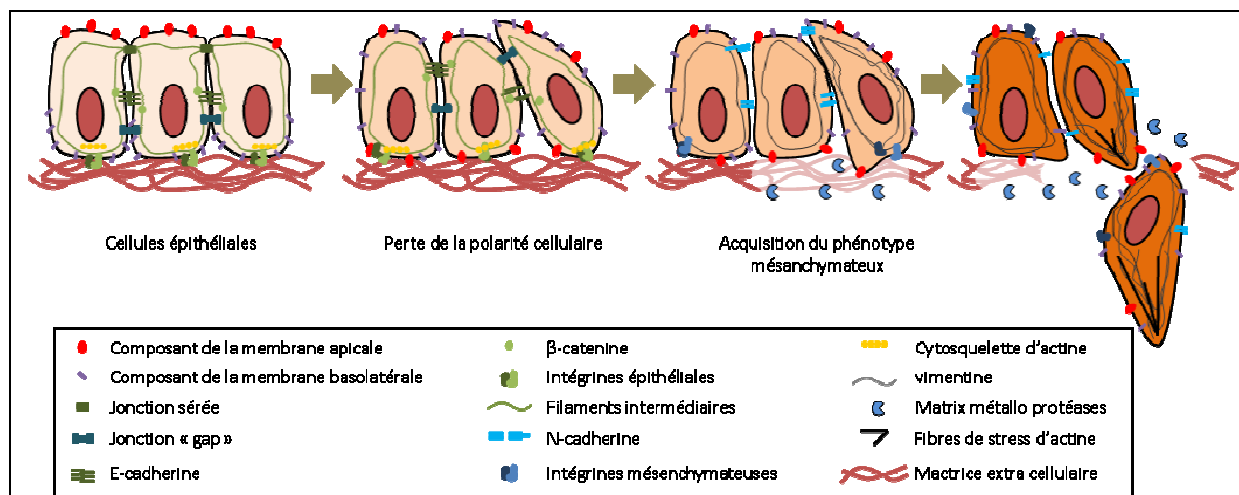
Dans la suite de notre travail, nous nous intéressons plus particulièrement à l'EMT impliquée dans les processus cancéreux (sauf mention explicite du contraire).



### C. Caractéristiques

L'EMT se caractérise par une perte de la polarité et des jonctions cellulaires, par une plus grande résistance à la mort cellulaire, ainsi que par une hausse du potentiel migratoire des cellules (Fig. 18). Alors que le cancer épithélial primaire correspond à une prolifération excessive de cellules épithéliales associée à une angiogénèse, l'EMT a pour conséquence de favoriser la dissémination de métastases dans l'organisme, de réduire leur sensibilité à la mort cellulaire ou à la sénescence, ou d'échapper au système immunitaire. Ces cellules mésenchymateuses peuvent donc changer de forme, perdre leur polarité ainsi que rompre leurs jonctions cellulaires pour ne développer que des contacts transitoires entre cellules voisines.

Concernant la prolifération des cellules subissant l'EMT, deux effets antagonistes sont décrits. Lorsque les cellules migrent, elles sont dans un état de différenciation particulier et leur prolifération est ralentie. Cependant, l'EMT induit également une dé-différenciation d'une fraction des cellules, avec une prolifération accrue et des caractéristiques de cellules souches ou progénitrices.



**Figure 18 : Représentation schématique des étapes clé de l'EMT (d'après Micalizzi et al, 2010)**

Les cellules épithéliales sont polarisées et expriment des molécules d'adhésion intercellulaires et avec la matrice extra-cellulaire (MEC) (jonctions serrées, jonctions de communication « gap », intégrines épithéliales et E-cadherine). L'EMT provoque une perte de ces caractéristiques épithéliales. Les cellules ayant acquis un phénotype mésenchymateux dégradent alors la MEC et rompent la lame basale en sécrétant des métallo-protéases. De plus l'expression par ces cellules de molécules comme la vimentine ou la N-cadherine favorise leur migration dans le stroma adjacent.

### 1. Perte de polarité cellulaire

Les cellules épithéliales présentent une polarité apico-basale et pendant la transition du phénotype épithélial vers le phénotype mésenchymateux, les cellules peuvent produire des pseudopodes qui pénètrent dans la matrice extracellulaire. Une cellule mésenchymateuse a une polarité avant-arrière par rapport au sens de migration ; sa polarité n'est plus définie par rapport à la lame basale.

### 2. Perte des jonctions cellulaires

L'EMT se caractérise principalement par la perte des jonctions cellulaires, et notamment par la répression de l'E-cadherine (cette répression est un diagnostic de l'EMT), au profit de la N-Cadherine, qui favorise des contacts faibles et transitoires entre cellules. En effet, il existe des migrations collectives, EMT-indépendantes, où les jonctions cellulaires sont maintenues et où les cellules progressent suivant un front de migration. Cependant, il semblerait que seules les cellules individualisées, ayant subi l'EMT, soient capables de passer la paroi des vaisseaux (intravasation). En effet, Giampieri a montré que dans des tumeurs mammaires, les

cellules qui migrent collectivement reçoivent des signaux TGF $\beta$  sécrétés par les Cancer Associated Fibroblastes (CAFs) ou les Tumor-Associated Macrophages (TAMs), et subissent donc l'EMT au moment de l'intravasion (Giampieri *et al.*, 2009).

### *3. Dégradation de la matrice extracellulaire*

Parallèlement à la répression de ces caractéristiques épithéliales, les cellules traversant l'EMT sont capables de sécréter des métalloprotéases qui vont cliver les composants de la matrice extracellulaire, jusqu'à la rupture de la membrane basale, facilitant leur passage vers la circulation sanguine. Par ailleurs, l'invasion est favorisée par des changements de composition de la matrice extracellulaire, avec une production accrue de fibronectine (permettant de guider la migration cellulaire). De nombreuses preuves indiquent que l'inverse est vrai et que les protéines de la matrice, comme des métalloprotéases, le collagène I et la fibuline, peuvent promouvoir l'EMT (Lee *et al.*, 2008 ; Medici et Nawshad, 2010 ; Mendez *et al.*, 2010 ; Radisky *et al.*, 2005).

### *4. Changements morphologiques*

Les caractéristiques migratoires des cellules cancéreuses se retrouvent dans leur forme. Leur cytosquelette se réorganise, des fibres de stress (longs filaments d'actine liés entre eux et reliés à des « moteurs moléculaires » comme la myosine II) se développent et confèrent une contractilité à la cellule, favorisant ainsi le mouvement cellulaire et la migration (Tojkander, Gateda et Lappalainen 2012).

La polymérisation d'actine permet de déformer la membrane plasmique et ainsi de produire des extensions cellulaires rétractiles appelées pseudopodes qui sont impliquées dans la migration. À l'extrémité de pseudopodes se trouvent des points d'adhésion focaux composés de protéines d'adhésion aux surfaces comme la vinculine et des intégrines. L'attachement de ces pseudopodes sur la matrice extracellulaire vers « l'avant » de la cellule tire celle-ci, qui avance en détachant les pseudopodes situés à « l'arrière ».

Enfin, les cellules mésenchymateuses expriment plus fortement un filament intermédiaire, la vimentine, liant entre eux les organites intracellulaires, permettant à la cellule en mouvement de maintenir son intégrité (Fuchs *et al.*, 1994).

La polymérisation d'actine peut être induite directement par la répression de l'E-cadhérine, via l'activation d'une petite protéine GTPase, RhoA (Ras homolog gene family, member A) (Burridge et Wenneberg, 2004).

### *5. Changements métaboliques*

La dédifférenciation des cellules cancéreuses lors de l'EMT s'accompagne d'un changement métabolique connu sous le nom d'effet Warburg, dans lequel les cellules cessent de produire leur ATP via la phosphorylation oxydative même en conditions aérobies. Nous détaillons plus largement cet aspect de l'EMT dans le chapitre concernant le métabolisme.

## D. Programmes impliqués dans l'EMT

### *1. Voies de signalisation*

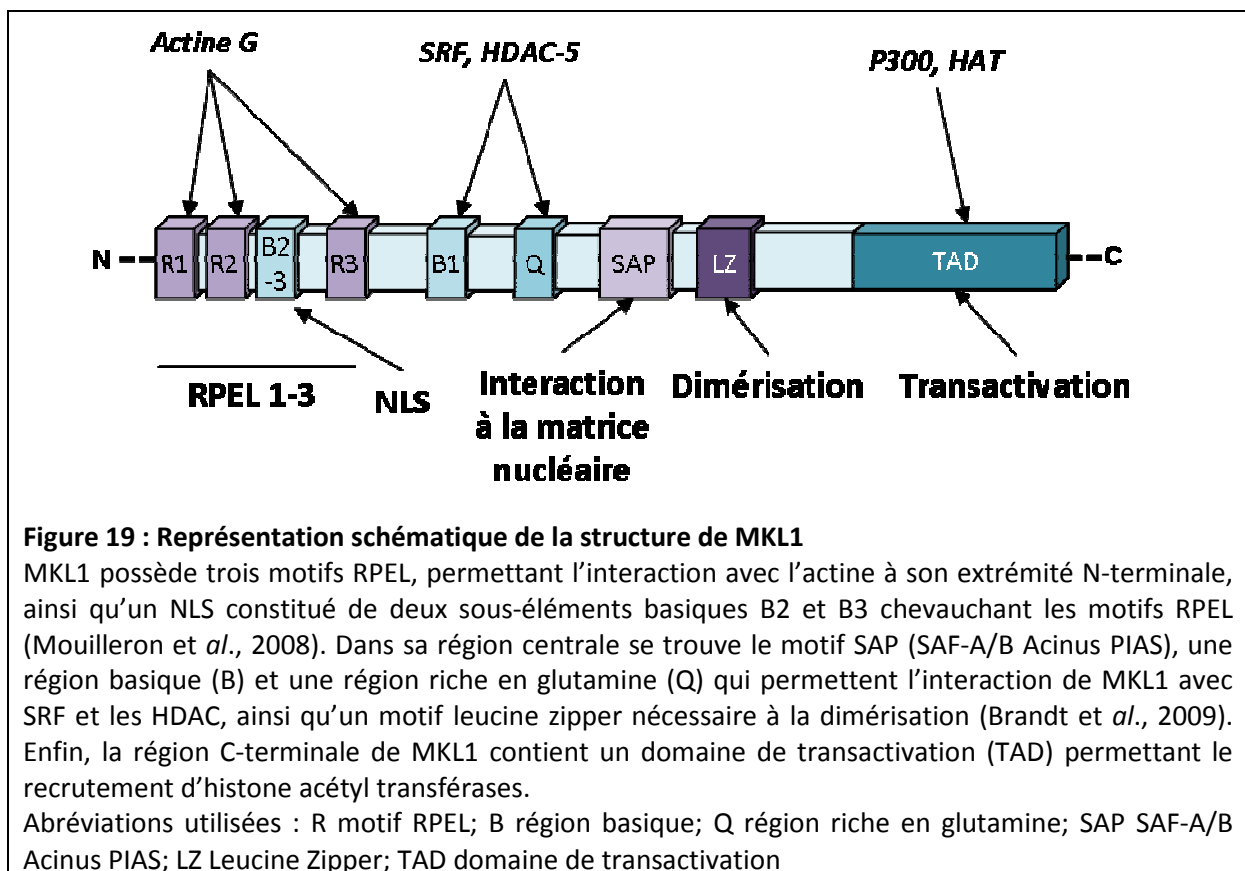
Les profonds changements qui affectent les cellules lors de l'EMT sont supportés par l'activation de plusieurs voies de signalisation, dont les membres appartiennent le plus souvent à la super-famille du Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ). Ainsi les voies de signalisation de Wnt, Notch, Sonic hedgehog, des facteurs de croissances épidermique (EGF), hépatique (HGF), fibroblastique (FGF), du facteur inductible par l'hypoxie (HIF1 $\alpha$ ) peuvent réguler l'activité de facteurs de transcription et être le point de départ de l'EMT (De Craene, van Roy et Berx, 2005 ; Thiey et Sleeman, 2006). Certaines voies de signalisation peuvent converger pour induire une EMT plus ou moins complète. En effet, l'EMT peut être partielle, les cellules conservant un certain nombre de caractéristiques épithéliales (les états intermédiaires observés correspondant à des stades différents d'un programme d'EMT), ou complète lorsque les cellules sont entièrement mésenchymateuses.

Le TGF $\beta$ , quant à lui, a deux fonctions antagonistes dans l'EMT : il inhibe la prolifération et induit la mort cellulaire lorsque la tumeur est à un stade précoce de développement mais il

peut contribuer lorsque la cancérisation est déjà amorcée à la progression vers le stade malin en promouvant l'invasion et les métastases (Massagué, 2008).

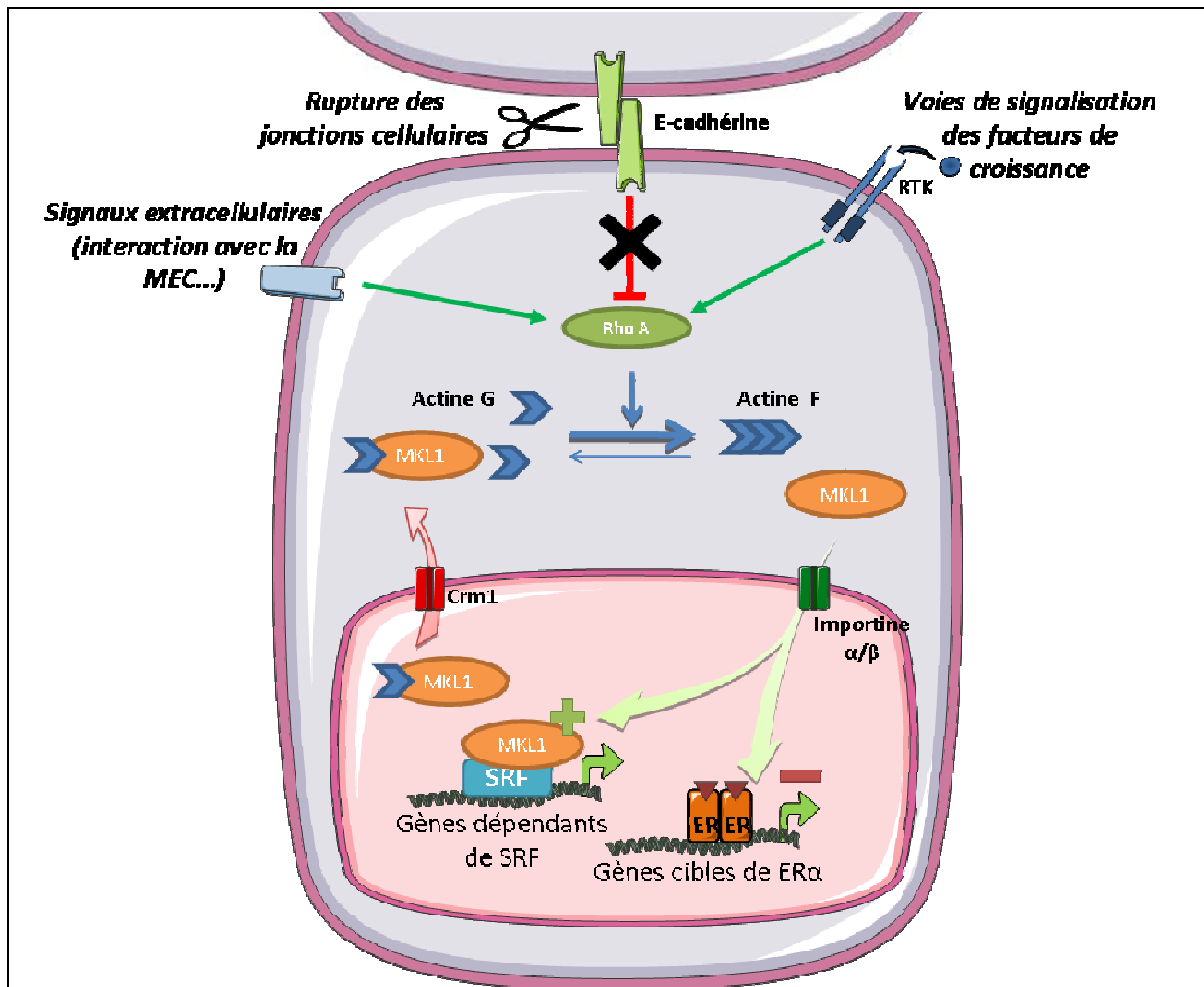
## 2. Facteurs de transcription et coactivateurs

Parmi les nombreux facteurs de transcription activés lors de l'EMT, les familles Snail, incluant SNAI I et SNAI II (ou Slug), les facteurs basiques hélice-boucle-hélice (bHLH), comme Twist ou l'oncogène Myc, ou les facteurs ZEB (facteurs de transcription à doigt de zinc) sont des acteurs centraux, capables de réprimer fortement l'expression de l'E-cadhérine. En association avec d'autres facteurs de transcription comme les « leucine zipper » (la famille Fos par exemple), ils ciblent également de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie cellulaire ou l'angiogénèse (Peinado, Olmeda et Cano et, 2007). Par ailleurs, l'activation de Snail dans les hépatocytes est suffisante pour induire le basculement de la fonction du TGF $\beta$  dans l'EMT et la résistance à la mort cellulaire (Franco et *al.*, 2010).





Par ailleurs, il existe différents facteurs de transcription capables de réguler l'expression de gènes participant au maintien de l'EMT en réponse à des modifications du cytosquelette. Parmi ceux-ci, le facteur MKL1 (pour megakaryoblastic leukemia 1, Fig. 19) est un coactivateur du facteur de transcription SRF (Serum Responsive Factor) dont les gènes cibles (impliqués dans la balance prolifération / différenciation) peuvent participer au maintien de l'EMT (Shore et Sharrocks, 1995).



**Figure 20 : Schéma présentant la régulation de l'activité de MKL1 par la dynamique de l'actine.**

Différents signaux peuvent induire l'activation de la Rho GTPase RhoA; une perte des contacts cellulaires dépendants des E-cadhérines, des voies de signalisation membranaires, comme celles des récepteurs des facteurs de croissance ou encore des modifications dans les interactions cellule-matrice extracellulaire. RhoA induit alors une polymérisation de l'actine G en actine F. Ce changement dans la dynamique d'actine résulte en la libération de MKL1, normalement sequestré par l'actine G. Le facteur de transcription MKL1 peut alors être transloqué au noyau via les importines  $\alpha/\beta$  et moduler l'activité des gènes dépendants de SRF (Serum response factor). D'autre part, MKL1 réprime aussi l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . Dans le noyau la liaison de MKL1 à l'actine G inactive MKL1 qui est alors exporté par Crm1.

En conditions basales, MKL1 est séquestré dans le cytoplasme par l'actine G. L'activation de RhoA entraîne la polymérisation de l'actine G en actine F, libérant MKL1 qui est alors dirigé au noyau via l'importine  $\alpha/\beta$ . MKL1 peut regagner le cytoplasme grâce au transporteur Crm1 après sa liaison à l'actine G (Vartiainen et *al.*, 2007) (Fig. 20).

Si l'initiation de l'EMT peut, via la polymérisation d'actine, activer MKL1, des études récentes ont également montré que MKL1 pouvait promouvoir l'EMT. En effet, MKL1 participe à l'EMT induite par le TGF $\beta$  en formant un complexe avec le facteur de transcription Smad3 qui induit l'expression de slug, provoquant la rupture des contacts cellulaires (Morita, Mayanagi et Sobue, 2007).

Un autre co-facteur de transcription, YAP (pour Yes Associated Protein), permet de relier l'état du cytosquelette à la transcription de gènes impliqués dans la prolifération ou la migration cellulaire. YAP est un facteur de la voie de signalisation Hippo, coactivateur des facteurs TEAD, impliqués dans la croissance cellulaire et la résistance à l'apoptose. Il est séquestré dans le cytoplasme quand cette voie est active, et transloqué au noyau lorsque la signalisation Hippo cesse, c'est-à-dire en cas de rupture des jonctions serrées et adhérentes.

### *3. Marquages structuraux de la chromatine*

Des motifs aberrants de méthylation de l'ADN affectant les inducteurs de l'EMT pendant la progression tumorale ont été décrits, par exemple pendant la progression du papillome vers le carcinome cutané chez la souris, suggérant un contrôle de l'EMT par les marquages chromatinien (Fraga et *al.*, 2004). De plus, Snail et Twist recrutent NuRD (nucleosome remodelling and histone deacetylase) et l'histone déméthylase LSD1 pour réprimer la transcription d'E-cadhérine (Fu et *al.*, 2011 ; Lin et *al.*, 2010). Enfin, les protéines de remodelage de la chromatine permettent une condensation globale de la chromatine favorisant la migration cellulaire, la condensation du noyau participant aux changements morphologiques plus généraux nécessaires à la migration (Gerlitz et Bustin., 2011).

## E. Maintien de l'état mésenchymateux

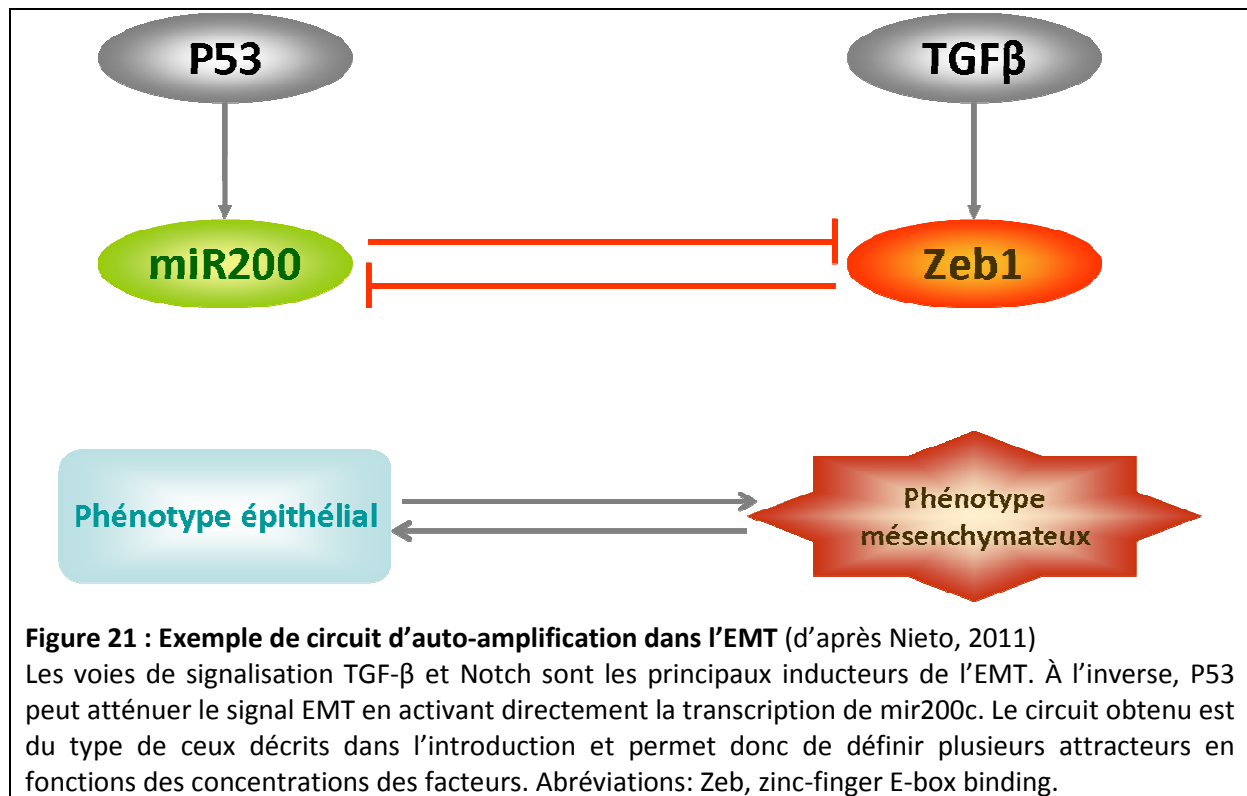
L'EMT est un phénomène réversible, la MET étant indispensable pour la différenciation des tissus et organes lors du développement embryonnaire, ainsi que pour l'implantation de métastases et la colonisation durable de tissus par les cellules cancéreuses (Polyak et Weinberg, 2009), c'est pourquoi le maintien de l'EMT est un phénomène actif.

Plusieurs mécanismes ont déjà été décrits concernant le maintien du phénotype mésenchymateux une fois l'EMT initiée. Ainsi, les signaux initiant l'EMT peuvent être activés de manière autocrine afin de maintenir l'expression de facteurs de transcription responsables de l'EMT (Scheel et *al.*, 2011).

Par ailleurs, plusieurs exemples de boucles de rétroactions positives renforçant le phénotype mésenchymateux, ont été décrits. Ainsi, dans un contexte d'inflammation chronique comme on en trouve dans les tissus fibrotiques ou les tumeurs, des boucles de rétroactions positives renforçant l'EMT ont été mises en évidence (Lopez-Novoa et Nieto, 2009).

De plus, la perte de la polarité apico-basale est due à la répression de gènes de polarisation cellulaire, comme *crumbs*, par la famille de Snail et Zeb. La répression de *Crumbs* active la voie de signalisation TGF $\beta$ , aboutissant donc à une boucle d'auto-amplification alimentant le processus d'EMT (Nieto 2011).

Enfin, les microARNs de la famille miR 200 ont un rôle important dans la régulation du phénotype épithélial en inhibant l'activité des facteurs ZEB, prévenant la répression de l'E-cadhérine (Brabletz et Brabletz, 2010). Ces microARNs sont eux-mêmes régulés par des facteurs inducteurs de l'EMT, formant des circuits d'auto-amplification du phénotype épithélial ou mésenchymateux, selon quel facteur prend le dessus sur l'autre (Fig. 21), définissant ainsi des attracteurs.



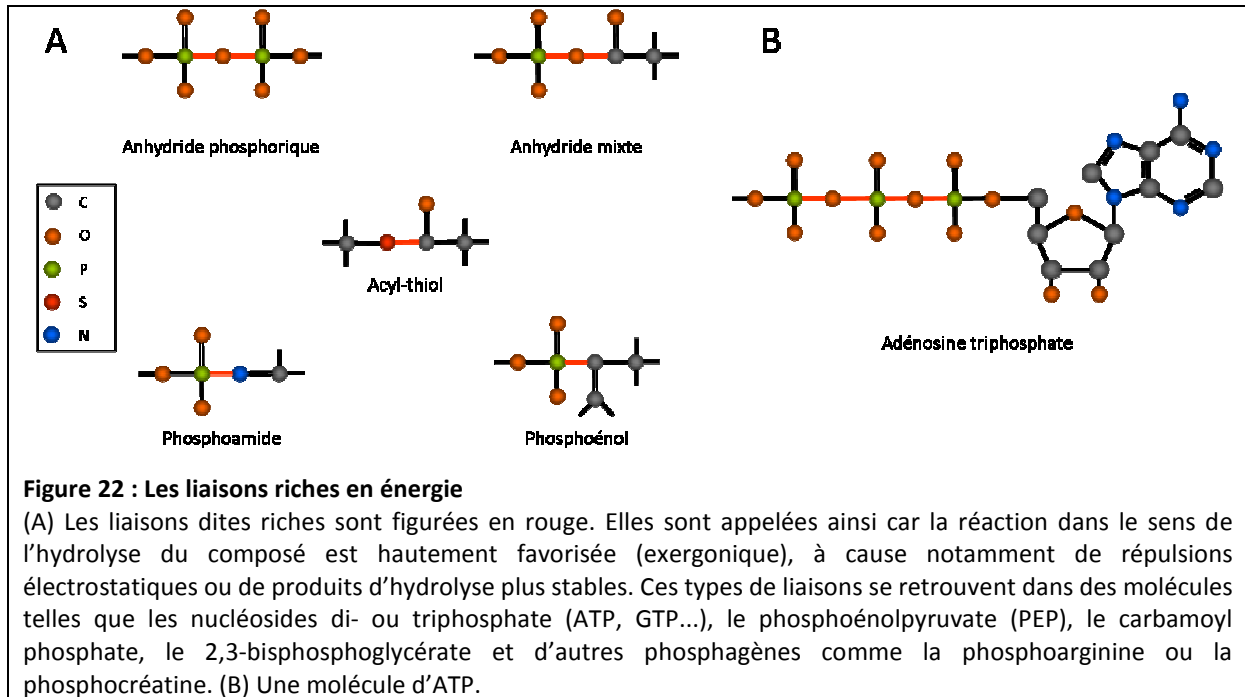
## II. Notions de métabolisme

Comme nous l'avons vu, l'effet Warburg est une caractéristique de l'EMT. Afin de mieux comprendre son fonctionnement, nous allons vous rappeler certaines notions de métabolisme énergétique cellulaire, puis nous décrivons à la fois ce changement métabolique et son implication dans le processus tumoral, ainsi que l'intérêt de le cibler en thérapie anti-cancéreuse.

### A. L'ATP, « monnaie énergétique » de la cellule

Dans les cellules, l'énergie nécessaire à diverses fonctions (la synthèse de macromolécules, la contraction musculaire, le transport actif d'ions, la production de chaleur...) est fournie par l'oxydation de carburants métaboliques tels que les glucides, les lipides et, en cas de jeûne (très) prolongé, les protéines. Cette énergie libre ainsi produite peut être stockée dans des liaisons dites « riches en énergie » (Fig. 22) au sein de molécules comme l'ATP. En effet, si ces liaisons en elles-mêmes sont riches en énergie et se retrouvent dans de nombreuses

molécules, le choix d'une molécule principale échangeuse d'énergie reconnue par un grand nombre d'enzymes (l'ATP) permet de réguler beaucoup plus finement les échanges énergétiques dans la cellule.



Par ailleurs, des expériences à la fois *in vitro* et *in vivo* ont démontré que le niveau intracellulaire de l'ATP pouvait être impliqué dans la régulation de processus fondamentaux, comme la croissance, le développement la survie ou la mort cellulaire, montrant ainsi le caractère indispensable de l'ATP dans la cellule. Ainsi, en 1967 Atkinson et Walton ont proposé une hypothèse de la charge énergétique stipulant que les enzymes régulant ces voies fondamentales devaient être sensibles à la charge énergétique, c'est-à-dire à la concentration d'ATP, ce qui est le cas notamment de certaines enzymes métaboliques qui sont activées de manière allostérique par l'AMP et inhibées par l'ATP.

## B. Sources d'ATP

Si l'ATP est une molécule porteuse d'énergie permettant le fonctionnement cellulaire quasi-universelle au sein du vivant, son instabilité (qui lui confère son haut potentiel énergétique) ne permet pas de la stocker durablement. Ainsi, il n'y a que peu d'ATP disponible dans les cellules et différentes voies métaboliques sont conçues pour maintenir sa concentration à

des niveaux compatibles avec son utilisation cellulaire. De manière générale, les animaux ne stockent pas l'ATP mais les molécules entrant dans ces voies métaboliques, et donc principalement les glucides (pour un stockage à court terme mobilisable rapidement, avec ou sans oxygène) et les lipides (pour un stockage à plus long terme et ne nécessitant pas d'apport d'eau).

Parmi les glucides, le glucose est la source principale d'ATP et peut être catabolisé par les trois processus suivants en vue de produire de l'ATP : la glycolyse, le cycle des acides tricarboxyliques (TCA), également appelé cycle de (Szent-Györgyi et) Krebs et finalement la phosphorylation oxydative.

Parmi les lipides, ce sont principalement les triglycérides qui vont être métabolisés par  $\beta$ -oxydation avant d'entrer dans le cycle TCA et la respiration oxydative.

### *1. La glycolyse*

La glycolyse, également appelée la voie d'Emben-Meyerhof-Parnas, est donc la première étape du catabolisme du glucose. Dans le cytoplasme, une série de dix réactions enzymatiques (Fig. 23) permet l'obtention, à partir d'une molécule de glucose (6 carbones), de deux molécules de pyruvate (3 carbones), qui pourront ensuite entrer dans les autres voies métaboliques. Ces réactions enzymatiques peuvent se décomposer en trois phases :

- *Une étape d'activation du glucose* : celui-ci est phosphorylé sur son C<sub>6</sub>, par l'hexokinase ou la glucokinase, lors d'une réaction irréversible consommant une molécule d'ATP. Cela empêche le glucose de sortir de la cellule, qui ne possède pas de récepteur à glucose 6-phosphate, avec pour effet d'augmenter le transport du glucose extracellulaire (non phosphorylé) vers la cellule (et donc de concentrer le glucose à l'intérieur de la cellule). Cette étape sert également de voie d'entrée dans d'autres voies métaboliques, comme la voie des pentoses phosphates ou la glycogénogénèse. À cause du caractère irréversible de cette réaction, l'hexokinase est finement régulée (avec notamment un rétro-contrôle négatif par le glucose 6-phosphate et une induction de son expression par l'insuline). Le glucose 6-phosphate formé est ensuite isomérisé en fructose 6-phosphate, qui est aussitôt phosphorylé sur son C<sub>1</sub>, consommant ainsi une deuxième molécule d'ATP. Cette réaction, également irréversible, est régulée par la quantité d'ATP libre dans la cellule : plus l'ATP libre

(non lié au  $Mg^{2+}$ , cofacteur de la phosphofructokinase) est important, moins celle-ci va catalyser cette réaction.

- *Un clivage donnant deux molécules à trois carbones* : Le fructose 6-diphosphate est clivé par une lyase en glycéraldéhyde 3-Phosphate (G3P) et en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) qui est ensuite isomérisé en G3P par la triosephosphate isomérase (une molécule de fructose diphosphate donne donc deux molécules de G3P, qui vont poursuivre les étapes de la glycolyse).

- *Une étape de récupération de l'énergie investie* : Le G3P est phosphorylé en 1,3-diphosphoglycérate, par ajout d'un phosphate inorganique  $HPO_4^{2-}$ , ce qui s'accompagne de la réduction d'une molécule de  $NAD^+$  en  $NADH, H^+$ . Le groupement phosphate du C1 du 1,3-diphosphoglycérate va permettre la production d'une molécule d'ATP par phosphorylation directe d'un ADP. Le 3-phosphoglycérate ainsi obtenu est isomérisé en 2-phosphoglycérate qui est lui-même déshydraté par l'énolase (ou phosphopyruvate hydratase) pour former du phosphoénolpyruvate (PEP). Une deuxième molécule d'ATP est produite par phosphorylation directe de l'ADP grâce au groupement phosphate du PEP, réaction irréversible catalysée par la pyruvate kinase utilisant un  $Mg^{2+}$  comme cofacteur. Cette réaction aboutit à la formation d'énolpyruvate qui se transforme en pyruvate par tautomérie (transfert réversible d'une double liaison avec déplacement d'un hydrogène). La pyruvate kinase, impliquée dans la troisième réaction irréversible de la glycolyse, est régulée par la disponibilité des réactifs (activée par l'AMP et le fructose 1,6-diphosphate et inhibée par l'ATP, l'acétyl-CoA et l'alanine).

Le bilan énergétique de la glycolyse est globalement faible : la lyse d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate consomme deux molécules d'ATP pour en produire quatre. Le bilan net de la glycolyse est donc de deux moles d'ATP par mole de glucose ainsi que deux moles de coenzymes réduits ( $NADH, H^+$ ).

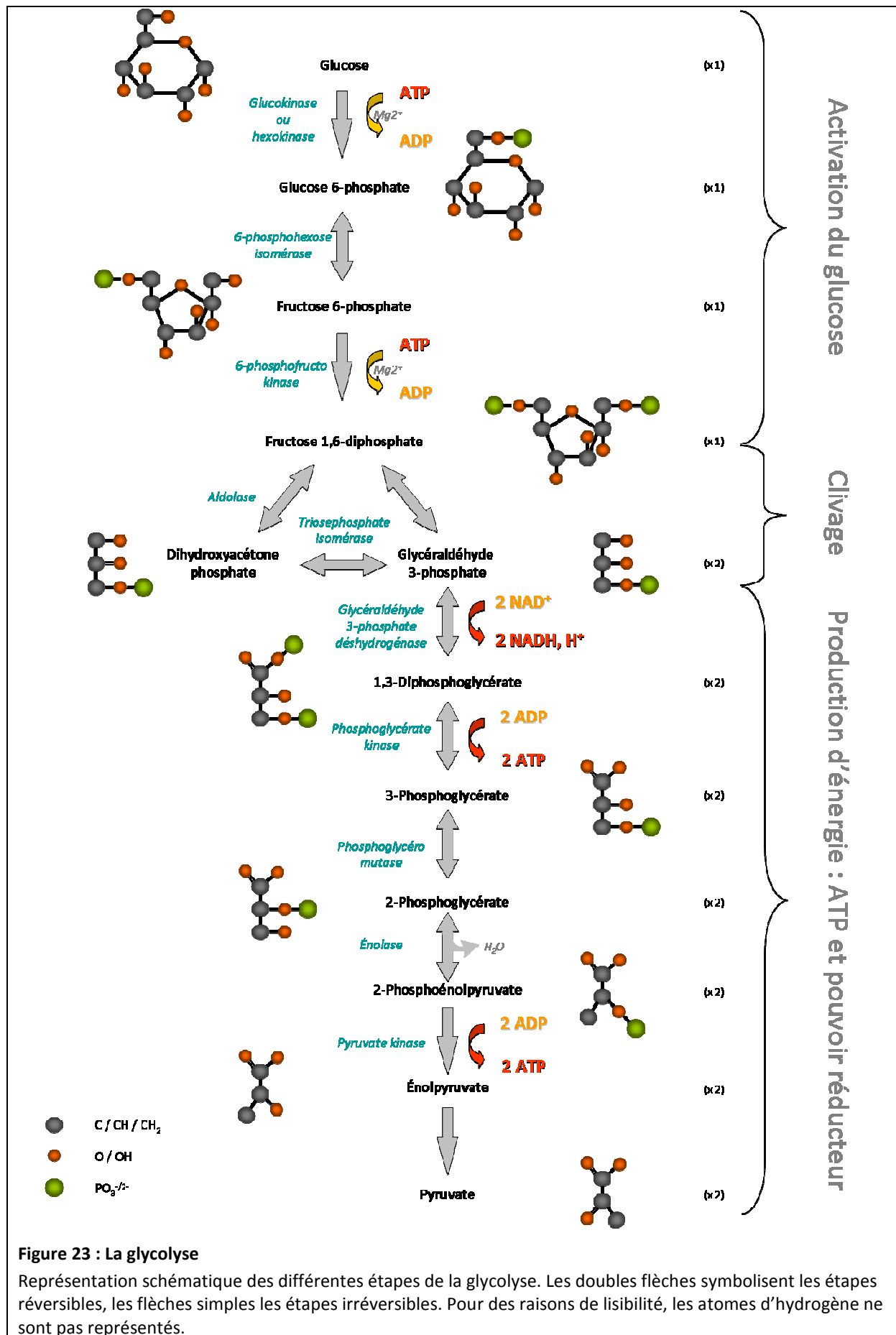
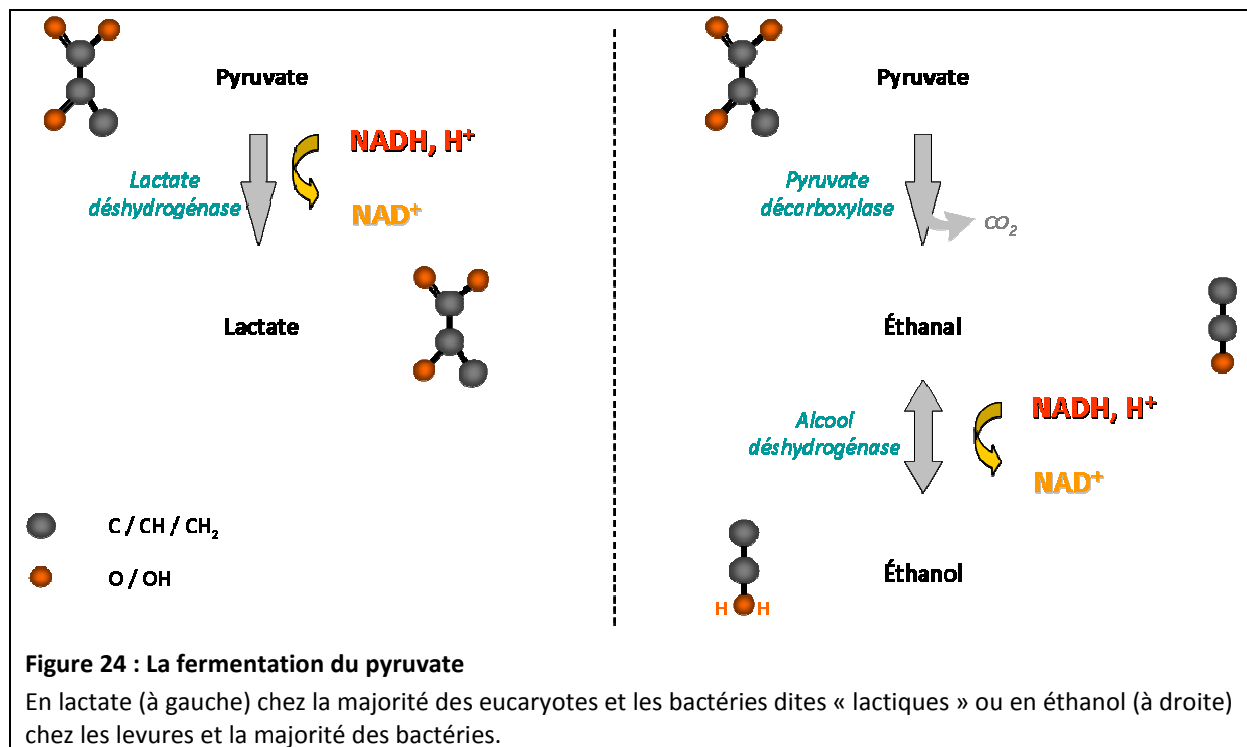


Figure 23 : La glycolyse

Représentation schématique des différentes étapes de la glycolyse. Les doubles flèches symbolisent les étapes réversibles, les flèches simples les étapes irréversibles. Pour des raisons de lisibilité, les atomes d'hydrogène ne sont pas représentés.



Le pyruvate produit lors de la glycolyse a plusieurs devenir possibles dans la cellule. En conditions anaérobies il peut être fermenté en lactate ou en éthanol (Fig. 24), ce qui aboutit à l'oxydation d'une molécule de NADH en NAD<sup>+</sup> par molécule de pyruvate et donc au recyclage des cofacteurs réduits qui peuvent à nouveau intervenir comme oxydant dans les étapes de glycolyse. Dans ce cas, il n'y a pas de production supplémentaire d'ATP.

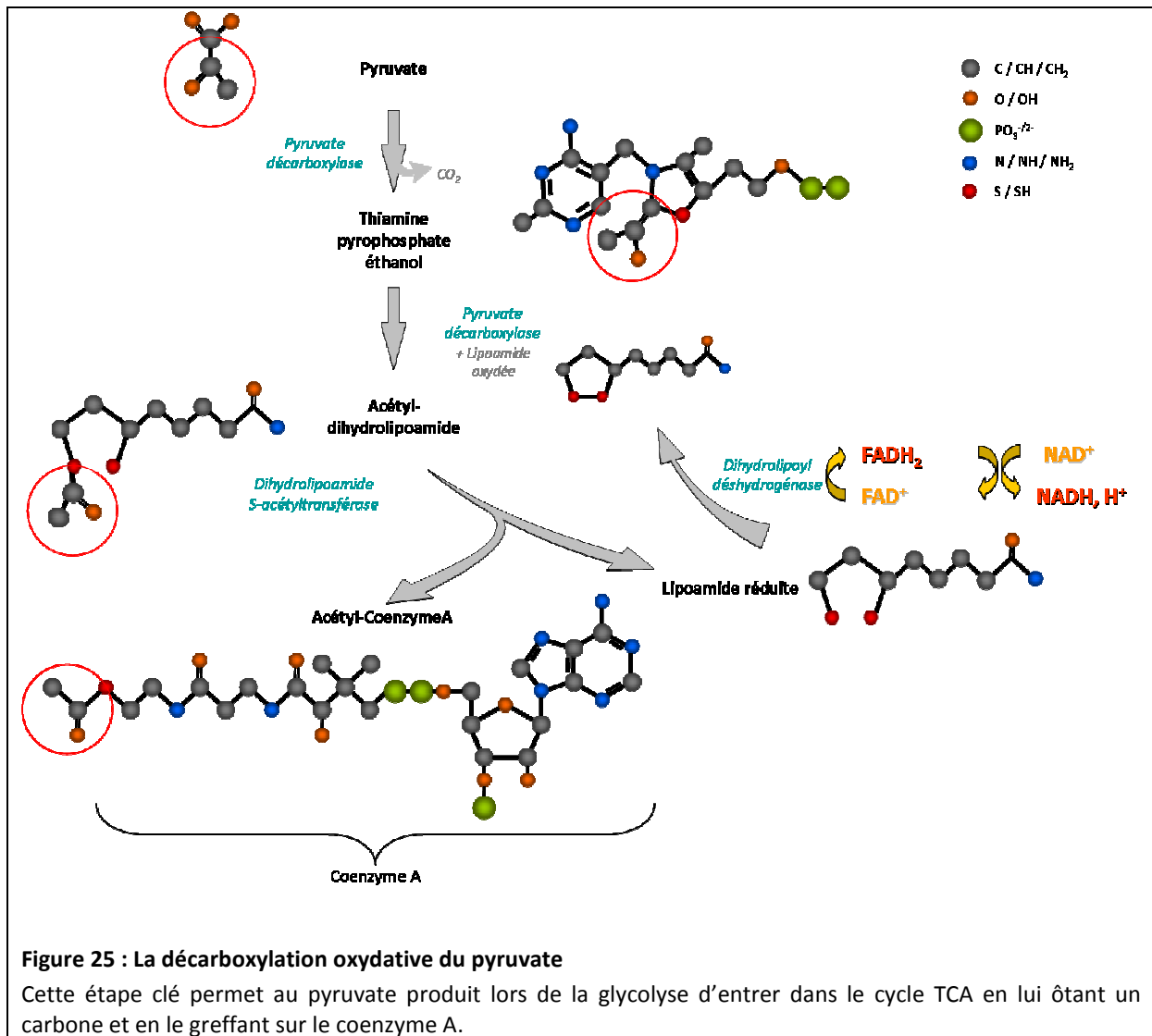


En conditions aérobies, au contraire, il peut être métabolisé en acétyl-CoA (par décarboxylation oxydative) ou en oxaloacétate (par carboxylation), deux métabolites qui vont ensuite entrer dans le cycle TCA.

## 2. La décarboxylation oxydative du pyruvate

La décarboxylation oxydative du pyruvate a lieu dans la matrice mitochondriale des eucaryotes ou dans le cytoplasme des procaryotes. Cette réaction qui permet l'obtention d'un acétyl-CoA à partir d'un pyruvate (Fig. 25) est catalysée par un complexe enzymatique de trois enzymes appelé pyruvate déshydrogénase, qui comprend une décarboxylase, une acétyl-transférase et une oxydo-réductase, chacune de ces enzymes fonctionnant avec un cofacteur. La lipoamide étant à la fois un produit de réaction et un cofacteur de la

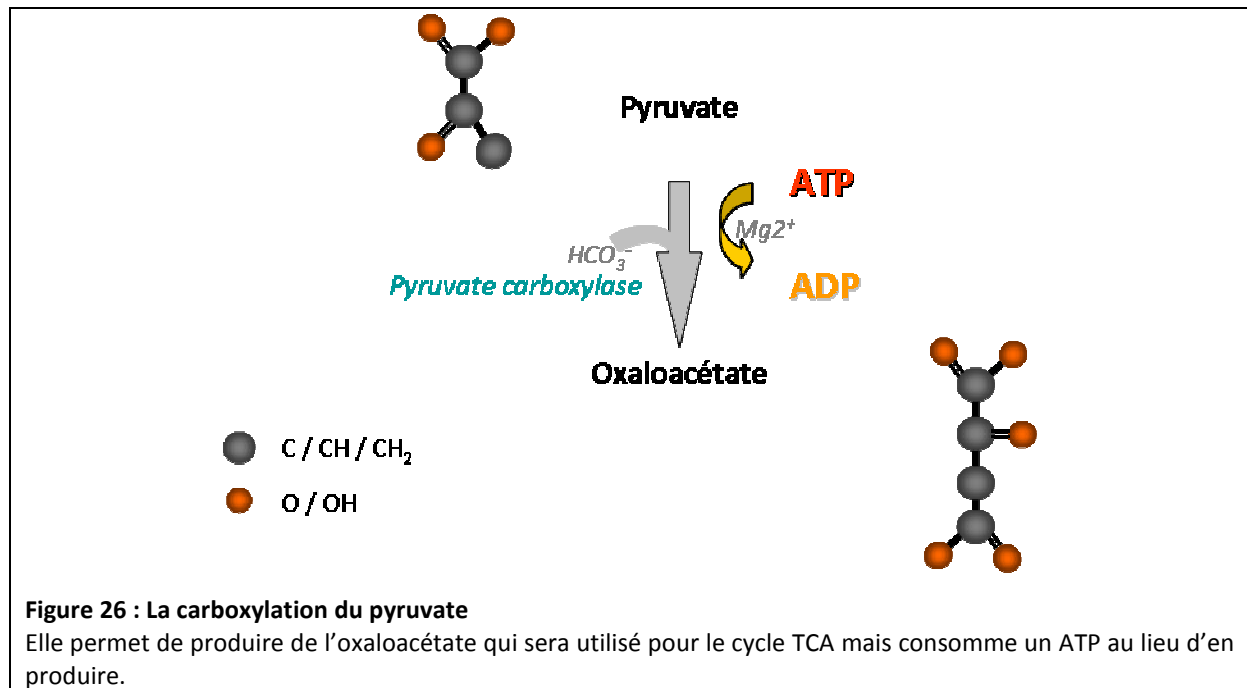
dihydrolipoamide S-acétyltransférase, on parle de réaction autocatalytique. La réaction d'oxydation de la lipoamide permettant son recyclage fait intervenir les cofacteurs  $FAD^+$  et  $NADH, H^+$  et permet *in fine* d'obtenir un  $NADH, H^+$ , molécule réductrice par molécule de pyruvate.



### 3. La carboxylation du pyruvate

Comme la décarboxylation oxydative du pyruvate, sa carboxylation en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase (Fig. 26) se produit dans les mitochondries des eucaryotes et le cytoplasme des procaryotes. Cette enzyme est régulée par l'acétyl-CoA et la synthèse d'oxaloacétate, tout comme celle d'acétyl-CoA, permet d'alimenter le cycle des acides

tricarboxyliques. Cette réaction consomme une molécule d'ATP par molécule de pyruvate carboxylée.



#### 4. La $\beta$ -oxydation des acides gras

Les acides gras sont des molécules hydrophobes, qui ne peuvent donc pas voyager librement dans la circulation sanguine. Ils sont apportés aux tissus grâce à des molécules de transport (les albumines), ou en formant des triacyl-glycérols liés à des protéines sous forme de chylomicrons ou de lipoprotéines de très faible densité (VLDL). Ils pénètrent dans les cellules selon leur gradient de concentration et sont de nouveau liés à des protéines permettant leur acheminement vers le lieu de leur catabolisme ou stockage.

La  $\beta$ -oxydation est la principale voie de métabolisme des acides gras, qui ne peut avoir lieu qu'en présence d'oxygène. Dans le cas des cellules eucaryotes, elle se déroule dans les mitochondries ou les peroxysomes (sauf la première étape qui a lieu dans le cytoplasme). Elle est régulée positivement par les catécholamines (hormones du stress et de l'effort physique) et négativement par la présence de glucose en quantité suffisante, *via* l'insuline notamment.

Le métabolisme des acides gras se déroule en trois étapes principales :

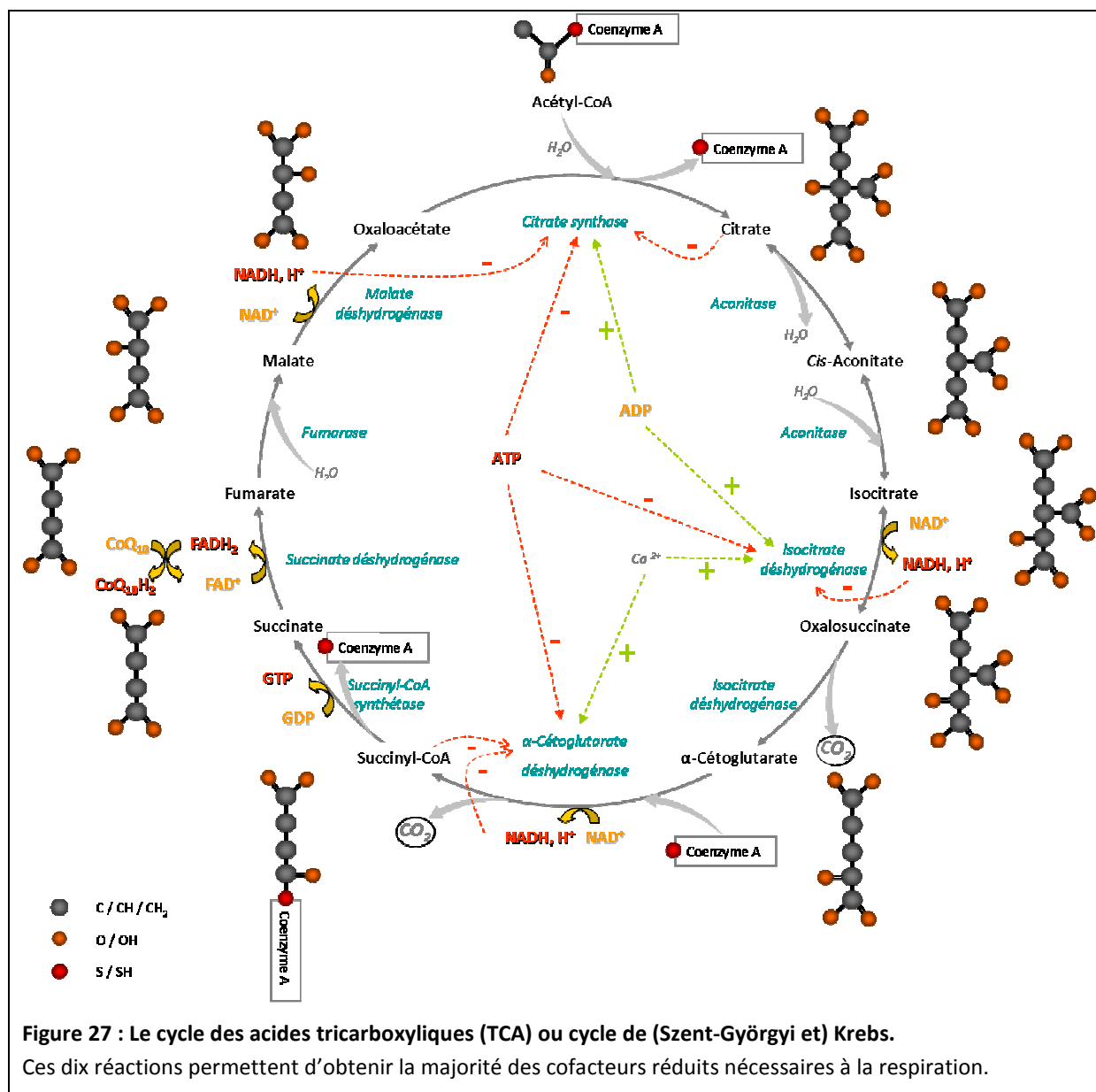
- *Une phase d'activation*, dans le cytoplasme (pour les acides gras à longue chaîne carbonée) ou dans la matrice mitochondriale (pour les acides gras à petite ou moyenne chaîne carbonée), où une chaîne d'acide gras et un coenzyme A réduit vont être associés pour donner un acyl-CoA. Les acyl-CoA de petite ou moyenne taille seront préférentiellement  $\beta$ -oxydés (car déjà situés dans la mitochondrie), tandis que les acyl-CoA de grande taille peuvent également servir d'intermédiaires du métabolisme ou réguler diverses fonctions cellulaires (en liant certaines protéines par exemple).

- *Une phase de transport vers la matrice mitochondriale* (ou le peroxysome), grâce aux carnitine acyl-transférases (les groupements acyl ne peuvent pas diffuser librement vers la mitochondrie). Les carnitines sont des protéines transmembranaires (sur la membrane externe des mitochondries avec le site actif vers le cytoplasme) ou solubles dans la matrice mitochondriale. Les carnitines dont le site est cytosolique reconnaissent l'acyl-CoA (surtout s'il est complexé avec des protéines de transport) et le lient, libérant un coenzyme A. Ce premier groupe de carnitines est inhibé par le malonyl-CoA, en réponse aux stocks de carburants cellulaires (glucose, lactate, pyruvate...). L'acide gras ainsi lié à la carnitine passe dans l'espace intermembranaire où une acyl-carnitine translocase le prend en charge et le fait passer jusque dans la matrice mitochondriale. Il est alors pris en charge par un autre groupe de carnitines, qui le lie à nouveau à l'acyl-CoA.

- *Une étape de  $\beta$ -oxydation* où les carbones de la chaîne sont ôtés deux par deux en fournissant à chaque fois un acétyl-CoA, qui se déroule en quatre phases (oxydation, hydratation, seconde oxydation et thiololyse) répétées jusqu'à ce qu'il n'y ait plus assez de carbones dans la chaîne. Chaque cycle de  $\beta$ -oxydation produit un NADH,  $H^+$ , un  $FADH_2$  (réoxydés par la chaîne respiratoire pour former de l'ATP) et un acétyl-CoA (qui entre alors dans le cycle TCA).

La  $\beta$ -oxydation ne produit pas d'ATP par phosphorylation directe sur le substrat, mais elle produit plus de pouvoir réducteur et d'acétyl-CoA que la glycolyse. Ainsi, pour une chaîne à six carbones, il y a production de 2 NADH,  $H^+$ , 2  $FADH_2$  et 3 acétyl-CoA (contre seulement 2 NADH,  $H^+$  et 2 ATP pour la glycolyse).

## 5. Le cycle des acides tricarboxyliques



Cette série de réactions (Fig. 27) a pour intérêt la réduction de cofacteurs et la production de métabolites qui seront ensuite pris en charge par la chaîne respiratoire. Le bilan de ce cycle est la transformation d'une molécule d'acétyl-CoA en deux molécules de CO<sub>2</sub> avec la production concomitante d'une molécule de GTP (équivalent de l'ATP au niveau énergétique), la réduction de trois molécules de cofacteur NADH, H<sup>+</sup> et d'une molécule de coenzyme Q (l'ubiquinol, échangeur d'électrons de la chaîne respiratoire).

Le cycle des TCA est régulé au niveau de trois enzymes, principalement en fonction de la disponibilité des substrats, le pouvoir réducteur, la charge énergétique et les produits des réactions catalysées :

- La citrate synthase est activée par l'ADP et inhibée par le NADH (pouvoir réducteur), l'ATP (charge énergétique de la cellule) et le citrate (produit de la réaction qu'elle catalyse).

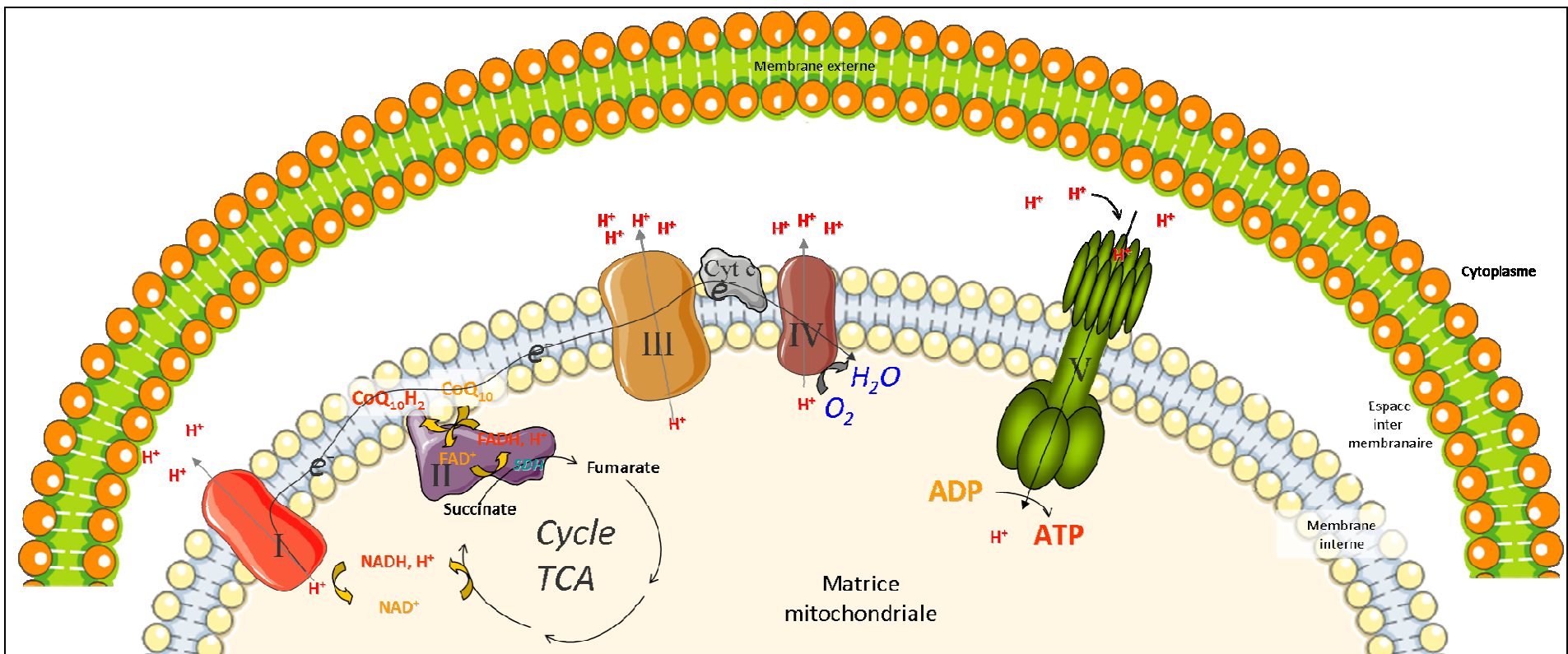
- L'isocitrate déshydrogénase est activée par le calcium et l'ADP et inhibée par le NADH et l'ATP.

- L' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase est activée par le calcium et inhibée par le NADH, l'ATP et le succinyl-CoA (produit de la réaction qu'elle catalyse).

En lui-même, ce cycle ne produit que peu d'ATP, mais il fournit à la fois les intermédiaires métaboliques et le pouvoir réducteur nécessaire à la production d'ATP dans la mitochondrie par l'ATP synthase grâce à la chaîne respiratoire.

### *6. La respiration ou phosphorylation oxydative*

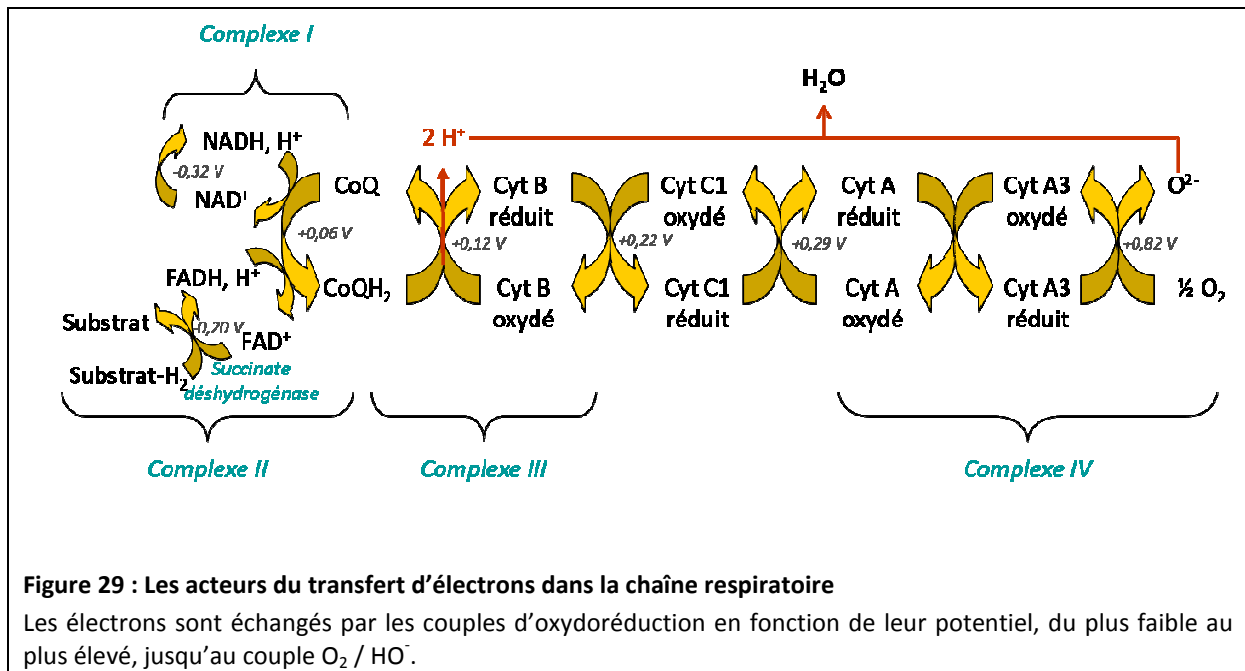
La respiration, au sens biochimique du terme, est une chaîne de réactions d'oxydoréduction, avec comme accepteur final d'électrons l'oxygène dans le cadre de la respiration aérobie que nous détaillerons ici. La chaîne respiratoire est un ensemble de complexes protéiques membranaires situés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie catalysant ces réactions. Elle permet en premier lieu de recycler en les réoxydant les cofacteurs (NADH,  $H^+$  et le coenzyme  $QH_2$ ) qui ont été réduits lors de la glycolyse, la décarboxylation oxydative du pyruvate ou le cycle des TCA. Elle s'accompagne de la création d'un gradient transmembranaire de protons, qui fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase, autre complexe protéique de la membrane interne mitochondriale. Comme il y a alors couplage de la chaîne respiratoire et de la production d'ATP, on parle d'oxydations phosphorylantes (ou phosphorylation oxydative) (Fig. 28).



**Figure 28 : La phosphorylation oxydative, couplage de la chaîne respiration et de la production d'ATP**

Les électrons, arrachés aux cofacteurs réduits lors des réactions cataboliques (glycolyse, cycle TCA...), suivent un parcours entre les quatre premiers complexes de la chaîne respiratoire, le complexe V étant l'ATP synthase. Ainsi, le complexe I (NADH-ubiquinone réductase) retire les électrons des NADH produits par le TCA et les transfère à la première navette, l'ubiquinone (facteur liposoluble situé dans la bicouche lipidique de la membrane interne). Le complexe II (succinate déshydrogénase-ubiquinone réductase) est une autre voie d'entrée des électrons dans la chaîne (dans ce cas, les électrons proviennent de l'oxydation du succinate, ils sont relayés à l'ubiquinone *via* le FAD). Une fois l'ubiquinone réduite en ubiquinol, elle peut transférer les électrons au complexe III (ubiquinone-cytochrome C réductase). Les électrons sont déplacés à travers plusieurs groupements prosthétiques de l'ubiquinol à une autre navette (hydrosoluble mais accroché à la membrane interne, côté espace inter-membranaire de la mitochondrie), le cytochrome C, qui va ensuite les transférer au complexe IV (cytochrome oxydase) qui peut ensuite, *via* son hème, réduire l'oxygène en eau. Ce transferts d'électrons le long de la chaîne respiratoire s'accompagne d'un transfert de protons vers l'espace inter-membranaire, créant ainsi un gradient de protons (ou force proton-motrice) qui permet à l'ATP-synthase de phosphoryler l'ADP.

Lors de la respiration, les électrons circulent en passant d'une molécule réductrice à une molécule oxydante, chaque couple ayant un potentiel d'oxydoréduction plus élevé que le précédent (Fig. 29), l'accepteur final d'électrons étant l'oxygène (couple  $O_2 / HO^-$  avec un potentiel d'oxydoréduction de +0,82 V).



**Figure 29 : Les acteurs du transfert d'électrons dans la chaîne respiratoire**

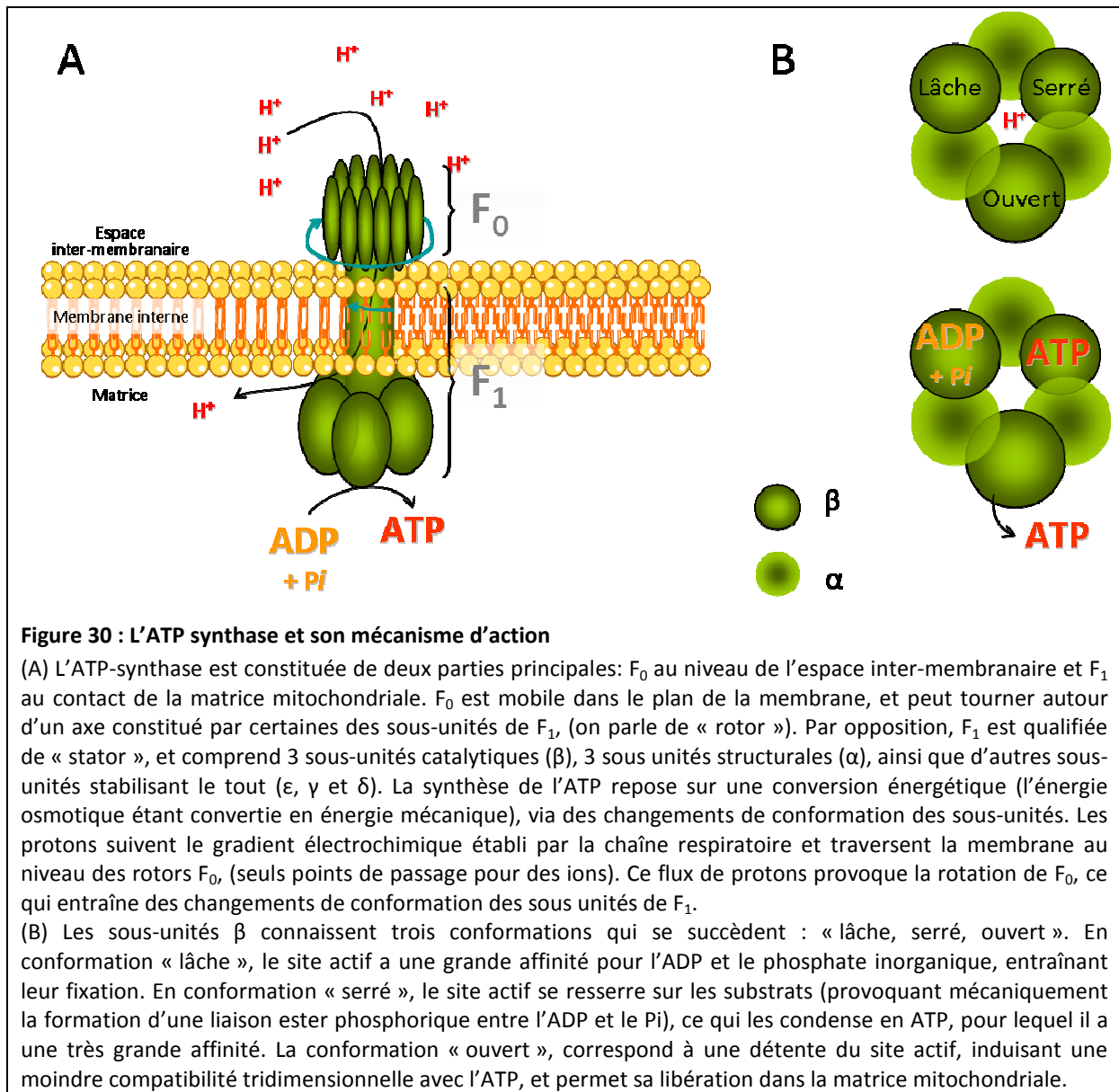
Les électrons sont échangés par les couples d'oxydoréduction en fonction de leur potentiel, du plus faible au plus élevé, jusqu'au couple  $O_2 / HO^-$ .

Ces réactions d'oxydoréduction entraînent l'expulsion de protons dans l'espace inter-membranaire par les complexes, I, III et IV, permettant alors à l'ATP synthase de produire l'ATP. En effet, il existe suite à l'expulsion de protons un potentiel de membrane (noté  $\Delta\Psi_m$ , de l'ordre de -180 à -200 mV) de part et d'autre de la membrane interne (avec une baisse du pH d'environ 0,75). C'est ce potentiel de membrane qui est utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP (réaction endergonique, nécessitant un apport d'énergie) (Fig. 30).

La chaîne respiratoire est régulée principalement par des apports en molécules réduites ( $NADH, H^+$  provenant du catabolisme de macromolécules), en d'oxygène (en l'absence de d'oxygène, il n'y a pas d'accepteur final d'électrons, ce qui paralyse l'ensemble des réactions), et par le ratio  $[ADP + P_i]/[ATP]$ . En effet, quand la cellule dispose de beaucoup d'ATP, la chaîne respiratoire est ralentie (l'ATP-synthase ne produit plus d'ATP et ne fait donc pas entrer de protons dans la matrice, la concentration de protons dans l'espace inter-



membranaire étant alors trop élevée). À l'inverse, un excès d'ADP va stimuler les réactions d'oxydoréduction et la production d'ATP.



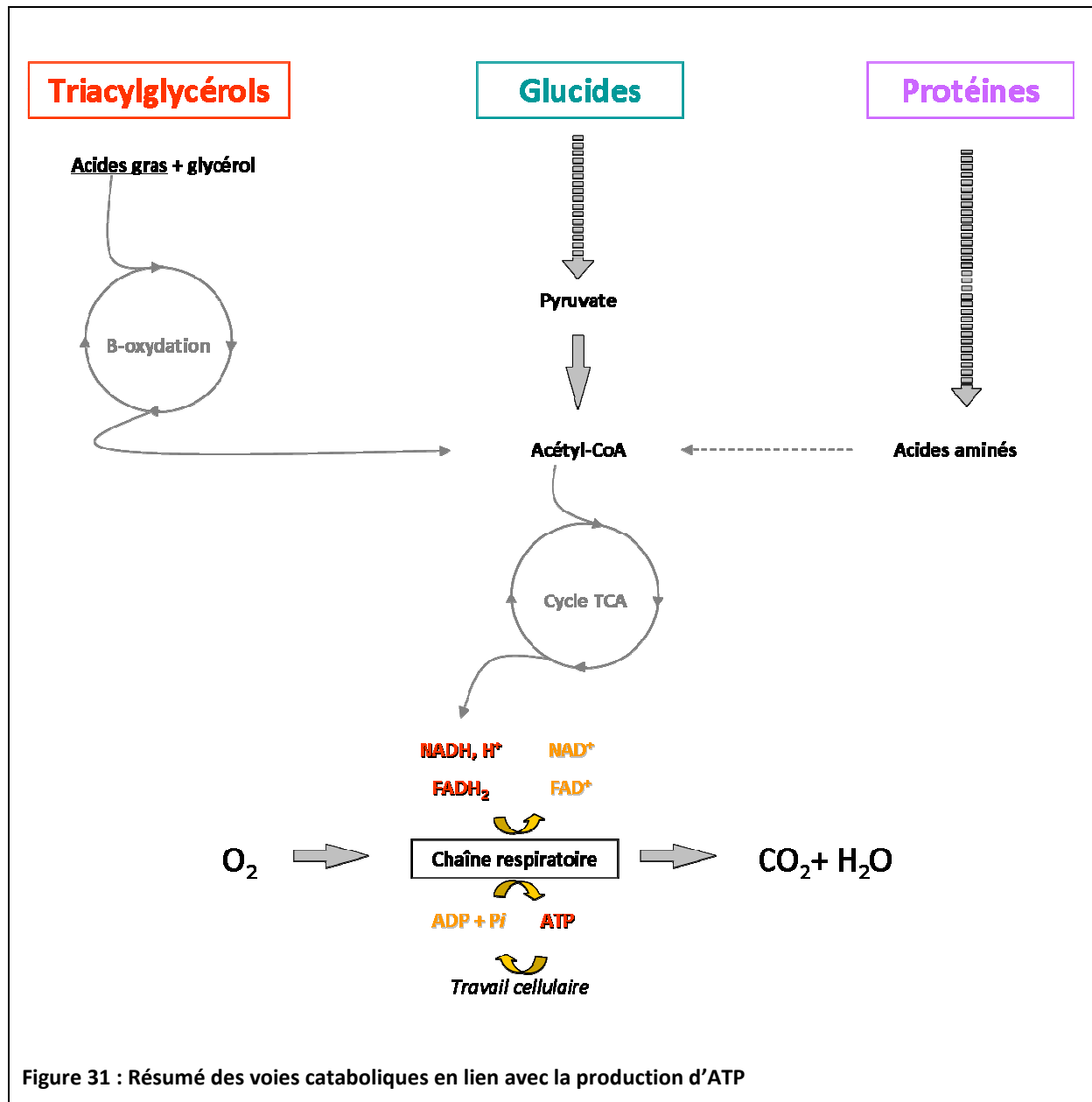
**Figure 30 : L'ATP synthase et son mécanisme d'action**

(A) L'ATP-synthase est constituée de deux parties principales:  $F_0$  au niveau de l'espace inter-membranaire et  $F_1$  au contact de la matrice mitochondriale.  $F_0$  est mobile dans le plan de la membrane, et peut tourner autour d'un axe constitué par certaines des sous-unités de  $F_1$ , (on parle de « rotor »). Par opposition,  $F_1$  est qualifiée de « stator », et comprend 3 sous-unités catalytiques ( $\beta$ ), 3 sous unités structurales ( $\alpha$ ), ainsi que d'autres sous-unités stabilisant le tout ( $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ ). La synthèse de l'ATP repose sur une conversion énergétique (l'énergie osmotique étant convertie en énergie mécanique), via des changements de conformation des sous-unités. Les protons suivent le gradient électrochimique établi par la chaîne respiratoire et traversent la membrane au niveau des rotors  $F_0$ , (seuls points de passage pour des ions). Ce flux de protons provoque la rotation de  $F_0$ , ce qui entraîne des changements de conformation des sous unités de  $F_1$ .

(B) Les sous-unités  $\beta$  connaissent trois conformations qui se succèdent : « lâche, serré, ouvert ». En conformation « lâche », le site actif a une grande affinité pour l'ADP et le phosphate inorganique, entraînant leur fixation. En conformation « serré », le site actif se resserre sur les substrats (provoquant mécaniquement la formation d'une liaison ester phosphorique entre l'ADP et le  $P_i$ ), ce qui les condense en ATP, pour lequel il a une très grande affinité. La conformation « ouvert », correspond à une détente du site actif, induisant une moindre compatibilité tridimensionnelle avec l'ATP, et permet sa libération dans la matrice mitochondriale.

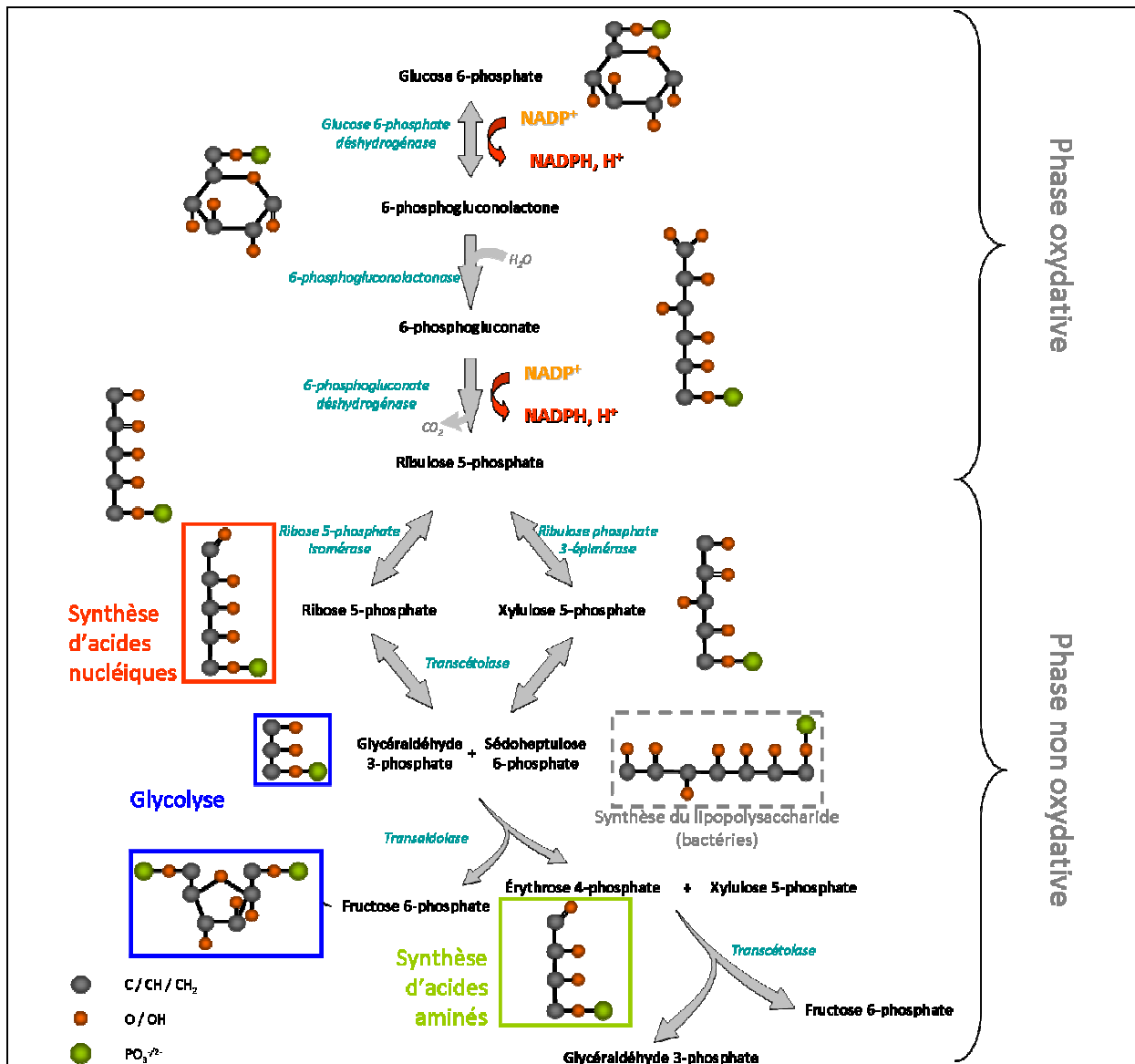
Concernant la production d'ATP, la respiration augmente considérablement le bilan des diverses voies métaboliques, grâce à la convergence de ces voies sur le cycle TCA, principale voie d'entrée à la respiration mitochondriale (Fig. 31). Ainsi en reprenant les diverses étapes depuis la glycolyse (2 NADH,  $H^+$ ), la décarboxylation oxydative du pyruvate (2 NADH,  $H^+$ ) et le cycle des TCA (6 NADH,  $H^+$ , 2  $CoQH_2$  et 2 GTP produits par phosphorylation directe), la chaîne respiratoire permet la synthèse de 36 à 38 ATP par molécule de glucose

(le bilan dépendant de la navette utilisée pour transporter le  $\text{NAD}^+$  de la glycolyse) au lieu du bilan de 2 ATP nets pour le bilan de la glycolyse seule.



Les molécules d'ATP produites par l'ATP-synthase se retrouvent donc dans la matrice mitochondriale, tandis que les principaux besoins en ATP sont dans le cytoplasme et le noyau. Elles empruntent alors un anti-port (ANT1 ou ANT3), protéine leur permettant de passer dans le sens « matrice mitochondriale » → « espace inter-membranaire » → « cytosol » (l'ADP passant dans le sens inverse). La différence de potentiel créée en partie par le gradient de protons accélère de 30 fois le transport de l'ATP par rapport à l'ADP.

## 7. La voie des pentoses phosphates



**Figure 32 : La voie des pentoses phosphates**

Cette voie de métabolisme du glucose démarre après la phosphorylation de celui-ci en glucose 6-phosphate par l'hexokinase et permet la synthèse de nombreux intermédiaires métaboliques précurseurs de voies anaboliques (synthèse d'acides nucléiques et d'acides aminés aromatiques notamment). Contrairement à la glycolyse, la voie des pentoses phosphates ne produit pas d'ATP (ni de métabolites pouvant entrer dans le cycle des TCA) et seulement deux cofacteurs réduits (dans la phase dite « oxydative »). Son rôle premier n'est pas la production d'ATP mais la synthèse de constituants cellulaires. Par ailleurs, les produits finaux de cette voie métaboliques, le fructose et le glycéraldéhyde, peuvent réintégrer la glycolyse et participer à la production d'ATP.

L'enchaînement des voies métaboliques (glycolyse ou  $\beta$ -oxydation, décarboxylation oxydative du pyruvate, cycle des TCA et respiration aérobie) permet une production d'ATP très rentable mais au final, la molécule de glucose est dégradée en  $\text{CO}_2$  Et  $\text{H}_2\text{O}$ . La voie des

pentoses phosphates (Fig. 32), qui débute juste après la première étape de la glycolyse (phosphorylation du glucose en glucose 6-phosphate) produit des intermédiaires de voies anaboliques, précurseurs de la synthèse d'acides aminés ou d'acides nucléiques dont peuvent avoir besoin les cellules pour leur entretien ou leur prolifération. Si cette voie permet d'initier la biosynthèse de constituants cellulaires, ses produits finaux peuvent tout de même rejoindre la glycolyse pour y être métabolisés et produire de l'énergie.

En résumé, les cellules différenciées, en présence d'oxygène, métabolisent le glucose principalement en  $\text{CO}_2$  via l'oxydation du pyruvate (issu de la glycolyse) par le cycle mitochondrial de l'acide tricarboxylique (TCA). Cette réaction produit du NADH qui alimente la phosphorylation oxydative pour augmenter la production d'ATP, avec un minimum de production de lactate. Ce n'est qu'en conditions anaérobies, où la respiration ne peut avoir lieu faute d'accepteur final, que les cellules différenciées produisent de grandes quantités de lactate.

### III. Cancer et métabolisme

#### A. Le métabolisme du glucose des cellules cancéreuses

##### *1. La glycolyse aérobie ou effet Warburg*

Warburg a le premier observé que les cellules cancéreuses, au contraire des cellules différenciées, produisent de grandes quantités de lactate, indépendamment de la disponibilité en oxygène (Warburg, 1953). On parle alors de « glycolyse aérobie » concernant leur métabolisme et d'« effet Warburg » pour décrire la bascule entre la phosphorylation oxydative et cette glycolyse aérobie. La production d'ATP par la glycolyse aérobie apparaissant beaucoup moins efficace que par la phosphorylation oxydative (Fig. 33), Warburg a dans un premier temps conclu à des dysfonctionnements mitochondriaux des cellules cancéreuses altérant la respiration aérobie, rendant ainsi ces dernières très dépendantes de la glycolyse. Cependant, d'importants travaux ont montré que la fonction mitochondriale n'est pas altérée dans la plupart des cancers. Par ailleurs, les cellules

embryonnaires lorsqu'elles ne sont pas encore différenciées et ne font que proliférer, adoptent également ce type de métabolisme. Il doit donc exister une autre explication à ce changement de métabolisme dans les cellules cancéreuses, rejoignant les observations faites sur la transition épithélio-mésenchymateuse et la réactivation de voies de signalisation embryonnaires.

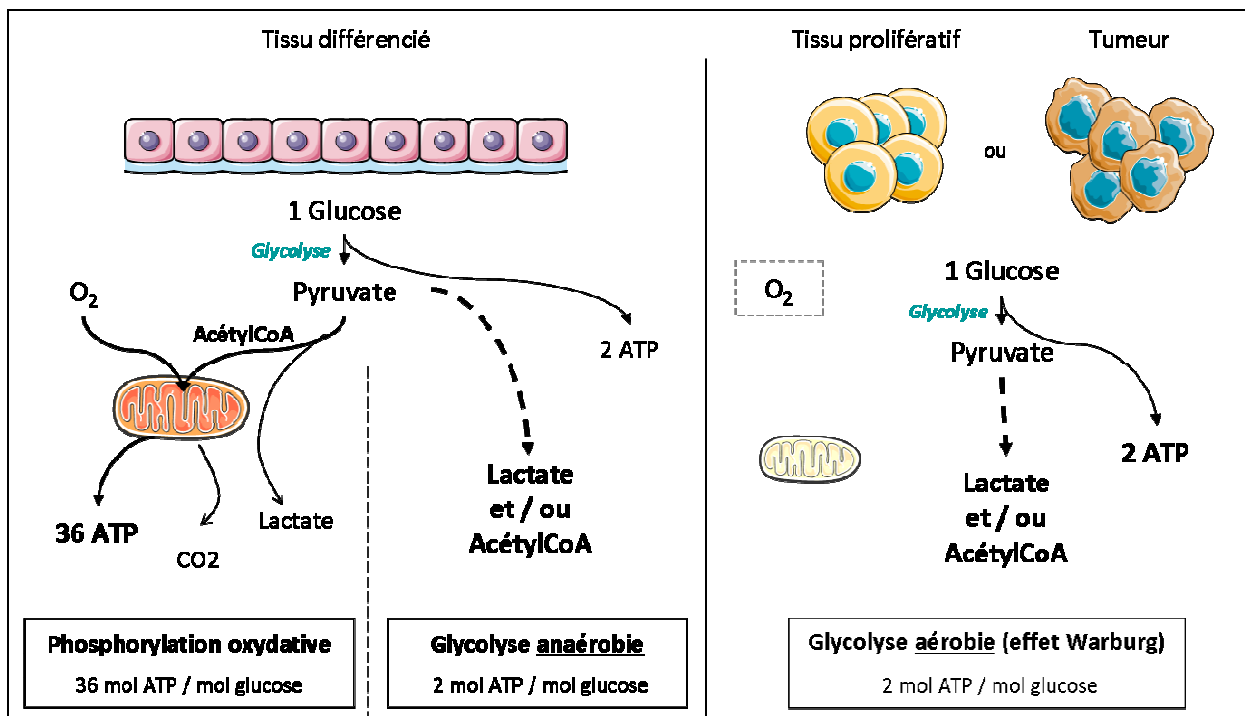


Figure 33 : Récapitulatif du métabolisme du glucose des différents types de cellules

La glycolyse du glucose en lactate produit seulement 2 ATP alors que la phosphorylation oxydative permet d'en obtenir jusqu'à 36 par molécule de glucose. La question de savoir pourquoi l'évolution a privilégié chez les cellules en prolifération un mécanisme aussi peu rentable du strict point de vue énergétique est donc tout à fait pertinente.

## 2. Prélever plus pour consommer plus

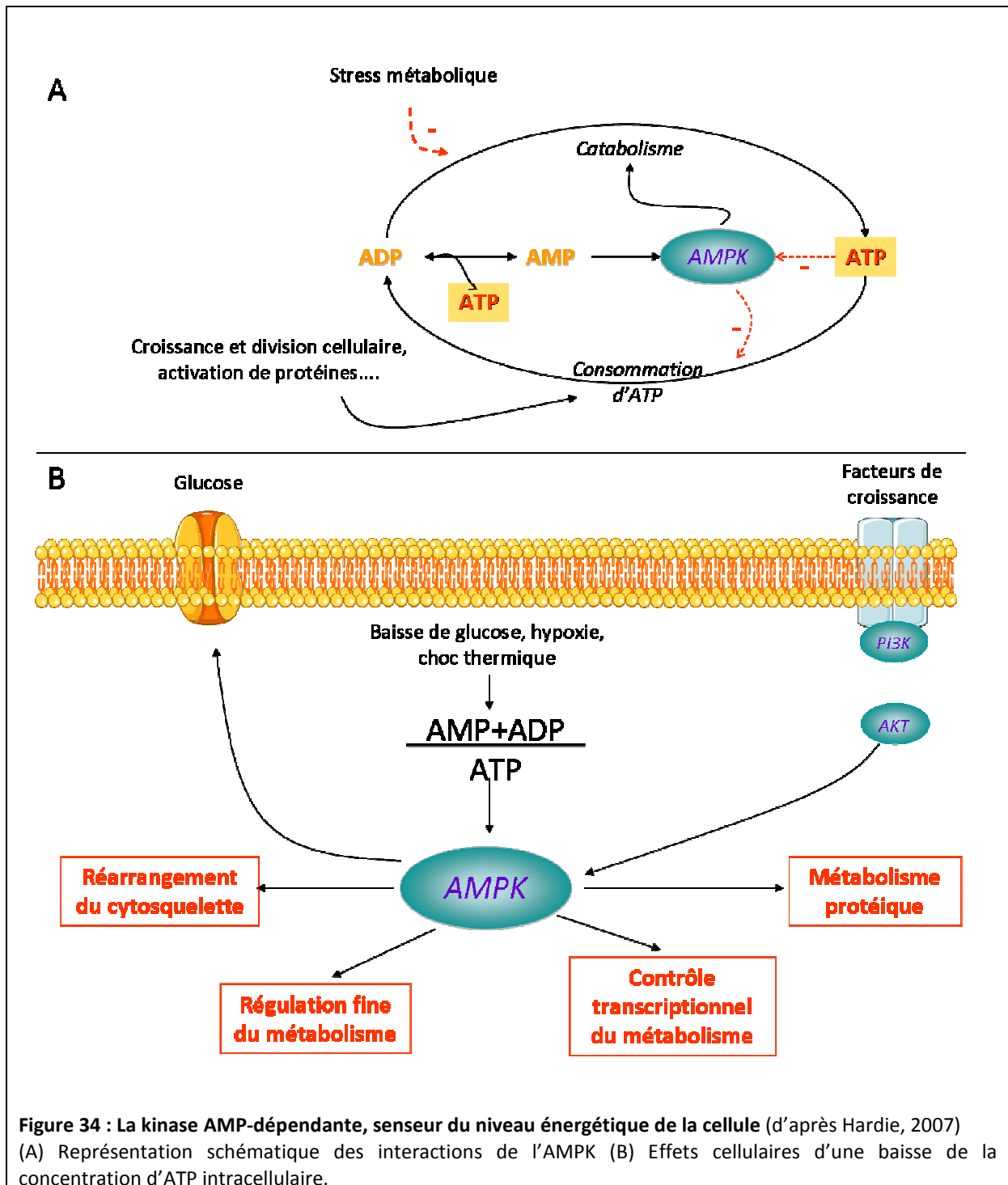
Tout d'abord, le problème de rentabilité énergétique ne se pose que quand les ressources sont rares. La cellule peut tout simplement compenser un rendement faible par un prélèvement de nutriments plus important, ce qui est possible pour les cellules connectées à la circulation sanguine. De plus, le fait que les organismes unicellulaires utilisent préférentiellement la fermentation (analogue de la glycolyse aérobie chez les cellules cancéreuses) quand ils sont en phase de croissance indique que ce type de métabolisme fournit l'énergie nécessaire aux cellules pour proliférer (Vander Heiden, Cantley et

Thompson, 2009). En effet, pour les êtres unicellulaires, il existe une pression évolutive à se reproduire le plus vite possible quand des nutriments sont disponibles. Leurs systèmes de contrôle métabolique ont évolué dans le sens d'un apport adapté entre les nutriments et les voies qui nécessitent du carbone, de l'azote, et de l'énergie permettant de fabriquer les intermédiaires nécessaires à la production d'une nouvelle cellule. Quand les nutriments viennent à manquer, les cellules stoppent leur reproduction et adaptent leur métabolisme pour tirer parti de la totalité des nutriments disponibles et survivre à cette période de jeûne. Ainsi, en reflet à ces contraintes ancestrales, différents mécanismes de régulation ont évolué pour contrôler le métabolisme des cellules en prolifération ou non.

Dans les organismes pluricellulaires, la plupart des cellules sont régulièrement approvisionnées en nutriments. Le bon fonctionnement et la survie des organismes nécessitent alors des systèmes de contrôle prévenant la prolifération aberrante de cellules individuelles quand la quantité de nutriments disponible le permettrait. Chez les mammifères, ce contrôle de la prolifération « abusive » se fait grâce aux facteurs de croissance, dont la présence indique aux cellules qu'elles peuvent utiliser les nutriments disponibles pour leur croissance. Les cellules cancéreuses dépassent cette dépendance aux facteurs de croissance en acquérant par exemple des mutations génétiques qui altèrent dans leurs fonctions les voies de signalisation initiées par leurs récepteurs.

De récentes études sur les voies métaboliques et leurs régulations dans des cellules en prolifération ont montré que l'ATP ne se trouve pas en quantité limitante dans ces cellules, ce qui va dans le sens d'une compensation du rendement par une prise exacerbée de « carburant ». Les cellules utilisant préférentiellement la glycolyse aérobie présentent de bons ratios ATP/ADP et NADH/ NAD<sup>+</sup>, suggérant que l'arrêt de la respiration ne les affecte pas (DeBerardinis et *al.*, 2008). De plus, certaines protéines comme UCP (un découplant mitochondrial) qui facilite le transport de protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, ou ATP1F1 (facteur d'inhibition de l'ATP synthase) bloquant l'activité ATP hydrolase de la synthèse d'ATP en d'ischémie, sont surexprimées dans certains cancers, suggérant que la production d'ATP ne s'effectue pas prioritairement *via* la chaîne respiratoire pour la cellule tumorale (Willers and Cuezva, 2011 ; Sanchez-Cenizo et *al.*, 2010).

Il existe également des voies sensibles au statut énergétique des cellules. L'accumulation d'AMP, par exemple, active l'AMPK (kinase sensible à l'accumulation d'AMP) (Fig. 34).



Cette activation est dépendante de la protéine sérine-thréonine kinase (STK11 plus connue comme LKB1) et aboutit à la phosphorylation de plusieurs cibles pour corriger la charge énergétique dans les cellules (Hardie, 2007). LKB1 a d'abord été identifiée comme suppresseur de tumeurs, indiquant que la capacité à évaluer le stress énergétique pourrait être un point de contrôle important prévenant la transformation dans certains types cellulaires. De plus, des adénylates kinases peuvent tamponner le déclin de la production d'ATP en convertissant deux ADP en un ATP et un AMP, permettant ainsi de conserver un taux ATP/ADP viable.

### *3. Un métabolisme adapté à la croissance et la prolifération cellulaire*

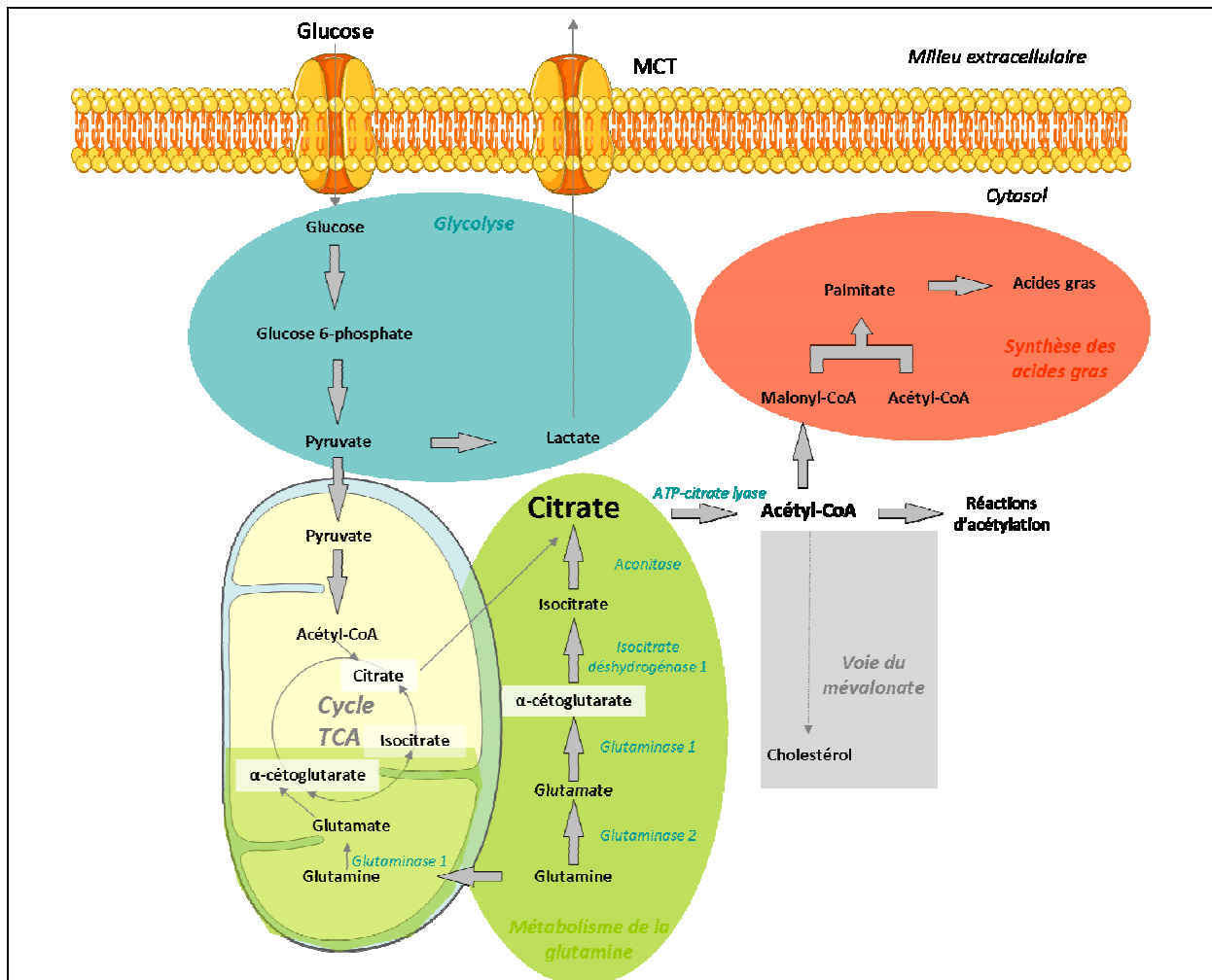
La deuxième explication concernant le changement métabolique vers la glycolyse aérobie serait que les cellules prolifératives ont des besoins accrus en métabolites pour accompagner la croissance cellulaire. Ainsi, pour produire deux cellules filles après une mitose, une cellule qui prolifère doit répliquer tout son contenu cellulaire. Cela implique de grands besoins en nucléotides, acides aminés et lipides. Pendant la croissance, le glucose est utilisé pour générer de la biomasse autant que pour produire de l'ATP. Bien que certaines réactions biochimiques en jeu dans la réplication du matériel cellulaire nécessitent de l'ATP, ces réactions ont également besoin d'autres substrats. Par exemple, la production de palmitate, constituant majeur des membranes cellulaires, nécessite 7 molécules d'ATP, 8 molécules d'acétyl-CoA et 14 molécules de NADPH.

Une molécule de glucose peut générer 36 ATP via la phosphorylation oxydative, ou 30 ATP et 2 NADPH s'il est dévié par le cycle des pentoses phosphates, mais représente 6 carbones disponibles pour la synthèse de macromolécules. Ainsi, une molécule de glucose peut fournir *via* la respiration cinq fois la quantité d'ATP requise pour synthétiser une chaîne d'acide gras à 16 carbones, alors que 7 molécules de glucose sont nécessaires pour produire par la glycolyse et le cycle TCA la quantité de NADPH nécessaire à cette même synthèse. *In vitro*, les molécules les plus catabolisées par la plupart des cellules de mammifères sont le glucose et la glutamine, qui doivent donc fournir les carbones, azotes, NADPH et l'énergie libre nécessaires à la croissance et à la division cellulaire.





Sachant cela, il n'est pas envisageable qu'une cellule transforme le glucose uniquement en  $\text{CO}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}$  via la phosphorylation oxydative dans le seul but d'optimiser la production d'ATP. Du glucose doit donc être converti en précurseurs de macromolécules comme l'acétyl-CoA pour les acides gras, des intermédiaires de glycolyse pour les acides aminés non essentiels et en ribose pour les nucléotides. Ainsi, les enzymes glycolytiques sont surexprimées dans les cellules cancéreuses et les adaptations qui en résultent (Fig. 35) orientent le métabolisme vers la synthèse de constituants cellulaires. L'arrêt de la respiration peut alors expliquer au moins en partie l'avantage apporté aux cellules par l'effet Warburg.



**Figure 36 : Convergence de la glycolyse et du métabolisme de la glutamine favorisant la synthèse d'acides gras (d'après Zaidi et al., 2012)**

Le citrate et l'acétyl-CoA sont des métabolites clé provenant du métabolisme du glucose et de la glutamine. L'ATP-citrate Lyase est une enzyme orientant le métabolisme des cellules cancéreuses vers l'anabolisme. L'acétyl-CoA permet également la synthèse, via la voie du mévalonate, de produire du cholestérol, un autre constituant des membranes cellulaires.

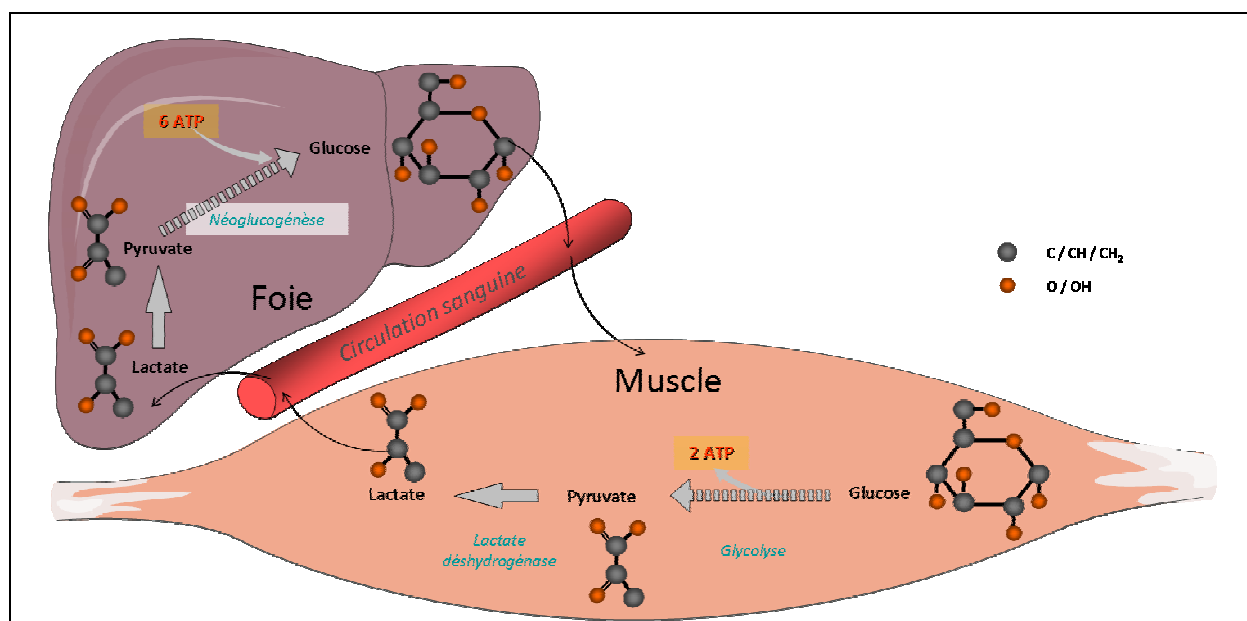
La majorité des carbones des acides gras provient du glucose. Celui-ci est en premier lieu transformé en acétyl-CoA dans la matrice mitochondriale et utilisé pour synthétiser du citrate via le cycle TCA, qui est excrété vers le cytosol où sont synthétisés les lipides. Dans le cytosol, l'acétyl-CoA est recapturé à partir du citrate par l'ATP-citrate Lyase (ACL) et utilisé comme source de carbone. Le métabolisme de la glutamine apparaît également très important pour la synthèse de lipides, dans le sens où elle fournit du carbone pour maintenir la production de citrate qui peut entrer dans le cycle TCA ou à son tour être utilisé pour récupérer de l'acétyl-CoA dans le cytoplasme. Ainsi, le métabolisme du glucose et de la glutamine est prévu pour alimenter la production d'Acétyl-CoA et de NADPH nécessaires à la synthèse d'acides gras (Fig. 36).

#### *4. Le lactate, déchet abondant ou allié des tumeurs ?*

La production excessive de lactate qui accompagne l'effet Warburg pourrait apparaître comme un gaspillage de ressources cellulaires. Chaque lactate excrété de la cellule représente 3 carbones qui pourraient être utilisés pour la production d'ATP ou comme précurseurs pour la biosynthèse de macromolécules. Cependant, il est possible que la perte de ces carbones sous forme de lactate soit tout de même efficace car la glycolyse aérobie permet une accumulation plus rapide du carbone dans la biomasse, ce qui accélérerait la division cellulaire.

Pour la plupart des cellules prolifératives, les nutriments ne sont pas en quantité limitante, il n'y a donc pas d'avantage supplémentaire à optimiser le métabolisme pour obtenir de meilleurs taux d'ATP. Au contraire, il y a un net avantage concernant la rapidité de ce métabolisme. La réponse immunitaire et la cicatrisation par exemple, dépendent de la vitesse de prolifération des cellules effectrices. Pour survivre, l'organisme doit inciter les cellules qui répondent à maximiser leur croissance anabolique. Les cellules qui convertissent le glucose et la glutamine en biomasse plus efficacement vont croître plus vite. Pour l'organisme, les nutriments peuvent se tarir mais il existe des voies métaboliques activées dans des tissus spécialisés, non proliférant, capables de recycler le lactate et l'alanine excédentaires rejetés par les cellules prolifératives.

Le cycle de Cori (Fig. 37), dans le foie, peut recycler le lactate et des voies analogues existent pour recycler l'alanine générée par le métabolisme « non rentable » de la glutamine. Cependant, le cycle de Cori nécessitant l'apport de 6 ATP pour produire une molécule de glucose (à mettre en balance avec les 2 ATP fournis par la glycolyse), le recyclage du lactate par ce cycle pourrait être en partie responsable de la cachexie observée chez les patients atteints de cancers à un stade avancé (Inui, 2002), cachexie qui affaiblit le système immunitaire de l'organisme et notamment sa réponse anti-tumorale. De plus, il existe certaines preuves indiquant que le métabolisme à l'intérieur même d'une tumeur est hétérogène, avec certaines cellules utilisant le lactate excédentaire comme carburant pour leur propre phosphorylation oxydative (Sonveaux et *al.*, 2008).



**Figure 37 : Le cycle de Cori**

Les besoins en glucose des cellules prolifératives ou tumorales sont beaucoup plus importants que ceux des cellules différenciées en présence d'oxygène, besoins compensés dans un cas comme dans l'autre par un prélèvement de glucose plus important dans le milieu extracellulaire.

Par ailleurs, la sécrétion de lactate dans le milieu extracellulaire acidifie celui-ci et pourrait favoriser la migration des cellules cancéreuses en détériorant la matrice extracellulaire et en stimulant la formation de point d'adhésion focaux (Stock et *al.*, 2005).

## B. Croisement des voies métaboliques et de la tumorigénèse

Nous avons vu précédemment que les cellules cancéreuses ne subissent pas l'effet Warburg mais au contraire adaptent leur métabolisme pour optimiser leur croissance et leur prolifération. Certaines voies de signalisation métaboliques sont croisées avec la signalisation tumorale, ce qui implique que métabolisme et tumorigénèse peuvent être intimement liés.

### 1. La voie PI3 kinase

La voie de signalisation de la Phosphoinositide 3 kinase (PI3K) est liée à la fois au contrôle de la croissance cellulaire et au métabolisme du glucose. En plus d'un rôle bien décrit dans l'aiguillage des acides aminés vers la synthèse des protéines via mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), la voie PI-3K régule la prise de glucose et son utilisation. Même dans les tissus insulino-indépendants, la signalisation PI3K via AKT (Ak transforming) peut réguler l'expression du transporteur de glucose, favoriser le capture du glucose par l'hexokinase et stimuler l'activité de la phosphofructokinase (Fig. 38). L'activation de la voie PI3K rend les cellules dépendantes de flux de glucose élevés. De petites molécules perturbant la signalisation PI3K conduisent à une baisse de la prise de glucose par les tumeurs mesurée par FDG PET ( $^{18}\text{F}$ -déoxyglucose tomographie par émission de positron, une méthode d'imagerie médicale permettant de mesurer en trois dimensions l'activité métabolique d'un organe grâce aux émissions produites par la désintégration d'un élément radioactif préalablement injecté, ici le  $^{18}\text{F}$ -déoxyglucose) et la capacité à inhiber la prise de FDG par les tumeurs est corrélée à une régression des tumeurs (Engelman et *al.*, 2008).

### 2. Les enzymes métaboliques

Il y a un nombre croissant d'études indiquant une contribution directe des enzymes métaboliques à la carcinogénèse. Des mutations des enzymes impliquées dans le TCA comme la succinate déshydrogénase et la fumarate hydratase ont été identifiées dans certaines formes de cancers du rein, des paragangliomes et des phéochromocytomes (Baysal et *al.*, 2000 ; Pollard, Wortham et Tomlinson IP, 2003). Un des effets connu de ces mutations

est l'activation de HIF1 $\alpha$  (Selak et *al.*, 2005), stimulant par exemple la néoangiogénèse, l'expression des enzymes de la glycolyse ou la formation de lactate à partir du pyruvate.

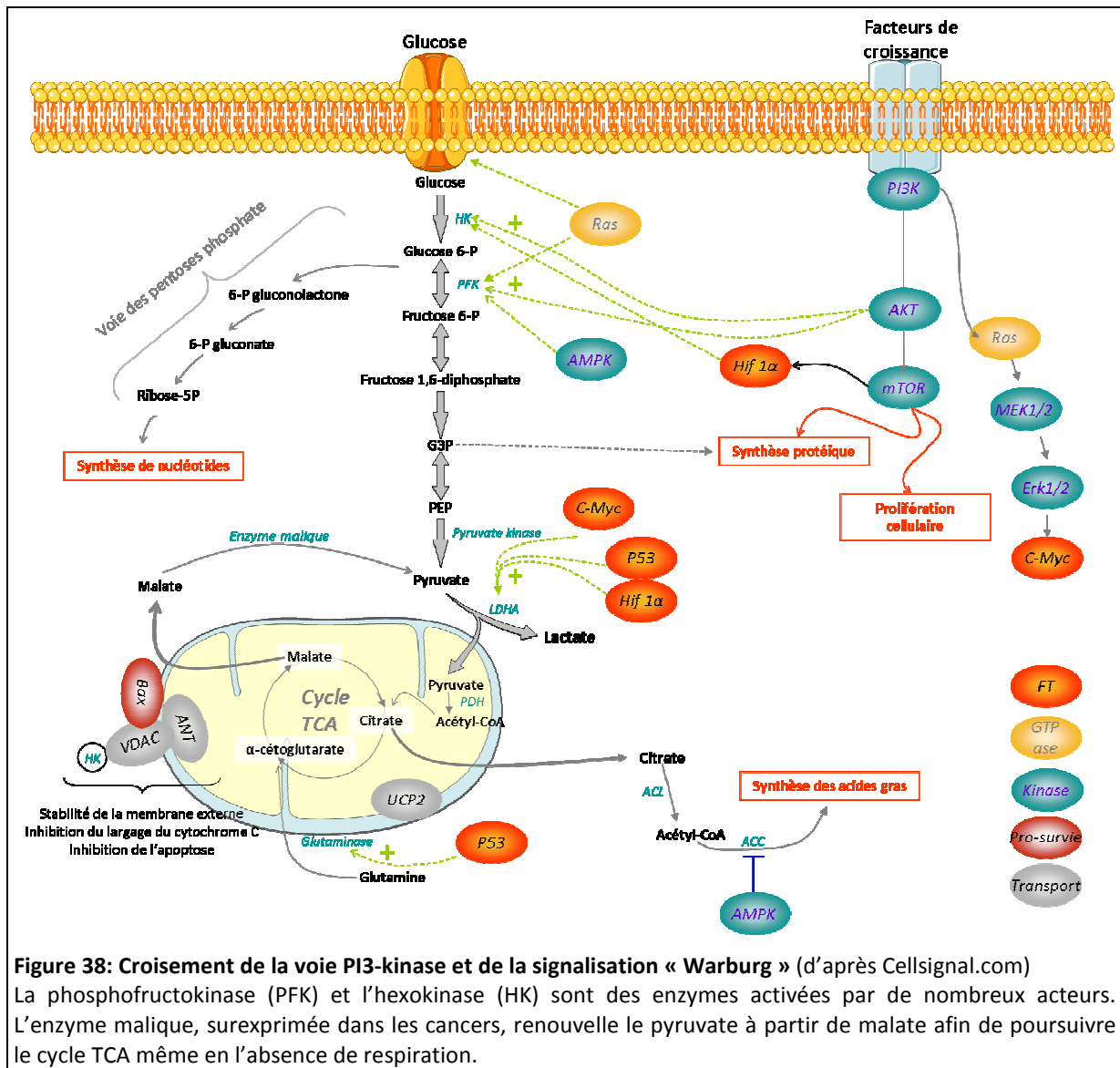


Figure 38: Croisement de la voie PI3-kinase et de la signalisation « Warburg » (d'après Cellsignal.com)

La phosphofructokinase (PFK) et l'hexokinase (HK) sont des enzymes activées par de nombreux acteurs. L'enzyme malique, surexprimée dans les cancers, renouvelle le pyruvate à partir de malate afin de poursuivre le cycle TCA même en l'absence de respiration.

### 3. Les tyrosine-kinases

De nombreux oncogènes sont des tyrosine-kinases. Une des particularités de la signalisation des tyrosine-kinases associée à la prolifération cellulaire est la régulation du métabolisme du glucose. Contrairement aux cellules différenciées, les cellules prolifératives exprimeraient sélectivement l'isoforme M2 de la pyruvate kinase (PK-M2, enzyme de la glycolyse), qui serait nécessaire à la prolifération *in vivo* (Christofk et *al.*, 2008). Cette vision est critiquée

par l'équipe de Ralser qui avance qu'il n'existe pas de preuve réelle de la balance entre PKM1 et PKM2 pendant la tumorigénèse (Bluemlein et *al.*, 2011).

#### 4. Glutamine et Myc

Les cellules tumorales humaines dont la croissance est déterminée par l'oncogène *Myc* sont particulièrement sensibles au retrait de glutamine (Yuneva et *al.*, 2007). De plus, les gènes impliqués dans le métabolisme de la glutamine sont sous le contrôle direct et indirect de la protéine *Myc* (Wise et *al.*, 2008 ; Gao et *al.*, 2009). La déplétion en glutamine des cellules transformées par *Myc* provoque une perte rapide des intermédiaires du cycle TCA et la mort cellulaire (Yuneva et *al.*, 2007). Par ailleurs, la dépendance à la glutamine pour la survie n'est pas liée à la génération d'ATP par le métabolisme de la glutamine.

#### 5. P53

Les voies des suppresseurs de tumeur peuvent également réguler le métabolisme cellulaire et peuvent coordonner l'utilisation de nutriments avec la physiologie cellulaire. Par exemple, l'expression de P53 contrôle certains gènes métaboliques et altère l'utilisation du glucose. L'expression de *TIGAR*, un gène induit par P53 conduit à l'inhibition de la phosphofructokinase, ce qui redirige le glucose vers le cycle des pentoses phosphates et la production de NADPH (Bensaad et *al.*, 2006).

### C. Glycolyse aérobie et hypoxie

Certains chercheurs expliquent les observations de Warburg par le fait que l'hypoxie dans les tumeurs sélectionnerait les cellules dépendantes d'un métabolisme anaérobie (Gatenby et Gillies, 2004). Cependant, les cellules cancéreuses utilisent le métabolisme glycolytique avant d'être en conditions hypoxiques. Par exemple, les cellules leucémiques sont hautement glycolytiques (Gottschalk et *al.*, 2004 ; Elstrom et *al.*, 2004) alors que ces cellules sont dans la circulation sanguine à des pressions en oxygène supérieures à la plupart des tissus normaux. De la même manière, les tumeurs du poumon survenant dans les voies aériennes font de la

glycolyse aérobie alors même que ces tumeurs sont exposées à l'oxygène lors de la tumorigénèse (Elstrom et *al.*, 2004). Ainsi, bien que l'environnement hypoxique des tumeurs soit clairement important pour d'autres aspects de la cancérologie, de nombreuses preuves suggèrent que cet évènement arrive tardivement dans la tumorigénèse et ne peut contribuer de manière majeure au changement de la phosphorylation oxydative à la glycolyse aérobie par les cellules cancéreuses. Il existe d'ailleurs des cancers où la glycolyse est favorisée par la surexpression de HIF1 $\alpha$  et d'autre où cette suractivation de la glycolyse se fait indépendamment de ce facteur.

La vision classique du métabolisme est celle d'un système homéostatique où un jeu d'enzymes permet à la cellule de répondre aux changements des besoins bioénergétiques. Cependant, il serait plus judicieux d'envisager un système régulé de manière dynamique programmé pour convenir aux besoins pour la prolifération cellulaire ou approprié à la fonction de chaque tissu différencié. Pour un tissu prolifératif comme l'embryon en développement ou durant la réponse immunitaire chez l'adulte, des signaux transmis par des facteurs de croissance autorisent les cellules à utiliser les nutriments pour la croissance (Elstrom et *al.*, 2004 ; Kondoh et *al.*, 2007). Il est alors envisageable qu'une fonction des voies des oncogènes serait de mener la prise de nutriments de manière non régulée par la cellule et un métabolisme tourné vers un programme prolifératif, tandis qu'une fonction des voies des suppresseurs de tumeurs serait de limiter cette utilisation de nutriments pour les processus anaboliques.

Pour résumer, l'effet Warburg qui se produit dans les cellules cancéreuses, bien qu'à première vue contre-productif, peut avoir plusieurs effets bénéfiques du point de vue de la progression tumorale :

- La glycolyse aérobie rend les cellules moins sensibles à une hypoxie, qui intervient au cœur de la tumeur quand celle-ci grandit trop vite par rapport à la néo-vascularisation,
- Les nutriments sont métabolisés de manière à produire plus de constituants cellulaires au lieu d'augmenter les stocks d'énergie dans la cellule (sous forme de glycogène ou inclusions lipidiques par exemple),
- Le lactate sécrété peut acidifier le milieu extracellulaire et faciliter la migration cellulaire,



- Le prélèvement massif de nutriments par les cellules tumorales peut priver les cellules saines alentours (avec notamment un phénomène de cachexie lié aux cancers), affaiblissant l'organisme et ses défenses immunitaires (dont les défenses anti-tumorales).

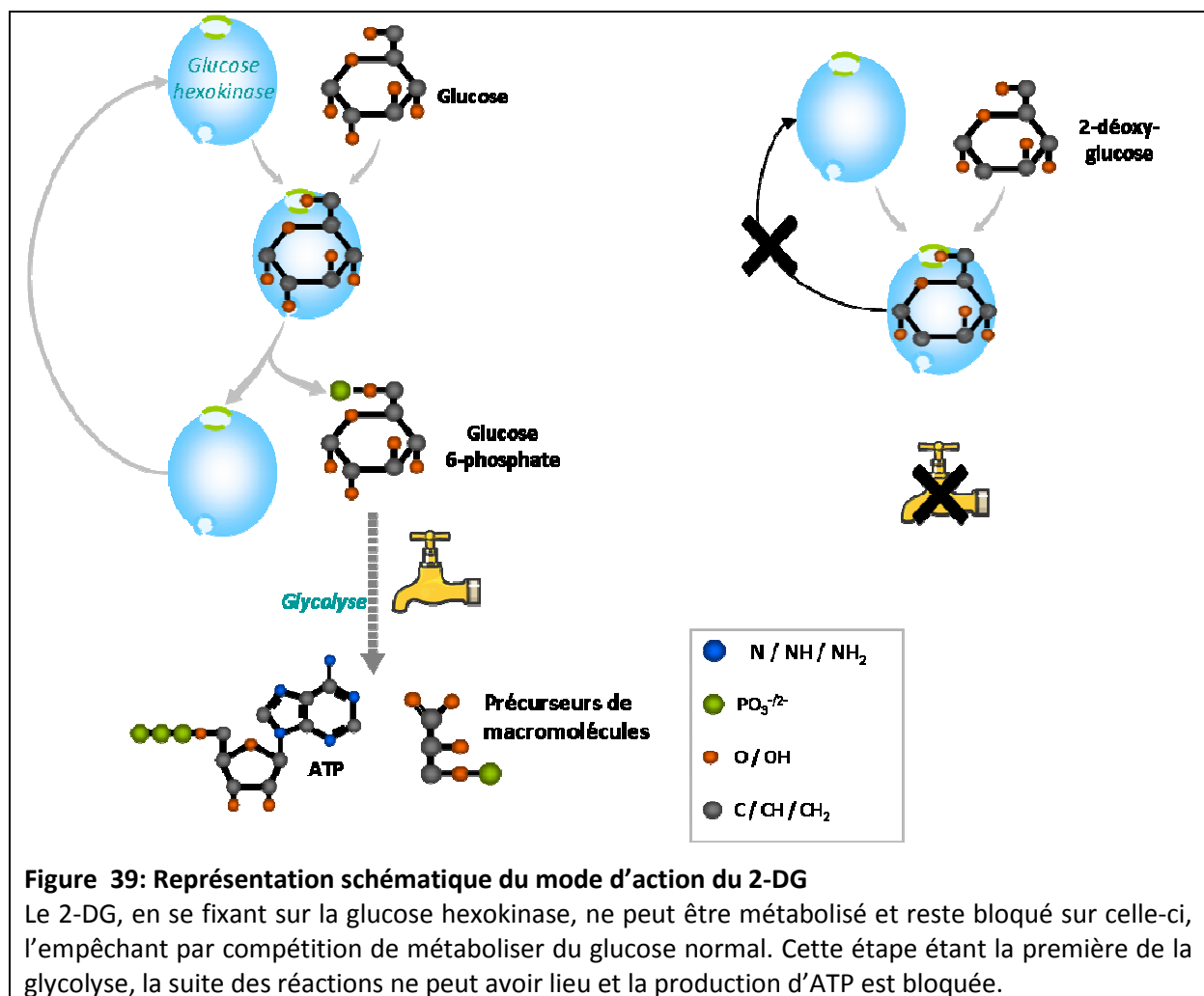
## D. Effet Warburg et thérapie

La très forte dépendance des cellules cancéreuses pour le glucose peut être exploitée pour les cibler en thérapie. En effet, lorsque les besoins bioénergétiques des cellules cancéreuses ne sont pas satisfaits, elles peuvent subir l'autophagie voire la mort cellulaire. Ainsi, les régulateurs du métabolisme et les enzymes clé de l'approvisionnement énergétique pourraient être une cible thérapeutique (Tennant et *al.*, 2010).

Par exemple, une grande fraction des cancers humains est dépendante de signalisations aberrantes via la voie PI3K/Akt, et les agents qui ciblent la PI3K et diverses molécules de signalisation en aval sont en essais cliniques. Les preuves croissantes que l'activation de PI3K augmente la dépendance des cellules à la glycolyse suggère que ces agents pourraient exercer certains de leurs effets en perturbant le métabolisme du glucose. Les médicaments ciblant des contrôles clés du métabolisme importants pour la glycolyse aérobie, comme la pyruvate kinase, l'hexokinase (cible de HIF1 $\alpha$  et *Myc*), ou la lactate déshydrogénase pourraient également justifier leur étude en tant que thérapies anticancéreuses potentielles. L'isoforme PFK2B3 de la phosphofructokinase, qui produit le fructose 2,6-diphosphate, peut être inhibé par une petite molécule, le 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propenone (3PO), qui diminue la glycolyse *in vitro* et la croissance des xénogreffes tumorale *in vivo* (Clem et *al.*, 2008).

De plus, les médicaments développés pour cibler des maladies métaboliques comme le diabète de type II pourraient être utilisés dans une stratégie anti-tumorale. De nombreuses études cliniques rétrospectives ont trouvé que la metformine (médicament largement utilisé contre le diabète) offrait de possibles bénéfices dans la prévention des cancers et donnaient aussi de bons résultats en traitement anticancéreux (Evans et *al.*, 2005). La metformine et la phenformine (un composé voisin plus puissant) activent l'AMPK dans les cellules, suggérant que la phenformine ou d'autres activateurs d'AMPK pourraient aussi être utilisés comme compléments dans les thérapies anti-tumorales. Il sera nécessaire, pour une utilisation

optimale de ces médicaments de mieux comprendre le métabolisme des cellules cancéreuses et d'identifier les voies de signalisation qui représentent le tendon d'Achille pour la prolifération cellulaire et la survie. Par ailleurs, certaines équipes cherchent à cibler spécifiquement le métabolisme de la glutamine, en ciblant l'isocitrate déshydrogénase (Reitman et Yan, 2010) ou la glutaminase (Wang et *al.*, 2010) pour prévenir la croissance des tumeurs ou provoquer leur mort. Enfin, le fait de couper « à la source » l'approvisionnement des cellules cancéreuses en glucose en utilisant un analogue non métabolisable de celui-ci, le 2-déoxyglucose (2-DG, Fig. 39) est également une piste étudiée dans la stratégie anti-tumorale (Ben Sahra et *al.*, 2010-a et -b).



La deuxième partie de mon travail de thèse porte sur les conséquences d'un traitement induisant une baisse des ressources énergétiques, et notamment de l'ATP, *via* justement le 2-DG

## IV. Les effets oncogéniques d'une privation de glucose.

En 1956, Otto Warburg a émis l'hypothèse que les cancers pouvaient être causés par une reprogrammation du métabolisme énergétique, consistant en une diminution de la part de la phosphorylation oxydative mitochondriale et en une augmentation de la part de la glycolyse cytoplasmique. Cette théorie a été redécouverte récemment et appelée l'Effet Warburg. La bascule énergétique et ses conséquences comme l'acidification du milieu environnant ont un rôle crucial pour le développement tumoral. Dans cette étude, nous montrons qu'il existe également des interactions auto-stabilisantes entre le phénotype malin et l'effet Warburg. En effet, d'un côté la concentration en ATP est plus sensible à la privation de nutriments dans les cellules malignes et d'un autre côté, un faible niveau d'ATP provoque des changements cellulaires morphologiques et génétiques favorisant la malignité. Ces changements évoquent les phénotypes mésenchymateux et migratoires, et impliquent les voies de signalisation liées à l'actine, comme la voie du co-facteur MKL1. Ensemble, nos résultats suggèrent que l'effet Warburg est à la fois une conséquence et une cause de phénotype malin, justifiant les inquiétudes actuelles à propos de la pertinence des stratégies anti-tumorales basées sur la famine et l'asphyxie des tumeurs, qui pourraient être plus délétères que bénéfiques sur le long terme, après une phase trompeuse de régression.

→ Article 2 : « The oncogenic role of energy depletion »

# The oncogenic role of energy depletion

**Floriane Nicol-Benoit, Gilles Flouriot, Rémy Le Guével, Denis Michel, Pascale Le Goff**

Université de Rennes1. IRSET. Campus de Beaulieu Bat. 13/ 35042 Rennes cedex

## Abstract

The theory of Otto Warburg, recently rediscovered and called the Warburg effect (WE), is that the prime cause of cancer could be a reprogramming of the energetic metabolism from mitochondrial oxidative phosphorylation to cytoplasmic glycolysis. Beyond the web of interactions underlying this phenomenon, this energetic switch and its by-products, such as the acidification of the surrounding medium, have been shown crucial for tumor development. In this study we show that in addition, self-stabilizing reciprocal relationships exist between the malignant phenotype and the WE. On the one hand, the ATP concentration is less resistant to nutrient deprivation in malignant cells and on the other hand, low ATP triggers morphological and genetic cellular changes reminiscent of mesenchymal and migratory phenotypes, involving the actin / MKL1 signalling pathway. Together, these results suggest that the WE is both a consequence and a cause of the malignant phenotype, substantiating the concerns recently raised about the rational of anti-cancer strategies based on tumor starvation and asphyxiation, which can be more deleterious than beneficial in the long term.

## Introduction

Epithelial to mesenchymal transition (EMT) is associated with changes in morphology, genetic and metabolism (such as aerobic glycolysis or use of glutamine as main carbon source) of cancerous cells. The change of energetic metabolism known as the Warburg effect (WE), has long been identified as an innermost hallmark of cancer cell (Warburg, 1956b). In this phenomenon, the slow and efficient mode of ATP production through oxidative phosphorylation in mitochondria (OXPHOS), is replaced by fast but inefficient glycolysis, followed by lactic acid fermentation in the cytosol. This metabolism is sometimes called aerobic fermentation (or glycolysis), because it remains predominant even when oxygen is plentiful. Cancer cells that underwent the WE should compensate the less efficient ATP production of glycolysis (yielding 2 ATP molecules from one glucose molecule, compared to 36 through oxydative phosphorylation), by an exacerbated uptake of circulating nutrients. The pumping of glucose from the medium by cancer cells has been exploited in medical imagery to detect the presence of cancer cells through the PET-scan technology (positron emission tomography), which confirmed the correlation between tumor growth and the rate of glucose consumption (Di Chiro et *al.*, 1987). ATP synthesis by mitochondria is cancelled in the WE in different manners, by inactivation of F1F0 ATP-synthase through either the synthesis of uncoupling proteins (UCP) (Willers and Cuezva, 2011) or of IF1 (Sanchez-Cenizo et *al.*, 2010). But contrary to the intuition of Warburg, the glycolytic switch does not necessarily result from mitochondrial damage, as early pointed by Weinhouse in the same journal issue that the founder article of Warburg (Weinhouse, 1956). Moreover, the transmembrane proton gradient used in normal circumstances by F1F0 ATP-synthase to make ATP, is maintained in the WE, due to interrupted proton flux (Sanchez-Cenizo et *al.*,

2010) or to the importation of protons in the mitochondria, thereby preserving the membrane potential ( $\Delta\psi$ ) and protecting WE cells from too intense apoptosis (Chevrollier et al., 2011). The WE emerges from a very complex network of molecular interactions, crossing several signalling pathways, of NF $\kappa$ B, Nrf, P53, Myc or HIF1- $\alpha$ . It involves key enzymes of metabolism and many other connected actors such as regulators of apoptosis, oncogenes, anti-oncogenes and micro-RNAs. As such, WE is an integral aspect of a most general cellular activity of dedifferentiation (Warburg, 1956a), to which the phenomenon of epithelial to mesenchymal transition (EMT) also relates. The entanglement between the WE and EMT is illustrated for example by the capacity of HIF1- $\alpha$  to induce the pivotal transcription factors of EMT, belonging to the ZEB, Twist and Snail families (Sánchez-Tilló et al., 2012). All these studies indicate that the cellular activities underlying the WE are not a pathological artefacts but correspond to the hijacking by cancer cells of normal cellular programs evolutionary selected for their role in other circumstances, such as during embryogenesis, wound healing or cell proliferation (Najafov and Alessi, 2010). The aim of the present study is to evaluate the phenotypic consequences of the WE without dissecting this complex system. Although the WE can appear paradoxical at first glance because it weakens energy production in cells expected to be very active, in fact, it confers a series of advantages to cancer cells: (i) It allows them to survive hypoxic conditions and thereby to colonize new, poorly vascularized body areas. (ii) WE reorients catabolism to supply the biomass synthesis necessary for cancer cell growth, in the form of proteins, membranes and nucleic acids. (iii) The acidification resulting from lactate accumulation has been shown to favor the migratory potential of cancer cells in two ways: in the cell, low pH stimulates the action of key enzymes, while after lactate export in the medium, low pH contributes to the dismantlement of the extracellular matrix (Stock et al., 2005), both enhancing the metastatic

capacity (Silva et al., 2009; Walenta and Mueller-Klieser, 2004). (iv) Finally, the takeover of circulating nutrients by cancer cells deprives surrounding healthy tissues, which can contribute to cachexia and weaken anti-cancer defences. In the present study, we show that the WE has additional deleterious consequences through potentially enhancing the tumoral grade. Inhibition of glucose metabolism with 2-deoxy-glucose (2-DG) is shown to have a greater impact on ATP level reduction in transformed cells. In turn, ATP decrease consolidates the malignant phenotype, with acquisition of star, F actin-rich phenotypes typical of aggressive cells. We identified the myocardin-related transcription factor A (MKL1), as a candidate actor for contributing to these effects, collectively favoring cancer progression.

## Materials and methods

### *Antibodies and reagents*

4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) and 2-deoxy-glucose (2-DG) were purchased from Sigma-Aldrich, Alexa Fluor<sup>®</sup> 594 Phalloidin and DNase1 Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Conjugated from Invitrogen, DAPI from Sigma-Aldrich.

Primary antibodies for immunofluorescence analysis used were :

Mouse monoclonal (Mm) antibody anti-vimentin (clone V9) acquired from Sigma-Aldrich, Mm antibody anti-PCNA from Dako, rabbit polyclonal (Rp) antibody anti-E-Cadherin (ab 15148) from Abcam, Rp anti-vinculin (Sc 5573) from Santa-Cruz.

Alexa Fluor<sup>®</sup> dye-conjugated secondary antibodies obtained from Invitrogen were used for immunofluorescence.

### *Cell culture and glucose deprivation*

MCF-7-DSMZ, MDA-MB231 and Mdck-ts-src cells were routinely cultured in Dulbecco's Modified eagle's Medium (DMEM 4,5 g/L glucose, Invitrogen) complemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma) and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen) at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C (MCF-7 and MDA-MB231) or 40°C (Mdck-ts-src).

MCF10A-ER-src cells were routinely cultured in DMEM F12 (Invitrogen) complemented with 5% dextran-treated charcoal stripped Horse Serum, 20 ng/mL of Epidermal Growth factor (EGF), 500 ng/mL of hydrocortisone, 100 ng/mL cholera toxin, 1X insulin-transferrin-selenium (Invitrogen) and 200 ng/mL puromycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. *Src* oncogene is induced by a 24h treatment with 1µM 4-OHT.

Before glucose depletion, cells were grown at 80% confluence in 6-wells plates. Then cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and treated for 2, 4, 8 or 24h with DMEM 0g/L glucose and 1mM 2-DG, 2% dextran-treated charcoal stripped FBS or DMEM 4g/L glucose, 2% dextran-treated charcoal stripped FBS (as a control).

### *Gene expression analysis*

Total RNA was isolated using Trizol (Invitrogen) according to manufacturer's protocol, reverse-transcribed using M-MLV reverse transcriptase. Complementary DNA generated was analyzed by quantitative real-time PCR using iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green supermix (Bio-Rad) on a My iQ cycler (Bio-Rad). Data were normalized to HPRT1, TBP or GAPDH expression and relative mRNA levels were determined by using the  $\Delta\Delta C_t$ . Primer sequences are available in Table 1 in supplemental data.



### *ATP assay*

Treated cells were trypsinized, centrifuged at 150 g for 15 min and ATP levels were measured using Roche ATP bioluminescence according to supplier's instructions.

### *Immunofluorescence*

Cells were plated on 12-mm glass coverslips in 24-well plates and treated as described above. Cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS), fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (PAF) for 15 min at room temperature (RT), and permeabilised with PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min at RT. Then cells were washed and incubated with primary antibodies in PBS containing 3% FBS overnight at 4°C. After washes, cells were incubated with secondary antibodies for 1h at RT. Cells were washed again and mounted in fluoromount (Sigma-Aldrich). Immuno-fluorescence imaging was performed on a Imager.Z1 ApoTome AxioCam (Zeiss) microscope.

### *Flow cytometry analysis of cell cycle*

After treatment, cells were trypsinized, fixed with 70% Ethanol for 30 min on ice and incubated in IFA buffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 4% FBS) for 20 min at 4°C and then with RNaseA (100 µg/mL). Finally, 25 µg/mL propidium iodide were added before FACS analysis. 10 000 cells from each sample were analyzed using the FACScan apparatus (Beckton-Dickinson).

### *Cellomics analysis of FG/ actin yields*

Cells were plated in 96-wells (4000 cells per well). After 24h treatment with 1mM 2-DG, cells were washed with PBS, fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (PAF) for 15 min at

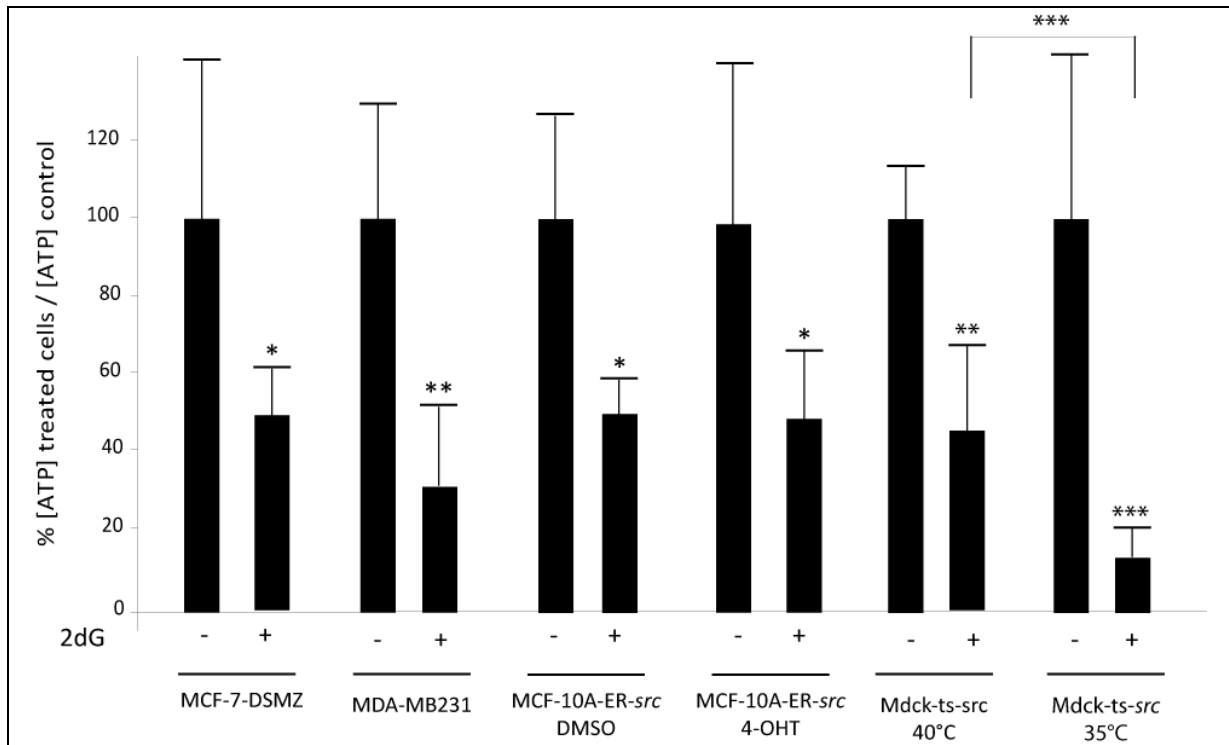
RT, and permeabilised with PBS containing 0.3% Triton X-100 for 10 min at RT. After three washes cells were incubated with DNase1 (1/1000) or phalloïdin (1/1000) with DAPI (1/1000) and washed again before imaging acquisition.

## Results

To not draw conclusions restricted to a single cellular tool, we used several cancer cell lines with different tumoral grades. MCF-7-DSMZ and MDA-MB231 are relatively differentiated and highly metastatic versions of breast cancer respectively. MCF-7 cells are moderately differentiated estrogen receptor-positive cells capable of generating tumors in nude mice upon estrogen supplying. Conversely, the aggressive MDA cells no longer synthesize estrogen receptor, express vimentin but not E-cadherin. The canine kidney cell line Mdck was engineered to express a thermosensitive mutant of the transforming oncogene *src* which can be activated upon shifting culture dishes from 40°C to 35°C (Mdck-ts-*src*) (Behrens et al., 1993). The MCF-10A cell line was modified (MCF-10A-ER-*src*) to express the oncogene *v-src* fused to the estrogen receptor so that its activity can be induced with 4-hydroxy-tamoxifen (4-OHT) (Iliopoulos et al., 2010). Both cell lines express vimentin upon *src* activation.

### *Sensitivity to 2-DG of ATP synthesis in tumoral cells.*

We first examined the resistance of ATP levels to the non-metabolizable glucose analog 2-DG.



**Figure 1 : Comparative resistance to 2DG of the cellular ATP content of cell lines with different differentiation states**

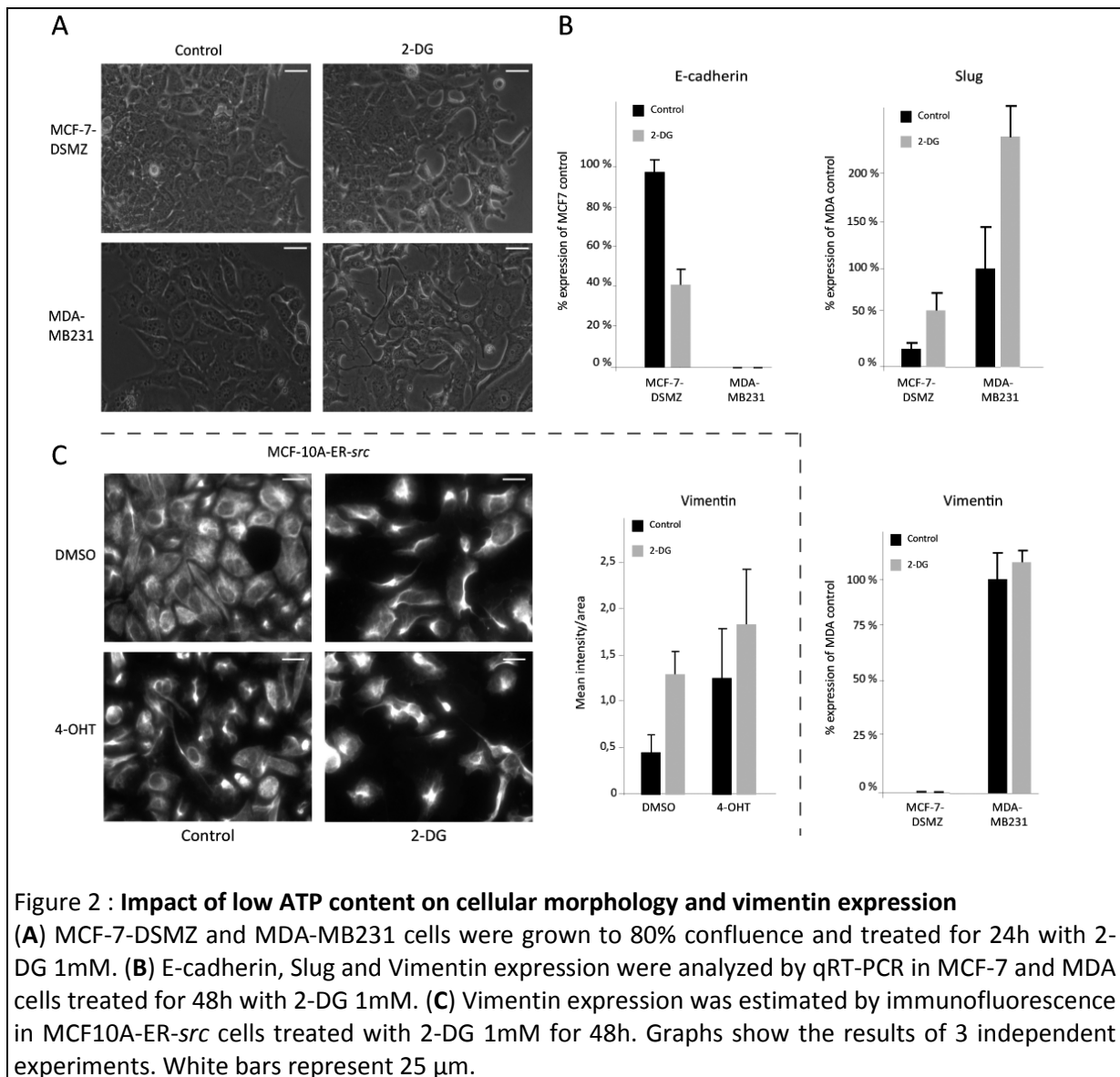
ATP contents were measured in MCF-7-DSMZ, MDA-MB231, MCF-10A-ER-*src* treated with DMSO or 4-OHT, Mdck-ts-*src*-40°C or 35°C, after 4h of 2-DG treatment (1mM). n = 5 (Mdck-ts-*src*), 6 (MCF-7-DSMZ and MDA-MB231) or 8 (MCF-10A-ER-*src*).

t Test were performed : \* 0,05 < p < 0,1 \*\* 0,01 < p < 0,05 \*\*\* p < 0,01

As shown in Fig. 1, the differentiated cells (MCF-7 or Mdck-ts-*src* before *src* activation) appeared less affected by this treatment whereas ATP contents dramatically decreased in highly transformed cells (such as MDA-MB231 or Mdck-ts-*src* after *src* activation) except for MCF-10A-ER-*src* cells which were equally sensitive to 2-DG before or after *src* activation. This could be explained by a higher ATP concentration after *src* activation (2.5 fold), and a longer 2-DG treatment would likely permit to reduce more drastically the ATP level in these cells. Strikingly, *src* activation at permissive temperature in Mdck-ts-*src* cells further weakened their resistance to 2-DG. The higher sensitivity to glucose metabolism inhibition of transformed or de-differentiated cells is compatible with the WE theory and to the lower yield of aerobic glycolysis with respect to the ratio ATP synthesis/substrate consumption.

These results suggest that the ATP content decreases in transformed cell living environments, deficient in nutrients, with possible consequences on cellular phenotypes. To evaluate the consequences of such drops, we then examined the phenotypic changes induced by 2-DG.

*Changes of cellular morphology induced by 2-DG.*



**Figure 2 : Impact of low ATP content on cellular morphology and vimentin expression**  
**(A)** MCF-7-DSMZ and MDA-MB231 cells were grown to 80% confluence and treated for 24h with 2-DG 1mM. **(B)** E-cadherin, Slug and Vimentin expression were analyzed by qRT-PCR in MCF-7 and MDA cells treated for 48h with 2-DG 1mM. **(C)** Vimentin expression was estimated by immunofluorescence in MCF10A-ER-src cells treated with 2-DG 1mM for 48h. Graphs show the results of 3 independent experiments. White bars represent 25  $\mu$ m.

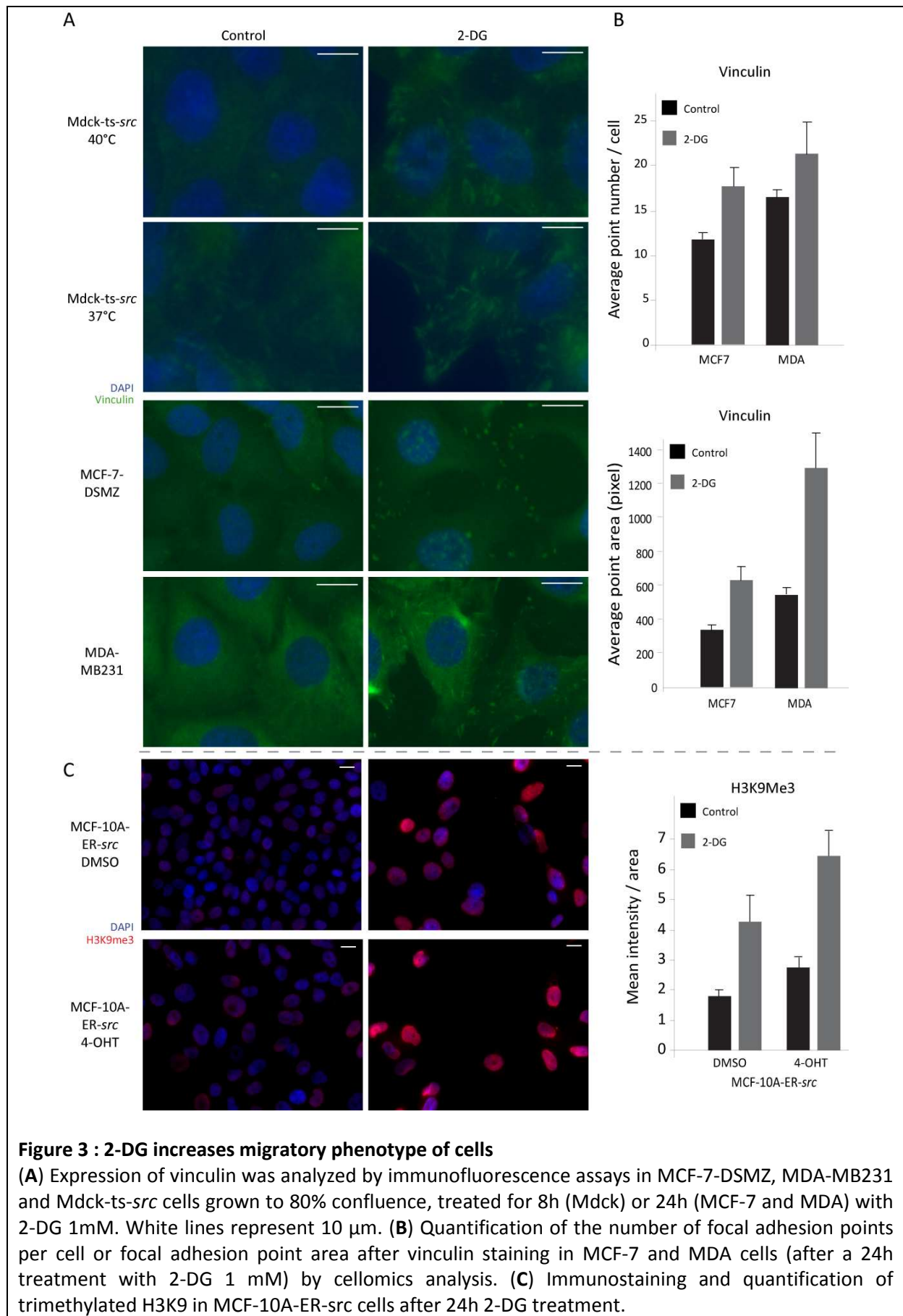
As shown in Fig. 2A, when cultured in a medium with no glucose, low serum concentration and in presence of 2-DG, MCF-7 and MDA cell populations lose their epithelial-like

organization. Moreover individualized cells display new shapes, with pseudopod-like extensions reminiscent of migratory cells.

We then tried to determine if these morphological transformations are associated with gene expression changes. To this end, we compared the two tumor grades of breast cancer, benign (MCF-7) and highly (MDA) malignant, with respect to the expression of three classical EMT markers : (i) the kinase Slug known to be increased during EMT (Peinado *et al.*, 2007), (ii) E-cadherin, a marker of differentiated epithelia that is lost during EMT and (iii) vimentin, an intermediate filament associated to cell mobility. As shown in Fig. 2B, Slug expression was up-regulated in both cell lines by 2-DG. 2-DG led to a strong decrease of E-cadherin in MCF-7 cells but was unable to significantly induce vimentin. In turn, vimentin was activated by 2-DG in MCF-10A cells (Fig 2C), together with visible alteration of cellular shape. Interestingly, 2-DG alone had the same impact on cellular individualization that the *src* oncogene. In addition, 2-DG induced a profound reorganization of the cytoskeleton, visible in both control and *src*-activated-MCF-10A cells. ATP depletion led to the dismantlement of epithelial-like cell layers, as reproducibly observed using several epithelial cell lines (MCF-7, Mdkc, MCF-10A).

#### *Migratory phenotype induced by 2-DG.*

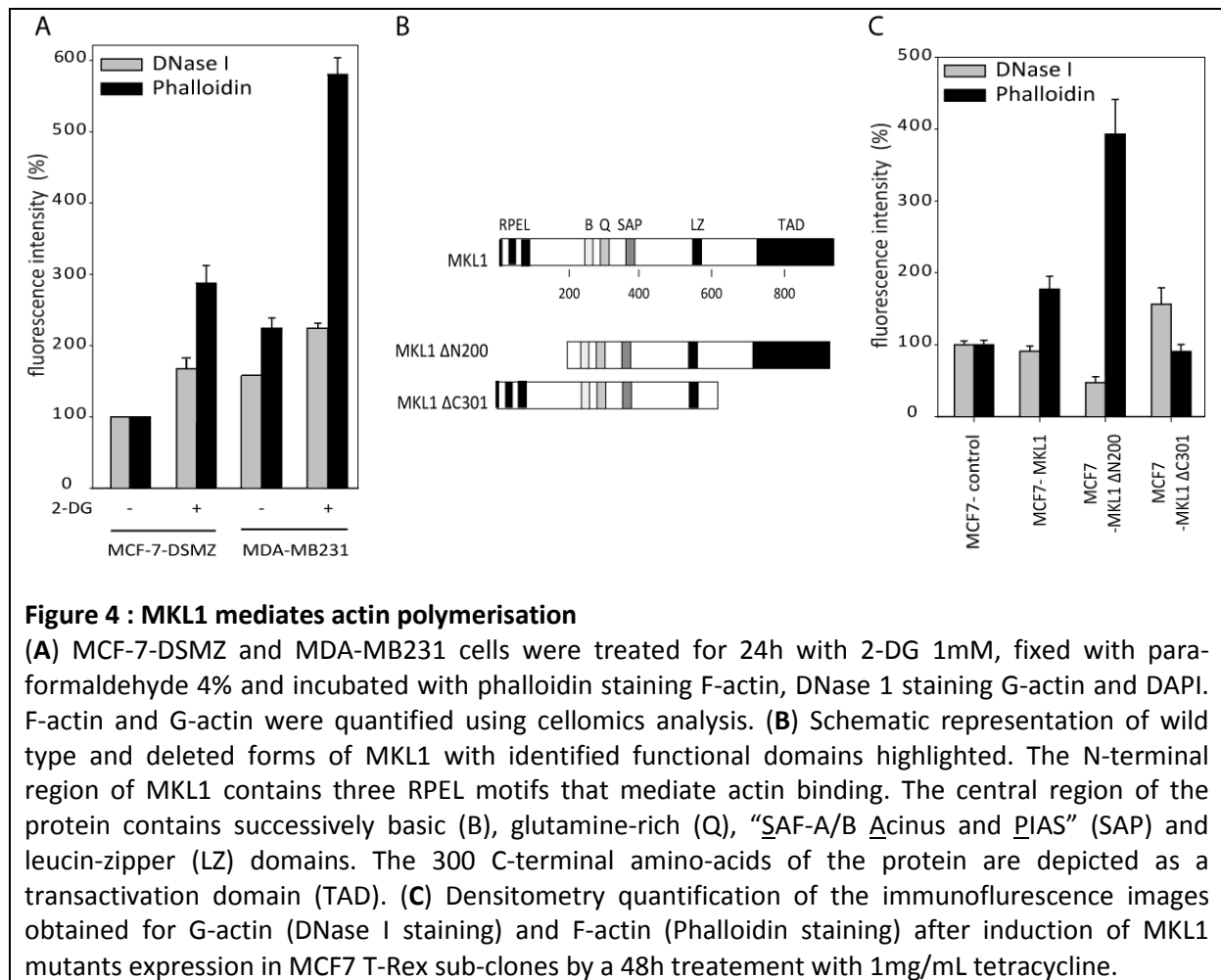
A characteristic of mesenchymal cells is their ability to migrate and colonize other tissues. As our results suggest an increase of mesenchymal markers, we investigated whether 2-DG could favor migration.



We used vinculin staining to mark focal adhesion points, involved in migration-associated support anchoring. As shown in Fig.3A, vinculin organizes itself, as soon as 8h in Mdkc cells, in focal adhesion points. The same phenomenon is observed in MCF-7 and MDA cell lines. The precise quantification of the number and area of vinculin-positive focal adhesion points showed a striking increase after 24h of 2-DG treatment (Fig. 3B). Finally, 2-DG induced chromatin compaction, required for nuclear compaction and migration (Yokoyama et al., 2013), associated with an increase of trimethylation of H3K9 in MCF-10A-ER-src (Fig 3C). However, we failed to observe clear translational migratory activity using the classical scratch assays, suggesting that in spite of an apparent migratory phenotype, effective migration could be prevented by lack of energy in our culture medium with low glucose and serum.

*MKL1 can link actin polymerization to ATP.*

The fall of ATP content was shown to correlate with the remodelling of the actin network, with intense actin polymerization (Atkinson et al., 2004). We reproduced these observations and verified that cellular extensions were associated to intense actin polymerization, as revealed by quantification of globular (G) and filamentous (F) actin that showed an increase of F-actin (Fig. 4A). Considering that the primary ATP-sensing target to explain cellular changes could be actin, we then look for regulation pathways possibly underlying these observations. Myocardin-related transcription factor-A (MRTF-A/MKL1) is a particularly good candidate because it has precisely been identified for its capacity to translate the degree of actin polymerisation into the modification of cellular programs.



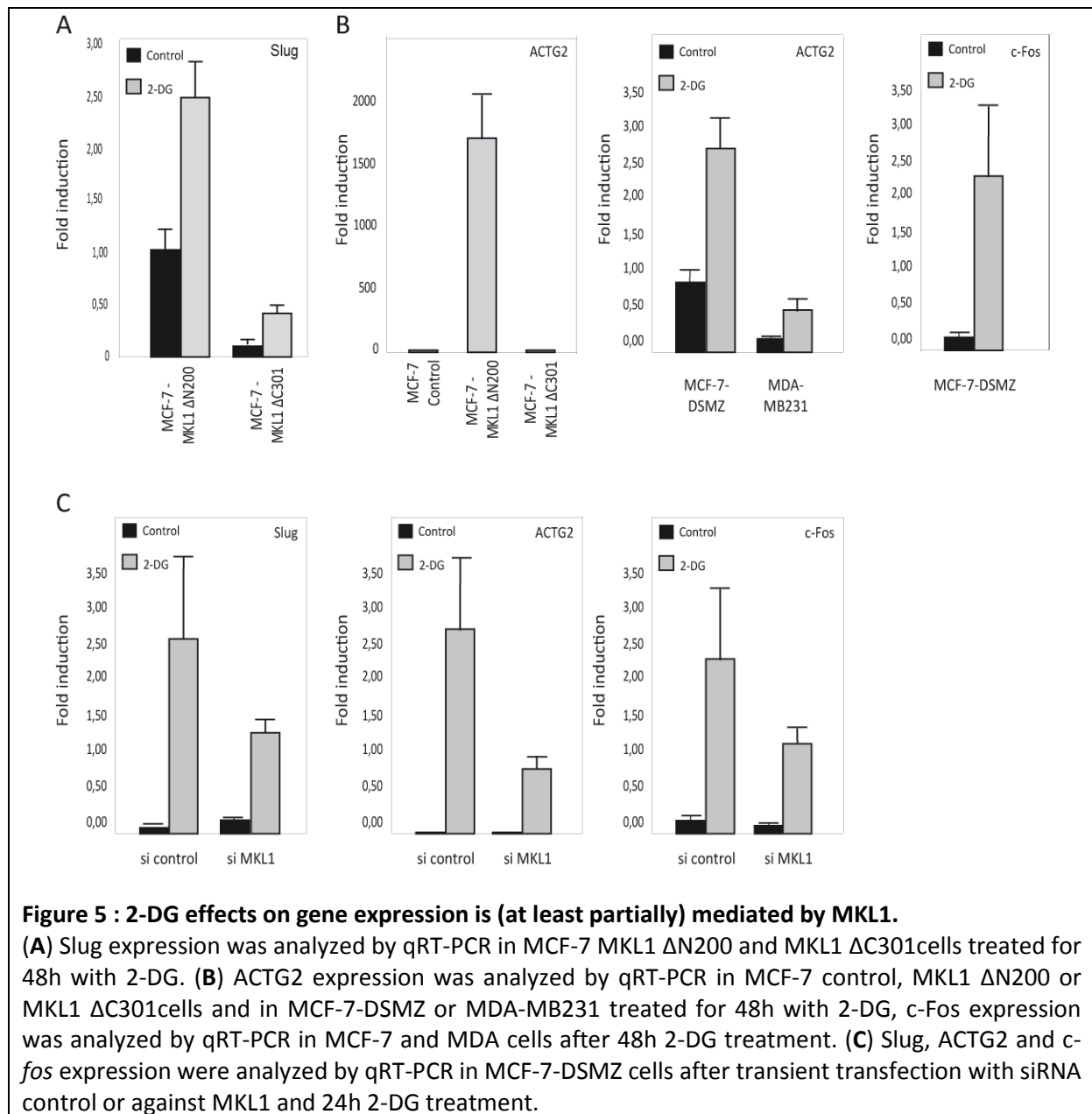
The admitted mode of action of MKL1 in relation with actin organization can be summarized as follows. MKL1 is sequestered by free actin monomers (G-actin) in the cytoplasm, preventing it to translocate into the nucleus, but upon actin polymerization in the form of F-actin, MKL1 enters the nucleus where it associates with DNA-bound Serum Responsive Factor (SRF) and strongly activates transcription at these loci (Miralles et al., 2003) and, in the epithelial context, can induce EMT (Huet et al., 2009). In this scenario, the ratio of monomeric over polymeric actin in the cell is deciding for the action of MKL1. The role of MKL1 in this regulation is dual since on the one hand, it can sense the degree of actin polymerization and on the other hand, it governs the expression of a collection of gene products regulating F-actin formation (Schratt et al., 2002). To examine the possibility that



the actin/MKL1 pathway could be involved in the dedifferentiation capacity of actin polymerisation, we tested if MKL1 could by itself regulate actin polymerisation in MCF7 cells. To this end, we used the wild type and two deletion mutants of MKL1 (Huet *et al.*, 2009), either deleted from its domain of interaction with monomeric actin (N-terminal RPEL motifs) and thereby constitutively "desequestretated" and active (MKL1  $\Delta$ N200), or on the contrary deleted from its C-terminal transactivation domain (MKL1  $\Delta$ C301), constitutively inactive and capable of working as a dominant negative with respect to endogenous MKL1 (Fig. 4B). To evaluate the impact of these constructs on actin organization, we stained the transfected cells with fluorescent Dnase I or phalloïdin that bind preferentially to G-actin and F-actin respectively. wtMKL1 significantly increased the level of polymerized actin and even more strikingly, the constitutively active mutant induced a 4-fold increase of F-actin (Fig. 4C). Conversely, the dominant negative MKL1 rather increased G-actin.

*MKL1 mediates the effects of 2-DG on gene expression.*

As previously noticed, MKL1, associated with SRF can modulate gene expression in response to actin polymerization. Besides, we showed that 2-DG induces actin network reorganization with actin polymerization. Based on these observations, we logically thought that MKL1 could mediate, at least partially, the action of 2-DG on gene expression. To test this hypothesis, we compared the effects on gene expression of 2-DG and two mutants MKL1  $\Delta$ N200 and MKL1  $\Delta$ C301 (Fig. 5). Slug expression, up-regulated in all tested cell lines after 2-DG treatment, was also either up-regulated by MKL1  $\Delta$ N200 or down-regulated by MKL1  $\Delta$ N301, suggesting that 2-DG regulation of slug expression could be mediated by MKL1.

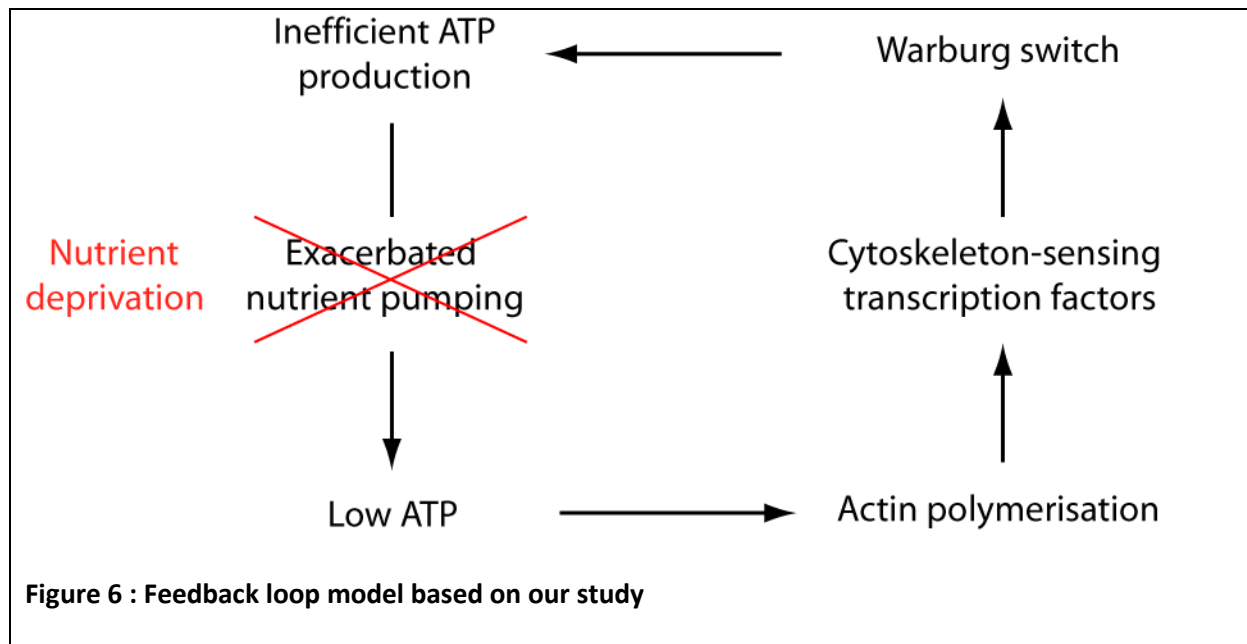


When the cells expressing the two mutants were treated by 2-DG, slug expression increased strongly in MKL1  $\Delta$ N200 MCF-7 cells but weakly in MKL1  $\Delta$ C301 MCF-7 cells (Fig. 5A). In the same way, vimentin protein expression increased with MKL1  $\Delta$ N200 and decreased with MKL1  $\Delta$ C301 (not shown). On the contrary, E-cadherin protein expression, down regulated by 2-DG, was also down regulated in MKL1  $\Delta$ N200 MCF-7 cells and up-regulated in MKL1  $\Delta$ C301 MCF-7 cells (not shown). Afterwards we considered expression of a typical SRF-dependent gene : the smooth muscle gamma actin SMGA / ACTG2 (Carson et al., 2000). As

expected, ACTG2 is expressed only in MKL1  $\Delta$ N200-expressing MCF-7 cells, confirming its upregulation by MKL1 (Fig. 5B). We also observed that ACTG2 expression was increased after 2-DG treatment, in MCF-7 as well as MDA cells. Furthermore, expression of another target gene of MKL1 and SRF, *c-fos*, was up-regulated by 2-DG treatment (Fig.5B). To confirm the involvement of MKL1 in these regulations, its expression was inhibited in MCF-7-DSMZ cells using siRNA (Fig. 5C). As shown in Fig. 5C, induction of Slug, ACTG2 and *c-fos* was weaker in cells transfected with MKL1 siRNA compared to control siRNA, suggesting that MKL1 mediates, at least in part, the effects of 2-DG treatment on gene expression.

## **Discussion : ATP as a link in a positive feedback.**

Positive feedbacks are inherently self-stabilizing circuits, specially involved in the maintenance of cellular states and their memory across cellular generations (Nicol-Benoit et al., 2012). Many such feedbacks have been reported to explain the robustness of the transformed cellular state, making it resistant to therapeutic attempts. One can cite among others, the reciprocal relationships existing between cellular transformation and inflammation (Iliopoulos et al., 2010), the positive loops generated by mutual inhibition between E-cadherin and EMT transcription factors (Onder et al., 2008), or between ZEB TFs and miR-200 (Brabletz and Brabletz, 2010). Self-stabilizing cycles can also exist between cellular architecture and genetic expression (Huang and Ingber, 2005-b). It is suggested in the present study that ATP could precisely contribute to such a positive feedback loop, with reciprocal effects of actin polymerization and ATP synthesis (Fig. 6).



On the one hand, the low yield of ATP synthesis through glycolysis can lead to a drop of its concentration in case of nutrient deprivation, which would lead to actin polymerization by releasing ATP bound to actin monomers. In turn, cytoskeletal organization has a well established impact on gene expression, transduced by several factors including YAP, TAZ (Halder et al., 2012) and MKL1 which can directly sense the degree of actin polymerisation (Olson and Nordheim, 2011; Iyer et al., 2012). Based on the present experiments, this latter actor is a good candidate for mediating the undesirable effects of nutrient deprivation in cancer cells shown in the present study. These observations are of utmost therapeutic importance as they suggest that contrary to intuitive expectation, anti-cancer strategies aimed at depriving cancers from nutrients, for example using 2-DG, or anti-angiogenesis agents, could be beneficial only during the first stages of the treatment by reducing the size of primary tumors, but could be dramatically counterproductive in the long term by favoring the emergence of more aggressive cells (Loges et al., 2009). Tumor reoxygenation and restoration of mitochondrial metabolism could be better ideas to fight cancer (Saidi et al., 2008 ; De Bock et al., 2011).

Beyond the biochemical and genetic complexity underlying the WE which remains far from completely understood, we focused in this study on the general consequences of this phenomenon on the phenotype of cancer cells. The WE can result in energy weakness in cancer cells living in oxygen- or nutrient-depleted media, but this effect could counter-intuitively provide an additional selective advantage to cancer cells by reinforcing their aggressiveness. On the one hand, the WE jeopardizes energy production in starved tumoral cells and on the other hand, low ATP strongly favours mesenchymal transformation through actin reorganization. Early reports established that the ATP content of cancer cells is inversely related to their tumour grade (Jackson *et al.*, 1980 ; Mazurek *et al.*, 2001). In fact, the ATP content depends on the cellular environment. It can be high in cancer cells well supplied in nutrients, as suggested by the reckoning Warburg's data by (Koppenol *et al.*, 2011), but it is also critically dependent on nutrient provisions. As noticed by Paldi (2012), the energetic status of a cell and substrate availability could determine cell fate, between proliferation and differentiation. OXPHOS leads to more complete oxidation of glucose, with production of only ATP, CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O. This more efficient consumption of glucose by OXPHOS optimizes the production of energy that is essential to maintain the regulations of differentiated cells whereas the incomplete oxidation of glucose in glycolysis can yield substrate molecules necessary for cellular growth and division. Hence, the uncertain energetic status of cancer cells could be more than a side consequence of the Warburg switch but can directly participate to the emergence of transformed cellular state and stabilize it once triggered. This vicious cycle strengthens the original idea of Warburg that the WE is a central mechanism determining cancer evolution. It can also shed light on the opposite evolution with age, of ATP and the risk of cancer.

The role of the energetic status in malignancy is rediscovered but could have been anticipated from the old studies on hypoxia (Goldblatt and Friedman, 1974). The actively studied link between hypoxia and malignancy (Lyssiotis et al., 2012) has long been brought to light by (Goldblatt and Cameron, 1953) even before the discovery of the WE. Moreover, anaerobiosis has been shown to persist in the environment of established tumors, as indirectly revealed by their capacity to stably harbor anaerobic bacteria (Malmgren and Flanigan, 1955). From an evolutionary point of view, as predicted in (Pfeiffer et al., 2001), consuming rapidly and inefficiently the resources is a typically selfish behavior advantageous for invaders, whereas oxidative phosphorylation is the hallmark of coherent tissues made of differentiated cells. Hence, the Warburg effect is not surprising from this perspective, considering that metastatic cells do recover the metabolic strategy of invaders and break off the cooperation established between tissue cells for optimizing the management of the energetic resources. Healthy and resting metazoan tissues have the capacity to share and use parsimoniously the collective nutrient resource through maximizing energy extraction by oxidative phosphorylation. By contrast, mobile invaders can use energetically inefficient fermentation because (i) they have the capacity to migrate and the opportunity to explore new sources of fresh nutrients allowing them to compensate their exacerbated need for nutrients and in turn (ii) the incomplete catabolism associated to fermentation allows to provide them with higher amounts of precursor substrates necessary for their enhanced biosynthetic activity. These unicellular behaviors which play normal roles during embryogenesis could be reactivated during the de-differentiation process associated to tumorigenesis.

## Supplemental data

Table 1 : sequences of primers used for Rt-qPCR

<b>Gene targeted</b>	<b>Reverse</b>	<b>Forward</b>
<b>ACTG2</b>	GCGGAAGTACTCAGTCTGG	CACTTCCTGTGGACAATGGA
<b>C-fos</b>	TGTATCAGTCAGCTCCCTCCT	AACTTCATTCCCACGGTCAC
<b>E-Cadherin</b>	CCCCTACCCCTCAACTAACC	GAACACATTTGCCCAATTCC
<b>HPRT1</b>	TCATTATGCCGAGGATTTGG	AGAGGGCTACGATGTGATGG
<b>Slug / Snai 2</b>	CAAGGACACATYAGAACTCACAC	AGGTTTTGGAGCAGTTTTGCAC
<b>Vimentin</b>	GACATGCTGTTCTGAATCTGAG	CCTTGAACGCAAAGTGGAATC

## V. Implication en santé : remise en question des traitements anti-angiogéniques.

L'implication du métabolisme dans les régulations épigénétiques soulève une autre question très pertinente. Étant donné la quantité d'énergie dépensée pour la régulation de l'expression génétique, une baisse des apports en énergie pourrait conduire à des régulations moins strictes de cette expression, et donc à une plus grande hétérogénéité des cellules. Or au sein d'une tumeur, l'hétérogénéité des cellules pourrait favoriser l'apparition de types cancéreux plus agressifs, certaines cellules pouvant du fait de ces dérégulations s'adapter à un environnement hostile (comme l'hypoxie) ou migrer pour chercher ailleurs de meilleures conditions.

Si les travaux que nous avons réalisés sur des modèles de cellules cancéreuses ne permettent pas d'appliquer des thérapies ciblées sur l'EMT ou l'effet Warburg, ils rejoignent les interrogations déjà soulevées sur le bienfondé des traitements anti-angiogéniques (Conley et *al.*, 2012), interrogations liées à l'activation d'HIF1 $\alpha$  suite à l'hypoxie et au rôle de celui-ci dans la signalisation spécifique de l'EMT et du Warburg. Nos travaux semblent particulièrement importants à l'heure où le 2-DG pourrait être utilisé en complément de thérapie anti-tumorale (Ben Sahara et *al.*, 2010), voire même pour induire une restriction calorique chez des sujets sains, dans le but de prévenir le vieillissement et d'allonger la durée de vie (Ingram et *al.*, 2006). Ces études semblent rapporter des effets bénéfiques du 2-DG chez l'animal, notamment en activant les voies de réponse au stress métabolique ; c'est cette adaptation au stress métabolique qui pourrait, dans notre étude, être responsable du phénotype mésenchymateux. En effet, si le 2-DG semble prévenir l'apparition de tumeurs (Zhang et *al.*, 2006 ; Aft et *al.*, 2002 ; Maher et *al.*, 2004), il est important d'évaluer son effet lorsque les tumeurs sont déjà là et que les cellules tumorales sont prêtes à traverser l'EMT. En cela nos travaux indiquent que ce genre de traitements comme anti-tumoraux pourraient être risqués, ce qui serait à confirmer par des études sur l'animal. Il serait ainsi judicieux d'observer les effets de traitements longs pour passer outre un premier effet anti-tumoral (perte de la masse tumorale apparente) et surveiller l'apparition de métastases à l'issue de ce type de traitements car si la masse tumorale



diminue bien, il est impossible de savoir si toutes les cellules cancéreuses ont bien été éliminées, et c'est justement celles qui pourraient résister à une déplétion en glucose qui subiraient l'EMT et seraient capables de métastaser.

Enfin, des études à haut débit des modifications de l'expression génétique induites par le 2-DG sont actuellement en cours au laboratoire sur des kératinocytes primaires, modèle de cellules très différenciées. Les résultats préliminaires indiquent que dès 2h de traitement, l'expression de plus de 600 gènes est modifiée. Ces gènes sont principalement impliqués dans la régulation du métabolisme, de la balance prolifération / différenciation, de la transcription, dans la cicatrisation, dans la dégradation de la matrice-extra-cellulaire, ou la migration. Il pourrait être extrêmement intéressant de poursuivre ce type d'analyses en comparant différents stades de différenciation cellulaires, et sur des traitements beaucoup plus longs, laissant le temps aux réseaux génétiques d'atteindre des états stables, afin de définir plus précisément les facteurs impliqués dans l'adaptation à ce stress métabolique.



# Conclusions



### I. Synthèse

Nos travaux s'inscrivent dans la logique des études post-génomiques découlant d'une meilleure connaissance des génomes et de la constatation que de nombreux phénomènes ne peuvent pas être expliqués par la génomique. Ils offrent une alternative à la vision purement chromatiniennne de l'épigénétique et de la mémoire cellulaire. En effet, les deux axes que nous avons étudiés mettent en lumière des phénomènes de mémoire impliquant des boucles de rétrocontrôle positives plus ou moins complexes.

Dans une première partie nous avons proposé un modèle d'auto-amplification, impliquant un récepteur tronqué à l'œstradiol et son co-activateur, permettant d'expliquer de manière satisfaisante l'effet mémoire observé chez les ovipares lors de la vitellogénèse et jusqu'alors non élucidé.

Dans une deuxième partie nous avons montré que le phénotype mésenchymateux pouvait être entretenu par un vaste circuit dynamique impliquant à la fois le métabolisme énergétique, des senseurs de l'état métabolique, des protéines du cytosquelette, des facteurs de transcription ainsi que des enzymes de modification de la chromatine.

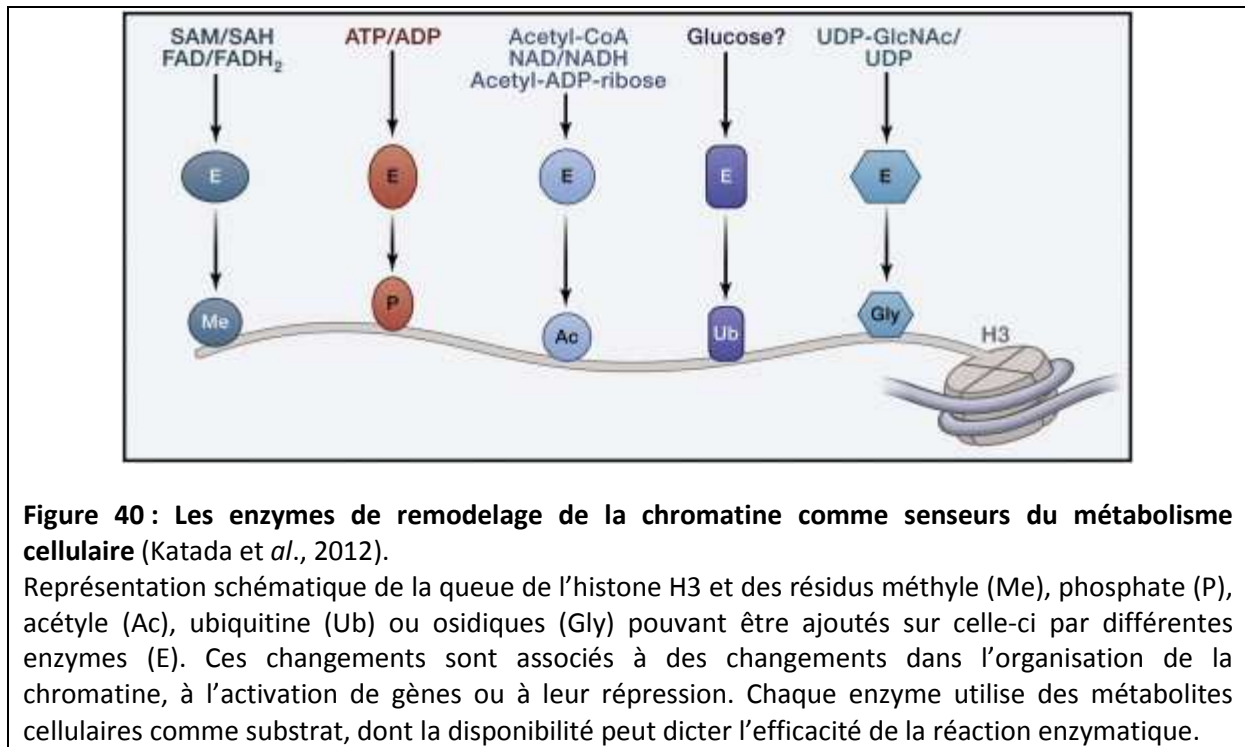
### II. Discussion

Nos travaux, qu'ils concernent l'effet mémoire de la vitellogénèse ou le maintien du phénotype mésenchymateux après l'EMT, définissent les boucles de rétroactions positives comme les acteurs principaux de la mémoire cellulaire, ré-élargissant ainsi la notion d'épigénétique aux attracteurs au lieu de la borner aux marquages de la chromatine. Cependant, loin d'être en opposition avec la vision actuelle de l'épigénétique, plus restrictive puisque limitée à l'étude de ces marquages, les notions d'attracteurs et de circuits

dynamiques de régulation de l'expression génétique permettent d'englober les études déjà menées sur les « marques épigénétiques ».

## A. Pour creuser le lien métabolisme / marques chromatiniennes

La notion d'attracteurs étant intimement liée aux concentrations des facteurs impliqués, la place du métabolisme et particulièrement de ses changements observés lors de l'EMT semble prépondérante dans la définition de certains états stables. Ainsi, Katada s'interroge sur l'influence potentielle de changements dans les taux de métabolites disponibles sur les marquages structuraux de la chromatine, son questionnement rejoignant l'étude que nous avons menée sur le maintien du phénotype mésenchymateux causé par l'effet Warburg associé à une privation de glucose (Katada, Imhof et Sassone-Corsi, 2012). En effet, les enzymes de modification de la chromatine (kinases, méthyl-transférases, acétyl-transférases) ont besoin pour fonctionner de métabolites capables de leur fournir des groupements phosphate, méthyle ou acétyle. Étant donné la quantité de résidus, aussi bien sur l'ADN que sur les histones, qui peuvent subir des modifications dans le génome à un instant donné, il est nécessaire que ces enzymes disposent de taux appropriés de substrats pour effectuer ces modifications. Les enzymes modifiant les histones pourraient alors interpréter l'état métabolique d'une cellule donnée en changeant les motifs de modifications chromatiniennes (Fig. 40). Ainsi, une réduction globale d'acétyl-CoA nucléaire diminue le niveau d'acétylation des histones tandis qu'une baisse du niveau de  $\text{NAD}^+$  inhibe quant à elle la déacétylation des histones (Nakahata et *al.*, 2009 ; Wellen et *al.*, 2009). De plus, nos propres résultats montrent qu'une baisse de la concentration d'ATP peut induire une compaction de la chromatine via la triméthylation de l'H3K9.



Cependant, d’autres paramètres que la quantité globale d’un métabolite donné doivent certainement réguler l’activité enzymatique des protéines de remodelage de la chromatine. En effet, les enzymes modifiant les histones peuvent être recrutées sur des domaines chromosomiques spécifiques via leur interaction avec des facteurs liant l’ADN, ce qui peut stimuler leur activité enzymatique localement. De plus, la distribution hétérogène de métabolites à l’intérieur de la cellule peut également conduire localement à une baisse ou un excès de cofacteurs pour les enzymes de modification de la chromatine. Par ailleurs, des enzymes qui utiliseraient les mêmes métabolites mais des substrats différents (comme les HMT ou les DNMT) pourraient être en compétition, ce qui conduirait à la méthylation des histones ou de l’ADN à l’exclusion de l’autre. Se pose alors la question de savoir si les affinités des enzymes pour leurs cofacteurs varient les unes des autres de telle sorte qu’une jauge de la concentration en métabolite serait possible. Même s’il existe peu de données sur les paramètres cinétiques des modificateurs d’histones ou sur la dynamique des changements en concentrations de métabolites, il est clair que les modificateurs d’histones ont des affinités variables pour leurs cofacteurs et ont des valeurs de  $K_M$  compatibles avec les concentrations de cofacteurs *in vivo* (Albaugh et *al.*, 2011 ; Sauve et *al.*, 2006). Les fluctuations locales et globales de concentrations de cofacteurs pourraient donc avoir un effet sur la capacité de ces enzymes à remplir leur fonction. Il est important de noter que le

degré de protection contre ces changements n'est certainement pas homogène le long de la chromatine. En effet, il doit beaucoup dépendre du niveau de compaction moléculaire, rendant l'hétérochromatine moins sensible aux changements métaboliques que les régions d'euchromatine (Bancaud et *al.*, 2009).

Les histones ne sont pas les seules molécules modifiées par des acétyl-transférases, des méthyl-transférase ou des kinases. Des fluctuations dans la concentration des cofacteurs peuvent également conduire à des changements dans les modifications post-traductionnelles d'enzymes qui à leur tour modifient les histones. En effet, beaucoup de ces enzymes subissent des modifications qui régulent leur activité (Vaquero et *al.*, 2007), leur capacité à lier la chromatine (Wei et *al.*, 2011) ou la composition en sous-unités d'un grand complexe (Huang W-C et *al.*, 2007). De telles modifications des réseaux pourraient générer de complexes boucles de rétroactions capables de traduire les changements physiologiques en modifications des marques chromatinienne par exemple.

Comme nous l'avons mis en avant lors de nos travaux, les marquages structuraux de la chromatine ne sont pas les seuls acteurs des régulations épigénétiques. Certains facteurs de transcription peuvent être directement régulés par de nombreux métabolites, plaçant là encore le métabolisme au cœur du contrôle de l'expression génétique, en faisant donc un acteur central des attracteurs et donc potentiellement de la mémoire cellulaire. De manière intéressante, même des changements transitoires dans la nutrition peuvent avoir des effets durables sur les patterns d'expression de gènes. Par exemple, des patients souffrant de diabète sont plus enclins à développer des complications médicales comme des néphropathies, associées à l'hyperglycémie (Keating et El-Osta, 2013), même si leur glycémie est maintenue à un niveau normal par les thérapies.

## B. Sur l'EMT et les boucles de régulations positives

Comme nous l'avons vu en introduction à la partie 2, il existe d'autres mécanismes d'auto-amplification décrits pour le phénotype épithélial ou mésenchymateux (Lopez-Novoa et Nieto, 2009 ; Nieto, 2011 ; Brabletz et Brabletz, 2010), avec des réseaux parfois très vastes



impliquant l'inflammation, des facteurs de transcription, des microARNs régulateurs, des protéines de surface... De plus, s'il est connu que les cellules ayant subi l'EMT modifient leur environnement extracellulaire, de nombreuses preuves indiquent que l'inverse est vrai et que les protéines de la matrice, comme des métalloprotéases, le collagène I et la fibuline, tout comme des protéines de cytosquelette (vimentine) à travers les cascades Rac GTPase peuvent promouvoir l'EMT (Lee et *al.*, 2008 ; Medici et Nawshad, 2010 ; Mendez et *al.*, 2010 ; Radisky et *al.*, 2005), aboutissant à la mise en place d'un nouveau « cercle vicieux ». Les travaux que nous avons menés et le modèle qui en découle correspond à une boucle supplémentaire, impliquant le cytosquelette, le métabolisme et des facteurs de transcription. Nous avons conscience de n'avoir identifié que certains des acteurs intervenant dans cette boucle de régulation positive, d'autres facteurs de transcription « senseurs » de l'état de polymérisation de l'actine pouvant certainement être impliqués dans le réseau.

### C. Mémoire épigénétique : marques structurales ou circuits actifs ?

Les notions concernant l'épigénétique, les marques chromatinienne et les attracteurs présentés en introduction et tout au long de ce manuscrit ont été publiés sous la forme d'un article de revue en février 2012 dans "Cellular and molecular Life Science", dont voici le résumé :

Une caractéristique des systèmes vivants est la gestion et le stockage de l'information, grâce à des mécanismes génétiques et épigénétiques. Bien que la notion de l'épigénétique concernait à l'origine toute régulation au-delà de la séquence d'ADN, elle a souvent été limitée aux modifications de la chromatine, censées se comporter comme marqueurs en *cis* indiquant les ensembles de gènes devant être exprimés ou réprimés.

Cette définition ne tient pas compte du point de vue initial de l'épigénétique, basé sur des réseaux d'interactions non linéaires dont les «attracteurs» peuvent rester stables sans aucun marquage chromatinien. En outre, les modifications de la chromatine sont les résultantes de

l'état d'équilibre entre des activités de modification et de démodification très dynamiques et à ce titre, semblent peu appropriées pour travailler comme gardiens de la mémoire à long terme. Au lieu de cela, la mémoire épigénétique pourrait être supportée par les attracteurs, auxquels appartiendraient les modifications de la chromatine ainsi que de nombreux autres composants.

L'influence des modifications de la chromatine dans la mémoire est très discutable quand elle est envisagée comme un marquage structurel statique, mais peut être intégrée dans la perspective d'un circuit dynamique, grâce à leurs propriétés d'auto-crédation de modèles. A côté de leurs fonctions répressives ou permissives standards, les modifications de la chromatine peuvent également influencer la transcription de différentes façons :

- 1) en randomisant ou au contraire en stabilisant l'expression des gènes,
- 2) en médiant la coopérativité entre des facteurs de transcription pionniers et secondaires et
- 3) l'hystérèse et l'ultrasensibilité des changements d'expression du gène permettent aux cellules de prendre des décisions non ambiguës dans la transcription de gènes.

→ Article 3 : "Epigenetic memories: structural marks or active circuits?"

# Epigenetic memories: structural marks or active circuits?

Floriane Nicol-Benoit, Pascale Le-Goff, Yves Le-Dréan, Florence Demay, Farzad Pakdel, Gilles Flouriot and Denis Michel

Université de Rennes1, Irset. IFR-GFAS Campus de Beaulieu. Bat.13. 35042 Rennes cedex  
denis.michel@live.fr Tel. 02232326131

## Abstract

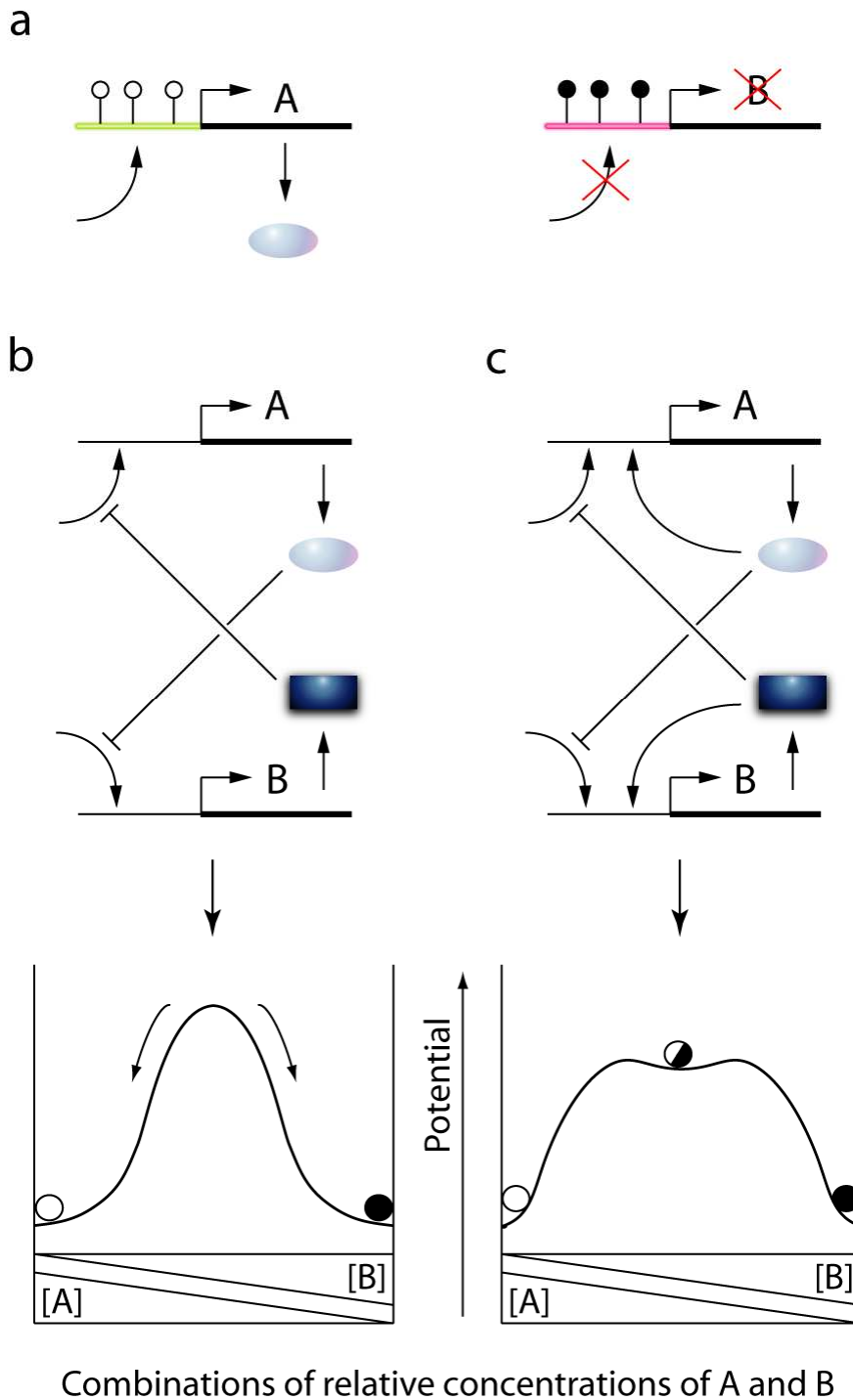
A hallmark of living systems is the management and the storage of information, through genetic and epigenetic mechanisms. Although the notion of epigenetics was originally given to any regulation beyond DNA sequence, it has often been restricted to chromatin modifications, supposed to behave as cis-markers specifying the sets of genes to be expressed or repressed. This definition does not take into account the initial view of epigenetics, based on nonlinear interaction networks whose "attractors" can remain stable without need for any chromatin mark. In addition, most chromatin modifications are the steady state resultants of highly dynamic modification and de-modification activities and as such, seem poorly appropriate to work as long term memory keepers. Instead, the basic support of epigenetic memory could remain the attractors, to which chromatin modifications belong as many other components. The influence of chromatin modifications in memory is highly questionable when envisioned as static structural marks, but can be recovered under the dynamic circuitry perspective, thanks to their self-templating properties. Beside their standard repressive or permissive functions, chromatin modifications can also influence transcription in multiple ways such as: i) by randomizing or inversely stabilizing gene expression, ii) by mediating cooperativity between pioneer and secondary transcription factors and iii) in the hysteresis and the ultrasensitivity of gene expression switches, allowing the cells to take unambiguous transcriptional decisions.

**Keywords** Epigenetics, chromatin modifications, attractors, gene regulatory networks

*Cellular and Molecular Life Sciences (2012) 69:2189-2203*

## Introduction

Beyond the fundamental genetic memory inscribed in DNA sequences and which allows the organisms to retain their identity, other memory mechanisms exist, that are called epigenetic. By memory in this context, we understand the persistence of cellular behaviours after disappearance of their initial cause. The epigenetic maintenance of gene expression memory have first been established in bacteria. The induced or uninduced state of the *E. coli* lactose operon (*lac*) (Cohn et Horibata, 1959), or the capacity or incapacity of *B subtilis* to incorporate exogenous DNA (Maamar et al., 2007), are perpetuated to their descendants without any change in DNA sequence (and, as explained in this paper, without need for gene marking). Memory effects are even more obvious in metazoans. Although most cells from a given organism have the same genome, they retain the cell-type specific pattern of gene expression selected during embryonic differentiation and transmit it to their lineage. Furthermore, cells with both the same genome and the same differentiation state can recall certain specific treatments or exposures experienced in the past, that can influence their responses to future stimulations. The success of nuclear transfer experiments shows that most somatic cells retain the integrity of the zygotic genome but can forget their epigenetic status, which is thus erasable. Epigenetics attracted considerable attention during the past decades but intriguingly, from different perspectives depending on the different research areas. To simplify the situation, for theoretical and modeling biologists, stable gene expression profiles essentially result from gene network configurations called attractors, whereas for most classical "eukaryotist" biologists, they rely on structural chromatin marks dictating the ability of genes to be expressed or not, depending on the cell type (Fig. 1a). This latter view neglects the attractor hypothesis and underestimates the dynamic nature of chromatin modifications. By inverting the hierarchy, chromatin marks could preferably be considered as actors of dynamical networks, which contribute to shape high dimensional attractors. The aim of the present report is not to minimize the importance of chromatin modifications but to restore their place in biological causation and more importantly, to suggest that we would benefit from integrating attractors into our mode of thinking and our research strategies on chromatin.



**Figure 1. Chromatin marking vs attractor views of gene expression memory.**

(a) Persistent chromatin marking of the cis-regulatory regions of the A- and B-encoding genes, differentially designate them as expressed and repressed respectively. (b) From the attractor perspective, the same result as in (a) can be obtained with a simple mutual inhibition circuit, starting from an initial condition in which A is slightly predominant. This configuration generates two attractors in which only A or B is expressed (bottom panel). (c) Variant scheme in which, in addition to the previous one, each gene is stimulated by its own product. The bottom panels represent sections of the corresponding 3D landscape in a plane  $[A]+[B] = \text{constant}$ . In these landscapes, inactivating transiently one gene product is sufficient to impose the migration of the system from one attractor to the other one.

## Static versus dynamic epigenetic memory

The two challenging conceptions of epigenetic memories can be summarized as follows.

### ***Structural reminders***

For a large fraction of searchers, epigenetics corresponds to chromatin modifications, including the structural, often covalent, chemical modifications of DNA and/or histones and the replacement of classical histones by variant isoforms (Zhang, 2011). These modifications are supposed to lock genes in expressible or repressed states (Bird, 2002 ; Reik, 2007 ; Ng and Gurdon, 2008 ; Zaidi et al., 2011), but also to stabilize the intensity of gene expression regardless of its level (Muramoto et al., 2010), which is also a sort of memory. The transcriptional instructions of chromatin marks can then be read directly by transcription machineries or by specific proteins domains such as bromodomains (Yun et al., 2011). Alternatively, the effects of chromatin marks can be indirectly mediated by higher-order chromatin structure (Zaidi et al., 2011), preventing transactivators to access the regulatory sequences of repressed genes, said closed. Sub-nuclear gene positioning (Brickner, 2010 ; Geyer et al., 2011) or the three-dimensional genome organization (Cavalli, 2011), are also structural determinants of gene expression. Occasionally during reprogramming, these modifications can be actively erased and reset (Reik, 2007). To symbolize the principle of chromatin marking, Fig.1a represents two genes, encoding A and B products and marked as to be expressed and repressed respectively. These marks are supposed to be responsible for the maintenance of many cellular activities, including the cell-type specific differentiation states established during development (Reik, 2007), as well as the immune memory allowing lifelong immunity against previously encountered infectious agents (Youngblood et al., 2010). Certain chromatin modifications are indeed unambiguously associated to the gene expression status. For example, hypermethylation of histone 3 lysine 9 (H3K9me3), linked to DNA methylation (Sarraf et Stancheva, 2004), reflects gene repression and chromatin condensation and can be self-perpetuated through mitosis. Conversely, hypermethylation of lysine 4 of this histone (H3K4me2-3) is a mark of active genes, correlated with H3K9 acetylation. The complex picture of chromatin modifications in relation to gene expression, is reviewed in (Bannister and Kouzarides, 2011 ; Suganuma and Workman, 2011).

## ***Attractors***

In spite of the widespread definition of epigenetics as chromatin modifications, the term epigenetic was originally used in a different context, long before the discovery of chromatin structures, according to the pioneer ideas of Waddington (Waddington, 1957), who is recognized as the founder of the famous concept of "epigenetic landscape" (Slack, 2002). In this landscape, attractors are physical entities resulting from the balance of gene interactions previously studied by Delbrück (Delbrück, 1949) and corresponding to the gene switching circuits drawn by Monod and Jacob (Monod and Jacob, 1961). For a given collection of genes, some of which regulating other ones, directly or indirectly, the combination of their expression levels cannot take any value but spontaneously adjust such that the strengths of interactions collectively compensate each others. The sets of compatible values are called attractors (Kauffman, 2004 ; Huang, 2011a). The formation of attractors in gene regulatory network (GRN) does not require specific covalent gene marking, whereas most experimental studies aimed at understanding eukaryotic cell behaviours focus attention on gene structure. Though they are often envisioned as equilibria resulting from webs of interactions, attractors are precisely not equilibria, but steady states in dissipative systems necessarily open, with continuous inputs of matter and free energy and associated to continuous heat dissipation. The attractors can be mathematically modeled using different tools (Thomas, 1973 ; Thomas, 1998 ; De Jong, 2002 ; Karlebach and Shamir, 2008 ; Bornholdt, 2008). Among them, sets of nonlinear differential equations are realistic enough as they avoid the simplifactory hypothesis of binary gene expression (on or off only). But unfortunately they are not solvable explicitly and suffer from the lack of knowledge of many interaction parameters in the cell. In the differential equations, the degradation of mRNA and proteins is satisfactorily described as a first order decay (like radioactive disintegration), but transcriptional input functions are much more difficult to capture. They are so far described using approximative and somewhat arbitrary Hill functions to satisfy sigmoidicity requirements, but which poorly reflect the complexity of transcription initiation mechanisms (Michel, 2010). Hill coefficients are generally chosen more for convenience than for their biological relevance, because the realistic transcriptional functions are currently out of reach experimentally. As nonlinear equations can have several solutions, GRN can be multistable, which means that different stationary

states can be obtained with exactly the same genes (Delbrück, 1949), if certain conditions are fulfilled (presence of positive circuits in the network and some nonlinearity in deterministic mechanisms) (Cherry and Adler, 2000 ; Kaufman et al., 2007). In the landscape of Waddington, hills and ridges correspond to unstable gene expression combinations devoid of biological interest, while attractors are the possible stationary states. This representation is consistent with the gene expression changes observed in large scale profiling studies, showing the progressive reshaping of expression patterns upon cellular reprogramming in response to environmental changes or to biological signals. The same final profiles can be reached following treatment with different agents and starting from the same initial states, but through different ways (Huang et al., 2005). For better visualization, these transient cellular changes are often compared to a sphere rolling down by gravity the Waddington landscape, from high elevation (low probability) to low elevation (high probability) states.

## Examples of simple attractors

### ***Two gene-attractor***

The circuit most often used as a model of bistability is made of two genes inhibiting each other (Huang, 2009). Fig. 1b represents such a reciprocal inhibition circuit between two genes otherwise expressed at a constant rate, said basal (without self activation). Inhibition of an inhibition is a prototype of positive circuit, and the presence of at least one positive circuit is in theory necessary for structuring a network into multiple attractors (Kaufman et al., 2007). In this scheme, the combinations of expression levels of A and B can take only two stable states, corresponding to exclusive expression of either A or B. This result is intuitively expected because if A is slightly more expressed than B, then the gene encoding B is slightly more inhibited and as a consequence is less able to inhibit A expression, so that A further increases ( $A > B \Rightarrow A \gg B$ ). Consecutive iterations of this cycle lead to a stable situation in which only the expression of A is detectable. Hence, the same issue as previously obtained for instructive chromatin marks (A expressed and B repressed, Fig. 1a), is now obtained through a simple circuitry mechanism, without any structural gene change. In principle, the system could remain such that A and B are expressed exactly at the same level, but this state is purely theoretical since it is very fragile and inexistent in real fluctuating cells, where any



transient faint excess of one factor is explosively amplified and definitely locked. If, in addition, each gene product stimulates its own gene, in a manner that is:

- (1) independent and additive with respect to the previous stimulation,
- (2) not inhibitable by the other gene product (Fig. 1c),

then, a third median attractor of lower probability is predicted, in which A and B are both expressed (Fig. 1c). This scheme is the most widely used in the current literature for modeling cellular differentiation, which is conceived as a shift from the median basin into a lateral stable one (Huang S. et al., 2007 ; Foster et al., 2009 ; MacArthur et al., 2009 ; Bhattacharya et al, 2011 ; Wang et al., 2011). This view of differentiation is supported by the antagonistic couples of TFs observed in progenitor cells that co-express markers of different cell lineages (Hu et al., 1997), such as the GATA/PU.1 in hematopoietic progenitors (Huang S. et al., 2007 ; Zhang et al, 1999), Pax3/Foxc2 in muscular vs vascular cells derived from somites (Lagha et al., 2009), or Sox2/Oct4 in the ectodermal vs mesendodermal balance (Thomson et al., 2011). The median attractor where A and B are both expressed (Fig. 1c), corresponds to bipotent cells while the high probability attractors correspond to differentiated cells that made a choice between A and B. Based on this mechanism, development proceeds through cascades of successive binary choices that can give rise to a maximum of  $2^n$  possible cellular states after  $n$  splitting events. During embryogenesis, these choices can be:

- (1) inductive and depend on the position of the cell relatively to a source of diffusing signals such as the organizers described by (once again) Waddington (Waddington, 1956),

- (2) or selective if different signals or survival factors can stabilize fractions of bipotent progenitor cells stochastically pre-committed towards A-only or B-only phenotypes. Such a selective mechanism would be much less demanding in term of number of regulators, than the traditional inductive view. Stochastic jumps in the landscape can occur upon fluctuations, particularly when the genetic circuits are regulated by few molecules or of weak intrinsic robustness, or because of a lack of discernment in cellular regulations. Backward transitions, from lower elevation to upper basins of attraction, are also possible in theory (Huang, 2009), stochastically in case of large fluctuations, or deterministically upon forced activation or inactivation of critical gene products.

### Single gene attractor

The minimal bistability-generating genetic circuit is provided by a gene whose expression is stimulated by its own product (Fig. 2). This is the archetypal memory loop which, once fired and in absence of antagonistic influences, indefinitely locks the gene at maximal expression. This single gene scheme can generate either monostable or bistable situations with coexistence of two phenotypes in the population: either uninduced or fully induced (Fig. 2).

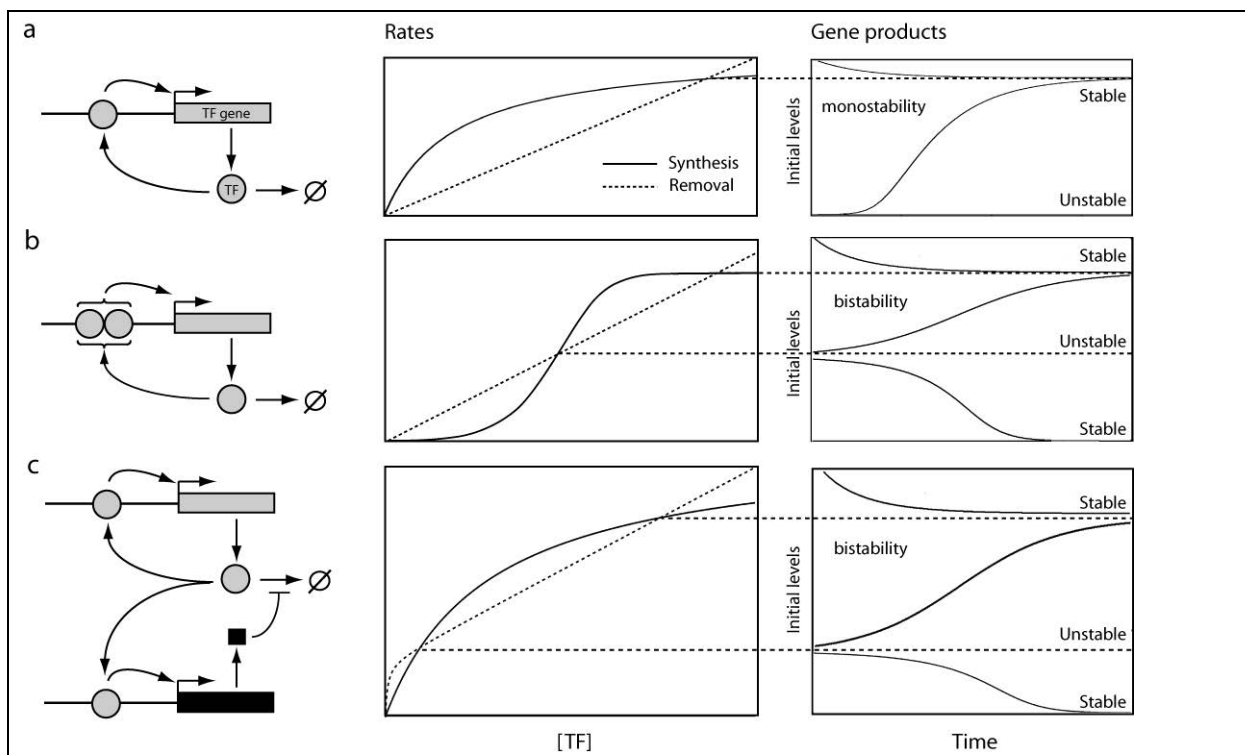


Figure 2. Positive feedbacks with a single gene.

The synthesis and degradation of the TF are two functions of its own concentration and the relative dependence on TF concentration of these two curves (left panels), determines if the system is monostable or bistable. The simple example shown is a direct positive feedback where a TF stimulates the expression of its own gene. (a) In case of non-cooperative action of the TF, the amplification loop is immediately primed upon a single event, so that the system is monostable. (b) In case of cooperativity illustrated in this scheme by TF dimerization, there can be a significant threshold of activation, leading to bistability. The right panels show how the bistable states are obtained when the rate of synthesis (plain line) and of removal (large dashes) equalize each other. (c) Bistability can also appear without sigmoidicity, as in the case of indirect cooperativity in which a target gene (black cassette) rapidly stimulated by the TF, encodes a product stabilizing either its mRNA or the protein. In addition to these deterministic mechanisms, bistability can also be obtained stochastically for systems in which gene expression burstiness allows to cross amplifications thresholds (not shown).

A classical way to obtain bistability and bimodal populations, is the cooperative action of the TF on its own gene promoter, for example through dimerization (Fig. 2b). In this simplistic case, the attractors are two points in a linear landscape, while for two interacting genes, the Waddington landscape is visualized as a 2D surface curved in a 3D plot whose bottom axes are the expression levels of A and B. Of course, larger systems are not representable graphically, but interestingly, the minimal circuit described above is sufficient to generate bistability and is the very common framework of many biological memory effects, as illustrated below.

## Positive feedbacks are pivotal components of memory circuits

Feedbacks are the backbones of cybernetics in all open systems, including those of biology. Beside negative feedbacks involved in homeostasis and periodic attractors, positive feedbacks have a particular importance in point attractor formation.

### ***State maintenance***

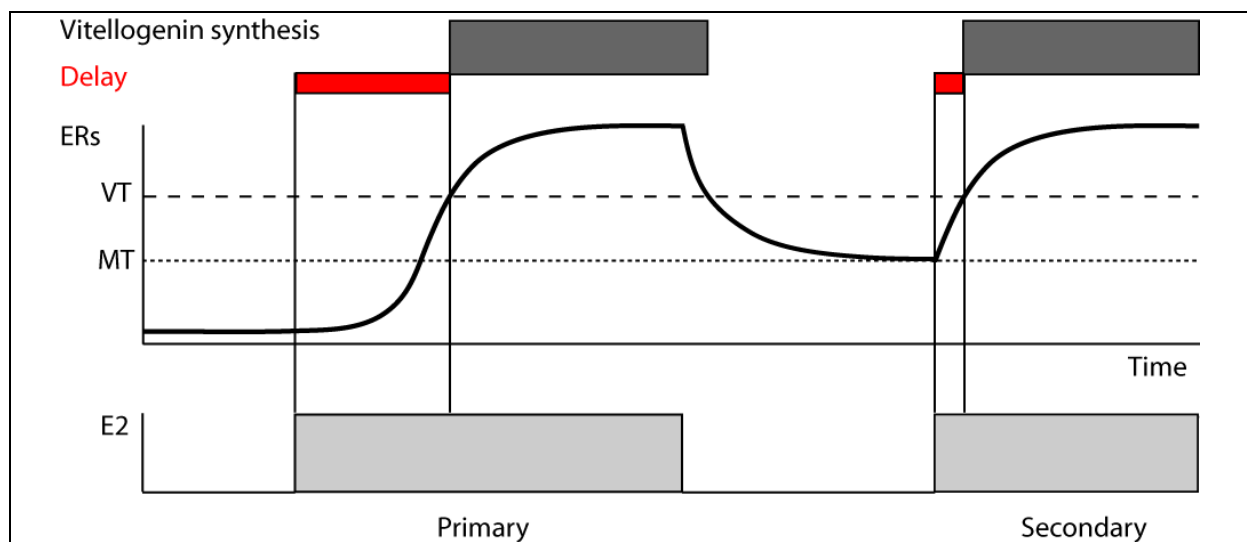
Many examples of epigenetic state maintenance are provided by bacteria. The most famous one is the induction of the lactose operon (*lac*) in *E. coli* (Cohn and Horibata, 1959; Novick and Weiner, 1957). Following treatment with a non-metabolizable inducer, the bacterial population splits into uninduced and fully-induced individual bacteria, which remain at this state over generations. This behaviour is called hysteretic since once primed, *lac* expression cannot be easily turned off and can survive transient periods of absence of the inducer. A central feature of this system is a positive feedback primed by a random event Novick and Weiner, 1957 and clearly drawn in (Cohn and Horibata, 1959), in which the *lac* product permease increases the entry of the inducer in the cell, which itself stabilizes the *lac* repressor in a form no longer capable of binding to DNA. The random commitment of *B. subtilis* towards a state competent for assimilating exogenous DNA, or not, also leads to binary states (Maamar et al, 2007). Given that the master TF governing this activity, named ComK, stimulates the expression of its own gene in a constitutive manner, the competent phenotype is in theory very stable. Such memory mechanisms driven by positive feedbacks also exist in eukaryotes. For example, the behaviour of aggressive cancer cells is reminiscent

of the mesenchymal phenotype, acquired after the epithelial-mesenchymal transition (EMT). It is directly inherited from unicellular organisms for which migration and active division are normal activities. In metazoans, these activities remained important during development or cicatrisation, but became undesirable in differentiated tissues for their associated risk of cancer. The problem is that the accidental commitment of cells into this attractor is relatively resistant to reversal, preventing metastatic cells from shifting back to the normal phenotype. One candidate feedback mechanism involved in the mesenchymal maintenance is made of a chain of disparate components including cytokines, TFs, kinases and micro-RNAs (Iliopoulos et al., 2009). Other such self-sustaining circuits exist between mechanical constraints and gene expression (Huang and Ingber, 2005). EMT is associated with expression of genes involved in cellular migration which goes with actin polymerization and in turn, actin polymerization has genetic effects favouring EMT, mediated by molecules such as MKL1 (Scharenberg et al., 2010).

### ***Memory of past signals***

Epigenetic memory has also been involved in the delayed effects of past, sometimes neonatal or fetal exposures to hormones or xeno-hormones, which have major outcomes in toxicology (Trichopoulos, 1990 ; Ho et al., 2006 ; Prins, 2008). Genetic circuits can keep alive the memory of hormones long after their removal. For example, it has long been evidenced that the production of the egg yolk in response to the sex hormone estradiol, is much stronger when the animals have already been stimulated by this hormone in the past. This famous phenomenon known as the "vitellogenesis memory effect", is observed in all egg-laying vertebrates. Even when not expressed, the vitellogenin gene, a marker of vitellogenesis, always remains competent for expression in liver, since it can be artificially turned on in male animals by administration of estrogens. Given that the chromatin modifications of the vitellogenin gene seem not durable enough to explain the vitellogenesis memory effect (Burch and Evans, 1986), we proposed a novel mechanism based on active circuits primed by the first exposure to estrogens and then maintained by endogenous factors after hormone withdrawal, without postulating persistent chromatin modifications (Nicol-Benoit et al., 2011). The principle of this memory is schematized in Fig. 3. The delay of response of the vitellogenin gene to hormone (E2) administration is strongly shortened during secondary administrations because the TF mediating this effet, a variant isoform of

the estrogen receptor (ERs), is more abundant in the cell. This phenomenon results from: (i) the fact that the ER gene expression is itself sensitive to E2 through a direct positive feedback mediated by a consensus ER-responsive element present in its promoter and (ii) once the ER amount in the cell exceeds a memory threshold (MT; lower dashed line which is equivalent to the unstable dashed line in Fig. 2b), it can no longer fall down to its ground level owing to maintenance of a positive feedback at low level in absence of hormone (this basal activity of ERs is not observed for normal ER isoforms). This basal activity is however unable to prime alone the feedback in virgin animals, thanks to a bistability threshold. Finally, the vitellogenin gene, is both strictly E2-dependent and requires a minimal amount of ER (VT, upper dashed line). These features are the consequence of a strongly cooperative action of ER on the non-consensus ER-responsive elements of the vitellogenin gene (Hill coefficient over 4) and allow that vitellogenin expression is always shut off in absence of E2.



**Figure 3. Dynamic model of the vitellogenesis effect.**

The key actor of the system is the short estrogen receptor  $\alpha$  (ERs) which stimulates its own expression. The initial priming of this feedback is necessarily triggered by estrogen administration (E2), but it is then sustained at low level (memory threshold MT) even in absence of E2 thanks to the basal hormone-independent activity of ERs. By this way, the delay between E2 stimulation and vitellogenin expression, which requires a minimum level of ERs (VT threshold), is strongly shortened in the secondary E2 administration.

A singular property of this mechanism is that: (i) it can be indefinitely perpetuated in absence of the hormone, contrary to the *lac* induced state, which progressively disappears after inducer withdrawal and permease degradation, and (ii) it is maintained in absence of

phenotypic change contrary to the competent state of *B. subtilis*, mediated by the signal-independent activity of *ComK*.

## Comparative properties of structural and dynamic memories

### ***Passive vs active maintenance***

While the conception of chromatin marks as static structures prevailed before discovering their dynamic nature, attractors have always been modeled as steady state phenomena underlied by continuous molecular exchanges. Structural signals can be compared to dead computer memories since once recorded and burned, information is maintained in disks, hard-disks or USB keys, as long as allowed by the longevity of the material. Conversely, dynamic circuits would disappear in absence of cellular refuelling with matter and energy, in the same manner that in computers, unsaved active files vanish in case of electricity black-out. Energy-dependent memory seems at first glance not safe enough, but in fact could be somewhat counter-intuitively, a safer mode of lifelong perpetuation of acquired information, given that living systems are never temporarily switched off, contrary to computing systems.

### ***Transfer of epigenetic information across cellular generations***

Both modes of epigenetic memory can survive cell division. On the one hand, attractors are preserved during mitosis thanks to the amounts of pre-synthesized molecules that can re-prime the circuits immediately after anaphasis. On the other hand, mechanisms exist to write out chromatin marks during DNA replication. The maintenance of the CG DNA methylation profile after replication can be simply achieved by the semi-conservative DNA replication and the mode of action of DNMT1 and its cofactors, recruited together with histone methylase by PCNA near the fork (Estève et *al.*, 2006). Chromatin proteins modifications are also duplicated by specialized machineries acting at the replication fork (Ng and Gurdon, 2008 ; Sarraf and Stancheva, 2004 ; Probst et *al.*, 2009 ; Moazed, 2011). In this respect, the inheritance of chromatin modifications is of the same nature that other

phenomena of structural inheritance mediated by the "guided assembly" of multi-macromolecular structures with "self-templating" properties (Jablonka and Lamb, 2005). The mitotic inheritance of certain marks has however been shown to progressively disappear in absence of restimulation, as for stress-induced ATF-2 dependent modifications (Seong et al., 2011).

### ***Transfer across organism generations***

The question is clearly different depending on whether the organisms correspond to single cells or to metazoans with sexual reproduction. Attractors have long been characterized in bacteria for their capacity to propagate over generations, but the question is much more complex for multicellular organisms. However, it received great interest since it could have fundamental importance in evolution, by providing a possible basis for the Lamarckian principle of the heredity of acquired characters. Chromatin modifications could in principle be very appropriate for carrying some epigenetic information to the offspring (Daxinger and Whitelaw, 2010). But most chromatin marks, including DNA methylation, are supposed to be reset between the generations. An exception to this rule is however known. The genes subject to parental imprinting in placental mammals, retain their gamete type-specific (sperm cell or ovule) methylation pattern in the early embryo, enabling it to distinguish between the paternal and the maternal gene copies to select one of them as an exclusive transcription template. It would be crucial to determine if other genes can evade methylation erasing, if these genes are differentially modified in germ cells, as supported by certain observations (Brykczynska et al., 2010), and if biases in germ cell chromatin modifications are robustly correlated to the living conditions, rather than randomly distributed.

### ***A role in the assimilation of environmental conditions?***

The possibility that experience- or environmentally-induced methylation can survive gametogenesis can be invoked to explain puzzling observations of transgenerational memory effects (Pembrey et al., 2006 ; Carone et al., 2010). This domain is somewhat related to the idea of genetic assimilation of (once again) Waddington (Waddington, 1952), but it raises a lot of open questions. To contribute to lamarkian evolution, chromatin

modifications should influence the probability of DNA mutation. This seems to be the case for CG DNA methylation, which favours C to T mutations, with evolutionary consequences (Galagan and Selker, 2004). Another critical point is to understand how germ cells, which remain so far the only admitted vectors of genetic information, could assimilate the acquired characters of body tissues. If it is conceivable that certain treatments can directly affect germ cells, such as nutrient deprivation or endocrine disruptors (Skinner et al., 2011), it is more difficult to understand how the repeated friction of the ventral skin of the ostrich, supposed by Waddington to have generated callosities (Slack, 2002), can epigenetically concern germ cells, unless postulating some intercellular transfer of information, for example ensured by RNA, such as in *C. elegans* (Alcazar et al., 2008). This possibility cannot be ruled out considering the growing evidence of extracellular RNA. Finally, other mechanisms can be involved in biased genetic evolution, including non-random meiotic recombination or gene network-based differential sensitivity to mutations, with which epigenetic marks can also interfere. There are definitely much more questions than answers in this domain (Daxinger and Whitelaw, 2010).

### ***Persistence of chromatin marking in given cell lineages***

Attractors are shaped by the topology of active circuits and can persist as long as the cell is refuelled with matter and free energy, a basic condition of life. Following the recent discovery of histone-demodification enzymes, chromatin marks now appear as the fragile resultants of the continuous antagonistic actions of modifiers and de-modifiers, which offers the possibility that linear changes in the ratio of modifying over de-modifying enzymes can cause brutal changes in the intensity of the covalent modifications (Goldbeter and Koshland, 1981). DNA methylation is also subject to active and rapid removal (Bhutani et al., 2011). These behaviours are in line with dynamic attractors but less consistent with their previously assumed locking action on cell fates, established during the embryonic stage and maintained throughout the life (Kundu and Peterson, 2009) but more interestingly and in a completely different perspective, dynamic exchanges of chromatin modifications can also have a role in stabilizing gene expression, as will be explained later.



### ***Coexistence of structural and epigenetic mechanisms in the classical memory of neurobiology***

Genetic and epigenetic phenomena also interfere in neurobiology (Changeux and Mikoshiba, 1978), where the concept of memory was of course first defined from our capacity to remind past experiences. The mechanisms underlying this classical memory remain far from fully understood, but it is intriguing to notice that as for cellular memory, dynamic and structural mechanisms coexist in the brain. It is also worth noting that chromatin modifications coincide with the transient process of memory acquisition in the hippocampus (Gupta et al., 2010). A learned neuronal system clearly acquired structural modifications, including dendritic spines (Hofer, 2010) and the stabilization or destabilization of synapses, but the phenomenon of memorization can itself involve neurone circuits with feedbacks (Lisman and Fallon, 1999 ; Li et al., 2006).

## **Why the attractor concept cannot be neglected in biology**

Let us first examine, in practice, the consequences of the attractor principles for scientific exploration in biology.

### ***Cellular behaviours emerge from collective molecule interactions***

Attractors complicate or hinder the traditional strategies of identification of candidate genes responsible for specific biological activities. Attractor-based causation is by essence collective, in sharp contrast with the linear chains of consecutive events classically drawn by biologists (Bornholdt, 2008). Even if certain nodes in a network can occasionally acquire master roles when they are the sites of entry of signals, if they are epistatic or hubs integrating many inputs, the evolution towards steady states is always determined collectively. This revision of causation principles nullifies certain traditional experiments. If transcriptome profiling is performed using mRNA extracted following perturbation, say for example 2 hours after hormone addition, the gene variations revealed by microarrays can correspond to transient behaviours (Huang et al., 2005) with poor predictive significance. Transcriptome analyses performed to compare gene expression profiles following natural

changes or experimental treatments, can appear disconcerting if we are looking for linear causation chains, because of the extensive transcriptome changes generally observed. Such massive reconfigurations of gene expression patterns are also obtained in experiments targeting a single gene, by genomic inactivation or siRNA. These generalized changes which are puzzling from the traditional perspective, are expected from the attractor view. The automatic self-reorganization of a network after removing a single node can give rise to a viable variant landscape, thanks to the robustness of landscapes that is likely to have been a central criterion of evolutionary selection. This can provide a possible mechanism by which somatic mutations can be buffered and explain why no defect is observed in many gene-inactivation experiments (knock out or KO). This result is deceiving if KOs are naïvely expected to give clear answers about the function of the targeted genes. For example, how to explain that when the celebrated actors of cell cycle (cyclins and CDK) are KO in mice, everything remains OK during the early embryonic development (Sherr and Roberts, 2004). Even more problematically, when phenotypic defects arise in KO experiments, they can in fact reflect only the aberrant attractors generated by node elimination, leading to erroneous conclusions about its role. Diffuse causality in attractors also explains why the forced overexpression of any molecule, either mutant or wild-type, can disrupt a lot of cellular activities. It would be not acceptable to focus only on certain of these modifications to draw falsely simple stories. Traditional approaches of molecular genetics remain useful, since experimental perturbations, in conjunction with "omic" analyses, could in principle allow to reconstruct mathematically the architectures of the underlying networks (Goutsias and Lee, 2007 ; Hecker et *al.*, 2009 ; Ulitsky et *al.*, 2010), for example thanks to in silico tools called GRN inference algorithms, developed to uncover in a bottom up manner the topology of a GRN (Greenfield et *al.*, 2010).

### ***A certain vanishing of the idea of gene function***

The principle of the epigenetic landscape challenges the traditional attempt to classify genes into precise functional categories. Conversely it supports the concept of biological tinkering, according to which individual gene products could be no more than tools, opportunistically adapted to many different complexes and functions (Jacob, 1977). This view satisfactorily explains how the apparent diversity of living organisms can be underlied by the same genes,

because it results from changes in the relative amounts of gene products rather than from differences in the functions of these products; a matter of regulation rather than of structure (Jacob, 1977 ; Carroll, 2000). In the same manner that a screwdriver can be used to make a stair and a closet, the same genes can be involved in distantly related cellular functions. For example, Toll genes are essential during *Drosophila* embryogenesis to specify the dorso-ventral axis and later, in the adult, contribute to immune defenses (Kambris et al., 2002). It is increasingly clear that many chromatin-modification machineries participate to different cellular activities including DNA repair and the control of cytoplasmic molecules. Genes previously associated with well defined functions, turn to contribute to other regulations, as NF- $\kappa$ B first classified as a main regulator of inflammation, is also involved in EMT (Iliopoulos et al., 2009 ; Wu et al., 2009). Moreover, certain genes completely evade our classification attempts. This is the case of the unique gene encoding both Histone H2A and Bufforin II (Cho et al., 2009): is it a chromatin component or an antimicrobial agent ? The biological effect of a signal can also depend on the attractor of the target cell. For instance, for quiescent differentiated cells, TGF $\beta$  is a safeguard signal, preventing the cells to divide, while conversely, if the cells are premalignant, TGF $\beta$  is a deleterious signal, aggravating the mesenchymal phenotype and leading to metastasis (Tian et al., 2011). The same ambiguity holds for the estrogen receptor  $\alpha$ , which is clearly involved in the initial onset of hormone-dependent breast cancers, but whose inactivation then promotes the metastatic evolution of these cancers. Such an ambivalence is also found at the level of chromatin modifications. The lysine-specific demethylase LSD1 (KDM1A), involved in cancer, can demethylate histone H3 at the level of lysine 4, favouring gene repression and at the level of lysine 9, favouring gene expression. These opposite actions are explained by the presence of LSD1 in different, mutually exclusive, protein complexes, complicating attempts at targeting LSD1 in anti-cancer strategies and which could explain striking discrepancies in the literature, where LSD1 is presented either as a marker of cancer (Lim et al., 2010), or inversely as an anti-metastatic molecule (Wang et al., 2009). Such contradictory observations are generally explained by introducing the notion of "context-specific" functions, which confusely reflects the idea of underlying networks. Because of these pleiotropic roles of molecules, designating a particular gene as a therapeutic target is rarely successful in practice, because of the possible unanticipated and boomerang effects of the

perturbations of this gene. In this respect, precise interactions (Colas, 2000) are more promising therapeutic target candidates than molecules by themselves.

## **Complexity, diversity and environment-sensitivity of genome-encoded attractors**

Based on the assumption that GRNs dictate the cellular fates and that chromatin modifications dictate gene expression patterns; a tremendous status is currently attributed to these modifications. Without denying their importance, their place in the complex cellular regulatory systems can however be reconsidered. Before examining the specific contributions of chromatin modifications, it is first necessary to survey some features of attractors.

### ***The complexity of biochemical networks***

GRNs should be understood as very large biochemical networks made of a wide diversity of molecules, including proteins, coding and non-coding RNAs, their different folding, localization and post-transcriptional modification states, the organic molecules synthesized by macromolecules, as well as the inorganic molecules whose concentrations in the different cellular compartments are also regulated by gene products. Primary transcripts are submitted to cascades of post-transcriptional and post-translational modifications, so that the functional interactions between the genes can be highly indirect. But since the machineries responsible for gene product modifications are themselves gene products, the idea that phenotypes are orchestrated by the genome can in principle be recovered. In the constellation of cellular molecules, genes are the unique components that are constant and not subject to birth and death. As the only invariant parameter of GRNs, the genome fully specifies the corpus of all possible attractors, whose number is very large but finite. Singularly, at a larger time scale, genomes result themselves from a circuitry mechanism in the biosphere system: a positive feedback based on the inverse relationship between information and entropy (Michel, 2011a). But more concretely in present cells with a given genome, the precise combination of molecular actors in the cell both reflects and determines an attractor. These bidirectional relationships, which are the essence of self-

organized cellular systems, also hold for chromatin modifications, which are both post-translational modifications and pre-transcriptional regulators.

### ***GRN attractors are environment-sensitive***

In the set of possible attractors inscribed in the genome, the one precisely occupied by every cell at every time point is selected by interplay between stochastic and deterministic phenomena, most of them resulting from the integration of exogenous signals. As explained in (Jablonka and Lamb, 2005), phenotype depends on a web of interactions between genes, their products and environment. Gene products are evolutionary prepared to be responsive to environmental conditions, so that the initial steps of chemical (hormones), electrical or mechanical signalling, are modifications of gene products, that can secondarily lead to a switch from the initial attractor to a new one. Pushing transiently gene product activities outside the range of values of an attractor basin, by post-translational activation or inactivation (through protein cleavage, degradation, phosphorylation, sumoylation or many other modifications), is sufficient to force the system to migrate to an adjacent basin, and ultimately to fall into a new attractor. Accordingly, the dramatic importance of the unbalanced dosage of non-mutant gene products on phenotypes, has long been revealed by trisomies.

### ***Evolutionary selected vs fortuitous attractors.***

The normal or "home" attractors (Baverstock, 2000), closer to the idea of "hardwired" program (Baverstock, 2011), are those resulting from evolutionary selection and robust enough to buffer strong molecular fluctuations. Certain vital stress responses are also strictly stereotyped (Bornholdt, 2008). These cellular activities correspond to profound attractor basins with acute valleys in the Waddington landscape, which can ensure the "canalisation" of invariant programs (Jablonka and Lamb, 2005) (once the cells have fallen into). Such attractors are likely to be predominant in development (Arnone and Davidson, 1997) and for eukaryotic cells embedded in homogeneous metazoan tissues, which have little degree of freedom. A level of flexibility in attractor selection is provided by non-deterministic quantitative and qualitative steps in the system, including for example, bursty transcription initiation, unsettled protein folding or stochastic post-translational modifications (Baverstock and Rönkkö, 2008). These loose controls offer the possibility for "unsheduled" conditions

and lifestyles to force, in a retrograde manner, the cell to fall into variant secondary attractors (Baverstock, 2000) that are the mere results of nonlinear interaction networks, certain of which, called garden-of-Eden states, are devoid of precursor states (Bornholdt, 2008). These moderately stable states, not evolutionary optimized and less occupied, can lead to pathological phenotypes. If, for example, the cell sequentially jumps between many secondary attractors and climb a rugged landscape to reach aberrant attractors close to the "archaic" attractor proposed to underly cancer (Huang, 2009; Huang and Ingber, 2006). In this respect, pathological states like cancer can, in some cases or at early stages, be purely epigenetic, without need for genetic mutations. Mutations drive evolution by imposing the automatic reshaping of the landscape, with genesis of new fortuitous attractors, translated into new phenotypes that provide the substrates of Darwinian selection. Conversely, the occupation of certain secondary attractors in a mutation-free landscape can influence the occurrence of mutations, for example if the expression of DNA-repair machineries is altered in this attractor. Since they are supposed to be much less stable than primary attractors [88], variant attractor are likely to not directly serve as selection substrates for metazoan evolution, but they could play this role for unicellular organisms and particularly in the clonal selection of cancer cells. This hypothesis contrasts with the more classical assumption that metastatic cells result from the accumulation of mutations, which has been contradicted by the possibility to reprogram the nuclei of malignant melanoma cells into all differentiation state-specific activities, showing that in fact most genes remained functional (Hochedlinger et al., 2004). This example suggests that cancer can arise in a mutation-independent manner, through abnormal cell positioning in a normal landscape, while mutations can irreversibly fix cancerous phenotypes by generating abnormal landscapes.

## **The multifaceted contribution of chromatin modifications in eukaryotic attractors**

### ***Chromatin modifications reflect underlying attractors***

In the face of the amazingly growing number of chromatin modifications recently identified, biologists hope that many of them are coordinated, to simplify the question. But from the

attractor view, everything is coordinated in the cell. Chromatin modifications are the result of the relative concentrations of a wide variety of actors, including the different chromatin modifying and de-modifying enzymes, their docking and/or activating factors, the TFs responsible for their expression and so on, which are all gene products and as such, belong altogether to high dimensional networks. The cooperative and combinatorial chromatin modifications are the emergent signatures of underlying attractors. As a matter of fact, if an aberrant DNA methylation pattern is erased using 5-aza-cytidine, then methylations are removed; but after removing 5-aza-cytidine, they reappear (McGarvey *et al.*, 2006), showing that the causes remain. In this experiment, DNA methylation appears as an epiphenomenon devoid of any decisional role. This conclusion is also suggested for histone modifications, by the surprising absence of phenotypic defects caused by the vast majority of mutant histones with deregulated modifications (Hyland *et al.*, 2005). As pointed in (Patshne, 2007), if one cannot deny that certain chromatin modifications are associated to active genes, this is also true for RNA polymerase. The purported activating or repressive chromatin modifications could be merely correlative rather than causes (Henikoff and Shilatifard, 2011). Moreover, they sometimes prove to have little influence on differentiation (Wu *et al.*, 2011). By contrast, the influence of TFs often prevails over pre-existing chromatin marks, as supported by the capacity of a quadron of TFs to reprogram a somatic cell into a stem-like cell, regardless of its previous structural epigenetic status (Takahashi *et al.*, 2007), or of a single TF (MyoD) to convert a fibroblast into a myoblast (Tapscott *et al.*, 1988). If TFs are strong enough, they can bypass epigenetic modifications (Koutroubas *et al.*, 2008). To be further provocative in this direction, let us reveal why the sub-nuclear organisation of heterochromatin domains is so important: to allow nocturnal vision. This surprising conclusion derives from a study showing that heterochromatin is confined in the nuclear center in rod receptors (Solovei *et al.*, 2009) whereas it is generally at the nuclear periphery in other cells (Guelen *et al.*, 2008). Since to our knowledge the genetic expression of rod receptors is as accurate as that of any other cell type, this study somehow discredits the numerous studies pointing to the dramatic importance of precise subnuclear organization for gene expression. The same conclusion is also suggested by the relevant results obtained for decades in gene promoter studies through transient expression assays, in which the transfected plasmids are likely to not obey to strict subnuclear localization and chromatin packaging rules.

### ***Chromatin modifications: a link among others in biochemical circuits.***

As parts of attractors, chromatin modifications can be involved both in the establishment of phenotypes by GRNs and conversely the readjustment of GRNs following stochastic or deterministic conditions changes. The transfer of information into chromatin marks is believed to be mediated by TFs, but it can also be more direct. For example, the energetic status of the cell has profound impact on chromatin modifications (Wallace and Fan, 2009), which is expected, in turn, to influence the expression of genes involved in energetic metabolism. It is illusive in this context to identify a causal hierarchy in a cyclic circuit. For example EMT induced by hypoxia (Pollard et al., 2008) or other means, upregulates the H3K9me3 demethylase JMJD2C/GASC, and conversely, overexpression of this molecule is oncogenic (Liu et al., 2009). The question is not to look for decisional actors in circuits but to understand how cells can fall into these circuits. In the Waddington's landscape, final cellular behaviours emerge from global molecular interactions and reciprocally, the whole network determines the effect of any node.

### ***Influences of chromatin modifications on GRN stochasticity.***

Chromatin modifications can stabilize attractors but they can also be the primers and the results of stochastic behaviours. Chromatin remodelers have been shown to affect transcription initiation steadiness (Raser and O'Shea, 2004). By slowing the reactivity of genes to TFs, they can also widen the time windows of gene activity and inactivity, and consequently the burstiness of transcript production, which is a primary generator of transcriptional noise (Pirone and Elston, 2004). Chromatin has also long been involved in the dramatic cell-to-cell heterogeneity called variegation (Fodor et al., 2010), in which the expression status of individual cells is binary at a given time, but without memory since the clonal descendants of this cell is repartitioned into expressing or non-expressing cells. The spreading of repressive chromatin through positive feedbacks initiated on both sides of genes can explain their binary expression status (Becskei et al., 2011).

At the opposite, certain marks have been shown to stabilize the steady-state gene expression levels in time (Muramoto et al., 2010). If cellular differentiation proceeds through differential gene closing by long-term heterochromatinization, then, the number of factors



necessary to regulate GRNs and particularly repressors, is expected to decrease, with beneficial impact on global noise. Interestingly, generalized euchromatinization (gene opening) and global increase of biosynthetic activity, such as that obtained by overexpressing *Myc* genes, as N-*Myc* (Cotterman et al., 2008), is associated to cancer. Hence, heterochromatin could be an essential tool developed for managing large genomes, that is not necessary in prokaryotes in which the number of repressors remains manageable.

### ***Roles of chromatin marks in GRN memory.***

Although the present review is aimed at suggesting that chromatin modifications are not the main guarantors of epigenetic memory, their participation in memory phenomena cannot be ruled out. The prolonged presence of chromatin modifications can play a role in mitotic bookmarking (Zaidi et al., 2011). Temporary bookmarking functions have not been extended to transgenerational batons, which remains so far purely speculative. If chromatin marks are catalysed by constitutively expressed chromatin-modifying enzymes, they can be regulated through the docking of these enzymes to DNA, by TFs, their corepressors and coactivators. But in this case, chromatin marks would merely behave as accessory modules of TFs and would not modify the standard description of GRNs. However, the turnovers of chromatin marks can be cancelled in case of disappearance of certain TFs and during critical phases of the cellular physiology such as mitosis, during which global gene expression is temporarily shut off and until the steady state attractor conditions are restored. Another possibility to achieve this goal would be to remove completely one enzymatic system (of modification or demodification) from the cell. Finally, one can also imagine that chromatin packaging triggered by the modifications, in turn renders them inaccessible to the de-modifying enzymes, in a hierarchical chain of events (Reik, 2010). But the existence of impenetrable forms of chromatin is questioned (Sha et al., 2010). In fact, the more problematic feature of chromatin marks opposed to the role of chromatin modifications in epigenetic memory, is their dynamic nature. Histone methylations have long been demonstrated experimentally to be transient. H3 histones are rapidly methylated in Ehrlich tumor cells, with an apparent rate of 0.21 /hour and the turnover of histone-bound acetate and phosphate groups is even more rapid (Thomas et al., 1975). Moreover, the observations of these authors imply that the antagonistic methylase and demethylase activities are present simultaneously in the cells since steady state values of mono-, di- and tri-methylated H3 rapidly stabilize at

intermediate levels. To further assess the dynamic vs static status of chromatin marks, it will be necessary to quantify the renewal cycle duration of chromatin modifications in non-dividing cells, through a pulse-chase method similar to that used to monitor nucleosome renewal (Deal and Henikoff, 2010). The role of chromatin marks in epigenetic memory, which is highly questionable when envisioned as structural marks, can be recovered under the dynamic circuitry perspective, as discussed below.

### ***Possible additional deterministic roles of chromatin marks***

Chromatin marks can also work as would do stable TFs, by recruiting transcription machineries. For example, the general transcription factor TFIID is recruited by chromatin patches enriched in H3K4me3, the hallmark of active promoters (Vermeulen *et al.*, 2007). Beside these roles in static memory during cellular and organism generations, the lagging effects of chromatin modifications could also introduce slow variables in dynamic networks. Delays in TF action could regulate the amplitude of periodic attractors generated by negative circuits and could destabilize or induce oscillations in stationary states. Finally, there is a lot of chromatin modifications: methylation, phosphorylation, acetylation, ubiquitination and many others (Bannister and Kouzarides, 2011; Tan *et al.*, 2011), most of them involving antagonistic enzymes, which opens the possibility of alternative roles of these modifications in the sharpness of transcriptional decisions through the so-called zero-order ultrasensitivity, initially established for the phosphorylation - dephosphorylation cycle (Goldbeter and Koshland, 1981) or in the hysteretic modification of chromosome regions. This latter possibility, linking chromatin modifications to dynamic circuits, is based on a feedback mechanism propagating and reinforcing local histone marks through the recruitment of the corresponding histone modifying enzymes (Dodd *et al.*, 2007). Such positive feedbacks have also been involved in the transfer of information between parental and newly synthesized nucleosomes during replication (Annunziato, 2005). In yeast, a positive feedback in histone deacetylation is ensured by the reiterative recruitment of histone deacetylases (Rusché *et al.*, 2002). Similarly, H3K9me3 can recruit Heterochromatin Protein 1 alpha (HP1a) which then recruits methyl-transferases increasing the methylation of nearby histones (Lachner *et al.*, 2001). Accordingly, even the long-term maintenance of constitutive heterochromatin is ensured by dynamic interactions with HP1 (Cheutin *et al.*, 2003). Hence, a picture emerges in which dynamic chromatin modifications contribute to the hysteresis and the stability of

cellular fates through self-templating mechanisms. In case of cellular reprogramming, these enzymatic circuits would still remain very useful by increasing the sharpness of the switches, thereby allowing the cell to take well-defined decisions. Finally, another contribution of chromatin to attractor formation is offered by chromatin-mediated TF cooperativity, as suggested for a particular type of structural chromatin modification: the displacement of nucleosomes along DNA by ATP-dependent chromatin modelers. This phenomenon is also dynamic and could play a role in hierarchical cooperativity between TFs (Michel, 2011b), a mechanism involved in the genesis of nonlinear relations in GRNs, necessary for creating multistability and providing the thresholds necessary for Boolean modeling. Covalent marking can work as well for mediating hierarchical cooperativity between pioneer TFs that set the marks necessary to subsequent TFs.

## Conclusion

Attractors and the epigenetic landscapes of Waddington are basically not biological activities but inevitable emergent physical entities applicable to any nonlinear interaction network. These general behaviours hold in different disciplines, for systems made of different components, which led von Bertalanffy to incorporate them into a "general systems theory" whose rules are transposable between distantly related fields, from quantum physics to economy (Bertalanffy, 1950). As a matter of fact for GRNs, studies examining the outcomes of various circuitries (Shoval and Alon, 2010), use exclusively mathematical tools. This could explain why they long remained ignored by the biologist community, when taking them into account would shed a new light on causation concepts. It is worth noting that any randomly constructed network spontaneously organizes into a given landscape with emergent properties, as long shown in Boolean simulations (Kauffman, 1969) mimicking extreme cases of nonlinear, step-like interactions. This phenomenon, coupled to Darwinian selection, typically illustrates the principle said of self-organization out of equilibrium. According to this scenario of system evolution, the combination of interactions between the different genes from the same genome, which are mediated by *cis* (promoter motifs) and *trans* (TFs and their regulators) factors, have been evolutionary selected such that gene expression patterns converge towards discrete sets of values corresponding precisely to physiologically

useful cellular phenotypes. By this way, the genuine targets of Darwinism are attractors rather than individual genes. When adapted to GRNs, the attractor view is much more elegant and integrated than the traditional causal reasoning in biology. Specifically, the attractor-based interpretation of development has the advantage to explain both: (i) the commitment of pluripotent cells and (ii) the memory of lineage-committed cells. This view also lightens previously unexplained observations, such as the fact that progenitor cells express the genes that will be active in the derived cell types (Hu et al., 1997). This feature has an overlooked practical importance because many experiments would have been precluded in its absence. Indeed, to make engineered mouse ES cells for generating gene-inactivated mice, it is first necessary to select them by using appropriate resistance-encoding cassettes, whose expression should be driven by the promoters of differentiation genes.

In spite of the success of the dynamic landscape principle, the assumption that epigenetic memory should be structurally engraved in the chromosomes, remains highly predominant. Three reasons can be proposed to explain this situation: (i) Chromatin marks are (misleadingly) more intuitive at first glance since once inscribed, they are expected to be maintained passively, while attractors are necessarily active and energy-dependent. (ii) The predominance of chromatin epigenetics can also result from a misinterpretation of chromatin marks as molecular flags, specifying the sets of genes to be expressed or repressed. This static view neglects the fact that the degree of chromatin modification quantified by biochemical approaches, is the result of steady state balances between continuously active chromatin-modifying and de-modifying enzymes. (iii) Finally, the highjacking of epigenetics by the chromatin community can be unintentional and due to the fact that the concept of attractor remains largely confined in the theoretical and modeling literature, even if pedagogical reviews on the subject are available, such as (Huang, 2009). It is striking that animal development is envisioned either in term of chromatin marks (Reik, 2007) or of attractors (MacArthur et al., 2009), with little connections between these interpretations. Of course, the true nature of development is likely to be somewhere between these extreme conceptions. For example, the two modes of memory compared in the present study can cooperate (Dodd et al., 2007) and are mixed together in a coherent mechanism fundamentally different from the principle of stable marking. The term

epigenomics sometimes used, though still ambiguous, would be preferable to not pollute the more general, original meaning of epigenetics.

It will be important to link more tightly attractors and quantitative biological parameters. This rapprochement would benefit from collaborations between theorists and biologists (Huang, 2011b), but the task will be difficult, considering the multiplicity of levels of regulation in the cell, certain ones remaining poorly explored, such as RNA editing (Hayden, 2011). Shifting from purely correlative to integrative approaches is a major challenge for future investigations. Together, the wide range of reciprocal influences, deterministic or non-deterministic, between chromatin modifications and cellular fates, as well as their dynamic nature, compromise the initial idea that cataloging chromatin modification patterns associated to physiological or pathological situations by high throughput array technologies and sophisticated bioinformatics, can allow to unravel functional schemes. Analyzing exhaustively the physiological and pathological cellular states is virtually impossible. Moreover, extensive catalogues will provide useful informations but will not reveal some Rosetta stone of chromatin hieroglyphs. The same illusion was common several years ago, when systematic genome sequencing was naively expected to allow the decryption of life, whereas living systems are plastic and clearly not equivalent to computers (Bornholdt, 2008). The quest for a self-consistent hidden user manual of chromatin modifications could be an impasse. Certain specialists in the field of gene expression regretted that such descriptive research programs divert too substantial funding resources (Madhani *et al.*, 2008). As for biochemical attractors, self-organization of searchers and ideas could be more productive than managerial guidelines based on presupposals.

Whatever the difficulty of dissecting real biological attractors, it is worth noting that contrary to chromatin marking, they are already manipulable as tools in synthetic biology approaches, for example to design memory devices (Burril and Silver, 2010), whereas chromatin marks are not easily programmable since they result from too complex and intricated regulations. Making simple artificial attractors is easier than modifying natural attractors.



# Annexe





## Annexe : Modélisation plus détaillée d'un attracteur en fonction de la concentration totale de F

---

La modélisation présentée en partie III B de l'introduction est simplifiée, en se basant sur le développement utilisé dans la littérature pour un facteur de transcription dimérisable (Keller, 1995). En conservant le circuit d'auto-amplification à un gène présenté en figure 3, nous pouvons reprendre le raisonnement mais en tenant compte cette fois-ci de la concentration totale du facteur F, c'est-à-dire en prenant en compte les deux formes (monomériques et dimériques) du facteur. De plus, nous introduisons dans la modélisation une faible expression basale du facteur. Comme on le verra, même s'il n'existe plus de formulation explicite générale du paysage de Waddington, ce schéma plus précis donne un résultat comparable en terme d'attracteurs.

### Quasi équilibre entre l'ADN et le facteur dimérisé.

Comme lors de la modélisation précédente, nous considérons que les interactions entre le facteur de transcription et l'ADN est rapide en comparaison de la dynamique de l'expression génétique. Nous utilisons donc la séparation d'échelle des temps (Michel, 2009) et la constante d'équilibre peut être assimilée à un ratio de concentration. La tendance de dissociation  $K/[F_2]$  est sans unité et dépend de la constante d'équilibre absolu  $K$  et de la concentration en  $[F_2]$ . Elle correspond au ratio d'ADN libre sur l'ADN lié :

$$\frac{K}{[F_2]} = \frac{[ADN_0]}{[ADN/F_2]} \quad (1)$$

où  $[ADN_0]$  et  $[ADN/F_2]$  doivent être compris comme les temps durant lesquels le promoteur est respectivement libre ou occupé.

L'ADN peut être soit libre soit occupé par un dimère de F, mais pas par un monomère de F. Ainsi,  $[ADN_{tot}] = [ADN_0] + [ADN/F_2]$  et sa fraction d'occupation est la fraction de temps pendant laquelle l'ADN est occupé par  $F_2$  et correspond à

$$Y = \frac{[ADN / F_2]}{[ADN_0] + [ADN / F_2]} \quad (2a)$$

qui peut être transformé en utilisant la valeur d'  $[ADN / F_2]$  donnée par l'équation (1)

$$Y = \frac{[ADN_0][F_2]}{K[ADN_0] + [ADN_0][F_2]} \quad (2b)$$

qui peut se simplifier en

$$Y = \frac{[F_2]}{K + [F_2]} \quad (2c)$$

**Quasi équilibre de dimérisation (D).**

$$D = \frac{[F_2]}{[F_1]^2} \quad (3a)$$

d'où

$$[F_2] = D[F_1]^2 \quad (3b)$$

et la somme des formes monomériques ou dimériques du facteur est la concentration totale en facteur

$$[F]_{tot} = 2[F_2] + [F_1] \quad (3c)$$

Les équations (3b, 3c) donnent

$$[F]_{tot} = D([F]_{tot} - 2[F_2])^2 \quad (4)$$

Et donc  $[F_2]$  est une solution acceptable d'une équation du second degré

$$4D[F_2]^2 - (1 + 4D[F]_{tot})[F_2] + D[F]_{tot}^2 = 0 \quad (5)$$

qui est

$$[F_2] = (1 + 4D[F]_{tot} - \sqrt{1 + 8D[F]_{tot}}) / 8D \quad (6)$$

### Modélisation du circuit.

L'évolution de  $[F]_{tot}$  dans le temps dépend du ratio entre sa synthèse et son élimination. Son taux de synthèse est la fréquence maximale de transcription «  $s$  », pondérée par la fraction de temps pendant laquelle le facteur est présent sur le promoteur ( $\gamma$ ).

La disparition de  $[F]_{tot}$  est simplement proportionnelle à sa quantité, avec un taux constant «  $r$  » (retrait). Nous obtenons alors une équation différentielle ordinaire

$$\frac{d[F]_{tot}}{dt} = s \frac{[F_2]}{K + [F_2]} - r[F]_{tot} \quad (7)$$

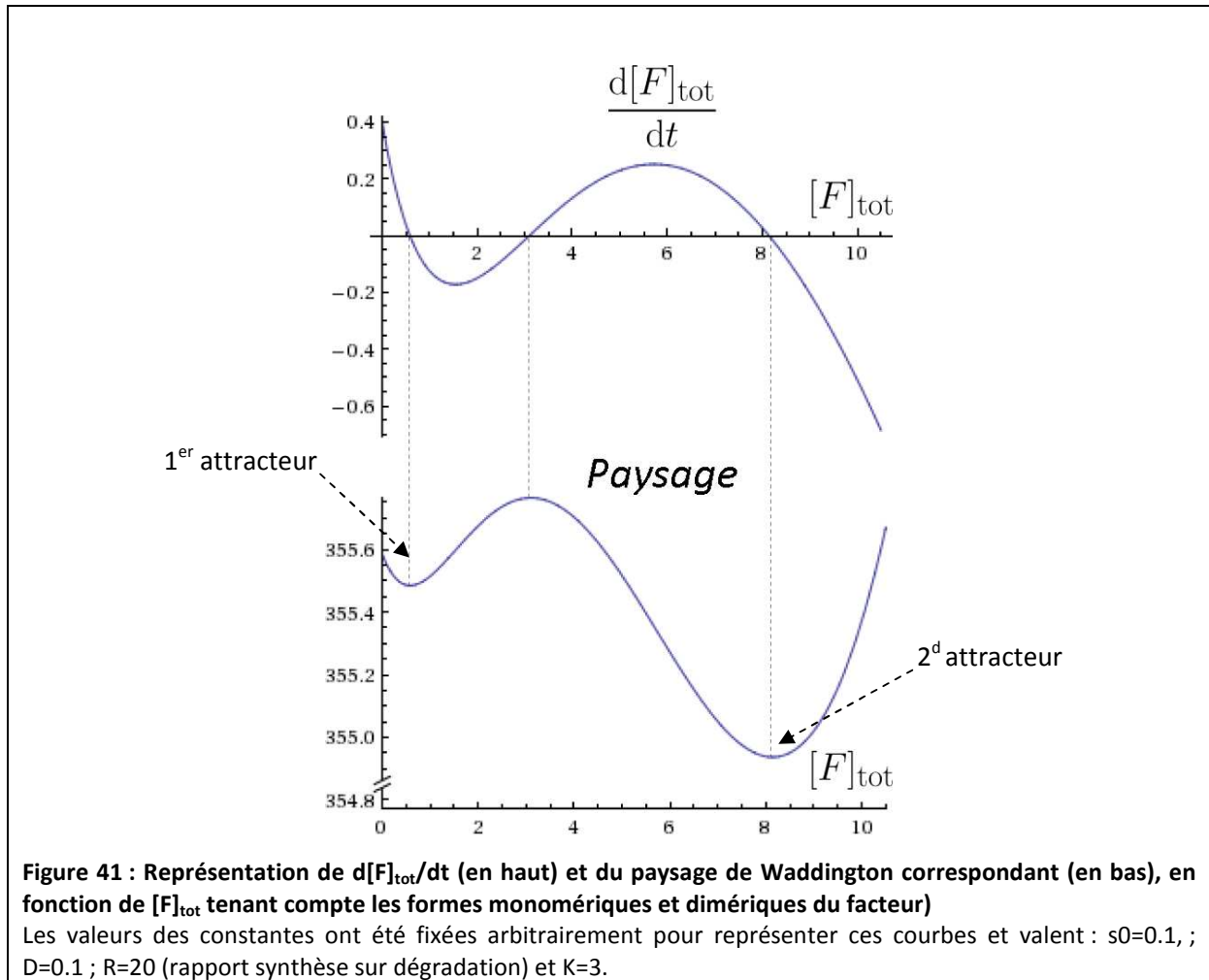
qui peut être exprimée en fonction de  $[F]_{tot}$ , simplement en remplaçant  $[F_2]$  par sa valeur définie dans l'équation (6)

$$\frac{d[F]_{tot}}{dt} = s \frac{1 + 4D[F]_{tot} - \sqrt{1 + 8D[F]_{tot}}}{1 + 8DK + 4D[F]_{tot} - \sqrt{1 + 8D[F]_{tot}}} - r[F]_{tot} \quad (8)$$

Enfin, pour autoriser les changements vers un fort niveau d'expression, le facteur doit être synthétisé indépendamment de sa propre action d'auto-stimulation. Ce taux de synthèse à faible fréquence est appelé  $s_0$ .

$$\frac{d[F]_{tot}}{dt} = s_0 + s_{max} \frac{1 + 4D[F]_{tot} - \sqrt{1 + 8D[F]_{tot}}}{1 + 8DK + 4D[F]_{tot} - \sqrt{1 + 8D[F]_{tot}}} - r[F]_{tot} \quad (9)$$

Cette équation, plus précise que celle présentée dans le corps de la thèse, donne les profils d'expression et le paysage de Waddington représenté sur la figure 41.



**Références**

**bibliographiques**



## Références bibliographiques

---

### A

- Aft, R.L., Zhang, F.W., Gius, D.**, 2002. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br. J. Cancer* 87, 805–812.
- Albaugh, B.N., Arnold, K.M., Lee, S., Denu, J.M.**, 2011. Autoacetylation of the histone acetyltransferase Rtt109. *J. Biol. Chem.* 286, 24694–24701.
- Alcazar, R.M., Lin, R., Fire, A.Z.**, 2008. Transmission dynamics of heritable silencing induced by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 180, 1275–1288.
- Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M., Chambon, P.**, 1993. Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *The EMBO Journal* 12, 1153.
- Annunziato, A.T.**, 2005. Split decision: what happens to nucleosomes during DNA replication? *J. Biol. Chem.* 280, 12065–12068.
- Arnone, M.I., Davidson, E.H.**, 1997. The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems. *Development* 124, 1851–1864.
- Atkinson, D.E., Walton, G.M.**, 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J. Biol. Chem.* 242, 3239–3241.

### B

- Bain, D.L., Heneghan, A.F., Connaghan-Jones, K.D., Miura, M.T.**, 2007. Nuclear Receptor Structure: Implications for Function. *Annual Review of Physiology* 69, 201–220.
- Baker, H.J., Shapiro, D.J.**, 1978. Rapid accumulation of vitellogenin messenger RNA during secondary estrogen stimulation of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.* 253, 4521–4524.
- Bancaud, A., Huet, S., Daigle, N., Mozziconacci, J., Beaudouin, J., Ellenberg, J.**, 2009. Molecular crowding affects diffusion and binding of nuclear proteins in heterochromatin and reveals the fractal organization of chromatin. *EMBO J.* 28, 3785–3798.
- Bannister, A.J., Kouzarides, T.**, 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 21, 381–395.
- Barton, M.C., Shapiro, D.J.**, 1988. Transient administration of estradiol-17 beta establishes an autoregulatory loop permanently inducing estrogen receptor mRNA. *PNAS* 85, 7119–7123.
- Baverstock, K.**, 2000. Radiation-induced genomic instability: a paradigm-breaking phenomenon and its relevance to environmentally induced cancer. *Mutat. Res.* 454, 89–109.
- Baverstock, K., Rönkkö, M.**, 2008. Epigenetic regulation of the mammalian cell. *PLoS ONE* 3, e2290.
- Baverstock, K.**, 2011. A comparison of two cell regulatory models entailing high dimensional attractors representing phenotype. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 443–449.

- Baysal, B.E., Ferrell, R.E., Willett-Brozick, J.E., Lawrence, E.C., Myssiorek, D., Bosch, A., Mey, A. van der, Taschner, P.E.M., Rubinstein, W.S., Myers, E.N., Richard, C.W., Cornelisse, C.J., Devilee, P., Devlin, B.,** 2000. Mutations in SDHD, a Mitochondrial Complex II Gene, in Hereditary Paraganglioma. *Science* 287, 848–851.
- Becskei, A., Séraphin, B., Serrano, L.,** 2001. Positive feedback in eukaryotic gene networks: cell differentiation by graded to binary response conversion. *EMBO J* 20, 2528.
- Becskei, A., Scherrer, S., Kelemen, J.Z., Murray, A.E.,** 2011. Modeling of chromosomal epigenetic silencing processes. *Transcription* 2, 173–178.
- Behrens, J., Vakaet, L., Friis, R., Winterhager, E., Van Roy, F., Mareel, M.M., Birchmeier, W.,** 1993. Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J. Cell Biol.* 120, 757–766.
- Ben Sahra, I., Laurent, K., Giuliano, S., Larbret, F., Ponzio, G., Gounon, P., Le Marchand-Brustel, Y., Giorgetti-Peraldi, S., Cormont, M., Bertolotto, C., Deckert, M., Auburger, P., Tanti, J.-F., Bost, F.,** 2010a. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 70, 2465–2475.
- Ben Sahra, I., Tanti, J.-F., Bost, F.,** 2010b. The combination of metformin and 2 deoxyglucose inhibits autophagy and induces AMPK-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Autophagy* 6.
- Benecke, A., Chambon, P., Gronemeyer, H.,** 2000. Synergy between estrogen receptor  $\alpha$  activation functions AF1 and AF2 mediated by transcription intermediary factor TIF2. *EMBO reports* 1, 151.
- Bensaad, K., Tsuruta, A., Selak, M.A., Vidal, M.N.C., Nakano, K., Bartrons, R., Gottlieb, E., Vousden, K.H.,** 2006. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell* 126, 107–120.
- Bertalanffy, L.,** 1950. An outline of general system theory. *Brit J Philos Sci.* 1 :134-165
- Beuving, G., Gruber, M.,** 1971. Induction of phosphatidyl synthesis in roosters by estradiol injection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 232, 529–536.
- Bhattacharya, S., Zhang, Q., Andersen, M.E.,** 2011. A deterministic map of Waddington’s epigenetic landscape for cell fate specification. *BMC Syst Biol* 5, 85.
- Bhutani, N., Burns, D.M., Blau, H.M.,** 2011. DNA demethylation dynamics. *Cell* 146, 866–872.
- Bird, A.,** 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16, 6–21.
- Bluemlein, K., Grüning, N.-M., Feichtinger, R.G., Lehrach, H., Kofler, B., Ralser, M.,** 2011. No evidence for a shift in pyruvate kinase PKM1 to PKM2 expression during tumorigenesis. *Oncotarget* 2, 393–400.
- Bornholdt, S.,** 2008. Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations. *J R Soc Interface* 5 Suppl 1, S85–94.
- Bourguet, W., Germain, P., Gronemeyer, H.,** 2000. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications. *Trends in Pharmacological Sciences* 21, 381–388.
- Brabletz, S., Brabletz, T.,** 2010. The ZEB/miR-200 feedback loop--a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 11, 670–677.



- Brandt, D.T., Xu, J., Steinbeisser, H., Grosse, R.,** 2009. Regulation of myocardin-related transcriptional coactivators through cofactor interactions in differentiation and cancer. *Cell Cycle* 8, 2523–2527.
- Brickner, J.H.,** 2010. Transcriptional Memory: Staying in the Loop. *Current Biology* 20, R20–R21.
- Brion, F., Tyler, C., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J., Garric, J., Flammarion, P.,** 2004. Impacts of 17 $\beta$ -estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 68, 193–217.
- Brock, M.L., Shapiro, D.J.,** 1983. Estrogen stabilizes vitellogenin mRNA against cytoplasmic degradation. *Cell* 34, 207–214.
- Brykczynska, U., Hisano, M., Erkek, S., Ramos, L., Oakeley, E.J., Roloff, T.C., Beisel, C., Schübeler, D., Stadler, M.B., Peters, A.H.F.M.,** 2010. Repressive and active histone methylation mark distinct promoters in human and mouse spermatozoa. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 679–687.
- Bunone, G., Briand, P.A., Miksicek, R.J., Picard, D.,** 1996. Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *The EMBO Journal* 15, 2174.
- Burch, J.B., Evans, M.I.,** 1986. Chromatin structural transitions and the phenomenon of vitellogenin gene memory in chickens. *Molecular and Cellular Biology* 6, 1886.
- Burrige, K., Wennerberg, K.,** 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167–179.
- Burrill, D.R., Silver, P.A.,** 2010. Making cellular memories. *Cell* 140, 13–18.
- Burrill, D.R., Inniss, M.C., Boyle, P.M., Silver, P.A.,** 2012. Synthetic memory circuits for tracking human cell fate. *Genes Dev.* 26, 1486–1497.

## C

- Carone, B.R., Fauquier, L., Habib, N., Shea, J.M., Hart, C.E., Li, R., Bock, C., Li, C., Gu, H., Zamore, P.D., Meissner, A., Weng, Z., Hofmann, H.A., Friedman, N., Rando, O.J.,** 2010. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. *Cell* 143, 1084–1096.
- Carroll, S.B.,** 2000. Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell* 101, 577–580.
- Carson, J.A., Fillmore, R.A., Schwartz, R.J., Zimmer, W.E.,** 2000. The smooth muscle gamma-actin gene promoter is a molecular target for the mouse bagpipe homologue, mNkx3-1, and serum response factor. *J. Biol. Chem.* 275, 39061–39072.
- Cavalli, G.,** 2011. From linear genes to epigenetic inheritance of three-dimensional epigenomes. *J. Mol. Biol.* 409, 54–61.
- Changeux, J.P., Mikoshiba, K.,** 1978. Genetic and “epigenetic” factors regulating synapse formation in vertebrate cerebellum and neuromuscular junction. *Prog. Brain Res.* 48, 43–66.
- Cherry, J.L., Adler, F.R.,** 2000. How to make a Biological Switch. *Journal of Theoretical Biology* 203, 117–133.
- Cheutin, T., McNairn, A.J., Jenuwein, T., Gilbert, D.M., Singh, P.B., Misteli, T.,** 2003. Maintenance of stable heterochromatin domains by dynamic HP1 binding. *Science* 299, 721–725.

- Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., Stepien, G.,** 2011. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 562–567.
- Cho, J.H., Sung, B.H., Kim, S.C.,** 2009. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1564–1569.
- Christofk, H.R., Vander Heiden, M.G., Harris, M.H., Ramanathan, A., Gerszten, R.E., Wei, R., Fleming, M.D., Schreiber, S.L., Cantley, L.C.,** 2008. The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* 452, 230.
- Clem, B., Telang, S., Clem, A., Yalcin, A., Meier, J., Simmons, A., Rasku, M.A., Arumugam, S., Dean, W.L., Eaton, J., Lane, A., Trent, J.O., Chesney, J.,** 2008. Small-molecule inhibition of 6-phosphofructo-2-kinase activity suppresses glycolytic flux and tumor growth. *Mol. Cancer Ther.* 7, 110–120.
- Cohn, M., Horibata, K.,** 1959. Inhibition by glucose of the induced synthesis of the beta-galactoside-enzyme system of *Escherichia coli*. Analysis of maintenance. *J. Bacteriol.* 78, 601–612.
- Colas, P.,** 2000. Combinatorial protein reagents to manipulate protein function. *Curr Opin Chem Biol* 4, 54–59.
- Cooney, A.J., Lee, C.T., Lin, S.-C., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J.,** 2001. Physiological function of the orphans GCNF and COUP-TF. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 12, 247–251.
- Cotterman, R., Jin, V.X., Krig, S.R., Lemen, J.M., Wey, A., Farnham, P.J., Knoepfler, P.S.,** 2008. N-Myc regulates a widespread euchromatic program in the human genome partially independent of its role as a classical transcription factor. *Cancer Res.* 68, 9654–9662.

## D

- Darzacq, X., Shav-Tal, Y., de Turris, V., Brody, Y., Shenoy, S.M., Phair, R.D., Singer, R.H.,** 2007. In vivo dynamics of RNA polymerase II transcription. *Nat Struct Mol Biol* 14, 796.
- Daxinger, L., Whitelaw, E.,** 2010. Transgenerational epigenetic inheritance: more questions than answers. *Genome Res.* 20, 1623–1628.
- De Bock, K., Mazzone, M., Carmeliet, P.,** 2011. Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? *Nat Rev Clin Oncol* 8, 393–404.
- De Craene, B., van Roy, F., Berx, G.,** 2005. Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell. Signal.* 17, 535–547.
- De Jong, H.,** 2002. Modeling and simulation of genetic regulatory systems: a literature review. *J. Comput. Biol.* 9, 67–103.
- Deal, R.B., Henikoff, S.,** 2010. Catching a glimpse of nucleosome dynamics. *Cell Cycle* 9, 3389–3390.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., Thompson, C.B.,** 2008. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metabolism* 7, 11–20.
- Delbrück, M.,** 1949. Discussion. In : Unités biologiques douées de continuité génétique. *Colloques Internationaux CNRS.* 8, 33-35
- Di Chiro, G., Hatazawa, J., Katz, D.A., Rizzoli, H.V., De Michele, D.J.,** 1987. Glucose utilization by intracranial meningiomas as an index of tumor aggressivity and probability of recurrence: a PET study. *Radiology* 164, 521–526.

- Dodd, I.B., Micheelsen, M.A., Sneppen, K., Thon, G., 2007.** Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification. *Cell* 129, 813–822.
- Dodson, R.E., Shapiro, D.J., 1997.** Vigilin, a Ubiquitous Protein with 14 K Homology Domains, Is the Estrogen-inducible Vitellogenin mRNA 3'-Untranslated Region-binding Protein. *J. Biol. Chem.* 272, 12249–12252.

## E

- Elstrom, R.L., Bauer, D.E., Buzzai, M., Karnauskas, R., Harris, M.H., Plas, D.R., Zhuang, H., Cinalli, R.M., Alavi, A., Rudin, C.M., Thompson, C.B., 2004.** Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 64, 3892–3899.
- Engelman, J.A., Chen, L., Tan, X., Crosby, K., Guimaraes, A.R., Upadhyay, R., Maira, M., McNamara, K., Perera, S.A., Song, Y., Chirieac, L.R., Kaur, R., Lightbown, A., Simendinger, J., Li, T., Padera, R.F., García-Echeverría, C., Weissleder, R., Mahmood, U., Cantley, L.C., Wong, K.-K., 2008.** Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat. Med.* 14, 1351–1356.
- Estève, P.-O., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F., Pradhan, S., 2006.** Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev.* 20, 3089–3103.
- Evans, J.M.M., Donnelly, L.A., Emslie-Smith, A.M., Alessi, D.R., Morris, A.D., 2005.** Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* 330, 1304–1305.

## F

- Ferrel, J.E Jr., 2012.** Bistability, bifurcations, and Waddington's epigenetic landscapes. *Curr Biol.* 2012 Jun 5;22(11).
- Fodor, B.D., Shukeir, N., Reuter, G., Jenuwein, T., 2010.** Mammalian Su(var) genes in chromatin control. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 471–501.
- Foster, D.V., Foster, J.G., Huang, S., Kauffman, S.A., 2009.** A model of sequential branching in hierarchical cell fate determination. *J. Theor. Biol.* 260, 589–597.
- Fraga, M.F., Herranz, M., Espada, J., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Erkek, E., Bozdogan, O., Peinado, H., Niveleau, A., Mao, J.-H., Balmain, A., Cano, A., Esteller, M., 2004.** A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant DNA methylation patterns of human tumors. *Cancer Res.* 64, 5527–5534.
- Franco, D.L., Mainez, J., Vega, S., Sancho, P., Murillo, M.M., de Frutos, C.A., Del Castillo, G., López-Blau, C., Fabregat, I., Nieto, M.A., 2010.** Snail1 suppresses TGF-beta-induced apoptosis and is sufficient to trigger EMT in hepatocytes. *J. Cell. Sci.* 123, 3467–3477.
- Fu, J., Qin, L., He, T., Qin, J., Hong, J., Wong, J., Liao, L., Xu, J., 2011.** The TWIST/Mi2/NuRD protein complex and its essential role in cancer metastasis. *Cell Res.* 21, 275–289.
- Fuchs, I.B., Lichtenegger, W., Buehler, H., Henrich, W., Stein, H., Kleine-Tebbe, A., Schaller, G., 2002.** The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Anticancer Res.* 22, 3415–3419.

## G

- Galagan, J.E., Selker, E.U.**, 2004. RIP: the evolutionary cost of genome defense. *Trends Genet.* 20, 417–423.
- Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., Zeller, K.I., De Marzo, A.M., Van Eyk, J.E., Mendell, J.T., Dang, C.V.**, 2009. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature* 458, 762–765.
- Gatenby, R.A., Gillies, R.J.**, 2004. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4, 891–899.
- Gerlitz, G., Bustin, M.**, 2011. The role of chromatin structure in cell migration. *Trends Cell Biol.* 21, 6–11.
- Geyer, P.K., Vitalini, M.W., Wallrath, L.L.**, 2011. Nuclear organization: taking a position on gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23, 354–359.
- Giampieri, S., Manning, C., Hooper, S., Jones, L., Hill, C.S., Sahai, E.**, 2009. Localized and reversible TGF $\beta$  signalling switches breast cancer cells from cohesive to single cell motility. *Nat Cell Biol* 11, 1287.
- Goldblatt, H., Cameron, G.**, 1953. Induced malignancy in cells from rat myocardium subjected to intermittent anaerobiosis during long propagation in vitro. *J. Exp. Med.* 97, 525–552.
- Goldblatt, H., Friedman, L.**, 1974. Prevention of malignant change in mammalian cells during prolonged culture in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1780–1782.
- Goldbeter, A., Koshland, D.E., Jr**, 1981. An amplified sensitivity arising from covalent modification in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 6840–6844.
- Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S.G., Serkova, N.J.**, 2004. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin. Cancer Res.* 10, 6661–6668.
- Goutsias, J., Lee, N.H.**, 2007. Computational and experimental approaches for modeling gene regulatory networks. *Curr. Pharm. Des.* 13, 1415–1436.
- Greenfield, A., Madar, A., Ostrer, H., Bonneau, R.**, 2010. DREAM4: Combining genetic and dynamic information to identify biological networks and dynamical models. *PLoS ONE* 5, e13397.
- Griffin, C., Flouriot, G., Sonntag-Buck, V., Gannon, F.**, 1999. Two Functionally Different Protein Isoforms Are Produced from the Chicken Estrogen Receptor- $\alpha$  Gene. *Molecular Endocrinology* 13, 1571–1587.
- Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M.B., Talhout, W., Eussen, B.H., de Klein, A., Wessels, L., de Laat, W., van Steensel, B.**, 2008. Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions. *Nature* 453, 948–951.
- Gupta, S., Kim, S.Y., Artis, S., Molfese, D.L., Schumacher, A., Sweatt, J.D., Paylor, R.E., Lubin, F.D.**, 2010. Histone methylation regulates memory formation. *J. Neurosci.* 30, 3589–3599.

## H

- Halder, G., Dupont, S., Piccolo, S.,** 2012. Transduction of mechanical and cytoskeletal cues by YAP and TAZ. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 591–600.
- Hansen, K.H., Bracken, A.P., Pasini, D., Dietrich, N., Gehani, S.S., Monrad, A., Rappsilber, J., Lerdrup, M., Helin, K.,** 2008. A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat Cell Biol* 10, 1291.
- Hardie, D.G.,** 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 774–785.
- Hayden, E.C.,** 2011. Evidence of altered RNA stirs debate. *Nature* 473, 432.
- Hecker, M., Lambeck, S., Toepfer, S., van Someren, E., Guthke, R.,** 2009. Gene regulatory network inference: data integration in dynamic models-a review. *BioSystems* 96, 86–103.
- Henikoff, S., Shilatifard, A.,** 2011. Histone modification: cause or cog? *Trends Genet.* 27, 389–396.
- Ho, S.-M., Tang, W.-Y., Belmonte de Frausto, J., Prins, G.S.,** 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 66, 5624–5632.
- Hochedlinger, K., Blleloch, R., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L., Jaenisch, R.,** 2004. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev.* 18, 1875–1885.
- Hofer, S.B.,** 2010. Structural traces of past experience in the cerebral cortex. *J. Mol. Med.* 88, 235–239.
- Hu, M., Krause, D., Greaves, M., Sharkis, S., Dexter, M., Heyworth, C., Enver, T.,** 1997. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.* 11, 774–785.
- Huang, S., Eichler, G., Bar-Yam, Y., Ingber, D.E.,** 2005. Cell Fates as High-Dimensional Attractor States of a Complex Gene Regulatory Network. *Phys. Rev. Lett.* 94, 128701.
- Huang, S., Ingber, D.E.,** 2005. Cell tension, matrix mechanics, and cancer development. *Cancer Cell* 8, 175–176.
- Huang, S., Guo, Y.-P., May, G., Enver, T.,** 2007. Bifurcation dynamics in lineage-commitment in bipotent progenitor cells. *Dev. Biol.* 305, 695–713.
- Huang, S., Ingber, D.E.,** 2007. A Non-Genetic Basis for Cancer Progression and Metastasis: Self-Organizing Attractors in Cell Regulatory Networks. *Breast Disease* 26, 27–54.
- Huang, W.-C., Ju, T.-K., Hung, M.-C., Chen, C.-C.,** 2007. Phosphorylation of CBP by IKK $\alpha$  promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF- $\kappa$ B. *Mol. Cell* 26, 75–87.
- Huang, S.,** 2009. Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *BioEssays* 31, 546–560.
- Huang, S.,** 2011a. On the intrinsic inevitability of cancer: from foetal to fatal attraction. *Semin. Cancer Biol.* 21, 183–199.
- Huang, S.,** 2011b. Systems biology of stem cells: three useful perspectives to help overcome the paradigm of linear pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 366, 2247–2259.

- Huet, G., Mérot, Y., Percevault, F., Tiffoche, C., Arnal, J.-F., Boujrad, N., Pakdel, F., Métivier, R., Flouriot, G.,** 2009. Repression of the estrogen receptor- $\alpha$  transcriptional activity by the Rho/megakaryoblastic leukemia 1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 33729–33739.
- Hyland, E.M., Cosgrove, M.S., Molina, H., Wang, D., Pandey, A., Cottee, R.J., Boeke, J.D.,** 2005. Insights into the role of histone H3 and histone H4 core modifiable residues in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10060–10070.

## I

- Iliopoulos, D., Hirsch, H.A., Struhl, K.,** 2009. An Epigenetic Switch Involving NF- $\kappa$ B, Lin28, Let-7 MicroRNA, and IL6 Links Inflammation to Cell Transformation. *Cell* 139, 693–706.
- Iliopoulos, D., Jaeger, S.A., Hirsch, H.A., Bulyk, M.L., Struhl, K.,** 2010. STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Mol. Cell* 39, 493–506.
- Inui, A.,** 2002. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin* 52, 72–91.
- Iyer, K.V., Pulford, S., Mogilner, A., Shivashankar, G.V.,** 2012. Mechanical activation of cells induces chromatin remodeling preceding MKL nuclear transport. *Biophys. J.* 103, 1416–1428.

## J-K

- Jablonka, E., Lamb, M.J.,** 2007. Précis of Evolution in Four Dimensions. *Behav Brain Sci* 30, 353–365; discussion 365–389.
- Jackson, R.C., Ross, D.A., Harkrader, R.J., Epstein, J.,** 1980. Biochemical approaches to enhancement of antitumor drug selectivity: selective protection of cells from 6-thioguanine and 6-mercaptopurine by adenosine. *Cancer Treat Rep* 64, 1347–1353.
- Jacob, F.,** 1977. Evolution and tinkering. *Science* 196, 1161–1166.
- Kalluri, R., Weinberg, R.A.,** 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–1428.
- Kambris, Z., Hoffmann, J.A., Imler, J.-L., Capovilla, M.,** 2002. Tissue and stage-specific expression of the Toll in *Drosophila* embryos. *Gene Expr. Patterns* 2, 311–317.
- Karlebach, G., Shamir, R.,** 2008. Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 770–780.
- Katada, S., Imhof, A., Sassone-Corsi, P.,** 2012. Connecting threads: epigenetics and metabolism. *Cell* 148, 24–28.
- Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D., Chambon, P.,** 1995. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491–1494.
- Kauffman, S.A.,** 1969. Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J. Theor. Biol.* 22, 437–467.
- Kauffman, S.,** 2004. A proposal for using the ensemble approach to understand genetic regulatory networks. *Journal of Theoretical Biology* 230, 581–590.

- Kaufman, M., Soulé, C., Thomas, R.,** 2007. A new necessary condition on interaction graphs for multistationarity. *J. Theor. Biol.* 248, 675–685.
- Keating, S.T., El-Osta, A.,** 2013. Glycemic Memories and the Epigenetic Component of Diabetic Nephropathy. *Curr. Diab. Rep.*
- Keller, A.D.,** 1995. Model genetic circuits encoding autoregulatory transcription factors. *J. Theor. Biol.* 172, 169–185.
- Kondoh, H., Leonart, M.E., Nakashima, Y., Yokode, M., Tanaka, M., Bernard, D., Gil, J., Beach, D.,** 2007. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid. Redox Signal.* 9, 293–299.
- Koppenol, W.H., Bounds, P.L., Dang, C.V.,** 2011. Otto Warburg’s contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat. Rev. Cancer* 11, 325–337.
- Koutroubas, G., Merika, M., Thanos, D.,** 2008. Bypassing the requirements for epigenetic modifications in gene transcription by increasing enhancer strength. *Mol. Cell. Biol.* 28, 926–938.
- Kundu, S., Peterson, C.L.,** 2009. Role of chromatin states in transcriptional memory. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790, 445–455.

## L

- Lachner, M., O’Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., Jenuwein, T.,** 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116–120.
- Lagha, M., Brunelli, S., Messina, G., Cumano, A., Kume, T., Relaix, F., Buckingham, M.E.,** 2009. Pax3:Foxc2 reciprocal repression in the somite modulates muscular versus vascular cell fate choice in multipotent progenitors. *Dev. Cell* 17, 892–899.
- Le Dréan, Y., Lazennec, G., Kern, L., Saligaut, D., Pakdel, F., Valotaire, Y.,** 1995. Characterization of an estrogen-responsive element implicated in regulation of the rainbow trout estrogen receptor gene. *J. Mol. Endocrinol.* 15, 37–47.
- Le Guellec, K., Lawless, K., Valotaire, Y., Kress, M., Tenniswood, M.,** 1988. Vitellogenin gene expression in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *General and Comparative Endocrinology* 71, 359–371.
- Lee, Y.-H., Albig, A.R., Regner, M., Schiemann, B.J., Schiemann, W.P.,** 2008. Fibulin-5 initiates epithelial–mesenchymal transition (EMT) and enhances EMT induced by TGF- $\beta$  in mammary epithelial cells via a MMP-dependent mechanism. *Carcinogenesis* 29, 2243–2251.
- Lees, J.A., Fawell, S.E., Parker, M.G.,** 1989. Identification of constitutive and steroid-dependent transactivation domains in the mouse oestrogen receptor. *J. Steroid Biochem.* 34, 33–39.
- Lewis, P.W., Müller, M.M., Koletsky, M.S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L.A., Garcia, B.A., Muir, T.W., Becher, O.J., Allis, C.D.,** 2013. Inhibition of PRC2 Activity by a Gain-of-Function H3 Mutation Found in Pediatric Glioblastoma. *Science*.
- Li, W.-C., Soffe, S.R., Wolf, E., Roberts, A.,** 2006. Persistent responses to brief stimuli: feedback excitation among brainstem neurons. *J. Neurosci.* 26, 4026–4035.
- Lim, S., Janzer, A., Becker, A., Zimmer, A., Schüle, R., Buettner, R., Kirfel, J.,** 2010. Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* 31, 512–520.

- Lin, C.-Y., Ström, A., Vega, V.B., Kong, S.L., Yeo, A.L., Thomsen, J.S., Chan, W.C., Doray, B., Bangarusamy, D.K., Ramasamy, A., Vergara, L.A., Tang, S., Chong, A., Bajic, V.B., Miller, L.D., Gustafsson, J.-A., Liu, E.T.,** 2004. Discovery of estrogen receptor alpha target genes and response elements in breast tumor cells. *Genome Biol.* 5, R66.
- Lin, T., Ponn, A., Hu, X., Law, B.K., Lu, J.,** 2010. Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 29, 4896–4904.
- Lisman, J.E., Fallon, J.R.,** 1999. What maintains memories? *Science* 283, 339–340.
- Liu, G., Bollig-Fischer, A., Kreike, B., van de Vijver, M.J., Abrams, J., Ethier, S.P., Yang, Z.-Q.,** 2009. Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer. *Oncogene* 28, 4491–4500.
- Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P., Carmeliet, P.,** 2009. Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited. *Cancer Cell* 15, 167–170.
- López-Novoa, J.M., Nieto, M.A.,** 2009. Inflammation and EMT: an alliance towards organ fibrosis and cancer progression. *EMBO Mol Med* 1, 303–314.
- Lyssiotis, C.A., Vander-Heiden, M.G., Heiden, M.G.V., Muñoz-Pinedo, C., Emerling, B.M.,** 2012. Emerging concepts: linking hypoxic signaling and cancer metabolism. *Cell Death Dis* 3, e303.

## M

- Maamar, H., Raj, A., Dubnau, D.,** 2007. Noise in Gene Expression Determines Cell Fate in *Bacillus subtilis*. *Science* 317, 526–529.
- Macarthur, B.D., Ma'ayan, A., Lemischka, I.R.,** 2009. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 672–681.
- Madhani, H.D., Francis, N.J., Kingston, R.E., Kornberg, R.D., Moazed, D., Narlikar, G.J., Panning, B., Struhl, K.,** 2008. Epigenomics: a roadmap, but to where? *Science* 322, 43–44.
- Maher, J.C., Krishan, A., Lampidis, T.J.,** 2004. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53, 116–122.
- Malmgren, R.A., Flanigan, C.C.,** 1955. Localization of the vegetative form of *Clostridium tetani* in mouse tumors following intravenous spore administration. *Cancer Res.* 15, 473–478.
- Margueron, R., Justin, N., Ohno, K., Sharpe, M.L., Son, J., Drury Iii, W.J., Voigt, P., Martin, S.R., Taylor, W.R., De Marco, V., Pirrotta, V., Reinberg, D., Gambin, S.J.,** 2009. Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461, 762.
- Martinez, E., Wahli, W.,** 1989. Cooperative binding of estrogen receptor to imperfect estrogen-responsive DNA elements correlates with their synergistic hormone-dependent enhancer activity. *The EMBO Journal* 8, 3781.
- Massaad, C., Coumoul, X., Sabbah, M., Garlatti, M., Redeuilh, G., Barouki, R.,** 1998. Properties of Overlapping EREs: Synergistic Activation of Transcription and Cooperative Binding of ER<sup>+</sup>. *Biochemistry* 37, 6023–6032.
- Massagué, J.,** 2008. TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215–230.



- Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P., Eigenbrodt, E.,** 2001. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. *Oncogene* 20, 6891–6898.
- McGarvey, K.M., Fahrner, J.A., Greene, E., Martens, J., Jenuwein, T., Baylin, S.B.,** 2006. Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. *Cancer Res.* 66, 3541–3549.
- Medici, D., Nawshad, A.,** 2010. Type I collagen promotes epithelial–mesenchymal transition through ILK-dependent activation of NF- $\kappa$ B and LEF-1. *Matrix Biology* 29, 161–165.
- Mendez, M.G., Kojima, S.-I., Goldman, R.D.,** 2010. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J* 24, 1838–1851.
- Menuet, A., Anglade, I., Flouriot, G., Pakdel, F., Kah, O.,** 2001. Tissue-Specific Expression of Two Structurally Different Estrogen Receptor Alpha Isoforms along the Female Reproductive Axis of an Oviparous Species, the Rainbow Trout. *Biol Reprod* 65, 1548–1557.
- Mester, J., Baulieu, E.-E.,** 1972. Nuclear estrogen receptor of chick liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 261, 236–244.
- Métivier, R., Petit, F.G., Valotaire, Y., Pakdel, F.,** 2000. Function of N-Terminal Transactivation Domain of the Estrogen Receptor Requires a Potential  $\alpha$ -Helical Structure and Is Negatively Regulated by the A Domain. *Molecular Endocrinology* 14, 1849–1871.
- Métivier, R., Penot, G., Flouriot, G., Pakdel, F.,** 2001. Synergism Between ER $\alpha$  Transactivation Function 1 (AF-1) and AF-2 Mediated by Steroid Receptor Coactivator Protein-1: Requirement for the AF-1  $\alpha$ -Helical Core and for a Direct Interaction Between the N- and C-Terminal Domains. *Molecular Endocrinology* 15, 1953–1970.
- Métivier, R., Gay, F.A., Hübner, M.R., Flouriot, G., Salbert, G., Gannon, F., Kah, O., Pakdel, F.,** 2002a. Formation of an hER $\alpha$ –COUP-TFI complex enhances hER $\alpha$  AF-1 through Ser118 phosphorylation by MAPK. *EMBO J* 21, 3443.
- Métivier, R., Stark, A., Flouriot, G., Hübner, M.R., Brand, H., Penot, G., Manu, D., Denger, S., Reid, G., Koš, M., Russell, R.B., Kah, O., Pakdel, F., Gannon, F.,** 2002b. A Dynamic Structural Model for Estrogen Receptor- $\alpha$  Activation by Ligands, Emphasizing the Role of Interactions between Distant A and E Domains. *Molecular Cell* 10, 1019–1032.
- Metzger, D., Losson, R., Bornert, J.M., Lemoine, Y., Chambon, P.,** 1992. Promoter specificity of the two transcriptional activation functions of the human oestrogen receptor in yeast. *Nucleic Acids Research* 20, 2813.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., Ford, H.L.,** 2010. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Parallels Between Normal Development and Tumor Progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 15, 117–134.
- Michel, D.,** 2009. Fine tuning gene expression through short DNA-protein binding cycles. *Biochimie* 91, 933–941.
- Michel, D.,** 2010. How transcription factors can adjust the gene expression floodgates. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 102, 16–37.
- Michel, D.,** 2011a. Basic statistical recipes for the emergence of biochemical discernment. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 106, 498–516.
- Michel, D.,** 2011b. Hierarchical cooperativity mediated by chromatin remodeling; the model of the MMTV transcription regulation. *J. Theor. Biol.* 287, 74–81.

- Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.-I., Treisman, R.,** 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* 113, 329–342.
- Moazed, D.,** 2011. Mechanisms for the inheritance of chromatin states. *Cell* 146, 510–518.
- Monod, J., Jacob, F.,** 1961. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth, and differentiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 26, 389–401.
- Moreno-Sánchez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Marín-Hernández, A., Saavedra, E.,** 2007. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS Journal* 274, 1393–1418.
- Morita, T., Mayanagi, T., Sobue, K.,** 2007. Reorganization of the actin cytoskeleton via transcriptional regulation of cytoskeletal/focal adhesion genes by myocardin-related transcription factors (MRTFs/MAL/MKLs). *Exp. Cell Res.* 313, 3432–3445.
- Mouilleron, S., Guettler, S., Langer, C.A., Treisman, R., McDonald, N.Q.,** 2008. Molecular basis for G-actin binding to RPEL motifs from the serum response factor coactivator MAL. *EMBO J.* 27, 3198–3208.
- Muramoto, T., Müller, I., Thomas, G., Melvin, A., Chubb, J.R.,** 2010. Methylation of H3K4 is required for inheritance of active transcriptional states. *Curr. Biol.* 20, 397–406.
- Murphy, K.F., Adams, R.M., Wang, X., Balázsi, G., Collins, J.J.,** 2010. Tuning and controlling gene expression noise in synthetic gene networks. *Nucl. Acids Res.* 38, 2712–2726.

## N

- Najafov, A., Alessi, D.R.,** 2010. Uncoupling the Warburg effect from cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 19135–19136.
- Nakahata, Y., Sahar, S., Astarita, G., Kaluzova, M., Sassone-Corsi, P.,** 2009. Circadian control of the NAD<sup>+</sup> salvage pathway by CLOCK-SIRT1. *Science* 324, 654–657.
- Ng, R.K., Gurdon, J.B.,** 2008. Epigenetic inheritance of cell differentiation status. *Cell Cycle* 7, 1173–1177.
- Nicol-Benoit, F., Amon, A., Vaillant, C., le Goff, P., le Dréan, Y., Pakdel, F., Flouriot, G., Valotaire, Y., Michel, D.,** 2011. A dynamic model of transcriptional imprinting derived from the vitellogenesis memory effect. *Biophys. J.* 101, 1557–1568.
- Nicol-Benoit, F., Le-Goff, P., Le-Dréan, Y., Demay, F., Pakdel, F., Flouriot, G., Michel, D.,** 2012. Epigenetic memories: structural marks or active circuits? *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2189–2203.
- Nieto, M.A.,** 2011. The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 347–376.
- Norris, J.D., Fan, D., Kerner, S.A., McDonnell, D.P.,** 1997. Identification of a Third Autonomous Activation Domain within the Human Estrogen Receptor. *Molecular Endocrinology* 11, 747–754.
- Novick, A., Weiner, M.,** 1957. Enzyme Induction as an All-or-None Phenomenon. *PNAS* 43, 553–566.

## O-P

- Olson, E.N., Nordheim, A.,** 2010. Linking actin dynamics and gene transcription to drive cellular motile functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 353–365.

- Onder, T.T., Gupta, P.B., Mani, S.A., Yang, J., Lander, E.S., Weinberg, R.A.,** 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res.* 68, 3645–3654.
- Ottino, J.M., Shinbrot, T.,** 1995. Nonlinear dynamics and chaos (with applications to physics, biology chemistry, and engineering). By S. H. Strogatz, Addison- Wesley, Reading, MA, 1994, 498pp., \$51.95 (hard cover). *AIChE Journal* 41, 1831–1832.
- Pakdel, F., Métivier, R., Flouriot, G., Valotaire, Y.,** 2000. Two Estrogen Receptor (ER) Isoforms with Different Estrogen Dependencies Are Generated from the Trout ER Gene. *Endocrinology* 141, 571–580.
- Paldi, A.,** 2012. What makes the cell differentiate? *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 110, 41–43.
- Park, J.-I., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J.,** 2003. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. *The Keio Journal of Medicine* 52, 174–181.
- Peinado, H., Olmeda, D., Cano, A.,** 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* 7, 415–428.
- Pembrey, M.E., Bygren, L.O., Kaati, G., Edvinsson, S., Northstone, K., Sjöström, M., Golding, J., ALSPAC Study Team,** 2006. Sex-specific, male-line transgenerational responses in humans. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 159–166.
- Pereira, F.A., Tsai, M.J., Tsai, S.Y.,** 2000. COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1388–1398.
- Perlman, A.J., Wolffe, A.P., Champion, J., Tata, J.R.,** 1984. Regulation by estrogen receptor of vitellogenin gene transcription in *Xenopus* hepatocyte cultures. *Molecular and Cellular Endocrinology* 38, 151–161.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S.,** 2001. Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* 292, 504–507.
- Pirone, J.R., Elston, T.C.,** 2004. Fluctuations in transcription factor binding can explain the graded and binary responses observed in inducible gene expression. *J. Theor. Biol.* 226, 111–121.
- Pollard, P.J., Wortham, N.C., Tomlinson, I.P.M.,** 2003. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. *Ann. Med.* 35, 632–639.
- Pollard, P.J., Loenarz, C., Mole, D.R., McDonough, M.A., Gleadle, J.M., Schofield, C.J., Ratcliffe, P.J.,** 2008. Regulation of Jumonji-domain-containing histone demethylases by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ . *Biochem. J.* 416, 387–394.
- Polyak, K., Weinberg, R.A.,** 2009. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat. Rev. Cancer* 9, 265–273.
- Prins, G.S.,** 2008. Estrogen imprinting: when your epigenetic memories come back to haunt you. *Endocrinology* 149, 5919–5921.
- Probst, A.V., Dunleavy, E., Almouzni, G.,** 2009. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 192–206.
- Ptashne, M.,** 2007. On the use of the word “epigenetic”. *Curr. Biol.* 17, R233–236.

## R

- Radisky, D.C., Levy, D.D., Littlepage, L.E., Liu, H., Nelson, C.M., Fata, J.E., Leake, D., Godden, E.L., Albertson, D.G., Angela Nieto, M., Werb, Z., Bissell, M.J.,** 2005. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature* 436, 123.
- Ramon y Cajal S.,** 1905. Manual de anatomía patológica general. N. Moya.
- Raser, J.M., O'Shea, E.K.,** 2004. Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. *Science* 304, 1811–1814.
- Reik, W.,** 2007. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* 447, 425–432.
- Reik, W.,** 2010. Wolf Reik: Inheritance beyond DNA. Interview by Nicole Lebrasseur. *J. Cell Biol.* 188, 302–303.
- Reitman, Z.J., Yan, H.,** 2010. Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 Mutations in Cancer: Alterations at a Crossroads of Cellular Metabolism. *JNCI J Natl Cancer Inst* 102, 932–941.
- Riegel, A.T., Aitken, S.C., Martin, M.B., Schoenberg, D.R.,** 1987. Differential Induction of Hepatic Estrogen Receptor and Vitellogenin Gene Transcription in *Xenopus laevis*. *Endocrinology* 120, 1283–1290.
- Romancer, M.L., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., Corbo, L.,** 2011. Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine Reviews* 32, 597–622.
- Rusché, L.N., Kirchmaier, A.L., Rine, J.,** 2002. Ordered nucleation and spreading of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 13, 2207–2222.

## S

- Saidi, A., Javerzat, S., Bellahcène, A., De Vos, J., Bello, L., Castronovo, V., Deprez, M., Loiseau, H., Bikfalvi, A., Hagedorn, M.,** 2008. Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. *Int. J. Cancer* 122, 2187–2198.
- Sánchez-Cenizo, L., Formentini, L., Aldea, M., Ortega, A.D., García-Huerta, P., Sánchez-Aragó, M., Cuezva, J.M.,** 2010. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg phenotype. *J. Biol. Chem.* 285, 25308–25313.
- Sánchez-Tilló, E., Liu, Y., de Barrios, O., Siles, L., Fanlo, L., Cuatrecasas, M., Darling, D.S., Dean, D.C., Castells, A., Postigo, A.,** 2012. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3429–3456.
- Sauve, A.A., Wolberger, C., Schramm, V.L., Boeke, J.D.,** 2006. The biochemistry of sirtuins. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 435–465.
- Scharenberg, M.A., Chiquet-Ehrismann, R., Asparuhova, M.B.,** 2010. Megakaryoblastic leukemia protein-1 (MKL1): Increasing evidence for an involvement in cancer progression and metastasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42, 1911–1914.

- Scheel, C., Eaton, E.N., Li, S.H.-J., Chaffer, C.L., Reinhardt, F., Kah, K.-J., Bell, G., Guo, W., Rubin, J., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., 2011.** Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast. *Cell* 145, 926–940.
- Schratt, G., Philippar, U., Berger, J., Schwarz, H., Heidenreich, O., Nordheim, A., 2002.** Serum response factor is crucial for actin cytoskeletal organization and focal adhesion assembly in embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 156, 737–750.
- Selak, M.A., Armour, S.M., MacKenzie, E.D., Boulahbel, H., Watson, D.G., Mansfield, K.D., Pan, Y., Simon, M.C., Thompson, C.B., Gottlieb, E., 2005.** Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* 7, 77–85.
- Sentis, S., Romancer, M.L., Bianchin, C., Rostan, M.-C., Corbo, L., 2005.** Sumoylation of the Estrogen Receptor  $\alpha$  Hinge Region Regulates Its Transcriptional Activity. *Molecular Endocrinology* 19, 2671–2684.
- Seong, K.-H., Li, D., Shimizu, H., Nakamura, R., Ishii, S., 2011.** Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell* 145, 1049–1061.
- Sha, K., Gu, S.G., Pantalena-Filho, L.C., Goh, A., Fleenor, J., Blanchard, D., Krishna, C., Fire, A., 2010.** Distributed probing of chromatin structure in vivo reveals pervasive chromatin accessibility for expressed and non-expressed genes during tissue differentiation in *C. elegans*. *BMC Genomics* 11, 465.
- Sherr, C.J., Roberts, J.M., 2004.** Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 18, 2699–2711.
- Shore, P., Sharrocks, A.D., 1995.** The MADS-box family of transcription factors. *Eur. J. Biochem.* 229, 1–13.
- Shoval, O., Alon, U., 2010.** SnapShot: network motifs. *Cell* 143, 326–e1.
- Silva, A.S., Yunes, J.A., Gillies, R.J., Gatenby, R.A., 2009.** The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer Res.* 69, 2677–2684.
- Skinner, M.K., Manikkam, M., Guerrero-Bosagna, C., 2011.** Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Reprod. Toxicol.* 31, 337–343.
- Slack, J.M.W., 2002. Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist? *Nat. Rev. Genet.* 3, 889–895.
- Smale, S.T., 2009.** Nuclear run-on assay. Cold Spring Harb Protoc 2009, *pdb.prot5329*.
- Smolen, P., Baxter, D.A., Byrne, J.H., 1998.** Frequency selectivity, multistability, and oscillations emerge from models of genetic regulatory systems. *Am J Physiol Cell Physiol* 274, C531–C542.
- Sobie, E.A., 2011.** Bistability in Biochemical Signaling Models. *Sci. Signal.* 4, tr10.
- Solovei, I., Kreysing, M., Lanctôt, C., Kösem, S., Peichl, L., Cremer, T., Guck, J., Joffe, B., 2009.** Nuclear architecture of rod photoreceptor cells adapts to vision in mammalian evolution. *Cell* 137, 356–368.
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M.C., Verrax, J., Rabbani, Z.N., De Saedeleer, C.J., Kennedy, K.M., Diepart, C., Jordan, B.F., Kelley, M.J., Gallez, B., Wahl, M.L., Feron, O., Dewhirst, M.W., 2008.** Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3930–3942.
- Stock, C., Gassner, B., Hauck, C.R., Arnold, H., Mally, S., Eble, J.A., Dieterich, P., Schwab, A., 2005.** Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange. *J. Physiol. (Lond.)* 567, 225–238.

- Subramanian, K., Jia, D., Kapoor-Vazirani, P., Powell, D.R., Collins, R.E., Sharma, D., Peng, J., Cheng, X., Vertino, P.M.,** 2008. Regulation of Estrogen Receptor  $\alpha$  by the SET7 Lysine Methyltransferase. *Molecular Cell* 30, 336–347.
- Suganuma, T., Workman, J.L.,** 2011. Signals and combinatorial functions of histone modifications. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 473–499.
- Sumpter, J.P., Jobling, S.,** 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103, 173.

## T

- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S.,** 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T., Cheng, Z., Rousseaux, S., Rajagopal, N., Lu, Z., Ye, Z., Zhu, Q., Wysocka, J., Ye, Y., Khochbin, S., Ren, B., Zhao, Y.,** 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146, 1016–1028.
- Tanenbaum, D.M., Wang, Y., Williams, S.P., Sigler, P.B.,** 1998. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *PNAS* 95, 5998–6003.
- Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., Lassar, A.B.,** 1988. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242, 405–411.
- Tennant, D.A., Durán, R.V., Gottlieb, E.,** 2010. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10, 267.
- Thiery, J.P., Sleeman, J.P.,** 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142.
- Thomas, G., Lange, H.W., Hempel, K.,** 1975. Kinetics of histone methylation in vivo and its relation to the cell cycle in Ehrlich ascites tumor cells. *Eur. J. Biochem.* 51, 609–615.
- Thomas, R.,** 1973. Boolean formalization of genetic control circuits. *J. Theor. Biol.* 42, 563–585.
- Thomas, R.,** 1998. Laws for the dynamics of regulatory networks. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 479–485.
- Thomassin, H., Flavin, M., Espinás, M.-L., Grange, T.,** 2001. Glucocorticoid-induced DNA demethylation and gene memory during development. *EMBO J* 20, 1974.
- Thomson, M., Liu, S.J., Zou, L.-N., Smith, Z., Meissner, A., Ramanathan, S.,** 2011. Pluripotency factors in embryonic stem cells regulate differentiation into germ layers. *Cell* 145, 875–889.
- Tian, M., Neil, J.R., Schiemann, W.P.,** 2011. Transforming growth factor- $\beta$  and the hallmarks of cancer. *Cell. Signal.* 23, 951–962.
- Tojkander, S., Gateva, G., Lappalainen, P.,** 2012. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 125, 1855–1864.
- Trichopoulos, D.,** 1990. Hypothesis: does breast cancer originate in utero? *Lancet* 335, 939–940.
- Tripodi, M., Filosa, A., Armentano, M., Studer, M.,** 2004. The COUP-TF nuclear receptors regulate cell migration in the mammalian basal forebrain. *Development* 131, 6119–6129.

**Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B., Pike, J.W., McDonnell, D.P., 1994.** Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Mol. Endocrinol.* 8, 21–30.

## U-V

**Ulitsky, I., Maron-Katz, A., Shavit, S., Sagir, D., Linhart, C., Elkon, R., Tanay, A., Sharan, R., Shiloh, Y., Shamir, R., 2010.** Expander: from expression microarrays to networks and functions. *Nat Protoc* 5, 303–322.

**Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., Thompson, C.B., 2009.** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

**Vaquero, A., Scher, M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Serrano, L., Reinberg, D., 2007.** SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* 450, 440–444.

**Vartiainen, M.K., Guettler, S., Larijani, B., Treisman, R., 2007.** Nuclear actin regulates dynamic subcellular localization and activity of the SRF cofactor MAL. *Science* 316, 1749–1752.

**Vermeulen, M., Mulder, K.W., Denissov, S., Pijnappel, W.W.M.P., van Schaik, F.M.A., Varier, R.A., Baltissen, M.P.A., Stunnenberg, H.G., Mann, M., Timmers, H.T.M., 2007.** Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. *Cell* 131, 58–69.

**Vilar J. M., Saiz L., 2011.** Control of gene expression by modulated self-assembly. *Nucleic Acids Research* 39, 6854–6863.

## W

**Waddington, C.H., 1942.** The Epigenotype. *Int. J. Epidemiol.* 41, 10–13.

**Waddington, C.H., 1952.** Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* 169, 625–626.

**Waddington, C.H., 1956.** Principles of Embryology. UK

**Waddington, C.H., 1957.** The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. ix +262 .

**Walenta, S., Mueller-Klieser, W.F., 2004.** Lactate: mirror and motor of tumor malignancy. *Semin Radiat Oncol* 14, 267–274.

**Wallace, D.C., Fan, W., 2010.** Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion* 10, 12–31.

**Wang, Y., Zhang, H., Chen, Y., Sun, Y., Yang, F., Yu, W., Liang, J., Sun, L., Yang, X., Shi, L., Li, R., Li, Y., Zhang, Y., Li, Q., Yi, X., Shang, Y., 2009.** LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell* 138, 660–672.

**Wang, J.-B., Erickson, J.W., Fuji, R., Ramachandran, S., Gao, P., Dinavahi, R., Wilson, K.F., Ambrosio, A.L.B., Dias, S.M.G., Dang, C.V., Cerione, R.A., 2010.** Targeting Mitochondrial Glutaminase Activity Inhibits Oncogenic Transformation. *Cancer Cell* 18, 207–219.

**Wang, J., Zhang, K., Xu, L., Wang, E., 2011.** Quantifying the Waddington landscape and biological paths for development and differentiation. *PNAS* 108, 8257–8262.

- Warburg, O.**, 1953. [The reaction of ascites tumor cells to oxygen under high pressure]. *Arch. Geschwulstforsch.* 6, 7–11.
- Warburg, O.**, 1956a. On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309–314.
- Warburg, O.**, 1956b. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
- Wei, Y., Chen, Y.-H., Li, L.-Y., Lang, J., Yeh, S.-P., Shi, B., Yang, C.-C., Yang, J.-Y., Lin, C.-Y., Lai, C.-C., Hung, M.-C.**, 2011. CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nat. Cell Biol.* 13, 87–94.
- Weinhouse, S.**, 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 267–269.
- Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., Thompson, C.B.**, 2009. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science* 324, 1076–1080.
- Westley, B., Knowland, J.**, 1979. Estrogen causes a rapid, large and prolonged rise in the level of nuclear estrogen receptor in *Xenopus laevis* liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 88, 1167–1172.
- Willers, I.M., Cuezva, J.M.**, 2011. Post-transcriptional regulation of the mitochondrial H(+)-ATP synthase: a key regulator of the metabolic phenotype in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 543–551.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.-Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., Thompson, C.B.**, 2008. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 18782–18787.
- Wu, Y., Deng, J., Rychahou, P.G., Qiu, S., Evers, B.M., Zhou, B.P.**, 2009. Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 15, 416–428.
- Wu, W., Cheng, Y., Keller, C.A., Ernst, J., Kumar, S.A., Mishra, T., Morrissey, C., Dorman, C.M., Chen, K.-B., Drautz, D., Giardine, B., Shibata, Y., Song, L., Pimkin, M., Crawford, G.E., Furey, T.S., Kellis, M., Miller, W., Taylor, J., Schuster, S.C., Zhang, Y., Chiaromonte, F., Blobel, G.A., Weiss, M.J., Hardison, R.C.**, 2011. Dynamics of the epigenetic landscape during erythroid differentiation after GATA1 restoration. *Genome Res.* 21, 1659–1671.

## Y-Z

- Yokoyama, Y., Hieda, M., Nishioka, Y., Matsumoto, A., Higashi, S., Kimura, H., Yamamoto, H., Mori, M., Matsuura, S., Matsuura, N.**, 2013. Cancer associated up-regulation of H3K9 trimethylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. *Cancer Sci.*
- Youngblood, B., Davis, C.W., Ahmed, R.**, 2010. Making memories that last a lifetime: heritable functions of self-renewing memory CD8 T cells. *Int. Immunol.* 22, 797–803.
- Yun, M., Wu, J., Workman, J.L., Li, B.**, 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 21, 564–578.
- Yuneva, M., Zamboni, N., Oefner, P., Sachidanandam, R., Lazebnik, Y.**, 2007. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J. Cell Biol.* 178, 93–105.



- Zaidi, S.K., Young, D.W., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., Stein, G.S.,** 2011. Bookmarking the genome: maintenance of epigenetic information. *J. Biol. Chem.* 286, 18355–18361.
- Zaidi, N., Swinnen, J.V., Smans, K.,** 2012. ATP-Citrate Lyase: A Key Player in Cancer Metabolism. *Cancer Res* 72, 3709–3714.
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-Aswapati, N., Radomska, H.S., Auron, P.E., Tenen, D.G., Sun, Z.,** 1999. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 8705–8710.
- Zhang, X.D., Deslandes, E., Villedieu, M., Poulain, L., Duval, M., Gauduchon, P., Schwartz, L., Icard, P.,** 2006. Effect of 2-Deoxy-D-glucose on Various Malignant Cell Lines In Vitro. *Anticancer Res* 26, 3561–3566.
- Zhang, Y.,** 2011. Recent progress in the epigenetics and chromatin field. *Cell Res.* 21, 373–374.
- Zhu, B., Reinberg, D.,** 2011. Epigenetic inheritance: Uncontested? *Cell Res* 21, 435.



**Vu :**  
**Le Directeur de Thèse**

**Vu :**  
**Le Responsable de l'Ecole Doctorale**

**VU pour autorisation de soutenance**

**Rennes, le**

**Le Président de l'Université de Rennes 1**

**Guy CATHELINEAU**

**VU après soutenance pour autorisation de publication :**

**Le président de Jury,**