



HAL
open science

Dynamique et mécanique de la fragmentation de filaments d'actine par l'ADF/cofiline : comparaison entre expériences et modèles.

Jérémy Roland

► **To cite this version:**

Jérémy Roland. Dynamique et mécanique de la fragmentation de filaments d'actine par l'ADF/cofiline : comparaison entre expériences et modèles.. Modélisation et simulation. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00566088

HAL Id: tel-00566088

<https://theses.hal.science/tel-00566088>

Submitted on 15 Feb 2011

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 DE GRENOBLE

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'Université de Grenoble

Spécialité : **Modèles, Méthodes et Algorithmes pour la Biologie, la Santé et l'Environnement**

préparée au laboratoire **Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique, Mathématiques et Applications de Grenoble (TIMC-IMAG)**

dans le cadre de l'École Doctorale **EDISCE**

présentée et soutenue publiquement

par

Jérémy Roland

le 8 octobre 2010

Titre:

Dynamique et mécanique de la fragmentation de filaments d'actine par l'ADF/cofiline : comparaison entre expériences et modèles

Directeur de thèse: **Jean-Louis Martiel**

Jury

M. Laurent Blanchoin,	Président du jury
M. Jean-Pierre Françoise,	Rapporteur
M. Jean-François Joanny,	Rapporteur
M. Guillaume Romet-Lemonne,	Examinateur
M. Jean-Louis Martiel,	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon Directeur de thèse, Jean-Louis Martiel, sans lequel ce projet n'aurait pas vu le jour. Notre rencontre lorsque j'étais encore étudiant à l'Ensimag fut à l'origine de mon entrée dans le monde de la Recherche. Il a su, par sa disponibilité, son ouverture d'esprit et ses conseils avisés, me guider au fil de ces trois années de thèse. Pour tout cela, je lui suis profondément reconnaissant.

Je souhaite par ailleurs témoigner toute ma gratitude aux membres de mon jury pour s'être investis dans la lecture de cet ouvrage et pour leur participation à la soutenance. Je remercie tout d'abord mes rapporteurs, Jean-Pierre Françoise et Jean-François Joanny, pour leurs réflexions ainsi que leurs questions. Leur expertise dans les domaines des mathématiques appliquées et de la physique des polymères ont permis d'ouvrir de nouvelles pistes de travail, améliorant considérablement la qualité de cette thèse. Je remercie par ailleurs mon examinateur, Guillaume Romet-Lemonne, pour les nombreuses corrections qu'il a apportées à ce manuscrit. Sa connaissance profonde du problème biologique adressé dans cet ouvrage est venue renforcer l'aspect interdisciplinaire de ce jury.

Je remercie Laurent Blanchoin pour avoir accepté de présider mon jury. Les travaux qu'il mène depuis de nombreuses années sur la dynamique de l'actine sont le point de départ de mon travail de recherche. Je profite par ailleurs de cet ouvrage pour remercier toute l'équipe PCV et plus particulièrement Cristian Suarez, avec qui la collaboration a été incroyablement fructueuse. Sans cette collaboration, le travail présenté ici n'aurait jamais pu être confronté à des données expérimentales et demeurerait purement spéculatif.

J'ai eu la chance pendant ces trois années d'évoluer au quotidien dans l'équipe TIMB, dont les membres sont devenus plus que des collègues : à ce titre je remercie Laure, Eric D, Flora, Vérane, Cédric, Hédi, Fabien, Nicolas, Olivier, Michael, Hervé et Eric F.

Enfin, il me faut remercier ma famille, mes amis et plus particulièrement Cécile. Ils m'ont soutenu et accompagné tout au long de cette thèse jusqu'au jour de sa soutenance. Quant au buffet qu'ils ont organisé, il était tout simplement parfait.

Résumé

L'actine est une protéine abondante dans le cytosquelette des eucaryotes qui se polymérise pour former des filaments. Ces filaments jouent un rôle fondamental dans de nombreux processus biologiques (contraction musculaire, division et motilité cellulaire, etc. . .). La dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments est sous le contrôle de plusieurs protéines associées à l'actine, en particulier l'ADF/Cofiline. Cette protéine s'associe aux filaments et les fragmente, accélérant ainsi le désassemblage du cytosquelette d'actine. Au cours de cette thèse, nous avons développé des modèles mathématiques pour étudier l'effet de l'ADF/Cofiline sur le cytosquelette d'actine. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'assemblage des filaments en présence d'ADF/Cofiline. Des simulations basées sur l'algorithme de Gillespie ont mis en évidence un équilibre dynamique dans lequel la polymérisation des filaments est contrebalancée par la fragmentation. Nous avons pu caractériser cet équilibre et comparer nos prédictions à des données *in vitro* obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Laurent Blanchoin (CEA/iRTSV/LPCV, Grenoble). Dans un second temps, nous nous sommes penchés sur la mécanique des polymères d'actine pour expliquer les bases physiques de la fragmentation. Un modèle mésoscopique du filament a permis de prouver l'existence d'un couplage entre les déformations en flexion et en torsion dans le filament. Ce couplage permet de convertir les fluctuations d'origine thermiques en un effort qui cisaille la section du filament, entraînant ainsi la fragmentation. Les résultats extraits de ces modèles ont donc permis d'améliorer notre compréhension de l'action de l'ADF/Cofiline sur le cytosquelette d'actine.

Abstract

Actin is an abundant protein in the cytoskeleton of eucaryotes and polymerize to form filaments. These filaments are essential in many biological processes, including cellular division and cell motility. Filaments assembly/disassembly is under the control of several proteins associated to actin. ADF/Cofilin is one of these proteins : its association on filaments promotes disassembly by severing . In this thesis, we develop several models to investigate the effect of ADF/Cofilin on the actin cytoskeleton. First, we focus on the kinetic of filaments assembly in presence of ADF/Cofilin. Our simulations are primarily based on the Gillespie algorithm and predict the emergence of a steady dynamical regime, where severing and polymerization compensate each other. We characterize this regime and compare our predictions to in vitro data obtained through a collaboration with Laurent Blanchoin's team (CEA/iRTSV/LPCV, Grenoble). Second, we investigate the physical basis of severing through a mechanical approach of actin filaments. A mesoscopic model reveals a strong, intrinsic twist-bend coupling in the filament. This coupling converts thermal fluctuations into a shear stress that severs the filament. Results presented in this thesis improved our knowledge of the role of ADF/Cofilin in the regulation of actin dynamics.

Table des matières

Résumé	v
Abstract	vi
Table des matières	vii
I Introduction	1
Préliminaire	3
1 Cytosquelette d'actine et protéines associées	5
1 Le cytosquelette	5
1.1 Composition	5
1.2 Fonctions principales	5
2 L'actine	6
2.1 Structure : du monomère au filament	6
2.2 Nucléation de filaments	6
2.3 Dynamique des filaments d'actine : élongation, rôle du nucléotide	7
2.4 Organisation des filaments d'actine dans le cytosquelette	9
3 L'actine et la production de forces	10
3.1 Motilité et production de forces	10
3.2 Production de forces	10
3.3 Mécanismes biologiques pour la production de forces	10
3.4 Brisures de symétries	11
4 L'ADF/Cofiline et autres protéines associées à l'actine	11
4.1 Protéines associées à l'actine	11
4.2 L'ADF/Cofiline : présentation générale	12
4.3 Fragmentation par l'ADF/Cofiline	12
4.4 Effets à longue portée de l'ADF/Cofiline sur le filament d'actine : modification des propriétés mécaniques	13
2 Modéliser le cytosquelette d'actine	15
1 Les modèles mathématiques appliqués à l'actine	15
1.1 Complexité de la dynamique de l'actine	15
1.2 L'essor de la modélisation du cytosquelette d'actine	15
1.3 Apports de la modélisation	15
2 Modèles mathématiques pour la dynamique de l'actine	16
2.1 Monomère d'actine et rôle du nucléotide	16
2.2 Nucléation de filaments	17
2.3 État du nucléotide et dynamique du filament	19
3 Modèles mathématiques pour les propriétés mécaniques de l'actine	22

3.1	Production de forces	22
3.2	Propriétés physiques du filament d'actine	25
4	Protéines associées à l'actine	27
4.1	Modèles pour l'action de l'ADF/Cofiline	27
4.2	Action des nucléateurs : Arp2/3 et formines	28
5	Modèles pour la motilité	29
5.1	Lamellipodes et réseaux branchés	30
5.2	Filopodes et câbles d'actine	32
5.3	Brisure de symétrie et motilité bactérienne	33
3	Motivations et objectifs	37
1	Modéliser la dynamique de l'actine en présence d'ADF/ Cofiline	37
2	Plan de la thèse	38
 II Modèles pour la dynamique de filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline		39
4	Modèle stochastique pour la croissance et la fragmentation de filaments d'actine	41
1	Problématique	41
2	L'algorithme de Gillespie	41
2.1	Principe général	42
2.2	Notations	42
2.3	Calcul des taux globaux de réaction	43
2.4	Loi de la prochaine réaction	45
2.5	Application de la réaction	47
2.6	Algorithme de Gillespie	47
3	Application à la dynamique de l'actine : mise en place du modèle	48
3.1	Présentation du modèle	48
3.2	Espèces considérées	48
3.3	Modélisation des différentes réactions	48
3.4	Mise en place de l'algorithme	51
3.5	Extraction de l'information	52
3.6	Implémentation et performances	53
3.7	Remarques diverses	53
5	La fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/Cofiline contrôle l'émergence d'un régime d'équilibre dynamique	55
1	Problématique biologique	55
2	Modèle	55
2.1	Simulations	55
2.2	Modèle analytique	56
3	Résultats principaux	59
3.1	Régulation des filaments en longueur	59
3.2	Composition chimique des filaments	61
3.3	Affinité de l'ADF/Cofiline pour le filament	61
3.4	Accélération du <i>turnover</i>	62
4	Discussion et conclusion	62
4.1	Contrôle de la longueur et de la composition des filaments	62

4.2	Nucléation de nouveaux filaments	63
4.3	Conséquence pour l' <i>in vivo</i> et l' <i>in vitro</i>	63
6	Quantification de l'association d'ADF/Cofiline sur des filaments d'actine en croissance	77
1	Problématique	77
2	Association d'ADF/Cofiline sur des filaments en croissance	78
2.1	Principe général	78
2.2	Conditions de l'expérience	78
3	Adaptation du modèle au système biologique	79
3.1	Croissance des filaments d'actine	79
3.2	Action de l'ADF/Cofiline de levure sur les filaments en croissance . .	79
4	L'ADF/Cofiline comme marqueur du nucléotide	80
4.1	Analyse des données de microscopie par ondes évanescentes	80
4.2	Extraction de la taille du cap ATP/ADP-Pi par le modèle stochastique	80
4.3	Dépendance de la taille du cap aux paramètres de l'expérience . . .	82
5	Événements de fragmentation : localisation, influence sur la taille moyenne des filaments	84
5.1	Localisation des zones de fragmentation	84
5.2	Conséquences sur la taille moyenne d'une population de filaments : mise en évidence du contrôle de la longueur par ADF/Cofiline	84
5.3	Efficacité de la fragmentation par ADF/Cofiline	86
6	Discussion	88
6.1	Impact d'ADF/Cofiline sur la structure générale des filaments	88
6.2	L'ADF/Cofiline comme marqueur de l'état du nucléotide	89
6.3	Implication de la localisation d'ADF/Cofiline sur la fragmentation .	90
III	Modèles mécaniques pour le filament d'actine	91
7	Modèle mésoscopique pour le filament d'actine : mise en évidence du couplage flexion/torsion	93
1	Problématique	93
1.1	Des modèles pour la mécanique du filament	93
1.2	Fragmentation et cisaillement	93
1.3	Couplage flexion torsion	94
2	Mise en place du modèle	94
2.1	Représentation du filament	94
2.2	Conformations du filament	95
3	Résultats	96
3.1	Mise en évidence du couplage flexion/torsion pour le filament d'actine	96
3.2	Lien avec l'énergie élastique du filament	98
3.3	Quantification du couplage et des propriétés physiques du filament .	99
3.4	Contribution du couplage flexion/torsion à l'énergie élastique du filament	100
4	Conclusion	101

8	Modèle continu pour le filament d'actine : intégration du couplage flexion/torsion	119
1	Contexte biologique	119
1.1	Fragmenter le filament d'actine	119
1.2	Un modèle 3D continu	120
2	Description du modèle	120
2.1	Définitions et notations	120
2.2	Lagrangien du système	124
2.3	Obtention des équations du système	125
2.4	Représentation à l'aide des quaternions	128
3	Conditions aux bords	129
3.1	Contraintes sur les positions et forces	129
3.2	Contraintes sur les angles et les moments	129
4	Couplage flexion/torsion	131
4.1	Introduction du couplage flexion/torsion dans le modèle	131
4.2	Quantifier les effets du couplage : simulations	132
4.3	Résultats	133
5	Application à la fragmentation par l'ADF/Cofiline	135
5.1	Modéliser la présence d'ADF/Cofiline sur le filament d'actine	136
5.2	Modéliser la fragmentation par ADF/Cofiline	137
6	Résultats	138
6.1	Quel profil d'ADF/Cofiline ?	138
6.2	Quelle mesure pour la fragmentation ?	139
6.3	Comparaison de 3 profils simples	140
6.4	Evènements de fragmentation : analyse des événements rares	142
6.5	Variantes de la décoration d'ADF/Cofiline : position de l'interface actine/cofilactine	145
6.6	Variantes de la décoration d'ADF/Cofiline : présence de plusieurs interfaces	147
7	Discussion	148
7.1	Rôle fondamental de la décoration d'ADF/Cofiline dans la fragmentation du filament	148
7.2	Limites du modèle	148
IV	Conclusion	151
9	Conclusion générale	153
1	Résultats principaux	153
1.1	Modèles stochastiques pour la cinétique du filament d'actine en présence d'ADF/Cofiline	153
1.2	Modèles mécaniques pour le filament d'actine	154
1.3	Action de l'ADF/Cofiline	154
2	Discussion	154
2.1	Contrôler la dynamique de l'actine	154
2.2	Apport de la modélisation dans la compréhension des processus biologiques	155
Annexe A : Contenu additionnel pour l'article "Origin of Twist-Bend Coupling in Actin Filaments".		159

Première partie

Introduction

Préliminaire

L'actine, une protéine très abondante dans le cytosquelette des cellules s'est particulièrement bien conservée au cours de l'évolution (Korn, 1982; Pollard, 1990). Elle se polymérise pour former des filaments qui jouent un rôle capital dans de nombreux processus cellulaires comme le maintien de la forme de la cellule, la division cellulaire et surtout la motilité. Afin de pouvoir réaliser ces différents processus, la cellule doit être en mesure de réorganiser très rapidement son cytosquelette. Cela implique de créer des structures d'actine là où elles sont requises, et de désassembler ces structures là où elles sont devenues inutiles.

La régulation de ces processus est sous le contrôle d'un ensemble de protéines associées à l'actine (Pollard et al., 2000). En particulier, l'ADF/Cofiline est capable de s'associer aux filaments d'actine et de les fragmenter, accélérant ainsi le désassemblage des structures d'actine (Bamburg et al., 1980). L'ADF/Cofiline a une action complexe sur le filament : elle modifie aussi bien sa biochimie que ses propriétés physiques, comme la rigidité en flexion et en torsion (McGough et al., 1997). Néanmoins, les mécanismes qui permettent à l'ADF/Cofiline de fragmenter le filament et d'en réguler la taille ne sont pas encore parfaitement compris.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à développer des modèles mathématiques pour répondre à ces questions. Ces modèles étudient la cinétique chimique de l'actine (polymérisation de filaments, association de l'ADF/Cofiline) et le comportement mécanique des filaments (génération de forces, de stress). Les résultats extraits de ces modèles ont pu être comparés à des données expérimentales obtenues dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Laurent Blanchoin (CEA/iRTSV/LPCV, Grenoble), et ont permis d'améliorer notre compréhension du rôle de l'ADF/Cofiline.

Dans cette introduction, nous commencerons par présenter brièvement le cytosquelette d'actine, en insistant tout particulièrement sur les propriétés cinétiques et mécaniques des filaments, et sur l'action de l'ADF/Cofiline. Nous reviendrons ensuite sur l'apport de la modélisation dans la compréhension des processus biologiques. Nous terminerons en présentant les objectifs de cette thèse et le plan de ce manuscrit.

Chapitre 1

Cytosquelette d'actine et protéines associées

1 Le cytosquelette

1.1 Composition

Les cellules qui composent le vivant sont des entités complexes et très organisées. Elles doivent en permanence contrôler une grande variété de propriétés telles que leur forme, leur position, leur structure interne, ou encore leur adhérence à l'environnement. Le cytosquelette est un ensemble de polymères biologiques présent à l'intérieur de la cellule et qui joue un rôle de premier plan dans le contrôle de ces propriétés.

On distingue trois types de polymères dans le cytosquelette : les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine. Ces polymères agissent souvent en interaction les uns avec les autres, mais ont chacun des propriétés différentes et des fonctions bien particulières. Les microtubules sont très rigides et permettent de maintenir la structure globale de la cellule, tout en jouant un rôle dans le transport intracellulaire et dans la division cellulaire (Howard and Hyman, 2003). Les filaments d'actine, plus souples, interviennent dans les déformations locales de la cellule, comme les protrusions membranaires. Ils sont à l'origine de la motilité, aussi bien de cellules comme les leucocytes, que d'autres organismes, comme les bactéries (*Listeria Monocytogenes* par exemple, (Tilney et al., 1992)). Les filaments intermédiaires, dont les fonctions sont moins bien connues, jouent un rôle dans le maintien de la forme cellulaire ainsi que dans l'adhésion de la cellule (Goldman, 1984).

Ces trois composants du cytosquelette sont constitués d'un assemblage de monomères, aussi appelés sous-unités lorsqu'ils sont incorporés au filament : tubuline pour les microtubules, monomère d'actine pour les filaments d'actine, vimentine, keratine, lamine et neurofilament pour les filaments intermédiaires (Helfand et al., 2004). Le cytosquelette étant en perpétuelle réorganisation, il est primordial de contrôler l'assemblage et le désassemblage de ces polymères. Ce contrôle repose autant sur les propriétés intrinsèques des polymères que sur l'action de certaines protéines, qui peuvent accélérer ou bloquer l'élongation des polymères, les stabiliser voire les fragmenter.

1.2 Fonctions principales

Le cytosquelette est impliqué dans un grand nombre de processus fondamentaux pour la cellule. Lors de la mitose, les microtubules permettent de positionner les centrosomes,

et jouent un rôle dans la séparation des chromatides. Les microtubules servent aussi de véritables "rails" de transport, sur lesquels des moteurs moléculaires, comme les kinésines et les dyneines peuvent circuler en déplaçant divers composants (Mitchison, 1988; Sharp et al., 2000).

Les filaments d'actine sont impliqués dans les déformations locales de la membrane, comme les lamellipodes et les filopodes. Ces protrusions membranaires permettent à la cellule d'explorer son environnement proche mais aussi de se déplacer en créant un front mouvant (Zheng et al., 1996). Enfin, l'anneau contractile qui se forme en fin de mitose est principalement composé de filaments d'actine, qui se contractent grâce aux myosines, des moteurs moléculaires (Pollard, 1981, 2009).

Les filaments intermédiaires semblent beaucoup plus stables que les deux autres polymères évoqués ci-dessus. Ils vont ainsi pouvoir servir de support et maintenir la forme de la cellule (Janmey et al., 1991).

2 L'actine

2.1 Structure : du monomère au filament

Le monomère d'actine, sous-unité constitutive des filaments, est une protéine de 43 kDa et d'environ 6 nm de diamètre. A chaque monomère est associé un nucléotide (figure 1.1(a)) dont l'état peut-être, ATP (adénosine tri-phosphate), ADP (adénosine di-phosphate), ou bien un complexe ADP-Pi (adénosine di-phosphate et phosphate inorganique). De plus la sous-unité contient un cation divalent (en vert sur la même figure), le plus souvent Mg^{2+} . Dans le reste de ce manuscrit, on se référera souvent à l'état du nucléotide des différents monomères en parlant d'actine-ATP, actine-ADP ou actine-ADP-Pi.

Afin de distinguer la forme polymérisée de l'actine de la forme monomérique, on appelle G-actine (pour globulaire) les monomères seuls en solution, et F-actine (pour filamenteuse) les filaments lorsque les sous-unités sont assemblées dans le polymère.

A l'intérieur du filament, les sous-unités sont organisées sur deux brins, donnant au filament un diamètre de 7 nm environ (Holmes, 2009; Oda et al., 2009; Howard, 2001). Du fait de cette structure, chaque monomère ajouté au filament ne contribue que pour 3 nm environ à la longueur totale du polymère. On compte ainsi 370 sous-unités par micromètre.

Comme on peut le voir en figure 1.1(b), le filament possède une hélicité intrinsèque, avec un pas de 13 monomères. Cette hélicité est primordiale et nous verrons par la suite qu'elle pourrait contrôler certaines propriétés physiques du filament.

En raison de cet arrangement particulier des monomères, les deux extrémités du filament ne sont pas équivalentes : l'une d'entre elle est appelée extrémité barbée, l'autre extrémité pointue. Ces deux extrémités ont des propriétés cinétiques différentes en particulier en ce qui concerne les taux de polymérisation et de dépolymérisation spontanés du filament (Pollard, 1986).

2.2 Nucléation de filaments

Il existe plusieurs mécanismes pour nucléer un filament d'actine. La nucléation spontanée tout d'abord, qui ne nécessite pas l'intervention d'une quelconque autre protéine. Cette nucléation passe par la formation d'un dimère d'actine (à partir de deux sous-unités), puis d'un trimère de façon totalement spontanée. Ces deux formes étant thermodynamiquement très instables, cette nucléation est relativement lente.

De nombreuses protéines associées à l'actine jouent un rôle de facteur de nucléation.

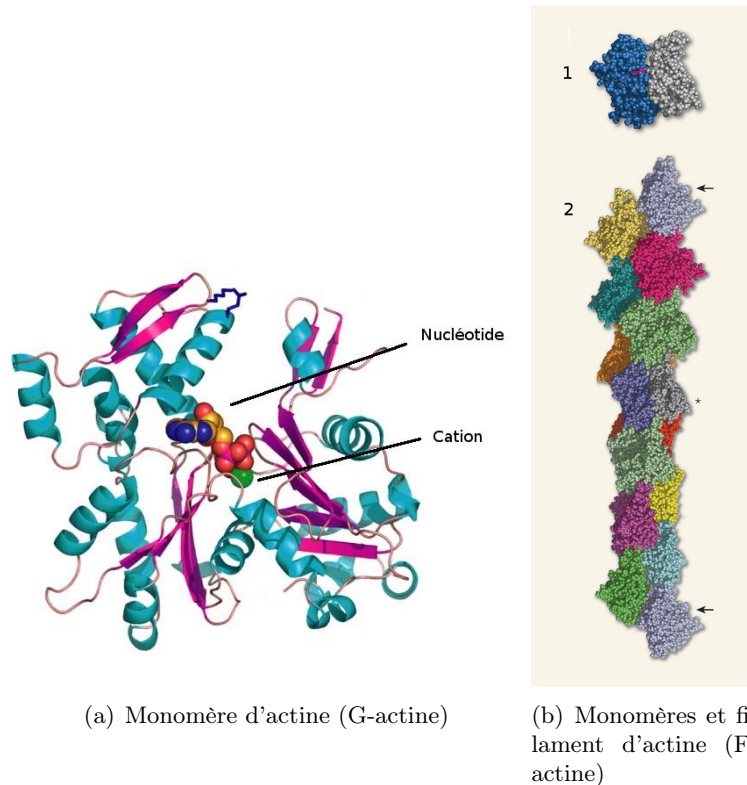


FIGURE 1.1 – **G-actine et F-actine.** (a) Structure atomique du monomère d'actine. Notez la présence du nucléotide, ainsi que du cation divalent (en vert) (Rould et al., 2006). (b) Le monomère (1), constitué de 2 domaines (en bleu et gris) qui renferme le nucléotide (magenta) (Holmes, 2009). Un modèle atomique du filament (2) tel que proposé par Oda et al (Oda et al., 2009). Les monomères ont été colorés afin de mettre en évidence la rotation des sous-unités dans le filament. L'astérisque indique un monomère (coloré en bleu-gris) que l'on peut comparer à celui en (1).

C'est le cas des protéines de la famille des formines, qui permettent de nucléer des filaments *de novo* (uniquement à partir des monomères en solution). Il faut aussi mentionner le complexe Arp2/3, qui en se fixant sur le côté d'un filament, permet d'en nucléer un nouveau avec un angle d'approximativement 70° (Mullins et al., 1998). Ce mécanisme permet de "brancher" les filaments entre eux et ainsi de créer de véritables réseaux, qui vont jouer un rôle fondamental dans la production de forces à l'échelle de la cellule.

2.3 Dynamique des filaments d'actine : élongation, rôle du nucléotide

L'élongation des filaments d'actine se fait par ajout de nouveaux monomères à l'une ou l'autre des extrémités. L'affinité des monomères d'actine pour le filament dépend de plusieurs facteurs, en particulier de l'état du nucléotide de la sous-unité à insérer, ainsi que de l'extrémité où il va s'insérer (barbée ou pointue). De manière générale, les filaments s'allongent par l'extrémité barbée, qui présente une forte affinité pour les monomères d'actine-ATP, à la vitesse de $11.6 \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$. Dans le même temps, ils raccourcissent par l'extrémité pointue en perdant des monomères d'actine-ADP à la vitesse de $0.1 s^{-1}$ (figure 1.2). Il est alors possible de définir une concentration dite *concentration critique* de G-actine, pour laquelle le filament polymérise autant de monomères qu'il en dépolymérise. La taille du filament va donc demeurer constante, aux fluctuations près. Dans les conditions qui nous intéressent, cette concentration critique se situe aux alentours de $0.1 \mu M$

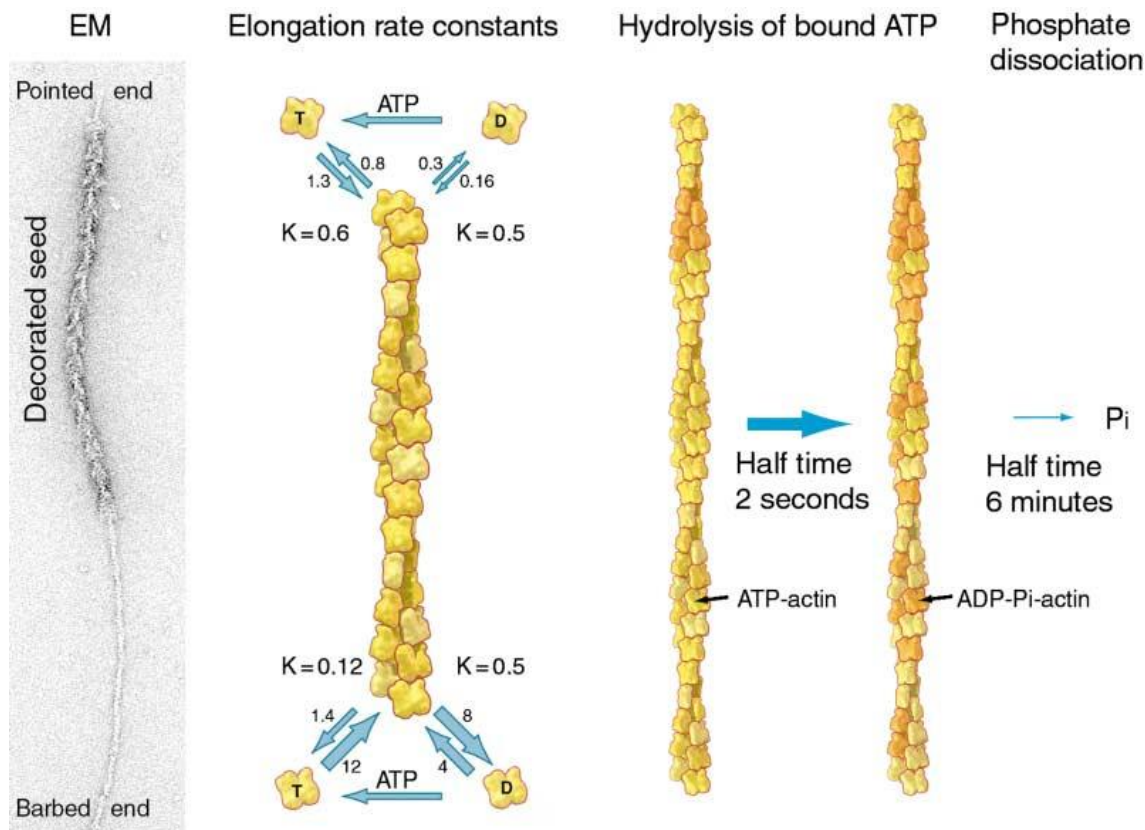


FIGURE 1.2 – **Dynamique du filament d'actine** : un filament d'actine présente deux extrémités qui sont structurellement différentes : l'extrémité barbée (barbed sur l'image en microscopie électronique) et l'extrémité pointue (pointed). La polymérisation et la dépolymérisation des monomères se font à des taux qui varient selon l'extrémité et l'état du nucléotide concerné. Les K représentent l'affinité des monomères (ATP et ADP) : il s'agit de constantes de dissociation ($K = k_-/k_+$). A l'intérieur du filament, les nucléotides liés aux monomères subissent d'abord une hydrolyse, puis relarguent leur phosphate inorganique. Les monomères d'actine-ATP sont représentés en jaune, ceux d'actine-ADP-Pi en orange clair, ceux d'actine-ADP en orange foncé. Figure tirée de Pollard and Borisy (2003)

La dynamique des filaments d'actine ne se limite pas aux extrémités. Les monomères récemment ajoutés au filament sont associés à l'ATP, mais l'état de leur nucléotide va changer au cours de leur séjour dans le filament (Pollard and Borisy, 2003). Ce nucléotide commence par subir une hydrolyse, le faisant passer de l'état ATP à ADP-Pi (le phosphate inorganique demeure lié au monomère). Cette première réaction est rapide, avec un temps de demi-vie de 2 secondes. La seconde étape est la dissociation du phosphate, qui se fait beaucoup plus lentement, avec un temps de demi-vie de l'ordre de 6 minutes (figure 1.2). Par ce mécanisme, l'état du nucléotide est directement dépendant de son temps de résidence à l'intérieur du filament, les "jeunes" monomères étant actine-ATP, les plus "vieux" actine-ADP. C'est un aspect fondamental de la dynamique des filaments d'actine, car cet état du nucléotide affecte l'immense majorité des propriétés physico-chimiques de l'actine, de la cinétique à la mécanique du filament en passant par son affinité pour certaines protéines associées. L'hydrolyse et la dissociation du phosphate sont supposées se produire aléatoirement le long du filament (Blanchoin and Pollard, 2002), mais un mécanisme d'hydrolyse vectorielle a également été proposé (Carlier et al., 1987). Dans ce mécanisme, l'hydrolyse et la dissociation du phosphate se feraient de proche en proche, de l'extrémité pointue vers l'extrémité barbée.

La dépolymérisation qui se produit à l'extrémité pointue du polymère pose la question du devenir des sous-unités qui ont quitté le filament. Ces monomères, qui sont essentiellement de l'actine-ADP, sont recyclés en actine-ATP, diffusent et pourront être polymérisés à nouveau. Ce phénomène qui permet de recycler les monomères pour le re-polymériser est appelé *turnover* dans la littérature. C'est un élément clé qui permet de réorganiser le cytosquelette d'actine, en recyclant les anciennes structures pour en reconstruire de nouvelles là où elles sont nécessaires.

2.4 Organisation des filaments d'actine dans le cytosquelette

Les filaments d'actine s'organisent en structures variées pour participer aux différents processus cellulaires.

Un filopode par exemple, est une déformation très locale de la membrane, qui prend la forme d'un "doigt" (figure 1.3(a)). Cette structure allongée permet à la cellule de sonder le milieu extérieur. A l'origine de cette déformation, on trouve un câble de filaments d'actine, appelé *bundle*. Cette structure est composée de plusieurs filaments d'actine maintenus côté à côté par des protéines de liaison, voire par de simples interactions non spécifiques. Un tel assemblage possède une rigidité bien supérieure à celle d'un filament simple, et la polymérisation de nouveaux monomères au niveau de la membrane (par des protéines de la famille des formines par exemple) permet d'allonger le câble en repoussant l'obstacle.

Lors du processus de migration cellulaire, on assiste à la formation de larges protrusions membranaires, appelées *lamellipodes*. Ces protrusions sont provoquées par un dense réseau de filaments polymérisant à la surface de la membrane (figure 1.3(b)). C'est l'assemblage de tous ces filaments enchevêtrés qui permet de produire les forces nécessaires au déplacement de la membrane.

Enfin, les filaments d'actine sont présents dans une dernière structure, les fibres de stress (figure 1.3(c)). Ces fibres sont composées d'un assemblage de filaments liés par des moteurs moléculaires, les myosines. Ces myosines sont à même de se déplacer sur les filaments d'actine et de les faire glisser les uns par rapport aux autres. Cette opération contracte la fibre et produit une tension donnant leur nom à ces structures.

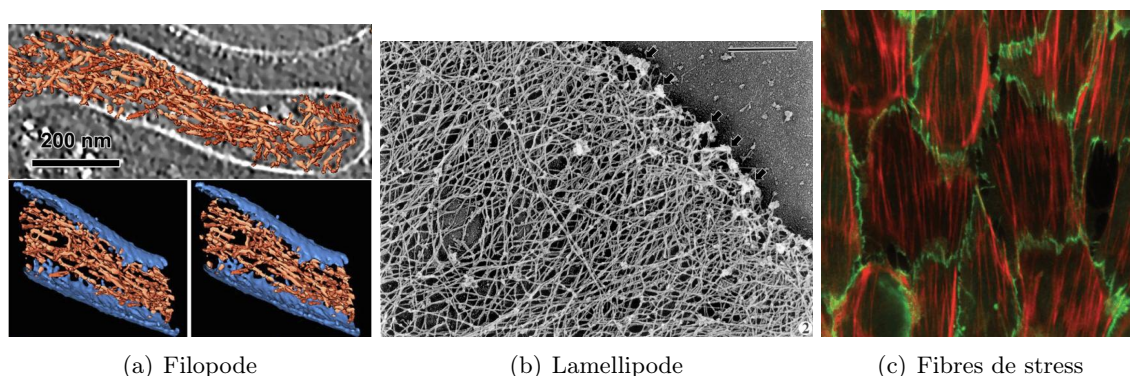


FIGURE 1.3 – **Structures d'actine.** Trois différentes structures pour les filaments d'actine : (a) un filopode constitué de plusieurs filaments, obtenu en tomographie à cryo-électron. L'actine est colorée en rouge et la membrane en bleu. Notez la direction privilégiée et l'alignement des filaments côté à côté (Médalia et al, 2009). (b) Un lamellipode en microscopie électronique : la barre représente $0.5 \mu\text{m}$ (Svitkina et al, 1995). (c) Des fibres de stress (en rouge) en microscopie confocale. Le vert représente les bordures de la cellule (Kaunas et al, 2005)

3 L'actine et la production de forces

3.1 Motilité et production de forces

Les protrusions membranaires comme les filopodes et les lamellipodes sont des mécanismes de base de la motilité cellulaire. C'est en déformant sa membrane dans une direction privilégiée que la cellule peut initier sa migration. Or, la déformation de cette membrane nécessite de produire des forces importantes dans une zone localisée de la cellule. La production de forces par le biais des filaments d'actine est aussi un aspect fondamental de la motilité de certaines bactéries, comme *Listeria Monocytogenes* et *Shigella Flexneri* (Gouin et al., 2005). Ces organismes exploitent l'actine intracellulaire pour se propulser, leur permettant de se déplacer dans la cellule hôte. Néanmoins, l'observation de ces processus *in vivo* ne permet pas encore de comprendre pleinement comment ces forces sont produites.

Le développement des essais de motilité *in vitro* a permis d'apporter un début de réponse à ces questions. Dans ces essais, il s'agit de greffer des activateurs de la polymérisation de l'actine sur des structures comme des billes ou des baguettes. En présence d'actine et de diverses protéines, on peut voir un gel se former puis repousser l'obstacle, reconstituant ainsi la motilité. Ces expériences ont permis de dresser la liste minimale des protéines nécessaires et suffisantes à cette motilité : en l'occurrence l'actine, le complexe Arp2/3, la protéine de coiffe et l'ADF/Cofilin (Loisel et al., 1999).

3.2 Production de forces

La production des forces, dans les systèmes *in vitro* et *in vivo*, passe soit par l'action de certains moteurs moléculaires, comme les myosines, les kinésines ou dynéines, soit par la polymérisation directe de filaments d'actine au contact d'un obstacle. Dans ce manuscrit, nous nous focalisons exclusivement sur ce deuxième mécanisme. Cette production de force par polymérisation s'explique par la nature même des filaments d'actine : ce sont des polymères semi-flexibles (Howard, 2001) que l'on peut assimiler à des bâtonnets élastiques. Un tel bâtonnet élastique possède une rigidité propre, en flexion comme en torsion, représentée par des grandeurs physiques comme la longueur de persistance ou la longueur de torsion (que l'on détaillera en chapitre 2 de ce manuscrit). Lorsque l'on déforme ces filaments, ils exercent en retour une force dont l'amplitude dépend de ces grandeurs physiques.

3.3 Mécanismes biologiques pour la production de forces

Plusieurs mécanismes biologiques sont susceptibles d'amener les filaments d'actine à polymériser au contact de l'obstacle.

Le premier est sans doute la processivité (Dickinson et al., 2004). Les formines processives peuvent polymériser des filaments d'actine tout en demeurant fixées à l'extrémité barbée de ces mêmes filaments. Si la formine en question se trouve aussi attachée à un obstacle, comme une bille de polystyrène, elle va agir à la manière d'une interface entre le filament et l'obstacle : le filament va s'allonger, flamber et exercer une force contre l'obstacle. Il a été prouvé que la polymérisation d'un filament unique par la formine mDia1 peut produire des forces de l'ordre du piconewton (Kovar and Pollard, 2004).

La processivité n'est pas forcément requise pour générer des forces via la polymérisation (en attestent tous les essais de motilité par Arp2/3). Le mécanisme le plus couramment cité est celui du cliquet Brownien (ou *Brownian ratchet*), introduit par Peskin et al., 1993. Lorsque les filaments sont en contact avec l'obstacle (ie, une membrane, une bille, ...), l'espace n'est pas suffisant pour pouvoir insérer un nouveau monomère. Mais les filaments

comme la membrane subissent des chocs thermiques et leur position va fluctuer. Lorsque ces fluctuations sont suffisantes, un nouveau monomère peut être inséré. Ceci fait, le filament s'est allongé ce qui lui permet de repousser l'obstacle à la manière d'un cliquet. Ce mécanisme a pu ensuite être adapté au problème de motilité, en prenant en compte les caractéristiques de l'actine (flexibilité des filaments). Nous reviendrons plus en détail sur ce modèle et ces variantes dans le chapitre suivant.

Les deux mécanismes vus précédemment illustrent la génération de force à un niveau moléculaire. Mais un ensemble de filaments enchevêtrés, comme on peut en obtenir avec le complexe Arp2/3, possède aussi des propriétés visco-élastiques qui l'apparentent à un gel (Bernheim-Groswasser et al., 2005). La polymérisation d'un tel gel autour d'une structure, comme une bille ou une baguette, permet de générer les forces nécessaires à la motilité (Gerbal et al., 2000). Notons toutefois que cette motilité passera forcément par la cassure du gel, brisant ainsi la symétrie de l'ensemble.

3.4 Brisures de symétries

Une brisure de symétrie correspond à l'apparition, dans un système à l'origine isotrope, d'une direction privilégiée. C'est un point clé des essais de reconstitution de la motilité *in vitro*, car les gels que l'on polymérise autour des différentes structures (billes, baguettes ...) sont à l'origine isotropes. Il est donc nécessaire de briser la symétrie de ces gels pour voir apparaître une direction privilégiée, celle du mouvement.

Cette brisure de symétrie se retrouve dans les expériences de motilité de billes recouvertes d'Arp2/3 (Van Der Gucht et al., 2005). Dans un premier temps, le gel est homogène, puis se fissure libérant ainsi la bille qui laisse derrière elle une comète d'actine pour se propulser (Achard et al., 2010; Dayel et al., 2009). Cette brisure de symétrie se produit aussi en présence de billes recouvertes de formines (Michelot et al., 2007). De nombreux filaments sont polymérisés dans toutes les directions, avant de se regrouper pour former des câbles dans une ou plusieurs directions données. Ces câbles sont alors à même d'initier le mouvement de la bille.

4 L'ADF/Cofilin et autres protéines associées à l'actine

De très nombreuses protéines interagissent avec l'actine, dans sa forme monomérique ou filamenteuse (Pollard et al., 2004). Nous présentons ici quelques unes de ces protéines, en mettant l'accent sur l'ADF/Cofilin qui occupe une place de premier plan dans cette thèse.

4.1 Protéines associées à l'actine

En amont de la polymérisation, certaines protéines interagissent directement avec les monomères d'actine. C'est le cas de la profiline, qui accélère l'échange du nucléotide ADP en ATP, rendant le monomère à nouveau disponible pour la polymérisation, et qui inhibe la nucléation spontanée (Pollard et al., 2000). A l'inverse, il existe des protéines séquestrant les monomères comme par exemple la thymosine ou de la latrunculine. En se fixant sur les monomères d'actine-ADP, la thymosine bloque l'échange du nucléotide ADP en ATP. Ces deux types de protéines permettent ainsi de réguler la quantité d'actine monomérique.

D'autres protéines affectent la dynamique générale de l'actine en agissant sur le nombre d'extrémités actives pour la polymérisation. C'est le cas de toutes celles qui permettent de nucléer de nouveaux filaments et nous les avons évoquées précédemment. Chaque nouveau

filament s'allongera en puisant dans les monomères en solution. D'autres protéines agissent sur la vitesse d'élongation de ces extrémités, que ce soit pour l'accélérer ou pour la bloquer : les protéines de coiffe (*capping proteins*) se fixent à l'extrémité barbée du filament pour bloquer sa polymérisation. Le filament coiffé se dépolymérise lentement, permettant de libérer de nouveaux monomères en solution. A l'inverse les protéines de la famille des formines accélèrent l'élongation des filaments en présence de profiline. Enfin, de nouvelles extrémités actives peuvent être générées par fragmentation : certaines protéines, comme l'ADF/Cofiline ou la gelsoline, se fixent sur les filaments pour les fragmenter. Cette opération permet de créer deux fragments à partir d'un filament, chaque fragment continuant à s'allonger par son extrémité barbée.

D'autres protéines agissent sur l'organisation spatiale des filaments d'actine. Nous avons déjà évoqué Arp2/3, à l'origine des réseaux branchés. Dans le cas de câbles d'actine, ce sont souvent des protéines de liaisons (ou *cross-linker*) qui lient les filaments entre eux. Citons entre autres l' α -actinine, les fascines ou encore la filamine.

4.2 L'ADF/Cofiline : présentation générale

L'ADF/Cofiline est une protéine de la famille des cofilines que l'on retrouve chez de nombreux eucaryotes (Dos Remedios et al., 2003). Il s'agit de petites protéines (15-19 kDa), présentes en abondance dans la cellule, en particulier dans les régions où la polymérisation et le désassemblage des filaments sont importants comme le front des cellules motiles (Svitkina and Borisy, 1999; Miyoshi et al., 2006).

L'association d'ADF/Cofiline sur les sous-unités d'actine est une simple réaction bimoléculaire, avec une stoechiométrie d'une molécule d'ADF pour une sous-unité. Néanmoins, l'affinité de l'ADF/Cofiline dépend fortement de l'état du nucléotide associé au monomère : la constante de dissociation (Kd) des différentes cofilines pour l'actine-ADP varie entre 20 nM et 1.5 μ M, mais elle augmente d'un ordre de grandeur pour l'actine-ATP ($Kd = 0.2-30 \mu$ M) (Maciver and Weeds, 1994; Carlier et al., 1997; Blanchoin and Pollard, 1999). L'ADF/Cofiline a donc une affinité plus élevée pour les parties les plus anciennes du filament.

Certaines ADF/Cofilines ont la particularité d'être coopératives (McGough et al., 1997), c'est à dire que l'association d'une molécule sur le filament favorise l'association de nouvelles molécules d'ADF/Cofiline à proximité. Il s'agit là d'un effet relativement complexe, car on ne connaît ni les mécanismes exacts qui permettent cette coopérativité, ni sa portée sur le filament.

L'ADF/Cofiline est aussi connue pour accélérer la dissociation du phosphate inorganique des nucléotides associés aux monomères (Blanchoin and Pollard, 1998). Mais encore une fois, ni la portée de cet effet, ni le mécanisme exact ne sont connus. Enfin, l'ADF/Cofiline est un nucléateur de la polymérisation à forte concentration (Andrianantoandro and Pollard, 2006).

4.3 Fragmentation par l'ADF/Cofiline

L'ADF/Cofiline promeut le désassemblage des filaments d'actine. Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer ce comportement : la fragmentation (Maciver et al., 1991) ou l'accélération de la dépolymérisation au niveau de l'extrémité pointue (Carlier et al., 1997). Cependant, des travaux récents ont permis de mesurer les vitesses de dépolymérisation en présence d'ADF/Cofiline, taux qui ne semblent pas affectés par la protéine (Andrianantoandro and Pollard, 2006). A l'inverse, l'activité de fragmentation de l'ADF/Cofiline a pu être observée de façon directe.

Le mécanisme exact par lequel l'ADF/Cofiline fragmente ces filaments demeure inconnu. Néanmoins, son efficacité de fragmentation a pu être mesurée expérimentalement : il en ressort qu'ADF/Cofiline fragmente de façon optimale à des concentrations faibles ou intermédiaires (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Pavlov et al., 2007). A haute concentration, l'ADF/Cofiline cesserait de fragmenter pour au contraire stabiliser le filament (Bobkov et al., 2006).

4.4 Effets à longue portée de l'ADF/Cofiline sur le filament d'actine : modification des propriétés mécaniques

Afin de mieux comprendre le processus de fragmentation particulier de l'ADF/Cofiline, il faut pouvoir évaluer ses effets sur le filament d'actine.

En 1997, McGough a mis en évidence que l'ADF/Cofiline modifie la torsion des filaments et fragilise les interactions entre monomères. Ces changements pourraient expliquer comment l'ADF/Cofiline déstabilise les filaments et provoque la fragmentation à proximité de son site d'attachement (McGough et al., 1997). En 2005, Prochniewicz et al ont pu démontrer que l'association d'une molécule d'ADF/Cofiline augmente la flexibilité en torsion du filament, et cela sur un voisinage de plusieurs centaines de monomères (Prochniewicz et al., 2005). Cet effet à longue portée est souvent invoqué pour expliquer l'accélération de la dissociation du phosphate observée en présence d'ADF/Cofiline. Enfin, des travaux récents ont montré que l'ADF/Cofiline augmente aussi la flexibilité des filaments d'actine (McCullough et al., 2008) : l'ADF/Cofiline rend donc les filaments plus souples, autant en flexion qu'en torsion.

Si l'on résume ces observations, plusieurs hypothèses sont avancées pour éclairer le mode de fragmentation de l'ADF/Cofiline :

- la fragmentation se fait à l'endroit où l'ADF/Cofiline se fixe sur le filament. Cette hypothèse repose sur l'affaiblissement observé des interactions entre monomères provoqué par l'ADF/Cofiline, mais entre en contradiction avec la stabilisation des filaments à haute concentration.
- l'ADF/Cofiline stabilise uniquement la sous-unité à laquelle elle est associée et déstabilise allostériquement les sous-unités à proximité. Cette déstabilisation se propage donc et entraîne la cassure du filament dans les zones où l'ADF/Cofiline n'est pas présente, en particulier aux interfaces entre les parties décorées et celles non décorées.
- la modification des propriétés mécaniques (rigidité en flexion, en torsion) entraîne une accumulation du stress mécanique aux interfaces entre les portions non décorées et décorées du filament.

Notons que les deux dernières hypothèses sont compatibles mais se placent à des niveaux d'interprétations différents (la deuxième hypothèse est moléculaire, la troisième se place du point de vue de la mécanique continue du filament).

Chapitre 2

Modéliser le cytosquelette d'actine

1 Les modèles mathématiques appliqués à l'actine

1.1 Complexité de la dynamique de l'actine

Le cytosquelette d'actine intervient dans de nombreux processus biologiques faisant appel à un nombre impressionnant de protéines. Ces protéines ont des interactions très diverses avec l'actine : séquestration des monomères, nucléation de nouveaux filaments, fragmentation de filaments existants... Dès lors, il devient très difficile de comprendre intuitivement les différents mécanismes qui vont émerger de ce type de systèmes.

Cette notion d'émergence d'un comportement à partir d'interactions simples se retrouve dans l'organisation même des structures d'actine. Les monomères ont certaines propriétés intrinsèques (comme leur structure ou l'état de leur nucléotide) qui conditionnent leur assemblage en filaments. Ces filaments seront eux-même les briques élémentaires des réseaux branchés et des câbles d'actine. Et l'on retrouvera ces câbles et ces réseaux dans les protrusions membranaires, comme les lamellipodes et les filopodes. Ainsi, chaque niveau d'organisation voit émerger diverses structures qui s'appuient sur les propriétés individuelles de chacun des acteurs, conférant à l'ensemble une réelle complexité. C'est pourquoi les modèles mathématiques sont actuellement en plein essor dans le domaine de l'actine.

1.2 L'essor de la modélisation du cytosquelette d'actine

Un modèle mathématique s'appuiera toujours en premier lieu sur les données biologiques, qui permettent de caractériser l'action individuelle de nombre de protéines du cytosquelette. En intégrant l'action de ces différentes protéines dans un même modèle, il est possible de modéliser de façon quantitative certaines fonctions du cytosquelette d'actine (polymérisation de filaments, formation de protrusions, cytokinèse...). L'exploitation de ces modèles passe évidemment par une étape de validation où l'on compare les prédictions aux données biologiques.

1.3 Apports de la modélisation

Quantifier ce qui n'est pas mesurable

De tels modèles présentent de nombreux avantages. Premièrement, ils permettent d'accéder à certaines grandeurs qui ne sont pas mesurables, en raison des limites propres aux

instruments. Dans le cas de l'actine, les techniques d'imagerie à onde évanescente permettent d'observer des filaments individuels en temps réel avec une résolution inférieure à 300 nm. Sous cette résolution, un pixel représente déjà une centaine de monomères, là où un modèle mathématique peut représenter fidèlement l'état de chacune des sous-unités dans le polymère. La modélisation permet ainsi d'accéder à une grande variété de paramètres comme des forces (générées par élongation de filaments, Kovar and Pollard, 2004), des constantes chimiques (vitesse d'élongation, Vavylonis et al., 2006) ou encore physiques (couplage flexion-torsion, chapitre 7).

Modéliser la dynamique de l'actine à plusieurs échelles

Ces modèles peuvent s'adapter aux différentes échelles présentes dans le cytosquelette d'actine : modèles pour le monomère (Zheng et al., 2007), pour le filament (Vavylonis et al., 2005), pour les réseaux branchés (Carlsson, 2001) ou la motilité (Schaus et al., 2007).

Eclairer le rôle des différents acteurs

La modélisation permet d'acquérir une meilleure compréhension du rôle de chacune des protéines impliquées dans un processus particulier. Dans le cadre de la biologie *in vitro* et des systèmes reconstitués, les expérimentateurs sont souvent amenés à manipuler plusieurs protéines en parallèle. Évaluer, par l'expérience, l'impact individuel de chacune de ces protéines sur le résultat final est difficile. Chaque protéine est un "degré de liberté" dont on peut faire varier la concentration ou d'autres paramètres comme l'affinité. Les modèles mathématiques permettent, via des simulations, d'évaluer de façon simple l'impact de chaque paramètre du modèle sur le système complet.

Guider l'expérience

Enfin, après validation, le modèle est susceptible de guider l'expérience. Dans ce cas, ce sont les capacités prédictives de la modélisation qui sont intéressantes. Pour preuve, le chapitre 6 présente une application d'un modèle pour la dynamique de l'actine à des données expérimentales. C'est la capacité de ce modèle à évaluer certaines caractéristiques du filament (en particulier l'avancement de son hydrolyse) qui a guidé le choix des expériences à mener.

Dans ce chapitre, nous allons présenter une vue d'ensemble des différents modèles mathématiques qui ont été développés pour le cytosquelette d'actine. Nous commencerons à l'échelle du monomère, pour remonter à celle du filament puis à la motilité, ceci afin de replacer le travail de cette thèse dans une vue d'ensemble du domaine.

2 Modèles mathématiques pour la dynamique de l'actine

2.1 Monomère d'actine et rôle du nucléotide

La structure du monomère d'actine étant connue et l'importance du nucléotide dans la dynamique générale de l'actine ayant été prouvée, de nombreux modèles se sont attachés à étudier les changements conformationnels qui peuvent apparaître dans la protéine, selon l'état du nucléotide. La technique la plus employée pour étudier ces questions est celle des simulations de dynamiques moléculaires (*molecular dynamics simulations*, plus simplement

MD simulations). Il s'agit de prendre en compte les différentes interactions entre les atomes à l'intérieur des protéines pour simuler d'éventuels changements de conformation.

Contrôle de la poche nucléotidique

Un monomère d'actine est constitué de quatre sous-domaines et d'une poche dans laquelle s'insère le nucléotide (figure 2.1). L'hypothèse la plus couramment répandue postule que l'hydrolyse puis la dissociation du phosphate entraîneraient une ouverture de cette poche : le monomère d'actine-ADP aurait donc une structure ouverte et le monomère d'actine-ATP une structure fermée. Les simulations de dynamiques moléculaires ont justement permis d'infirmer cette hypothèse en montrant que, dans les deux cas, cette poche demeurerait fermée (Chu and Voth, 2005; Dalhaimer et al., 2007; Zheng et al., 2007). Ces simulations ont aussi été réalisées pour la protéine Arp3 (*actin related protein 3*) qui présente certaines similitudes avec le monomère d'actine. Dans ces simulations, la poche nucléotidique d'Arp3 montrait une certaine tendance à s'ouvrir, mais cette tendance ne semble pas liée à la nature du nucléotide (la poche pouvant s'ouvrir aussi bien avec un nucléotide ATP, ADP-Pi ou ADP) (Dalhaimer et al., 2007). Ces résultats ont toutefois été récemment remis en question. Dans une publication de 2009, Pfaendtner et al ont montré en utilisant un nouvel algorithme pour leurs simulations, qu'un nucléotide ADP favorise l'ouverture de la poche nucléotidique, là où elle demeure fermée avec un nucléotide ADP-Pi (Pfaendtner et al., 2009). Cette question demeure donc encore ouverte.

Effet du nucléotide sur les interactions entre sous-unités

Ces simulations se concentrent par ailleurs sur un autre sous-domaine bien particulier du monomère, la boucle *DB* (pour *DNase I-binding loop*). Cette boucle est une partie très souple du monomère et a une certaine tendance à s'organiser en hélice α lorsque le nucléotide est ADP, tandis qu'elle reste dépliée lorsque le nucléotide est ATP (Pfaendtner et al., 2009; Dalhaimer et al., 2007). Nous verrons plus tard que ce changement est une des hypothèses de base pour expliquer certaines variations dans la flexibilité des filaments d'actine.

Profiline et échange du nucléotide

Enfin ces modèles pour la dynamique moléculaire ont aussi été appliqués au complexe profiline-ATP-actine. La profiline se fixe entre les sous-domaines 1 et 3 du nucléotide (à l'extrémité opposée à l'ouverture de la poche nucléotidique, Schutt et al., 1993) et accélère l'échange du nucléotide ADP en ATP. Cette fonction a été attribuée à la structure de ce complexe profiline-ATP-actine, car la poche du nucléotide y est ouverte (Chik et al., 1996). Des simulations ont montré que la fixation de la profiline sur ce site était nécessaire à cette ouverture. En absence de profiline, cette configuration est instable et la poche se referme (Minehardt et al., 2006).

2.2 Nucléation de filaments

La nucléation spontanée de nouveaux filaments est une étape très lente passant par la formation d'un dimère puis d'un trimère d'actine très instables. Au delà du trimère, le filament est stabilisé. De nombreux modèles se sont attaqués à ces étapes pour améliorer notre connaissance de la nucléation.

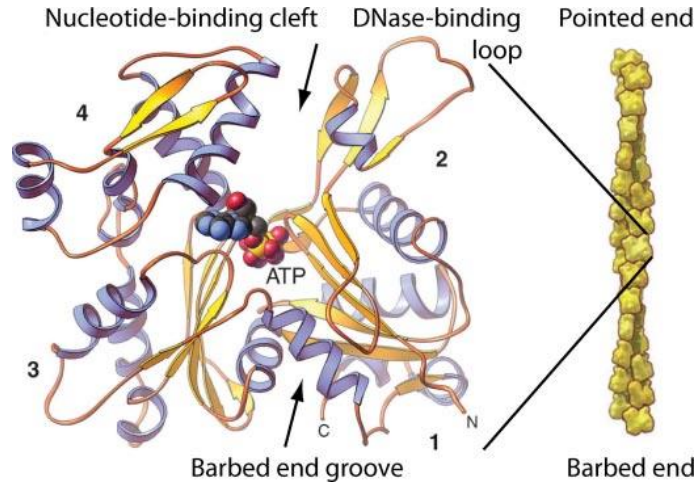
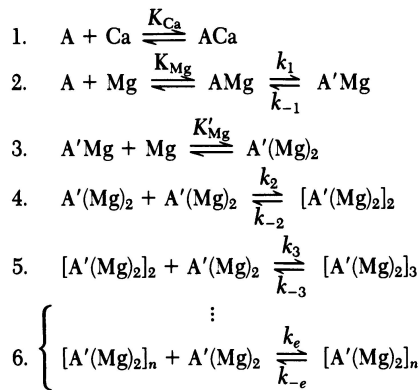


FIGURE 2.1 – Monomère d'actine et ses quatre sous-domaines : sur cette figure, on représente le monomère d'actine et ses quatre sous-domaines. La poche nucléotidique est mise en évidence ainsi que la boucle DB (*DNase-binding loop sur le schéma*). Figure tirée de Pollard and Earnshaw (2007)

Premiers modèles pour la cinétique de nucléation spontanée

Dans les années 80, Carl Frieden a adapté des modèles cinétiques à la question de la polymérisation de l'actine et a publié une série d'article montrant combien ces modèles sont utiles quand il s'agit d'évaluer les constantes cinétiques de la nucléation et de la polymérisation de l'actine (Barshop et al., 1983; Frieden, 1983; Frieden and Goddette, 1983; Frieden, 1985). A l'aide d'équations différentielles simples, Frieden crée un modèle pour la formation des dimères et des trimères lors de la nucléation. Puis il applique ce modèle à des données expérimentales afin de remonter aux constantes cinétiques. Comme on peut le voir, le modèle mathématique permet de quantifier cette instabilité du dimère, avec une constante de dissociation de l'ordre de $10^5 \mu M$.



(a) Modèle pour la nucléation de filament en Mg^{2+}

Table 1. Kinetic constants used to fit data according to Scheme I

Step	Constant*	Values obtained by using AEDANS-labeled G-actin (5)
1	$K_{Ca} = 20 \mu M$	$7 \mu M$
2	$K_{Mg} = 900 \mu M$	$900 \mu M$
	$k_1 = 0.33 \text{ sec}^{-1}$	0.19 sec^{-1}
	$k_{-1} = 0.01 \text{ sec}^{-1}$	0.01 sec^{-1}
	$K'_{Mg} k_{-1}/k_1 = 27 \mu M$	$47 \mu M$
3	$K'_{Mg} = 5 \text{ mM}$	
4	$k_{-2}/k_2 = 8 \times 10^5 \mu M$	
5	$k_{-3}/k_3 = 5 \mu M$	
6	$k_{-e}/k_e = 0.15^{\dagger}$	

(b) Table des constantes cinétiques

FIGURE 2.2 – Modèle cinétique pour la nucléation (a) le modèle mis en place par Frieden prend en compte la formation des dimères (étape 4), des trimères (étape 5) et la polymérisation de manière générale (étape 6). (b) La comparaison des résultats expérimentaux de polymérisation avec les courbes prédites par le modèle permet de remonter aux constantes cinétiques. Notez que les étapes 4 et 5 ont des constantes de dissociation les rendant instables (en particulier pour les dimères) ce qui n'est pas le cas de la polymérisation. Modèle et table tirés de Frieden (1983).

Étapes de la nucléation spontanée

En 2001, Sept et al ont effectué des simulations de dynamique Brownienne (*Brownian Dynamics*, ou *BD*) afin de déterminer avec précision les différentes étapes de la nucléation (Sept and McCammon, 2001). Plusieurs mécanismes sont susceptibles de former un nouveau filament stable, selon que les monomères sont ajoutés longitudinalement, ou bien sur le côté (figure 2.3).

Le modèle permet de proposer un chemin optimal (représenté par les flèches en gras) qui passe par un dimère longitudinal avant de former un trimère en ajoutant un monomère sur le côté. Ces modèles de dynamique Brownienne sont des algorithmes stochastiques qui simulent les interactions entre molécules. Ils sont couramment utilisés pour déterminer les cinétiques d'association entre protéines et les agencements qui sont les plus favorables (Elcock et al., 2001)

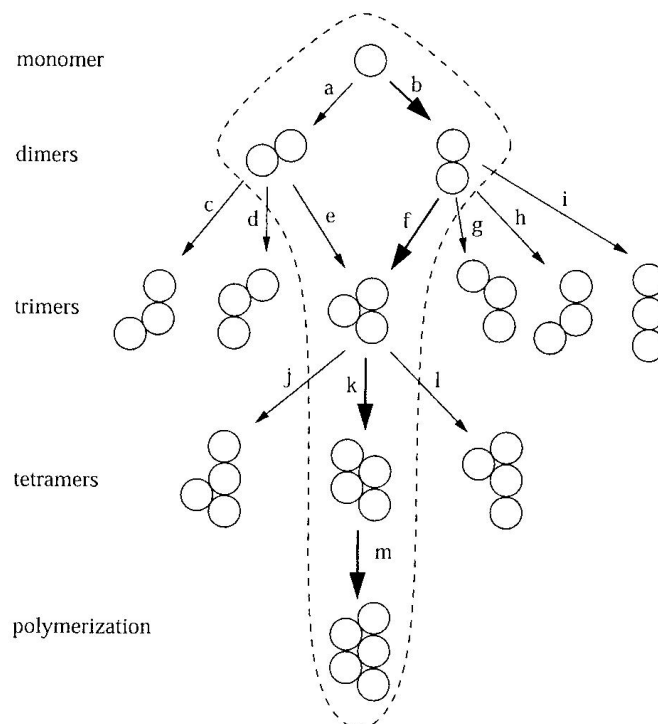


FIGURE 2.3 – Différentes étapes possibles pour la nucléation d'un filament d'actine : ce schéma prend en compte toutes les possibilités pour former un dimère, puis un trimère et enfin un tétramère avant d'allonger le filament. Les flèches en gras représentent le parcours privilégié tel qu'il ressort du modèle. Figure tirée de Sept and McCammon (2001).

2.3 État du nucléotide et dynamique du filament

Asymétrie entre les deux extrémités du filament

La cinétique d'élongation des filaments pose la question cruciale de l'asymétrie entre les deux extrémités : en d'autres termes, pourquoi l'affinité des monomères d'actine est-elle bien supérieure pour l'extrémité barbée que pour l'extrémité pointue ?

Les résultats obtenus par Sept et al mettent en évidence que ce sont les interactions électrostatiques qui sont en partie responsables, puisqu'elle s'opposent à l'insertion des mo-

nomères à l'extrémité pointue (Sept et al., 1999a). Sans prendre en compte ces interactions, l'extrémité pointue aurait même une vitesse d'élongation supérieure à l'extrémité barbée. Le modèle permet dans ce cas précis de mieux cerner les raisons de cette asymétrie, chose impossible si l'on se limite à l'expérience.

Hydrolyse du nucléotide et dissociation du phosphate

L'asymétrie n'est pas la seule question posée par la polymérisation. L'influence du nucléotide (comme on peut le voir en figure 1.2) et son évolution par hydrolyse et dissociation du phosphate sont toujours des domaines actifs de recherche. Dans leur article de 2006, Rould et al ont étudié l'effet du nucléotide sur des monomères non polymérisables (Rould et al., 2006). Il apparaît que l'hydrolyse de ces monomères en solution se fait en plusieurs dizaines d'heures, là où cette hydrolyse est extrêmement rapide à l'intérieur du filament ($k_{hydro} = 0.3 \text{ s}^{-1}$).

Des simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées en 1999 par Wriggers et al pour visualiser les étapes de la dissociation du phosphate. L'étape limitante semble être la séparation entre ce phosphate et le cation divalent, en raison d'interactions électrostatiques (Wriggers and Schulten, 1999). Néanmoins, on ne connaît pas encore les mécanismes qui régissent cette hydrolyse et cette dissociation du phosphate dans le polymère.

Composition nucléotidique du filament

Ces modèles ont permis d'introduire la question de la nature du nucléotide à l'intérieur des sous-unités du filament. Nous avons évoqué dans le chapitre précédent les différentes hypothèses (aléatoire contre vectorielle) qui régissent cette hydrolyse et cette dissociation du phosphate. La question centrale est de savoir si l'on peut voir émerger à l'intérieur du filament un gradient qui reposerait sur l'état du nucléotide, et donc sur le temps de résidence des sous-unités dans le polymère.

Vavylonis et al ont proposé en 2005 un modèle pour analyser cette composition du filament en monomères d'actine-ATP, ADP-Pi et ADP (Vavylonis et al., 2005). Leur approche est à la fois analytique et numérique. Une approche analytique permet de calculer la vitesse de croissance générale du filament : la principale difficulté étant que la vitesse de dépolymérisation de l'extrémité barbée dépend de l'état du nucléotide s'y trouvant actuellement. Mais il n'est pas possible par ce biais de représenter la nature précise des monomères ainsi que les fluctuations de la longueur du filament au cours du temps. Ce type de problème peut être résolu en ayant recours à des simulations numériques reposant sur l'algorithme de Gillespie (Gillespie, 1977, 2007). Nous reviendrons plus en détail sur cet algorithme en raison de l'utilisation que nous en faisons dans ce manuscrit. Rappelons simplement qu'il permet de simuler de façon exacte un ensemble de réactions moléculaires. Ceci peut être appliqué aux monomères dans le filament afin de simuler non seulement la polymérisation/dépolymérisation, mais aussi l'évolution du nucléotide.

Cap ATP/ADP-Pi : définition et modélisation

Les résultats obtenus soulignent l'importance capitale du *cap* dans la stabilité de la croissance du filament : par le terme *cap*, on désigne le groupe de sous-unités qui ne sont pas actine-ADP présentes à l'extrémité barbée. Ce cap est bien plus difficile à dépolymériser (figure 1.2) que les sous-unités actine-ADP au cœur du filament. Aux alentours de la concentration critique, ce cap a tendance à disparaître par moment provoquant de larges fluctuations de la vitesse d'élongation du filament, fluctuations que l'on avait pu observer

expérimentalement (Fujiwara et al., 2002; Kuhn and Pollard, 2005). Un modèle théorique développé par Stukalin *et al* a permis de confirmer ces résultats et de dériver des expressions analytiques pour la taille de ce cap et de ces fluctuations (Vavylonis et al., 2005; Stukalin and Kolomeisky, 2006).

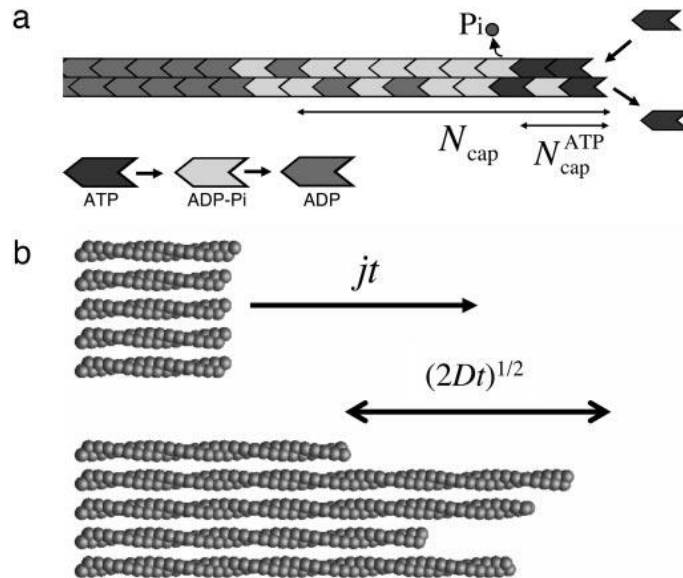


FIGURE 2.4 – **Modèle pour la dynamique du filament et l'influence du nucléotide.**(a) Schéma présentant le filament d'actine et la distinction entre les différents monomères selon l'état du nucléotide. Le *cap* (de longueur N_{cap}) représente le groupe de monomères non actine-ADP protégeant l'extrémité barbée.(b). En un temps t , chaque filament s'allongera en moyenne d'une longueur égale à jt . Cette élongation présente une certaine variabilité caractérisée par une variance égale à $(2Dt)^{\frac{1}{2}}$, D étant une constante représentant la dispersion des longueurs mesurées. Figure tirée de Vavylonis et al. (2005).

A mesure que l'on s'éloigne de la concentration critique, la longueur de ce cap augmente. En effet, la durée moyenne qui est nécessaire à l'hydrolyse et à la dissociation du phosphate ne change pas, mais la vitesse d'élongation elle, augmente, produisant un cap plus conséquent. Bindschadler et al fournissent une analyse plus précise de cette composition du filament (Bindschadler et al., 2004). En accord avec les résultats de Vavylonis et al le cap d'actine-ATP calculé est extrêmement réduit, suivi par un cap d'actine-ADP-Pi beaucoup plus long (la dissociation du phosphate étant beaucoup plus lente, Vavylonis et al., 2005).

Dépendance des modèles cinétiques aux mesures expérimentales

Notons enfin que les modèles pour la dynamique de l'actine cités précédemment sont étroitement liés aux mesures expérimentales d'un grand nombre de constantes cinétiques (vitesse d'élongation, hydrolyse ...). Ces mesures sont toujours susceptibles d'évoluer et de remettre en question ces mêmes modèles. Récemment, Fujiwara et al ont montré que la dissociation du phosphate, que l'on suppose aléatoire et uniforme dans l'immense majorité des modèles, est en réalité plus rapide aux extrémités du filament. De plus, l'affinité du phosphate inorganique pour les monomères est 10 fois plus faible à l'extrémité pointue qu'à l'extrémité barbée ce qui pourrait expliquer la différence de concentration critique entre ces deux extrémités (Fujiwara et al., 2007).

3 Modèles mathématiques pour les propriétés mécaniques de l'actine

3.1 Production de forces

Nous avons évoqué dans le chapitre 1 le rôle des filaments d'actine dans la production de forces, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Or, mesurer de telles forces ne peut se faire uniquement par des moyens expérimentaux. Ce sont bien souvent des modèles qui permettent d'évaluer cette production de forces.

Production de force par polymérisation

En 2004, Kovar et al mettent au point un protocole pour évaluer ces forces. Les filaments d'actine s'allongent par leur extrémité barbée, laquelle est immobilisée par une formine processive. Leur extrémité pointue est associée à une myosine inactive. Ces filaments sont donc contraints de s'allonger entre deux extrémités fixes et vont flamber. Néanmoins, ce flambage nécessite de produire une certaine force, dont l'expression fait intervenir la longueur de persistance du filament :

$$F_{flambage} = \pi^2 k_B T \frac{L_B}{L^2} \quad (2.1)$$

où $k_B T$ est la constante de Boltzmann multipliée par la température, L_B la longueur de persistance du filament (sur laquelle nous reviendrons ultérieurement) et L la longueur du filament.

La longueur de persistance étant une quantité connue, il reste à observer le flambage de filaments de tailles diverses. Plus le filament est court, plus la force nécessaire pour le faire flamber est importante. Il est alors possible de déterminer une borne inférieure pour la force produite par élongation via la formine. Dans le cadre de ces travaux, cette force est supérieure au piconewton (Kovar and Pollard, 2004).

Flambage de filaments d'actine

En 2007, Berro et al ont développé un modèle reproduisant le flambage de filament d'actine entre deux points fixes (Berro et al., 2007). Le filament y est considéré comme un bâtonnet semi-flexible dont le flambage varie en fonction de conditions aux extrémités (figure 2.5) : l'angle du flambage ou sa dérivée peuvent être fixés, modifiant ainsi la force produite. Un tel modèle prédit des forces de l'ordre du piconewton, qui peuvent atteindre la dizaine de piconewton si la distance entre les deux extrémités est courte.

La principale limitation de ce type de modèle est liée à la présence de la formine (modélisée ici comme un ressort). En effet, c'est la processivité dans ce cas de figure qui produit la force pendant l'élongation. Néanmoins, les filaments d'actine sont à même de produire ces forces via la polymérisation en absence de formine.

Cliquet Brownien

Le modèle le plus répandu pour expliquer cette production de forces est celui du cliquet Brownien (Peskin et al., 1993). Nous l'avons rapidement évoqué précédemment et nous revenons ici sur son principe ainsi que sur les variantes qui l'ont suivies.

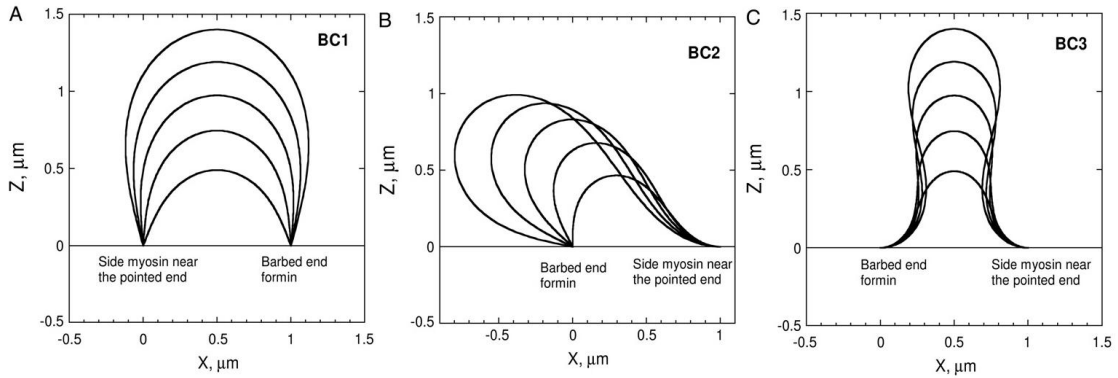


FIGURE 2.5 – **Flambage de filament d'actine.** Différents scénarios pour le flambage de filaments entre deux points fixes selon les conditions imposées aux bords (*Boundary Conditions*, ou *BC*). Dans chaque cas, l'extrémité barbée est associée à une formine et l'extrémité pointue à une myosine. (A) Les angles sont libres. (B) Un des deux angles est fixé, l'autre est laissé libre. (C) Les deux angles sont fixés. Chaque scénario produira une relation force / distance entre les extrémités différente. Figure adaptée de Berro et al. (2007).

Principe général

Le principe du cliquet Brownien (ou *Brownian ratchet*) est simple : un polymère en contact avec un obstacle (comme une membrane) n'est susceptible de s'allonger que lorsque l'espace entre son extrémité et l'obstacle est supérieur à la taille d'une sous-unité. Cela revient donc à pondérer la vitesse d'élongation du polymère par la probabilité de pouvoir insérer de nouvelles sous-unités à son extrémité. Les polymères qui se sont allongés vont permettre de repousser l'obstacle et de faire avancer le cliquet.

Initialement Peskin et al ont appliqué ce modèle à la polymérisation de l'actine en faisant l'hypothèse que les filaments sont très rigides, font face à la membrane, et que celle-ci fluctue en raison des chocs thermiques (figure 2.6(a)). La vitesse d'élongation de ce cliquet s'exprime de façon très simple :

$$v_{cliquet} = \delta[\alpha e^{-\frac{\omega}{k_B T}} - \beta] \quad (2.2)$$

où δ représente la longueur d'une sous-unité dans le filament ($\approx 3nm$), α la vitesse de polymérisation du filament en l'absence de toute contrainte, et β la vitesse de dépolymérisation du filament. Le terme $e^{-\frac{\omega}{k_B T}}$ représente la probabilité de pouvoir insérer un monomère à l'extrémité du filament, avec $\omega = f\delta$ l'énergie nécessaire pour repousser la membrane lorsqu'elle exerce une force f sur les filaments du cliquet.

Cliquet Brownien élastique

Ce modèle a été remis en cause pour deux raisons. Premièrement il suppose une orientation des filaments orthogonale à l'obstacle, là où l'observation directe de réseaux d'actine a montré que les filaments privilégient souvent une orientation de 45° avec la membrane (Small et al., 1995). Deuxièmement, seul le mouvement Brownien de l'obstacle est pris en compte. Ce mouvement étant dépendant de la géométrie et de la taille de l'obstacle, des différences de vitesse importantes devraient être observées d'un système à l'autre (par exemple *Listeria* et *Shigella*) ce qui n'est pas le cas.

En 1996, Mogilner et al ont proposé une nouvelle version de ce modèle (Mogilner and Oster, 1996). Cette fois-ci, les fluctuations thermiques de l'obstacle sont ignorées au profit

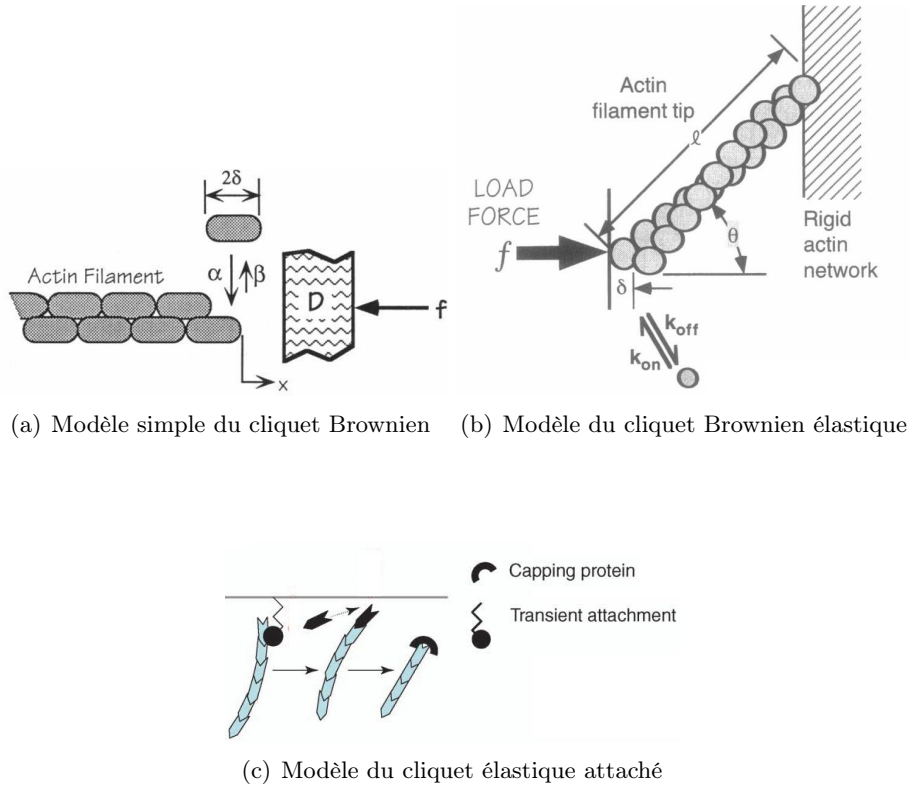


FIGURE 2.6 – **Modèles du cliquet Brownien** (a) Le modèle du cliquet Brownien tel qu'introduit en 1993 par Peskin et al. Le filament est considéré comme rigide et faisant face à la paroi. Ce sont les fluctuations thermiques de l'obstacle (représentées par le coefficient de diffusion D) qui permettent l'insertion d'un monomère de taille 2δ . La polymérisation (α) et la dépolymérisation (β) sont représentées, ainsi que la force f exercée par l'obstacle. Image adaptée de Peskin et al. (1993) (b) Le modèle de cliquet élastique introduit par Mogilner et al en 1996. Le filament d'actine adopte un angle θ par rapport à l'obstacle et est considéré comme semi-flexible. L'obstacle est cette fois-ci fixe et ce sont les fluctuations du polymère qui permettent l'insertion des sous-unités. Image adaptée de Mogilner and Oster (1996). (c) Modèle du cliquet élastique attaché. Le filament passe par une phase transitoire où il est attaché à l'obstacle, avant d'être libéré, de polymériser, puis d'être coiffé. Image adaptée de Mogilner (2006).

de celles du filament, d'où le nom de cliquet élastique. L'élasticité du polymère est représentée sous la forme d'un ressort dont l'extrémité est soumise à des fluctuations. L'orientation du filament étant libre, l'espace nécessaire pour l'insertion d'un nouveau monomère dépend de l'angle entre le filament et l'obstacle (figure 2.6(b)). Cette fois ci, la relation vitesse/force exercée par l'obstacle prend une forme différente :

$$v_{cliquet\,élastique} = \delta \cos(\theta)[k_{on}Mp(\theta, f) - k_{off}] \quad (2.3)$$

La vitesse du cliquet fait intervenir l'angle formé par le filament avec l'obstacle (car un monomère ajouté au filament ne contribue à repousser l'obstacle que d'une quantité $\delta \cos(\theta)$). La vitesse de polymérisation est toujours pondérée par la probabilité d'avoir l'espace suffisant pour l'insertion d'un nouveau monomère. Ici cette probabilité ne dépend plus des caractéristiques physiques de l'obstacle mais bien de l'angle adopté par le filament, de sa taille et de sa longueur de persistance.

Cliquet Brownien élastique attaché

Le modèle du cliquet Brownien élastique a lui même été l'objet de nombreuses critiques. Plusieurs résultats expérimentaux ont montré que les filaments qui propulsent *Listeria* sont rattachés, au moins transitoirement, à la surface de la bactérie, ce qui ne semble pas cohérent avec le modèle du cliquet Brownien (Gerbal et al., 2000; Cameron et al., 2001). Une nouvelle version du modèle a été développée en 2003 pour adresser ce problème (Mogilner and Oster, 2003). Dans ce modèle de cliquet Brownien élastique attaché, les filaments sont nucléés à la surface et y sont retenus temporairement par des protéines (voir figure 2.6(c)). Ils finissent par se dissocier de cette surface et peuvent s'allonger pour produire les forces nécessaires à la motilité. Ils seront finalement coiffés par des protéines ce qui les éloigne de la surface de la bactérie.

Le cliquet Brownien demeure encore aujourd'hui le modèle dominant en ce qui concerne la production de forces à l'échelle du filament. Ces différentes variantes montrent combien ce mécanisme peut s'adapter à plusieurs problématiques biologiques, de la propulsion de *Listeria* à la formation des Lamellipodes.

3.2 Propriétés physiques du filament d'actine

Rigidité en flexion et en torsion : définition de la longueur de persistance et de la longueur de torsion

Certaines propriétés physiques des polymères d'actine, comme l'élasticité des filaments, peuvent être quantifiées à l'aide de modèles mathématiques. Les filaments d'actine étant des polymères semi-flexibles, leur élasticité en flexion et en torsion est représentée par des longueurs caractéristiques : la longueur de persistance représente l'élasticité du filament en flexion, la longueur de torsion l'élasticité en torsion. Plus la longueur de persistance est élevée, plus le filament est rigide, inversement plus elle est faible, plus le filament est souple.

De façon plus formelle, si l'on note $\theta(s_1)$ l'angle formé par la tangente au filament au point d'abscisse curviligne s_1 et $\theta(s_2)$ ce même angle au point d'abscisse curviligne s_2 (figure 2.7), ces deux angles sont liés par la relation :

$$\langle \cos(\theta(s_1) - \theta(s_2)) \rangle = \exp\left(-\frac{s_2 - s_1}{2L_B}\right) \quad (2.4)$$

où L_B est la longueur de persistance. La quantité $\langle \cos(\theta(s_1)\theta(s_2)) \rangle$ est calculée en moyenne car les déformations du filament sont usuellement liées à l'agitation thermique. Dans l'expression 2.4, plus L_B est élevée, plus le terme $\exp\left(-\frac{s_2 - s_1}{2L_B}\right)$ tend vers 0, moins cette angle $\theta(s)$ est autorisé à varier entre s_1 et s_2 . Le filament aura ainsi tendance à ne pas dévier de son axe, traduisant bien cette notion de rigidité en flexion. Le même principe s'applique à la torsion du filament, que nous appellerons "Longueur de torsion" et que nous noterons L_T dans le reste de ce manuscrit.

Détermination de la longueur de persistance

En 1995, Isambert et al mesurent le mouvement Brownien de filaments d'actine en microscopie à fluorescence (Isambert et al., 1995). En quantifiant la courbure de ces filaments

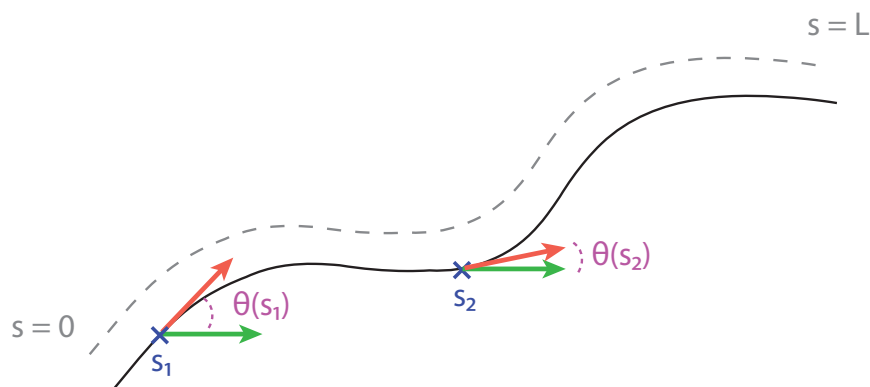


FIGURE 2.7 – **Illustration de la longueur de persistance du filament d'actine.** Un filament d'actine est un polymère semi-flexible. La longueur de persistance traduit la rigidité de ce polymère en contraignant les déformations du filament. Ici, cette déformation est représentée par l'angle $\theta(s)$ entre la tangente au filament au point s et l'axe des x (vecteur vert). Les angles $\theta(s_1)$ et $\theta(s_2)$ sont contraints par la relation 2.4.

sous les fluctuations thermiques, les auteurs déterminent une longueur de persistance de $9 \mu m$ environ pour les filaments d'actine-ADP, et de $13 \mu m$ pour les filaments d'actine-ATP. Une approche théorique des modes de déformations de l'actine filamentreuse conduite la même année prédit une longueur de persistance de l'ordre de $10 \mu m$, en accord avec ces données (Ben-Avraham and Tirion, 1995).

Impact du nucléotide sur la longueur de persistance

Plus récemment, des simulations de dynamique moléculaire ont apporté une meilleure compréhension de la différence de flexibilité entre l'actine-ATP et l'actine-ADP (Chu and Voth, 2005). La boucle présente dans le sous-domaine 2 du monomère adopterait un repliement en hélice α dans le cas des monomères d'actine-ADP. Ce changement de conformation affaiblit les contacts longitudinaux entre les monomères, rendant le filament plus souple. La longueur de persistance prédite est de $16 \mu m$ pour les filaments d'actine-ATP et de $8.5 \mu m$ pour ceux d'actine-ADP, en cohérence avec les mesures expérimentales. Ces simulations sont complétées par des modèles *Coarse-Grained* qui prédisent des longueurs de persistance s'échelonnant entre $5 \mu m$ et $17 \mu m$ en fonction de la distance d'interaction entre monomères (Chu and Voth, 2006).

Détermination de la longueur de torsion

Les filaments d'actine sont beaucoup plus souples en torsion qu'en flexion. Les premières mesures de la torsion des filaments menées en 1983 et 1984 par l'étude de l'anisotropie de fluorescence indiquent une rigidité en torsion de l'ordre de $2 \times 10^{-18} \text{ dyn cm}^2$, soit une longueur de torsion inférieure au μm (Mihashi et al., 1983; Yoshimura et al., 1984). En d'autres termes, le flambage des filaments se fait sur des longueurs supérieures au μm , là où la torsion s'accumule sur des longueurs inférieures au μm . La modélisation de l'actine étant encore naissante, ce sont des modèles issus de l'analyse de l'ADN qui seront adaptés au filament d'actine (Schurr, 1984). L'application de ces modèles par Prochniewicz et al. aux données d'anisotropie permet de confirmer ces valeurs expérimentales (Prochniewicz et al., 2005).

4 Protéines associées à l'actine

Les nombreuses protéines qui interagissent avec l'actine le font parfois de façon complexe : dans le cas de l'ADF/Cofiline par exemple, l'affinité variable de la protéine (liée à l'état du nucléotide) couplée à son activité de fragmentation permettent d'accélérer le désassemblage du réseau d'actine. Certains nucléateurs comme Arp2/3 contraignent la géométrie du réseau d'actine en créant des branches sur le côté du filament avec un angle bien défini.

Les modèles mathématiques permettent d'étudier et de caractériser la réponse du réseau d'actine à l'introduction de ces protéines associées. Nous présentons ici quelques modèles centrés sur l'action de ces protéines. Nous nous concentrerons sur l'ADF/Cofiline, qui tient une place particulière dans ce manuscrit, ainsi que sur les nucléateurs Arp2/3 et formines.

4.1 Modèles pour l'action de l'ADF/Cofiline

L'ADF/Cofiline s'associe aux filaments d'actine et provoque leur fragmentation. Cette activité a un grand nombre d'implications aussi bien en terme de nucléation (les fragments constituent de nouvelles extrémités actives) que de contrôle de la taille des filaments. La fragmentation d'une population de filaments de taille fixe est susceptible de changer profondément la distribution des longueurs en favorisant l'apparition de fragments courts. Cette activité est d'autant plus complexe qu'elle peut être associée à d'autres protéines, comme les protéines de coiffe, qui vont elles bloquer l'élongation des fragments.

Impact de l'ADF/Cofiline sur la longueur d'une population de filaments

Dans un tel contexte, les modèles mathématiques se révèlent très efficaces pour évaluer, par des méthodes analytiques ou par des simulations, les nombreux effets de l'ADF/Cofiline sur une population de filaments. En 1998, Du et al font l'étude de la cinétique de polymérisation de l'actine en présence d'ADF/Cofiline de levure (Du and Frieden, 1998). Leur modèle cinétique pour la croissance des filaments comprend les différentes étapes de la nucléation et de la polymérisation. Les auteurs montrent qu'en présence d'ADF/Cofiline, le modèle ne peut rendre compte des données que si l'on y ajoute une étape de fragmentation. Les taux de fragmentation prédits se situent entre $10^{-3} s^{-1}$ et $10^{-2} s^{-1}$ événements par filament. Ces premières évaluations rejoignent les mesures d'activité de l'actophorine qui seront effectuées ultérieurement et pour lesquelles les taux de fragmentation mesurés et prédits sont de l'ordre de $2 \times 10^{-2} s^{-1}$ (Blanchoin and Pollard, 1999).

Un premier modèle analytique pour la distribution des longueurs de filaments en présence de fragmentation est proposé par Edelstein-Keshet et al la même année (Edelstein-Keshet and Ermentrout, 1998; Ermentrout and Edelstein-Keshet, 1998). Néanmoins, la fragmentation y est considérée indépendamment de la polymérisation, et avec une probabilité uniforme de fragmenter le long du filament, hypothèses peu réalistes dans le cas de l'ADF/Cofiline. Un modèle plus détaillé suivra en 2001 dans lequel la probabilité de fragmenter le filament est supposée, au choix : constante le long du filament ou dépendante du gradient d'actine-ADP (Edelstein-Keshet and Ermentrout, 2001). Couplée à l'activité des protéines de coiffe, la fragmentation stimule la production de filaments et induit une distribution gaussienne des longueurs de filaments.

Des simulations de dynamique stochastique couplées à un modèle analytique ont montré une stimulation de la polymérisation d'actine filamenteuse en présence d'ADF/Cofiline et de protéine de coiffe (Carlsson, 2006). Cette stimulation est attribuée à la fragmentation qui libère de nouvelles extrémités barbées. La croissance de ces nouveaux filaments est favorisée

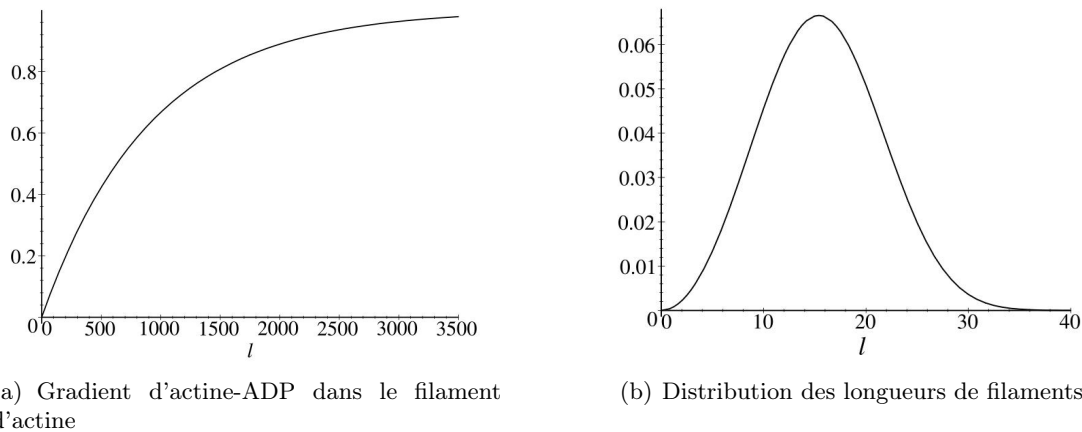


FIGURE 2.8 – Effets de la fragmentation sur la distribution des longueurs dans une population de filaments (a) Gradient d'actine-ADP à l'intérieur du filament d'actine, exprimé en % en fonction de la distance à l'extrémité barbée (exprimée en sous-unités). (b) Distribution des longueurs dans une population de filaments en présence de fragmentation. Notez que l'efficacité de la fragmentation est modulée par le gradient d'actine-ADP présenté ci-dessus. Résultats tirés de Edelstein-Keshet and Ermentrout (2001)

par une diminution de la concentration critique d'actine monomérique. L'originalité de ce modèle réside dans la modélisation de la fragmentation : la probabilité de fragmentation est un paramètre du modèle que les auteurs peuvent faire varier afin d'en étudier les effets. Par ailleurs, cette probabilité est exprimée en événement par seconde par sous-unité, et non par filament. Les filaments les plus longs ont de ce fait une probabilité plus importante d'être fragmentés. Le calibrage du modèle à l'aide de données réelles fixe cette constante de fragmentation aux alentours de $10^{-6} s^{-1}$. Cette valeur est légèrement plus élevée que celles prédites ($10^{-8} s^{-1}$, Erickson, 1989 ; $4-6 \times 10^{-7} s^{-1}$, Sept et al., 1999b) ou mesurées ($7 \times 10^{-7} s^{-1}$, Kinosian et al., 1993) précédemment.

Modifications des propriétés physiques du filament par l'ADF/Cofiline

La modélisation de l'ADF/Cofiline ne se limite pas aux propriétés de fragmentation. Nous avons évoqué précédemment les effets de l'ADF/Cofiline sur la mécanique du filament : les filaments de cofilactine sont plus souples, en flexion comme en torsion. L'association de l'ADF/Cofiline sur les monomères d'actine (Wriggers et al., 1998) et plus récemment sur les filaments (Pfaendtner et al., 2010) ont été modélisées à l'aide de simulations de dynamique moléculaire. L'ADF/Cofiline modifie la structure du filament et affaiblit les interactions latérales entre les deux brins du filament. La longueur de persistance s'en trouve divisée par 2 avec une valeur prédite de $3.7 \mu m$, proche des $2.2 \mu m$ mesurés expérimentalement (McCullough et al., 2008).

La longueur de torsion L_T du filament est également affectée par l'ADF/Cofiline chutant ainsi de $0.6 \mu m$ à $0.03 \mu m$ (Prochniewicz et al., 2005).

4.2 Action des nucléateurs : Arp2/3 et formines

Les nucléateurs ont un effet majeur sur la formation des réseaux d'actine : en stimulant la création de nouveaux filaments, ils provoquent une augmentation générale de la quantité d'actine polymérisée. L'utilisation de modèles mathématiques permet de quantifier cette augmentation et de préciser le mode d'action de ces nucléateurs (constantes cinétiques, vitesse de polymérisation).

Modèles pour le complexe Arp2/3

Arp2/3 est un nucléateur qui se fixe sur le côté d'un filament existant pour en nucléer un nouveau avec un angle d'approximativement 70° . Des simulations de la cinétique de polymérisation de l'actine ont permis d'identifier l'ensemble des étapes de cette nucléation (Beltzner and Pollard, 2008). Arp2/3 doit préalablement former un complexe ternaire avec l'actine et un promoteur de la nucléation comme WASp. Ce complexe ternaire n'est pas actif tant qu'il n'a pas pu se fixer sur le côté d'un filament préexistant. Ce modèle permet aux auteurs de proposer un ensemble de constantes cinétiques pour chacune des étapes de la nucléation.

Modèles pour les protéines de la famille des formines

Les protéines de la famille des formines ont en commun un sous-domaine, appelé FH2, qui joue un rôle fondamental dans l'activité de nucléation de la formine. Un modèle cinétique appliqué à des données expérimentales a permis d'expliquer ce rôle nucléateur : le sous-domaine FH2 stabilise les dimères d'actine, étape la plus instable de la polymérisation (Pring et al., 2003).

La caractéristique la plus remarquable de la formine est sans doute la processivité. Le domaine FH2 de la formine se dimérise pour former un collier qui vient se fixer à l'extrémité barbée du filament (Otomo et al., 2005). La description exacte de ce mécanisme n'a pas encore été élucidée. Il faut ajouter à cela l'accélération de la vitesse de polymérisation : le sous-domaine FH2 seul ralentit la polymérisation (Pruyne et al., 2002) mais en présence de profiline et associé à un autre sous-domaine, nommé FH1, la polymérisation est accélérée (d'un facteur 4.5 pour la formine mDia1 par exemple (Kovar et al., 2006)). Un modèle de coiffe processif fait actuellement consensus : un dimère FH2 serait attaché à l'extrémité barbée mais pourrait adopter deux états : un premier état dans lequel les deux parties du dimère sont liées au filament (état que l'on nomme "bloqué"), et un deuxième état dans lequel l'une des parties du dimère bascule en avant et laisse un espace libre pour polymériser un nouveau monomère (état "ouvert") (Xu et al., 2004; Vavylonis et al., 2006). L'alternance entre ces deux états permettrait d'allonger le filament tout en conservant le dimère à l'extrémité barbée.

En 2007 Shemesh et Kozlov développent un modèle théorique basé sur ce scénario (Shemesh and Kozlov, 2007). Ce modèle permet de rendre compte des différents taux de polymérisation observés expérimentalement et vient par conséquent soutenir l'hypothèse initiale de Xu et al. Notons toutefois qu'il repose uniquement sur une approche énergétique (c'est l'énergie élastique de l'extrémité coiffée par formine qui est étudiée par le modèle) et n'incorpore aucune information de type mécanique. La question du fonctionnement exacte de la formine reste donc ouverte.

5 Modèles pour la motilité

Nous avons présenté en introduction le rôle majeur du cytosquelette d'actine dans la motilité. La reconstitution de cette motilité fait intervenir la polymérisation de l'actine mais aussi les nombreuses protéines associées évoquées précédemment : protéines de fragmentation (ADF/Cofilin), nucléateurs des réseaux branchés (Arp2/3), protéines de coiffe, et bien d'autres encore. Modéliser cette motilité implique de prendre en compte tous ces processus au sein d'un même modèle unifié.

Les objectifs sont multiples : préciser le rôle propre de chacune des protéines impli-

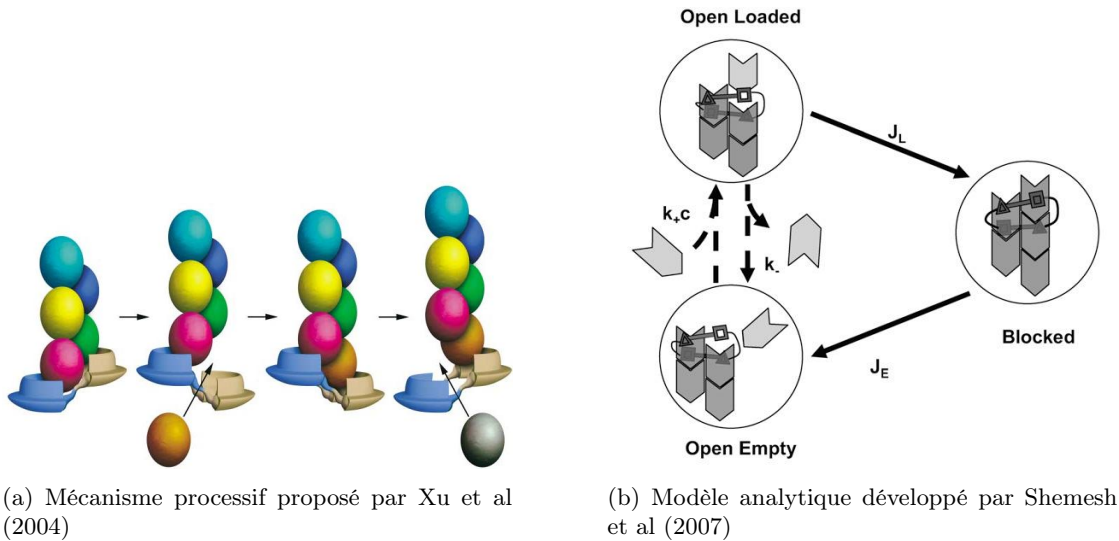


FIGURE 2.9 – **Modélisation de l'élongation de filaments d'actine par une formine processive**
 (a) Modèle pour la processivité de la formine tel que proposé par Xu et al en 2004. Le dimère FH2 prend la forme d'un collier qui enserré l'extrémité barbée du filament. L'insertion des monomères se ferait par le décalage de l'une des deux parties du dimère. Ce décalage permet à la formine de demeurer au niveau de l'extrémité barbée. Figure adaptée de Xu et al. (2004). (b) Modèle analytique mis en place par Shemesh et al. Ce modèle repose sur la mise en évidence de différents états pour la formine : ouvert (open) lorsque la formine est prête à accueillir un nouveau monomère, fermé quand elle ne l'est plus (blocked). Le passage d'un état à l'autre se fait sur une certaine durée représentée par les flux J_L et J_E . La polymérisation dans l'état ouvert se fait classiquement à un taux égal à k_+c (c concentration d'actine monomérique) et la dépolymérisation à un taux k_- . Figure tirée de Shemesh and Kozlov (2007).

quées (quel impact pour la coiffe des filaments? Pour la fragmentation?); Déterminer l'organisation générale qui émergera d'un tel système (quelle orientation pour les filaments d'actine?); Caractériser certaines propriétés physiques de la motilité (vitesse de déplacement, forces produites par la polymérisation du réseau d'actine, relation force/vitesse).

Les différentes approches de ce problème sont très variées : modèles analytiques, simulations stochastiques, modèles discrets où les filaments sont représentés individuellement ou approche continue du réseau sous la forme d'un gel (comme c'est souvent le cas pour la motilité bactérienne). Nous présentons ici quelques uns de ces modèles.

5.1 Lamellipodes et réseaux branchés

Modèle de nucléation dendritique

Le modèle de nucléation dendritique (Pollard and Borisy, 2003) est le modèle de référence pour la création de motilité par réseaux branchés. L'activation d'Arp2/3 au niveau de la membrane entraîne la création de nombreuses branches qui vont polymériser au contact de l'obstacle et le propulser par le mécanisme du cliquet Brownien (Peskin et al., 1993; Mogilner and Oster, 1996).

Organisation des filaments à l'intérieur du réseau branché

Un premier modèle, proposé par Maly et Borisy en 2001, pose la question de l'organisation des filaments à l'intérieur de ce réseau branché (Maly and Borisy, 2001). L'orientation d'une nouvelle branche (une "fillette") dépend directement de l'orientation du filament

"mère" puisque le complexe Arp2/3 privilégie un angle aux alentours de 70° entre ce filament "mère" et le filament "fille". L'orientation du réseau suit donc un processus d'évolution, l'aléa dans l'angle formé par les nouvelles branches pouvant être considéré comme une mutation. Un tel modèle prédit une orientation des filaments à $\pm 35^\circ$ par rapport à la membrane. Cette orientation diffère de l'orientation à $\pm 45^\circ$ observée auparavant (Small et al., 1995) mais elle est soutenue par une analyse poussée de l'orientation des filaments sur des images obtenues en microscopie électronique.

Carlsson propose la même année un modèle stochastique basé sur la formation de ces réseaux branchés (Carlsson, 2001). Ce modèle prend en compte la création des branches (qui peut être restreinte ou non aux extrémités des filaments), leur polymérisation contre un obstacle et la présence des protéines de coiffe. Cela permet de créer une variété de modèles dont la géométrie va changer en fonction de la coiffe et de la localisation des branches. Le modèle met en évidence une vitesse de propulsion de l'obstacle qui est peu affectée par la force de l'obstacle. La géométrie du réseau est telle qu'en cas d'obstacle particulièrement lourd, les filaments les plus longs flambent, amenant plus de filaments au contact de l'obstacle pour en supporter le poids. Ces résultats sont cohérents avec certaines observations de la motilité bactérienne où la géométrie de l'obstacle varie mais pas la vitesse de propulsion.

Propulsion de l'obstacle par le réseau branché

Quel est le nombre de filaments actifs nécessaires à la propulsion de l'obstacle ? Mogilner et Edelstein-Keshet développent en 2002 un modèle basé sur un ensemble d'équations différentielles pour la régulation du réseau branché (Mogilner and Edelstein-Keshet, 2002). Ce système suppose une répartition uniforme de la force générée par l'obstacle sur les filaments, avec diffusion des monomères et coiffe des filaments. Les vitesses prédites par le modèle sont de l'ordre de $12 \mu m.min^{-1}$. Ce modèle met en évidence un nombre optimal d'extrémités actives qui dépend directement de la rigidité de la membrane. Cet optimum varie entre 25 et 250 extrémités par μm . En dessous de cet optimum, les filaments ne sont pas assez nombreux pour soutenir l'obstacle ; au-dessus, le nombre d'extrémités actives est trop important et la compétition entre ces filaments pour les monomères qui ont diffusés réduit la vitesse globale.

Afin d'unifier ces différents aspects de la croissance du réseau branché (vitesse de propulsion, orientation des filaments, coiffe des filaments), Schaus et al développent en 2007 un modèle stochastique plus complet (Schaus et al., 2007). Ce modèle incorpore tous les aspects évoqués précédemment : diffusion des monomères, coiffe des filaments, protection des filaments au contact de la membrane (en raison de l'obstacle), filaments élastiques, modélisation de la membrane et branchement de nouveaux filaments. Leurs résultats soulignent une orientation préférentielle des filaments $\pm 35^\circ$, comme prédite précédemment. Cette orientation induit une vitesse de croissance du réseau de l'ordre de $8 \mu m.min^{-1}$, soit 40 % de la vitesse d'élongation des filaments individuels en l'absence de contrainte. Néanmoins, cette orientation demeure fortement dépendante de plusieurs paramètres du modèle comme la flexibilité des filaments, l'efficacité du branchement et la coiffe des filaments. En cas de plus grande souplesse des filaments ou d'une vitesse de création de branches faibles, l'orientation des filaments change pour un triplet $-70^\circ/0^\circ/+70^\circ$. Cette orientation serait particulièrement adaptée à des vitesses de croissance du réseau faibles ($< 20\%$ de la vitesse d'élongation individuelle du filament).

Récemment, un modèle stochastique en deux dimensions développé par Weichsel et al a mis en évidence une différence fondamentale dans la relation force/vitesse entre ces deux types d'organisation du réseau branché (Weichsel and Schwarz, 2010). En cas de force très

faible, l'orientation $-70^\circ/0^\circ/+70^\circ$ est privilégiée car elle permet aux filaments orthogonaux à la membrane de suivre le mouvement. En cas de force intermédiaire, c'est bien le schéma $\pm 35^\circ$ qui domine. Enfin, lorsque l'obstacle est très important, le flambage des filaments favorise à nouveau un schéma $-70^\circ/0^\circ/+70^\circ$ avec une vitesse de déplacement de l'obstacle faible. Ces résultats permettent de rendre compte des différentes relations force/vitesse observées expérimentalement (Marcy et al., 2004; Parekh et al., 2005).

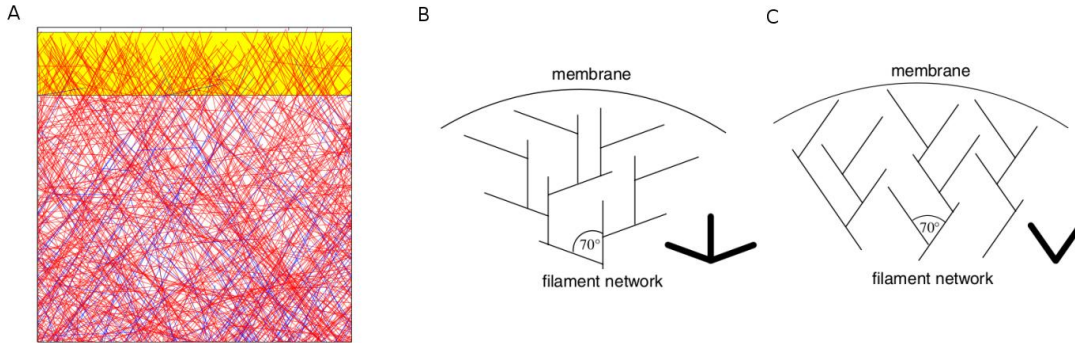


FIGURE 2.10 – **Réseaux branchés d'actine.** Exemple de modèle mathématique pour les réseaux branchés d'actine. (A) Simulation d'un réseau branché de filaments en présence d'Arp2/3 et de protéines de coiffe. La tranche en jaune représente les filaments actifs (en élévation). (B) et (C) Deux types d'orientation privilégiée pour les filaments, avec un réseau à $-70^\circ/0^\circ/+70^\circ$ en B et à $\pm 35^\circ$ en C. Ces deux orientations induisent une relation force/vitesse différente lors de la propulsion du lamellipode. Figure adaptée de Weichsel and Schwarz (2010).

Activation d'Arp2/3

Notons enfin que tous les modèles d'organisation du réseau précédemment cités reposent sur un processus de création de branches à proximité de l'obstacle et projettent le lamellipode en deux dimensions uniquement. Dans un modèle en trois dimensions pour l'activation d'Arp2/3 par WASp et sa diffusion avant la création d'une branche, Atilgan et al ont prouvé la nécessité d'ajouter de nouvelles contraintes spatiales pour expliquer l'organisation des filaments du réseau (Atilgan et al., 2005). Selon ces résultats, un réseau de filaments orienté à $\pm 35^\circ$ par rapport à la membrane ne peut pas être obtenu si Arp2/3 diffuse librement après son activation. Il est nécessaire pour le complexe de demeurer lié à de protéines membranaires (comme WASp) afin de nucléer de nouvelles branches.

5.2 Filopodes et câbles d'actine

Lien avec les protéines de la famille des formines

Nous avons présenté en introduction les filopodes, ces fines protrusions que l'on observe souvent à la frange du lamellipode. Un filament seul ne possède pas la rigidité suffisante à la formation de ces structures, ce sont donc des câbles d'actine, constitués de filaments alignés parallèlement, qui produisent ces protrusions. La production de ces câbles a pu être reliée expérimentalement à la présence des formines (Kobiellak et al., 2003; Michelot et al., 2005, 2006) mais ces structures peuvent aussi émerger à partir d'un réseau branché (Svitkina et al., 2003; Vignjevic et al., 2003). La modélisation mathématique de ces câbles se focalise sur deux questions cruciales : comment les filopodes sont-ils générés ? Comment maintenir cette déformation de la membrane ?

Initiation du câble d'actine

L'initiation d'un filopode est étroitement liée à la formation du câble de filaments d'actine. Plusieurs hypothèses ont été retenues. Si l'on considère plusieurs filaments parallèles, soumis à des fluctuations thermiques, il est possible pour ces filaments d'entrer en contact, de demeurer liés soit par des interactions non spécifiques soit par des protéines de liaison, avant de se "zipper" à la manière d'une fermeture éclair (Brill-Karniely et al., 2009; Kraikivski et al., 2008; Yang et al., 2006). La probabilité de formation du câble dépend alors fortement de trois paramètres : la distance entre les deux filaments, l'énergie de liaison apportée par la protéine de liaison et la longueur des filaments concernés. La distance entre filaments est un paramètre important du modèle car elle dépend fortement de la manière dont ces mêmes filaments ont été nucléés. En présence d'Arp2/3 et de fascine (une protéine de liaison), des asters de filaments apparaissent ainsi que des câbles. De façon surprenante, la taille, l'épaisseur et le nombre de câbles diminuent avec les concentrations croissantes d'Arp2/3, un résultat prédit par un simple modèle de cinétique stochastique (Haviv et al., 2006; Ideses et al., 2008).

Rôle de la membrane dans la formation des câbles

Ce type de modèle reste critiquable en raison de l'absence de la membrane. En 2008, Liu et al parviennent à former des câbles d'actine à l'intérieur de vésicules artificielles à partir d'Arp2/3 (Liu et al., 2008). Le modèle développé pour interpréter leurs résultats repose sur le comportement de la membrane. Lorsque deux filaments s'allongent, il peut être énergétiquement préférable pour la membrane de les réunir afin de limiter sa propre déformation. Cet effet favorise la formation de grands câbles, indépendamment des fluctuations thermiques.

Rôle de la membrane dans la formation des câbles

La capacité des câbles d'actine à croître malgré la rigidité de l'obstacle (la membrane) dépend fortement du nombre de filaments composant le câble ainsi que du nombre de protéines de liaison qui les relie. La longueur de persistance d'un câble, qui caractérise la force qu'il peut soutenir, varie linéairement avec le nombre de filaments lorsque les liens inter-filaments sont faibles, et quadratiquement lorsque les protéines de liaison sont nombreuses (Mogilner and Rubinstein, 2005). Plusieurs modèles ont situé le nombre optimal de filaments dans le câble aux alentours de la trentaine (Bathe et al., 2008; Haviv et al., 2008). Les câbles plus fins ne sont pas assez rigides pour soutenir la croissance, tandis que les câbles plus épais voient leur croissance limitée par la diffusion des monomères. Enfin, des simulations de dynamique stochastique ont permis de relier la vitesse de croissance de ces câbles aux fluctuations de la membrane (Lan and Papoian, 2008) ainsi qu'à la présence de protéine de coiffe (Daniels, 2010). De façon surprenante, de grandes fluctuations de la membrane limitent la vitesse de croissance, tandis que la coiffe de certains filaments dans le câble permet au contraire de l'accélérer.

5.3 Brisure de symétrie et motilité bactérienne

Les bactéries telles que *Listeria* et *Shigella* provoquent la formation d'un exocytosquelette d'actine pour se mouvoir à l'intérieur de la cellule qui les héberge. La reconstitution *in vitro* de cette motilité bactérienne a ouvert la voie à la modélisation mathématique de ce phénomène très complexe (Loisel et al., 1999).

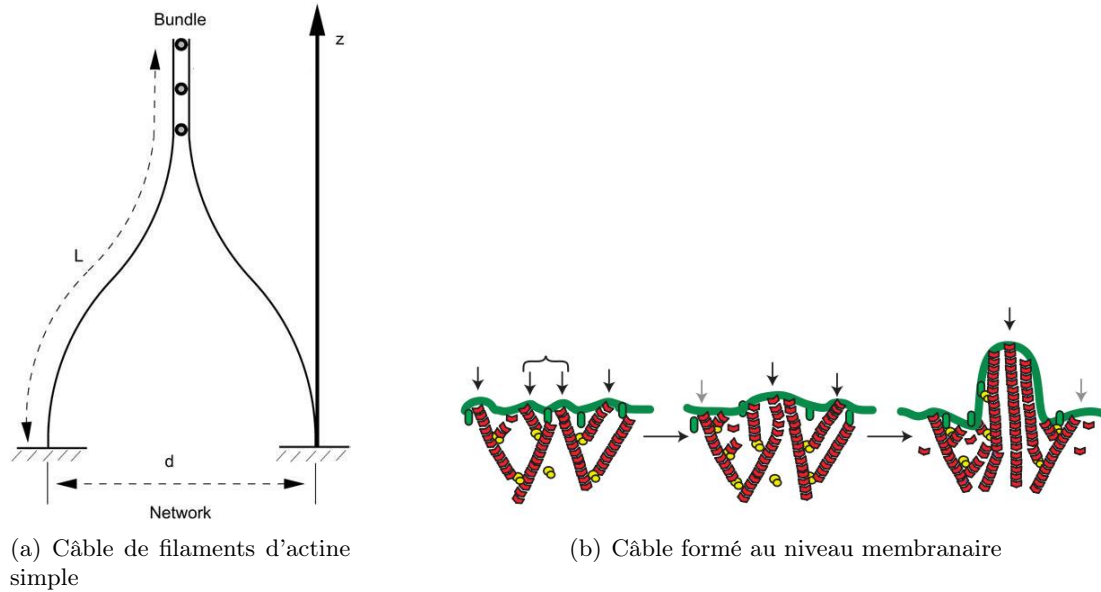


FIGURE 2.11 – **Modèles pour la formation de câbles de filaments d'actine** (a) Le câble est formé ici par assemblage de deux filaments parallèles. Les protéines de liaison sont symbolisées par les cercles gris-noir. Le rapprochement des deux filaments dépend des fluctuations thermiques et donc de la distance d qui les sépare ainsi que de leur longueur L . Figure adaptée de Yang et al. (2006). (b) Modèle de formation de câble incorporant l'effet de la membrane (en vert). Les filaments (en rouge) sont branchés par le complexe Arp2/3 (en jaune). Initialement, les déformations de la membrane (indiquées par les flèches en noir) sont nombreuses. A mesure que les filaments s'allongent, il devient énergétiquement favorable de les réunir dans le même câble. Figure adaptée de Liu et al. (2008).

Deux grandes classes de modèles ressortent lorsqu'il est question de modéliser ce phénomène : des modèles "filament-centrés" dans lesquels les propriétés des filaments individuels sont représentées, et d'autres plus macroscopiques qui considèrent le réseau d'actine propulsant la bactérie comme un gel visco-élastique. Ces deux approches permettent de rendre compte de la motilité bactérienne à des niveaux de détail différents. Unifier ces différentes représentations (c'est à dire rendre compte des propriétés globales du réseau d'actine à partir du comportement individuel des filaments) demeure encore aujourd'hui un challenge.

Modèles microscopiques

Un des premiers modèles microscopiques développé pour la motilité bactérienne est présenté en 2003 par Mogilner et al. Adapté du cliquet Brownien élastique, ce modèle prend en compte l'attachement des filaments individuels à la bactérie par l'intermédiaire de protéines variées (WASp, ActA) (Mogilner and Oster, 2003). Ce modèle analytique, couplé à des simulations de dynamique stochastique, prédit des vitesses de propulsion de l'ordre de la dizaine de nanomètres par seconde en accord avec les données expérimentales.

En 2004, Alberts et al proposent une véritable reconstitution *in silico* de la motilité de *Listeria* (Alberts and Odell, 2004). Ce modèle combine les propriétés élémentaires des filaments, comme l'attachement à la bactérie selon le mécanisme du cliquet Brownien élastique, avec la diffusion des monomères d'actine. Les simulations permettent de rendre compte du mouvement saltatoire de *Listeria*.

Modélisation par un gel visco-élastique

Ce mouvement saltatoire peut aussi être reproduit au travers d'un modèle macroscopique. En effet, la croissance du réseau d'actine est fortement influencée par la géométrie de la bactérie. La comète d'actine peut être modélisée comme un gel visco-élastique pressant à la fois sur les côtés et à l'arrière de la bactérie (Gerbal et al., 2000). Le stress ainsi exercé produit le mouvement de *Listeria*. Des systèmes bio-mimétiques, dans lesquels la bactérie est remplacé par une vésicule (Bernheim-Groswasser et al., 2002; Upadhyaya et al., 2003) ou une goutte d'huile (Boukellal et al., 2004), ont permis d'analyser le stress et les déformations produites par ce gel. Les vésicules, auparavant sphériques, prennent la forme d'une perle à mesure que le stress s'accumule à l'arrière. Le stress atteint une valeur critique pour laquelle le gel se brise, propulsant la vésicule en avant.

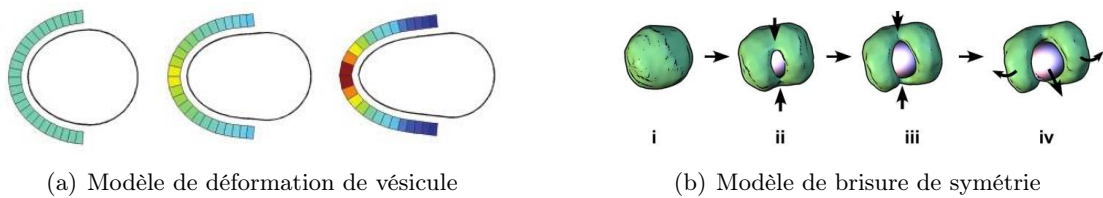


FIGURE 2.12 – Modèles divers pour la motilité bactérienne et la brisure de symétrie (a) Modèle de calcul du stress de déformation d'une vésicule. Le vert code pour un stress faible et le rouge pour un stress fort. A mesure que le gel croît, le stress augmente à l'arrière de la vésicule. Lorsqu'il atteint une valeur critique, l'attachement à l'arrière se fracture, propulsant la vésicule en avant. Figure adaptée de Upadhyaya et al. (2003). (b) Modèle de fracture d'un gel isotrope en croissance autour d'une bille. Le gel est initialement isotrope (i), avant de se fracturer (ii). La fracture prend la forme d'une fente (iii). Lorsque la fente est suffisante, le gel se relaxe sur les côtés de la bille, la propulsant en avant (iv). Figure adaptée de Dayel et al. (2009).

Brisure de symétrie

Cette brisure du gel est une étape cruciale de la mise en mouvement de l'objet. Les essais de reconstitution de la motilité à partir de billes de polystyrène ont permis de faire l'analyse détaillée de cette brisure de symétrie. La modélisation joue un rôle majeur dans ces expériences en permettant d'évaluer le stress produit par le gel sur la bille (Dafalias and Pitouras, 2009) et de prédire la fracture.

Un modèle pour la brisure de symétrie basé sur la fracture de gel est proposé en 2005 par Van Der Gucht et al. A mesure que les couches de gel s'accumulent sur la bille, le stress élastique s'accroît. Ce stress étant maximal à la surface du gel, les auteurs proposent un mécanisme dans lequel la brisure provient toujours de l'extérieur et permet un relâchement du stress élastique accumulé (Van Der Gucht et al., 2005). Le choix du site initial de la fracture est souvent attribué à un défaut dans la construction du gel, produisant une vulnérabilité dans la coque (Sekimoto et al., 2004). Des travaux plus récents ont remis en cause cette hypothèse. Dans le modèle de fracture développé par Dayel et al, le site de fracture n'est pas déterminé par la rupture des couches extérieures du gel mais bien par une fracture interne au gel (Dayel et al., 2009). Un modèle de croissance de réseaux branchés au contact de la bille mis en place par Achard et al propose un mécanisme dit de "primer". Certains filaments vont entrer en contact avec la bille et commencer à nucléer des sous-réseaux. Lorsque ces réseaux se rencontrent, leur croissance les uns contre les autres

entraîne une accumulation de stress qui finit par briser la coque (Achard et al., 2010). Ces différentes interprétations d'un même phénomène soulignent la complexité du mécanisme biologique.

Chapitre 3

Motivations et objectifs

1 Modéliser la dynamique de l'actine en présence d'ADF/Cofiline

Diversité des approches en modélisation

Le chapitre précédent, consacré à un rapide état de l'art de la modélisation mathématique au service de l'actine, met en évidence le rôle majeur pris par la modélisation dans la compréhension des processus biologiques. Ces modèles s'illustrent tout particulièrement par leur diversité : diversité dans l'échelle spatiale considérée, avec des modèles qui vont de l'échelle moléculaire (Pfaendtner et al., 2009) à la bactérie (Alberts and Odell, 2004), en passant par les réseaux branchés (Achard et al., 2010) et les filaments (Vavylonis et al., 2005). Diversité dans l'échelle temporelle, avec des modèles mécaniques basés sur des temps de relaxation de l'ordre de la milliseconde (Berro et al., 2007) jusqu'aux modèles de brisure de la symétrie (Dayel et al., 2009), événements se produisant sur plusieurs minutes.

Diversité dans la construction du modèle par ailleurs : un modèle peut être discret ou continu, déterministe ou stochastique, chacun de ces choix ayant certaines implications sur ce que l'on pourra observer via le modèle. Les systèmes discrets sont particulièrement adaptés lorsque les éléments modélisés sont peu nombreux : des sous-unités à l'intérieur d'un filament par exemple. Lorsque le nombre d'éléments modélisés augmente, le coût en temps de calcul peut exploser ce qui n'est pas le cas dans un modèle continu. Sur le même principe, un modèle stochastique permet d'analyser simplement les fluctuations propres à un système ainsi que les événements rares. Cependant, si ces événements se produisent en très grand nombre, un modèle déterministe peut capturer très fidèlement le comportement global du système à un coût en temps souvent moindre.

La construction de modèles pour l'actine implique de faire les bons choix entre ces différentes options en se basant naturellement sur les propriétés du système biologique considéré : la coque d'actine qui précède la brisure de symétrie sera considérée comme un milieu élastique continu (Van Der Gucht et al., 2005), là où les fluctuations de longueur des filaments individuels sont aisément simulées par des modèles stochastiques (Michelot et al., 2007).

Fragmentation par l'ADF/Cofiline

Dans ce contexte, la dynamique des filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline est un cas d'étude admirable. En effet, la fragmentation est un processus complexe dont les mécanismes sont encore mal compris, avec de nombreuses implications sur le filament : la fragmentation agit sur la longueur du filament, sur sa composition et sur sa capacité à produire des forces, autant d'effets que la modélisation est en mesure de quantifier.

Cette thèse s'inscrit dans cette démarche en proposant plusieurs approches, donc plusieurs modèles, pour mieux comprendre non seulement les effets de la fragmentation, mais également les bases physiques qui vont permettre à l'ADF/Cofiline de provoquer cette fragmentation.

2 Plan de la thèse

Ce travail de thèse se décompose en deux parties principales. La première propose d'utiliser des approches stochastiques inspirées par l'algorithme de Gillespie pour simuler la croissance du filament d'actine en présence de fragmentation par l'ADF/Cofiline (chapitre 4). Ce modèle nous permet de quantifier l'impact de la fragmentation sur le filament d'actine : un régime d'"équilibre dynamique" émerge dans lequel la taille et la composition du filament sont étroitement contrôlés (chapitre 5). Ce modèle est enfin appliqué à l'étude de données biologiques : des images de microscopie à onde évanescente montrent la décoration de filaments d'actine par ADF/Cofiline, décoration qui peut alors être comparée aux prédictions du modèle (chapitre 6).

La deuxième partie de ce manuscrit est consacrée à des modèles pour la mécanique du filament afin de mieux comprendre le(s) mécanisme(s) par lesquels l'ADF/Cofiline fragmente ces polymères. L'étude à une échelle mésoscopique des propriétés géométriques du filament révèle un couplage mécanique entre la flexion et la torsion, les deux principaux modes de déformation du filament (chapitre 7). Nous montrons enfin que ce couplage permet de convertir l'énergie issue des fluctuations thermiques en un stress de cisaillement qui fragmente le filament (chapitre 8).

Deuxième partie

Modèles pour la dynamique de filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline

Chapitre 4

Modèle stochastique pour la croissance et la fragmentation de filaments d'actine

1 Problématique

Comme nous l'avons souligné dans notre introduction, la polymérisation de l'actine est un processus fondamental en biologie, en particulier en ce qui concerne la production de forces. La quantité d'actine à l'intérieur de la cellule étant limitée, il faut en permanence réguler la dynamique de l'actine à l'aide de protéines associées. L'ADF/Cofiline participe à cette régulation en accélérant le désassemblage des filaments. Ce désassemblage ne se fait cependant pas de façon anarchique. La forte affinité de l'ADF/Cofiline pour les parties âgées du filament, l'accélération dans la dissociation du phosphate inorganique, la fragmentation qui s'ensuit, tous ces processus couplés à la dynamique classique des filaments vont favoriser l'émergence d'un régime "d'équilibre dynamique". Dans ce régime, la taille des filaments est régulée par la fragmentation, leur permettant d'assurer efficacement leur rôle dans le cytosquelette. Au cours de cette thèse, nous avons développé des modèles mathématiques pour mettre en évidence et caractériser ce régime.

Dans ce chapitre, nous présentons un modèle stochastique qui permet de simuler de façon exacte cette régulation des filaments en présence d'ADF/Cofiline. Ce modèle est basé sur un algorithme publié en 1977 par D. Gillespie, qui permet de simuler un ensemble de réactions chimiques concurrentes. Nous l'adaptions à notre problématique biologique en simulant l'ensemble des réactions biochimiques qui interviennent dans la polymérisation des filaments d'actine. Dans un premier temps, nous présenterons ce modèle en revenant sur l'algorithme de Gillespie et sur les réactions biochimiques que nous prenons en compte. Nous reviendrons ensuite sur cet "équilibre dynamique" que nous avons pu mettre en évidence. Nous montrerons enfin un cas d'application de ce modèle à des données biologiques obtenues par Cristian Suarez (doctorant) dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe de Laurent Blanchoin (CEA/iRTSV/LPSV).

2 L'algorithme de Gillespie

Supposons un volume donné, comprenant un certain nombre d'espèces chimiques. Ces espèces réagissent les unes avec les autres via un ensemble de réactions chimiques dont nous connaissons la stoechiométrie, ainsi que les constantes cinétiques de réaction. Comment

décrire l'évolution temporelle d'un tel système ? La méthode la plus couramment utilisée consiste à "traduire" la stœchiométrie ainsi que les constantes cinétiques en un ensemble d'équations différentielles ordinaires. Les variables considérées sont les concentrations de chacune des espèces chimiques au cours du temps. En ajoutant certaines conditions initiales (les concentrations de chacune des espèces chimiques au temps zéro), il est possible de trouver la solution de ce système et de décrire ainsi l'évolution de chacune des espèces jusqu'à l'état stationnaire.

Cette approche pose néanmoins un problème : elle nous contraint à nous placer à l'échelle de l'échantillon et ne nous permet d'observer que des concentrations. Elle se prête ainsi relativement mal à l'étude de structures telles que les polymères d'actine. La structure même du filament d'actine, avec un agencement bien particulier des monomères, est très difficile à modéliser de cette manière. Ce ne sont plus, dans ce cas, des concentrations qui nous intéressent mais bien chaque sous-unité du filament : son temps de séjour dans le polymère, l'état de son nucléotide et sa probabilité de fragmenter le filament. Il nous faut donc changer d'échelle et adopter une modélisation où chaque sous-unité peut être représentée simplement. C'est en substance ce que l'algorithme de Gillespie nous permet d'effectuer.

2.1 Principe général

Contrairement aux approches déterministes classiques, l'algorithme de Gillespie est un algorithme stochastique. Chaque molécule de l'échantillon considéré est susceptible d'interagir avec n'importe laquelle des autres molécules (via l'une des réactions chimiques connues) avec une certaine probabilité. L'algorithme nous permet dans un premier temps de calculer le temps d'attente avant que la prochaine réaction entre ces molécules ne se produise. Nous tirons ensuite aléatoirement la réaction qui va s'effectuer. Nous appliquons la réaction, ce qui modifie le système et nous permet de relancer un nouveau "pas" de l'algorithme.

2.2 Notations

Definition. Dans la première partie de ce manuscrit, nous appellerons **molécule** toute protéine, complexe ou composé susceptible de prendre part à une **réaction**. Les molécules d'un même type forment une **espèce**. Les molécules d'une même espèce sont candidates aux mêmes réactions. De ce fait, pour une réaction considérée, il existe en fait plusieurs **occurrences** de cette réaction, selon la/les molécules qui vont effectivement y participer.

Problème considéré

Soit un volume V homogène. Dans ce volume, nous considérons N_E espèces différentes. Chacune de ces espèces est notée E_1, \dots, E_{N_E} .

Par ailleurs, ces espèces chimiques peuvent interagir via N_R réactions chimiques différentes, chacune d'entre elles étant notée R_1, \dots, R_{N_R} .

Ces réactions font intervenir différentes espèces avec une stœchiométrie donnée. Du côté des réactifs, notons $\alpha_{E_i}^{R_j}$ la stœchiométrie de la $i^{\text{ème}}$ espèce pour la $j^{\text{ème}}$ réaction. Faisons de même pour les produits en notant $\beta_{E_i}^{R_j}$ la stœchiométrie de la $i^{\text{ème}}$ espèce pour la $j^{\text{ème}}$ réaction.

Pour une même réaction, plusieurs molécules d'une même espèce sont susceptibles de participer à la réaction. Il existe donc plusieurs occurrences d'une même réaction. Notons O_{R_i} le nombre d'occurrences de la $i^{\text{ème}}$ réaction. Ce principe d'occurrences multiples d'une

réaction est crucial. Prenons l'exemple d'une réaction bi-moléculaire simple : la polymérisation d'un monomère à l'extrémité barbée du filament, illustrée en figure 4.1. Le bilan de cette réaction s'exprime simplement :



Où M désigne un monomère quelconque, $E_{\text{barbée}}$ l'extrémité barbée d'un filament et $M \bullet E_{\text{barbée}}$ la nouvelle sous-unité ajoutée en tête du filament. Si dans un volume donné, on trouve 3 monomères en solution et 2 extrémités barbées, il existe 6 occurrences différentes de cette même réaction de polymérisation, car chaque monomère et chaque extrémité barbée est considéré comme une molécule distincte.

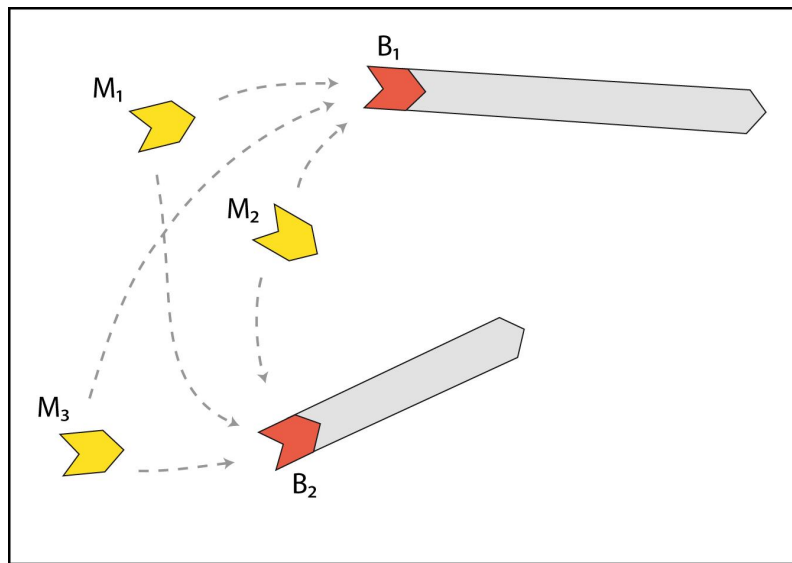


FIGURE 4.1 – **Différentes occurrences d'une réaction.** Nous illustrons ces différentes occurrences par un exemple de réaction simple : la polymérisation d'une nouvelle sous-unité à l'extrémité barbée d'un filament. Trois monomères différents (M_1 , M_2 , M_3 , en jaune) peuvent être polymérisés à l'une des deux extrémités barbées disponibles (B_1 , B_2 , en rouge). Soit six occurrences de la même réaction

Chacune de ces occurrences possède une certaine probabilité d'avoir lieu : notons cette probabilité c_{R_i} pour la $i^{\text{ème}}$ réaction. Ce taux, que Gillespie définit comme le **taux stochastique de la réaction**, signifie qu'en moyenne, en un intervalle de temps dt , une occurrence donnée de la réaction possède une probabilité $c_{R_i}dt$ de se produire.

Ainsi, pour une réaction R_i donnée, nous pouvons calculer le **taux global de la réaction** G_{R_i} , c'est à dire la probabilité de réaliser l'une des occurrences de la réaction R_i pendant le temps dt .

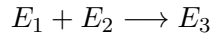
$$G_{R_i}dt = O_{R_i}c_{R_i}dt \quad (4.2)$$

2.3 Calcul des taux globaux de réaction

Le calcul de ces taux globaux des réactions est la première étape dans l'algorithme de Gillespie. Il s'agit d'évaluer le nombre d'occurrences O_{R_i} de chaque réaction ainsi que son taux stochastique c_{R_i} .

Taux stochastique de réaction

Prenons le cas particulier d'une réaction bimoléculaire qui fait intervenir deux réactifs E_1 et E_2 au cours du réaction R_γ de constante cinétique k_γ .



Cette réaction s'effectue dans un volume V contenant n_1 molécules de l'espèce E_1 et n_2 de l'espèce E_2 .

Le calcul du nombre d'occurrences de la réaction est relativement simple : il s'agit de dénombrer les couples de molécules de E_1 et E_2 que l'on peut former. Dans notre cas,

$$O_{R_\gamma} = n_1 n_2$$

Le taux stochastique représente la probabilité qu'ont un certain nombre de molécules individuelles de réagir ensemble. Intuitivement, cette probabilité est d'autant plus forte que la réaction en question est rapide du point de vue de la cinétique chimique. Or, nous disposons pour chaque réaction R_i d'une constante de réaction k_i qui traduit précisément cette vitesse de réaction. Il s'agit donc de calculer les c_{R_i} à partir des k_i .

Connaissant le nombre d'occurrences de la réaction R_γ , la probabilité qu'une de ces réactions se produise dans le temps dt s'écrit :

$$\begin{aligned} P(R_\gamma, dt) &= c_{R_\gamma} O_{R_\gamma} dt \\ &= c_{R_\gamma} n_1 n_2 dt \end{aligned}$$

Les constantes cinétiques sont des constantes déterministes, exprimées en molaire. Il nous faut donc adapter cette probabilité en considérant le nombre moyen de molécules présentes dans le volume V et en ramenant ce nombre d'occurrences en molaire :

$$P(R_\gamma, dt) = c_{R_\gamma} \frac{\langle n_1 n_2 \rangle}{N_A V} dt$$

où N_A représente le nombre d'Avogadro.

La constante cinétique k_γ représente ce taux moyen de réaction par mole par unité de volume, rapporté aux concentrations moyennes des réactifs. Il nous faut donc diviser cela par la concentration moyenne des réactifs E_1 et E_2 .

$$\begin{aligned} k_\gamma &= c_{R_\gamma} \frac{\langle n_1 n_2 \rangle}{N_A V} \frac{1}{\frac{\langle n_1 \rangle}{N_A V} \frac{\langle n_2 \rangle}{N_A V}} \\ &= c_{R_\gamma} \frac{\langle n_1 n_2 \rangle}{\langle n_1 \rangle \langle n_2 \rangle} N_A V \end{aligned}$$

Dans le formalisme déterministe, $\langle n_1 n_2 \rangle = \langle n_1 \rangle \langle n_2 \rangle$ (on ne peut distinguer le produit des moyennes de la moyenne du produit). On a donc :

$$c_{R_\gamma} = \frac{k_\gamma}{N_A V}$$

Dans ce cas simple, le passage de la constante cinétique classique au taux stochastique de la réaction se fait en prenant simplement en compte que la constante s'exprime en terme de concentration molaire, là où le taux repose sur un nombre brut de molécules.

Généralisation

Ce calcul peut être généralisé à toutes les réactions qui font intervenir λ_γ réactifs différents avec une stœchiométrie de 1. On a alors :

$$c_{R_\gamma} = \frac{k_\gamma}{(N_A V)^{\lambda_\gamma - 1}}$$

Dans son article de 1977, Gillespie attire néanmoins l'attention sur un cas particulier : celui des réactifs dont la stœchiométrie est supérieure à 1. En effet, si l'on considère la réaction : $2E_1 \rightarrow E_2$. L'ensemble des paires de molécules E_1 que l'on peut former n'est pas égal à $n_1 n_1$ mais bien $\frac{n_1(n_1-1)}{2}$. Par conséquent, on a pour cette réaction l'égalité :

$$\begin{aligned} k_\gamma &= c_{R_\gamma} \frac{\langle n_1(n_1-1) \rangle}{2N_A V} \frac{1}{\frac{\langle n_1 \rangle}{N_A V} \frac{\langle n_1 \rangle}{N_A V}} \\ &\approx c_{R_\gamma} \frac{1}{2} N_A V \end{aligned}$$

On voit apparaître dans le taux stochastique un facteur 1/2 qui découle directement du nombre de paires de molécules E_1 que l'on peut former.

2.4 Loi de la prochaine réaction

Les taux globaux ayant été calculés, il est possible de déterminer la prochaine réaction qui va avoir lieu. Ceci se fait en deux étapes : on commence par calculer la loi du temps d'attente avant la prochaine réaction. Puis on détermine la réaction qui va avoir effectivement lieu (entre les différentes réactions possibles).

Loi du temps d'attente avant la prochaine réaction

Notre système comporte un certain nombre de réactions dont nous connaissons les taux globaux G_{R_i} . Soit t_{R_i} le temps d'attente avant que la prochaine occurrence de la réaction R_i ne se produise. Ce temps d'attente suit une loi exponentielle de paramètre G_{R_i} .

$$t_{R_i} \sim \varepsilon(G_{R_i})$$

Toutes ces réactions se produisent de façon simultanées. La prochaine réaction peut donc être n'importe laquelle des R_i . Le temps d'attente avant la prochaine réaction est donc le minimum de ces temps d'attente t_{R_i} .

$$t_{NextReaction} = \min(t_{R_i})$$

Le minimum d'un groupe de variables de lois exponentielles de paramètres G_{R_i} suit une loi exponentielle de paramètre $\lambda = \sum_{i=1}^n G_{R_i}$. Donc :

$$t_{NextReaction} \sim \varepsilon\left(\sum_{i=1}^n G_{R_i}\right)$$

Loi de la prochaine réaction

Une fois le temps d'attente écoulé, il faut déterminer laquelle des réactions doit se produire parmi celles disponibles. Intuitivement, cette probabilité devrait être reliée aux taux stochastiques des différentes réactions.

La probabilité pour qu'une réaction R_i soit la prochaine réaction à se produire au temps t , notée $P_{NextReaction}(R_i, t)$, est égale à la probabilité qu'aucune autre réaction ne se produise jusqu'au temps t , notée $P_{NoReaction}(R_i, t)$ multipliée par la probabilité que cette réaction là se fasse au temps t , notée $P(R_i, t)$

$$P_{NextReaction}(R_i, t) = P_{NoReaction}(R_i, t)P(R_i, t)$$

Néanmoins, nous souhaitons connaître la probabilité que la réaction R_i soit la prochaine à se produire, tous temps confondus. Pour obtenir $P_{NextReaction}(R_i)$, il nous faut donc intégrer cette quantité sur tous les temps possibles.

$$P_{NextReaction}(R_i) = \int_0^{\infty} P_{NoReaction}(R_i, t)P(R_i, t)dt$$

La quantité $P(R_i, t)$ est simple à calculer puisque nous connaissons le taux global de cette réaction. Le temps d'attente pour voir la réaction R_i se produire suit une loi exponentielle de paramètre G_{R_i} . On a donc :

$$P(R_i, t) = G_{R_i}e^{-G_{R_i}t}$$

Il reste à calculer $P_{NoReaction}(R_i, t)$ c'est à dire la probabilité qu'aucune autre réaction que R_i ne se produise jusqu'au temps t . On a :

$$P_{NoReaction}(R_i, t + dt) = P_{NoReaction}(R_i, t)\left(1 - \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_R} G_{R_j}\right)dt$$

En effet, nous avons défini le taux global G_{R_i} comme la probabilité qu'en un temps dt , une des occurrences de R_i se produise. La quantité $(1 - \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_R} G_{R_j}dt)$ représente donc la probabilité qu'aucune autre réaction que R_i ne se produise dans ce temps dt . On a alors :

$$\begin{aligned} \frac{P_{NoReaction}(R_i, t + dt) - P_{NoReaction}(R_i, t)}{dt} &= -P_{NoReaction}(R_i, t) \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_R} G_{R_j} \\ \frac{dP_{NoReaction}(R_i, t)}{dt} &= -P_{NoReaction}(R_i, t) \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_R} G_{R_j} \end{aligned}$$

Et en intégrant :

$$P_{NoReaction}(R_i, t) = e^{-\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_R} G_{R_j}t}$$

On a donc finalement :

$$\begin{aligned}
 P_{NextReaction}(R_i) &= \int_0^\infty P_{NoReaction}(R_i, t)P(R_i, t)dt \\
 &= \int_0^\infty e^{-\sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^{N_R} G_{R_j} t} G_{R_i} e^{-G_{R_i} t} dt \\
 &= \int_0^\infty \frac{e^{-\sum_{j=1}^{N_R} G_{R_j} t}}{e^{-G_{R_i} t}} G_{R_i} e^{-G_{R_i} t} dt \\
 &= G_{R_i} \int_0^\infty e^{-\sum_{j=1}^{N_R} G_{R_j} t} dt \\
 &= \frac{G_{R_i}}{\sum_{j=1}^{N_R} G_{R_j}}
 \end{aligned}$$

En d'autres termes, la probabilité qu'une réaction donnée R_i se produise est proportionnelle au "poids" relatif de sa constante globale. Une fois la réaction R_i en question choisie, il suffit de tirer aléatoirement une occurrence de cette réaction et de l'appliquer aux molécules concernées (les occurrences d'une réaction ont toutes la même probabilité de se produire).

2.5 Application de la réaction

Une fois la prochaine réaction choisie, il reste à l'appliquer au système. Ceci modifie la quantité de molécules disponibles pour les espèces concernées. Au prochain pas de l'algorithme, il faudra recalculer le nombre d'occurrences de chaque réaction et donc les taux globaux de chaque réaction.

2.6 Algorithme de Gillespie

L'algorithme de Gillespie se présente donc de la façon suivante

Algorithm 1 Algorithme de Gillespie

- 1: **Initialisation.** Calculer les c_{R_i} . Fixer les n_i , nombres initiaux de molécules de chaque espèce. Fixer le temps courant t à 0 et le nombre de pas n_{step} de l'algorithme à 0. Fixer le temps de simulation total t_{max} .
 - 2: **while** $t < t_{max}$ **do**
 - 3: Pour $i = 1 \dots N_R$, calculer les $G_{R_i} = O_{R_i} c_{R_i}$.
 - 4: Calculer $G_{Total} = \sum_{i=1}^{N_R} G_{R_i}$
 - 5: Tirer t_{next} sachant que $t_{next} \sim \varepsilon(G_{Total})$
 - 6: Tirer aléatoirement une réaction R_i (proportionnellement au poids des G_{R_i})
 - 7: Appliquer l'une des occurrences de R_i . Prendre en compte les modifications des n_i induites par la réaction.
 - 8: Mettre à jour t et n_{step} : $t = t + t_{next}$, $n_{step} = n_{step} + 1$.
 - 9: **end while**
-

3 Application à la dynamique de l'actine : mise en place du modèle

3.1 Présentation du modèle

Au cours de cette thèse, nous avons développé un modèle dédié à la dynamique de l'actine. Ce modèle est basé sur l'algorithme de Gillespie présenté précédemment : au lieu d'adopter une représentation déterministe, nous proposons un modèle stochastique qui permet de simuler l'ensemble des réactions chimiques qui agissent sur le filament d'actine. Nous détaillons ici le fonctionnement de ce modèle : les espèces chimiques que nous prenons en considération, les réactions que nous modélisons, ainsi que les informations que nous sommes à même d'extraire de ces simulations.

3.2 Espèces considérées

Le modèle que nous proposons est dédié à l'étude du filament d'actine. Nous représentons un filament comme une structure unidimensionnelle constituée d'un assemblage de sous-unités. Un filament possède une extrémité barbée et une extrémité pointue. Notez que nous ne considérons pas l'espace dans cette représentation (les filaments n'ont pas de position, ne diffusent pas, n'entrent pas en contact les uns avec les autres). Nous ne considérons pas non plus les deux brins du filament : en conséquence, chaque monomère ajouté au filament ne contribue que pour 3 nm à la longueur totale.

Une sous-unité dans le filament est caractérisée par sa position, numérotée de 1, pour la première sous-unité à l'extrémité barbée, à N pour la dernière sous-unité (celle qui constitue l'extrémité pointue). Une sous-unité renferme un nucléotide dont l'état peut varier comme nous l'avons souligné en introduction. Nous considérons trois états différents : ATP, ADP-Pi (état résultant de l'hydrolyse d'un nucléotide ATP) et ADP (état résultant de la dissociation du phosphate inorganique d'un nucléotide ADP-Pi). Nous considérons que cet état du nucléotide est la caractéristique première d'une sous-unité. Nous parlons donc de sous-unité ATP, ADP ou ADP-Pi.

L'association de l'ADF/Cofilin sur le filament est une réaction qui s'effectue avec une stoechiométrie de 1 molécule d'ADF pour 1 sous-unité. Nous représentons donc l'association de l'ADF/Cofilin comme une modification de l'état de la sous-unité concernée : une sous-unité classique peut être ADP, lorsqu'une molécule d'ADF/Cofilin s'associe à cette sous-unité, elle devient ADP-ADF.

3.3 Modélisation des différentes réactions

Nous présentons ici les principales réactions chimiques prises en compte dans notre modèle.

Polymérisation

La polymérisation de nouvelles sous-unités se fait aux deux extrémités du filament. Nous considérons que les sous-unités nouvellement polymérisées sont obligatoirement ATP. Nous adresserons cette hypothèse dans les remarques diverses en fin de ce chapitre.

Dépolymérisation

La dépolymérisation des sous-unités du filament se fait également au deux extrémités, avec des taux stochastiques différents selon la nature de la sous-unité (ATP, ADP-Pi, ADP,

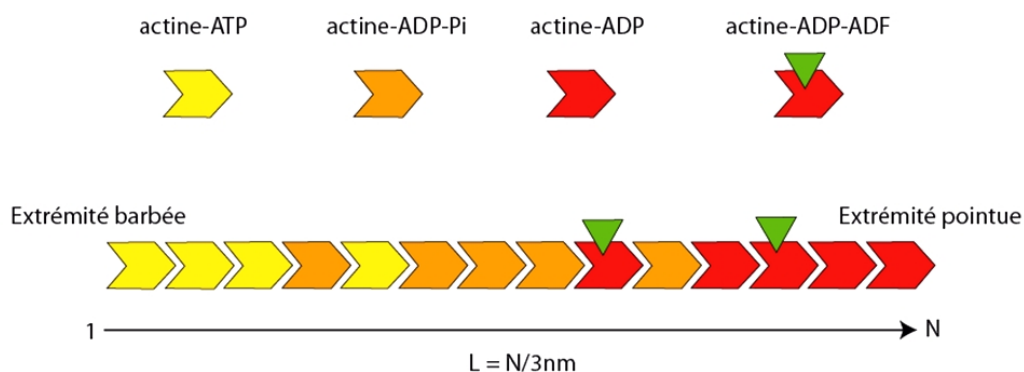


FIGURE 4.2 – **Espèces considérées** Un filament est modélisé comme un assemblage unidimensionnel de sous-unités. Ces sous-unités sont caractérisées par leur position dans le filament ainsi que leur état : ATP, ADP-Pi, ADP, ADP-ADF.

ADP-ADF).

Hydrolyse

Nous considérons une hydrolyse aléatoire des sous-unités à l'intérieur du filament. L'hypothèse vectorielle n'a pas été retenue. L'hydrolyse est modélisée comme une réaction irréversible.

Dissociation du phosphate inorganique

La dissociation du phosphate est aussi modélisée comme une réaction aléatoire. La constante de dissociation (K_d) est très faible (de l'ordre de $1.5mM$) ce qui nous permet de considérer cette réaction comme irréversible.

Notons par ailleurs que le taux associé à cette dissociation est susceptible de varier. En effet, l'ADF/Cofiline est connue pour accélérer cette étape ce que nous modélisons par un facteur d'accélération de la constante de réaction associée à cette réaction. Nous reviendrons sur ce cas particulier dans le chapitre 6.

Association d'ADF/Cofiline

L'association d'ADF/Cofiline peut avoir lieu avec les sous-unités ADP-Pi ou ADP. Notez que la faible affinité d'ADF/Cofiline pour les sous-unités ADP-Pi nous amène parfois à ne considérer l'association que sur les sous-unités ADP.

Le taux de cette réaction peut être modifié par un mécanisme de coopérativité lié à la présence d'ADF/Cofiline à proximité. Nous représentons cette accélération par un facteur multiplicateur du taux d'association.

Dissociation d'ADF/Cofiline

La dissociation d'ADF/Cofiline est modélisée comme une réaction aléatoire. Cette dissociation est peu affectée par la coopérativité, nous ne modifions donc pas ce taux.

Effet à longue portée de l'ADF : coopérativité, action sur le nucléotide

Les effets à longue portée d'ADF/Cofiline sont nombreux. Nous nous concentrons sur la cinétique des réactions chimiques et nous distinguons ainsi deux effets : l'accélération de la dissociation du phosphate et la coopérativité dans l'association de l'ADF/Cofiline. Le fonctionnement exact de ces mécanismes n'est pas encore clair, ce qui nous amène à considérer que les portées de ces deux mécanismes sont différentes. Nous introduisons ainsi deux portées, $Range_{Coop}$ et $Range_{Release}$ et deux facteurs d'accélération K_{Coop} et $K_{Release}$ pour ces mécanismes. Nous considérons que les réactions associées voient leur constante cinétique multipliée par ce facteur K sur un voisinage de $Range$ sous-unités, comme illustré en figure 4.3. Cette hypothèse demeure simpliste, car rien ne permet d'affirmer que l'accélération de ces mécanismes est uniforme. De plus, nous ne considérons que deux taux différents (normal ou accéléré) c'est à dire que les effets de plusieurs ADF/Cofiline ne se cumulent pas.

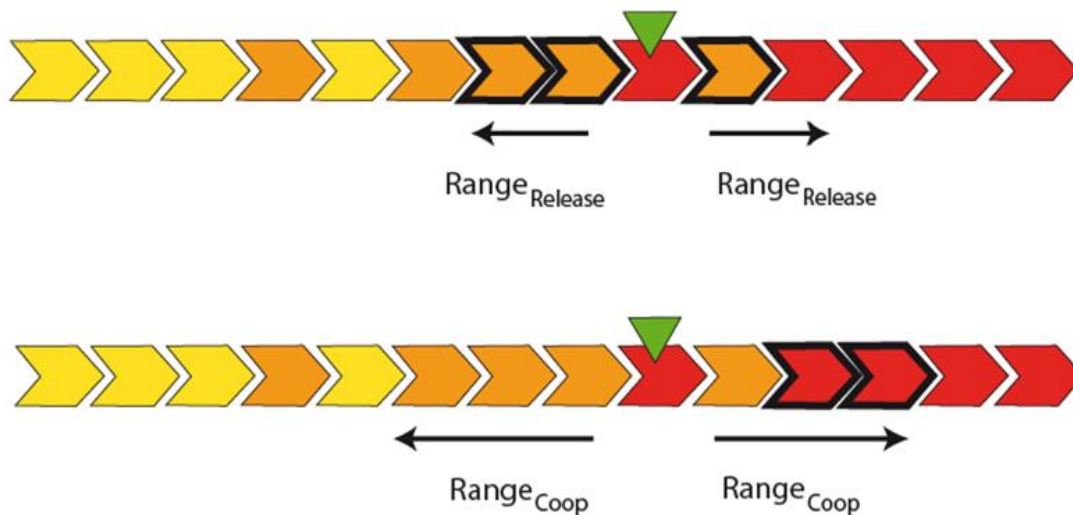


FIGURE 4.3 – **Effets à longue portée de l'ADF/Cofiline.** Nous modélisons les effets de l'ADF/Cofiline sur la dissociation du phosphate ainsi que la coopérativité par des voisinages sur lesquels la cinétique de ces réactions est accélérée. Les sous-unités affectées apparaissent en gras. Le premier schéma illustre l'accélération de la dissociation du phosphate à proximité d'une molécule d'ADF/Cofiline. $Range_{Release}$ est fixée à 2 sous-unités à droite et à gauche. Le second schéma illustre la coopérativité, avec une portée $Range_{Coop}$ fixée à 3 sous-unités.

Fragmentation

La fragmentation est un processus complexe, lié tout autant à la cinétique chimique de fixation de l'ADF/Cofiline qu'à des contraintes purement mécaniques. Dans cette partie de ce manuscrit, nous faisons l'hypothèse la plus simple : la fragmentation est considérée comme une réaction assortie d'une constante cinétique (mesurée expérimentalement). Nous considérons que la fragmentation intervient au niveau d'une paire de sous-unités décorées par l'ADF/Cofiline. L'efficacité de la fragmentation est donc uniquement liée à la cinétique de fixation de l'ADF/Cofiline sur le filament.

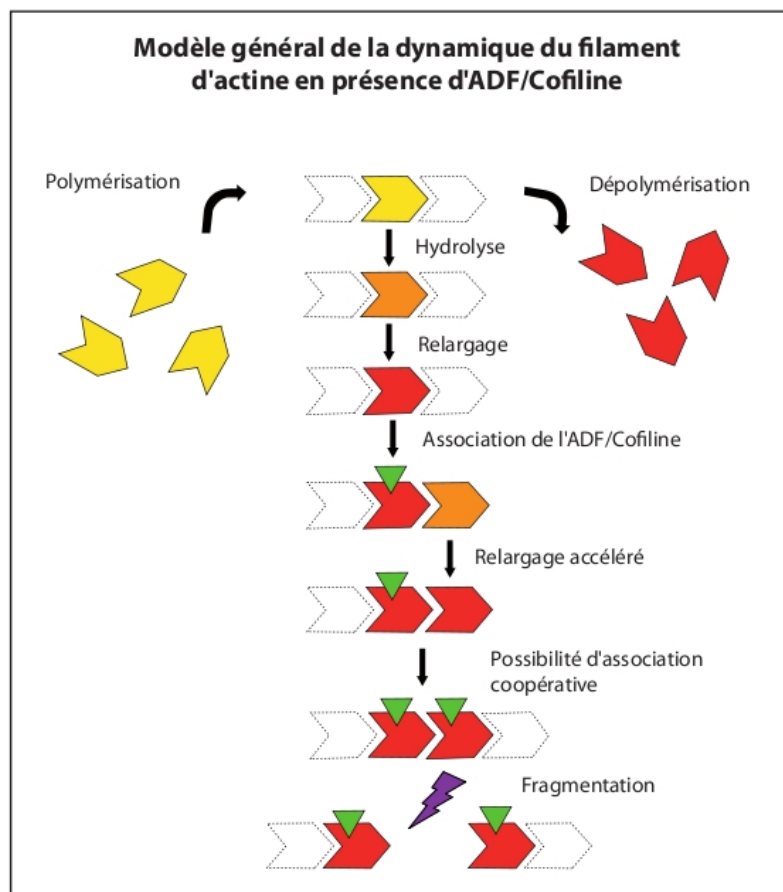


FIGURE 4.4 – **Réactions considérées.** Schéma récapitulatif de l'ensemble des réactions incluses dans le modèle. Nous ne précisons pas les taux, car ils sont susceptibles d'être adaptés aux systèmes que nous souhaitons modéliser. Notez l'effet de la fragmentation qui scinde le filament en deux filaments fils.

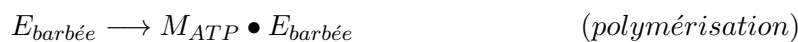
3.4 Mise en place de l'algorithme

Notre modèle implémente l'algorithme de Gillespie (algorithme 1) présenté précédemment.

Calcul des taux stochastiques

Un filament unique peut comporter plusieurs milliers de sous-unités (rappelons qu' $1\mu m = 333$ sous-unités). Afin de limiter les temps de calcul, nous ne modélisons réellement que les sous-unités à l'intérieur du filament. Les molécules en solution ne sont pas représentées individuellement mais sous la forme d'une concentration de molécules en solution. Nous reviendrons sur ce choix dans les remarques de fin de cette section et nous verrons que cette approximation peut se faire sans influencer sur les résultats des simulations.

De ce fait, les réactions que nous modélisons font toujours intervenir un seul réactif (la sous-unité concernée par la réaction) avec une stoechiométrie de 1 :



Où M_{ATP} désigne une sous-unité dans le filament dont le nucléotide est ATP.

Ceci simplifie beaucoup le calcul des taux stochastiques des réactions. Rappelons que pour une réaction R_γ donnée, avec λ_γ réactifs impliqués avec une stœchiométrie de 1, nous avons :

$$c_{R_\gamma} = \frac{k_\gamma}{(N_{AV})^{\lambda_\gamma - 1}}$$

Dans le cas de nos réactions, $\lambda_\gamma = 1$, d'où :

$$c_{R_\gamma} = k_\gamma$$

Il en ressort que les taux stochastiques de nos réactions sont directement égaux aux constantes cinétiques.

Quand au nombre d'occurrences de chaque réaction, ils sont calculables simplement en dénombrant le nombre de sous-unités du filament qui sont susceptibles d'effectuer la réaction. Pour la réaction d'hydrolyse du nucléotide ATP par exemple :

$$\begin{aligned} c_{R_{hydrolyse}} &= k_{hydrolyse} \\ O_{R_{hydrolyse}} &= n_{ATP} \\ G_{R_{hydrolyse}} &= n_{ATP} k_{hydrolyse} \end{aligned}$$

où n_{ATP} représente le nombre de sous-unités ATP dans le filament.

Algorithm 2 Cinétique du filament d'actine

- 1: **Initialisation.** Pour $i = 1 \dots N_R$, $c_{R_i} = k_i$. Fixer la structure initiale du filament $(n_{ATP}, n_{ADP-Pi}, n_{ADP})$. Fixer le temps courant t à 0 et le nombre de pas n_{step} de l'algorithme à 0. Fixer le temps de simulation total t_{max} .
 - 2: **while** $t < t_{max}$ **do**
 - 3: Pour $i = 1 \dots N_R$, calculer les $G_{R_i} = O_{R_i} c_{R_i}$.
 - 4: Calculer $G_{Total} = \sum_{i=1}^{N_R} G_{R_i}$.
 - 5: Tirer $u_1 \in \mathbf{U}(0; 1)$. On a alors $t_{next} = \frac{1}{G_{Total}} \frac{1}{\ln(u_1)}$.
 - 6: Tirer $u_2 \in \mathbf{U}(0; 1)$. Choisir la réaction R_γ telle que $\frac{\sum_{i=1}^{\gamma-1} G_{R_i}}{G_{Total}} < u_2 < \frac{\sum_{i=1}^{\gamma} G_{R_i}}{G_{Total}}$.
 - 7: Appliquer l'une des occurrences de R_γ aléatoirement. Modifier le filament en conséquence et mettre à jour les n_i ($n_{ATP}, n_{ADP-Pi}, n_{ADP}, n_{ADP-ADF}$).
 - 8: Mettre à jour t et n_{step} : $t = t + t_{next}$, $n_{step} = n_{step} + 1$.
 - 9: **end while**
-

3.5 Extraction de l'information

L'algorithme de Gillespie nous fait progresser "par bond" : la variable qui représente le temps écoulé durant la simulation prend une suite de valeurs discrètes correspondant aux temps auxquels une réaction se produit. Afin de prélever l'information contenue dans la structure du filament nous définissons un pas de temps d'échantillonnage. A chacun de ces

pas de temps, la structure du filament est extraite du modèle. Nous pouvons ainsi suivre la dynamique du filament sur la durée totale de la simulation.

3.6 Implémentation et performances

Implémentation

Cet algorithme est implémenté en C++. Le langage objet se prête remarquablement bien à ce type de modèle, car nous pouvons créer une classe pour chaque type de molécule impliquée dans les simulations : une classe monomère et une classe filament par exemple. Nous utilisons les structures de données fournies par la *STL* (Standard Template Library) : un filament peut ainsi être représenté comme un vecteur de sous-unités.

Performances

Les temps de calcul varient fortement en fonction de certains paramètres du modèle : la vitesse de polymérisation (une vitesse élevée implique des filaments longs donc des structures de données lourdes), le taux de fragmentation (inversement un taux élevé raccourcit les filaments), la concentration d'ADF/Cofiline (plus elle est élevée, plus on modélise de réactions d'association) et bien sûr le temps total de simulation (t_{max}). Une simulation typique d'un filament, avec des paramètres standards, sur une durée de 30 minutes est menée à bien en quelques secondes.

3.7 Remarques diverses

Dans cette section, nous adressons certaines limitations du modèle que nous avons évoquées au cours de ce chapitre.

Molécules en solution

Nous choisissons de ne modéliser que les sous-unités à l'intérieur du filament et non les molécules en solution. Ce choix s'explique par le coût important, en terme de calcul, que représenterait la modélisation de chacune de ces molécules. Ne pouvant garder trace ni du nombre de ces molécules en solution, ni de leur état, nous faisons l'hypothèse que :

- l'actine monomérique en solution est de type G-ATP.
- la concentration d'actine G-ATP en solution est constante au cours du temps.
- la concentration d'ADF/Cofiline en solution est constante au cours du temps.

D'un point de vue biologique, ces choix peuvent se justifier simplement : l'actine monomérique est toujours très abondante en rapport avec l'actine filamenteuse. Dans les systèmes *in vitro* auxquels nous appliquons nos modèles, la vitesse de polymérisation reste quasi-constante sur la durée de l'expérience. Ainsi, il n'est pas nécessaire de garder trace du nombre de monomères disponibles à la polymérisation, car nous pouvons considérer ce nombre comme constant sur la durée des simulations. Le même raisonnement s'applique pour l'ADF/Cofiline qui est présente en surabondance. La présence de profiline dans le milieu accélère le recyclage des monomères G-ADP en G-ATP, à tel point que nous pouvons considérer tous les monomères polymérisés comme étant G-ATP.

Fragmentation

Notre représentation de la fragmentation est critiquable principalement sur deux points : le calcul du taux de fragmentation et le devenir des fragments.

Nous représentons la fragmentation comme une réaction chimique. La densité de fragmentation est liée au nombre de paires de sous-unités décorées par ADF/Cofiline présentes sur le filament. Des expériences récentes menées par Cristian Suarez que nous présenterons en chapitre 6 montrent que l'efficacité de fragmentation n'augmente pas nécessairement avec la concentration d'ADF/Cofiline (Andrianantoandro and Pollard, 2006). A forte concentration, l'ADF/Cofiline est même connue pour avoir un effet stabilisateur sur le filament (Bobkov et al., 2006). Néanmoins, notre hypothèse reste valable tant que la concentration d'ADF/Cofiline demeure aux alentours du μM . Enfin, pour offrir une meilleure modélisation du processus de fragmentation un modèle mécanique du filament est nécessaire, modèle que nous présentons en chapitre 8.

Notre modèle est centré sur l'étude d'un filament unique. Par conséquent, lors d'un événement de fragmentation, nous ne gardons pas trace du fragment généré du côté de l'extrémité pointue. C'est un choix qui peut se justifier de plusieurs manières. Du point de vue de la biologie *in vivo*, la plupart des fragments ainsi générés seront coiffés pour être finalement désassemblés. Dans les systèmes *in vitro*, dans lesquels la protéine de coiffe n'est pas toujours présente, ces fragments peuvent être considérés comme indistinguables des filaments nucléés de façon "classique" (ils s'allongent à la même vitesse et "voient" les mêmes concentrations de protéines en solution).

Chapitre 5

La fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/Cofiline contrôle l'émergence d'un régime d'équilibre dynamique

1 Problématique biologique

Les expériences *in vitro* menées par Alphée Michelot (Michelot et al., 2007) et plus récemment par Cristian Suarez (chapitre 6) mettent en évidence des fluctuations de la longueur des filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline. Ces fluctuations s'expliquent simplement par la fragmentation des filaments décorés. De façon surprenante, ces événements aléatoires de fragmentation permettent de réguler la taille des filaments, taille qui oscille autour d'une valeur moyenne. Ces mesures de longueur réalisées expérimentalement sont les premiers indices de l'émergence d'un régime que nous qualifions d'"équilibre dynamique" : dynamique, car ces filaments ne sont pas à la concentration critique et continuent de s'allonger ; équilibre, car leur longueur et leur composition sont étroitement contrôlées par l'ADF/Cofiline.

Dans ce chapitre, nous avons cherché à caractériser cet équilibre. Nous utilisons pour cela le modèle stochastique que nous avons présenté dans le chapitre précédent. Ce modèle nous permet de faire varier différents paramètres cinétiques et d'étudier leurs effets sur cet équilibre. Ce travail ayant donné lieu à une publication dans une revue scientifique internationale, nous commençons par un résumé en français de la méthode et des principaux résultats que nous ferons suivre par la publication elle-même.

2 Modèle

2.1 Simulations

Nous prenons en compte toutes les réactions présentées dans le chapitre précédent. Signalons toutefois deux cas particuliers :

- L'ADF/Cofiline que nous modélisons ici est l'actophorine. L'actophorine est connue pour être coopérative, c'est à dire que l'association de nouvelles molécules d'ADF/Cofiline est favorisée à proximité de molécules déjà associées au filament (voir figure 4.3).

Cette coopérativité se traduit par une portée $Range_{Coop}$, que nous fixons ici à 1 et un facteur d'accélération K_{Coop} que nous fixons à 8.82 (Blanchoin and Pollard, 1999).

- L'accélération dans la dissociation du phosphate est supposée avoir une portée infinie. En présence d'ADF/Cofiline, toutes les sous-unités du filament perdent leur phosphate inorganique à une vitesse accélérée. Cette accélération est représentée par un facteur multiplicateur $K_{release}$ que nous fixons à 15 (Blanchoin and Pollard, 1999).

Les constantes cinétiques associées aux différentes réactions figurent dans la table qui suit. Rappelons que ces constantes permettront de calculer les taux stochastiques des réactions. Nous fournissons certaines notations qui nous seront utiles dans la présentation du modèle analytique.

Réactions	Constante cinétique	Notation	Référence
Polymérisation G-ATP, extrémité barbée	$11.6 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{on,B}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, extrémité barbée	$1.4 s^{-1}$	$k_{off,B}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, extrémité barbée	$7.2 s^{-1}$	$k_{off,B}$	[1]
Polymérisation G-ATP, extrémité pointue	$1.3 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{on,P}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, extrémité pointue	$0.8 s^{-1}$	$k_{off,P}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, extrémité pointue	$0.3 s^{-1}$	$k_{off,P}$	[1]
Hydrolyse F-ATP en F-ADP-Pi	$0.35 s^{-1}$	$k_{ATP-hydrolysis}$	[2]
Dissociation du phosphate inorganique (F-ADP-Pi en F-ADP)	$0.0019 s^{-1}$	$k_{Pi-release}$	[3]
Dissociation accélérée du phosphate inorganique en présence d'ADF/Cofiline (F-ADP-Pi en F-ADP)	$0.035 s^{-1}$	$k_{Pi-release}$	[4]
Association ADF/Cofiline sur F-ADP	$0.0085 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{on,ADF}$	[4]
Association coopérative d'ADF/Cofiline sur F-ADP	$0.075 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{coop,ADF}$	[4]
Dissociation d'ADF/Cofiline sur F-ADP	$0.005 s^{-1}$	$k_{off,ADF}$	[4]
Fragmentation	$0.012 s^{-1}$	$k_{severing}$	[1],[4]

TABLE 5.1 – **Constantes cinétiques de réaction** : valeurs tirées de Pollard (1986) [1]; Blanchoin and Pollard (2002) [2]; Melki et al. (1996) [3] Blanchoin and Pollard (1999) [4].

2.2 Modèle analytique

A ces simulations numériques, nous joignons une étude analytique de notre modèle. Les différentes variables du modèle sont présentées dans le tableau suivant.

Paramètre ou variable	Définition	notation (cf Table 5.1)
v_B	Vitesse d'élongation barbée	$k_{on,B}[Actin] - k_{off,B}$
v_P	Vitesse d'élongation pointue	$k_{on,P}[Actin] - k_{off,P}$
v	Vitesse totale d'élongation du filament	$v = v_B + v_P$
r_1	Hydrolyse	$k_{ATP-hydrolysis}$
r_2	Dissociation du phosphate	$k_{Pi-release}$
r_3	Attachement / détachement de l'ADF/Cofiline	$k_{on,ADF}[ADF] - k_{off,ADF}$
r_4	Attachement coopératif / détachement de l'ADF/Cofiline	$k_{coop,ADF}[ADF] - k_{off,ADF}$
r_5	Fragmentation	$k_{severing}$
$F(L, t)$	Population de filaments de taille L au temps t	-
δ	Longueur apportée au filament par la polymérisation d'un monomère	3 nm
$P(L)$	Probabilité de couper le filament entre L et $L + \delta$	-

TABLE 5.2 – Variables et notations pour l'approche analytique

Un modèle analytique ne permet pas de décrire avec précision la composition du filament, mais il est possible de dériver des expressions pour la distribution des longueurs de filaments au cours du temps. Cette expression nous permet de mettre en évidence la dépendance de cette distribution envers les concentrations d'actine monomérique (notée $[Actine]$) et d'ADF/Cofiline (notée $[ADF/Cofiline]$). Cette approche est dérivée de la méthode mise en place par Ermentrout et Edelstein-Keshet (Edelstein-Keshet and Ermentrout, 2001).

Distribution des longueurs de filaments

Notons $F(L, t)$ la quantité de filament de longueur L au temps t . Nous avons :

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

On retrouve dans cette expression les différents termes qui peuvent faire varier la population de filaments de longueur L au temps t . Le premier terme en facteur de v représente l'effet de la polymérisation. Les filaments de taille L vont s'allonger et ne seront donc plus de taille L , tandis que ceux de taille $L - \delta$ vont s'allonger pour atteindre la taille L . Les deux autres termes représentent l'influence de la fragmentation. Les filaments de taille supérieure à L sont susceptibles d'être fragmentés et de produire ainsi des filaments de taille L (donc comptés en positif), tandis que ceux qui sont déjà de taille L peuvent être fragmentés et ramenés à une taille inférieure (donc comptés en négatif). C'est cette équation maîtresse que nous allons résoudre pour extraire la distribution des longueurs de filaments. Un développement de Taylor d'ordre 1 nous donne :

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

et à l'état stationnaire :

$$0 = -v\delta\left(\frac{\partial F(L, t)}{\partial L}\right) + r_5 P(L) \int_L^\infty F(s, t) ds - r_5 F(L, t) \int_0^L P(s) ds$$

En introduisant la variable $Z(L) = \int_L^\infty F(s) ds$:

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

Et par simple intégration, en ajoutant que $Z(0) = 1$, nous avons :

$$Z(L) = \exp\left(-\frac{r_5}{v\delta} \int_0^L \left(\int_0^S P(s) ds\right) dS\right)$$

Par définition de $Z(L)$, nous en déduisons $F(L)$:

$$F(L) = \frac{r_5}{v\delta} \left(\int_0^L P(s) ds\right) \exp\left(-\frac{r_5}{v\delta} \int_0^L \left(\int_0^S P(s) ds\right) dS\right) \quad (5.1)$$

Ce résultat nécessite néanmoins d'avoir une expression pour $P(L)$, probabilité de couper un filament à la position L. Cette probabilité est liée à l'état du nucléotide puisque nous faisons l'hypothèse que les filaments sont coupés au niveau des paires de sous-unités liées à l'ADF/Cofiline. Il nous faut donc faire l'analyse de l'état du nucléotide le long du filament.

État du nucléotide et probabilité de fragmenter

Considérons 5 états possibles pour une sous-unité et notons :

$$\{S_1(t), S_2(t), S_3(t), S_4(t), S_5(t)\}$$

la probabilité qu'une sous-unité donnée à un temps t soit respectivement dans l'un des états :

$$\{F - ATP, F - ADP - Pi, F - ADP, F - ADP - ADF, F - ADP - ADF_2\}$$

L'état $S_5 : F - ADP - ADF_2$ représente l'état où cette sous-unité a aussi un voisin associé à l'ADF/Cofiline. C'est donc l'état dans lequel il lui est possible de fragmenter le filament. Le système différentiel qui contrôle l'évolution de ces 5 variables est le suivant :

$$\begin{aligned}
 \frac{dS_1}{dt} &= v - r_1 S_1 \\
 \frac{dS_2}{dt} &= r_1 S_1 - r_2 S_2 \\
 \frac{dS_3}{dt} &= r_2 S_2 - r_3 S_3 \\
 \frac{dS_4}{dt} &= r_3 S_3 - r_4 S_4 \\
 \frac{dS_5}{dt} &= r_4 S_4
 \end{aligned}
 \tag{5.2}$$

Avec

$$S_1 + S_2 + S_3 + S_4 + S_5 = 1$$

Ces équations s'obtiennent de façon très simple : nous considérons que chaque sous-unité va évoluer de l'état S_1 vers l'état S_5 sans possibilité de "revenir en arrière". Cela est vrai pour les évolutions du nucléotide (hydrolyse, dissociation du phosphate). La seule approximation concerne la fixation de l'ADF/Cofiline, que l'on considère définitive. Cette approximation est juste si l'on considère que la concentration d'ADF/Cofiline est importante : l'équilibre chimique bascule alors en faveur de l'association d'ADF/Cofiline sur le filament.

La résolution de ce système nous donne la probabilité pour le nucléotide d'être dans n'importe quel état. Revenons à la probabilité $P(x)$ de fragmenter le filament. On a :

$$S_5 = 1 + \sum_{i=1}^4 K_i \exp(-r_i t)$$

avec $K_i = - \left(\prod_{j=1, j \neq i}^4 r_j \right) \left(\prod_{j=1, j \neq i}^4 (r_j - r_i) \right)^{-1}$ qui nous donne la probabilité d'être dans l'état S_5 . La probabilité de fragmenter le filament en x s'écrit alors :

$$P(x) = \frac{1}{\delta} S_5 \left(\frac{x}{v\delta} \right) = \frac{1}{\delta} \left(1 + \sum_{i=1}^4 K_i \exp\left(-\frac{r_i x}{v\delta}\right) \right)$$

En reportant cette expression dans l'équation 5.1, nous avons :

$$F(L) = \left(\frac{r_5}{v\delta} \right) P_1(L) \exp \left(- \left(\frac{r_5}{v\delta} \right) P_2(L) \right)$$

avec 2 coefficients $P_1(L)$ et $P_2(L)$ dont l'expression exacte ne sera pas donnée ici (voir annexe de notre publication en fin de ce chapitre). Ainsi, un modèle analytique simple permet de dériver des expressions pour la distribution des longueurs de filaments, l'état des sous-unités, ainsi que la probabilité de fragmenter. Dans les sections suivantes, nous confrontons les résultats obtenus par simulation avec ces expressions.

3 Résultats principaux

3.1 Régulation des filaments en longueur

En absence de fragmentation, un état stationnaire pour la croissance des filaments ne peut être atteint qu'à la concentration critique d'actine monomérique. Au contraire, en

présence de fragmentation, cet état peut être atteint pour un large éventail de concentrations d'ADF/Cofiline. Comme on peut le voir en figure 5.1 (graphe A), les filaments expérimentent une phase de croissance très courte (< 200 secondes) avant de voir leur taille fluctuer en raison de la fragmentation. La distribution des tailles rappelle une loi Gaussienne, mais les régressions que nous avons appliquées à ces données infirment cette hypothèse. En présence de concentrations croissantes d'ADF/Cofiline, le pic de la distribution se déplace vers des longueurs plus courtes, et l'amplitude des fluctuations diminue (graphe A et B).

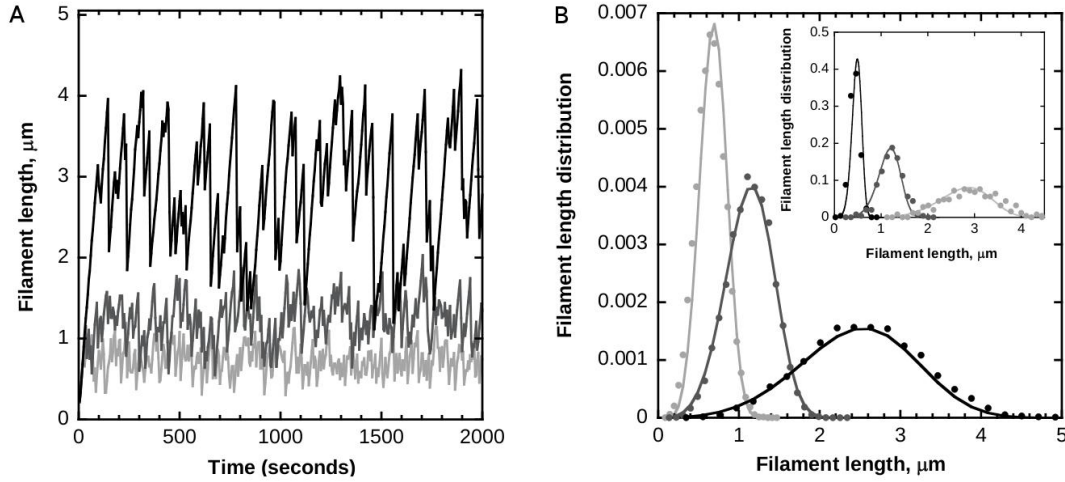


FIGURE 5.1 – **Régulation de la longueur des filaments d'actine par l'ADF/Cofiline.** (A) Fluctuations de la longueur de 3 filaments au cours du temps. Conditions : $[Actine] = 1 \mu M$, $[ADF/Cofiline] = 0.1 \mu M$ (noir) ; $1 \mu M$ (gris foncé) ; $10 \mu M$ (gris clair). (B) Distribution des longueurs dans les mêmes conditions : les points correspondent aux simulations et les courbes aux expressions analytiques obtenues par l'équation 5.1. (Cadre) Distribution des longueurs à concentration d'ADF/Cofiline fixée : $[ADF/Cofiline] = 1 \mu M$, $[Actine] = 0.5 \mu M$ (noir) ; $1 \mu M$ (gris foncé) ; $2 \mu M$ (gris clair).

En faisant l'hypothèse que la vitesse de polymérisation des filaments est grande devant les autres réactions (ce qui se vérifie toujours dans les conditions standards dans lesquelles nous faisons nos simulations), nous pouvons simplifier l'expression analytique des longueurs de filaments (5.1) :

$$F(L) = \frac{1}{5!} \frac{1}{\delta} \left(\frac{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5}{v^5} \right) \left(\frac{L}{\delta} \right)^5 \times \exp \left(-\frac{1}{6!} \left(\frac{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5}{v^5} \right) \left(\frac{L}{\delta} \right)^6 \right)$$

Cette expression simple permet d'extraire la moyenne/variance de la distribution des longueurs : de façon surprenante, la variance apparaît déconnectée des taux de réactions v, r_{1-5} et se situe à environ 20% de la longueur des filaments :

$$\frac{\sqrt{\langle \Delta L^2 \rangle}}{\langle L \rangle} \approx 20\%$$

Cette longueur moyenne dépend presque linéairement de la vitesse de polymérisation, mais sa dépendance à la concentration d'ADF/Cofiline est beaucoup plus faible :

$$\langle L \rangle \propto ([Actin])^{\frac{5}{6}} ([ADF/Cofilin])^{\frac{1}{3}}$$

3.2 Composition chimique des filaments

En raison de sa forte affinité pour les sous-unités d'actine-ADP, l'ADF/Cofiline fragmente le filament dans ses parties les plus "âgées". Les filaments d'actine ne sont donc pas régulés uniquement en longueur, mais le sont aussi dans leur composition. A mesure que la concentration d'ADF/Cofiline augmente, la proportion de sous-unités d'actine-ADP diminue (voir figure 5.2, graphe A). A partir de $0.1 \mu\text{M}$ d'ADF/Cofiline, l'actine-ADP occupe moins de 50 % de la totalité du filament, un changement dramatique par rapport à des filaments classiques (non décorés) où cette seule espèce représente plus de 90 % du filament. Cette diminution de la proportion d'actine-ADP se fait au profit de l'actine-ADP-Pi qui peut représenter jusqu'à 60 % de la totalité du filament. On assiste ainsi à un rajeunissement général du filament, caractérisé par un temps de résidence des sous-unités dans le filament particulièrement court (figure 5.2, graphe B). Notons que la proportion de

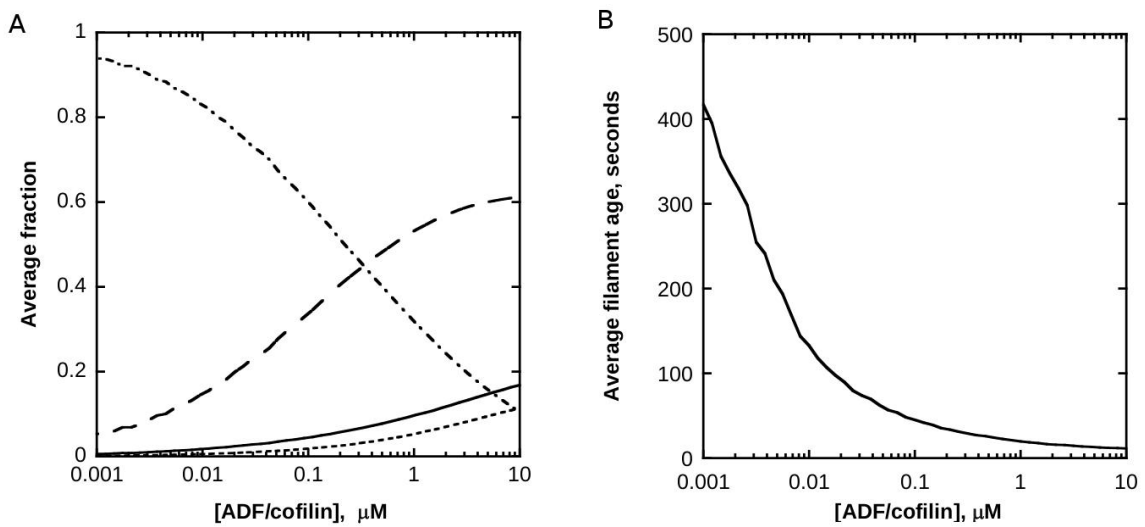


FIGURE 5.2 – **Composition du filament** (A) Composition du filament (en fraction) en fonction de la concentration d'ADF/Cofiline : ATP (ligne pleine) ; ADP-Pi (ligne pointillés larges) ; ADP (ligne alternance points-pointillés) ; ADP-ADF (ligne pointillés courts). (B) Age moyen des sous-unités (au sens du temps de résidence) en fonction de la concentration d'ADF/Cofiline.

sous-unités décorées par l'ADF/Cofiline (graphe A, courbe en pointillé) n'augmente pas de façon très significative. Cet effet est simplement dû à la fragmentation, qui retire les parties les plus anciennes et régule donc à la baisse la quantité d'ADF/Cofiline fixée.

3.3 Affinité de l'ADF/Cofiline pour le filament

La probabilité pour une sous-unité d'être dans l'état actine-ADP augmente progressivement à mesure que l'on s'éloigne de l'extrémité barbée du filament (en raison des délais importants nécessaires à la dissociation du phosphate). Ainsi, l'affinité de l'ADF/Cofiline, que nous avons reliée jusqu'à présent à la notion d'"âge" des sous-unités, peut être convertie en une affinité spatiale à l'échelle du filament. La probabilité pour une sous-unité de lier l'ADF/Cofiline augmente rapidement avec la distance à l'extrémité barbée, pour atteindre quasiment 1 à 7 ou 8 μm (en conditions standards : voir figure 5.3, graphe A). Nous traduisons cette affinité sélective du filament par une constante de dissociation spatiale, notée $K_{D,spatial}$, que nous extrayons analytiquement du système 5.2 (figure 5.3, graphe

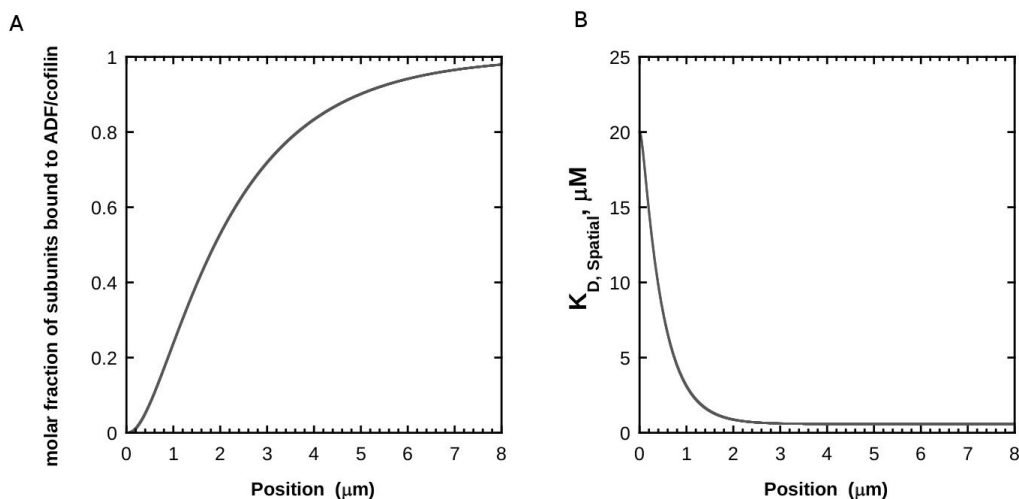


FIGURE 5.3 – **Affinité de l'ADF/Cofiline pour le filament d'actine.** (A) Probabilité pour une sous-unité de lier l'ADF/Cofiline en fonction de la distance à l'extrémité barbée. Conditions : [Actine] = $1 \mu M$; [ADF/Cofiline] = $1 \mu M$. (B) Constante de dissociation spatiale de l'ADF/Cofiline.

B). Cette constante de dissociation varie entre $20 \mu M$ (l'affinité de l'ADF/Cofiline pour la sous-unité actine ADP-Pi) et $0.58 \mu M$ (son affinité pour la sous-unité actine-ADP). Le plateau est atteint à $2 \mu M$ de l'extrémité barbée, traduisant bien la présence d'un "cap", c'est à dire une section à l'extrémité barbée du filament où le nucléotide protège le filament de la fragmentation.

3.4 Accélération du *turnover*

Nous avons souligné en introduction le rôle de l'ADF/Cofiline dans le désassemblage des structures d'actine. Afin de quantifier ce rôle, nous évaluons la balance monomérique du filament, c'est à dire le nombre de sous-unités gagnées ou perdues sous l'action combinée de la dépolymérisation et de la fragmentation (figure 5.4). Ce taux converge rapidement vers 0, confirmant l'existence d'un équilibre dynamique dans lequel la fragmentation rétablit la balance entre élongation et désassemblage. Plus surprenant, ce taux converge vers 0 quelque soit la concentration d'ADF/Cofiline. Le plateau est atteint plus rapidement lorsque cette concentration est élevée, la régulation étant alors plus efficace.

4 Discussion et conclusion

4.1 Contrôle de la longueur et de la composition des filaments

Des simulations stochastiques associées à un modèle analytique nous permettent de montrer l'existence d'un régime d'équilibre dynamique pour le filament d'actine en présence d'ADF/Cofiline. La fragmentation des parties les plus âgées du filament permet d'en réguler à la fois la longueur et la composition. Les filaments ainsi régulés sont plus courts et principalement constitués de sous-unités ADP-Pi. Cet équilibre est atteint quelque soit la concentration d'ADF/Cofiline : la taille régulée des filaments est d'ailleurs faiblement dépendante de cette concentration (à travers une puissance $\frac{1}{3}$). Le désassemblage par l'ADF/Cofiline a pendant longtemps été attribué à une accélération de la dépolymérisation à l'extrémité pointue (Carlier et al., 1997). Nous montrons par là-même que cette

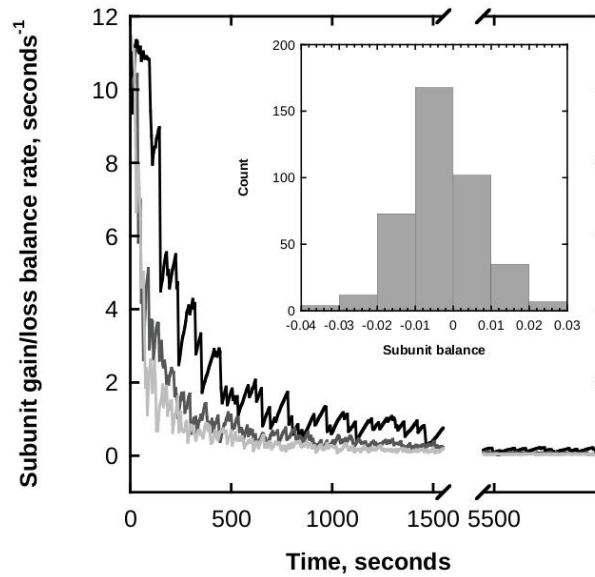


FIGURE 5.4 – **Balance monomérique du filament d'actine.** Gain/perte de sous-unités par seconde pour un filament d'actine au cours du temps en présence de différentes concentrations d'ADF/Cofilin : $0.1 \mu m$ (noir) ; $1 \mu m$ (gris foncé) ; $10 \mu m$ (gris clair). (Histogramme) Distribution des vitesses de gain/perte de sous-unités sur une simulation de 2000 secondes.

accélération n'est pas nécessaire et que l'augmentation du turnover peut être due à la seule activité de fragmentation par l'ADF/Cofilin.

4.2 Nucléation de nouveaux filaments

L'activité de fragmentation de l'ADF/Cofilin favorise l'apparition de nouvelles extrémités barbées à un rythme que nous pouvons désormais quantifier. Ce mode de nucléation est particulièrement visible dans les systèmes *in vitro* (Michelot et al., 2007) où la protéine de coiffe n'est pas toujours présente pour réguler le nombre d'extrémités actives.

4.3 Conséquence pour l'*in vivo* et l'*in vitro*

Les conséquences pour l'*in vivo* de ce mécanisme de régulation sont nombreuses : l'accélération dans le turnover est nécessaire à la formation des protrusions membranaires que nous avons présentées en introduction. Ces déformations se font sur des échelles de temps très rapides et un désassemblage des filaments par la seule dépolymérisation n'est pas envisageable. Par ailleurs, le contrôle de la taille des filaments est vital seuls des filaments courts sont à même de produire des forces importantes lors de la polymérisation, les plus longs étant condamnés à flamber de façon inefficace.

Enfin, ce modèle nous permet de convertir l'affinité de l'ADF/Cofilin pour les sous-unités (dont les valeurs étaient connues au préalable) en un gradient spatial d'occupation du filament. Nous mettons ainsi en évidence une section du filament (un "cap") immunisée à l'action de l'ADF/Cofilin. Nous verrons dans le chapitre suivant que l'ADF/Cofilin peut alors être vue comme un marqueur de l'état de ce nucléotide sur le filament.

Stochastic Severing of Actin Filaments by Actin Depolymerizing Factor/Cofilin Controls the Emergence of a Steady Dynamical Regime

Jeremy Roland,* Julien Berro,* Alphée Michelot,[†] Laurent Blanchoin,[†] and Jean-Louis Martiel*

*Université Joseph Fourier, TIMC-IMAG Laboratory, Grenoble, France; CNRS UMR 5525, Grenoble, France; INSERM, IRF 130, Grenoble, France; and [†]Institut de Recherches en Technologie et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Commissariat à l'Energie Atomique, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Recherche Agronomique and Université Joseph Fourier, F38054 Grenoble, France

ABSTRACT Actin dynamics (i.e., polymerization/depolymerization) powers a large number of cellular processes. However, a great deal remains to be learned to explain the rapid actin filament turnover observed *in vivo*. Here, we developed a minimal kinetic model that describes key details of actin filament dynamics in the presence of actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin. We limited the molecular mechanism to 1), the spontaneous growth of filaments by polymerization of actin monomers, 2), the ageing of actin subunits in filaments, 3), the cooperative binding of ADF/cofilin to actin filament subunits, and 4), filament severing by ADF/cofilin. First, from numerical simulations and mathematical analysis, we found that the average filament length, $\langle L \rangle$, is controlled by the concentration of actin monomers (power law: 5/6) and ADF/cofilin (power law: $-2/3$). We also showed that the average subunit residence time inside the filament, $\langle T \rangle$, depends on the actin monomer (power law: $-1/6$) and ADF/cofilin (power law: $-2/3$) concentrations. In addition, filament length fluctuations are $\sim 20\%$ of the average filament length. Moreover, ADF/cofilin fragmentation while modulating filament length keeps filaments in a high molar ratio of ATP- or ADP-P_i versus ADP-bound subunits. This latter property has a protective effect against a too high severing activity of ADF/cofilin. We propose that the activity of ADF/cofilin *in vivo* is under the control of an affinity gradient that builds up dynamically along growing actin filaments. Our analysis shows that ADF/cofilin regulation maintains actin filaments in a highly dynamical state compatible with the cytoskeleton dynamics observed *in vivo*.

INTRODUCTION

Actin filaments, a major component of the cytoskeleton, grow by polymerization of actin monomers and organize into dendritic networks or bundles in cell compartments (lamellipodia or filipodia) (1). A long-standing challenge in cell biophysics is to understand the molecular mechanisms controlling the assembly and disassembly of actin cytoskeleton, a dynamical process that generates forces and ultimately cell movement (2–4). Indeed, depending on how actin filaments are initiated by a nucleation-promoting factor (i.e., Arp2/3 complex, spire, formins), actin filaments will elongate between $11.6 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ and $38 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (5–7). In the meantime, to avoid a depletion of the cellular concentration of actin monomers, actin filaments need to be rapidly recycled (8). Biomimetic systems helped to identify the minimal set of actin binding proteins that are essential to maintain this high turnover rate and induce actin-based motility (9,10). Among these proteins, actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin stimulates actin cytoskeleton dynamics by severing actin filaments (11–13) and increasing filament turnover *in vitro* (14) or in biomimetic systems (9,10). Recently ADF/cofilin has been shown to control the filament length in

parallel with a reduction of the subunit residence time in filaments (6). Because these new facts change our understanding of actin dynamics, we present a model for the polymerization of actin filaments in the presence of ADF/cofilin. We base our approach on accepted mechanisms for the polymerization of actin monomers and the interactions between ADF/cofilin and actin subunits in a filament.

First, we assumed that each polymerized ATP-actin subunit hydrolyzes its ATP independently in a first-order reaction that is not influenced by surrounding subunits (15). Second, ADF/cofilin accelerates phosphate dissociation (16). Third, ADF/cofilin exclusively binds to actin subunits loaded with ADP (16). Fourth, ADF/cofilin binds cooperatively to subunits in the filament (17). In addition, we assumed that ADF/cofilin severs filaments between two adjacent decorated subunits only. A recent study questioned the acceleration of depolymerization at the pointed end, showing that it is almost independent of the presence of ADF/cofilin (12). Therefore, we assumed that the pointed- and barbed-end depolymerization rates are unaffected by ADF/cofilin. Finally, we simulated the set of chemical reactions in the presence of a large excess of actin monomers, an assumption relevant to the conditions in cells and to the experimental data used to validate our approach.

We combined a stochastic molecule-based model, in which single actin monomers or subunits inside the filament and ADF/cofilin are the modeling units, and a continuous approach to analyze the statistical properties of the control

Submitted September 13, 2007, and accepted for publication November 19, 2007.

Jeremy Roland and Julien Berro contributed equally to this work.

Address reprint requests to Jean-Louis Martiel, TIMC-IMAG Laboratory, Taillefer Building, Faculty of Medicine, F-38706 La Tronche, France. Tel.: 33-456-520-069; E-mail: jean-louis.martiel@imag.fr.

Editor: Alexander Mogilner.

© 2008 by the Biophysical Society
0006-3495/08/03/2082/13 \$2.00

doi: 10.1529/biophysj.107.121988

exerted by ADF/cofilin on filament dynamics. The Monte Carlo simulation of the stochastic model illustrates how ADF/cofilin controls the emergence of a stable dynamical regime for actin dynamics and stimulates actin subunit turnover in filaments. Then, from the statistical distribution of filament population, we analytically determined the average filament length and the residence time of subunits in filaments, with respect to the rate constants for the reactions and the concentrations of actin monomers and ADF/cofilin. Our study offers a satisfactory and coherent understanding of the experiments in biomimetic assays (6) and presents a useful tool to analyze *in vivo* mechanisms for cytoskeleton dynamics, in particular its fast actin turnover.

METHODS

Model and simulation methods

Kinetic model for filament polymerization and severing

We developed a kinetic model to simulate the dynamics of polymerization of ATP-actin monomers in the presence of ADF/cofilin. Since free actin monomers and free ADF/cofilin are small molecules (respectively, 42 kD and 15 kD) that diffuse rapidly, we assumed their spatial distribution is homogeneous. In addition, we hypothesized that the compartment where reactions take place exchanges molecules with a large reservoir so that concentrations of actin monomers and free ADF/cofilin are constant. We considered polymerization of actin at both filament ends (reaction rates v_B and v_P , Fig. 1 A, Tables 1 and 2), ATP hydrolysis and inorganic phosphate release (respectively, reaction rates r_1 and r_2 , Fig. 1 A, Tables 1 and 2). ATP hydrolysis and phosphate release are assumed to be independent and affect actin subunits randomly. ADF/cofilin binding to ADP-bound subunits induces the acceleration of phosphate release from surrounding ADP- P_i subunits and the cooperative binding of new ADF/cofilin molecules (16). Recently, Prochniewicz et al. (18) established that the binding of a single ADF/cofilin facilitates two distinct structural changes on actin filament that may explain ADF/cofilin effects. First, we assumed that the binding of a single ADF/cofilin to one ADP subunit accelerates the release of inorganic phosphate and enhances the production of F-ADP for the whole filament (modification of r_2 , Fig. 1 A). To justify this drastic hypothesis, we investigated different models in which phosphate release acceleration is limited to the R (R is an integer) subunits on both sides of a bound ADF/cofilin. Numerical simulations proved that infinite cooperativity (i.e., a bound ADF/cofilin affects the phosphate release of the whole filament) is an excellent approximation of the filament dynamics. Second, we modeled ADF/cofilin binding to actin subunits in filaments as a two-step process. Initially, a single ADF/cofilin binds to a subunit bound to the nucleotide ADP (F-ADP) whose two neighbors are free from ADF/cofilin (reaction rate r_3 , Fig. 1 B, Tables 1 and 2). Subsequently, the binding of a second ADF/cofilin to an F-ADP subunit is facilitated by the neighboring decorated subunits (reaction rate r_4 , Fig. 1 C, Tables 1 and 2).

We also assumed that filament severing occurs between two adjacent F-ADP-ADF subunits (reaction rate r_5 , Fig. 1 D, Tables 1 and 2). The two new pieces generated by severing have different fates (Fig. 1 D). Because of the large amount of capping proteins *in vivo* (8), we assumed that the piece associated with the new barbed end (i.e., fragment, Fig. 1 D) is immediately capped and cannot elongate. Therefore, to simplify simulations and the mathematical analysis in the Appendix, the piece associated with the old barbed end, referred to as the ‘‘filament’’ (Fig. 1 D), remains under investigation. The other piece, associated with the old pointed end, referred to as the ‘‘fragment’’ (Fig. 1 D), is discarded from simulations, except in Fig. 5 B.

Models for actin filament dynamics predicted the existence of a diffusive length ($\sim 30\text{--}34$ monomers 2 s $^{-1}$) at the barbed end in conditions close to

chemical equilibrium (19,20). This result agrees with experimental work (21,22) but represents only minor fluctuations of the filament length. Here, although we used the same set of chemical reactions, we addressed the specific role of ADF/cofilin in stimulating large filament fluctuations and fast monomer turnover.

Simulation methods

We used the Gillespie algorithm to determine the evolution of the filament and the chemical transformation of subunits (23,24). This molecule-based approach provides precise information on the dynamics of actin filaments. In particular, we could determine the spatial and temporal distribution of actin subunits along the filament, the nature (i.e., ATP, ADP- P_i , or ADP) of the nucleotide bound to the subunit, and the subunit residence time. All averaged variables (e.g., filament length or subunit residence time) were determined from the sampling of time-dependent simulations (typically, simulations during 10,000 s were sampled every 20 s). The analytical distribution of filament length and subunit residence time in filaments is presented and analyzed in the Appendix section.

RESULTS

ADF/cofilin induces large amplitude fluctuations in growing actin filaments

Initially, we addressed the question of how actin filament length reaches a steady dynamical regime by balancing assembly and disassembly of subunits at both ends, independent of the biochemical conditions in cells or in biomimetic assays. We investigated the key issue of actin filament length control by the severing activity of ADF/cofilin. First, we assumed a control of the length of actin filaments based only on an increase in the rate of depolymerization and in the absence of ADF/cofilin-severing activity ($k_{\text{severing}} = 0$) (Fig. 2 A). Simulations show that a steady dynamical regime is achieved for only a single value of the actin monomer concentration, somewhere between 0.8 and 0.9 μM (Fig. 2 A). For different concentrations of actin monomer, actin filaments will grow (above 0.9 μM) or shrink to zero length (below 0.8 μM). Addition of the severing activity of ADF/cofilin to this model substantially modified the behavior of actin filaments (Fig. 2 B). After an initial period of continuous growth for $\sim 150\text{--}300$ s, actin filaments follow periods of sustained polymerization and sudden shrinkage mediated by ADF/cofilin severing (Fig. 2 B). Although the rate of polymerization of actin subunits is constant, severing prevents unrestricted filament growth and induces large-amplitude fluctuations that follow a well-defined distribution (Fig. 2 C).

The succession of elongation and shortening periods for actin filaments depends on the efficiency of the severing activity of ADF/cofilin (Fig. 2 B). Despite the highly irregular behavior (see Fig. 2 B), the length distribution is bell-shaped, with a marked peak sharper than in a Gaussian distribution (Fig. 2 C and Eq. A9). Conversely, the average and standard deviation of the filament length increase with the concentration of actin monomers (Fig. 2 C, *inset*). We derived a very simple relation between the average (respectively the standard deviation) of the filament length and the rates of reactions for

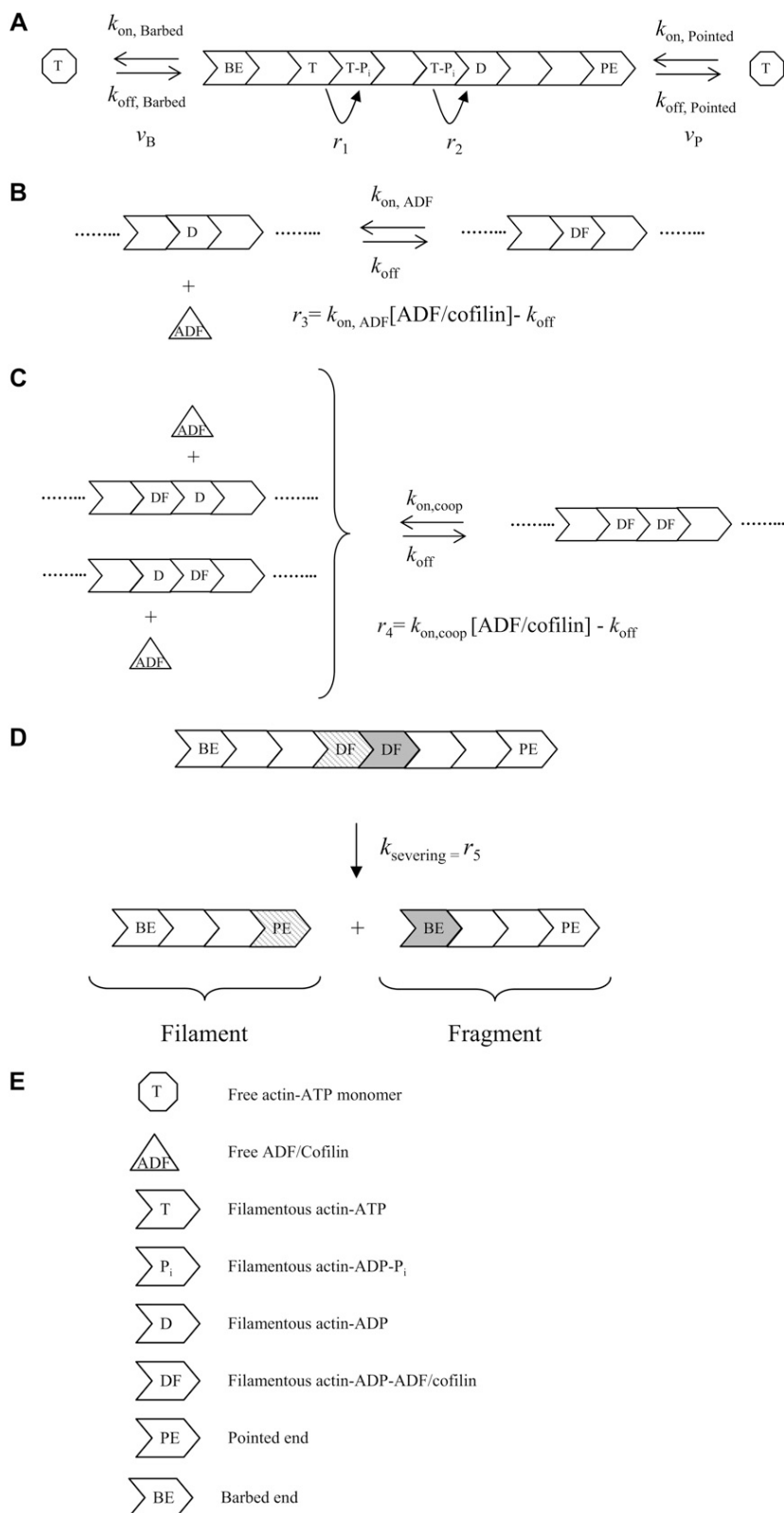


FIGURE 1 Molecule-based stochastic model for actin filament elongation and severing. (A) Actin filament elongation by addition of actin monomers bound to ATP at filament ends. v_B and v_P are, respectively, the barbed- and pointed-end polymerization rates. We assumed that random ATP hydrolysis (rate r_1) is followed by the release of the inorganic phosphate P_i (rate r_2). (B) ADF/cofilin binds reversibly to an isolated ADP-actin subunit in the filament. (C) Cooperative binding of ADF/cofilin molecules facilitates the formation of decorated subunit pairs along one of the two actin filament strands. (D) Severing occurs between two consecutive F-ADP-ADF subunits, creating a piece containing the “old” pointed end and “new” barbed end (fragment) and a piece containing the “old” barbed end and a new pointed end (filament). (E) Code for the different symbols in A–D. The elongation and reactions rates (v_B , v_P , and r_{1-5}) represent molecule fluxes and are basically obtained as the product of an intrinsic reaction rate by a concentration (Tables 1 and 2).

TABLE 1 Chemical rates constant

Chemical rate	Numerical value	Reference
$k_{\text{on,B}}$	$11.6 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (GATP)	(5)
$k_{\text{off,B}}$	1.4s^{-1} (GATP)	(5)
$k_{\text{on,P}}$	$1.3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (GATP)	(5)
$k_{\text{off,P}}$	0.8s^{-1} (GATP) 0.27s^{-1} (GADP)	(5)
$k_{\text{ATP-hydrolysis}}$	0.35s^{-1}	(15)
$k_{\text{Pi-release}}$	0.0019s^{-1}	(32)
$k_{\text{Pi-release}}$ (in the presence of ADF/cofilin)	0.035s^{-1}	(16)
$k_{\text{on,ADF}}$	$0.0085 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	(16)
$k_{\text{off,ADF}}$	0.005s^{-1}	(16)
$k_{\text{coop,ADF}}$	$0.075 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$	(16)
k_{severing}	0.012s^{-1}	(5,16)

GATP, ATP-loaded monomer.

GADP, ADP-loaded monomer.

the polymerization and ADF/cofilin-dependent severing (Eqs. A10, A12, and A13). Basically, the average filament length, $\langle L \rangle$ (respectively standard deviation, $\sqrt{\langle \Delta L^2 \rangle}$), depends almost linearly on the actin monomer concentration (power law: 5/6) and is inversely proportional to the ADF/cofilin concentration (power law: $-1/3$):

$$\langle L \rangle \propto ([\text{Actin}])^{5/6} ([\text{ADF/cofilin}])^{-1/3},$$

$$\sqrt{\langle \Delta L^2 \rangle} \approx 0.2 \langle L \rangle.$$

This analytical result shows that the average filament length and the size of the fluctuations, determined by the standard deviation of the distribution, are reduced in the presence of a high ADF/cofilin concentration, in agreement with the numerical simulations presented in Fig. 2 C (and *inset*). This reduction of fluctuations is also visible in Fig. 2 B, with a marked correlation between the severing activity of ADF/cofilin and the fluctuation amplitude. The actin fragment average length (Fig. 2 D) decreases to a value below $0.5 \mu\text{M}$ for ADF/cofilin concentration above $0.2 \mu\text{M}$. This emphasizes that high ADF/cofilin concentrations will generate actin filaments too small to be detected in light microscopy. Inversely, for a constant concentration of ADF/cofilin ($1 \mu\text{M}$)

TABLE 2 Reaction rates

Variable	Reaction	Expression
v_B	Elongation rate at the barbed end	$k_{\text{on,B}}[\text{Actin}] - k_{\text{off,B}}$
v_P	Elongation at the pointed end	$k_{\text{on,P}}[\text{Actin}] - k_{\text{off,P}}$
v	Total elongation	$v = v_B + v_P$
r_1	ATP hydrolysis	$k_{\text{ATP-hydrolysis}}$
r_2	Phosphate release	$k_{\text{Pi-release}}$
r_3	Binding/unbinding of ADF/cofilin to F-ADP subunits	$k_{\text{on,ADF}}[\text{ADF/cofilin}] - k_{\text{off,ADF}}$
r_4	Cooperative binding/unbinding of ADF/cofilin to F-ADP subunits	$k_{\text{coop,ADF}}[\text{ADF/cofilin}] - k_{\text{off,ADF}}$
r_5	Severing	k_{severing}

an increase in actin monomer concentration induces an almost linear increase in actin filament mean lengths (Fig. 2 D, *inset*, and Eq. A14).

We also analyzed models where R actin subunits (R is an integer) on both sides of a bound ADF/cofilin have their rate of phosphate release increased. In the case of finite cooperativity, the average phosphate release rate for a filament slows the transformation of F-ADP- P_i into F-ADP and the subsequent binding to ADF/cofilin. Therefore, the average filament length is increased in reference to the model with infinite cooperativity (compare *black* and *red* curves in Supplementary Material Fig. S1, *inset*). However, the deviation from this last model, which is maximal for R in the range 10–90 actin subunits, becomes practically undetectable for R larger than 125 subunits. Prochniewicz et al. (18) measured that the increased torsional flexibility after the binding of a single ADF/cofilin affects 427 ± 355 subunits, to which a parameter R in the range 40–390 corresponds in our modeling approach. Hence, because these numbers are highly variable and because model outputs are practically indistinguishable for $R \geq 125$ subunits, the infinite cooperativity hypothesis is excellent; we used it throughout this study.

Chemical composition of the actin filament

ADF/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime, with a well-defined average length and fluctuation amplitude (Fig. 2 C). Since ADF/cofilin preferentially binds to ADP-actin subunits, the severed fragments are principally made of subunits bound to ADP, whereas the remaining actin filament is composed of younger subunits bound to ATP or ADP- P_i . Consequently, in the steady regime, the molar fraction of the different nucleotide on a filament is highly dependent on the severing activity, as shown in Fig. 3 A. Although ATP or ADP- P_i represent only transient chemical states for the nucleotide bound to subunits (half-time lives are, respectively, 2 s and 6 min), their molar fraction in the actin filament increases regularly with ADF/cofilin concentrations (Fig. 3 A). At ADF/cofilin concentrations above $0.1 \mu\text{M}$, ATP/ADP- P_i -bound subunits represent $>50\%$ of the total subunits in a filament (Fig. 3 A). Conversely, most of ADP-bound subunits are removed from the filament by severing, and their molar fraction drops to only 20% for ADF/cofilin above $1 \mu\text{M}$ (Fig. 3 A). Therefore, ADF/cofilin directly controls the age of the filament by removing subunits bound to ADP (Fig. 3 B).

Although the ADF/cofilin concentration used in the simulations lies in the range 0.001 – $10 \mu\text{M}$, the number of decorated pairs remains globally low and plateaus at ~ 25 pairs per filament (Fig. 3 C), which represents only a small percentage of the total number of actin subunits. To measure the apparent drop of binding efficacy of ADF/cofilin, we defined an apparent “dissociation equilibrium constant” of cofilin bound to actin filament by

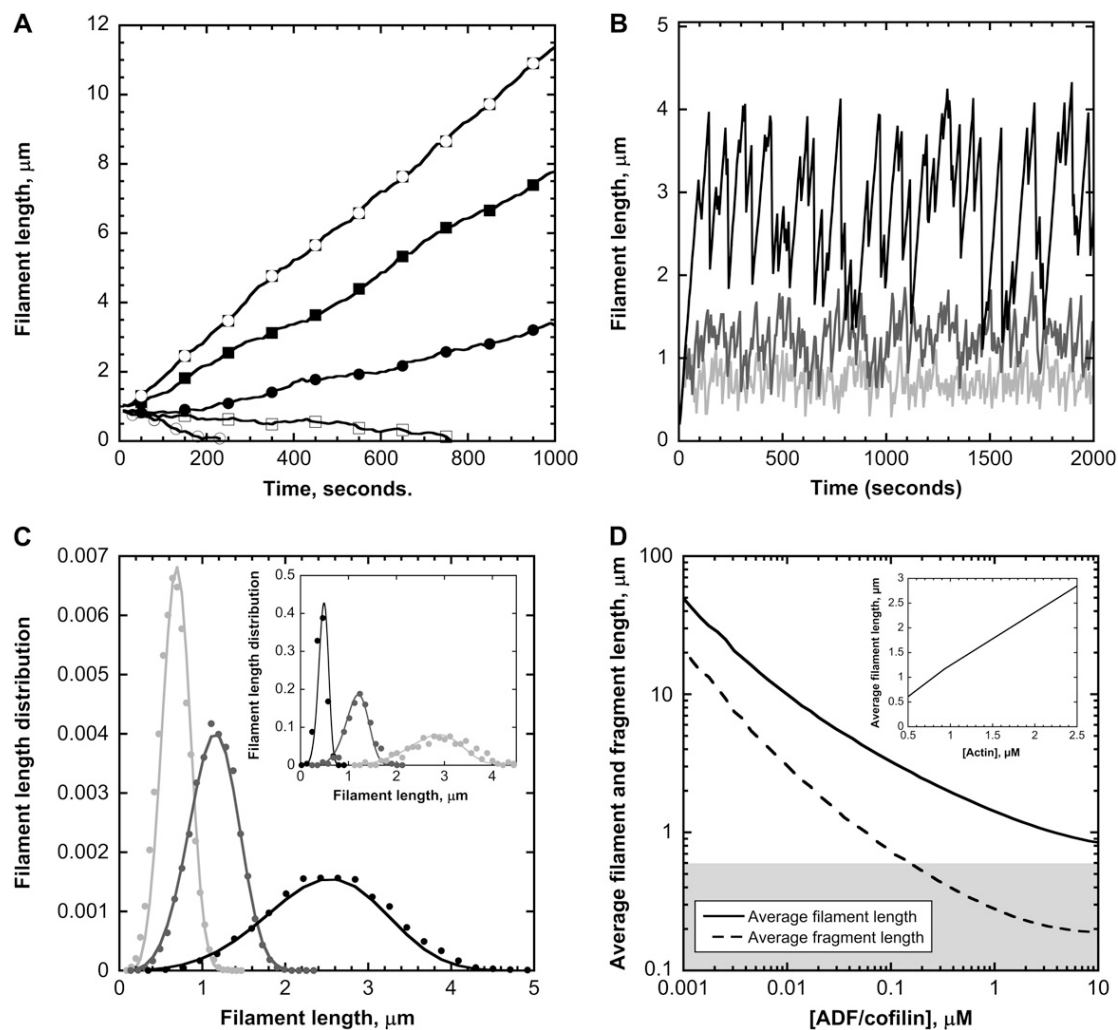


FIGURE 2 Steady-state dynamics of actin filaments. (A) Filament length time course for different actin monomer concentrations. We assumed that depolymerization at the pointed end is multiplied by a factor of up to 25 and that ADF/cofilin has no severing activity (14). The actin monomer concentrations used in the simulations are (from *bottom to top*) 0.63 (○), 0.71 (□), 0.81 (●), 0.92 (■), and 1.05 (▣) μM. (B) ADF/cofilin-mediated large amplitude fluctuations. Increasing concentrations of ADF/cofilin reduce the average filament length and the amplitude of the fluctuations. We used a single actin monomer concentration of 1 μM; no qualitative changes have been observed for different actin monomer concentrations. Black curves 0.1 μM ADF/cofilin, dark gray 1 μM ADF/cofilin, and light gray 10 μM ADF/cofilin. (C) Increasing severing activity decreases both the average and the variance of the distribution of filament length for different values of ADF/cofilin (*light gray* 10 μM; *gray* 1 μM, and *black* 0.1 μM) and [Actin] = 1 μM. The model prediction from the balance equation (Eq. A5, *solid curve*) matches the empirical distribution based on the molecule-based model (*points*). (*Inset*) Model prediction (*solid curve*) and empirical (*points*) distributions for the filament length with different concentrations of actin monomers (*light gray curve* 0.5 μM, *gray curve* 1 μM, and *black curve* 2 μM). The ADF/cofilin is fixed at 1 μM. (D) ADF/cofilin controls the average filament length (*solid curve*) and the average fragment size (*dashed curve*); [Actin] = 1 μM. Note that for ADF/cofilin above 0.2 μM, the fragment size is <0.5 μM, the resolution limit in light microscopy, as indicated by the shaded area. (*Inset*) The average filament length increases with the concentration of actin monomers. ADF/cofilin is held constant at 1 μM. Parameters for A are $v_B = 11.6[\text{Actin}] \text{ s}^{-1}$, $v_P = 1.3[\text{Actin}] - 6.75 \text{ s}^{-1}$, $r_1 = 0.3 \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 0.0019 \text{ s}^{-1}$, $r_3 = 0 \text{ s}^{-1}$, $r_4 = 0 \text{ s}^{-1}$, and $r_5 = 0 \text{ s}^{-1}$. Parameters for B–D are $v_B = 11.6[\text{Actin}] \text{ s}^{-1}$, $v_P = 1.3[\text{Actin}] - 0.27 \text{ s}^{-1}$, $r_1 = 0.3 \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 0.035 \text{ s}^{-1}$, $r_3 = (0.0085[\text{ADF/cofilin}] - 0.005) \text{ s}^{-1}$, $r_4 = (0.075[\text{ADF/cofilin}] - 0.005) \text{ s}^{-1}$, and $r_5 = 0.012 \text{ s}^{-1}$.

$$K_{D,App} = \frac{[\text{ADF/cofilin}] \langle \# \text{FADP} \rangle}{\langle \# \text{FADP-ADF} \rangle},$$

where $\langle \# \text{FADP} \rangle$ (respectively $\langle \# \text{FADP-ADF} \rangle$) is the average number of actin subunits bound to ADP in the filament

(respectively the average number of ADF/cofilin molecules bound to the actin filament). Simulations demonstrated that $K_{D,App}$ increases with the concentration of free ADF/cofilin (Fig. 3 C, *inset*). This apparent dissociation equilibrium constant remained low at ADF/cofilin concentrations below

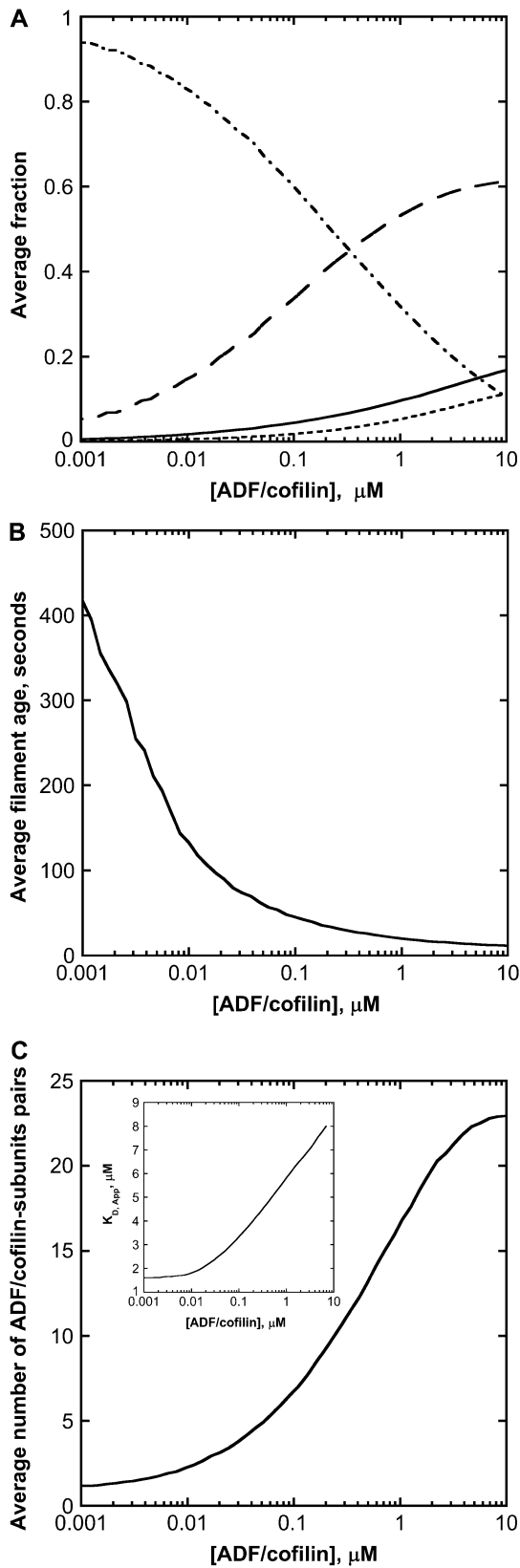


FIGURE 3 Chemical composition of actin filaments at steady state. (A) ADF/cofilin concentration controls the molar fraction of the nucleotide bound

0.1 μM . For ADF/cofilin concentration in the range 0.1–10 μM , the $K_{D,App}$ increased, implying a drop in the available binding sites for ADF/cofilin on the filament.

To test the role of subunit ageing, we determined the average spatial distribution of actin subunits, given the state of the associated nucleotide (ATP, ADP-P_i, or ADP, Figs. S2 and S3). It turns out that a long simulation (10,000 s) is sufficient for the spatial distribution of actin subunit to stabilize, except large fluctuations at the pointed end (Fig. S2). Using the time-dependent solution of the system of Eq. A2, which expresses the time course of the chemical transformation of the nucleotide, and from the conversion between time and space $x = \nu\delta t$ where x is the position of an actin subunit incorporated into the filament t ago (δ and ν are, respectively, the size of an actin subunit and the polymerization rate), we can match the time-dependent curves (Fig. S3) with the spatial distribution obtained from a long run of the stochastic model (Fig. S2). This result suggests that chemical transformation of ATP into ADP-P_i and ADP, and the subsequent binding of ADF/cofilin to F-ADP subunits, provides the timer necessary to control the elongation/severing cycle.

To further investigate the effect of subunit ageing on the binding of ADF/cofilin along growing actin filaments, we analyzed the fraction of subunits bound to ADF/cofilin and the spatial variation of the local dissociation constant of the actin subunit-ADF/cofilin complex formation, denoted $K_{D,Spatial}$ as a function of the position along the actin filament (Fig. 4). (Note that $K_{D,App}$ is the average of the dissociation constant determined from the whole filament, discarding the information coming from the spatial position of actin subunits with respect to the barbed end.) The 0 intercept with the x and y axes corresponds to the position of the growing barbed end where actin subunits are always in the ATP-bound state (Fig. 4 A). At this position, $K_{D,Spatial}$ is $\sim 20 \mu\text{M}$ (Fig. 4 B) and the molar fraction of bound ADF/cofilin is nearly 0 (Fig. 4 A). $K_{D,Spatial}$ decreases sharply to reach the value of the actual

to subunits in filament: F-ATP (solid thick curve), F-ADP-P_i (long dashed curve), F-ADP (dot-dashed curve), and F-ADP-ADF/cofilin (dotted curve). The removal of a large piece made of F-ADP subunits favors the molar ratio ATP or ADP-P_i versus ADP and ADP-ADF/cofilin-bound subunits. (B) The age of the filament decreases with ADF/cofilin activity. The age of a particular subunit in an actin filament at time t is the time spent by this subunit since its polymerization in the filament before time t . The filament age is determined by averaging the subunit ages in a filament. (C) The number of ADF/cofilin decorated subunit pairs depends on the ADF/cofilin concentration. The number of ADF/cofilin-decorated subunit pairs is a sigmoidal function of the ADF/cofilin concentration, which plateaus at high ADF/cofilin level. (Inset) Variation of the apparent dissociation equilibrium constant, $K_{D,App}$ for the binding of ADF/cofilin to actin filaments. For concentrations of ADF/cofilin below 0.01 μM , the $K_{D,App}$ is low and almost constant. Because high ADF/cofilin levels favor low F-ADP molar ratio in filaments, $K_{D,App}$ increases linearly with ADF/cofilin concentration. At concentrations of ADF/cofilin higher than 50 μM , $K_{D,App}$ plateaus at a value of 20 μM (data not shown). Parameters for simulations are listed in the legend of Fig. 2 B.

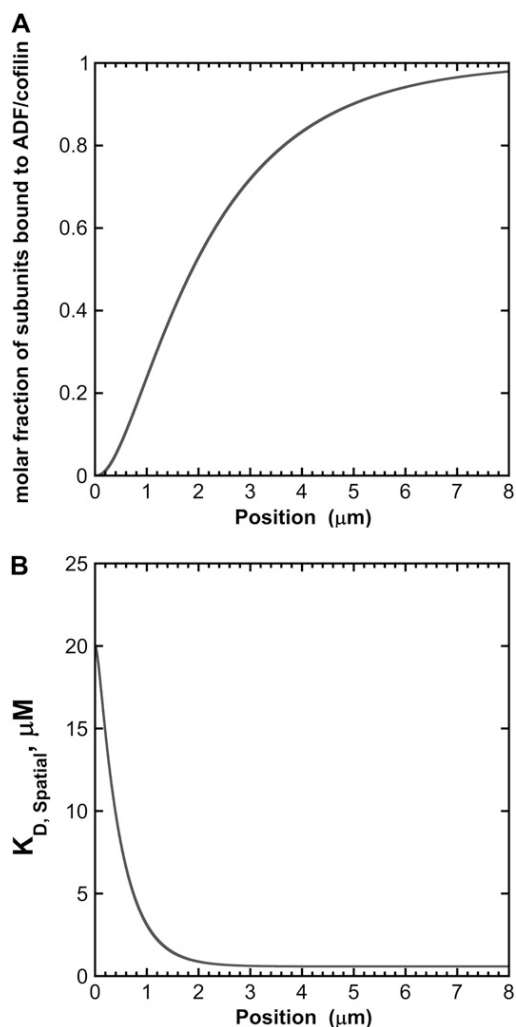


FIGURE 4 Effect of the ageing of actin filament on the binding of ADF/cofilin. (A) The binding of ADF/cofilin to ADP-bound actin subunits increases with the distance to the growing barbed end, symbolized by the x, y axis 0 position. We assumed a constant level (time and space) for the actin monomer concentration ($[\text{Actin}] = 1 \mu\text{M}$) and ADF/cofilin ($[\text{ADF/cofilin}] = 1 \mu\text{M}$). We simulated Eq. A2 with $r_1 = 0.3 \text{ s}^{-1}$, $r_2 = 0.035 \text{ s}^{-1}$, $r_3 = 0.0085[\text{ADF/cofilin}] - 0.005 \text{ s}^{-1}$, $r_4 = 0.075[\text{ADF/cofilin}] - 0.005 \text{ s}^{-1}$, and $r_5 = 0.012 \text{ s}^{-1}$. Note that the spatial distribution was obtained by converting time into space (Eq. A4). The growing barbed end is assumed to be at position 0. (B) ADF/cofilin-actin subunit dissociation constant at steady state. From the spatial distribution of the different nucleotide states bound to actin subunit (ATP, ADP-P_i, or ADP) found by solving Eq. A2 (the simulation parameters are given in A), we determined the local apparent dissociation constant of the complex ADF/cofilin-actin subunit given by $K_{D, \text{Spatial}} = (f_{\text{ATP}} + f_{\text{ADP-P}_i})K_{D0} + (1 - f_{\text{ATP}} - f_{\text{ADP-P}_i})K_{D1}$, where K_{D0} (respectively K_{D1}) is the dissociation constant of the complex ADF/cofilin with F-ATP and F-ADP-P_i (respectively with actin ADP). $K_{D0} = 20 \mu\text{M}$ and $K_{D1} = 0.58 \mu\text{M}$ (16); f_{ATP} , $f_{\text{ADP-P}_i}$ are, respectively, the average fraction of actin subunits bound to ATP, with ADP-P_i at position x from the barbed end.

dissociation constant of ADF/cofilin for ADP-bound actin filaments (Fig. 4 B) at $2 \mu\text{m}$ from the growing barbed end, corresponding to a molar fraction of bound ADF/cofilin of ~ 1 (Fig. 4 A).

Residence time of actin subunits in the actin filament

We next examined the role of ADF/cofilin on the time spent by subunits in the filament and on the global turnover of actin monomers. The restricted filament length variation, as shown in Fig. 2 B, suggests that gain and loss of actin subunits should be balanced over long periods. To further test this assumption, we plotted the net balance of actin subunits in the filament (i.e., the difference between the rates of addition and

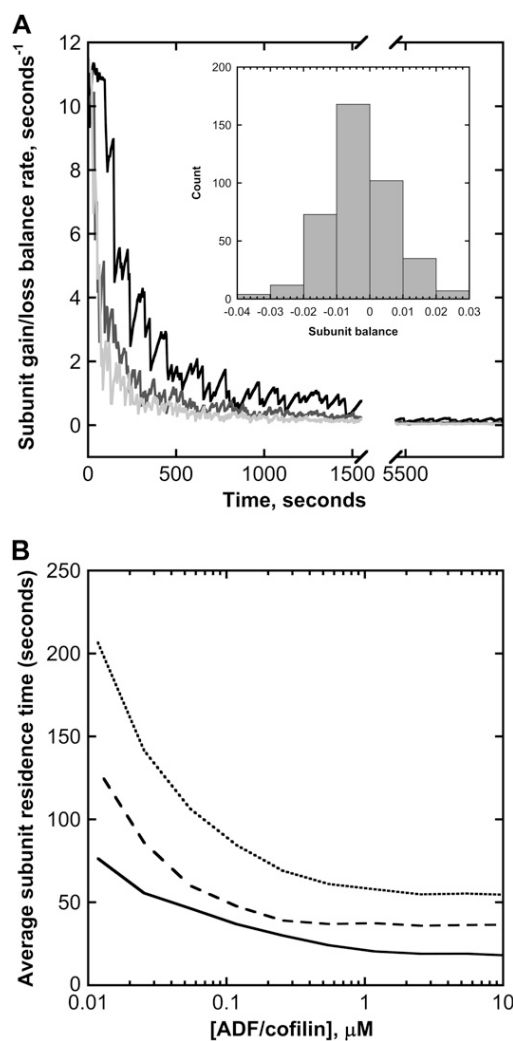


FIGURE 5 Subunit dynamics in a single filament. (A) Variation of the subunit gain/loss balance rate. After an initial transient decrease, the net balance between gain and loss of actin subunits rapidly converges to zero, regardless of the ADF/cofilin concentration used in simulations (black curve corresponds to $0.1 \mu\text{M}$; dark and light gray are obtained with 1 and $10 \mu\text{M}$, respectively). (Inset) Net balance fluctuation histogram determined over the last 2000 s of simulations. (B) ADF/cofilin-severing activity controls the average time spent by a subunit in actin filaments (solid black curve) and in the different fragments generated by the same filament (dashed black curve). The average duration of a life cycle (monomer to filament to monomer) is given by the dotted black curve. Parameters for simulations are listed in the legend of Fig. 2 B.

loss of actin monomers) for three ADF/cofilin concentrations (Fig. 5 A).

After the first initial transient phase, due to the lag between actin filament elongation and ATP hydrolysis of subunits (Fig. 5 A), the balance between subunit gains and losses presents zero-centered fluctuations (Fig. 5 A and *inset*) indicating that, on average, the number of subunits in the filament will practically remain constant. Note that the actin subunit loss includes contributions from actin monomer depolymerization at both ends and the sudden removal of a large amount of subunits in the case of filament severing. In the simulations, this latter phenomenon represented $\sim 80\%$ of the total subunit loss (Fig. S4).

The dynamics of actin filament length regulation directly affects the residence time of actin subunits in the filament. We analyzed the average time spent by a particular subunit in the filament, between its incorporation and its release, either by depolymerization or by severing (Fig. 5 B). ADF/cofilin drastically reduces this average time at concentrations below $1 \mu\text{M}$. However, further reductions are hardly seen for concentrations above $1 \mu\text{M}$, and the minimal average time remains ~ 25 s. Both ADF/cofilin and actin monomer control the average residence time negatively (Supplementary Material Figs. S5 and S6), in agreement with the analytical distribution (Eqs. A6 and A7; compare also Figs. 2 C and S5). In addition, note that actin concentration increases the average length (Fig. 2 C, *inset*) whereas it has an opposite effect on the subunit residence time (Fig. S6).

To address the question of the global turnover of a monomer, we also determined the residence time of one subunit in the fragments obtained after filament severing. Assuming that fragments are immediately capped, as *in vivo*, the time spent by a particular subunit in the successive fragments is about twice the time spent in the filament (Fig. 5 B, *dashed curve*). Finally, we also determined the average actin monomer life cycle duration (i.e., from monomer to filament to monomer). As shown by the dotted curve in Fig. 5 B, the total time spent is substantially reduced (down to ~ 50 s) in the presence of high ADF/cofilin concentrations, above $1 \mu\text{M}$, and the global monomer turnover is accelerated by a factor of >100 , when compared to the situation without cofilin (data not shown).

Fragments generated by ADF/cofilin severing

The severing of filaments produces fragments of different sizes. To analyze the fragmentation process, we determined the distribution of the fragment lengths generated from a single filament (Fig. S7). Although ADF/cofilin favors filament severing, the proportion of large filaments, above $0.5 \mu\text{m}$, diminishes abruptly with the severing activity (compare *red*, *blue*, and *black* curves in Fig. S7). This observation suggests that most of the severing activity above $1 \mu\text{M}$ ADF/cofilin will be undetectable by light microscopy. This con-

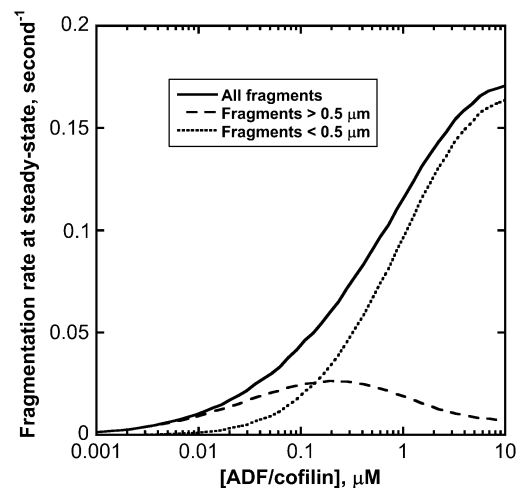


FIGURE 6 ADF/cofilin severing at steady state. The production of new actin filament increases with ADF/cofilin activity (*solid black curve*). Large filaments, above $0.5 \mu\text{m}$, are optimally produced for low severing activity (*dashed black curve*); conversely, pieces below $0.5 \mu\text{m}$ are predominant at large ADF/cofilin concentration (*dotted black curve*). Parameters for simulations are listed in the legend of Fig. 2 B.

clusion is valid over four orders of magnitude for the ADF/cofilin concentration and is consistent with the statistical distribution of filaments (Fig. 2 C). At steady state, the fragmentation rate increased with the severing activity before plateauing at high ADF/cofilin concentration (Fig. 6, *solid curve*). If we considered fragments larger than $0.5 \mu\text{m}$ only (that are observable experimentally by light microscopy), the apparent fragmentation rate is optimal for $[\text{ADF/cofilin}]$ of $\sim 0.2 \mu\text{M}$ (Fig. 6, *dashed curve*). However, fragments $< 0.5 \mu\text{m}$ are preferentially produced at higher concentrations of ADF/cofilin (Fig. 6, *dotted curve*; see also Fig. S7).

DISCUSSION

Dynamic organization of actin filaments into highly ordered arrays (actin cables or a dendritic network) that produce the forces necessary to deform or move cells requires a coordination of actin-binding protein activity together with the transduction of chemical energy into force (1). Recently a biomimetic system, comprising a minimal set of actin-interacting proteins (including formin, ADF/cofilin, and profilin), was able to reproduce actin filament dynamics at a rate compatible with *in vivo* actin filament turnover (6). This study demonstrated that ADF/cofilin was the only actin-binding protein necessary to rapidly disassemble growing actin filaments generated by an actin-promoting factor from the formin family. Here, we developed a kinetic model for the control of ADF/cofilin on single actin filament dynamics. We showed that ADF/cofilin regulates the actin filament length (Fig. 2), resembling the fast elongation periods followed by abrupt shrinkage events observed in biomimetic assays (6).

Model simulations (Fig. 2) and mathematical analysis (Appendix) suggest that the conjunction of the ageing of subunits in the actin filament and the binding of ADF/cofilin to actin subunits loaded with ADP followed by severing are essential for actin filament dynamics. Under these conditions, actin filament length distribution reaches a stable stationary regime. This is an emergent property of the actin system that constitutes a building block for future investigations of the ADF/cofilin-driven control over actin dynamics in more complex systems, both experimentally and in modeling approaches.

Filaments are in a stable dynamical regime that is independent from the chemical conditions

The presence of actin-interacting proteins produces different biochemical conditions that can affect actin filament polymerization quite dramatically. Therefore, we addressed whether a stable regime for actin dynamics (i.e., a balance between assembly and disassembly) is possible, whatever the biochemical conditions in cells or in biomimetic assays. In the presence of ADF/cofilin, simulations suggest that filament length and chemical composition, though highly variable, have a perfectly defined average and standard deviation (Eqs. A10–A12). Additionally, both the average and the amplitude of actin filament length fluctuations depend on the actin monomer or ADF/cofilin concentrations only, with a constant fluctuation/average ratio ($\sim 20\%$, Eq. A13). The existence of a stable dynamical regime, as shown in Fig. 2, implies that the contribution of actin filament elongation is balanced by subunit loss (combining depolymerization and severing). The match between gain and loss of actin subunits emerges from the combination of constant ageing of actin subunits in the filament and from the specific higher affinity for binding of ADF/cofilin to F-ADP subunits (16). Since only a few ADF/cofilin-actin subunit pairs are necessary to fragment an actin filament, the balance between gain and loss of subunits becomes almost independent of the actual ADF/cofilin concentration, except at very low ADF/cofilin (~ 0.1 nM). This resolves the apparent contradiction between the drop of the apparent binding affinity of ADF/cofilin at large concentration (Fig. 3 C, *inset*) and the severing efficacy illustrated in Figs. 2 B and 5 B.

This result has important consequences for *in vivo* or *in vitro* conditions, where nonequilibrium conditions often prevail. A previous report (6) and this study highlight that a stable dynamical regime is achieved for a whole set of ADF/cofilin and actin monomers (Fig. 2, C and D). This is possible because ADF/cofilin cannot bind to F-ATP or F-ADP-P_i actin subunits (16) and, consequently, the filament region close to the elongated barbed end is never severed. This has the further consequence of preventing total disassembly of a filament at its growing end due to ADF/cofilin activity that is too high.

Subunit residence time in filaments and global turnover of actin monomers

By severing the oldest part of the filament, ADF/cofilin largely contributes to the active turnover of subunits (Fig. 5 B), simultaneously enriching the molar ratio of the remaining actin filament with subunits bound to ATP or ADP-P_i (Fig. 3 A). Experiments (6) and simulations prove that the maximal efficiency of ADF/cofilin is obtained at concentrations below $1 \mu\text{M}$, in agreement with the evolution of $K_{D,App}$.

We also investigated the dynamics of fragments, assuming that they were immediately capped by capping proteins before further severing by ADF/cofilin. We found that the average subunit residence time in such daughter fragments, originating from the same mother filament, happens to be twice the average time spent in the mother filament (Fig. 5 B). Similarly, we examined the global monomer turnover by looking at the time spent by a particular monomer throughout its complete life cycle. All residence times decrease rapidly at low ADF/cofilin level (below $1 \mu\text{M}$, Fig. 5 B), whereas further time reduction is hardly seen at concentrations above $1 \mu\text{M}$, in agreement with experimental data (see Fig. 3 E in Michelot et al. (6)). This is a consequence of the protection provided by the F-ATP and F-ADP-P_i population of subunits against severing. The residual turnover observed at large ADF/cofilin concentrations represents the time delay necessary for ATP hydrolysis and phosphate release (Figs. S2 and S3). More interestingly, Fig. 5 B gives the correct order of magnitude for actin filament turnover (~ 50 s) *in vivo* (3) or in biomimetic assays (9). As suggested by the model and in conjunction with experimental data, ADF/cofilin-driven filament fragmentation is likely the most important factor that determines actin turnover through the acceleration of the monomer life cycle in filaments and/or fragments.

Nucleation of new filaments and inhibition of severing

Each fragment generated by severing is a potential seed for the generation of a new actin filament (Fig. 6), unless rapidly capped with capping protein. To reconcile this model-driven analysis with recent results showing that ADF/cofilin severs filaments, with optimal activity $\sim 0.01 \mu\text{M}$ (whereas higher levels, above $0.1 \mu\text{M}$, stabilize the filaments (12,25,26)), one has to consider the initial composition of the actin filament. All previous studies use F-ADP actin filaments, which become decorated on each subunit very rapidly in the presence of excess ADF/cofilin. This rapid and huge change of the composition stabilizes the filament and prevents its severing. In our model, we started from short filaments made of ATP-bound subunits which become decorated by ADF/cofilin after the hydrolysis and the release of the γ -phosphate bound to the nucleotide. However, since ADF/cofilin-decorated subunits are scattered, severing occurs before the complete

stabilization of the structure, giving rise to a new filament made of ATP or ADP-P_i-bound subunits. Therefore, the initial composition keeps the severing of growing actin filaments on, avoiding the stabilization of growing actin filaments at high ADF/cofilin concentration.

Apparent non-mass-action kinetics

Most of the parameters analyzed so far (average filament length, subunit residence time, fraction of bound ADF/cofilin to filaments, or apparent equilibrium dissociation constant of ADF/cofilin for growing actin filaments) show a marked drop at high ADF/cofilin concentration (Figs. 2 D, 3 B, 4, and 5 B). Although the binding of ADF/cofilin to actin subunits has a constant affinity (Table 1), the apparent equilibrium dissociation constant, $K_{D,App}$, increases from 1.66 μM at very low ADF/cofilin concentrations to 8 μM at 10 μM of ADF/cofilin (Fig. 3 C, *inset*). At low ADF/cofilin activity, long and aged filaments (most of the subunits are bound to ADP, Fig. 3 A) offer a large number of binding sites, hence the low value for $K_{D,App}$. Conversely, if severing activity is high, actin filaments are short and subunits are predominantly bound to ATP or ADP-P_i (Fig. 3 A). As a consequence, the number of potential binding sites for ADF/cofilin is low, resulting in a low apparent affinity of ADF/cofilin for actin filaments.

Extension of the model to in vivo situations

This numerical study documents quantitatively the role of ADF/cofilin severing on actin filament turnover and predicts that growing filaments reach a stable dynamical regime, independent from the concentration of the different factors modulating the reaction rates (formin, profilin, ADF/cofilin) or the concentration of available actin monomers ready to polymerize. This may explain how different cell types or organisms use the same battery of proteins (i.e., formin, profilin, ADF/cofilin) with similar but fluctuating activities and concentrations to control actin filaments length, chemical composition, and turnover.

In addition, we proposed that the activity of ADF/cofilin in vivo is modulated by a gradient of spatial affinity. At the growing barbed end of actin filaments, which is likely located near a membrane structure, the high apparent dissociation equilibrium constant $K_{D,Spatial}$ limits ADF/cofilin activity. As we moved along the growing actin filament from the barbed end to the pointed end, the $K_{D,Spatial}$ decreased progressively to reach a low value $\sim 2 \mu\text{m}$ away from the growing barbed end (Fig. 4, A and B). Therefore, the molar ratio of ADF/cofilin along growing actin filaments derived from our analysis (Fig. 4 A) is an effective way to predict the number of available sites for the fixation of ADF/cofilin. This predicted gradient of ADF/cofilin binding sites based on the variation of $K_{D,Spatial}$ agrees with the observed localization of ADF/cofilin activity in vivo (27,28).

APPENDIX

Distribution of filament length and subunit residence time

Model variables and parameters

Parameter or variable	Dimension	Definition
x	L	Monomer position along the filament (origin at the barbed end)
t	T	Time
L	L	Filament length
T	T	Subunit residence time in a filament
[Actin]	μM	Concentration of actin monomers (assumed constant and homogeneous)
[ADF/cofilin]	μM	Concentration of ADF/cofilin (assumed constant and homogeneous)
$F(L)$	L^{-1}	Distribution of filaments of length L
$G(T)$	T^{-1}	Distribution of subunits of age T in the filament
$\nu = \frac{(k_{on,B} + k_{on,P})}{[Actin] - (k_{off,B} + k_{off,P})}$	T^{-1}	Global (de)polymerization rate
δ	L	Step change in filament length associated with polymerization of one monomer
r_1	T^{-1}	P _i dissociation rate (F-ATP to F-ADP-P _i)
r_2	T^{-1}	P _i release rate (F-ADP-P _i to F-ADP)
r_3	T^{-1}	Fixation rate of the first ADF/cofilin molecule on F-ADP
r_4	T^{-1}	Cooperative-fixation rate of the second ADF/cofilin molecule on F-ADP-ADF
r_5	T^{-1}	Severing rate of F-ADP-(ADF) ₂
$P(L)$	L^{-1}	Filament-severing probability at a distance L from position $x = 0$ (position of the filament barbed end)

Modeling hypothesis and equation

We combined the contribution of both barbed and pointed ends to filament dynamics into a unique term, denoted ν :

$$\nu = (k_{on,B} + k_{on,P})[Actin] - (k_{off,B} + k_{off,P})$$

Note that ν can be modulated by actin-binding proteins or the concentration of available actin monomers. For example, in the presence of profilin, the polymerization at the pointed end vanishes (i.e., $k_{on,P} = 0$); another simplification occurs if we consider formin-driven polymerization, for which one has $k_{on,B}[Actin] \gg (k_{off,P} + k_{off,B})$. Here, we assume that a), free actin monomers are continuously supplied to the reaction system, and b), the polymerization rate at the pointed end is negligible.

Let x be the position of a subunit along the filament. By convention, the barbed end is at $x = 0$ so that the position of a subunit in the filament also indicates the distance it traveled since its addition to the filament at the barbed end. The number of filaments of length L at time t , denoted $F(L,t)$, is the solution of an integrodifferential equation (29):

$$\frac{\partial F(L,t)}{\partial t} = \underbrace{\nu(F(L-\delta,t) - F(L,t))}_{(1)} + \underbrace{r_5 P(L) \int_L^\infty F(s,t) ds}_{(2)} - \underbrace{r_5 F(L,t) \int_0^L P(s) ds}_{(3)}$$

The first term (1) represents filament elongation (or shortening, if $v < 0$) by monomer addition at the filament barbed end ($x = 0$). The second term (2) represents the fragmentation by severing the filament at position L . The last term (3) gives the removal of a filament of length L by cutting anywhere between $x = 0$ and L . Because of the modification of the nucleotide bound to actin subunits (due to ATP hydrolysis and phosphate release), the function P changes in time. However, Monte Carlo simulations showed that the spatial distribution of subunit types along the filament is rapidly achieved at steady state (see Supplementary Material Fig. S2); hence, we are justified in using a time-independent expression for P .

Since a typical filament length, L , is much larger than δ , one uses the Taylor expansion of the first term to obtain

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

At steady state, we have

$$0 = -\nu\delta \frac{\partial F(L)}{\partial L} + r_5 P(L) \int_L^\infty F(s) ds - r_5 F(L) \int_0^L P(s) ds.$$

Introducing an auxiliary variable $Z(L) = \int_L^\infty F(s) ds$, the final equation reads

$$\nu\delta \frac{\partial^2 Z(L)}{\partial L^2} = r_5 P(L) Z(L) - r_5 \frac{\partial Z(L)}{\partial L} \times \int_0^L P(s) ds = -r_5 \frac{\partial}{\partial L} \left(Z(L) \int_0^L P(s) ds \right).$$

By direct integration, and using the conditions $Z(\infty) = 0$ and $Z(0) = 1$, one gets

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

from which we obtain the number of filaments of length L at steady state

$$F(L) = \frac{r_5}{\nu\delta} \left(\int_0^L P(s) ds\right) \exp\left(-\frac{r_5}{\nu\delta} \int_0^L \left(\int_0^s P(s) ds\right) dS\right). \quad (\text{A1})$$

This result is analogous to Eq. 8 in Edelman-Keshet and Ermentrout (29).

Model for the severing probability function P

Let

$$\{S_1(t), S_2(t), S_3(t), S_4(t), S_5(t)\}$$

be the probability distribution that a given subunit is in one of the states listed below

$$\{\text{F-ATP}, \text{F-ADP-P}_i, \text{F-ADP}, \text{F-ADP-ADF}, \text{F-ADP-(ADF)}_2\}$$

at time t , given that it entered the filament, as F-ATP, at time $t = 0$. Note that the cooperative binding of a second ADF/cofilin molecule is coded into the state F-ADP-(ADF)₂, which actually represents pairs of actin subunits decorated by ADF/cofilin. Because of probability conservation

$$S_1(t) + S_2(t) + S_3(t) + S_4(t) + S_5(t) = 1,$$

we are left with a system of four linear differential equations

$$\begin{aligned} \frac{dS_2}{dt} &= r_1 - (r_1 + r_2)S_2 - r_1S_3 - r_1S_4 - r_1S_5 \\ \frac{dS_3}{dt} &= r_2S_2 - r_3S_3 \\ \frac{dS_4}{dt} &= r_3S_3 - r_4S_4 \\ \frac{dS_5}{dt} &= r_4S_4 \end{aligned} \quad (\text{A2})$$

with initial conditions

$$S_{2-5}(0) = 0,$$

and $r_1 = k_{\text{ATP-hydrolysis}}$, $r_2 = k_{\text{Pi-release}}$, $r_3 = (k_{\text{on,ADF}}[\text{ADF}])$, $r_4 = (k_{\text{coop,ADF}}[\text{ADF}])$, $r_5 = k_{\text{severing}}$. Note that in Eq. A2, we neglect ADF/cofilin dissociation from actin filaments. The probability that a subunit is in the state F-ADP-ADF₂ at time t is obtained as the solution of Eq. A2:

$$S_5(t) = 1 + \sum_{i=1}^4 K_i \exp(-r_i t), \quad (\text{A3})$$

with

$$K_i = -\left(\prod_{j=1, j \neq i}^4 r_j\right) \left(\prod_{j=1, j \neq i}^4 (r_j - r_i)\right)^{-1}.$$

To determine the severing probability, P , we need a connection between the actin subunit age, t , and its position in the filament, x . If we neglect stochastic fluctuations of the actual (de)polymerization rate, the distance travelled by an actin subunit during time t is

$$x = \nu\delta t. \quad (\text{A4})$$

In consequence, the probability that a filament is severed in the interval $[x, x+\delta]$ is

$$P(x) = \frac{1}{\delta} S_5\left(\frac{x}{\nu\delta}\right) = \frac{1}{\delta} \left(1 + \sum_{i=1}^4 K_i \exp\left(-\frac{r_i}{\nu\delta} x\right)\right).$$

The prefactor δ^{-1} ensures normalization so that P is the probability density for severing. Using this expression for P and Eq. A1, the steady-state distribution for filament length reads

$$F(L) = \left(\frac{r_5}{\nu\delta}\right) P_1(L) \exp\left(-\left(\frac{r_5}{\nu\delta}\right) P_2(L)\right) \quad (\text{A5})$$

with

$$P_1(L) = \int_0^L P(x) dx = \frac{1}{\delta} \left(L + \sum_{i=1}^4 K_i \left(\frac{\nu\delta}{r_i}\right) - \sum_{i=1}^4 K_i \left(\frac{\nu\delta}{r_i}\right) \exp\left(-\frac{r_i}{\nu\delta} L\right)\right),$$

and

$$P_2(L) = \int_0^L P_1(x) dx = \frac{1}{\delta} \left(\frac{L^2}{2} + L \left(\sum_{i=1}^4 K_i \left(\frac{\nu\delta}{r_i}\right)\right) - \sum_{i=1}^4 K_i \left(\frac{\nu\delta}{r_i}\right)^2 + \sum_{i=1}^4 K_i \left(\frac{\nu\delta}{r_i}\right)^2 \exp\left(-\frac{r_i}{\nu\delta} L\right)\right).$$

Distribution of monomer lifetime in filaments

To gain further insight into the distribution of filament age or subunit residence time in filament, we look at the subunit loss after severing. We changed the previous analysis slightly and used a different set of differential equations, including 1), the polymerization step, ν (first equation), and 2), the outflow after severing (last equation, variable $S_6(t)$)

$$\begin{aligned}\frac{dS_1}{dt} &= \nu - r_1 S_1 \\ \frac{dS_2}{dt} &= r_1 S_1 - r_2 S_2 \\ \frac{dS_3}{dt} &= r_2 S_2 - r_3 S_3 \\ \frac{dS_4}{dt} &= r_3 S_3 - r_4 S_4 \\ \frac{dS_5}{dt} &= r_4 S_4 - r_5 S_5 \\ \frac{dS_6}{dt} &= r_5 S_5\end{aligned}\quad (\text{A6})$$

The other variables or parameters are those of Eq. A2. The probability that a monomer incorporated at time $t = 0$ (as F-ATP) leaves the filament at time $T > 0$

$$1 - \exp(-S_6(T)).$$

where $S_6(T)$ represents the probability that a subunit is severed from the filament at time T . The distribution of the residence time of a single subunit in the filament is obtained by differentiating the above expression with respect to T

$$G(T) = r_5 S_5 \exp(-S_6(T)). \quad (\text{A7})$$

Average and variance of the filament length at low reaction rates

From Eqs. A5 or A7, one can obtain the average and variance of the filament length or subunit residence time. Unfortunately, no closed expression for these parameters is possible in the general case. However, in the limit of large polymerization rate, i.e., if

$$\max_{i=1-4} \left(\frac{r_i L}{\nu \delta} \right) \ll 1 \quad (\text{A8})$$

holds, the Taylor expansion of P (Eq. A5) reads

$$P(L) = \frac{r_1 r_2 r_3 r_4}{4!} \left(\frac{L}{\nu \delta} \right)^4 + O \left(\left(\max_{i=1-4} \left(\frac{r_i L}{\nu \delta} \right) \right)^5 \right).$$

Therefore, we get the filament length distribution

$$\begin{aligned}F(L) &= \frac{1}{5!} \frac{1}{\delta} \left(\frac{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5}{\nu^5} \right) \left(\frac{L}{\delta} \right)^5 \\ &\times \exp \left(-\frac{1}{6!} \left(\frac{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5}{\nu^5} \right) \left(\frac{L}{\delta} \right)^6 \right),\end{aligned}\quad (\text{A9})$$

to which corresponds an average filament length

$$\begin{aligned}\langle L \rangle &= \int_0^\infty L F(L) dL = c_1 \delta \left(\frac{\nu^5}{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5} \right)^{1/6}, \\ c_1 &= \left(\pi (2)^{2/3} (3)^{-2/3} 5^{1/6} \Gamma \left(\frac{5}{6} \right)^{-1} \right) \approx 2.78 \dots,\end{aligned}\quad (\text{A10})$$

and variance

$$\begin{aligned}\langle \Delta L^2 \rangle &= \int_0^\infty L^2 F(L) dL - \langle L \rangle^2 = c_2 \delta^2 \left(\frac{\nu^5}{r_1 r_2 r_3 r_4 r_5} \right)^{1/3}, \\ c_2 &= \frac{4\pi}{27} (10)^{1/3} \Gamma \left(\frac{2}{3} \right)^{-4} \left((2)^{1/3} (3)^{2/3} \pi^2 - (3)^{13/6} \Gamma \left(\frac{2}{3} \right)^3 \right) \\ &\approx .290 \dots\end{aligned}\quad (\text{A11})$$

Using Eq. A7, and the condition (Eq. A8) to simplify the expression of $S_6(t)$ in Eq. A6, we get the average and variance of the subunit residence time:

$$\begin{aligned}\langle T \rangle &= c_1 (r_1 r_2 r_3 r_4 r_5 \nu)^{-1/6}, \\ \langle \Delta T^2 \rangle &= c_2 (r_1 r_2 r_3 r_4 r_5 \nu)^{-1/3}.\end{aligned}\quad (\text{A12})$$

where c_1 and c_2 are given by Eqs. A10 and A11.

Equations A9–A12 have important consequences that characterize the dynamics of actin filaments subjected to ADF/cofilin severing. First, the ratio standard deviation to average length (respectively subunit residence time) is independent of the kinetic parameters r_{1-5} , ν , or δ :

$$\frac{\sqrt{\langle \Delta L^2 \rangle}}{\langle L \rangle} = \frac{\sqrt{\langle \Delta T^2 \rangle}}{\langle T \rangle} = \frac{\sqrt{c_2}}{c_1} \approx \frac{\sqrt{.290 \dots}}{2.78 \dots} \approx .194 \dots \approx 20\%.\quad (\text{A13})$$

Second, the control of the average filament length by actin scales as

$$\frac{\langle L \rangle}{\langle L_0 \rangle} = \left(\frac{\nu}{\nu_0} \right)^{5/6}.$$

where ν and ν_0 correspond to two different polymerization rates (e.g., two different actin monomer concentrations). In the presence of a large excess of actin monomers or rapid polymerization (e.g., with formins (30,31)), ν is approximately proportional to the concentration of actin monomers. Therefore, the average filament length can be expressed directly as

$$\frac{\langle L \rangle}{\langle L_0 \rangle} = \left(\frac{[\text{Actin}]}{[\text{Actin}]_0} \right)^{5/6}.\quad (\text{A14})$$

The control exerted by ADF/cofilin through rates $r_{3,4}$ gives a different scaling:

$$\frac{\langle L \rangle}{\langle L_0 \rangle} = \left(\frac{(r_3 r_4)_0}{(r_3 r_4)} \right)^{1/6} = \left(\frac{[\text{ADF/cofilin}]_0}{[\text{ADF/cofilin}]} \right)^{1/3},\quad (\text{A15})$$

where (r_3, r_4) and $(r_{3,0}, r_{4,0})$ are associated to two different ADF/cofilin concentrations. From Eq. A12, we see that the average residence time for a single subunit in the filament scales as

$$\frac{\langle T \rangle}{\langle T_0 \rangle} = \left(\frac{\nu_0}{\nu} \right)^{1/6} = \left(\frac{[\text{Actin}]_0}{[\text{Actin}]} \right)^{1/6}.\quad (\text{A16})$$

Conversely, two different levels of ADF/cofilin (at constant actin monomer concentration) give an equation similar to Eq. A15:

$$\frac{\langle T \rangle}{\langle T_0 \rangle} = \left(\frac{(r_3 r_4)_0}{(r_3 r_4)} \right)^{1/6} = \left(\frac{[\text{ADF/cofilin}]_0}{[\text{ADF/cofilin}]} \right)^{1/3}.\quad (\text{A17})$$

SUPPLEMENTARY MATERIAL

To view all of the supplementary files associated with this article, visit www.biophysj.org.

The authors thank Dr. Christopher J. Staiger and Dr. Rajaa Boujemaa-Paterski for their help in handling the manuscript and fruitful discussions.

Financial support was provided by the Agence Nationale de la Recherche (Programme physique et chimie du vivant, Mac-Mol-Actin project) and the Rhône-Alpes Institute of Complex Systems (IXXI), France.

REFERENCES

- Pollard, T. D., and G. G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453–465.
- Wang, Y. L. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* 101:597–602.
- Theriot, J. A., and T. J. Mitchison. 1991. Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature*. 352:126–131.
- Medeiros, N. A., D. T. Burnette, and P. Forscher. 2006. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat. Cell Biol.* 8:215–226.
- Pollard, T. D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103:2747–2754.
- Michelot, A., J. Berro, C. Guerin, R. Boujemaa-Paterski, C. J. Staiger, J. L. Martiel, and L. Blanchoin. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17:825–833.
- Quinlan, M. E., J. E. Heuser, E. Kerkhoff, and R. D. Mullins. 2005. Drosophila spire is an actin nucleation factor. *Nature*. 433:382–388.
- Pollard, T. D., L. Blanchoin, and R. D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29:545–576.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R. M. Golsteyn, M. F. Carlier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature*. 417:308–311.
- Loisel, T. P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*. 401:613–616.
- Maciver, S. K., H. G. Zot, and T. D. Pollard. 1991. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J. Cell Biol.* 115:1611–1620.
- Andrianantoandro, E., and T. D. Pollard. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell.* 24:13–23.
- Moriyama, K., and I. Yahara. 1999. Two activities of cofilin, severing and accelerating directional depolymerization of actin filaments, are affected differentially by mutations around the actin-binding helix. *EMBO J.* 18:6752–6761.
- Carlier, M. F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. X. Xia, Y. Hong, N. H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J. Cell Biol.* 136:1307–1322.
- Blanchoin, L., and T. D. Pollard. 2002. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*. 41:597–602.
- Blanchoin, L., and T. D. Pollard. 1999. Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274:15538–15546.
- Didry, D., M. F. Carlier, and D. Pantaloni. 1998. Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover. *J. Biol. Chem.* 273:25602–25611.
- Prochniewicz, E., N. Janson, D. D. Thomas, and E. M. De la Cruz. 2005. Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J. Mol. Biol.* 353:990–1000.
- Stukalin, E. B., and A. B. Kolomeisky. 2006. ATP hydrolysis stimulates large length fluctuations in single actin filaments. *Biophys. J.* 90:2673–2685.
- Vavylonis, D., Q. Yang, and B. O'Shaughnessy. 2005. Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 102:8543–8548.
- Fujiwara, I., S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. Ishiwata. 2002. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat. Cell Biol.* 4:666–673.
- Kuhn, J. R., and T. D. Pollard. 2005. Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 88:1387–1402.
- Gillespie, D. T. 1997. Exact stochastic simulation of coupled reactions. *J. Phys. Chem.* 81:2340–2361.
- Gillespie, D. T. 2007. Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 58:35–55.
- De La Cruz, E. M. 2005. Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346:557–564.
- Pavlov, D., A. Muhrad, J. Cooper, M. Wear, and E. Reisler. 2007. Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* 365:1350–1358.
- Svitkina, T. M., and G. G. Borisy. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145:1009–1026.
- Okreglak, V., and D. G. Drubin. 2007. Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* 178:1251–1264.
- Edelstein-Keshet, L., and G. B. Ermentrout. 2001. A model for actin-filament length distribution in a lamellipod. *J. Math. Biol.* 43:325–355.
- Michelot, A., E. Derivery, R. Paterski-Boujemaa, C. Guerin, S. Huang, F. Parcy, C. J. Staiger, and L. Blanchoin. 2006. A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr. Biol.* 16:1924–1930.
- Kovar, D. R., E. S. Harris, R. Mahaffy, H. N. Higgs, and T. D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*. 124:423–435.
- Melki, R., S. Fievez, and M. F. Carlier. 1996. Continuous monitoring of P_i release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry*. 35:12038–12045.

Chapitre 6

Quantification de l'association d'ADF/Cofiline sur des filaments d'actine en croissance

1 Problématique

Les nombreuses études *in vitro* dédiées à l'ADF/Cofiline mettent en jeu des filaments d'actine préformés (Maciver et al., 1991; De La Cruz, 2005; Andrianantoandro and Pollard, 2006). Cette approche pose problème, car l'activité de l'ADF/Cofiline est liée à l'état du nucléotide. Or, ces filaments préformés sont constitués de sous-unités d'actine-ADP et ne sont, la plupart du temps, plus en croissance (la concentration d'actine monomérique étant alors proche de la concentration critique).

Nous présentons dans ce chapitre une application de notre modèle pour la dynamique du filament à des données expérimentales obtenues par Cristian Suarez (équipe de Laurent Blanchoin, CEA/iRTSV/LPCV, Grenoble). Ces données reposent sur le marquage *in vitro*, non seulement des filaments d'actine, mais aussi de l'ADF/Cofiline : il est alors possible d'observer, par microscopie à onde évanescente (TIRFM), la fixation de l'ADF/Cofiline sur des filaments en croissance et non préformés. Ce système nous donne donc accès à la localisation de l'ADF/Cofiline sur des filaments dynamique, une information cruciale pour :

- déterminer l'état du nucléotide sur des filaments en élongation : l'affinité de l'ADF/Cofiline pour l'actine-ADP en fait un marqueur naturel du nucléotide. Nous allons donc être en mesure d'identifier les parties du filaments qui sont décorés par l'ADF/Cofiline et de valider/contredire les prédictions faites dans le chapitre précédent. Le $K_{D,spatial}$ défini à cette occasion devrait se traduire par une section à l'extrémité barbée du filament dépourvue d'ADF/Cofiline (section que nous appellerons "cap", comme cela est fait dans la littérature).
- la localisation de la fragmentation : les événements de fragmentation pourront être localisés et leurs emplacements reliés à la présence/absence d'ADF/Cofiline. La fragmentation a-t-elle lieu directement dans les parties décorées ? Dans les parties non-décorées ? Aux interfaces ?

Nous commencerons par présenter brièvement les données expérimentales et l'adaptation de notre modèle à ces données. Puis nous présenterons les résultats principaux qui

concernent la mise en évidence du "cap" à l'extrémité barbée des filaments et l'étude des événements de fragmentation. Précisons dès à présent que notre contribution dans cette partie porte à la fois sur l'analyse "graphique" des données expérimentales (mesures de longueur, quantification des fluorescences) et sur les aspects de modélisation (application du modèle cinétique aux données mesurées).

2 Association d'ADF/Cofiline sur des filaments en croissance

2.1 Principe général

L'ADF/Cofiline utilisée dans ce chapitre provient de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une mutation de cette ADF/Cofiline permet d'y associer un fluorophore, l'Alexa-488. Les filaments d'actine sont marqués par un autre fluorophore, l'Alexa-568. Les protéines marquées ont été testées et sont totalement fonctionnelles.

En présence de cette ADF/Cofiline, les filaments d'actine polymérisent normalement et sont progressivement décorés. Les images de microscopie à onde évanescente montrent des filaments en croissance qui sont progressivement décorés par des "spots", puis par de larges bandes d'ADF/Cofiline que nous appellerons "Stretches" (figure 6.1).

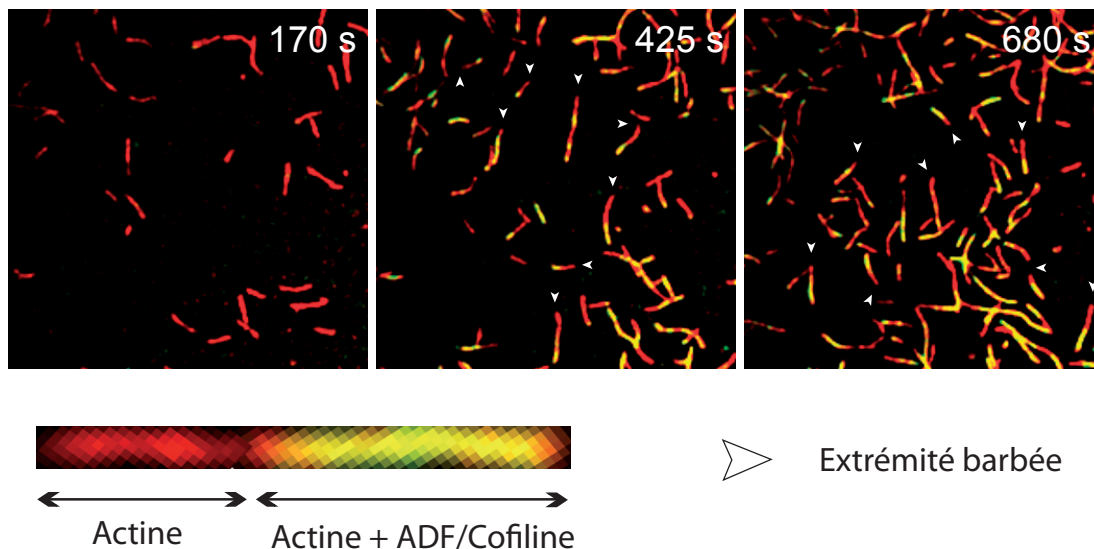


FIGURE 6.1 – Association d'ADF/Cofiline marquée sur des filaments d'actine en croissance. Images de microscopie à onde évanescente de filaments d'actine (en rouge) à trois temps différents. L'ADF/Cofiline marquée (en vert) s'associe progressivement sur les filaments dont les extrémités barbées sont indiquées par des flèches blanches. Conditions : filaments d'actine marqués par Alexa-568, concentration monomérique fixée à $0.8 \mu M$. ADF/Cofiline marquée par Alexa-488, concentration fixée à $0.92 \mu M$. Images obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV)

2.2 Conditions de l'expérience

Ces expériences se font dans des conditions particulières qu'il convient de résumer ici :

- Les filaments étudiés ici se trouvent en régime dynamique. Contrairement à nombre de publications dans lesquelles la décoration d'ADF/cofiline est étudiée sur des filaments préformés, ces filaments d'actine évoluent hors concentration critique. Ils

s'allongent par polymérisation et nous verrons que cela change considérablement la dynamique observée des filaments, ainsi que celle de fragmentation.

- Les filaments sont libres de toute contrainte mécanique. Leurs extrémités ne sont pas attachées à un quelconque obstacle et ils se déforment au gré de l'agitation thermique. Notons toutefois que la surface est traitée avec de la méthylcellulose, ce qui maintient les filaments dans le champ de l'observation.

3 Adaptation du modèle au système biologique

3.1 Croissance des filaments d'actine

Notre modèle pour la dynamique des filaments d'actine présenté dans le chapitre 4 est particulièrement adapté à l'étude de ces données de microscopie à onde évanescente. Ce modèle permet de représenter fidèlement l'état de chacune des sous-unités qui composent un filament en croissance. Nous pouvons donc accéder au nucléotide et déterminer quelles sous-unités sont décorées par l'ADF/Cofiline. Cette information peut être reliée et comparée aux mesures de fluorescence effectuées sur les images TIRFM.

Les tables 6.1 et 6.2 contiennent un récapitulatif des constantes cinétiques employées dans nos simulations.

Réactions	Constante cinétique	Notation	Référence
Polymérisation G-ATP, extrémité barbée	$11.6 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{on,B}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, extrémité barbée	$1.4 s^{-1}$	$k_{off,B}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, extrémité barbée	$7.2 s^{-1}$	$k_{off,B}$	[1]
Polymérisation G-ATP, extrémité pointue	$1.3 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{on,P}$	[1]
Dépolymérisation G-ATP, extrémité pointue	$0.8 s^{-1}$	$k_{off,P}$	[1]
Dépolymérisation G-ADP, extrémité pointue	$0.3 s^{-1}$	$k_{off,P}$	[1]
Hydrolyse F-ATP en F-ADP-Pi	$0.35 s^{-1}$	$k_{ATP-hydrolysis}$	[2]
Dissociation du phosphate inorganique (F-ADP-Pi en F-ADP)	$0.0019 s^{-1}$	$k_{Pi-release}$	[3]

TABLE 6.1 – **Constantes cinétiques du filament d'actine** valeurs tirées de Pollard (1986) [1]; Blanchoin and Pollard (2002) [2]; Melki et al. (1996) [3].

3.2 Action de l'ADF/Cofiline de levure sur les filaments en croissance

Contrairement au chapitre 5, nous ne modélisons pas l'actophorine mais une ADF/Cofiline de levure. L'association de l'ADF/Cofiline de levure sur l'actine musculaire est supposée non coopérative (Bobkov et al., 2002). Les mesures de constante de dissociation effectuées (données non présentées ici) dans notre cas suggère une ADF/Cofiline très faiblement coopérative avec un K_d apparent de $0.35 \mu M$ que nous utilisons ici. Nous faisons cette fois-ci

la supposition que l'accélération dans la dissociation du phosphate n'a pas une portée infinie. La table 6.2 présente les constantes cinétiques liées à l'ADF/Cofiline qui nous ont permis d'accorder au mieux le modèle aux données.

Réactions ou constantes	Valeur	Notation	Référence
Accélération de la dissociation du phosphate	7	$K_{release}$	[1]
Portée pour l'accélération de la dissociation	10	$Range_{release}$	[1]
Association ADF/Cofiline sur F-ADP	$0.03 \mu M^{-1} s^{-1}$	$k_{on,ADF}$	[1]
Dissociation d'ADF/Cofiline sur F-ADP	$0.01 s^{-1}$	$k_{off,ADF}$	[1]
Fragmentation	$0.012 s^{-1}$	$k_{severing}$	[2]

TABLE 6.2 – **Constantes cinétiques pour l'action d'ADF/Cofiline.** Références : [1] Déterminées dans cette étude. [2] Blanchoin and Pollard (1999).

4 L'ADF/Cofiline comme marqueur du nucléotide

4.1 Analyse des données de microscopie par ondes évanescentes

Les images TIRFM permettent de situer l'extrémité barbée des filaments et de quantifier la fluorescence d'ADF/Cofiline le long du filament (figure 6.2, image TIRFM en A). Cette fluorescence (en vert) est comparée à la fluorescence du filament (en rouge) (figure 6.2, linescan en B). Cette quantification met clairement en évidence une zone où la fluorescence d'ADF/Cofiline est absente : nous appelons cette section du filament "cap", car nous soupçonnons que cette absence est due à l'état du nucléotide qui limite l'association de l'ADF/Cofiline sur le cap d'actine-ATP/ADP-Pi à l'extrémité barbée du filament.

Ce cap est mesuré pour une population complète de filaments, produisant ainsi une distribution (figure 6.2, C). De cette distribution, nous pouvons extraire la moyenne et la variance empirique de ce cap. Notons que cette distribution varie fortement en fonction de certains paramètres : à concentration d'actine fixée ($[Gactine] = 0.8 \mu M$), ce cap passe de plus de $5 \mu m$ lorsque $[ADF/Cofiline] = 0.35 \mu M$ à moins de $2 \mu m$ lorsque $[ADF/Cofiline] = 0.92 \mu M$.

4.2 Extraction de la taille du cap ATP/ADP-Pi par le modèle stochastique

Notre hypothèse principale pour expliquer la présence de ce cap repose sur l'affinité sélective de l'ADF/Cofiline : l'affinité de la protéine est très forte pour les sous-unités d'actine-ADP (éloignées de l'extrémité barbée) et très faible pour les sous-unités d'actine ATP/ADP-Pi (majoritaires à l'extrémité barbée). Le nucléotide serait donc l'élément qui protège le bout barbé du filament, comme prédit dans le chapitre 5 avec la notion de $K_{D,spatial}$.

Cette hypothèse permet d'expliquer la diminution observée de ce cap avec les valeurs croissantes de la concentration d'ADF/Cofiline : le cap résulte d'une balance entre l'élongation du filament, qui ajoute des monomères d'actine-ATP à l'extrémité barbée, et la

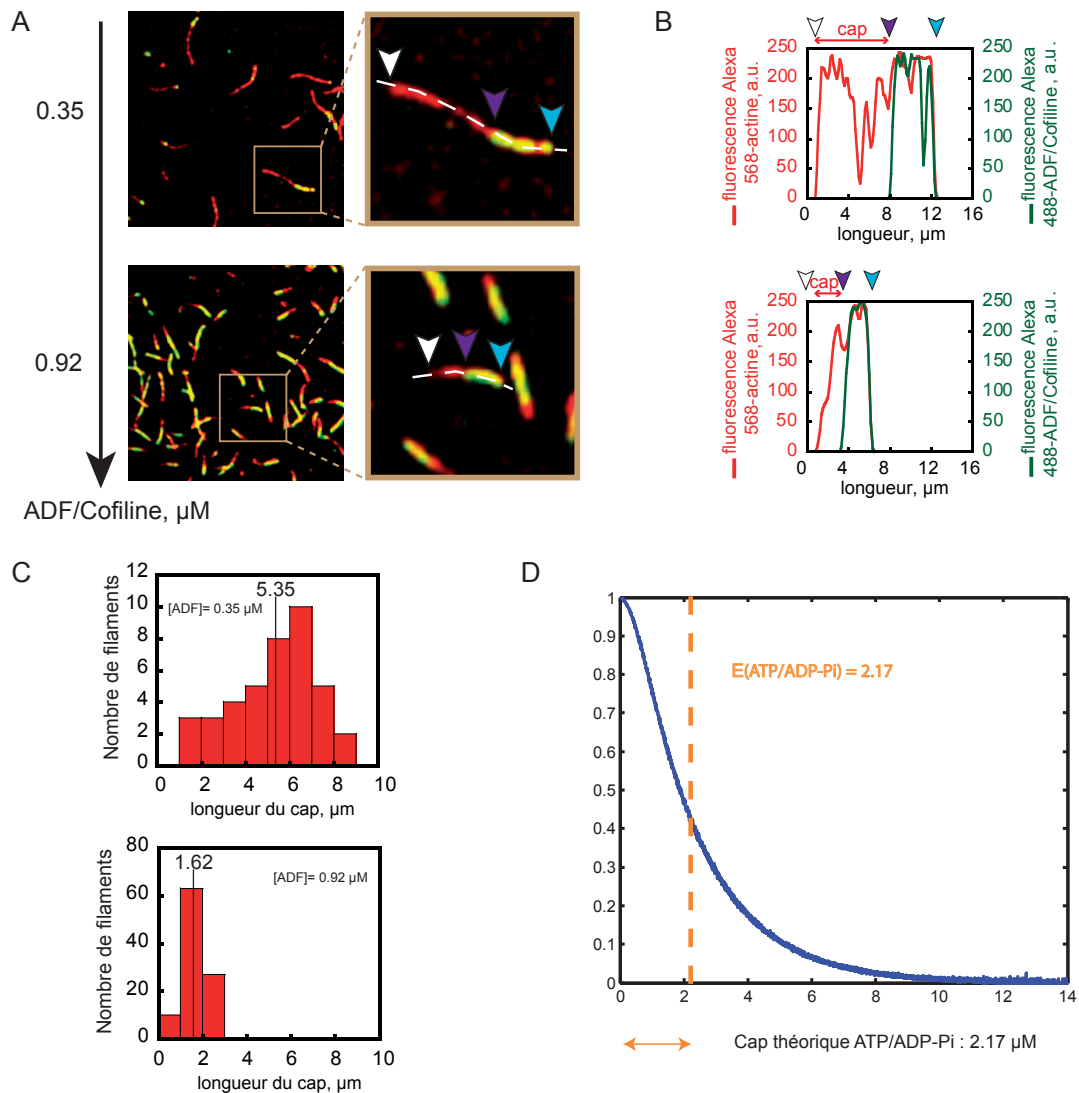


FIGURE 6.2 – Mesure de cap sur filaments en croissance. (A) Images TIRFM pour deux concentrations d'ADF/Cofiline : $[ADF/Cofiline] = 0.35 \mu\text{M}$ (ligne du haut), $[ADF/Cofiline] = 0.92 \mu\text{M}$ (ligne du bas) avec un agrandissement sur un filament typique. (B) La fluorescence en rouge (actine) et en vert (ADF/Cofiline) est analysée le long de la ligne en pointillés blancs : le cap d'actine-ATP/ADP-Pi apparaît clairement entre les flèches blanches (extrémité barbée) et mauves. La flèche bleue représente l'extrémité pointue des filaments. (C) Les mesures en (B) permettent d'extraire la taille du cap. Ces mesures sont effectuées pour une population complète de filaments, produisant deux histogrammes : $[ADF/Cofiline] = 0.35 \mu\text{M}$ (haut), $[ADF/Cofiline] = 0.92 \mu\text{M}$ (bas). (D) Exemple d'extraction du cap ATP/ADP-Pi à l'aide du modèle : des simulations sur 5000 filaments permettent d'extraire la probabilité empirique pour une sous-unité d'être dans l'état ATP/ADP-Pi en fonction de la distance à l'extrémité barbée. Nous prenons comme mesure du cap l'espérance de cette probabilité. Conditions : $[Gactine] = 0.8 \mu\text{M}$, $[ADF/Cofiline] = 0.6 \mu\text{M}$. Données expérimentales en (A), (B) et (C) obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV)

dissociation du phosphate inorganique. Plus l'ADF/Cofiline est présente, plus son association sur le filament est rapide. Or l'ADF/Cofiline accélérant la dissociation du phosphate, le cap ATP/ADP-Pi s'en trouve naturellement réduit. Cette hypothèse est difficile à valider par la simple expérience, car le nucléotide n'est pas visible sur le filament. C'est dans ce contexte que notre modèle stochastique révèle son utilité : il permet d'extraire l'état du

nucléotide en fonction de la distance à l'extrémité barbée, tout au long de la croissance du filament.

Contrairement aux images de microscopie, le cap ATP/ADP-Pi dans un filament n'a pas de véritable délimitation franche, sauf à considérer que ce cap s'arrête à la première sous-unité d'actine-ADP. Cette définition est trop drastique et surtout ne peut être mise en relation avec les données expérimentales : la résolution étant de l'ordre de $0.4 \mu m$, il ne nous est pas possible de distinguer avec précision la fluorescence de chaque sous-unité individuelle pour la comparer aux simulations du modèle. Pour extraire le cap d'actine ATP/ADP-Pi de notre modèle, nous simulons un grand nombre de filaments (≈ 5000) pour déterminer la probabilité empirique d'une sous-unité d'être dans l'état ATP ou ADP-Pi (figure 6.2, D). Cette probabilité démarre à 1 au niveau de l'extrémité barbée puis chute progressivement vers 0 à mesure que l'on s'en éloigne. Une fois normalisée (afin de manipuler une densité de probabilité), nous prenons comme mesure du cap l'espérance de cette densité.

$$Length_{Cap \text{ ATP/ADP-Pi}} = E(P_{\text{empirique, ATP/ADP-Pi}}(X))$$

Avec $P_{\text{empirique, ATP/ADP-Pi}}(X)$ la probabilité pour une sous-unité ATP/ADP-Pi d'être à une distance X de l'extrémité barbée. Ce cap extrait des simulations peut être comparé à celui mesuré expérimentalement.

4.3 Dépendance de la taille du cap aux paramètres de l'expérience

Le cap ATP/ADP-Pi est directement dépendant de la balance entre la vitesse de polymérisation et celle d'association d'ADF/Cofiline sur le filament. Pour mettre en évidence cette dépendance, nous présentons deux groupes d'expériences :

- Fixer la concentration de G-actine et faire varier celle d'ADF/Cofiline.
- Fixer la concentration d'ADF/Cofiline et faire varier celle de G-actine.

Dépendance à la concentration d'ADF/Cofiline

Les expérimentations, réalisées pour cinq concentrations différentes d'ADF/Cofiline, montrent une forte diminution de la taille du cap qui se stabilise aux alentours de $1.7 \mu m$ (figure 6.5(a), points en rouge).

Notez bien que le taux "classique" de dissociation du phosphate (en absence d'ADF/Cofiline) est de l'ordre de $0.002 s^{-1}$. Il faut donc en moyenne plusieurs minutes pour libérer le phosphate inorganique du filament. Sachant que dans le même temps, ces filaments s'allongent à une vitesse supérieure à $1 \mu m \text{ min}^{-1}$, nous évaluons leur cap ATP/ADP-Pi en absence d'ADF/Cofiline aux alentours de $9 \mu m$. En présence d'ADF/Cofiline, ces images TIRFM montrent des stretches présents à seulement quelques μm de l'extrémité barbée, rappelant ainsi que ce cap est drastiquement réduit par l'ADF/Cofiline.

Le modèle stochastique prédit une forte dépendance de la taille du cap non seulement à la concentration d'ADF/Cofiline, mais aussi au paramètre $Range_{Release}$ (chapitre 4, figure 4.3) qui détermine la portée de l'accélération dans la dissociation du phosphate inorganique. Nous présentons quatre courbes différentes, pour quatre valeurs : 1, 3, 10 et 100 (figure 6.5(a)). Comme on peut le voir, les courbes fournies par le modèle s'accordent avec les données expérimentales pour les valeurs de $Range_{Release}$ comprises entre 10 et 100.

Nous en concluons que cette accélération est nécessaire, et que sa portée est d'au moins 10 sous-unités (à droite et à gauche) sur le filament.

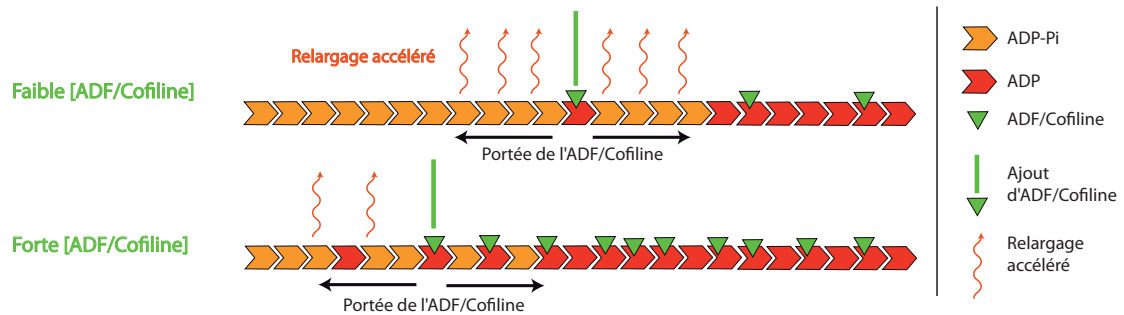


FIGURE 6.3 – **Effet de la concentration d'ADF/Cofiline sur le cap ATP/ADP-Pi.** Nous représentons ici l'effet d'une molécule d'ADF/Cofiline ajoutée sur le filament (ligne verticale verte). A faible concentration, les premières molécules d'ADF/Cofiline ont un fort effet sur le cap, accélérant la dissociation du phosphate chez de nombreuses sous-unités (schéma du haut). A mesure que l'on sature le filament (figure du bas), les seules sous-unités ADP-Pi restantes sont celles récemment incorporées sur le filament, le cap atteint donc un plateau stable (figure 6.5(a)).

La décroissance exponentielle observée est directement liée à l'action de l'ADF/Cofiline sur la dissociation du phosphate. Les premières molécules de Cofiline qui s'associent sur le filament vont accélérer la dissociation du phosphate chez de nombreuses sous-unités (figure 6.3). Mais à mesure que le filament se recouvre d'ADF/Cofiline, les sous-unités ADP sont de moins en moins nombreuses. A forte concentration, toute la partie "ancienne" du filament, du côté de l'extrémité pointue, est recouverte d'ADF/Cofiline (figure 6.3). Seule la polymérisation de nouvelles sous-unités permet de maintenir un cap ATP/ADP-Pi au niveau de l'extrémité barbée.

Dépendance à la concentration de G-actine

Les données expérimentales montrent une dépendance linéaire de la taille du cap ATP/ADP-Pi à la concentration de G-actine (figure 6.5(b), points rouges). Avec une concentration d'ADF/Cofiline de l'ordre du μM , le cap passe de $2.5 \mu m$ pour $[G\text{-actine}] = 1 \mu M$ à $5 \mu m$ pour $[G\text{-actine}] = 2 \mu M$. Cette dépendance linéaire est confirmée par le modèle stochastique (figure 6.5(b), droite noire). La droite obtenue ne croise pas l'axe des abscisse en 0 mais aux alentours de $0.1 \mu M$, ce qui correspond à la concentration critique en dessous de laquelle les filaments ne font que dépolymériser avant de disparaître. Le cap ne peut donc être mesuré dans ce cas précis.

Cette dépendance linéaire s'explique encore une fois par le mode d'action de l'ADF/Cofiline : le cap ATP/ADP-Pi résulte d'une balance entre la polymérisation de nouvelles sous-unités ATP, qui tend à allonger le cap, et la dissociation accélérée du phosphate par l'ADF/Cofiline, qui tend à réduire ce cap (figure 6.4).

Soit $[G]$ la concentration de G-actine et $[C]$ celle d'ADF/Cofiline. Une sous-unité nouvellement polymérisée met en moyenne un temps t_{Cap} à être hydrolysée et à perdre son phosphate sous l'action de l'ADF/Cofiline. Ce temps t_{Cap} dépend donc exclusivement de la concentration d'ADF/Cofiline. Cependant, pendant le temps nécessaire à ces étapes d'hydrolyse et de perte du phosphate, le filament a continué de polymériser à une vitesse v_{Polym} . La sous-unité que nous considérons se trouve donc désormais à une distance $v_{Polym} \cdot t_{Cap}$ de l'extrémité barbée : nous avons donc un cap de longueur $v_{Polym} \cdot t_{Cap}$ en moyenne. Nous faisons maintenant l'approximation que v_{Polym} dépend linéairement de

$[G]$ à travers la relation $v_{Polym} = k_{on,B} [G]$ (en réalité $v_{Polym} = k_{on,B} [G] - k_{off,B}$, mais $k_{off,B} \ll k_{on,B} [G]$). La taille de notre cap est donc :

$$L_{Cap} = k_{on,B} [G] t_{Cap}$$

Si nous multiplions ou divisons $[G]$ par un facteur k , t_{Cap} ne changera pas car t_{Cap} ne dépend que de l'action de l'ADF/Cofiline. La longueur du cap L_{Cap} dépend donc linéairement de $[G]$.

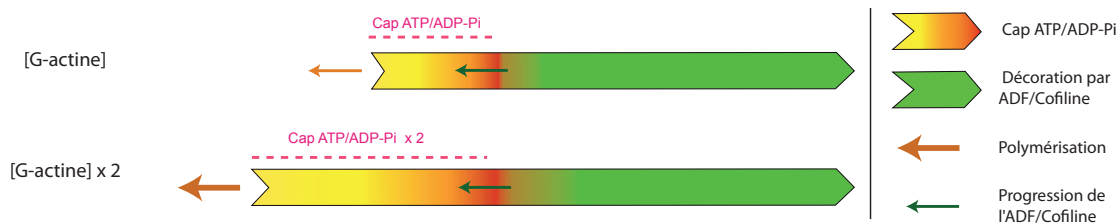


FIGURE 6.4 – Effet de la concentration d'actine sur le cap ATP/ADP-Pi. Nous représentons ici l'effet d'une augmentation de la concentration de G-actine. La taille du cap augmente linéairement avec la concentration de monomères libres en solution.

5 Événements de fragmentation : localisation, influence sur la taille moyenne des filaments

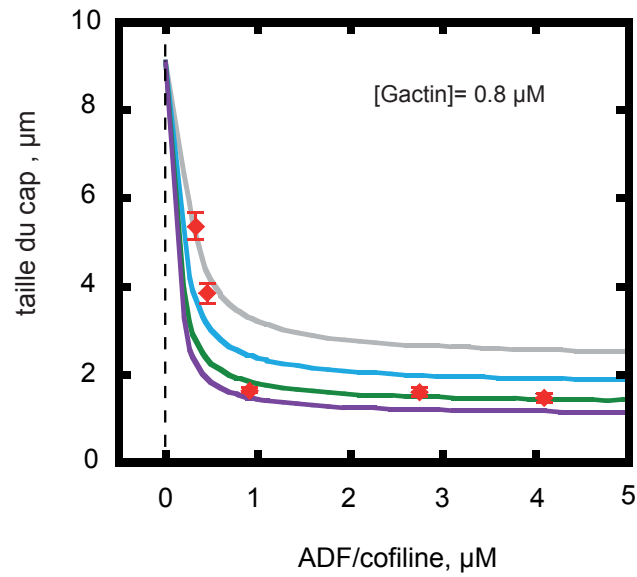
La décoration des filaments par ADF/Cofiline n'est pas la seule information fournie par les images TIRFM. Les événements de fragmentation sont clairement identifiables, pourvu que les fragments libérés soient de taille supérieure à la résolution de l'instrument ($0.4 \mu m$). Les sites de fragmentation peuvent être localisés et leur position reliée à la fluorescence d'ADF/Cofiline, nous permettant de faire le lien entre fragmentation et décoration.

5.1 Localisation des zones de fragmentation

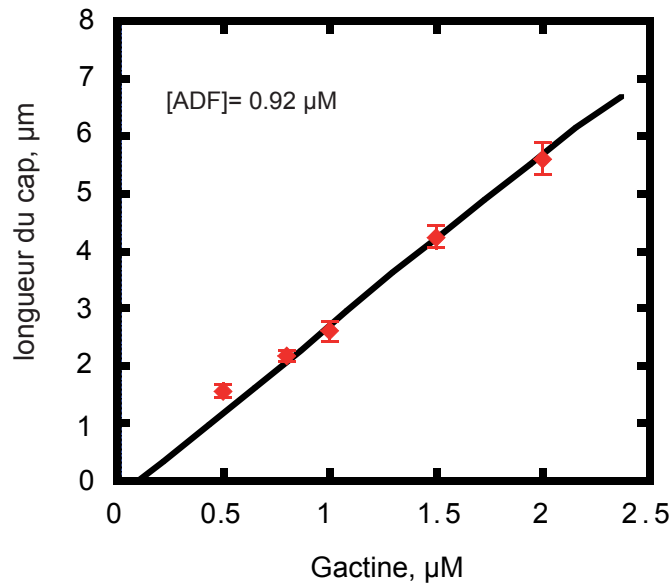
Les événements de fragmentation sont suivis de façon individuelle : chaque événement visible est extrait des images TIRFM puis analysé en quantifiant la fluorescence de l'actine (rouge) et de l'ADF/Cofiline (vert) le long de l'axe du filament (figure 6.6, graphe A, axe du filament en pointillé). Cette analyse permet d'extraire le profil de fluorescence d'ADF/Cofiline et d'y placer le site de fragmentation (figure 6.6, graphe B, flèche bleue).

5.2 Conséquences sur la taille moyenne d'une population de filaments : mise en évidence du contrôle de la longueur par ADF/Cofiline

La fragmentation a un effet important sur la longueur moyenne d'une population complète de filaments. Dans le chapitre 5, nous prédisions l'émergence d'un régime d'équilibre dynamique en présence d'ADF/Cofiline, régime dans lequel la taille des filaments fluctue autour d'une valeur moyenne, la polymérisation étant contre balancée par la fragmentation (chapitre 5, figure 5.4). Les images TIRFM nous permettent de tester cette prédiction en mesurant la taille de filaments au cours du temps. La figure 6.7 présente ces mesures réalisées pour une population de filaments avec une concentration de $0.92 \mu M$ d'ADF/Cofiline. En absence de fragmentation, un filament s'allonge librement et sa taille n'est limitée que



(a) Cap ATP/ADP-Pi : dépendance à la concentration d'ADF/Cofiline



(b) Cap ATP/ADP-Pi : dépendance à la concentration de G-actine

FIGURE 6.5 – **Dépendance du cap ATP/ADP-Pi aux concentrations d'ADF/Cofiline et de G-actine.** (a) A concentration de G-actine fixée ($[G - actine] = 0.8 \mu M$), le cap ATP/ADP-Pi subit une décroissance rapide avant d'atteindre un plateau. Les données expérimentales situent (points rouges) ce plateau à environ $1.7 \mu m$, plateau qui est atteint à partir de $1 \mu M$ d'ADF/Cofiline. Le cap ATP/ADP-Pi prédit par le modèle (lignes pleines) dépend fortement du paramètre $Range_{Release}$, c'est à dire de la portée de l'accélération dans la dissociation du phosphate : 1 (gris), 3 (bleu), 10 (vert) ou 100 (violet). (b) A concentration d'ADF/Cofiline fixée ($[ADF/Cofiline] = 0.92 \mu M$), le cap ATP/ADP-Pi mesuré (points rouges) et prédit par le modèle (droite noire) sont en accord et montrent une dépendance linéaire à la concentration de G-actine. Données expérimentales (points rouges) obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV).

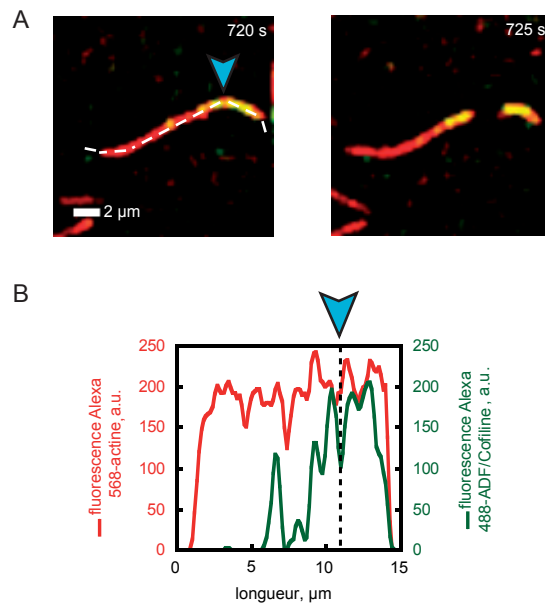


FIGURE 6.6 – **Analyse des événements de fragmentation.** (A) Les événements individuels de fragmentation sont extraits des images TIRFM. Les fluorescences de l'actine (rouge) et d'ADF/Cofiline sont quantifiées le long de l'axe du filament (pointillés blancs). (B) Profils de fluorescence mesurés à partir des images en (A). Le site de fragmentation est replacé sur ces profils (flèche bleue). Images obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV).

par la quantité de monomères disponibles en solution (6.7, graphe A, ligne supérieure) . En présence d'ADF/Cofiline, les événements de fragmentation successifs régulent la taille des polymères (6.7, graphe B) et font émerger une taille moyenne (6.7, graphe C) qui se maintient au cours du temps. Plus important encore, cette taille moyenne est en accord avec celle prédite par nos simulations stochastiques. Ceci vient donc conforter les résultats exposés dans le chapitre 5.

5.3 Efficacité de la fragmentation par ADF/Cofiline

Limite du modèle liée à l'efficacité de la fragmentation

Une des limites de notre modèle stochastique, évoquée en fin du chapitre 4, concerne le traitement de la fragmentation : modélisée comme une réaction, la fragmentation est d'autant plus probable que le filament est décoré de façon importante par l'ADF/Cofiline. Cette approximation est juste pour les concentrations faibles ou intermédiaires d'ADF/Cofiline mais pas pour les concentrations élevées. En effet, les hautes concentrations d'ADF/Cofiline sont connues pour stabiliser le filament d'actine et bloquer la fragmentation (Bobkov et al., 2006; Andrianantoandro and Pollard, 2006; Pavlov et al., 2007).

Ces observations sont confirmées par les données expérimentales de notre étude. L'efficacité de fragmentation a été mesurée pour 4 concentrations d'ADF/Cofiline différentes (de $0.46 \mu M$ à $4.1 \mu M$). La fragmentation atteint un pic aux alentours de $1 \mu M$, puis diminue rapidement à mesure que l'ADF/Cofiline stabilise le filament (figure 6.8, (D), points rouges).

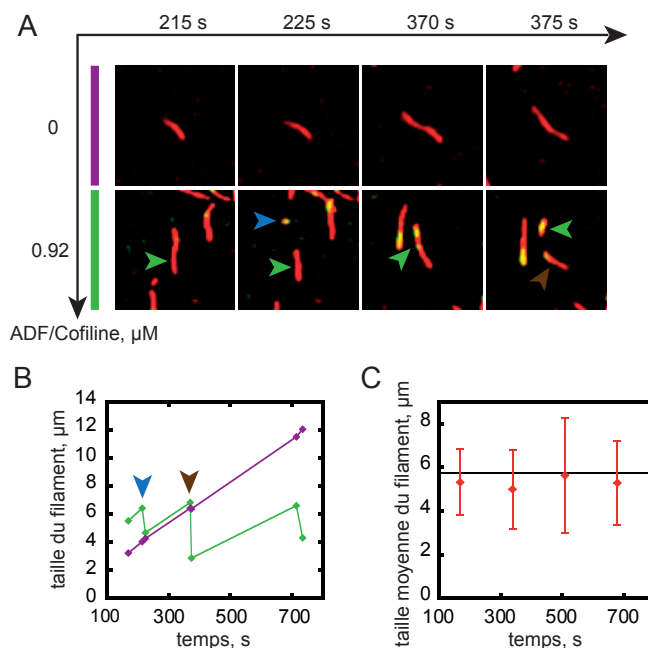


FIGURE 6.7 – Effet de la fragmentation sur la taille moyenne des filaments d'actine. (A) Images TIRFM de filaments individuels en croissance en absence d'ADF/Cofiline (ligne supérieure) et en présence de $0.92 \mu M$ d'ADF/Cofiline (ligne inférieure). Fragments indiqués par les flèches bleues et marrons. (B) Longueur au cours du temps des filaments précédents (en A). En absence d'ADF/Cofiline (courbes violettes) le filament s'allonge de façon régulière. En présence d'ADF/Cofiline (courbe verte), la longueur est régulée par les événements de fragmentation. (C) Les mesures pour cette concentration sont étendues à toute une population de filaments (points rouges), et réalisées à plusieurs temps. Une taille moyenne émerge, en accord avec celle prédite par le modèle (ligne noire). Données expérimentales (images et mesures) obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV).

Fragmentation aux interfaces "décorées/non-décorées"

Nous avons évoqué en introduction les différentes hypothèses proposées pour expliquer le mécanisme de fragmentation par ADF/Cofiline. Les changements de propriétés mécaniques liés à l'ADF/Cofiline (rigidité en torsion et en flexion) pourraient provoquer la fragmentation, non pas là où l'ADF/Cofiline s'est fixée, mais aux interfaces entre les parties décorées et celles non décorées. En toute logique, un tel mécanisme devrait favoriser la fragmentation dans des zones où la fluorescence d'ADF/Cofiline est faible ou intermédiaire, les zones saturées de fluorescence étant de fait stabilisées.

Pour vérifier cette hypothèse, nous comparons la fluorescence d'ADF/Cofiline à l'endroit de la fragmentation avec le reste du filament. Près de 60% des événements de fragmentation ont lieu dans les zones qui sont les moins fluorescentes du filament, confortant ainsi cette hypothèse (figure 6.8, (A)).

Une méthode alternative consiste à relever la fluorescence d'ADF/Cofiline autour du site de fragmentation et à moyenner ces valeurs sur un grand nombre d'événements. Si la fragmentation a bien lieu à l'interface entre les parties décorées et celles non-décorées, la fluorescence devrait laisser voir un minimum local. Ces profils sont présentés pour 3 concentrations d'ADF/Cofiline (figure 6.8, (B)) et présentent tous ce minimum local. Notons que ce minimum est très marqué quand la concentration d'ADF/Cofiline est très forte (courbe verte) : l'ADF/Cofiline recouvre alors toute la partie ADP du filament, il n'existe donc que peu d'interfaces, qui sont toutes localisées entre le cap ATP/ADP-Pi (par nature

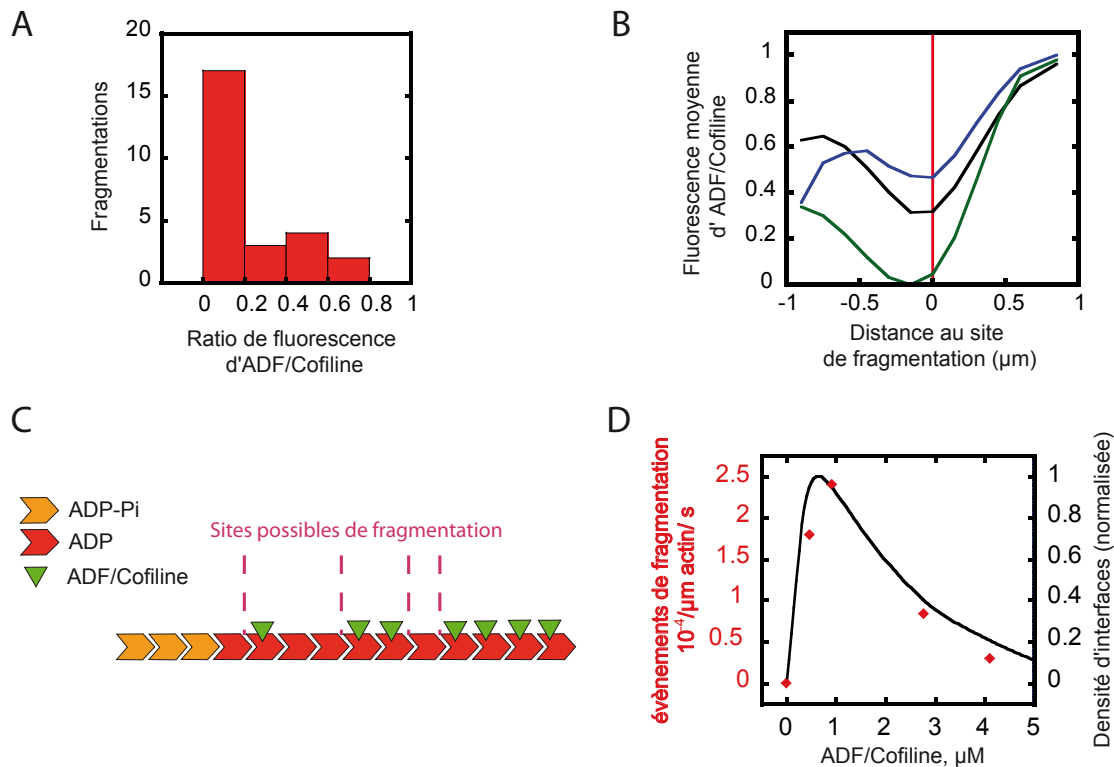


FIGURE 6.8 – **Caractérisation de la fragmentation.**(A) Histogramme des fluorescences relatives d'ADF/Cofiline au site de fragmentation. L'histogramme présente un pic marqué vers les valeurs faibles (0-20%). (B) Profils de fluorescence d'ADF/Cofiline autour de la zone de fragmentation (ligne rouge) pour 3 concentrations d'ADF/Cofiline : 0.46 (noir), 0.92 (bleu), 2.76 (vert). (C) Illustration des interfaces entre sous-unités décorées par ADF/Cofiline et sous-unités non-décorées. Ces interfaces peuvent être extraites du modèle uniquement. (D) L'efficacité de fragmentation (en occurrence par minute et par micromètre) est évaluée expérimentalement pour plusieurs concentrations d'ADF/Cofiline (points rouges). Cette efficacité est comparée à la quantité d'interfaces (telles que présentées en (C)) prédite par le modèle (courbe noire). Données expérimentales (points rouges) obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV).

impossible à fragmenter) et le reste du filament (ADP+ADF/Cofiline). Les fragmentations vont donc se dérouler massivement à cette interface qui est très marquée.

Apport du modèle

Les interfaces entre sous-unités décorées et sous-unités non-décorées ne sont pas visibles aux images TIRFM mais nous pouvons les extraire des simulations stochastiques (figure 6.8, (C)). La courbe ainsi obtenue suit le même profil que les mesures d'efficacité de la fragmentation obtenues expérimentalement (figure 6.8, (D), courbe noire). Encore une fois, notre hypothèse de fragmentation aux interfaces permet d'accorder les résultats du modèle aux données expérimentales.

6 Discussion

6.1 Impact d'ADF/Cofiline sur la structure générale des filaments

Ces données expérimentales, couplées à notre modèle stochastique, permettent de caractériser mieux encore le contrôle que met en place l'ADF/Cofiline sur les filaments d'actine.

En absence d'ADF/Cofiline, les expériences *in vitro* montrent des filaments longs, très souples, avec un cap ATP/ADP-Pi important (de l'ordre de la dizaine de microns). Ce cap est la conséquence directe de l'évolution du nucléotide avec une dissociation du phosphate inorganique qui se fait très lentement (Carlier and Pantaloni, 1986). D'un point de vue biologique, ces filaments sont inefficaces puisque trop longs pour générer une force quelconque dans les structures classiques comme les lamellipodes où les filaments sont d'un ordre de grandeur inférieur en longueur (Svitkina and Borisy, 1999; Berro et al., 2007).

En présence d'ADF/Cofiline, on observe un changement drastique dans la dynamique des filaments : le cap ATP/ADP-Pi se réduit ainsi que la taille moyenne des filaments qui sont activement fragmentés par l'ADF/Cofiline. Notons que ce basculement intervient à des concentrations intermédiaires : aux alentours de $1 \mu M$, le cap atteint un plateau et la fragmentation se révèle de moins en moins efficace. Nous récapitulons ces différents aspects dans la figure 6.9.

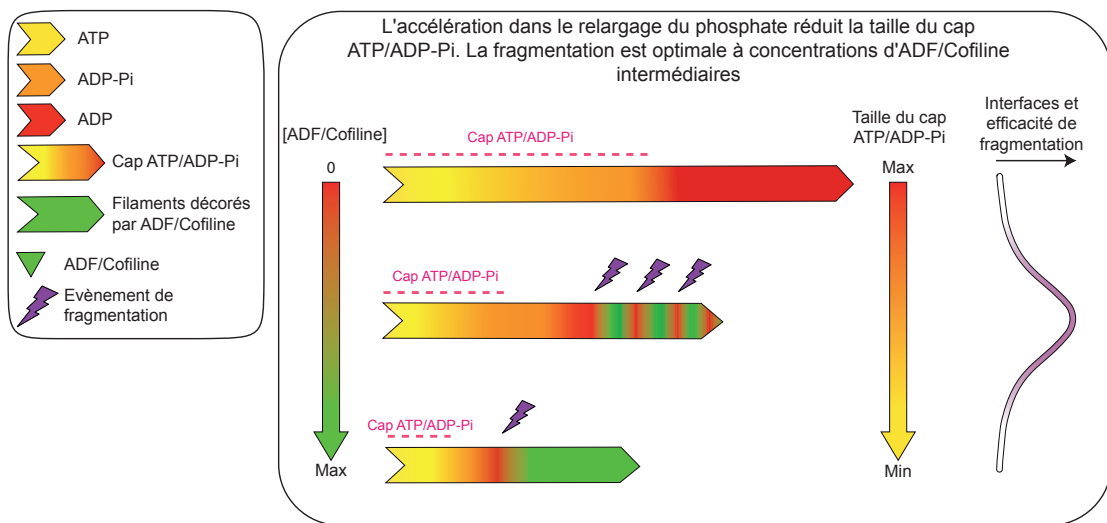


FIGURE 6.9 – **Modèle général de l'action d'ADF/Cofiline sur le filament d'actine.** Schéma récapitulatif de l'action d'ADF/Cofiline sur le filament d'actine. En présence de concentrations croissantes d'ADF/Cofiline, le cap ATP/ADP-Pi se réduit progressivement et la fragmentation mène à une réduction de la taille des filaments. Cette fragmentation est optimale à des concentrations intermédiaires.

6.2 L'ADF/Cofiline comme marqueur de l'état du nucléotide

En se basant sur l'affinité particulièrement forte de l'ADF/Cofiline pour les sous-unités d'actine-ADP (Carlier et al., 1997; Blanchoin and Pollard, 1999), l'ADF/Cofiline prend le rôle d'un marqueur du nucléotide sur le filament. Le modèle vient valider cette hypothèse : les prédictions pour la taille du cap ATP/ADP-Pi, sur lequel l'ADF/Cofiline ne peut se fixer, sont en accord avec les mesures expérimentales.

L'accès à cette information est crucial et nous permet de souligner le rôle fondamental du nucléotide dans la régulation du filament. C'est par le nucléotide que l'on contrôle l'action de l'ADF/Cofiline et donc la fragmentation. Le nucléotide définit en quelque sorte une "taille efficace" pour les filaments d'actine : les sections ATP/ADP-Pi, de l'ordre de quelques micromètres dans nos conditions standards, sont protégées de la fragmentation et peuvent produire la force nécessaire à la motilité, là où les sections ADP sont simplement vouées à être recyclées pour maintenir le stock d'actine monomérique en solution.

6.3 Implication de la localisation d'ADF/Cofiline sur la fragmentation

Notre connaissance des mécanismes de fragmentation continue de progresser : l'hypothèse initiale postulait que la fragmentation est le résultat de l'affaiblissement des contacts entre sous-unités dû à l'ADF/Cofiline (McGough et al., 1997). Cette hypothèse ne permet néanmoins pas d'expliquer pourquoi l'efficacité de fragmentation s'effondre pour des concentrations fortes d'ADF/Cofiline (De La Cruz, 2005; Andrianantoandro and Pollard, 2006).

Les modèles plus récents reposent sur une fragmentation qui aurait lieu aux interfaces entre les portions décorées et non-décorées (Bobkov et al., 2006; McCullough et al., 2008). Nos conclusions vont dans ce sens, tant du point de vue expérimental que du point de vue du modèle : la fragmentation a lieu de façon privilégiée aux interfaces avec les stretches de fluorescence d'ADF/Cofiline ; le modèle prédit un pic dans le nombre d'interfaces qui coïncide avec le pic d'efficacité observé expérimentalement.

Cette efficacité a été évaluée sur des filaments en croissance et non préincubés. Même pour de fortes concentrations d'ADF/Cofiline, l'existence du cap ATP/ADP-Pi permet de maintenir une interface entre une partie inaccessible à l'ADF/Cofiline et la partie la plus ancienne du filament. La stabilisation des filaments ne se produit donc jamais complètement : il subsiste toujours un grand nombre de filaments très courts et efficaces du point de vue de la motilité.

Troisième partie

Modèles mécaniques pour le filament
d'actine

Chapitre 7

Modèle mésoscopique pour le filament d'actine : mise en évidence du couplage flexion/torsion

1 Problématique

1.1 Des modèles pour la mécanique du filament

Nous avons consacré les chapitres précédents à l'étude de la fragmentation par ADF/Cofiline sur des filaments en croissance. Cependant, nous nous sommes placés sous l'angle de la cinétique uniquement, en considérant la fragmentation comme une pseudo-réaction chimique (contrôlée par une constante cinétique). Cette représentation est évidemment erronée : la fragmentation d'un polymère comme le filament d'actine nécessite de produire des forces mécaniques importantes qui vont briser les interactions entre sous-unités. Dans les chapitres qui vont suivre, nous présentons des modèles pour la mécanique du filament. Ces modèles vont nous permettre d'évaluer les forces et les stress subis par le filament, en particulier lorsqu'il est décoré par l'ADF/Cofiline, afin de mieux comprendre le phénomène de fragmentation.

1.2 Fragmentation et cisaillement

Les filaments d'actine se déforment principalement selon deux modes : la flexion et la torsion. L'énergie élastique accumulée dans une conformation donnée du filament est reliée à ces modes par deux constantes bien connues : la longueur de persistance pour la flexion et la longueur de persistance en torsion pour la torsion. Comme nous l'avons abordé en introduction, les filaments sont bien plus rigides en flexion qu'en torsion, c'est pourquoi l'on serait tenté de négliger la torsion.

Pourtant cette torsion est essentielle pour la fragmentation des filaments. En effet, les filaments d'actine sont des polymères quasi-inextensibles. Le stress nécessaire à leur cassure pourrait donc être un stress, non en extension, mais bien en cisaillement, donc un stress relié à la torsion locale des sous-unités dans le filament.

Toutefois, nous avons vu dans le chapitre 6 que des filaments d'actine décorés par ADF/Cofiline et qui diffusent librement se fragmentent spontanément. Or, les chocs thermiques induisent des fluctuations en flexion de la configuration des filaments. Ils sont donc suffisants pour observer cette fragmentation. Il est difficile d'imaginer comment un stress de cisaillement peut émerger dans de telles conditions.

1.3 Couplage flexion torsion

Les filaments d'actine sont formés de deux brins qui s'enroulent l'un autour de l'autre avec un certain pas d'hélice. Conséquence de cette structure hélicoïdale, la flexion et la torsion du filament sont en réalité couplées : l'une modifie l'autre et inversement. Au cours de ce chapitre, nous développons un modèle mésoscopique du filament d'actine pour caractériser ce couplage. Ce travail a donné lieu à un article en cours de révision. Nous présentons donc un résumé en français du modèle et de ses principaux résultats, suivi par le manuscrit tel qu'il a été accepté dans la revue *Biophysical Journal*. Afin de faciliter la lecture de cet article, nous plaçons les figures supplémentaires ainsi que le développement de certains calculs en annexe A de ce manuscrit.

2 Mise en place du modèle

2.1 Représentation du filament

Nous représentons un filament comme une succession de sous-unités liées entre elles par des liens élastiques. Ces sous-unités sont des ellipsoïdes de dimensions comparables à celles d'un monomère ($6.7 \times 4 \times 4.7 \text{ nm}$). Chaque sous-unité est caractérisée par la position G de son centre de masse et par un repère de 3 vecteurs d_1 , d_2 , d_3 représentant son orientation. L'orientation et la position que vont adopter les différentes sous-unités dépendent directement des interfaces qu'elles ont établies entre elles. Une interface entre deux sous-unités est représentée comme une surface sur laquelle sont fixés des ressorts élastiques (figure 7.1). Le nombre d'interfaces, leur surface, le nombre de ressorts par

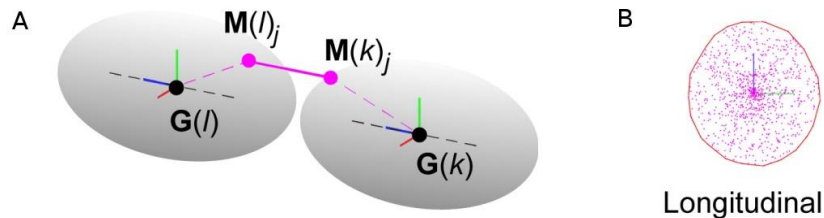


FIGURE 7.1 – **Sous-unités, interfaces et liens élastiques.** (A) Deux sous-unités k et l , avec la position de leur centre de masse $G(l)$ et $G(k)$. Notez les repères propres à chaque sous-unité : d_3 (en bleu), d_1 (en rouge) et d_2 (en vert). Nous représentons un des nombreux liens de l'interface entre l et k (en magenta). Ce lien est caractérisé par une position d'attache sur chacun des sous-unités ($M(l)$ et $M(k)$), par une constante de raideur S et par une longueur de repos. (B) Nous donnons ici une représentation d'une interface complète entre deux sous-unités : il s'agit du projeté sur un plan de chacun des liens entre les deux sous-unités l et k . Chaque point représente un lien comme celui vu en (A). L'aire de cette interface, le nombre de liens, leur raideur et leur dispersion sont autant de paramètres qui influent sur les propriétés élastiques du filament.

interface ainsi que leur rigidité sont des paramètres que nous pouvons modifier pour étudier différents scénarios. En effet, afin de mettre en évidence que c'est bien la géométrie des interactions entre sous-unités qui fonde les propriétés élastiques du filament (longueur de persistance, de torsion), nous proposons quatre modèles différents pour le filament (figure 7.2) :

- (A) Filament simple brin, non hélicoïdal : un tel filament n'a que deux interfaces, une avec la sous-unité qui la précède, une avec celle qui la suit.
- (B) Filament simple brin, hélicoïdal : similaire au cas précédent mais avec un hélicité qui mime le simple brin d'un filament d'actine.
- (C) Filament double brin, hélicoïdal, brins alignés : un tel filament est constitué de deux brins qui s'enroulent l'un sur l'autre. Ces deux brins étant alignés, chaque sous-unité possède cinq interfaces. Deux interfaces longitudinales avec les sous-unités précédentes et suivantes sur le même brin. Une interface latérale avec la sous-unité qui lui fait face sur le brin opposé. Et deux interfaces diagonales avec deux sous-unités du brin opposé.
- (D) Filament double brin, hélicoïdal, brins décalés : c'est la configuration qui mime fidèlement le filament d'actine. Une sous-unité établit quatre interfaces : Deux interfaces longitudinales avec les sous-unités précédentes et suivantes sur le même brin. Et deux interfaces diagonales avec deux sous-unités du brin opposé.

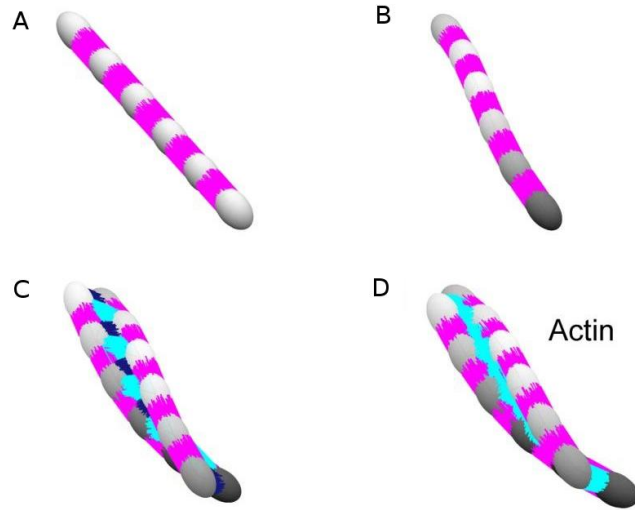


FIGURE 7.2 – Configurations de repos des différents modèles envisagés pour le filament. (A) Filament simple brin, non hélicoïdal; (B) Filament simple brin, hélicoïdal; (C) Filament double brin, hélicoïdal, brins alignés; (D) Filament double brin, hélicoïdal, brins décalés. Liens : longitudinaux en magenta, diagonaux en cyan, latéraux en bleu foncé.

2.2 Conformations du filament

Les sous-unités que nous représentons sont des macromolécules de l'ordre de grandeur du nanomètre. De même, les vitesses considérées sont extrêmement lentes. Nous pouvons donc négliger les forces d'inertie. Le déplacement des sous-unités est ainsi contrôlé par l'équilibre des forces et des moments d'origine élastique (pour les interactions entre sous-unités) et visqueuse. Notons F les forces élastiques subies par la $k^{\text{ème}}$ sous-unité en raison de son interface avec la $l^{\text{ème}}$ (figure 7.1), C_T le coefficient de viscosité en translation, on peut alors décrire le déplacement de la sous-unité k :

$$C_T \frac{dG(k)}{dt} = \sum_j F(k, l)_j \quad (7.1)$$

avec $F(k, l)_j$ la force exercée par le $j^{\text{ème}}$ lien "tendu" entre les sous-unités k et l . Notons $M(l)$ et $M(k)$ les positions d'attaches de ce lien sur les sous-unités l et k , on exprime simplement $F(k, l)_j$

$$F(k, l)_j = -S (|M(l)_j M(k)_j| - |M(l, 0)_j M(k, 0)_j|) \frac{M(k)_j M(l)_j}{|M(k)_j M(l)_j|}$$

où $|M(l)_j M(k)_j|$ est la longueur du lien j et $|M(l, 0)_j M(k, 0)_j|$ sa longueur de repos. S est la raideur du lien. La force exercée par ce lien est tout simplement proportionnelle à l'extension du lien ($|M(l)_j M(k)_j| - |M(l, 0)_j M(k, 0)_j|$)

L'équation 7.1 régit le déplacement du centre de masse de la sous-unité. Les forces élastiques s'appliquent aux points d'attaches des liens (notés M), produisant des moments qui peuvent changer l'orientation des sous-unités (et donc les 3 vecteurs d_1, d_2, d_3). La somme de ces moments est contrebalancée par la viscosité en rotation du milieu. Avec C_R le coefficient de viscosité en rotation, on peut écrire :

$$C_R \Omega(k) = - \sum_j F(k, l)_j \times G(k) M(k)_j \quad (7.2)$$

Avec $\Omega(k)$ la vitesse angulaire de la sous-unité k , et $F(k, l)_j \times G(k) M(k)_j$ qui représente le moment produit par le lien j sur cette sous-unité. Cette rotation modifie l'orientation du repère propre à chaque sous-unité :

$$\frac{d}{dt} d(k)_i = \Omega(k) \times d(k)_i \quad (7.3)$$

Nous adoptons une représentation pour cette rotation à base d'angles d'Euler ($\theta(k), \phi(k), \psi(k)$). La rotation $\Omega(k)$ modifie ces angles selon le système suivant :

$$\begin{aligned} \frac{d\theta(k)}{dt} &= \Omega(k)_1 \cos \phi(k) + \Omega(k)_2 \sin \phi(k) \\ \frac{d\phi(k)}{dt} &= \Omega(k)_3 + \cos \theta(k) (-\Omega(k)_1 \sin \phi(k) + \Omega(k)_2 \cos \phi(k)) \\ \frac{d\psi(k)}{dt} &= \frac{1}{\sin \theta(k)} (\Omega(k)_1 \sin \phi(k) - \Omega(k)_2 \cos \phi(k)) \end{aligned}$$

Les équations 7.1, 7.2 et 7.3 nous permettent de simuler le déplacement des sous-unités, tandis que le système ci-dessus nous donne l'évolution des angles d'Euler et donc de l'orientation des sous-unités.

3 Résultats

3.1 Mise en évidence du couplage flexion/torsion pour le filament d'actine

Afin de mettre en évidence un couplage entre la flexion et la torsion, nous prenons comme configurations de départ les configurations de repos du filament dans chacun des scénarios envisagés (A, B, C et D, figure 7.2). Nous appliquons alors une force de compression aux deux extrémités du filament : cette force permet de déplacer les extrémités du filament l'une vers l'autre (chacune se déplaçant d'une distance de l'ordre de 20 nm, figure 7.3,

graphe A). Le filament est contraint de flamber, et l'on peut distinguer deux cas. En l'absence de couplage, aucune torsion n'est générée et le filament flambe dans un plan. En présence d'un couplage, la flexion produit en retour de la torsion et le filament flambe hors du plan.

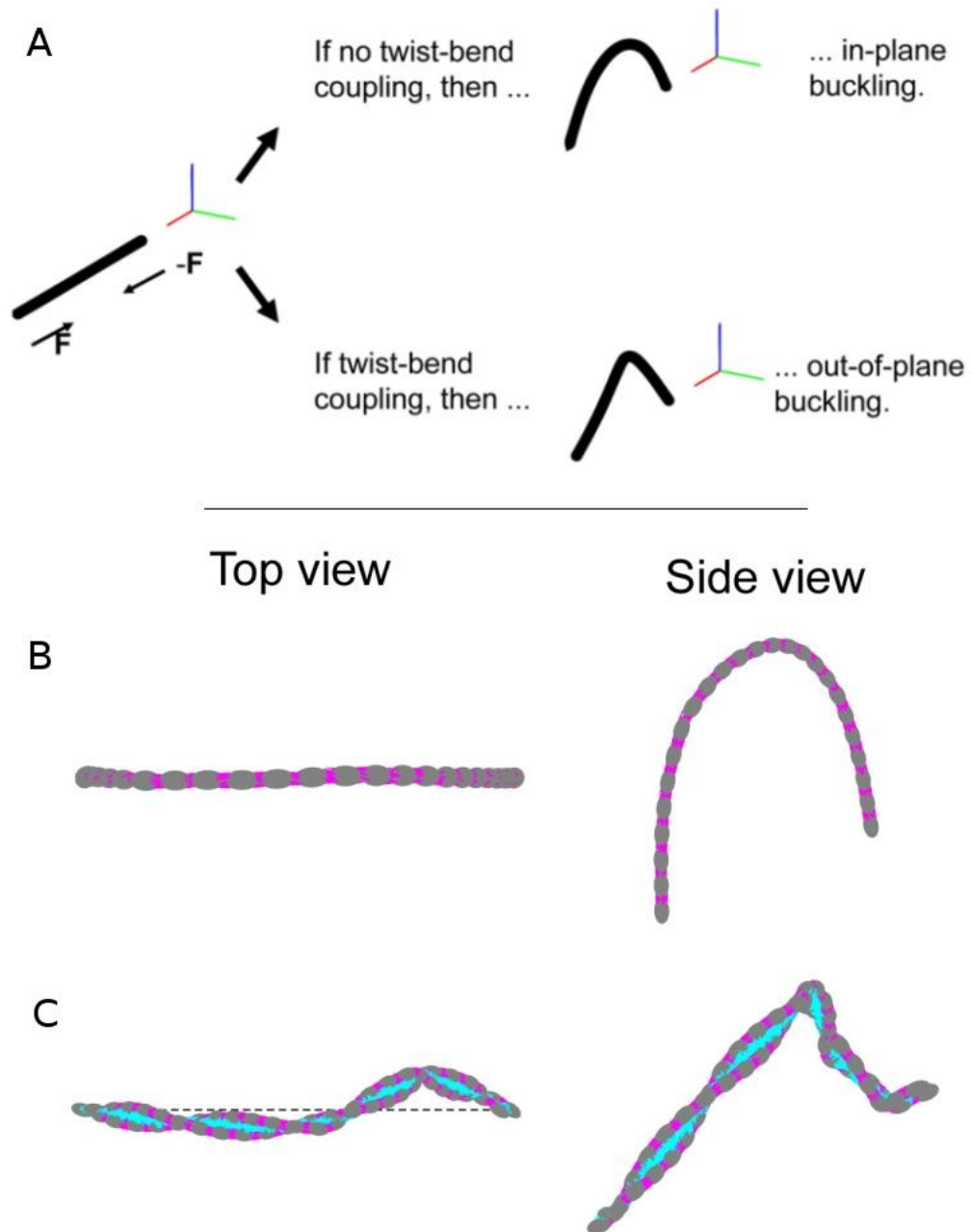


FIGURE 7.3 – Mise en évidence du couplage flexion/torsion dans le filament d'actine (A) En partant de la configuration de repos, le filament est comprimé. La distance entre ces deux extrémités est réduite, ce qui le contraint à flamber. En cas de couplage, cette flexion produit en retour une torsion : le filament ne peut plus être contenu dans un seul plan. (B et C) Flambage du filament dans deux scénarios différents : (B) filament à un seul brin, non hélicoïdal et (C) filament double brin, hélicoïdal avec brins décalés (mime le filament d'actine réel). La ligne en pointillé indique le plan dans lequel le filament serait contenu en absence de couplage).

Nous présentons en figure 7.3 (graphe B) les configurations obtenues dans le cas d'un

filament simple brin, non hélicoïdal et l'on peut voir que ce filament flambe dans un plan, et ne présente donc pas de couplage entre la flexion et la torsion. A l'inverse, dans le cas d'un filament double brin, hélicoïdal avec brins décalés (figure 7.3, graphe C) qui mime le filament d'actine, le flambage se fait hors du plan. Le couplage est donc en relation directe avec la présence de l'hélicité et d'une organisation à deux brins décalés.

3.2 Lien avec l'énergie élastique du filament

Afin de pouvoir quantifier l'importance de ce couplage, nous devons :

- Évaluer l'énergie élastique contenue à l'interface entre les différentes sous-unités.
- Mettre cette énergie sous une forme qui laisse apparaître les grandeurs caractéristiques que sont la longueur de persistance (L_P), la longueur de persistance en torsion (L_T) et le couplage flexion/torsion (que nous noterons L_{TB}).

Formulation continue

Dans ce chapitre, nous considérons un filament comme un assemblage de sous-unités liées par des interactions. Néanmoins, il existe d'autres représentations du filament : la plus courante consiste à modéliser un filament d'actine comme un bâtonnet semi-flexible (Howard, 2001). L'énergie élastique $F_{elastic}$ accumulée dans une petite section ds du filament s'exprime alors de la manière suivante :

$$F_{elastic} = \frac{1}{2}k_B T (L_B(\kappa_1^2 + \kappa_2^2) + L_T(\kappa_3^2) + 2L_{TB}(\kappa_1\kappa_3 + \kappa_2\kappa_3)) \quad (7.4)$$

Cette formulation fait apparaître L_B , L_T et L_{TB} , ainsi que le vecteur κ qui représente la déformation locale du filament au niveau de la section ds considérée. Ce vecteur a trois composantes $\kappa_{i,i=1...3}$, chacune d'entre elle représente le degré de rotation autour du vecteur d_i correspondant. Par exemple, κ_3 représente la rotation locale du repère autour du vecteur d_3 (le vecteur tangent à l'axe du filament). Une composante κ_3 élevée indique que l'on tourne beaucoup autour de d_3 , donc que l'on applique une torsion importante au filament localement. L'énergie stockée est liée à la rigidité en torsion et l'on voit donc apparaître le facteur $L_T(\kappa_3^2)$ dans l'énergie élastique.

Formulation mésoscopique

Pour quantifier le couplage flexion/torsion dans les différents scénarios envisagés, nous devons calculer l'énergie emmagasinée à l'interface entre les sous-unités et la mettre sous une forme similaire à celle de l'équation 7.4.

L'énergie élastique contenue dans l'extension ou la compression d'un lien j à l'interface entre deux sous-unités, s'exprime simplement :

$$F_{elastic}(k, l)_j = \frac{S}{2} (|M(l)_j M(k)_j| - |M(l, 0)_j M(k, 0)_j|)^2$$

Dans la configuration de repos, l'énergie potentielle élastique est nulle. Lorsque l'on applique une déformation au filament (par exemple en le forçant à flamber), certains liens vont être étirés, d'autres compressés, accumulant ainsi de l'énergie élastique dans la conformation du filament. L'énergie élastique totale se calcule en sommant cette quantité sur tous

les liens élastiques j aux différentes interfaces.

$$F_{elastic} = \sum_j F_{elastic}(k, l)_j$$

En annexe A de ce manuscrit, nous détaillons les calculs qui nous permettent d'exprimer cette énergie emmagasinée à l'interface entre deux sous-unités. Cette énergie est de la forme :

$$\frac{2F_{elastic}}{k_B T} = \kappa^T \cdot Q \cdot \kappa \quad (7.5)$$

Où κ représente la déformation locale associée à la sous-unité considérée. Le parallèle avec l'équation 7.4 est évident, et la matrice Q contient tous les paramètres d'intérêt, en particulier L_B , L_T et L_{TB} . Point crucial, il s'agit là d'une formulation générale, mais la forme de la matrice Q dépend fortement du scénario envisagé (hélicité ou non, simple brin ou double brin). Les valeurs prédites pour ces paramètres vont donc reposer fortement sur l'architecture choisie.

3.3 Quantification du couplage et des propriétés physiques du filament

L'architecture hélicoïdale à double brin est la seule qui permette de retrouver des valeurs pour la longueur de persistance et la longueur de torsion qui soient en accord avec les valeurs connues. Les valeurs prédites sont résumées dans la table 7.4 et comparées aux valeurs mesurées expérimentalement. La différence est d'un facteur 2 au maximum qui peut être attribué à l'incertitude dans la mesure des interactions réelles entre sous-unités dans le filament.

Nucléotide	L_B (prédite)	L_B (mesurée)	L_T (prédite)	L_T (mesurée) [3]	L_{TB} (prédite)
MgATP	12.4 μm	13 μm [1]	1.4 μm	–	0.4 μm
MgADP	4.2 μm	9.1 μm [2]	0.45 μm	0.5 μm	0.15 μm

FIGURE 7.4 – **Comparaison entre les propriétés mécaniques prédites par le modèle et les mesures expérimentales.** [1] Isambert et al. (1995) [2] Isambert et al. (1995), McCullough et al. (2008) [3] Prochniewicz et al. (2005).

Pour comparaison, nous montrons en figure 7.5 la dépendance des L_B , L_T et L_{TB} prédites à l'aire de l'interface et à la raideur des liens élastiques. De façon intuitive, plus l'aire est importante (abscisse) et les liens entre sous-unités rigides (ordonnée), plus les interactions entre sous-unités sont fortes et le filament rigide (en torsion comme en flexion).

L'architecture choisie pour le filament influe beaucoup sur les valeurs prédites : un filament simple brin, non hélicoïdal (figure 7.5, graphes A) présente une longueur de persistance très faible, une rigidité en torsion quasi nulle et un couplage entre les deux inexistant. En comparaison l'architecture hélicoïdale double brin décalée (figure 7.5, graphes B) prédit un couplage flexion torsion de l'ordre de 0.5 μm .

Le nucléotide a un effet important sur les interactions entre sous-unités (que nous avons documenté dans notre état de l'art) : la rigidité des liens entre sous-unités est donc affectée

par ce nucléotide et nous prédisons deux ensembles de valeurs pour les propriétés mécaniques du filament (figure 7.5, graphes B, astérisque pour ATP, point pour ADP) qui apparaissent dans la table 7.4.

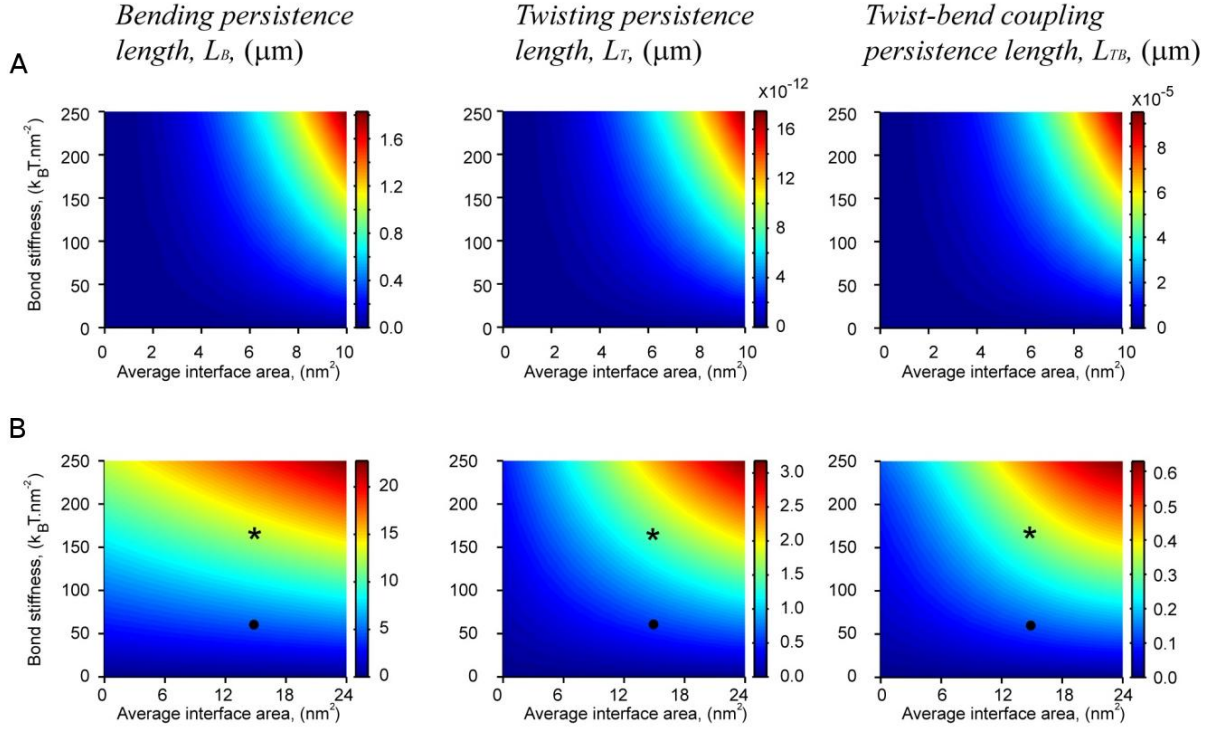


FIGURE 7.5 – **Prédictions des propriétés mécaniques du filament.** (A) Prédictions pour l'architecture simple brin non hélicoïdale. Comme on peut le voir, les longueurs de persistance sont faibles (maximum : 1.6 μm) et la rigidité en flexion ainsi que le couplage quasi inexistant. (B) Prédictions pour l'architecture à deux brins décalés hélicoïdale. Astérisque : MgATP, point : MgADP.

3.4 Contribution du couplage flexion/torsion à l'énergie élastique du filament

Ce travail se concentre sur l'existence d'un couplage flexion/torsion et sur son rôle dans le comportement élastique du filament. La plupart des modèles continus pour le filament négligent ce couplage. On peut donc légitimement s'interroger sur sa contribution relative à l'énergie élastique totale du filament : comment-on une erreur en le négligeant ?

En raison de l'architecture même du filament d'actine, l'énergie stockée dans la conformation du filament dépend de la déformation qui lui est appliquée. Dans la section précédente, nous avons représenté cette déformation de la sous-unité comme une rotation, sous la forme d'un vecteur $\vec{\kappa}$. Notons θ l'angle formé par ce vecteur avec d_3 et ϕ l'angle formé avec d_1 . La figure 7.6 présente la part relative d'énergie élastique stockée dans cette déformation en fonction des angles θ et ϕ . Cette part F_{TB} se définit comme telle :

$$F_{TB} = \frac{|2L_{TB}\kappa_3(\kappa_1 + \kappa_2)|}{L_B(\kappa_1^2 + \kappa_2^2) + L_T(\kappa_3^2) + 2L_{TB}\kappa_3(\kappa_1 + \kappa_2)}$$

Le lien avec la formulation continue de l'énergie élastique (équation 7.4) est immédiat. Sous certaines déformations, la part de l'énergie élastique due au couplage atteint 60% (figure

7.6, graphe C).

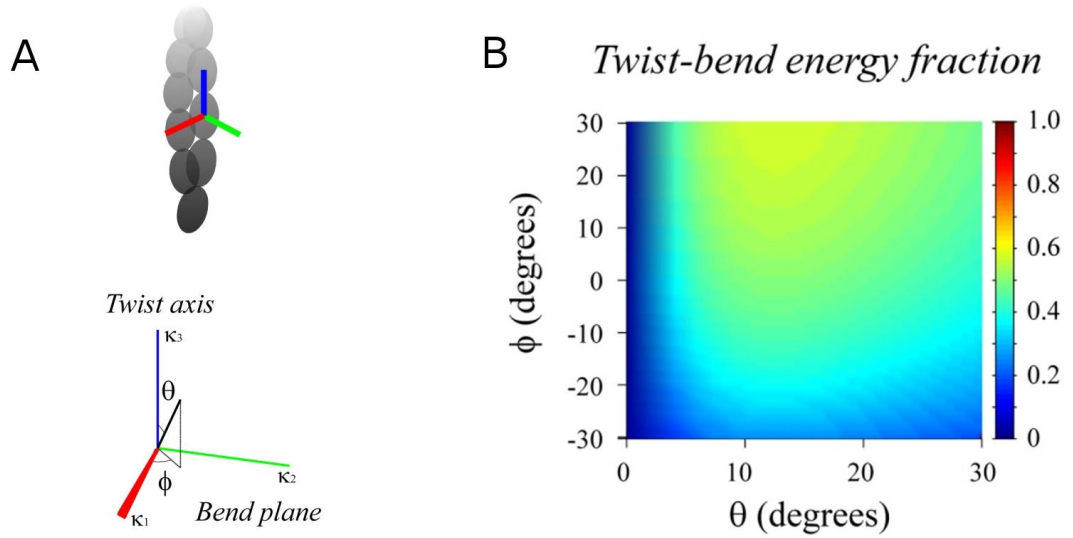


FIGURE 7.6 – Contribution du couplage à l'énergie élastique totale du filament. (A) Déformation appliquée à une sous-unité : en noir, le vecteur \vec{k} , dont les trois composantes κ_1 , κ_2 , κ_3 sont projetées sur les vecteurs d_1 , d_2 et d_3 associés à la sous-unité. L'angle θ et l'angle ϕ apparaissent directement. (B) Part de l'énergie élastique due au couplage en fonction de la déformation appliquée.

4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté un modèle mésoscopique du filament d'actine qui prouve l'existence d'un couplage mécanique entre la flexion et la torsion. Ce couplage est une conséquence directe de l'architecture hélicoïdale à deux brins décalés du filament. L'énergie élastique stockée dans la déformation des liens entre sous-unités peut être exprimée sous une forme qui laisse apparaître les grandeurs caractéristiques que sont la longueur de persistance en flexion et en torsion (L_B et L_T). Les prédictions numériques sont en accord avec les valeurs expérimentales.

Les simulations nous permettent de quantifier ce couplage ($L_{TB} = 0.4\mu m$) et d'évaluer sa contribution à l'énergie élastique totale du filament. Cette contribution représente jusqu'à 60% de l'énergie totale du filament et ne saurait donc être négligée.

Ce couplage entre flexion et torsion a des implications importantes pour la fragmentation. En effet, la conversion d'une partie de l'énergie de flexion en torsion via ce couplage pourrait jouer un rôle dans l'accumulation de stress mécanique à l'intérieur du filament. Nous montrerons dans le chapitre suivant que ce stress peut se localiser à certains points précis du polymère et favoriser leur fragmentation.

Origin of Twist-Bend Coupling in Actin Filaments.

Enrique M. De La Cruz^{1*}, Jeremy Roland², Brannon R. McCullough¹, Laurent Blanchoin³, and Jean-Louis Martiel^{2*}

¹Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, PO Box 208114, 260 Whitney Avenue, New Haven, CT 06520-8114, U.S.A.; ²Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, CNRS/UJF, Pavillon Taillefer Faculté de Médecine, La Tronche, 38706, France; ³Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, France

Address correspondence to: Enrique M. De La Cruz, Yale University, Department of Molecular Biophysics & Biochemistry, PO Box 208114 New Haven, CT 06520-8114 Tel. (203) 432-5424; Fax. (203) 432-1296; email: enrique.delacruz@yale.edu and/or Jean-Louis Martiel, Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, CNRS/UJF, Pavillon Taillefer Faculté de Médecine, La Tronche, 38706, France; email: jean-louis.martiel@imag.fr

Keywords: biopolymer, mechanics, elasticity, stress, strain

Specific contributions: E.M.D.L.C., L.B. and J.L.M. designed research; E.M.D.L.C., J.R., B.M. and J.L.M. performed research; E.M.D.L.C. and J.L.M. contributed new reagents or analytic tools, analyzed data, and wrote the paper.

Abstract

Actin filaments are semi-flexible polymers that display large-scale conformational twisting and bending motions. Modulation of filament bending and twisting dynamics has been linked to regulatory actin binding protein function, filament assembly and fragmentation, and overall cell motility. The relationship between actin filament bending and twisting dynamics has not been evaluated. We present in this study numerical and analytical experiments that reveal actin filaments have a strong intrinsic twist-bend coupling that obligates the reciprocal interconversion of bending energy and twisting stress. We developed a mesoscopic model of actin filaments that captures key documented features including the subunit dimensions, interaction energies, helicity and geometrical constraints coming from the double stranded structure. The filament bending and torsional rigidities predicted by the model compare to experimental values, demonstrating the capacity of the model to assess the mechanical properties of actin filaments including the coupling between twisting and bending motions. The predicted actin filament twist-bend coupling is strong, with a persistence length of 0.15-0.4 μm , depending on the actin-bound nucleotide. Twist-bend coupling is an emergent property that introduces local asymmetry to actin filaments and contributes to their

overall elasticity. Up to 60% of the filament subunit elastic free energy originates from twist-bend coupling, with the largest contributions resulting under relatively small deformations. Comparison of filaments with different architectures indicates that twist-bend coupling in actin filaments originates from their double protofilament and helical structure.

Introduction

Actin is an abundant and highly conserved cytoskeleton protein that powers a broad range of eukaryotic cell movements by self-associating into helical double-stranded filaments (1). Actin filaments also serve as tracks for contractile myosin molecular motors. Assembled filaments can reach tens of μm in length and are often arranged in networks and bundles that help determine cell shape and mechanical stability (2). Filament stability and assembly, network and bundle integrity and response, as well as overall force generation and cell motility are strongly influenced by the filament mechanical properties. Quantitative knowledge of actin filament elasticity is therefore central for developing predictive molecular models of actin-based cell motility.

Actin filaments have complex mechanical properties and internal motions (bending, twisting, and subunit dynamics) occurring on different time and length scales. The thermal twisting and bending deformations of actin filaments occur on the μs to ms-sec timescale respectively, and have been measured experimentally using various methods, including analysis of thermal fluctuations in shape (3-6), intrinsic curvature (7-8), rotational diffusion (9-10), single molecule imaging (11) and nanometry (12-13), and all atom simulations (14-16). Subunit dynamics are rapid (nsec timescale) and defined by small amplitude fluctuations relative to filament dimensions (10).

Actin filament bending and twisting mechanics are typically described by continuum properties that assume an isotropic and homogenous material (3-4, 6, 17-18). Filament bending and twisting rigidities are commonly associated with the bending persistence length (L_p) and torsional rigidity ($C = L_T k_B T$, where L_T is the torsional persistence length), respectively. The total elastic free energy (F_{elastic}) stored in the deformation (thermal or active) of an actin filament described as a semi-flexible continuum polymer is determined by contributions from bending and twisting, as well any coupling that may exist between these motions (19), as defined by the elasticity Hamiltonian (see Table S1 for parameter and variable definitions and units and Figure S1 for illustration):

$$\frac{2F_{\text{elastic}}}{k_B T} = L_B(\kappa_1^2 + \kappa_2^2) + L_T(\kappa_3 - \kappa_{30})^2 + 2L_{TB}(\kappa_3 - \kappa_{30})(\kappa_1 + \kappa_2) \quad (1),$$

where the first product term on the *rhs* corresponds to bending, the second to twisting, and the third to twist-bend coupling; κ_1 , κ_2 and κ_3 are rotation strain vectors along the three filament axes, with κ_3 representing that of the long axis (Figure S1); and L_{TB} is the twist-bend coupling persistence length. The elastic free energy contributions arising from twist-bend coupling can be rather significant since it is proportional to $2L_{TB}$ (20). Here, we assume that the coupling factors between twist (κ_3) and the two bending rotation strains (κ_1 and κ_2) are identical, as predicted for homogenous cylinders. Given the helical structure of actin filaments,

anisotropies arising from local, non-cylindrical fluctuations in shape will be averaged on length-scales greater than the filament helical repeat. We also include an extra component, κ_{30} , to account for the intrinsic twist in helical single or double-stranded (Figure 1, panels C to E).

Despite its potential contribution to the mechanical properties of filaments, the existence of twist-bend coupling and how it influences the conformational dynamics and energetics of actin filaments has not been evaluated. In this report, we demonstrate the existence and identify the origin of twist-bend coupling in actin filaments using a theoretical and geometric modelling approach that fills a gap between molecular-dynamic simulations and bulk rod-mechanics models of biopolymers. The derived mesoscopic models reveal the microscopic basis of actin filament mechanical properties and the origin of twist-bend coupling in complex linear polymers, in general.

Materials and Methods

Simulation of Eqs. (2-4) supplemented with Eqs. S2-S3 (Figure 2, main text) was carried out using the Matlab function *ode15s* (algorithm for stiff ordinary differential equations). The initial, resting filament configuration is linear. A constant “inward” load was applied to filament ends (Figure S2), which caused the right- and leftmost filament subunits centers of mass to move towards the filament center. The new subunit positions correspond to points at a distance of 3 subunits long axis width (i.e. $3 \times 6.7 = 21$ nm) in the leftward direction for the rightmost filament subunit or in the rightward direction for the leftmost subunit. During simulations, the right- and leftmost subunit center positions were constrained at their new positions. However, in the absence of any torque applied to both filament ends, the two subunits are free to rotate around their center of mass. These particular initial conditions make the system of differential equations numerically stiff; hence the usage of the Matlab function *ode15s*.

The addition of random forces in the pico-Newton range (comparable to forces of thermal origin) accelerates the convergence to equilibrium during the first initial calculation steps. Eqs. 5 and 6 obtained from equations S4-S53, using appropriate relations (Eq. S24 or Eq. S52) were used to generate data presented in Figure 3 and 4. In agreement with the use of free energy function normalized by the thermal energy factor $k_B T$, bond stiffness, usually given as $\text{J}\cdot\text{m}^{-2}$ (or equivalently as $\text{kcal}/\text{mole}/\text{\AA}^2$ (21)) are expressed in $\text{k}_B T\cdot\text{nm}^{-2}$. The reported bond stiffness of $1 \text{ kcal}/\text{mole}/\text{\AA}^2$ for ATP-actin corresponds to $\sim 165 \text{ k}_B T\cdot\text{nm}^{-2}$.

The average interaction area between subunits in an actin filament was determined by calculating the buried solvent accessible surface area (SASA), defined as the difference in SASAs between the dimer and two free subunits. The SASA of an actin subunit, and the lateral and longitudinal dimers of the Oda filament model (22) were calculated using the calc-surface program ((23) accessed using the NIH scientific supercomputing resource at <http://helixweb.nih.gov/structbio/basic.html>) for all atoms except waters in the PDB using a probe size of 1.4 \AA .

Results & Discussion

A. Model filament geometries, subunit organization and interfaces.

We consider filaments as a series of non-deformable subunits with the dimensions of actin monomers ($6.7 \times 4.0 \times 3.7$ nm) (1, 22) connected via elastic bonds dispersed uniformly over an interface of a defined area (Figure 1A). Each subunit is characterized by its center of

mass position, \mathbf{G} , and its orientation in three-dimensional space. The latter is defined by a set of three space vectors positioned along the three principal subunit axes, (\mathbf{d}_1 , \mathbf{d}_2 , and \mathbf{d}_3), where \mathbf{d}_1 and \mathbf{d}_2 are unit vectors spanning the plane orthogonal to \mathbf{d}_3 , the long filament axis (Figure 1A). The bonds dispersed over the subunit interfaces are treated as extensible, freely-rotating and non-diffusible springs with constant stiffness (Figure 1A). We assume that the bonds adjoining a pair of connected subunits are parallel to the line connecting the subunits center of mass. Therefore, the convex envelope of the bond projections onto the plane orthogonal to the line connecting the subunit defines the interface between these subunits. Forthcoming we evaluate the effects of bond stiffness and interface area.

To determine the geometric factors that contribute to filament mechanical properties, we consider four different linear polymer architectures: *a*) single-stranded non-helical (Figure 1B); *b*) single-stranded helical, equivalent to that of an individual actin filament strand (Figure 1C); *c*) double-stranded helical with strands aligned (Figure 1D); and *d*) double-stranded helical with strands staggered (Figure 1E). The latter mimics the structural organization of actin filaments. We do not consider double-stranded non-helical filaments since they are anisotropic in bending rigidity; the unit vectors spanning the plane orthogonal to the long filament axis axes (\mathbf{d}_1 and \mathbf{d}_2) are not equivalent and therefore large scale bending about \mathbf{d}_1 and \mathbf{d}_2 depend on the direction of applied load.

The numbers of neighbouring subunits in single- and double-stranded aligned and double-stranded staggered filaments differ (Figure 1). Consequently, the relative position and total number of interfaces per subunit varies with the filament organization. Single-stranded linear and helical filament interfaces are restricted to longitudinal contacts - one on each end of a subunit for a total of two per subunit (Figure 1B and 1C). Double stranded aligned filaments are defined by three interface types - longitudinal, lateral and diagonal - with each subunit possessing five interfaces - two longitudinal, one lateral, and two diagonal (Figure 1D). Double stranded staggered filaments (e.g. actin filaments) are defined by two interfaces - longitudinal and diagonal - with each subunit possessing two of each interface for a total of four (Figure 1E). Note that what we define as diagonal contacts are commonly referred to as “lateral” actin filament contacts.

B. Equations for filament subunit displacement.

In dynamical regimes characterized by low Reynolds’ number (defined as the ratio of inertial forces to viscous forces) experienced by nm- μ m size biological macromolecules, inertial forces are insignificant and viscous forces dominate. Consequently, the balance of force and moment originating from elastic and viscous drags governs the dynamics of large-scale filament shape fluctuations and motion. In the case of slender bodies (e.g. filaments or elongated ellipsoids), the drag force exerted on the particle (filament subunit or segment) is proportional to the center of mass velocity. Hence, the viscous ($C_T d\mathbf{G}(k)/dt$) and elastic forces (\mathbf{F}) experienced by the k^{th} subunit (with nearest neighbour l) are balanced:

$$C_T \frac{d\mathbf{G}(k)}{dt} = \sum_l \sum_{j(k,l)} \mathbf{F}(k,l)_{j(k,l)} \quad (2),$$

where C_T is the translational drag coefficient of the entire filament and $d\mathbf{G}(k)/dt$ is the translational velocity; $\mathbf{F}(k,l)_{j(k,l)}$ is the elastic force arising from the extension of the j^{th} bond between subunits k and l (Figure 1A). In the case of single stranded filaments (Figure 1, panels A and B), summation (Eq. 2) is limited to the two subunits flanking subunit k (i.e. $l=k-1$ and $k+1$). In the case of double stranded filaments, summation terms (Eq. 2) include two (Figure 1, panel C) or one (Figure 1, panel D) additional subunits on the opposite strand with a common interface contacting subunit k .

The moment of the elastic force (\mathbf{F}) experienced by subunit k is determined by the net sum of all forces acting on subunit k times the change in center of mass position, and must balance the drag angular momentum, which is proportional to the product of the angular velocity ($\mathbf{\Omega}(k)$) and the rotational drag coefficient (C_R):

$$C_R \mathbf{\Omega}(k) = -\sum_j \mathbf{F}(k, l)_j \times \mathbf{G}(k) \mathbf{M}(k)_j \quad (3).$$

The net rotation of subunit k is then given by the subunit orientation space vectors:

$$\frac{d}{dt} \mathbf{d}(k)_i = \mathbf{\Omega}(k) \times \mathbf{d}(k)_i \quad (4)$$

for $i = 1, 2, 3$ subunit axes. The global configuration of filaments in time and space are described by the geometry of filament subunit organization (Figure 1; Section A) and the equations for filament subunit orientation and displacement (Eqs. 2-4).

C. Dependence of filament geometry on twist-bend coupling.

To determine how the existence and magnitude of twist-bend coupling depends on the filament geometry, we computed the configuration of filaments under an external mechanical load applied at filament ends and evaluate the in- and out of plane deformations from the dispersion of subunit position in space (i.e. the fraction of total in plane subunits). The “external load” was applied without torque (i.e. no imposed twisting) towards the filament center. Under these conditions, out of plane buckling occurs only when twist-bend coupling exists; in the absence of twist-bend coupling, bending is confined to a plane (Figure S2).

Single-stranded non-helical filaments buckle in plane (Figure 2A). Single-stranded helical filaments buckle slightly out of plane, indicating that twist-bend coupling exists and that it arises from the helical organization of subunits since it is absent in non-helical, single-stranded filaments (Figure 2B). Both aligned and staggered double-stranded filaments display more prominent twist-bend coupling than single-stranded helical filaments (Figures 2C and 2D).

These data reveal that three geometric factors govern the emergence of twist bend coupling in linear polymers: *a*) helicity, *b*) multi-stranded configuration, and *c*) the relative alignment of subunits in the strands, with coupling in the staggered double-stranded alignment being the strongest of configurations we consider in this study. Actin filaments possess all of these structural features and must therefore possess twist-bend coupling.

D. Elastic free energies of filaments.

In the Supplementary Material (SM) we provide derivations for the total free elastic energy stored in configurations of the various filament architectures evaluated in this study. The general expression for elastic free energy is:

$$\frac{2F_{Elastic}}{k_B T} = \boldsymbol{\kappa}^T \cdot \mathbf{Q} \cdot \boldsymbol{\kappa} \quad (5),$$

where $\boldsymbol{\kappa}$ is a strain vector associated with local deformation and the coefficients of matrix \mathbf{Q} explicitly account for the different filament geometries and directly provide the filament mechanical parameters of interest, namely, the filament bending, torsional and twist-bend coupling persistence lengths. The bond stiffness- and interface area-dependence of the

filament persistence length, torsional constant, and twist-bend coupling constant for the four filament types investigated in this study were computed using Eq. 5 (Figure 3).

The elastic free energy function derived in this work (Eq. 5, SM) is formally equivalent to the Kirchhoff equation used in continuum model approaches (19). The advantage of this expression over the more familiar Kirchhoff equation is that all parameters are derived from the microscopic filament structure, and therefore explicitly account for the subunit dimensions, filament geometry (e.g. helicity, number of strands, and staggered versus aligned double strands), the number and type (e.g. lateral, diagonal, longitudinal) of subunit interface bonds, as well as the intersubunit bond dispersion area.

E. Dependence of subunit interface areas and bond stiffness on filament mechanics.

The filament mechanical properties (bending, twisting and coupling; we assume that filaments are essentially inextensible – a reasonable approximation given the ~2.3 GPa longitudinal elastic modulus (24-25) obtained from muscle fiber stiffness measurements and the <1% extensibility observed in contracting muscle (26-28) depend on the bond stiffness and interface area (Figure 3; note the scales vary), but the extent to which they contribute is a function of the geometry, specifically the number of strands comprising the filament. Single-stranded filaments, helical and non-helical, readily bend and twist unless the interface areas and/or bond stiffness are large (Figure 3A). Single-stranded helical filaments are marginally harder to bend and twist than single-stranded, non-helical filaments due to their cylindrical width and the existence, albeit weak, of twist-bend coupling, respectively.

The bending, twisting and coupling of aligned and staggered double-stranded filaments depend on the subunit interface area and intersubunit bond stiffness (Figure 3C and D). Double-stranded filaments have considerably larger bending persistence lengths than filaments of single-stranded geometries (Figure 3A and B), as predicted from contributions to the geometric moment and radial mass distribution. The twisting and coupling persistence lengths of double-stranded filaments are also larger by many orders of magnitude. The major determinant of twist-bend coupling in filaments is the double-stranded structure (geometry), although the integrity (bond stiffness) of the subunit contacts also contributes.

F. Mechanical properties of actin filaments.

Knowledge of the actin filament bond stiffness and interface areas permits evaluation of the mesoscopic (double stranded, staggered) filament model and theory presented in this work, as well as the development of novel predictions regarding actin filament mechanical properties. The interface contacts adjoining adjacent subunits in an actin filament behave as harmonic bonds with an effective stiffness that depends on the actin-bound nucleotide, displaying a range of 50-150 kcal mol⁻¹ nm⁻² for ATP- and 20-50 kcal mol⁻¹ nm⁻² for ADP-actin (21). The subunit interface areas estimated from the atomic actin filament model are ~20 nm² for longitudinal and ~10 nm² for “lateral” (i.e. diagonal) interactions, respectively (22, 29), yielding a total interface area of ~60 nm² per subunit and an average of ~15 nm² per interface since each actin filament subunit contacts four neighbouring subunits (Figure 3D).

The bending persistence lengths of ATP- and ADP-actin filaments predicted for double-stranded, staggered filaments agree with experimental values within about a factor of two or less (4-5) (Table 1). The predicted torsional persistence length of ADP-actin filaments also agrees well with the experimentally determined value (Table 1). The small discrepancy may arise from uncertainties in the estimated bond stiffness (we use the average in our calculations) and/or subunit interface areas, our use of the average (lateral and longitudinal) interface area, and/or the existence of some subunit compliance (22).

Although actin filaments in solution are dynamic and adopt multiple structural states (30), the close agreement between the model predictions and the experimentally observed

parameters indicates that the (double-stranded, staggered) geometric model reliably captures not only the predominant structural features of actin filaments, but also their bending and twisting mechanics. Therefore, our approach permits prediction of twist-bend coupling in actin filaments, which we estimate to be 0.4 μm for ATP- and 0.15 μm for ADP-actin filaments (Figure 3D; Table 1). The nucleotide-dependence of the coupling constant arises from the different greater subunit interface bond stiffness of ATP-actin. We note that the flexural rigidity of actin filaments calculated from the persistence length includes twist-bend coupling contributions and therefore underestimates the true intrinsic filament flexural rigidity.

G. Distribution of bending, twisting and coupling elastic free energies under deformation.

The fractional contributions of bending, twisting and coupling to the total filament elastic free energy depend on the type (bend and/or twist) of deformation. The normalized total elastic free energy density stored in a given filament configuration is a function of the external strain (defined by variables κ_1 , κ_2 and κ_3). The condition $|L_{TB}| \leq \sqrt{\frac{L_P L_T}{2}}$ ensures energy density positivity under all strains and is fulfilled with the predicted filament persistence lengths of all filament types evaluated (Table 1), indicating thermodynamic validity of the models and theory presented in this study.

The total elastic free energy fraction originating from twist-bend coupling (\bar{F}_{TB}):

$$\bar{F}_{TB} = \frac{|2L_{TB}(\kappa_3 - \kappa_{30})(\kappa_1 + \kappa_2)|}{L_B(\kappa_1^2 + \kappa_2^2) + L_T(\kappa_3 - \kappa_{30})^2 + 2L_{TB}(\kappa_3 - \kappa_{30})(\kappa_1 + \kappa_2)} \quad (6)$$

is independent of the strain vector amplitude (i.e. extent of imposed deformation). The fraction \bar{F}_{TB} can be computed for different strain vector orientations in three-dimensional space using a spherical angle representation (Figure 4A and 4B). The total elastic free energy of a filament subunit and the fractional bending and twisting contributions can also be obtained (Figure 4C-F).

As predicted from the theory of elastic rods, the total elastic free energy of an actin filament subunit (note that this *does not* refer to the elastic energy of the entire filament, but that of an individual subunit) depends on the magnitude and type of deformation (Figure 4C). The existence of twist-bend coupling introduces asymmetry (with respect to bend and twist deformation) to the total free energy landscape (Figure 4C) despite the perfectly symmetrical and isotropic (i.e. they do not depend on the angle ϕ) bending and twisting energy landscapes (Figure 4D & 4E). Twist-bend coupling contributes a substantial fraction of the total filament elastic free energy - up to ~60% - under small deformations (Figure 4H) such as those experienced by thermally fluctuating actin filaments (3-6, 10). This elastic behavior of actin filaments differs from that of DNA, for which twist-bend coupling is relatively insignificant in most situations (31), particularly when the polymer length exceeds that of a single helical turn (32-34); DNA under tension stretches (20). The relative contribution from pure twisting is relatively small ($\leq 3\%$ of total elastic energy) at all deformations (Figure 4E); filaments twist more easily than they bend ($L_T < L_P$; Table 1).

Conclusion

The models and theory developed in this study demonstrate the existence of twist-bend coupling as an emergent property of actin filaments. Twist-bend coupling can dramatically influence the energetic and mechanical properties of filaments, such that conformational (elastic) energy is either stored or dissipated depending on the combination of bending and twisting deformation. This behavior arises because of the helical and double-stranded organization of actin filament subunits, which allows for inter-conversion of bending and twisting elastic energies.

Twist-bend coupling is an intrinsic property of helical multi-stranded helical polymers with stable interstrand interactions. Coupling between bending and twisting likely reflects a general functional adaptation of multi-stranded polymers, similar to a critical concentration and rate-limiting nucleation of assembly, terminal subunit addition and dissociation, and long length distribution (25). The emergence of twist-bend coupling introduces important physico-chemical properties that can modulate energy transduction and work production, which may reflect a general evolutionary adaptation for driving cell global organization.

The reciprocal conversion of bending and twisting energies enables actin filaments and filament assemblies (i.e. bundles and networks) to respond adaptively to external stresses, by allowing elastic energies associated with external bending or twisting loads to dissipate through random fluctuations if filaments are free to translate or rotate, thereby modulating mechanical properties and preventing large-scale deformation or possible failure. Alternatively, elastic energy can be stored and subsequently released in the form of work production when actin filament motions are restricted, as occurs in assemblies or near surfaces (e.g., cell membranes and organelles). Such dissipation of stored elastic free energy can drive motility (35).

The existence of twist-bend coupling in actin filaments could therefore have important implications for cell physiology and function. Coupling likely contributes to actin-based cell motility and mechanics since it is most prominent at small filament deformations such as those associated with subunit incorporation (i.e. filament growth) at the leading edge of migrating cells (35), interaction with regulatory proteins (36-38), displacement of filament bundles (39), and interaction with contractile motor proteins (40). Modulation of filament bending (5) and twisting (10) dynamics by regulatory proteins could contribute to stress accumulation that increases the probability of failure (i.e. filament severing; (5, 36-37)).

Twist-bend coupling may also play a role in higher-order assemblies, such as filament bundles and networks, in which filament motions are restricted. Contributions from twist-bend coupling to the elastic properties of such assemblies have yet to be evaluated. However, given that coupling can dominate contributions to the filament elastic energy, it can be critical for driving assembly dynamics of lamellipodia, filopodia and other higher ordered actin filament structures.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the National Institutes of Health (GM071688 and GM071688-03S1 awarded to E.M.D.L.C, U.S.A.), the American Heart Association (0940075N awarded to E.M.D.L.C.; U.S.A.), the Agence Nationale de la Recherche (ANR-06-PCV-135054 and ANR-08-SYSC-013 awarded to L.B. and J.L.M.; France), and the Institute of Complex Systems IXXI, Rhône-Alpes (awarded to J.L.M.; France). E.M.D.L.C. is an American Heart Association Established Investigator, an NSF-CAREER Award recipient (MCB-0546353) and Hellman Family Fellow.

References

1. Holmes, K. C., D. Popp, W. Gebhard, and W. Kabsch. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* 347:44-49.
2. Fletcher, D. A., and R. D. Mullins. 2009. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463:485-492.
3. Gittes, F., B. Mickey, J. Nettleton, and J. Howard. 1993. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* 120:923-934.
4. Isambert, H., P. Venier, A. C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M. F. Carlier. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem* 270:11437-11444.
5. McCullough, B. R., L. Blanchoin, J. L. Martiel, and E. M. De la Cruz. 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol* 381:550-558.
6. Le Goff, L., O. Hallatschek, E. Frey, and F. Amblard. 2002. Tracer studies on f-actin fluctuations. *Phys Rev Lett* 89:258101.
7. Orlova, A., and E. H. Egelman. 1993. A conformational change in the actin subunit can change the flexibility of the actin filament. *J Mol Biol* 232:334-341.
8. De La Cruz, E. M., A. Mandinova, M. O. Steinmetz, D. Stoffler, U. Aebi, and T. D. Pollard. 2000. Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J Mol Biol* 295:517-526.
9. Prochniewicz, E., Q. Zhang, E. C. Howard, and D. D. Thomas. 1996. Microsecond rotational dynamics of actin: spectroscopic detection and theoretical simulation. *J Mol Biol* 255:446-457.
10. Prochniewicz, E., N. Janson, D. D. Thomas, and E. M. De la Cruz. 2005. Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J Mol Biol* 353:990-1000.
11. Forkey, J. N., M. E. Quinlan, and Y. E. Goldman. 2005. Measurement of single macromolecule orientation by total internal reflection fluorescence polarization microscopy. *Biophys J* 89:1261-1271.
12. Tsuda, Y., H. Yasutake, A. Ishijima, and T. Yanagida. 1996. Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12937-12942.
13. Yasuda, R., H. Miyata, and K. Kinoshita, Jr. 1996. Direct measurement of the torsional rigidity of single actin filaments. *J Mol Biol* 263:227-236.
14. Chu, J. W., and G. A. Voth. 2005. Allostery of actin filaments: molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:13111-13116.
15. Pfaendtner, J., D. Branduardi, M. Parrinello, T. D. Pollard, and G. A. Voth. 2009. Nucleotide-dependent conformational states of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12723-12728.
16. Pfaendtner, J., E. M. De La Cruz, and G. A. Voth. 2010. Actin filament remodeling by ADF/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:7299-7304.
17. Kas, J., H. Strey, J. X. Tang, D. Finger, R. Ezzell, E. Sackmann, and P. A. Janmey. 1996. F-actin, a model polymer for semiflexible chains in dilute, semidilute, and liquid crystalline solutions. *Biophys J* 70:609-625.
18. Greenberg, M. J., C. L. Wang, W. Lehman, and J. R. Moore. 2008. Modulation of actin mechanics by caldesmon and tropomyosin. *Cell Motil Cytoskeleton* 65:156-164.

19. Landau, L. D., and E. M. Lifshitz. 2002. *Theory of Elasticity*. Elsevier.
20. Marko, J. F. 1998. DNA under high tension: Overstretching, underwinding, and relaxation dynamics. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 57:2134.
21. Chu, J. W., and G. A. Voth. 2006. Coarse-grained modeling of the actin filament derived from atomistic-scale simulations. *Biophys J* 90:1572-1582.
22. Oda, T., M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maeda, and A. Narita. 2009. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 457:441-445.
23. Gerstein, M. 1992. A Resolution-Sensitive Procedure for Comparing Protein Surfaces and its Application to the Comparison of Antigen-Combining Sites. *Acta crystallographica. Section A, Foundations of crystallography* 48:271-276.
24. Higuchi, H., T. Yanagida, and Y. E. Goldman. 1995. Compliance of thin filaments in skinned fibers of rabbit skeletal muscle. *Biophys J* 69:1000-1010.
25. Howard, J. 2001. *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associates, Inc.
26. Huxley, H. E., A. Stewart, H. Sosa, and T. Irving. 1994. X-ray diffraction measurements of the extensibility of actin and myosin filaments in contracting muscle. *Biophys J* 67:2411-2421.
27. Wakabayashi, K., Y. Sugimoto, H. Tanaka, Y. Ueno, Y. Takezawa, and Y. Amemiya. 1994. X-ray diffraction evidence for the extensibility of actin and myosin filaments during muscle contraction. *Biophys J* 67:2422-2435.
28. Bordas, J., A. Svensson, M. Rothery, J. Lowy, G. P. Diakun, and P. Boesecke. 1999. Extensibility and symmetry of actin filaments in contracting muscles. *Biophys J* 77:3197-3207.
29. Sept, D., and J. A. McCammon. 2001. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys J* 81:667-674.
30. Reisler, E., and E. H. Egelman. 2007. Actin structure and function: what we still do not understand. *J Biol Chem* 282:36133-36137.
31. Marko, J. F., and E. D. Siggia. 1994. Bending and twisting elasticity of DNA. *Macromolecules* 27:981-988.
32. Lankas, F., J. Sponer, P. Hobza, and J. Langowski. 2000. Sequence-dependent elastic properties of DNA. *J Mol Biol* 299:695-709.
33. Panyukov, S., and Y. Rabin. 2000. Fluctuating filaments: statistical mechanics of helices. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 62:7135-7146.
34. Panyukov, S., and Y. Rabin. 2000. Thermal fluctuations of elastic filaments with spontaneous curvature and torsion. *Phys Rev Lett* 85:2404-2407.
35. Mogilner, A., and G. Oster. 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J* 71:3030-3045.
36. De La Cruz, E. M. 2005. Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J Mol Biol* 346:557-564.
37. De La Cruz, E. M. 2009. How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev* 1:51-59.
38. Prochniewicz, E., D. Henderson, J. M. Ervasti, and D. D. Thomas. 2009. Dystrophin and utrophin have distinct effects on the structural dynamics of actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:7822-7827.
39. Bathe, M. 2007. A finite element framework for computation of protein normal modes and mechanical response. *Proteins* 70:1595-1609.
40. Prochniewicz, E., H. F. Chin, A. Henn, D. E. Hannemann, A. O. Olivares, D. D. Thomas, and E. M. De La Cruz. 2010. Myosin isoform determines the conformational dynamics and cooperativity of actin filaments in the strongly bound actomyosin complex. *J Mol Biol* 396:501-509.

Tables

Table 1. Summary of actin filament mechanical properties.

<u>Nucleotide</u>	<u>L_B (predicted)</u>	<u>L_B (measured)</u>	<u>L_T (predicted)</u>	<u>L_T (measured)[†]</u>	<u>L_{TB} (predicted)</u>
MgATP	12.4 μm	13 μm^*	1.4 μm	-----	0.4 μm
MgADP	4.2 μm	9.1 (± 0.3) μm^\ddagger	0.45 μm	0.5 (± 0.2) μm	0.15 μm

*Value of the MgATP actin filament bending persistence length (L_p) is estimated from that of BeF_x actin filaments (4).

[†]The values of the filament torsional persistence length (L_T) are calculated from the torsional rigidity ($C = 2.3 \pm 1.0 \times 10^{-27} \text{ N m}^2 \text{ rad}^{-1}$; (10)) using $L_T = C/(k_B T)$ with $k_B T = 4.1 \times 10^{-21} \text{ J}$.

[‡]The MgADP actin filament bending persistence length (L_p) value represents an average of the values reported in (4) and (5, 18)

Figure Legends

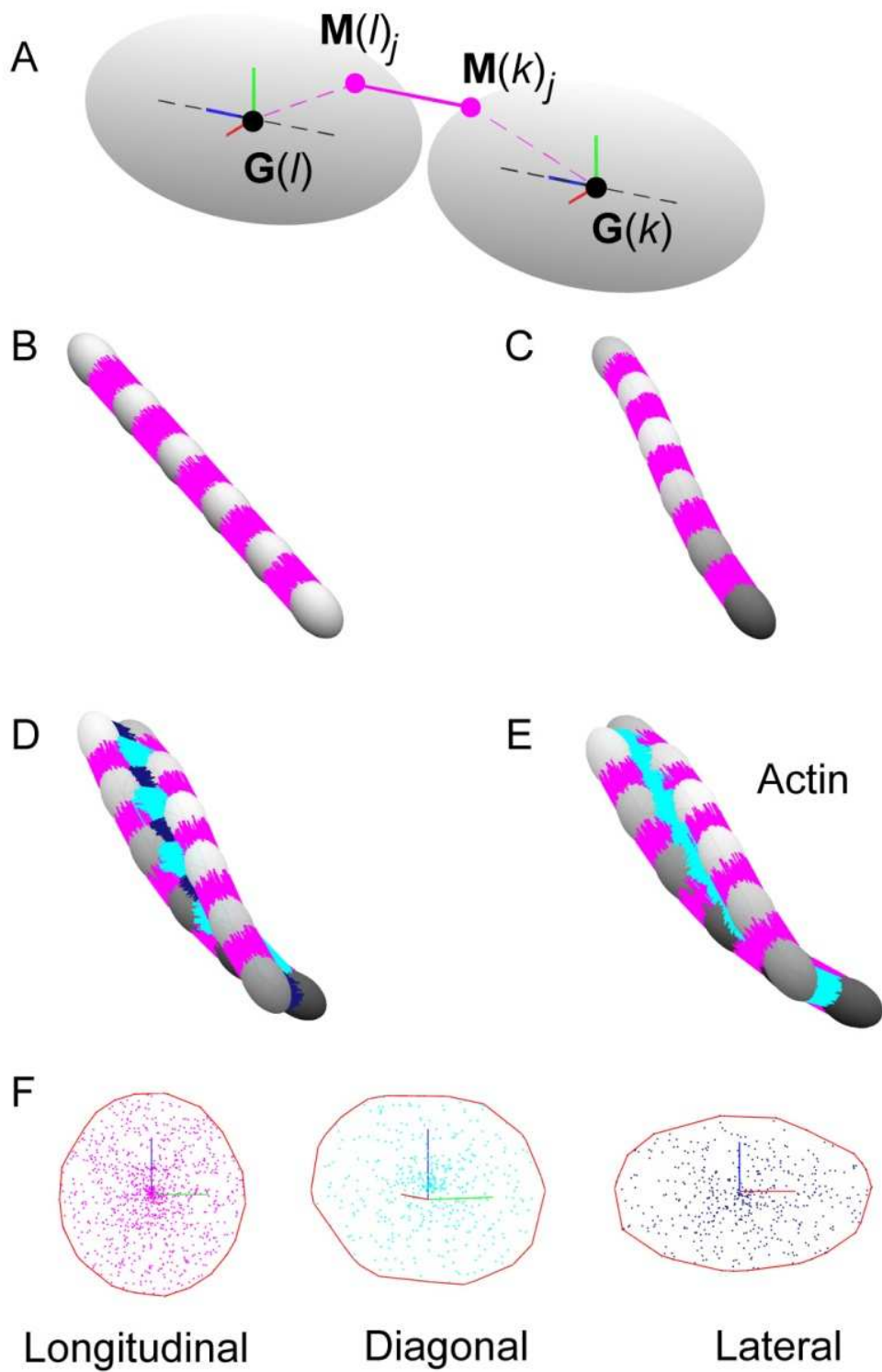
Figure 1. Microscopic organization of model filaments. Panel A. Schematic of filament subunits modeled as ellipsoids connected by elastic bonds. The subunit centers of mass are given by $\mathbf{G}(k)$ or $\mathbf{G}(l)$ and their respective bond attachment coordinates by $\mathbf{M}(k)_j$ and $\mathbf{M}(l)_j$. Panel B-E. Schematic of filament resting configurations: single-stranded non-helical (panel B), single-stranded helical (panel C), aligned double-stranded helical (panel D), and staggered double-stranded helical (panel E). Longitudinal contacts are colored magenta, diagonal contacts are colored cyan, and lateral contacts are colored dark blue. Panel F. Schematic of subunit interface bonds attachments dispersion areas. The interface is the convex envelope of the bond projections onto the plane normal to the line connecting the center of mass connecting two neighboring subunits.

Figure 2. Equilibrium configurations of resting and strained filaments. Filaments, with different microscopic organization, were loaded without twisting along the long filament axis. At equilibrium, configurations result from the balance between load-induced bending, responsible for large in-plane loops, and intrinsic twist-bend coupling arising from the microscopic subunit organization, responsible for out-of plane buckling. Single stranded, non-helical filaments do not present intrinsic twist-bend coupling (panel A, top and side views); helical filaments show minute out-of plane buckling (panel B, top and side views), thereby indicating that the helicity present in the resting configuration is sufficient to drive the loop out of the bending plane. Equilibrium configuration for double-stranded with aligned (panel C) or staggered (panel D) subunits filaments present a marked deviation from planar buckling alone, showing the presence of a strong coupling at the microscopic subunit arrangement level.

Figure 3. Bending, twisting and coupling persistence length landscapes. Dependence of the bending, twisting and coupling persistence lengths of single-stranded non-helical (panel A), single-stranded helical (panel B), aligned double-stranded helical (panel C), and staggered

double-stranded helical (panel D) filaments on the intersubunit bond stiffness and average subunit interface area. Note the scales differ among panels and that helicity and double-stranded structures both contribute to the emergence of twist-bend coupling. The star and dot in panel D correspond to the average bond stiffness and interface areas of ATP actin (14.6 nm^2 , $165 k_B T \cdot \text{nm}^{-2}$) and ADP actin (14.6 nm^2 , $55 k_B T \cdot \text{nm}^{-2}$) filaments, respectively. The ATP- and ADP-actin filaments bond stiffness range from $50\text{-}150 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$ and $20\text{-}50 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ nm}^{-2}$, respectively (21). Normalization of the elastic free energy by $k_B T$, yields a corresponding range of $80\text{-}250 k_B T \text{ nm}^{-2}$ for ATP-actin and $30\text{-}80 k_B T \cdot \text{nm}^{-2}$ for ADP-actin filaments.

Figure 4. Contributions of bending, twisting and coupling to the total elastic free energy. Panels A and B. Geometric coordinates associated with orientation of an individual filament subunit (see also Figure S5) used to quantitate the elastic free energy terms originating from bending, twisting and coupling. The vector of strain rotation, $\mathbf{\kappa}$, is determined by angles θ and ϕ , respectively. The angle between $\mathbf{\kappa}$ and the vertical axis is denoted θ , the angle between the direction Ox and the projection of $\mathbf{\kappa}$ on the Oxy plane is ϕ . Note that a twist along the long subunit axis, parallel to the filament long axis corresponds to a vector $\mathbf{\kappa}$ aligned with the vertical axis (i.e. $\theta = 0$ or 180°); conversely, when $\theta = 90^\circ$, the rotation imposed to the subunit corresponds to bending. The angle ϕ controls the degree of coupling between bending and twisting strains. The rotation imposed to the subunit corresponds to an angle of 1 rad about the axis along the unit vector $\mathbf{\kappa}$. Panels C-F: Dependence of total (panel C), bending (panel D), twisting (panel E) and coupling (panel F) elastic free energies on the angular strain rotation. Panels G and H: The fractional contributions from bending and coupling.



Figure

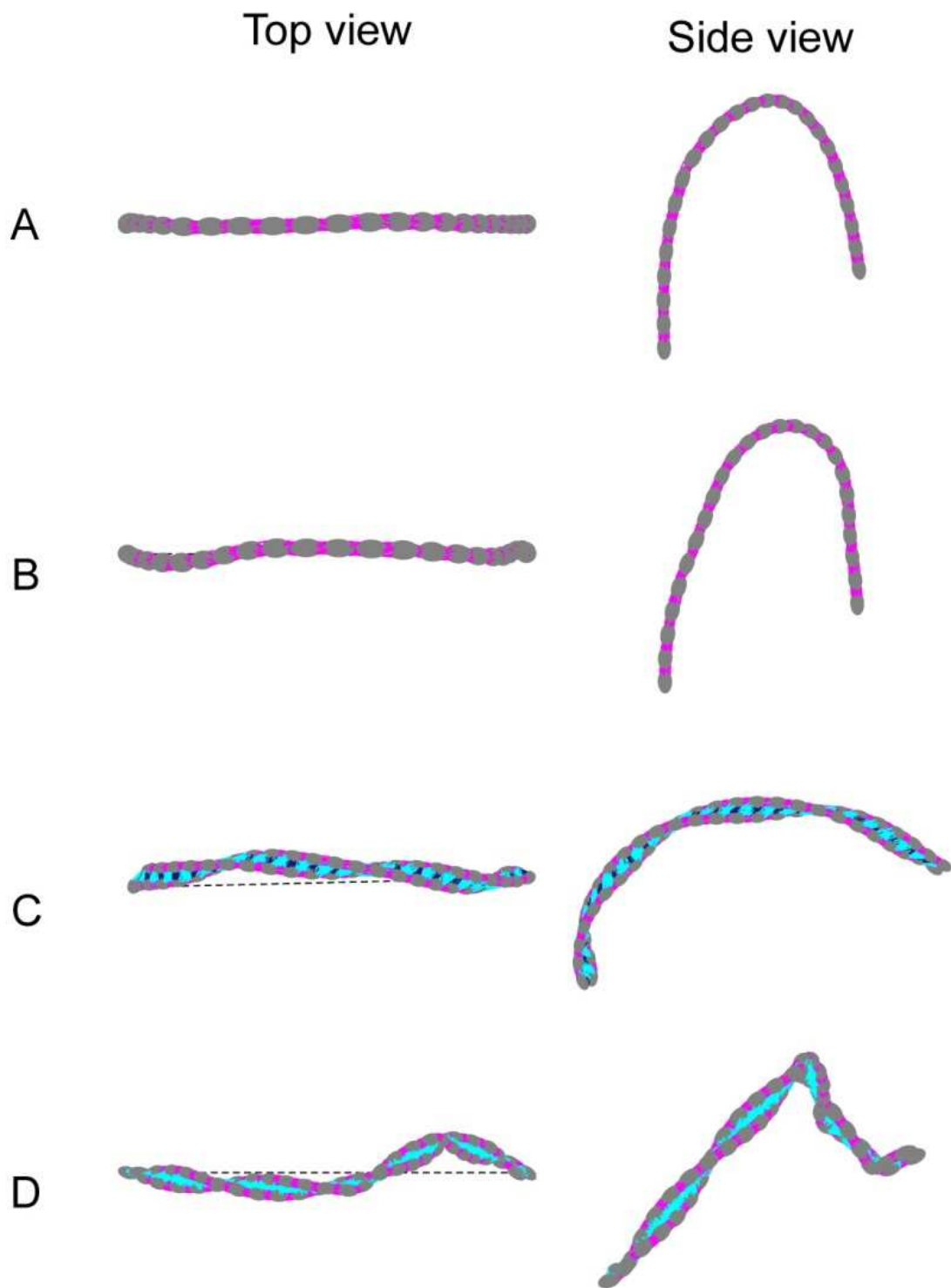


Figure 2

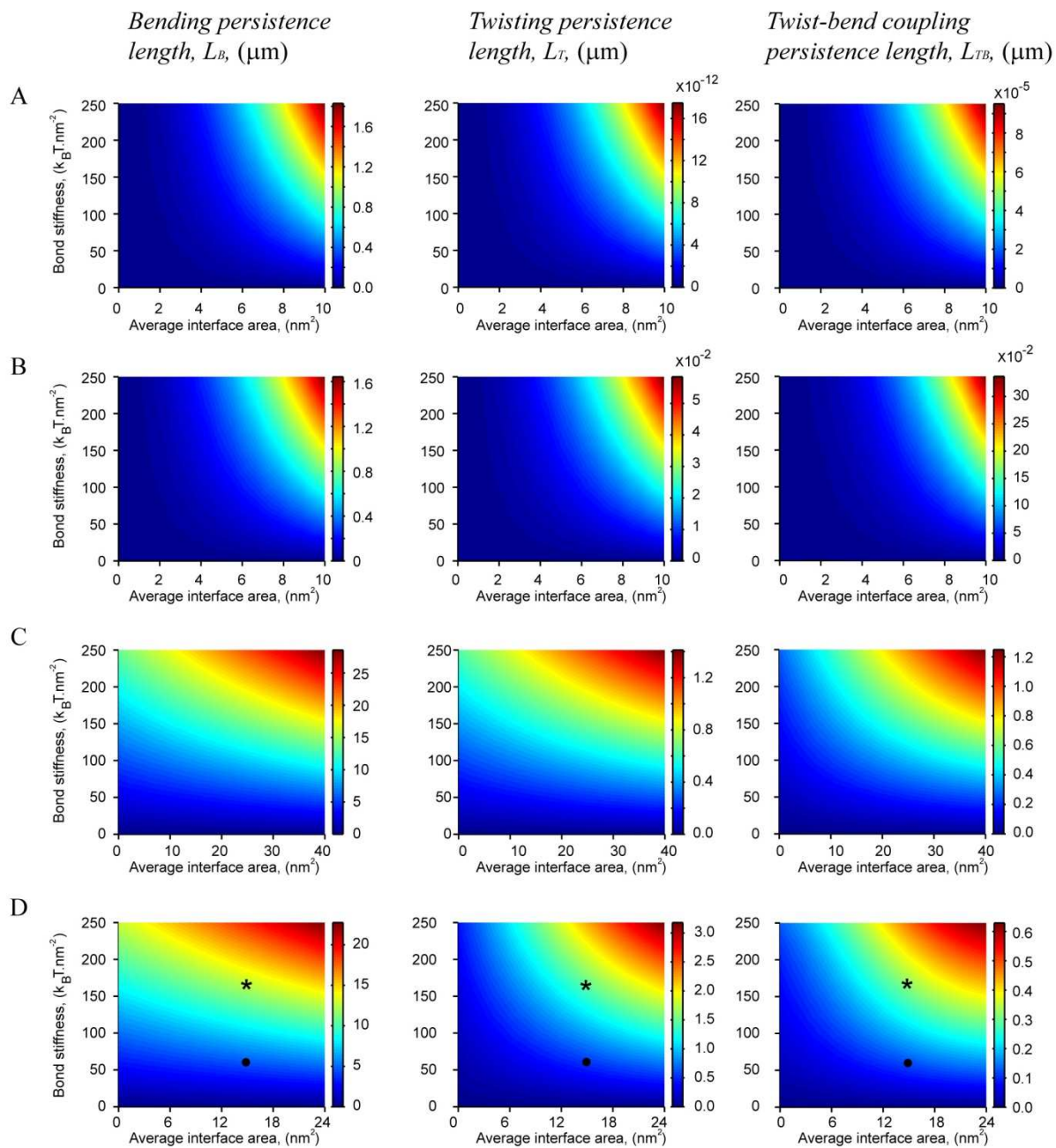


Figure 3

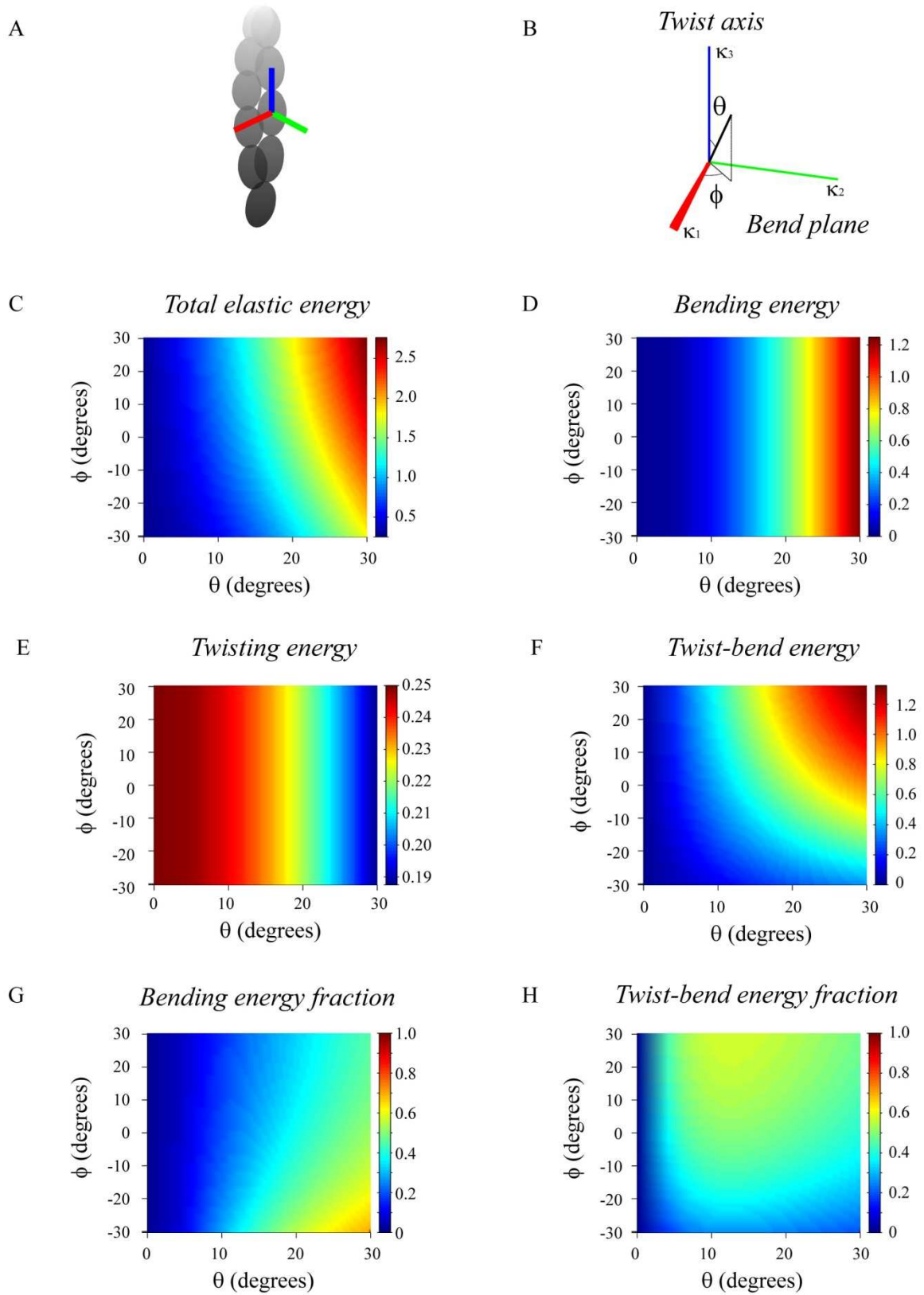


Figure 4

Chapitre 8

Modèle continu pour le filament d'actine : intégration du couplage flexion/torsion

1 Contexte biologique

1.1 Fragmenter le filament d'actine

Après avoir étudié les effets de l'ADF/Cofiline sur le filament d'actine (Partie II), nous nous intéressons ici aux bases mécaniques de la fragmentation des filaments. Nous pouvons résumer ce que nous avons appris en deux points principaux :

- **La décoration des filaments par l'ADF/Cofiline n'est pas uniforme** (chapitre 6 de ce manuscrit). A l'échelle moléculaire, des interfaces apparaissent entre sous-unités décorées et non décorées (chapitre 6, figure 6.8). A l'échelle du filament, le "cap" présent à l'extrémité barbée est protégé de la fragmentation contrairement aux parties anciennes du filament (chapitre 6, figure 6.8). Or l'ADF/Cofiline modifie les propriétés mécaniques du filament d'actine, en particulier la rigidité en flexion et en torsion (Prochniewicz et al., 2005; McCullough et al., 2008).
Combinés, ces deux effets impliquent une hétérogénéité des propriétés physiques dans un même filament, les parties décorées étant plus souples que les parties non-décorées. Ces interfaces sont considérées comme les sites les plus plausibles de fragmentation (De La Cruz, 2009; McCullough et al., 2008), il est donc naturel de chercher une des causes de la fragmentation dans cette hétérogénéité des propriétés mécaniques induite par l'ADF/Cofiline.
- **Flexion et torsion sont couplés chez le filament d'actine** (chapitre 7 de ce manuscrit). La fragmentation a souvent été reliée à la torsion du filament (McGough et al., 1997), ce qui peut sembler contradictoire avec le comportement *in vitro* des filaments : ces derniers se fragmentent sous l'influence du bruit thermique. Or ces forces aléatoires se traduisent simplement par des ondulations de flexions, qui se manifestent sur de grandes distances le long du filament (quelques microns) et ne peuvent, à elles seules, rendre compte de la fragmentation. Un couplage entre flexion et torsion permet d'apporter une réponse, puisque cette flexion va être partiellement convertie en torsion par le biais du couplage.

Dans ce chapitre nous développons un modèle mécanique qui incorpore ces deux aspects : nous montrons que le couplage flexion/torsion génère un stress de cisaillement interne au

filament, tandis que la décoration par ADF/Cofilin accumule ce stress aux interfaces entre les parties décorées et non-décorées du filament.

1.2 Un modèle 3D continu

Le modèle que nous développons dans cette partie est basé sur les équations de Kirchhoff pour le bâtonnet élastique et inextensible. Un filament est un polymère semi-flexible qui peut subir des déformations sous l'action de contraintes extérieures. Voici quelques unes des caractéristiques de ce modèle :

- La plupart des modèles mécaniques pour le filament considèrent un flambage en 2 dimensions, en accord avec les observations de microscopie à onde évanescente. Nous souhaitons modéliser la déformation des filaments en toute généralité, y compris leur torsion : ceci peut les amener à flamber hors du plan, nécessitant un modèle en 3 dimensions.
- En cohérence avec le point précédent, nous incorporons la torsion ainsi que le couplage entre flexion et torsion dans notre étude.
- La présence d'ADF/Cofilin est modélisée par des changements dans les propriétés physiques du filament, en particulier dans la longueur de persistance en flexion L_B , la longueur de torsion L_T et le couplage entre flexion et torsion L_{TB} ¹. En d'autres termes, L_B , L_T et L_{TB} ne sont plus des constantes mais dépendent de la présence d'ADF/Cofilin le long du filament.
- La fragmentation des filaments se produit *in vitro* en présence de simples fluctuations thermiques. Nous introduisons ce bruit dans le modèle sous la forme de forces aléatoires qui viennent perturber le filament et l'éloigner de sa configuration d'équilibre.

2 Description du modèle

2.1 Définitions et notations

Un filament est décrit à l'aide d'une variable s , l'abscisse curviligne, qui varie entre 0 (la première extrémité du filament) et L (la longueur totale du filament). En tout point du filament repéré par son abscisse s , on peut définir un vecteur position $r(s)$ ainsi qu'une base locale $B(s)$:

$$(\vec{r}(s), B(s)),$$

où $\vec{r}(s)$ est le vecteur position associé à ce point s sur le filament, avec :

$$\vec{r}(s) = \begin{pmatrix} x(s) \\ y(s) \\ z(s) \end{pmatrix},$$

où $x(s), y(s), z(s)$ sont les coordonnées cartésiennes de ce point dans le repère classique du laboratoire $R_{lab} = (O, \vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3)$ (figure 8.1). La base locale $B(s)$ elle, permet de représenter la conformation du filament au point s et est composée de 3 vecteurs :

$$B(s) = (\vec{d}_1(s), \vec{d}_2(s), \vec{d}_3(s)).$$

Le vecteur $\vec{d}_3(s)$ est le vecteur tangent à l'axe du filament, tandis que les vecteurs $\vec{d}_1(s)$ et $\vec{d}_2(s)$ sont orthogonaux à $\vec{d}_3(s)$, de manière à former une base directe. $\vec{d}_1(s)$ et $\vec{d}_2(s)$ sont

1. B , T et TB font référence à "Bending" (flexion), "Twisting" (torsion) et "Twist-Bend" (flexion-torsion).

liés à la section du filament et permettent de rendre compte de la distribution non-isotrope de la masse dans le filament (8.1 section du filament).

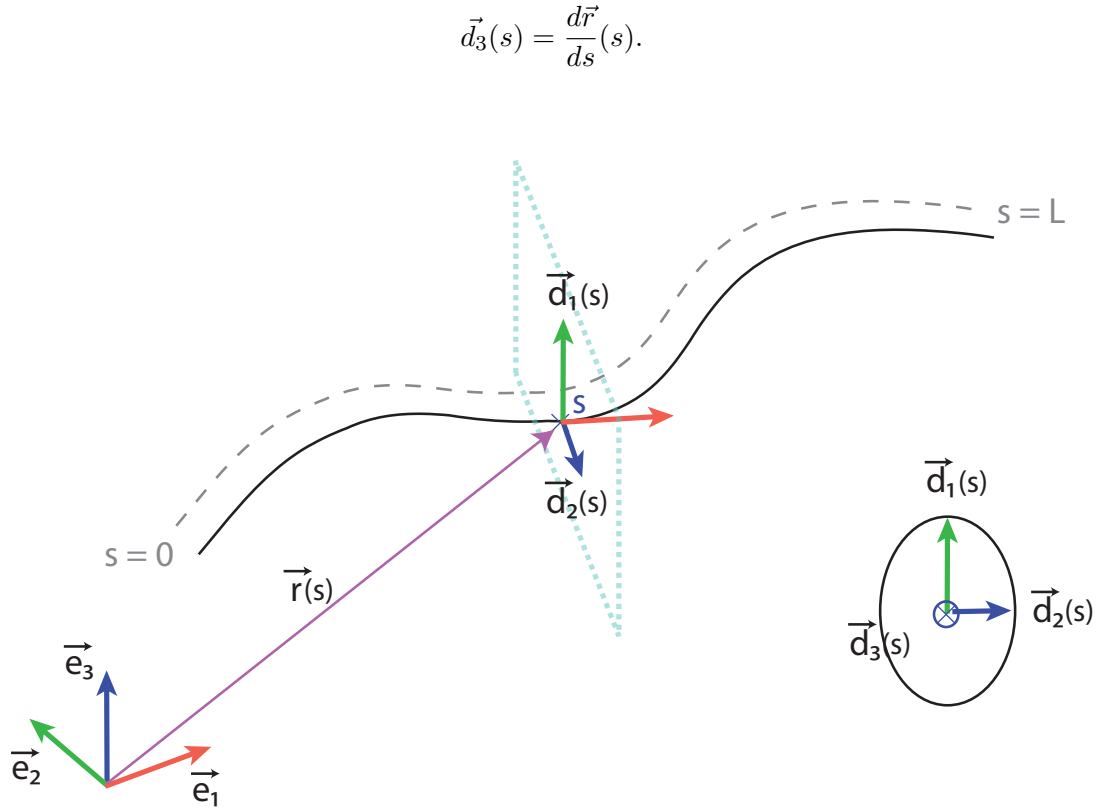


FIGURE 8.1 – **Modèle continu pour la déformation du filament d’actine.** Le filament (en noir) est modélisé comme un bâtonnet élastique. Chaque point est identifié par son abscisse curviligne s (abscisse curviligne en gris) variant entre 0 et L (les deux extrémités). Sa position est définie par un vecteur $\vec{r}(s)$ (en violet). L’orientation du filament en s est définie par le repère local constitué de 3 vecteurs $\vec{d}_1(s), \vec{d}_2(s), \vec{d}_3(s)$, avec $\vec{d}_3(s)$ tangent à l’axe du filament. Les vecteurs $\vec{d}_1(s)$ et $\vec{d}_2(s)$ sont dans le plan orthogonal à $\vec{d}_3(s)$ (bleu clair). Le repère global $\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3$ permet de définir la position globale du filament

Cette base locale va nous permettre d’exprimer simplement les déformations élastiques du filament (figure 8.2). En effet, toute variation de $\vec{d}_3(s)$ correspond à une flexion du filament, tandis qu’une variation des vecteurs $\vec{d}_1(s)$ et $\vec{d}_2(s)$ ne change pas l’axe du filament mais imprime une torsion à ce dernier.

Illustrons ceci à l’aide d’un exemple simple : en un point s du filament, le repère $(\vec{d}_1(s), \vec{d}_2(s), \vec{d}_3(s))$ a une certaine configuration. En $s + ds$, la conformation du filament a changé, et ce repère a changé aussi, subissant une rotation R . Cette rotation se fait autour d’un axe, représenté par le vecteur \vec{u} , avec un angle α égal à $\alpha_0 ds$, où α_0 est le taux de rotation autour de \vec{u} au point s (exprimé en radians. μm^{-1}). L’angle final α de la rotation est donc intrinsèquement dépendant de ds , la distance parcourue le long du filament.

$$R(\vec{u}, \alpha) \text{ avec : } \|\vec{u}\| = 1 \text{ et } \vec{u} = \begin{pmatrix} u_1 \\ u_2 \\ u_3 \end{pmatrix}_{B(s)} .$$

Soit K la matrice définie sur $B(s)$ par :

$$K = \begin{pmatrix} 0 & -u_3 & u_2 \\ u_3 & 0 & -u_1 \\ -u_2 & u_1 & 0 \end{pmatrix}.$$

La rotation R peut s'exprimer simplement sous la forme d'une matrice qui fait intervenir la matrice K et l'angle α :

$$R = I + \sin(\alpha) K + (1 - \cos(\alpha)) K^2.$$

Avec I la matrice identité. En supposant que ds est suffisamment petit, α l'est aussi. On peut donc simplifier l'expression de R par :

$$\begin{aligned} R &\approx I + \alpha K + \frac{\alpha^2}{2} K^2 + O(\alpha^3) \\ R &\approx I + \alpha K + O(\alpha^2). \end{aligned}$$

Par cette rotation, on passe de $\vec{d}_i(s)$ à $\vec{d}_i(s + ds)$. On a donc :

$$\begin{aligned} \vec{d}_i(s + ds) &= R \vec{d}_i(s) \\ &= (I + \alpha K) \vec{d}_i(s) + O(\alpha^2). \end{aligned}$$

On rappelle que α est dépendant de ds par la relation $\alpha = \alpha_0 ds$.

$$\begin{aligned} \vec{d}_i(s + ds) &= (I + \alpha K) \vec{d}_i(s) + O(\alpha^2) \\ &= (I + ds \alpha_0 K) \vec{d}_i(s) + O(\alpha^2) \\ &= \vec{d}_i(s) + ds \alpha_0 K \vec{d}_i(s) + O(\alpha^2), \end{aligned}$$

que l'on peut finalement mettre sous la forme, après passage à la limite ($ds \rightarrow 0$)

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{d}_i(s)}{ds} &= \alpha_0 K \vec{d}_i(s) \\ &= \vec{\kappa}(s) \times \vec{d}_i(s), \end{aligned}$$

où $\vec{\kappa}(s)$ est le vecteur de rotation équivalent à l'application de la matrice K . Ce vecteur $\vec{\kappa}(s)$ est colinéaire à \vec{u} et de norme α_0 . $\vec{\kappa}(s)$ s'écrit simplement dans la base locale sous la forme :

$$\vec{\kappa}(s) = \kappa_1(s) \vec{d}_1(s) + \kappa_2(s) \vec{d}_2(s) + \kappa_3(s) \vec{d}_3(s),$$

avec $\kappa_i(s) = \alpha_0 \vec{u} \cdot \vec{d}_i(s)$. Ainsi, chaque composante de $\vec{\kappa}(s)$ correspond à la composante de la rotation autour du vecteur \vec{d}_i correspondant. Par exemple, si le vecteur de rotation $\vec{\kappa}(s)$ est porté uniquement par $\vec{d}_3(s)$, on a :

$$\vec{\kappa}(s) = \kappa_3(s) \vec{d}_3(s),$$

et l'application de cette rotation à notre base de vecteurs locaux donne :

$$\frac{d\vec{d}_1(s)}{ds} = \kappa_3(s) \vec{d}_3(s) \times \vec{d}_1(s) = -\kappa_3(s) \vec{d}_2(s)$$

$$\frac{d\vec{d}_2(s)}{ds} = \kappa_3(s) \vec{d}_3(s) \times \vec{d}_2(s) = \kappa_3(s) \vec{d}_1(s)$$

$$\frac{d\vec{d}_3(s)}{ds} = \kappa_3(s) \vec{d}_3(s) \times \vec{d}_3(s) = 0.$$

En d'autres termes, la rotation laisse $\vec{d}_3(s)$ inchangé, c'est à dire que cette rotation ne va pas modifier la direction du filament (figure 8.2, (B)). La rotation représentée par ce $\vec{\kappa}(s)$ induit donc une torsion du matériel entre les points s et $s + ds$. A l'inverse, une rotation portée uniquement par les vecteurs $\vec{d}_1(s)$ et $\vec{d}_2(s)$ laissera ces mêmes vecteurs inchangés et sera donc associée à de la flexion pour le même matériel entre s et $s + ds$ (figure 8.2, (A)).

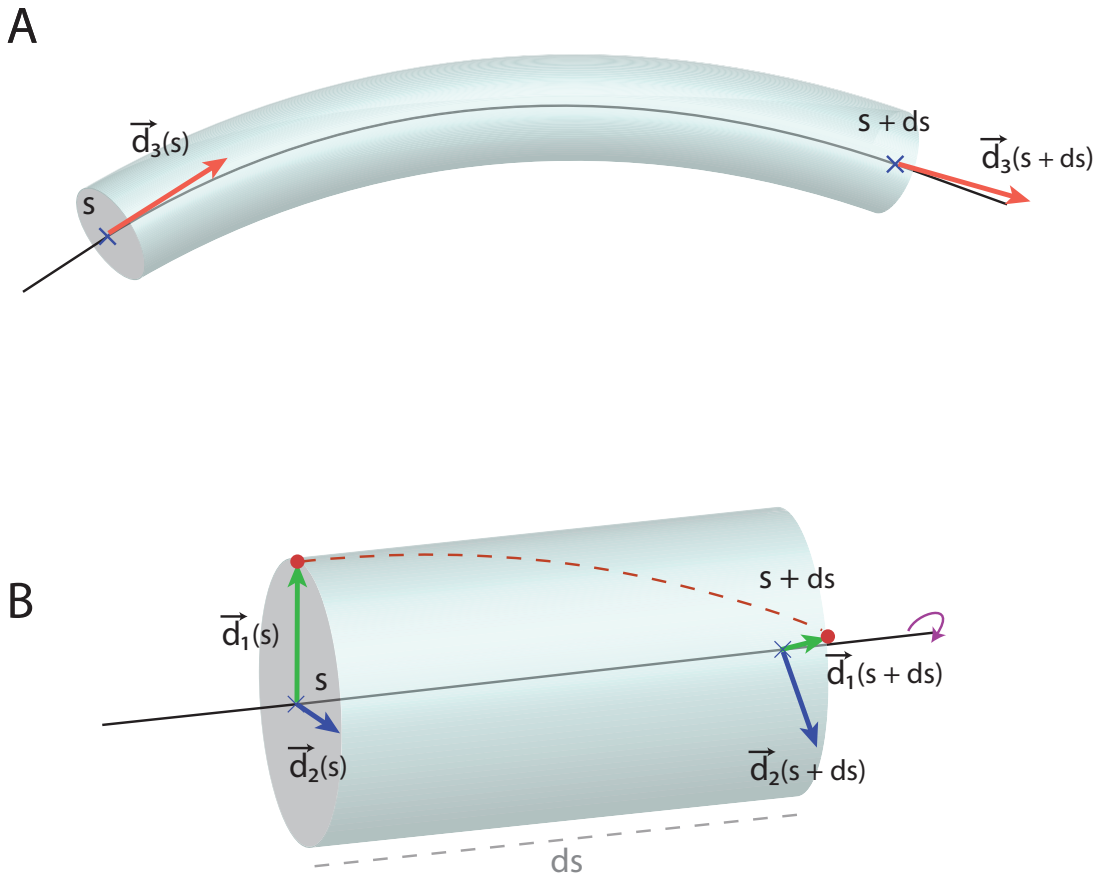


FIGURE 8.2 – Déformations du filament d'actine. (A) Déformation en flexion : le filament est représenté par un petit cylindre de matière ds (dont nous exagérons la taille ici). Entre s et $s + ds$, l'orientation du filament change : le vecteur \vec{d}_3 subit une rotation. (B) Déformation en torsion : l'axe du filament ne change pas (ligne noire) ni le vecteur \vec{d}_3 (non représenté car confondu avec l'axe). Par contre, le petit cylindre de matière subit une torsion (flèche violette) qui va déplacer le vecteur \vec{d}_1 le long de la trajectoire en pointillés rouges. Le vecteur \vec{d}_2 subit la même rotation.

2.2 Lagrangien du système

Nous listons ici les contributions à l'énergie élastique du filament.

Énergie potentielle élastique

Les déformations que nous avons décrites au-dessus ont un coût en terme d'énergie élastique. Ce coût peut être relié à cette déformation en introduisant \vec{m} , le moment élastique associé. Considérons à nouveau une portion ds du filament qui a subi une déformation. Le repère local subit entre s et $s + ds$ une rotation portée par le vecteur $\vec{\kappa}(s)$. Par analogie avec la cinématique du corps solide en rotation, on définit le vecteur $\vec{m}(s)$:

$$\vec{m}(s) = \beta_B \left(\kappa_1(s) \vec{d}_1(s) + \kappa_2(s) \vec{d}_2(s) \right) + \beta_T \kappa_3(s) \vec{d}_3(s),$$

Comme le vecteur moment associé à la déformation entre les points s et $s + ds$. Avec :

$$\begin{aligned} \beta_B &= k_B T L_B \\ \beta_T &= k_B T L_T, \end{aligned}$$

et $k_B T$ représente la constante de Boltzmann multipliée par la température, L_B la longueur de persistance et L_T la longueur de torsion. L'énergie élastique contenue dans la section ds du filament peut s'exprimer en fonction de ce moment et de la rotation autour du vecteur $\vec{\kappa}(s)$ de la façon suivante :

$$E_{\text{el}} = \frac{ds}{2} \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s).$$

L'énergie élastique totale stockée dans la configuration du filament s'obtient naturellement en intégrant cette quantité sur tout le filament.

$$E_1 = \frac{1}{2} \int_0^L \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) ds$$

Inextensibilité du filament

Nous décrivons ici le filament d'actine comme un polymère quasi inextensible. Cette contrainte se traduit par un force interne \vec{F} qui assure, en chaque point s du filament, que la contrainte :

$$\frac{d\vec{r}(s)}{ds} - \vec{d}_3(s) = 0$$

est bien respectée. Pour cela, on introduit le vecteur $\vec{F}(s)$ comme un multiplicateur de Lagrange. La contribution à l'énergie potentielle du filament s'écrit :

$$E_{\text{interne}} = \vec{F}(s) \cdot \left(\frac{d\vec{r}(s)}{ds} - \vec{d}_3(s) \right).$$

Ce facteur permet de "pénaliser" toute déviation de la contrainte d'inextensibilité. La contrainte totale s'obtient en intégrant cette quantité sur tout le filament.

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

Le Lagrangien complet du système s'obtient alors en faisant la différence de l'énergie cinétique et de l'énergie potentielle. Comme les deux termes calculés relèvent tous les deux de l'énergie potentielle, on a :

$$\begin{aligned} L[\vec{m}, \vec{\kappa}, \vec{F}, \vec{r}] &= -E_1 - E_2 \\ &= -\frac{1}{2} \int_0^L \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) ds - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \left(\frac{d\vec{r}(s)}{ds} - \vec{d}_3(s) \right) ds. \end{aligned}$$

2.3 Obtention des équations du système

Nous appliquons ici un principe général en physique : le principe variationnel. Les configurations d'équilibre du filament sont des configurations pour lesquelles des variations très faibles de la configuration de base laissent le Lagrangien inchangé. Le Lagrangien apparaît comme une fonctionnelle, c'est à dire une fonction de fonctions (comme la position, l'orientation du repère local, la force interne) qui dépendent elles-mêmes de s , l'abscisse curviligne. Nous allons appliquer une variation à chacune de ces fonctions et en déduire les équations correspondantes en contraignant le Lagrangien à rester invariant.

Variation du vecteur position

Introduisons une perturbation du vecteur position sous la forme :

$$\vec{r}(s) = \vec{r}(s) + \delta\vec{r}(s),$$

avec la perturbation $\delta\vec{r}(s)$ telle que $\delta\vec{r}(0) = \delta\vec{r}(L) = 0$. Notons $L[\vec{r} + \delta\vec{r}]$ le Lagrangien modifié par cette perturbation. Notez que nous ne faisons pas apparaître la dépendance du Lagrangien aux autres fonctions car nous ne les perturbons pas. Pour ne pas confondre les perturbations appliquées aux fonctions et leur dérivées par rapport à s , notons $(\prime) = \left(\frac{d}{ds}\right)$. On a alors :

$$\begin{aligned} L[\vec{r} + \delta\vec{r}] &= -\frac{1}{2} \int_0^L \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) ds - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \left(\vec{r}'(s) + \delta\vec{r}'(s) - \vec{d}_3(s) \right) ds \\ &= -\frac{1}{2} \int_0^L \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) ds - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \left(\vec{r}'(s) - \vec{d}_3(s) \right) ds + \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \delta\vec{r}'(s) ds \\ &= L[\vec{r}] - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \delta\vec{r}'(s) ds. \end{aligned}$$

Par intégration par parties :

$$\begin{aligned} L[\vec{r} + \delta\vec{r}] &= L[\vec{r}] - \left[\vec{F}(s) \cdot \delta\vec{r}(s) \right] + \int_0^L \vec{F}'(s) \cdot \delta\vec{r}(s) ds \\ &= L[\vec{r}] - \vec{F}(L) \cdot \delta\vec{r}(L) + \vec{F}(0) \cdot \delta\vec{r}(0) + \int_0^L \vec{F}'(s) \cdot \delta\vec{r}(s) ds \\ &= L[\vec{r}] + \int_0^L \vec{F}'(s) \cdot \delta\vec{r}(s) ds, \end{aligned}$$

car $\delta\vec{r}(0) = \delta\vec{r}(L) = 0$. On a donc :

$$\delta L[\vec{r}] = \int_0^L \vec{F}'(s) \cdot \delta\vec{r}(s) ds.$$

On applique alors simplement le lemme fondamental du calcul des variations et on en déduit que :

$$\frac{d\vec{F}(s)}{ds} = 0 \quad (8.1)$$

en tout point s , $s \in [0, L]$

Variation de la force interne

L'application de ce même principe variationnel, mais en introduisant une perturbation sur la force cette fois-ci, nous donne :

$$\begin{aligned} L[\vec{F} + \delta\vec{F}] &= -\frac{1}{2} \int_0^L \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) ds + \int_0^L \left(\vec{F}(s) + \delta\vec{F}(s) \right) \cdot \left(\vec{r}(s) - \vec{d}_3(s) \right) ds \\ &= L[\vec{F}] + \int_0^L \delta\vec{F}(s) \cdot \left(\vec{r}(s) - \vec{d}_3(s) \right) ds. \end{aligned}$$

Et l'application de ce même lemme nous donne :

$$\frac{d\vec{r}(s)}{ds} = \vec{d}_3(s). \quad (8.2)$$

Variation liée au vecteur $\vec{\kappa}(s)$

La variation liée à ce vecteur est plus complexe à exprimer, car le vecteur de rotation $\vec{\kappa}(s)$ et le repère local sont liés. Les variations de l'un ont un effet sur les variations de l'autre. Nous allons donc traiter simultanément le cas d'une perturbation sur les vecteurs $\vec{d}_i(s)$ du repère local et sur le vecteur $\vec{\kappa}(s)$.

Pour donner une expression plus simple de nos calculs, supposons une fonction vectorielle dérivable $\delta\vec{X}(s)$ et posons $\delta\vec{d}_i(s)$:

$$\delta\vec{d}_i(s) = \delta\vec{X}(s) \times \vec{d}_i(s).$$

Nous voulons maintenant perturber le vecteur $\vec{\kappa}(s)$. Pour cela, nous introduisons une perturbation sur les composantes $\kappa_{i,i=1..3}(s)$ (les composantes du vecteur $\vec{\kappa}(s)$ dans le repère local) sous la forme :

$$\delta\kappa_{i,i=1..3}(s) = \delta X'_{i,i=1..3}(s).$$

On peut alors exprimer la perturbation complète appliquée au vecteur $\vec{\kappa}(s)$. Rappelons que :

$$\vec{\kappa}(s) = \kappa_1(s) \vec{d}_1(s) + \kappa_2(s) \vec{d}_2(s) + \kappa_3(s) \vec{d}_3(s).$$

$\vec{\kappa}(s)$ dépend des composantes $\kappa_{i,i=1..3}(s)$ et des vecteurs $\vec{d}_{i,i=1..3}(s)$. C'est pourquoi la perturbation totale de $\vec{\kappa}(s)$ fait intervenir les perturbations sur ses composantes propres mais aussi sur les vecteurs $\vec{d}_{i,i=1..3}(s)$. On a :

$$\begin{aligned} \delta\vec{\kappa}(s) &= \sum_i \delta\kappa_i(s) \vec{d}_i(s) + \sum_i \kappa_i(s) \delta\vec{d}_i(s) \\ &= \sum_i \delta X'_i(s) \vec{d}_i(s) + \sum_i \kappa_i(s) \delta\vec{X}(s) \times \vec{d}_i(s) \\ &= \delta\vec{X}'(s) + \delta\vec{X}(s) \times \vec{\kappa}(s). \end{aligned}$$

Désormais, nous pouvons introduire les perturbations des vecteurs $\vec{\kappa}(s)$ et $\vec{d}_i(s)$ conjointement dans le Lagrangien :

$$\begin{aligned} L[\vec{\kappa}(s) + \delta\vec{\kappa}(s); \vec{d}_i(s) + \delta\vec{d}_i(s)] &= -\frac{1}{2} \int_0^L A(\vec{\kappa}(s) + \delta\vec{\kappa}(s)) \cdot (\vec{\kappa}(s) + \delta\vec{\kappa}(s)) ds \\ &\quad - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \left(\frac{d\vec{r}(s)}{ds} - (\vec{d}_3(s) + \delta\vec{d}_3(s)) \right) ds, \end{aligned}$$

où $\vec{m}(s) = A \vec{\kappa}(s)$ avec :

$$A = \begin{pmatrix} \beta_B & 0 & 0 \\ 0 & \beta_B & 0 \\ 0 & 0 & \beta_T \end{pmatrix}_{B(s)}.$$

Ainsi :

$$\begin{aligned} \delta L[\vec{\kappa}(s) + \delta\vec{\kappa}(s); \vec{d}_i(s) + \delta\vec{d}_i(s)] &= -\frac{1}{2} \int_0^L (A\delta\vec{\kappa}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) + A\vec{\kappa}(s) \cdot \delta\vec{\kappa}(s)) ds \\ &\quad - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \delta\vec{d}_3(s) ds + O(|\delta\kappa|^2) \end{aligned}$$

Afin de simplifier notre notation, utilisons simplement la notation δL :

$$\begin{aligned} \delta L &= -\frac{1}{2} \int_0^L (\delta\vec{\kappa}(s) \cdot A^T \vec{\kappa}(s) + \delta\vec{\kappa}(s) \cdot (A\vec{\kappa}(s))) ds \\ &\quad - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \delta\vec{d}_i(s) ds + O(|\delta\kappa|^2) \\ &= -\int_0^L (\delta\vec{\kappa}(s) \cdot A\vec{\kappa}(s)) ds - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \delta\vec{d}_3(s) ds \quad \text{car } A^T = A. \end{aligned}$$

Introduisons maintenant les expressions de $\delta\vec{\kappa}(s)$ et de $\delta\vec{d}_i(s)$:

$$\begin{aligned} \delta L &= -\int_0^L \left(\delta\vec{X}'(s) \cdot A\vec{\kappa}(s) + \delta\vec{X}(s) \times \vec{\kappa}(s) \cdot (A\vec{\kappa}(s)) \right) ds \\ &\quad - \int_0^L \vec{F}(s) \cdot \left(\delta\vec{X} \times \vec{d}_3(s) \right) ds. \end{aligned}$$

Or, à partir de l'identité vectorielle $a \cdot (b \times c) = (a \times b) \cdot c$, on a :

$$\begin{aligned} \delta L &= -\int_0^L \left(\delta\vec{X}'(s) \cdot A\vec{\kappa}(s) - \delta\vec{X}(s) \cdot (\vec{\kappa}(s) \times A\vec{\kappa}(s)) \right) ds \\ &\quad + \int_0^L \left(\vec{F}(s) \times \vec{d}_3(s) \right) \cdot \delta\vec{X} ds. \end{aligned}$$

Enfin, après intégration par parties, nous avons :

$$\begin{aligned}
\delta L &= + \int_0^L \left(\delta \vec{X}(s) \cdot (A\vec{\kappa}(s))' + \delta \vec{X}(s) \cdot (\vec{\kappa}(s) \times A\vec{\kappa}(s)) \right) ds \\
&\quad - \int_0^L \left(\vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s) \right) \cdot \delta \vec{X} ds \\
&= \int_0^L \left(\delta \vec{X}(s) \cdot (A\vec{\kappa}(s))' + \delta \vec{X}(s) \cdot (\vec{\kappa}(s) \times A\vec{\kappa}(s)) - \left(\vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s) \right) \cdot \delta \vec{X} \right) ds \\
&= \int_0^L \left((A\vec{\kappa}(s))' + \vec{\kappa}(s) \times A\vec{\kappa}(s) - \vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s) \right) \cdot \delta \vec{X} ds \\
&= \int_0^L \left(\vec{m}'(s) - \vec{m}(s) \times \vec{\kappa}(s) - \vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s) \right) \cdot \delta \vec{X} ds.
\end{aligned}$$

Et nous obtenons :

$$\vec{m}'(s) = \vec{m}(s) \times \vec{\kappa}(s) + \vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s).$$

En résumé : ces équations constituent le système différentiel que nous utiliserons dans ce modèle

$$\begin{cases}
\vec{F}'(s) &= 0 \\
\vec{r}'(s) &= \vec{d}_3(s) \\
\vec{d}_i'(s) &= \vec{\kappa}(s) \times \vec{d}_i(s) \\
\vec{m}'(s) &= \vec{m}(s) \times \vec{\kappa}(s) + \vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s).
\end{cases}$$

2.4 Représentation à l'aide des quaternions

Les équations précédentes sont indépendantes de la représentation choisie pour le vecteur de rotation $\vec{\kappa}(s)$ comme pour les vecteurs $\vec{d}_i(s)$ du repère local. Il existe plusieurs méthodes pour paramétrer ces rotations dans un espace en 3 dimensions, la plus commune étant celle des angles d'Euler. Néanmoins cette représentation présente un défaut majeur : les angles d'Euler sont connus pour laisser apparaître des singularités dans certains cas. Notre modèle a pour vocation de présenter les déformations du filament en toute généralité, nous ne pouvons donc pas choisir une représentation qui limite la rotation du repère local dans certains cas particuliers.

Pour cette raison, nous avons choisi de représenter les rotations à l'aide de quaternions. Les problèmes de singularités disparaissent, mais les équations présentées ci-dessus sont nettement moins intuitives que lorsqu'elles sont exposées avec les angles d'Euler.

Nous introduisons un quaternion $q = (q_1, q_2, q_3, q_4)^T$ tel que :

$$\begin{aligned}
q \cdot q &= q_1^2 + q_2^2 + q_3^2 + q_4^2 = 1. \\
q &= q_1 i + q_2 j + q_3 k + q_4 \quad \text{avec } i^2 = j^2 = k^2 = -1.
\end{aligned}$$

Ainsi, la rotation D qui permet de passer du repère global $(\vec{e}_1, \vec{e}_2, \vec{e}_3)$ au repère local $B(s) = (\vec{d}_1(s), \vec{d}_2(s), \vec{d}_3(s))$ s'exprime sous forme matricielle :

$$D = \begin{pmatrix} q_1^2 - q_2^2 - q_3^2 + q_4^2 & 2(q_1q_2 + q_3q_4) & 2(q_1q_3 - q_2q_4) \\ 2(q_1q_2 - q_3q_4) & -q_1^2 + q_2^2 - q_3^2 + q_4^2 & 2(q_1q_4 + q_2q_3) \\ 2(q_1q_3 + q_2q_4) & 2(-q_1q_4 + q_2q_3) & -q_1^2 - q_2^2 + q_3^2 + q_4^2 \end{pmatrix}.$$

Comme on peut s'en apercevoir, les quaternions ne permettent pas une compréhension de l'effet de la rotation aussi immédiate que celle des angles d'Euler (où les angles θ , ϕ et ψ se visualisent aisément). C'est pourquoi nous avons tenu à conserver dans ce manuscrit une forme générale pour nos équations qui fait abstraction de la représentation choisie pour les rotations.

3 Conditions aux bords

Pour résoudre le système différentiel précédent, nous devons fixer des conditions aux bords, c'est à dire aux deux extrémités du filament d'actine, en $s = 0$ et en $s = L$. Ces conditions vont changer en fonction de ce que nous souhaitons modéliser. Nous présentons ici ces différentes conditions.

3.1 Contraintes sur les positions et forces

Fixer la position du filament aux extrémités nous permet de déterminer en retour la force exercée par le filament. Inversement, fixer la force exercée sur le filament à ses extrémités nous permet de déterminer leur position.

Fixer les positions

Les extrémités du filament sont contraintes à rester fixes aux points de coordonnées (x_0, y_0, z_0) en $s = 0$ et x_L, y_L, z_L en $s = L$.

$$\begin{aligned} x(0) &= x_0, & x(L) &= x_L \\ y(0) &= y_0, & y(L) &= y_L \\ z(0) &= z_0, & z(L) &= z_L \end{aligned}$$

Fixer les forces

On peut préférer fixer la force aux extrémités du filament, auquel cas la résolution du système différentiel nous donne la position pour laquelle cette force est atteinte.

$$\begin{aligned} F_x(0) &= F_{0x}, & F_x(L) &= F_{Lx} \\ F_y(0) &= F_{0y}, & F_y(L) &= F_{Ly} \\ F_z(0) &= F_{0z}, & F_z(L) &= F_{Lz} \end{aligned}$$

Où F_x , F_y et F_z sont les composantes de la force interne définie précédemment.

3.2 Contraintes sur les angles et les moments

De la même manière, nous pouvons fixer les angles à travers l'orientation du repère local $B(s)_{s=0; s=L}$, ou les moments à travers le vecteur $\vec{\kappa}(s)$.

Fixer les angles

On fixe l'orientation du repère local $B(s)_{s=0;s=L}$ en fixant les composantes du quaternion (figure 8.3, (A)).

$$\begin{aligned} q_1(0) &= q_{1;0}, & q_1(L) &= q_{1;L} \\ q_2(0) &= q_{2;0}, & q_2(L) &= q_{2;L} \\ q_3(0) &= q_{3;0}, & q_3(L) &= q_{3;L} \\ q_4(0) &= q_{4;0}, & q_4(L) &= q_{4;L} \end{aligned}$$

Fixer les moments

On fixe les moments en contraignant les composantes du vecteurs $\vec{\kappa}(s)$ (figure 8.3, (B)).

$$\begin{aligned} \kappa_1(0) &= k_{1;0}, & \kappa_1(L) &= k_{1;L} \\ \kappa_2(0) &= k_{2;0}, & \kappa_2(L) &= k_{2;L} \\ \kappa_3(0) &= k_{3;0}, & \kappa_3(L) &= k_{3;L} \end{aligned}$$

Par exemple, fixer $\kappa_1(0) = \kappa_2(0) = \kappa_3(0) = 0$ implique que $\frac{d\vec{d}_i(0)}{ds} = \vec{\kappa}(0) \times \vec{d}_i(0) = 0$ et les moments seront bien nuls en $s = 0$.

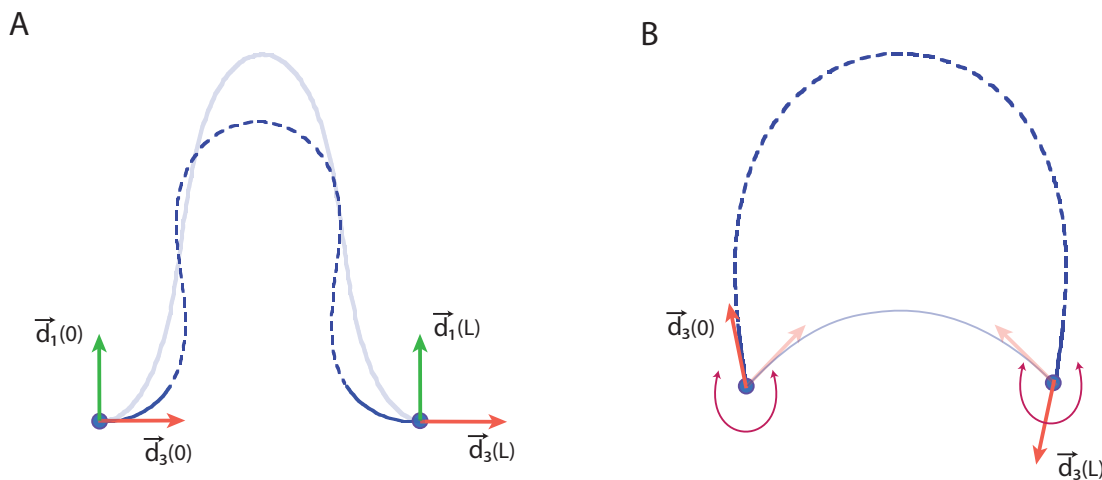


FIGURE 8.3 – **Conditions aux bords : angles et moments.** Les positions des deux extrémités sont fixées. On peut alors fixer les angles ou les moments. (A) L'angle du filament est fixé au moyen du repère local en $s = 0$ et $s = L$ (vecteur \vec{d}_3 en rouge). En pointillés l'une des configurations possibles du filament, en transparence une autre configuration valable. (B) Configurations obtenues dans le cas où l'angle du filament est laissé libre, comme le montrent les deux configurations présentées (pointillé et transparence) : l'angle formé par le vecteur \vec{d}_3 (rouge) change. Les moments sont fixés à 0, le filament a donc une courbure nulle à proximité des deux extrémités.

Ces conditions aux bords peuvent être combinées comme on le souhaite, en fixant par exemple les positions et les angles, les positions et les moments, ou encore les forces et les moments. Elles vont dépendre du système biologique que l'on souhaite modéliser.

4 Couplage flexion/torsion

4.1 Introduction du couplage flexion/torsion dans le modèle

Le couplage entre flexion et torsion intervient directement dans l'expression du moment élastique $\vec{m}(s)$. Nous avons défini $\vec{m}(s)$ comme :

$$\vec{m}(s) = A\vec{\kappa}(s) \quad \text{avec : } A = \begin{pmatrix} \beta_B & 0 & 0 \\ 0 & \beta_B & 0 \\ 0 & 0 & \beta_T \end{pmatrix}_{B(s)} \quad \text{Avec } A^T = A.$$

Le couplage entre flexion et torsion consiste à relier les déformations en flexion, liées à $\kappa_1(s)$ et $\kappa_2(s)$, aux déformations en torsion, liées à $\kappa_3(s)$. Pour cela, nous considérons un coefficient β_{TB} défini par :

$$\beta_{TB} = L_{TB} k_B T$$

Avec L_{TB} le couplage flexion torsion déterminé dans le chapitre 7. β_{TB} a les mêmes dimensions que β_B et β_T . La matrice A s'écrit désormais :

$$A = \begin{pmatrix} \beta_B & 0 & \beta_{TB} \\ 0 & \beta_B & \beta_{TB} \\ \beta_{TB} & \beta_{TB} & \beta_T \end{pmatrix}$$

Et l'énergie élastique contenue dans une petite section ds du filament s'écrit alors :

$$\begin{aligned} E_{el} &= \frac{ds}{2} \vec{m}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) \\ &= \frac{ds}{2} A \vec{\kappa}(s) \cdot \vec{\kappa}(s) \\ &= \frac{ds}{2} [\beta_B (\kappa_1^2(s) + \kappa_2^2(s)) + \beta_T \kappa_3^2(s)] \\ &\quad + 2 \frac{ds}{2} \beta_{TB} (\kappa_1(s)\kappa_3(s) + \kappa_2(s)\kappa_3(s)) \end{aligned}$$

On reconnaît dans la partie entre crochet l'expression classique de l'énergie élastique, la partie inférieure de l'égalité correspond aux termes qui apparaissent grâce au couplage. Ces termes permettent effectivement de lier $\kappa_1(s)$ et $\kappa_2(s)$ à $\kappa_3(s)$ dans le calcul de l'énergie élastique. Le Lagrangien est modifié en conséquence. L'équation $\vec{m}'(s) = \vec{m}(s) \times \vec{\kappa}(s) - \vec{d}_3(s) \times \vec{F}(s)$ est toujours valable, mais le moment élastique $\vec{m}(s)$ incorpore désormais les termes liés à ce couplage :

$$\begin{aligned} \vec{m}(s) &= A \vec{\kappa}(s) \\ &= \begin{pmatrix} \beta_B & 0 & \beta_{TB} \\ 0 & \beta_B & \beta_{TB} \\ \beta_{TB} & \beta_{TB} & \beta_T \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \kappa_1(s) \\ \kappa_2(s) \\ \kappa_3(s) \end{pmatrix} \\ &= \begin{pmatrix} \beta_B \kappa_1(s) + \beta_{TB} \kappa_3(s) \\ \beta_B \kappa_2(s) + \beta_{TB} \kappa_3(s) \\ \beta_T \kappa_3(s) + \beta_{TB} (\kappa_1(s) + \kappa_2(s)) \end{pmatrix} \end{aligned}$$

Le couplage apparaît clairement au travers des différentes composantes du moment élastique. Dans chaque composante, le premier terme est classique, mais un deuxième terme

apparaît en facteur de β_{TB} qui relie les moments en flexion à $\kappa_3(s)$, c'est à dire à la torsion et le moment de torsion aux moments de flexion ($\kappa_1(s)$ et $\kappa_2(s)$).

4.2 Quantifier les effets du couplage : simulations

Le couplage génère une torsion à partir d'un pur mouvement de flexion, et inversement. Afin de tester ce couplage, nous effectuons deux simulations du flambage de filaments d'actine, l'une en absence de couplage, l'autre avec un couplage équivalent à celui déterminé dans le chapitre 7.

Nous partons d'un filament ayant les caractéristiques suivantes :

Longueur totale	$10 \mu m$
Longueur de persistance	$9.1 \mu m$
Longueur de torsion	$0.5 \mu m$
Couplage flexion/torsion	0 (absence de couplage) ou $0.4 \mu m$

Nous fixons des conditions aux bords qui permettent de visualiser de façon indiscutable l'effet du couplage : en partant de la configuration initiale de repos (le filament est rectiligne), nous exerçons un mouvement de compression qui va rapprocher les deux extrémités du filament, tout en maintenant l'angle formé par le filament en $s = 0$ et $s = L$ colinéaire à \vec{e}_1 .

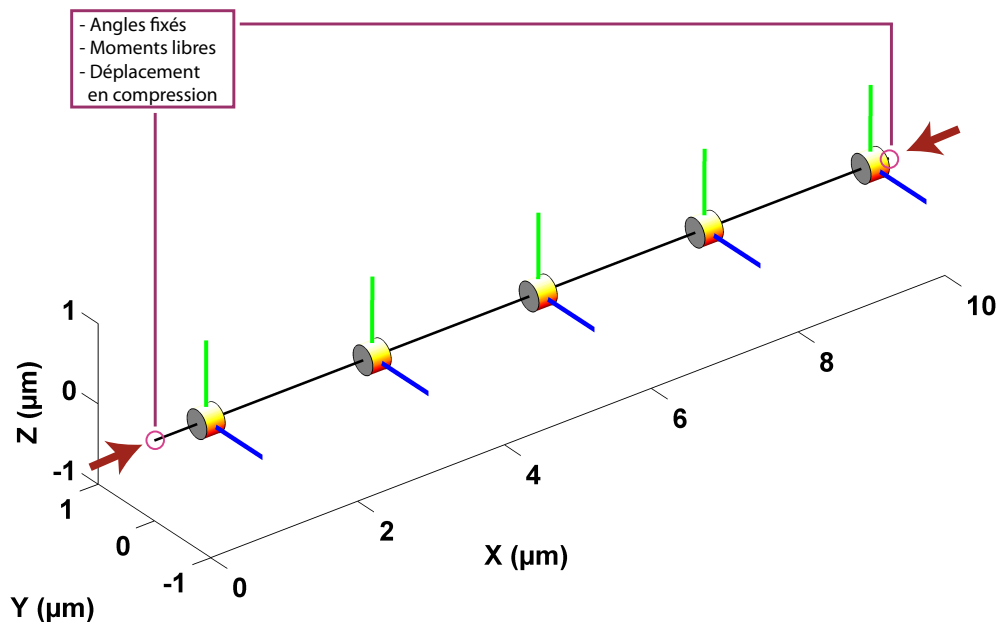


FIGURE 8.4 – Mise en évidence des effets du couplage. Un filament de $10 \mu m$ de longueur est modélisé. Les positions des deux extrémités sont fixées, ainsi que les angles. On applique un mouvement de compression en rapprochant progressivement les deux extrémités du filament (flèches marron). La torsion sera visible par la rotation des vecteurs $\vec{d}_1(s)$ (en vert) et $\vec{d}_2(s)$ (en bleu). Nous représentons cette rotation par un petit cylindre dont la couleur de tranche représente de façon simple ce mouvement de torsion.

Positions fixées

$$\begin{aligned} x(0) &= x_0, & x(L) &= x_L \\ y(0) &= y_0, & y(L) &= y_L \\ y(0) &= y_0, & y(L) &= y_L \end{aligned}$$

La position des extrémités est fixée. On déplace peu à peu la position en x de chaque extrémité pour les rapprocher l'une de l'autre.

Angles fixés

Dans le même temps, on fixe le quaternion en $s = 0$ et $s = L$. Le repère local B est fixé aux deux extrémités, avec $\vec{d}_3(s)$ colinéaire à \vec{e}_1 .

La figure 8.4 présente la configuration initiale du filament avant de démarrer cette compression. Notez bien que si la flexion est très facilement visible sur un filament, il n'en va pas de même pour les mouvements de torsion autour de l'axe principal. Afin de rendre ces mouvements visibles, nous plaçons en quelques points du filament une perle de forme cylindrique dont les couleurs codent pour l'orientation du repère local (par exemple, la tranche claire indique l'orientation du vecteur $\vec{d}_1(s)$). Bien évidemment, aucune torsion n'est présente dans la configuration de repos (le cylindre ne subit aucune rotation) mais cette représentation sera très utile par la suite.

Ce mouvement de compression devrait provoquer le flambage du filament. En absence de couplage, ce flambage devrait se faire dans le plan ; à l'inverse, en présence d'un couplage, le filament devrait flamber hors du plan.

4.3 Résultats

Configurations

Les configurations obtenues changent drastiquement selon que le couplage est présent ou non. Comme prévu, en absence de couplage (colonne de gauche), le filament demeure dans un plan (le plan xOz , figure 8.5). La torsion est nulle comme le montrent les perles qui n'ont pas subi de rotation autour de l'axe du filament. Au contraire, la présence d'un couplage (colonne de droite) force le filament à sortir du plan xOz comme le montre la coupe dans le plan yOz . Les perles réparties le long du filament marquent cette rotation du repère local autour de l'axe principal.

Densités d'énergie élastique

La comparaison de l'énergie élastique stockée entre ces deux configurations (figure 8.6(a)) montre que la présence du couplage n'implique pas forcément une augmentation de cette énergie élastique. Les deux profils se ressemblent fortement avec une densité d'énergie importante en 3 points : les deux extrémités, et le centre du filament. Ce résultat découle directement des conditions aux bords que nous avons imposées : l'angle du filament étant maintenu fixe aux deux bords, ce dernier va devoir se courber très fortement. Or l'énergie élastique est directement liée à cette déformation, puisqu'elle dépend du vecteur $\vec{\kappa}$, qui est directement liée à la courbure par la relation $\frac{d\vec{d}_i(s)}{ds} = \vec{\kappa}(s) \times \vec{d}_i$.

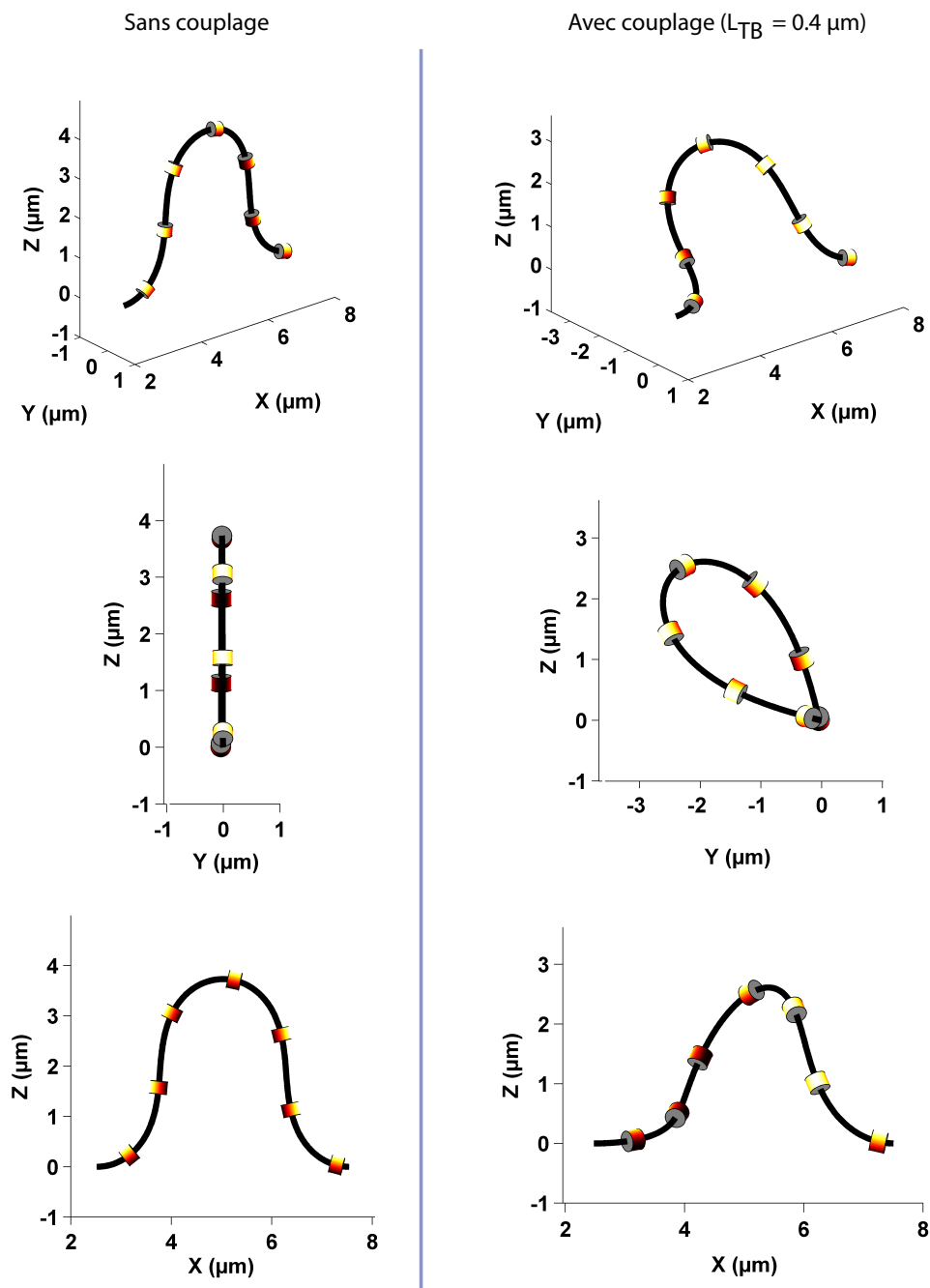
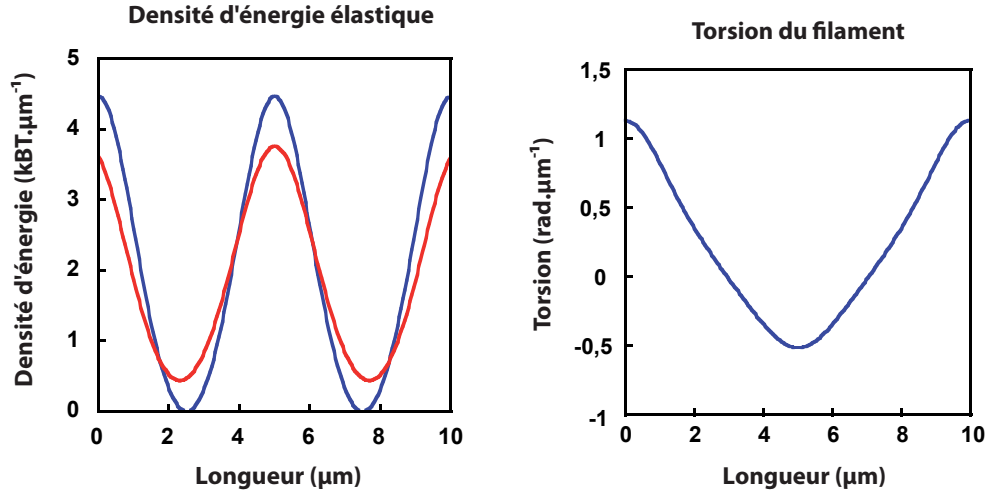


FIGURE 8.5 – Impact du couplage sur le flambage des filaments. La distance entre les deux extrémités des filaments est réduite à $5 \mu\text{m}$: ils flambent. La colonne de gauche présente la configuration obtenue sans couplage, celle de droite avec couplage.

Torsion

En absence de couplage, le filament ne présente aucune torsion. En présence de couplage la densité de torsion (en μm^{-1}) suit un profil proche de la densité d'énergie élastique : la torsion est très forte au niveau des extrémités avec un autre pic plus faible au cœur du filament (figure 8.6(b)). C'est encore une fois un comportement attendu puisque cette torsion ne résulte que du couplage, et va donc coïncider avec une flexion importante. Cette

torsion est loin d'être négligeable, puisqu'elle dépasse par endroit $1 \text{ rad}.\mu\text{m}^{-1}$ (soit près de $60^\circ\mu\text{m}^{-1}$).



(a) Densités d'énergie élastique

(b) Densité de torsion

FIGURE 8.6 – **Énergie élastique et torsion du filament.** (a) La densité d'énergie élastique du filament pour les deux configurations présentées en figure 8.5, sans couplage (bleu) et avec couplage (rouge). (b) Densité de torsion pour la configuration obtenue avec couplage.

Répartition dans l'énergie élastique

La densité d'énergie élastique E_{el} ($\text{J}.\mu\text{m}^{-1}$) :

$$E_{el} = \frac{1}{2} k_B T \left[\underbrace{(\kappa_1^2(s) + \kappa_2^2(s)) L_B}_{\text{flexion}} + \underbrace{\kappa_3^2(s) L_T}_{\text{torsion}} + \underbrace{2(\kappa_1(s) \kappa_3(s) + \kappa_2(s) \kappa_3(s)) L_{TB}}_{\text{couplage}} \right].$$

contient plusieurs contributions provenant de la flexion, de la torsion ou encore du couplage.

La contribution prédominante provient de la flexion (figure 7.6, en rouge), conséquence naturelle de la différence entre la longueur de persistance (de l'ordre des $10 \mu\text{m}$) et la longueur de torsion ou le facteur de couplage (qui sont d'un ordre de grandeur inférieur). La déformation du filament étant importante, c'est bien la flexion qui va dominer. Notons aussi que le terme lié au couplage est ici négatif : ceci peut être interprété comme une possibilité pour le filament de décharger une partie de la contrainte dans ce couplage flexion/torsion, lui permettant ainsi de diminuer la quantité d'énergie élastique stockée et donc de stabiliser cette configuration.

5 Application à la fragmentation par l'ADF/Cofiline

Le couplage que nous avons introduit nous permet de générer de la torsion, et donc un stress de cisaillement, dans un système que l'on ne modélisait auparavant que sous l'angle de la flexion. Nous pouvons ainsi attaquer la problématique de la fragmentation par l'ADF/Cofiline, un des thèmes principaux de ce travail de thèse.

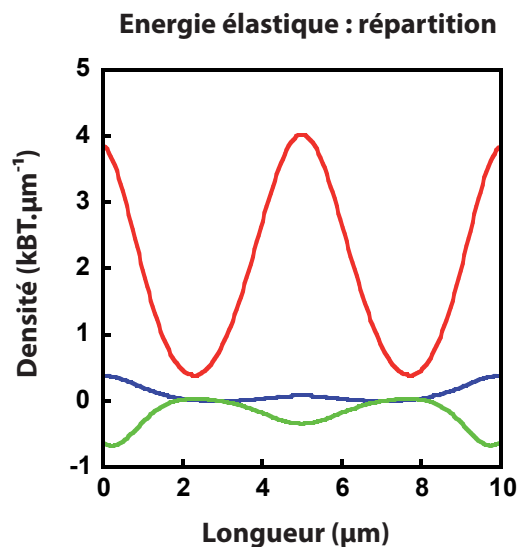


FIGURE 8.7 – **Contributions à l'énergie élastique.** Dans le cas d'un couplage non nul, l'énergie élastique est la sommation de plusieurs contributions : flexion (rouge), torsion (bleu) et couplage flexion/torsion (vert).

5.1 Modéliser la présence d'ADF/Cofiline sur le filament d'actine

Nous rappelons en introduction que la décoration du filament par l'ADF/Cofiline n'est pas homogène. L'ADF/Cofiline est absente du cap ATP/ADP-Pi et produit de larges *stretches* sur le reste du filament. Or l'ADF/Cofiline modifie les propriétés physiques du filament, en particulier certains paramètres fondamentaux de notre modèle : la longueur de persistance (L_B), la longueur de torsion (L_T) et selon toute vraisemblance le couplage entre flexion et torsion (L_{TB}).

Pour prendre en compte ce phénomène, nous proposons de ne plus considérer ces longueurs caractéristiques comme des constantes "figées", mais de les modifier en fonction de la présence d'ADF/Cofiline sur le filament :

	Filament non décoré	Filament saturé en ADF/Cofiline
Longueur de persistance	$9.1 \mu m$	$2.2 \mu m$ (1)
Longueur de torsion	$0.5 \mu m$	$0.03 \mu m$ (2)
Couplage flexion/torsion	$0.4 \mu m$	$0.05 \mu m$ (3)

(1)Prochniewicz et al. (2005), (2) McCullough et al. (2008) (3) fixé arbitrairement par comparaison avec le filament non décoré.

Intégrer l'information biologique

Les images de microscopie à onde évanescente nous donnent de multiples exemple de décoration partielle. Prenons un filament décoré partiellement par l'ADF/Cofiline (comme celui présenté en figure 8.8). L'analyse de la fluorescence révèle un gradient d'ADF/Cofiline que nous traduisons en un gradient de propriétés mécaniques pour le filament.

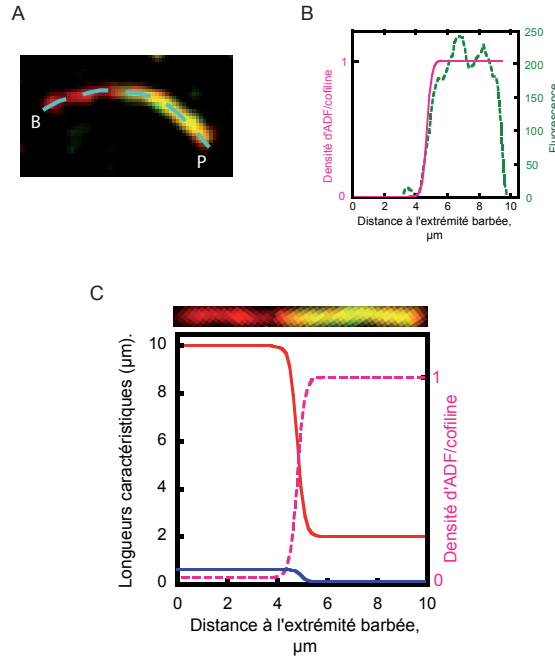


FIGURE 8.8 – **Gradient de propriétés mécaniques dû à l'ADF/cofiline.** (A) Image de microscopie à onde évanescente. La fluorescence est mesurée le long de la ligne en pointillés (B pour barbée, P pour pointue). (B) La fluorescence d'ADF/Cofiline (en vert) est résumée par une sigmoïde (en rose). L'occupation d'ADF/Cofiline sur le filament découle de ce gradient. (C) Les longueurs caractéristiques du filament (longueur de persistance en rouge et de torsion en bleu) sont modifiées selon le gradient précédent. Images obtenues par C. Suarez (CEA/iRTSV).

Implication pour le modèle continu

Les paramètres L_B , L_T et L_{TB} sont maintenant des fonctions de s , l'abscisse curviligne, et non plus des constantes. Les principaux changements dans les calculs présentés précédemment concernent donc la matrice A , dont les termes dépendent désormais de s :

$$A(s) = \begin{pmatrix} \beta_B(s) & 0 & \beta_{TB}(s) \\ 0 & \beta_B(s) & \beta_{TB}(s) \\ \beta_{TB}(s) & \beta_{TB}(s) & \beta_T(s) \end{pmatrix}.$$

5.2 Modéliser la fragmentation par ADF/Cofiline

Les images de microscopie à onde évanescente montrent des filaments qui se fragmentent en présence de simples fluctuations thermiques. Nous adaptons notre modèle pour pouvoir adresser cette question cruciale. Contrairement aux simulations précédentes, où nous cherchions à mettre en évidence les effets du couplage, les perturbations ici ne se feront pas nécessairement en compression et les conditions aux bords vont changer.

Introduction des fluctuations thermiques

Les fluctuations thermiques sont modélisées comme des forces aléatoires qui s'appliquent en tout point du filament, et qui sont décorréliées dans le temps comme dans l'espace. Ces forces viennent modifier le système différentiel, au lieu d'avoir $F'(s) = 0$,

nous avons :

$$\frac{d\vec{F}(s)}{ds} = \underbrace{-C \frac{d\vec{r}(s)}{dt}}_{\text{viscosité du milieu}} + \underbrace{f^R(s)}_{\text{fluctuations thermiques}},$$

avec C proportionnel à la viscosité du milieu, qui s'oppose au mouvement et $f^R(s)$ la force aléatoire qui simule les chocs thermiques.

Conditions aux bords

Les conditions aux bords se doivent de refléter le mieux possible les conditions expérimentales.

Premièrement, les extrémités des filaments en solution ne sont pas fixées en un point précis du substrat. Nous ne pouvons donc pas fixer directement x , y et z comme auparavant. Par contre, le filament va toujours adopter une configuration telle que les chocs thermiques et la viscosité du milieu contrebalancent la force produite par le flambage. Ces contributions sont toutes prises en compte dans la variable $\vec{F}(s)$ et cet équilibre se traduit par :

$$\begin{aligned} F_x(0) &= 0, & F_x(L) &= 0 \\ F_y(0) &= 0, & F_y(L) &= 0 \\ F_z(0) &= 0, & F_z(L) &= 0 \end{aligned}$$

Deuxièmement, les extrémités étant libres, il n'est pas possible de leur imposer une certaine orientation. Nous fixons alors les moments à zéro, signifiant ainsi que le filament ne cherchera pas à adopter une forte courbure aux niveaux de ces extrémités.

$$\begin{aligned} \kappa_1(0) &= 0, & \kappa_1(L) &= 0 \\ \kappa_2(0) &= 0, & \kappa_2(L) &= 0 \\ \kappa_3(0) &= 0, & \kappa_3(L) &= 0 \end{aligned}$$

Protocole pour les simulations

Contrairement aux simulations présentées dans la section 4, nous ne sommes plus intéressés uniquement par une configuration particulière, mais bien par l'ensemble des configurations successives adoptées par le filament. Notre procédure de simulation est résumée par l'algorithme 3 présenté ci-après.

Partant d'une configuration initiale classique (rectiligne par exemple), nous tirons aléatoirement les forces qui simulent le bruit thermique. Nous calculons la solution du système différentiel. La configuration nouvelle est sauvegardée. Puis on l'utilise pour mettre à jour la configuration courante ainsi que les conditions aux bords.

Nous obtenons ainsi une succession de configurations qui résument les déformations du filament au fil du temps. Avec plusieurs milliers de configurations, nous pouvons effectuer des statistiques sur ces déformations.

6 Résultats

6.1 Quel profil d'ADF/Cofline ?

Le modèle décrit dans ce chapitre nous donne un canevas pour simuler les déformations mécaniques de filaments d'actine décorés par ADF/Cofline. Il reste néanmoins un

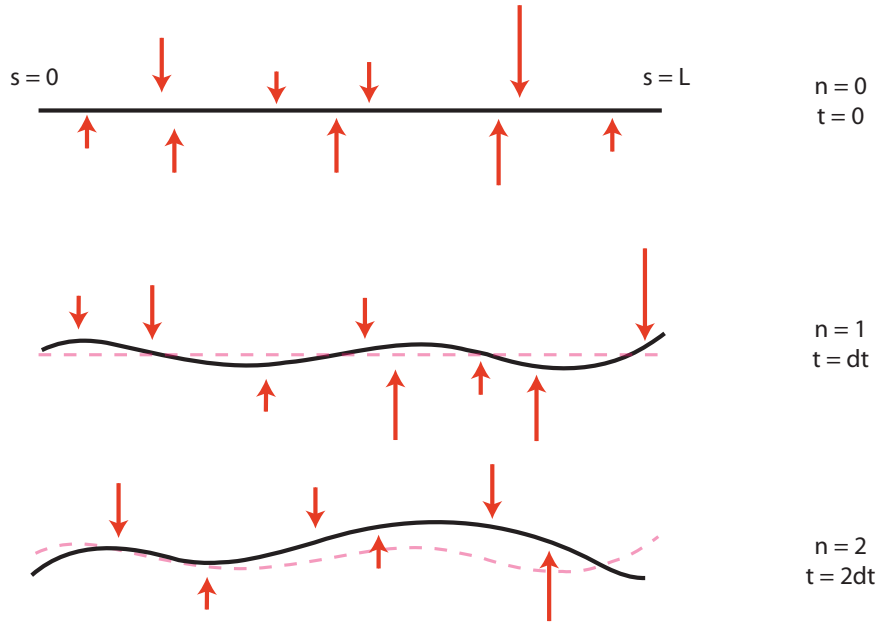


FIGURE 8.9 – **Protocole de simulation.** Partant de la configuration initiale ($t = 0, n = 0$) le filament (en noir) est soumis à des fluctuations thermiques (en rouge) qui le déforment (configuration précédente en pointillés roses). Les différentes configurations successives sont conservées pour obtenir un échantillon statistique.

Algorithm 3 Déformations du filament en solution

- 1: **Initialisation.** Initialisation de t et n_{step} (le temps courant et le nombre de pas de l'algorithme) : $t = 0, n_{step} = 0$.
Choix d'un temps total de simulation t_{max} .
Création d'une configuration initiale $C_{Initiale}$ pour le filament. Configuration courante $C_{Courante} = C_{Initiale}$.
 - 2: **while** $t < t_{max}$ **do**
 - 3: Tirage des forces aléatoires f^R (simulent le bruit thermique).
 - 4: Calcul de la nouvelle configuration $C_{Nouvelle}$ à partir de la configuration courante $C_{Courante}$ et des forces aléatoires f^R .
 - 5: $C_{Courante} = C_{Nouvelle}$. Mise à jour de t et n_{step} : $t = t + dt, n_{step} = n_{step} + 1$.
 - 6: Sauvegarde de la configuration fraîchement calculée : $Configurations(n_{step}) = C_{Courante}$.
 - 7: **end while**
-

paramètre "libre" qui va influencer sur les résultats des simulations : le profil de décoration d'ADF/Cofilin. Dans cette section, nous présenterons les configurations obtenues pour différents profils et comparons les stress mécaniques mesurés.

6.2 Quelle mesure pour la fragmentation ?

Nous voulons mettre en évidence le rôle de l'ADF/Cofilin dans la fragmentation des filaments. Nous faisons l'hypothèse que la fragmentation est liée à la torsion locale du

filament. Dans nos simulations nous nous intéresserons donc tout particulièrement à deux grandeurs : l'énergie de torsion et l'effort de cisaillement.

La densité d'énergie de torsion dans le filament se définit comme :

$$E_{\text{Torsion}}(s) = \frac{1}{2} \beta_T(s) \kappa_3^2(s) .$$

Cette grandeur nous renseigne sur les sections du filament où l'énergie de torsion va naturellement s'accumuler.

L'effort de cisaillement se définit naturellement comme la dérivée du moment de torsion élastique. Le moment de torsion élastique au point s , porté par $\vec{d}_3(s)$ est :

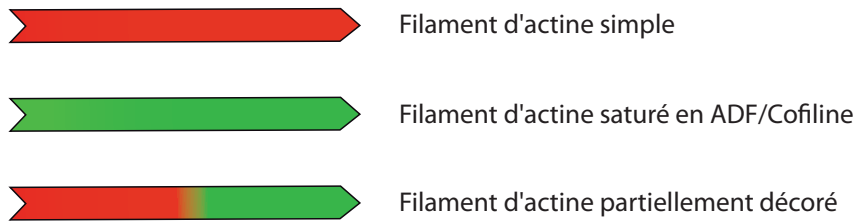
$$m_{\text{torsion}}(s) = k_B T L_T(s) \kappa_3(s) \quad (\text{en } \text{J} \cdot \mu\text{m}^{-1}) .$$

Et l'effort de cisaillement se définit comme :

$$f_{\text{cisaillement}}(s) = k_B T \left| \frac{d}{ds} (L_T(s) \kappa_3(s)) \right| .$$

6.3 Comparaison de 3 profils simples

Pour mettre en évidence le rôle des interfaces entre parties décorées du filament et parties non décorées, nous proposons de comparer 3 profils simples d'ADF/Cofiline :



Remarquez que dans le cas du profil partiellement décoré, nous plaçons la transition au milieu du filament (à $5\mu\text{m}$ des deux extrémités).

Énergie de torsion moyenne

Pour chacun de ces profils, nous simulons les déformations du filament sur plusieurs heures. A partir de toutes les configurations obtenues, nous calculons la densité d'énergie de torsion moyenne (figure 8.10).

La différence entre ces trois profils est frappante. Les deux profils homogènes (actine simple et cofilactine) montrent une densité d'énergie élastique semblable à un plateau. L'énergie de torsion est nulle au niveau des extrémités en raison des conditions aux bords que nous avons imposées : $\kappa_3(s) = 0$ en $s = 0$ et $s = L$. Remarquons au passage que l'énergie de torsion est plus faible pour le filament de cofilactine que pour le filament d'actine simple. Ce constat souligne le caractère "stabilisé" des filaments d'actine saturés en ADF/Cofiline (Prochniewicz et al., 2005; Andrianantoandro and Pollard, 2006; De La Cruz and Sept, 2010).

Dans le cas d'un filament partiellement décoré, la densité d'énergie de torsion présente un profil très différent. Cette énergie s'accumule peu à peu à mesure que l'on s'approche de l'interface puis chute brutalement une fois la zone saturée en ADF/Cofiline atteinte. Le maximum est bien atteint au niveau de cette interface, ce qui en fait une zone privilégiée

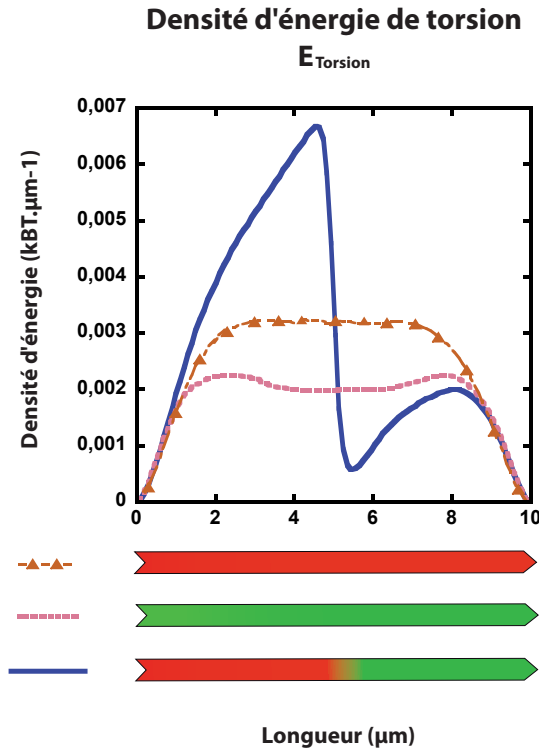


FIGURE 8.10 – **Densité d'énergie de torsion moyenne en fonction du profil de décoration d'ADF/Cofilin.** Densité de l'énergie de torsion $E_{\text{Torsion}}(s)$ (voir texte principal) tout au long du filament en fonction du profil de décoration d'ADF/Cofilin. Nous testons ici les trois profils simples représentés en dessous du graphique. Remarquez comment le pic de $E_{\text{Torsion}}(s)$ coïncide avec la zone de transition dans le cas du filament partiellement décoré.

pour la fragmentation. Ce résultat conforte les observations du chapitre 6.

Naïvement, nous pourrions croire qu'un tel filament se comporterait comme un filament d'actine simple dans sa partie non décorée, et comme un filament saturé en ADF/Cofilin dans sa partie décorée. Ces résultats montrent qu'il n'en est rien : le pic d'énergie de torsion atteint à l'interface est supérieur d'un facteur 2 au moins par rapport aux profils classiques.

Pour interpréter ce phénomène, il faut revenir à la définition même de l'énergie de torsion contenue dans une section ds du filament :

$$E_{\text{Torsion}}(s) = \frac{1}{2} \beta_T(s) \kappa_3^2(s) ds .$$

Cette énergie dépend, d'une part de l'amplitude de la torsion (à travers κ_3^2), et d'autre part de la rigidité en torsion (représentée par $\beta_T(s)$). Par exemple, un filament saturé en ADF/Cofilin sera plus souple et va enregistrer des torsions importantes, mais sa rigidité en torsion est faible. Le produit de ces deux composantes ne sera donc pas nécessairement élevé (figure 8.10, courbe pointillés roses). Dans le cadre d'un filament partiellement décoré, la partie décorée subit des fluctuations importantes (car plus souple), mais ces fluctuations se transmettent au reste du filament et donc aux parties plus rigides. L'interface se trouve ainsi en situation de "perdant-perdant" : elle subit des fluctuations importantes dans sa partie décorée, tout en ayant la rigidité en torsion du filament non décoré.

Effort de cisaillement

Comme pour l'énergie élastique, nous comparons l'effort de cisaillement moyen obtenu pour chacun de ces trois profils. Cet effort représente la tendance à cisailer la section du filament et donc à le fragmenter. $f_{\text{cisaillement}}(s)$ est extrêmement faible pour les deux profils homogènes, mais présente un pic très élevé à l'interface entre partie décorée et non décorée (figure 8.11). Le maximum atteint est de l'ordre de $10^{-3}pN$. Ce moment peut sembler faible mais il s'applique sur la section du filament, qui est de l'ordre de grandeur du nanomètre.

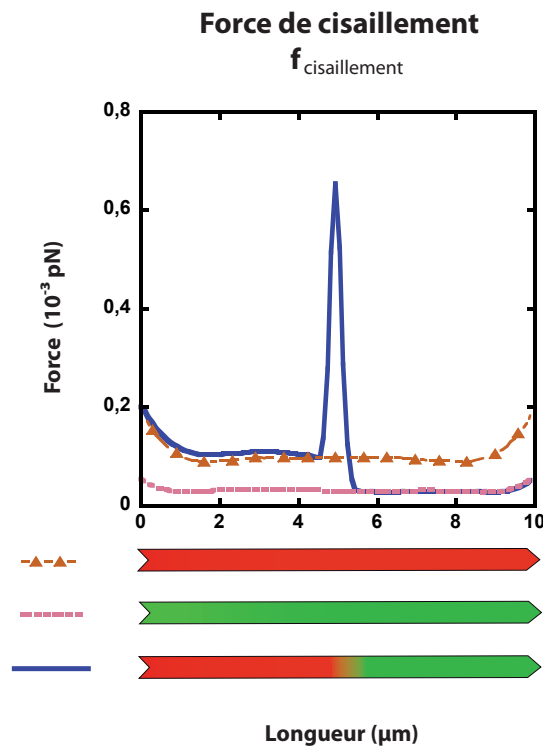


FIGURE 8.11 – Effort de cisaillement moyen : comparaison entre les différents profils de décoration d'ADF/Cofiline. L'effort de cisaillement $f_{\text{cisaillement}}(s)$ est calculé pour chacun des trois profils de décoration d'ADF/Cofiline. Notez encore une fois comment la décoration partielle du filament engendre un pic à l'interface actine/cofilactine.

6.4 Evènements de fragmentation : analyse des événements rares

Une analyse en moyenne de $E_{\text{Torsion}}(s)$ et de $f_{\text{cisaillement}}(s)$ permet de comprendre le comportement global de notre système, mais les événements de fragmentation sont des événements rares qui se produisent avec des périodes de plusieurs centaines de secondes. Ce sont surtout des événements extrêmes, le filament ne se fragmentant que lorsque les contraintes mécaniques sont exceptionnellement importantes.

Maximum de l'énergie de torsion

A partir des configurations simulées pour le filament partiellement décoré, nous proposons d'étudier le maximum de $E_{\text{Torsion}}(s)$ et en particulier la localisation de ce maximum sur le filament. Pour chaque configuration successive, nous repérons le maximum de $E_{\text{Torsion}}(s)$

et relevons sa distance par rapport à l'extrémité barbée : ce site est le meilleur candidat à la fragmentation. L'histogramme en figure 8.12 présente cette localisation : un pic très prononcé est clairement visible à l'interface non décorée/décorée du filament : le maximum de $E_{\text{Torsion}}(s)$ est donc bien souvent localisé à cette interface, en accord avec les résultats précédents.

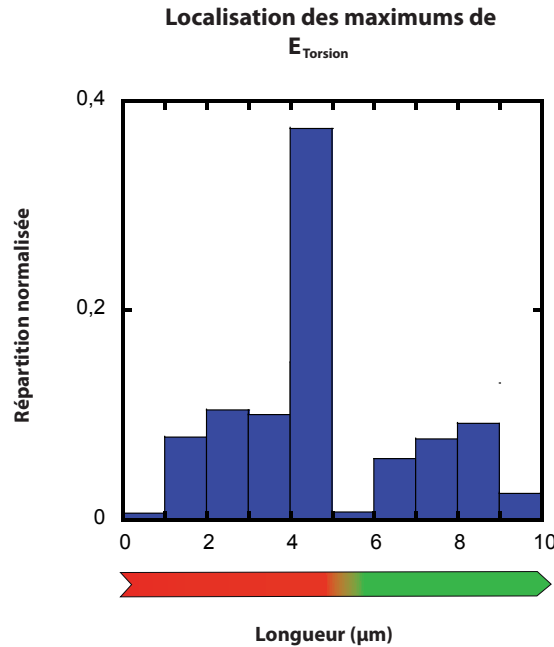


FIGURE 8.12 – Localisation des maximums de l'énergie de torsion sur le filament. Pour chaque configuration, nous cherchons la valeurs maximale de $E_{\text{Torsion}}(s)$ et notons sa localisation. Cet histogramme montre bien que l'interface actine/cofilactine est le point du filament où se localise le plus souvent ce maximum, en faisant un candidat privilégié pour la fragmentation.

Fréquence des événements extrêmes

L'histogramme précédent (figure 8.12) ne résume que la localisation des maximums observés mais ne permet pas de les comparer entre eux. Pour résoudre ce problème, nous proposons d'analyser les configurations de la façon suivante : chaque point matériel du filament est identifié par son abscisse curviligne s (figure 8.13, A). Au cours de la simulation, nous construisons le profil au cours du temps de $E_{\text{Torsion}}(s)$ et de $f_{\text{cisaillement}}(s)$ pour ce point donné. A partir de ce profil, nous pouvons appliquer un seuil $S_{E_{\text{Torsion}}}$ ou $S_{f_{\text{cisaillement}}}$ et en déduire la fréquence avec laquelle ce seuil est franchi en ce point s . En généralisant ce calcul pour tous les points du filament, nous obtenons une courbe de fréquences qui nous révèle quelles portions du filament sont de bonnes candidates à la fragmentation. La figure 8.13 illustre cette démarche. A partir d'un filament partiellement décoré, nous appliquons un seuil de $0.03 k_B T \mu\text{m}^{-1}$ et construisons cette courbe de fréquence : la zone à l'interface entre actine et cofilactine dépasse ce seuil avec une fréquence de 0.01 s^{-1} qui n'est pas sans rappeler certaines mesures expérimentales du taux de fragmentation (Blanchoin and Pollard, 1999).

Nous ne connaissons pas avec précision l'ampleur des stress ou des énergies suffisants pour fragmenter le filament. L'intérêt de notre méthode réside dans ce que nous sommes

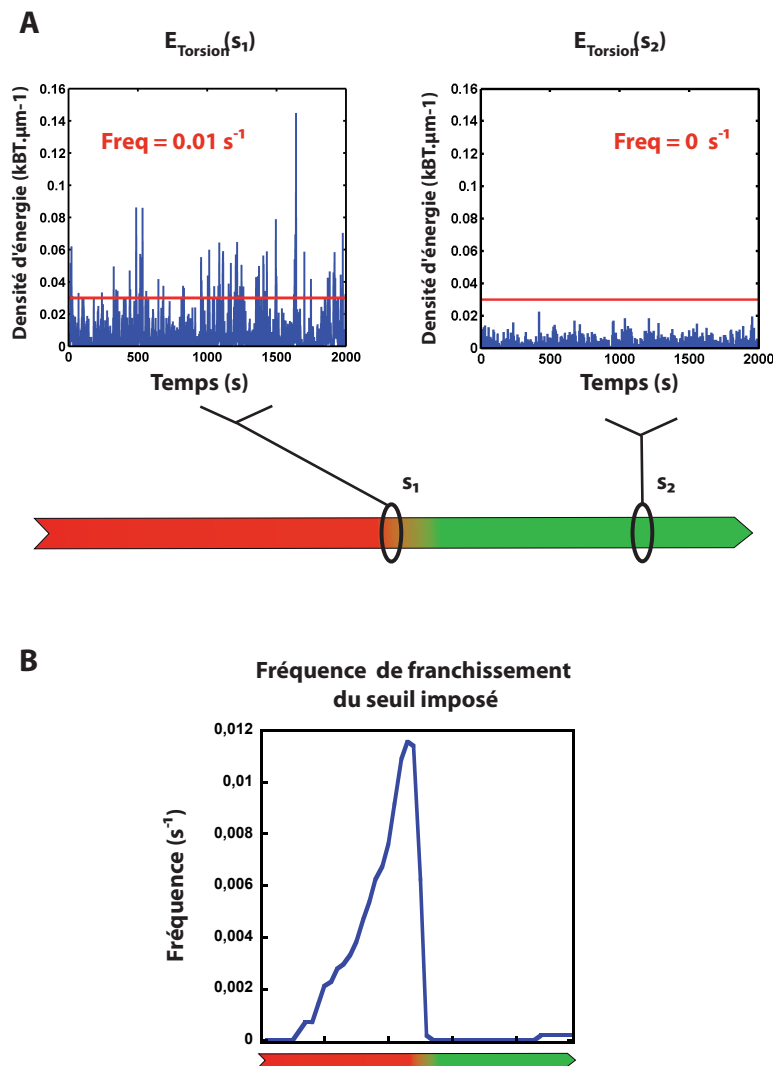


FIGURE 8.13 – Calculs de fréquences. (A) Pour chaque configuration adoptée au cours du temps, nous relevons les mesures de $E_{Torsion}(s)$ (bleu). Un seuil $S_{E_{Torsion}}$ (rouge) est appliqué à ces mesures, ce qui permet de déterminer une fréquence empirique de franchissement du seuil. Ce calcul est effectué pour plusieurs points (s_1 et s_2 par exemple) permettant de calculer une fréquence pour chacun de ces points. (B) Ces fréquences sont réunies dans un même graphique, révélant ainsi les sections du filament les plus susceptibles de dépasser le seuil imposé.

libres de choisir toute valeur pour ce seuil et d'observer les fréquences prédites. Nous pouvons de même faire varier ce seuil : nous obtenons alors une surface en trois dimensions qui nous prédit, pour un couple [seuil, position] sur le filament, la fréquence de fragmentation observée. Appliquée à notre filament partiellement décoré, cette méthode produit les profils présentés en figure 8.14 (A et B).

Cette représentation est particulièrement intéressante car elle permet de déterminer visuellement l'impact de notre seuil sur les fréquences prédites. Comme prévu, fixer un seuil faible pour $E_{Torsion}(s)$ ou $f_{Cisaillement}(s)$ (c'est à dire un seuil très permissif) donne des fréquences élevées (de l'ordre de 0.1 s^{-1}). A mesure que l'on relève ce seuil, les fréquences diminuent et permettent de discriminer de mieux en mieux la zone d'interface en section décorée et non décorée du filament.

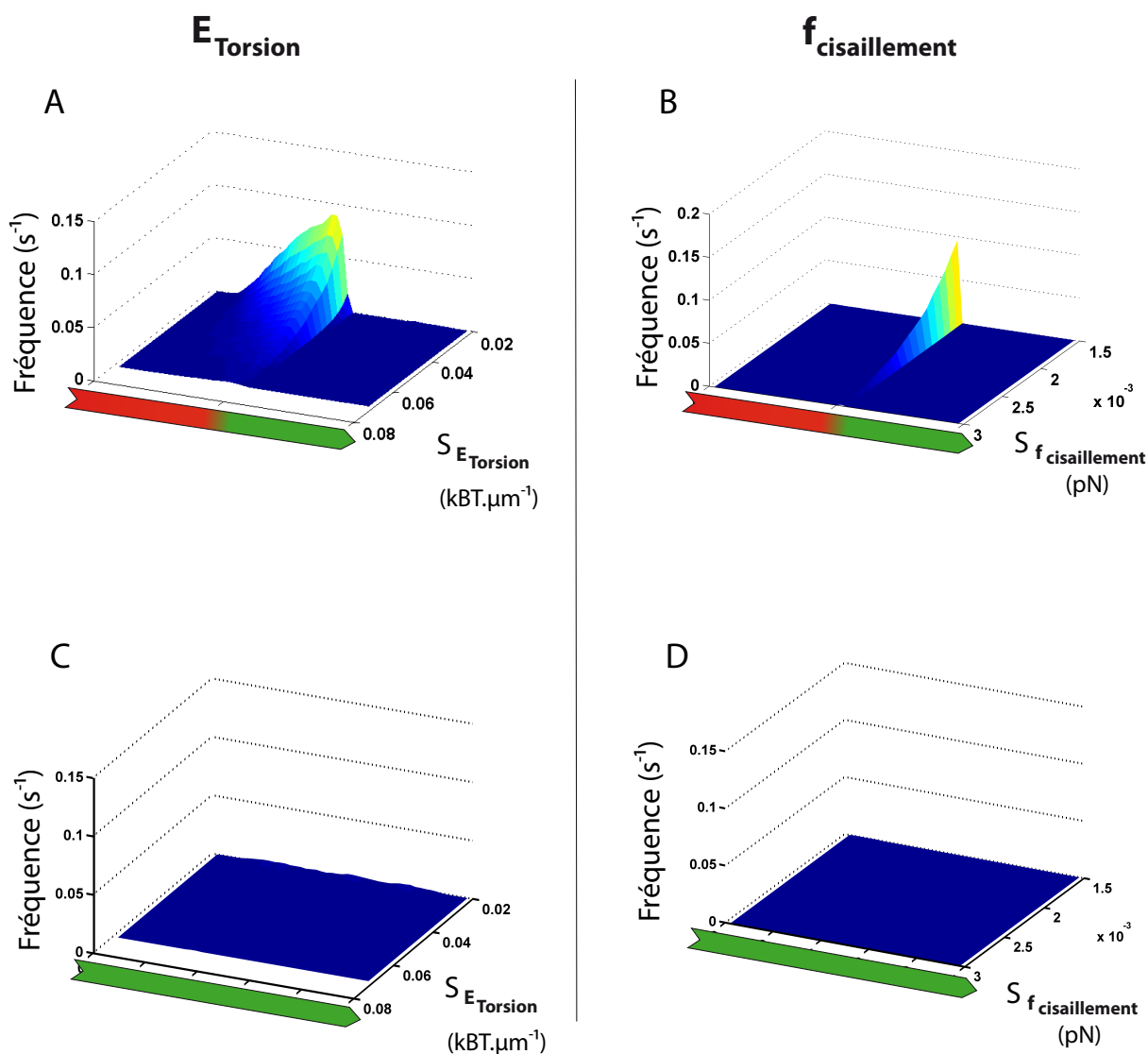


FIGURE 8.14 – **Impact des seuils $S_{E_{Torsion}}$ et $S_{f_{cisaillement}}$ sur les fréquences observées.** Différents seuils sont appliqués afin de construire une surface pour $E_{Torsion}(s)$ ou $f_{Cisaillement}(s)$. Cette opération est effectuée pour un filament partiellement décoré (A et B), et pour un filament totalement décoré (C et D).

Ce traitement est également appliqué au cas d'un filament totalement décoré par ADF/Cofilin (8.14, C et D). Comme prévu, les fréquences prédites sont extrêmement faibles ($< 10^{-4} s^{-1}$) et ne présentent aucun pic caractéristique.

6.5 Variantes de la décoration d'ADF/Cofilin : position de l'interface actine/coflactine

La représentation précédente permet d'étudier simplement l'effet de la décoration d'ADF/Cofilin sur la fragmentation. Une décoration différente prédit des fréquences de fragmentation différentes, que nous pouvons comparer entre elles.

Nous commençons par déplacer la position de l'interface entre partie décorée et non décorée : sur un filament de $10 \mu m$, nous la plaçons dans un premier temps à $3 \mu m$ de l'extrémité barbée, puis à $7 \mu m$. Les fréquences prédites sont présentées en figure 8.15.

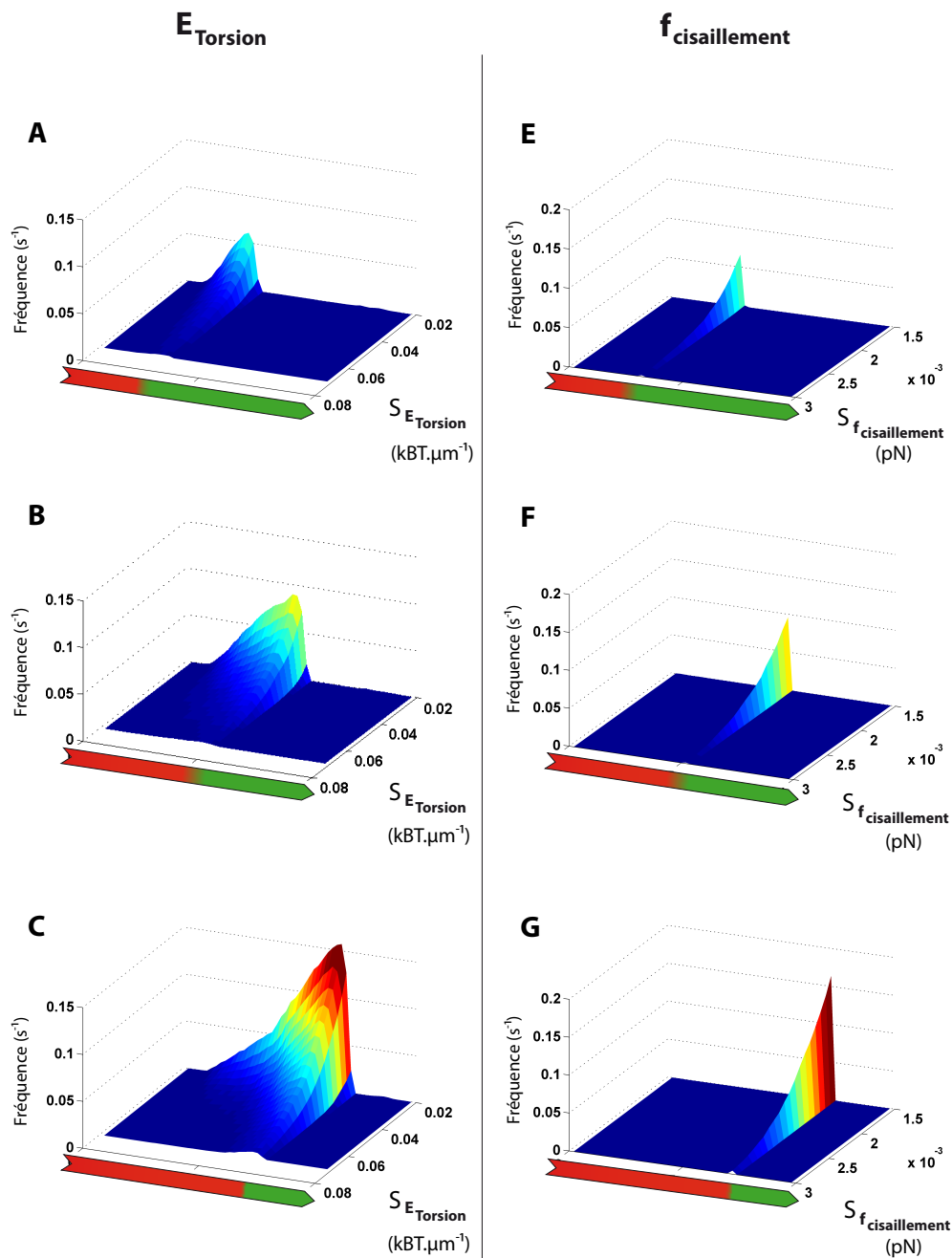


FIGURE 8.15 – Impact de la décoration d'ADF/Cofiline sur les fréquences observées. (A), (B), (C) : Comparaison des surfaces obtenues en fixant $S_{E_{Torsion}}$. (D), (E) et (F) : Comparaison des surfaces obtenues en fixant $S_{f_{cisaillement}}$

Premièrement, le pic de fréquence pour $E_{Torsion}(s)$ comme pour $f_{Cisaillement}(s)$ coïncide toujours avec la position de l'interface. Ceci consolide notre hypothèse selon laquelle l'interface actine/cofilactine est bien déterminante dans la localisation de la fragmentation. Par ailleurs, les fréquences observées diminuent clairement à mesure que l'ADF/Cofiline recouvre le filament. Un *stretch* court d'ADF/Cofiline à l'extrémité pointue (figure 8.15) a une probabilité jusqu'à 3 fois plus importante d'être fragmenté qu'un *stretch* de $7 \mu\text{m}$. La stabilisation des filaments observée pour les fortes concentrations d'ADF/Cofiline n'est

donc pas uniquement liée à une disparition des interfaces mais aussi à une stabilisation mécanique du filament.

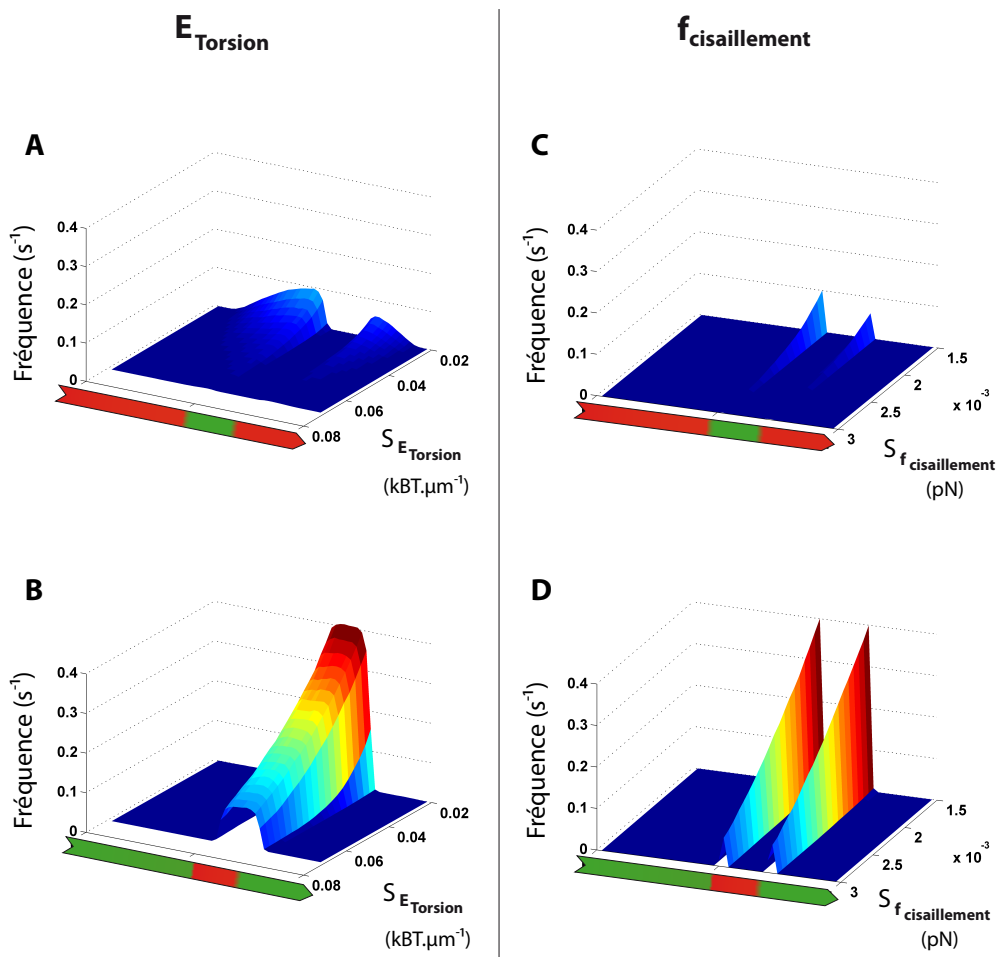


FIGURE 8.16 – Interfaces multiples au sein d'un filament. (A et C) *Stretch* d'ADF/Cofiline au sein d'un filament d'actine. (B et D) *Stretch* d'actine seule au sein d'un filament saturé en ADF/Cofiline.

6.6 Variantes de la décoration d'ADF/Cofiline : présence de plusieurs interfaces

Nous déplaçons maintenant le *stretch* d'ADF/Cofiline vers l'intérieur du filament, de sorte qu'il y a deux interfaces actine/cofilactine à l'intérieur du filament (8.16, (A) et (C)). Deux pics apparaissent qui correspondent aux deux interfaces : de multiples interfaces engendrent ainsi de multiples sites de fragmentation potentiels, en accord avec le pic d'efficacité de la fragmentation observé aux concentrations proches de la constante d'équilibre d'ADF/Cofiline (chapitre 6).

Ces résultats suggèrent que la présence et la localisation d'une interface sont les seuls facteurs contrôlant la fragmentation. Pour tester cette hypothèse, nous avons en quelque sorte "inversé" la décoration d'ADF/Cofiline précédente : nous simulons cette fois-ci un *stretch* d'actine non décorée au sein d'un filament saturé en ADF/Cofiline (8.16, (B) et (D)) : les interfaces sont donc placées de façon identique. Les résultats sont éloquentes : les

fréquences prédites sont 4 à 5 fois plus élevées qu'auparavant, contredisant notre hypothèse. Nous pouvons donc en conclure que les interfaces actine/cofilactine constituent toujours des sites privilégiés pour la fragmentation, mais l'efficacité même de cette fragmentation repose essentiellement sur la décoration complète du filament.

7 Discussion

7.1 Rôle fondamental de la décoration d'ADF/Cofiline dans la fragmentation du filament

La démarche développée dans ce chapitre est l'aboutissement logique de ce travail de thèse, et toutes les connaissances que nous avons acquises sur le mode de fonctionnement de l'ADF/Cofiline y sont mises à contribution : l'étude cinétique de la fixation d'ADF/Cofiline nous a permis de localiser cette protéine sur le filament, tandis que la mise en évidence d'un couplage flexion/torsion nous offre un mécanisme simple pour expliquer le cisaillement de ces filaments.

Dans ce chapitre, nous développons un modèle continu pour la mécanique du filament qui incorpore ces différents éléments. Ce modèle nous permet de quantifier l'énergie de torsion ainsi que l'effort de cisaillement induits par le bruit thermique le long du filament. La décoration en ADF/Cofiline est un des paramètres du modèle : nous montrons qu'une décoration uniforme, aussi bien pour un filament "nu" qu'un filament saturé en ADF/Cofiline, ne produit aucun site privilégié pour la fragmentation. Inversement la présence d'un *stretch* d'ADF/Cofiline, et donc d'une interface, montre un pic très clair dans l'énergie de torsion comme dans l'effort de cisaillement. Ce pic se localise au niveau de l'interface en accord avec les données de microscopie à onde évanescence présentées dans le chapitre 6.

La décoration d'ADF/Cofiline influe fortement sur les contraintes mesurées, en particulier la position et le nombre d'interfaces. Le modèle révèle tout son intérêt dans cette quantification, car il est difficile de relier expérimentalement la probabilité de fragmenter le filament à sa décoration.

7.2 Limites du modèle

Notre modèle présente plusieurs limitations : la première concerne l'absence de la cinétique alors même que les travaux récents de De La Cruz and Sept (2010) soulignent que l'activité d'ADF/Cofiline varie au fil de l'assemblage du réseau d'actine. Initialement peu présente, elle atteint un premier pic d'activité alors que les filaments sont partiellement décorés, puis stabilise les filaments lorsqu'ils sont saturés avant de les fragmenter de nouveau lorsque le décrochage de molécules d'ADF/Cofiline provoque l'apparition d'interfaces au cœur du filament. Cette dynamique est absente de nos simulations, mais nous pouvons compenser ce manque en agissant sur la décoration d'ADF/Cofiline décrite dans le modèle.

En jouant sur la position du *stretch* par rapport à l'extrémité barbée, nous reproduisons fidèlement les premiers temps de l'action d'ADF/Cofiline : initialement présente à l'extrémité pointue, l'ADF/Cofiline progresse rapidement vers l'extrémité barbée et son efficacité de fragmentation diminue à mesure qu'elle stabilise le filament.

Enfin, on pourrait reprocher à ce modèle de ne simuler que des filaments libres en solution : *in vivo*, les filaments d'actine sont intégrés à des structures plus complexes, comme des câbles ou des réseaux branchés, et ne sont pas libres de diffuser de façon anarchique. Notre modèle reste néanmoins viable car les conditions aux bords peuvent être facilement

modifiées, en contraignant la position des filaments par exemple, afin d'adresser ce problème.

Quatrième partie

Conclusion

Chapitre 9

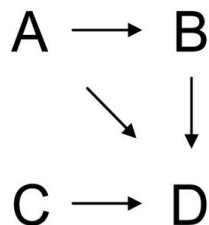
Conclusion générale

1 Résultats principaux

Au cours de cette thèse, nous avons mis la modélisation mathématique au service d'une problématique fondamentale en biologie : celle de la dynamique du cytosquelette d'actine. La dynamique d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine est un processus qui fait intervenir de nombreuses protéines, en particulier l'ADF/Cofiline, dédiée à la fragmentation de ces filaments. Nous avons centré notre travail sur l'action de cette protéine en proposant plusieurs approches pour étudier la fragmentation. La diversité de ces approches est l'un des points forts de cette thèse, dont nous résumons les résultats principaux dans le schéma qui suit cette conclusion.

Schéma récapitulatif des résultats obtenus

Le schéma récapitulatif des résultats obtenus au cours de la thèse est présenté à la suite de cette conclusion. L'ordre logique de lecture est le suivant :



Les quatre cadres A,B,C et D correspondent respectivement aux chapitres 5,6,7 et 8 de ce manuscrit.

1.1 Modèles stochastiques pour la cinétique du filament d'actine en présence d'ADF/Cofiline

Nous avons dans un premier temps abordé la problématique de la dynamique des filaments sous l'angle de la cinétique : un modèle stochastique pour l'assemblage, le désassemblage et la fragmentation des filaments a été développé. Ce modèle met en évidence l'existence d'un régime "d'équilibre dynamique" pour le filament, régime dans lequel l'élongation des filaments est contrebalancée par la fragmentation des parties anciennes (cadre A). Nous illustrons ainsi que la fragmentation est tout simplement indispensable au désassemblage des structures d'actine, la dépolymérisation simple n'étant pas assez rapide pour assurer seule cette fonction.

L'accès à des données de microscopie à onde évanescente nous permet de localiser l'ADF/Cofiline sur les filaments en croissance. Ces données montrent clairement une décoration par ADF/Cofiline qui n'est pas homogène. Notre modèle stochastique nous permet de donner une explication à ce phénomène : l'affinité sélective d'ADF/Cofiline limite sa fixation au niveau du cap ATP/ADP-Pi (cadre B). Nous pouvons alors quantifier la taille de ce cap et sa dépendance aux paramètres expérimentaux (concentrations de G-actine et d'ADF/Cofiline).

1.2 Modèles mécaniques pour le filament d'actine

Les données de microscopie présentées précédemment permettent de localiser la fragmentation et de la relier à la décoration d'ADF/Cofiline. Une compréhension fine de la mécanique des filaments est nécessaire pour étudier les causes de cette fragmentation.

Nous développons tout d'abord un modèle mésoscopique pour le filament d'actine. Ce modèle, qui se fonde sur la géométrie des interactions entre sous-unités, met en évidence un couplage fort entre la flexion et la torsion du filament (cadre C). Ce couplage permet de convertir une partie de la déformation de flexion en torsion, susceptible de cisailer le filament et donc de le fragmenter.

Nous validons cette hypothèse en développant un modèle continu pour les déformations mécaniques du filament d'actine (cadre D). Le couplage entre la flexion et la torsion permet de générer le stress de cisaillement, tandis que la modification des propriétés physiques du filament induite par l'ADF/Cofiline localise ce stress aux zones d'interface.

1.3 Action de l'ADF/Cofiline

Ce travail de thèse propose donc un cadre cohérent pour étudier l'action de l'ADF/Cofiline sur les filaments d'actine et son rôle dans le renouvellement rapide du cytosquelette d'actine *in vivo*.

L'action complexe de l'ADF/Cofiline (sur la chimie du filament, sur sa dynamique, sur ses propriétés mécaniques) implique une diversité dans les approches, avec des modèles stochastiques et d'autres déterministes, à l'échelle de la molécule individuelle ou du filament, discrets ou continus. Les prédictions effectuées par ces modèles ont été comparées à des données expérimentales obtenues dans le cadre d'une collaboration avec Cristian Suarez, doctorant dans l'équipe de Laurent Blanchoin (CEA/iRTSV/LPCV). Cette collaboration a joué un rôle fondamental dans le déroulement de cette thèse : les données expérimentales sont à la fois un champ d'application pour la modélisation, et une confrontation qui permet de valider/infirmier nos hypothèses.

2 Discussion

2.1 Contrôler la dynamique de l'actine

Le cytosquelette d'actine s'illustre par son aspect hautement dynamique : *in vivo*, de très larges structures s'organisent puis disparaissent sur des échelles de temps de quelques minutes. Une telle complexité ne peut émaner uniquement des propriétés intrinsèques de l'actine : elle est le résultat d'un nombre impressionnant de protéines associées qui participent toutes, à des degrés divers, à la régulation de l'assemblage et du désassemblage du cytosquelette d'actine. Ces protéines influent aussi bien sur la dynamique (nucléation, élongation, dépolymérisation) que la mécanique (modifications des propriétés physiques des filaments) ou la géométrie du réseau (fixation et orientation des filaments).

Même en réduisant chacune de ces protéines à quelques fonctions élémentaires, leur réunion dans le cytosquelette produit un système d'une immense complexité dont il est très difficile de prédire quels comportements vont émerger. L'ADF/Cofiline est un parfait exemple de cette complexité : nous considérons ici deux propriétés simples de l'ADF/Cofiline, à savoir l'affinité sélective pour les parties âgées du filament et la modification de la rigidité des filaments. Ces deux effets combinés à la dynamique du filament vont tout simplement faire de l'ADF/Cofiline un des piliers du désassemblage des réseaux d'actine.

Enfin, l'ADF/Cofiline est un exemple qui montre parfaitement l'imbrication de la cinétique, de la mécanique et de la géométrie dans la régulation de l'actine : la cinétique d'attachement de l'ADF/Cofiline est liée à la géométrie du filament (sa longueur), elle influe sur la fragmentation mécanique par la création de *stretches*. La fragmentation va en retour réguler la longueur du filament et donc limiter la cinétique d'association.

2.2 Apport de la modélisation dans la compréhension des processus biologiques

Cette thèse de modélisation s'illustre par son caractère interdisciplinaire : des méthodes mathématiques sont appliquées à des problématiques qui relèvent de la biophysique.

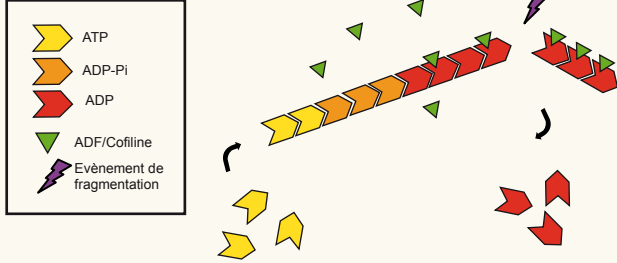
Les modèles présentés dans cet ouvrage ont prouvé leur utilité sous une multitude d'aspects : ils ont tout d'abord permis de quantifier certaines grandeurs qui ne sont pas observables de façon simple par l'expérimentateur (distribution du nucléotide sur le filament, chapitre 5). Ils proposent ensuite une interprétation à certains phénomènes observés et permettent de tester quantitativement la validité de cette interprétation (fragmentation, chapitre 8). Ils jouent enfin un rôle prédictif qui peut guider l'expérience (mesure de *cap*, chapitre 6).

Nous espérons que le travail exposé dans cet ouvrage aura convaincu le lecteur du bien-fondé de cette démarche, qui se révèle aussi enrichissante pour le modélisateur que pour ses collaborateurs dans le domaine de la physique du vivant.

Dynamique et mécanique de la fragmentation de filaments d'actine par la Cofiline : comparaison entre expériences et modèles

A Dynamique stochastique de l'élongation du filament d'actine

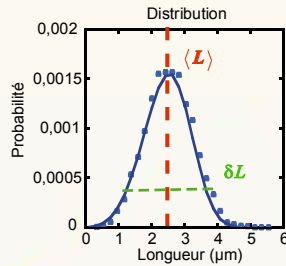
- Modèle microscopique
- Temps continu
- Processus stochastique
- Publié : Roland *et al*, Biophysical Journal 2008



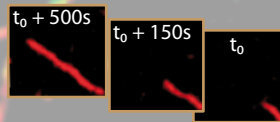
Distribution des longueurs L
 Dépendance à la concentration d'actine et d'ADF/Cofiline :

$$\langle L \rangle \propto ([\text{Actine}])^{1/2} ([\text{ADF/Cofiline}])^{-1/2}$$

$$\langle \delta L \rangle \approx 0.2 \langle L \rangle$$



Dynamique observée de l'actine



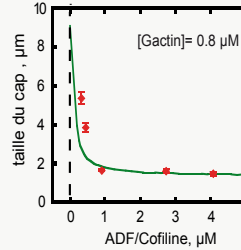
Déformations des filaments d'actine



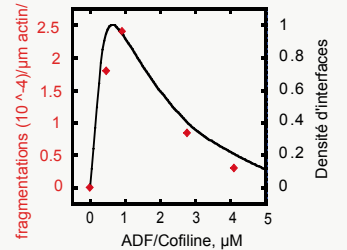
B Analyse des données expérimentales de fixation de l'ADF/Cofiline

- Analyse de fluorescence (TIRFM)
- Application du modèle (A) : fit de paramètres, prédictions
- Manuscrit en préparation

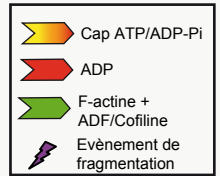
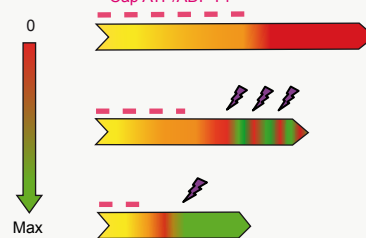
Effet de l'ADF/Cofilin sur le cap ATP/ADP-Pi



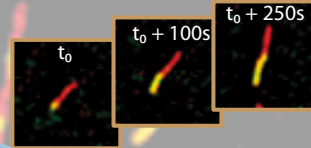
Efficacité de la fragmentation



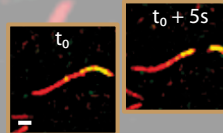
[ADF/Cofiline]



Visualisation directe de l'ADF/Cofiline



Fragmentation par l'ADF/Cofiline

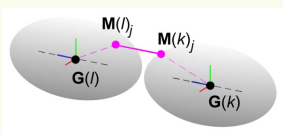


Données expérimentales

C Origine du couplage flexion/torsion dans le filament d'actine

- Modèle microscopique / mésoscopique
- Temps continu
- Déterministe
- Accepté dans Biophysical Journal

Déplacement et orientation des sous-unités contrôlés par :

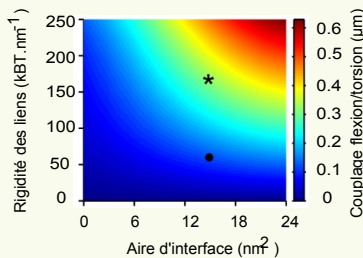


$$C_r \frac{d\mathbf{G}(k)}{dt} = \sum \mathbf{F}(k, l)_j$$

$$C_r \Omega(k) = -\sum \mathbf{F}(k, l)_j \times \mathbf{G}(k) \mathbf{M}(k)_j$$

Avec, C_r , C_r : Coefficients de viscosité en translation, rotation
 Ω : Vitesse angulaire \mathbf{F} : Force

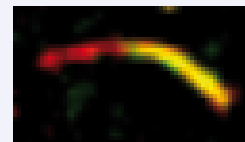
Couplage flexion/torsion du filament



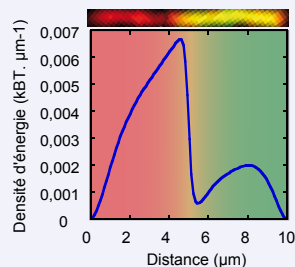
D Fragmentation par accumulation de stress mécanique

- Modèle continu (temps et espace)
- Déterministe
- Introduction d'un gradient de propriétés mécaniques
- Manuscrit en préparation

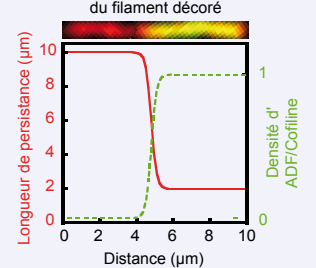
Décoration du filament d'actine



Densité énergie de torsion



Propriétés physiques du filament décoré



Energie élastique :

$$\frac{2E_{\text{élastique}}}{k_B T} = L_p (\kappa_1^2 + \kappa_2^2) + L_T \kappa_3^2 + 2L_{TB} \kappa_1 (\kappa_1 + \kappa_2)$$

Avec, $E_{\text{élastique}}$: énergie élastique
 $\kappa_{1,2,3}$: vecteur déformation
 L_p : longueur de persistance
 L_T : rigidité en torsion
 L_{TB} : couplage flexion/torsion

Annexes

Annexe A : Contenu additionnel pour l'article "Origin of Twist-Bend Coupling in Actin Filaments".

Nous présentons dans cette annexe les figures supplémentaires ainsi que le développement précis de certaines expressions décrites dans le chapitre 7.

Supplementary Material

A. Mesoscopic model of filaments: elastic force and subunit orientation.

An elastic bond connecting points $\mathbf{M}(k)$ and $\mathbf{M}(l)$ on neighbouring subunits k and l , respectively will experience extension (or retraction) due to changes in the relative subunit orientation and/or position (Figure S3). The total elastic free energy (F_{elastic}) stored in the j^{th} bond extension/retraction is given by:

$$F_{\text{elastic}}(k, l)_j = \frac{S}{2} \left(\left| \mathbf{M}(k)_j \mathbf{M}(l)_j \right| - \left| \mathbf{M}(k;0)_j \mathbf{M}(l;0)_j \right| \right)^2 \quad (\text{S1}).$$

The points $\mathbf{M}(k)_j$ or $\mathbf{M}(l)_j$ (resp. $\mathbf{M}(k;0)_j$ or $\mathbf{M}(l;0)_j$) represent the attachment points of the j^{th} bond on subunits k and l in an arbitrary configuration (other than the resting, denoted by 0, configuration); S is the bond stiffness; $\left| \mathbf{M}(k)_j \mathbf{M}(l)_j \right|$ (resp. $\left| \mathbf{M}(k;0)_j \mathbf{M}(l;0)_j \right|$) is the length of the j^{th} bond in an arbitrary subunit configuration (resp. at rest). The resulting elementary elastic force is proportional to the bond stiffness (S) and change in bond length ($\left(\left| \mathbf{M}(k) \mathbf{M}(l) \right| - \left| \mathbf{M}(k;0) \mathbf{M}(l;0) \right| \right)$). The force resulting from bond extension or retraction is along a line through points $\mathbf{M}(k)$ and $\mathbf{M}(l)$ as:

$$\mathbf{F}(k, l) = -S \left(\left| \mathbf{M}(k) \mathbf{M}(l) \right| - \left| \mathbf{M}(k;0) \mathbf{M}(l;0) \right| \right) \frac{\mathbf{M}(k) \mathbf{M}(l)}{\left| \mathbf{M}(k) \mathbf{M}(l) \right|} \quad (\text{S2}).$$

Summation of all elementary forces exerted on the interface bonds between subunit k and l yields the sum of elastic force (\mathbf{F}) experienced by the k^{th} subunit (term in the *rhs* of Eq. 2 in main text). The balance of torques (Eq. 3, main text) and the kinematic condition (Eq. 4, main text) provide the equations for the Euler angles ($\theta(k)$, $\phi(k)$, $\psi(k)$) associated with vectors ($\mathbf{d}(k)_1$, $\mathbf{d}(k)_2$, $\mathbf{d}(k)_3$):

$$\begin{aligned} \frac{d\theta(k)}{dt} &= \Omega(k)_1 \cos \phi(k) + \Omega(k)_2 \sin \phi(k) \\ \frac{d\phi(k)}{dt} &= \Omega(k)_3 + \cot \theta(k) (-\Omega(k)_1 \sin \phi(k) + \Omega(k)_2 \cos \phi(k)) \\ \frac{d\psi(k)}{dt} &= \frac{1}{\sin \theta(k)} (\Omega(k)_1 \sin \phi(k) - \Omega(k)_2 \cos \phi(k)) \end{aligned} \quad (\text{S3}),$$

where ($\Omega(k)_1$, $\Omega(k)_2$, $\Omega(k)_3$) are the three-dimensional components of the angular velocity $\boldsymbol{\Omega}(k)$ expressed in the standard vector basis in \mathbb{R}^3 [1,2].

The equations for filament subunit displacement (Eqs. 2-4, main text) determine the magnitude of displacement resulting from external forces (Eq. S2). Substitution of the angular velocity of subunit k ($\boldsymbol{\Omega}(k)$; Eq. 3 in main text) into Eq. S3 permits calculation of the time evolution of the Euler angles ($\theta(k)$, $\phi(k)$, $\psi(k)$), and, consequently, the evolution of ($\mathbf{d}(k)_1$, $\mathbf{d}(k)_2$, $\mathbf{d}(k)_3$) associated with subunit k . The Matlab function *ode15s* was used to simulate subunit displacement and filament deformation under applied external loads (Figure 2, main text).

B. Analysis of the filament elastic free energy.

We provide in the following section derivations for the total free elastic energy stored in model filament configurations under various orientation constraints and show that they are formally equivalent to the Kirchhoff elastic free energy expression used in classical continuum model approaches. These expressions directly yield the filament bending, torsional, and twist-bend coupling persistence lengths, and were used to generate the three-dimensional bond stiffness-subunit interface area-persistence length phase diagrams (Figure 3, main text).

To determine how the mesoscopic mechanical properties of actin filaments are rooted in the geometric organization of bonds, we first consider the free elastic energy stored in the extension (or retraction) of individual subunit interface bond (Eq. S1 and Figure S3). The analysis presented forthcoming is limited to orientation changes that do not alter the subunit center of mass position (defined by points $\mathbf{G}(k)$ and $\mathbf{G}(l)$; Figure S3).

The following sections are organized as follows. We first derive the change in attachment point positions of a single (i.e. j^{th}) bond (Eq. S15, section *B1* forthcoming) when subunits are rotated from the resting to an arbitrary configuration (Figure S3, Panel A), then using Eq. S15 subsequently derive the elastic free energy associated with extension of this bond (Eq. S24 section *B2* forthcoming). We then use Eq. S24 to express the total elastic free energy of the different filament models considered in this study under load and deformation (section *C* forthcoming).

B1. Bond attachment and displacement with subunit rotation.

The attachment point positions of the j^{th} bond in the resting configuration is

$$\begin{aligned}\mathbf{M}(k;0)_j &= \mathbf{G}(k) + \sum_{i=1}^3 a(k)_{j,i} \mathbf{d}_i(k;0) \\ \mathbf{M}(l;0)_j &= \mathbf{G}(l) + \sum_{i=1}^3 a(l)_{j,i} \mathbf{d}_i(l;0)\end{aligned}\tag{S4},$$

where the scalars $a(k)_{j,i}$ and $a(l)_{j,i}$, $i = 1, 2$ or 3 , are, respectively, the components of bond attachments points $\mathbf{M}(k)_j$ and $\mathbf{M}(l)_j$ expressed in their respective local vector basis $(\mathbf{d}(k;0)_1, \mathbf{d}(k;0)_2, \mathbf{d}(k;0)_3)$ and $(\mathbf{d}(l;0)_1, \mathbf{d}(l;0)_2, \mathbf{d}(l;0)_3)$; the indexes k or l refers to the subunit number. Note that the $\mathbf{a}(k)_j$ or $\mathbf{a}(l)_j$ are fixed quantities independent of the spatial subunit orientation. We introduce two matrices, $\mathbf{R}(k;0)$ and $\mathbf{R}(l;0)$, whose columns are given by vector quantities $(\mathbf{d}(k;0)_1, \mathbf{d}(k;0)_2, \mathbf{d}(k;0)_3)$ or $(\mathbf{d}(l;0)_1, \mathbf{d}(l;0)_2, \mathbf{d}(l;0)_3)$, respectively. Matrices $\mathbf{R}(k;0)$ (resp. $\mathbf{R}(l;0)$) are orthogonal so that their inverse is given by their transpose matrix

$$\mathbf{R}^T(k,0) \mathbf{R}(k,0) = \mathbf{I}_3; \quad \mathbf{R}^T(l,0) \mathbf{R}(l,0) = \mathbf{I}_3\tag{S5},$$

where \mathbf{I}_3 is the identity matrix. Note that it is equivalent to define the orientation of a subunit either by the set of the three vectors $(\mathbf{d}_1, \mathbf{d}_2, \mathbf{d}_3)$ or its associated matrix \mathbf{R} .

To simplify the mathematical discussion, we introduce as the reference point the mid-point between subunits k and l :

$$\overline{\mathbf{G}} = \frac{1}{2}(\mathbf{G}(k) + \mathbf{G}(l))\tag{S6},$$

to which we assign a system of three mutually orthogonal unit vectors $(\bar{\mathbf{d}}_1(0), \bar{\mathbf{d}}_2(0), \bar{\mathbf{d}}_3(0))$. An “average” rotation, denoted $\bar{\mathbf{R}}(0)$ whose columns are given by the three vectors $(\bar{\mathbf{d}}_1(0), \bar{\mathbf{d}}_2(0), \bar{\mathbf{d}}_3(0))$ is computed as the solution of two simultaneous matrix equations:

$$\mathbf{R}(k,0) = \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}^T, \quad \mathbf{R}(l,0) = \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A} \quad (\text{S7}),$$

where \mathbf{A} is an unknown (orthogonal) matrix obeying

$$\mathbf{R}(k;0)\mathbf{A} = \mathbf{R}(l;0)\mathbf{A}^T \quad (\text{S8}).$$

Matrix \mathbf{A} is solved by taking the square root of the product $\mathbf{R}(k;0)^T \cdot \mathbf{R}(l;0)$. Once \mathbf{A} is obtained, the “average” rotation is expressed as:

$$\bar{\mathbf{R}}(0) = \mathbf{R}(k;0)\mathbf{A} = \mathbf{R}(l;0)\mathbf{A}^T \quad (\text{S9}),$$

and Eq. S4 becomes

$$\begin{aligned} \mathbf{M}(k;0)_j &= \mathbf{G}(k) + \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}^T \mathbf{a}(k)_j \\ \mathbf{M}(l;0)_j &= \mathbf{G}(l) + \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A} \mathbf{a}(l)_j \end{aligned} \quad (\text{S10}).$$

All perturbations imposed to subunits k and l are expressed with respect to the local vector basis given by the “averaged” orthogonal matrix $\bar{\mathbf{R}}(0)$ associated with the mid-point $\bar{\mathbf{G}}$.

We impose an arbitrary rotation to subunits k and l (about the mid-point $\bar{\mathbf{G}}$) and compute the resulting bond end displacements. Since only the relative motion of subunits is relevant, we consider a single perturbation denoted \mathbf{K} , expressed in the local vector basis associated with $\bar{\mathbf{R}}(0)$, so that the rotations applied to subunits k or l are, respectively:

$$\begin{aligned} \mathbf{R}(k) &= (\mathbf{I} - \sin(\varepsilon)\mathbf{K} + (1 - \cos(\varepsilon)\mathbf{K}\mathbf{K})\bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}^T \\ \mathbf{R}(l) &= (\mathbf{I} + \sin(\varepsilon)\mathbf{K} + (1 - \cos(\varepsilon)\mathbf{K}\mathbf{K})\bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A} \end{aligned} \quad (\text{S11}).$$

where \mathbf{K} is represented by a skew symmetric matrix

$$\mathbf{K} = \begin{pmatrix} 0 & -\frac{\kappa_3(k,l)}{|\boldsymbol{\kappa}|} & \frac{\kappa_2(k,l)}{|\boldsymbol{\kappa}|} \\ \frac{\kappa_3(k,l)}{|\boldsymbol{\kappa}|} & 0 & -\frac{\kappa_1(k,l)}{|\boldsymbol{\kappa}|} \\ -\frac{\kappa_2(k,l)}{|\boldsymbol{\kappa}|} & \frac{\kappa_1(k,l)}{|\boldsymbol{\kappa}|} & 0 \end{pmatrix} \quad (\text{S12}).$$

The quantities $\kappa_i(k,l)$, where $i = 1, 2$ and 3 , are the components of the axial vector $\boldsymbol{\kappa}$ associated with matrix \mathbf{K} and $|\boldsymbol{\kappa}|$ its norm; ε is the rotation angle defined as $\varepsilon = |\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|$. It is assumed that the rotation amplitude (ε) is small relative to subunit

dimensions. Therefore, we limited the expansion to order (ε) only to avoid extra (quartic) terms in the free elastic energy function.

The relation (S11) is used to express the position of attachment points in the rotated subunit configurations:

$$\begin{aligned}
\mathbf{M}(k)_j &= \bar{\mathbf{G}} + \mathbf{R}(k)\mathbf{a}(k)_j \\
&= \bar{\mathbf{G}} + (\mathbf{I} - \varepsilon\mathbf{K})\bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}^T\mathbf{a}(k)_j \\
&= \bar{\mathbf{G}} + \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}^T\mathbf{a}(k)_j - |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|\boldsymbol{\kappa} \times \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}^T\mathbf{a}(k)_j \\
&= \mathbf{M}(k;0)_j - |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|\boldsymbol{\kappa} \times \bar{\mathbf{G}}\mathbf{M}(k;0)_j
\end{aligned} \tag{S13},$$

A similar relation holds for attachment points on subunit l :

$$\begin{aligned}
\mathbf{M}(l)_j &= \mathbf{M}(l;0)_j + |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|\boldsymbol{\kappa} \times \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{A}\mathbf{a}(l)_j \\
&= \mathbf{M}(l;0)_j + |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|\boldsymbol{\kappa} \times \bar{\mathbf{G}}\mathbf{M}(l;0)_j
\end{aligned} \tag{S14}.$$

The bond vector $\mathbf{M}(k)_j\mathbf{M}(l)_j$ in the rotated configuration is given by:

$$\begin{aligned}
\mathbf{M}(k)_j\mathbf{M}(l)_j &= \mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j + |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|\boldsymbol{\kappa} \times (\bar{\mathbf{G}}\mathbf{M}(l;0)_j + \bar{\mathbf{G}}\mathbf{M}(k;0)_j) \\
&= \mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j \\
&\quad + |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|\boldsymbol{\kappa} \times (\bar{\mathbf{G}}\mathbf{G}(l) + \bar{\mathbf{G}}\mathbf{G}(k) + \mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;0)_j + \mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;0)_j)
\end{aligned} \tag{S15}.$$

B2. Free energy corresponding to the extension of a single bond.

Combining equations (S1) and (S15) yields the elastic free energy stored in bond extension or retraction as:

$$\begin{aligned}
F_{elastic}(k,l) &= \frac{S|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{2} \left(\frac{\mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j \cdot (\boldsymbol{\kappa} \times (\bar{\mathbf{G}}\mathbf{G}(l) + \bar{\mathbf{G}}\mathbf{G}(k) + \mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;0)_j + \mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;0)_j))}{|\mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j|} \right)^2 \\
&= \frac{S|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{2} \left(\frac{\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j \times (\bar{\mathbf{G}}\mathbf{G}(l) + \bar{\mathbf{G}}\mathbf{G}(k) + \mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;0)_j + \mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;0)_j))}{|\mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j|} \right)^2 + O((|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|)^3)
\end{aligned} \tag{S16},$$

To convey the importance of bond geometry in relation (S16), we introduce the global bond direction ($\mathbf{u}(k, l)$):

$$\mathbf{u}(k, l) = \frac{\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)}{|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|} \tag{S17},$$

which corresponds to the unit vector along the line connecting subunits k and l . Assuming that the j^{th} bond is along the line connecting the two subunit centers:

$$\mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j = |\mathbf{M}(k;0)_j\mathbf{M}(l;0)_j|\mathbf{u}(k, l) \tag{S18},$$

and that the subunits are perfectly aligned (i.e. $\overline{\mathbf{G}}\mathbf{G}(l) + \overline{\mathbf{G}}\mathbf{G}(k) = \mathbf{0}$), Eq. S16 simplifies to:

$$F_{elastic}(k,l) = \frac{S|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{2} \left(\boldsymbol{\kappa} \cdot \left(\mathbf{u}(k,l) \times \left(\mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;0)_j + \mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;0)_j \right) \right) \right)^2 + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^3) \quad (\text{S19}).$$

Model symmetries are used to express the coordinates of points $\mathbf{M}(k;0)_j$ and $\mathbf{M}(l;0)_j$ as bond attachment positions (\mathbf{a}):

$$\begin{aligned} \mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;0)_j &= \beta(k,l,j)\mathbf{u}(k,l) + \gamma(k,l,j) \left(\cos \phi(k,l,j)\mathbf{u}^{\perp_1}(k,l) + \sin \phi(k,l,j)\mathbf{u}^{\perp_2}(k,l) \right) \\ \mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;0)_j &= -\beta(k,l,j)\mathbf{u}(k,l) + \gamma(k,l,j) \left(\cos \phi(k,l,j)\mathbf{u}^{\perp_1}(k,l) + \sin \phi(k,l,j)\mathbf{u}^{\perp_2}(k,l) \right) \end{aligned} \quad (\text{S20}),$$

where β , $\gamma \cos \phi$ and $\gamma \sin \phi$ are the j^{th} bond projections (Figure S3, panel B) along and orthogonal to vector $\mathbf{u}(k,l)$, respectively $(\mathbf{u}^{\perp_1}(k,l), \mathbf{u}^{\perp_2}(k,l))$ are two (fixed) unit vectors orthogonal to $\mathbf{u}(k,l)$ so that $(\mathbf{u}(k,l), \mathbf{u}^{\perp_1}(k,l), \mathbf{u}^{\perp_2}(k,l))$ form a direct orthonormal vector basis. It is assumed that $\gamma(k,l,j)$ and $\phi(k,l,j)$ are randomly distributed with their two first moments given by:

$$\begin{aligned} \langle \gamma(k,l,j) \cos \phi(k,l,j) \rangle &= \langle \gamma(k,l,j) \sin \phi(k,l,j) \rangle = 0 \\ \langle \gamma(k,l,j)^2 \cos \phi(k,l,j) \sin \phi(k,l,j) \rangle &= 0 \\ \langle \gamma(k,l,j)^2 \cos^2 \phi(k,l,j) \rangle &= \langle \gamma(k,l,j)^2 \sin^2 \phi(k,l,j) \rangle = \frac{\rho^2}{2} \end{aligned} \quad (\text{S21}).$$

Rearranging equations (S18 and S19) and substituting like terms provides the total elastic free energy expression of an individual subunit bond (e.g. the j^{th} bond) yields:

$$\begin{aligned} F_{elastic}(k,l) &= \frac{S|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{2} \gamma(k,l,j)^2 \left(\boldsymbol{\kappa} \cdot \left(\mathbf{u}(k,l) \times \left(\cos \phi(k,l,j)\mathbf{u}^{\perp_1} + \sin \phi(k,l,j)\mathbf{u}^{\perp_2} \right) \right) \right)^2 \\ &= \frac{S|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{2} \gamma(k,l,j)^2 \left(\cos^2 \phi(k,l,j) (\boldsymbol{\kappa} \cdot \mathbf{u}^{\perp_1})^2 + \sin^2 \phi(k,l,j) (\boldsymbol{\kappa} \cdot \mathbf{u}^{\perp_2})^2 \right) \\ &\quad + S|\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2 \gamma(k,l,j)^2 \left(\sin \phi(k,l,j) \cos \phi(k,l,j) (\boldsymbol{\kappa} \cdot \mathbf{u}^{\perp_1}) (\boldsymbol{\kappa} \cdot \mathbf{u}^{\perp_2}) \right) + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^3) \end{aligned} \quad (\text{S22}),$$

which when combined with Eq. S21 yields the average energy of an individual subunit bond:

$$\begin{aligned} \langle F_{elastic}(k,l)_j \rangle &= \frac{S\rho^2 |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{4} \left((\boldsymbol{\kappa} \cdot \mathbf{u}^{\perp_1})^2 + (\boldsymbol{\kappa} \cdot \mathbf{u}^{\perp_2})^2 \right) + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^3) \\ &= \frac{S\rho^2 |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{4} \left(\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{I}_3 - \mathbf{u}(k,l) \otimes \mathbf{u}(k,l)) \cdot \boldsymbol{\kappa} \right) + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^3) \end{aligned} \quad (\text{S23}).$$

Summation over all elementary bonds adjoining subunits k and l (i.e. summation over index j) yields the total elastic free energy change of the subunit interface under an applied load:

$$\langle F_{elastic}(k,l) \rangle = \frac{S\rho^2 N(k,l) |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2}{4} (\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{I}_3 - \mathbf{u}(k,l) \otimes \mathbf{u}(k,l)) \cdot \boldsymbol{\kappa}) + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^3) \quad (\text{S24})$$

The terms in Eq. (S24) have physical significance. The term $SN(k,l) |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2$ is the total bond stiffness ($SN(k,l)$, where $N(k,l)$ is the total number of elementary bonds distributed over a subunit k,l interface) times the square of the distance between the two subunit centers of mass and represents the total interface elastic energy. The term ρ^2 is the square of the bond dispersion radius and accounts for the interface area, which in the case of a disc is approximated by $Area(k,l) = \pi\rho^2$. The value of $\rho \rightarrow 0$ when bond attachment points are concentrated in an infinitely small area such that the radial dispersion approaches zero. We note that the mesoscopic model presented in this study accurately predicts an energy change of zero under these conditions. The matrix $(\mathbf{I}_3 - \mathbf{u}(k,l) \otimes \mathbf{u}(k,l))$ corresponds to the projection on a plane orthogonal to the bond unit vector $\mathbf{u}(k,l)$. The axial vector $\boldsymbol{\kappa}$ has dimensions of radian.m^{-1} and its components represent the rotation strains imposed on subunits k and l .

Transformation allows for the different parameters of interest to be expressed as the elastic free energy function (Eq. S24). We introduce a composite parameter, w :

$$w = \frac{N(k,l)S |\mathbf{G}(k)\mathbf{G}(l)|^2 \rho^2}{2} \quad (\text{S25})$$

and the components of bond vectors $\mathbf{u}(k,l)$ and $\boldsymbol{\kappa}$, with respect to the basis $(\bar{\mathbf{d}}_1(0), \bar{\mathbf{d}}_2(0), \bar{\mathbf{d}}_3(0))$, as:

$$\begin{aligned} \mathbf{u}(k,l) &= (u_1, u_2, u_3) \\ \boldsymbol{\kappa}(k,l) &= (\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3) \end{aligned} \quad (\text{S26}).$$

The projection matrix $(\mathbf{I}_3 - \mathbf{u}(k,l) \otimes \mathbf{u}(k,l))$ reads as:

$$(\mathbf{I}_3 - \mathbf{u}(k,l) \otimes \mathbf{u}(k,l)) = \begin{pmatrix} u_2^2 + u_3^2 & -u_1u_2 & -u_1u_3 \\ -u_1u_2 & u_1^2 + u_3^2 & -u_2u_3 \\ -u_1u_3 & -u_2u_3 & u_1^2 + u_2^2 \end{pmatrix} \quad (\text{S27}).$$

The elastic free energy function (Eq. S24) of the mesoscopic filament models can be expressed in the form of the Kirchhoff elastic free energy equation used in the (continuum) theory of elastic rods [2,3]:

$$\begin{aligned} \langle F_{elastic}(k, l) \rangle = & \frac{w}{2} \left((u_2^2 + u_3^2) \kappa_1^2 + (u_1^2 + u_3^2) \kappa_2^2 + (u_1^2 + u_2^2) \kappa_3^2 \right) \\ & - w \left((u_1 u_2) \kappa_1 \kappa_2 + (u_1 u_3) \kappa_1 \kappa_3 + (u_2 u_3) \kappa_2 \kappa_3 \right) \end{aligned} \quad (S28).$$

Parameters of interest are the flexural (bending) rigidities ($w(u_2^2 + u_3^2)$ or $w(u_1^2 + u_3^2)$), torsional (twisting) rigidity ($w(u_1^2 + u_2^2)$), and the coupling between twisting and bending ($w(u_1 u_3) + w(u_2 u_3)$).

The advantage of the elastic free energy function derived in this work (Eq. S24) over the more familiar Kirchhoff equation used in continuum mechanics is that all parameters are derived from microscopic filament structural properties, including the subunit dimensions, filament geometry (e.g. helicity, number of strands, and staggered versus aligned double strands), the number and type (e.g. lateral, diagonal, longitudinal) of subunit interface bonds, as well as the intersubunit bond area.

C. Elastic free energy of the different filament models considered in this study

Eq. S24 is a general form of the elastic free energy stored in the configuration of the linear polymers described in this study. The expression can be simplified depending on the specific microscopic filament properties. In the following section, we derive these simplified expressions for the four filament types evaluated in this study.

C1. *Single stranded, non helical filament.*

Without loss of generality, we assume that the long axes of filament subunits are arranged in a parallel manner such that the three vectors $\mathbf{u}(k, l)$, $\mathbf{d}_3(k)$ and $\mathbf{d}_3(l)$ are aligned in a fixed vertical direction \mathbf{e}_3 :

$$\mathbf{u}(k, l) = \mathbf{d}_3(k) = \mathbf{d}_3(l) = \mathbf{e}_3 \quad (S29).$$

Under these conditions, Eq. S28 can be approximated by:

$$\langle F_{elastic}(k, l) \rangle = \frac{w}{2} (\kappa_1^2 + \kappa_2^2) \quad (S30),$$

indicating that the elastic free energy is dominated by bending (i.e. no twisting or twist-bend coupling). Therefore, the mechanical properties of the single stranded, non helical filaments evaluated in this study are governed by isotropic bending rigidities. We stress that this does not mean that single-stranded non-helical filaments do not possess an elastic torsional component (i.e. torsional rigidity), but that the bending stiffness is considerably larger than that of twisting and therefore dominates the overall mechanics.

C2. *Single stranded, helical filament.*

The center of mass positions of subunits in a single stranded, helical filament correspond to those of a helix with rise b and arclength (i.e. contour length) s wrapping with frequency, ω , around a cylinder of radius r such that:

$$\begin{aligned} x(s) &= bs \\ y(s) &= r \cos(\omega s) \\ z(s) &= r \sin(\omega s) \end{aligned} \quad (S31).$$

A helix that maintains radial contact with the cylinder (i.e. helical filament with constant width) satisfies the condition:

$$b^2 + \omega^2 r^2 = 1 \quad (\text{S32}).$$

Therefore, the vector quantities $(\mathbf{d}_1, \mathbf{d}_2, \mathbf{d}_3)$ are given by derivation of the $x, y,$ and z point positions (S30) as follows:

$$\mathbf{d}_3 = \begin{pmatrix} b \\ -\omega r \sin(\omega s) \\ \omega r \cos(\omega s) \end{pmatrix}, \mathbf{d}_1 = \begin{pmatrix} 0 \\ \cos(\omega s) \\ \sin(\omega s) \end{pmatrix}, \mathbf{d}_2 = \begin{pmatrix} -\omega r \\ -b \sin(\omega s) \\ b \cos(\omega s) \end{pmatrix} \quad (\text{S33}).$$

If subunit k and l centers of mass are located at positions $s = s_1$ and $s = s_2$ along the helix, respectively, the bond vector $\mathbf{u}(k, l)$ can be expressed using the $(\bar{\mathbf{d}}_1, \bar{\mathbf{d}}_2, \bar{\mathbf{d}}_3)$ vectors at mid-point position $s_{12} = \frac{1}{2}(s_1 + s_2)$:

$$\mathbf{u}(k, l) = (1 + \alpha_1 \delta^4) \bar{\mathbf{d}}_3(s_{12}) + (\alpha_2 \delta^2 + \alpha_3 \delta^4) \bar{\mathbf{d}}_2(s_{12}) + O(\delta^6) \quad (\text{S34}),$$

With

$$\delta = s_2 - s_1, \alpha_1 = \frac{rb\omega^3}{1152}, \alpha_2 = -\frac{rb\omega^2}{24}, \alpha_3 = \frac{rb\omega^5(3b^2 + 7r^2\omega^2)}{5760} \quad (\text{S35}).$$

Tedious manipulation yields the matrix $(\mathbf{I} - \mathbf{u}(k, l) \otimes \mathbf{u}(k, l))$:

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & 1 - \alpha_2 \delta^4 & -\alpha_2 \delta^2 - \alpha_3 \delta^4 \\ 0 & -\alpha_2 \delta^2 - \alpha_3 \delta^4 & 2\alpha_1 \delta^4 \end{pmatrix} + O(\delta^6) \quad (\text{S36}),$$

from which the equation for total elastic free energy change can be obtained:

$$\langle F_{elastic}(k, l) \rangle = \frac{w}{2} (\kappa_1^2 + (1 - \alpha_2 \delta^4) \kappa_2^2 + 2\alpha_1 \delta^4 \kappa_3^2 - (\alpha_2 \delta^2 + \alpha_3 \delta^4) \kappa_1 \kappa_3) \quad (\text{S37}).$$

Therefore, in addition to isotropic flexural rigidities (proportional to first two terms in *rhs* parentheses), single stranded helical filaments possess an intrinsic torsional rigidity (proportional to third term in *rhs* parentheses) and twist-bend coupling (proportional to fourth term in *rhs* parentheses). However, the magnitude of these rigidity parameters scales with the arclength distance (δ) along the helix connecting the subunit centers. Consequently, the twist-bend coupling ($\sim \delta^2$) of single-stranded helical filaments is weaker than their bending rigidity (~ 1), but stronger than torsional rigidity ($\sim \delta^4$), as illustrated in Figure 3, (panel B, main text).

C3. *Double stranded, helical, aligned and staggered filaments.*

We now apply equations (S19 and S24) to the case of double stranded filament organization by modifying the reference point position (Eq. S6) and the ‘‘average’’ rotation (Eqs. S7-S9). We consider four consecutive subunits in a double stranded filament, denoted k_{1-2} and l_{1-2} and their average center position, \mathbf{G} (Figure S4). For each subunit pair k_{1-2} and l_{1-2} , the two associated ‘‘average’’ matrices (see Eqs. S7-9) are computed from:

$$\begin{aligned}\mathbf{R}(k_1,0) &= \mathbf{R}(k_1,k_2;0)\mathbf{A}^T, & \mathbf{R}(k_2,0) &= \mathbf{R}(k_1,k_2;0)\mathbf{A}, \\ \mathbf{R}(l_1,0) &= \mathbf{R}(l_1,l_2;0)\mathbf{B}^T, & \mathbf{R}(l_2,0) &= \mathbf{R}(l_1,l_2;0)\mathbf{B},\end{aligned}\tag{S38},$$

with

$$\mathbf{A} = \left(\mathbf{R}(k_1,0)^T \mathbf{R}(k_2,0) \right)^{1/2}, \quad \mathbf{B} = \left(\mathbf{R}(l_1,0)^T \mathbf{R}(l_2,0) \right)^{1/2}\tag{S39}$$

And

$$\begin{aligned}\mathbf{R}(k_1,k_2;0) &= \mathbf{R}(k_1;0)\mathbf{A} = \mathbf{R}(k_2;0)\mathbf{A}^T, \\ \mathbf{R}(l_1,l_2;0) &= \mathbf{R}(l_1;0)\mathbf{B} = \mathbf{R}(l_2;0)\mathbf{B}^T\end{aligned}\tag{S40}.$$

Note that matrices $\mathbf{R}(k_1, k_2;0)$ and $\mathbf{R}(l_1,l_2;0)$ refer to the positions $\mathbf{G}(k_1,k_2)$ and $\mathbf{G}(l_1,l_2)$ (Figure S4). The averaging procedure is repeated and the ‘‘average’’ rotation $\overline{\mathbf{R}}(0)$ associated with the central position \mathbf{G} (Figure S4) is obtained from the following equations:

$$\begin{aligned}\mathbf{R}(k_1,k_2;0) &= \overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}^T, \\ \mathbf{R}(l_1,l_2;0) &= \overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C},\end{aligned}\tag{S41}$$

With

$$\mathbf{C} = \left(\mathbf{R}(k_1,k_2;0)^T \mathbf{R}(l_1,l_2;0) \right)^{1/2}\tag{S42}$$

And

$$\mathbf{R}(0) = \mathbf{R}(k_1,k_2;0)\mathbf{C} = \mathbf{R}(l_1,l_2;0)\mathbf{C}^T\tag{S43}.$$

The matrix $\overline{\mathbf{R}}(0)$ provides a set of vector basis ($\mathbf{d}_1, \mathbf{d}_2, \mathbf{d}_3$) associated with the central point \mathbf{G} (Figure S4). Using relations (S38-43), the original rotations can be expressed as:

$$\begin{aligned}\mathbf{R}(k_1,0) &= \overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}^T \mathbf{A}^T, & \mathbf{R}(k_2,0) &= \overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}^T \mathbf{A}, \\ \mathbf{R}(l_1,0) &= \overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}\mathbf{B}^T, & \mathbf{R}(l_2,0) &= \overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}\mathbf{B},\end{aligned}\tag{S44}$$

or, after perturbation (see Eq. S11)

$$\begin{aligned}\mathbf{R}(k_1) &= (\mathbf{I} - \epsilon\mathbf{K})\overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}^T \mathbf{A}^T, & \mathbf{R}(k_2) &= (\mathbf{I} - \epsilon\mathbf{K})\overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}^T \mathbf{A}, \\ \mathbf{R}(l_1) &= (\mathbf{I} + \epsilon\mathbf{K})\overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}\mathbf{B}^T, & \mathbf{R}(l_2) &= (\mathbf{I} + \epsilon\mathbf{K})\overline{\mathbf{R}}(0)\mathbf{C}\mathbf{B},\end{aligned}$$

(S45)

with \mathbf{K} , a skew symmetric matrix similar to Eq. S12.

We compute the total elastic free energy by applying arbitrary rotations to alter the position of a bond attachment point (Eq. S13) from:

$$\mathbf{M}(x;0) = \mathbf{G} + \bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{X}\mathbf{a}(x) \quad (\text{S46}),$$

where x stands for any subunit number (e.g. k_1, k_2, l_1 , or l_2) and \mathbf{X} corresponds to any of the following matrices:

$$\mathbf{C}^T\mathbf{A}^T, \mathbf{C}^T\mathbf{A}, \mathbf{C}\mathbf{B}^T, \mathbf{C}\mathbf{B} \quad (\text{S47}).$$

After perturbation, the same bond attachment point has moved to a new position, $\mathbf{M}(x)$:

$$\begin{aligned} \mathbf{M}(x) &= \mathbf{G} + (\mathbf{I} \pm \varepsilon\mathbf{K})\bar{\mathbf{R}}(0)\mathbf{X}\mathbf{a}(x) \\ &= \mathbf{G} + (\mathbf{I} \pm \varepsilon\mathbf{K})\mathbf{G}\mathbf{M}(x;0) \\ &= \mathbf{G} + (\mathbf{I} \pm \varepsilon\mathbf{K})(\mathbf{G}\mathbf{G}(x) + \mathbf{G}(x)\mathbf{M}(x;0)) \end{aligned} \quad (\text{S48}).$$

Eq. S48 is equivalent to Eq. S13 or S14 with a notable difference arising from contribution of the distance $\mathbf{G}\mathbf{G}(x)$ between the averaged position \mathbf{G} center of subunits k_1, k_2, l_1 , or l_2 . These terms are absent from Eq. S13 and S14 and are responsible for distinct mechanical properties of the filaments that emerge with the double-stranded structure. The total elastic free energy change associated with subunit pair (x,y) , where (x,y) stands for any pair of subunits connected by bonds, is therefore given by:

$$\begin{aligned} F_{elastic}(x, y) &= \frac{S}{2} \left(\frac{\mathbf{M}(x;0)\mathbf{M}(y;0) \cdot (\boldsymbol{\kappa} \times (\mathbf{G}\mathbf{M}(x;0) + \mathbf{G}\mathbf{M}(y;0)))}{|\mathbf{M}(x;0)\mathbf{M}(y;0)|} \right)^2 + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|^3) \\ &= \frac{S}{2} \left(\frac{\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{M}(x;0)\mathbf{M}(y;0) \times (\mathbf{G}\mathbf{G}(x) + \mathbf{G}(x)\mathbf{M}(x;0) + \mathbf{G}\mathbf{G}(y) + \mathbf{G}(y)\mathbf{M}(y;0)))}{|\mathbf{M}(x;0)\mathbf{M}(y;0)|} \right)^2 + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|^3) \end{aligned} \quad (\text{S49}).$$

This formula is equivalent to Eq. S16, which was derived as a general form. We introduce the global bond direction $\mathbf{u}(x,y)$ as in Eq. S16:

$$\mathbf{u}(x, y) = \frac{\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)}{|\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|} \quad (\text{S50}),$$

to simplify Eq. (S49)

$$F_{elastic}(x, y) = \frac{S}{2} (\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{u}(x, y) \times (\mathbf{G}\mathbf{G}(x) + \mathbf{G}\mathbf{G}(y))) + \boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{u}(x, y) \times (\mathbf{G}(x)\mathbf{M}(x;0) + \mathbf{G}(y)\mathbf{M}(y;0))))^2 + O(|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|^3) \quad (\text{S51}).$$

Finally, using Eq. S20, the averaged *rhs* of Eq. S51 reads

$$\begin{aligned}
\langle F_{elastic}(x, y) \rangle &= \frac{S|\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|^2}{2} (\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{v}(x, y) \otimes \mathbf{v}(x, y)) \cdot \boldsymbol{\kappa}) \\
&\quad + \frac{S\rho^2|\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|^2}{4} (\boldsymbol{\kappa} \cdot (\mathbf{I}_3 - \mathbf{u}(x, y) \otimes \mathbf{u}(x, y)) \cdot \boldsymbol{\kappa}) + O((|\boldsymbol{\kappa}| |\mathbf{G}(x)\mathbf{G}(y)|)^3)
\end{aligned}
\tag{S52},$$

With

$$\mathbf{v}(x, y) = \mathbf{u}(x, y) \times (\mathbf{G}\mathbf{G}(x) + \mathbf{G}\mathbf{G}(y))
\tag{S53}.$$

Table S1. The elastic free energy of an unstretchable elastic filament.

<i>Parameter variable</i>	<i>or Symbol</i>	<i>Definition</i>	<i>Units</i>
Thermal energy	$k_B T$		J
Normalized total elastic free energy density	$F_{Elastic}$	$\frac{2F_{elastic}}{k_B T} = L_P(\kappa_1^2 + \kappa_2^2) + L_T \kappa_3^2 + 2L_{TB} \kappa_3 (\kappa_1 + \kappa_2)$	$k_B T \cdot m^{-1}$
Total normalized free energy.	----	$F_{elastic} = F_{bend} + F_{twist} + F_{coupling}$	----
Normalized elastic free energy of bending	F_{Bend}	$L_P(\kappa_1^2 + \kappa_2^2)$	$k_B T \cdot m^{-1}$
Normalized elastic free energy of twisting	F_{Twist}	$L_T \kappa_3^2$	$k_B T \cdot m^{-1}$
Normalized elastic free energy of twist-bend coupling	$F_{Coupling}$	$2L_{TB} \kappa_3 (\kappa_1 + \kappa_2)$	$k_B T \cdot m^{-1}$
Filament segment length	Δs		m
Normalized total elastic free energy	$\Delta s \cdot F_{Elastic}$	<i>Elastic energy stored in filament segment</i>	$k_B T$
Rotation vector	$\boldsymbol{\kappa}$		$rad \cdot m^{-1}$
Rotation vector components	$\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3$	<i>Strain variables of rotation about subunit principal axes</i>	$rad \cdot m^{-1}$
Bending persistence length	L_P		m
Twisting persistence length	L_T		m
Coupling persistence length	L_{TB}		m
----	$ L_{TB} \leq \sqrt{\frac{L_B L}{2}}$	<i>Condition to ensure positivity of filament elastic free energy</i>	----

Table S2. Vectors and angles associated with subunit orientations in filament.

Rotation operation	Invariant axis (resting configuration)	Rotation angle	Angle θ	Angle φ
R1	Vector \mathbf{d}_3 (blue)	$\pi/6$	0	0
R2	Vector \mathbf{d}_3 (blue)	$-\pi/6$	0	0
R3	Vector \mathbf{d}_1 (red)	$\pi/6$	$\pi/2$	0
R4	Vector \mathbf{d}_1 (red)	$-\pi/6$	$\pi/2$	0
R5	Vector \mathbf{d}_2 (green)	$\pi/6$	$\pi/2$	$\pi/2$
R6	Vector \mathbf{d}_2 (green)	$-\pi/6$	$\pi/2$	$-\pi/2$

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Classic theory of elastic rods. Schematic representation of a continuous elastic rod (solid black line), the local vector basis (\mathbf{d}_1 , \mathbf{d}_2 , \mathbf{d}_3) associated with a specific point on the filament and the standard basis vector in \mathbb{R}^3 (\mathbf{e}_1 , \mathbf{e}_2 , \mathbf{e}_3). Vectors (\mathbf{d}_1 , \mathbf{d}_2) span the plane orthogonal to the rod whereas \mathbf{d}_3 is the tangent vector to the rod direction.

Figure S2. In- and out-of-plane filament buckling under load. A constant load applied to the filament ends yields in-plane or out-of-plane buckling depending on the existence of twist-bend coupling.

Figure S3. Elastic free energy associated with bond extension. Panel A. Arbitrary rotations $\mathbf{R}(k)$ (resp. $\mathbf{R}(l)$) applied to subunit k (resp. l) move the bond end position $\mathbf{M}(k;0)$ (resp. $\mathbf{M}(l;0)$) to a new position $\mathbf{M}(k)$ (resp. $\mathbf{M}(l)$). The elastic free energy stored in the bond extension/retraction is a complex function of the rotation angles (coded by rotations $\mathbf{R}(k)$ and $\mathbf{R}(l)$) and the microscopic filament architecture. Panel B. Projection of $\mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;0)_j$ and $\mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;0)_j$, respectively, either on the line connecting subunits centers (points $\mathbf{M}(k;1)$ and $\mathbf{M}(l;1)$, indicated by large black dots) or on the plane orthogonal to the bond vector (points $\mathbf{M}(k;2)$ and $\mathbf{M}(l;2)$, indicated by large black dots); φ is the angle between the projected bond vector $\mathbf{G}(k)\mathbf{M}(k;2)$ and $\mathbf{d}_1(k)$ or $\mathbf{G}(l)\mathbf{M}(l;2)$ and $\mathbf{d}_1(l)$ (red line segments).

Figure S4. Elementary meshes in double stranded filament organizations. Rotations applied to subunits of double stranded filament organization are referred to a mesh consisting of four neighboring subunits, as shown for the aligned (panel A) or staggered (panel B) architectures. Each mesh is characterized by its central point (\mathbf{G} , magenta square) and the different groups of bonds connecting subunits. Panel A. Double-stranded aligned filaments have 2 aligned bond populations (between subunits (k_1, k_2) and (l_1, l_2)), 2 transversal bond populations (subunits (k_1, l_2) and (k_2, l_1)) and two longitudinal groups of bond (subunits (k_1, l_1) and (k_2, l_2)). Panel B. Double-stranded staggered filaments have 2 longitudinal bond groups (subunits (k_1, l_1) and (k_2, l_2)) and 2 transversal bond populations (subunits (k_1, l_2) and (k_2, l_1)).

Figure S5. Subunit orientation in filaments. The elastic free energy change depends on filament subunit orientation. Rotations R_i , ($i = 1, \dots, 6$) that bring the resting configuration (center) to a given subunit orientation (examples shown at the cartoon periphery), are characterized by an invariant vector and angle (see Table S2). The (θ, ϕ) components of the rotation invariant are indicated in the two last columns of the Table S2.

Figure S6. Contributions of bending, twisting and coupling to the total elastic free energy. Dependence of total (panel A), bending (panel B), twisting (panel C), coupling (panel D), fractional bending (panel E) and fractional coupling (panel F) elastic free energies on the angular strain rotation as presented in Figure 4 of main text, but expanded over larger strain angles. We note that at large deformation values of unknown quantity, the linear theory presented in this work may fail. Any function of the rotation strain variables $(\kappa_1, \kappa_2, \kappa_3)$, with the condition $\kappa_1^2 + \kappa_2^2 + \kappa_3^2 = 1$, can be mapped either on the unit sphere or represented as a (θ, ϕ) -diagram; the north (resp. south) pole of the unit sphere corresponds to the $\theta = 0$ (resp. $\theta = 180^\circ$) side of the (θ, ϕ) -diagram. Both representations are used in panels A-F.

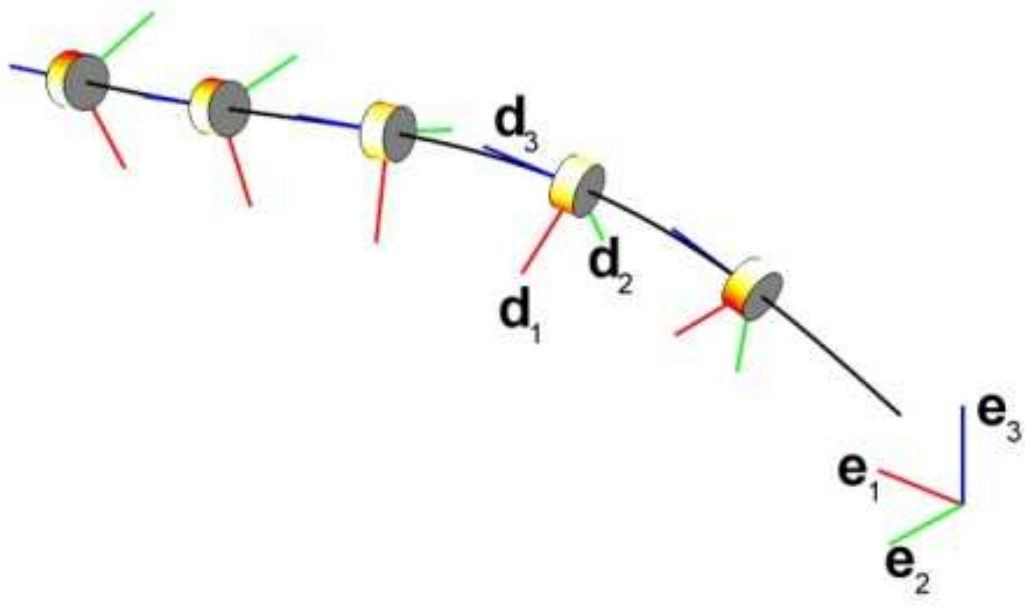


Figure S1

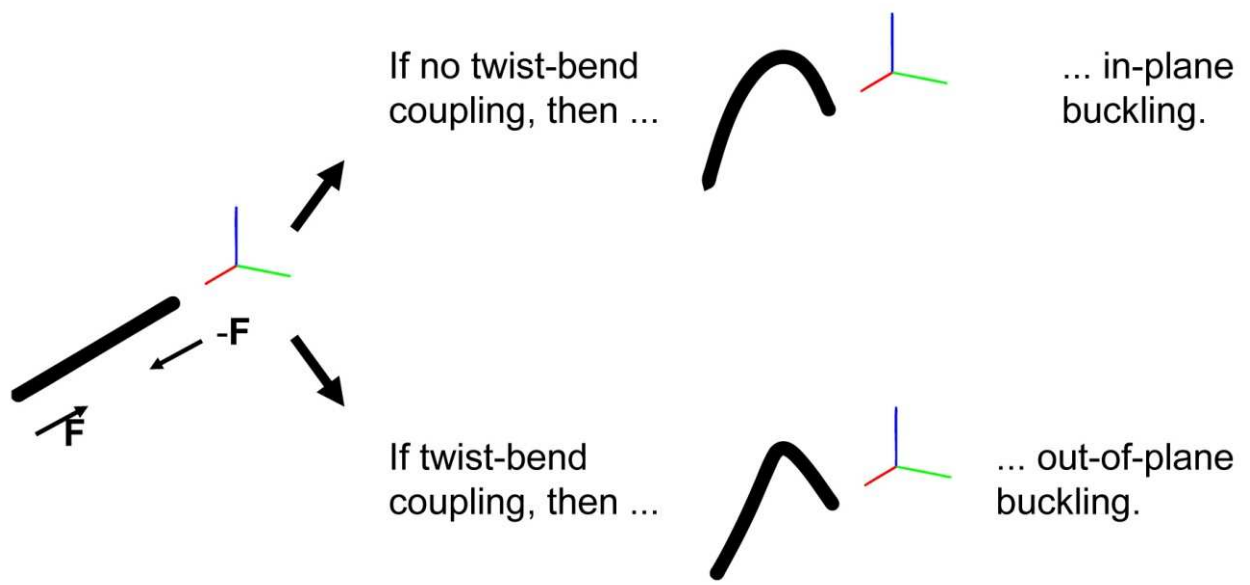
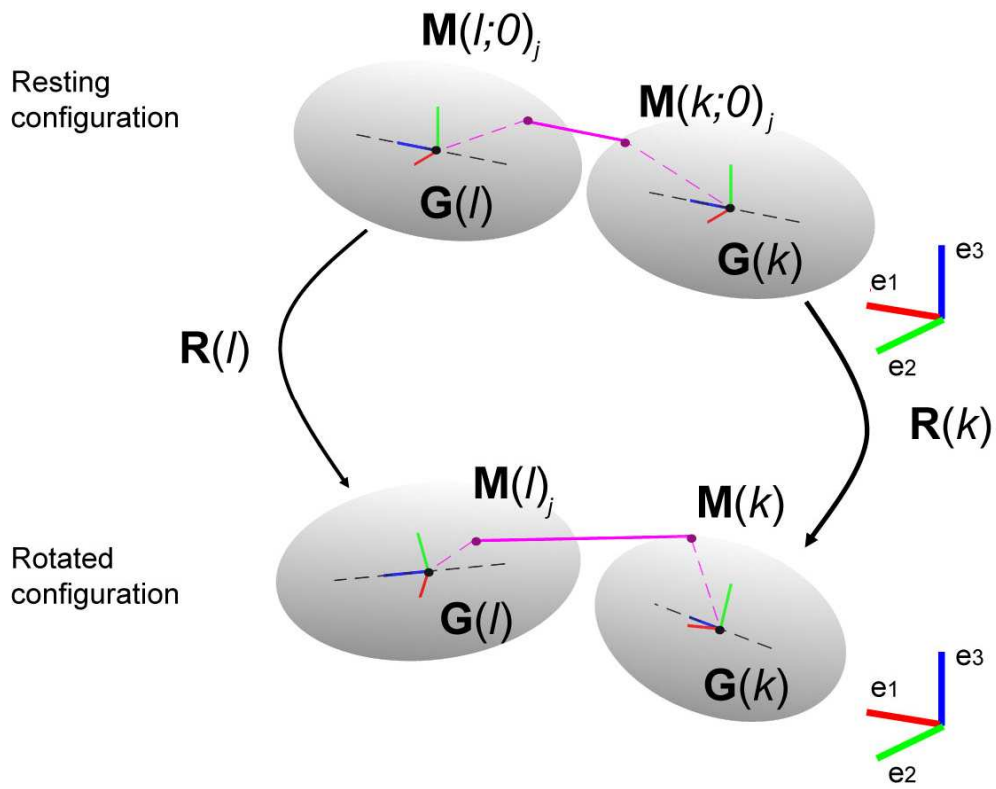


Figure S2

A



B

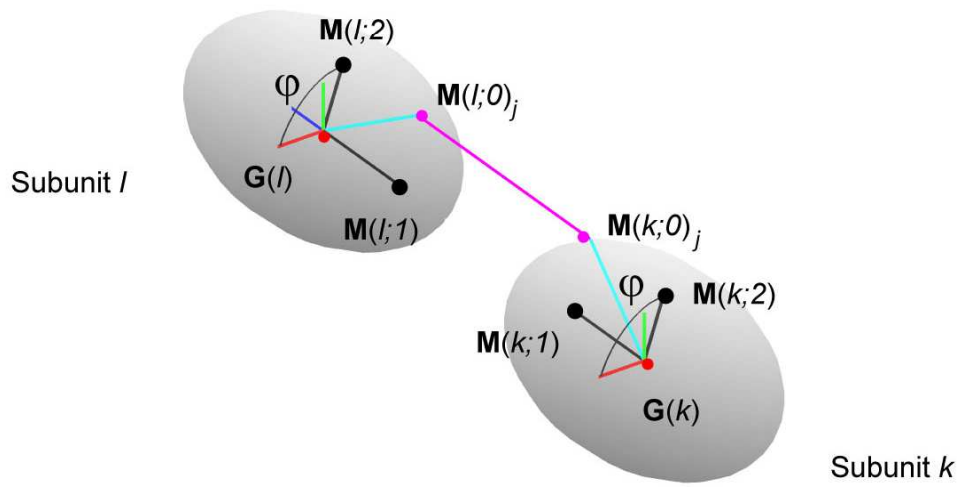


Figure S3

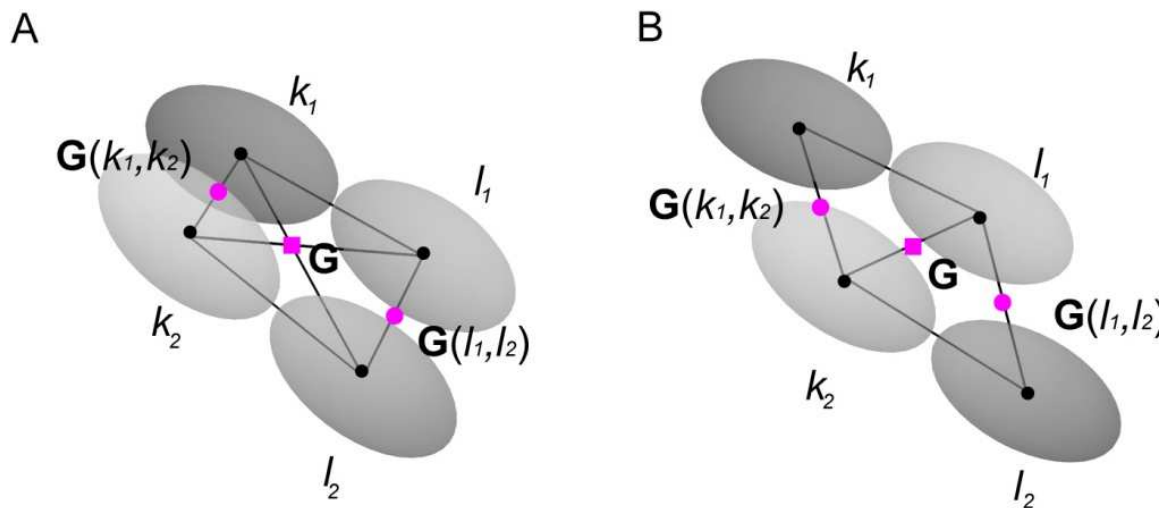


Figure S4

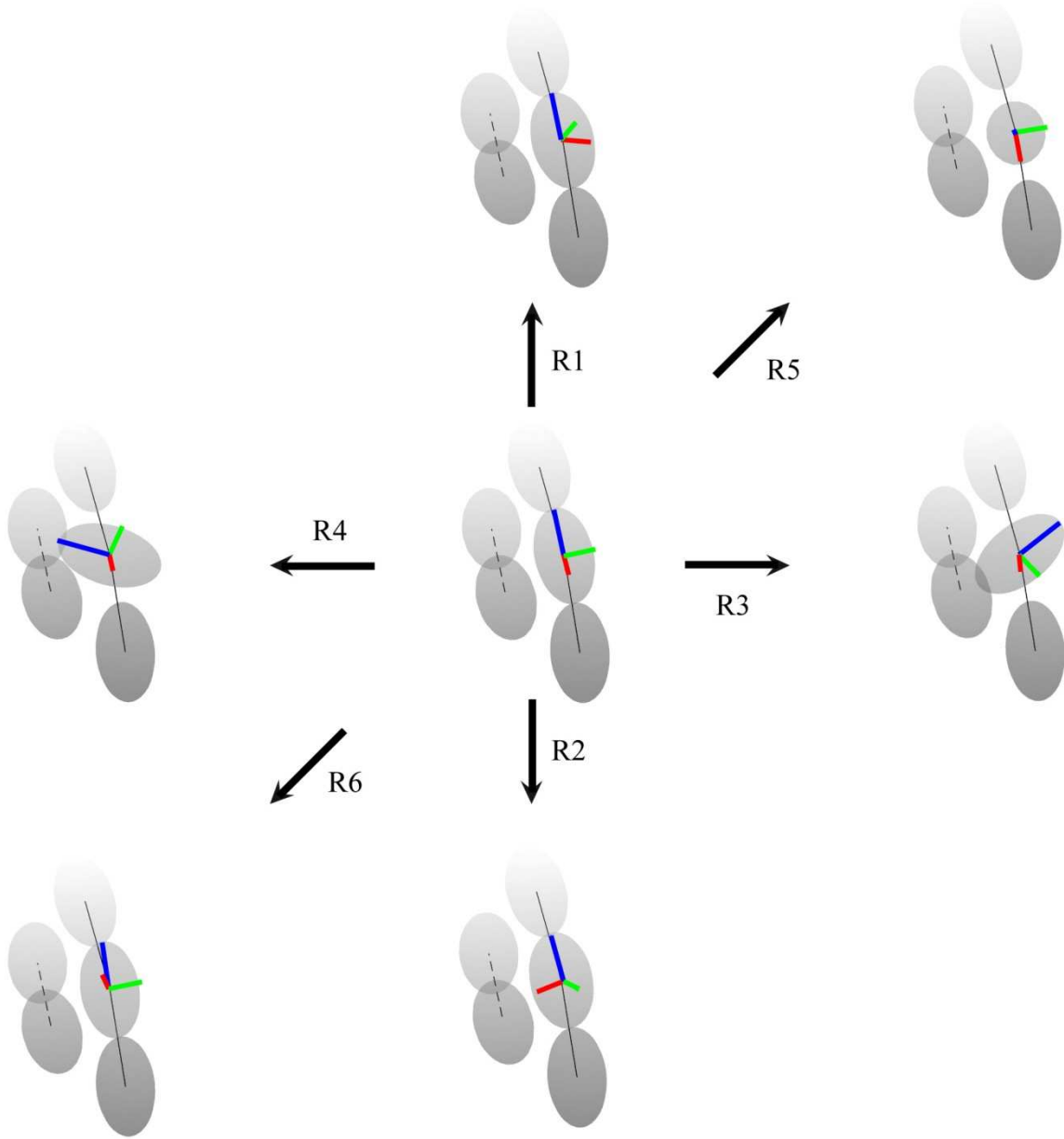


Figure S5

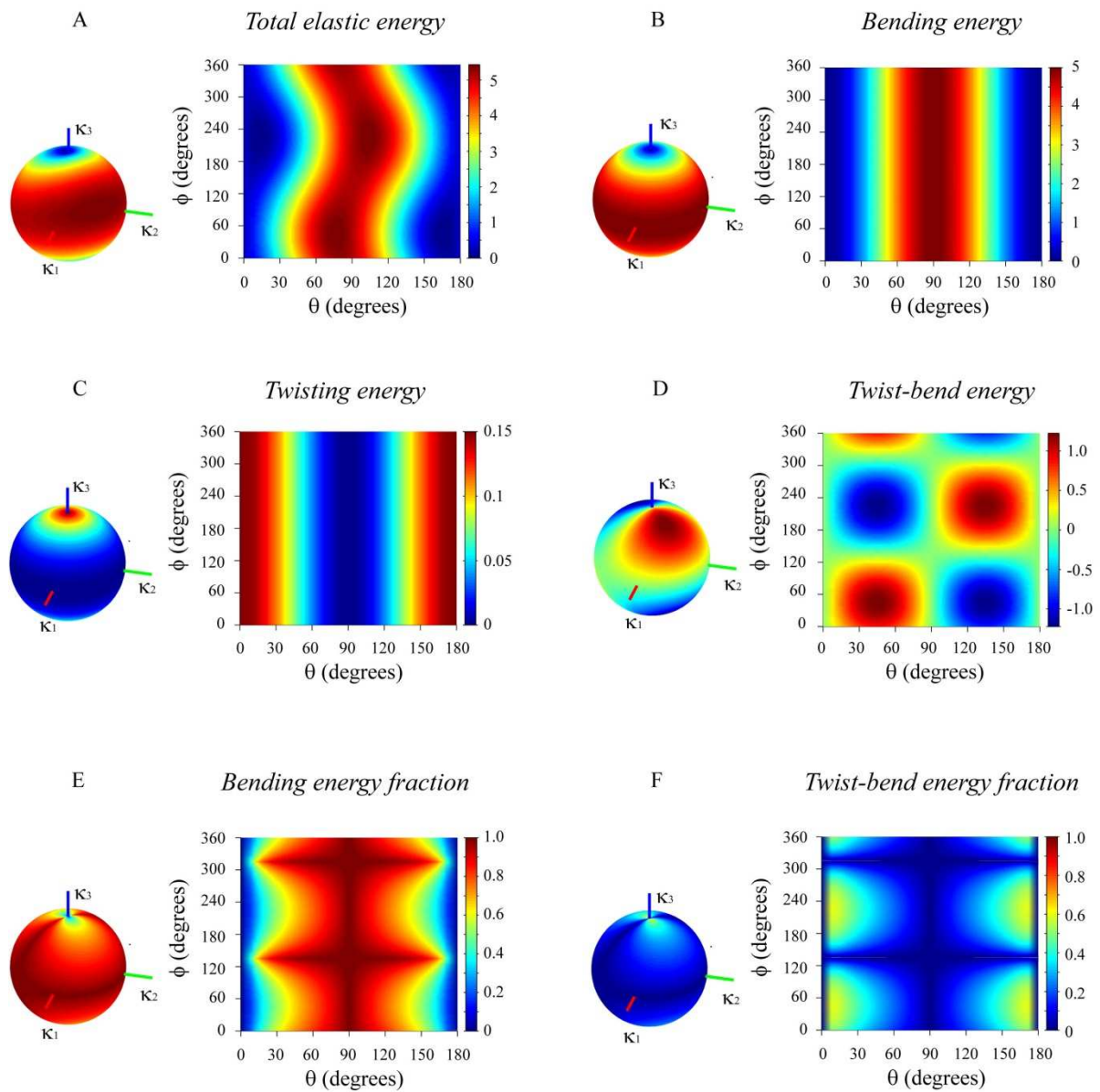


Figure S6

1. Landau LD, Lifshitz EM (2003) *Mechanics*: Elsevier.
2. Antman S (1995) *Nonlinear Problems of Elasticity*: Springer.
3. Landau LD, Lifshitz EM (2002) *Theory of Elasticity*: Elsevier.

Bibliographie

- Achard, V., J. Martiel, A. Michelot, C. Guérin, A. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski, 2010. A "Primer"-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility. *Current biology* 20 :432–8.
- Alberts, J., and G. Odell, 2004. In silico reconstitution of Listeria propulsion exhibits nano-saltation. *PLoS Biol* 2 :e412.
- Andrianantoandro, E., and T. Pollard, 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Molecular cell* 24 :13–23.
- Atilgan, E., D. Wirtz, and S. Sun, 2005. Morphology of the lamellipodium and organization of actin filaments at the leading edge of crawling cells. *Biophysical journal* 89 :3589–3602.
- Bamburg, J., H. Harris, and A. Weeds, 1980. Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain. *FEBS letters* 121 :178–182.
- Barshop, B., R. Wrenn, and C. Frieden, 1983. Analysis of numerical methods for computer simulation of kinetic processes : development of KINSIM—a flexible, portable system. *Analytical Biochemistry* 130 :134–145.
- Bathe, M., C. Heussinger, M. Claessens, A. Bausch, and E. Frey, 2008. Cytoskeletal bundle mechanics. *Biophysical Journal* 94 :2955–2964.
- Beltzner, C., and T. Pollard, 2008. Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex. *Journal of Biological Chemistry* 283 :7135–7144.
- Ben-Avraham, D., and M. Tirion, 1995. Dynamic and elastic properties of F-actin : a normal-modes analysis. *Biophysical Journal* 68 :1231–1245.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R. Golsteyn, M. Carlier, and C. Sykes, 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417 :308–311.
- Bernheim-Groswasser, A., J. Prost, and C. Sykes, 2005. Mechanism of actin-based motility : a dynamic state diagram. *Biophysical journal* 89 :1411–1419.
- Berro, J., A. Michelot, L. Blanchoin, D. Kovar, and J. Martiel, 2007. Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophysical journal* 92 :2546–2558.
- Bindschadler, M., E. Osborn, C. Dewey, and J. McGrath, 2004. A mechanistic model of the actin cycle. *Biophysical Journal* 86 :2720–2739.

- Blanchoin, L., and T. Pollard, 1998. Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *Journal of Biological Chemistry* 273 :25106–25111.
- Blanchoin, L., and T. Pollard, 1999. Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *Journal of Biological Chemistry* 274 :15538–46.
- Blanchoin, L., and T. Pollard, 2002. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* 41 :597–602.
- Bobkov, A., A. Muhrad, K. Kokabi, S. Vorobiev, S. Almo, and E. Reisler, 2002. Structural effects of cofilin on longitudinal contacts in F-actin. *Journal of molecular biology* 323 :739–750.
- Bobkov, A., A. Muhrad, D. Pavlov, K. Kokabi, A. Yilmaz, and E. Reisler, 2006. Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *Journal of molecular biology* 356 :325–334.
- Boukellal, H., O. Campás, J. Joanny, J. Prost, and C. Sykes, 2004. Soft Listeria : actin-based propulsion of liquid drops. *Physical Review E* 69 :61906.
- Brill-Karniely, Y., Y. Ideses, A. Bernheim-Groswasser, and A. Ben-Shaul, 2009. From Branched Networks of Actin Filaments to Bundles. *ChemPhysChem* 10 :2818–2827.
- Cameron, L., T. Svitkina, D. Vignjevic, J. Theriot, and G. Borisy, 2001. Dendritic organization of actin comet tails. *Current Biology* 11 :130–135.
- Carrier, M., and D. Pantaloni, 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 :7789–92.
- Carrier, M., D. Pantaloni, and E. Korn, 1987. The mechanisms of ATP hydrolysis accompanying the polymerization of Mg-actin and Ca-actin. *Journal of Biological Chemistry* 262 :3052–9.
- Carrier, M., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G. Xia, Y. Hong, N. Chua, and D. Pantaloni, 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover : implication in actin-based motility. *Journal of Cell Biology* 136 :1307–22.
- Carlsson, A., 2001. Growth of branched actin networks against obstacles. *Biophysical Journal* 81 :1907–1923.
- Carlsson, A., 2006. Stimulation of actin polymerization by filament severing. *Biophysical journal* 90 :413–422.
- Chik, J., U. Lindberg, and C. Schutt, 1996. The structure of an open state of β -actin at 2.65 Å resolution. *Journal of molecular biology* 263 :607–623.
- Chu, J., and G. Voth, 2005. Allostery of actin filaments : molecular dynamics simulations and coarse-grained analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 :13111–6.
- Chu, J., and G. Voth, 2006. Coarse-grained modeling of the actin filament derived from atomistic-scale simulations. *Biophysical journal* 90 :1572–1582.

- Dafalias, Y., and Z. Pitouras, 2009. Stress field in actin gel growing on spherical substrate. *Biomechanics and modeling in mechanobiology* 8 :9–24.
- Dalhaimer, P., T. Pollard, and B. Nolen, 2007. Nucleotide-mediated conformational changes of monomeric actin and Arp3 studied by molecular dynamics simulations. *Journal of molecular biology* 376 :166–83.
- Daniels, D., 2010. Effect of Capping Protein on a Growing Filopodium. *Biophysical Journal* 98 :1139–1148.
- Dayel, M., O. Akin, M. Landeryou, V. Risca, A. Mogilner, and R. Mullins, 2009. In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility. *Plos Biology* 7 :e1000201.
- De La Cruz, E., and D. Sept, 2010. The Kinetics of Cooperative Cofilin Binding to Actin Filaments. *Biophysical Journal* 98 :1893–901.
- De La Cruz, E., 2005. Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments : isoform-dependent cooperative interactions. *Journal of molecular biology* 346 :557–564.
- De La Cruz, E., 2009. How cofilin severs an actin filament. *Biophysical Reviews* 1 :51–59.
- Dickinson, R., L. Caro, and D. Purich, 2004. Force generation by cytoskeletal filament end-tracking proteins. *Biophysical journal* 87 :2838–2854.
- Dos Remedios, C., D. Chhabra, M. Kekic, I. Dedova, M. Tsubakihara, D. Berry, and N. Nosworthy, 2003. Actin binding proteins : regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews* 83 :433–73.
- Du, J., and C. Frieden, 1998. Kinetic Studies on the Effect of Yeast Cofilin on Yeast Actin Polymerization†. *Biochemistry* 37 :13276–84.
- Edelstein-Keshet, L., and G. Ermentrout, 1998. Models for the length distributions of actin filaments : I. simple polymerization and fragmentation. *Bulletin of mathematical biology* 60 :449–475.
- Edelstein-Keshet, L., and G. Ermentrout, 2001. A model for actin-filament length distribution in a lamellipod. *Journal of Mathematical Biology* 43 :325–355.
- Elcock, A., D. Sept, and J. McCammon, 2001. Computer Simulation of Protein- Protein Interactions. *J. Phys. Chem. B* 105 :1504–1518.
- Erickson, H., 1989. Co-operativity in protein-protein association* 1 : : The structure and stability of the actin filament. *Journal of molecular biology* 206 :465–474.
- Ermentrout, G., and L. Edelstein-Keshet, 1998. Models for the length distributions of actin filaments : II. Polymerization and fragmentation by gelsolin acting together. *Bulletin of mathematical biology* 60 :477–503.
- Frieden, C., and D. Goddette, 1983. Polymerization of actin and actin-like systems : evaluation of the time course of polymerization in relation to the mechanism. *Biochemistry* 22 :5836–5843.
- Frieden, C., 1983. Polymerization of actin : mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20 degrees C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 :6513–7.

- Frieden, C., 1985. Actin and tubulin polymerization : the use of kinetic methods to determine mechanism. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* 14 :189–210.
- Fujiwara, I., S. Takahashi, H. Tadakuma, T. Funatsu, and S. Ishiwata, 2002. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature cell biology* 4 :666–673.
- Fujiwara, I., D. Vavylonis, and T. Pollard, 2007. Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 :8827–32.
- Gerbal, F., P. Chaikin, Y. Rabin, and J. Prost, 2000. An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion. *Biophysical Journal* 79 :2259–2275.
- Gillespie, D., 1977. Exact stochastic simulation of coupled chemical reactions. *The journal of physical chemistry* 81 :2340–2361.
- Gillespie, D., 2007. Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annual Reviews of Physical Chemistry* 58 :35–55.
- Goldman, R., 1984. Intermediate filaments. *The Journal of Cell Biology* 22–27.
- Gouin, E., M. Welch, and P. Cossart, 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current opinion in microbiology* 8 :35–45.
- Haviv, L., Y. Brill-Karniely, R. Mahaffy, F. Backouche, A. Ben-Shaul, T. Pollard, and A. Bernheim-Groswasser, 2006. Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 :4906–11.
- Haviv, L., N. Gov, Y. Ideses, and A. Bernheim-Groswasser, 2008. Thickness distribution of actin bundles in vitro. *European Biophysics Journal* 37 :447–454.
- Helfand, B., L. Chang, and R. Goldman, 2004. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *Journal of Cell Science* 117 :133–41.
- Holmes, K., 2009. Structural biology : actin in a twist. *Nature* 457 :389–390.
- Howard, J., and A. Hyman, 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* 422 :753–758.
- Howard, J., 2001. Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. *Sunderland, MA : Sinauer* .
- Ideses, Y., Y. Brill-Karniely, L. Haviv, A. Ben-Shaul, and A. Bernheim-Groswasser, 2008. Arp2/3 branched actin network mediates filopodia-like bundles formation in vitro. *PLoS One* 3.
- Isambert, H., P. Venier, A. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M. Carlier, 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry* 270 :11437–44.
- Janmey, P., U. Euteneuer, P. Traub, and M. Schliwa, 1991. Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks. *Journal of Cell Biology* 113 :155–60.

- Kinosian, H., L. Selden, J. Estes, and L. Gershman, 1993. Actin filament annealing in the presence of ATP and phalloidin. *Biochemistry* 32 :12353–12357.
- Kobiela, A., H. Pasolli, and E. Fuchs, 2003. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature cell biology* 6 :21–30.
- Korn, E., 1982. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiological Reviews* 62 :672–737.
- Kovar, D., and T. Pollard, 2004. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 :14725–30.
- Kovar, D., E. Harris, R. Mahaffy, H. Higgs, and T. Pollard, 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* 124 :423–435.
- Kraikivski, P., B. Slepchenko, and I. Novak, 2008. Actin Bundling : Initiation Mechanisms and Kinetics. *Physical review letters* 101 :128102.
- Kuhn, J., and T. Pollard, 2005. Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophysical journal* 88 :1387–1402.
- Lan, Y., and G. Papoian, 2008. The stochastic dynamics of filopodial growth. *Biophysical journal* 94 :3839–3852.
- Liu, A., D. Richmond, L. Maibaum, S. Pronk, P. Geissler, and D. Fletcher, 2008. Membrane-induced bundling of actin filaments. *Nature physics* 4 :789–793.
- Loisel, T., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M. Carlier, 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401 :613–616.
- Maciver, S., and A. Weeds, 1994. Actophorin preferentially binds monomeric ADP-actin over ATP-bound actin : consequences for cell locomotion. *FEBS letters* 347 :251–256.
- Maciver, S., H. Zot, and T. Pollard, 1991. Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Cell Biology* 115 :1611–20.
- Maly, I., and G. Borisy, 2001. Self-organization of a propulsive actin network as an evolutionary process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 :11324–9.
- Marcy, Y., J. Prost, M. Carlier, and C. Sykes, 2004. Forces generated during actin-based propulsion : a direct measurement by micromanipulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 :5992–7.
- McCullough, B., L. Blanchoin, J. Martiel, and E. De La Cruz, 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments : implications for severing and cell mechanics. *Journal of molecular biology* 381 :550–558.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds, 1997. Cofilin changes the twist of F-actin : implications for actin filament dynamics and cellular function. *Journal of Cell Biology* 138 :771–81.

- Melki, R., S. Fievez, and M. Carlier, 1996. Continuous Monitoring of Pi Release Following Nucleotide Hydrolysis in Actin or Tubulin Assembly Using 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurine Ribonucleoside and Purine-Nucleoside Phosphorylase as an Enzyme-Linked Assay†. *Biochemistry* 35 :12038–12045.
- Michelot, A., C. Guerin, S. Huang, M. Ingouff, S. Richard, N. Rodiuc, C. Staiger, and L. Blanchoin, 2005. The formin homology 1 domain modulates the actin nucleation and bundling activity of Arabidopsis FORMIN1. *The Plant Cell Online* 17 :2296.
- Michelot, A., E. Derivery, R. Paterski-Boujemaa, C. Guérin, S. Huang, F. Parcy, C. Staiger, and L. Blanchoin, 2006. A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Current Biology* 16 :1924–1930.
- Michelot, A., J. Berro, C. Guérin, R. Boujemaa-Paterski, C. Staiger, J. Martiel, and L. Blanchoin, 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Current Biology* 17 :825–833.
- Mihashi, K., H. Yoshimura, T. Nishio, A. Ikegami, and K. Kinoshita Jr, 1983. Internal Motion of F-Actin in 10-6-10-3s Time Range Studied by Transient Absorption Anisotropy : Detection of Torsional Motion. *Journal of biochemistry* 93 :1705–7.
- Minehardt, T., P. Kollman, R. Cooke, and E. Pate, 2006. The open nucleotide pocket of the profilin/actin x-ray structure is unstable and closes in the absence of profilin. *Biophysical journal* 90 :2445–2449.
- Mitchison, T., 1988. Microtubule dynamics and kinetochore function in mitosis. *Annual review of cell biology* 4 :527–545.
- Miyoshi, T., T. Tsuji, C. Higashida, M. Hertzog, A. Fujita, S. Narumiya, G. Scita, and N. Watanabe, 2006. Actin turnover dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network : evidence of frequent filament severing. *The Journal of Cell Biology* 175 :947–55.
- Mogilner, A., and L. Edelstein-Keshet, 2002. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells : a quantitative analysis. *Biophysical journal* 83 :1237–1258.
- Mogilner, A., and G. Oster, 1996. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophysical Journal* 71 :3030–3045.
- Mogilner, A., and G. Oster, 2003. Force generation by actin polymerization II : the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophysical Journal* 84 :1591–1605.
- Mogilner, A., and B. Rubinstein, 2005. The physics of filopodial protrusion. *Biophysical Journal* 89 :782–795.
- Mogilner, A., 2006. On the edge : modeling protrusion. *Current opinion in cell biology* 18 :32–39.
- Mullins, R., J. Heuser, and T. Pollard, 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin : nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 :6181–6.
- Oda, T., M. Iwasa, T. Aihara, Y. Maéda, and A. Narita, 2009. The nature of the globular-to fibrous-actin transition. *Nature* 457 :441–445.

- Otomo, T., D. Tomchick, C. Otomo, S. Panchal, M. Machius, and M. Rosen, 2005. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433 :488–494.
- Parekh, S., O. Chaudhuri, J. Theriot, and D. Fletcher, 2005. Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nature cell biology* 7 :1219–1223.
- Pavlov, D., A. Muhlrads, J. Cooper, M. Wear, and E. Reisler, 2007. Actin filament severing by cofilin. *Journal of molecular biology* 365 :1350–1358.
- Peskin, C., G. Odell, and G. Oster, 1993. Cellular motions and thermal fluctuations : the Brownian ratchet. *Biophysical Journal* 65 :316–324.
- Pfaendtner, J., D. Branduardi, M. Parrinello, T. Pollard, and G. Voth, 2009. Nucleotide-dependent conformational states of actin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 :12723–8.
- Pfaendtner, J., E. De La Cruz, and G. Voth, 2010. Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 :7299–304.
- Pollard, T., and G. Borisy, 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112 :453–465.
- Pollard, T., and W. Earnshaw, 2007. Cell biology, 2nd Ed. Saunders Philadelphia.
- Pollard, T., L. Blanchoin, and R. Mullins, 2000. MOLECULAR MECHANISMS CONTROLLING ACTIN FILAMENT DYNAMICS IN NONMUSCLE CELLS. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29 :545–576.
- Pollard, T., W. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, and G. Johnson, 2004. Cell biology, Saunders. *Elsevier Science USA* 276 :127–215.
- Pollard, T., 1981. Cytoplasmic contractile proteins. *Journal of Cell Biology* 91 :156–165.
- Pollard, T., 1986. Rate constants for the reactions of ATP-and ADP-actin with the ends of actin filaments. *Journal of Cell Biology* 103 :2747–54.
- Pollard, T., 1990. Actin. *Current opinion in cell biology* 2 :33–40.
- Pollard, T., 2009. Mechanics of cytokinesis in eukaryotes. *Current Opinion in Cell Biology* 22 :50–6.
- Pring, M., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, and S. Zigmond, 2003. Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42 :486–496.
- Prochniewicz, E., N. Janson, D. Thomas, and E. De La Cruz, 2005. Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *Journal of molecular biology* 353 :990–1000.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmond, A. Bretscher, and C. Boone, 2002. Role of formins in actin assembly : nucleation and barbed-end association. *Science* 297 :612–5.

- Rould, M., Q. Wan, P. Joel, S. Lowey, and K. Trybus, 2006. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *Journal of Biological Chemistry* 281 :31909–19.
- Schaus, T., E. Taylor, and G. Borisy, 2007. Self-organization of actin filament orientation in the dendritic-nucleation/array-treadmilling model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 :7086–91.
- Schurr, J., 1984. Rotational diffusion of deformable macromolecules with mean local cylindrical symmetry* 1. *Chemical Physics* 84 :71–96.
- Schutt, C., J. Myslik, M. Rozycki, N. Goonesekere, and U. Lindberg, 1993. The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature* 365 :810–816.
- Sekimoto, K., J. Prost, F. J. "ulicher, H. Boukellal, and A. Bernheim-Grosswasser, 2004. Role of tensile stress in actin gels and a symmetry-breaking instability. *The European Physical Journal E : Soft Matter and Biological Physics* 13 :247–259.
- Sept, D., and J. McCammon, 2001. Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophysical Journal* 81 :667–674.
- Sept, D., A. Elcock, and J. McCammon, 1999. Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry1. *Journal of Molecular Biology* 294 :1181–1189.
- Sept, D., J. Xu, T. Pollard, and J. Andrew McCammon, 1999. Annealing accounts for the length of actin filaments formed by spontaneous polymerization. *Biophysical journal* 77 :2911–2919.
- Sharp, D., G. Rogers, and J. Scholey, 2000. Microtubule motors in mitosis. *Nature* 407 :41–47.
- Shemesh, T., and M. Kozlov, 2007. Actin polymerization upon processive capping by formin : A model for slowing and acceleration. *Biophysical journal* 92 :1512–1521.
- Small, J., M. Herzog, and K. Anderson, 1995. Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *Journal of Cell Biology* 129 :1275–86.
- Stukalin, E., and A. Kolomeisky, 2006. ATP hydrolysis stimulates large length fluctuations in single actin filaments. *Biophysical journal* 90 :2673–2685.
- Svitkina, T., and G. Borisy, 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *Journal of Cell Biology* 145 :1009–26.
- Svitkina, T., E. Bulanova, O. Chaga, D. Vignjevic, S. Kojima, J. Vasiliev, and G. Borisy, 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *Journal of Cell Biology* 160 :409–21.
- Tilney, L., D. DeRosier, A. Weber, and M. Tilney, 1992. How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. II. Nucleation, actin filament polarity, filament assembly, and evidence for a pointed end capper. *Journal of Cell Biology* 118 :71–81.

- Upadhyaya, A., J. Chabot, A. Andreeva, A. Samadani, and A. Van Oudenaarden, 2003. Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 :4521–6.
- Van Der Gucht, J., E. Paluch, J. Plastino, and C. Sykes, 2005. Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 :7847–52.
- Vavylonis, D., Q. Yang, and B. O’Shaughnessy, 2005. Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 :8543–8.
- Vavylonis, D., D. Kovar, B. O’Shaughnessy, and T. Pollard, 2006. Model of formin-associated actin filament elongation. *Molecular cell* 21 :455–466.
- Vignjevic, D., D. Yarar, M. Welch, J. Peloquin, T. Svitkina, and G. Borisy, 2003. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *Journal of Cell Biology* 160 :951–62.
- Weichsel, J., and U. Schwarz, 2010. Two competing orientation patterns explain experimentally observed anomalies in growing actin networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 :6304–9.
- Wriggers, W., and K. Schulten, 1999. Investigating a back door mechanism of actin phosphate release by steered molecular dynamics. *Proteins Structure Function and Genetics* 35 :262–273.
- Wriggers, W., J. Tang, T. Azuma, P. Marks, and P. Janmey, 1998. Cofilin and gelsolin segment-1 : molecular dynamics simulation and biochemical analysis predict a similar actin binding mode1. *Journal of molecular biology* 282 :921–932.
- Xu, Y., J. Moseley, I. Sagot, F. Poy, D. Pellman, B. Goode, and M. Eck, 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116 :711–723.
- Yang, L., D. Sept, and A. Carlsson, 2006. Energetics and dynamics of constrained actin filament bundling. *Biophysical journal* 90 :4295–4304.
- Yoshimura, H., T. Nishio, K. Mihashi, K. Kinoshita, et al., 1984. Torsional motion of eosin-labeled F-actin as detected in the time-resolved anisotropy decay of the probe in the sub-millisecond time range. *Journal of molecular biology* 179 :453–467.
- Zheng, J., J. Wan, and M. Poo, 1996. Essential role of filopodia in chemotropic turning of nerve growth cone induced by a glutamate gradient. *Journal of Neuroscience* 16 :1140–9.
- Zheng, X., K. Diraviyam, and D. Sept, 2007. Nucleotide effects on the structure and dynamics of actin. *Biophysical journal* 93 :1277–1283.