

## Fluctuations aléatoires dans le métabolisme et la croissance cellulaire

Philippe Nghe<sup>1,2</sup>, Sarah Boulineau<sup>1</sup>, Sander J Tans<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Biophysics laboratory, AMOLF, Amsterdam, Pays-Bas

<sup>2</sup>Laboratoire de Biochimie, ESPCI, Paris, France

### Fluctuations d'origine thermique à l'échelle cellulaire

Les mouvements incessants de grains de pollens en solution observés par Robert Brown en 1827 furent interprétés comme un caractère vivant, jusqu'à ce qu'Einstein démontre en 1905 qu'ils sont en réalité une conséquence de l'agitation thermique, dont les effets deviennent visibles aux échelles de l'ordre du micron. En 1944, le physicien Erwin Schrödinger constate que les chromosomes sont représentés en nombre et à une échelle suffisamment petits pour être soumis à ces fluctuations [1], et se demande si ces dernières pourraient avoir des conséquences physiologiques. En effet, bien que l'ADN ne soit pas encore caractérisé, les chromosomes étaient déjà identifiés comme source de l'organisation cellulaire.

C'est seulement durant la dernière décennie que cette idée fut vérifiée, grâce à une quantification suffisamment précise et systématique de la production de protéines et d'ARNs par microscopie de fluorescence en cellules uniques [2,3]. Les fluctuations d'origine thermique affectant non seulement les trajectoires des molécules mais aussi les interactions entre complexes moléculaires de la transcription et la traduction, elles sont à l'origine de variations significatives du niveau d'expression des gènes. Ces variations, qui représentent typiquement 10% à 30% du niveau moyen, peuvent affecter d'autres gènes régulés en amont, s'additionnant à travers les cascades de signalisation [4]. Cependant, il n'est pas *a priori* évident qu'elles puissent déterminer l'état des cellules à un niveau véritablement physiologique, tel que le métabolisme ou la croissance.

### Quantifier les fluctuations à l'échelle de la cellule unique

Nous avons combiné microscopie en *time-lapse*, analyse d'image de cellules uniques, analyse statistique et modélisation mathématique pour montrer comment et à quel point les fluctuations d'expression des gènes peuvent affecter la croissance de bactéries *Escherichia Coli* [5].

La microscopie *time-lapse* consiste simplement à capturer des images de colonies de bactéries à des intervalles de temps réguliers. Les bactéries, inoculées à faible densité, croissent en monocouches sur une surface de polyacrylamide imbibée d'un milieu de culture [6]. Nous avons enregistré à raison d'environ une image par minute et à grossissement 100X les divisions cellulaires durant 9 générations à partir d'une cellule unique, soit de l'ordre de 500 bactéries après plusieurs heures. Un logiciel maison nous a permis de déterminer automatiquement le contour des cellules individuelles à partir d'images de contraste de phase (Figure 1A), puis de mesurer avec précision la longueur de chaque cellule (Figure 1B). Le taux de croissance instantané est

ensuite calculé par la dérivée du logarithme de la longueur (Figure 1C). L'acquisition d'images de fluorescence permet de mesurer simultanément l'expression de protéines fluorescentes associées à des gènes d'intérêt (Figure 1D), tels que des enzymes métaboliques.

Nous obtenons alors pour chaque lignée l'expression de gènes d'intérêt et le taux de croissance cellulaire, avec plusieurs mesures par cycle cellulaire. Pour interpréter ces données, nous avons utilisé les corrélations calculées avec différents décalages temporels entre les signaux. En effet, une corrélation usuelle entre signaux simultanés ne permet pas d'identifier la causalité entre 2 signaux X et Y, sachant que X peut causer Y, ou l'inverse, ou bien la corrélation peut provenir d'un phénomène tiers Z, ou encore d'une mixture entre ces différents possibilités. La prise en compte de délais temporels entre les signaux résout en grande partie ce problème, car elle permet de discriminer de nombreux scénarios de causalité parmi un ensemble de modèles envisagés [7].

Considérons le taux de croissance  $\mu$  des cellules (Figure 1C) et la concentration E de la  $\beta$ -galactosidase (Figure 1D), enzyme catabolique nécessaire à la croissance sur un milieu ayant pour seule source de carbone le lactose. Pour un décalage temporel donné  $\Delta t$ , on calcule le coefficient de corrélation  $R(\Delta t)$  entre les signaux  $\mu(t)$  et  $E(t+\Delta t)$  (Figure 1E). On obtient ainsi une fonction  $R(\Delta t)$  qui indique le coefficient de corrélation obtenu pour tous les décalages temporels possibles entre  $\mu$  et E,  $R(\Delta t=0)$  étant le coefficient de corrélation usuel, et dont l'asymétrie indique l'existence de délais entre les signaux (Figure 1F).

### **Modes de propagation et fluctuations de croissance**

On a mesuré que lorsque la concentration de l'enzyme est maintenue à un niveau limitant pour le métabolisme, les fluctuations du taux de croissance tendent à apparaître plus tard que celles du taux de production de l'enzyme. À l'opposé, lorsque la concentration de l'enzyme est maintenue saturante, elle tend à fluctuer avec un retard comparé au taux de croissance (comme illustré sur la Figure 1F). L'hypothèse explicative la plus élémentaire est qu'il existe différents modes de transmission des fluctuations dans les cellules qui dominent plus ou moins les corrélations en fonction de la concentration moyenne de l'enzyme: (i) les fluctuations de croissance causent en permanence des fluctuations de concentrations de l'enzyme, (ii) si l'enzyme est limitante, ses fluctuations causent des fluctuations de croissance.

Nous avons effectué une comparaison quantitative des corrélations croisées temporelles et d'un modèle mathématique utilisant les relations connues entre croissance et expression enzymatique. Nous avons utilisé une approche phénoménologique, dans laquelle les différentes variables réagissent de manière proportionnelle aux variations des autres. Un tel modèle, malgré la simplification extrême qu'il représente par rapport aux processus cellulaires, explique avec une grande fidélité les corrélations mesurées en utilisant très peu de paramètres. Le résultat essentiel de cette analyse est que les fluctuations se décomposent en modes élémentaires de transmission, superposés les uns aux autres dans des

proportions variables selon le degré de limitation de l'enzyme, le gène considéré et le milieu nutritif.

Outre des confirmations de la causalité par perturbations externes, nous avons testé les modes de transmissions prédits par notre modèle en effectuant plusieurs modifications génétiques. Nous avons ainsi pu vérifier qu'une augmentation temporaire de croissance cause à la fois une augmentation de production des protéines et une augmentation de volume, qui peuvent se compenser pour maintenir la concentration constante (Figure 2A). Par ailleurs, puisque les fluctuations d'une enzyme se propagent à la croissance, qui elle-même perturbe l'expression d'autres gènes, les fluctuations d'un seul gène métabolique causent des fluctuations d'expression d'autres gènes sans lien de régulation, par la seule modulation de l'activité métabolique (Figure 2B). Enfin, nous avons vérifié sur des gènes de la glycolyse et du cycle de Krebs que leurs fluctuations d'expression engendrent des fluctuations de croissance si et seulement s'ils sont limitants, et ce indépendamment du fait que les enzymes correspondantes soient consécutives dans la chaîne métabolique (Figure 2C).

## Conclusion

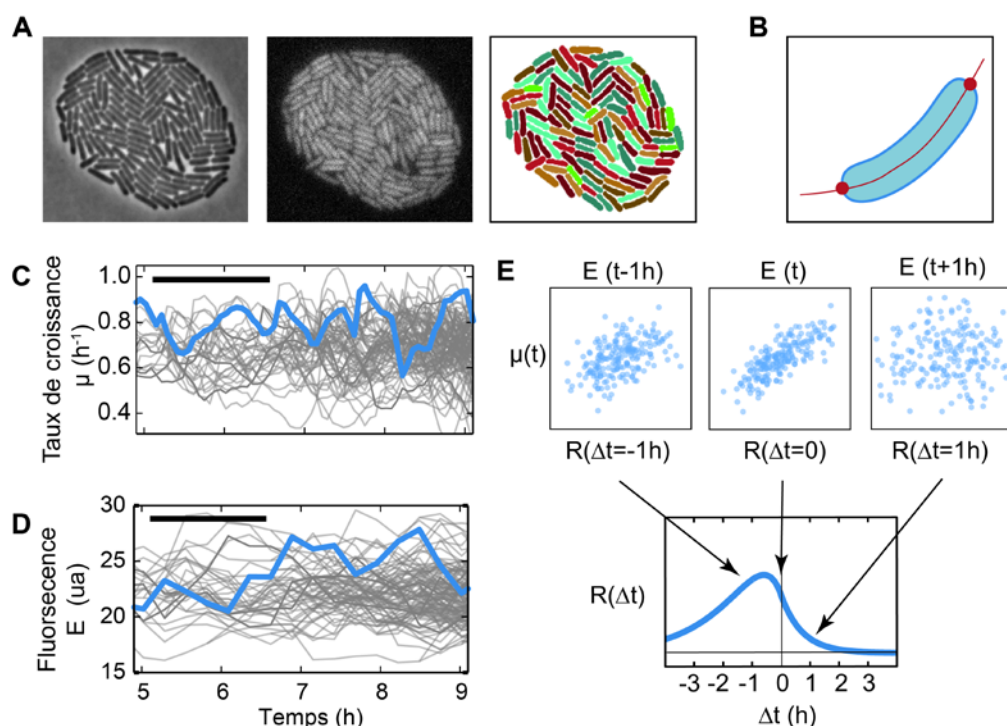
Nous pouvons finalement répondre à l'interrogation de Schrödinger : l'agitation thermique à l'échelle des molécules biologiques a des conséquences observables à un niveau physiologique, en particulier sur la croissance cellulaire. Ainsi, la cellule traverse en permanence une diversité d'états métaboliques, diversité qui prend une importance particulière lors d'événements de différenciation [8], notamment en réponse à des stress [9] ou des changements environnementaux [10]. Paradoxalement, la sensibilité du vivant aux fluctuations d'origine physique semble être une contrepartie, inévitable à petite échelle, du haut degré d'organisation et d'interdépendance dans la cellule.

- [1] Schrödinger E. What is life? With mind and matter and autobiographical sketches, 1929 Cambridge University Press.
- [2] Elowitz MB, Levine AJ, Siggia ED, Swain PS. Stochastic gene expression in a single cell. *Science* 2002 ; 297 : 1183-1186.
- [3] Cai L, Friedman N, Xie XS. Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level. *Nature* 2006 ; 440 : 358-362.
- [4] Pedraza JM, van Oudenaarden A. Noise propagation in gene networks. *Science* 2005 ; 307 : 1965-1969.
- [5] Kiviet DJ, Nghe P, Walker N, Boulineau S, Sunderlikova V, Tans SJ. Stochasticity of metabolism and growth at the single-cell level. *Nature* 2014, 514 : 376-379.
- [6] Nghe P, Boulineau S, Gude S, Recouvreux P, van Zon JS, Tans SJ. Microfabricated Polyacrylamide Devices for the Controlled Culture of Growing Cells and Developing Organisms. *PloS one* 2013 ; 8 : e75537.
- [7] Dunlop MJ, Cox RS, Levine JH, Murray RM, Elowitz MB. Regulatory activity revealed by dynamic correlations in gene expression noise. *Nature genetics* 2008 ; 40 : 1493-1498.

[8] Chang HH, Hemberg M, Barahona M, Ingber DE, Huang S. Transcriptome-wide noise controls lineage choice in mammalian progenitor cells. *Nature* 2008 ; 453 : 544-547.

[9] Locke JC, Young JW, Fontes M, Jiménez MJH, Elowitz MB. Stochastic pulse regulation in bacterial stress response. *Science* 2011 ; 334 : 366-369.

[10] Boulineau S, Tostevin F, Kiviet DJ, ten Wolde PR, Nghe P, Tans SJ. Single-cell dynamics reveals sustained growth during diauxic shifts. *PloS one* 2013 ; 8 : e61686.



**Figure 1. Analyse des fluctuations de croissance et d'expression enzymatique.** **A.** Des images de colonies bactériennes sont acquises à intervalles réguliers, en contraste de phase (gauche), en fluorescence (milieu), les bactéries individuelles étant ensuite détectées automatiquement (droite) d'après l'image de contraste de phase. **B.** Pour chaque bactérie détectée, on mesure sa longueur. **C.** Cette longueur est utilisée pour calculer le taux de croissance de chaque lignée. **D.** La fluorescence est également extraite par cellule individuelle puis reconstituée par lignée. **E.** Pour chaque décalage temporel  $\Delta t$  entre les signaux représentés en C et D, on calcule le coefficient de corrélation  $R(\Delta t)$  entre  $\mu(t)$  et  $E(t+\Delta t)$ , c'est-à-dire pour toutes les valeurs de  $t$  à  $\Delta t$  fixé. **F.** On représente finalement la fonction  $R(\Delta t)$ , qui dans cet exemple a des valeurs plus élevées aux décalages temporels négatifs entre  $\mu$  et  $E$ , indiquant que les fluctuations de concentration de l'enzyme sont typiquement en retard sur celles de la croissance.

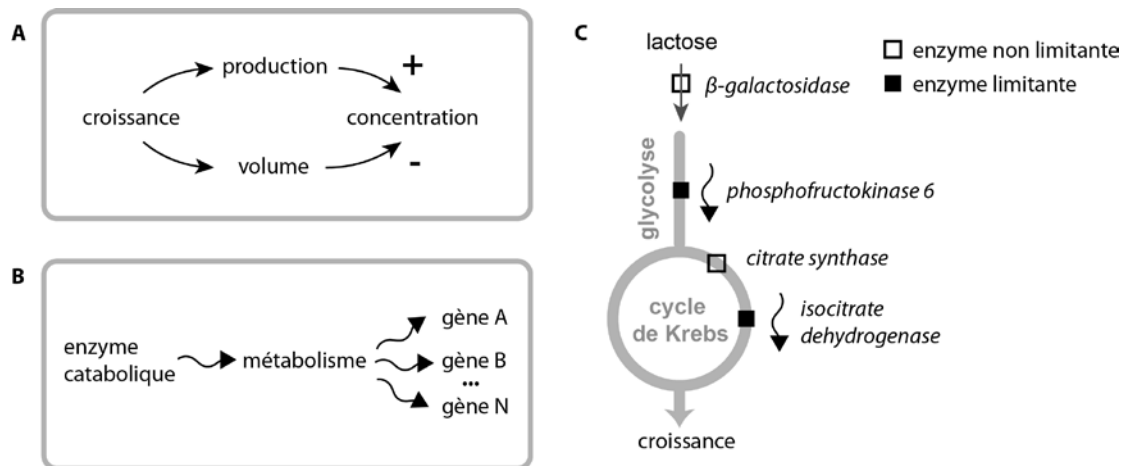


Figure 2. **Mécanismes de transmission des fluctuations dans la cellule.** **A.** Une augmentation temporaire de croissance cause simultanément une augmentation de la production de protéines et du volume, ce dernier contribuant à équilibrer l'excès de production par dilution. **B.** Les enzymes cataboliques limitant le flux métabolique peuvent engendrer des fluctuations corrélées dans tous les gènes, et ce indépendamment de tout lien de régulation. **C.** Durant la croissance sur le lactose, certaines enzymes telles que la *phosphofruktokinase* ou l'*isocitrate deshydrogénase* sont limitantes pour le métabolisme. Leurs fluctuations se transmettent alors à la croissance cellulaire. À l'opposé, les fluctuations d'autres enzymes appartenant aux mêmes voies métaboliques, mais non limitantes, telles que la *β-galactosidase* ou la *citrate synthase*, n'ont pas d'impact mesurable sur la croissance.