Projet de Recherche Doctorale – Programme Interface Pour le Vivant

Modèles et imagerie de condensats biologiques autour de l'ADN

Les progrès récents de l'imagerie ont permis de découvrir de nouvelles formes d'organisation cellulaire, en particulier au sein du noyau des cellules eucaryotes. Le développement conjoint des techniques de modélisation à ces échelles peut enrichir fortement l'analyse des expériences, pour relier les images à des phénomènes physiques originaux. Nous proposons ici des simulations browniennes de modèles issus de la physico-chimie des milieux chargés en réaction, associés à la caractérisation expérimentale de microphases à l'intérieur du noyau par la combinaison de microscopie super-résolue et du suivi de molécules uniques.

Contexte : Organisations sans membrane du matériel génétique

Au cours des dix dernières années, l'étude d'organelles sans membrane, aussi appelés **condensats biologiques**, a fortement modifié la compréhension de l'organisation des fluides intracellulaires [Banani17]. Les condensats biologiques sont des structures dont l'échelle de taille varie de la dizaine de nanomètres au micromètre. Leurs caractéristiques physiques peuvent être similaires à celles d'un liquide, d'un gel, voire d'un solide. Les biophysiciens parlent de **microphases** pour les distinguer de systèmes présentant une transition de phase macroscopique. Les nombreuses fonctions biologiques des microphases expliquent certaines pathologies liées à une perturbation de leur structure [Wang21].

La formation de microphases dans le noyau (figure 1), lieu de séquestration du matériel génétique, fait aujourd'hui l'objet d'un large consensus [Sabari18, Chen 19, Sabari20, Rippe22]. Les condensats ont ainsi été corrélés expérimentalement à l'activation contrôlée de gènes ou à la réparation d'ADN endommagé. Par ailleurs, la régionalisation de l'espace en petits domaines fait écho à des résultats expérimentaux obtenus via les techniques de *Chromosome Conformation Capture* (3C et HiC [Lieberman-Aiden09]). Ces études montrent que les chromosomes présentent des architectures spatiales organisées en domaines, appelés *Topologically Associating Domains* (TADs), qui tendent à occuper des régions distinctes dans l'espace 3D du noyau, sur des tailles de l'ordre de 100 nm [Cattoni17, Xu18].



Figure 1 - A : Image hypothétique de la formation d'un condensat liquide sphérique autour d'une fibre de chromatine. Le condensat est formé de protéines (en jaune). Une telle image peut être (1) simulée grâce à des modèles numériques, (2) obtenue expérimentalement grâce aux méthodes de microscopie super-résolue, imageant la concentration d'une protéine avec une résolution spatiale de l'ordre de 10 nm. B : Représentation de processus de diffusionréaction qui peuvent être simulés par des calculs de dynamique brownienne. Les interactions entre protéines et avec la fibre influencent les trajectoires, les vitesses de réactions, et donc les propriétés des condensats. Ces trajectoires peuvent être partiellement caractérisées expérimentalement par le suivi de molécules uniques (Single Particle Tracking). (Images issues de [Miné-Hattab22])

<u>Question de recherche</u> : Comment les propriétés des condensats et leurs fonctions biologiques sont contrôlées par un couplage entre diffusion, réactions et électrostatique ?

Les fonctions supposées des domaines et des microphases incluent le contrôle des concentrations locales en biomolécules, pour coordonner dans le temps et l'espace les réactions chimiques. Pour le comprendre, il est important de bien décrire les forces physiques qui permettent le contrôle de la taille, de la composition et de la dynamique de ces structures. Un faisceau d'évidences indique des mécanismes couplés de phénomènes passifs (**flux de diffusion entrant ou sortant des condensats**) et actifs (**réactions chimiques** consommant de l'ATP) [Söding20]. Par ailleurs, le **rôle des charges électrostatiques** dans les condensats nucléaires commence à être considéré [Lyons23], mais sans cadre théorique établi.

Dans le cas de microphases incluant la chromatine, nous faisons l'hypothèse que ces structures peuvent être influencées par des réactions chimiques le long de la chromatine [Cortini16], perpendiculairement (polymérisation d'ARN ou parylation [Mine-Hattab22]), ou en 3D au sein du liquide nucléaire. Enfin, de par l'abondance de molécules très chargées dans le noyau [Dahirel09], il convient de comprendre le rôle de l'électrostatique quant à son influence sur la diffusion et les réactions chimiques. Dans le cas des membranes biologiques, Il est clairement établi que la combinaison de flux et de forces électrostatiques engendre un potentiel de membrane, exploité par les cellules pour réaliser des travaux ou pour transmettre un signal. Nous faisons l'hypothèse que les flux diffusifs alimentant les condensats incluent de nombreuses espèces ioniques, et donc génèrent des champs électriques.

Nous cherchons dans ce projet de recherche à **caractériser comment l'électrostatique, la cinétique des réactions chimiques et les processus de diffusion affectent de façon couplée les propriétés de microphases nucléaires**. Pour ce faire, nous avons identifié un système biologique pour lequel l'apparition de condensats est corrélée à la réaction de polymérisation d'une biomolécule fortement chargée. Ces condensats se forment autour de cassures de l'ADN dans les cellules humaines. Des protéines (PARP1) se lient aux zones de cassures et entraîne la réaction de polymérisation (la *parylation*) d'une chaîne fortement chargée, sur les histones ainsi que sur PARP-1 elle-même (auto-parylation). Cette réaction est corrélée à la formation de condensats comprenant la protéine FUS puis 53BP1 [Mine-Hattab22] (voir la figure 2). Ces condensats jouent potentiellement un rôle dans la réparation de l'ADN cassé, et leur dérégulation est source d'instabilité génétique et à l'origine de nombreux cancers.



Figure 2 : Le système biologique étudié. Formation de condensats des protéines FUS et 53BP1 autour de la chromatine, suite à une cassure de l'ADN. (Image adaptée de [Miné-Hattab22])

Mise en œuvre du projet doctoral : Imagerie couplée à la simulation

La doctorante avec qui nous construisons ce projet entreprendra la mise-en-œuvre parallèle des outils de modélisation et d'imagerie afin d'optimiser la synergie entre théorie et expérience. Elle le fera au sein de deux équipes de recherche de SU, l'équipe MEM (*Modélisation et Expériences Multiéchelles*), du laboratoire PHENIX, et l'équipe FIONA (*Functional Imaging Of Nuclear Architecture*) du LCQB. Au-delà de leurs spécificités thématiques, ces deux équipes occupent un espace scientifique original de par les échelles de tailles qu'elles sont en mesure de caractériser, adaptées à l'étude des microphases.

<u>Au sein de l'équipe MEM</u>, Vincent Dahirel et Pierre Illien formeront la doctorante aux modélisations *mésoscopiques browniennes* utilisées pour simuler les mouvements et les réactions des espèces formant des condensats. Les simulations browniennes seront adaptées avec la doctorante au problème particulier de ce projet. Ces méthodes sont pertinentes pour des modèles de structures mésoscopiques comme les condensats biologiques. Nous les avons récemment utilisées pour mettre en lumière un mécanisme de couplage entre séparation de phase et propulsion d'une particule colloïdale active [Decayeux20].

<u>Au sein de l'équipe FIONA</u>, Judith Mine-Hattab formera la doctorante à l'utilisation de techniques d'imagerie adaptées à l'échelle de taille des microphases. Bien que certaines données biochimiques et de microscopie à grand champ apportent des informations indirectes, ces observations sont à la limite de la résolution optique (300 nm). Pour mieux visualiser la structure et la dynamique des condensats, nous utiliserons des techniques d'imagerie super résolue permettant de visualiser la distribution de molécules individuelles (Photo Activable Localisation Microscopy – PALM) et leur dynamique (Single Particle Tracking – SPT) avec une résolution de 20 nm. Ces techniques nous permettront d'établir FUS et 53BP1 formant des condensats en réponse aux dommages de l'ADN [Mine-Hattab22].

Les expériences seront mises-en-œuvre dans le but de mesurer les grandeurs calculées par simulation, et réciproquement, les grandeurs calculées seront adaptées aux types d'observables accessibles expérimentalement (voir [Lesage19] pour une démarche similaire de l'équipe MEM pour l'analyse d'images de chromatine chez la drosophile). En particulier, imagerie et simulations donneront accès aux cartes de densité et de coefficients de diffusion des protéines, dans chaque phase et à l'interface. Des modifications des systèmes expérimentaux permettront de comparer l'influence de différents paramètres des modèles, par exemple via l'ingénierie d'un mutant de charge modifiée, ou de mutants de PARP1 qui forment des chaînes plus longues, portant donc plus de charges négatives. En comparant données expérimentales et simulations, nous pourrons mieux comprendre quels ingrédients des modèles contrôlent la formation de condensats, et gouvernent les caractéristiques des condensats pouvant expliquer leur action réparatrice de l'ADN.

[Banani17] S.F. Banani, [...] A. A. Hyman, M. K. Rosen, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017, 18, 285

[Cattoni17] D. I. Cattoni, [...] G. Cavalli, M. Nollmann. Nature Communications 2017, 8, 1753.

[Chen19] Y. Chen, A. S. Belmont, Curr. Op. Gen. Dev., 2019, 55, 91.

- [Cortini16] R. Cortini, [...], J-M Victor, Rev. Mod. Phys, 2016, 88, 025002.
- [Dahirel09] V. Dahirel, [...], M. Barbi, J-M. Victor, Phys. Rev. Lett. 2009, 102, 228101.

[Lesage19] A. Lesage, V. Dahirel, J-M. Victor, M. Barbi. Epigenetics & Chromatin 2019, 12, 28.

- [Lieberman-Aiden09] E. Lieberman-Aiden, [...] E. S. Lander, J. Dekker. Science 2009, 326, 289.
- [Lyons23] H. Lyons, [...] R. G. Roeder, B. R. Sabari, Cell 2023, 186, 327.
- [Miné-Hattab22] J. Miné-Hattab, S. Liu, A. Taddei, Genes 2022, 13, 1846.
- [Rippe22] K. Rippe, Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2022, 14, a040683.
- [Sabari18] R. B. Sabari, [...], P. A. Sharp, A. K. Chakraborty, R. A. Young, Science 2018, 361, 3958.
- [Sabari20] R. B. Sabari, A. Dall'Agnese, R. A. Young, Trends in Biochemical Sciences, 2020, 45, 961.
- [Söding20] J. Söding, [...] J. Kirschbaum, Trends in Cell Biology, 2020, 30, 4.
- [Wang21] B. Wang, [...] F. Zhou, Signal Transduc. Target. Ther., 2021, 6, 290.
- [Xu18] J. Xu, H. Ma, J. Jin, S. Uttam, R. Fu, Y. Huang, Y. Liu. Cell Reports, 2018, 24, 87.

[[]Decayeux21] J. Decayeux, V. Dahirel, M. Jardat, P. Illien, Phys. Rev. E 2021, 104, 034602.