



APPEL A PRE-PROJETS DE RECHERCHE Automne 2013

Formulaire de demande de soutien financier pour un pré-projet de recherche impliquant une ou plusieurs équipes de l'IXXI

Les projets doivent être soumis avant le 3 novembre 2013

Les dotations sont de 5000 € par projet retenu pour le présent appel. Les projets retenus seront financés sur l'exercice 2013 et pour une durée de deux ans. Par ailleurs, les porteurs de projets pourront solliciter un financement supplémentaire de l'IXXI pour organiser un séminaire sur le thème de leurs projets (sous réserve d'acceptation préalable par la direction de l'Institut). Ils sont donc encouragés à proposer un tel séminaire dans la durée du projet (l'organisation pratique et le financement du séminaire étant alors assurés par l'Institut).

Les projets seront sélectionnés par le comité de pilotage de l'IXXI. Pour le présent appel, les critères de sélection seront les suivants (aucun de ces critères n'est à lui seul nécessaire et suffisant) :

- *Qualité scientifique du projet,*
- *Relations aux systèmes complexes et/ou pluri/inter/transdisciplinarité,*
- *Caractère "émergent" du projet et prise de risque (projets novateurs et exploratoires, développement de nouveaux thèmes, ...),*
- *Collaborations intra-IXXI ou intra-Rhône-Alpes,*
- *Intérêt potentiel pour l'IXXI (visibilité, structuration, perspectives, ...)*

Les porteurs de projets soutenus s'engagent à transmettre à l'IXXI toute retombée du projet (publication, soutien complémentaire,...), à faire figurer l'IXXI dans les remerciements des publications soumises et à transmettre à l'IXXI un rapport de synthèse en fin de projet. L'IXXI pourra en outre demander aux porteurs de participer comme orateurs à des séminaires ou à des journées organisées par l'Institut.

DESCRIPTION DU PROJET

Titre du projet

Modèles théoriques de l'Hétérochromatine:
entre répression de la transcription et transcription pour la répression.

Résumé à paraître sur le site web de l'IXXI

Les chromosomes eucaryotes sont ainsi en général composés de deux types de domaines épigénétiques structurels et fonctionnels chromatiniens: l' euchromatine, ouverte et généralement accessible, où l'on retrouve la plupart des gènes actifs et l'hétérochromatine, fortement condensée, riche en éléments transposables et en séquences répétées. D'un point de vue fonctionnel, l'hétérochromatine contrôle plusieurs aspects fondamentaux du fonctionnement nucléaire comme la répression de la transcription des séquences sous-jacentes et voisines ou l'activation et la répression de certaines interactions à longue distance impliquées notamment dans la régulation du développement. En effet, l'hétérochromatine est étroitement associée à la différenciation cellulaire, que ce soit dans les organismes unicellulaires où elle contrôle le type cellulaire et la reproduction sexuée ou dans les organismes multicellulaires où est impliquée dans la maintenance de l'identité cellulaire. On distingue deux types d'hétérochromatine : (i) l'hétérochromatine constitutive associée aux séquences répétées et éléments transposables garantissant l'intégrité génomique des cellules ; (ii) l'hétérochromatine facultative typiquement associée aux gènes régulés au cours du développement. Malgré son importance, les mécanismes de formation, de régulation, d'héritabilité épigénétique et surtout la manière dont ce type de chromatine exécute ces différentes fonctions sont encore assez mal connues. En étroite collaboration avec des biologistes, ce projet vise à mettre en place les approches théoriques permettant la modélisation des différents modes d'hétérochromatinisation observés chez l'organisme modèle *S. pombe*. En particulier et notre étude théorique se concentrera sur la caractérisation du couplage entre hétérochromatine et métabolismes des ARN nucléaires intervenant dans la régulation de la différenciation sexuelle. La modélisation du système se basera sur des méthodes analytiques et numériques issues de la physique statistique et permettra de formuler des prédictions vérifiables expérimentalement.

Mots-clés :

Hétérochromatine - interférence ARN/exosome – Différenciation sexuelle- *S. pombe*

Secteurs disciplinaires :

Physique statistique équilibre/hors-équilibre – Biologie
moléculaire/Transcription/Chromatine

Autres demandes de soutien pour le projet (reçues/demandées/envisagées) :

Aucune

Coordinateur du projet (obligatoirement membre IXXI)

Nom	Prénom	Laboratoire	Equipe
VAILLANT	Cédric	Physique-ENSL	1

Participants

Nom	Prénom	Laboratoire	Equipe
JOST	Daniel	Physique-ENSL	1
VERDEL	André	Institut Albert-Bonniot (Grenoble)	ARN et EPIGENETIQUE
HADDAD	Noelle	Physique-ENSL	1

+ EKWALL Karl: Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Sweden.

Publications significatives du coordinateur et des partenaires du projet

G. Chevereau, L. Palmeira, C. Thermes, A. Arneodo & **C. Vaillant**. Thermodynamics of intragenic nucleosome ordering. *Phys. Rev. Lett.* 103, 188103 (2009).

P. Milani, G. Chevereau, **C. Vaillant**, B. Audit, Z. Haftek-Terreau, M. Marilley, P. Bouvet, F. Argoul & A. Arneodo. Nucleosome positioning by genomic excluding-energy barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106, 22257-22262 (2009).

C. Vaillant, L. Palmeira, G. Chevereau, B. Audit, Y. d'Aubenton Carafa, C. Thermes & A. Arneodo. A novel strategy of transcription regulation by intragenic nucleosome ordering. *Genome Res.* 20, 59-67 (2010).

G. Chevereau, A. Arneodo & **C. Vaillant**. Influence of the genomic sequence on the primary structure of chromatin. *Frontiers in Life Science* 5, 29-68 (2011).

D. Jost, A. Nowojewski & E. Levine. sRNA biology is systems biology. *BMB Rep.* 44, 11-21 (2011).

D. Jost, A. Nowojewski & E. Levine. Regulating the Many to Benefit the Few: Role of Weak Small RNA Targets. *Biophys. J.* 104, 1773-1782 (2013).

D. Jost, Bifurcation in epigenetics: implication in development, proliferation and disease. *Phys. Rev. E*. In submission.

A. Verdel, S. Jia, S. Gerber, T. Sugiyama, S. Gygi, S. Grewal & D. Moazed. RNAi-mediated targeting of the heterochromatin by the RITS complex. *Science* 303 : 672-676 (2004).

E. Hiriart ,..., **A. Verdel** , Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to specific meiotic genes in fission yeast, *EMBO J.* 31 2296-2308 (2012)

Établissement gestionnaire du projet

CNRS

Contexte scientifique ; bibliographie (une page maximum) :

Bibliographie:

Ce texte est largement inspiré des deux revues suivantes:

SI Grewal and S. Jia. Heterochromatin revisited. *Nat. Rev. Gen.* **8** : 35-46 (2007)

FE Reyes-Turcu and SI Grewal. Different means, same end -heterochromatin formation by RNAi and RNAi-independent RNA processing factors in fission yeast. *Curr. Opin. Gen. Dev.* **22** : 156-163 (2012)

Les chromosomes eucaryotes sont ainsi en général composés de deux types de domaines épigénétiques structurels & fonctionnels chromatiniens: l' euchromatine, ouverte et généralement accessible, où l'on retrouve la plupart des gènes actifs et l'hétérochromatine, fortement condensée, riche en éléments transposables et en séquences répétées. D'un point de vue fonctionnel, l'hétérochromatine contrôle plusieurs aspects fondamentaux du fonctionnement nucléaire: (i) assemblage du kinetochore (ii) cohésion des chromatides soeurs assurant ainsi la bonne ségrégation durant la division cellulaire (iii) recombinaison: inhibition de toute recombinaison inopinée au niveau des séquences répétées garantissant ainsi une stabilité génomique (iv) expression des gènes: répression de la transcription des séquences sous-jacentes et voisines (v) activation/repression de certaines interactions à longue distance impliquées notamment dans la régulation du développement. L'hétérochromatine est en effet associée à la différenciation cellulaire, que ce soit dans les organismes unicellulaires où elle contrôle le type cellulaire et la reproduction sexuée ou dans les organismes multicellulaires où elle est impliquée dans la maintenance de l'identité cellulaire au cours du développement. On distingue deux types d'heterochromatine : (i) l'heterochromatine constitutive associée aux séquences répétées et éléments transposables garantissant l'intégrité génomique des cellules ; (ii) l'heterochromatine facultative typiquement associée aux genes regulés au cours du developpement. **Malgré son importance, les mécanismes de formation (nucléation, propagation et confinement), de transmission et maintenance (héritabilité), de régulation et surtout la manière dont ce type de chromatine exécute ces différentes fonctions sont encore assez mal connues. De fait, encore très peu d'approches théoriques quantitatives ont été mises en oeuvre.**

D'un point de vue moléculaire, l'hétérochromatine se caractérise par des signatures biochimiques particulières et assez bien conservées de *S. pombe* aux eucaryotes supérieurs: l'hypo-acétylation des histones et la méthylation spécifique H3K9me catalysée par l'histone méthyltransferase Clr4/Suv39h. H3K9me permet de recruter des protéines structurales de la famille HP1 ou d'autres protéines (via leur chromodomaine) et va constituer une « plateforme » de signalisation/recrutement de facteurs impliqués dans divers processus tels que la différenciation cellulaire, la ségrégation des chromosomes et la régulation de la transcription.

L'hétérochromatine est en effet impliquée dans la répression transcriptionnelle (en anglais « TGS : Transcriptional Gene Silencing ») : le recrutement et l'action combinée de complexes de remodelage (Mit1), de chaperones d'histones (Asf1-HiRA), de déacétylases (Clr3,Clr6) conduiraient à la structuration d'une fibre de chromatine compacte, avec peu de turn-over d'histone et donc *in fine* plutôt réfractaire à la fixation de PolII. L' assemblage hétérochromatinien peut-être initiée/nucléée à certains sites spécifiques par la fixation de protéines capables de recruter les facteurs heterochromatiniens. Une fois initiée, l'état hétérochromatinien a cela de remarquable qu'il peut se propager à partir du site de nucléation et s'étendre sur de grandes distances génomiques. Les ressorts de cette propagation tiennent en la capacité de Clr4 à se fixer à la marque H3K9me qu'elle catalyse et à HP1 à oligomériser sur le substrat chromatiniens marqué par H3K9me.

Mais l'hétérochromatine intervient aussi dans la répression co-transcriptionnelle (« CTGS »): les voies de dégradation des ARN, e.g. la voie RNAi et la voie « exosome » apparaissent en effet couplées à l'assemblage hétérochromatinien. Ainsi la nucléation de l'hétérochromatine au niveau du centromère et au locus « Mat » chez *S. pombe* est-elle en partie induite par une voie RNAi nucléaire ciblant les séquences répétées transcrites par PolII : les siRNA portés par le complexe RITS (RNA-induced Transcriptional Silencing) vont recruter ce complexe au niveau des transcrits naissants et de la chromatine et ce complexe va lui même induire le recrutement de Clr4 à la chromatine.

D'autres mécanismes impliquant la transcription et la dégradation des ARN peuvent, en opérant indépendamment du RNAi ou de concert, contribuer à la mise en place ou au renforcement de la répression TGS et/ou CTGS. Ainsi la répression des gènes méiotiques, mais aussi des rétrotransposons, implique-t-elle un couplage entre les voies nucléaires de dégradation des ARN , « exosome » & « RNAi » et le ciblage puis l'assemblage hétérochromatinien (H3K9/HP1...).

**Relations aux systèmes complexes et/ou caractère pluri/inter/transdisciplinaire
(une demi-page maximum) :**

La répression transcriptionnelle via la structuration d'une fibre de chromatine compacte et peu accessible, via l'action combinée de différents cofacteurs ciblés à certains loci génomiques ou via le recrutement de complexes nucléaires de dégradation des ARN naissants, est un système complexe par essence. En effet, comme beaucoup de métabolismes (ici nucléaire), c'est un système multi-composants et multi-agents engagés dans des réseaux d'interactions et de réactions biochimiques couplées. Le couplage entre « structure » chromatinienne, transcription et métabolisme des ARN ajoute évidemment une complexité supplémentaire qui n'a été finalement que très peu appréhendée théoriquement. Dans un cadre interdisciplinaire via un dialogue constant avec des équipes de biologistes, nous proposons de mettre en place des approches théoriques issues de la physique statistique de l'équilibre et du hors-équilibre pour la modélisation de ce couplage chez l'organisme modèle *S. pombe*.

Description scientifique (une à deux pages maximum)

En collaboration avec des groupes de biologistes expérimentateurs, l'objectif est de développer des modèles de régulation de l'hétérochromatine et de la répression transcriptionnelle qu'elle induit. En particulier, il s'agira de modéliser à la fois les mécanismes de répression transcriptionnelle et co-transcriptionnelle. *S. pombe* est un organisme de choix pour une telle étude puisqu'il présente des modes d'assemblage hétérochromatinien qu'on retrouve en grande partie dans les organismes multicellulaires. La taille réduite du génome et la possibilité de tester « assez facilement » expérimentalement certaines hypothèses par le biais de mutants rend cet organisme extrêmement attractif pour aborder une telle étude théorique.

1) Hétérochromatine comme « plateforme » de répression transcriptionnelle.

Questions posées : (1) comment la fibre d'hétérochromatine réprime l'accessibilité des différents activateurs transcriptionnels ? (2a) Mécanismes et dynamiques de « propagation » à partir de sites de nucléation ? (2b) Mécanisme de confinement à certains sites génomiques, les « frontières » (3) Mécanismes et dynamique de transmission post-répllicative (héritabilité) ?

L'idée ici est donc de construire des modèles moléculaires structuraux de fibre de chromatine, notamment de positionnement de nucléosomes qui tiennent compte de l'action des différents facteurs et régulateurs hétérochromatiniens mis en jeu, à savoir dans un premier temps H3K9me/Clr4, HP1, facteurs de remodelage et deacetylases. Il s'agit également de tenir compte du « contexte » génomique avec la présence de sites de nucléations et de frontières. On développera des modèles thermodynamiques « à l'équilibre » en continuité avec nos travaux précédents (cf publications coord. C. Vaillant) et des simulations stochastiques de type « Gillespie » (Gillespie, D. (1976). A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *Journal of Computational Physics* 22, 403-434). Désormais en plus de sa position génomique, le nucléosome sera caractérisé par un état « épigénétique » interne (i.e. par ses marques épigénétiques Ac/nonAc, H3K9me1,2,3/nonH3K9me... ainsi que la présence ou non de HP1). Formellement, ce système peut s'apparenter à une chaîne de spin ou à un fluide 1D (gaz sur réseau). Dans l'approche « à l'équilibre » on associera aux différents états nucléosomiaux accessibles un coût énergétique et on introduira des couplages entre les états épigénétiques des nucléosomes voisins: pour rendre compte de l'association de Clr4 à H3K9me et donc de la forte propension qu'a un nucléosome marqué par H3K9me à transmettre cette marque aux nucléosomes voisins il suffira d'introduire une énergie de couplage positive entre les deux états nucléosomiaux voisins s'ils sont « H3K9me »; de même pour modéliser l'oligomérisation de HP1 il faudra introduire des couplages positifs entre deux états voisins s'ils sont « HP1 »; dans les deux cas il faudra introduire une contrainte de distance entre les deux nucléosomes, et c'est là qu'interviennent les remodelleurs qu'on introduira via des interactions attractives positionnelles. On pourra écrire un hamiltonien et en dériver toutes les propriétés statistiques à l'équilibre par des méthodes numériques de type matrice de transfert. Dans l'approche « dynamique stochastique » l'action des différents régulateurs sera explicitement introduite via des taux de transition : taux de méthylation (Clr4), taux de repositionnement (remodelleur)...; c'est avec cette approche qu'on abordera l'effet de la réplication. Pour paramétrer au mieux l'association HP1/H3K9 et HP1-HP1 on pourra se baser sur les récents travaux du groupe de Narlikar (Canzio et al. A conformational switch in HP1 releases auto-inhibition to drive heterochromatin assembly. *Nature* 496:377-81 (2013)).

En sortie, on établira des cartes d'hétérochromatinisation (et donc d'accessibilité) le long de certains domaines génomiques (notamment le long du locus « Mat » de *S. Pombe*) en fonction des différents paramètres de contrôle des modèles. On comparera notamment les

prédiction de densités en nucleosomes, en marques H3K9me1,2,3, en HP1 à celles mesurées expérimentalement (cf ci-après).

Expérimentalement, notre objectif est, avec André Verdel (cf point 2)) de mettre en place une collaboration avec Karl Ekwall (<http://www.bionut.ki.se/groups/kek/>) spécialiste de la régulation chromatinienne chez *S. pombe* et qui serait intéressé par mener des expériences de reconstitution *in vitro* et *in situ* de l'hétérochromatine. Il s'agit de profiter de la puissance de manipulation génétique offerte par le système levure *S. pombe*. L'idée est de construire un ADN contenant un locus génomique d'intérêt tel que le locus « Mat » (ou un retrançon Tf2) et d'une part d'assembler *in vitro* l'hétérochromatine par le biais d'extraits cellulaires dont on pourrait « maîtriser » la composition en choisissant les cellules d'organismes mutants qui nous intéressent. On identifierait ainsi les régulateurs et facteurs déterminants dans l'assemblage hétérochromatinien que l'on comparerait à un assemblage fait *in situ* (de façon native) par insertion du locus exogène en question dans les mêmes cellules mutantes. Nous proposons donc ici de « préparer » la mise en place future (dans le cadre de financement de type « ANR») de ce projet expérimental assez ambitieux par des rencontres et discussions avec le groupe de K. Ekwall.

2) Hétérochromatine comme « plate-forme » de dégradation d'ARN et vice-versa

On abordera ici principalement la relation entre répression co-transcriptionnelle et structure hétérochromatinienne dans le système de régulation des gènes méiotiques chez *S. pombe*. De récentes études ont en effet montré un couplage entre la présence de marques répressives H3K9 et les voies de dégradation des ARN méiotiques par l'exosome. La protéine Mmi1 qui se lie aux ARN codants méiotiques (produit par PIII) par reconnaissance de motifs spécifiques recrute (i) l'exosome qui va dégrader l'ARN nucléaire (naissant) et (ii) d'autres protéines (Red1) impliquées dans le recrutement de Clr4 qui va induire la formation d'hétérochromatine (facultative) via la déposition d'H3K9. C'est le même principe qu'au niveau des séquences répétées, où c'est le complexe RITS qui, dans ce cas est ciblé via les siRNA et recrute Clr4 à la chromatine. Le fait que RITS puisse par ailleurs se fixer à H3K9 (via un chromodomain) induit une boucle de rétroaction positive renforçant la nucléation hétérochromatinienne. Un recrutement de RITS médié par Mmi1 et ses partenaires a été également observé dans les gènes méiotiques (Hiriart et al., Mmi1 RNA surveillance machinery directs RNAi complex RITS to specific meiotic genes in fission yeast, *EMBO J.* 31 2296-2308 (2012)). Il a été récemment montré que les deux voies RNAi et exosomes sont en effet impliquées dans la répression de certains gènes développementaux méiotiques et de **retrotransposons** (Yamanaka et al. RNAi triggered by specialized machinery silences developmental genes and retrotransposons. *Nature* 493 557 (2013)).

Questions posées : (1) Mécanisme et dynamique de régulation de la dégradation des ARN codants méiotiques ? Contributions relatives des voies nucléaires « exosome » et « RNAi » (redondantes , complémentaires) ? (2) Rôle de H3K9me et plus généralement des facteurs hétérochromatiniens (HP1,Clr3): est-ce simplement une plateforme de recrutement ou contribue-elle aussi à une répression de type TGS ? (3) Régulation au cours du cycle cellulaire : Effet de la réplication ? (4) Voies de dérégulation (de la répression) au cours de la différenciation sexuelle ?

Pour commencer à aborder ces questions, on écrira les réactions biochimiques mises en jeu dans cette voie de régulation transcriptionnelle (production des mRNA, export, ciblage par Mmi1, dégradation par exosome et/ou RNAi) dont on résoudra les cinétiques par des approches déterministes (intégration d'EDO) et stochastiques : Résolution des équations maîtresses, soit par des simulations exactes de type Monte Carlo Cinétique de « Gillespie », soit de façon approchée par intégration d'équation de Fokker-Planck (NG

Van kampen. Stochastic Processes in Physics and Chemistry, Third Edition (North-Holland Personal Library). **On couplera ce processus à la dynamique épigénétique chromatinienne le long des gènes (cf point 1)) en considérant dans un premier temps une modélisation « minimale » de l'assemblage hétérochromatinien (par exemple, comme dans : IB Dodd *et al.*. Theoretical analysis of epigenetic cell memory by nucleosome modification. *Cell* **129**, 813822 (2007) et dans: D. Jost, Bifurcation in epigenetics: implication in development, proliferation and disease. *Phys. Rev. E*. In submission).**

Ce travail de modélisation se fera en étroite collaboration avec le groupe d'André Verdel de l'Institut Albert Bonniot à Grenoble, spécialiste de la voie RNAi chez *S. pombe*. Par l'étude de mutants ou par des constructions génétiques on essaiera de disséquer un peu plus en détail les voies biochimiques impliquées dans la régulation co-transcriptionnelle des gènes méiotiques. Cela nous permettra de mieux définir et paramétriser le modèle (et justifier certaines approximations), faire des prédictions et les tester expérimentalement etc...Et donc par aller-retour constant entre théorie et expériences aller plus loin dans la compréhension du système.

