



**HAL**  
open science

# Du monomère à la cellule: Modèles de la dynamique de l'actine

Julien Berro

► **To cite this version:**

Julien Berro. Du monomère à la cellule: Modèles de la dynamique de l'actine. Mathématiques [math]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT : . tel-00221384

**HAL Id: tel-00221384**

**<https://theses.hal.science/tel-00221384>**

Submitted on 28 Jan 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER, GRENOBLE I**

**THÈSE** pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER**

**Spécialité : « Modèles et Instruments en Médecine et Biologie »**

préparée au *Laboratoire des Techniques de l'Imagerie, de la Modélisation et de la Cognition* dans le cadre de l'École Doctorale « **Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement** »

préparée et soutenue publiquement par

Julien BERRO

le 4 Décembre 2006

*Titre :*

**Du monomère à la cellule:  
Modèles de la dynamique de l'actine**

---

*sous la direction de Jean-Louis Martiel*

---

**JURY**

Jean-Pierre François	Rapporteur
Cécile Sykes	Rapporteur
Laurent Blanchoin	Examineur
Franz Bruckert	Examineur
Jacques Demongeot	Examineur
Jean-Louis Martiel	Directeur de thèse



*Nasr Eddin bavarde agréablement avec l'un de ses amis, lorsque ce dernier se met soudain à rire en repensant à ce qu'il a vu le matin même :*

*— Ô Hodja, écoute un peu c'est drôle : figure-toi que, tout à l'heure, j'ai surpris un homme, un pauvre idiot qui, ne sachant plus combien il avait de doigts, s'efforçait de les compter en les enfonçant l'un après l'autre dans la terre – un, deux, trois, quatre, cinq... Quel imbécile n'est-ce pas ?*

*— En effet, répond Nasr Eddin, car je peux te dire qu'avec cette méthode ce ne sont pas les doigts qu'on compte, mais les trous.*

ANONYME, XIII-XV<sup>e</sup> siècle



## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jean-Louis Martiel pour m'avoir initié à la recherche et de m'y avoir donné goût au cours de mon DEA puis de m'avoir suivi pendant ces trois années de thèse. Je voudrais souligner sa disponibilité, sa rigueur, sa large culture scientifique, sa persévérance qui sont des qualités essentielles pour un directeur de thèse. Je voudrais ensuite remercier Laurent Blanchoin sans qui une très grande partie de ce travail n'aurait pas pu avoir lieu. Je le remercie aussi de m'avoir accueilli quelques mois dans son laboratoire afin de me permettre de m'initier à la biologie expérimentale juste après ma soutenance de thèse.

Je remercie également les membres de mon jury en commençant par mes deux rapporteurs Cécile Sykes et Jean-Pierre François pour leur lecture attentive de mon manuscrit, ainsi que Franz Bruckert pour avoir assisté à ma soutenance et m'avoir permis de découvrir les aspects expérimentaux de la biologie en me permettant de suivre son cours de DEA, et bien évidemment Jacques Demongeot sans qui cette thèse n'aurait pu exister.

Un travail de thèse est toujours une entreprise collective. Je tiens donc à souligner l'importance des personnes avec qui j'ai travaillé pendant ces trois années en particulier Alphée Michelot (PCV) et Jérémy Roland qui ont très largement participé aux résultats obtenus dans cette thèse, mais aussi les stagiaires que nous avons accueillis à TIMB : Vivek, Nancy, Rado, Benoît, Benjamin, Frédéric. Merci aussi à Rajaa Boujemaa-Paterski et Christophe Guérin de PCV.

Les membres du laboratoire TIMC-IMAG et en particulier ceux de l'équipe TIMB ont aussi leur part de mérite dans cette thèse, grâce à leurs conseils avisés, leurs regards critiques ou tout simplement leur bonne humeur ou leurs petites histoires rocambolesques ! Merci donc à Loïc, Nicolas G., Michaël, Adrien, Mathieu E., David, Nicolas H., Patrick, Sylvain F., Mathieu R., Olivier, Hervé, Cécile, et tous les autres de m'avoir supporté, dans tous les sens du terme... Je remercie aussi les travailleuses de l'ombre que sont les secrétaires, en commençant par Caro, qui sait si bien arranger les choses, et en n'oubliant pas Céline, Kim, Nadine et Corinne.

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont soutenu tout au long de la thèse (et même quand elle n'avait pas encore commencé...) et en particulier à ceux qui se sont déplacés jusqu'à Grenoble pour le pot de thèse. Evidemment, un merci très spécial à Amandine.



## Avant-propos \*

Cette thèse propose trois approches de modélisation, sur trois échelles différentes, afin de mieux comprendre la dynamique du cytosquelette d'actine. Elle comprend cinq parties.

La première partie propose une introduction sur le cytosquelette (chapitre 1), ainsi qu'une description de la problématique de cette thèse (chapitre 2).

La deuxième partie porte sur la modélisation de l'assemblage des filaments à partir d'interactions élémentaires entre molécules. Après une présentation des algorithmes classiques de simulation stochastiques de systèmes de réactions biochimiques (chapitre 3), nous présentons un nouvel outil de simulation multi-agent de réaction-diffusion (chapitre 4). Les applications de cet outil sont présentées dans le chapitre 5 où nous modélisons la polymérisation de filaments nucléés par des formines, disposées autour d'une bille, en présence d'ADF/Cofilin. Nous avons approfondi l'étude de ce système (chapitre 6) par des simulations, ainsi que par une étude analytique, afin de quantifier l'effet des différents paramètres cinétiques.

La troisième partie traite du flambage de filaments dont les extrémités sont fixes. Le modèle est présenté dans le chapitre 7, les résultats sur l'estimation des forces dans le chapitre 8. Ces résultats et leurs conséquences pour la génération de forces *in vivo* sont discutés dans le chapitre 9.

La quatrième partie présente un cadre pour la gestion des données de cinétique biochimique. Après une description du contexte (chapitre 10), nous présentons la base de données SBliD ainsi que les outils permettant sa gestion et la création de modèles (chapitre 11). Nous proposons au chapitre 12 une application à l'organisation des données concernant les voies de signalisation de la polymérisation de l'actine.

La cinquième partie conclue ce travail (chapitre 13) par un rappel puis une discussion des principaux résultats obtenus au cours de cette thèse.

---

\*Note : les références bibliographiques seront données à la fin de chaque partie



# Table des matières

<b>I</b>	<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Le cytosquelette d'actine</b>	<b>3</b>
1.1	Le cytosquelette . . . . .	3
1.1.1	Fonction . . . . .	3
1.1.2	Composition . . . . .	3
1.2	Les filaments d'actine . . . . .	4
1.2.1	Rôle spécifique de l'actine au sein du cytosquelette . . . . .	4
1.2.2	Structure . . . . .	4
1.2.3	Dynamique des filaments . . . . .	5
1.2.4	Protéines associées à l'actine . . . . .	7
1.3	Propriétés mécaniques des filaments d'actine . . . . .	8
1.3.1	Production de forces <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> . . . . .	8
1.3.2	Mécanismes de la production de forces . . . . .	8
1.3.3	Résistance aux contraintes . . . . .	10
1.3.4	Ruptures de symétries . . . . .	10
1.4	Régulation . . . . .	10
<b>2</b>	<b>Motivations et Objectifs</b>	<b>13</b>
2.1	Modéliser la dynamique de l'actine . . . . .	13
2.1.1	Pourquoi modéliser le cytosquelette d'actine? . . . . .	13
2.1.2	Comment modéliser? . . . . .	14
2.2	Objectifs de cette thèse . . . . .	15
2.2.1	Plan . . . . .	15
<b>II</b>	<b>Modèles stochastiques de la polymérisation de filaments biologiques</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Algorithmes stochastiques de simulation</b>	<b>23</b>
3.1	Introduction . . . . .	23
3.2	Algorithme de Gillespie . . . . .	23
3.2.1	Idée générale . . . . .	23
3.2.2	Définitions et notations . . . . .	24
3.2.3	Loi de la prochaine réaction . . . . .	25
3.2.4	Liens avec les constantes cinétiques classiques . . . . .	27

3.2.5	Algorithme de Gillespie . . . . .	29
3.3	Performances . . . . .	30
3.3.1	Exactitude . . . . .	30
3.4	Variantes de l'algorithme de Gillespie . . . . .	30
<b>4</b>	<b>Le simulateur MAMol</b>	<b>33</b>
4.1	Description de l'approche . . . . .	33
4.1.1	Une approche multi-agent . . . . .	33
4.1.2	Une approche stochastique . . . . .	33
4.1.3	Un simulateur en 2 dimensions . . . . .	34
4.1.4	Types de réactions simulées . . . . .	34
4.2	Recensement des réactions . . . . .	34
4.2.1	Notion de voisinage : voisinages sphériques . . . . .	34
4.2.2	Approximation du voisinage : voisinage rectangulaire global . . . . .	35
4.2.3	Conditions pour avoir l'équivalence en moyenne des 2 approches, en 2 dimensions . . . . .	36
4.3	Déplacements . . . . .	38
4.3.1	Diffusion . . . . .	38
4.3.2	Collisions . . . . .	39
4.4	Simulation des réactions . . . . .	39
4.4.1	Lois exponentielles avec rejet . . . . .	39
4.4.2	Algorithme de Gillespie avec rejet . . . . .	41
4.5	Autres fonctionnalités du simulateur MAMol . . . . .	42
4.5.1	Molécules constantes ou homogènes . . . . .	42
4.5.2	Formation de faisceaux . . . . .	43
4.6	Algorithme et performances . . . . .	45
4.6.1	Idée générale . . . . .	45
4.6.2	Algorithme du simulateur MAMol . . . . .	45
4.6.3	Complexité . . . . .	45
4.6.4	Choix du pas de temps . . . . .	47
4.7	Implémentation et améliorations . . . . .	47
4.7.1	Implémentation . . . . .	47
4.7.2	Améliorations possibles des performances . . . . .	48
<b>5</b>	<b>Billes, formines et ADF/Cofline</b>	<b>49</b>
5.1	Introduction . . . . .	49
5.1.1	Actine, Formines et ADF/Cofline . . . . .	49
5.1.2	Systèmes reconstitués avec des billes . . . . .	49
5.2	Modélisation . . . . .	50
5.2.1	Aspects biochimiques . . . . .	50
5.2.2	Aspects mécaniques . . . . .	52
5.2.3	Simulation de faisceaux de filaments . . . . .	52
5.3	Activation des formines et vitesse d'élongation . . . . .	53
5.4	Élongation en présence d'ADF/Cofline . . . . .	54
5.4.1	Évolution de la longueur des filaments . . . . .	54

5.4.2	Limite de l'échantillonnage de prises de vue . . . . .	55
5.4.3	Limite de la résolution optique . . . . .	57
5.5	Bundling et rupture de symétrie . . . . .	57
5.5.1	Agrégation de filaments . . . . .	57
5.5.2	Directions privilégiées . . . . .	58
5.6	Discussion . . . . .	58
5.6.1	Fluctuations . . . . .	58
5.6.2	Accélération du turnover . . . . .	59
5.6.3	Symétrie, rupture de symétrie et motilité . . . . .	59
5.6.4	Conséquences <i>in vivo</i> . . . . .	60
<b>6</b>	<b>Étude systématique des paramètres cinétiques</b>	<b>61</b>
6.1	Introduction . . . . .	61
6.2	Modèle . . . . .	61
6.2.1	Système simulé . . . . .	61
6.2.2	Simulations . . . . .	62
6.2.3	Modèle analytique . . . . .	63
6.3	Régulation en longueur . . . . .	65
6.4	Accélération du turnover des filaments . . . . .	68
6.4.1	Taux de dépolymérisation apparent . . . . .	68
6.4.2	Temps de résidence des sous-unités au sein du filament . . . . .	68
6.4.3	Composition du filament . . . . .	71
6.5	Discussion . . . . .	72
6.5.1	Régulation en longueur et longueur moyenne en présence d'ADF/Co- filine . . . . .	72
6.5.2	Accélération du turnover . . . . .	73
6.5.3	Discussion des résultats de Andrianantoandro et Pollard (2006)	73
6.5.4	Conséquences <i>in vivo</i> . . . . .	75
<b>III</b>	<b>Modèle déterministe du flambage de filaments d'actine</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>Mise en place du modèle</b>	<b>83</b>
7.1	Contexte biologique . . . . .	83
7.1.1	Étude des forces produites par les formines . . . . .	83
7.1.2	Flambage dans le plan . . . . .	83
7.2	Équations du modèle . . . . .	84
7.2.1	Longueur de persistance . . . . .	84
7.2.2	Notations . . . . .	85
7.2.3	Formulation Lagrangienne . . . . .	86
7.2.4	Équations d'Euler-Lagrange . . . . .	87
7.3	Conditions aux bords . . . . .	88
7.3.1	Contraintes de position . . . . .	88
7.3.2	Contraintes angulaires . . . . .	88
7.4	Cas classique des petites amplitudes avec les conditions BC1 . . . . .	90

7.5	Normalisation des équations . . . . .	91
7.5.1	Forme normalisée . . . . .	91
7.5.2	Conditions aux bords . . . . .	91
7.6	Analyse des configurations initiales . . . . .	92
7.6.1	Solutions avec les conditions aux bords BC1 . . . . .	92
7.6.2	Solutions avec les conditions aux bords BC2 . . . . .	94
7.6.3	Solutions avec les conditions aux bords BC3 . . . . .	94
7.7	Justification de l'approche employée . . . . .	95
7.7.1	Équations à l'état stationnaire . . . . .	95
7.7.2	Fluctuations et transitions entre les différents modes . . . . .	96
<b>8</b>	<b>Résultats</b>	<b>99</b>
8.1	Configurations des filaments . . . . .	99
8.2	Force exercée au cours de l'élongation . . . . .	103
8.3	Force initiale . . . . .	104
8.4	Vitesses d'élongation . . . . .	105
8.5	Mesure de la force . . . . .	107
8.6	Concentration d'actine et longueur minimale . . . . .	107
8.7	Modèles de la jonction entre l'extrémité des filaments et la lame . . . . .	110
8.7.1	Solutions de petite amplitude . . . . .	111
8.7.2	Longueur critique . . . . .	111
8.7.3	Raideur critique . . . . .	112
<b>9</b>	<b>Discussion</b>	<b>115</b>
9.1	Intérêt du modèle . . . . .	115
9.2	Configurations du filament et conditions aux bords . . . . .	115
9.3	Mesure de la force . . . . .	116
9.4	Concentration d'actine . . . . .	116
9.5	Liaison entre la formine et la lame . . . . .	117
9.6	Génération de forces <i>in vivo</i> . . . . .	117
<b>IV</b>	<b>Organisation de l'information biochimique</b>	<b>121</b>
<b>10</b>	<b>Contexte</b>	<b>123</b>
10.1	La biologie des systèmes ou <i>Systems Biology</i> . . . . .	123
10.2	Les langages de description de systèmes . . . . .	123
10.3	Les bases de données de réaction biochimiques . . . . .	125
10.3.1	Les bases de données exhaustives . . . . .	125
10.3.2	Les bases de données spécifiques . . . . .	125
10.3.3	Les bases de modèles . . . . .	125
10.4	Organiser son propre problème . . . . .	126
10.4.1	Besoins . . . . .	126
10.4.2	Solutions existantes . . . . .	126

---

<b>11 SBliD: SBML like Database</b>	<b>127</b>
11.1 Fonctionnalités . . . . .	127
11.1.1 Schéma du langage SBML . . . . .	127
11.1.2 Utilitaires de gestion de la base . . . . .	127
11.2 Adaptations du langage SBML . . . . .	128
11.2.1 Modifications de types SBML existants . . . . .	129
11.2.2 Nouvelles entités . . . . .	130
11.2.3 Entités SBML sans équivalent dans SBliD . . . . .	131
11.3 Utilitaires . . . . .	133
11.3.1 SBliD.Manager: une interface web pour SBliD . . . . .	133
11.3.2 SBliD.Builder: une interface d'élaboration de modèles . . . . .	134
11.4 Schémas Entité-Association de la section 11.2 . . . . .	136
<b>12 Application: Réseau de régulation de l'actine</b>	<b>139</b>
12.1 Voies de signalisation . . . . .	139
12.1.1 La famille de protéines Rho . . . . .	139
12.1.2 Voie de régulation des réseaux branchés de type lamellipodes . . . . .	139
12.1.3 Voie de régulation des câbles de filament de type filopodes . . . . .	140
12.1.4 Voie de régulation des fibres de stress . . . . .	140
12.1.5 Régulation des ADF/Cofilines . . . . .	140
12.2 La base de données ActinDB . . . . .	140
12.3 Conclusion . . . . .	141
<b>V Conclusion</b>	<b>147</b>
<b>13 Conclusion générale</b>	<b>149</b>
13.1 Résultats principaux . . . . .	149
13.1.1 Apports pour la modélisation . . . . .	149
13.1.2 Apports pour la dynamique du cytosquelette . . . . .	149
13.2 Discussion . . . . .	150
13.2.1 Régulation chimique, géométrique et mécanique . . . . .	150
13.2.2 Génération de forces . . . . .	151
13.2.3 Changements d'échelle, systèmes complexes et ruptures de symétrie . . . . .	151
13.2.4 Modéliser les systèmes biologiques . . . . .	152



# Première partie

## Introduction



# Chapitre 1

## Le cytosquelette d'actine

### 1.1 Le cytosquelette

#### 1.1.1 Fonction

Afin de s'organiser les unes avec les autres, les cellules doivent maintenir ou transformer certaines de leurs propriétés, telles que leurs formes, leurs nombres, leurs positions ou leurs fonctions. Chez les cellules eucaryotes, ces transformations sont assurées par l'intermédiaire de l'organisation d'un ensemble de filaments biologiques internes aux cellules appelé cytosquelette.

Le cytosquelette est ainsi capable de se réorganiser et de participer à la morphogénèse de la cellule, que ce soit localement au niveau de la membrane comme pour la formation des épines dendritiques dans le neurone (Tada et Sheng, 2006), ou globalement à l'échelle de la cellule lors de l'adhésion (Théry *et al.*, 2006). Il joue aussi un grand rôle tout au long de la division cellulaire, de la réorganisation des chromosomes à la formation de l'anneau contractile. Il a été aussi montré que ce réseau de filaments participe au trafic intra-cellulaire en servant de rails guidant le transport de vésicules, de la membrane au noyau et inversement. De plus, le cytosquelette permet à la cellule de supporter les tensions et les compressions qu'elle peut subir des cellules alentours ou du milieu extérieur (Alberts *et al.*, 2002).

#### 1.1.2 Composition

Le cytosquelette est constitué de filaments biologiques très abondants dans les cellules eucaryotes, dont les protéines ont été très bien conservées au cours de l'évolution. De plus, certains procaryotes possèdent des protéines homologues aux protéines du cytosquelette des eucaryotes (Shih et Rothfield, 2006).

Il existe trois types de filaments dans les cellules eucaryotes. Chacun a une fonction particulière, correspondant à une échelle d'action différente, même s'il existe des interactions entre les différents types de filaments. Les microtubules, qui sont très rigides, participent à la structure et à l'organisation globale de la cellule ainsi qu'au trafic intracellulaire. L'actine, qui est plus souple, agit plus localement sur la membrane de la cellule et permet sa déformation. L'actine est aussi à la base de la motilité

de vésicules et de bactéries. Certains métazoaires, dont les vertébrés et les mollusques, sont aussi constitués d'un troisième type de filament, les filaments intermédiaires, dont les fonctions sont moins bien connues mais qui semblent jouer un rôle de support mécanique pour la membrane.

Ces trois types de filaments ont des propriétés structurelles communes : ces sont des *polymères* constitués d'un assemblage de protéines élémentaires, appelées *monomères* lorsqu'elles sont libres en solution et *sous-unités* lorsqu'elles sont incorporées dans un filament. Ces filaments sont très dynamiques, principalement aux extrémités où s'effectuent l'assemblage et le désassemblage de sous-unités. Ainsi, ces événements de polymérisation et de dépolymérisation permettent au cytosquelette de se réarranger très rapidement et de s'adapter aux signaux mécaniques et chimiques de l'environnement extérieur.

## 1.2 Les filaments d'actine

### 1.2.1 Rôle spécifique de l'actine au sein du cytosquelette

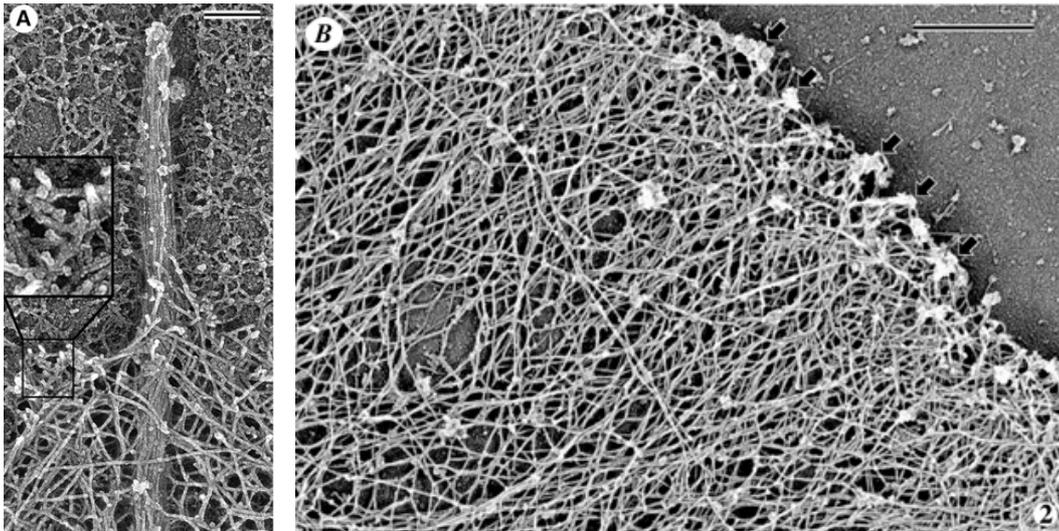
Les filaments d'actine s'organisent dans la cellule en trois structures distinctes. Premièrement, plusieurs filaments peuvent se regrouper en *faisceaux parallèles*, ou *bundles*, comme c'est le cas au sein des filopodes, qui sont des avancées de la membrane cellulaire en forme doigt ou de fil, mesurant jusqu'à quelques micromètres de longueur et quelques nanomètres de diamètre (figure 1.1A). Les filaments peuvent aussi s'organiser en un *réseau branché*, comme dans les lamellipodes, qui sont de larges avancées de membrane sur une faible épaisseur en forme de lamelle (figure 1.1B). Enfin, en association avec des myosines, des filaments parallèles d'actine peuvent former des *fibres de stress*, où les filaments coulissent les uns sur les autres dans des sens opposés.

En outre, certaines bactéries, telles que *Listeria* ou *Shigella*, et certains endosomes peuvent utiliser l'actine de la cellule hôte pour se déplacer en polymérisant à leur surface un réseau branché de filaments, dont la structure a plusieurs points communs avec les réseaux que l'on peut observer dans les lamellipodes.

### 1.2.2 Structure

Les constituants élémentaires des filaments d'actine sont des protéines de 43 kDa, d'environ 6 nm de diamètre qui peuvent lier un nucléotide ATP (Adénosine Tri-Phosphate), ADP (Adénosine Di-Phosphate) ou un complexe ADP-Pi (Adénosine Di-Phosphate et un Phosphate inorganique). Ces monomères sont appelés actine filamentueuse, ou *F-actine*, lorsqu'ils sont polymérisés dans le filament, et actine globulaire ou *G-actine*, lorsqu'ils sont en solution, sous forme non polymérisée.

Au sein des filaments, les sous-unités d'actine sont organisées sur deux rangées (figure 1.2), ayant ainsi un diamètre de 7 nm. Ils contiennent environ 330 sous-unités par micromètre. De plus, ils ont une hélicité intrinsèque le long de leur axe d'un pas de 13 sous-unités par tour. Les deux extrémités des filaments ne sont pas identiques



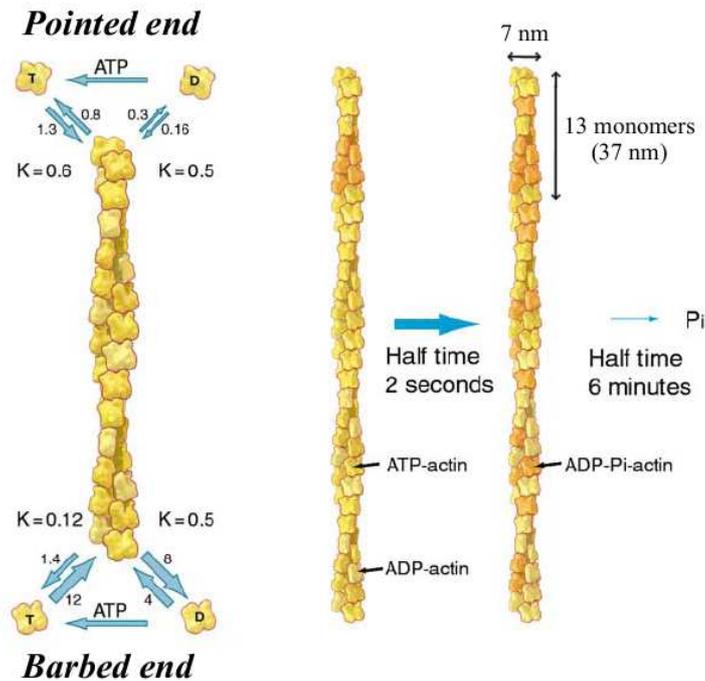
**FIG. 1.1 – Organisation des filaments d'actine** – Images en microscopie électronique du cytosquelette d'actine dans un filopode (A) et un lamellipode (B). Les barres correspondent à  $0.2 \mu\text{m}$  (A) et  $0.5 \mu\text{m}$  (B). Images tirées de (Svitkina *et al.*, 1995) et (Svitkina *et al.*, 2003).

structurellement et ont par conséquent des propriétés biochimiques très différentes. L'une est appelée *extrémité barbée* et l'autre *extrémité pointue*.

### 1.2.3 Dynamique des filaments

Du fait de la différence structurale entre les deux extrémités, la polymérisation et la dépolymérisation ne s'y effectuent pas à la même vitesse. Celles-ci sont aussi influencées par la nature du nucléotide (ATP, ADP-Pi ou ADP) lié aux monomères d'actine qui vont être insérés ou retirés. Ainsi, en général, la polymérisation se fera préférentiellement avec des monomères d'actine-ATP à l'extrémité barbée au taux de  $12 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$  et le filament perdra des monomères d'actine-ADP à l'extrémité pointue au taux de  $0.3 \text{ s}^{-1}$ . Le filament va alors croître si la concentration de G-actine-ATP en solution est supérieure à une valeur seuil, appelée *concentration critique*, et se raccourcir si elle est inférieure (figure 1.2). Dans des conditions expérimentales classiques *in vitro*, lorsqu'il n'y a que de l'actine en solution, la concentration critique est de  $0.12 \mu\text{M}$  environ.

Lorsqu'ils sont au sein d'un filament, les sous-unités d'actine subissent une *hydrolyse* de leur nucléotide. Le passage de F-actin-ATP en F-actin-ADP-Pi est très rapide (demi-vie de quelques secondes) ; le relargage du phosphate est quant à lui assez lent (demi-vie de 6 minutes environ). Ainsi, le type de nucléotide attaché à la sous-unité donne une idée de l'âge de la sous-unité dans le filament. Les sous-unités les plus 'jeunes', c'est à dire nouvellement polymérisées, seront sous forme F-actin-ATP ; les plus vieilles auront comme nucléotide un ADP. Cette hydrolyse semble s'effectuer aléatoirement et uniformément le long du filament (Blanchoin et Pollard, 2002). Cependant,



**FIG. 1.2 – Biochimie des filaments d'actine** – La polymérisation et la dépolymérisation aux extrémités s'effectue avec des taux différents, aussi fonction du type de monomère (en  $\mu M^{-1} s^{-1}$  pour les taux d'association et en  $s^{-1}$  pour les taux de dissociation). L'hydrolyse de l'ATP des sous-unités de F-actine est très rapide mais le relargage du phosphate est assez lent.  $K$  représente la constante d'équilibre :  $K = k^-/k^+$ . Les sous-unités ATP sont en jaune, ADP-Pi en orange et ADP en beige clair. L'extrémité barbée est en bas et l'extrémité pointue en haut. Schéma adapté de Pollard et Earnshaw (2004). Valeurs issues de Pollard *et al.* (2000).

un modèle alternatif d'hydrolyse vectorielle, qui suppose une hydrolyse dirigée, de proche en proche le long du filament, à partir des extrémités a été également proposé (Carlier *et al.*, 1987).

Après dépolymérisation, les monomères de G-actine-ADP sont recyclés en G-actine-ATP et peuvent être polymérisés à nouveau. On voit ainsi une propriété très spécifique des filaments biologiques, et de l'actine en particulier, dans la possibilité de recycler les monomères, appelé *turnover* ou *treadmilling*. Ce turnover est caractérisé de façon quantitative par le temps de séjour moyen d'une sous-unité au sein du filament, c'est à dire le temps entre le moment où il est polymérisé et le moment où il est relargué en solution.

### 1.2.4 Protéines associées à l'actine

La formation et la dynamique du cytosquelette d'actine *in vivo* fait intervenir plus de 60 familles de protéines interagissant directement avec les monomères sous forme globulaire ou filamenteuse (Pollard et Earnshaw, 2004). Les anomalies génétiques sur certaines de ces protéines peuvent conduire à des pathologies telles que des dystrophies musculaires, des cardiomyopathies, ou une fragilité accrue des globules rouges.

Un certain nombre de protéines agit directement sur la dynamique de la polymérisation en régulant la concentration de G-actine polymérisable, comme les  $\beta$ -thymosines qui séquestrent l'actine monomérique ou les profilines qui libèrent des monomères et en favorisent l'assemblage à l'extrémité barbée.

Un autre moyen de réguler la dynamique de l'actine est de contrôler le nombre d'extrémités de filaments actives, que ce soit pour augmenter la polymérisation ou augmenter la dépolymérisation. Trois types de protéines le permettent. Les **protéines de coiffe**, ou **capping protein**, se fixent directement sur les extrémités barbées, et la rendent inactive, favorisant ainsi l'activité de l'extrémité pointue. Deuxièmement, les **protéines de fragmentation** s'attachent le long des filaments, créent ainsi de nouvelles extrémités barbées et pointues en coupant les filaments, accélérant le treadmilling (ex : les ADF/cofiline) ou favorisant la dépolymérisation à l'extrémité pointue en coiffant les nouvelles extrémités barbées (ex : la Gelsoline). Un dernier moyen de créer de nouvelles extrémités est de créer de nouveau filaments par l'intermédiaire de **nucléateurs**, de novo (avec les formines par exemple) ou en créant de nouvelles branches à partir d'anciens filaments (avec le complexe Arp2/3 par exemple).

D'autres protéines ont un effet sur les liaisons entre les filaments et sur leur organisation au sein de la cellule. Certaines permettent la formation de faisceaux de filaments d'actine (fascines,  $\alpha$ -actinines) ou la formation de maillages (filamines). D'autres permettent l'attachement à des complexes membranaires (spectrines, dystrophines) ou au cytosquelette de filaments intermédiaires ou de microtubules (MAP-2).

En outre, les myosines sont des moteurs moléculaires qui se fixent sur les filaments le long desquels elles se déplacent. Elles permettent, entre autres, le transport de vésicules le long du cytosquelette d'actine et sont l'élément moteur des fibres de stress.

## 1.3 Propriétés mécaniques des filaments d'actine

### 1.3.1 Production de forces *in vivo* et *in vitro*

Les protrusions de la membrane sont à la base de la motilité cellulaire. Les forces nécessaires à de telles déformations sont transmises par les lamellipodes ou les filopodes. D'autre part, des bactéries telles que *Listeria* et *Shigella* (Gouin *et al.*, 2005) détournent le cytosquelette d'actine de la cellule infectée pour se déplacer. L'étude de la production de forces dans ces systèmes *in vivo* a été complétée par la reconstitution *in vitro* de la motilité avec des billes ou des barreaux synthétiques sur lesquels ont été greffés des activateurs de la polymérisation. Ces études ont pu mettre en évidence les protéines nécessaires et suffisantes à la motilité (Actine, Arp2/3, protéines de coiffe, ADF/Cofiline) (Loisel *et al.*, 1999) et ont pu ainsi permettre de proposer des mécanismes pour la production de forces .

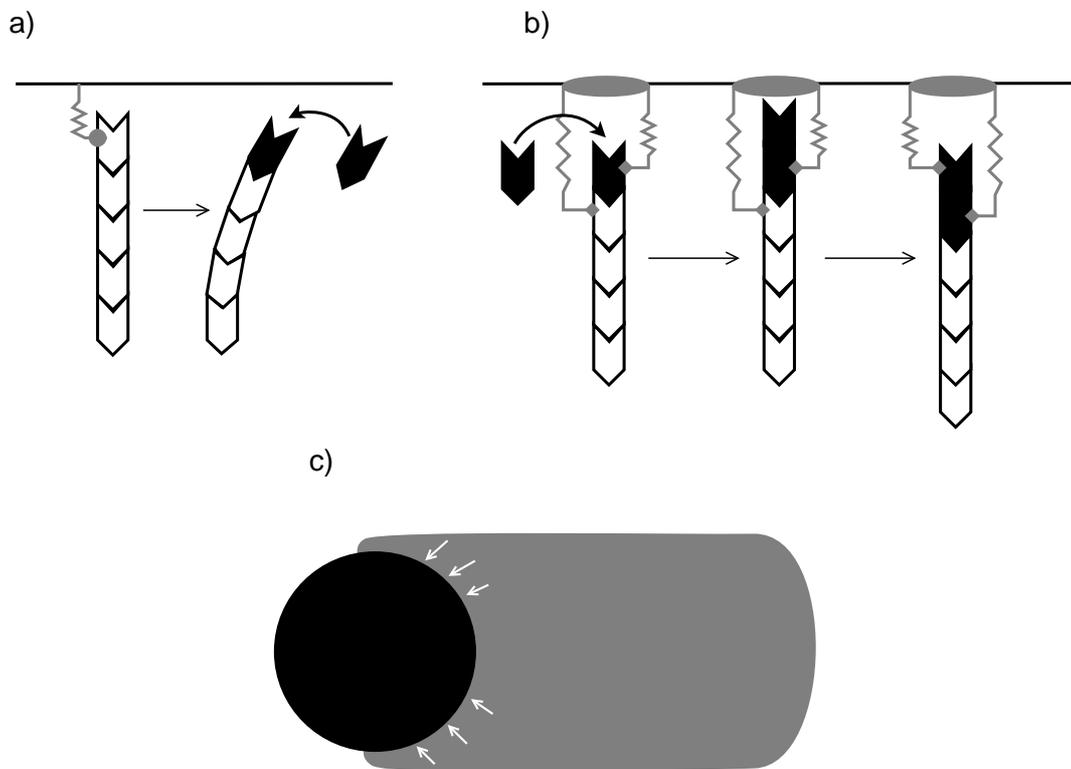
### 1.3.2 Mécanismes de la production de forces

Trois mécanismes de production de forces ont été proposés pour expliquer les reconstitutions de motilité : le cliquet brownien, la processivité à l'extrémité des filaments et la propulsion élastique.

Le mécanisme du cliquet brownien, proposé par Peskin *et al.* (1993), met en avant le fait qu'un objet en solution subit des fluctuations thermiques et que des filaments qui polymérisent d'un côté de cet objet jouent un rôle de cliquet en polymérisant un monomère chaque fois que l'espace entre le filament et l'objet est suffisamment grand (figure 1.3a). Plusieurs variantes ont été proposées afin de prendre en compte, d'une part, l'élasticité des filaments et leurs fluctuations (Mogilner et Oster, 1996), et d'autre part la possibilité pour les filaments d'être attachés épisodiquement à la surface de l'objet, donnant au final le modèle de cliquet brownien avec attachement ou "tethered ratchet" (Mogilner et Oster, 2003) .

La processivité est un autre mécanisme de production de forces au niveau moléculaire (Dickinson *et al.*, 2004). Une protéine, située à l'interface entre l'objet à déplacer et le filament, favorise l'insertion de monomères à son extrémité, ce qui permet la production d'une force pouvant mouvoir la charge (figure 1.3b). Kovar et Pollard (2004) ont montré que la formine de mammifères mDia1 est processive et peut engendrer des forces de l'ordre du piconewton.

Le troisième mécanisme, la propulsion élastique, a lieu, non plus à l'échelle du monomère mais à l'échelle d'un ensemble de filaments. Le principe est que, à un niveau macroscopique, les réseaux de filaments d'actine, tels que les réseaux branchés créés en présence d'Arp2/3, peuvent être considérés comme des gels visco-élastiques (Bernheim-Groswasser *et al.*, 2005). La polymérisation d'un tel gel autour d'une bille va créer des pressions sur la surface qui vont permettre à la bille d'avancer (figure 1.3c) (Gerbal *et al.*, 2000).



**FIG. 1.3 – Modèles de génération de forces –**

a) Cliquet brownien élastique avec attachement : lorsque le filament se détache de la surface, ses fluctuations ainsi que celles de l'objet laissent la place nécessaire à l'ajout d'un monomère ; le filament courbé engendre alors une force sur la surface, d'une part, et, d'autre part, empêche l'objet de revenir en arrière.

b) Processivité : la molécule attachée à la surface (en gris) permet l'insertion de monomères à l'extrémité du filament, en exerçant une force sur celui-ci.

c) Propulsion élastique : le gel d'actine (en gris), en se polymérisant, exerce une pression (flèches blanches) sur la bille (en noir).

Dans les schémas a) et b), l'actine ATP est en noir, l'actine ADP-Pi en blanc. Schéma inspiré de Mogilner (2006).

### 1.3.3 Résistance aux contraintes

Les filaments d'actine sont considérés comme des polymères semi-flexibles (Howard, 2001). Aussi, ils peuvent subir des petites déformations dues à des contraintes exercées par des forces extérieures ou par leur propre polymérisation. Cependant, ces déformations seront moins importantes que celles de l'ADN, mais plus que celles des microtubules, qui sont beaucoup plus rigides.

Comme montré par les expériences de Kovar et Pollard (2004), un filament unique peut se déformer sous la force engendrée par la processivité de la formine qui coiffe son extrémité barbée ; une telle déformation est appelée *flambage*. La résistance à la contrainte d'un filament en train de flamber va alors être largement diminuée (voir chapitre 8). La formation de faisceaux de filaments est un moyen de supporter une plus grande contrainte sans flamber. Vignjevic *et al.* (2006) ont montré que la formation de filopodes viables n'est possible que si les filaments peuvent former des faisceaux, seuls capables de ne pas flamber lors de la polymérisation contre la membrane de la cellule.

D'autre part, un réseau de filaments polymérisant autour d'une bille en présence d'Arp2/3 va croître à partir de la surface de la bille, et des tensions vont alors se créer au sein de la coque d'actine ainsi formée. Ces dernières sont assez importantes pour permettre la rupture de ce réseau de filaments (van der Gucht *et al.*, 2005).

### 1.3.4 Ruptures de symétries

La *rupture de symétrie* est le fait de créer des directions privilégiées à partir d'un milieu isotrope, en changeant la symétrie du système. On peut observer une rupture de symétrie dans des systèmes contenant de l'actine répartie de façon homogène dans le milieu.

Ainsi, dans le cas d'une bille recouverte d'activateurs de Arp2/3 répartis de façon homogène à la surface, le réseau de filaments qui se constitue autour de la sphère de façon a priori homogène est capable, dans certaines conditions, de se déchirer, privilégiant alors la création d'une comète d'un côté de la bille, ce qui lui permettra de promouvoir la motilité (van der Gucht *et al.*, 2005).

Un autre système constitué de formines réparties là aussi de façon homogène autour d'une bille amène à une rupture de symétrie par l'agrégation progressive de filaments en faisceaux (voir section 5.5).

La capacité de l'actine de pouvoir rompre la symétrie est tout à fait remarquable. Grâce à elle, un système homogène peut commencer à se mouvoir de façon directionnelle uniquement par l'activation de la polymérisation isotrope de l'actine. La mise en mouvement de pathogènes comme *Listeria* ou de vésicules peut donc se produire grâce à un système réactionnel très simple.

## 1.4 Régulation

Les 3 grands types d'organisation de l'actine sont l'expression de 3 voies différentes de polymérisation de l'actine. Les filopodes sont issus de la polymérisation de

filaments parallèles nucléés par des formines. Les lamellipodes sont la conséquence de la formation d'un réseau branché construit en présence d'Arp2/3. Les fibres de stress sont, quant à elles, issues de l'interaction de filaments parallèles et de myosines. Les cellules ont la capacité de déclencher alternativement, ou en même temps et à différents endroits dans le cytoplasme, ces trois types d'organisation. Un keratocyte en mouvement est ainsi capable de polymériser un cytosquelette de type filopode pour explorer l'avant de la cellule, une structure en lamellipode juste derrière pour créer une large protrusion et des fibres de stress pour ramener l'arrière de la cellule.

Le contrôle de la structure qui va être construite ne se fait pas directement sur les effecteurs, i.e. Arp2/3, les formines et les myosines. Ces derniers sont en effet les derniers maillons de voies de régulation mettant en jeu l'activation ou l'inhibition de nombreuses protéines. En haut de ces cascades, se trouve la famille des protéines Rho. Elles font partie d'une famille de GTPases qui permettent l'activation de protéines par phosphorylation de leur nucléotide GDP en GTP. Cette famille est constituée de sous-familles parmi lesquelles on trouve les protéines Rho, Rac et Cdc42, chacune à la tête d'une cascade de signalisation vers un des trois différents types d'organisation du cytosquelette (respectivement les fibres de stress, les lamellipodes et les filopodes), en contrôlant l'activité des protéines à l'origine de ces organisations (respectivement des formines plus des myosines, des formines seules, et Arp2/3).



# Chapitre 2

## Motivations et Objectifs

### 2.1 Modéliser la dynamique de l'actine

#### 2.1.1 Pourquoi modéliser le cytosquelette d'actine ?

Le cytosquelette d'actine est un objet biologique qui a des propriétés très intéressantes d'un point de vue chimique et physique. En effet, les filaments d'actine sont très dynamiques et ils sont capables, en fonction de signaux chimiques extérieurs, de s'organiser en différentes structures permettant de supporter ou de générer des forces. En polymérisant et en dépolymérisant, l'actine est donc capable de transformer l'énergie chimique en énergie mécanique. Cette transduction est en fait le résultat de l'émergence d'un comportement global à partir d'interactions élémentaires spécifiques qui se produisent localement. L'organisation du cytosquelette d'actine est donc un système complexe allant du monomère jusqu'à la cellule toute entière, où les propriétés à chaque échelle sont le résultat d'interactions d'éléments du cytosquelette aux autres échelles. Ainsi, les monomères s'assemblent en filaments, qui eux-mêmes interagissent entre eux et se structurent en faisceaux ou en réseau branché, qui vont eux-mêmes avoir une influence sur la dynamique de l'élongation des filaments à une échelle inférieure et sur la structure globale de la cellule à une échelle supérieure.

Les modélisations mathématiques et biophysiques du cytosquelette sont donc des outils très utiles pour mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. A l'instar des reconstitution biochimiques *in vitro*, telles que celles effectuées pour la motilité de *Listeria* (Loisel *et al.*, 1999) qui ont permis de mettre en évidence les protéines nécessaires et suffisantes pour générer du mouvement, la modélisation permet de proposer ou de tester des hypothèses physico-chimiques sur les interactions entre molécules ou entre une molécule et son environnement et de comparer le comportement émergent avec les expériences (comme par exemple la reconstitution *in silico* de la motilité de *Listeria* par Alberts et Odell (2004)). La modélisation est donc particulièrement utile dans les cas où la biologie expérimentale ne parvient pas à trancher parmi différents mécanismes, particulièrement pour les mécanismes microscopiques, comme la génération de forces par exemple (Peskin *et al.*, 1993; Mogilner et Oster, 2003; Gerbal *et al.*, 2000).

De plus, l'étude théorique des systèmes biologiques permet de quantifier de façon

précise des paramètres non mesurables directement, tels que les forces générées par des filaments uniques (Kovar et Pollard, 2004), des constantes physiques (longueur de persistance, ...) (Claessens *et al.*, 2006), des constantes de réaction (Vavylonis *et al.*, 2006), des concentrations (Edelstein-Keshet et Ermentrout, 2001).

La modélisation permet en outre de proposer des mécanismes de formation de structures d'ordre supérieur (Haviv *et al.*, 2006) ou de ruptures de symétrie (van der Gucht *et al.*, 2005).

### 2.1.2 Comment modéliser ?

Selon l'échelle à laquelle on se place, les composants élémentaires du cytosquelette d'actine peuvent être représentés comme continus ou bien comme discrets. Ainsi, dans des milieux peu denses sur des échelles inférieures au micromètre, il est légitime de considérer les filaments ainsi que les sous-unités qui les constituent comme des entités individuelles. En revanche, sur des échelles plus grandes que la centaine de micromètres, on peut modéliser des milieux denses comme des milieux continus. Le choix entre l'approche continue et l'approche discrète est non seulement motivée par la finesse de l'explication que l'on veut donner mais aussi par la complexité des calculs qui découlent de chaque approche. En effet, un système discret sera plus précis qu'un système continu mais il sera aussi beaucoup plus coûteux à simuler. Les modèles continus feront plutôt intervenir des équations différentielles ou aux dérivées partielles alors que les modèles discrets utiliseront plutôt les techniques de simulation de type systèmes multi-agent.

La question du déterminisme ou de la stochasticité des événements simulés doit aussi être prise en compte lors de la construction d'un modèle. Un événement est considéré comme déterministe si pour une cause donnée, il produit systématiquement la même conséquence. Il est considéré comme stochastique si une cause peut donner plusieurs conséquences différentes, chacune ayant une certaine probabilité de se produire. Le choix entre ces deux approches est donné par le nombre d'événements qui peuvent se produire par unité de temps. Si peu d'événements se produisent par unité de temps, leurs réalisations sont trop irrégulières pour prendre une approche déterministe. En revanche, si beaucoup d'événements se produisent par unité de temps, la loi des grands nombres permet d'employer une approche déterministe dont le résultat est très proche de l'approche stochastique.

L'art de la modélisation va donc résider dans le choix de la représentation des objets à simuler (discrète ou continue), ainsi que dans l'approche de réalisation des événements (déterministe ou stochastique). Ces choix vont s'effectuer en fonction de la quantité d'objets à modéliser ainsi que la quantité d'événements qui vont se produire par unité de temps. Pour l'actine, l'approche sera différente si on considère un réseau dense de filaments avec une forte activité tel que pour modéliser des billes polymérisant une coque d'actine (modèle continu, déterministe (Bernheim-Groswasser *et al.*, 2005)) ou l'étude d'un filament unique avec une faible activité, avec une concentration d'actine G-ATP proche de la concentration critique (modèle discret, stochastique (Stukalin et Kolomeisky, 2006; Vavylonis *et al.*, 2006)).

## 2.2 Objectifs de cette thèse

Cette thèse s'inscrit dans une démarche de modélisation du cytosquelette d'actine. Notre objectif est de mieux comprendre la dynamique de polymérisation de l'actine et sa régulation, la génération de forces et les ruptures de symétrie qui peuvent en découler, afin de mettre en évidence les mécanismes fondamentaux de transduction de l'énergie chimique en énergie mécanique au sein de la cellule. Tout d'abord, afin d'étudier la régulation et l'organisation de filaments à partir d'interactions locales entre molécules, nous avons dû développer les outils d'organisation de l'information et de simulation nécessaires à la modélisation de tels systèmes. L'application de ces outils a permis de proposer des mécanismes pour les expériences de A. Michelot et L. Blanchoin (CEA, Grenoble) sur l'organisation de filaments en présence d'ADF/Cofilin. D'autre part, nous avons voulu contribuer à l'analyse des mécanismes de génération de forces par les filaments d'actine. Nous avons ainsi proposé un modèle afin d'étudier qualitativement et quantitativement les expériences de Kovar et Pollard (2004).

### 2.2.1 Plan

Dans la première partie, après une présentation de l'algorithme stochastique de Gillespie (chapitre 3), nous présentons l'outil de simulation MAMol (chapitre 4), qui propose une adaptation de cet algorithme pour des systèmes de réaction diffusion multi-agents. Le simulateur MAMol a été utilisé pour simuler la croissance de filaments d'actine nucléés par des formines autour d'une bille, en présence d'ADF/Cofilin, et a permis de montrer que la seule hypothèse de fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/Cofilin permet d'expliquer les fluctuations et les ruptures de symétrie observées expérimentalement (chapitre 5). Le chapitre 6 présente une étude numérique et analytique systématique des paramètres intervenant dans un tel système réactionnel.

La deuxième partie traite du flambage de filaments uniques d'actine, tels qu'observés dans les expériences de Kovar et Pollard (2004). Le modèle est présenté dans le chapitre 7 et le chapitre 8 présente des résultats sur l'estimation des forces générées, en fonction des conditions d'attachement des extrémités du filament, qui sont discutés quant à leur pertinence *in vivo* dans le chapitre 9.

Enfin, la troisième partie traite de l'organisation de données de cinétique biochimique (chapitre 10), le chapitre 11 proposant un cadre de base de données pour gérer ces informations et en extraire un modèle de façon efficace. Une application à la régulation de la polymérisation de l'actine est proposée au chapitre 12.



# Bibliographie

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. et WALTER, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- ALBERTS, J. B. et ODELL, G. M. (2004). In silico reconstitution of listeria propulsion exhibits nano-saltation. *PLoS Biol*, 2(12):e412.
- BERNHEIM-GROSWASSER, A., PROST, J. et SYKES, C. (2005). Mechanism of actin-based motility : a dynamic state diagram. *Biophys J*, 89(2):1411–1419.
- BLANCHOIN, L. et POLLARD, T. D. (2002). Hydrolysis of atp by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, 41(2):597–602.
- CARLIER, M. F., PANTALONI, D. et KORN, E. D. (1987). The mechanisms of atp hydrolysis accompanying the polymerization of mg-actin and ca-actin. *J Biol Chem*, 262(7):3052–3059.
- CLAESSENS, M. M. A. E., BATHE, M., FREY, E. et BAUSCH, A. R. (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate f-actin bundle stiffness. *Nat Mater*, 5(9):748–753.
- DICKINSON, R. B., CARO, L. et PURICH, D. L. (2004). Force generation by cytoskeletal filament end-tracking proteins. *Biophys J*, 87(4):2838–2854.
- EDELSTEIN-KESHET, L. et ERMENTROUT, G. B. (2001). A model for actin-filament length distribution in a lamellipod. *J Math Biol*, 43(4):325–355.
- GERBAL, F., CHAIKIN, P., RABIN, Y. et PROST, J. (2000). An elastic analysis of listeria monocytogenes propulsion. *Biophys J*, 79(5):2259–2275.
- GOUIN, E., WELCH, M. D. et COSSART, P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 8(1):35–45.
- HAVIV, L., BRILL-KARNIELY, Y., MAHAFFY, R., BACKOUCHE, F., BEN-SHAUL, A., POLLARD, T. D. et BERNHEIM-GROSWASSER, A. (2006). Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(13):4906–4911.
- HOWARD, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates.

- KOVAR, D. R. et POLLARD, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41):14725–14730.
- LOISEL, T. P., BOUJEMAA, R., PANTALONI, D. et CARLIER, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of listeria and shigella using pure proteins. *Nature*, 401(6753):613–616.
- MOGILNER, A. (2006). On the edge : modeling protrusion. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1):32–39.
- MOGILNER, A. et OSTER, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J*, 71(6):3030–3045.
- MOGILNER, A. et OSTER, G. (2003). Force generation by actin polymerization ii : the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J*, 84(3):1591–1605.
- PESKIN, C. S., ODELL, G. M. et OSTER, G. F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations : the brownian ratchet. *Biophys J*, 65(1):316–324.
- POLLARD, T. D., BLANCHOIN, L. et MULLINS, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:545–576.
- POLLARD, T. D. et EARNSHAW, W. C. (2004). *Cell Biology*. Saunders.
- SHIH, Y.-L. et ROTHFIELD, L. (2006). The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(3):729–754.
- STUKALIN, E. B. et KOLOMEISKY, A. B. (2006). Atp hydrolysis stimulates large length fluctuations in single actin filaments. *Biophys J*, 90(8):2673–2685.
- SVITKINA, T. M., BULANOVA, E. A., CHAGA, O. Y., VIGNJEVIC, D. M., KOJIMA, S.-I., VASILIEV, J. M. et BORISY, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 160(3):409–421.
- SVITKINA, T. M., VERKHOVSKY, A. B. et BORISY, G. G. (1995). Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells. *J Struct Biol*, 115(3):290–303.
- TADA, T. et SHENG, M. (2006). Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Curr Opin Neurobiol*, 16(1):95–101.
- THÉRY, M., PÉPIN, A., DRESSAIRE, E., CHEN, Y. et BORNENS, M. (2006). Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton*, 63(6):341–355.
- van der GUCHT, J., PALUCH, E., PLASTINO, J. et SYKES, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22):7847–7852.

- VAVYLONIS, D., KOVAR, D. R., O'SHAUGHNESSY, B. et POLLARD, T. D. (2006). Model of formin-associated actin filament elongation. *Mol Cell*, 21(4):455–466.
- VIGNJEVIC, D., KOJIMA, S.-I., ARATYN, Y., DANCIU, O., SVITKINA, T. et BORISY, G. G. (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol*, 174(6):863–875.



## Deuxième partie

# Modèles stochastiques de la polymérisation de filaments biologiques



# Chapitre 3

## Algorithmes stochastiques de simulation pour les systèmes de réactions biologiques

### 3.1 Introduction

De nombreux processus biologiques se produisent en ne faisant intervenir qu'un faible nombre de molécules. On peut citer par exemple la transcription de l'ADN qui ne produit que quelques copies d'ARN correspondant. Ainsi, on ne peut considérer l'évolution de tels systèmes comme déterministe et continue. Des algorithmes stochastiques de simulation ont donc été développés depuis 1976, où Gillespie (1976) a proposé un algorithme stochastique exact de simulation, se basant sur les équations maîtresses d'évolution d'un système biochimique. Cet algorithme s'applique pour des systèmes homogènes et bien mélangés et ne prend pas en compte l'espace. Depuis, plusieurs variantes ont été proposées pour améliorer ses performances en temps de calcul dans des cas particuliers. L'algorithme que nous proposons pour le simulateur MAMol (chapitre 4) est une adaptation de l'algorithme de Gillespie à des systèmes de réaction-diffusion. Nous présentons dans ce chapitre les fondements de l'algorithmes de Gillespie, ainsi que quelques unes de ses améliorations.

### 3.2 Algorithme de Gillespie

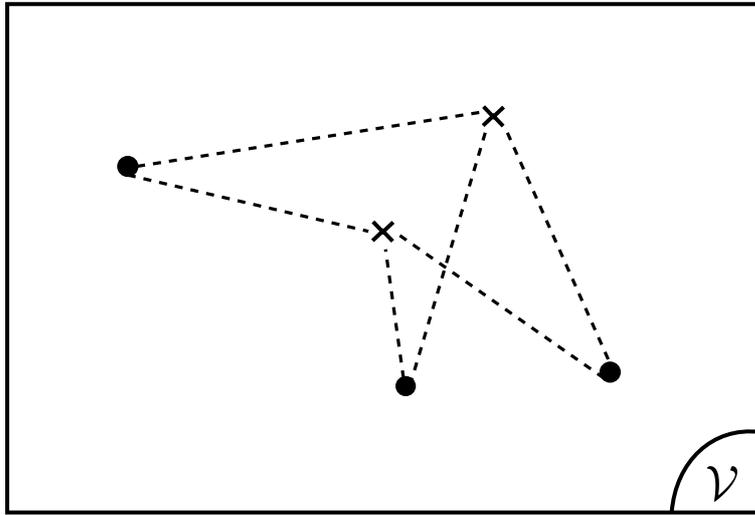
#### 3.2.1 Idée générale

L'algorithme de Gillespie (Gillespie, 1976, 1977) est un algorithme stochastique permettant de simuler un système de réactions chimiques en prenant en compte les quantités de molécules et non les concentrations. Il se base sur le fait que, pour chaque réaction, le temps d'attente avant qu'elle ne se réalise suit une loi exponentielle. Par conséquent, si on considère toutes les réactions possibles, le temps d'attente avant que la prochaine réaction se produise suit aussi une loi exponentielle et chaque réaction a alors une probabilité proportionnelle à son taux de réaction de se réaliser.

### 3.2.2 Définitions et notations

**Définition 3.1** Dans la suite de ce chapitre, on appellera **molécule** toute protéine, ion, composé chimique, etc. en tant qu'entité individuelle, pouvant interagir physiquement les unes avec les autres. Les **molécules** de mêmes types sont les représentantes d'une même **espèce**.

**Définition 3.2** Plusieurs **espèces** peuvent intervenir dans une **réaction**. Pour chaque **réaction**, plusieurs **instances de réactions** ou **occurrences de réactions** peuvent se produire. Elles font intervenir les **molécules** des **espèces** intervenant dans la **réaction**.



**FIG. 3.1** – Illustrations des définitions et notations – La **réaction**  $A+B \rightarrow C$  a comme **réactifs** les **espèces**  $A$  et  $B$ . Le volume réactionnel  $\mathcal{V}$  contient 2 **molécules** de l'espèce  $A$  (croix,  $\times$ ) et 3 **molécules** de l'espèce  $B$  (points,  $\bullet$ ). Il y a par conséquent 6 **occurrences** de la **réaction**  $A+B \rightarrow C$  possibles, représentées en pointillés.

On considère un ensemble de molécules dans un volume  $\mathcal{V}$  homogène et bien mélangé, c'est à dire que chaque molécule peut éventuellement réagir avec n'importe quelle autre. Nous noterons  $N_s$  le nombre d'espèces chimiques différentes que nous noterons  $S_1, \dots, S_{N_s}$ .

D'autre part, on considère  $N_r$  réactions différentes notées  $R_1, \dots, R_{N_r}$ , qui ont comme réactifs certaines des espèces  $S_j$  avec une stœchiométrie  $\alpha_{R_i}^{S_j}$  et comme produits certaines des espèces  $S_k$  avec une stœchiométrie  $\beta_{R_i}^{S_k}$ .

On notera  $c_{R_i}$  le taux de la réaction  $R_i$  c'est à dire que, pendant l'intervalle de temps infinitésimal  $dt$ , une instance de la réaction  $R_i$  a une probabilité  $c_{R_i}dt$  de se réaliser. Par conséquent, si on note  $h_{R_i}$  le nombre d'occurrences de la réaction  $R_i$ , la probabilité de réaliser une des  $h_{R_i}$  instances de la réaction  $R_i$  pendant  $dt$  est

$$a_{R_i}dt = h_{R_i}c_{R_i}dt$$

De plus, on notera

$$\mathcal{P}(X_1, X_2, \dots, X_{N_s}, t)$$

la probabilité qu'il y ait  $X_1$  molécules de l'espèce  $S_1$ ,  $X_2$  molécules de l'espèce  $S_2$ , ... ,  $X_{N_s}$  molécules de l'espèce  $S_{N_s}$  au temps  $t$ .

### 3.2.3 Loi de la prochaine réaction

Dans cette section, nous allons nous intéresser aux transitions d'un système de réaction et donner la loi de probabilité de réalisation de la prochaine réaction qui doit se produire dans le système.

#### Calcul de la loi

La probabilité qu'aucune réaction ne se produise entre les temps  $t$  et  $t + \tau + d\tau$  s'exprime comme le produit de la probabilité qu'aucune réaction ne se produise entre  $t$  et  $t + \tau$  et la probabilité qu'aucune réaction ne se produise dans l'intervalle  $d\tau$  qui suit. En notant  $\mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau)$  la probabilité qu'aucune réaction ne se produise entre les temps  $t$  et  $t + \tau$ , on a, en ne gardant que les termes du premier ordre en  $d\tau$  :

$$\mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau + d\tau) = \mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau) \times \left(1 - \sum_{k=1}^{N_r} a_{R_k} d\tau\right)$$

D'où, pour  $d\tau \rightarrow 0$  :

$$\frac{d\mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau)}{d\tau} = -\left(\sum_{k=1}^{N_r} a_{R_k}\right) \times \mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau)$$

Par conséquent, on a :

$$\mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau) = \exp\left(-\sum_{k=1}^{N_r} a_{R_k} \tau\right)$$

La probabilité qu'une réaction se produise entre les temps  $t$  et  $t + \tau$  est donc :

$$1 - \mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau) = 1 - \exp\left(-\sum_{k=1}^{N_r} a_{R_k} \tau\right)$$

Par conséquent, le temps d'attente avant que la prochaine réaction se produise dans le système suit une loi exponentielle de paramètre la somme des taux de toutes les réactions.

D'autre part, si on calcule la probabilité  $\mathcal{P}(R_i, t, t + \tau)$  que, partant du temps  $t$ , la première réaction qui se produise soit la réaction  $R_i$  et qu'elle se déroule entre les temps  $t + \tau$  et  $t + \tau + d\tau$ , on a, au premier ordre en  $d\tau$  :

$$\mathcal{P}(R_i, t, t + \tau) d\tau = \mathcal{P}(\emptyset, t, t + \tau) \times a_{R_i} d\tau$$

d'où

$$\mathcal{P}(R_i, t, t + \tau) = a_{R_i} \exp\left(-\sum_{k=1}^{N_r} a_{R_k} \tau\right) = a_{R_i} \exp(-a_\Sigma \tau)$$

$$\text{avec } a_\Sigma = \sum_{k=1}^{N_r} a_{R_k}.$$

### Autre démonstration

On peut obtenir ces lois d'une autre manière un peu plus intuitive.

Notons  $T_{R_i}^{k_i}$  le temps d'attente avant que l'occurrence numéro  $k_i$  de la réaction de type  $R_i$  se produise.  $T_{R_i}^{k_i}$  suit une loi exponentielle de paramètre  $c_{R_i}^{k_i} = c_{R_i}$ .

Le temps d'attente  $T^{next}$  avant qu'une occurrence de n'importe laquelle des réactions se produise est donc le minimum des temps d'attente  $(T_{R_i}^{k_i})_{i,k_i}$  de toutes les réactions possibles :

$$T^{next} = \min_{i,k_i} T_{R_i}^{k_i}$$

Or, un théorème classique de probabilité dit que la loi du minimum de lois exponentielles est une loi exponentielle dont le paramètre est la somme des paramètres de ces lois (François, 2000). Donc

$$\begin{aligned} T^{next} &\sim \epsilon \left( \sum_i \sum_{k_i} c_{R_i}^{k_i} \right) \\ T^{next} &\sim \epsilon(a_\Sigma) \end{aligned}$$

$$\text{avec } a_\Sigma = \sum_i \sum_{k_i} k_i c_{R_i}^{k_i} = \sum_i a_{R_i}.$$

Ainsi, le temps d'attente avant la prochaine réaction suit une loi exponentielle de paramètre  $a_\Sigma$

D'autre part, on peut calculer la probabilité que la réaction  $R_j^{k_j}$ , une instance de la réaction  $R_j$ , soit la première effectuée : il suffit d'intégrer sur le temps, la probabilité que cette réaction se fasse entre  $t$  et  $t + dt$  alors que les autres ne se sont pas produites avant le temps  $t$  :

$$\begin{aligned}
\mathcal{P}(T^{next} = T_{R_j}^{k_j}) &= \int_0^\infty \left( \prod_{i \neq j} \prod_{k_i} e^{-c_{R_i}^{k_i} t} \right) \times c_{R_j}^{k_j} e^{-c_{R_j}^{k_j} t} dt \\
&= \int_0^\infty e^{-\left(\sum_{i \neq j} \sum_{k_i} c_{R_i}^{k_i}\right)t} \times c_{R_j}^{k_j} e^{-c_{R_j}^{k_j} t} dt \\
&= \int_0^\infty \frac{e^{-\left(\sum_i \sum_{k_i} c_{R_i}^{k_i}\right)t}}{e^{-c_{R_j}^{k_j} t}} \times c_{R_j}^{k_j} e^{-c_{R_j}^{k_j} t} dt \\
&= c_{R_j}^{k_j} \int_0^\infty e^{-a_\Sigma t} dt \\
&= \frac{c_{R_j}^{k_j}}{a_\Sigma} \\
&= \frac{c_{R_j}}{a_\Sigma}
\end{aligned}$$

Cette formule signifie que la probabilité d'effectuer en premier une réaction particulière de type  $R_j$  est proportionnelle au taux de cette réaction. Par conséquent, la probabilité d'effectuer une réaction  $R_j$  est donc proportionnelle au produit du nombre d'instances de cette réaction et de son taux.

$$\mathcal{P}(1^{\text{ère}} \text{ réaction} = R_j) = \frac{a_{R_j}}{\sum_{j=1}^{Nr} a_{R_j}} \quad (3.1)$$

### 3.2.4 Liens avec les constantes cinétiques classiques

#### Cas particulier d'une réaction bimoléculaire

Considérons la réaction bimoléculaire  $R_\mu$  qui a comme réactifs les deux espèces différentes  $S_1$  et  $S_2$  en quantité  $X_1$  et  $X_2$ , respectivement, dans un volume  $\mathcal{V}$  homogène et bien mélangé. La probabilité qu'une occurrence de la réaction  $R_\mu$  se produise pendant l'intervalle de temps  $dt$  peut s'écrire :

$$\mathcal{P}(R_\mu, dt) = c_\mu X_1 X_2 dt$$

où le produit  $X_1 X_2$  correspond au nombre d'instances de la réaction  $R_\mu$  qu'il est potentiellement possible d'effectuer pendant l'intervalle de temps  $dt$ .

Si on prend la moyenne de cette probabilité, notée  $\langle .. \rangle$ , on obtient un taux moyen de réalisation de la réaction  $R_\mu$

$$c_\mu \langle X_1 X_2 \rangle$$

soit par unité de volume

$$\frac{c_\mu \langle X_1 X_2 \rangle}{V}$$

D'autre part, la constante de réaction classique  $k_\mu$ , exprimée en nombre de molécules, pour la réaction  $R_\mu$  est définie comme ce taux de réaction moyen par unité de volume divisé par le produit des concentrations moyennes de chacun des réactifs  $\frac{\langle X_1 \rangle}{\mathcal{N}_A V} \times \frac{\langle X_2 \rangle}{\mathcal{N}_A V}$ , d'où :

$$k_\mu = c_\mu \frac{\langle X_1 X_2 \rangle}{\langle X_1 \rangle \langle X_2 \rangle} \mathcal{N}_A V$$

Cependant, dans la formulation déterministe des cinétiques chimiques, aucune distinction n'est faite entre la moyenne d'un produit et le produit des moyennes (ce qui annule en fait l'effet des corrélations). Ce qui donne donc la relation pour une réaction bimoléculaire :

$$c_\mu = \frac{k_\mu}{\mathcal{N}_A V}$$

### Généralisation

Il est aisé de voir que pour une réaction faisant intervenir  $\beta_\mu$  réactifs différents (en comptant la stœchiométrie de chaque réactif), on aura la relation :

$$c_\mu = \frac{k_\mu}{(\mathcal{N}_A V)^{\beta_\mu - 1}}$$

Par ailleurs, on peut remarquer qu'il faut aussi prendre en compte, lorsqu'on calcule les taux stochastiques globaux, le fait que ces taux font intervenir le nombre de réactions qu'il est possible d'effectuer, donc, faire attention aux réactifs avec une stœchiométrie strictement plus grande que 1. En effet si on a une réaction de type  $2R_1 \longrightarrow R_2$  et qu'il y a  $X_1$  molécules de l'espèce  $S_1$ , il y aura  $X_1(X_1 - 1)/2$  instances de réactions différentes qui pourront être effectuées. Le taux de réaction stochastique global  $X_1(X_1 - 1)/2c_\mu$  sera donc près de 2 fois plus petit que le taux classique  $X_1^2 k_\mu (\mathcal{N}_A V)^{n-1}$ . Plus généralement, si on a une réaction  $R_\mu$  faisant intervenir  $N_{S_{R_\mu}}$  réactifs  $S_i$  présents en quantité  $X_i$  ayant chacun une stœchiométrie  $\alpha_{R_\mu}^{S_i}$ , le nombre de réaction qu'il est possible de réaliser est :

$$\prod_{i=1}^{N_{S_{R_\mu}}} \mathcal{C}_{X_i}^{\alpha_{R_\mu}^{S_i}}$$

où  $\mathcal{C}_n^k$  est le nombre de combinaison à  $k$  éléments parmi  $n$  éléments :  $\mathcal{C}_n^k = \frac{n!}{(n-k)! k!}$ .

Le taux stochastique global de la réaction  $R_\mu$  sera donc :

$$c_\mu^{global} = \left( \prod_{i=1}^{N_{S_{R_\mu}}} \mathcal{C}_{X_i}^{\alpha_{R_\mu}^{S_i}} \right) \frac{k_\mu}{(\mathcal{N}_A V)^{\beta_\mu}}$$

où  $\beta_\mu = \sum_{i=1}^{N_{S_{R_\mu}}} \alpha_{R_\mu}^{S_i}$  est le nombre de réactifs de la réaction  $R_\mu$ , alors que le taux déterministe global serait :

$$k_\mu^{global} = \prod_{i=1}^{N_{S_{R_\mu}}} X_i^{\alpha_{R_\mu}^{S_i}} k_\mu$$

### 3.2.5 Algorithme de Gillespie

Les algorithmes de Gillespie (Gillespie, 1976, 1977) se basent sur les résultats de la section 3.2.3. Deux méthodes légèrement différentes ont été proposées :

#### La méthode 'directe'

L'idée de la méthode directe est de tirer deux variables aléatoires : le temps d'attente avant la prochaine réaction et quel type de réaction sera effectué à ce moment.

Dans les algorithmes suivants, on notera  $t_{max}$  la durée maximale de la simulation.

#### Algorithme

```

t ← 0
répéter
  Pour  $i = 1 \dots N_r$ , calculer les taux de réaction  $a_i = h_i c_i$ 
  Tirer  $\tau$  selon une loi exponentielle de paramètre  $\sum_{i=1 \dots N_r} a_i$ 
  Tirer  $\mu$  selon la loi discrète de l'équation 3.1
  Effectuer une réaction du type  $R_\mu$ 
   $t \leftarrow t + \tau$ 
jusqu'à  $t > t_{max}$ 

```

**Preuve.** C'est en fait pour les mêmes raisons que la deuxième démonstration du paragraphe 3.2.3. ■

#### La méthode de 'la première réaction'

L'idée de la méthode de la première réaction est de tirer  $N_r$  variables aléatoires  $\tau_i$  représentant les temps d'attente avant que chaque type de réaction se produise.

#### Algorithme

```

t ← 0
répéter
  Pour  $i = 1 \dots N_r$ , mettre à jour les taux de réaction  $a_i = h_i c_i$ 
  pour  $i = 1$  à  $N_r$  faire
    si  $a_i$  a changé alors
      Tirer  $\tau_i$  selon une loi exponentielle de paramètre  $a_i$ 
    fin
  fin
  Calculer  $\tau = \min(\tau_i, i = 1 \dots N_r)$ 
  Prendre  $\mu$  tel que  $\tau = \tau_\mu$ 
  Effectuer une réaction du type  $R_\mu$ 
   $t \leftarrow t + \tau$ 
jusqu'à  $t > t_{max}$ 

```

**Preuve.** Chacune des variables  $\tau_i$  est tirée selon une loi exponentielle de paramètre  $a_i = h_i c_i$  et est donc le minimum des  $h_i$  lois exponentielles de paramètre  $c_i$  représentant le temps d'attente avant la première occurrence de la réaction de type  $i$ . Comme nous l'avons déjà dit dans le paragraphe 3.2.3, le minimum de lois exponentielles est une loi exponentielle de paramètre la somme des paramètres de chacune des lois élémentaires. Par conséquent, la loi de  $\tau$  étant un minimum de loi exponentielles, elle est bien la même loi exponentielle que celle simulée par la méthode directe. ■

## 3.3 Performances

### 3.3.1 Exactitude

Les deux algorithmes de Gillespie (la méthode 'directe' et la méthode de 'la première réaction') sont tous les deux des algorithmes exacts. Il n'y a donc aucune approximation et chaque occurrence de chaque type de réaction est prise en compte individuellement.

La contrepartie est que les temps de calculs peuvent être assez longs, particulièrement lorsque les constantes des réactions sont très différentes (sur plusieurs ordres de grandeur). Ainsi, plusieurs variantes de l'algorithme de Gillespie ont été proposées pour simuler de tels systèmes de réaction, en échange de quelques approximations (voir la section 3.4).

## 3.4 Variantes de l'algorithme de Gillespie

Il existe plusieurs variantes de l'algorithme de Gillespie qui permettent d'améliorer les performances dans des cas particuliers. Tout d'abord, il a été proposé par l'équipe de D.T. Gillespie (Gillespie, 2001; Rathinam *et al.*, 2003) une méthode, appelé la méthode de ' $\tau$ -leaping' permettant d'améliorer les temps de calcul dans le cas particulier où il existe différentes échelles de temps pour les taux de réactions, c'est à dire lorsque un type réaction se produit beaucoup plus souvent que les autres. L'idée est de ne plus considérer pour la réaction rapide le temps d'attente avant la prochaine réaction mais d'estimer le nombre de réactions qui peuvent se produire pendant un pas de temps  $\tau$ .

D'autre part, Gibson et Bruck (2000) ont proposé une amélioration de la méthode dite 'de la prochaine réaction' de l'algorithme de Gillespie afin d'améliorer les performances. Les auteurs proposent d'utiliser un graphe de dépendances des réactions afin de ne mettre à jour que les variables aléatoires correspondant aux réactions qui sont affectées par la dernière réaction qui vient de se réaliser. Ainsi, on recycle la plupart des variables aléatoires qui ont déjà été calculées et chaque pas de temps nécessite seulement le tirage d'une seule variable aléatoire.

On peut aussi noter que Hattne *et al.* (2005) ont proposé récemment un algorithme ressemblant fortement à l'algorithme de Gillespie où l'espace est discrétisé en sous-volumes et la diffusion des molécules est prise en compte comme le déplacement stochastique d'un sous-volume à un autre. Ainsi, les déplacements par diffusion

peuvent être simulés d'une manière similaire aux réactions dans l'algorithme de Gillespie. A l'instar de la méthode directe de l'algorithme de Gillespie, on tire le temps du prochain événement, cet événement pouvant être une diffusion ou une réaction.



# Chapitre 4

## Le simulateur MAMol

### 4.1 Description de l'approche

Au cours de cette thèse, nous avons voulu étudier le développement de filaments d'actine ainsi que leur organisation en fonction de la composition de l'environnement moléculaire dans lequel ils se développent. Si on se place à une échelle plus petite que l'échelle de la cellule, on peut difficilement considérer l'ensemble de filaments d'actine comme un milieu homogène ou continu. De plus, même à une telle échelle, un filament d'actine ne peut pas toujours être considéré comme homogène dans sa composition et pour certains événements il est parfois nécessaire de la connaître exactement.

#### 4.1.1 Une approche multi-agent

Nous avons donc développé un outil de simulation, MAMol (**M**ulti-**A**gent **M**olecules), qui se base sur les molécules élémentaires individuelles. C'est donc un modèle multi-agent où les agents sont les composants élémentaires participant aux réactions de polymérisation. Dans la classification de Ferber (1995), les agents sont purement réactifs, c'est à dire qu'ils peuvent uniquement réagir les uns avec les autres lorsque éventuellement ils se rencontrent.

Dans l'outil de simulation MAMol, les molécules, peuvent :

- se déplacer par diffusion dans un milieu contenant des obstacles ;
- réagir avec d'autres molécules en suivant une loi d'action de masse

#### 4.1.2 Une approche stochastique

Si on se place à l'échelle de la molécule ou d'un filament, on ne peut plus considérer que les déplacements et les réactions sont déterministes et ce pour deux raisons :

- les échelles d'espace nanométriques sont trop petites pour que les déplacements des molécules et des filaments soient vus de façon déterministe, comme c'est le cas sur des échelles micrométriques ;
- le faible nombre de réactifs en présence empêche de prendre une approche déterministe pour l'issue de la réaction, qui n'est valable que lorsque le nombre d'événements est élevé.

### 4.1.3 Un simulateur en 2 dimensions

De nombreux phénomènes auxquels participent l'actine se déroulent sur de faibles épaisseurs. Le lamellipode, par exemple, a une épaisseur de 150 à 200 nanomètres; les filopodes sont constitués de quelques dizaines de filaments et ont donc une épaisseur de quelques dizaines de nanomètres. D'autre part, les expériences *in vitro* où on peut observer des filaments uniques sont principalement effectuées en 2 dimensions (attachement de filament sur une surface telle que la lame) ou sur une faible épaisseur (la profondeur du champ d'observation en microscopie par ondes évanescentes est de quelques *nm*).

Le passage de 3 dimensions à 2 dimensions est en général assez aisé : il suffit de projeter la faible épaisseur du champ d'observation sur la surface 2D. Outre le fait qu'on ne perde que peu d'information lorsqu'on effectue des simulations dans un environnement 2D, cela permet en outre de diminuer de façon considérable les temps de calculs.

### 4.1.4 Types de réactions simulées

L'outil de simulation MAMol permet de simuler des réactions de plusieurs types :

- Réactions suivant une loi d'action de masse pour les réactions "classiques" où les molécules changent d'état, sont créées ou détruites (comme par exemple :  $F-ADP \longrightarrow F-ADP-Pi$  ou  $F-ATP \longrightarrow F-ADP-Pi$ );
- Réactions d'attachement pour les réactions de polymérisation, de re-annealing (fusion de filaments bout à bout);
- Réactions de détachement pour les réactions de dépolymérisation, de fragmentation;
- Réactions coopératives pour les réactions qui mettent en jeu une coopérativité le long d'un filament (ex : l'attachement coopératif de l'ADF/Cofilin sur une sous-unité ADP d'un filament);
- Formation de faisceaux (bundles) pour permettre de regrouper plusieurs filaments en un seul faisceau.

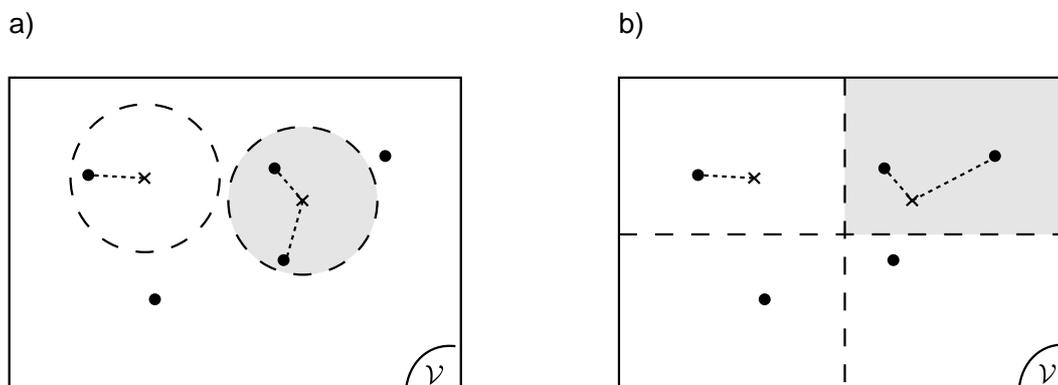
## 4.2 Recensement des réactions

### 4.2.1 Notion de voisinage : voisinages sphériques

Les simulations moléculaires classiques (Andrews et Bray, 2004) ont l'inconvénient d'être assez coûteuses en temps de calcul, particulièrement lorsqu'il s'agit de rechercher les couples de molécules qui peuvent réagir entre elles. Cette recherche se base sur le recensement du voisinage de chaque molécule dans l'espace réactionnel dont la complexité est proportionnelle au carré du nombre de molécules ( $\mathcal{O}(N^2)$ ). En effet, il faut calculer et tester les distances entre quasiment tous les couples de réactifs.

En règle générale, il est légitime de prendre comme voisinage d'une molécule la sphère dont elle est le centre et dont le volume (l'aire si on est en 2 dimensions) correspond à l'espace visité par diffusion pendant le pas de temps  $dt$ . Ce rayon sera

appelé le *rayon de réaction* de la molécule. Ce voisinage sera appelé *voisinage sphérique*.



**FIG. 4.1 – Illustrations des voisinages sphériques et rectangulaires** – On considère la réaction  $A+B \rightarrow C$ . Les croix ( $\times$ ) représentent les molécules de l'espèce  $A$  et les points ( $\bullet$ ) les molécules de l'espèce  $B$ . Les voisinages des molécules  $A$  sont délimités par des tirets. Les pointillés représentent les réactions qu'il est possible d'effectuer, en tenant compte du fait que les molécules  $B$  sont dans le voisinage des molécules  $A$ . En gris sont représentés les voisinages sphériques (a) et rectangulaires homogènes (b) de la molécule  $A$  de droite. Notons que, dans cet exemple, le nombre de réactions possibles est le même dans les deux approches. Cependant, elles ne vont pas affecter exactement les mêmes molécules.

### 4.2.2 Approximation du voisinage : voisinage rectangulaire global

Afin d'accélérer les calculs, nous avons découpé l'espace en cellules élémentaires dans lesquelles on va considérer que toutes les molécules sont "proches" les unes des autres. Ceci revient à approximer l'espace en sous-espaces élémentaires homogènes, que nous appellerons par la suite *cellules élémentaires*. Le recensement des réactions s'effectue alors en un temps proportionnel au nombre de molécules ( $\mathcal{O}(N)$ ), puisqu'il suffit de recenser les molécules de chaque cellule élémentaire.

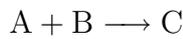
Une façon simple et rapide pour découper l'espace en de telles zones homogènes est de prendre un quadrillage de pas fixe. En faisant cela, nous commettons forcément une erreur puisque nous approximations les voisinages de chaque molécule par des rectangles. On peut limiter les erreurs dans l'approximation en dimensionnant ce quadrillage afin que dans chaque cellule élémentaire, le nombre de réactions réalisables soit en moyenne le même que si on avait calculé les voisinages sphériques de chaque molécule. Ce voisinage sera appelé *voisinage rectangulaire global*.

### 4.2.3 Conditions pour avoir l'équivalence en moyenne des 2 approches, en 2 dimensions

On considère un domaine rectangulaire d'aire  $\mathcal{V}$  divisé en  $N$  cellules élémentaires rectangulaires d'aire  $\mathcal{A}$ , dans lequel il y a  $n_A$  molécules de type  $A$  et  $n_B$  molécules de type  $B$ . On considère que les molécules ont un rayon de réaction noté  $R$ . On considère de plus, pour éviter les problèmes aux bords, que le domaine a des conditions aux bords toriques (c'est à dire que si en se déplaçant on dépasse un des bords du volume réactionnel, alors on continue en repartant du côté opposé). Cela revient aussi à considérer que chaque rectangle a des rectangles voisins identiques tout autour de lui et que tous les voisinages sphériques sont effectivement des sphères.

#### Réactions bimoléculaires $A + B \longrightarrow C$

**Théorème 4.1** *On considère que deux espèces  $A$  et  $B$  pouvant réagir dans un espace 2D suivant la réaction :*



*Le nombre de réactions qu'il est possible d'effectuer sera le même, en moyenne, lorsqu'on utilise :*

1. les voisinages rectangulaires globaux d'aire  $\mathcal{A}$
2. les voisinages sphériques de rayon de réaction  $R = \sqrt{\frac{\mathcal{A}}{\pi}}$

#### Preuve.

- Si on considère le voisinage rectangulaire global, il y a en moyenne  $n_B \mathcal{A} / \mathcal{V}$  molécules  $B$  et  $n_A \mathcal{A} / \mathcal{V}$  molécules  $A$ , donc le nombre d'occurrences de réactions possibles est :

$$N \times n_B \times n_A \times \left(\frac{\mathcal{A}}{\mathcal{V}}\right)^2$$

où  $N = \mathcal{V} / \mathcal{A}$  est le nombre de cellules élémentaires. Le nombre total de réactions est donc en moyenne :

$$N_{\text{rectangulaire}} = n_A \times n_B \times \frac{\mathcal{A}}{\mathcal{V}}$$

- D'autre part, si on considère que les molécules ont toutes un voisinage sphérique de rayon de réaction  $R$ , alors, si on considère une molécule de type  $A$ , elle a un voisinage d'aire  $\pi R^2$ . Or, si les molécules sont réparties de façon homogène dans ce rectangle, on a en moyenne  $\frac{n_B \pi R^2}{\mathcal{V}}$  molécules de type  $B$  dans le voisinage de la molécule considérée donc autant d'occurrences de réactions dans lesquelles elle peut participer.

Toujours pour la raison d'homogénéité de la répartition des molécules des différents types, il n'y a pas de corrélation entre les positions des différentes molécules donc, quelque soit la molécule de type  $A$  qu'on considère, elle aura en moyenne  $\frac{\pi R^2}{\mathcal{V}} n_B$  molécules  $B$  dans son voisinage sphérique.

Si on recense toutes les réactions qu'il est possible d'effectuer dans l'ensemble de l'espace réactionnel rectangulaire, en considérant les voisinages sphériques, elles sont en nombre :

$$N_{spherique} = \frac{\pi R^2}{\mathcal{V}} n_B \times n_A$$

- Maintenant, si on veut l'équivalence en moyenne des 2 approches, il faut que  $N_{rectangulaire} = N_{spherique}$ , soit

$$\frac{\pi R^2}{\mathcal{V}} n_B \times n_A = n_A \times n_B \times \frac{\mathcal{A}}{\mathcal{V}}$$

D'où :

$$R = \sqrt{\frac{\mathcal{A}}{\pi}}$$

■

### Réactions bimoléculaires $2A \rightarrow C$

**Théorème 4.2** *On considère une seule espèce A pouvant réagir suivant la réaction :*



*Le nombre de réactions qu'il est possible d'effectuer sera le même, en moyenne, lorsqu'on utilise :*

1. les voisinages rectangulaires globaux d'aire  $\mathcal{A}$
2. les voisinages sphériques de rayon de réaction  $R = \sqrt{\frac{\mathcal{A}}{\pi}}$

**Preuve.** Il suffit de reprendre la preuve du théorème 4.1.

- Dans un voisinage rectangulaire global, de la même manière, on a  $n_A(n_A - 1)/2 (\mathcal{A}/\mathcal{V})^2$  réactions possibles. D'où

$$N_{rectangulaire} = \frac{n_A(n_A - 1)}{2} \frac{\mathcal{A}}{\mathcal{V}}$$

- Dans un voisinage sphérique, il y a  $\frac{\pi R^2}{\mathcal{V}}(n_A - 1)$  molécules  $A$ , autres que le centre de la sphère, en moyenne, donc autant d'occurrences de réactions possibles. Sur tout l'espace, on a donc en moyenne :

$$N_{spherique} = \frac{n_A(n_A - 1)}{2} \frac{\pi R^2}{\mathcal{V}}$$

La division par 2 vient du fait qu'en ajoutant les réactions de tous les voisinages sphériques, on compte toutes les réactions 2 fois.

Pour avoir  $N_{rectangulaire} = N_{spherique}$ , on doit donc avoir

$$R = \sqrt{\frac{\mathcal{A}}{\pi}}$$

■

## Généralisation

On généralise assez facilement les résultats des deux théorèmes précédents :

**Corollaire 4.3** *Quelque soit le nombre de réactifs et le type de réactions qu'il est possible d'effectuer, si  $R = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$ , alors le nombre de réactions qu'il est possible d'effectuer sera le même, en moyenne, lorsqu'on utilise :*

1. les voisinages rectangulaires globaux d'aire  $A$
2. les voisinages sphériques de rayon de réaction  $R = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$

Si on veut un découpage en carrés de l'environnement de simulation, alors on a le corollaire suivant :

**Corollaire 4.4** *Si les cellules élémentaires sont des carrés de côté  $a$  alors on a :*

$$a = \sqrt{\pi}R$$

## Conséquences pour les simulations

Par conséquent, on peut découper l'espace de simulation en carrés élémentaires de côté  $a = \sqrt{\pi}R$  et effectuer les réactions en considérant que, à chaque pas de temps, chaque carré est homogène. D'après les corollaires 4.3 et 4.4 cet algorithme est équivalent, en moyenne, à un algorithme où on recenserait les voisinages de chaque molécule. Nous avons ainsi un algorithme de recherche de voisinage beaucoup plus rapide, dont la complexité est abaissée de  $\mathcal{O}(N_{\text{molécules}}^2)$  à  $\mathcal{O}(N_{\text{molécules}})$ .

## 4.3 Déplacements

### 4.3.1 Diffusion

Le déplacement de chaque molécule (ou ensemble de molécules tel qu'un filament) s'effectue en simulant une diffusion isotrope sur le pas de temps  $dt$ . Pour cela, on tire une variable aléatoire selon une loi normale de moyenne 0 et de variance  $2Ddt$ ,  $\mathcal{N}(0, 2Ddt)$ , où  $D$  est le coefficient de diffusion macroscopique de la molécule, puis on déplace la molécule de cette quantité, dans une direction tirée uniformément sur  $[0, 2\pi[$ . A chaque pas de temps les voisinages des molécules vont alors changer.

Le coefficient de diffusion est propre à chaque molécule du système réactionnel. Dans notre modèle, les assemblages de molécules tels que les filaments ont un coefficient de diffusion proportionnel à l'inverse de leur masse. De plus, la diffusion est isotrope, même si on sait que la diffusion dépend normalement de la forme globale des molécules ou des assemblages de molécules. Ceci n'a que peu d'influence sans les systèmes qui vont être simulés.

### 4.3.2 Collisions

Nous n'avons pas pris en compte explicitement les collisions entre molécules (en fait, elles sont prises en compte dans les coefficients de diffusion), ni les collisions entre filaments. Ceci peut être justifié par le fait que les phénomènes biologiques ne se déroulent pas tout à fait en 2 dimensions mais sur une faible épaisseur. Les filaments peuvent donc la plupart du temps se croiser en se chevauchant et ne sont pas totalement bloqués les uns par les autres. Ceci permet en outre de gagner en temps de calcul.

Cependant, nous pouvons prendre en compte les collisions des molécules et des filaments avec des obstacles se trouvant dans la solution, comme des billes ou une membrane par exemple. Ceci permet de rendre compte de géométries complexes et de mettre en évidence certains phénomènes qui peuvent se produire dans des milieux non homogènes.

## 4.4 Simulation des réactions

Pour simuler les réactions, nous avons utilisé un algorithme stochastique. Comme nous l'avons présenté plus haut (section 4.2), nous avons découpé l'espace selon les voisinages rectangulaires globaux en sous-espaces élémentaires homogènes dans lesquels toutes les molécules peuvent réagir les unes avec les autres. Cependant, la composition de ces sous-espaces va changer à chaque pas de temps, puisque les molécules peuvent diffuser.

Ainsi, nous devons adapter l'algorithme de Gillespie pour prendre en compte les déplacements éventuels. L'idée est d'utiliser cet algorithme tant qu'on peut, c'est à dire tant que l'on n'a pas dépassé le pas de temps, et de rejeter les réactions qui se produiraient trop tard, puis de déplacer les molécules et recommencer au pas de temps suivant. Nous allons montrer dans cette section qu'un tel algorithme est équivalent à l'algorithme de Gillespie.

### 4.4.1 Lois exponentielles avec rejet

Nous allons montrer, dans le cas où on est dans un milieu homogène que l'algorithme de Gillespie avec rejet est équivalent à l'algorithme de Gillespie.

#### Algorithme de simulation

Considérons que le temps soit subdivisé en pas de temps élémentaires de longueur  $\delta t_0, \delta t_1, \delta t_2, \dots, \delta t_i, \dots$ . L'axe des temps sera donc divisé en  $t_0, t_1, t_2, \dots, t_i, \dots$ , avec  $t_0 = 0$  et  $t_{i+1} = t_i + \delta t_i = \sum_{k=0}^i \delta t_k$ .

Soit  $X$  une variable aléatoire suivant la loi décrite par l'algorithme II.1 :

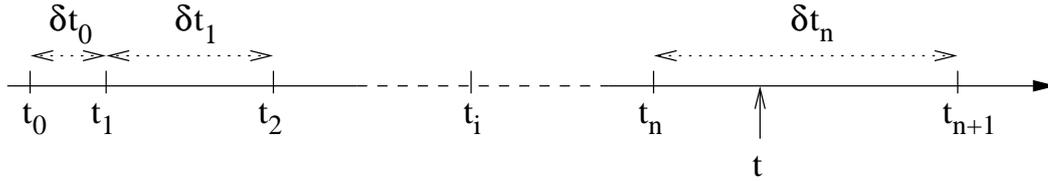


FIG. 4.2 – Subdivision du temps – Subdivision en pas de temps élémentaires de longueurs  $\delta t_0, \delta t_1, \dots, \delta t_i, \dots$

```

i ← 0
répéter
  | i ← i + 1
  | Tirer  $X_i \sim \epsilon(\lambda)$ 
jusqu'à  $X_i < \delta t_i$ 
retourner  $X \leftarrow t_{i-1} + X_i$ 
.

```

**Algorithme II.1 : Simulation d'une loi exponentielle avec rejet** -  $X_i \sim \epsilon(\lambda)$  signifie que  $X_i$  suit une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$  (i.e.,  $\mathcal{P}(X_i \leq t) = 1 - e^{-\lambda t}$ )

### Loi de la variable aléatoire $X$

Nous avons le théorème suivant :

**Théorème 4.5** Une variable  $X$  simulée par l'algorithme II.1 suit une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$ .

**Preuve.** Soit  $t \in \mathbb{R}^+$ , un temps positif. Dans notre subdivision du temps, il existe un entier  $n$  tel que  $t$  est encadré par  $t_n$  et  $t_{n+1}$ , donc tel que  $t \in [\sum_{k=0}^{n-1} \delta t_k, \sum_{k=0}^n \delta t_k]$ .

- Si  $n = 0$ , c'est à dire  $t < t_1$ , alors on ne fait qu'une seule itération de la boucle, donc  $X = X_0$  suit une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$ .
- Si  $n = 1$ , c'est à dire  $t_1 \leq t < t_2$ , alors on fait 2 itérations de la boucle et on a  $X = t_1 + X_1$ . Calculons la probabilité que  $X$  soit plus grand que  $t$  :

$$\mathcal{P}(X > t) = \mathcal{P}(X_0 > \delta t_1 \cap t_1 + X_1 > t)$$

Comme les variable  $X_0$  et  $X_1$  sont indépendantes, on a :

$$\begin{aligned} \mathcal{P}(X > t) &= \mathcal{P}(X_0 > \delta t_1) \times \mathcal{P}(X_1 > t - t_1) \\ &= \exp(-\lambda \delta t_1) \times \exp(-\lambda(t - t_1)) \\ &= \exp(-\lambda t) \end{aligned}$$

puisque  $\delta t_1 = t_1$ .

- Pour un  $n$  quelconque,  $t_n \leq t < t_{n+1}$ , alors on fait  $n + 1$  itérations de la boucle et on a  $X = t_n + X_n$ . Calculons la probabilité que  $X$  soit plus grand que  $t$  :

$$\mathcal{P}(X > t) = \mathcal{P}(X_0 > \delta t_1 \cap X_1 > \delta t_2 \cap X_2 > \delta t_3 \cap \dots \cap t_n + X_n > t)$$

Comme les variable  $\{X_i\}_{i=0\dots n}$  sont indépendantes, on a :

$$\begin{aligned}
 \mathcal{P}(X > t) &= \prod_{k=0}^{n-1} \mathcal{P}(X_k > \delta t_k) \times \mathcal{P}(X_n > t - t_n) \\
 &= \prod_{k=0}^{n-1} \exp(-\lambda \delta t_k) \times \exp(-\lambda(t - t_n)) \\
 &= \exp(-\lambda \sum_{k=0}^{n-1} \delta t_k) \times \exp(-\lambda(t - t_n)) \\
 &= \exp(-\lambda t_n) \times \exp(-\lambda(t - t_n)) \quad \text{puisque par construction } t_n = \sum_{k=0}^{n-1} \delta t_k \\
 &= \exp(-\lambda t)
 \end{aligned}$$

La variable  $X$  suit donc une loi exponentielle de paramètre  $\lambda$  ■

#### 4.4.2 Algorithme de Gillespie avec rejet

On peut donc adapter les algorithmes de Gillespie avec le résultat de la section précédente. En effet, dans la méthode directe et dans la méthode de la première réaction, il est nécessaire de tirer une loi exponentielle. On peut donc remplacer ce tirage classique de loi exponentielle par le tirage d'une loi exponentielle avec rejet comme décrit par l'algorithme II.1.

Une telle modification n'a a priori pas d'intérêt si le milieu simulé est homogène. Cependant, si à chaque pas de temps  $\delta t_i$  le milieu réactionnel change, alors on peut mettre à jour le paramètre de la loi exponentielle à simuler. Nous allons montrer plus loin (section 4.6.2), comment on peut utiliser cet algorithme dans le cas d'un système de réaction diffusion.

L'algorithme II.2 présente une adaptation de la méthode directe de Gillespie pour prendre en compte un découpage régulier de l'axe des temps, c'est à dire comme dans la section 4.4.1, mais avec pour tout  $i$ ,  $\delta t_i = \delta t$ .

## Algorithme

```

n ← 0 // Numéro du pas de temps
répéter
  tlocal ← 0
  tant que tlocal ≤ δtn faire
    Pour k = 1...Nr, calculer ak = hkck // Mise à jour des taux
    Calculer aΣ = ∑k ak
    Tirer X ~ ε(aΣ)
    tlocal ← tlocal + X
    si tlocal ≤ δtn alors
      Tirer μ selon la loi discrète de l'équation 3.1
      Effectuer une réaction du type Rμ
    fin
  fin
  n ← n + 1 // Incrémentement du pas de temps
jusqu'à fin de la simulation

```

**Algorithme II.2 : Algorithme de Gillespie avec rejet (Méthode directe)** -  $a_i$  est le taux de la réaction  $R_i$ ,  $c_i$  est le taux d'une occurrence de la réaction de type  $R_i$ ,  $h_i$  est le nombre d'occurrences de la réaction  $R_i$ ,  $N_r$  est le nombre de réactions.

De la même manière, on pourrait aisément adapter la 'méthode de la première réaction' de l'algorithme de Gillespie.

## 4.5 Autres fonctionnalités du simulateur MAMol

D'autres fonctionnalités ont été ajoutées à l'algorithme de base de MAMol. Nous avons implémenté la possibilité de fixer la valeur de certaines molécules ainsi que la formation de faisceau de filaments.

### 4.5.1 Molécules constantes ou homogènes

Tout d'abord, afin de permettre de fixer les concentrations de certaines espèces, nous avons mis en place deux procédures différentes.

La première permet d'ajouter à chaque pas de temps, aléatoirement et uniformément dans l'espace réactionnel, le nombre de molécules nécessaires pour maintenir la concentration fixée. La répartition aléatoire uniforme se justifie par le fait que nous avons des conditions toriques et par cette méthode, aucun lieu de l'espace réactionnel n'est privilégié.

Une deuxième approche permet de ne plus prendre en compte individuellement les molécules relativement abondantes dans le milieu réactionnel, réparties de façon uniforme et dont la concentration doit rester constante au cours de la simulation. Ainsi, de telles molécules n'existent plus en tant qu'entités individuelles, seul leur nombre est pris en compte. L'intérêt est principalement d'accélérer les temps de simulations puisque ces molécules ne sont plus considérées individuellement, donc leur diffusion

non plus et leur recensement s'effectue directement. Ne pas prendre en compte la diffusion de ces molécules a comme conséquence qu'aucune inhomogénéité ne peut se créer avec celles-ci. Par exemple, dans le cas où les monomères d'actine sont ainsi modélisés et si plusieurs extrémités réactives d'un filament se trouvent proches les unes des autres, elle ne seront pas limitées et croîtront aussi vite que si elles étaient éloignées.

### 4.5.2 Formation de faisceaux

L'actine, tout comme d'autres filaments biologiques tels que les microtubules, peut sous certaines conditions former des faisceaux (ou 'bundles'), c'est à dire que les filaments s'agrègent les uns aux autres et forment un ensemble se comportant comme un filament de longueur de persistance plus élevé. Ces faisceaux de filaments se créent grâce aux fluctuations thermiques qu'ils subissent et qui les amènent à se courber. Ainsi par simples interactions électrostatiques ou par l'intermédiaire de protéines de liaison, les filaments qui entrent en contact en un point propagent ce contact avec un mécanisme de type fermeture éclair.

Le simulateur MAMol permet de gérer la formation de bundles par des règles déterministes simples. Ces faisceaux seront représentés comme un unique filament ayant les propriétés physico-chimiques d'un faisceau de filaments. Ainsi, un faisceau de  $N$  filaments aura une longueur de persistance :

$$L_p^{bundle}(N) = N^\alpha L_p$$

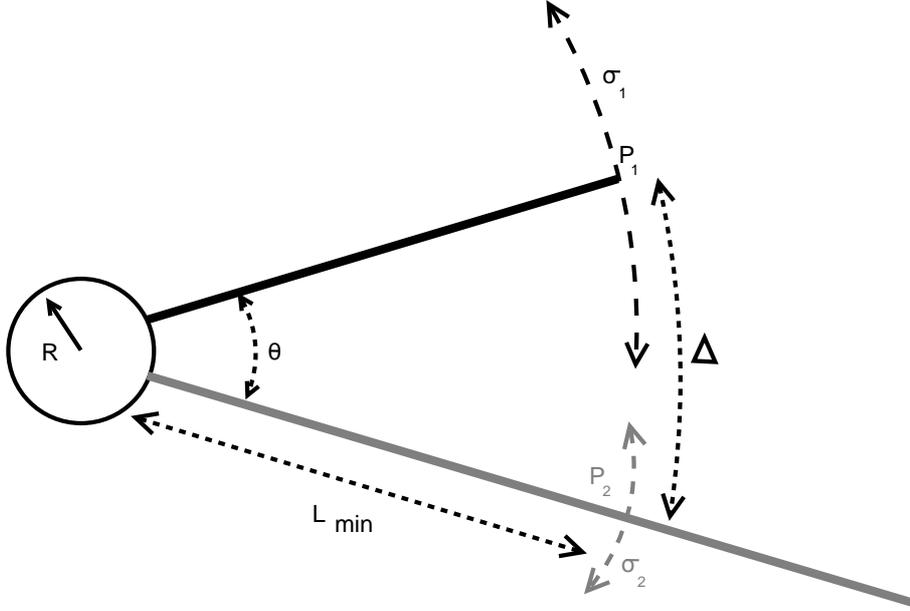
en notant  $L_p$  la longueur de persistance d'un filament isolé, où le paramètre  $\alpha$ , compris entre 1 et 2, reflète la nature de la liaison entre les filaments à l'intérieur du faisceau ;  $\alpha = 1$  correspond à des interactions faibles où les filaments peuvent coulisser les uns sur les autres et  $\alpha = 2$  correspond à des interactions fortes entre les filaments qui sont attachés les uns aux autres (Claessens *et al.*, 2006).

Dans le cas où les filaments sont nucléés sur un cercle (ce qui est le cas pour des formines greffées sur une bille), une des extrémités de chaque filament est fixée dans l'espace et on considère les fluctuations thermiques de l'autre extrémité. Considérons un filament de longueur  $L$ . Les fluctuations thermiques sont décrites par une distribution Gaussienne autour d'une position d'équilibre et la variance  $\sigma^2$  de la distribution est donnée par la relation (Howard, 2001) :

$$\sigma^2 = \frac{L^3}{3L_p}$$

En extrapolant ce résultat, on peut donner une approximation simple de la variance des fluctuations thermiques en n'importe quel point le long du filament, en remplaçant  $L$  par la distance entre ce point et l'extrémité maintenue sur la bille, dans la relation précédente.

Ainsi, si on prend en compte deux filaments, de longueur respectives  $L_1$  et  $L_2$ , où chacun a une extrémité attachée sur un cercle, alors le premier contact qui pourra avoir lieu se situera à la distance  $L_{min} = \min(L_1, L_2)$  de l'extrémité contrainte de



**FIG. 4.3 – Fluctuations et formation de faisceaux de filaments** –  $\sigma_i$  est l'écart-type de l'amplitude des fluctuations,  $\theta$  est l'angle entre les 2 filaments,  $R$  le rayon du cercle,  $\Delta$  la distance entre  $P_1$  et  $P_2$ , potentiels points de contacts,  $L_{min}$  le minimum des longueurs des deux filaments.

chaque filament (voir figure 4.3). Notons  $P_1$  et  $P_2$  ces deux points de contact et  $\Delta$  la distance séparant de tels points sur chacun des filaments. Comme les filaments sont attachés sur un cercle de rayon  $R$ , on a  $\Delta = \theta(R + L_{min})$ , en notant  $\theta$  l'angle entre chacun des points d'attache de chacun des filaments. Le contact ne peut se produire que si la somme des fluctuations de  $P_1$  et  $P_2$  est au moins égale à  $\Delta$ . Ainsi, on a la probabilité de formation d'un bundle, c'est à dire la probabilité de rencontre de ces points, en fonction de  $\Delta$  :

$$\begin{aligned} \mathcal{P}_{\text{contact}}(\Delta) &= \int_{-\infty}^{\infty} \mathcal{P}(P_1 \text{ fluctue de } x) \times \mathcal{P}(P_2 \text{ fluctue de } \Delta - x) dx \\ &= \frac{1}{2\pi\sigma_1\sigma_2} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left(-\frac{(x - \frac{\Delta}{2})^2}{2\sigma_1^2}\right) \exp\left(-\frac{(x + \frac{\Delta}{2})^2}{2\sigma_2^2}\right) dx \\ &= \frac{1}{\sqrt{2\pi(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}} \exp\left(-\frac{\Delta^2}{2(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}\right) \end{aligned}$$

C'est donc une loi normale de moyenne 0 et de variance la somme des variances des fluctuations des points qui vont entrer en contact.

Ainsi, nous pouvons construire une règle déterministe simple de formation de faisceaux :

Si  $L_{min}^3 \left( \frac{1}{3L_{p,1}} + \frac{1}{3L_{p,2}} \right) > \theta(R + L_{min})$  , alors on agrège les filaments en faisceau

avec  $L_{min}$  la longueur du plus petit filament,  $L_{p,i}$  la longueur de persistance du filament  $i$ ,  $\theta$  l'angle entre les deux filaments,  $R$  le rayon du cercle (ou de la bille).

Notons que cette démarche est exactement la même si au lieu d'agréger des filaments on agrège des faisceaux entre eux.

## 4.6 Algorithme et performances

### 4.6.1 Idée générale

L'objectif du simulateur MAMol est de pouvoir simuler des systèmes de réaction-diffusion stochastiques discrets. Nous avons adapté l'algorithme de Gillespie pour prendre en compte l'espace et la position des différentes molécules qui entrent en jeu. L'idée générale est de considérer, à chaque pas de temps  $dt$ , des espaces élémentaires qui seront considérés comme homogènes pendant ce pas de temps, sur lesquels on appliquera une variante de l'algorithme de Gillespie.

### 4.6.2 Algorithme du simulateur MAMol

Notre algorithme se base sur 2 pas de temps :

- un pas de temps fixe noté  $dt$  pendant lequel on considère que les molécules restent toutes dans une même cellule élémentaire.
- un pas de temps variable noté  $\delta\tau$  qui correspond au temps d'attente entre 2 réactions.

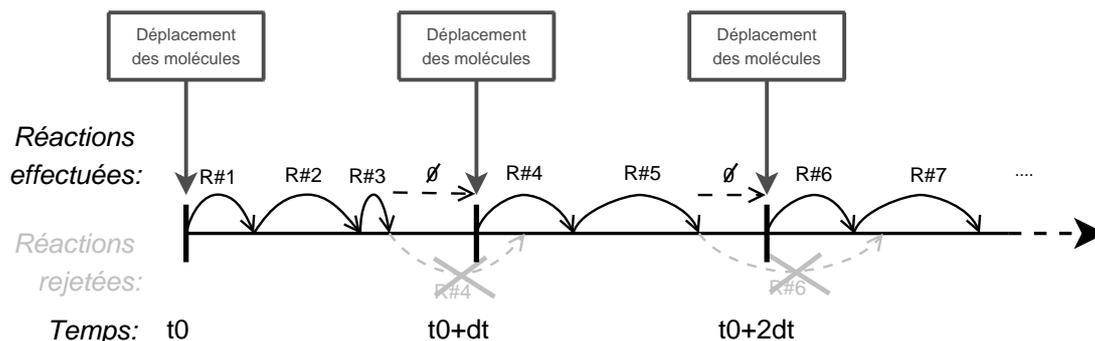
Il est décrit par l'algorithme II.3. Au début d'un pas de temps, noté  $t$ , on déplace les molécules existantes. Puis pendant  $dt$ , dans chaque cellule élémentaire qui délimite les molécules qui sont proches les unes des autres pendant ce temps, on effectue successivement les réactions selon l'algorithme de Gillespie, tant que le temps d'attente ne dépasse pas  $t + dt$  (figure 4.4). Ainsi, cet algorithme est assez semblable à l'algorithme de Gillespie avec rejet II.2, en prenant un pas de temps constant  $\delta t_i = dt, \forall i$ .

### 4.6.3 Complexité

Soit  $M$  le nombre de molécules. Les déplacements des molécules s'effectuent en  $\mathcal{O}(M)$  et la gestion des collision en  $\mathcal{O}(M \times C)$  où  $C$  est le nombre de côtés des objets qu'il faut éviter. Ainsi, chaque déplacement de toutes les molécules est en  $\mathcal{O}(M \times C)$ .

Effectuer une réaction nécessite le tirage de 2 nombres aléatoires, un selon une loi uniforme, l'autre selon une loi exponentielle. Ces tirages s'effectuent en  $\mathcal{O}(N_R)$ , où  $N_R$  est le nombre de réactions différentes. Effectuer une réaction ne nécessite que quelques opérations.

Le temps moyen entre 2 réactions est proportionnel à l'inverse de la somme des taux des différentes réactions. Le nombre de réactions dans la méthode directe de l'algorithme de Gillespie avec rejet par unité de temps est donc difficile à estimer mais est du même ordre de grandeur que pour la méthode directe de l'algorithme de Gillespie sans rejet, en fait un peu supérieur puisque une réaction par pas de temps



**FIG. 4.4 – Evolution du temps dans l’algorithme MAMol** – Le temps des simulations est divisé en pas de temps  $dt$ . On effectue des réactions (notées  $R_{\#i}$ , en haut) tant que le temps cumulé avant qu’elles ne se produisent ne dépasse pas  $dt$ . Si le temps d’attente est trop grand, on rejette la réaction (en pointillés gris, en bas) et on passe au début du pas de temps suivant sans effectuer de réaction (flèches en tirets noirs et symbole  $\emptyset$ , en haut).

```

répéter
   $t_{local} \leftarrow 0$ 
  tant que  $t_{local} \leq dt$  faire
    pour chaque molécule m faire
      Déplacer de  $dl$  suivant une loi normale  $\mathcal{N}(0, \sqrt{2D_m dt})$  ...
      ... dans une direction tirée selon un loi uniforme
    fin
    pour chaque sous-espace élémentaire du domaine réactionnel faire
      // Algorithme de Gillespie avec rejet
      pour chaque réaction  $R_k$  faire
         $a_k = h_k c_k$  // Mise à jour des taux
      fin
      Calculer  $a_\Sigma = \sum_k a_k$ 
      Tirer  $\delta\tau \sim \epsilon(a_\Sigma)$  // Temps avant la prochaine réaction
       $t_{local} \leftarrow t_{local} + \delta t$ 
      si  $t_{local} \leq dt$  alors
        Tirer  $\mu$  selon la loi discrète de l’équation 3.1
        Effectuer une réaction du type  $R_\mu$ 
      fin
    fin
  fin
jusqu’à fin de la simulation

```

**Algorithme II.3 : Algorithme du simulateur MAMol** -  $a_i$  est le taux de la réaction  $R_i$ ,  $c_i$  est le taux d’une occurrence de la réaction de type  $R_i$ ,  $h_i$  est le nombre d’occurrences de la réaction  $R_i$ ,  $N_r$  est le nombre de réactions.

et par sous-espace réactionnel homogène est rejetée à chaque pas de temps. On peut remarquer que dans l'algorithme de MAMol le nombre de réactions par unité de temps est le même que si on avait considéré que tout le volume réactionnel est homogène. Ainsi, le nombre de tirages de nombres aléatoires est à peu près le même que si on avait considéré un système réactionnel homogène en 0D (c'est à dire sans prendre en compte les phénomènes spatiaux tels que la diffusion).

#### 4.6.4 Choix du pas de temps

Le choix du pas de temps n'a a priori pas beaucoup d'influence sur le nombre de réactions effectuées, puisque que quelque soit le pas de temps choisi, il y aura toujours autant de réactions qui se produisent par unité de temps.

Cependant, si on prend un pas de temps trop petit, le nombre de réactions rejetées risque d'être relativement grand puisque le temps d'attente peut souvent dépasser le pas de temps. Ainsi, on risque de tirer souvent des nombres aléatoires qui seront rejetés.

Inversement, si le pas de temps est trop grand et que le milieu réactionnel est très inhomogène, on risque de perdre, d'une part, en précision en espace (les sous-espaces de réactions homogènes sont alors très grands, puisque leur taille est proportionnelle à  $\sqrt{2Dt}$ ) et d'autre part, on risque de créer une "famine", c'est à dire que les molécules peuvent venir à manquer dans un des milieux réactionnels vu qu'elles ne sont pas renouvelées assez régulièrement.

Ainsi, un pas de temps optimum est un pas de temps qui est assez grand et qui permet d'avoir un rapport entre le nombre de réactions effectuées et le nombre de rejet bien plus grand que 1, mais pas trop grand pour éviter une trop grande erreur spatiale ou une famine.

## 4.7 Implémentation et améliorations

### 4.7.1 Implémentation

L'algorithme de MAMol a été implémenté en Java, qui est un langage objet avec une grande souplesse d'utilisation. La structure de données de MAMol est assez simple et ressemble beaucoup à la représentation intuitive qu'on peut se faire d'un système réactionnel. Les molécules sont des objets Java qui, sous forme de listes chaînées (éventuellement de taille 1), constituent des polymères. Ces polymères peuvent réagir dans un des sous-espaces homogènes qui constituent l'espace réactionnel global.

Afin de rendre générique le programme et de pouvoir l'utiliser avec différents systèmes de réactions, nous avons utilisé comme format natif de MAMol le format SBML auquel nous avons fait quelques enrichissements spécifiques aux modèles de polymères et à l'algorithme utilisé. Ainsi, le simulateur n'est pas dépendant d'un modèle et nous pouvons l'utiliser pour résoudre d'autres problèmes réactionnels en biologie cellulaire.

### 4.7.2 Améliorations possibles des performances

L'algorithme de base de MAMol étant adapté de l'algorithme de Gillespie, on pourrait améliorer les performances en utilisant les variantes proposées par Gillespie (2001), Rathinam *et al.* (2003), ou Gibson et Bruck (2000) pour cet algorithme. Cependant, MAMol se veut générique et les améliorations proposées (Gillespie, 2001; Rathinam *et al.*, 2003) nécessitent de faire des simplifications au cas par cas. Elles sont donc difficiles à mettre en œuvre dans un outil comme MAMol. D'autre part, le fait que l'on emploie un algorithme avec rejet, où à chaque pas de temps le milieu réactionnel change, rendent beaucoup moins efficaces les modifications proposées par Gibson et Bruck (2000).

En revanche, la parallélisation de l'algorithme de MAMol semble être une voie d'amélioration des performances relativement facile à mettre en œuvre. En effet, comme on peut le voir sur l'algorithme II.3, les calculs sont effectués sur chaque cellule élémentaire, indépendamment les unes des autres. Ainsi, on pourrait partager aisément la charge de calcul sur différents processeurs.

# Chapitre 5

## Elongation de filaments nucléés par des formine autour d'une bille

### 5.1 Introduction

#### 5.1.1 Actine, Formines et ADF/Cofiline

Les formines constituent une famille de nucléateurs de la polymérisation de l'actine (Kovar *et al.*, 2006). Elles participent à la formation de structures complexes au sein du cytosquelette, comme les câbles chez la levure (Sagot *et al.*, 2002), l'assemblage de l'anneau contractile (Pelham et Chang, 2002), les contacts focaux d'adhésion (Tominaga *et al.*, 2000; Riveline *et al.*, 2001; Kobiela *et al.*, 2004), la migration cellulaire (Higashida *et al.*, 2004; Koka *et al.*, 2003), la motilité d'endosomes (Gasman *et al.*, 2003) et la formation de filopodes (Peng *et al.*, 2003). Quasiment toutes les formines connues sont processives (Higgs, 2005), c'est à dire que, tout en restant attachées à l'extrémité barbée, elles permettent une polymérisation à un taux constant même en présence d'une force (exercée par exemple par une bille, une vésicule ou une membrane), les seules exceptions connues étant la formine de plante Arabidopsis FORMIN1 (Michelot *et al.*, 2006). Les taux d'élongation de filaments coiffés d'une formine peuvent être jusqu'à 10 fois plus importants que les taux mesurés pour des extrémités barbées libres (Romero *et al.*, 2004; Faix et Grosse, 2006; Kovar *et al.*, 2006).

Les ADF/Cofiline sont des protéines qui se lient à l'actine monomérique ou filamentueuse. Parmi leurs propriétés, il est communément admis qu'elles accélèrent la dissociation de l'actine (Carlier *et al.*, 1997) et ont la propriété de fragmenter les filaments (Blanchoin et Pollard, 1999). Ainsi, cette famille de protéines participe activement à la régulation de la polymérisation de l'actine *in vivo* (Lappalainen et Drubin, 1997).

#### 5.1.2 Systèmes reconstitués avec des billes

Depuis plusieurs années, des billes ont été utilisées pour des expériences *in vitro* afin d'effectuer des reconstitutions de motilité (Cameron *et al.*, 1999) et d'étudier

les ruptures de symétries de tels systèmes (van der Gucht *et al.*, 2005) . Une des propriétés importantes de telles reconstitutions est de pouvoir localiser dans l'espace, à la surface de la bille, certaines protéines. L'inhomogénéité de leur répartition ainsi créée permet l'émergence de comportements qui ne pourraient se produire dans une solution homogène.

Certaines reconstitutions ont été effectuées en microscopie par ondes évanescentes, appelée TIRF (*Total Internal Reflexion Microscopy*). Le principe (Kuhn et Pollard, 2005) est d'éclairer l'échantillon à observer avec un laser de telle sorte qu'une onde évanescente se crée sur une très faible épaisseur à la surface de la lame (moins de 500 nanomètres). Ceci permet d'observer des phénomènes qui se passent en 2 dimensions (ou sur une très faible épaisseur) et ainsi on est capable d'observer des filaments uniques de façon assez précise.

Laurent Blanchoin et Alphée Michelot (CEA, Grenoble) ont utilisé cette méthode afin d'étudier un système constitué de formines processives greffées sur des billes de polystyrène, dans une solution d'actine monomérique et d'ADF/Cofiline. Ils ont ainsi pu observer la croissance processive de filaments d'actine nucléés par les formines de la bille. En présence d'ADF/Cofiline, ils ont montré que la longueur des filaments d'actine fluctue autour d'une longueur moyenne. D'autre part, la présence d'une grande quantité de formines sur les billes conduit les filaments à s'agréger en faisceaux (ou 'bundles'), qui s'allongent beaucoup plus que les filaments isolés. Au bout de plusieurs heures, l'agrégation est telle qu'il ne reste plus que quelques faisceaux, deux en général, contenant la plupart des longs filaments.

## 5.2 Modélisation

Nous avons modélisé le système réactionnel utilisé par Michelot et Blanchoin et nous l'avons étudié avec le simulateur MAMol (voir chapitre 4). L'objectif est de simuler dans les mêmes conditions le système bille-formine-ADF/Cofiline et ainsi d'éclairer, avec des hypothèses simples et biologiquement pertinentes, les résultats expérimentaux.

### 5.2.1 Aspects biochimiques

Le modèle prend en compte un cercle représentant une bille, sur laquelle sont fixées des formines qui peuvent nucléer de nouveaux filaments. La solution est modélisée par de l'actine monomérique ATP et de l'ADF/Cofiline en concentration fixe et homogène dans l'espace réactionnel. Ceci correspondrait expérimentalement à un pool constant d'actine et d'ADF/Cofiline en solution, dont la diffusion n'aurait pas d'effet sur la répartition de ces molécules. Ces hypothèses semblent vérifiées dans le contexte expérimental qui nous préoccupe.

Le modèle prend en compte la polymérisation des monomères d'actine G-ATP à l'extrémité barbée coiffée d'une formine et à l'extrémité pointue, ainsi que la dépolymérisation de tous les types de monomères aux deux extrémités. On considère que le recyclage en G-ATP des monomères G-ADP, G-ADP-Pi, ainsi que ceux ayant lié

une ADF/Cofiline est quasiment instantanée, ce qui implique que ces monomères sont quasiment inexistantes en solution.

Les filaments d'actine sont constitués de sous-unités F-ATP, F-ADP-Pi, F-ADP et F-ADP-ADF, selon l'état d'hydrolyse de leur nucléotide. L'attachement de l'ADF/Cofiline s'effectue uniquement le long des filaments sur les sous-unités F-ADP, éventuellement de façon coopérative : si une sous-unité d'actine ADP a fixé une ADF/Cofiline, alors ses plus proches voisines ont un taux de fixation de l'ADF/Cofiline plus élevé. D'autre part, les filaments peuvent se faire couper entre 2 sous-unités ayant attaché de l'ADF.

Le tableau 5.1 recense les différentes valeurs cinétiques utilisées pour les simulations.

Réaction ou Espèce	Taux ou Concentration	Référence
Nucléation par la formine	$0.001 s^{-1}$	-
Polymérisation G-ATP, ext. barbée coiffée d'une formine	$40 \mu M^{-1} s^{-1}$	-
Polymérisation G-ATP, ext. pointue	$1.3 \mu M^{-1} s^{-1}$	[1]
Polymérisation G-ADP, ext. pointue	$0.16 \mu M^{-1} s^{-1}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, ext. pointue	$0.8 s^{-1}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, ext. pointue	$0.26 s^{-1}$	[1]
Hydrolyse F-ATP en F-ADP-Pi	$0.35 s^{-1}$	[2]
Relargage du phosphate (F-ADP-Pi en F-F-ADP)	$0.0019 s^{-1}$	[3]
Relargage du phosphate en présence d'ADF/cofilin	$0.03 s^{-1}$	[4]
Association ADF et F-actine	$0.0085 \mu M^{-1} s^{-1}$	[4]
Association coopérative ADF et F-actine	$0.075 \mu M^{-1} s^{-1}$	[4]
Dissociation ADF de F-actine	$0.005 s^{-1}$	[4]
Fragmentation par l'ADF	$0.012 s^{-1}$	[4]
G-Actin-ATP	$1.2 \mu M$	-
ADF/Cofiline	0 ou $1 \mu M$	-
Formine*	$100 nM$	-

**FIG. 5.1 – Tableau des constantes utilisées pour les simulations** – Références : [1] : Pollard (1986) ; [2] : Blanchoin et Pollard (2002) ; [3] : Carlier et Pantaloni (1986) ; [4] : Blanchoin et Pollard (1999) ; - : déterminé dans cette étude . \* : lors de leur préparation, les billes ont été incubées dans une solution contenant  $100 nM$  de formines, ce qui correspond à une quarantaine de formines actives par bille environ.

### 5.2.2 Aspects mécaniques

Dans les simulations où l'on ne prend pas en compte la formation de faisceaux, les filaments sont considérés comme rigides et ne subissent pas de déformations dues aux fluctuations thermiques ou à d'autres forces extérieures. Cette approche est justifiée par le fait que les filaments ont une longueur inférieure ou proche de leur longueur de persistance et que les changements de forme des filaments n'ont pas d'effet sur la cinétique du système. En effet, nous ne nous intéressons principalement qu'aux aspects cinétiques, qui se déroulent en grande majorité à la surface de la bille et ne sont donc pas influencés (ou de façon négligeable) par les fluctuations thermiques à l'autre bout du filament.

Dans les simulations faisant intervenir des faisceaux d'actine, les fluctuations ne seront prises en compte que indirectement par l'utilisation de règles d'agrégation en faisceaux, comme présenté dans la section 4.5.2.

### 5.2.3 Simulation de faisceaux de filaments

Les propriétés physico-chimiques pour un faisceau de filaments sont différentes de celles de filaments isolés. En effet l'accès aux filaments du centre du faisceau est limité par les autres filaments du faisceau, d'une part, et, d'autre part, un faisceau de filaments est plus rigide qu'un filament isolé. Ainsi, ces deux limitations vont réduire la capacité de l'ADF/Cofilin à se fixer sur les sous-unités d'actine filamenteuse ainsi que sa capacité à fragmenter les filaments.

Tout d'abord, il a été montré que l'ADF/Cofilin modifie les propriétés mécaniques des filaments (Galkin *et al.*, 2003), ce qui a une influence sur l'attachement aux filaments et sur la fragmentation. Il a été proposé que la torsion locale induite par l'insertion d'une ADF/Cofilin destabiliserait le filament (Prochniewicz *et al.*, 2005). Il est ainsi légitime de penser que l'insertion d'ADF/Cofilin et la fragmentation dépendent de l'énergie élastique du filament, qui est elle-même fonction linéaire de la longueur de persistance (voir section 7.2.3 et Howard (2001)). Ainsi, comme les interactions dans les faisceaux de filaments sont faibles, la longueur de persistance est inversement proportionnelle au nombre de filaments dans le faisceau, ce qui sera répercuté de la même manière sur les taux d'attachement de l'ADF/Cofilin et de fragmentation.

D'autre part, si on considère que les filaments s'arrangent en faisceaux selon une section circulaire, l'accessibilité des filaments au centre du faisceau va dépendre approximativement de la racine carrée du nombre de filaments. De même, la fragmentation des filaments intérieurs ne peut s'effectuer que lorsque les fragments extérieurs le sont.

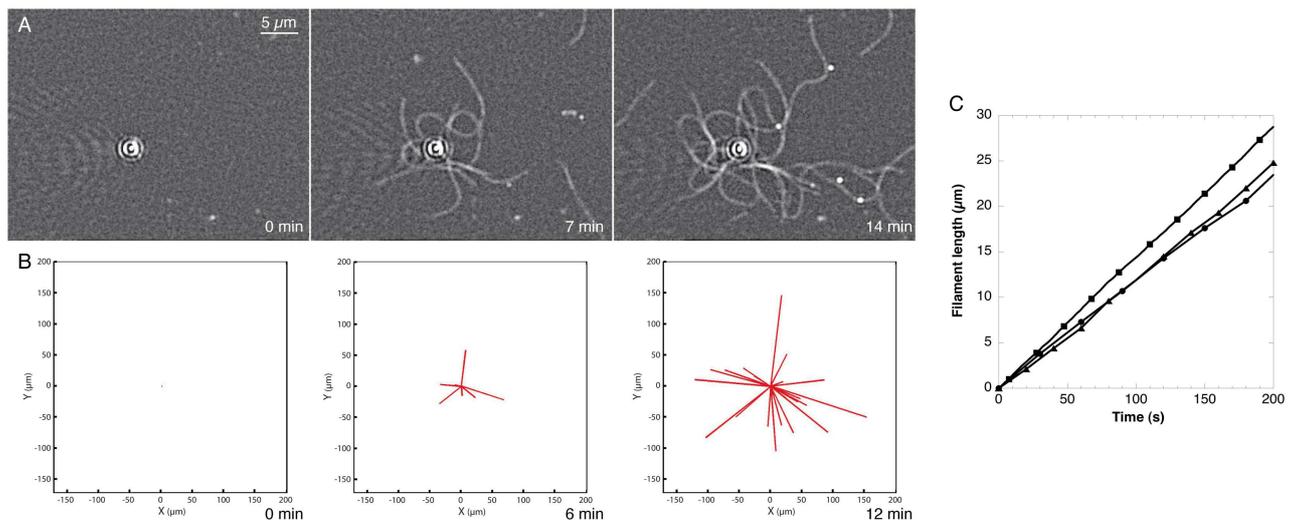
Si on considère qu'un faisceau de filaments ne peut être fragmenté que si tous les filaments du fragment le sont, il faut diviser le taux de fragmentation d'un filament isolé par le nombre de filaments dans le faisceau pour obtenir son taux de fragmentation. Le même raisonnement est valable pour le taux d'attachement de l'ADF/Cofilin.

Finalement, en prenant en compte les facteurs de ces trois limitations, les taux d'attachement de l'ADF/Cofilin et de fragmentation des filaments seuls doivent être divisés par un facteur environ égal à  $N^{2.5}$ , où  $N$  est le nombre de filaments, pour avoir

les taux pour un faisceau de filaments.

### 5.3 Activation des formines et vitesse d'élongation

Les expériences montrent qu'en absence d'ADF/Cofiline, les formines nucléent des filaments qui restent attachés à la bille pendant plusieurs heures d'élongation. Cependant, la longueur des filaments autour de la bille ne suit pas une distribution gaussienne. Les simulations ont montré que ce phénomène n'a pu être expliqué en prenant uniquement en compte les fluctuations intrinsèques dues à la stochasticité des réactions, puisque ces dernières ont une amplitude trop faible.

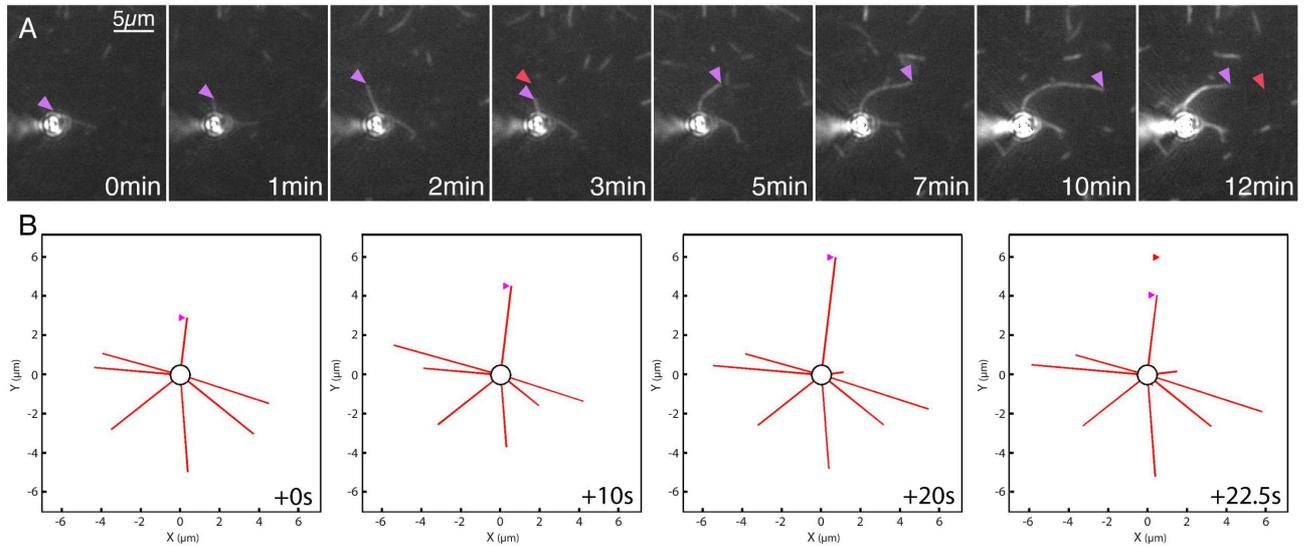


**FIG. 5.2 – Élongation de formines greffées sur une bille en absence d'ADF/Cofiline** – (A) Images en microscopie par ondes évanescentes de l'élongation de formines mDia1 greffées sur une bille (Images obtenues par A. Michelot et L. Blanchoin). (B) Simulation de l'élongation de billes couvertes de formines processives. (C) Evolution de la longueur d'un filament d'actine au cours du temps. Comparaison entre les données expérimentales en présence d'actine marquée à la rhodamine (cercles), marquée à l'Alexa 532 (triangles) et simulé par le modèle (carrés). Dans les simulations et les expériences, les concentrations de G-Actin-ATP et de formines sur la bille sont respectivement de  $1.2 \mu M$  et  $100 nM$ .

Ainsi, l'ajout d'un état d'activation de la formine dans le modèle a permis d'expliquer les différences de longueurs des filaments observés autour de la bille. Cette activation pourrait être le reflet du mécanisme qui prend en compte la formation d'un dimère d'actine et sa stabilisation après accrochage à la formine (Pring *et al.*, 2003). La constante d'activation a ainsi été estimée à  $10^{-3} s^{-1}$ , ce qui correspond à un temps moyen d'activation d'une quinzaine de minutes.

Les figures 5.2 montrent que l'accord entre les expériences et le modèle est assez bon, qualitativement et quantitativement. Les constantes cinétiques utilisées sont donc validées par cette première approche.

## 5.4 Élongation en présence d'ADF/Cofiline



**FIG. 5.3 – Élongation de formines greffées sur une bille en présence d'ADF/Cofiline** – (A) Images en microscopie par ondes évanescentes de l'élongation de formines mDia1 greffées sur une bille en présence d'ADF/Cofiline (Images obtenues par A. Michelot et L. Blanchoin). (B) Simulation de l'élongation de billes couvertes de formines processives en présence d'ADF/Cofiline. Dans les simulations, les fragments ne sont pas représentés. Les flèches violettes montrent l'extrémité du filament au moment de la prise de vue. Les flèches rouges montrent la position du filament dans l'image précédente. Dans les expériences et dans les simulations, les concentrations de formines, d'actine et d'ADF/Cofiline sont respectivement de  $100\text{ nM}$ ,  $1.2\text{ }\mu\text{M}$  et  $1\text{ }\mu\text{M}$ .

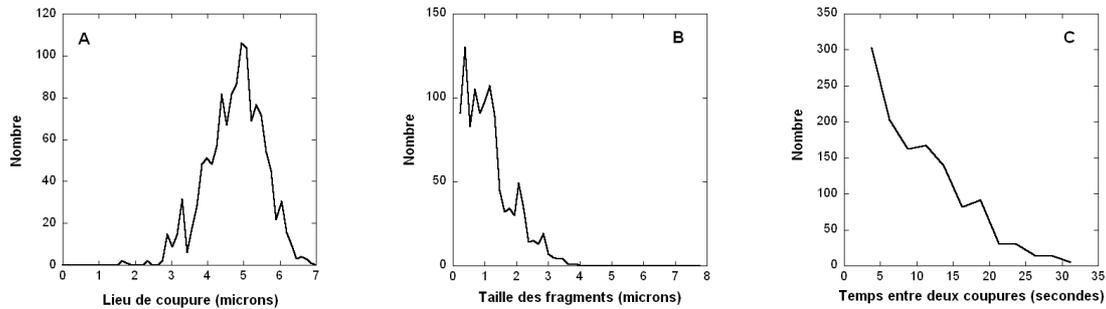
L'ajout d'ADF/Cofiline au système étudié précédemment a permis de mettre en évidence expérimentalement des fluctuations des filaments autour d'une longueur moyenne (Michelot et Blanchoin, communication personnelle). Des petits filaments apparaissent aussi dans le milieu réactionnel à proximité des filaments attachés à la bille, laissant penser que l'ADF/Cofiline, en fragmentant les filaments, est à l'origine des fluctuations en longueur.

Les simulations, effectuées sous la seule hypothèse de fragmentation aléatoire des filaments entre deux sous-unités ayant lié une ADF/Cofiline, ont permis d'expliquer les propriétés du système expérimental.

### 5.4.1 Évolution de la longueur des filaments

Les simulations ont montré que, en présence de  $1.2\text{ }\mu\text{M}$  d'actine et  $1\text{ }\mu\text{M}$  d'ADF/Cofiline, la première coupure se produit au bout de quelques dizaines de secondes. Le filament va alors osciller en longueur, en s'allongeant à l'extrémité barbée, puis en se raccourcissant de façon brutale, par fragmentation, la partie contenant l'extrémité barbée

restant attachée à la bille et la partie contenant l'extrémité pointue partant en solution. Comme le montre la figure 5.4A, les fluctuations se produisent autour d'une longueur moyenne, d'environ  $5 \mu\text{m}$ , dans les conditions expérimentales sus-citées.

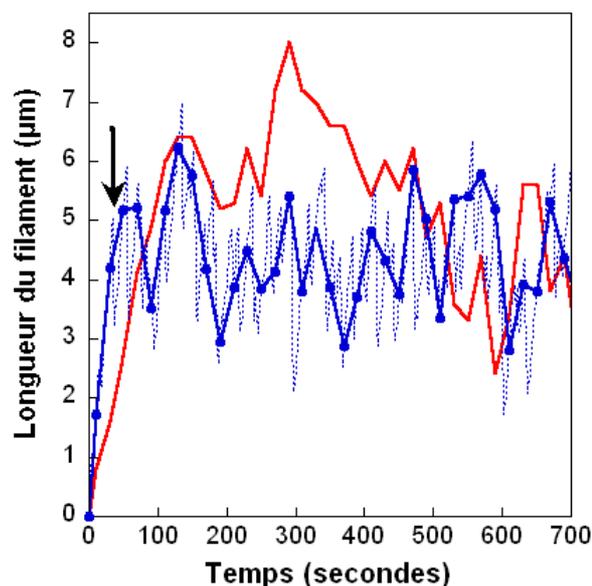


**FIG. 5.4 – Distributions des lieux de coupure, de la taille des fragments et des temps entre 2 fragmentations.** – La figure (A) montre que la fragmentation s'effectue à la distance d'environ 5 microns de l'extrémité barbée. La figure (B) présente la distribution de la taille des fragments. La figure (C) montre que les fragmentations sont assez fréquentes (moyenne de 7 secondes environ).

On s'aperçoit dans ces simulations que les fluctuations sont nombreuses et que le temps entre 2 coupures est assez court, de moins d'une dizaine de secondes en moyenne (voir figure 5.4C). Ainsi les changements de longueur observés dans les simulations sont beaucoup plus fréquents que ceux observés expérimentalement. Cela peut sembler être un paradoxe puisque le taux de fragmentation par l'ADF/Cofline utilisé dans les simulations est le même que celui qui a été mesuré expérimentalement par Blanchoin et Pollard (1999). En fait, la combinaison de deux phénomènes peut expliquer ces différences et valider les résultats obtenus par les simulations.

### 5.4.2 Limite de l'échantillonnage de prises de vue

Tout d'abord, les simulations permettent un échantillonnage en temps aussi précis que l'on veut. En revanche, à cause du photobleaching (qui est la perte d'intensité, à chaque prise de vue, de la fluorescence des protéines marquées), l'état de la solution d'actine ne peut être suivi en continu; les prises de vue sont alors effectuées par intervalles de temps réguliers de plusieurs secondes voire quelques dizaines de secondes. De plus, le système expérimental ne permet d'observer que les filaments proches de la lame et on ne peut par conséquent voir les fragments en solution que lorsqu'ils viennent juste d'être coupés et n'ont pas encore diffusé dans la solution, ou bien lorsqu'ils sont maintenus près de la lame par interactions électrostatiques. Ainsi, il est possible que l'on manque un certain nombre d'événements de coupure qui se produiraient entre deux prises de vues. La courbe en traits pleins bleus de la figure 5.3C montre que l'échantillonnage des prises de vue fait manquer un nombre important d'événements de



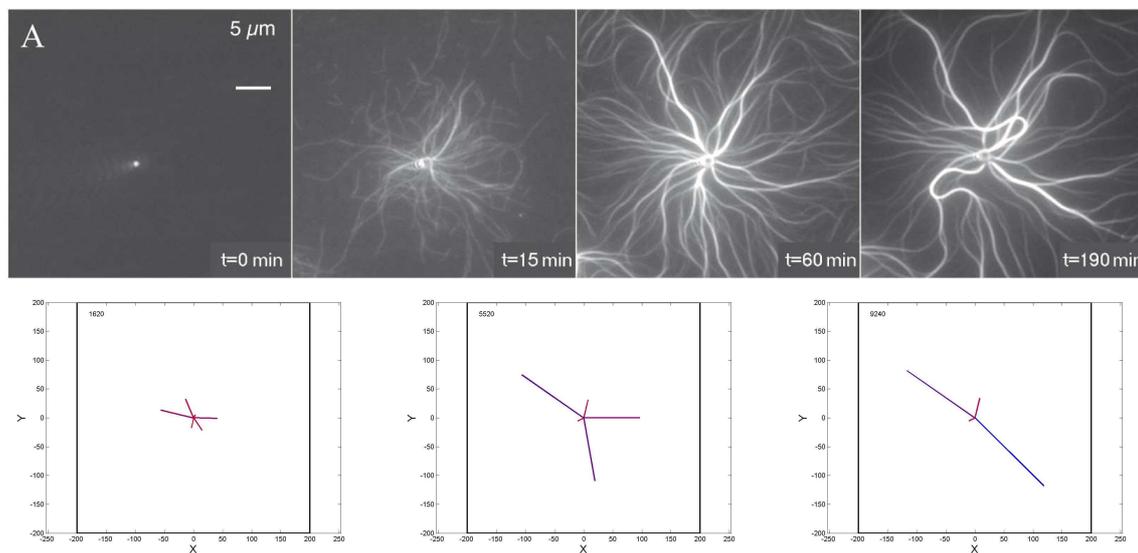
**FIG. 5.5 – Evolution de la taille d'un filament** – Les données simulées sont représentées en pointillés bleus (sans échantillonnage) et en traits pleins bleus (avec un échantillonnage toutes les 20 secondes). En rouge sont représentées les données expérimentales (échantillonnées toutes les 20 secondes). La flèche noire représente une coupure qui ne serait pas visible à cause de l'échantillonnage. D'autre part, dans les simulation, environ un quart des fragments sont inférieurs à  $0.5 \mu m$  et ne sont par conséquent pas visibles en microscopie par ondes évanescentes.

coupure (courbe en pointillés bleus). La deuxième fragmentation par exemple (flèche noire) est totalement ignorée, si on échantillonne toutes les 20 secondes.

### 5.4.3 Limite de la résolution optique

D'autre part, la résolution optique ne permet pas de distinguer en microscopie par ondes évanescentes des objets de taille inférieure à  $0.5 \mu m$  environ. Ainsi, les petits fragments ne sont pas visibles et ne peuvent être comptabilisés. La courbe de la figure 5.3B montre que les fragments coupés sont relativement petits et qu'une partie des fragments auront une taille inférieure à la résolution optique et seront donc invisibles. Dans la figure 5.5, ces fragments représentent 23% des événements.

## 5.5 Bundling et rupture de symétrie



**FIG. 5.6 – Formation de faisceaux et directions privilégiées** – Les simulations montrent que l'hypothèse selon laquelle l'attachement et la fragmentation par l'ADF/Cofiline sont décroissants avec le nombre de filaments dans le faisceau explique la création de directions privilégiées autour de la bille, en accord avec les données expérimentales. (A) Images en microscopie par ondes évanescentes obtenues par A. Michelot et L. Blanchoin. (B) Simulations. Le code couleur utilisé pour représenter les faisceaux va du rouge (1 seul filament) au bleu (16 filaments).

### 5.5.1 Agrégation de filaments

On observe dans les expériences que, à forte concentration de formines sur la bille, les filaments ont tendance à s'agréger en faisceaux. Ce phénomène est dû aux fluctuations thermiques qui conduisent les filaments à se rencontrer et à se coller les uns

aux autres localement, puis de proche en proche, par un mécanisme de type fermeture éclair. Ces faisceaux semblent beaucoup plus rigides que les filaments seuls. Ils sont de plus beaucoup moins souvent fragmentés que ces derniers. En nous appuyant sur les travaux de Prochniewicz *et al.* (2005), nous proposons dans le modèle que cette rigidité rend les filaments moins enclins à être attaqués par l'ADF/Cofiline. Ainsi, dans le modèle, les constantes cinétiques d'attachement de l'ADF/Cofiline et de fragmentation d'un faisceau de  $N$  filaments seront divisées par un facteur  $N^{2.5}$  par rapport aux mêmes constantes pour des filaments uniques (voir section 5.2.3).

### 5.5.2 Directions privilégiées

La fragmentation préférentielle des filaments seuls par rapport aux faisceaux crée des directions privilégiées autour de la bille. En effet, face à la fragmentation, seuls survivent et peuvent s'allonger les gros faisceaux, qui, en continuant leur élongation, s'agrègent petit à petit les uns aux autres. Ainsi, une bille qui au départ était recouverte de filaments de façon homogène n'aura que de quelques faisceaux de filaments à sa surface au bout d'une à deux heures.

On remarque que la répartition des faisceaux est relativement homogène autour de la bille. Ceci est dû au fait que les filaments ou les faisceaux trop proches les uns des autres vont avoir tendance à s'agréger. Ainsi, cela crée des zones d'influences de bundles déjà formés, qui vont "absorber" les filaments ou les faisceaux trop près d'eux. De façon assez intuitive, on voit que les faisceaux vont donc se répartir de façon assez homogène.

## 5.6 Discussion

### 5.6.1 Fluctuations

Les fluctuations observées expérimentalement peuvent être de l'ordre du micron, voire de plusieurs microns. De telles amplitudes ne sont pas explicables par la seule stochasticité des réactions de polymérisation et dépolymérisation aux extrémités, puisqu'il a été montré, par simulation (Vavylonis *et al.*, 2005; Stukalin et Kolomeisky, 2006) et expérimentalement (Kuhn et Pollard, 2005), que ces fluctuations ne concernent que quelques dizaines de sous-unités tout au plus, et uniquement lorsque la concentration d'actine est proche de sa concentration critique ( $0.1 \mu M$ ). Or, dans le système étudié, la concentration est beaucoup plus élevée ( $1.2 \mu M$ ). Le modèle proposé montre que la seule hypothèse de fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/Cofiline suffit à créer de telles fluctuations.

Le modèle prédit même que les fragmentations sont plus fréquentes que ce qui peut être observé. En effet, la résolution optique, d'une part, et la résolution temporelle de l'échantillonnage des prises de vues, d'autre part, empêchent de voir tous les phénomènes de fragmentation. Nous avons montré que, dans le système considéré, l'intervalle de temps entre deux événements de fragmentation successifs est d'environ 7 secondes, bien inférieur au pas temps de l'échantillonnage des images. D'autre part,

près d'un quart des fragments coupés sont inférieurs à 0.5 microns et ne sont donc pas visibles.

Ce modèle met aussi en évidence une longueur moyenne stationnaire pour les filaments, qui ne dépend que des concentrations d'actine et d'ADF/Cofiline. Ainsi, tous les filaments autour de la bille fluctuent autour de la même longueur moyenne. Ce phénomène de régulation spatiale est tout à fait remarquable puisqu'il ne nécessite qu'une seule protéine : l'ADF/Cofiline.

### 5.6.2 Accélération du turnover

La longueur moyenne stationnaire est en fait le reflet d'une accélération du turnover. En effet, l'accélération de la polymérisation d'environ 4 fois due à la formine est exactement compensée en moyenne par la dépolymérisation et la fragmentation par l'ADF/Cofiline. Ceci signifie que la vitesse de dépolymérisation apparente des filaments attachés à la bille est donc exactement l'opposé de la vitesse de polymérisation, soit environ 45 sous-unités par secondes. Ce taux est 6 fois supérieur à ce qui a déjà été obtenu par Carlier *et al.* (1999) en présence d'ADF/Cofiline et environ 170 fois plus rapide que la dépolymérisation "naturelle" de l'extrémité pointue. Le modèle montre donc que l'ADF/Cofiline permet une forte accélération du turnover, ce qui est un résultat tout à fait étonnant.

### 5.6.3 Symétrie, rupture de symétrie et motilité

Le modèle utilise une hypothèse mécanique pour expliquer la fragmentation préférentielle de filaments uniques ou des faisceaux contenant peu de filaments par rapport aux faisceaux en contenant beaucoup. Le modèle prédit que sous ces hypothèses, une bille pouvant nucléer un grand nombre de filaments de façon homogène à sa surface va, au bout de plusieurs dizaines de minutes, être recouverte de quelques faisceaux de filaments répartis de façon homogène. Ces derniers vont à leur tour s'agréger les uns aux autres pour donner, au final, seulement deux filaments diamétralement opposés sur la bille, comme le montrent les expériences. Cet état va permettre à la bille de se mouvoir dans une des directions orthogonales au diamètre défini par les deux faisceaux, jusqu'à ce que ceux-ci s'agrègent à leur tour.

Tout au long de l'évolution du système, la répartition des filaments autour de la bille est à peu près symétrique. Cependant, plus les filaments s'agrègent, moins il y a de faisceaux à la surface de la bille et plus le nombre de filaments contenus dans chaque faisceau est différent. En fait, la dissymétrie va venir du fait que les inhomogénéités, qui peuvent se moyennner globalement (et donc annuler leurs effets) lorsqu'il y a de nombreux filaments seuls donc très flexibles, ne le peuvent plus lorsqu'il ne reste plus que quelques axes privilégiés très rigides. Elles vont alors conduire le système non pas à un équilibre mais à un déséquilibre menant à la motilité.

#### 5.6.4 Conséquences *in vivo*

La régulation de la longueur des filaments semble être effectuée de façon assez précise *in vivo*. Ainsi, certaines structures comme les doigts des jonctions adhérentes (Delanoë-Ayari *et al.*, 2004) ont une longueur très stable. Ce chapitre montre comment cette régulation en longueur pourrait être effectuée par l'intermédiaire de l'ADF/Cofiline.

D'autre part, nous avons montré dans le chapitre 8.3 que les forces pouvant être supportées par des filaments courts sont plus importantes que pour des filaments plus longs. On voit ainsi que l'ADF/Cofiline pourrait raccourcir les filaments afin de les rendre plus résistants au flambage et par conséquent aux contraintes exercées dans la cellule.

De plus, cette étude montre que les faisceaux de filaments d'actine sont moins facilement attaqués que les filaments seuls, ce qui leur permet d'avoir une longueur moyenne stationnaire plus élevée. Cependant, ces faisceaux sont aussi plus rigides que les filaments seuls donc plus résistants aux forces exercées. La combinaison de la formation de faisceaux et la fragmentation par l'ADF/Cofiline permettrait donc d'engendrer ou de supporter des forces assez importantes sur des grands compartiments, tels que les filopodes.

# Chapitre 6

## Étude systématique des paramètres cinétiques dans la fragmentation de filaments uniques en présence d'ADF/Cofiline

### 6.1 Introduction

Les expériences de A. Michelot et L. Blanchoin (chapitre 5) ont mis en évidence les fluctuations dans la longueur des filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline ce qui suggère un rôle régulateur pour l'ADF/Cofiline. Dans le chapitre 5, nous avons proposé un modèle rendant bien compte du comportement observé expérimentalement. Nous allons maintenant dans ce chapitre étudier de façon systématique l'influence des vitesses de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofiline sur la dynamique des filaments d'actine, d'une part par simulations stochastiques et d'autre part analytiquement, à partir des équations maîtresses de l'évolution du système réactionnel.

### 6.2 Modèle

#### 6.2.1 Système simulé

Le système se constitue d'un filament d'actine unique qui peut incorporer à l'extrémité barbée de l'actine ATP et dont les sous-unités subissent une hydrolyse de leur nucléotide. De plus, une sous-unité d'actine filamenteuse F-ADP peut attacher une ADF/Cofiline pour devenir une F-ADP-ADF, et, si une sous-unité voisine a attaché une ADF/Cofiline, devenir ensuite une F-ADP-2ADF à un taux dix fois plus élevé que la réaction précédente. Le filament peut alors être fragmenté entre 2 telles sous-unités ayant attaché une ADF/Cofiline. Il peut en outre polymériser et dépolymériser à son extrémité pointue.

Nous allons étudier de façon systématique l'influence de la vitesse de polymérisation de l'actine-ATP à l'extrémité barbée et de la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofiline

sur la dynamique de l'élongation des filaments. Une vitesse de réaction sera définie par une quantité de monomères qui réagissent par unité de temps. Ainsi, la vitesse de polymérisation sera le produit du taux de polymérisation par la concentration d'actine et représentera le nombre de monomères incorporés au filament par unité de temps ; la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofiline sera le produit du taux d'attachement par la concentration d'ADF/Cofiline et représentera donc le nombre de molécules d'ADF/Cofiline qui vont se fixer à des sous-unités d'actine filamenteuse par unité de temps. L'intérêt de prendre comme paramètres du modèle les vitesses est de rendre compte globalement de l'effet conjugué des concentrations des molécules et des taux de réaction. Ainsi, une vitesse de polymérisation de 40 sous-unités par secondes peut être obtenue ou bien avec des formines comme mDia qui polymérisent au taux de  $40 \mu M^{-1} s^{-1}$  en présence de  $1 \mu M$  de G-actine, ou bien avec des filaments libres en solution (sans formine) qui polymérisent au taux de  $10 \mu M^{-1} s^{-1}$  en présence de  $4 \mu M$  d'actine. Ceci rend le modèle générique et le rend indépendant des propriétés cinétiques des différents types de nucléateurs et de protéines de coupures présents dans le système.

Dans la suite, on notera :

- $r_1$  la vitesse de l'hydrolyse de l'ATP :  $F-ATP \rightarrow F-ADP-Pi$
- $r_2$  la vitesse du relargage du phosphate, que nous considérerons indépendant de l'action de l'ADF/Cofiline :  $F-ADP-Pi \rightarrow F-ADP$
- $r_3$  la vitesse d'attachement non-coopératif de l'ADF/Cofiline :  
 $F-ADP \rightarrow F-ADP-ADF$
- $r_4$  la vitesse d'attachement coopératif de l'ADF/Cofiline :  
 $F-ADP-ADF \rightarrow F-ADP-2ADF$
- $r_5$  la vitesse de fragmentation de  $F-ADP-2ADF$

Chacune des réactions mentionnées suit une loi exponentielle de paramètre  $r_i$ . Si on considère le passage d'une sous-unité  $F-ATP$  à la forme  $F-ADP-2ADF$ , on a un mélange de lois exponentielles, donc la formation de  $F-ADP-2ADF$  suit la loi :

$$\mathcal{P}(F-ADP-2ADF, t) = 1 - \sum_{i=1}^4 K_i \exp(-r_i t)$$

avec  $K_i = \frac{\prod_{j \neq i} r_j}{\prod_{j \neq i} (r_j - r_i)}$ . Cette probabilité temporelle peut être transformée en probabilité spatiale, en considérant qu'une sous-unité ayant été polymérisée au temps 0 sera au temps  $t$  à la position  $x = \nu t$ , comptée en nombre de sous-unités, en notant  $\nu$  le **taux de polymérisation apparent**, c'est à dire le résultat de la polymérisation et de la dépolymérisation aux deux extrémités  $\nu = (k_B^+ + k_P^+)[G-ATP] - (k_B^- + k_P^-)$ . Ainsi,

$$\mathcal{P}(F-ADP-2ADF, x) = P(x) = 1 - \sum_{i=1}^4 K_i \exp\left(-\frac{r_i}{\nu} x\right) \quad (6.1)$$

## 6.2.2 Simulations

Les simulations ont été effectuées sans prendre en compte l'espace, selon l'algorithme de Gillespie (Gillespie, 1977). Chaque simulation laisse le filament évoluer

jusqu'à un état stationnaire où il polymérise et se fragmente. Après chaque fragmentation, on ne se préoccupe plus que du fragment contenant l'extrémité barbée, l'autre fragment étant ignoré pour la suite des simulations.

Par la suite, nous appellerons *conditions standard* les conditions expérimentales classiques pour l'étude de la polymérisation de l'actine en présence d'ADF/Cofiline, où le milieu réactionnel est composé de  $1.2 \mu M$  d'actine monomérique ATP et de  $1 \mu M$  d'ADF/Cofiline et la taux de polymérisation à l'extrémité barbée est de  $11.6 \mu M^{-1} s^{-1}$ , et le taux d'attachement de l'ADF/Cofiline est de  $0.0085 \mu M^{-1} s^{-1}$ . Les taux des différentes réactions sont donnés dans la table 6.1.

Réaction ou Espèce	Taux ou Concentration	Référence
Polymérisation G-ATP, ext. barbée, standard	$11.6 \mu M^{-1} s^{-1}$	[1]
Polymérisation G-ATP, ext. pointue	$1.4 \mu M^{-1} s^{-1}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, ext. barbée	$1.3 s^{-1}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, ext. pointue	$0.8 s^{-1}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, ext. barbée	$7.2 s^{-1}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, ext. pointue	$0.26 s^{-1}$	[1]
Hydrolyse F-ATP en F-ADP-Pi ( $r_1$ )	$0.35 s^{-1}$	[2]
Relargage du phosphate ( $r_2$ ) en présence d'ADF/cofilin (F-ADP-Pi en F-F-ADP)	$0.03 s^{-1}$	[3]
Association ADF et F-actine ( $r_3/[ADF]$ ) standard	$0.0085 \mu M^{-1} s^{-1}$	[4]
Association ADF et F-actine coopératif ( $r_4/[ADF]$ )	$8.82 \times r_3/[ADF]$	[4]
Dissociation ADF de F-actine	$0.005 s^{-1}$	[4]
Fragmentation par l'ADF ( $r_5$ )	$0.012 s^{-1}$	[4]
[G-Actin-ATP] standard	$1.2 \mu M$	-
[ADF/Cofiline] standard	$1 \mu M$	-

**FIG. 6.1** – Tableau des constantes utilisées pour les simulations – Références : [1] : Pollard (1986) ; [2] : Blanchoin et Pollard (2002) ; [3] : Carlier et Pantaloni (1986) ; [4] : Blanchoin et Pollard (1999) ; - : déterminé dans cette étude

### 6.2.3 Modèle analytique

#### Distribution des longueurs des filaments

Le modèle analytique est dérivé du modèle proposé par Edelstein-Keshet et Ermentrout (2001). On note  $F(L, t)$  la probabilité que le filament ait une taille  $L$  (comptée en nombre de sous-unités) au temps  $t$ . L'évolution d'un filament de taille  $L$  est influencée par (1) la polymérisation et la dépolymérisation aux deux extrémités, ainsi que par (2) la fragmentation quelque part sur une des  $L$  sous-unités du filament. D'autre part, (3) un filament de taille supérieure à  $L$  peut lui-même être fragmenté pour donner un

filament de taille  $L$ . Ces 3 contributions se retrouvent dans l'équation maîtresse :

$$\frac{\partial F(L, t)}{\partial t} = \nu(F(L-1, t) - F(L, t)) - r_5 F(L, t) \int_0^L P(s) ds + r_5 P(L) \int_L^\infty F(s, t) ds$$

où  $P(s)$  est la probabilité que la fragmentation se produise à la position  $s$ ,  $\nu$  le taux de polymérisation apparent.

On peut transformer l'équation précédente, en exprimant  $(F(L, t) - F(L-1, t))$  comme une approximation de la dérivée partielle de  $F$  par rapport à la position  $L$ .

$$\frac{\partial F(L, t)}{\partial t} = -\nu \frac{\partial F(L, t)}{\partial L} - r_5 F(L, t) \int_0^L P(s) ds + r_5 P(L) \int_L^\infty F(s, t) ds$$

D'où à l'état stationnaire :

$$\nu \frac{\partial F(L)}{\partial L} = -r_5 F(L) \int_0^L P(s) ds + r_5 P(L) \int_L^\infty F(s) ds$$

On pose  $Z(L) = \int_L^\infty F(s) ds$ . L'équation devient donc :

$$\begin{aligned} \nu \frac{\partial^2 Z(L)}{\partial L^2} &= -r_5 \frac{\partial Z(L)}{\partial L} \int_0^L P(s) ds - r_5 P(L) Z(L) \\ &= -r_5 \frac{\partial}{\partial L} \left\{ Z(L) \int_0^L P(s) ds \right\} \end{aligned}$$

Ainsi, en intégrant et en remarquant que  $Z(0) = 1$  et  $\lim_{L \rightarrow \infty} Z(L) = 0$ , on a :

$$Z(L) = \exp \left( -\frac{r_5}{\nu} \int_0^L \left\{ \int_0^\sigma P(s) ds \right\} d\sigma \right)$$

d'où

$$F(L) = \frac{r_5}{\nu} \left( \int_0^L P(s) ds \right) \exp \left( -\frac{r_5}{\nu} \int_0^L \left\{ \int_0^\sigma P(s) ds \right\} d\sigma \right)$$

En utilisant l'équation 6.1 :

$$F(L) = \frac{r_5}{\nu} P_1(L) \exp \left( -\frac{r_5}{\nu} P_2(L) \right) \quad (6.2)$$

avec

$$\begin{cases} P_1(L) &= \int_0^L P(s) ds &= L - \sum_{i=1}^4 K_i \frac{\nu}{r_i} (1 - \exp(-\frac{r_i}{\nu} L)) \\ P_2(L) &= \int_0^L P_1(s) ds &= \frac{L^2}{2} - L \sum_{i=1}^4 K_i \frac{\nu}{r_i} + \sum_{i=1}^4 K_i \left( \frac{\nu}{r_i} \right)^2 (1 - \exp(-\frac{r_i}{\nu} L)) \end{cases}$$

### Distribution des fragments relâchés en solution

Notons  $G(L, t)$  la probabilité d'avoir un fragment de taille  $L$  relâché en solution. Un fragment de taille  $L$  peut être produit à partir d'un filament de taille plus grande qui serait fragmenté à la  $N^{\text{ème}}$  sous-unité. Ceci se traduit par :

$$\begin{aligned} \frac{\partial G(L, t)}{\partial t} &= r_5 \int_0^\infty F(L+x, t) P(x) dx \\ &= \frac{r_5^2}{\nu} \int_0^\infty P(x) P_1(L+x) \exp\left(-\frac{r_5}{\nu} P_2(L+x)\right) dx \end{aligned} \quad (6.3)$$

Nous ne nous intéresserons pas par la suite à l'évolution de ces fragments mais seulement à leur taille au moment où ils sont créés par fragmentation. Ainsi, la quantité  $\frac{\partial G(L, t)}{\partial t}$  donne la distribution de leur taille au moment où ils sont créés.

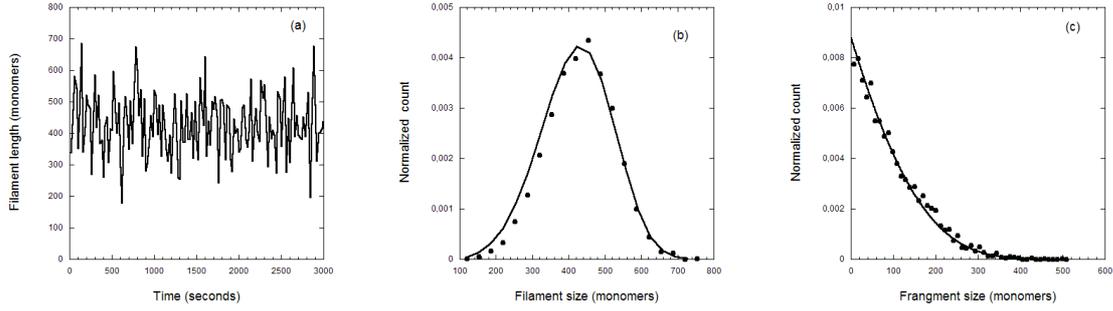
## 6.3 Régulation en longueur

Les expériences de A. Michelot et L. Blanchoin ont montré que l'ADF/Cofiline fragmente les filaments et permet des fluctuations autour d'une longueur moyenne. Les simulations stochastiques de l'élongation de filaments en présence d'ADF/Cofiline a permis d'étudier systématiquement l'influence des vitesses de polymérisation de l'actine et de l'attachement de l'ADF/Cofiline sur les distributions des longueurs des filaments et des fragments relâchés en solution. Il est en effet légitime de prendre comme paramètre pour l'étude la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofiline, puisque, d'une part elle dépend de la concentration variable de l'ADF/Cofiline et d'autre part, la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofiline sur les filaments a une influence directe sur la fragmentation. En effet, plus la vitesse d'attachement est élevée, plus le nombre de sites où pourra se produire une fragmentation est important. Le nombre de fragmentation par unité de temps va donc être augmenté.

### Distributions des tailles

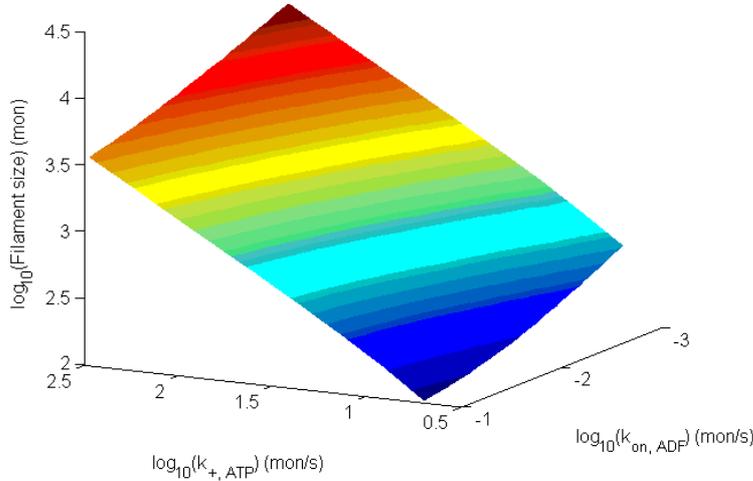
Dans les conditions standard de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofiline, la distribution de la taille des filaments, obtenue par simulation, ressemble à une distribution Gaussienne (figure 6.2B). Cependant, la régression des données avec une telle distribution n'est pas satisfaisant. Nous avons montré par l'étude analytique que cette distribution suit en fait une loi un peu plus compliquée faisant intervenir des composées d'exponentielles, comme le montre l'équation 6.2. On peut remarquer que la distribution obtenue par simulation est centrée autour d'une valeur non nulle.

D'autre part, nous avons obtenu par simulation la distribution des longueurs des fragments relâchés en solution. Cette distribution montre une forte prédominance des fragments courts (voir figure 6.2C), la décroissance de la distribution étant assez rapide (plus rapide qu'une exponentielle). L'analyse des équations permet de donner une expression de cette distribution (voir équation 6.3).



**FIG. 6.2 – Longueurs de filaments d’actine en présence d’ADF/Cofiline** – (A) Fluctuations de la longueur d’un filament en élongation en présence d’ADF/Cofiline. (B) Distributions simulée et analytique de la longueur d’un filament juste après sa fragmentation. (C) Distributions simulée et analytique de la longueur des fragments relâchés en solution juste après la fragmentation. Les simulations ont été effectuées dans les conditions standard de polymérisation et de fragmentation.

### Longueur moyenne



**FIG. 6.3 – Longueur moyenne des filaments d’actine après fragmentation** – La longueur moyenne est représentée en fonction des vitesses de polymérisation et d’attachement de l’ADF/Cofiline. Les 3 axes sont sur des échelles logarithmiques. La régression sur les données simulées donne un plan obtenu d’équation  $\langle L \rangle^{\log} = C^0 + \alpha v^{\log} + \beta r_4^{\log}$  où  $C^0$ ,  $\alpha$  et  $\beta$  ont été estimés numériquement :  $C^0 = 2.555$ ,  $\alpha = 0.869$ ,  $\beta = -0.288$  ; et analytiquement  $\alpha = \frac{5}{6} \simeq 0.833$  et  $\beta = -\frac{1}{3} \simeq -0.333$ .

L’analyse systématique des couples de paramètres a permis de mettre en évidence les propriétés des moyennes et des variances des longueurs des filaments en pré-

sence d'ADF/Cofline. On s'aperçoit que, pour une vitesse donnée d'attachement de l'ADF/Cofline, la longueur moyenne décroît de façon quasiment linéaire en fonction de la vitesse de polymérisation. De même, si on fixe cette dernière, on peut remarquer que la décroissance en fonction de la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofline n'est pas linéaire. La figure 6.3 montre que, si tous les axes sont sur des échelles logarithmiques, la surface représentant la moyenne des longueurs des filaments en fonction des vitesses de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofline est proche d'un plan. La régression sur les données donne l'équation du plan :

$$\langle L \rangle^{\log} = C^0 + \alpha \nu^{\log} + \beta r_4^{\log}$$

où  $C^0 = 2.555$ ,  $\alpha = 0.869$ ,  $\beta = -0.288$ .

Cette équation peut être approchée à partir d'une simplification de la distribution des longueurs dans le cas où la vitesse de polymérisation est grande devant les vitesses des autres réactions. Cette condition est toujours valide lorsque les concentrations d'actine sont au dessus de la concentration critique, c'est à dire lorsque le filament croît globalement. Ainsi, le développement limité de l'équation 6.1, qui donne la probabilité que le filament se fragmente au niveau de la sous-unité à la position  $L$ , a comme premier terme :

$$P(L) \simeq \frac{1}{5!} \frac{r_1 r_2 r_3 r_4}{\nu^4} L^5$$

En reportant dans l'équation 6.2, cette approximation permet de donner une expression de la distribution des longueurs :

$$F(L) \simeq \frac{1}{5!} \frac{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5}{\nu^5} L^5 \exp\left(-\frac{1}{6!} \frac{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5}{\nu^5} L^6\right)$$

Le calcul de la moyenne donne donc :

$$\begin{aligned} \langle L \rangle &= \int_0^\infty L F(L) dL \\ &= K_{\langle L \rangle} \left( \frac{\nu^5}{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5} \right)^{\frac{1}{6}} \end{aligned}$$

avec  $K_{\langle L \rangle} = \frac{\pi^{5/6} (\frac{2}{3})^{2/3}}{\Gamma(\frac{5}{6})} \simeq 2.77$  où  $\Gamma(z) = \int_0^\infty t^{(z-1)} \exp(-t) dt$ . Cette expression est assez proche de celle obtenue par les simulations et montre bien que, si on se place sur une échelle logarithmique, on a :

$$\langle L \rangle^{\log} = K'_{\langle L \rangle} + \frac{5}{6} \nu^{\log} - \frac{1}{3} r_4^{\log}$$

où les variables avec l'exposant "log" représentent les logarithmes décimaux de ces mêmes variables, et  $K'_{\langle L \rangle} = \log\left(\frac{K_{\langle L \rangle}}{(8.82 r_1 r_2 r_5)^{1/6}}\right)$ . Le facteur 1/3 vient du fait que dans le modèle  $r_4 = 8.82 \times r_3$ , c'est à dire que l'attachement coopératif de l'ADF/Cofline est 8.82 fois plus grand que l'attachement non coopératif (Blanchoin et Pollard, 1999).

Cette équation est donc bien l'équation d'un plan dont les coefficients sont très proches de ceux obtenus à partir des données simulées.

Si on étudie la variance de la distribution des longueurs des filaments, on a :

$$\begin{aligned} Var(L) &= \int_0^{\infty} L^2 F(L) dL - \langle L \rangle^2 \\ &= K_{Var} \left( \frac{\nu^5}{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5} \right)^{\frac{1}{3}} \end{aligned}$$

$$\text{avec } K_{Var} = \frac{4\pi 30^{\frac{1}{3}}}{\Gamma(\frac{2}{3})} \left( 1 - \frac{3\pi 2^{\frac{1}{3}}}{\Gamma(\frac{2}{3})^3} \right) \simeq 0.29$$

On peut remarquer que l'écart-type varie de la même manière que la moyenne, en  $\left( \frac{\nu^5}{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5} \right)^{\frac{1}{6}}$ . On s'aperçoit donc que l'écart type des fluctuations sera d'environ 20% ( qui est la valeur du rapport  $\sqrt{K_{Var}/K(L)}$ ) de la longueur moyenne, quelles que soient les vitesses de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofiline.

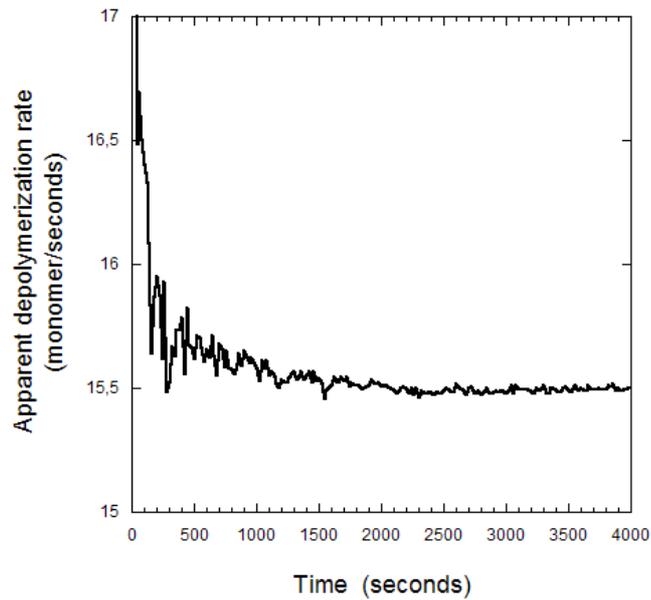
## 6.4 Accélération du turnover des filaments

### 6.4.1 Taux de dépolymérisation apparent

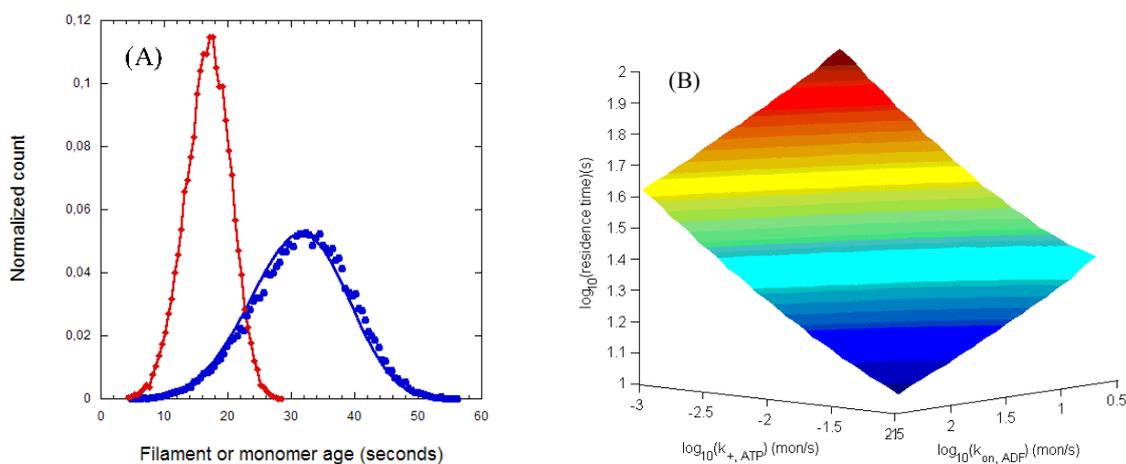
Outre une régulation en longueur, les simulations ont permis de montrer que l'ADF/Cofiline permet d'accélérer le *turnover*, c'est à dire le recyclage des monomères. Ceci signifie que ces derniers séjournent moins longtemps au sein du filament lorsqu'il y a de l'ADF/Cofiline que lorsqu'il n'y en a pas. Nous avons ainsi étudié l'évolution de la vitesse de *dépolymérisation apparente*. Cette vitesse représente la quantité de sous-unités de F-actine qui sont retirés du filament par unité de temps, que ce soit par dépolymérisation aux extrémités ou par relargage de fragments en solution, après coupure par l'ADF/Cofiline. La figure 6.4 montre l'évolution au cours du temps de la vitesse de dépolymérisation apparente dans les conditions standard. On s'aperçoit que cette vitesse se stabilise autour d'une valeur asymptotique qui est exactement égale à la somme des vitesses de polymérisation aux deux extrémités du filament, soit 15.6 monomères par secondes. Ceci montre que le filament atteint bien un état stationnaire où la dépolymérisation apparente compense exactement la polymérisation. Les simulations ont permis de montrer qu'un tel état stationnaire existe sur toute la gamme de vitesses de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofiline.

### 6.4.2 Temps de résidence des sous-unités au sein du filament

Afin de mettre en évidence le recyclage des monomères d'actine dû au turnover, nous avons aussi étudié le *temps de résidence* d'une sous-unité dans le filament, défini par le temps compris entre le moment où le monomère est incorporé au filament par polymérisation et le moment où il est relâché en solution par dépolymérisation ou après fragmentation. La figure 6.5A montre que pour 1.2  $\mu M$  de G-actin-ATP et 1



**FIG. 6.4 – Dépolymérisation apparente** – La dépolymérisation apparente du filament est la combinaison de la dépolymérisation aux extrémités et du relargage en solution de fragments de filaments coupés par l'ADF/Cofiline. Après un régime transitoire d'environ 1000 secondes, la dépolymérisation apparente se stabilise autour d'une valeur stationnaire d'environ 15.6 monomères par secondes et compense ainsi la polymérisation du filament, ce qui est la preuve d'un état stationnaire, correspondant à un turnover des monomères. Les simulations ont été effectuées dans les conditions standard (voir section 6.2.2).

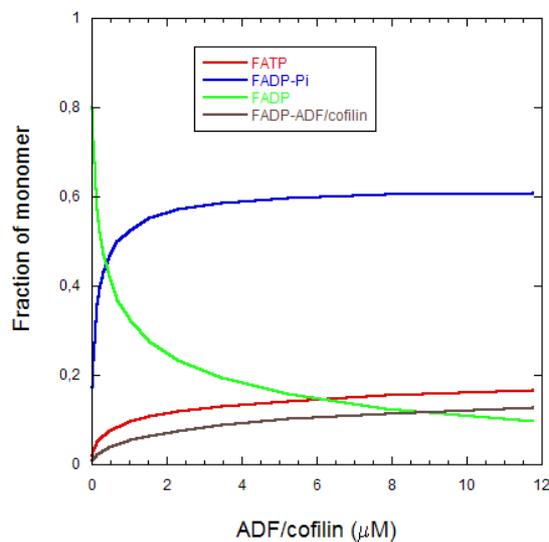


**FIG. 6.5 – Age des sous-unités au moment de la fragmentation** – (A) La courbe bleue représente la distribution des âges des sous-unités où s’effectue la fragmentation. La courbe en rouge représente la distribution de l’âge moyen des sous-unités dans le filament contenant l’extrémité barbée juste après la fragmentation. La figure montre que le filament contient des sous-unités jeunes et que la sous-unité où se produit la fragmentation a un temps de résidence de l’ordre de 35 secondes dans les conditions standard, ce qui signifie que le turnover est très rapide. (B) Age moyen de la sous-unité où se produit la fragmentation en fonction des vitesses de polymérisation et d’attachement de l’ADF/Cofilin estimé par simulation. La régression sur les données simulées donne un plan d’équation  $\langle L \rangle^{\log} = C^0 + \alpha \nu^{\log} + \beta r_4^{\log}$  où  $C^0$ ,  $\alpha$  et  $\beta$  ont été estimés numériquement :  $\alpha = -0.184$ ,  $\beta = -0.289$ ; et analytiquement  $\alpha = -\frac{1}{6} \simeq -0.167$  et  $\beta = -\frac{1}{3} \simeq -0.333$ .

$\mu M$  d'ADF/Cofilin, dans les conditions standard, la sous-unité où s'effectue la fragmentation a un âge qui se distribue autour d'une trentaine de secondes. L'expression de la distribution des âges des sous-unités où s'effectue la fragmentation est en fait la même que la distribution des longueurs (équation 6.2), en faisant le changement de variable  $t = L/\nu$ .

Ainsi, tout comme pour la taille moyenne des filaments, l'âge moyen des sous-unités où se produit la fragmentation en fonction des vitesses de polymérisation et d'attachement sera donc un plan, si on le représente sur une échelle logarithmique (figure 6.5B).

### 6.4.3 Composition du filament



**FIG. 6.6 – Composition du filament après fragmentation** – La figure donne la composition moyenne du filament après fragmentation en fonction de la concentration d'ADF/Cofilin dans les conditions standard de polymérisation. A partir de  $2 \mu M$ , le filament est principalement composé de sous-unités de type ADP-Pi et ATP.

Une des conséquences de l'accélération du turnover et de la diminution des âges des sous-unités dans le filament est que la composition de ce dernier va varier en fonction des vitesses de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofilin. La figure 6.6 montre la composition moyenne d'un filament après fragmentation, en fonction de la concentration d'ADF/Cofilin, dans les conditions standard. On s'aperçoit que plus il y a d'ADF/Cofilin, plus le filament contient, en proportion, de sous-unités d'actine sous la forme F-ADP-Pi. Ces dernières représentent près de 60% du filament, pour des concentrations supérieures à  $2 \mu M$ . La proportion de F-actine-ADP décroît aussi très rapidement. Ceci montre bien que la fragmentation permet de garder des sous-unités jeunes, ayant principalement un nucléotide ATP ou ADP-Pi. Notons que la croissance

de la proportion d'actine-ADP-Pi est très rapide et que même avec relativement peu d'ADF/Cofiline on peut changer de façon significative la composition du filament.

Ainsi, l'ADF/Cofiline permet de tirer la composition du filament vers des sous-unités ayant un nucléotide sous forme peu hydrolysée. Cette propriété est à mettre en relation avec la propriété de "rajeunissement" du filament montrée dans la section précédente. En effet, l'état d'hydrolyse du nucléotide dépend de l'âge de la sous-unité dans le filament.

Il faut aussi noter que le relargage du phosphate peut devenir le facteur limitant de la fragmentation puisque le filament tend à avoir de moins en moins de sites de fixation de l'ADF/Cofiline. Ainsi, l'efficacité de la fragmentation, c'est à dire le nombre d'événements de coupure comparé à la quantité d'ADF/Cofiline introduite en solution, tend à diminuer.

## 6.5 Discussion

### 6.5.1 Régulation en longueur et longueur moyenne en présence d'ADF/Cofiline

Les simulations et l'étude analytique de la fragmentation de filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline ont permis de mettre en évidence l'existence de fluctuations de la longueur des filaments autour d'une longueur moyenne, et ce, quelles que soient les vitesses de polymérisation et d'attachement de l'ADF/Cofiline. Ce résultat est assez remarquable puisque la régulation de la longueur des filaments ne nécessite que l'ADF/Cofiline et se produit quelle que soit sa concentration.

L'analyse des équations du système a permis de donner une expression analytique de cette longueur moyenne, dans le cas où la polymérisation est très rapide comparée à toutes les autres réactions qui se produisent au sein du filament. Cette condition est toujours vraie dans le cadre de la polymérisation de l'actine. La longueur moyenne est donc proportionnelle au rapport :

$$\frac{(k^+[G-ATP] - k^-)^{\frac{5}{6}}}{(k_{\text{attach}}[ADF])^{\frac{1}{3}}}$$

où  $k^+$  (respectivement  $k^-$ ) est la somme des taux de polymérisation (respectivement dépolymérisation) aux extrémités barbées et pointues,  $k_{\text{attach}}$  le taux d'attachement de l'ADF/Cofiline. De plus, nous avons montré que l'écart-type est systématiquement égal à 20% de la longueur moyenne. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils permettent d'estimer la longueur moyenne des filaments ainsi que l'amplitude des fluctuations pour n'importe quelle composition du milieu de polymérisation.

De plus, on peut remarquer que la dépendance en la vitesse de polymérisation de l'actine est quasiment linéaire alors que la dépendance dans la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofiline est en puissance 1/3. Ainsi, le système réactionnel sera beaucoup plus sensible à une variation de l'activité de la polymérisation qu'à celle de l'attachement de l'ADF/Cofiline. Une augmentation d'un ordre de grandeur de la concentration d'actine se traduira par une augmentation de la longueur moyenne d'environ 600%,

alors qu'une diminution de la concentration d'ADF/Cofilin d'un ordre de grandeur n'aura comme effet qu'une augmentation de 30% de la longueur moyenne.

### 6.5.2 Accélération du turnover

Si le système se stabilise autour d'une longueur moyenne, cela signifie que la dépolymérisation apparente compense la polymérisation du filament. Les simulations ont montré qu'en régime permanent, c'est effectivement le cas. Ce résultat est assez surprenant puisqu'il a comme conséquence que le turnover est largement accéléré. Ainsi, nous montrons que la seule hypothèse de fragmentation permet d'expliquer l'augmentation de la dépolymérisation et qu'il n'est pas nécessaire de considérer que l'ADF/Cofilin accélère la dépolymérisation 'naturelle' des sous-unités à l'extrémité pointue. Le mécanisme que nous proposons est donc une alternative à cette dernière hypothèse qui est communément admise pour l'ADF/Cofilin (Carlier *et al.*, 1997).

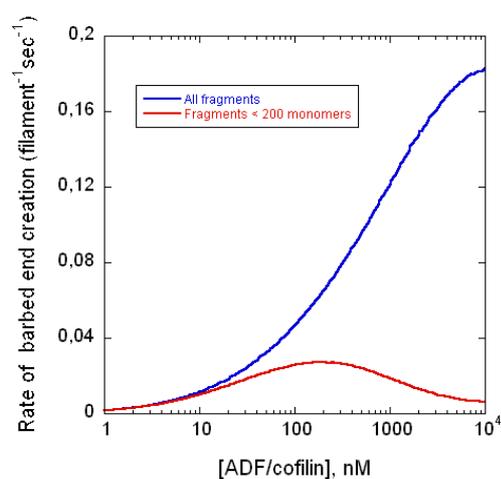
De plus, nous montrons que la dépolymérisation apparente engendrée par fragmentation des filaments permet des taux de dépolymérisation apparents aussi élevés que l'on veut puisqu'il compensent systématiquement la polymérisation et peuvent donc être tout à fait comparables aux taux mesurés *in vitro* ou *in vivo* (Theriot, 1997; Carlier *et al.*, 1999) .

Cependant, le taux de dépolymérisation global en solution est probablement moins élevé que la vitesse de dépolymérisation apparente que nous donnons. En effet, les fragments relâchés en solution ne vont pas dépolymériser instantanément. Néanmoins, nous avons montré que les fragments relâchés sont composés de sous-unités relativement "vieilles" (sous forme ADP ou ADP-ADF) qui pourront donc se faire fragmenter à nouveau ou dépolymériser assez rapidement. En revanche, s'il n'y a pas de protéines de coiffe pour les extrémités barbées, les fragments vont polymériser à nouveau dans la solution.

### 6.5.3 Discussion des résultats de Andrianantoandro et Pollard (2006)

A partir des conclusions du modèle nous pouvons discuter les conclusions de la récente étude de Andrianantoandro et Pollard (2006). Dans cet article, les auteurs ont étudié *in vitro*, en microscopie par ondes évanescentes, l'influence de la concentration de plusieurs protéines de la famille des ADF/Cofilin sur la fragmentation des filaments . Dans leurs conclusions, ils proposent que la fragmentation par l'ADF/Cofilin est optimale pour une concentration de quelques dizaines de nanomolaires et que, à forte concentration, l'ADF/Cofilin n'aurait plus les propriétés de fragmentation qu'elle a à faible concentration mais une propriété de nucléation de nouveaux filaments. Leurs conclusions semblent donc être contradictoires avec les hypothèses que nous avons retenues pour le modèle.

Cependant, nous avons montré que les fragments relâchés en solution ont une distribution strictement décroissante avec une décroissance assez rapide. Or la limite de résolution optique est de l'ordre de  $0.5 \mu\text{m}$ . Ainsi, à forte concentration, si



**FIG. 6.7 – Taux de création d’extrémités barbées** – La figure donne le taux création d’extrémités barbées qui correspond au nombre de fragmentation par filament et par secondes. La courbe bleu prend en compte tous les fragments créés, sans distinction de taille, la courbe rouge ne prend en compte que les fragments de plus de 200 sous-unités, c’est à dire plus grands que  $0.6 \mu m$  donc visibles en microscopie par ondes évanescentes. On remarque que l’efficacité apparente est maximale autour de  $200 nM$ .

l'ADF/Cofiline fragmente toujours les filaments, la grande majorité des fragments obtenus ne vont plus être visibles en microscopie. Ceci expliquerait les conclusions des auteurs quand à la perte des propriétés de fragmentation à forte concentration. La figure 6.7 montre que, sous les hypothèses de notre modèle, le nombre d'extrémités barbées créées par unité de temps est bien croissant avec la concentration d'ADF/Cofiline. Cependant, si on ne représente pas les fragments trop petits pour être visibles en microscopie par ondes évanescentes, le nombre de fragments créés par unité de temps va effectivement être maximal pour des concentrations de l'ordre de 200  $nM$ . Ces résultats montrent que les filaments non observables peuvent être la cause du maximum dans l'efficacité de coupure de l'ADF/Cofiline décrite par Andrianantoandro et Pollard. Notons que la concentration optimale que nous obtenons est supérieure à celle obtenue par les auteurs. Cependant, l'ADF/Cofiline de *S. Pombe* que ces derniers utilisent est plus active que celle qui a été considérée dans notre modèle. Par conséquent, la courbe qui pourrait être obtenue en prenant les constantes cinétiques de l'ADF/Cofiline de *S. Pombe* serait semblable à la figure 6.7 mais avec un décalage vers la gauche, ce qui permettrait d'observer une concentration optimale plus proche de ce que Andrianantoandro et Pollard ont obtenu.

De plus, en absence de protéines de coiffe (capping proteins), comme c'est le cas dans l'étude de Andrianantoandro et Pollard, les nombreux fragments de filaments en solution vont continuer à s'allonger à l'extrémité barbée et vont ainsi devenir assez long pour dépasser la limite de résolution optique de la microscopie par ondes évanescentes. Ainsi, la différence entre les filaments visibles et la courbe représentant tous les fragments pourrait représenter ce que les auteurs interprètent comme une nucléation due à une forte concentration d'ADF/Cofiline, puisque ces fragments, n'étant pas visibles au moment de leur création, vont devenir visibles en s'allongeant.

La fragmentation des filaments par l'ADF/Cofiline permet d'expliquer très simplement les résultats de Andrianantoandro et Pollard (2006). Ainsi, cette hypothèse est suffisante et l'hypothèse supplémentaire des auteurs, selon laquelle l'ADF/Cofiline en forte concentration pourrait se lier aux monomères d'actine globulaire et nucléaire des filaments, n'est pas nécessaire à l'observation de nouveaux filaments en solution.

#### 6.5.4 Conséquences *in vivo*

Contrairement au modèle de Andrianantoandro et Pollard, notre modèle pourrait assez bien expliquer comment une concentration locale élevée d'ADF/Cofiline peut stimuler l'assemblage de l'actine *in vivo* Ghosh *et al.* (2004) par la création de nouvelles extrémités issues de la fragmentation des filaments présents en solution. D'autre part, notre modèle permet d'expliquer le turnover rapide des sous-unités d'actine observables *in vivo* (Lappalainen et Drubin, 1997). En outre, l'ADF/Cofiline pourrait jouer un rôle important dans le maintien de structures dont la longueur est très peu variable, telles que les doigts des jonctions adhérentes (Delanoë-Ayari *et al.*, 2004).



# Bibliographie

- ANDREWS, S. S. et BRAY, D. (2004). Stochastic simulation of chemical reactions with spatial resolution and single molecule detail. *Phys Biol*, 1(3-4):137–151.
- ANDRIANANTOANDRO, E. et POLLARD, T. D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of adf/cofilin. *Mol Cell*, 24(1):13–23.
- BLANCHOIN, L. et POLLARD, T. D. (1999). Mechanism of interaction of *acanthamoeba* actophorin (adf/cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem*, 274(22):15538–15546.
- BLANCHOIN, L. et POLLARD, T. D. (2002). Hydrolysis of atp by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, 41(2):597–602.
- CAMERON, L. A., FOOTER, M. J., van OUDENAARDEN, A. et THERIOT, J. A. (1999). Motility of acta protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(9):4908–4913.
- CARLIER, M. F., LAURENT, V., SANTOLINI, J., MELKI, R., DIDRY, D., XIA, G. X., HONG, Y., CHUA, N. H. et PANTALONI, D. (1997). Actin depolymerizing factor (adf/cofilin) enhances the rate of filament turnover : implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136(6):1307–1322.
- CARLIER, M. F. et PANTALONI, D. (1986). Direct evidence for adp-pi-f-actin as the major intermediate in atp-actin polymerization. rate of dissociation of pi from actin filaments. *Biochemistry*, 25(24):7789–7792.
- CARLIER, M. F., RESSAD, F. et PANTALONI, D. (1999). Control of actin dynamics in cell motility. role of adf/cofilin. *J Biol Chem*, 274(48):33827–33830.
- CLAESSENS, M. M. A. E., BATHE, M., FREY, E. et BAUSCH, A. R. (2006). Actin-binding proteins sensitively mediate f-actin bundle stiffness. *Nat Mater*, 5(9):748–753.
- DELANOË-AYARI, H., LENZ, P., BREVIER, J., WEIDENHAUPT, M., VALLADE, M., GULINO, D., JOANNY, J. F. et RIVELINE, D. (2004). Periodic adhesive fingers between contacting cells. *Phys Rev Lett*, 93(10):108102.

- EDELSTEIN-KESHET, L. et ERMENTROUT, G. B. (2001). A model for actin-filament length distribution in a lamellipod. *J Math Biol*, 43(4):325–355.
- FAIX, J. et GROSSE, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev Cell*, 10(6):693–706.
- FERBER, J. (1995). *Les systèmes multi-agents*. InterEditions.
- FRANÇOIS, O. (2000). *Notes de cours de probabilités*. ENSIMAG-INPG.
- GALKIN, V. E., ORLOVA, A., VANLOOCK, M. S., SHVETSOV, A., REISLER, E. et EGELMAN, E. H. (2003). Adf/cofilin use an intrinsic mode of f-actin instability to disrupt actin filaments. *J Cell Biol*, 163(5):1057–1066.
- GASMAN, S., KALAIIDZIDIS, Y. et ZERIAL, M. (2003). Rhod regulates endosome dynamics through diaphanous-related formin and src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol*, 5(3):195–204.
- GHOSH, M., SONG, X., MOUNEIMNE, G., SIDANI, M., LAWRENCE, D. S. et CONDEELIS, J. S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science*, 304(5671):743–746.
- GIBSON, M. A. et BRUCK, J. (2000). Efficient exact stochastic simulation of chemical systems with many species and many channels. *J Phys Chem A*, 104(9):1876–1889.
- GILLESPIE, D. T. (1976). A general method for numerically simulating the stochastic time evolution of coupled chemical reactions. *J Comput Phys*, 22(4):403–434.
- GILLESPIE, D. T. (1977). Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *J Phys Chem*, 81(25):2340–2361.
- GILLESPIE, D. T. (2001). Approximate accelerated stochastic simulation of chemically reacting systems. *J Chem Phys*, 115(4):1716–1733.
- HATTNE, J., FANGE, D. et ELF, J. (2005). Stochastic reaction-diffusion simulation with mesord. *Bioinformatics*, 21(12):2923–2924.
- HIGASHIDA, C., MIYOSHI, T., FUJITA, A., OCEGUERA-YANEZ, F., MONYPENNY, J., ANDOU, Y., NARUMIYA, S. et WATANABE, N. (2004). Actin polymerization-driven molecular movement of mdia1 in living cells. *Science*, 303(5666):2007–2010.
- HIGGS, H. N. (2005). Formin proteins : a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*, 30(6):342–353.
- HOWARD, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates.
- KOBIELAK, A., PASOLLI, H. A. et FUCHS, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol*, 6(1):21–30.

- KOKA, S., NEUDAUER, C. L., LI, X., LEWIS, R. E., MCCARTHY, J. B. et WESTENDORF, J. J. (2003). The formin-homology-domain-containing protein fhod1 enhances cell migration. *J Cell Sci*, 116(Pt 9):1745–1755.
- KOVAR, D. R., HARRIS, E. S., MAHAFFY, R., HIGGS, H. N. et POLLARD, T. D. (2006). Control of the assembly of atp- and adp-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2):423–435.
- KUHN, J. R. et POLLARD, T. D. (2005). Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys J*, 88(2):1387–1402.
- LAPPALAINEN, P. et DRUBIN, D. G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*, 388(6637):78–82.
- MICHELOT, A., DERIVERY, E., PATERSKI-BOUJEMAA, R., GUÉRIN, C., HUANG, S., PARCY, F., STAIGER, C. J. et BLANCHOIN, L. (2006). A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr Biol*, 16(19):1924–1930.
- PELHAM, R. J. et CHANG, F. (2002). Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature*, 419(6902):82–86.
- PENG, J., WALLAR, B. J., FLANDERS, A., SWIATEK, P. J. et ALBERTS, A. S. (2003). Disruption of the diaphanous-related formin drf1 gene encoding mdia1 reveals a role for drf3 as an effector for cdc42. *Curr Biol*, 13(7):534–545.
- POLLARD, T. D. (1986). Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2):2747–2754.
- PRING, M., EVANGELISTA, M., BOONE, C., YANG, C. et ZIGMOND, S. H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*, 42(2):486–496.
- PROCHNIEWICZ, E., JANSON, N., THOMAS, D. D. et la CRUZ, E. M. D. (2005). Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J Mol Biol*, 353(5):990–1000.
- RATHINAM, M., PETZOLD, L., CAO, Y. et GILLESPIE, D. (2003). Stiffness in stochastic chemically reacting systems : The implicit tau-leaping method. *J Chem Phys*, 119(24):12784–12794.
- RIVELINE, D., ZAMIR, E., BALABAN, N. Q., SCHWARZ, U. S., ISHIZAKI, T., NARUMIYA, S., KAM, Z., GEIGER, B. et BERSHADSKY, A. D. (2001). Focal contacts as mechanosensors : externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mdia1-dependent and rock-independent mechanism. *J Cell Biol*, 153(6):1175–1186.

- ROMERO, S., CLAINCHE, C. L., DIDRY, D., EGILE, C., PANTALONI, D. et CARLIER, M.-F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated atp hydrolysis. *Cell*, 119(3):419–429.
- SAGOT, I., KLEE, S. K. et PELLMAN, D. (2002). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*, 4(1):42–50.
- STUKALIN, E. B. et KOLOMEISKY, A. B. (2006). Atp hydrolysis stimulates large length fluctuations in single actin filaments. *Biophys J*, 90(8):2673–2685.
- THERIOT, J. A. (1997). Accelerating on a treadmill : Adf/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J Cell Biol*, 136(6):1165–1168.
- TOMINAGA, T., SAHAI, E., CHARDIN, P., MCCORMICK, F., COURTNEIDGE, S. A. et ALBERTS, A. S. (2000). Diaphanous-related formins bridge rho gtpase and src tyrosine kinase signaling. *Mol Cell*, 5(1):13–25.
- van der GUCHT, J., PALUCH, E., PLASTINO, J. et SYKES, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(22):7847–7852.
- VAVYLONIS, D., YANG, Q. et O'SHAUGHNESSY, B. (2005). Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(24):8543–8548.

## Troisième partie

# Modèle déterministe du flambage de filaments d'actine



# Chapitre 7

## Mise en place du modèle

### 7.1 Contexte biologique

#### 7.1.1 Étude des forces produites par les formines

La plupart des formines connues polymérisent l'actine de façon processive (Romero *et al.*, 2004; Kovar et Pollard, 2004) et sont ainsi des vecteurs de la transduction de l'énergie chimique en énergie mécanique. La microscopie par ondes évanescentes est une méthode qui a récemment été utilisée pour mettre en évidence la production de forces par les formines (Kovar et Pollard, 2004).

Ainsi, (Kovar et Pollard, 2004) ont étudié des filaments d'actine maintenus dans le champ de l'onde évanescente par l'intermédiaire de formines et de myosines inactivées greffées sur la lame. Ce système expérimental permet l'élongation de filament dont l'extrémité barbée et une ou plusieurs sous-unités du filaments sont fixées sur la lame. Dans ces expériences, l'élongation processive des filaments contraints en au moins deux points les amène à flamber, c'est à dire à se tordre et à former une boucle, ou à se détacher si les contraintes sont trop fortes.

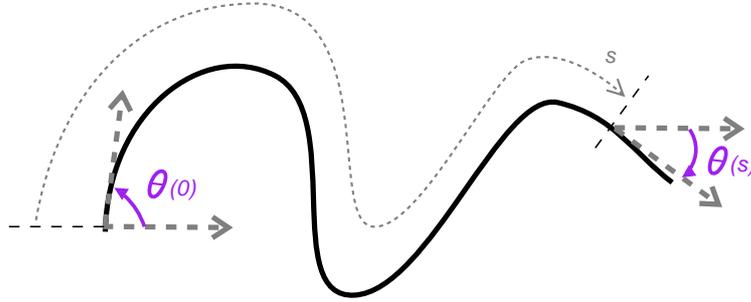
#### 7.1.2 Flambage dans le plan

Lors de ces expériences, même lorsque le flambage est important, les filaments restent entièrement dans le champ de l'onde évanescente. Ceci montre qu'on peut aisément considérer que le filament reste dans un plan au cours du flambage et justifie a posteriori l'utilisation de la microscopie en onde évanescente.

D'autre part, Kovar et Pollard ont ajouté de l'ARP2/3 dans la solution afin de savoir si le filament subit une torsion au cours de son élongation. Ils ont pu observer que la branche créée par Arp2/3 reste entièrement dans le champ de l'onde évanescente, ce qui suggère fortement qu'il n'y a pas de torsion.

## 7.2 Équations du modèle

### 7.2.1 Longueur de persistance



**FIG. 7.1 – Angles et longueur de persistance** – La longueur de persistance représente la distance typique telle que les tangentes au filament soient décorréelées :  $\langle \cos(\theta(s) - \theta(0)) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{2L_p}\right)$ .

Les filaments biologiques tels que l'actine et les microtubules sont considérés comme semi-flexibles (Howard, 2001) puisque, à la différence d'autres polymères biologiques tels que l'ADN, ils restent souvent quasiment droits et se tordent assez peu *in vivo*. Les filaments semi-flexibles sont caractérisés par le fait que leur longueur est proche d'une longueur caractéristique, intrinsèque au type de filament, appelée **longueur de persistance**, notée  $L_p$ . Elle représente la longueur au dessus de laquelle les fluctuations thermiques subies par le filament deviennent importantes. Plus formellement, en notant  $\theta(s)$  l'angle que fait la tangente au filament au point d'abscisse curviligne  $s$  avec un vecteur de référence (figure 7.1), plus  $s$  est grand, plus  $\theta(s)$  et  $\theta(0)$  vont être décorréelées, puisque la quantité (Howard, 2001) :

$$\langle \cos(\theta(s) - \theta(0)) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{2L_p}\right)$$

va devenir très petite.

La longueur de persistance est liée au module de flexion  $\kappa$  du filament, à la constante de Boltzmann  $k_B$  et à la température absolue  $T$  par la relation :

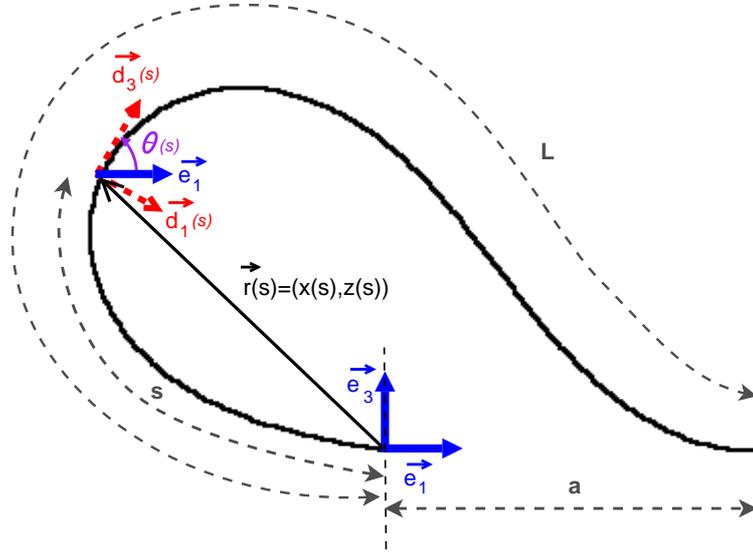
$$L_p = \frac{\kappa}{k_B T}$$

Notons que la longueur de persistance est une quantité spécifique à chaque type de filament ou faisceau de filaments. Un filament rigide est peu sensible aux fluctuations et a donc une longueur de persistance assez grande.

D'autre part, on peut encadrer la longueur de persistance d'un faisceau constitué de  $N$  filaments ayant tous la même longueur de persistance  $L_p$ . Selon la nature des liens entre les filaments du faisceau, sa longueur de persistance sera comprise entre  $N \times L_p$ , pour des liens faibles laissant les filaments coulisser les uns sur les autres, et  $N^2 \times L_p$  pour des filaments attachés les uns aux autres sur toute leur longueur.

Les filaments d'actine ont une longueur de persistance comprise entre  $9 \mu m$ , pour des filaments constitués d'actine-ADP, et  $15 \mu m$  pour des filaments ADP-Pi (Isambert *et al.*, 1995).

### 7.2.2 Notations



**FIG. 7.2 – Représentation géométrique d'un filament** – Un point sur le filament, à l'abscisse curviligne  $s$ , à la position  $\vec{r}(s)$ , est caractérisé par le repère matériel  $(\vec{d}_1(s), \vec{d}_3(s))$ , où  $\vec{d}_3(s)$  est la tangente au filament en ce point. Le repère fixe  $(\vec{e}_1, \vec{e}_3)$  permet de définir l'orientation globale du filament ;  $\theta(s)$  définit l'angle entre  $\vec{d}_3(s)$  et  $\vec{e}_1$  ; le vecteur joignant les points d'attache est  $a\vec{e}_1$ .

Le modèle des filaments d'actine que nous développons dans cette partie est basé sur les équations de barreau élastique, isotrope et inextensible de Kirchhoff (Dill, 1992) en 2 dimensions. La configuration d'un point du filament à l'abscisse curviligne  $s$  est définie par un couple de deux vecteurs

$$(\vec{r}(s), \vec{d}_1(s))$$

où  $\vec{r}(s)$  est la position du point et  $\vec{d}_1(s)$  est le vecteur orthogonal au filament en  $s$ . Ainsi, le vecteur tangent au filament en  $s$ , noté  $\vec{d}_3(s)$ , est défini par :

$$\frac{d\vec{r}}{ds}(s) = \vec{d}_3(s)$$

et le couple  $(\vec{d}_1(s), \vec{d}_3(s))$  forme un repère direct du plan.

Avec l'hypothèse d'absence de torsion du filament, les vecteurs  $\vec{r}(s)$ ,  $\vec{d}_1(s)$  et  $\vec{d}_3(s)$  restent dans le plan défini par les vecteurs unitaires de la base  $(\vec{e}_1, \vec{e}_3)$ .

On définit  $\theta(s)$  l'angle entre  $\vec{d}_3(s)$  et  $\vec{e}_1$ ,  $x(s)$  et  $z(s)$  les coordonnées cartésiennes du point du filament à la longueur d'arc  $s$ . On a donc :

$$\begin{aligned}\vec{r}(s) &= x(s) \vec{e}_1 + z(s) \vec{e}_3 \\ \vec{d}_3(s) &= \cos \theta(s) \vec{e}_1 + \sin \theta(s) \vec{e}_3 \\ \vec{d}_1(s) &= \sin \theta(s) \vec{e}_1 - \cos \theta(s) \vec{e}_3\end{aligned}$$

### 7.2.3 Formulation Lagrangienne

Nous allons écrire les équations statiques de la configuration d'un filament de longueur  $L$ , dont les deux extrémités sont maintenues à une distance  $a$  l'une de l'autre. Nous considérerons que le filament est toujours dans un état d'équilibre dynamique, ce qui sera justifié dans la section 7.7.1.

#### Énergie élastique

Notons  $\kappa$  le module de flexion. On peut le relier à la longueur de persistance par la relation suivante (Howard, 2001) :

$$\kappa = L_p k_B T$$

où  $k_B$  est la constante de Boltzmann et  $T$  est la température absolue.

L'énergie élastique d'un filament de longueur  $L$  est donc :

$$E_1 = \frac{\kappa}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds$$

#### Énergie potentielle

Notons  $\vec{N}^*$  la force interne au filament qui permet d'assurer l'inextensibilité du filament. Ainsi, toute déviation de la condition géométrique  $d\vec{r}(s)/ds = \vec{d}_3(s)$  contribue à l'énergie potentielle par :

$$E_2 = - \int_0^L \vec{N}^* \cdot \left( \frac{d\vec{r}(s)}{ds} - \vec{d}_3(s) \right) ds$$

#### Réaction avec la surface

Les forces de réaction avec la surface en  $s = 0$ , notée  $\vec{u}_0^*$ , et en  $s = L$ , notée  $\vec{u}_L^*$ , contribuent aussi au Lagrangien :

$$E_3 = \vec{u}_0^* \cdot \vec{r}(0) + \vec{u}_L^* \cdot (\vec{r}(L) - \vec{a})$$

avec  $\vec{a} = a\vec{e}_1$  le vecteur reliant les 2 extrémités du filament fixées à la lame.

### Lagrangien

Le Lagrangien s'écrit donc :

$$\begin{aligned} L_G^* &= -E_1 - E_2 + E_3 \\ &= -\frac{L_p k_B T}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds + \int_0^L \vec{N}^* \cdot \left( \frac{d\vec{r}}{ds} - \vec{d}_3 \right) ds + \vec{u}_0^* \cdot \vec{r}(0) + \vec{u}_L^* \cdot (\vec{r}(L) - \vec{a}) \end{aligned}$$

En normalisant par  $k_B T$ ,  $L_G = \frac{L_G^*}{k_B T}$ ,  $\vec{N} = \frac{\vec{N}^*}{k_B T}$ ,  $\vec{u}_{0,L} = \frac{\vec{u}_{0,L}^*}{k_B T}$ , :

$$L_G = -\frac{L_p}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds + \int_0^L \vec{N} \cdot \left( \frac{d\vec{r}}{ds} - \vec{d}_3 \right) ds + \vec{u}_0 \cdot \vec{r}(0) + \vec{u}_L \cdot (\vec{r}(L) - \vec{a}) \quad (7.1)$$

### 7.2.4 Équations d'Euler-Lagrange

Le principe de moindre action (Landau et Lifshitz, 1982) s'exprime, pour chaque variable  $q$  dont dépend le système et en notant  $\dot{q} = \frac{dq}{ds}$  et  $L_G = \int_0^L l(q, \dot{q}, s) ds$  :

$$\begin{aligned} \delta L_G &= \delta \left( \int_0^L l(q, \dot{q}, s) ds \right) \\ &= \int_0^L \left( \frac{\partial l}{\partial q} - \frac{d}{ds} \frac{\partial l}{\partial \dot{q}} \right) \delta q ds + \frac{\partial l}{\partial q}(L) \delta q(L) - \frac{\partial l}{\partial q}(0) \delta q(0) \\ &= 0 \end{aligned}$$

Cette relation doit être vérifiée pour toute variation  $\delta q$ . Ainsi, on a :

$$\begin{aligned} \frac{\partial l}{\partial q} - \frac{d}{ds} \left( \frac{\partial l}{\partial \dot{q}} \right) &= 0 \\ \frac{\partial l}{\partial \dot{q}}(L) &= 0 \\ \frac{\partial l}{\partial \dot{q}}(0) &= 0 \end{aligned}$$

On obtient ainsi les équations d'Euler-Lagrange :

$$\left\{ \begin{array}{l} L_p \frac{d^2\theta}{ds^2} = -N_1 \sin \theta + N_3 \cos \theta \\ \frac{d\vec{N}}{ds} = 0 \\ \frac{dx}{ds} = \cos \theta \\ \frac{dz}{ds} = \sin \theta \end{array} \right. \quad (7.2)$$

avec les conditions aux bords :

$$\begin{cases} \vec{u}_0 - \vec{N}(0) = 0 \\ \vec{u}_L + \vec{N}(L) = 0 \end{cases} \quad (7.3)$$

La première équation représente l'équilibre entre le moment de flexion et les contraintes exercées aux extrémités du filament ; elle est obtenue en différentiant par rapport à  $\theta$ . Les troisième et quatrième équations donnent les composantes du vecteur tangent au filament au point d'abscisse curviligne  $s$  ; elles sont obtenues en différentiant par rapport à la force  $\vec{N}$ .

Les quantités  $N_1$  et  $N_3$  sont les composantes de la force exercée aux extrémités et dépendent donc des conditions aux bords.

D'autre part, la deuxième équation du système 7.2, qui est obtenue en différentiant par rapport à  $\vec{r}$ , montre que la force exercée ne dépend pas de la position. Cette force est la même aux deux extrémités, ainsi que tout le long du filament.

## 7.3 Conditions aux bords

### 7.3.1 Contraintes de position

Les extrémités du filament sont contraintes à rester fixes aux points de coordonnées  $(0, 0)$  et  $(L, 0)$ . Cela se traduit par

$$\begin{aligned} x(0) &= 0, & z(0) &= 0 \\ x(L) &= a, & z(L) &= 0 \end{aligned}$$

### 7.3.2 Contraintes angulaires

On doit aussi donner des conditions aux bords pour le comportement du filament à ces extrémités. Deux types de conditions peuvent exister :

1. l'extrémité du filament peut être contrainte à avoir une tangente fixe : c'est le cas où plusieurs attaches (des myosines et éventuellement une formine à l'extrémité barbée) relient le filament à la lame. Cette relation s'exprime par la relation :

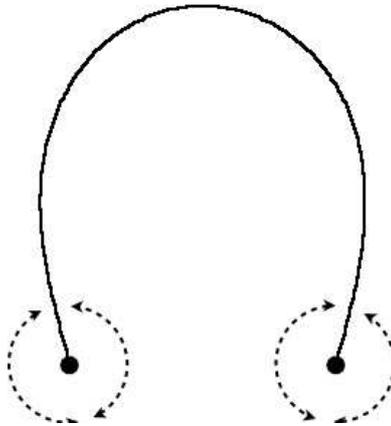
$$\begin{cases} \theta(0) = 0 \\ \text{ou} \\ \theta(L) = 0 \end{cases}$$

2. l'extrémité du filament peut tourner librement autour du point d'attache : c'est le cas si une formine seulement fait le lien entre l'extrémité et la lame. Cette relation s'exprime, en  $s = 0$  ou  $s = L$ , par la relation :

$$\left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0,L} = 0$$

On a donc 3 combinaisons possibles de ces conditions au bord :

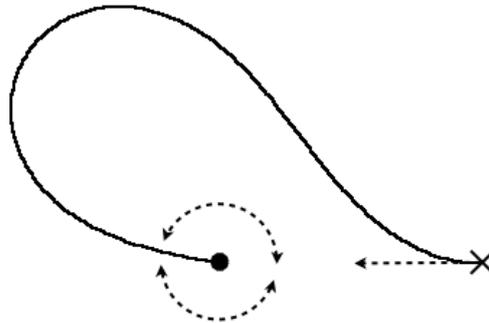
## Les deux extrémités peuvent pivoter librement



**FIG. 7.3 – Conditions aux bords BC1** – Les deux extrémités du filament peuvent pivoter librement autour des deux points d'attache.

$$BC1 : \begin{cases} \frac{d\theta}{ds}(s=0) = 0 \\ \frac{d\theta}{ds}(s=L) = 0 \end{cases}$$

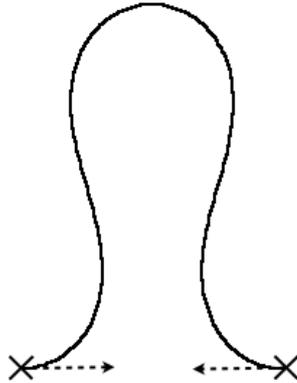
## Une extrémité a une tangente fixée et l'autre peut pivoter librement



**FIG. 7.4 – Conditions aux bords BC2** – L'extrémité de gauche ( $x(0) = 0$ ) du filament peut pivoter librement autour de son point d'attache ; L'extrémité de droite ( $x(L) = a$ ) du filament a une tangente fixée, colinéaire à  $\vec{e}_1$  ( $\theta(L) = 0$ ).

$$BC2 : \begin{cases} \frac{d\theta}{ds}(s=0) = 0 \\ \theta(s=L) = 0 \end{cases}$$

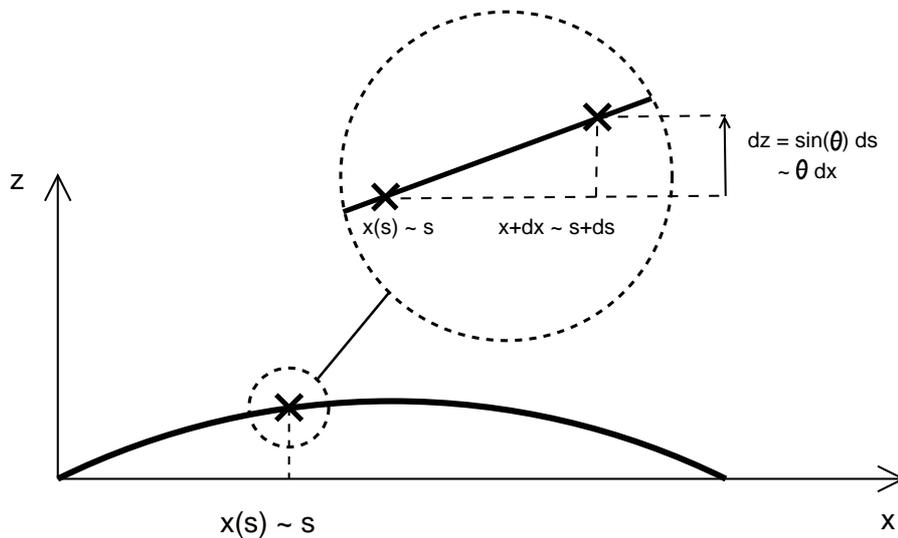
Les deux tangentes aux extrémités sont fixées



**FIG. 7.5 – Conditions aux bords BC3** – Les deux extrémités du filament ont une tangente fixée, colinéaire à  $\vec{e}_1$  ( $\theta(0) = 0$  et  $\theta(L) = 0$ ).

$$BC3 : \begin{cases} \theta(s=0) = 0 \\ \theta(s=L) = 0 \end{cases}$$

## 7.4 Cas classique des petites amplitudes avec les conditions BC1



**FIG. 7.6 – Petites amplitudes** – Dans le cas des petites amplitudes, on peut confondre  $s$  et  $x(s)$ ,  $dx/ds$  et  $\cos(\theta) \simeq 1 - \theta^2/2$ ,  $dz/ds$  et  $\sin(\theta) \simeq \theta$

Dans le cas où les 2 extrémités peuvent pivoter librement autour du point d'attache et dans le cas où les angles sont faibles, c'est à dire si la longueur du filament est proche de la distance entre les 2 points d'attache (voir figure 7.6), on a  $s \simeq x(s)$ . On a donc  $dz/ds \simeq dz/dx \simeq \sin \theta \simeq \theta$ . Par conséquent,  $d^2z/dx^2 \simeq d\theta/ds$ .

D'autre part, comme le filament est presque droit, la force  $\vec{N}$  est dirigée selon  $\vec{e}_1$  uniquement et la composante verticale  $N_3$  est nulle (voir aussi la section 7.6.1).

Ainsi, en remplaçant dans la première équation d'Euler-Lagrange, on retrouve l'équation différentielle linéaire classique (Howard, 2001) :

$$L_p \frac{d^4 z}{dx^4} + N_1 \frac{d^2 z}{dx^2} = 0$$

## 7.5 Normalisation des équations

### 7.5.1 Forme normalisée

On peut normaliser les équations d'Euler-Lagrange par la longueur totale du filament  $L$ . On se retrouve ainsi avec un système d'équation sans paramètre :

$$\begin{cases} \frac{d^2 \theta}{d\sigma^2} = -n_1 \sin \theta + n_3 \cos \theta \\ \frac{d\xi}{d\sigma} = \cos \theta \\ \frac{d\zeta}{d\sigma} = \sin \theta \end{cases}$$

où

$$\sigma = \frac{s}{L}, \quad \xi = \frac{x}{L}, \quad \zeta = \frac{z}{L}, \quad n_i = \frac{L^2}{L_p} N_i$$

L'absence de paramètre dans ces équations normalisées présente l'intérêt de mettre en évidence les propriétés des solutions, indépendamment du problème initial. Il sont tous équivalents, à un changement d'échelle près.

### 7.5.2 Conditions aux bords

Avec les variables normalisées, les contraintes de position des extrémités se transforment en :

$$\begin{aligned} \xi(0) &= 0, & \zeta(0) &= 0 \\ \xi(1) &= \frac{a}{L}, & \zeta(1) &= 0 \end{aligned}$$

Les contraintes angulaires aux extrémités se transforment en :

#### Les deux extrémités peuvent pivoter librement

$$\widetilde{BC1} : \begin{cases} \frac{d\theta}{d\sigma}(\sigma = 0) = 0 \\ \frac{d\theta}{d\sigma}(\sigma = 1) = 0 \end{cases}$$

Une extrémité a une tangente fixée et l'autre peut pivoter librement

$$\widetilde{BC2} : \begin{cases} \frac{d\theta}{d\sigma}(\sigma = 0) = 0 \\ \theta(\sigma = 1) = 0 \end{cases}$$

Les deux tangentes aux extrémités sont fixées

$$\widetilde{BC3} : \begin{cases} \theta(\sigma = 0) = 0 \\ \theta(\sigma = 1) = 0 \end{cases}$$

## 7.6 Analyse des configurations initiales

Les équations du flambage peuvent être résolues de façon exacte en utilisant les fonctions elliptiques de Jacobi. Elles ont une infinité de solutions, correspondant aux différentes harmoniques, dues aux conditions aux bords.

Pendant, dans cette section nous allons donner une expression de  $\theta$  et des forces internes  $N_1$  et  $N_3$  dans le cas de filaments faiblement courbés, c'est à dire dans le cas où la longueur du filament est proche de la distance entre les 2 extrémités :  $L \simeq a$ . Ainsi, nous développerons les solutions au premier ordre en  $\delta = 1 - a/L$  qui sera donc proche de 0.

Rappelons que dans ce cas, on a  $\frac{dz}{ds} \simeq \sin(\theta) \simeq \theta$  et  $\frac{dx}{ds} \simeq \cos(\theta) \simeq 1 - \theta^2/2$ .

### 7.6.1 Solutions avec les conditions aux bords BC1

Force  $N$

En intégrant directement la première équation du système de Euler-Lagrange 7.2 :

$$\begin{aligned} L_p \int_0^L \frac{d^2\theta}{ds^2} ds &= \int_0^L \{-N_1 \sin \theta + N_3 \cos \theta\} ds \\ \implies L_p \left( \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=L} - \left( \frac{d\theta}{ds} \right)_{s=0} \right) &= -N_1 \int_0^L \frac{dz}{ds} ds + N_3 \int_0^L \frac{dx}{ds} ds \end{aligned}$$

Les conditions BC1 permettent de rendre nul le terme du membre de gauche. On a donc

$$\begin{aligned} 0 &= -N_1 (z(L) - z(0)) + N_3 (x(L) - x(0)) \\ \implies 0 &= aN_3 \end{aligned}$$

grâce aux contraintes géométriques de position des extrémités.

Cette dernière équation implique  $N_3 = 0$  ce qui signifie que la force qui permet de maintenir les deux extrémités du filament est uniquement dirigée le long du filament et la composante verticale est nulle.

**Angle du vecteur tangent  $\theta$** 

On peut maintenant linéariser le sinus dans la première équation du système de Euler-Lagrange 7.2 (le terme en cosinus s'annule, d'après ce que nous avons montré précédemment sur  $N_3$ )

$$L_p \frac{d^2\theta}{ds^2} = -N_1\theta$$

Les solutions élémentaires qui satisfont l'équation précédente et les conditions au bord BC1 sont de la forme :

$$\theta_k(s) = \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right)$$

avec  $N_k = \left(\frac{k\pi}{L}\right)^2 L_p$

Ainsi, toutes les solutions de l'équation avec les conditions BC1 peuvent s'écrire comme la somme de ces solutions élémentaires (c'est en fait sa série de Fourier) :

$$\theta(s) = \sum_{k=1}^{\infty} A_k \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right)$$

En fait on a forcément un nombre fini de termes, puisque chaque mode est associé à une énergie moyenne  $\frac{1}{2}k_B T$ , donc s'il n'y avait pas un nombre fini de termes, l'énergie totale serait infinie. En ne gardant que les  $N_c$  premiers, on a donc :

$$\theta(s) = A_1 \cos\left(\frac{\pi s}{L}\right) + A_2 \cos\left(\frac{2\pi s}{L}\right) + \dots + A_{N_c} \cos\left(\frac{N_c \pi s}{L}\right)$$

Pour obtenir une expression de l'abscisse en fonction de la longueur d'arc, il suffit d'intégrer  $dx/ds$ , qui, avec l'approximation  $L \simeq a$  donne :

$$\begin{aligned} \frac{dx}{ds} &= \cos\theta \simeq 1 - \frac{\theta^2}{2} \\ &= 1 - \frac{1}{2} \left( \sum_{k=1}^{N_c} A_k \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right) \right)^2 \\ &= 1 - \frac{1}{2} \left\{ \sum_{k=1}^{N_c} A_k^2 \cos^2\left(\frac{k\pi s}{L}\right) + \sum_{k,l=1; k \neq l}^{N_c} A_k A_l \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right) \cos\left(\frac{l\pi s}{L}\right) \right\} \\ &= 1 - \frac{1}{2} \left\{ \sum_{k=1}^{N_c} A_k^2 \cos^2\left(\frac{k\pi s}{L}\right) + \sum_{k,l=1; k \neq l}^{N_c} \frac{A_k A_l}{2} \left( \cos\left(\frac{(k-l)\pi s}{L}\right) + \cos\left(\frac{(k+l)\pi s}{L}\right) \right) \right\} \end{aligned}$$

D'où, en intégrant entre 0 et  $L$  :

$$x(L) - x(0) = L - \frac{L}{4} \sum_{k=1}^{N_c} A_k^2$$

Et comme on a  $x(L) = a$  et  $x(0) = 0$ ,

$$\sum_{k=1}^{N_c} A_k^2 = 4 \left(1 - \frac{a}{L}\right) = \mathcal{O}(\delta)$$

Si on limite la série de Fourier au premier terme, c'est à dire au premier mode, on a

$$\theta(s) = 2\sqrt{1 - \frac{a}{L}} \cos\left(\frac{\pi s}{L}\right)$$

et

$$N_1 = \left(\frac{\pi}{L}\right)^2 L_p, \quad N_3 = 0$$

### 7.6.2 Solutions avec les conditions aux bords BC2

Comme les conditions BC2 sont asymétriques les composantes  $N_1$  et  $N_3$  sont toutes les deux non nulles. L'équation linéarisée de l'équilibre des moments s'écrit :

$$L_p \frac{d^2\theta}{ds^2} = -N_1\theta + N_3$$

Ainsi, pour vérifier les conditions aux bords, on a :

$$\theta(s) = \frac{N_3 \cos(\alpha L) - \cos(\alpha s)}{N_1 \cos(\alpha L)}$$

où  $\alpha$  est positif et est donné par la relation

$$\tan(\alpha L) = \alpha L$$

La liste des solutions commence par les valeurs  $\alpha_1 \simeq 4.493$ ,  $\alpha_2 \simeq 10.904$ ,  $\alpha_3 \simeq 17.220$ . L'expression asymptotique de  $\alpha$  est donnée par la relation  $\alpha_k = \xi_k/L$  où  $\xi_k = \frac{2(2k-1)+1}{2}\pi$ .

En supposant que  $N_3$  est en  $\mathcal{O}(\delta^{1/2})$ , on a :

$$\begin{aligned} N_1 &= \left(\frac{\xi_k}{L}\right)^2 L_p \\ N_3 &= \left(\frac{\xi_k}{L}\right)^2 L_p \frac{2\xi_k \cos^2(\xi_k)}{\sqrt{\xi_k^2(1 + 2\cos(\xi_k)) - 3\cos^2(\xi_k)}} \delta^{1/2} \\ \theta(s) &= \frac{2\xi_k}{\sqrt{\xi_k^2(1 + 2\cos(\xi_k)) - 3\cos^2(\xi_k)}} \left(\cos(\xi_k) - \cos\left(\xi_k \frac{s}{L}\right)\right) \delta^{1/2} \end{aligned}$$

### 7.6.3 Solutions avec les conditions aux bords BC3

Comme dans la condition BC1, les conditions BC3 sont symétriques et impliquent une composante verticale pour la force  $N_3$  nulle. Ainsi, l'équation linéarisée de l'équilibre des moments s'écrit :

$$L_p \frac{d^2\theta}{ds^2} = -N_1\theta$$

D'où :

$$N_1 = \left( \frac{2k\pi}{L} \right)^2 L_p$$

$$N_3 = 0$$

$$\theta(s) = 2 \sin \left( 2k\pi \frac{s}{L} \right) \delta^{1/2}$$

Notons que l'on a uniquement les harmoniques paires à cause de la condition  $z(L) = 0$ .

## 7.7 Justification de l'approche employée

Les équations que nous employons dans ce modèle sont des équations à l'état stationnaire. Nous pouvons justifier cette approche par le fait que les temps de relaxation des différentes configurations sont assez faibles.

### 7.7.1 Équations à l'état stationnaire

#### Temps de relaxation

En se mettant dans le cas où on peut linéariser les équations, c'est à dire lorsque la longueur du filament est proche de la distance entre les points d'attache ( $L \simeq a$ ), et en rajoutant un terme correspondant aux forces visqueuses, on obtient l'équation (Gittes *et al.*, 1993) :

$$L_p \frac{\partial^4 \theta}{\partial s^4} + N_1 \frac{\partial^2 \theta}{\partial s^2} = -\frac{c}{k_B T} \frac{\partial \theta}{\partial t}$$

où  $c$  est le coefficient de friction perpendiculaire d'un filament évoluant à une altitude  $h$  d'une surface plane (Brennen et Winet, 1977) :

$$c = \frac{4\pi\eta}{\ln\left(\frac{2h}{r}\right)}$$

où  $\eta$  est la viscosité du fluide et  $r$  est le rayon de la section du filament.

Dans les conditions BC1 (les deux extrémités peuvent pivoter librement), le temps de relaxation du  $k^{ime}$  mode de flexion est :

$$\tau_k = \frac{4c}{L_p k_B T} \left( \frac{L}{k\pi} \right)^4$$

## Ordres de grandeurs

Dans les expériences de Kovar et Pollard (2004) et Michelot et Blanchoin (communication personnelle) sur lesquelles se base notre étude, le milieu est relativement visqueux et  $\eta = 0.07 \text{ Pa}\cdot\text{sec}^{-1}$ . On a aussi  $h = 500 \text{ nm}$ , qui est de l'ordre de grandeur de la profondeur du champ d'observation en microscopie par ondes évanescentes, et  $r = 4 \text{ nm}$  qui est l'ordre de grandeur de la section d'un filament. En prenant une longueur de persistance  $L_p = 15 \text{ }\mu\text{m}$  et un filament dont la longueur est entre  $0.2 \text{ }\mu\text{m}$  et  $1 \text{ }\mu\text{m}$ , les temps de relaxation du premier mode se situent dans l'intervalle :

$$0.17 \text{ ms} \leq \tau_1 \leq 107 \text{ ms}$$

Par conséquent, comme les temps de relaxation des autres modes sont inférieurs à celui du premier mode, tous les temps de relaxation sont très faibles et l'étude des états d'équilibre seuls est justifiée.

### 7.7.2 Fluctuations et transitions entre les différents modes

#### Transitions entre les modes

L'approche déterministe utilisée néglige les fluctuations et les transitions entre les différentes solutions. Pour justifier cette approche, nous allons estimer le nombre de configurations à l'équilibre pour des polymères semi-rigides de longueur variable  $L$  et de longueur de persistance  $L_p$  dont les extrémités sont fixées à une distance constante  $a$ , comme étudié dans (Wilhelm et Frey, 1996).

Pour des longueurs de persistance entre 10 et  $15 \text{ }\mu\text{m}$ , ce qui est l'ordre de grandeur pour les filaments d'actine, si on considère toutes les configurations possibles pour un filament dont la longueur  $L$  varie, 99% d'entre elles se situent pour des filaments de longueur proche de la longueur initiale du filament :

$$a \leq L \leq a + 10d$$

où  $d$  est le diamètre d'un monomère d'actine ( $d \simeq 6 \text{ nm}$ ).

Ainsi, pour des rapports  $a/L$  inférieurs à 0.95, c'est à dire pour des filaments plus long d'au moins 5% que  $a$ , le nombre de configurations compatibles avec les contraintes est faible, et par conséquent, on peut se limiter aux configurations de plus petite énergie.

D'autre part, la physique des polymères semi-flexibles prédit une transition entre les régimes rigides et flexibles pour des longueurs grandes devant la longueur de persistance (environ 3 fois plus grandes (Samuel et Sinha, 2002)). Ainsi, pour des filaments très longs (environ 30 à  $45 \text{ }\mu\text{m}$ ), le modèle que nous étudions ici n'est plus valide. Cependant, des filaments d'une telle longueur sont rares *in vivo*. Ainsi, nous pouvons dire que notre approche est tout à fait valide dans l'intervalle :

$$\frac{a}{0.95} \leq L \leq 2L_p$$

**Domaine de validité**

Dans les expériences de flambage de filaments d'actine de Kovar et Pollard (2004) et Michelot et Blanchoin (communication personnelle), le flambage est observé pour des longueurs de filaments entre  $0.7 \mu m$  et  $10 \mu m$ . Ainsi, le rapport  $L/L_p$  varie de 0.05 à 0.6, bien en dessous de la limite de validité du modèle.

D'autre part, la vitesse de l'élongation du filament est élevée et par conséquent le rapport  $a/L$  tombe très rapidement en dessous de la limite de 0.95.

Ainsi, les expériences sur lesquelles nous basons notre étude sont toujours dans le domaine de validité de notre approche déterministe de la mécanique d'un filament au cours de son flambage.

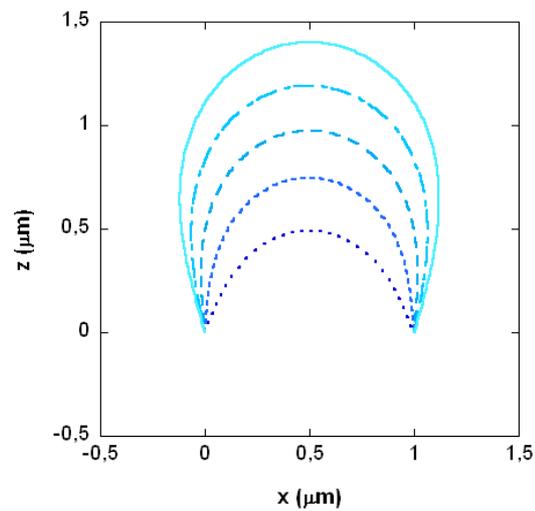
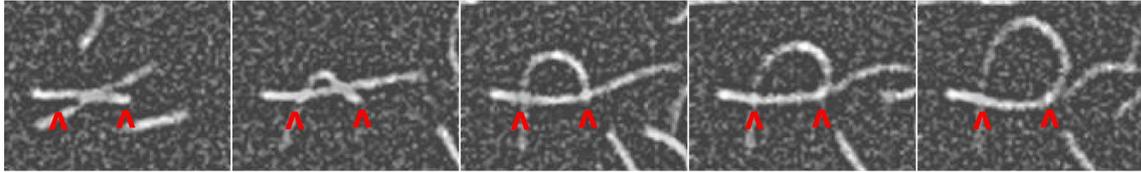


# Chapitre 8

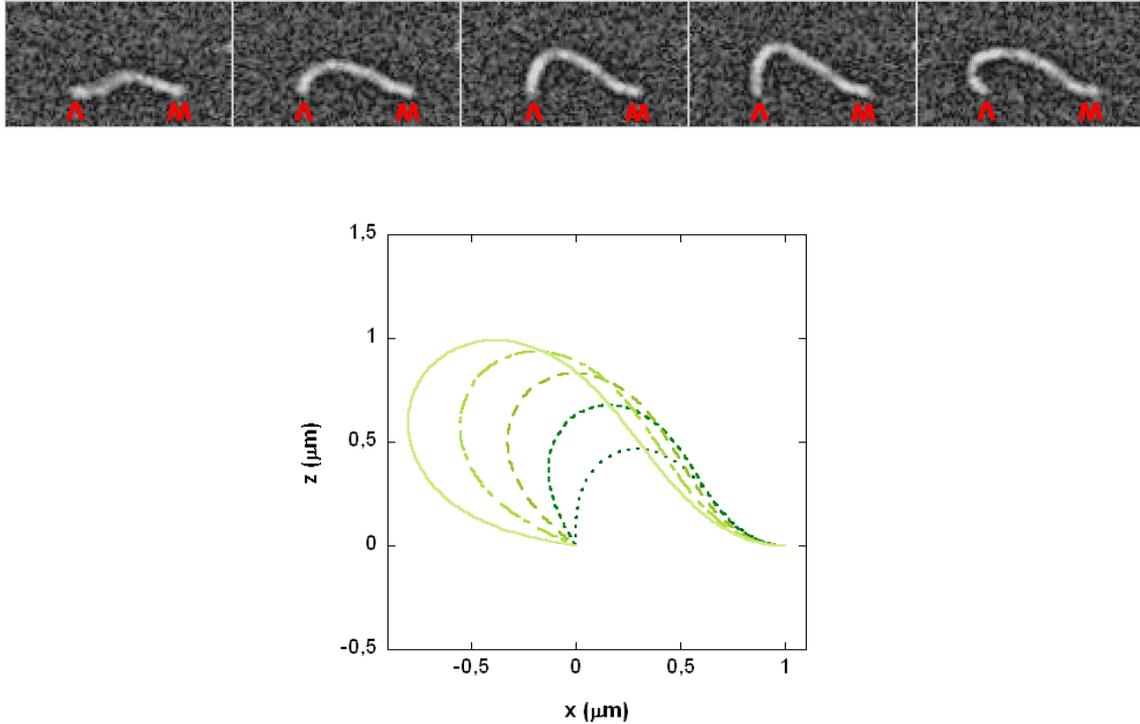
## Résultats

### 8.1 Configurations des filaments

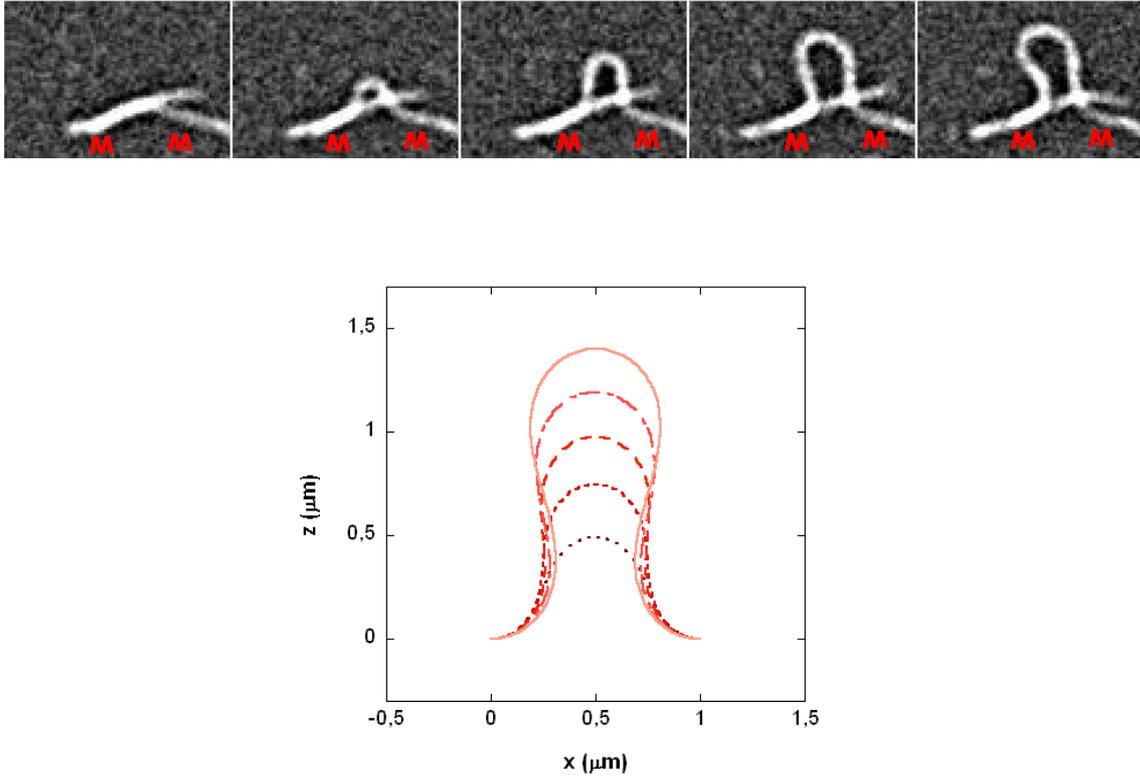
Les configurations des filaments prédites par les équations 7.2, 7.3 et les différentes conditions aux bords BC1, BC2, BC3 (figure 8.1, 8.2 et 8.3), sont en très bon accord avec les résultats expérimentaux (voir aussi la figure 3 de (Kovar et Pollard, 2004)). Le modèle montre que les 3 jeux de conditions aux bords BC1, BC2, BC3 peuvent se produire dans des conditions réalistes, selon le nombre de points d'attache entre les extrémités des filaments et les myosines ou les formines attachées à la surface de la lame. Dans les figures 8.2, 8.3, nous avons fixé une tangente horizontale à une (ou deux) extrémité(s). Cependant, d'autres tangentes sont possibles mais donnent des résultats qualitativement similaires.



**FIG. 8.1 – Conditions BC1 : Comparaison entre les configurations théoriques et expérimentales** – Configurations (a) théoriques et (b) expérimentales d'un filament flambant dans les conditions aux bords BC1 : les deux extrémités peuvent pivoter librement. (a) Les configurations expérimentales ont été observées en présence de GST-mDia1-FH1-FH2 et de NEM-Myosine II attachées à la lame. La distance entre les points d'attache est de  $3 \mu\text{m}$ . Les images ont été prises toutes les 15 secondes. Images fournies par David Kovar (non publiées). (b) Les configurations théoriques ont été calculées pour une distance entre les points d'attache de  $1 \mu\text{m}$  et une longueur de filament variant de  $1.5$  à  $3.5 \mu\text{m}$ .

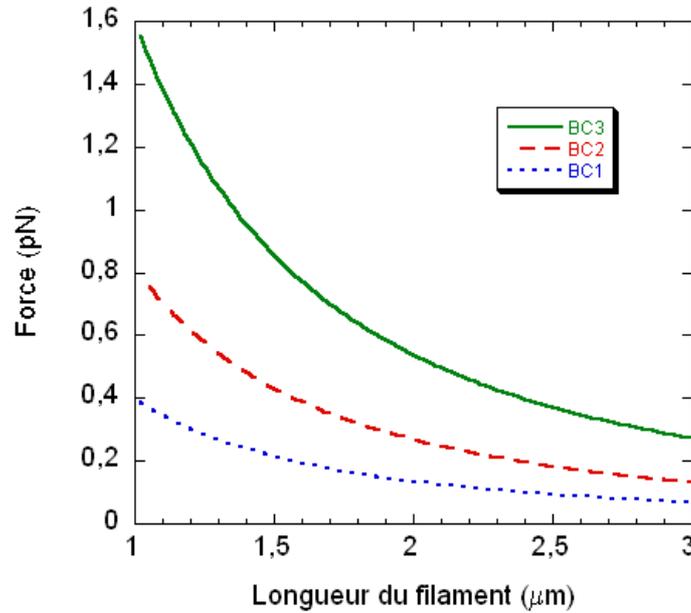


**FIG. 8.2 – Conditions BC2 : Comparaison entre les configurations théoriques et expérimentales** – Configurations (a) théoriques et (b) expérimentales d'un filament flambant dans les conditions aux bords BC2 : l'extrémité de gauche peut pivoter librement, l'extrémité de droite a une tangente fixe. (a) Les configurations expérimentales ont été observées en présence de GST-mDia1-FH1-FH2 et de NEM-Myosine II attachées à la lame. La distance entre les points d'attache est de  $5 \mu m$ . Les images ont été prises toutes les 15 secondes. Images fournies par Alphée Michelot et Laurent Blanchoin. (b) Les configurations théoriques ont été calculées pour une distance entre les points d'attache de  $1 \mu m$  et une longueur de filament variant de  $1.5$  à  $3.5 \mu m$ .



**FIG. 8.3 – Conditions BC3 : Comparaison entre les configurations théoriques et expérimentales** – Configurations (a) théoriques et (b) expérimentales d'un filament flambant dans les conditions aux bords BC3 : les deux extrémités ont des tangentes fixées. (a) Les configurations expérimentales ont été observées en présence de GST-mDia1-FH1-FH2 et de NEM-Myosine II attachées à la lame. La distance entre les points d'attache est de  $2 \mu m$ . Les images ont été prises toutes les 15 secondes. Images fournies par Alphée Michelot et Laurent Blanchoin. (a) Les configurations théoriques ont été calculées pour une distance entre les points d'attache de  $1 \mu m$  et une longueur de filament variant de  $1.5$  à  $3.5 \mu m$ .

## 8.2 Force exercée au cours de l'élongation



**FIG. 8.4 – Force au cours de l'élongation** – La force est maximale lorsque le filament est court, i.e. lorsqu'il est presque droit, et diminue au cours de l'élongation. La distance entre les points d'attache est de  $1 \mu m$ .

Au cours de l'élongation, les filaments d'actine exercent une force sur la surface (ou, *in vivo*, sur des structures cellulaires) par l'intermédiaire des formines ou des myosines. L'intensité de la force n'est pas directement proportionnelle à l'amplitude de la flexion des filaments puisque son maximum est observé pour des longueurs de filaments  $L$  juste au-dessus de la distance entre les points d'attache  $a$ , lorsque les filaments sont presque droits (voir figure 8.4). Les résultats de la figure 8.4 mettent en évidence le rôle des conditions aux bords dans la transmission des forces. Au début de l'élongation les filaments sont presque droits (quelles que soient les conditions aux bords) et donc la force exercée est colinéaire au vecteur reliant les points d'attache du filament ; la composante orthogonale est nulle (terme  $N_3$  dans les équations 7.2). Ainsi, la force totale est donnée par la composante horizontale du vecteur  $\vec{N}$  :

$$|\vec{N}^*| \simeq N_1^* = \frac{k_B T}{L^2} L_p n_1$$

où  $n_1$  est la composante normalisée de la force dans l'équation 7.5.1. La condition BC1, qui donne une force initiale de  $0,4 pN$  pour une distance entre les extrémités de  $a = 1 \mu m$  (équation 8.1, normalisée par  $k_B T$ ), concorde avec la condition classique

d'Euler qui donne la force au moment où le flambage commence :

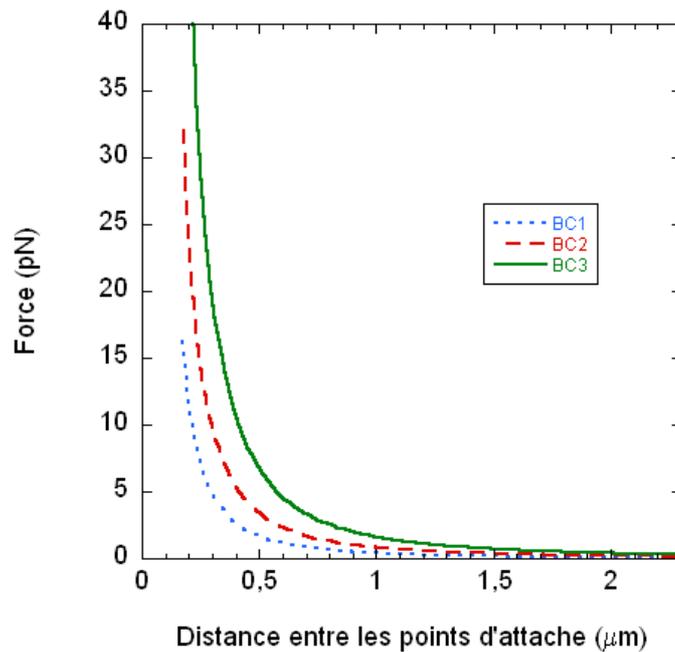
$$N_{Euler} = \frac{k_B T}{a^2} L_p \pi^2$$

Pour la condition BC2, à cause de la contrainte due à la tangente horizontale en  $s = L$ , la force produite est environ 2 fois plus grande (environ  $0.8 \text{ pN}$ , pour  $a = 1 \text{ }\mu\text{m}$ ), comme prédit dans l'analyse des équations linéarisées 8.1.

Pour la condition BC3, les tangentes sont fixées aux deux extrémités, ce qui donne une force beaucoup plus importante (environ  $1.6 \text{ pN}$ , pour  $a = 1 \text{ }\mu\text{m}$ ), en accord avec l'équation 8.1.

Remarquons que ces résultats ne sont pas intuitifs. En effet, au début de l'élongation, les filaments sont presque totalement droits et ont des configurations très semblables. Cependant, on voit bien que les forces exercées vont du simple au quadruple selon les conditions aux bords. Ce résultat est donc particulièrement étonnant puisque des configurations géométriques quasiment identiques engendrent des forces très différentes. De plus, on s'aperçoit bien que les conditions aux bords ont un effet dès le début du flambage des filaments.

### 8.3 Force initiale



**FIG. 8.5 – Force au début du flambage** – La figure présente l'intensité de la force en fonction de la distance entre les points d'attache du filament. La température utilisée est de  $25^\circ\text{C}$ , la longueur de persistance de  $15 \text{ }\mu\text{m}$ .

On peut étudier de façon systématique l'évolution de la force au début du flambage en fonction de la distance entre les extrémités. Comme le montrent les équations dans

le cas des petites amplitudes de la section 7.6, les forces sont proportionnelles à  $1/L^2$ , quelles que soient les conditions aux bords.

Ainsi, au début du flambage des filaments, on a :

$$\left| \vec{N} \right|_{\text{initiale}} = \begin{cases} \left( \frac{\pi}{a} \right)^2 L_p & \text{pour BC1} \\ \gamma \left( \frac{\pi}{a} \right)^2 L_p & \text{pour BC2} \\ 4 \left( \frac{\pi}{a} \right)^2 L_p & \text{pour BC3} \end{cases} \quad (8.1)$$

avec  $\gamma$  tel que  $\xi_1 = \sqrt{\gamma}\pi$ , où  $\xi_1$  la plus petite solution strictement positive de  $\tan(\xi) = \xi$ . Numériquement,  $\xi_1 \simeq 4.493$  et  $\gamma \simeq 2.045$ .

Comme le montre la figure 8.5, la force au début du flambage est très importante pour les filaments dont les deux extrémités sont maintenues proches l'une de l'autre, et décroît rapidement (en  $1/a^2$ ) pour les filaments dont les extrémités sont plus éloignées. Cette figure confirme que les conditions d'attachement des extrémités sont un facteur important dans l'amplitude des forces au début du flambage.

## 8.4 Vitesses d'élongation

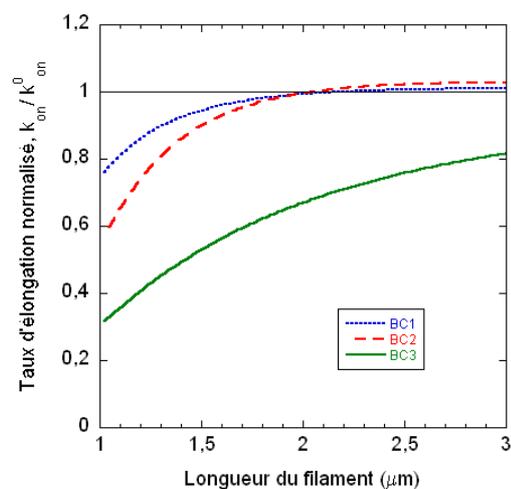
Dans le cas où l'actine est en excès dans le milieu, l'élongation est contrôlée par le taux de polymérisation à l'extrémité barbée  $k_{on}$ , qui est de  $11.6 \mu M^{-1} s^{-1}$  pour des extrémités barbées libres (Pollard *et al.*, 2000), et peut être jusqu'à 4 fois plus grande en présence d'une formine (Kovar *et al.*, 2006). Ainsi, à cause du travail produit par la force  $\vec{N}^*$  lors de l'incorporation d'un monomère de diamètre  $d$  à l'extrémité barbée, le taux  $k_{on}$  effectif est modifié selon l'expression (Mogilner et Oster, 1996; Howard, 2001) :

$$\left( \frac{k_{on}}{k_{on}^0} \right) = \exp \left( - \frac{\vec{N}^* \cdot \vec{d}_3}{k_B T} d \right) \quad (8.2)$$

où  $k_{on}^0$  est le taux d'élongation d'une extrémité barbée libre.

La figure 8.6 montre que, au début de l'élongation, le rapport  $k_{on}/k_{on}^0$  peut être assez faible (c'est à dire que la vitesse d'élongation effective est petite devant la vitesse d'élongation d'un filament dont l'extrémité est libre).

Au cours de l'élongation, ce rapport peut s'approcher de 1, lorsque la force exercée est très faible. Sur la figure 8.6, on s'aperçoit que pour les conditions BC1 et BC2, ce rapport peut dépasser 1. Ceci signifie que la vitesse d'élongation pourrait devenir plus grande que celle d'un filament libre. Ce phénomène non intuitif est dû au changements de direction de la force exercée par le filament, qui, en s'allongeant, passe d'une configuration où il pousse sur les points d'attache, donc limite l'insertion des monomères, à une configuration où il tire dessus. C'est le cas lorsque la tangente au filament au niveau de la formine est plus grande que  $\pi/2$  (voir figure 8.1 et 8.2). Notons qu'une telle configuration ne peut se réaliser dans le cas des conditions aux bords BC3, puisque les deux tangentes aux points d'attache sont fixées à 0.



**FIG. 8.6 – Taux d'élongation normalisé en fonction de la longueur du filament** – Pour les conditions BC1 et BC2, la force exercée pousse sur les points d'attache au début de l'élongation ( $L < 2 \mu\text{m}$ ), ce qui ralentit la polymérisation ; ensuite la force tire ( $L < 2 \mu\text{m}$ ) sur ceux-ci. Contrairement à BC1 et BC2, dans les conditions BC3 le filament pousse toujours sur les extrémités et le taux d'élongation est toujours plus petit que le taux de polymérisation intrinsèque pour une extrémité barbée non contrainte. La longueur de persistance utilisée est de  $15 \mu\text{m}$ , la température de  $20^\circ\text{C}$  et la distance entre les points d'attache de  $1 \mu\text{m}$ .

## 8.5 Mesure de la force

L'ensemble des configurations adoptées par un filament au cours de son élongation donne un moyen direct de mesurer les composantes des forces  $N_1$  et  $N_3$ . Ainsi, à partir d'images d'élongation de filaments prises en microscopie par ondes évanescentes, on peut utiliser des B-Splines pour déterminer la longueur d'arc  $s$ , l'angle  $\theta(s)$  de la tangente au filament en  $s$ , ainsi que les coordonnées  $(x(s), z(s))$ .

Afin de comparer les configurations expérimentales et théoriques, on peut intégrer par rapport à  $s$  deux fois l'équation d'équilibre des moments (première ligne des équations d'Euler-Lagrange 7.2) :

$$L_p(\theta(s) - \theta(0)) + N_1 \int_0^s x(u)du - N_3 \int_0^s z(u)du = 0$$

Les coefficients inconnus de la force  $N_1$  et  $N_3$  sont déterminés pour vérifier l'équation précédente dans chaque image expérimentale. Ainsi, on cherche une solution de l'équation matricielle  $MX = 0$  où :

$$X = {}^T(Lp, N_1, N_3) \quad \text{et}$$

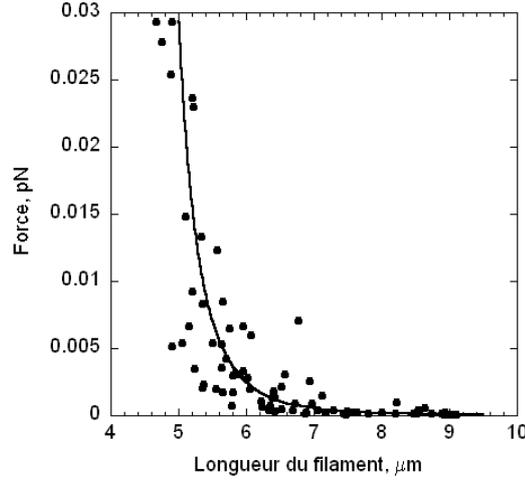
$$M = \begin{pmatrix} (\theta_1 - \theta_0) & X_1 & Z_1 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ (\theta_i - \theta_0) & X_i & Z_i \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ (\theta_N - \theta_0) & X_N & Z_N \end{pmatrix}$$

$N$  est le nombre de points de discrétisation du filament,  $(\theta_i - \theta_0)$ ,  $X_i$  et  $Z_i$  sont les estimations numériques de  $\theta(s) - \theta(0)$  et des intégrales  $\int_0^s x(u)du$  et  $\int_0^s z(u)du$  à partir des reconstructions en B-splines des filaments.

Compte tenu de la dimension de la matrice  $M$ , La solution du problème  $MX = 0$  doit être cherchée au sens des moindres carrés. Ainsi, la solution sera le vecteur propre associé à la plus petite valeur propre de la matrice  ${}^TMM$ . Cette solution étant un vecteur propre, elle est valable à une homothétie près. Ainsi, on est obligé de connaître l'une des 3 composante du vecteur solution  ${}^T(Lp, N_1, N_3)$  (ou une relation non linéaire entre les 3) afin permettre d'exprimer les 2 autres de façon unique. Ainsi, la connaissance de la longueur de persistance du filament permet d'estimer les deux composantes de la force. La figure 8.7 montre qu'il y a une assez bonne concordance entre les observations expérimentales et le modèle. Notons que les forces estimées sont relativement faibles, puisque les filaments observables sont grands (entre 5 et 10 microns), en concordance avec la prédiction du modèle (figure 8.5).

## 8.6 Concentration d'actine et longueur minimale

Un des facteurs critiques pour maintenir l'élongation d'un filament est la concentration d'actine monomérique. En effet, l'énergie nécessaire pour flamber le filament



**FIG. 8.7 – Détermination de la force à partir des données expérimentales** – A partir d’images de filaments en train de flamber issus de la série d’images des figures 8.1 et de données non publiées fournies par D. Kovar, la force exercée par les filaments est estimée à partir de l’équation de l’équilibre des moments (première ligne du système 7.2) par la méthode décrite dans la section 8.5.

est fournie par l’addition de monomères à l’extrémité barbée, coiffée d’une formine. La présence d’un obstacle induit un ralentissement de la vitesse d’élongation comme montré dans l’équation 8.2 . Dans le cas des conditions aux bords BC1, au début de l’élongation, le taux de polymérisation devient :

$$k_{on} = k_{on}^0 \exp\left(-\frac{\pi^2 L_p}{a^2 k_B T} d\right)$$

où  $d = 3 \text{ nm}$  est la distance dont le filament doit se déplacer pour permettre l’insertion d’un monomère. Nous ferons l’hypothèse communément admise que le taux de dépolymérisation n’est pas affecté par la présence de la contrainte. Ainsi, la concentration d’actine nécessaire afin de permettre l’élongation et l’observation du flambage de filaments est donc :

$$[Actin] = [Actin]_{Critique} \exp\left(\frac{\pi^2 L_p}{a^2 k_B T} d\right) \quad \text{pour BC1}$$

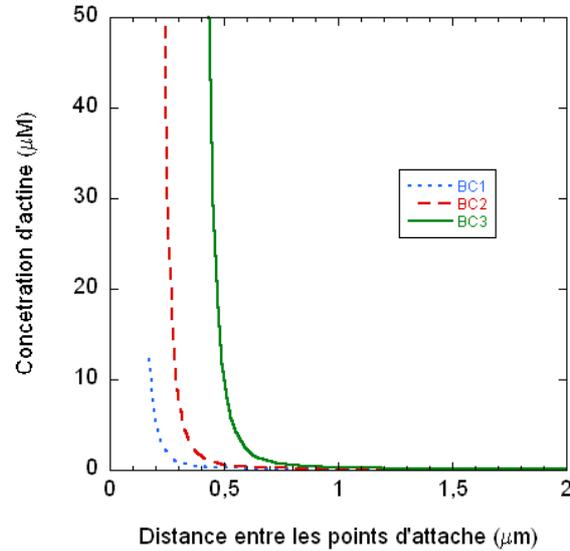
où  $[Actin]_{Critique}$  est la concentration critique pour une extrémité barbée libre.

De même, on peut écrire pour BC2 et BC3 :

$$[Actin] = [Actin]_{Critique} \exp\left(\frac{\xi_1^2 L_p}{a^2 k_B T} d\right) \quad \text{pour BC2}$$

$$[Actin] = [Actin]_{Critique} \exp\left(\frac{4\pi^2 L_p}{a^2 k_B T} d\right) \quad \text{pour BC3}$$

(Rappelons que pour les conditions BC2,  $\xi_1$  est la plus petite solution strictement positive de l'équation  $\tan(x) = x$ ,  $\xi_1 \simeq 4.493$ .)



**FIG. 8.8 – Concentration d'actine nécessaire au maintien de l'élongation au début du flambage** – La température utilisée est de  $25^{\circ}C$ , la longueur de persistance de  $15 \mu m$ .

Ainsi, selon la concentration d'actine monomérique en solution, on a une limite inférieure de la distance entre les extrémités pour laquelle le flambage du filament peut se produire (voir figure 8.8). Pour une concentration classique d'actine de  $1 \mu M$ , le modèle prédit que des filaments dont les extrémités sont attachées à la lame à une distance inférieure à :

$$\begin{aligned} 0.3 \mu m & \text{ pour BC1} \\ 0.35 \mu m & \text{ pour BC2} \\ 0.4 \mu m & \text{ pour BC3} \end{aligned}$$

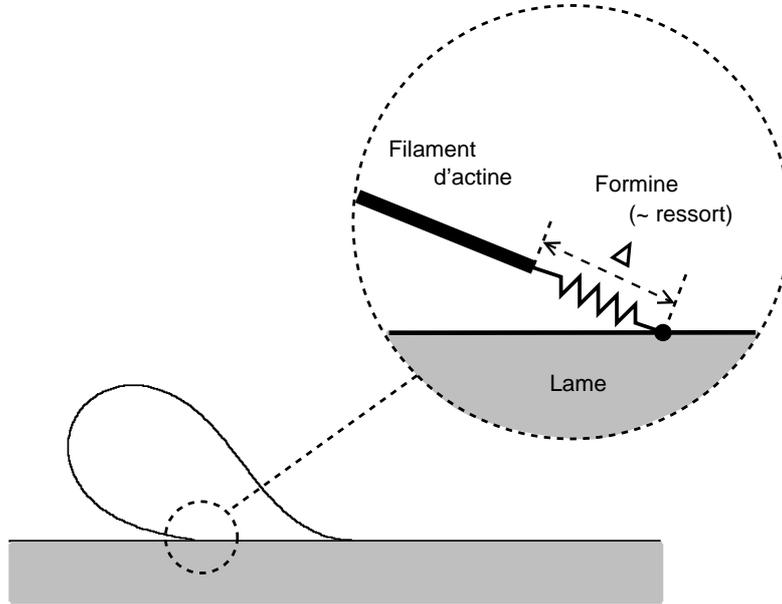
ne peuvent pas s'allonger et flamber.

Pour une concentration d'actine plus grande, de l'ordre de  $50 \mu M$ , les distances minimales sont quasiment inchangées :

$$\begin{aligned} 0.2 \mu m & \text{ pour BC1} \\ 0.25 \mu m & \text{ pour BC2} \\ 0.4 \mu m & \text{ pour BC3} \end{aligned}$$

En outre, on peut remarquer sur la figure 8.8 que, pour une distance entre les extrémités données, la condition BC3, où les tangentes aux extrémités sont fixées, nécessite une concentration d'actine beaucoup plus grande que pour les autres conditions. Cependant, cette condition permet de générer des forces plus importantes (voir figure 8.5).

## 8.7 Modèles de la jonction entre l'extrémité des filaments et la lame



**FIG. 8.9** – Schéma de la jonction entre la lame et le filament – La formine est modélisée comme un ressort de raideur  $\mu$ . La longueur du ressort est notée  $\Delta$ .

Afin de mieux comprendre les mécanisme de la transmission de force entre le filament et la surface de la lame, on peut compléter le modèle en modélisant la jonction entre la formine et la lame par un ressort de raideur  $\mu^*$  (figure 8.9). Notons que ainsi, seules les conditions BC1 et BC2 seront affectées.

Le Lagrangien (équation 7.1) n'est modifié que dans son dernier terme, où la contrainte géométrique en  $s = 0$ ,  $\vec{u}_0 \cdot \vec{r}(0)$ , est remplacée par un potentiel harmonique  $-\mu/2 \vec{r}(0)^2$  où  $\mu = \mu^*/k_B T$ . Le Lagrangien devient donc :

$$L_G = -\frac{L_p}{2} \int_0^L \left( \frac{d\theta}{ds} \right)^2 ds + \int_0^L \vec{N} \cdot \left( \frac{d\vec{r}}{ds} - \vec{d}_3 \right) ds - \frac{\mu}{2} \vec{r}(0)^2 + \vec{u}_L \cdot (\vec{r}(L) - \vec{a})$$

Les dérivations du Lagrangien donne des équations similaires à 7.2 mais avec des conditions aux bords différentes :

$$\begin{aligned} -\mu \vec{r}(0) - \vec{N}(0) &= 0 \\ \vec{u}_L + \vec{N}(L) &= 0 \end{aligned} \tag{8.3}$$

La première équation représente l'équilibre des forces entre l'extension du ressort et la force interne  $\vec{N}$ .

### 8.7.1 Solutions de petite amplitude

#### Conditions aux bords BC1

Les solutions pour les petites amplitudes s'obtiennent de la même manière que dans la section 7.6 :

$$\theta_k(s) = A_k \cos\left(\frac{k\pi s}{L}\right)$$

mais avec  $A_k$  vérifiant :

$$A_k^2 = 4\left(1 - \frac{a}{L}\right) - 4\left(\frac{k\pi}{L}\right)^2 \frac{L_p}{L\mu} \quad (8.4)$$

Notons que les forces internes sont les mêmes que dans le modèle sans ressort, c'est à dire :

$$N_1 = \left(\frac{\pi}{L}\right)^2 L_p \quad , \quad N_3 = 0$$

#### Conditions aux bords BC2

De même, pour les conditions aux bords BC2,  $A_k$  vérifie :

$$A_k^2 = 4\left(1 - \frac{a}{L}\right) - 4\left(\frac{\xi_k}{L}\right)^2 \frac{L_p}{L\mu} \quad (8.5)$$

où  $\xi_k$  est une solution de l'équation  $\tan(x) = x$ .

Les expressions des forces sont les mêmes que dans le modèle sans ressort :

$$N_1 = \left(\frac{\xi_k}{L}\right)^2 L_p \quad , \quad N_3 = \left(\frac{\xi_k}{L}\right)^2 L_p \frac{2\xi_k \cos^2(\xi_k)}{\sqrt{\xi_k^2(1 + 2\cos(\xi_k)) - 3\cos^2(\xi_k)}} \left(1 - \frac{a}{L}\right)^{1/2}$$

### 8.7.2 Longueur critique

On peut remarquer que dans l'expression des solutions,  $A_k^2$  pourrait être négatif. La condition de positivité va donner une condition sur la longueur afin de permettre le flambage du filament.

Dans le cas où  $A_k^2$  est négatif, le filament ne flambe pas mais reste droit : la force de rappel du ressort compense la force interne exercée par le filament. Toute la déformation est donc prise par le ressort, ce qui évite le flambage.

#### Conditions aux bords BC1

Lorsque les conditions aux bords permettent une libre rotation du filament autour des 2 points d'attache, pour avoir des solutions réelles en  $A_k$  de l'expression 8.4, il est nécessaire que celle-ci soit positive, donc que les longueurs soient supérieures à une longueur critique  $L_c$  vérifiant :

$$\mu(L_c - a) - \left(\frac{k\pi}{L_c}\right)^2 L_p = 0 \quad (8.6)$$

Ainsi, dans l'intervalle  $a \leq L \leq L_c$ , la configuration la plus favorable pour le filament est de rester droit. La transition entre la configuration droite et la configuration courbée se produit lorsque la force engendrée par l'extension du ressort compense la force de courbure interne, comme indiqué dans la relation précédente 8.6.

### Conditions aux bords BC2

Dans le cas où une extrémité est libre en rotation et l'autre a une tangente fixée, pour avoir des filaments qui flambent, le membre de droite de l'équation 8.5 doit être positif, ce qui donne la relation que doit vérifier la longueur critique  $L_c$  :

$$\mu(L_c - a) - \left(\frac{\xi_k}{L_c}\right)^2 L_p = 0$$

### 8.7.3 Raideur critique

Les équations permettent aussi de donner une estimation de la raideur minimale que doit avoir le ressort modélisant la liaison entre l'extrémité du filament et la surface de la lame pour que l'extrémité du filament reste proche du point d'attache, c'est à dire à quelques nanomètres, soit l'ordre de grandeur de la taille d'un monomère d'actine.

Ainsi, d'après l'équation 8.3 on a :

$$|\vec{r}(0)| = \frac{|\vec{N}(0)|}{\mu}$$

Par conséquent, si on veut une distance entre l'extrémité du filament et le point d'attache inférieur à  $\Delta$ , on a :

$$\mu \geq \mu_{\text{Critique}} = \frac{|\vec{N}(0)|}{|\vec{r}(0)|}$$

On a donc pour les conditions BC1 :

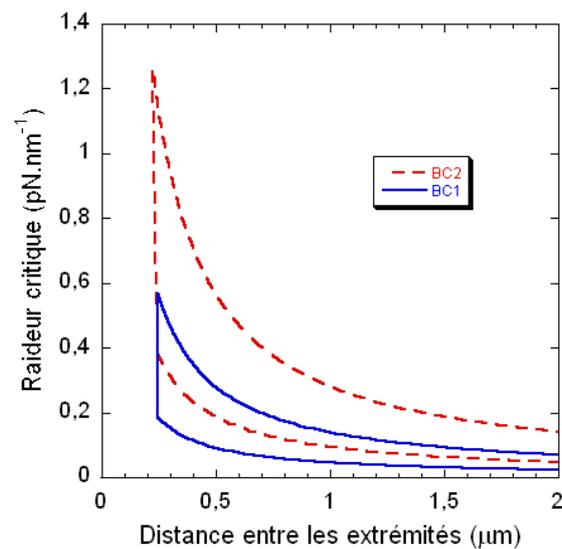
$$\mu_{\text{Critique}} = \left(\frac{\pi}{L}\right)^2 \frac{L_p}{\Delta}$$

Et pour la conditions BC2 :

$$\mu_{\text{Critique}} = \left(\frac{\xi_1}{L}\right)^2 \frac{L_p}{\Delta}$$

### Ordres de grandeur

Lorsque la distance entre les points d'attache des deux extrémités du filament est petite (c'est à dire de l'ordre de grandeur de la résolution optique, soit  $0.5 \mu\text{m}$ ), aussi bien pour les conditions aux bords BC1 que pour les conditions aux bords BC2, la raideur nécessaire pour garder l'extrémité du filament à la distance  $\Delta$  du point d'attache doit être relativement élevée, entre  $0.2$  et  $1.2 \text{ pN.nm}^{-1}$  (figure 8.10).



**FIG. 8.10 – Raideur critique de la jonction entre le filament et la lame** – La figure présente les conditions nécessaires sur la raideur de la forme pour maintenir l'extrémité barbée du filament à une distance  $\Delta$  du point d'attache, en fonction de la distance entre les 2 points d'attache  $a$ . La courbe en traits pleins bleus représente les conditions aux bords BC1, celle en pointillés rouges les conditions BC2. Pour chaque condition, la courbe du haut correspond à une distance entre l'extrémité du filament et le point d'attache sur la lame de  $\Delta = 3 \text{ nm}$ , la courbe du bas correspond à  $\Delta = 9 \text{ nm}$ . La limite à gauche traduit la condition  $L > L_c$  définie dans la section 8.7.2 : en dessous de cette limite, aucun flambage n'est possible, quelle que soit la raideur de la liaison.

Inversement, pour des filaments plus grands que  $1.5 \mu m$ , la raideur critique descend en dessous de  $0.2 pN$ , quelles que soient les conditions.

# Chapitre 9

## Discussion

### 9.1 Intérêt du modèle

Dans cette partie, nous avons analysé le flambage *in vitro* de filaments individuels, grâce à un modèle de barreau élastique, basé sur l'équilibre des forces et des moments à l'état stationnaire. Ce modèle simple est très intéressant puisqu'il ne dépend que d'un seul paramètre : la longueur de persistance. Après normalisation, le modèle ne dépend plus d'aucun paramètre ; seuls comptent les conditions d'attachement du filament et le rapport entre la longueur du filament et la distance entre les points d'attache ( $a/L$ ). Ainsi, nous avons pu analyser l'effet de différentes conditions aux bords sur les configurations du filament, mesurer les forces exercées et donner l'évolution de celles-ci en fonction de la distance entre les points d'attache ou la longueur du filament, estimer la quantité d'actine nécessaire pour développer de telles forces, donner des valeurs limites pour la longueur du filament et pour la raideur de la liaison avec la lame afin de pouvoir observer le flambage.

D'autre part, l'étude ne porte que sur des filaments uniques d'actine. Compte tenu de la simplicité des équations et du fait qu'elles ne dépendent que d'un seul paramètre, la longueur de persistance, le modèle se généralise très bien à des faisceaux de filaments d'actine, ou encore à d'autres types de filaments semi-flexibles tels que les microtubules.

### 9.2 Configurations du filament et conditions aux bords

Les solutions des équations 7.2, associées aux différentes conditions aux bords BC1, BC2 ou BC3 rendent très bien compte des configurations observées *in vitro*, moyennant une homothétie pour les abscisses ou les ordonnées. Les différentes conditions aux bords correspondent aux différentes configurations des liens entre le filament et la lame, maintenus par les formines et les myosines.

Dans le cas où le filament est attaché par une unique formine à l'extrémité barbée et une seule myosine vers l'extrémité pointue, le filament peut tourner librement autour de ses deux extrémités, ce qui correspond au cas de la figure 8.1 et aux conditions aux bords BC1.

Dans le cas où plusieurs myosines sont attachées vers l'extrémité pointue et une ou plusieurs myosines sont aussi attachées vers l'extrémité barbée (en plus de la formine), les tangentes aux deux extrémités sont fixées et ne peuvent changer au cours de l'élongation. C'est le cas dans la figure 8.3 qui correspond aux conditions aux bords BC3.

Un dernier cas, qui est un cas intermédiaire, se produit lorsque une des deux extrémités est attachée à la lame par une seule molécule de myosine ou de formine et l'autre est attaché avec plusieurs myosines. Comme le montre la figure 8.2, les filaments développent alors une grande boucle autour de l'extrémité barbée et sont dissymétriques.

Dans cette étude, lorsque la tangente à une extrémité est fixée, nous prenons une tangente colinéaire au vecteur reliant les 2 points d'attache (c'est à dire une tangente horizontale). Cependant, d'autres tangentes peuvent se rencontrer dans les données expérimentales mais les résultats du modèle ne changent pas qualitativement.

### 9.3 Mesure de la force

Bien que l'énergie potentielle due à la flexion du filament est proportionnelle à son amplitude, donc dépend de la longueur du filament, la force maximale est exercée au début de l'élongation, lorsque les filaments sont presque droits.

Ainsi, lorsqu'on prend un filament d'actine dont les extrémités sont maintenues à  $1 \mu m$  l'une de l'autre, la force exercée au début de l'élongation dépend fortement des conditions aux bords. Des extrémités pouvant pivoter librement donnent lieu à des forces relativement faibles (environ  $0.4 pN$ ), force qui est doublée ( $0.8 pN$ ) lorsque l'une des extrémités ne peut plus pivoter et quadruplée ( $1.6 pN$ ) lorsque les deux extrémités sont bloquées (équation 8.1 et figure 8.4). De plus, si on réduit la distance entre les points d'attache, la force croît énormément, jusqu'à  $10 pN$  lorsque cette distance est de  $0.5 \mu m$  (figure 8.5).

Nous avons par ailleurs validé directement le modèle en estimant la force à partir de configurations de filaments obtenues expérimentalement. La figure 8.7 montre que l'accord est très bon, particulièrement pour des filaments dont la longueur est proche de la distance entre les points d'attaches. Par conséquent, ces résultats justifient a posteriori notre approche qui consiste à ne pas prendre en compte les fluctuations des filaments.

### 9.4 Concentration d'actine

L'insertion de monomères d'actine à l'extrémité barbée est limitée en présence de forces (Howard, 2001). Cependant, ce n'est pas toujours un facteur limitant, particulièrement dans le cas du flambage de filaments, puisque  $1 \mu M$  est suffisant pour permettre l'élongation de filaments plus grands que  $0.5 \mu m$ , quelles que soient les conditions aux bords. En revanche, pour des filaments plus petits que  $0.5 \mu m$ , la concentration d'actine monomérique nécessaire à l'élongation croît rapidement. Ainsi,

pour permettre l'élongation de petits filament qui développent des forces de l'ordre de  $10 \text{ pN}$  (filaments d'environ  $0.2 \text{ }\mu\text{m}$ ), il est nécessaire d'avoir des concentrations d'actine beaucoup plus grandes, supérieures à  $50 \text{ }\mu\text{M}$ . De telles concentrations sont rares *in vitro* mais peuvent cependant être rencontrées *in vivo*.

## 9.5 Liaison entre la formine et la lame

Nous avons dans un deuxième temps modélisé la liaison entre l'extrémité barbée du filament et la lame par un ressort de raideur  $\mu$ . Ce ressort permet de prendre en compte l'élasticité de la chaîne d'acides aminés constituant la formine ainsi que les élasticités des liaisons entre la formine et le filament, d'une part, et la formine et la lame, d'autre part. En l'absence de données précises sur ces élasticités, nous avons contraint l'extrémité barbée du filament à rester à une distance de l'ordre de grandeur d'un monomère d'actine du point d'attache au niveau de la lame. Cette contrainte nous a amené 2 résultats intéressants.

Premièrement, le modèle prédit que la raideur du ressort modélisant la liaison doit se situer entre  $0.2$  et  $1.2 \text{ pNnm}^{-1}$ . De telles raideurs sont tout à fait comparables avec les raideurs de liaison classiques trouvées dans la littérature. En effet, Ishijima *et al.* (1996) ont déterminé que la raideur de la tête de myosine dans le système acto-myosine est compris entre  $0.14$  et  $0.28 \text{ pNnm}^{-1}$ . Une valeur d'environ  $0.69 \text{ pNnm}^{-1}$  a été mesuré par Veigel *et al.* (1998) pour la liaison d'acto-myosine au cours du mouvement. Si on prend une raideur de  $0.3 \text{ pNnm}^{-1}$ , dans les conditions BC1, le flambage n'est possible que pour des filaments dont les points d'attache sont distants d'au moins  $0.2$  à  $0.4 \text{ }\mu\text{m}$  et, dans les conditions BC2, pour des filaments dont les attaches sont distantes d'au moins  $0.3$  à  $0.9 \text{ }\mu\text{m}$ . Ce résultat est assez étonnant puisque, pour des filaments dont la distance entre les points d'attache est la même, dans les conditions BC1 la force exercée est plus faible que dans les conditions BC2.

Deuxièmement, nous avons mis en évidence des valeurs limites pour la distance entre les deux points d'attache du filament au dessous desquelles le flambage est impossible. Cette valeur est le minimum de 2 valeurs déterminées par :

- la condition montrée dans la section 8.7.2 : au dessous de cette valeur, le filament reste droit et la liaison entre le filament et la lame s'étend, au dessus, le filament flambe ;
- la condition sur la raideur de la liaison : la liaison ne doit pas s'allonger de plus que l'ordre de grandeur de la dimension d'un monomère d'actine (voir figure 8.10).

## 9.6 Génération de forces *in vivo*

L'organisation et la réorganisation du cytosquelette d'actine est essentielle pour permettre de créer de nouveaux compartiments cellulaires (tels que les filopodes), pour établir la polarité cellulaire avant la division, pour assembler l'anneau contractile durant la mitose et pour réguler les interactions entre les cellules ou entre la cellule

et la surface durant l'adhésion ou la motilité cellulaire (Faix et Grosse, 2006). Tous ces processus requièrent la bonne combinaison, dans le temps et dans l'espace, de différents facteurs physico-chimiques, tels que la taille des filaments, la concentration d'actine monomérique, les conditions aux bords, la raideurs des liaisons, afin d'être efficaces dans la cellule ou les compartiments cellulaires. Bien que notre approche ait été motivée par des expériences *in vitro* effectuées avec des systèmes reconstitués, nous pouvons étendre ces résultats aux conditions *in vivo*.

Nous avons montré que, sur une grande gamme de conditions, un filament unique peut développer des forces assez grandes pour déformer une membrane ou organiser le cytosquelette. En effet, les filaments peuvent développer des force jusqu'à  $10\text{ pN}$  (figure 8.5), c'est à dire de l'ordre de grandeur des forces qui ont pu être mesurées pour des déformations de membranes avec une forte courbure dans les neurones (Hochmuth *et al.*, 1996). Le développement de telles forces nécessite une concentration d'actine assez élevée, environ  $10\text{ }\mu\text{M}$  dans les conditions BC1 et  $50\text{ }\mu\text{M}$  dans les conditions BC2 (figure 8.8), ainsi qu'une liaison de raideur de  $0.1$  à  $0.5\text{ pN}$ . Toutes ces valeurs sont tout à fait compatibles avec les concentrations et les raideurs mesurées expérimentalement.

# Bibliographie

- BRENNEN, C. et WINET, H. (1977). Fluid mechanics of propulsion by cilia and flagella. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 9:339–98.
- DILL, E. (1992). Kirchhoff's theory of rods. *Arch. Hist. Exact. Sci.*, 44.
- FAIX, J. et GROSSE, R. (2006). Staying in shape with formins. *Dev Cell*, 10(6):693–706.
- GITTES, F., MICKEY, B., NETTLETON, J. et HOWARD, J. (1993). Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol*, 120(4):923–934.
- HOCHMUTH, F. M., SHAO, J. Y., DAI, J. et SHEETZ, M. P. (1996). Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys J*, 70(1):358–369.
- HOWARD, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates.
- ISAMBERT, H., VENIER, P., MAGGS, A. C., FATTOUM, A., KASSAB, R., PANTALONI, D. et CARLIER, M. F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem*, 270(19):11437–11444.
- ISHIJIMA, A., KOJIMA, H., HIGUCHI, H., HARADA, Y., FUNATSU, T. et YANAGIDA, T. (1996). Multiple- and single-molecule analysis of the actomyosin motor by nanometer-piconewton manipulation with a microneedle : unitary steps and forces. *Biophys J*, 70(1):383–400.
- KOVAR, D. R., HARRIS, E. S., MAHAFFY, R., HIGGS, H. N. et POLLARD, T. D. (2006). Control of the assembly of atp- and adp-actin by formins and profilin. *Cell*, 124(2):423–435.
- KOVAR, D. R. et POLLARD, T. D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(41):14725–14730.
- LANDAU, L. D. et LIFSHITZ, E. M. (1982). *Physique théorique 1 : Mécanique*. Ed. Mir (Moscou).

- MOGILNER, A. et OSTER, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J*, 71(6):3030–3045.
- POLLARD, T. D., BLANCHOIN, L. et MULLINS, R. D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 29:545–576.
- ROMERO, S., CLAINCHE, C. L., DIDRY, D., EGILE, C., PANTALONI, D. et CARLIER, M.-F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated atp hydrolysis. *Cell*, 119(3):419–429.
- SAMUEL, J. et SINHA, S. (2002). Elasticity of semiflexible polymers. *Physical Review E*, 66(5):050801+.
- VEIGEL, C., BARTOO, M. L., WHITE, D. C., SPARROW, J. C. et MOLLOY, J. E. (1998). The stiffness of rabbit skeletal actomyosin cross-bridges determined with an optical tweezers transducer. *Biophys J*, 75(3):1424–1438.
- WILHELM, J. et FREY, E. (1996). Radial distribution function of semiflexible polymers. *Phys Rev Lett*, 77(12):2581+.

Quatrième partie

Organisation de l'information  
biochimique



# Chapitre 10

## Contexte

### 10.1 La biologie des systèmes ou *Systems Biology*

Les récentes avancées dans les techniques de biochimie ont amené à la production d'une masse de données symboliques et cinétiques pour les interactions entre gènes et/ou protéines. Cette croissance exponentielle a fait apparaître un besoin de structuration et de traitement de ces données par l'utilisation d'outils informatiques et mathématiques. Même si l'idée d'utiliser ces deux disciplines remontent aux années 50, nous avons récemment vu l'apparition d'un nouveau domaine de recherche appelé *Systems Biology* (Kitano, 2002a,b), dont le but est l'analyse de telles masses de données.

L'un des principaux champs de recherche de la *Systems Biology* est de développer des concepts et des outils pour décrire et organiser efficacement l'information biologique. Ceci a amené, d'une part, à la multiplication de langages informatiques de description des systèmes et, d'autre part, à la multiplication des bases de données et de connaissances permettant de stocker ces informations.

### 10.2 Les langages de description de systèmes

Avec le développement des modèles mathématiques pour la biologie, plusieurs langages de descriptions de systèmes de réactions biochimiques ont vu le jour. Ces dernières années le formalisme XML (*eXtended Markup Language*) a permis de normaliser et de rendre plus clair, grâce aux balises, ces langages. Deux langages très proches ont pris une place importante : le langage CellML (*Cell Markup Language*) (Lloyd *et al.*, 2004), et le langage SBML (*System Biology Markup Language*) (Finney et Hucka, 2003).

SBML est en train de devenir une norme et est utilisé par de nombreux logiciels. En effet, une large communauté très active s'est construite autour de ce langage et lui permet d'évoluer de façon régulière. La description d'un modèle dans le langage SBML est assez bien structurée et assez intuitive. La figure 10.1 présente un exemple de description en SBML d'un modèle simple.

```

<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<sbml xmlns="http://www.sbml.org/sbml/level1" level="1" version="2">
<model name="SampleModel">
  <listOfCompartments>
    <compartment name="Filopodia" volume="1.0"/>
  </listOfCompartments>
  <listOfUnitDefinitions>
    </unitDefinition>
    <unitDefinition name="micromol_1_s_1">
      <listOfUnits>
        <unit kind="mole" exponent="-1" scale="-6"/>
        <unit kind="second" exponent="-1"/>
      </listOfUnits>
    </unitDefinition>
    <unitDefinition name="s_1">
      <listOfUnits>
        <unit kind="second" exponent="-1"/>
      </listOfUnits>
    </unitDefinition>
  </listOfUnitDefinitions>
  <listOfSpecies>
    <species name="F_Actin_Barbed_End" initialAmount="1" units="item"
      boundaryCondition="false" compartment="Filopodia"/>
    <species name="F_Actin_ATP" initialAmount="0.0" units="item"
      boundaryCondition="false" compartment="Filopodia"/>
    <species name="G_Actin_ATP" initialAmount="12.0" units="micromol"
      boundaryCondition="false" compartment="Filopodia"/>
  </listOfSpecies>
  <listOfReactions>
    <reaction name="R0" reversible="true">
      <listOfReactants>
        <speciesReference species="F_Actin_Barbed_End" stoichiometry="1"/>
        <speciesReference species="G_Actin_ATP" stoichiometry="1"/>
      </listOfReactants>
      <listOfProducts>
        <speciesReference species="F_Actin_ATP" stoichiometry="1"/>
        <speciesReference species="F_Actin_Barbed_End" stoichiometry="1"/>
      </listOfProducts>
      <kineticLaw formula="RO_K1*(F_Actin_Barbed_End)*(G_Actin_ATP)-RO_K2*(F_Actin_Barbed_End)">
        <listOfParameters>
          <parameter name="RO_K1" value = "11.6" units="micromol_1_s_1"/>
          <parameter name="RO_K2" value = "1.3" units="s_1"/>
        </listOfParameters>
      </kineticLaw>
    </reaction>
  </listOfReactions>
</model>
</sbml>

```

FIG. 10.1 – Exemple de description SBML – La réaction réversible de polymérisation de l'actine-ATP à l'extrémité barbée est décrite dans le langage SBML.

## 10.3 Les bases de données de réaction biochimiques

Avec l'accumulation des données d'interactions biochimiques, de nombreuses bases de données ont vu le jour. Certaines stockent des informations purement qualitatives comme les interactions entre protéines et/ou gènes, qu'elles soient effectivement démontrées et/ou supposées comme existantes. De telles données sont utiles pour les modèles qualitatifs ou les modèles booléens. Cependant, pour les modèles quantitatifs, ces données sont la plupart du temps insuffisantes.

Ainsi, plusieurs bases de données quantitatives ont été développées. Elles peuvent être classées en 3 catégories : les bases exhaustives, les bases spécifiques à un organisme ou à un problème donné et les bases de modèles.

### 10.3.1 Les bases de données exhaustives

Le but des bases de données exhaustives est de répertorier toutes les données de cinétique ou d'interactions entre molécules qu'il est possible de trouver dans toute la littérature scientifique. Parmi elles, citons BIND (Alfarano *et al.*, 2005), KDBI (Ji *et al.*, 2003), SigPath (Campagne *et al.*, 2004) et SABIO-RK (SABIORK, 2006). Ces bases tendent à être exhaustives et contiennent donc une quantité de données très importante. L'inconvénient est que très vite, les informations spécifiques à un problème précis sont facilement noyées dans la masse des données et il est donc difficile, ne serait-ce que par les différents noms sous lesquels peuvent être référencées les protéines ou les gènes, de trouver et d'accéder rapidement aux informations qui sont pertinentes pour un problème spécifique.

### 10.3.2 Les bases de données spécifiques

Un moyen de surmonter de telles contraintes est d'utiliser une base spécifique au problème que l'on veut étudier. Plusieurs bases de données quantitatives de cinétique chimique relatives à un organisme, un organe ou un type de réaction ont été développées. Parmi elles, BRENDA (Schomburg *et al.*, 2004) et MetaCyc (Caspi *et al.*, 2006) stockent respectivement des informations sur les réactions enzymatiques et les réseaux métaboliques ; QKDB (Dzodic *et al.*, 2004) organise les données quantitatives de cinétique mais aussi de propriétés physico-chimiques spécifiques au rein. Cependant, seulement quelques domaines ont développé de telles bases de données et celles qui existent sont difficilement transposables à d'autres champs de recherche que celui pour lequel elles ont été créées parce qu'elles ont très souvent une structure non générique.

### 10.3.3 Les bases de modèles

La troisième façon de stocker des données de cinétique chimiques est de stocker les modèles de réseaux d'interactions eux-mêmes dans des bases de modèles, à l'intérieur desquelles on peut effectuer des recherches. BioModels Database (Le Novère *et al.*, 2006), CellML repository (CellML, 2006), JWS Online Model Database (Olivier et Snoep, 2004), Database Of Quantitative Cellular Signalling (Sivakumaran *et al.*, 2003)

en sont trois exemples. Le principal inconvénient est que chaque modèle répertorié n'utilise qu'un seul jeu de paramètres par interaction et il est impossible de stocker toute la variété des paramètres mesurés expérimentalement.

## 10.4 Organiser son propre problème

### 10.4.1 Besoins

Les bases de données publiques existantes offrent un contrôle des données assez poussé (croisement des données avec des références à d'autres bases de données, en particulier pour les dénominations des protéines ou des gènes) ce qui a l'avantage de limiter les erreurs dans les données. La contrepartie est que ce système de contrôle est souvent très contraignant, en particulier lors de la soumission des données, ou bien, lorsqu'on ne veut utiliser qu'une partie des données ou bien des données non publiées.

Un groupe de chercheurs peut avoir besoin de rassembler, pour un problème spécifique, des données issues de la littérature ou d'expériences non publiées dans une base de données, facile et rapide d'utilisation, à partir de laquelle on puisse construire facilement des modèles.

### 10.4.2 Solutions existantes

Deux environnements de bases de données existent et permettent d'implémenter une base pour gérer ses propres données. SigPath (Campagne *et al.*, 2004) en est un exemple mais l'utilisation d'une telle base souffre des mêmes contraintes de soumission des données que celles décrites précédemment. D'autre part, le projet QxDB (Ribba *et al.*, 2006) est une version générique de la base QKDB sur le rein qui permet de développer sa propre base de données. Cependant, cette base est plus généralement orientée vers toutes les données quantitatives et n'est pas spécifique aux données cinétiques, ce qui la rend moins efficace pour ce problème. D'autre part, elle ne permet pas de créer de modèles à partir des données stockées.

# Chapitre 11

## SBliD : SBML like Database

### 11.1 Fonctionnalités

Afin de palier au manque d'outils permettant de regrouper et gérer l'information sur des systèmes de réactions biochimiques propres à un problème particulier, nous avons développé une base de données générique, appelée SBliD (SBML like Database). Cet outil permet aux chercheurs travaillant sur un même réseau de réactions de rassembler toutes les données de cinétique chimique le concernant et de les partager.

#### 11.1.1 Schéma du langage SBML

Afin de rendre l'utilisation plus simple et surtout plus efficace, nous nous sommes inspirés du schéma du langage de description de modèles de systèmes de réactions biochimiques SBML. En effet, ce langage décrit de façon concise et efficace les éléments qui constituent un ensemble de réactions. De plus, ce format est en passe de devenir une norme du domaine : plus de 90 logiciels l'utilisent déjà comme format de sauvegarde ou d'importation de modèles (SBML, 2006b; Hucka *et al.*, 2004), et de nombreuses revues scientifiques (comme Nature) le recommande comme format lors de la publication de modèles.

Un autre intérêt de s'inspirer du langage SBML est que la construction de modèles à partir des données de la base est donc largement simplifié, vu que la structure des données du modèle SBML est quasiment la même que celle de la base de données.

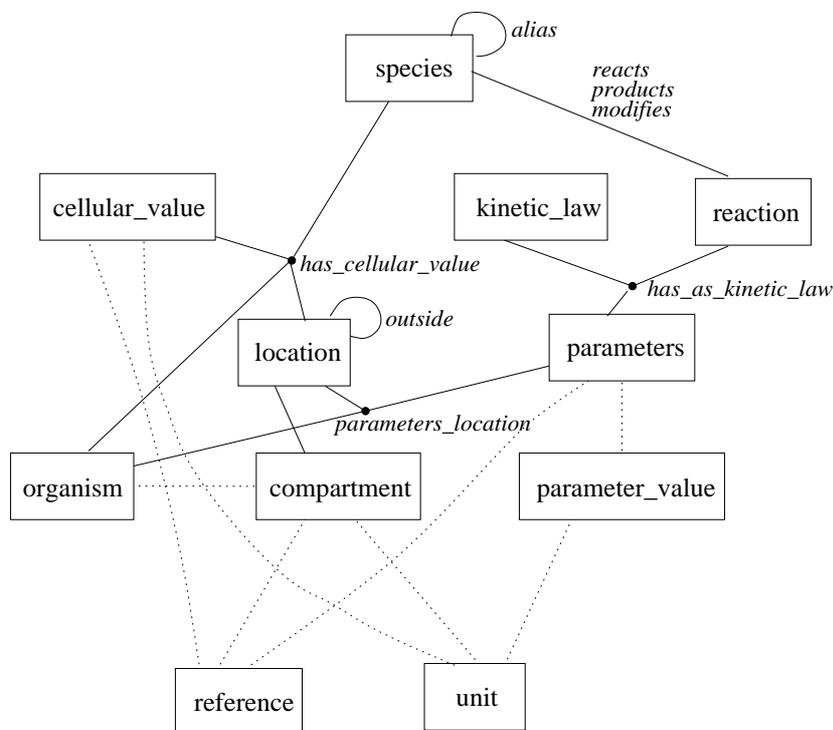
#### 11.1.2 Utilitaires de gestion de la base

Afin de permettre la consultation et la gestion des données, nous avons développé une interface web synthétique appelée *SBliD.Manager*, plus simple et rapide à utiliser que la plupart des bases de données existantes.

D'autre part, nous avons aussi développé un outil permettant de construire des modèles à partir des données d'une base SBliD, appelé *SBliD.Builder*. Cet outil a été développé en Java pour le rendre plus facile et plus efficace à utiliser que les interfaces web classiques. Les modèles sont sauvegardés au format SBML, auxquels sont incorporées des annotations permettant de garder une trace de l'origine des données telles

que les références bibliographiques. Ceci permet une utilisation ultérieure du modèle plus efficace.

## 11.2 Adaptations du langage SBML



**FIG. 11.1 – Schéma entité-association simplifié** – Les rectangles représentent les entités et les lignes représentent les associations. Les noms à côté des associations sont les noms de celles qui relient plusieurs entités. Les lignes pointillées représentent les associations qui ne deviendront pas des relations dans le schéma relationnel de SBliD. Nous n'avons pas représenté l'entité `dbuser` et les associations la faisant intervenir afin de rendre la figure plus lisible. Cette entité est en effet en association avec toutes les autres entités.

Nous avons essayé de construire le schéma Entité-Association de la base de donnée SBliD aussi proche que possible de la structurer de données de SBML. Cependant, comme indiqué dans les différentes documentations de ce langage (SBML, 2006a), SBML n'est pas prévu pour être un schéma de base de donnée, et par conséquent on ne peut l'utiliser tel quel.

Ainsi, certains types de SBML n'ont pas été utilisés dans le schéma de SBliD parce qu'ils n'étaient ou bien non pertinents, ou bien non essentiels pour notre base de données (citons par exemple le type `functionDefinitions`). Inversement, de nouvelles entités ont été ajoutées, en particulier afin de permettre le contrôle de l'origine des données ainsi que le traçage des modifications. Le tableau 11.1 synthétise les diffé-

rences entre les entités et les champs de la base de données SBliD et leurs équivalents dans le langage SBML.

D'autre part, nous avons changé la cardinalité de certaines relations entre entités afin de permettre des choix multiples (par exemple, plusieurs jeux de paramètres peuvent être reliés à une même loi cinétique, alors que l'entité équivalente dans le langage SBML ne le permet pas). Un schéma entité-association simplifié de SBliD est présenté figure 11.1. Un schéma plus détaillé est présenté dans les figures 11.6 et 11.7 à la fin de ce chapitre (section 11.4).

### 11.2.1 Modifications de types SBML existants

#### Espèces chimiques

Afin de permettre de référencer plusieurs concentrations typiques mesurées expérimentalement pour la même espèce chimique dans un compartiment cellulaire, nous avons divisé l'entité SBML `species` en deux entités SBliD, nommées `species` et `cellular_value`. Ceci permet l'association d'une liste de valeurs numériques pour une espèce donnée.

Deuxièmement, nous avons fusionné deux champs SBML, `initialConcentration` et `initialAmount`, en un champ SBliD unique, `initial_value`. Cela permet d'avoir un champ unique, l'unité `units` de ce champ permet de déterminer si la valeur `initial_value` est un nombre de molécules ou une concentration.

#### Paramètres

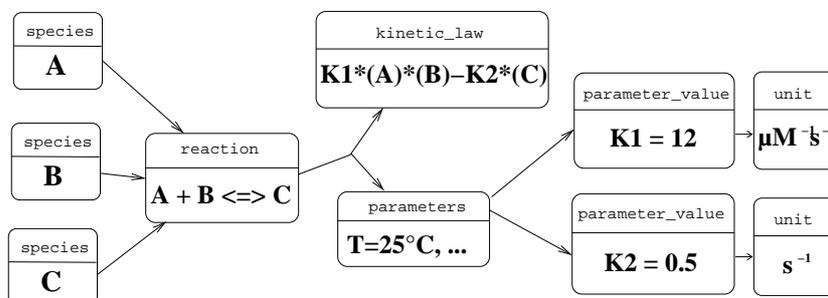


FIG. 11.2 – Exemple de liens entre les tables de la base de données SBliD relatives aux réactions – La figure est une représentation de la façon dont la réaction réversible  $A + B \leftrightarrow C$ , sa loi cinétique et ses paramètres sont stockés dans une base de donnée SBliD. Les rectangles représentent les tables de SBliD. Les flèches représentent les liens entre les tables.

Un des intérêts de la base de données est de pouvoir stocker plusieurs valeurs pour un paramètre d'une loi cinétique. Cependant, il est important de pouvoir manipuler dans leur ensemble tous les paramètres d'une même loi cinétique. C'est pour cela que nous avons créé une super entité, `parameter`, qui représente un jeu de paramètres et qui contient les informations relatives aux conditions expérimentales dans lesquelles il

a été obtenu. Les valeurs des paramètres sont quant à elles stockées dans la nouvelle entité SBliD `parameter_value` (voir figure 11.2).

### 11.2.2 Nouvelles entités

En plus des changements sus-cités, nous avons ajouté 4 nouvelles entités qui n'ont pas d'équivalent en SBML. Ces entités permettent de contrôler la provenance des données.

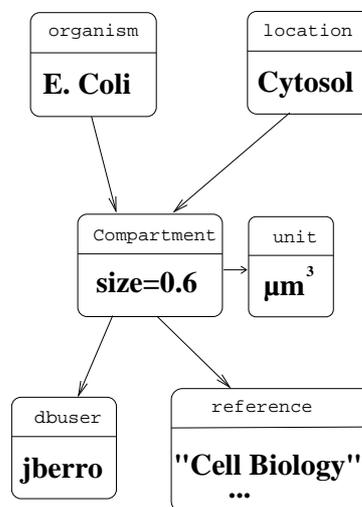
#### Origine biologique

Les entités `organism` et `location` permettent de stocker, respectivement, la description de l'organisme et du type cellulaire ou de la partie de la cellule, du tissu ou de l'organe utilisé lors des expériences. Ainsi, l'entité SBliD `compartment` est une description d'un lieu biologique (`location`) d'un `organism`.

#### Origine scientifique

L'entité `reference` a été ajoutée afin de permettre d'associer une donnée quantitative de la base à une référence bibliographique.

Enfin, l'entité `dbuser` a été ajoutée au schéma de SBliD. Elle fournit un moyen de suivre les modifications apportées à la base par les différents utilisateurs. Ainsi, chaque donnée numérique de la base est associée à une `reference` et un utilisateur (`dbuser`) comme montré dans la figure 11.3.



**FIG. 11.3 – Exemple de liens entre les tables de la base de données SBliD relatives aux compartiments** – La figure est une représentation de la façon dont les compartiments de réaction, l'organisme (E. Coli) et le lieu cellulaire (le cytoplasme) dont ils sont issus, ainsi que la provenance des données, sont stockés dans une base de donnée SBliD. Les rectangles représentent les tables de SBliD. Les flèches représentent les liens entre les tables.

### 11.2.3 Entités SBML sans équivalent dans SBliD

Plusieurs types ou champs SBML n'ont pas d'équivalent dans la base de donnée SBliD, et ce pour deux raisons.

Tout d'abord, certaines données SBML ne sont pas pertinentes dans une base de donnée. Par exemple, en SBML, on peut spécifier qu'une réaction est 'rapide' (grâce au champ booléen `fast`). Cependant, on ne peut dire qu'une réaction est rapide que comparée à d'autres ; l'intérêt d'un tel qualificatif en SBML est de pouvoir utiliser des algorithmes de simulation différents selon les vitesses des réactions. Cependant, les données de SBliD sont stockées indépendamment et il n'est donc pas pertinent de spécifier qu'une réaction est 'rapide' dans l'absolu. C'est pour des raisons similaires que le type SBML `Event` n'apparaît pas dans la structure de SBliD.

Deuxièmement, deux types SBML, `functionDefinition` et `rules`, utilisés pour simplifier la construction de modèles n'ont pas été inclus dans la structure de SBliD. Ces deux types, qui sont utilisés en SBML respectivement pour définir des fonctions et des contraintes sur les paramètres, ne sont pas nécessaires dans une base de donnée et sont assez compliqués à mettre en œuvre.

SBML level 2		Equivalent SBliD	Commentaires
Entité	Champ		
Species	compartment	∅	Non pertinent
	initialConcentration, initialAmount	cellular_value.initial_value, has_cellular_value	Clarté
	spatialSizeUnits	∅	Non pertinent
	hasOnlySubstanceUnits	∅	Non pertinent
	boundaryCondition	∅	Non pertinent
	constant	∅	Non pertinent
∅	∅	alias	Relie 2 espèces
Reaction	reactant	reacts	Relation
	product	products	Relation
	modifier	modifies	Relation
	fast	∅	Non pertinent
	∅	reaction.symbolic_expr	Ex : “ $A + B \rightarrow C$ ”
KineticLaw	math	kinetic_law.flux	Clarté
	timeUnits	∅	Non pertinent
	substanceUnits	∅	Non pertinent
	∅	kinetic_law.symbolic_expr	Ex : “ $A + B \rightarrow C$ ”
	∅	kinetic_law.reversible	Reversibilité
	∅	kinetic_law.nb_param	Nb de paramètres
	∅	kinetic_law.nb_reactants	Nb de réactifs
Parameter	Tous les champs	parameters, parameter_value, has_as_kinetic_law	Valeurs multiples
	constant	∅	Non pertinent
Compartment	constant	∅	Non pertinent
UnitDefinition	Tous les champs unit	unit unit.SBML_expr	Clarté
∅	∅	organism	Origine des données
∅	∅	location	Origine des données
∅	∅	dbuser	Utilisateur de la base
∅	∅	reference	Bibliographie

**TAB. 11.1 – Différences entre SBML et SBliD**– *Non pertinent* qualifie les données qu’il n’est pas pertinent de stocker dans une base de données. *Clarté* indique que les modifications ont été faites pour faciliter l’utilisation de la base de données.  $\emptyset$  indique qu’il n’y a pas d’équivalent dans SBML ou SBliD. *Relation* signifie que les champs SBML ont été transformés en relation dans le schéma entité-association. *Valeurs multiples* indique que la structure de SBML a été modifiée afin de stocker plusieurs jeux de paramètres. *Nb* signifie ‘nombre’.

## 11.3 Utilitaires

### 11.3.1 SBliD.Manager : une interface web pour SBliD

SBliD.Manager est une interface web pour les bases de données SBliD. Elle permet aux utilisateurs de consulter, ajouter et supprimer des données de façon simple et logique. En effet, nous avons restreint l'accès aux différentes tables afin de permettre une utilisation plus intuitive. Par exemple, les valeurs des taux de réaction stockées dans la table `parameter_value` peuvent uniquement être atteintes après avoir d'abord choisi une `reaction` puis une loi cinétique (`kinetic_law`) pour cette réaction (figure 11.4).

The screenshot shows the SBliD.Manager web interface in a Mozilla Firefox browser. The main content area displays the following information:

**Kinetic laws and parameters for reaction:**  
 $F\_Actin\_Barbed\_End + G\_Actin\_ATP \rightleftharpoons F\_Actin\_ATP + F\_Actin\_Barbed\_End$

Kinetic law:  $K1 * (F\_Actin\_Barbed\_End) * (G\_Actin\_ATP) - K2 * (F\_Actin\_Barbed\_End)$

Buttons: Add a kinetic law or new parameters, Update current kinetic law

**Parameter Set 1**

K1	5.2	micromol_1_s_1
K2	0.36	s_1

Reference:  
 Title: [Rate constants for actin polymerization in ATP determined using cross-linked actin trimers as nuclei.](#)  
 Authors: Lal AA, Korn ED, Brenner SL.  
 Journal: *J Biol Chem* (1984)  
 Original Work: true

Method:  
 Info: ionic conditions at 25 degrees C 5 mM Tris X HCl, 0.2 mM ATP, 0.03 mM MgCl2 or 0.1 mM CsCl2, 0.2 mM dithiothreitol, and 0.01% sodium azide, pH 7.5  
 Organism: Unknown  
 Location: Unknown  
 Inserted by: jberro 2004-08-04 15:57:26

Buttons: Delete, Update

**Parameter Set 2**

K1	1.4	micromol_1_s_1
K2	0.14	s_1

Reference:  
 Title: [Actin polymerization and ATP hydrolysis.](#)  
 Authors: Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D.  
 Journal: *Science* (1987)  
 Original Work: true

Method: unknown  
 Info:  
 Organism: Unknown  
 Location: Unknown  
 Inserted by: jberro 2004-09-19 15:58:55

Buttons: Delete, Update

Left sidebar (Menu): Species, Reaction, Location, Organism, Reference, Unit

Right sidebar (Connection): Database, ActinDemo, Host, souchong, Login, jberro, Logout

Bottom right: Consult FAQ, Contact admin, Created by: TMC:IMAG

FIG. 11.4 – Capture d'écran de l'interface SBliD.Manager – Cette capture d'écran de SBliD.Manager montre deux jeux de paramètres pour la réaction :  $F\_Actin\_Barbed\_End + G\_Actin\_ATP \leftrightarrow F\_Actin\_ATP + F\_Actin\_Barbed\_End$

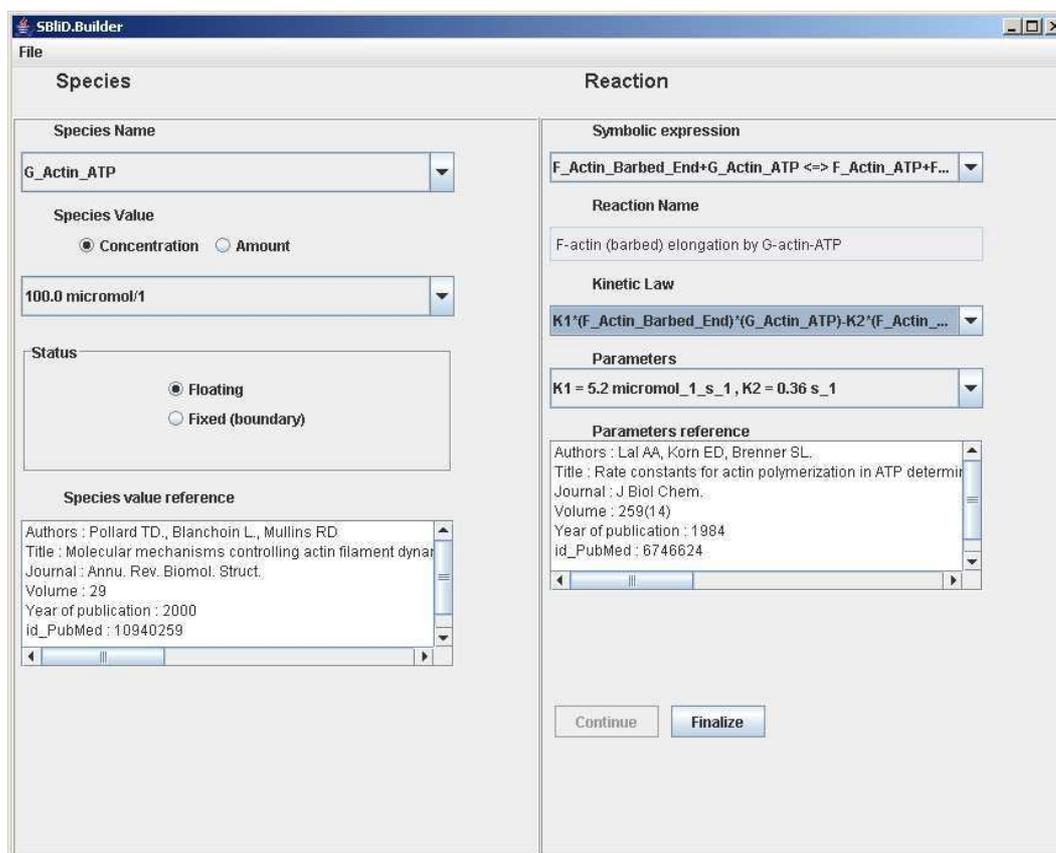
SBliD.Manager a été développé en PHP, HTML et Javascript et utilise les fonctionnalités PostgreSQL de PHP. Cette application doit donc être installée sur une machine hébergeant un serveur web. Notons que la base de données SBliD et SBliD.Manager

peuvent être installées sur deux machines différentes. Cela permet entre autre de gérer plusieurs bases de données hébergées à différents endroits par une seule interface web.

L'intérêt d'une interface web est de permettre l'accès à distance à partir de n'importe quelle machine reliée à Internet. Le type de système d'exploitation de l'ordinateur de l'utilisateur n'a donc pas d'importance. Ceci est très important puisque la modélisation nécessite l'échange d'informations entre des chercheurs de différentes communautés scientifique qui n'ont pas tous les mêmes habitudes dans l'utilisation des moyens informatiques.

### 11.3.2 SBliD.Builder : une interface d'élaboration de modèles

SBliD.Builder est un outil permettant de construire un modèle cinétique à partir des données d'une base de données SBliD (figure 11.5). Son utilisation est assez simple et intuitive. L'utilisateur peut sauvegarder son modèle au format SBML level 2, auquel sont ajoutées des informations au sujet de l'origine des données utilisées (référence bibliographique, organisme, ...).

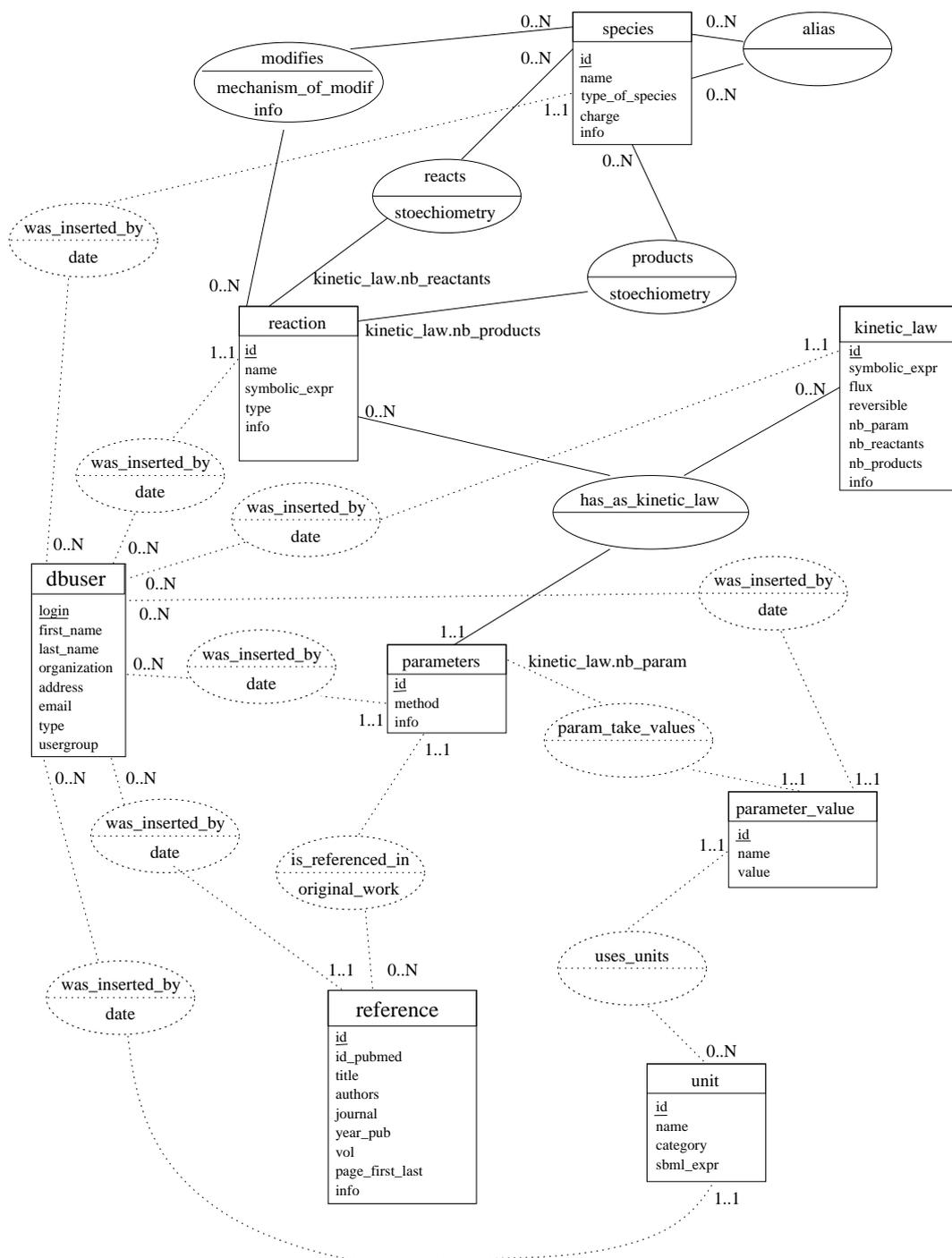


**FIG. 11.5** – Capture d'écran de l'outil SBliD.Builder – Cette capture d'écran de SBliD.Builder permet de voir l'interface permettant de choisir une valeur de concentration (ou une quantité) pour une molécule (partie gauche), et celle permettant de choisir un jeu de paramètres pour une réaction.

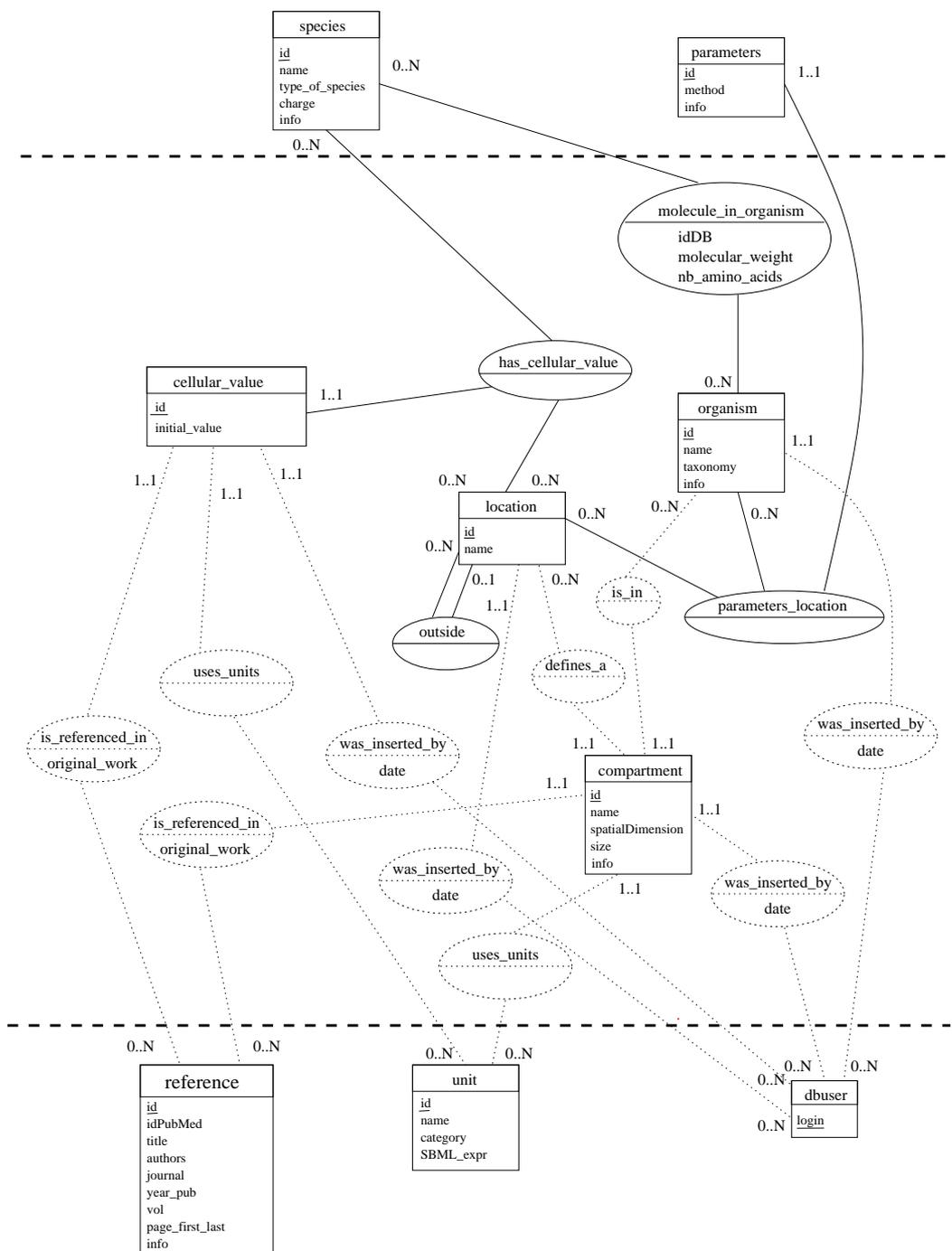
---

SBliD.Builder est implémenté en Java et utilise le driver JDBC pour interfacer le programme avec la base de données PostgreSQL SBliD. Outre la rapidité et la mania-bilité d'une interface Java, une application en Java peut être installée sur n'importe quelle machine, quelque soit le système d'exploitation (Windows, Mac OS, Linux, Unix), sur laquelle est installée une machine virtuelle Java (JVM 1.4 ou plus récente).

## 11.4 Schémas Entité-Association de la section 11.2



**FIG. 11.6 – Sous-schéma entité-association pour les réactions** – Les rectangles représentent les entités et les ovales représentent les associations. Les lignes pointillées représentent les associations qui ne deviendront pas des relations explicites dans le schéma relationnel de SBliD. Les nombres indiquent les cardinalités des relations.



**FIG. 11.7 – Sous-schéma entité-association pour les compartiments** – Les rectangles représentent les entités et les ovales représentent les associations. Les lignes pointillées représentent les associations qui ne deviendront pas des relations explicites dans le schéma relationnel de SBliD. Les nombres indiquent les cardinalités des relations.

# Chapitre 12

## Application : Réseau de régulation de l'actine

### 12.1 Voies de signalisation

#### 12.1.1 La famille de protéines Rho

La famille des protéines Rho est une famille de GTPases, qui, lorsqu'elles ont un nucléotide GTP (*Guanine Tri-Phosphate*), permettent l'activation ou la désactivation de protéines cibles. Trois sous-familles des protéines Rho vont amener aux trois différents types d'organisation de l'actine. Les protéines Rho se trouvent principalement au niveau de la membrane et vont activer la formation des fibres de stress, les protéines Rac les lamellipodes et Cdc42 les filopodes.

La plupart des protéines Rho sont activées par les GEF (*Guanine Exchange Factor*), qui favorisent l'échange de nucléotide GDP en GTP, et désactivées par les GAP (*GTPases Activated Proteins*), qui catalysent l'hydrolyse du GTP, convertissant ainsi la protéine dans sa forme GDP inactive. Les GDI (*Guanine Dissociation Inhibitor*) se lient à certaines protéines Rho et les empêchent de s'attacher à la membrane et contrôlent ainsi leur activité.

#### 12.1.2 Voie de régulation des réseaux branchés de type lamellipodes

Les lamellipodes sont constitués de réseaux de filaments branchés où les filaments sont nucléés après la fixation d'une molécule d'Arp2/3 sur le côté des filaments existants. Afin d'être active, la molécule Arp2/3 doit former un complexe avec un activateur de la famille des WASP (*Wiskott Aldrich Syndrome Protein*) ou de la famille Scar/WAVE qui contiennent toutes les deux le domaine VCA (*Verprolin Cofilin Acidic*). Les protéines WASP sont elle-même directement régulées par Cdc42. D'autre part, Rac semble activer indirectement les protéines WAVE (Suetsugu *et al.*, 2006).

### 12.1.3 Voie de régulation des câbles de filament de type filopodes

Les câbles et les faisceaux d'actine sont les structures de base des filopodes. Ils sont initiés par des formines dont les *Diaphanous-related formins* qui semblent être régulées directement par des protéines de la famille Rho, chacune ayant cependant un activateur distinct (Higgs, 2005).

### 12.1.4 Voie de régulation des fibres de stress

La famille Rho est associée à l'activation des myosines (MLC) qui interviennent dans la mise en place des fibres de stress. Deux cascades entrent en jeu. La première fait intervenir les protéines ROCK qui sont activées par les protéines Rho et la deuxième les protéines PAK (*p21-activated kinase*), MLCK (*Myosin Light Chain Kinase*) et est déclenchée par Rac (Matsumura, 2005).

### 12.1.5 Régulation des ADF/Cofilines

Les ADF/Cofilines sont régulées par l'intermédiaire des protéines Cdc42 et Rho qui activent respectivement les protéines PAK et ROCK, toutes deux régulatrices des LIMK. Ces dernières vont phosphoryler les ADF/Cofilines et ainsi les inactiver (Huang *et al.*, 2006).

## 12.2 La base de données ActinDB

Nous avons utilisé le cadre de base de données SBliD afin de stocker l'information cinétique sur la régulation de la polymérisation de l'actine dans la base de données *ActinDB*. Nous avons introduit dans cette base les informations cinétiques que nous avons pu trouver dans la littérature concernant les différentes voies de signalisation dont nous avons parlé dans la section précédente.

Les réactions concernant directement le cœur de la polymérisation des filaments d'actine est assez bien documenté. La nucléation ainsi que la polymérisation et la dépolymérisation des filaments a été étudié depuis plus de 20 ans. Les protéines interagissant directement avec les filaments ou les monomères ont aussi fait l'objet de nombreuses études. En particulier les données cinétiques sont relativement nombreuses.

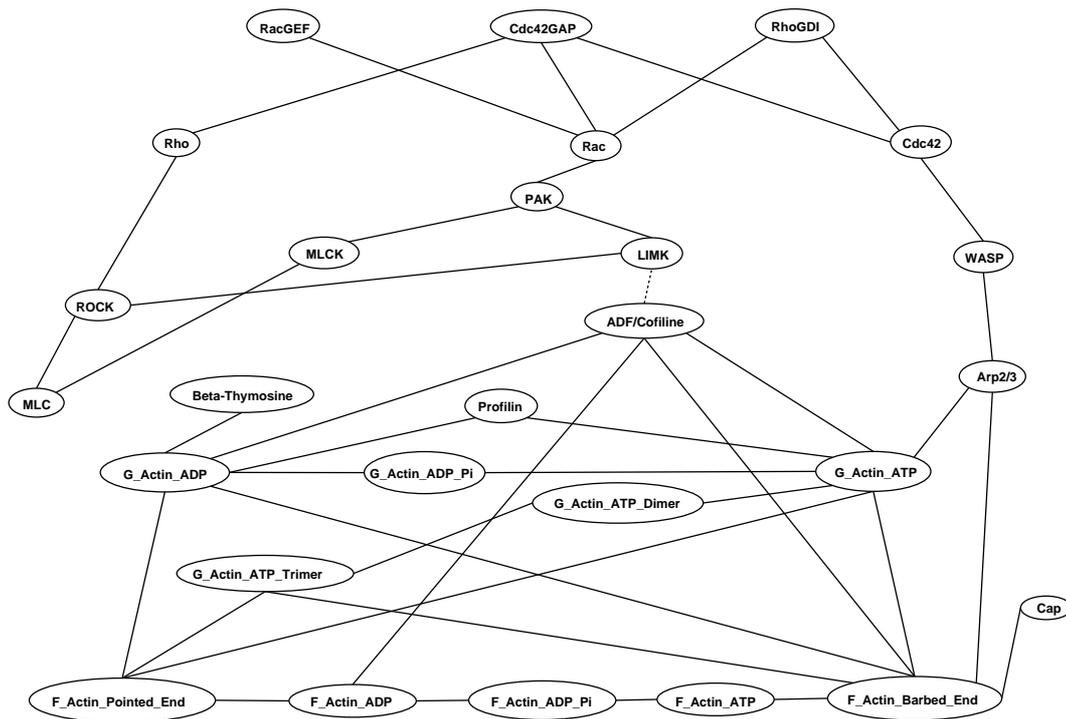
Ces dernières années, les GTPases Rho ainsi que leurs interactions avec leurs activateurs et leurs inhibiteurs ont fait l'objet de plusieurs études et plusieurs articles proposent des données quantitatives sur les cinétiques d'interactions.

Cependant, nous nous sommes heurtés à deux obstacles qui ont limité le développement de la base ActinDB. Tout d'abord, certains mécanismes de régulation sont encore discutés ou inconnus. En effet, le nombre élevé de protéines et de réactions qui interviennent dans la régulation de la polymérisation du cytosquelette *in vivo* rend difficile l'inférence des interactions entre les couples de molécules. Ainsi, les mécanismes

d'interactions de la LIMK avec l'ADF/Cofiline ne sont pas du tout documentés au niveau cinétique et semble en fait un peu plus complexe que ce qui est communément admis (Soosairajah *et al.*, 2005).

D'autre part, les données cinétiques de certaines interactions connues sont assez mal documentées du fait qu'elles aient été découvertes récemment et que la purification et la caractérisation cinétique des différentes protéines sont relativement longues à effectuer.

La figure 12.1 a été générée automatiquement par les outils de validation du site web de SBML (SBML, 2006b) et donne un schéma des interactions référencées dans la base de données.



**FIG. 12.1 – Représentation schématique des voies de signalisation stockées dans la base ActinDB** – Les protéines de la famille Rho se situent en haut du schéma et le cœur de la polymérisation de l'actine se situe en bas de celui-ci. Les lignes reliant deux molécules indiquent qu'il existe une interaction entre elles. Les lignes pointillées indiquent les interactions pour lesquelles aucune donnée cinétique n'a pu être trouvée dans la littérature (SBML, 2006b).

## 12.3 Conclusion

Nous avons développé un cadre de base de données afin de rendre plus aisé l'organisation des données biochimiques concernant des réseaux de régulation. Elle comporte une base de données, un outil pour sa gestion et un outil de création de modèle couplé

à cette base. Elle permet à des groupes de chercheurs d'organiser l'information biochimique relative à un problème spécifique et de partager cette information au sein du groupe.

A partir de ce cadre, nous avons implémenté une base de données concernant la régulation de la polymérisation de l'actine. Cette base tend à recenser les informations disponibles dans la littérature et qui concernent les cascades de réactions à partir des protéines de la famille Rho. Elle est appelée à évoluer du fait que les recherches sur la régulation de l'actine fournissent régulièrement de nouvelles données cinétiques.

# Bibliographie

- ALFARANO, C., ANDRADE, C. E., ANTHONY, K., BAHROOS, N., BAJEC, M., BANTOFT, K., BETEL, D., BOBECHKO, B., BOUTILIER, K., BURGESS, E., BUZADZIJA, K., CAVERO, R., D'ABREO, C., DONALDSON, I., DORAIRAJOO, D., DUMONTIER, M. J., DUMONTIER, M. R., EARLES, V., FARRALL, R., FELDMAN, H., GARDERMAN, E., GONG, Y., GONZAGA, R., GRYTSAN, V., GRYZ, E., GU, V., HALDORSEN, E., HALUPA, A., HAW, R., HRVOJIC, A., HURRELL, L., ISSERLIN, R., JACK, F., JUMA, F., KHAN, A., KON, T., KONOPINSKY, S., LE, V., LEE, E., LING, S., MAGIDIN, M., MONIAKIS, J., MONTOJO, J., MOORE, S., MUSKAT, B., NG, I., PARAISO, J. P., PARKER, B., PINTILIE, G., PIRONE, R., SALAMA, J. J., SGRO, S., SHAN, T., SHU, Y., SIEW, J., SKINNER, D., SNYDER, K., STASIUK, R., STRUMPF, D., TUEKAM, B., TAO, S., WANG, Z., WHITE, M., WILLIS, R., WOLTING, C., WONG, S., WRONG, A., XIN, C., YAO, R., YATES, B., ZHANG, S., ZHENG, K., PAWSON, T., OUELLETTE, B. F. et HOGUE, C. W. (2005). The biomolecular interaction network database and related tools 2005 update. *Nucleic Acids Res*, 33(Database issue):D418–424.
- CAMPAGNE, F., NEVES, S., CHANG, C. W., SKRABANEK, L., RAM, P. T., IYENGAR, R. et WEINSTEIN, H. (2004). Quantitative information management for the biochemical computation of cellular networks. *Sci STKE*, 2004(248).
- CASPI, R., FOERSTER, H., FULCHER, C. A., HOPKINSON, R., INGRAHAM, J., KAIPA, P., KRUMMENACKER, M., PALEY, S., PICK, J., RHEE, S. Y., TISSIER, C., ZHANG, P. et KARP, P. D. (2006). Metacyc : a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue).
- CELLML (2006). Cellml model repository. <http://www.cellml.org/examples/repository/>.
- DZODIC, V., HERVY, S., FRITSCH, D., KHALFALLAH, H., THEREAU, M. et THOMAS, S. R. (2004). Web-based tools for quantitative renal physiology. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 50(7):795–800.
- FINNEY, A. et HUCKA, M. (2003). Systems biology markup language : Level 2 and beyond. *Biochem Soc Trans*, 31(6):1472–1473.
- HIGGS, H. N. (2005). Formin proteins : a domain-based approach. *Trends Biochem Sci*, 30(6):342–353.

- HUANG, T. Y., DERMARDIROSSIAN, C. et BOKOCH, G. M. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, 18(1):26–31.
- HUCKA, M., FINNEY, A., BORNSTEIN, B. J., KEATING, S. M., SHAPIRO, B. E., MATTHEWS, J., KOVITZ, B. L., SCHILSTRA, M. J., FUNAHASHI, A., DOYLE, J. C. et KITANO, H. (2004). Evolving a lingua franca and associated software infrastructure for computational systems biology : The systems biology markup language (sbml) project. *Systems Biology*, 1(1).
- JI, Z. L., CHEN, X., ZHEN, C. J., YAO, L. X., HAN, L. Y., YEO, W. K., CHUNG, P. C., PUY, H. S., TAY, Y. T., MUHAMMAD, A. et CHEN, Y. Z. (2003). Kdbi : Kinetic data of bio-molecular interactions database. *Nucleic Acids Res*, 31(1):255–257.
- KITANO, H. (2002a). Computational systems biology. *Nature*, 420(6912):206–210.
- KITANO, H. (2002b). Systems biology : a brief overview. *Science*, 295(5560):1662–1664.
- LE NOVERE, N., BORNSTEIN, B., BROICHER, A., COURTOT, M., DONIZELLI, M., DHARURI, H., LI, L., SAURO, H., SCHILSTRA, M., SHAPIRO, B., SNOEP, J. L. et HUCKA, M. (2006). Biomodels database : a free, centralized database of curated, published, quantitative kinetic models of biochemical and cellular systems. *Nucleic Acids Res*, 34(Database issue):D689–691.
- LLOYD, C. M., HALSTEAD, M. D. et NIELSEN, P. F. (2004). Cellml : its future, present and past. *Prog Biophys Mol Biol*, 85(2–3):433–450.
- MATSUMURA, F. (2005). Regulation of myosin ii during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol*, 15(7):371–377.
- OLIVIER, B. G. et SNOEP, J. L. (2004). Web-based kinetic modelling using jws online. *Bioinformatics*, 20(13):2143–2144.
- RIBBA, B., TRACQUI, P., BOIX, J.-L., BOISSEL, J.-P. et THOMAS, S. R. (2006). Qxldb : a generic database to support mathematical modelling in biology. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 364(1843):1517–1532.
- SABIORK (2006). Sabio reaction kinetics database. <http://sabio.villabosch.de/SABIORK/>.
- SBML (2006a). System biology markup language faq. <http://sbml.org/faq>.
- SBML (2006b). System biology markup language website. <http://sbml.org/>.
- SCHOMBURG, I., CHANG, A., EBELING, C., GREMSE, M., HELDT, C., HUHN, G. et SCHOMBURG, D. (2004). Brenda, the enzyme database : updates and major new developments. *Nucleic Acids Res*, 32(Database issue).

- SIVAKUMARAN, S., HARIHARAPUTRAN, S., MISHRA, J. et BHALLA, U. S. (2003). The database of quantitative cellular signaling : management and analysis of chemical kinetic models of signaling networks. *Bioinformatics*, 19(3):408–15.
- SOOSAIRAJAH, J., MAITI, S., WIGGAN, O., SARMIERE, P., MOUSSI, N., SARCEVIC, B., SAMPATH, R., BAMBURG, J. R. et BERNARD, O. (2005). Interplay between components of a novel lim kinase-slingshot phosphatase complex regulates cofilin. *EMBO J*, 24(3):473–486.
- SUETSUGU, S., KURISU, S., OIKAWA, T., YAMAZAKI, D., ODA, A. et TAKENAWA, T. (2006). Optimization of wave2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound irsp53, pip(3), and rac. *J Cell Biol*, 173(4):571–585.



# Cinquième partie

## Conclusion



# Chapitre 13

## Conclusion générale

### 13.1 Résultats principaux

#### 13.1.1 Apports pour la modélisation

Cette thèse présente un nouvel outil de simulation, MAMol (*Multi-Agent Molecules*), qui permet d'étudier des systèmes de réaction diffusion en prenant en compte les interactions entre molécules individuelles. Il utilise un algorithme stochastique original dérivé de l'algorithme de Gillespie. MAMol permet de simuler l'assemblage de structures moléculaires dans un milieu encombré par des obstacles et de mettre en évidence des comportements émergents globaux issus d'interactions locales. Par conséquent cet outil est tout à fait adapté à l'étude de la dynamique de l'assemblage de l'actine ou d'autres filaments biologiques.

Ce manuscrit propose aussi un modèle pour le flambage de filaments contraints aux extrémités, avec différentes conditions aux bords. Ce modèle permet d'estimer les forces générées au cours du flambage de façon théorique et aussi de les estimer à partir des données expérimentales. De plus, il ne dépend que d'un seul paramètre, la longueur de persistance, ce qui le rend tout à fait générique et applicable aisément à d'autres cas tels que le flambage de microtubules ou de faisceaux de filaments.

La dernière partie de la thèse propose un cadre bioinformatique, SBliD (*SBML like Database*), qui permet de gérer les données cinétiques de réactions biochimiques. La base de données est complétée d'un logiciel permettant de construire aisément un modèle cinétique à partir des données de la base. Ces outils aident à gagner en efficacité lors de la construction de modèles de systèmes réactionnels complexes.

#### 13.1.2 Apports pour la dynamique du cytosquelette

Nous avons montré dans cette thèse que l'hypothèse de fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/Cofilin permet d'expliquer les fluctuations observées expérimentalement. Ces dernières sont le reflet d'une régulation en longueur, qui existe quelles que soient les valeurs des différents paramètres cinétiques. Les simulations et l'étude analytique du modèle ont montré que la longueur moyenne et l'écart-type varient de façon quasiment linéaire en fonction de la vitesse de polymérisation (en fait à

la puissance  $5/6$ ) et sont proportionnels à l'inverse de la vitesse d'attachement de l'ADF/Cofiline sur le filament à la puissance  $1/3$  et à l'inverse des autres vitesses de réaction à la puissance  $1/6$ .

Cette régulation en longueur est aussi le reflet d'une accélération du turnover des sous-unités dans le filament, et donc d'un rajeunissement global du filament. Ainsi la proportion de sous-unités ATP et ADP-Pi au sein du filament croît avec l'augmentation de la concentration d'ADF/Cofiline.

De plus, nous avons montré que l'ADF/Cofiline permet une rupture de symétrie dans un système composé de filaments nucléés par des formines en élongation autour d'une bille. Cette rupture de symétrie est la conséquence de la sélection face à la fragmentation des faisceaux de filaments par rapport aux filaments isolés.

Le modèle de flambage a permis de mettre en évidence l'importance des conditions d'attachement des extrémités ainsi que de la longueur du filament dans l'intensité de la force. Ainsi, nous avons montré que la force est maximale pour des filaments courts dont les tangentes aux extrémités sont maintenues dans une direction donnée, comme cela peut être le cas lorsque les extrémités sont attachées en plusieurs sous-unités proches les unes des autres. Dans de telles conditions, les forces générées sont près de 4 fois plus grandes que lorsque les extrémités peuvent pivoter librement.

## 13.2 Discussion

### 13.2.1 Régulation chimique, géométrique et mécanique

Nous avons mis en évidence au cours de cette thèse, que la régulation de la polymérisation du cytosquelette d'actine s'effectue de plusieurs façons différentes. Tout d'abord, la régulation peut s'effectuer par les voies de signalisation chimiques, qui permettent d'activer différentes protéines qui vont interagir directement avec l'actine globulaire (profiline,  $\beta$ -thymosines,...) ou avec l'actine filamentueuse (formines, Arp2/3, ADF/Cofilines,  $\alpha$ -actinines,...). Cette régulation chimique influe directement sur la cinétique de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine mais aussi sur les aspects géométriques des filaments individuels, de même que sur l'organisation d'ensembles de filaments. Ainsi, l'ADF/Cofiline produit des filaments individuels plus courts et favorise aussi la formation de longs faisceaux de filaments. Par conséquent, la régulation chimique a une influence directe sur les structures et l'organisation spatiale des filaments.

En outre, les propriétés géométriques des filaments influencent leurs propriétés mécaniques. Les filaments courts permettent en effet de supporter des forces plus grandes et la formation de faisceaux de filaments permet de créer des structures de longueurs de persistance beaucoup plus élevées et qui permettront donc elles aussi de supporter des forces plus importantes.

D'autre part, les propriétés mécaniques des filaments jouent également un rôle important dans la régulation chimique. En effet, l'élongation d'un filament est beaucoup moins rapide lorsqu'une force est exercée à son extrémité. En outre, la longueur de persistance élevée des faisceaux de filaments diminue le taux d'attachement de

l'ADF/Cofilin sur les sous-unités d'actine filamenteuse et le taux de fragmentation des filaments.

Le cytosquelette d'actine est donc particulièrement étonnant puisque sa régulation est le résultat des interactions entre ses propriétés chimiques, géométriques et mécaniques. La bonne compréhension de la dynamique de systèmes composés de filaments d'actine nécessite donc de prendre en compte tous ces aspects.

### 13.2.2 Génération de forces

Dans cette thèse, nous avons montré l'importance de la longueur des filaments et des conditions d'attachement de leurs extrémités dans la production de forces. D'autre part, nous avons mis en évidence le rôle de l'ADF/Cofilin dans la régulation en longueur des filaments. Ces résultats nous suggèrent l'importance d'une action conjointe de la régulation en longueur par l'ADF/Cofilin et du contrôle de l'ancrage des extrémités des filaments sur la production de forces au sein de la cellule. Ainsi, des filaments trop grands et des attaches trop lâches empêcheraient une transmission efficace de la force.

Ainsi, on pourrait expliquer la nécessité de la présence d'ADF/Cofilin dans les reconstitutions de motilité en présence d'Arp2/3, par le fait que la première régulerait la longueur des branches de filaments créées par la deuxième, permettant ainsi aux filaments de ne pas flamber. De plus, l'angle entre la branche créée par Arp2/3 et le filament mère semble assez stable pour laisser penser que l'on est dans les conditions optimale de génération de forces du chapitre 8, ce qui permettrait de supporter plus grandes que si la jonction était moins contrainte.

### 13.2.3 Changements d'échelle, systèmes complexes et ruptures de symétrie

La dynamique de l'assemblage des filaments d'actine est un processus faisant intervenir des interactions à différentes échelles, allant du nanomètre (échelle des monomères) à plusieurs dizaines de microns (échelle de la cellule), ce qui correspond à un rapport d'échelle de plus de 4 ordres de grandeur. L'émergence de structures aussi complexes à partir d'interactions locales est donc tout à fait étonnant.

L'actine est aussi capable de créer de nombreuses ruptures de symétries. En effet, à partir d'une solution homogène et isotrope, l'actine polymérise rendant ainsi le milieu inhomogène, puisque les filaments créent des directions privilégiées. L'organisation de ces filaments entre eux peut conduire à la formation de structures encore plus complexes, qui, sur une échelle de l'ordre du micromètre, augmente l'anisotropie du système (cas de l'agrégation en faisceaux) ou la diminue (cas de la formation d'une coque d'actine autour d'une bille par exemple). Ainsi, nous voyons que la dynamique de l'actine est une suite de ruptures de symétrie.

### 13.2.4 Modéliser les systèmes biologiques

Simuler des phénomènes sur une aussi grande étendue d'échelle est un challenge pour la modélisation. En effet, un modèle prenant en compte toutes les interactions locales peut vite devenir impossible à simuler dans des temps acceptables. L'art de la modélisation est donc de faire les simplifications nécessaires et suffisantes pour rendre le modèle le plus proche possible de la réalité et simulable dans des temps raisonnables.

Cette thèse a montré à plusieurs reprises l'intérêt de la modélisation dans l'étude de la dynamique de l'actine. Tout d'abord, la modélisation nous a permis d'estimer des grandeurs qui ne peuvent être mesurées directement, telles les forces générées par des filaments uniques, la composition exacte d'un filament, les temps de résidence des sous-unités au sein des filaments. De plus, elle nous a permis de justifier des comportements émergents à partir d'interactions locales entre molécules. D'autre part, nous avons mis en évidence certaines limites techniques de la biologie expérimentale. En effet, nous avons montré que la fragmentation de filaments est largement sous-estimée si elle est mesurée par l'observation en microscopie par ondes évanescentes, à cause d'une part de la limite de résolution optique et d'autre part de l'échantillonnage dans le temps des prises de vues.

Cette thèse montre ainsi l'importance des informations qu'un modèle peut apporter dans la compréhension des phénomènes biologiques et plus particulièrement dans l'assemblage du cytosquelette d'actine.



## Résumé

Les filaments d'actine sont des polymères biologiques très abondants dans le cytosquelette des eucaryotes. Leur auto-assemblage et leur auto-organisation sont très dynamiques et ils jouent un rôle majeur dans la motilité cellulaire et dans les déformations de la membrane. Nous présentons dans cette thèse trois approches de modélisation, à différentes échelles, afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'assemblage, de l'organisation et de la production de forces par des filaments biologiques tels que les filaments d'actine. Nous avons tout d'abord développé un outil de simulation multi-agent stochastique pour l'étude de la dynamique de filaments biologiques prenant en compte les interactions à l'échelle du nanomètre. Ce nouvel outil nous a permis de mettre en évidence l'accélération du turnover des monomères d'actine par fragmentation des filaments par l'ADF/Cofilin ainsi que les ruptures de symétries induites par cette protéine, résultats concordant avec les expériences de l'équipe de L. Blanchoin (CEA Grenoble). Nous avons également mené l'étude d'un modèle continu pour le flambage de filaments qui a permis d'estimer les forces exercées *in vivo* et *in vitro* en fonction des conditions d'attachement des extrémités et de donner des conditions limites de certains paramètres permettant le flambage. Troisièmement, nous avons développé un cadre pour l'organisation des données de cinétique biochimique de réseaux de régulation que nous avons utilisé pour la régulation de la polymérisation de l'actine. Ces trois approches de modélisation ont permis d'améliorer la connaissance sur la dynamique de l'actine et sont complémentaires aux approches expérimentales de la biologie.

## Abstract

Actin filaments are biological polymers that are very abundant in the cytoskeleton of eucaryotes. Their auto-assembly and auto-organization are highly dynamic and are essential in cell motility and membrane deformations. In this thesis we propose three approaches, on different scales, in order to enlighten mechanisms for the regulation of the assembly, the organization and the production of force by biological filaments such as actin filaments. First, we have developed a stochastic multi-agent simulation tool for studying biological filaments taking into consideration interactions on the nanometer scale. This new tool allowed us to bring out the acceleration of actin monomer turnover due to fragmentation of filaments by ADF/Cofilin and the symmetry breaking induced by this protein, which agree well with experimental data from L. Blanchoin group (CEA Grenoble). Secondly, we studied a continuous model for filament buckling, providing, on the one hand, an estimation of forces exerted *in vitro* or *in vivo* with respect to extremity attachment conditions and, on the other hand, limit conditions for buckling. Thirdly, we developed a framework for organizing kinetic biochemical data from reaction networks, which was used for the regulation of actin polymerization. These three modeling approaches improved the knowledge on actin dynamics and are useful complements for experimental approaches in biology.