



INSTITUTE FOR RESEARCH
IN IMMUNOLOGY
AND CANCER



Université 
de Montréal

Programmer la cellule

François Major

et les autres collaborateurs du labo d'ingénierie des ARN :

Gerardo, Trang, Frédérique, Jean, Cédric, Véronique, Karine, Nicolas, Paul, Marc-Frédéric, Yifei, Julie P, Maria et Julie R

Francois.Major@UMontreal.CA
www.major.irc.ca

Synopsis

- La cellule (est un véritable ordinateur)
- Son programme est l'ADN
- Ses input proviennent de l'environnement
- Son output les protéines
- Cependant, elle exprime beaucoup plus d'ARN que de protéines
- Ces ARN effectuent des calculs moléculaires en générant toutes les possibilités d'hybridation et résolvent instantanément des problèmes NP-complets
- En même temps, ces ARN représentent une porte d'entrée pour intervenir dans le programme cellulaire, **comment** ?
- Nous modélisons l'hybridation par le problème des mariages stables
- ***Sera-t-il possible un jour de bien modéliser l'hybridation des ARN, de comprendre son effet sur l'output des protéines et ainsi fabriquer des médicaments à base d'ARN efficaces et sans effets secondaires ?***

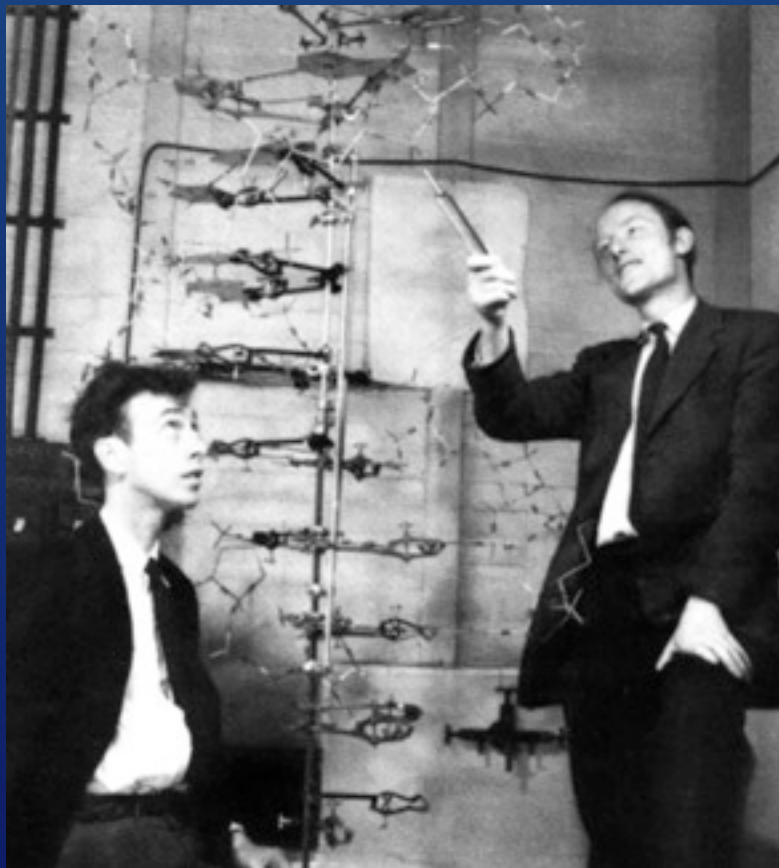
Dans la cellule, l'ADN se trouve le plus souvent sous la forme de double hélice formée de 2 brins **complémentaires**

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962

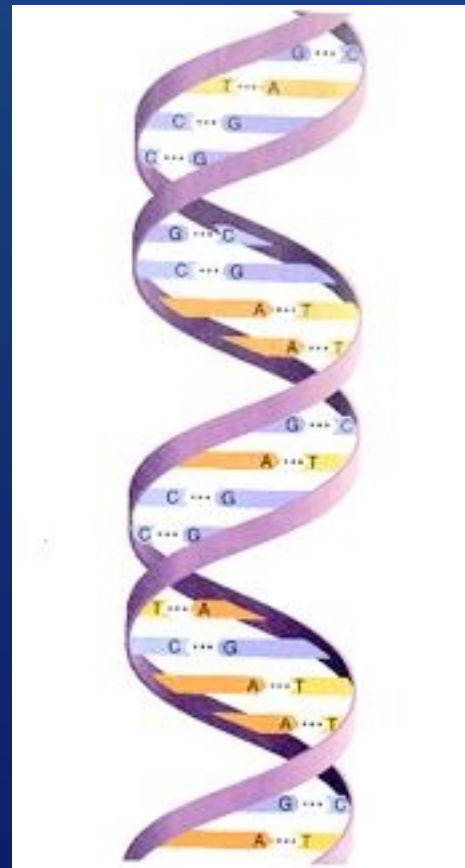
Francis Crick, James Watson, Maurice Wilkins

"for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material"

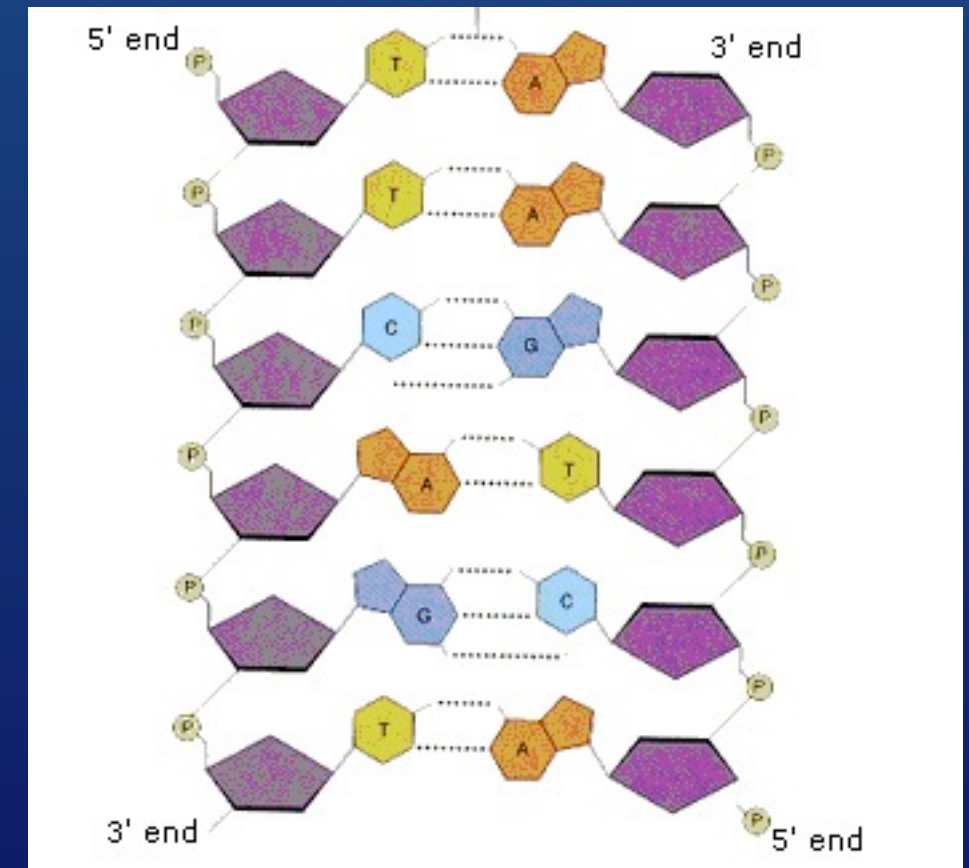
TutorVista.com



First correct double-helix model of DNA Structure in 1953



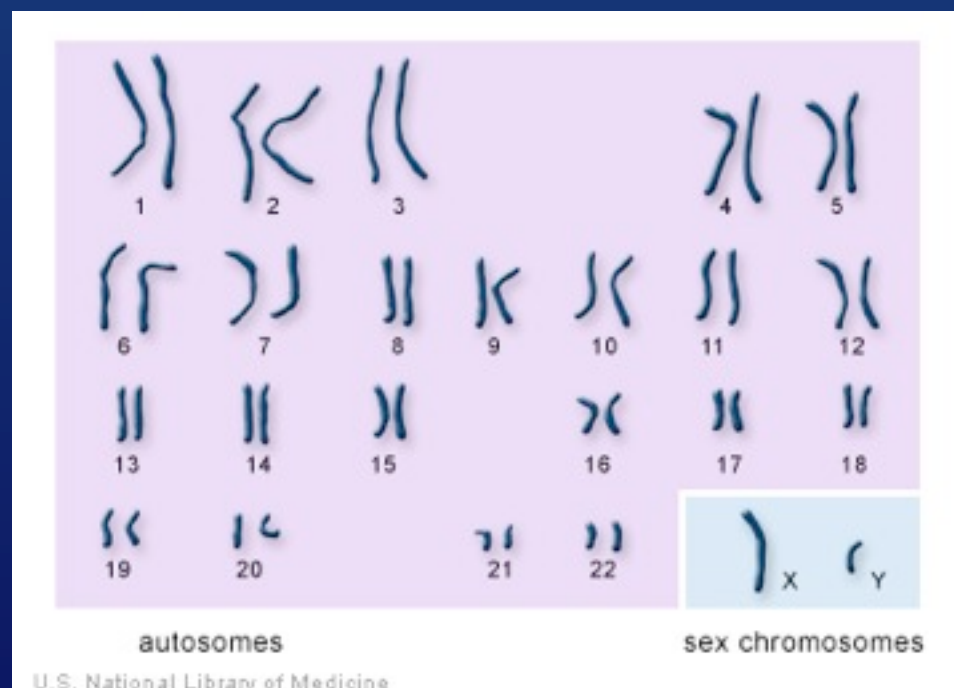
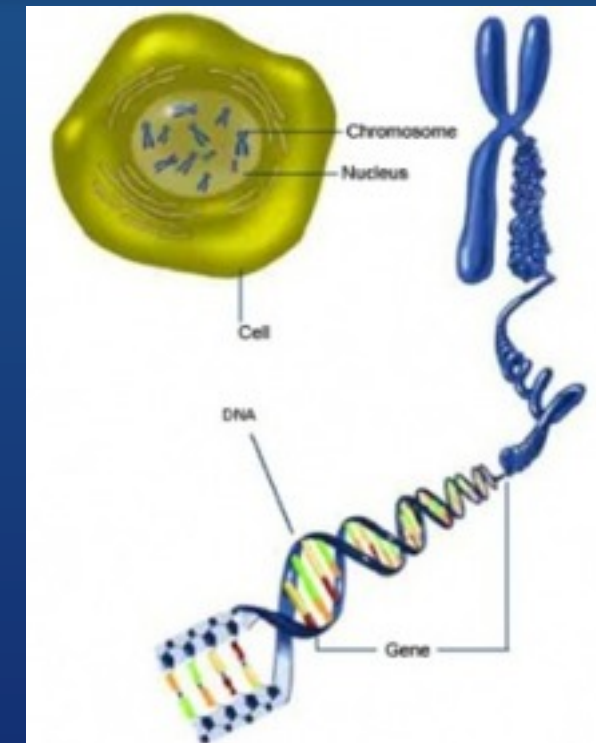
DNA Double Helix



adenine(A), guanine (G),
thymine(T), cytosine(C),
phosphate(P)

L'ADN et les chromosomes

- L'ADN est dans toutes nos cellules sauf les globules rouges
- L'ADN est le plan de la vie
- L'ADN est distribué chez l'humain dans 46 chromosomes



- Les chromosomes sont localisés dans le noyau de la cellule
- L'ADN dans un chromosome varie de 50 à 250 millions de paires de bases
- La séquence complète d'ADN s'appelle le **génom**
- Le génome humain est estimé à 3 milliards de paires de bases

Input/Output

Dogme central : ADN → ARN → Protéines



DNA

Transcription

RNA

Traduction

Protein

CCTGAGCCAACTATTGATGAA

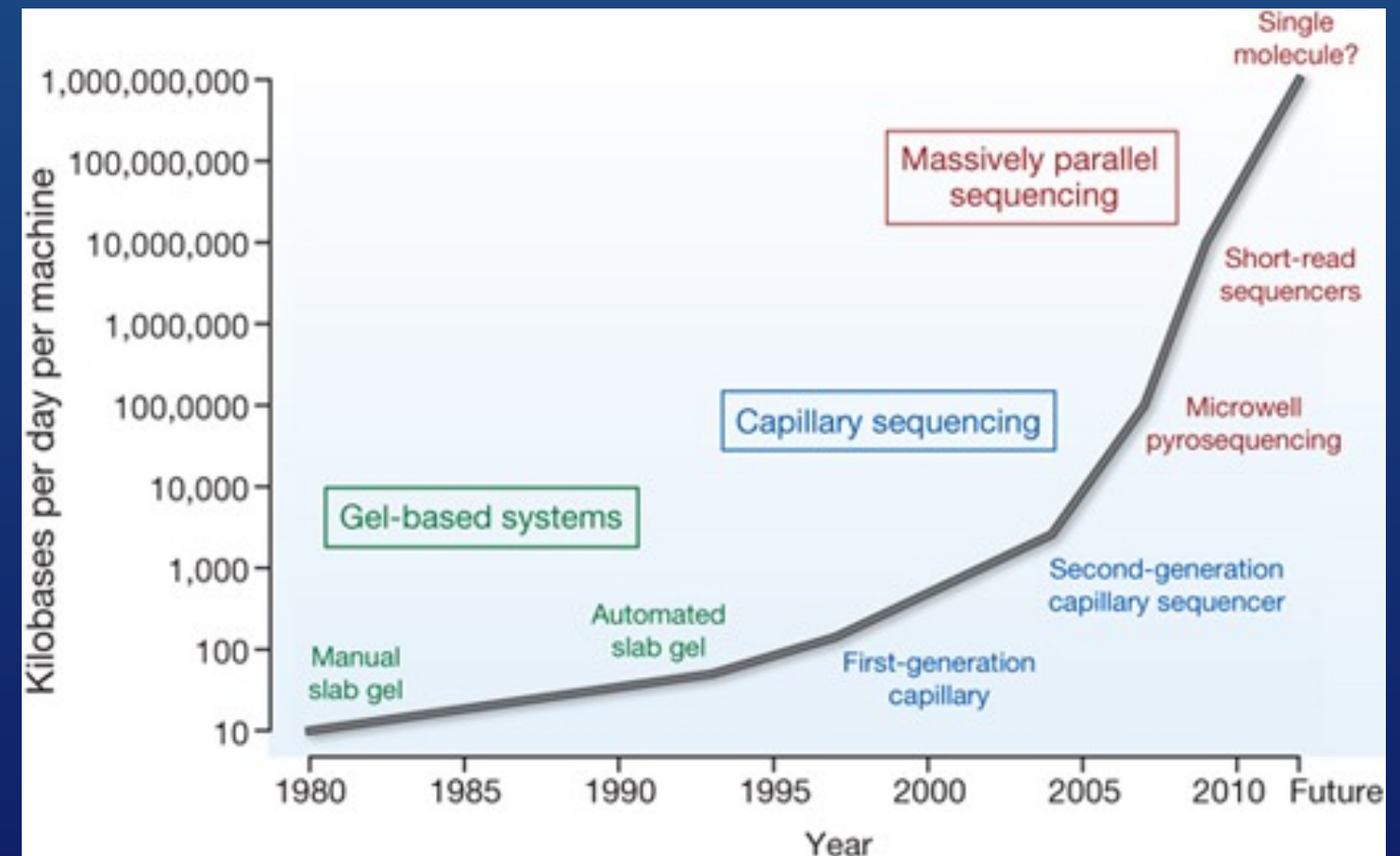
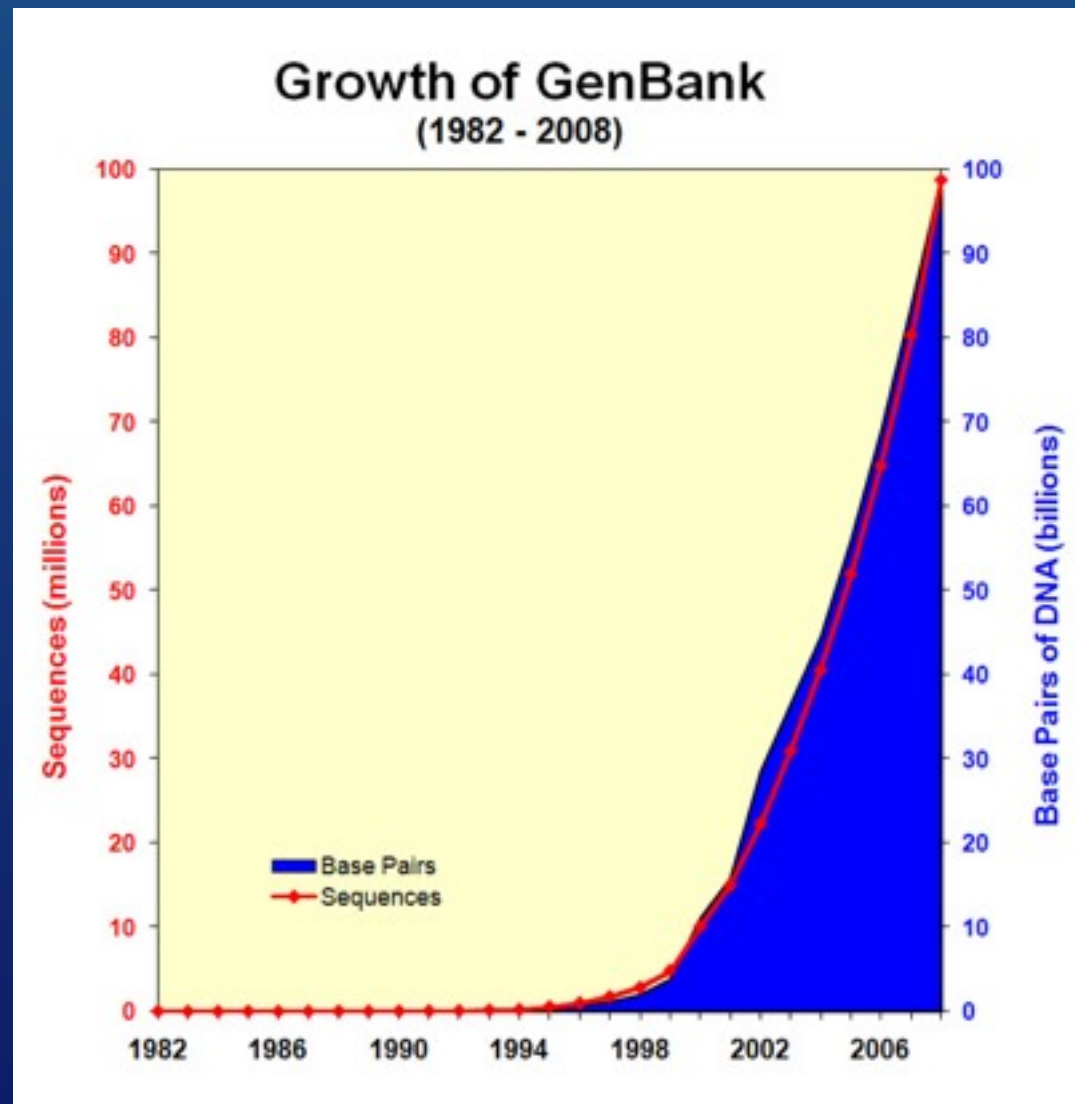


CCUGAGCCAAACUAUUGAUGAA



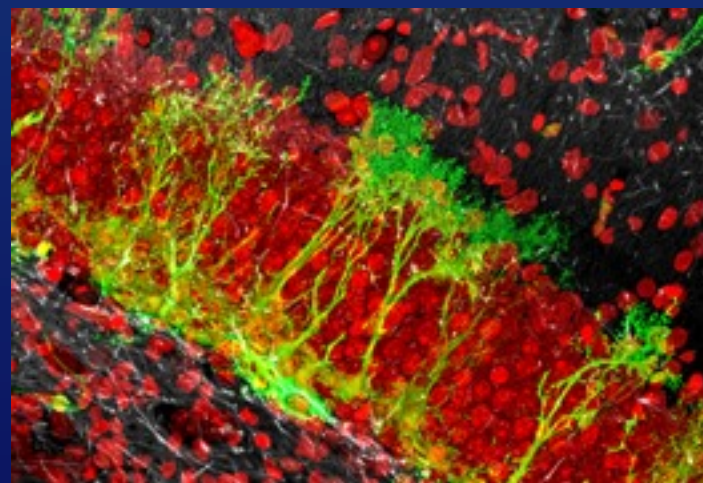
PEPTIDE

La croissance des données génomiques est exponentielle



Les protéines dictent les phénotypes et états cellulaires

- Les types cellulaires (différentiation)
- Les maladies
- Les états cellulaires des cellules différenciées :
division (prolifération), perte de la division (sénescence), mort (apoptose), cancer (prolifération incontrôlée)



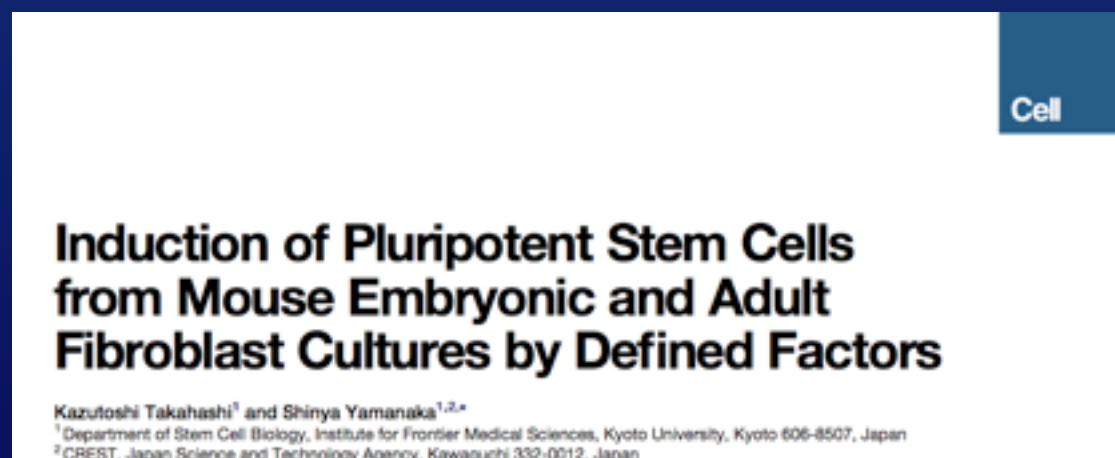
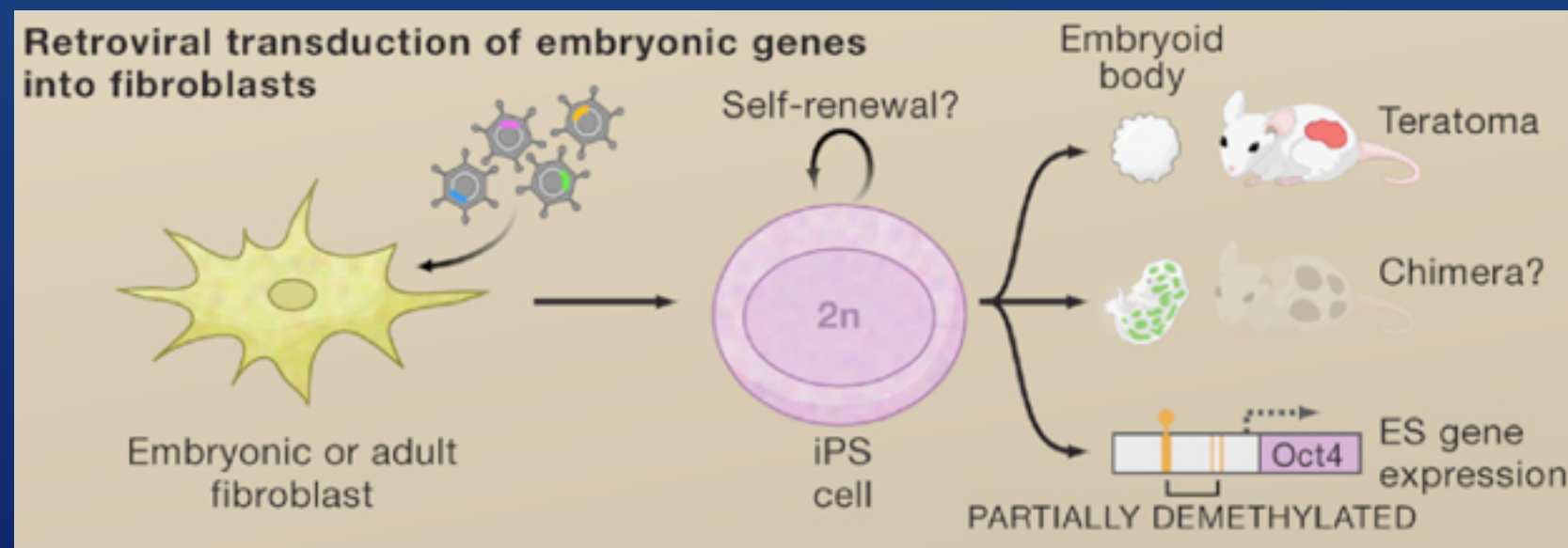
Cell Picture Show



NiTi Surgical Solutions

En introduisant des protéines, on reprogramme des cellules différenciées vers des cellules embryonnaires

- Induction par l'introduction de 4 facteurs de transcription : Oct3/4, Sox2, c-Myc et Klf4
- Résultat encourageant pour les thérapies cellulaires, i.e. pour la régénération de tissus

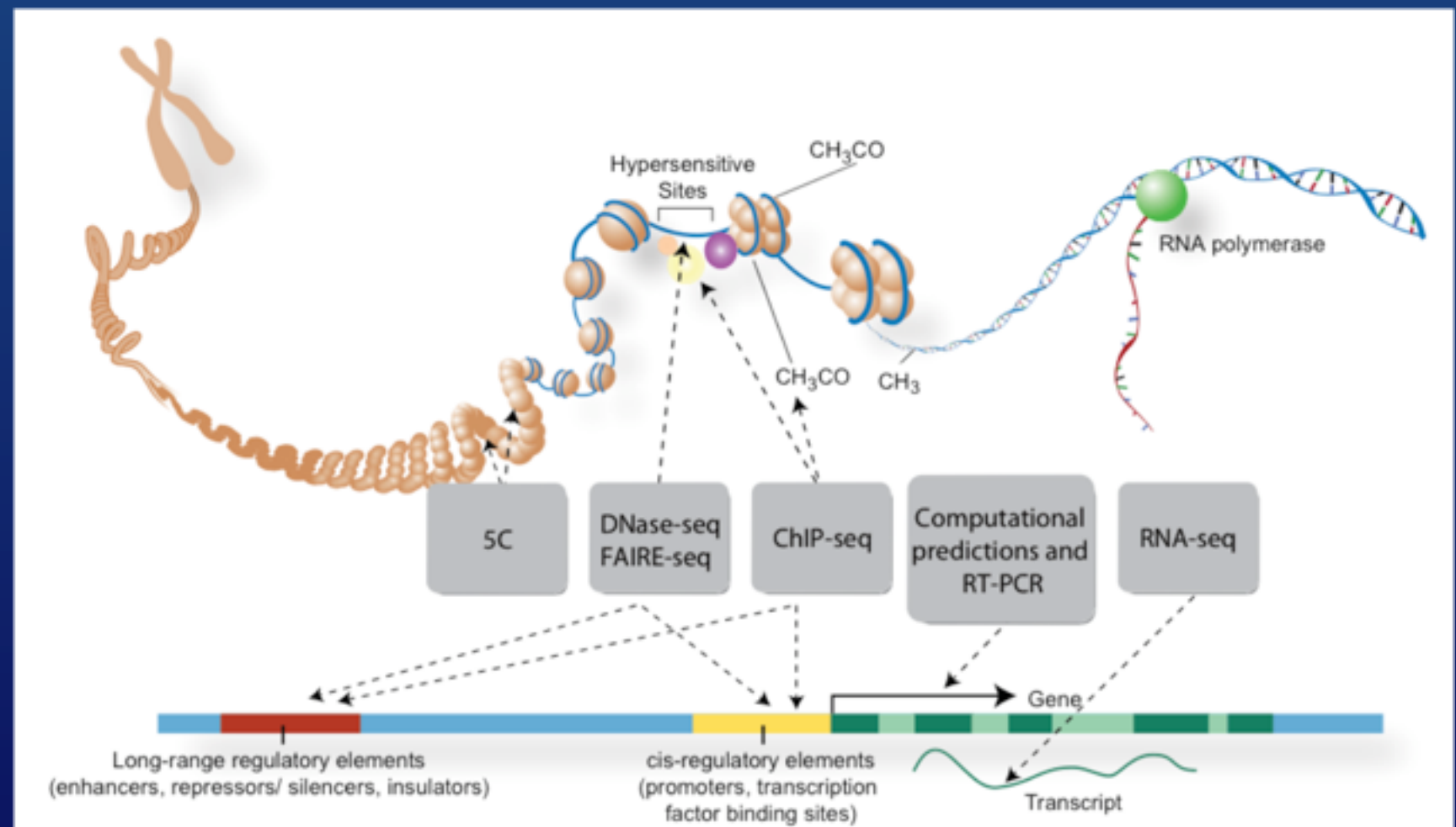


Mais seulement 1.2% du génome code pour des protéines

- À quoi sert le reste du génome ?
 - ➔ À produire des centaines de milliers d'ARN non-codant ?



The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) Consortium is an international collaboration of research groups funded by the National Human Genome Research Institute (NHGRI). The goal of ENCODE is to build a comprehensive parts list of functional elements in the human genome, including elements that act at the protein and RNA levels, and regulatory elements that control cells and circumstances in which a gene is active.



Quel est le rôle des ARN non-codant ?

- Contrôler l'expression de protéines
- Comprendre comment fonctionne ces ARN non-codant nous permettra de mieux comprendre les programmes cellulaires et ainsi d'intervenir de l'extérieur de la cellule (de manière exogénique) sur l'output de protéines

Les siRNA sont des ARN artificiels (exogènes) qui interfèrent avec l'expression d'une protéine



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Andrew Z. Fire, Craig C. Mello



The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006

Nobel Prize Award Ceremony

Andrew Z. Fire

Craig C. Mello



Photo: L. Cicero

Andrew Z. Fire

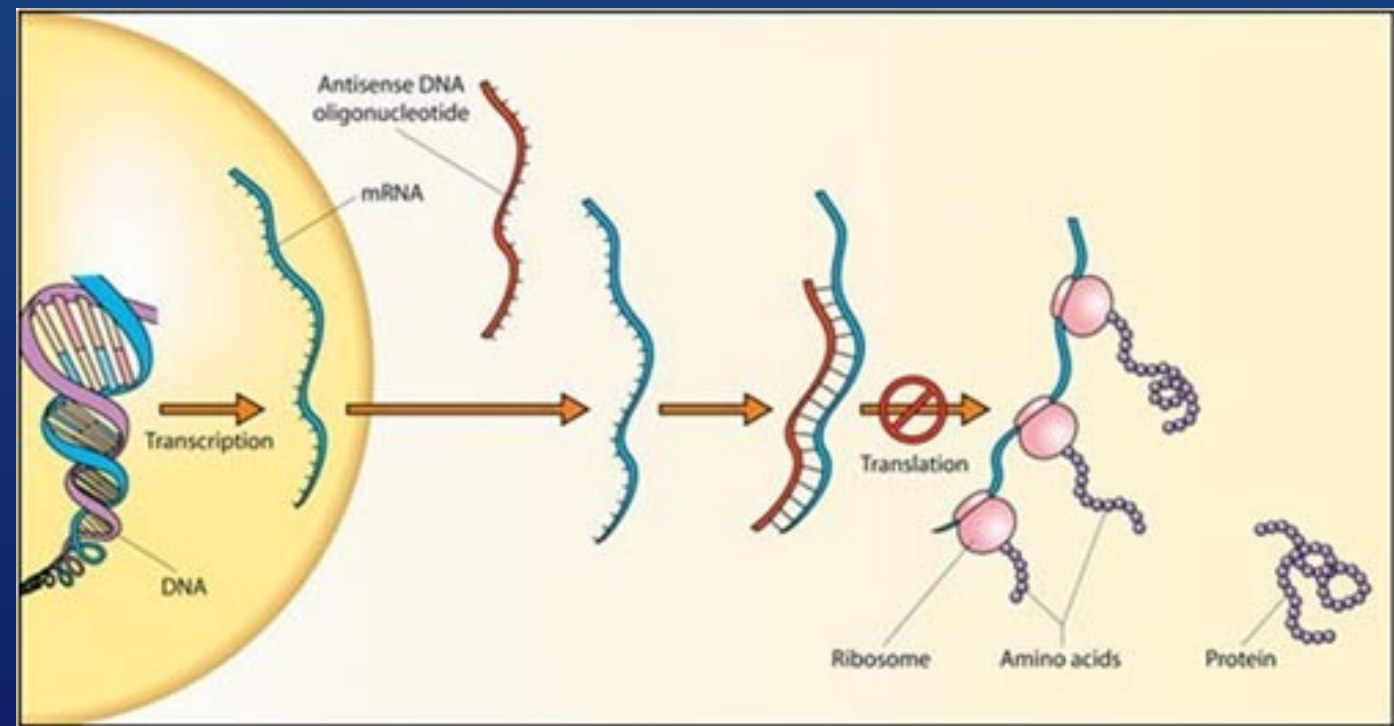


Photo: J. Mottern

Craig C. Mello

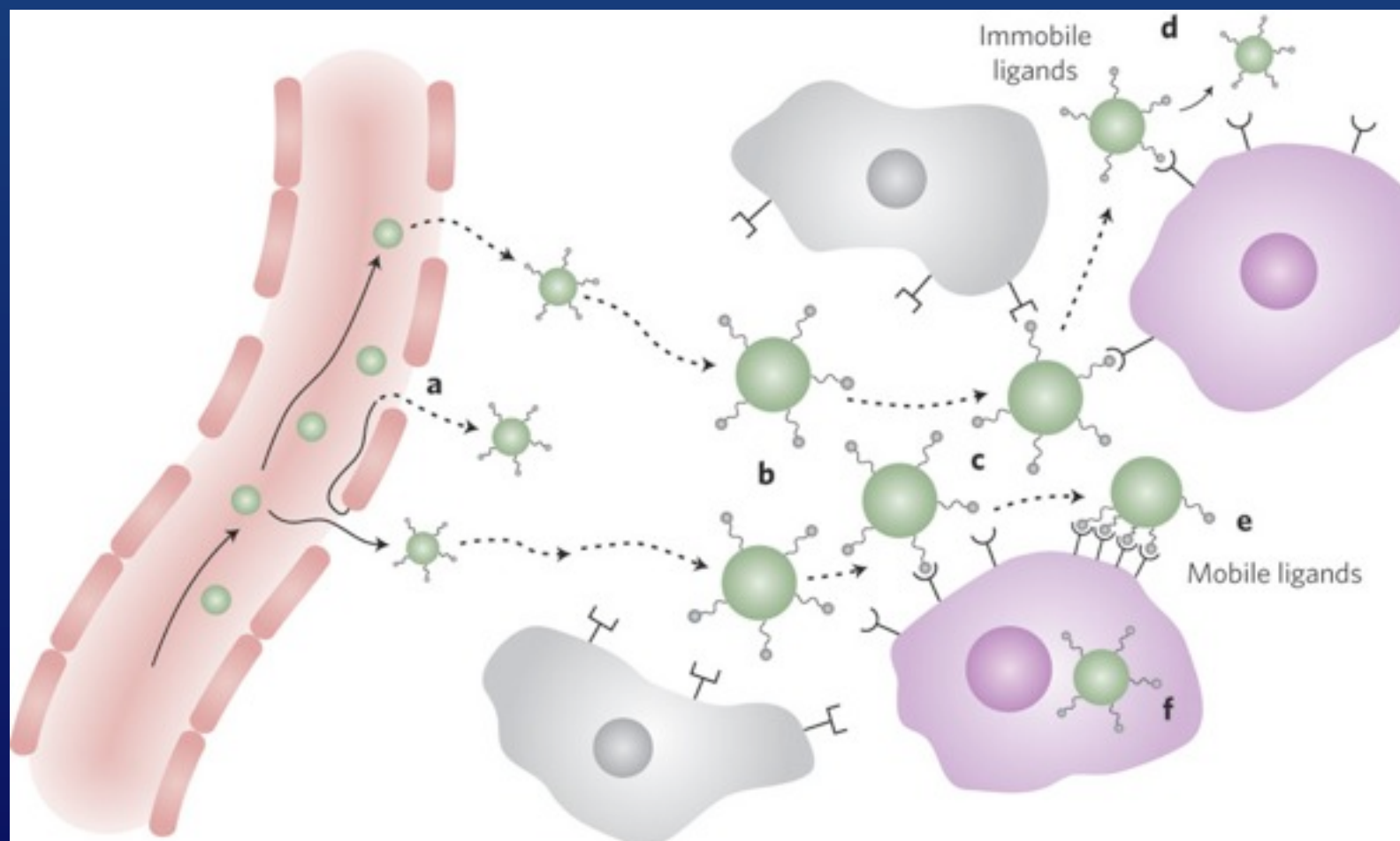
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006 was awarded jointly to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello "for their discovery of RNA interference - gene silencing by double-stranded RNA"

Photos: Copyright © The Nobel Foundation



Le nouvel âge de la pharmacologie consiste à “livrer” des siRNA dans des cellules

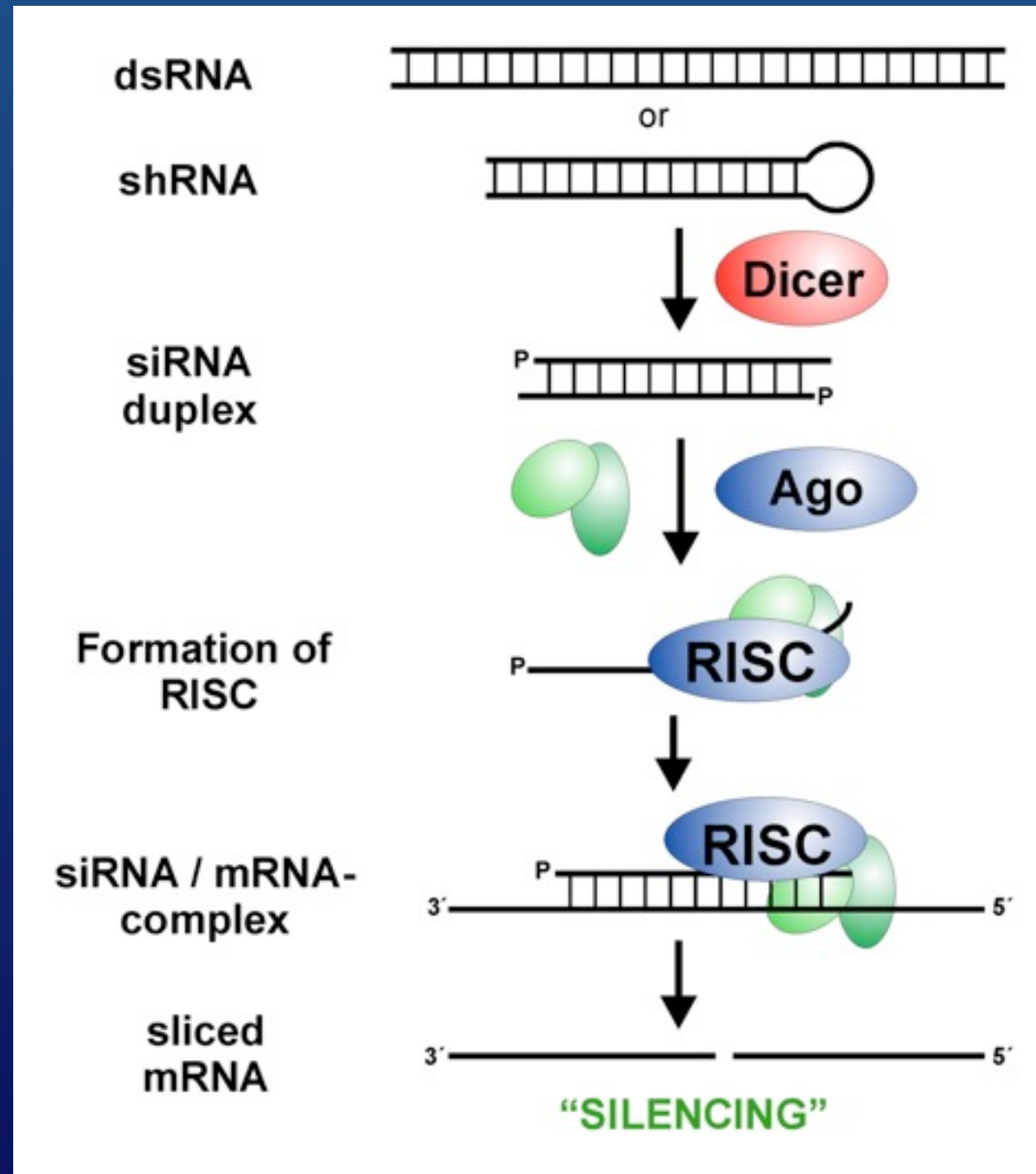
- Livrer des nanoparticules dans les vésicules
- Cibler les cellules malades



Encapsulées dans des nanoparticules, les molécules thérapeutiques peuvent viser sélectivement jusqu'à l'intérieur même des cellules malades. Les essais cliniques ont commencé, notamment pour le traitement des cancers.

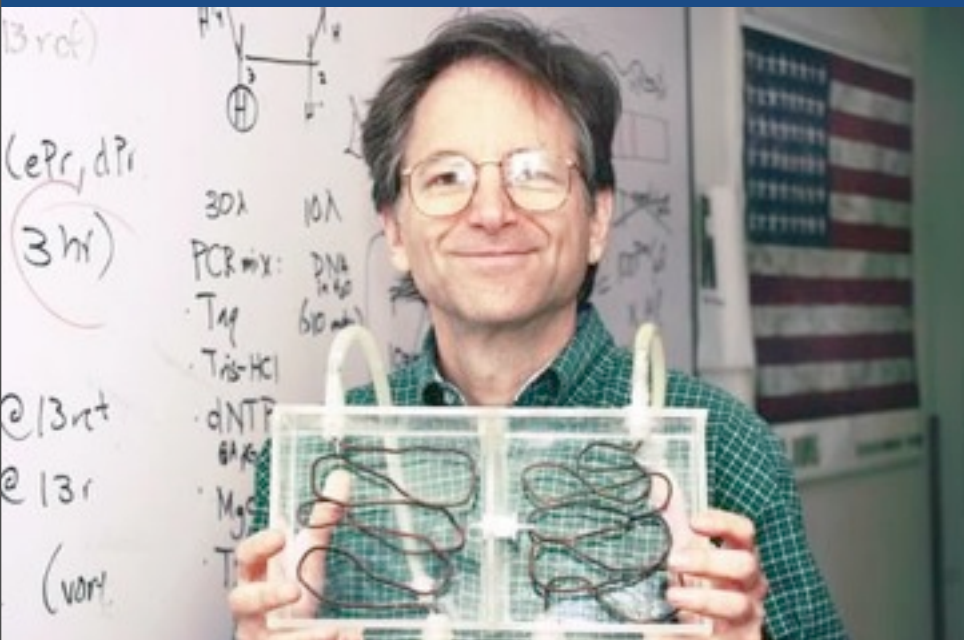


Les siRNA s'hybrident aux messagers des gènes



@gene-quantification.info

L'hybridation est à la base du calcul ADN



Adleman 1994

Science

Molecular Computation of Solutions to Combinatorial Problems

Leonard M. Adleman

The tools of molecular biology were used to solve an instance of the directed Hamiltonian path problem. A small graph was encoded in molecules of DNA, and the "operations" of the computation were performed with standard protocols and enzymes. This experiment demonstrates the feasibility of carrying out computations at the molecular level.



In 1959, Richard Feynman gave a visionary talk describing the possibility of building computers that were "sub-microscopic".

R. P. Feynman, in *Minaturization*, D. H. Gilbert, Ed. (Reinhold, New York, 1961), pp. 282-296.

Nobel Price in Physics in 1965

L'hybridation est la base du calcul ADN



L'algorithme proposé par Adleman est le suivant :

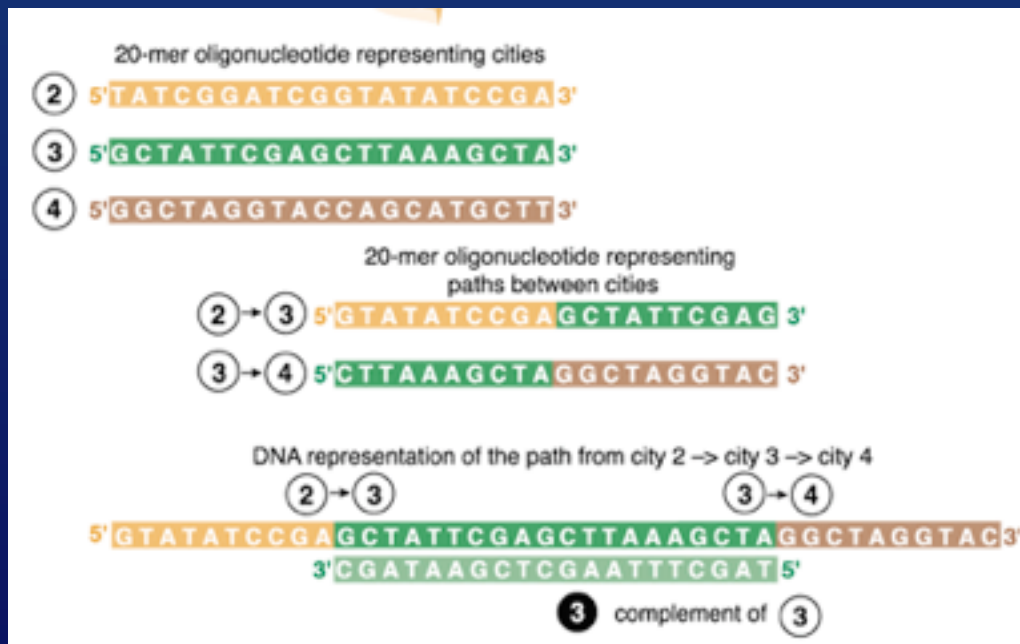
1. Générer un grand nombre de séquences, correspondant à des chemins aléatoires ;
2. Filtrer (par exemple par la masse) pour ne garder que les chemins avec n sommets (où n est la taille du graphe) ;
3. Filtrer pour ne garder que les chemins qui contiennent une fois chaque sommet ;
4. S'il reste des séquences qui passent les deux filtres, le graphe a un chemin hamiltonien.

Fabriquer les oligos complémentaires qui se liguent par éliassage

Gel d'électrophorèse

Purification par chromatographie d'affinité utilisant des billes magnétiques

S'il reste du produit, c'est que le graphe contient un chemin hamiltonien

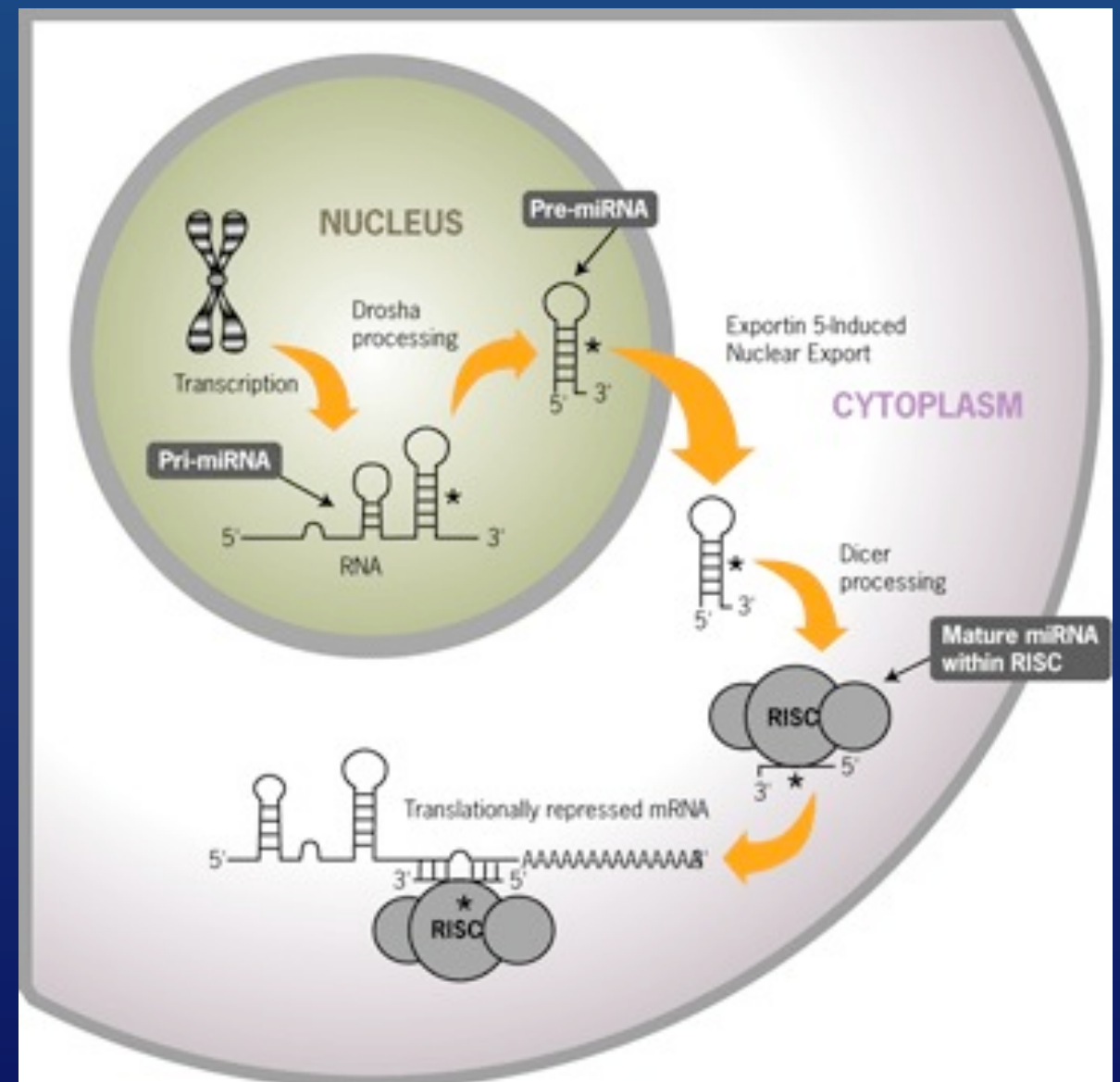


Qu'est-ce qu'on apprend du calcul ADN ?

- L'introduction d'un siRNA ou de tout autre ARN dans la cellule change le graphe d'interactions (d'hybridation) !
- On peut donc s'attendre à des effets difficiles voir impossibles (NP-complet) à prédire

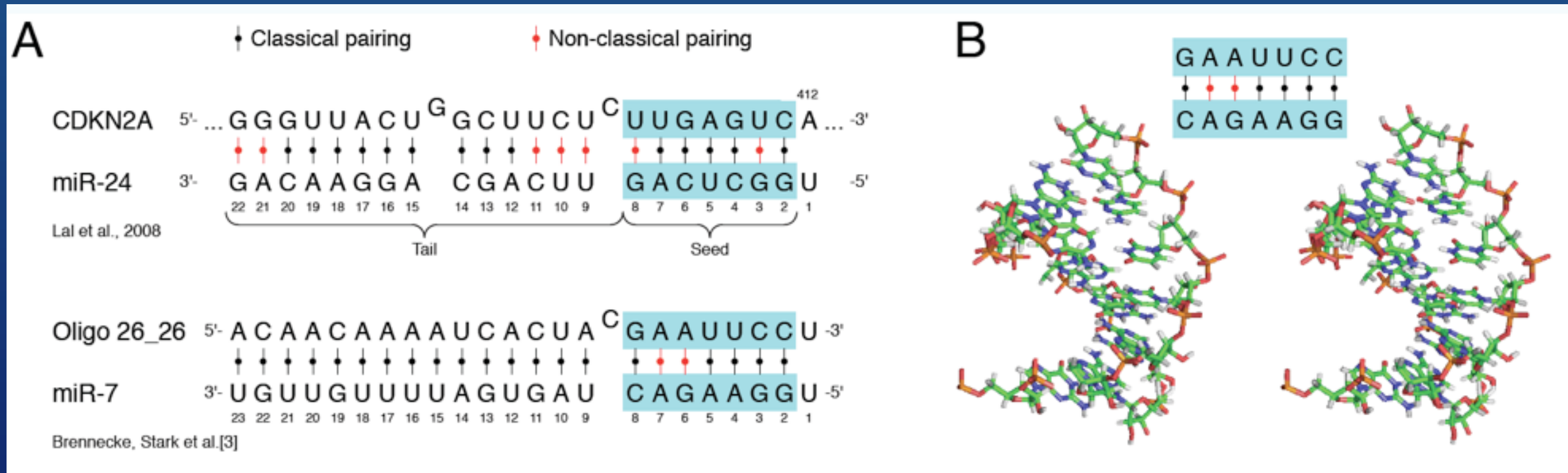
La cellule utilise le phénomène de l'interférence ARN

- Les miRNA forment des familles de gènes non-codant qui sont directement impliquées dans le contrôle génétique



- Ils ont des rôles dans :
 - La différenciation des types cellulaires
 - Les maladies
 - Les états des cellules différenciées : prolifération, sénescence, apoptose, cancer

Les miRNA s'hybrident aux mRNA avec une complémentarité imparfaite

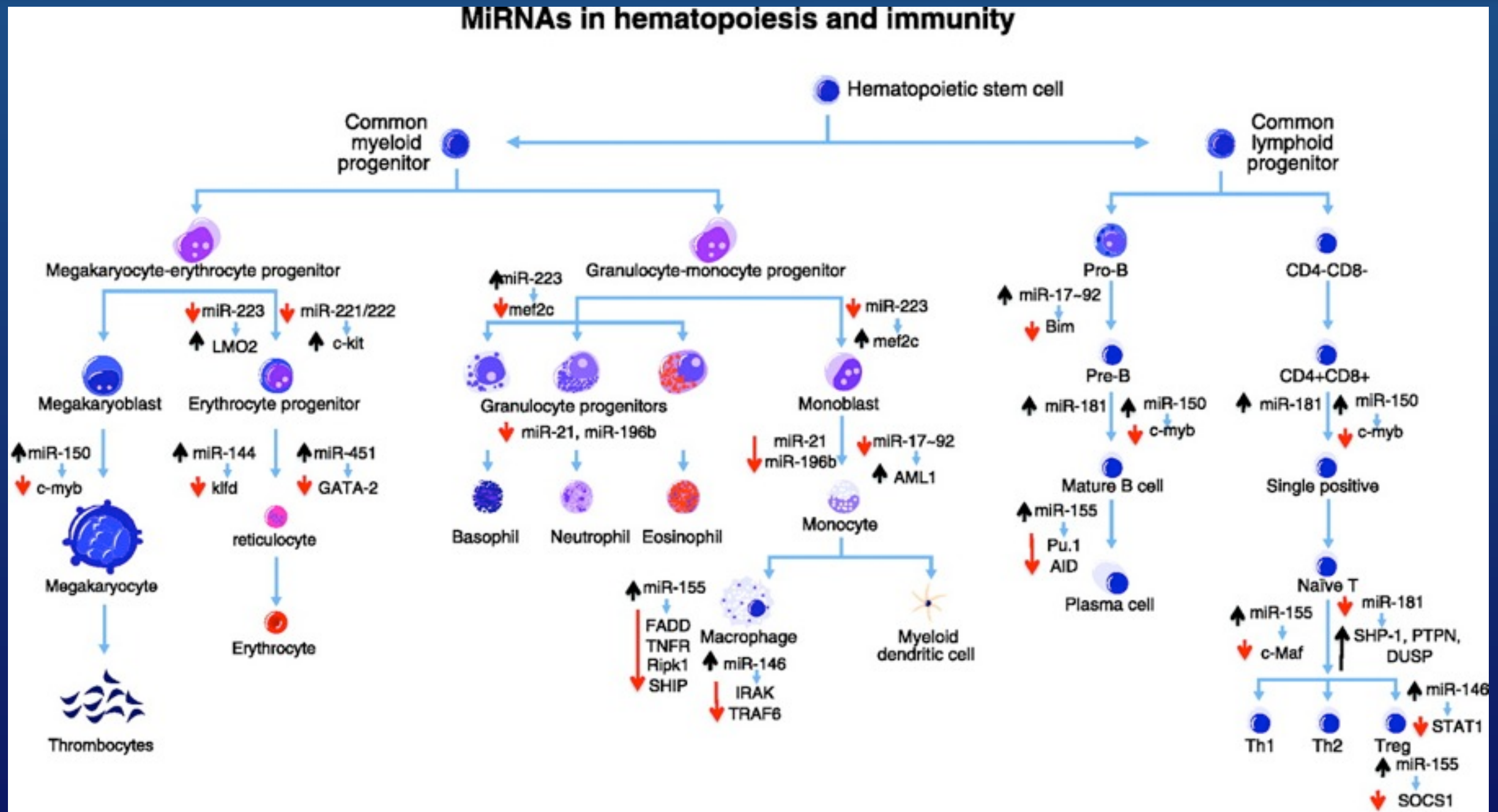


Calculer l'énergie d'hybridation
ajoute donc de la complexité à
sa combinatoire !



Scott

Le rôle des miRNA dans la différenciation cellulaire



La reprogrammation des cellules différenciées

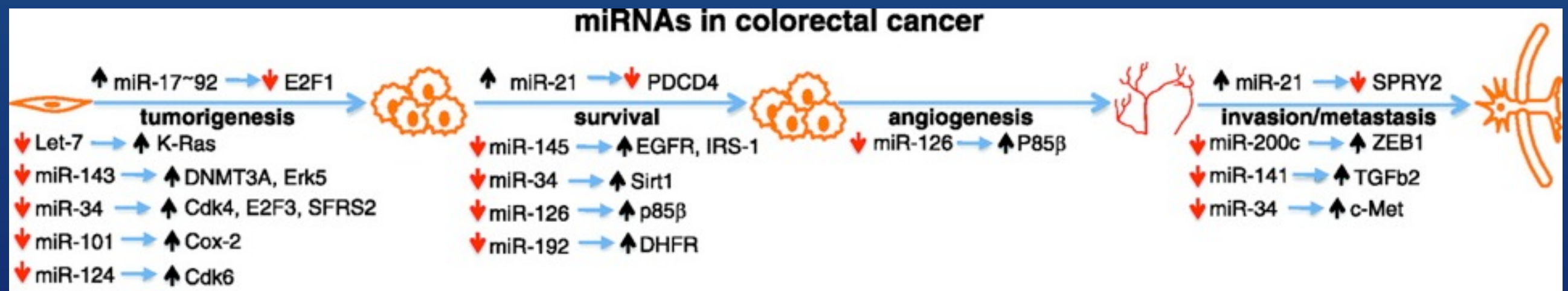


- Des miRNA seuls peuvent reprogrammer les cellules différenciées en cellules embryonnaires
 - Le groupe de miRNA miR-302/367 reprogramme les fibroblasts de la souris et humains
- ➡ plutôt que de parser l'output, on change le programme !

MiRNA dans le cancer

- Les miRNA peuvent provoquer le cancer (**oncogènes**) ou nous défendre contre son développement (**suppresseurs de tumeurs**)
- L'augmentation de la quantité d'un miRNA ciblant des protéines suppresseur de tumeurs est oncogénique (puisque ça fait baisser la quantité de suppresseur de tumeurs)
- La perte d'un miRNA ciblant des protéines oncogéniques est suppresseur de tumeurs (puisque ça fait augmenter la quantité d'oncogènes)
- Le matériel génétique des individus diffère par des mutations. Ces mutations peuvent s'exprimer dans les gènes codant et non-codant.
- Une mutation dans un miRNA peut changer ses affinités d'hybridation pour les gènes ciblés. C'est une autre manière d'augmenter ou de diminuer, respectivement, des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs (e.g. miR-125a)

Rôle des miRNA dans le cancer



miR-125a cible des oncogènes du cancer du sein

Human Molecular Genetics, 2007, Vol. 16, No. 9 1124–1131
doi:10.1093/hmg/ddm062
Advance Access published on March 30, 2007

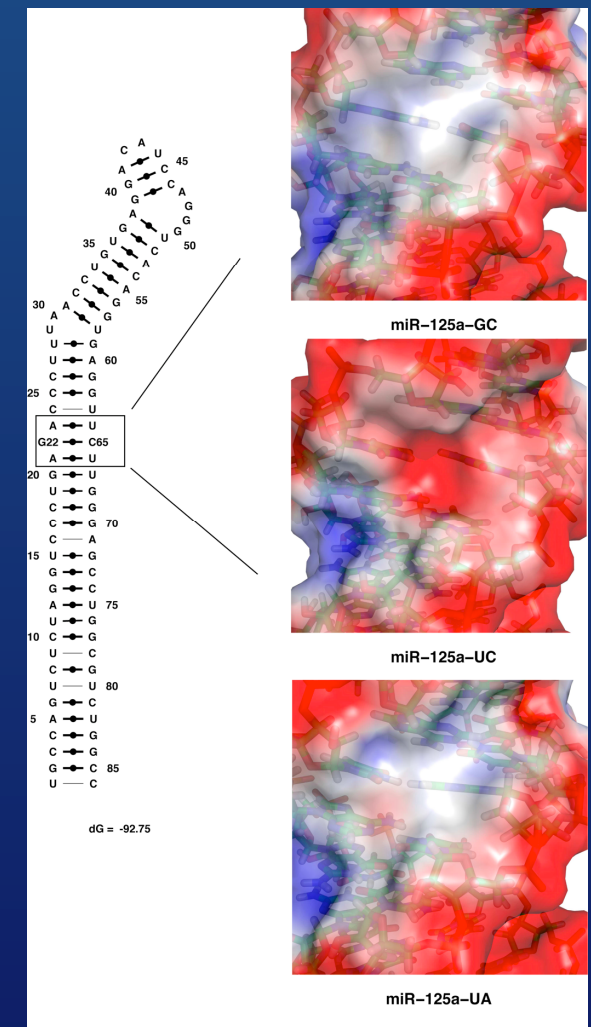
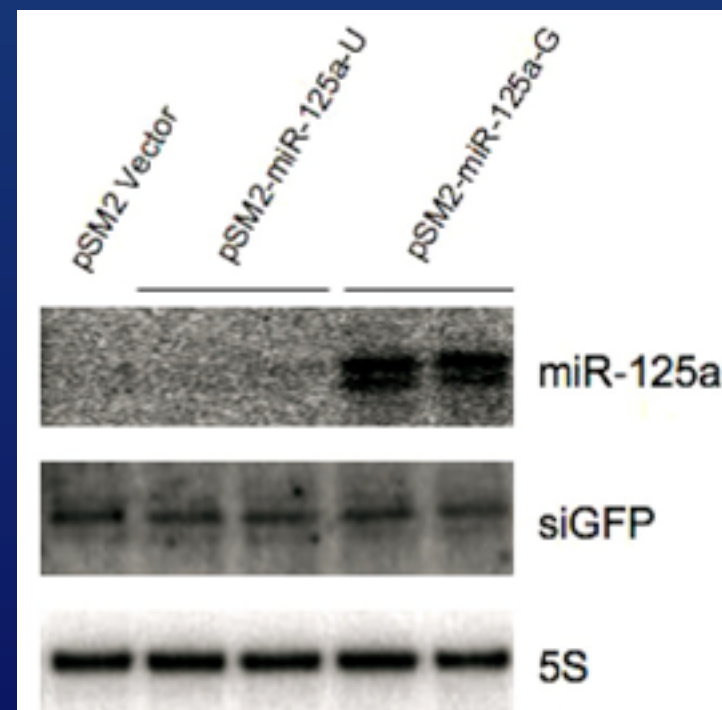
Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA

Ranhui Duan¹, Changhui Pak^{1,2} and Peng Jin^{1,2,*}

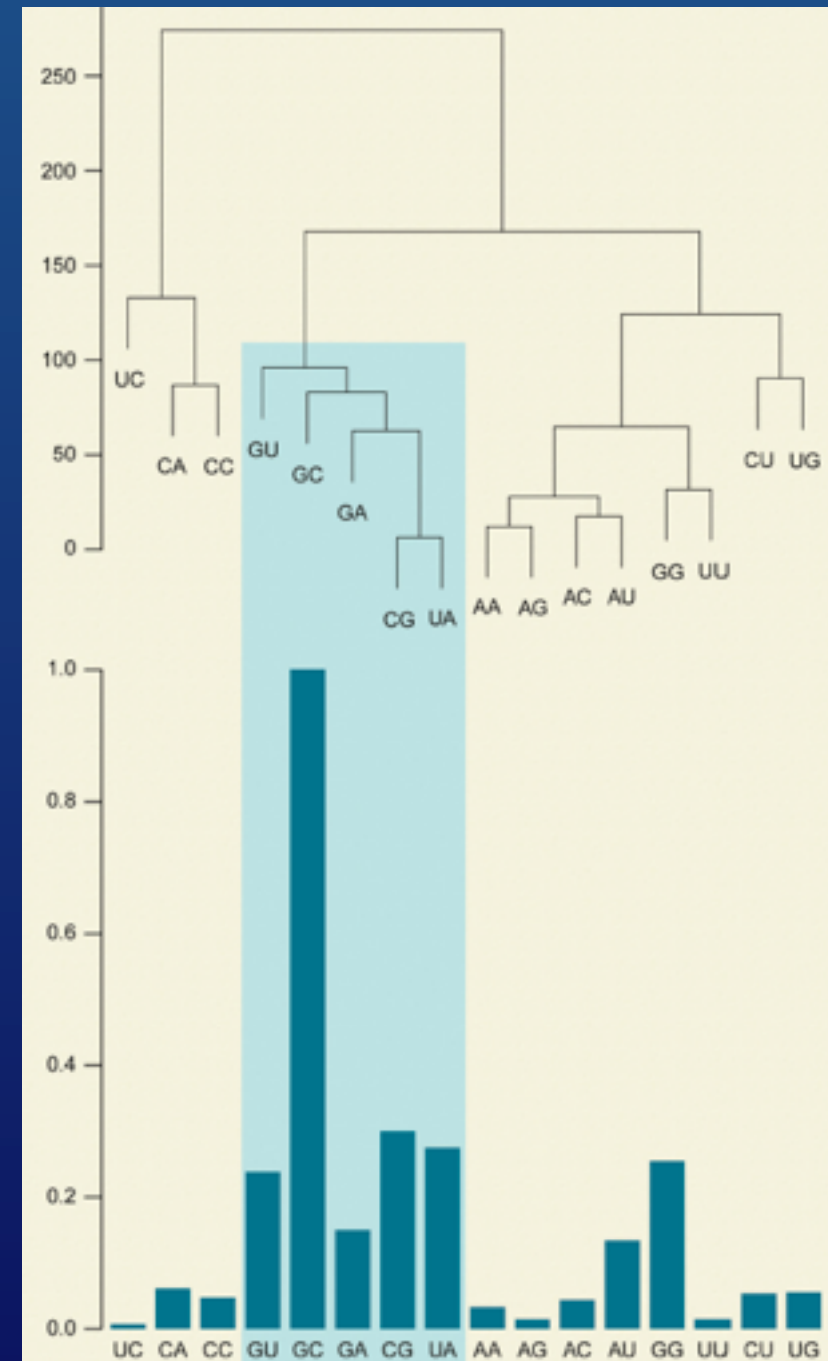
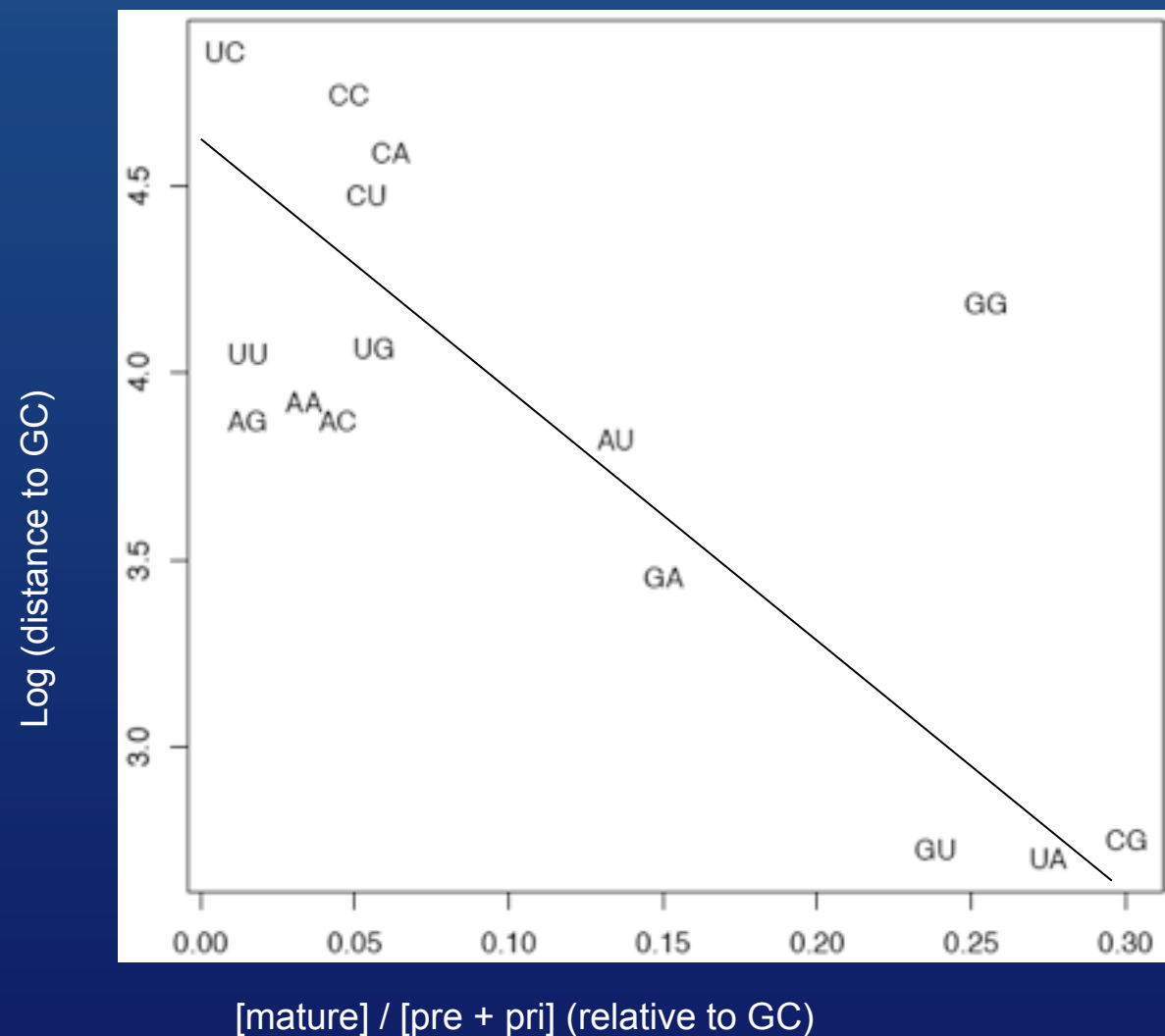
¹Department of Human Genetics and ²Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA 30322, USA

Received January 25, 2007; Revised and Accepted March 13, 2007

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that inhibit expression of specific target genes at the post-transcriptional level. Sequence variations in miRNA genes, including pri-miRNAs, pre-miRNAs and mature miRNAs, could potentially influence the processing and/or target selection of miRNAs. In this study, we have systematically identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with 227 known human miRNAs. Among 323 total SNPs that we identify, 12 are located within the miRNA precursor and one is at the eighth nucleotide (+8) of the mature miR-125a, which has been proposed to play a critical role in recognition of mRNA targets by miRNAs. Through a series of *in vivo* analyses, we unexpectedly find that this miR-125a SNP significantly blocks the processing of pri-miRNA to pre-miRNA, in addition to reducing miRNA-mediated translational suppression. Thus, our study reveals an additional structural requirement for pri-miRNA processing and emphasizes the importance of identifying new miRNA SNPs and their contributions to miRNA biogenesis and human genetic disease.



Les distances de TopoSpace de avec l'allèle majeur des mutants corrélient avec les données d'expression



Dallaire

MiRNA artificiels dans les thérapies du cancer

- Reprogrammer les cellules cancéreuses vers un état normal (débuggage)
- Induire l'apoptose des cellules cancéreuses (collecte d'ordures)

Design de smart RNAs



Designing small multiple-target artificial RNAs

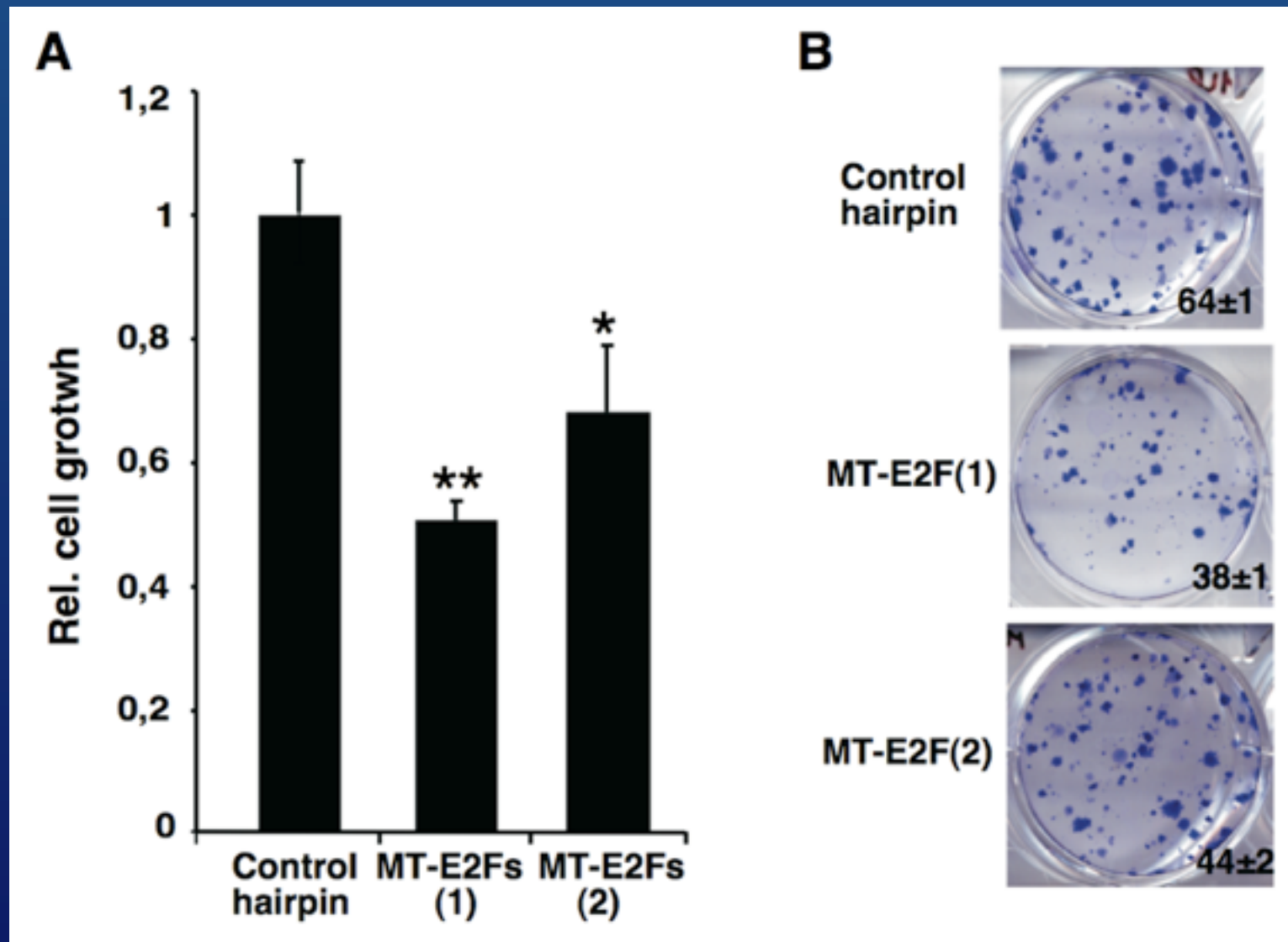
Nucleic Acids
Research

Vincent De Guire¹, Maxime Caron², Nicolas Scott², Catherine Ménard¹,
Marie-France Gaumont-Leclerc¹, Pascal Chartrand¹, François Major^{2,*} and
Gerardo Ferbeyre^{1,*}



DeGuire et al. *NAR* 2010

Deux smart RNAs qui ont un impact sur la prolifération de cellules PC3 (cancer de la prostate)



Clonogenic assays.

(A) Relative cell growth.

(B) Decreased number of colonies.

DeGuire et al. *NAR* 2010

On modélise les interactions du transcriptome par le problème des mariages stables

```
function stableMatching {  
  Initialize all  $m \in M$  and  $w \in W$  to free  
  while  $\exists$  free man  $m$  who still has a woman  $w$  to propose to {  
     $w = m$ 's highest ranked such woman who he has not proposed to yet  
    if  $w$  is free  
       $(m, w)$  become engaged  
    else some pair  $(m', w)$  already exists  
      if  $w$  prefers  $m$  to  $m'$   
         $(m, w)$  become engaged  
         $m'$  becomes free  
      else  
         $(m', w)$  remain engaged  
    } // while  
  } // function
```

1 propose 1; 1 est libre donc accepte
2 propose 3; 3 est libre donc accepte
3 propose 4; 4 est libre donc accepte
4 propose 3; 3 est avec 2, donc rejette
4 propose 2; 2 est libre donc accepte

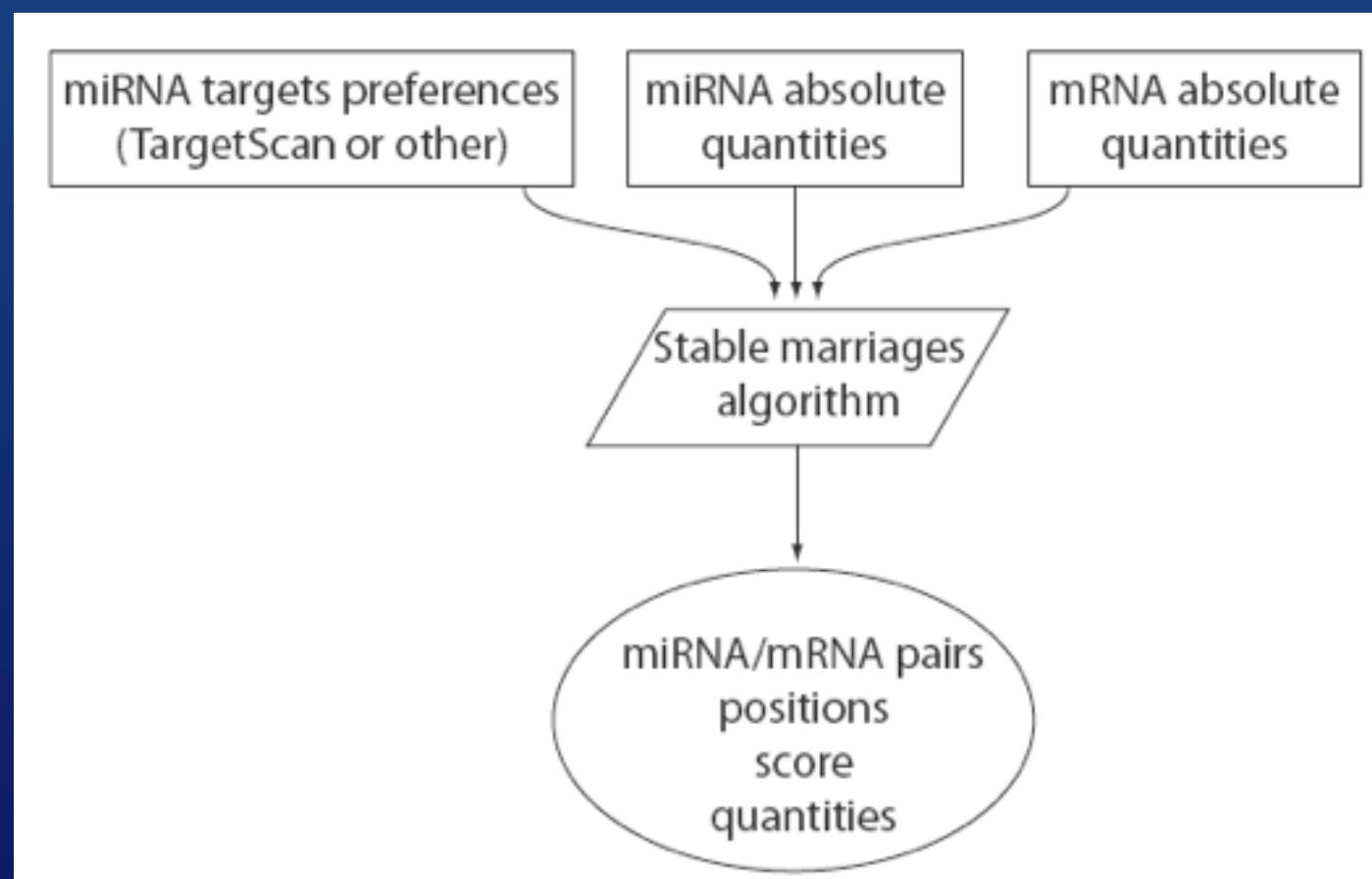
1	<u>1</u>	3	2	4
2	<u>3</u>	4	1	2
3	<u>4</u>	2	3	1
4	3	<u>2</u>	1	4
1	2	<u>1</u>	3	4
2	4	1	2	<u>3</u>
3	1	3	<u>2</u>	4
4	<u>2</u>	3	1	4

Acceptor
Proposer

Lier le transcriptome et le protéome par les mariages stables

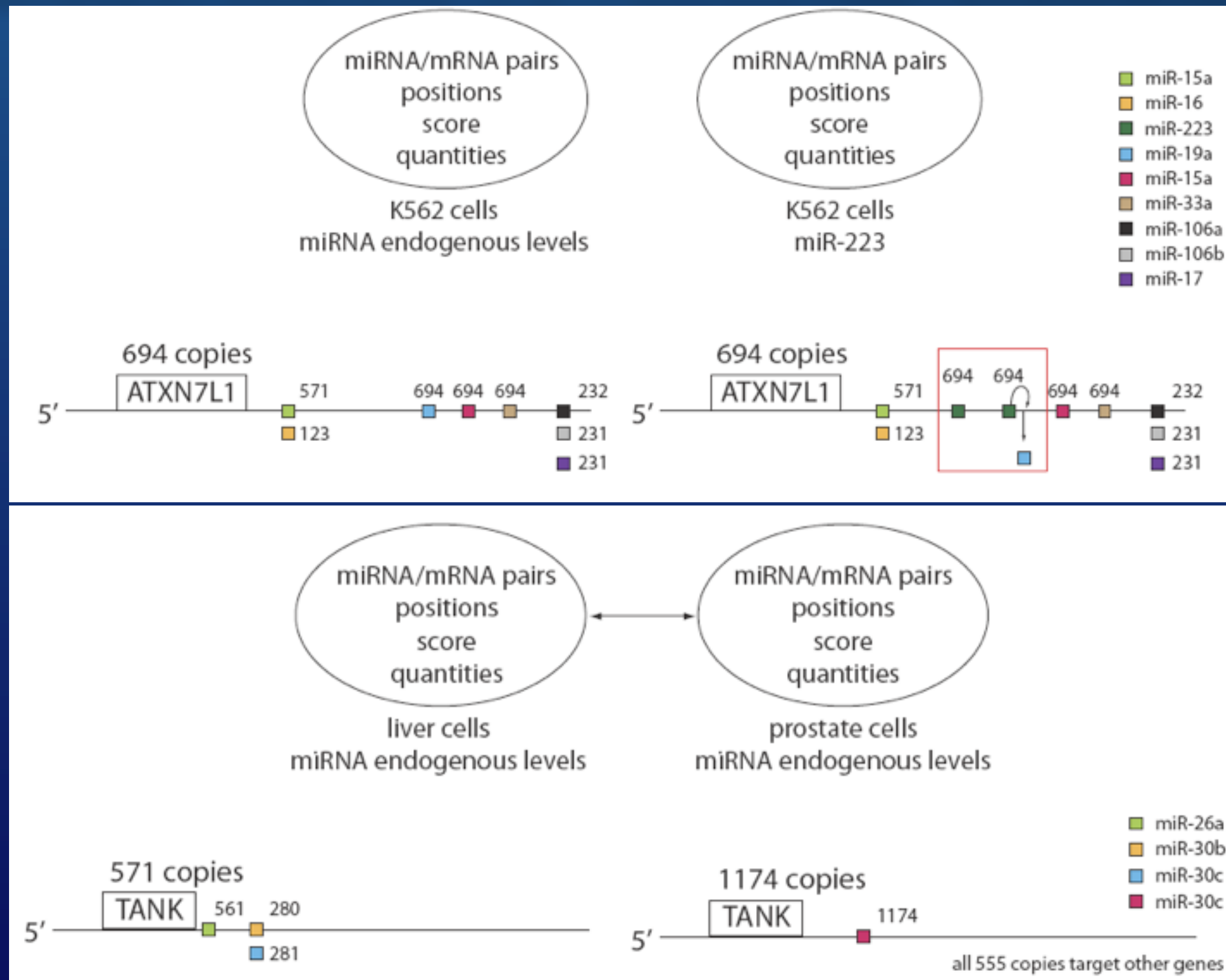
function *microTargetome* ::

transcriptome → interactions → protéome



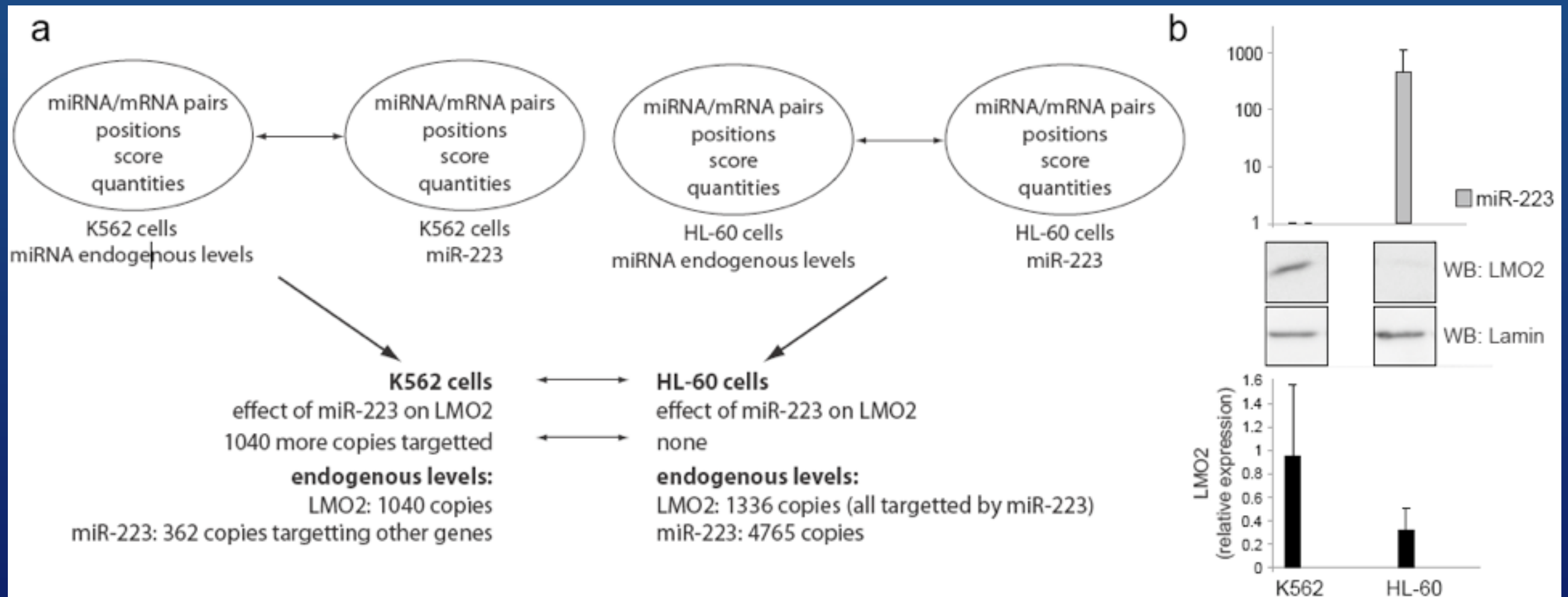
Lisi & Paquette

Effets cascade et de spécificité cellulaire



Lisi & Paquette

Effet de saturation



Lisi & Paquette

4 rapports dans le dernier numéro de Cell (du 14 octobre 2011) confirment les phénomènes...

Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs p344

Yvonne Tay, Lev Kats, Leonardo Salmena, Dror Weiss, Shen Mynn Tan, Ugo Ala, Florian Karreth, Laura Poliseno, Paolo Provero, Ferdinando Di Cunto, Judy Lieberman, Isidore Rigoutsos, Pier Paolo Pandolfi

In Vivo Identification of Tumor- Suppressive PTEN ceRNAs in an Oncogenic BRAF-Induced Mouse Model of Melanoma p382

Florian A. Karreth, Yvonne Tay, Daniele Perna, Ugo Ala, Shen Mynn Tan, Alistair G. Rust, Gina DeNicola, Kaitlyn A. Webster, Dror Weiss, Pedro A. Perez-Mancera, Michael Krauthammer, Ruth Halaban, Paolo Provero, David J. Adams, David A. Tuveson, Pier Paolo Pandolfi

Free Sponsored Article

A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA p358

Marcella Cesana, Davide Cacchiarelli, Ivano Legnini, Tiziana Santini, Olga Sthandier, Mauro Chinappi, Anna Tramontano, Irene Bozzoni

An Extensive MicroRNA-Mediated Network of RNA-RNA Interactions Regulates Established Oncogenic Pathways in Glioblastoma p370

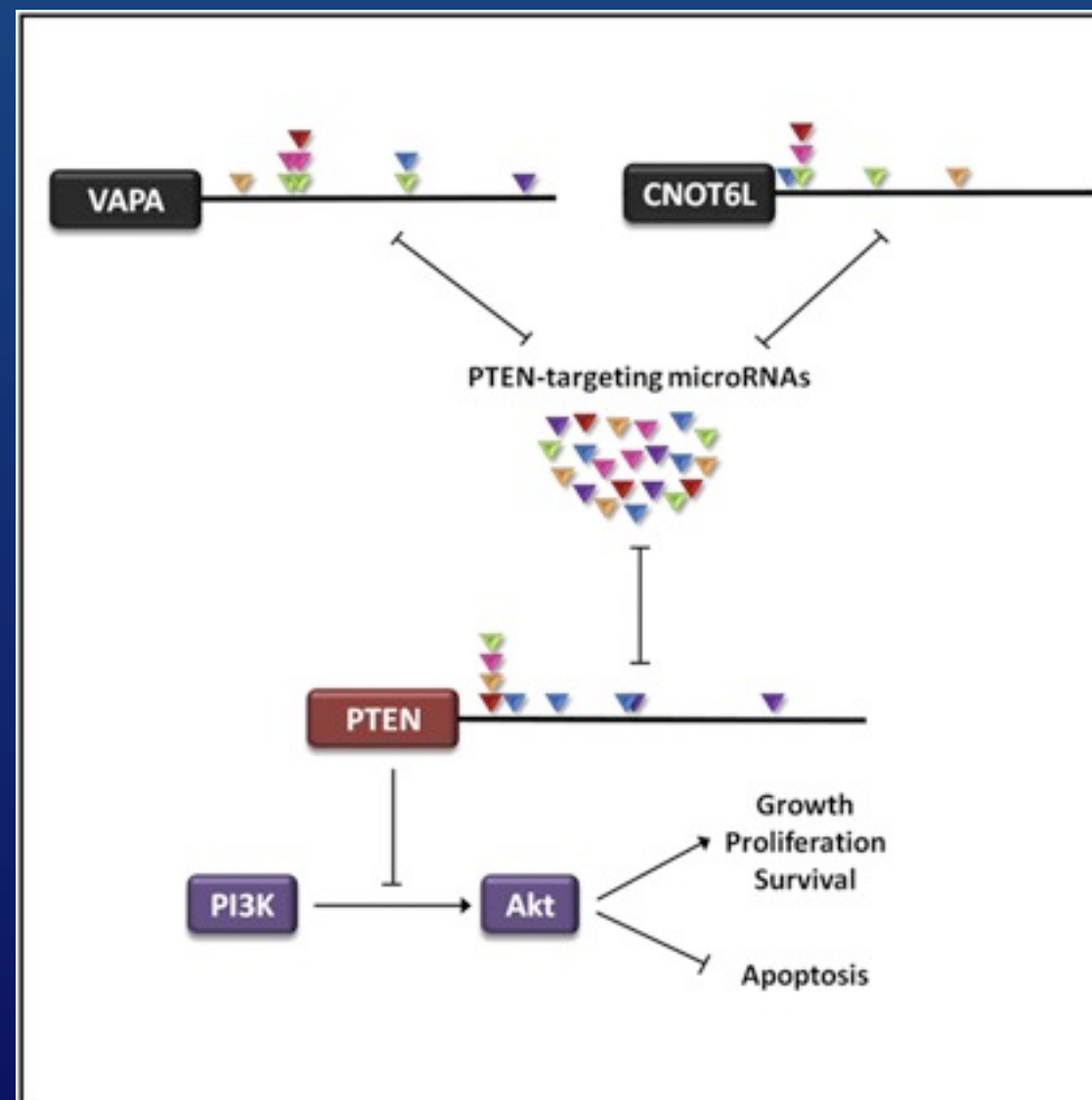
Pavel Sumazin, Xuerui Yang, Hua-Sheng Chiu, Wei-Jen Chung, Archana Iyer, David Llobet-Navas, Presha Rajbhandari, Mukesh Bansal, Paolo Guarnieri, Jose Silva, Andrea Califano

Cell

Contrôle de PTEN par des miRNA dépend de la présence de gènes contrôlés par les mêmes miRNA (ceRNA)

Coding-Independent Regulation of the Tumor Suppressor PTEN by Competing Endogenous mRNAs p344

Yvonne Tay, Lev Kats, Leonardo Salmena, Dror Weiss, Shen Mynn Tan, Ugo Ala, Florian Karreth, Laura Poliseno, Paolo Provero, Ferdinando Di Cunto, Judy Lieberman, Isidore Rigoutsos, Pier Paolo Pandolfi

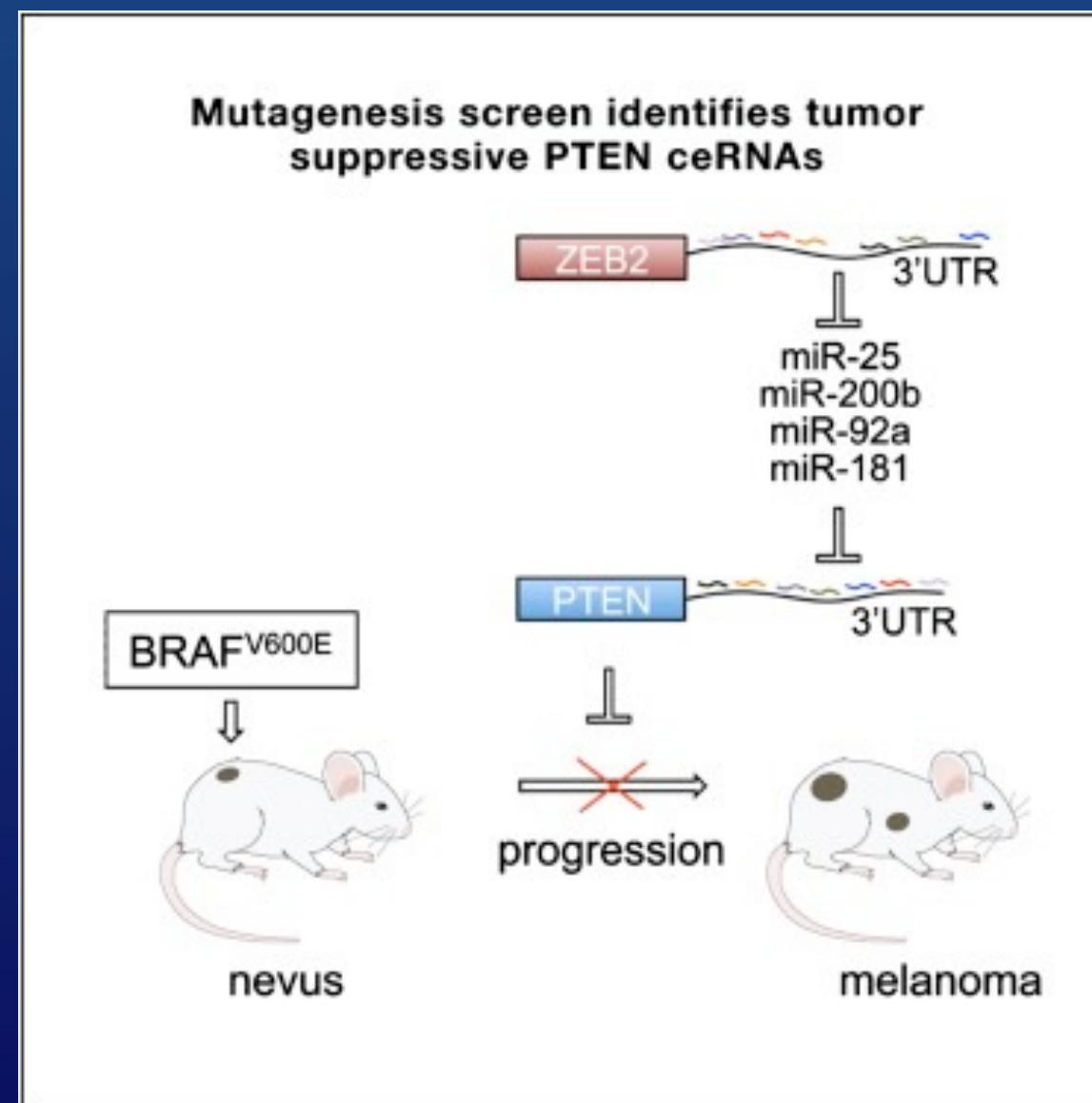


Cell

Confirmation du rôle des ceRNA dans le cancer

In Vivo Identification of Tumor- Suppressive PTEN ceRNAs in an Oncogenic BRAF-Induced Mouse Model of Melanoma p382

Florian A. Karreth, Yvonne Tay, Daniele Perna, Ugo Ala, Shen Mynn Tan, Alistair G. Rust, Gina DeNicola, Kaitlyn A. Webster, Dror Weiss, Pedro A. Perez-Mancera, Michael Krauthammer, Ruth Halaban, Paolo Provero, David J. Adams, David A. Tuveson, Pier Paolo Pandolfi

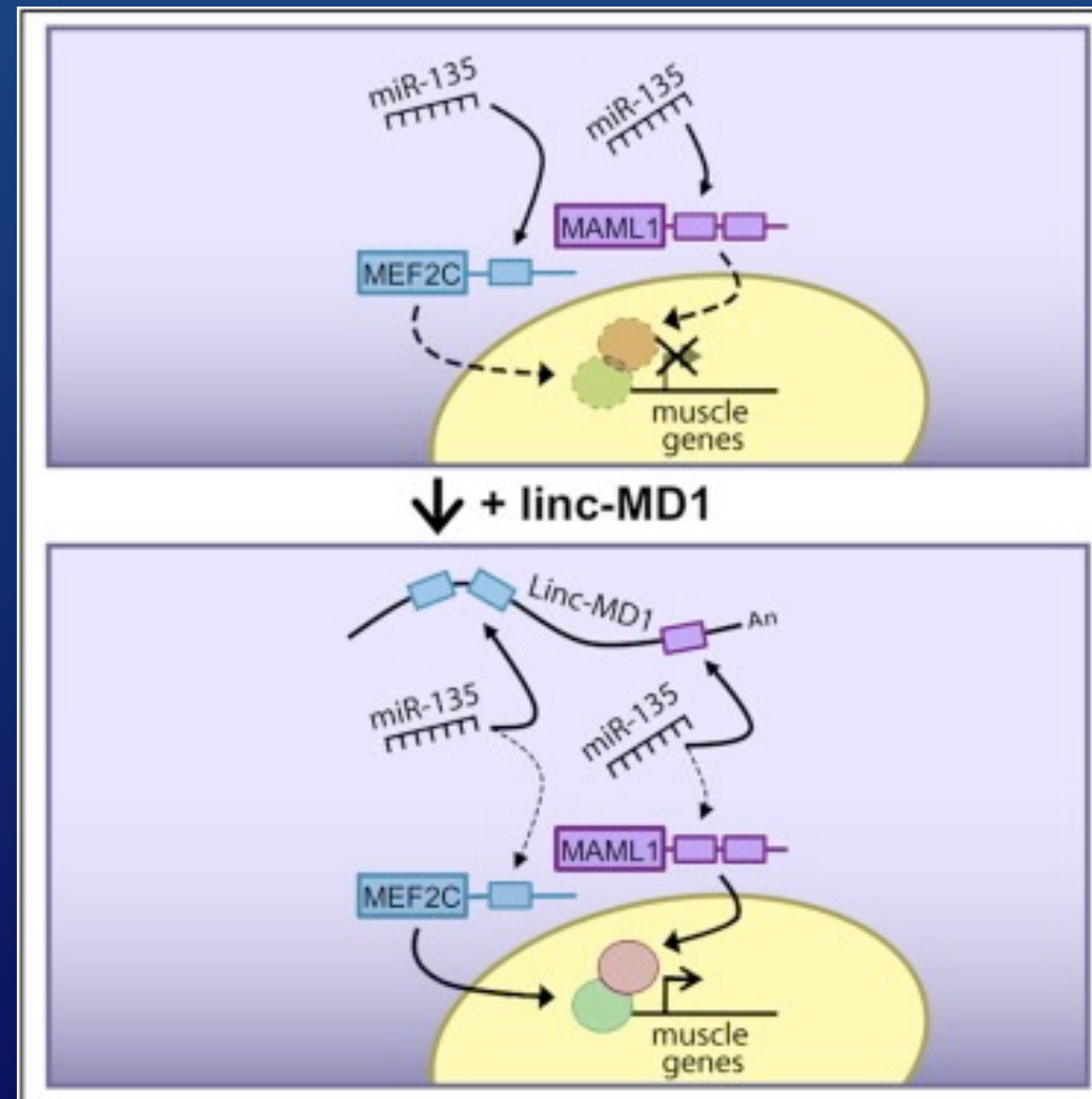


Cascade des miRNA vers un lincRNA dans la différenciation musculaire

Free Sponsored Article

A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA p358

Marcella Cesana, Davide Cacchiarelli, Ivano Legnini, Tiziana Santini, Olga Sthandier, Mauro Chinappi, Anna Tramontano, Irene Bozzoni

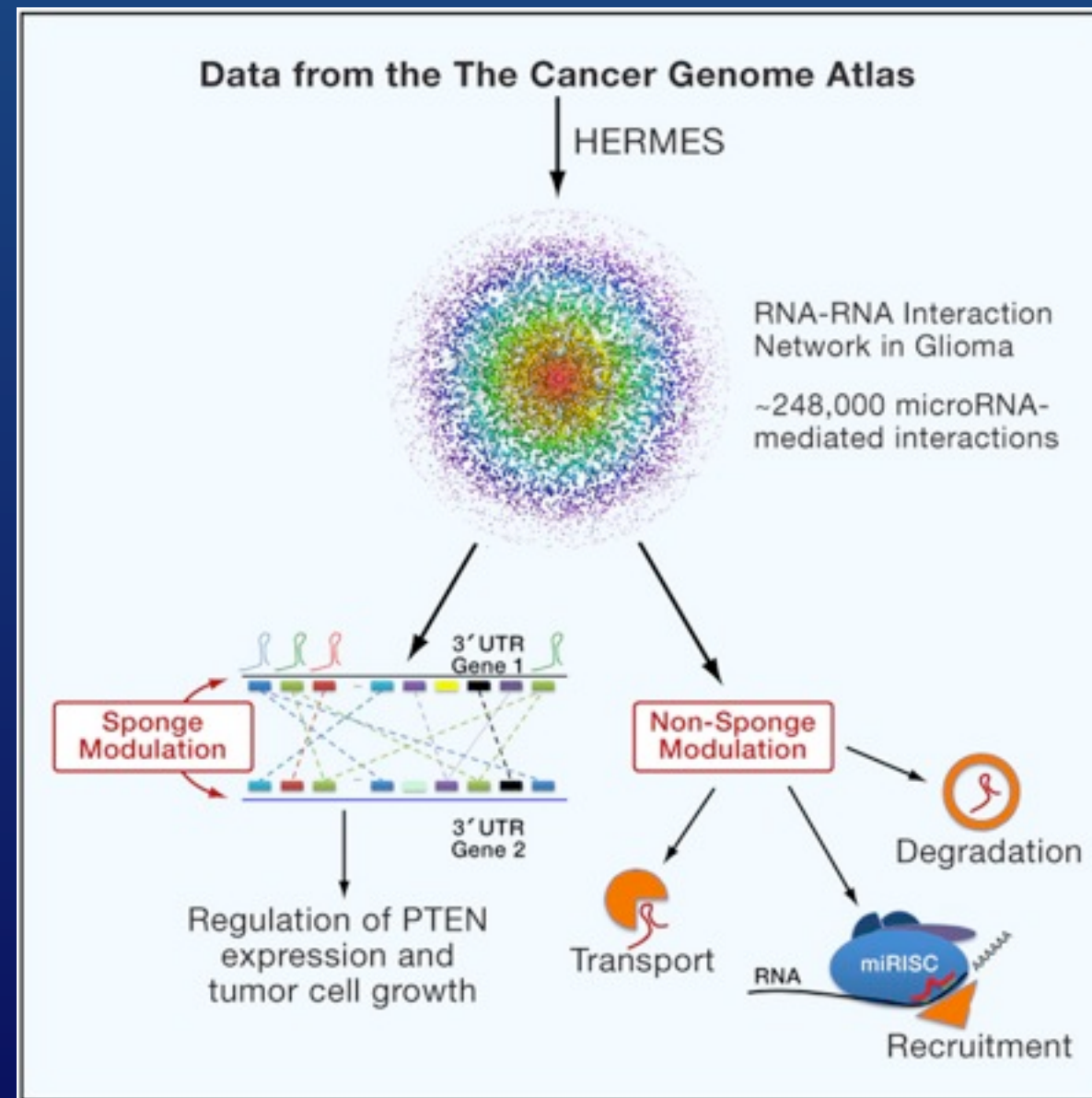


Cell

L'absence de régulateurs qui épongent les miRNA ciblant PTEN explique sa suppression

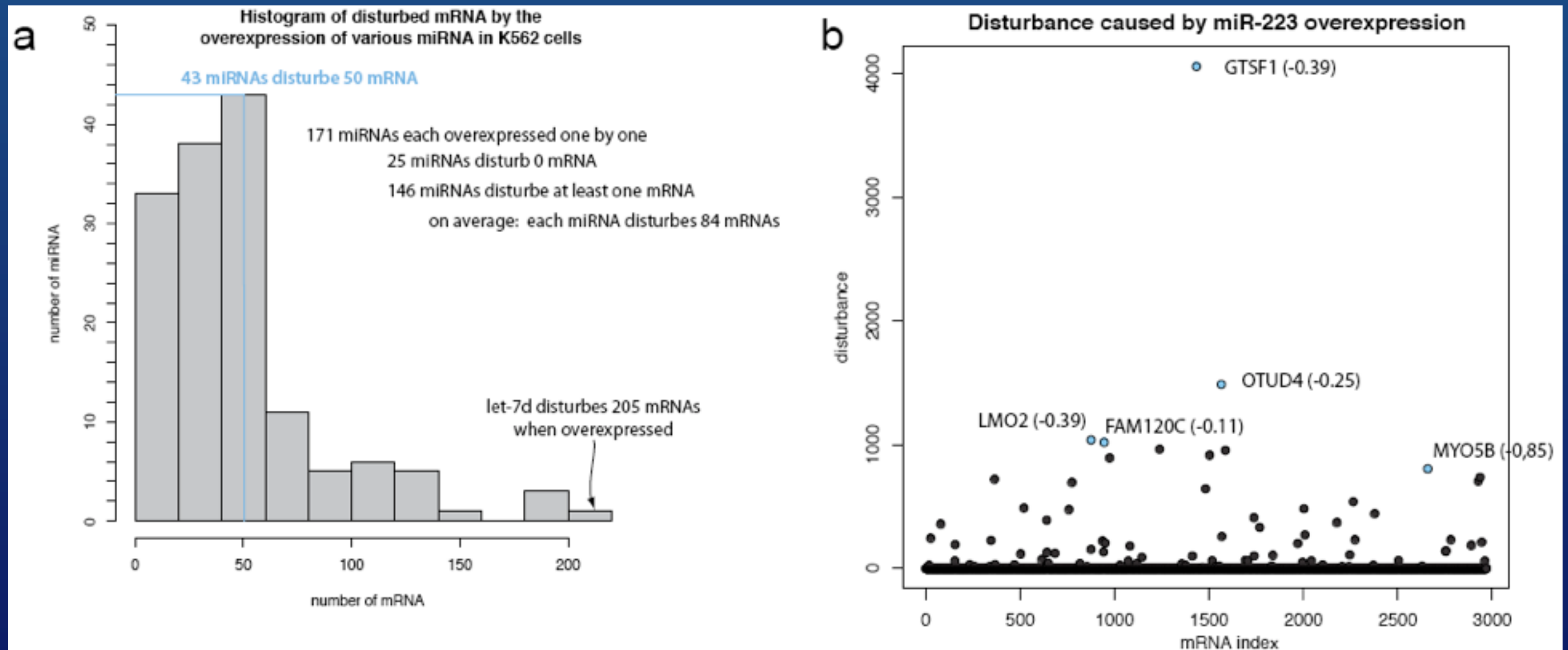
An Extensive MicroRNA-Mediated Network of RNA-RNA Interactions Regulates Established Oncogenic Pathways in Glioblastoma p370

Pavel Sumazin, Xuerui Yang, Hua-Sheng Chiu, Wei-Jen Chung, Archana Iyer, David Llobet-Navas, Presha Rajbhandari, Mukesh Bansal, Paolo Guarnieri, Jose Silva, Andrea Califano



Cell

Quantification de la portée du phénomène par les mariages stables



Lisi & Paquette

L'informatique indispensable dans la lutte contre le cancer ?

- Si le PMS ou un autre algorithme modélise bien l'état du réseau d'interactions des ARN non-codant, alors chaque fois qu'on fait intervenir un nouvel élément dans le transcriptome on doit vérifier ses effets possibles (cascade, saturation) en exécutant l'algorithme des mariages stables

Conclusions

- La cellule est un véritable ordinateur qui peut résoudre des problèmes NP-complets (instantanément et constamment)
- Le rôle des ARN est de produire mais aussi contrôler les protéines
- On peut intervenir dans le programme moléculaire de la cellule en ajoutant des ARN non-codant (e.g. siRNA et miRNA artificiels, lncRNA, etc)
- On approxime les effets d'hybridation par un algorithme qui résout le problème des mariages stables
- Bien modéliser l'hybridation des ARN et comprendre son effet sur l'output des protéines est indispensable pour fabriquer des médicaments efficaces et sans effets secondaires

Perspectives

- Le développement de cellules cancéreuses apporte des changements au niveau du transcriptome qui sont détectés par la cellule qui réagit en conséquence (système immunitaire)
- Malheureusement, la réaction immunitaire est parfois inefficace et on doit s'aider avec des médicaments
- Avec les données de transcriptomiques et de protéomiques, ainsi que d'algorithmes puissants pouvant prédire les changements d'interactions, on peut imaginer un jour équiper nos cellules de nanoparticules qui réagiront automatiquement en exprimant les ARN nécessaires à rétablir l'ordre

➡ Cela pourrait être le futur vaccin contre le cancer

Remerciements

Membres présents et passés du
laboratoire :

Frédérique Badeaux
Jean Paquette
Cédric Saule
Véronique Lisi

Karine St-Onge
Nicolas Scott
Paul Dallaire
Marc-Frédéric Blanchet
Yifei Yan
Julie Pelloux
Maria Abaissa
Julie Robitaille

Collaborateurs :

Philip Bevilacqua (Penn State)
Gerardo Ferbeyre (Montreal)
Trang Hoang (IRIC)
Peng Jin (Emory)
Luc Jaeger (UCSB)
Sunjoo Jeong (Dankook)
David Lilley (Dundee)
Dave Mathews (Rochester)
Tobin Sosnick (Chicago)
Doug Turner (Rochester)
Eric Westhof (Strasbourg)