

Inférence de paramètres bio-physiques par microscopie FRAP

Oihan JOYOT¹ Frédéric DE GOURNAY³ Fabian ERDEL² Pierre WEISS¹

¹Institut de Recherche en Informatique de Toulouse (IRIT), Toulouse, France

²Centre de Biologie Intégrative (CBI), Toulouse, France

³Institut de Mathématiques de Toulouse (IMT), Toulouse, France

Résumé – Les condensats cellulaires régulent les activités biochimiques dans le temps et l’espace, mais leur dynamique est peu comprise alors même que des dysfonctionnements peuvent causer des maladies graves comme des cancers et des maladies neurodégénératives. Dans ce travail, nous proposons une technique d’inférence des paramètres clés comme la perméabilité et la viscosité du condensat. Elle repose sur la microscopie FRAP qui permet de visualiser le retour à un état d’équilibre de molécules fluorescentes après les avoir photoblanchies. Nous proposons un modèle mathématique qui consiste à décrire les molécules fluorescentes comme des particules avec position et vitesse régies par des lois de mouvements stochastiques. On infère ensuite les paramètres de ce modèle en grâce à un problème de régression sur des vidéos de dynamique moléculaire. Des résultats préliminaires encourageants sont présentés, donnant accès à des quantités encore inaccessibles actuellement.

Abstract – Cellular condensates regulate biochemical activities in time and space, but their dynamics remain poorly understood, even though dysfunctions can lead to severe diseases such as cancer and neurodegenerative disorders. In this work, we propose a technique for inferring key parameters such as condensate permeability and viscosity. This approach is based on FRAP microscopy, which enables the visualization of the return to equilibrium of fluorescent molecules after photobleaching. We introduce a mathematical model that describes fluorescent molecules as particles with position and velocity governed by stochastic motion laws. The parameters of this model are then inferred through a regression problem applied to molecular dynamics videos. Preliminary encouraging results are presented, providing access to previously inaccessible quantities.

1 Introduction

La cellule biologique possède des compartiments qui séparent les activités biochimiques dans l’espace et dans le temps. Comme le noyau est dépourvu de membrane interne, cette séparation est réalisée par la formation de sous-compartiments sans membranes, appelés condensats. Dans ces derniers ont lieu des activités cellulaires spécifiques [2]. Ce cloisonnement est nécessaire à la bonne régulation des activités cellulaires, notamment l’activation et la répression de l’expression des gènes [4] et la réparation de l’ADN endommagé [1]. Selon le type de condensats, la dérégulation de ces processus peut induire de graves problèmes de santé tels que des cancers ou des maladies neurodégénératives [8, 13].

Bien que plusieurs études récentes aient indiqué le rôle central des condensats, un défi persiste : comprendre les mécanismes moléculaires qui sont responsables de leur formation. Il existe aujourd’hui un débat animé sur l’origine de ces structures. Sont-elles formées par séparation de phases liquide-liquide [6] ou par d’autres phénomènes fondamentalement différents [4] ?

Jusqu’à récemment, il n’y avait pas de méthode pour identifier l’origine des condensats [7]. Les auteurs de [9, 3] ont introduit une approche par microscopie de fluorescence appelée MOCHA-FRAP pour distinguer une séparation de phase liquide-liquide d’autres modèles. Cette technique, bien que pionnière, manque actuellement d’une théorie quantitative permettant d’extraire des paramètres clés liés au condensat, tels que sa perméabilité et sa viscosité, en résolvant un problème inverse.

La technique MOCHA-FRAP dérive de la méthode FRAP

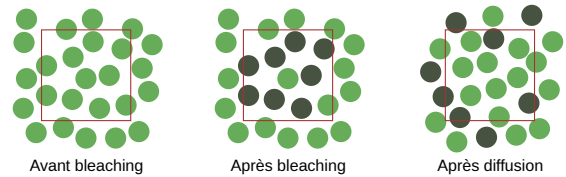


FIGURE 1 : Évolution d’une distribution de particules fluorescentes. Les particules claires émettent de la lumière par fluorescence. Avant bleaching toutes les particules émettent de la lumière. Après bleaching, la plupart de celles présentes dans la zone de bleach ont perdu cette fluorescence. Après diffusion, les particules lumineuses et celles qui ne le sont plus sont mélangées.

(Fluorescence Recovery After Photobleaching). En microscopie confocale fluorescente, le “bleach” (photoblanchiment) consiste à interagir avec les molécules fluorescentes situées dans une zone grâce à un laser de haute intensité. Ainsi, la plupart des molécules de cette zone vont perdre de manière définitive leur fluorescence et ne vont donc plus émettre de lumière (voir Figure 1). Le microscope permet alors d’observer indirectement la diffusion moléculaire des particules non photoblanchies, en observant l’évolution spatio-temporelle de la quantité de fluorescence par unité de volume. Cela a pour effet de perturber l’état stationnaire de la densité de particules marquées non photoblanchies sans pour autant perturber l’état d’équilibre global des particules (les particules photoblanchies existent toujours bien qu’invisibles).

La particularité de la méthode MOCHA-FRAP par rapport à la méthode FRAP est que le bleach ne s’effectue que sur

une moitié du condensat (voir Figure 2). Par rapport au FRAP classique, cela permet de perturber l'état d'équilibre d'une manière qui révèle plus de paramètres. Dans notre étude, les premiers paramètres que l'on veut trouver sont : les densités de fluorophores intérieure/extérieure à l'équilibre, les coefficients de diffusion intérieur/extérieur, la perméabilité de la frontière et la proportion de particules photoblanchies.

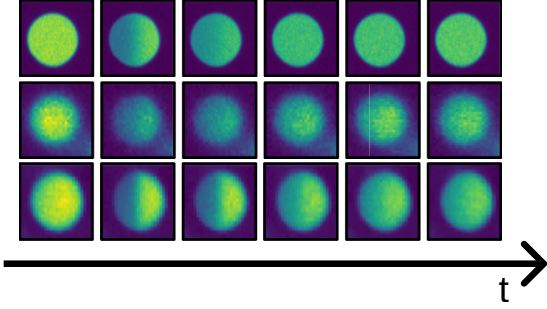


FIGURE 2 : Évolution dans le temps de 3 condensats traités par MOCHA-FRAP. Images successives obtenues par microscopie confocale. Adapté de [9].

Actuellement, les vidéos sont analysées en mesurant l'évolution de l'intensité moyenne sur les parties gauches et droites du condensat. La figure 3 donne un exemple de telles courbes. Elles permettent de distinguer certaines propriétés. Pour le premier condensat (a), les intensités à gauche (en turquoise) et à droite (en violet) dans les deux moitiés s'équilibrent après le bleach. Ceci signifie que le système est clos : la quantité de fluorescence globale dans le condensat est préservée, il n'y a pas d'échange avec l'extérieur. On peut donc conclure que la perméabilité de la frontière est nulle. Pour le deuxième condensat (b), la situation est différente, il y a un regain d'intensité, ce qui laisse penser qu'il y a de nouvelles particules qui s'introduisent dans le condensat par l'extérieur et que la frontière est donc perméable, contrairement à celle de (a).

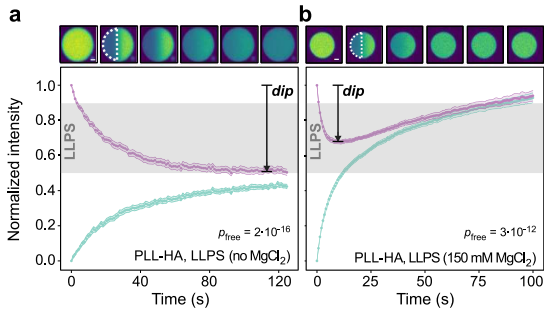


FIGURE 3 : Courbes d'intensité moyennes de 2 condensats traités par MOCHA-FRAP. Les deux courbes correspondent à l'intensité lumineuse moyenne mesurée dans une moitié de condensat en fonction du temps. Adapté de [9].

Nous proposons ici une technique numérique permettant de quantifier ces paramètres. Pour ce faire, nous proposons d'abord un modèle mathématique assez simple de la dynamique des particules fluorescentes. Dans un second temps, nous proposons une technique numérique permettant de remonter aux paramètres décrivant ce modèle, grâce à des techniques d'optimisation bayésienne.

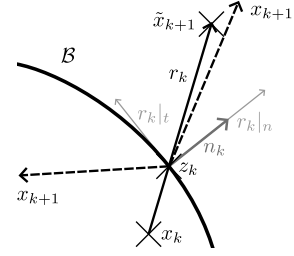


FIGURE 4 : Le principe de réflexion. Seul la composante normale change. On multiplie par un facteur $\sqrt{D_{\text{out}}/D_{\text{in}}}$ si la particule traverse la frontière (changement de domaine de diffusion) ou on prend l'opposé sinon (rebond).

2 Modèle direct

On note $\Omega \subset \mathbb{R}^D$ le domaine spatial d'intérêt. On s'intéresse au cas tri-dimensionnel $D = 3$. Ce domaine est partitionné en $\Omega = \Omega_{\text{in}} \sqcup \Omega_{\text{out}}$ où Ω_{in} désigne l'intérieur du condensat et Ω_{out} son complémentaire. On note aussi la frontière $\mathcal{B} = \partial\Omega_{\text{in}}$.

Modèle discret Dans ce travail, nous considérons que toutes les molécules se comportent de manière indépendante les unes des autres. Ainsi, on ne s'intéresse qu'à la description de la position d'une molécule. La dynamique particulière est une fonction $x : [0, T] \rightarrow \mathbb{R}^D$. En pratique, nous proposons de la discrétiser avec un pas de temps dt et de considérer une suite (x_k) avec $x_k \approx x(k \cdot dt)$.

L'idée générale est que la particule suit un mouvement brownien avec un coefficient de diffusion D_{in} (resp. D_{out}) à l'intérieur (resp. extérieur) du condensat. Elle passe à travers la frontière avec deux probabilités $p_{\text{in} \rightarrow \text{out}}$ et $p_{\text{out} \rightarrow \text{in}}$. Le modèle particulière est ainsi déterminé par 4 paramètres qu'il va falloir retrouver : $D_{\text{in}}, D_{\text{out}}, p_{\text{in} \rightarrow \text{out}}, p_{\text{out} \rightarrow \text{in}}$.

Dans le cas où $x_k \in \Omega_{\text{in}}$, la loi d'une particule est donnée par l'algorithme 1. Un algorithme similaire est utilisé pour $x_k \in \Omega_{\text{out}}$.

Algorithme 1 Une itération pour une particule dans Ω_{in}

- 1: **Données :** $x_k \in \Omega_{\text{in}}, D_{\text{in}}, D_{\text{out}}, p_{\text{in} \rightarrow \text{out}}, p_{\text{out} \rightarrow \text{in}}$
- 2: Tirer $b_k \sim \mathcal{N}(0, I_D)$
- 3: Définir $\tilde{x}_{k+1} = x_k + \sqrt{2dt \cdot D_{\text{in}}} \cdot b_k$
- 4: **Si** $\tilde{x}_{k+1} \in \Omega_{\text{in}}$ **alors**
- 5: $x_{k+1} = \tilde{x}_{k+1}$
- 6: **Sinon**
- 7: Définir $z_k = [x_k, \tilde{x}_{k+1}] \cap \mathcal{B}$
- 8: Définir n_k le vecteur normal unitaire à $\mathcal{B}$ en z_k
- 9: Définir $r_k = \tilde{x}_{k+1} - z_k$
- 10: Définir $r_k|_n = \langle r_k, n_k \rangle n_k$ et $r_k|_t = r_k - r_k|_n$
- 11: Tirer $u \sim \mathcal{U}([0, 1])$
- 12: **Si** $u < p_{\text{in} \rightarrow \text{out}} \cdot \sqrt{dt}$ **alors**
- 13: $x_{k+1} = z_k + \sqrt{\frac{D_{\text{out}}}{D_{\text{in}}}} \cdot r_k|_n + r_k|_t$
- 14: **Sinon**
- 15: $x_{k+1} = z_k - r_k|_n + r_k|_t$
- 16: **Fin Si**
- 17: **Fin Si**

Cet algorithme présente plusieurs subtilités. A la ligne 13 et 15, lorsque la particule interagit avec la frontière, la com-

posante normale de sa vitesse change (voir Figure 4). Elle est proportionnelle à $\sqrt{D_{\text{in}}}$ dans le condensat et à $\sqrt{D_{\text{out}}}$ à l'extérieur, ce qui explique le terme correctif en $\sqrt{D_{\text{in}}/D_{\text{out}}}$. Aux lignes 3 et 12, la normalisation des mouvements et probabilités par une quantité $\sqrt{dt}$ assure l'invariance d'échelle en temps du modèle. Grâce à ces normalisations, on peut effectuer un passage micro-macro et établir le résultat suivant.

Modèle continu En pratique, on considère $N \in \mathbb{N}$ particules indépendantes régies par les lois ci-dessus. A la limite $N \rightarrow \infty$ et $dt \rightarrow 0$, nous avons démontré en 1D qu'on obtient le modèle décrit dans l'article [14]¹.

Theorem 2.1 (Limite d'échelle informelle) Soit $\rho : \Omega \rightarrow \mathbb{R}_+$ la densité de particules à la limite. Alors ρ est régie par l'équation aux dérivées partielles suivante :

$$\begin{cases} \frac{d}{dt} \rho_{\text{in}} = D_{\text{in}} \Delta \rho_{\text{in}} & \text{dans } \Omega_{\text{in}} \\ \frac{d}{dt} \rho_{\text{out}} = D_{\text{out}} \Delta \rho_{\text{out}} & \text{dans } \Omega_{\text{out}} \\ -D_{\text{in}} \partial_n \rho_{\text{in}} = \kappa [\rho_{\text{in}} - \Gamma \rho_{\text{out}}] & \text{sur } \mathcal{B} \\ D_{\text{in}} \partial_n \rho_{\text{in}} = D_{\text{out}} \partial_n \rho_{\text{out}} & \text{sur } \mathcal{B} \end{cases} \quad (1)$$

où $\kappa = \frac{\sqrt{D_{\text{in}} p_{\text{in} \rightarrow \text{out}}}}{\sqrt{\pi}}$ et $\Gamma = \frac{p_{\text{out} \rightarrow \text{in}}}{p_{\text{in} \rightarrow \text{out}}} \sqrt{\frac{D_{\text{out}}}{D_{\text{in}}}}$.

En physique, le terme κ est interprété comme une résistance de l'interface (une perméabilité), et Γ est appelé coefficient de partition. C'est le rapport des densités de fluorophores intérieur/extérieur à l'équilibre. D'un point de vue macroscopique, ces équations signifient que les fluorophores suivent des équations de diffusion à l'intérieur et à l'extérieur. L'avant dernière conditions de bord a été proposée en 1951 dans [11] pour modéliser les phénomènes de transfert aux interfaces. La dernière est une équation de conservation de flux.

Spécificité numériques D'un point de vue numérique, l'algorithme est implémenté en PyTorch, ce qui permet d'effectuer une simulation avec 10^7 particules sur 10^4 pas de temps en moins de 10 secondes sur une carte graphique d'ordinateur portable RTX 3500 modeste. Un exemple de simulation avec 6 particules et 3 pas de temps est montrée sur la figure 5.

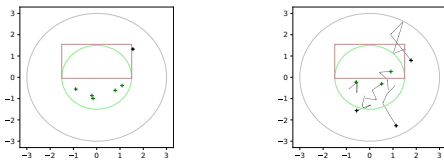


FIGURE 5 : Projection 2D du moteur physique 3D avant et après 3 pas de temps. Les 6 particules suivent une marche aléatoire brownienne. 3 domaines : condensat (vert), zone du bleach (rouge), domaine extérieur (gris).

Simulation optique Soit $(x_k^n)_{1 \leq k \leq K, 1 \leq n \leq N}$, la simulation de $N \in \mathbb{N}$ particules pendant $K \in \mathbb{N}$ pas de temps. A un temps donné, on peut construire la mesure : $\mu_k = \sum_{n=1}^N \delta_{x_k^n}$. Pour synthétiser une vidéo, on convolue cette mesure avec la réponse impulsionnelle 3D h (Point Spread Function 3D) du système optique de microscopie. Le modèle complet est donc :

$$\phi(\gamma)[k] = S(\mu_k \star h), \quad (2)$$

¹La preuve est 1D, mais validée expérimentalement pour la 2D/3D.

où $S : L^2(\mathbb{R}^D) \rightarrow \mathbb{R}^L$ est un opérateur d'échantillonnage sur une grille de L voxels, $\gamma = (p_{\text{in} \rightarrow \text{out}}, p_{\text{out} \rightarrow \text{in}}, D_{\text{in}}, D_{\text{out}})$ est le vecteur des paramètres physiques à retrouver et $\phi(\gamma) \in \mathbb{R}^{L \times K}$ est la vidéo synthétisée. Nous utilisons le modèle [10] qui décrit la réponse impulsionnelle d'un microscope confocal.

On obtient ainsi une série d'images réalistes qui correspond à la dynamique observée avec un microscope. Un exemple de simulation est donné sur la figure 6.

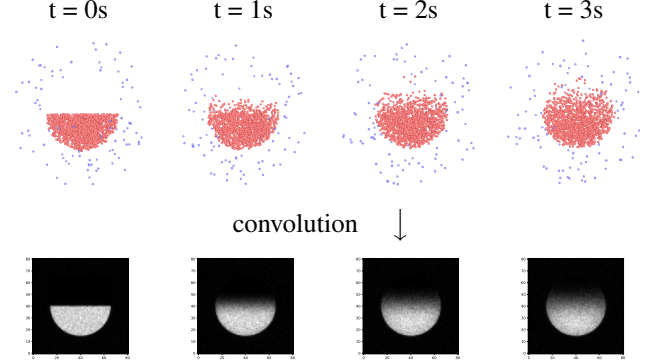


FIGURE 6 : Synthèse d'une vidéo à partir des positions successives de la simulation. Les particules marquées en rouge (resp. bleu) sont situées à l'intérieur (resp. extérieur) du condensat.

3 Résolution du problème inverse

Pour inférer les paramètres γ sous-jacents à une vidéo acquise par microscopie $v \in \mathbb{R}^{L \times K}$, on doit résoudre un problème inverse. Pour le résoudre, on considère la formule variationnelle suivante :

$$\min_{\gamma \in \mathbb{R}^4} \text{dist}(\phi(\gamma), v). \quad (3)$$

où $\phi(\gamma)$ est la vidéo synthétisée et v la vidéo observée. La fonction dist est une fonction perte qui mesure la distance entre les deux vidéos. Après différents essais, nous avons simplement choisi la norme ℓ^2 .

3.1 Optimisation

Pour résoudre ce problème, nous avons opté pour une méthode d'optimisation bayésienne [5]. Ce choix semble particulièrement adapté car :

- le nombre de paramètres n'est pas grand
- on dispose de bornes sur les paramètres à optimiser
- la fonction est non-convexe
- difficile de différencier le modèle (méthode d'ordre 0)
- le modèle est intrinsèquement stochastique

Résultats Un exemple préliminaire de régression est présenté dans la figure 7. On observe bien que la vidéo synthétisée et la vidéo réelle se ressemblent. Le bruit apparent sur la simulation est lié au caractère stochastique de la simulation.

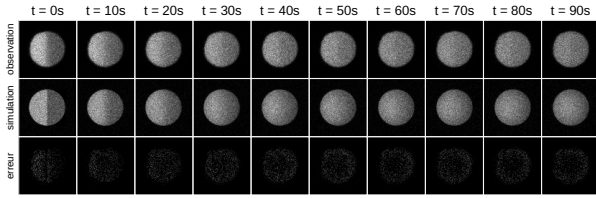


FIGURE 7 : En haut : Intensité lumineuse v au cours du temps observée *in vivo*. Au milieu : simulation $\phi(\hat{\gamma})$ retrouvée par optimisation bayésienne en environ 100s. En bas : différence entre les deux premières.

4 Conclusion

Dans ce travail, nous avons montré comment extraire les paramètres physiques de vidéos MOCHA-FRAP en couplant modélisation, simulation et optimisation. Les résultats préliminaires sont très encourageants, pour ce problème central en biologie. Cependant, plusieurs points sont à améliorer et nous y travaillons activement.

Théorie Le théorème informel 2.1 est technique à montrer et requiert encore de l’attention, notamment pour la généralisation aux dimensions supérieures. Nous essayons aussi de trouver des descriptions analytiques des solutions dans le cas de domaines Ω_{in} simples (e.g. demi-plan).

Simulation Deux descriptions de la dynamique sont possibles : celle par agent, ou celle par équation aux dérivées partielles. Nous travaillons actuellement sur les intérêts respectifs de ces deux approches en terme de temps de calcul et de capacité de modéliser finement les phénomènes physiques sous-jacents.

Complexification du modèle Le modèle mathématique considéré jusqu’à présent est assez simple et ne semble pas réaliste pour des condensats cellulaires. Il faudrait notamment ajouter des interactions avec le « substrat ». Par exemple, les molécules fluorescentes peuvent s’accrocher et se décrocher de la chromatine [12]. On peut aussi considérer des interactions multivalentes inter-polymère [14].

Quantification d’incertitude Même si la différence présentée à la figure 7 semble faible, rien ne garantit que les paramètres retrouvés sont les bons. Il existe peut-être des régimes physiques différents où les vidéos sont identiques. L’optimisation bayésienne fournit naturellement une quantification de l’incertitude codée à travers la covariance d’un processus gaussien et aux fonctions d’acquisition comme la « probabilité d’amélioration » [5]. Nous souhaitons – à terme – mesurer cette incertitude.

Validation Finalement, il faut valider la méthode sur données synthétiques et réelles, pour une grande variété de condensats et différents régimes physiques.

Références

- [1] Coline ARNOULD, Vincent ROCHER, SAUR *et al.* : Chromatin compartmentalization regulates the response to dna damage. *Nature*, 623(7985):183–192, 2023.
- [2] Salman F BANANI, Hyun O LEE, Anthony A HYMAN *et al.* : Biomolecular condensates : organizers of cellular biochemistry. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 18(5):285—298, May 2017.
- [3] Fabian ERDEL, Anne RADEMACHER, Rifka VLIJM *et al.* : Mouse heterochromatin adopts digital compaction states without showing hallmarks of hp1-driven liquid-liquid phase separation. *Molecular cell*, 78(2):236–249, 2020.
- [4] Fabian ERDEL et Karsten RIPPE : Formation of chromatin subcompartments by phase separation. *Biophysical journal*, 114(10):2262–2270, 2018.
- [5] Peter I FRAZIER : A tutorial on bayesian optimization. *arXiv preprint arXiv :1807.02811*, 2018.
- [6] Mitch LESLIE : Separation anxiety. *Science*, 371(6527):336–338, 2021.
- [7] David T MCSWIGGEN, Mustafa MIR, Xavier DARZACQ et Robert TJIAN : Evaluating phase separation in live cells : diagnosis, caveats, and functional consequences. *Genes & Development*, 33(23-24):1619–1634, 2019.
- [8] Sohum MEHTA et Jin ZHANG : Liquid–liquid phase separation drives cellular function and dysfunction in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 22(4):239–252, 2022.
- [9] Fernando MUZZOPAPPA, Johan HUMMERT, Michela ANFOSSI *et al.* : Detecting and quantifying liquid–liquid phase separation in living cells by model-free calibrated half-bleaching. *Nature Communications*, 13(1):7787, 2022.
- [10] Michael J NASSE et Jörg C WOEHL : Realistic modeling of the illumination point spread function in confocal scanning optical microscopy. *Journal of the Optical Society of America A*, 27(2):295–302, 2010.
- [11] EJ SCOTT, LH TUNG et HG DRICKAMER : Diffusion through an interface. *Journal of Chemical Physics*, 19(9):1075–1078, 1951.
- [12] Brian L SPRAGUE, Robert L PEGO, Diana A STAVREVA et James G MCNALLY : Analysis of binding reactions by fluorescence recovery after photobleaching. *Biophysical journal*, 86(6):3473–3495, 2004.
- [13] Aurélie ZBINDEN, Manuela PÉREZ-BERLANGA, Pierre DE ROSSI *et al.* : Phase separation and neurodegenerative diseases : a disturbance in the force. *Developmental Cell*, 55(1):45–68, 2020.
- [14] Yaojun ZHANG, Andrew GT PYO, Ross KLIEGMAN, Yoyo JIANG, Clifford P BRANGWYNNE, Howard A STONE et Ned S WINGREEN : The exchange dynamics of biomolecular condensates. août 2024.