



HAL
open science

Exploration par simulations numériques de l'auto-organisation du cytosquelette sous conditions géométriquement contrôlées

Gaëlle Letort

► **To cite this version:**

Gaëlle Letort. Exploration par simulations numériques de l'auto-organisation du cytosquelette sous conditions géométriquement contrôlées. Physiologie [q-bio.TO]. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAS048 . tel-01330526v2

HAL Id: tel-01330526

<https://theses.hal.science/tel-01330526v2>

Submitted on 24 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **MBS - Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Gaëlle LETORT

Thèse dirigée par **Laurent BLANCHOIN**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, équipe "Physique du Cytosquelette et de la Morphogénèse"** et de **l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement**

Exploration par simulations numériques de l'auto-organisation du cytosquelette sous conditions géométriquement contrôlées.

Thèse soutenue publiquement le **22 septembre 2015**, devant le jury composé de :

Mr. Bertrand FOURCADE

Professeur - Université Joseph Fourier, Grenoble, Président

Mr. Zoher GUEROUI

Chargé de recherche - École Normale Supérieure, Paris, Rapporteur

Mr. Karsten KRUSE

Professeur - Universität des Saarlandes, Saarbrücken, Rapporteur

Mr. Guillaume SALBREUX

Group Leader - Francis Crick Institute, Londres, Examineur

Mr. François NEDELEC

Directeur de recherche - EMBL, Heidelberg, Examineur

Mr. Laurent BLANCHOIN

Directeur de recherche CNRS - CEA, Grenoble, Directeur de thèse



For there is nothing either good or bad, but thinking makes it so.

William Shakespeare

REMERCIEMENTS

Ma thèse a duré 4 ans, dans des conditions assez originales et avec une première année particulièrement difficile. Si j'y ai survécu, c'est grâce à tous les gens formidables que j'ai eu la chance de cotoyer avant et pendant ces années. Je tiens donc à présent à tous vous remercier, en particulier :

- le labo LISA, pour votre soutien surtout durant la première année. Mention spéciale pour le groupe du "jeudi bar" et extension (Agathe, Baptiste, Fred, Cedric, Lionel, Thomas, Mathieu, Blandine, Arnaud, Francois, Delphine, AnneSo, Alice, Antho, Jean-Gui, Charlotte, Ophélie...) dont le super esprit a été essentielle pour tenir le coup.
- Laurent, tu m'as bien aidé malgré tout en devenant mon directeur de thèse en deuxième année. Tu as été très exigeant, donc j'ai pas mal progressé. J'ai beaucoup appris durant ces années grâce et à cause de toi. Je pense que vers la fin nous avons réussi à trouver un bon équilibre pour travailler ensemble. J'ai bien apprécié de pouvoir plaisanter avec toi et de te parler sans détours. Surement parce que tu viens du Sud Centre. Par contre, je n'ai toujours pas compris le canard sans tête.
- Manu, j'ai gagné de la motivation grâce à ton enthousiasme sur mes simus. T'as toujours apporté plein de supers idées, et j'ai beaucoup aimé d'avoir plusieurs projets sortant de l'actine. J'ai eu beaucoup de libertés sur ces projets ce qui m'a permis d'explorer ce que je voulais et de m'amuser.
- Laurent et Manu, en tant que chefs de l'équipe Cytomorpha, j'ai apprécié la façon dont l'équipe fonctionnait, votre accessibilité, les personnes que vous avez embauché, les retraites de labo...
- Je remercie aussi Francois Nedelec qui nous a passé le code source de Cytosim et de nombreux conseils et aides bien appréciés. L'école d'été de Cytosim était une semaine particulièrement intéressante.
- L'équipe Cytomorpha dans laquelle régnait un super esprit, on se croirait presque une famille. Merci pour tout ces moments partagés (les aliquots, le mur anti-stress, les phrases du labo, les gateaux, les twizys...).
Merci à, en priorité les "slaves" de mon box I, la news channel Dr. Hayer avec qui j'ai beaucoup collaboré monomaniaquement, the useless secretary Mytoo, the vice-boss Batata, l'external affair minister Lawrene, food manager Aleks.
Bien qu'extérieurs au box, on n'aurait pas survécu sans notre buffer Tic-Tac : Yérémi et Chri-chri.
Je remercie aussi les autres hors-box du labo (mais néanmoins sympathiques) : Fabricey, Audrey, Emil'ail, Charlotte, Lea, Ila, Amandine, Mag, Danielle, Sophie, Alphée, Karine. Encore plus loin, tout les parisiens : Ben, Ana, James, grand Stéphane, petit Stéfan, Jérémie. Les "petits" nouveaux, merci de prendre soin de tout ces gens : Thomas, Dmitri, Daisuké, LJ. Et merci enfin à tous les anciens du labo que j'ai rencontré : Andyyyyyy, Lord Aldo, TheO, Bobias, Tim, Didier, Rajaa, Fra, Agnieszka, Rémi, Christian, Virginie, Johnathan, Jerome.
- Et les meilleurs pour la fin, un énorme merci pour tout à ma famille et mes amis proches. Merci pour votre présence (mentale ou physique) à la soutenance, malgré les

distances. Et pour tout le soutien depuis de nombreuses années et toutes les années à venir. Félicitations à ma famille pour le pot de thèse fabuleux.

En résumé, je vous dis à tous (cités ci-dessus ou non) un énorme

Milesker

Table des matières

Remerciements	3
Avant Propos	10
Première partie I Présentation générale	11
1. Introduction	12
1.1 Contexte général	12
1.2 Assemblage des composants du cytosquelette	13
1.2.1 Du monomère au filament d'actine	13
1.2.2 Les microtubules	15
Instabilité dynamique	16
1.3 Propriétés des polymères	17
1.3.1 Polarité des polymères	17
1.3.2 Propriétés mécaniques d'un polymère biologique	17
1.3.3 Forces de polymérisation	18
1.4 Rôles et organisations des polymères du cytosquelette	19
1.4.1 Les structures cellulaires de filaments d'actine	20
Assemblage de structures d'actine	20
Dynamique des structures d'actine	37
1.4.2 Rôles des microtubules	38
2. Méthodes d'études	42
2.1 Méthodes d'études possibles	42
2.1.1 Étude <i>in-silico</i>	42
Le problème de l'éléphant	44
Réflexion et simplicité avant tout...	44
2.2 Approche utilisée dans le cadre de ma thèse	45
2.2.1 Niveaux de complexité	45
2.2.2 Étude <i>in-vitro</i> du cytosquelette	46
2.3 Objectifs et contenu	48
2.3.1 Outil utilisé	48
2.3.2 Objectifs	49
3. Cytosim : simulation du cytosquelette	50
3.1 Cytosim : présentation générale	50
3.1.1 Principe	50
Exemple de simulation	51
Espace de simulation	51

Interactions électrostatiques	51
3.2 Objets utilisés	52
3.2.1 Fiber	52
Dynamique d'un filament	53
3.2.2 Hand	53
Motor	53
Nucleator	54
3.2.3 Single	54
Picket	54
3.2.4 Couple	54
CrossLink	54
Fork	54
3.3 Utilisations précédentes de Cytosim	54
Deuxième partie II Organisation des filaments d'actine	57
4. Formation de structures d'actine : observations in-vitro	58
4.1 Méthode de "micropatterning" du cytosquelette d'actine	58
4.2 Observations	58
4.3 Questions soulevées	61
5. Formation de structures d'actine : explications in-silico	62
5.1 Simulation de micropatrons	62
5.1.1 Implémentation d'un filament d'actine	62
5.1.2 Implémentation des micropatrons avec Cytosim	62
5.1.3 Paramètres globaux	64
5.1.4 Implémentation générale de la simulation	65
5.2 Auto-organisation des filaments d'actine à partir de micropatrons : résultats	66
5.2.1 Lois physiques régissant la formation des architectures d'actine	66
5.2.2 Croissance des filaments d'actine dans un environnement confiné.	97
Troisième partie III Contractilité des structures d'actine	101
6. Présentation générale de la contractilité	102
6.1 La contractilité dans la cellule	102
6.1.1 Les moteurs moléculaires : les myosines	102
6.1.2 Les structures contractiles cellulaires	104
6.2 Études de la contractilité	105
6.2.1 Les modèles illustrant la contractilité	105
6.2.2 Caractéristiques de la contraction	109
6.2.3 Les conditions biochimiques pour la contractilité	110
6.2.4 Questions soulevées	111
7. Simulations de la contractilité : réorganisation des filaments	112
7.1 Simulation des protéines nécessaires à la contractilité	112
7.1.1 Moteurs moléculaires : \approx myosine VI	112

7.1.2	Protéines de pontage : $\approx \alpha$ -actinine	112
7.2	Principes de la contraction <i>in-silico</i>	114
7.2.1	Au niveau de 2 filaments	114
7.2.2	Extension à plusieurs filaments	114
7.3	Contrôle de la contractilité	115
7.3.1	Effet des moteurs moléculaires	116
7.3.2	Ajout de protéines de pontage	117
7.3.3	Propriétés mécaniques des filaments	119
8.	Étude de la contraction de structures d'actine	122
8.1	Contraction des architectures d'actine selon leur composition biochimique	122
8.2	Désassemblage induit par les myosines	164
8.2.1	Simulation du désassemblage par dépolymérisation	164
8.2.2	Dissociation des complexes Arp2/3	165
8.2.3	Fragmentation des filaments	165
8.2.4	Conclusion du désassemblage	167
Quatrième partie IV Positionnement du centrosome		169
9.	Le centrosome dans la cellule	170
9.1	Présentation générale du centrosome	170
9.1.1	Où est le centrosome dans la cellule ?	171
9.1.2	Fuseau mitotique	172
9.2	Théories du placement du centrosome	173
9.2.1	Observation des forces mises en jeu	173
	Étude dans la cellule	173
	Observations <i>in-vitro</i>	174
9.2.2	Identification des forces mises en jeu	176
9.2.3	Forces de "pushing"	177
9.2.4	Forces de "pulling"	178
9.2.5	Effet du confinement	179
10.	Positionnement du centrosome : simulations	182
10.1	Configuration des simulations	182
10.1.1	Ajout des moteurs moléculaires	183
10.2	Forces de "pushing" : simulations	184
10.2.1	Répartition des microtubules	184
10.2.2	Efficacité des forces	187
	Rigidité relative des microtubules	187
	Dynamique des microtubules	190
	Nombre de microtubules	191
10.3	Forces de "pulling" : simulations	192
10.3.1	Le duel "pushing" vs "pulling"	192
10.3.2	Variation de la géométrie cellulaire	195

11. Applications à des cas particuliers	198
11.1 Ciliogenèse	198
11.1.1 Observations <i>in-vitro</i>	198
11.1.2 Simulations du décentrage du centrosome	199
Lien avec le noyau	200
11.2 Fuseau mitotique monopolaire	201
Cinquième partie V Conclusion	203
12. Bilan et perspectives	204
12.1 Bilan	204
12.2 Perspectives	205
12.2.1 Combinaison <i>in-vitro</i> et <i>in-silico</i>	205
12.2.2 Évolution de Cytosim	206
12.2.3 Perspective générale	206
Annexe	209
A. Analyse statistique	210
A.1 Ségrégation asymétrique de l'ADN	210
Bibliographie	229

AVANT PROPOS

Mon interaction avec le monde de la biologie a débuté par un mois à cliquer sur des cellules. Pour une informaticienne, effectuer une tâche répétitive à la main (et sous Windows) ne semble pas être le projet idéal. Néanmoins, ces cellules qui prenaient toutes sortes de formes au bout de mon curseur sont des entités fascinantes, avec une complexité, une variabilité et une multitude de comportements étonnante, tout en étant singulièrement optimales pour le fonctionnement de tout organisme vivant. Je me suis donc dirigée vers une thèse dans l'ambition de développer de belles théories mathématiques et/ou de développer des logiciels, qui en bonus permettraient d'aider à l'exploration du monde biologique. Ma compréhension initiale de mon sujet de thèse était qu'il fallait développer un logiciel qui permettrait de prédire, comment certains filaments (qui seraient importants pour le fonctionnement des cellules) s'organisent géométriquement selon les conditions initiales que l'on impose. Il devait donc s'agir principalement de programmation, d'un peu de considérations géométriques et d'un soupçon de biologie pour relever le tout. Ce ne fût pas le cas.

Nous avons en effet réalisé après quelques temps que nous pouvions utiliser un logiciel déjà existant pour faire toutes ces prédictions, ce qui a remis en cause tout mon plan de travail. Disposant alors d'un outil très performant et étant plongée dans un environnement expérimentaliste, mon but pour cette thèse a progressivement dévié d'une philosophie "la méthode en priorité" vers "le projet en priorité". Cette thèse ne pouvait donc plus se cantonner au domaine des mathématiques appliquées ou de l'informatique : il m'a fallu investir d'autres disciplines qui m'étaient moins familières, notamment la biologie et la physique. J'ai ainsi cherché à développer mes compétences non pas dans un seul domaine mais bien à l'interface de toutes ces disciplines. Il m'est donc difficile de catégoriser cette thèse comme un pur travail de mathématiques appliquées, d'informatique ou même de modélisation : sa caractéristique principale est son interdisciplinarité. C'est pourquoi je tiens à avertir les futurs lecteurs qu'il est possible que ce manuscrit contienne des inexactitudes qui pourraient choquer un expert dans le domaine correspondant. Néanmoins j'espère avoir réussi à proposer un ensemble suffisamment correct pour permettre au lecteur d'apprécier l'étude que nous avons construite.

Le fil conducteur de ce mémoire de thèse est d'explorer, grâce aux simulations en particulier, différents mécanismes des polymères du cytosquelette, primordiaux dans les processus cellulaires. La question biologique initiale n'a pas changé : nous avons effectivement étudié l'organisation des filaments d'actine selon les contraintes géométriques de la zone de nucléation, mais grâce à l'utilisation du logiciel Cytosim, nous avons pu aller plus loin que prévu dans cette étude. Nous avons en effet utilisé mes simulations pour "soutenir" des projets expérimentaux développés dans l'équipe Cytomorpho, portant sur la contraction de réseaux d'actine et le positionnement du centrosome. Cette collaboration étroite entre la théorie et la démarche expérimentale demande un effort d'adaptation, mais donne tout son intérêt au projet.

Pour conclure cet avant propos, une citation d'Albert Einstein me paraît toute indiquée : *"In theory, theory and practice are the same. In practice, they are not."*

Première partie

PRÉSENTATION GÉNÉRALE

1. Introduction	12
1.1 Contexte général	12
1.2 Assemblage des composants du cytosquelette	13
1.3 Propriétés des polymères	17
1.4 Rôles et organisations des polymères du cytosquelette	19
2. Méthodes d'études	42
2.1 Méthodes d'études possibles	42
2.2 Approche utilisée dans le cadre de ma thèse	45
2.3 Objectifs et contenu	48
3. Cytosim : simulation du cytosquelette	50
3.1 Cytosim : présentation générale	50
3.2 Objets utilisés	52
3.3 Utilisations précédentes de Cytosim	54

1. INTRODUCTION

1.1 Contexte général

La cellule est l'unité de base de tout organisme vivant. Une cellule est un système autonome, mais les cellules interagissent néanmoins entre elles et avec l'environnement extérieur. Les cellules peuvent adopter une grande variété de formes et moduler leur morphologie suivant la fonction physiologique exercée. On peut notamment citer la migration cellulaire (Figure 1.1 (A)), la formation de tissu, la cicatrisation d'une blessure (Figure 1.1 (B)), la mort cellulaire (apoptose), la division cellulaire (Figure 1.1 (C)), la différenciation de cellules souches (Figure 1.1 (D))...

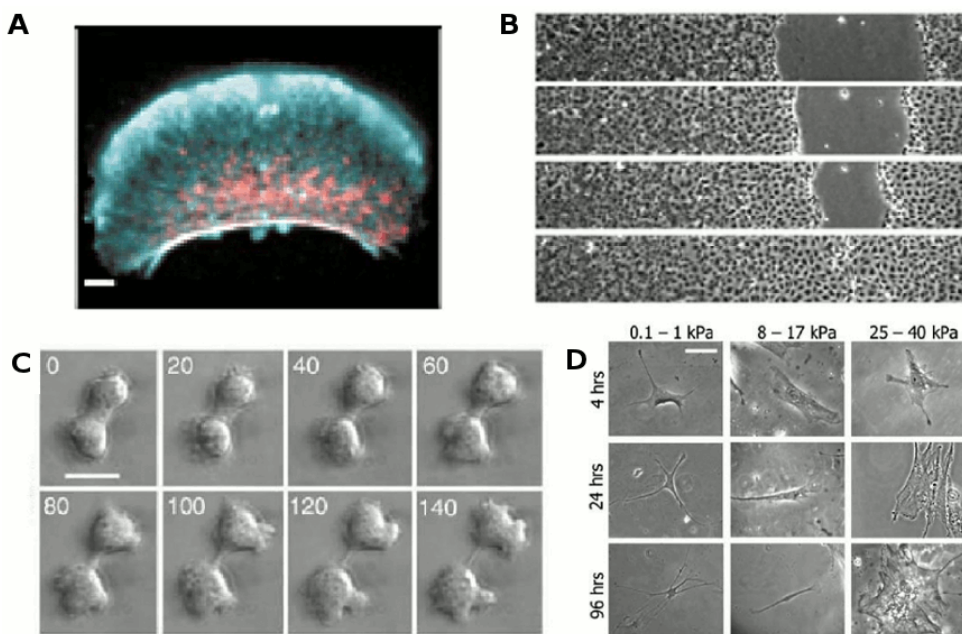


Fig. 1.1 : Exemples de processus cellulaires

(A) Fragment mobile de kératocyte. Tiré de [Verkhovsky et al.(1999)]. (B) Colonisation d'une blessure par des cellules épithéliales. Tiré de [Matsubayashi et al.(2011)]. (C) Cytocinèse : division d'une cellule. Tiré de [Girard et al.(2004)]. (D) Différenciation de cellules souches en différentes cellules selon la rigidité du substrat. Tiré de [Engler et al.(2006)].

Lors de ces événements de morphogénèse, la cellule utilise son squelette dynamique, le cytosquelette (Figure 1.2), composé de 3 types de polymères : les microtubules, les filaments d'actine et les filaments intermédiaires. La dynamique du cytosquelette est fortement influencée par les conditions extérieures (stress, signaux biochimiques, concentrations, substrat...) et dirige ainsi les différents processus cellulaires.

Grâce à sa grande adaptabilité, le cytosquelette confère à la cellule sa forme en réponse aux contraintes de l'environnement extérieur. Il permet aussi à la cellule d'organiser les différents organites dans le cytoplasme, de produire les forces propulsives et contractiles nécessaires à la migration. De plus, lors de la division cellulaire, le cytosquelette permet de séparer les chromosomes et de former un anneau contractile permettant de dissocier les 2 cellules.

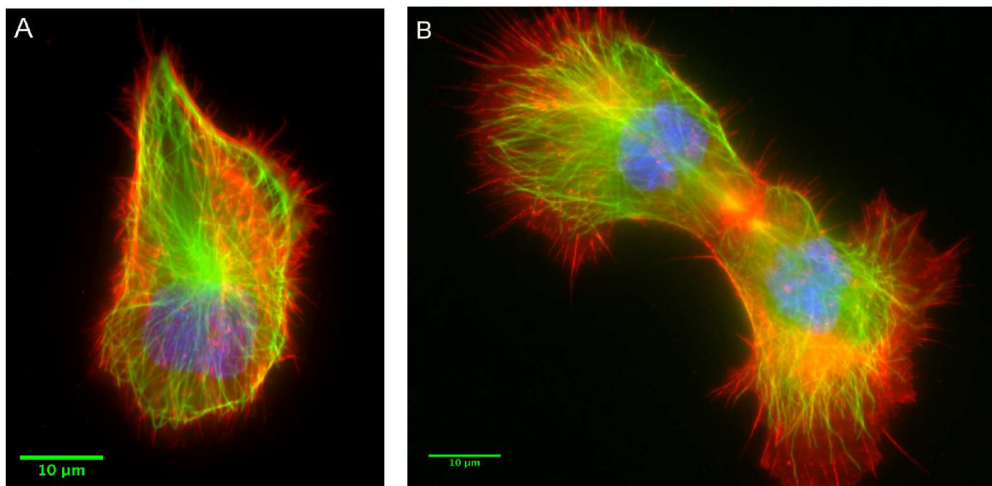


Fig. 1.2 : Le cytosquelette dans la cellule

Le cytosquelette dans une cellule épithéliale en interphase (A) et dans des cellules épithéliales à la fin de la division (B); Rouge : filaments d'actine; Vert : microtubules; Bleu : noyau. Images prises par Mithila Burute (Équipe Cytomorpho).

L'étude de la dynamique du cytosquelette et de son rôle dans la morphogénèse cellulaire est donc essentielle pour progresser dans la compréhension des mécanismes impliqués dans des dysfonctionnements cellulaires, notamment au cours de maladies : cancer, maladie neuro-dégénératrice... Nous allons donc au cours de cette thèse étudier les 2 principaux composants du cytosquelette, les filaments d'actine et les microtubules et plus particulièrement comment ces entités peuvent s'auto-assembler en structures fonctionnalisées leur permettant d'assurer leurs fonctions physiologiques.

1.2 Assemblage des composants du cytosquelette

Les filaments d'actine et les microtubules sont des polymères biologiques, c'est-à-dire qu'ils se forment à partir d'une brique élémentaire par auto-assemblage. Cette brique élémentaire peut être un monomère d'actine dans le cas des filaments d'actine ou un hétérodimère de tubuline dans le cas des microtubules. Dans la partie suivante, nous allons décrire ce processus d'auto-assemblage de chacun de ces 2 polymères.

1.2.1 Du monomère au filament d'actine

Les monomères d'actine sont des protéines polarisées, qui en s'assemblant forment un polymère semi-flexible orienté, d'un diamètre d'environ 8 nm, le filament d'actine (Figure 1.3). La longueur d'un filament d'actine peut varier de quelques nanomètres (*in-vivo*) à plusieurs dizaines de microns (*in-vitro*). Les monomères d'actine peuvent s'associer sur chacune des extrémités (élongation) ou s'en dissocier (dépolymérisation). Les constantes d'association et de dissociation des monomères au filament sont différentes entre les 2 extrémités (Figure 1.3), l'extrémité barbée (ou \oplus) du filament d'actine s'allongeant 10 fois plus vite que l'extrémité pointue (ou \ominus , [Pollard(1986)]). Néanmoins ces vitesses sont modulées par les conditions environnementales (concentration d'actine en solution, nature du nucléotide ou du cation divalent lié au monomère d'actine...) mais aussi par des protéines interagissant avec le filament (cf 1.4.1).

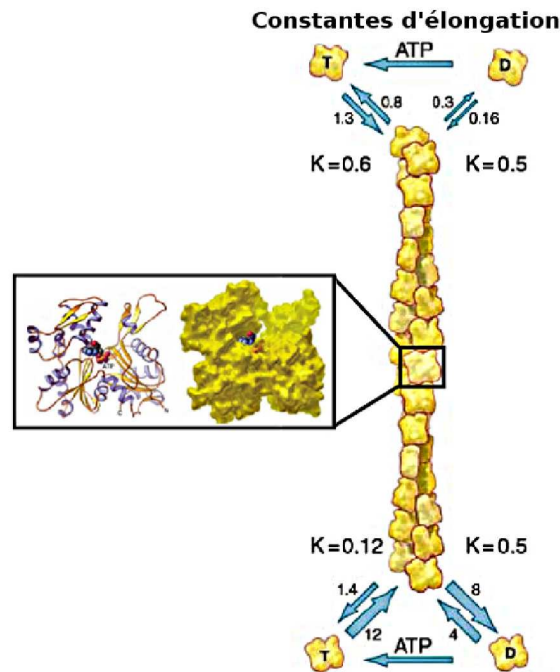


Fig. 1.3 : Monomère d'actine et élongation d'un filament

Structure d'un monomère et constantes d'association et de dissociation des monomères d'actine aux 2 extrémités du filament. Adapté de [Pollard et Borisy(2003), Pollard et Cooper(2009)].

La formation d'un nouveau filament à partir des monomères en solution (appelé nucléation) est un processus thermodynamiquement peu favorable, dû à l'instabilité des dimères et trimères d'actine [Pollard et Borisy(2003)] (Figure 1.4 (A)). Cependant certaines protéines, appelées "facteurs de nucléation d'actine" (le complexe Arp2/3, les formines, les protéines WH2), favorisent cet assemblage (Figure 1.4 (B)). Les processus de nucléation et les principales protéines interagissant avec les monomères ou les filaments d'actine seront détaillés dans le chapitre 1.4.1 et dans la revue qui y est associée [Letort et al.(2015a)].

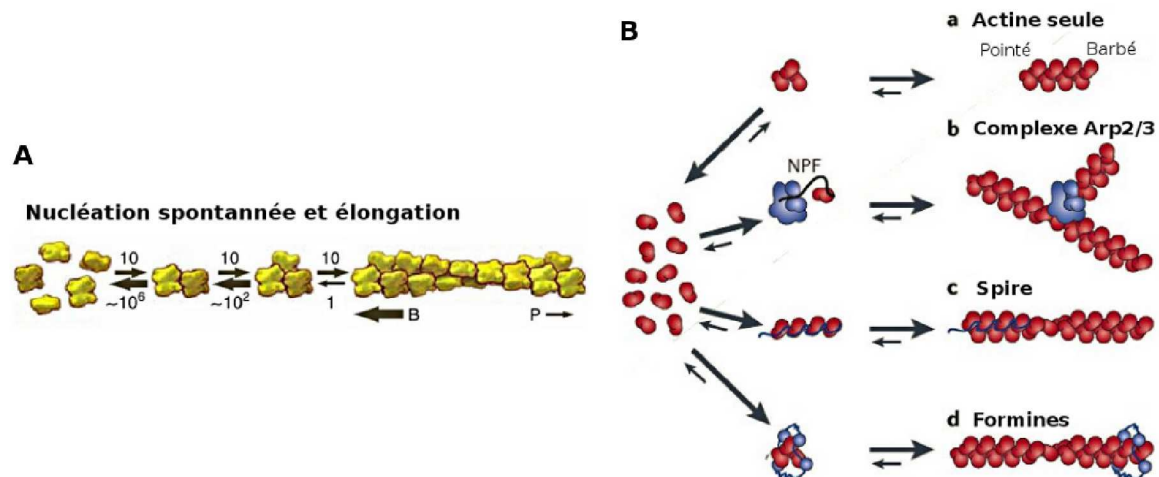


Fig. 1.4 : Nucléation des filaments d'actine

(A) Nucléation spontanée par formation de dimères et trimères, fortement instables. Tiré de [Pollard et Cooper(2009)]. (B) Différentes voies de nucléation à l'aide de facteurs de nucléation d'actine. Tiré de [Goley et Welch(2006)].

1.2.2 Les microtubules

Un microtubule est un tube, de 25 nm de diamètre, composé en général de 13 protofilaments. Un protofilament est formé par des hétérodimères de tubuline, formés par l'association de sous-unités d' α -tubuline et de β -tubuline. Le microtubule est formé par l'association latérale de ces protofilaments (Figure 1.5 (A)). Il peut être long de quelques microns à des centaines de microns et est 100 fois plus rigide qu'un filament d'actine. De même que les monomères d'actine confèrent au filament d'actine sa polarité, les hétérodimères de tubuline déterminent la polarité d'un microtubule. En effet il possède une extrémité \ominus dont la dynamique est bien plus lente que son extrémité \oplus .

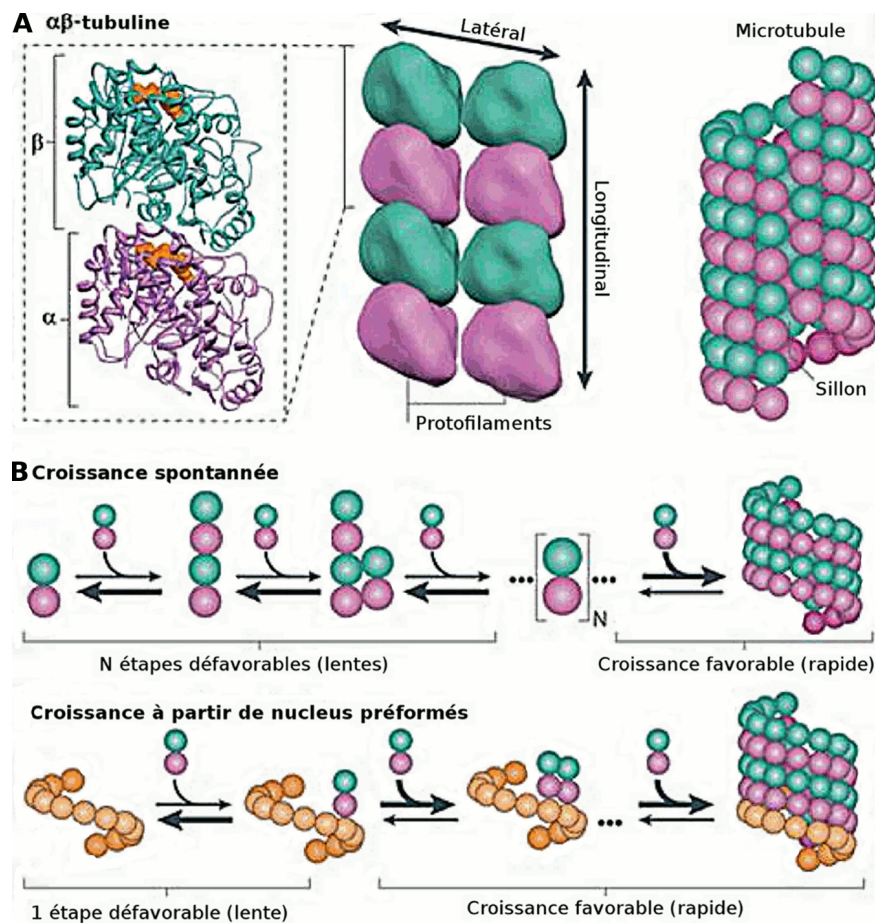


Fig. 1.5 : Formation et nucléation d'un microtubule

(A) Hétérodimère formé d'une α -tubuline et une β -tubuline (gauche). Formation de protofilaments à partir d'hétérodimères (milieu). Assemblage des protofilaments en un microtubule (droite). (B) Croissance spontanée des microtubules (haut) et croissance à partir de noyaux préformés (bas). Les flèches en gras indiquent si l'étape est favorable à l'assemblage ou au désassemblage. Tiré de [Kollman et al.(2011)]

La croissance spontanée d'un microtubule est un processus lent car peu probable (Figure 1.5 (B)). En effet, cela requiert l'assemblage spontané de dimères de tubuline en protofilaments ou l'association latérale d'oligomères de tubuline [Kirschner et al.(1975), Job et al.(2003)]. Lorsque le nombre de protofilaments formés est suffisant, ils se referment pour constituer un tube, le microtubule. Pour favoriser cet assemblage, la cellule utilise différents mécanismes, dont le plus connu est lié à la protéine γ -tubuline. En s'associant à

d'autres protéines, elle forme un complexe appelé γ -TURC (un anneau de tubuline), qui ressemble à la section transversale d'un microtubule, permettant ainsi l'assemblage de tubuline (Figure 1.5 (B)).

Dans la plupart des cellules animales, la majorité des microtubules sont nucléés proches du centre de la cellule, par un centre d'organisation des microtubules (MTOC), le centrosome. Les microtubules que ce dernier nucléé sont organisés en aster autour de lui, avec leurs extrémités \ominus attachées à ce MTOC, alors que leurs extrémités \oplus polymérisent et explorent tout l'espace cellulaire. La dynamique des microtubules est donc un facteur important leur permettant de contrôler leur croissance dans un environnement confiné tel que la cellule.

Instabilité dynamique

Il a été observé *in-vivo* et *in-vitro* que les microtubules changent fréquemment d'état dynamique. Ils peuvent en effet basculer d'un état de polymérisation (élongation) à un état de dépolymérisation (raccourcissement), ou inversement. Ce phénomène a été appelé instabilité dynamique [Mitchison et Kirschner(1984)]. Le passage d'un microtubule en phase de croissance à un microtubule en phase de dépolymérisation s'appelle une catastrophe (Figure 1.6), et le passage inverse de dépolymérisation à polymérisation est appelé sauvetage ("rescue").

Cette dynamique peut être influencée par de nombreux facteurs : la concentration de tubuline [Walker et al.(1988)], l'interaction avec d'autres protéines, les conditions du milieu (température, flux...). En particulier la fréquence de catastrophes va être augmentée lorsque le microtubule est soumis à une force opposée à l'extrémité \oplus (rencontres d'obstacles.. [Janson et al.(2003)]). On peut ainsi imaginer que l'instabilité dynamique confère une très forte adaptabilité du microtubule à son environnement et est donc un facteur essentiel à sa fonction physiologique (cf 1.4.2).

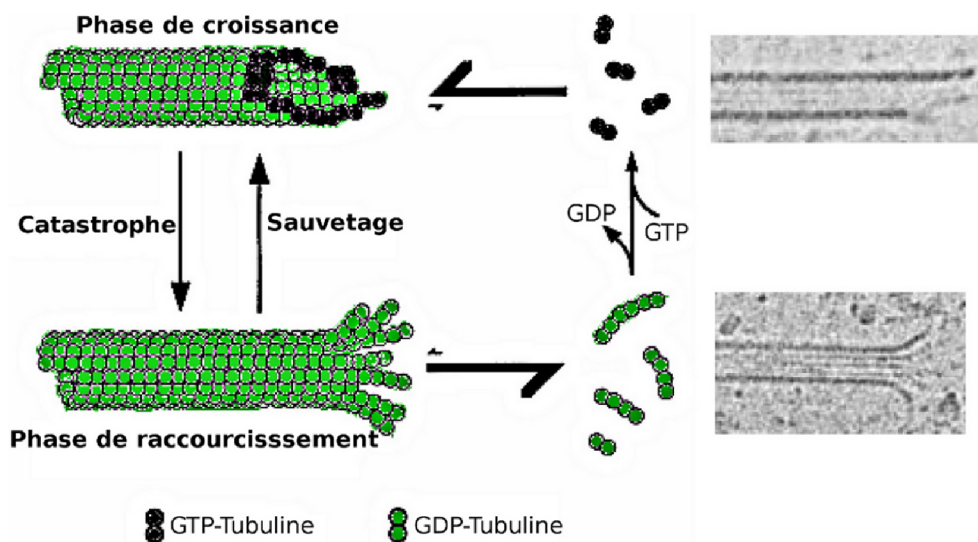


Fig. 1.6 : Instabilité dynamique des microtubules

Élongation d'un microtubule (haut) par addition de tubuline à l'extrémité \oplus et dépolymérisation (bas) par dissociation d'oligomères. Transitions d'un état à un autre, appelées catastrophe et sauvetage. Images de microscopie électronique de microtubules en polymérisation ou en dépolymérisation (droite). Adapté de [Inoué et Salmon(1995), Mandelkow et al.(1991)].

L'assemblage de ces polymères biologiques en filaments hélicoïdaux (filaments d'actine)

ou structures en tube (microtubules) va leur conférer des propriétés différentes.

1.3 Propriétés des polymères

1.3.1 Polarité des polymères

La polarité des filaments d'actine et des microtubules est importante pour comprendre la dynamique de croissance (élongation) ou de dépolymérisation mais aussi pour déterminer l'organisation d'assemblages plus complexes (construits à partir de plusieurs polymères). Lorsqu'une structure sera formée à partir de polymères avec une orientation identique, on parlera de structures parallèles (Figure 1.7), lorsque les polymères auront des orientations opposées, elle se nommera antiparallèle. L'organisation parallèle ou antiparallèle va notamment permettre à certaines protéines interagissant avec le cytosquelette d'agir de façon sélective [Reymann et al.(2012), Courson et Rock(2010)].

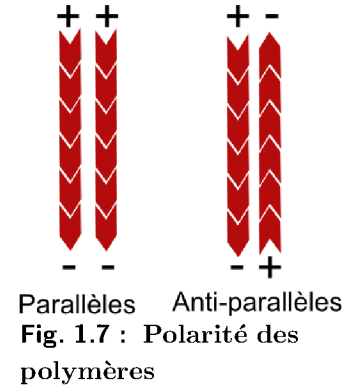


Fig. 1.7 : Polarité des polymères

En plus de fournir une polarité structurelle à ces polymères, l'organisation en filaments hélicoïdaux ou tubes va leur conférer des propriétés mécaniques différentes.

1.3.2 Propriétés mécaniques d'un polymère biologique

La longueur de persistance L_p est une mesure de la rigidité des polymères. Elle correspond à la longueur à partir de laquelle la corrélation entre les directions des vecteurs tangents d'un polymère sujet aux seules fluctuations thermiques est perdue. En effet, cette corrélation le long du polymère peut être décrite par une décroissance exponentielle d'un facteur $1/L_p$:

$$\langle \vec{t}_0 \cdot \vec{t}_s \rangle \propto e^{-|s|/L_p}$$

\vec{t}_s étant le vecteur tangent à l'abscisse curviligne s .

Un polymère plus court que sa longueur de persistance sera donc plutôt droit et rigide, alors qu'un polymère plus long se courbera plus facilement. Lorsque le polymère a une longueur de l'ordre de sa longueur de persistance, il est appelé semi-flexible : il peut en effet se courber mais est suffisamment résistant pour ne pas s'enrouler. C'est le cas du filament d'actine. Lorsque le polymère a une longueur très inférieure à sa longueur de persistance, il est appelé rigide. C'est le cas du microtubule. Enfin, un polymère dont la longueur est très supérieure à sa longueur de persistance est flexible. C'est le cas du brin d'ADN.

Les valeurs des longueurs de persistance de ces 3 filaments sont détaillées ci-dessous :

- **Filament d'actine** : la longueur de persistance d'un filament d'actine est comprise entre 10 et 20 μm [Isambert et al.(1995), Ott et al.(1993), Gittes et al.(1993)]. La longueur de persistance par défaut utilisée lors de mon travail de thèse est 15 μm , ce qui correspond à une rigidité ($L_p k_B T$) de 0.06 $pN \mu m^2$ (Figure 1.8 ; voir aussi Figure 3.2, filament rouge).
- **Microtubule** : un microtubule a une longueur de persistance de plus de 1000 μm [Gittes et al.(1993), Wen et Janmey(2011)]. Sa valeur est moins bien déterminée que

pour un filament d'actine car elle dépend de sa longueur et peut varier selon son état (par exemple un microtubule subissant une force prolongée répétée peut avoir des défauts et devenir plus souple). Par la suite, la longueur de persistance d'un microtubule utilisée sera de 5 mm , soit une rigidité de $25\text{ pN}\mu\text{m}^2$ (Figure 1.8; voir aussi Figure 3.2, filament vert).

- **Brin d'ADN** : pour comparaison, un brin d'ADN a une longueur de persistance de 45 nm ([Blanchoin et al.(2014)], Figure 1.8). Soumis aux mêmes fluctuations thermiques que les filaments d'actine ou les microtubules, à longueur équivalente, le brin d'ADN serait totalement replié due à sa très faible rigidité (Figure 3.2, filament bleu).

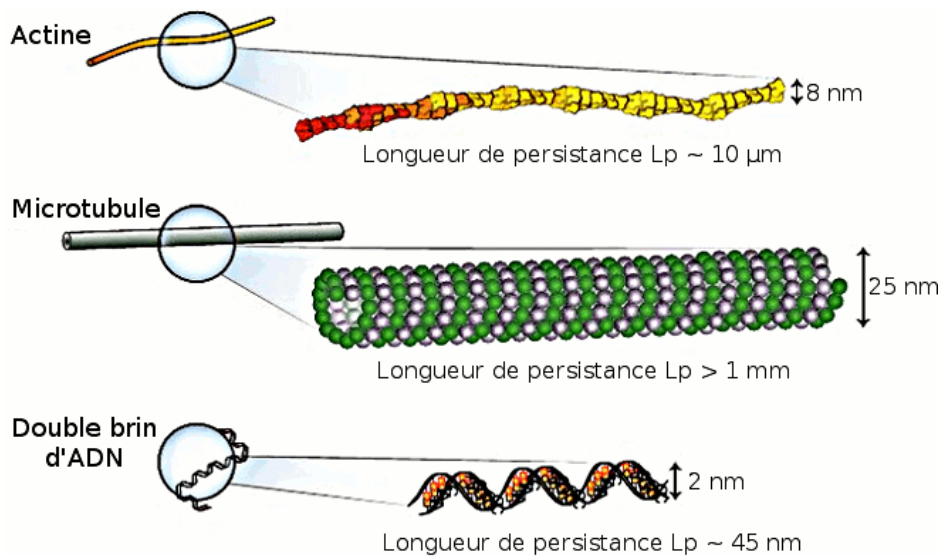


Fig. 1.8 : Comparaison des propriétés mécaniques des polymères biologiques

Longueur de persistance des filaments d'actine (haut), des microtubules (milieu) et d'un brin d'ADN (bas). Tiré de [Blanchoin et al.(2014)].

Nous pouvons ainsi comprendre en quoi les propriétés mécaniques de ces polymères sont en relation avec leurs rôles physiologiques (ADN comprimé dans le noyau, filament d'actine agissant comme ressort à l'échelle de la cellule, microtubules étant des rails rigides parcourant l'environnement intracellulaire).

Nous venons de détailler les propriétés mécaniques des polymères biologiques. Cependant du fait que les filaments d'actine et les microtubules sont des structures dynamiques, leur auto-assemblage, en relation avec ces propriétés mécaniques, va leur permettre d'exercer des forces intracellulaires.

1.3.3 Forces de polymérisation

Les filaments d'actine et les microtubules s'allongent par addition de monomères (ou hétérodimères) à leur extrémité \oplus . Cependant si cette extrémité est soumise à une force opposée (par exemple si le filament s'allonge contre un obstacle, comme la membrane plasmique), cette contrainte peut fortement ralentir sa croissance, voire la stopper. Néanmoins les filaments d'actine ou microtubules peuvent dans certains cas déplacer l'obstacle. Ce processus de polymérisation sous force opposée a été étudié et décrit par le modèle du rochet (cliquet) Brownien [Peskin et al.(1993)].

Le principe de ce modèle est basé sur la probabilité qu'un monomère s'insère entre l'extrémité du filament et l'obstacle. La position de l'extrémité du filament est définie comme l'origine, et les mouvements de l'obstacle et du filament sont suivis sur l'axe (Ox) de la direction du filament (Figure 1.9). Ainsi la diffusion de l'obstacle se fait au-dessus de cette position : $x > 0$. Lorsque par diffusion la distance entre l'extrémité du filament et l'obstacle est supérieure ou égale à la taille d'un monomère (δ), un monomère peut s'assembler à l'extrémité du filament avec une probabilité dépendante de la dynamique de polymérisation du filament libre. Suite à l'addition d'un monomère, la nouvelle position de l'extrémité est $0 + \delta$, et donc les fluctuations de l'obstacle seront limitées à $x > \delta$. L'obstacle a donc été déplacé de δ par la polymérisation du filament.

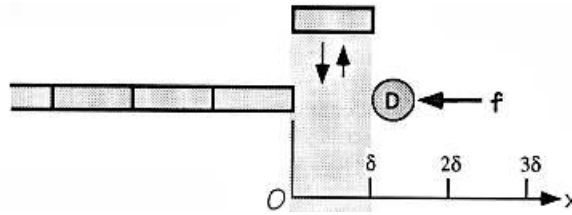


Fig. 1.9 : Modèle du cliquet Brownien de la polymérisation de polymères biologiques. Tiré de [Peskin et al.(1993)]

Cette description a permis de déduire la dépendance de la vitesse de polymérisation en fonction de la force opposée à l'allongement du filament [Peskin et al.(1993)]. Ce modèle a ensuite été adapté pour les cas spécifiques des filaments semi-flexibles [Mogilner et Oster(1996)] ou pour des tubes rigides [Dogterom(1997)]. La variation de la vitesse de polymérisation d'un polymère, v_p , en fonction de la force antagoniste appliquée à son extrémité croissante est décrite par une dépendance exponentielle :

$$v_p = v_0 e^{f/f_s}$$

avec $f < 0$ la force opposée (le load), f_s la force d'arrêt d'un filament et v_0 la vitesse de polymérisation d'une extrémité libre.

La force d'arrêt, f_s , est considérée comme la force maximale permettant l'élongation. Ce paramètre illustre ainsi la force maximale de polymérisation que le polymère peut exercer. Cette force est de l'ordre de 0.8 pN pour un filament d'actine [Footer et al.(2007)] et entre 1 et 10 pN pour un microtubule [Dogterom(1997)]. Elle dépend aussi de la concentration de monomères d'actine ou de dimères de tubuline libres.

Basé sur ces observations, nous pouvons facilement imaginer que les filaments d'actine et les microtubules vont avoir des comportements cellulaires dynamiques et mécaniques différents et ainsi assurer des fonctions cellulaires très variées.

1.4 Rôles et organisations des polymères du cytosquelette

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.1, les filaments d'actine sont essentiels dans de nombreux processus cellulaires [Pollard et Cooper(2009)] : la migration, la cytokinèse (division), le transport des protéines à l'intérieur de la cellule, l'endocytose (transport de molécules vers l'intérieur de la cellule)... Dans tous ces processus, l'organisation des filaments et les protéines associées jouent un rôle particulièrement important pour assurer leurs différentes fonctions.

1.4.1 Les structures cellulaires de filaments d'actine

Les filaments d'actine étant des polymères semi-flexibles dans le référentiel d'une cellule (diamètres $\approx 30 \mu\text{m}$ pour certaines cellules), l'assemblage en structures organisées de plusieurs filaments d'actine semble un élément essentiel de l'architecture cellulaire. En effet là où un filament isolé ne pourra exercer qu'une force limitée et préférera se déformer, la formation de structures organisées va permettre au cytosquelette d'actine d'exercer des forces et de jouer son rôle physiologique. Plusieurs filaments à l'intérieur d'une organisation plus large pourront effectivement agir de façon collective pour résister aux forces intracellulaires [Wang et Carlsson(2014)] et exercer des forces suffisantes pour permettre le transport intracellulaire ou les changements de forme cellulaire. Ceci souligne l'importance de la présence dans la cellule de différentes structures d'actine. On distingue 4 principaux types d'organisation dans la cellule : le cortex, le lamellipode, le filopode et les fibres contractiles (Figure 1.10).

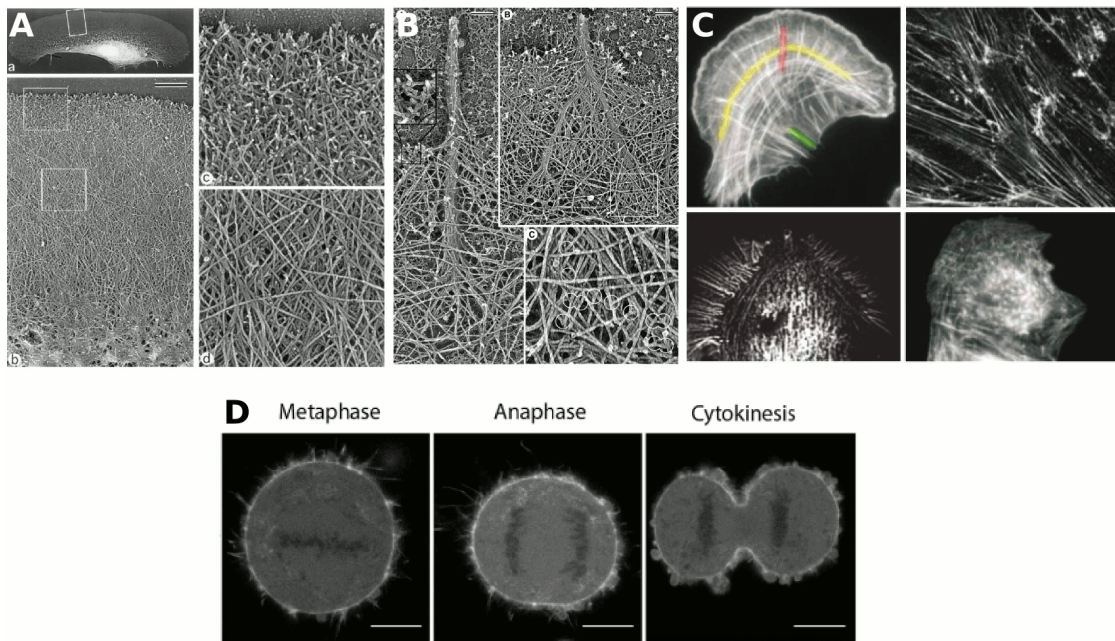


Fig. 1.10 : Les structures d'actine dans la cellule

(A) Lamellipode dans des kératocytes de poisson. Tiré de [Svitkina et al.(1997)]. (B) Filopode dans des cellules de mélanome (cellules de la peau). Tiré de [Svitkina et al.(2003)]. (C) Différentes structures contractiles dans des cellules animales. Tiré de [Tojkander et al.(2012)]. (D) Distribution de l'actine dans des cellules HeLa au cours des différentes phases de la mitose. Le cortex est la fine couche fluorescente accolée à la membrane cellulaire. Tiré de [Bovellan et al.(2014)].

La présence de ces différentes structures soulève la question d'identifier les mécanismes permettant la formation d'architectures cellulaires diverses à partir de la même brique élémentaire, le monomère d'actine.

Assemblage de structures d'actine

La formation, l'architecture, les fonctions et la dynamique de ces structures sont présentées dans la revue ci-dessous que nous avons pu écrire récemment [Letort et al.(2015a)].

Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton

Gaëlle Letort^{1*}, Hajer Ennomani^{1*}, Laurène Gressin¹, Manuel Théry^{1,2}, and Laurent Blanchoin^{1#}

¹Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, CNRS/CEA/UGA, Grenoble, France

²Unité de Thérapie Cellulaire, Hôpital Saint Louis, Institut Universitaire d'Hématologie, UMRS1160, INSERM/AP-HP/Université Paris Diderot, Paris, France.

* These authors contributed equally to this work

Correspondence: laurent.blanchoin@cea.fr

Abstract

Cellular processes including morphogenesis, polarization, and motility rely on a variety of actin-based structures. Although the biochemical composition and filament organization of these structures are different, they often emerge from a common origin. This is possible because the actin structures are highly dynamic. Indeed, they assemble, grow and disassemble in a time scale of a second to a minute. Therefore the reorganization of a given actin structure can promote the formation of another. Here, we discuss such transitions and illustrate them with computer simulations.

Cellular-actin assembly can generate a variety of architectures. These highly dynamic actin-based structures lie at the heart of a diverse array of cellular processes (1, 2). Actin filaments are found inside cells in three basic patterns: branched-filament networks, parallel- or mixed-polarity filament bundle arrays. These different types of organization can contribute to more complex structures and determine their functions (3). Although most of the time many actin structures are localized to different parts of the cell, they are rarely independent and their dynamics often influence each other. In this review, we will discuss the dynamic reorganization of actin inside the cell and explore the crosstalk between different architectures.

Actin structures in the cell: formation, architecture and functions

The cell cytoplasm provides a large reservoir of actin monomers, and this reservoir is necessary for the assembly of complex actin-based structures (4). The initial step in building such a large structural array containing different types of actin-filament arrangements (Figure 1) requires controlled actin assembly and the inhibition of spontaneous polymerization (4). Two actin-binding proteins play a major role in regulating this process: thymosin and profilin (5). Thymosins sequester actin monomers to which they bind and thus fully block filament assembly (6). Profilins also bind to actin monomers but only inhibit spontaneous nucleation (7). Indeed the profilin/actin complex can add on to any preexisting free filament barbed end and therefore participate to actin elongation (8).

Several types of proteins, classified as actin nucleators, can counteract the inhibitory effects on actin assembly by thymosin, profilin or other monomer binding proteins (9,10). These actin nucleators include the Arp2/3 complex, formins, and proteins containing WASP homology 2 (WH2) domains. However, the Arp2/3 complex (11,12) is the only definitive actin nucleator in the sense that it can overcome the limiting step in the formation of an efficient actin nucleus during assembly. Indeed, this complex contains two actin-related proteins (Arps), Arp2 and Arp3 that mimic an actin dimer (11). Other actin nucleators including formins (13,14) or WH2-domain containing proteins (15) appear to stabilize preexisting dimers rather than generating or mimicking new ones (16,17). Interestingly profilin in yeast and mammalian cells can inhibit Arp2/3 complex nucleation activity thus favoring the actin filament elongation activity of formin or Ena/VASP (18, 19).

The lamellipodium is a dense branched array of filaments that occurs at the leading edge of a motile cell and its formation is dictated by the activity of Arp2/3 complex (Figure 1 and 19). This specific type of actin organization pushes forward the plasma membrane during motility (1,21,22). This property relates to the lamellipodium's optimal composition of arrays of growing actin-filaments which are oriented at $\pm 35^\circ$ with respect to the membrane. Once growing, actin filaments extend beyond $\sim 1 \mu\text{m}$, they form parallel-filament bundles and emerge as finger-like protrusions called filopodia (23,24).

Filopodia direct how the cell probes the extra-cellular matrix (Figure 1, and 25), and control the orientation of lamellipodium (26). The parallel-filament bundles within the filopodium also serve as tracks for protein transport (27). Filopodia are $\sim 1\text{-}10 \mu\text{m}$ long (28,29), with 10-30 actin filaments ($\sim 1\text{-}10 \mu\text{m}$ long) crosslinked in parallel arrays by fascin (30). Structural models predict that the densely-packed nature of these actin arrays is important for the filaments to resist the loads coming from the membrane such that filament elongation (by insertion of monomeric actin at the growing tip) remains uninhibited (29,31). Moreover, the filaments within the filopodium have a turnover rate of ~ 20 min (32) and hence are far more stable than those filaments within the lamellipodium, which have a turnover rate of ~ 1 min (33), or even only few seconds at the very front of the lamellipodium (34).

The cell can also contain actin structures assembled from short filaments that are sites for action of molecular motors of the myosin family. Depending on their orientation, the short filaments can act as tracks for myosin or as contractile fibers such as the transverse arcs or ventral stress fibers (35), and the perinuclear actin cap (Figure 1 and 36). Radial and ventral stress fibers, oriented parallel to the migration axis (37), are anchored at focal adhesions at one (radial) or both (ventral) ends (35). Transverse arcs are formed just behind the lamellipodium (35, 38). Ventral stress fibers are made of filaments of $>2 \mu\text{m}$ in length, whereas transverse fibers are made of shorter filaments of $\sim 1 \mu\text{m}$ in length. These fibers contain on average 10-30 filaments by width section (39). Filament polarities inside stress fibers can be random (i.e. mixed polarity), graded or sarcomeric (i.e. anti-parallel) (39,40). Contractility is triggered by myosins that mediate sliding of anti-parallel filaments along each other (41). The equilibrium between contractile stress and adhesion strength can act as a modulator of cellular tension (42), and of the conversion of mechanical signals (tension) into biochemical signals (focal adhesion maturation), thus regulating the communication between the cell and the ECM (36,43). Indeed, the assembly of stress fibers may only occur once the cell is under mechanical stress (36). Ventral fibers allow the retraction of the motile cell's trailing edge (39), and may also initiate cell motility (44). By connecting the lamellipodium and the lamella, the transverse arcs, in the flattened perinuclear region (45), participate in the persistence of cell motility (35,46). The perinuclear cap, a structure consisting of acto-myosin fibers positioned around the nucleus, regulates the shape and position of the nucleus (47).

The actin structures described above are highly dynamic in terms of formation, elongation/contraction, and disassembly; and these processes can be interdependent (Figure 2). Therefore, to have a more complete understanding of the cellular actin organization, it is essential to take into account the cytoskeleton dynamics inside the cell.

From one actin structure to another: dynamical transitions

From lamellipodium to filopodia

The potential for filopodia to emerge from the lamellipodium near the plasma membrane (Figure 2A) raised the question of how a structure made of parallel actin bundles can arise from a densely branched actin network. Two overlapping theoretical models have attempted to explain this transition: the convergent-elongation model and the nucleation model (23,48,49).

According to the convergent-elongation model, filopodia are initiated by reorganization of the branched actin network due to a fine-tuning of actin-filament elongation at their growing ends (25). The branched actin filaments of the lamellipodium are short due to the regulation of their growth by capping proteins (50,51). An attractive hypothesis to explain the transition between short filaments in the lamellipodium and the longer filaments driving filopodium formation is that some of the barbed actin filament ends in the lamellipodium are protected from capping proteins by cellular elongation factors such as Ena/VASP proteins (52,53) or formins, (54), and will therefore grow longer. In support of this hypothesis, Ena/VASP and formin proteins have been observed at filopodia tips (30,55) and can induce filopodia formation (56,57).

Moreover, depletion of capping protein promotes filopodia formation at the expense of lamellipodia extension, and Ena/VASP proteins have been shown to play an important role in filopodia formation (58). Indeed, Ena/VASP proteins promote the convergence of filament barbed ends and have an enhanced activity when bound to trailing barbed ends in a fascin bundle, thus allowing the trailing ends to catch up with the leading barbed ends (59). Longer actin filaments can, after positional fluctuations and bending, be captured and aligned into bundles by fascin (Figure 2), depending on

the angle of their association (60,61). These initial thin bundles can be further reinforced by other actin filaments to form a rigid body that is necessary for filopodium growth (29). Convergence of actin network filaments into filopodia-like bundles can be recapitulated by both *in-vitro* reconstitution (23,58) and Monte-Carlo simulation (58,63).

The nucleation model is supported by the observation that filopodia can form even when the lamellipodium is absent as a consequence of lack of Arp2/3 complex or its activation (64,65,66,67). In this model, formin and/or Ena/VASP promoting *de-novo* tip nucleation form actin filaments in filopodium. Further support for this model comes from the recent observation that fibroblasts lacking Arp2/3 complex produce more prominent filopodia than wild-type cells (68). However, it is not yet clear how precisely filaments are initiated in absence of Arp2/3 complex. In a very elegant study using fission yeast, inhibition of the Arp2/3 complex disturbed the balance of different actin structures that were, in effect, competing for actin monomers from the same reservoir, and resulted in the enhanced formation of formin-dependent structures (69). The abundance of filopodia when Arp2/3 complex is knocked down might also be explained by the disruption of actin homeostasis causing an increased incidence of spontaneous assembly of actin filaments in the cytoplasm (68). A proportion of these spontaneously-formed actin filaments may be capped by Ena/VASP and/or formins, whose activities are enhanced by the absence of Arp2/3 complex, to promote filopodia formation (49). Together, the two models are not necessarily mutually exclusive and might be reconciled by a capture-elongation model mediated by Ena/VASP or formins.

To interrogate and illustrate the dynamic transition from lamellipodia to filopodia, we performed mathematical simulations, using the cytoskeleton simulation software Cytosim (70). In the simulation, a lamellipodium-like branched network was grown by distributing Arp2/3 complex-like nucleators within a broad, two-dimensional area (Figure 3A, top and 61). To create the variation of lengths among those actin filaments, formin-like (could also be Ena/VASP-like) entities were added, to capture the barbed ends of growing actin filaments and accelerate filament elongation. The growing actin filaments then extended out of the lamellipodium network, and merged into bundled filaments by fascin-like crosslinkers. In the simulation, a synergy between the modulation of actin-filament elongation at growing barbed ends by Ena/VASP and/or formin and actin-filament crosslinking into tight bundles is sufficient (Figure 3A, top) and necessary to induce filopodium formation (Figure 3A, bottom panel).

Although the principle of the transition from lamellipodium to filopodium may be simple, it is quite difficult to exactly identify which proteins or pathways are involved in the formation of a filopodium. There exists potential competition or redundancy between different cellular actors, illustrated by formins that constitute a large family of different isoforms (71). Moreover, the interactions between filaments and the membrane could also regulate this transition. The tension produced by the membrane can determine filopodia dimensions (29) and can induce filament alignment in protrusions even in the absence of crosslinkers (72).

From lamellipodium to contractile structures

A considerable amount of information about the assembly mechanisms of contractile structures has been obtained from numerous studies using live-cell imaging (36,38,46,73,74). The current model for the assembly of radial fibers is based on a simple mechanism of initiation, whereby the fibers are generated by formin-mediated nucleation at focal adhesions (75). Following this initiation step, the growing actin filaments are brushed into parallel bundles by the retrograde flow toward the cell center (38). Radial fibers further recruit crosslinked filaments from the lamella, giving rise to an organization of filaments with graded polarity (36).

The model for the formation of transverse arcs is clearly different to that of radial fibers (38). Transverse arcs are assembled by end-to-end annealing of myosin filaments and actin bundles that have come from the reorganization of the Arp2/3 complex-branched network at the back of the lamellipodium (Figure 2, 46). The reorganization of a branched network into actin bundles of mixed polarity includes several steps. First, disassembly factors such as ADF/cofilin and GMF disconnect the network by debranching Arp2/3 complex links (76–78). Second, the released short filaments are captured by myosin and actin-filament crosslinkers such as α -actinin, which are present in the lamella to trigger the formation of small bundles (Figure 2B). Third, the alignment of the filaments is enforced by the high mechanical stress produced by the interaction between focal adhesions and the extracellular matrix, and by centripetal flow at the lamellipodium/lamella interface (79). Fourth, the nascent bundles are pushed away from the cell edge by the actin centripetal flow (74), while condensing and forming transverse arcs, until they encounter focal adhesions and pre-formed radial fibers (38,80). The radial fibers and transverse arcs will then associate, with crosslinked actin bundles incorporating into the ends of radial fibers through the activity of myosin filaments.

We have also performed simulations of the transition from a branched-actin network to a contractile fiber using Cytosim and the same simulation starting point using Arp2/3 complex-like nucleators as described above (Figure 3A). To mimic focal adhesions nucleating the radial fibers, two small zones of adherence (friction points) with a few parallel filaments growing toward the cell center were placed at the bottom of a growing branched network. Arp2/3 complex connections were removed to simulate the lamellipodium debranching effect mediated by ADF/cofilin or GMF, and then motors (to simulate myosins) and crosslinkers (to simulate α -actinin) were added. A slow, directed flow was added to simulate the effect of centripetal actin flow. With only these few ingredients, the transition from a branched, non-contractile network to a mixed polarity, contractile fiber emerged from numerical simulations (Figure 3B, top panel). These ingredients all seem essential, since removal of the motors, crosslinkers or friction points all prevented the efficient formation of the contractile-cable (Figure 3B, bottom panel).

Other transitions:

Fusion of contractile and non-contractile structures

Radial fibers can associate with transverse arcs by the incorporation of myosin II filaments and subsequently develop into ventral fibers (37,38). During this process, first, two independent radial fibers connect with a pre-existing transverse arc that is pushed to the trailing edge of the motile cell by the flow. As a consequence, arc contractile forces get transmitted to radial fibers. Second, the distal parts of the transverse arc dissociate because of local stress relaxation (Figure 2C). Finally, the radial fibers fuse with what remains of the contracting transverse arc to form a ventral stress fiber that is attached to focal adhesions at both ends (38).

In addition, a ventral stress fiber could be formed by fusion of two dorsal stress fibers (without transverse-arc incorporation (80)). This latter case has been observed in Arp2/3 complex knockdown cells (38).

Filopodia disassembly and their fate.

The mechanisms by which filopodia disassemble remains to be determined. However, stationary

filopodia can be disassembled into small bundles by ADF/cofilin (81). Filopodia may also develop kinks after a decrease and/or change of direction of the actin flow between the lamellipodium and lamella leading to their integration into the lamella (73,74,82). In both scenarios, short actin bundles generated by filopodia disassembly would then participate in the formation of contractile structures, by feeding preexisting contractile fibers with actin filaments.

Conclusion

Cellular functions depend on complex actin choreography. To orchestrate such a diversity of actin organizations, the dynamic integration of different mechanistic pathways is necessary. Some pathways are quite specific to the formation and maintenance of a particular basic actin organization; but because these actin structures may reorganize and transform, they may also indirectly participate in the emergence of other structures. The prevalence of these different basic actin organizations also varies in different cell types (e.g. lamellipodia predominate over filopodia in keratocytes and neutrophils, whereas filopodia predominate over lamellipodia in dendritic cells or neuronal growth cones). Within a given cell type, the predominance and/or existence of the different actin structures can be regulated to achieve specific functions for example during collective migration (83). Thus, focusing on the behavior of a single type of actin structure may only provide an incomplete view of its formation and maintenance *in vivo*. Hence the development of more appropriate experimental systems that can reconstitute more than one actin structure at a time should improve understanding the complexity of cellular actin dynamics. Mathematical simulations demonstrate that only few components and simple boundary conditions are sufficient to mediate transitions between or during the emergence of complex actin structures. These mathematical approaches may also help in elaborating more appropriate experimental systems to unveil the general law behind dynamic cytoskeletal reorganization.

Acknowledgments

We thank F. Nedelec for providing an unpublished code used to run the simulations with Cytosim. LB is supported Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant N° ANR-12-BSV5-0014 (Contract). HE and LG are supported by IRTELIS grant from CEA.

References

1. Pollard TD, Borisy GG. **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.** *Cell.* 2003; **112**: 453–65.
2. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. **Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility.** *Physiological Reviews.* 2014; **94**: 235–63.
3. Fletcher DA, Mullins RD. **Cell mechanics and the cytoskeleton.** *Nature.* 2010; **463**: 485–92.
4. Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD. **Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.** *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* 2000; **29**: 545–76.

5. Carlier MF, Pantaloni D. **Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin β 4 and profilin.** *Seminars in Cell Biology*. 1994; **5**: 183–91.
6. Pantaloni D, Carlier MF. **How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4.** *Cell*. 1993; **75**: 1007–14.
7. Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK, Pollard TD. **Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin.** *The Journal of Cell Biology*. 1991; **113**:1081–9.
8. Pollard TD, Cooper JA. **Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation.** *Biochemistry*. 1984; **23**: 6631-41.
9. Chesarone MA, Goode BL. **Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay.** *Current Opinion in Cell Biology*. 2009; **21**: 28–37.
10. Campellone KG, Welch MD. **A nucleator arms race: cellular control of actin assembly.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010; **11**: 237–51.
11. Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, Vandekerckhove J. **Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose.** *The Journal of Cell Biology*. 1994; **127**:107–15.
12. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. **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*. 1998; **95**: 6181–6.
13. Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmond S, Bretscher A, et al. **Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association.** *Science*. 2002; **297**: 612-5.
14. Sagot I, Rodal AA, Moseley J, Goode BL, Pellman D. **An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin.** *Nature Cell Biology*. 2002; **4**: 626–31.
15. Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P. **WH2 domain : a small , versatile adapter for actin monomers.** *FEBS Letters*. 2002; **513**: 92–7.
16. Xu Y, Moseley JB, Sagot I, Poy F, Pellman D, Goode BL, et al. **Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture.** *Cell*. 2004; **116**: 711–23.
17. Renault L, Deville C, van Heijenoort C. **Structural features and interfacial properties of WH2, β -thymosin domains and other intrinsically disordered domains in the regulation of actin cytoskeleton dynamics.** *Cytoskeleton*. 2013; **70**: 686–705.
18. Rotty JD, Wu C, Haynes EM, Suarez C, Winkelman JD, Johnson HE, et al. **Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2 /3-dependent and -independent pathways.** *Developmental Cell*. 2015; **32**: 54–67.

19. Suarez C, Carroll RT, Burke TA, Christensen JR, Bestul AJ, Sees JA, et al. **Profilin Regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex.** *Developmental Cell*. 2015; **32**: 43–53.
20. Svitkina TM, Borisy GG. **Organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia.** *The Journal of Cell Biology*. 1999; **145**:1009–26.
21. Keren K, Pincus Z, Allen GM, Barnhart EL, Marriott G, Mogilner A, et al. **Mechanism of shape determination in motile cells.** *Nature*. 2008; **453**: 475–80.
22. Mogilner A. **Mathematics of cell motility: Have we got its number?** *Journal of Mathematical Biology*. 2009; **58**: 105–34.
23. Vignjevic D, Yasar D, Welch MD, Peloquin J, Svitkina T, Borisy GG. **Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network.** *The Journal of Cell Biology*. 2003; **160**: 951–62.
24. Le-Clainche C, Carlier M. **Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration.** *Physiological Reviews*. 2008; **88**: 489–513.
25. Mattila PK, Lappalainen P. **Filopodia : molecular architecture and cellular functions.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008; **9**: 446-54.
26. Johnson HE, King SJ, Asokan SB, Rotty JD, Bear JE, Haugh JM. **F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling.** *The Journal of Cell Biology*. 2015; **208**: 443-55.
27. Zhuravlev PI, Lan Y, Minakova MS, Papoian GA. **Theory of active transport in filopodia and stereocilia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2012; **109**:10849–54.
28. Welch MD, Mullins RD. **Cellular control of actin nucleation.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2002; **18**: 247–88.
29. Mogilner A, Rubinstein B. **The physics of filopodial protrusion.** *Biophysical Journal*. 2005; **89**: 782–95.
30. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, et al. **Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network.** *The Journal of Cell Biology*. 2003; **160**: 409–21.
31. Lan Y, Papoian GA. **The Stochastic Dynamics of Filopodial Growth.** *Biophysical Journal*. 2008; **94**: 3839-52.
32. Mallavarapu A, Mitchison T. **Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction.** *The Journal of Cell Biology*. 1999; **146**:1097–106.

33. Theriot JA, Mitchison TJ. **Actin microfilament dynamics in locomoting cells.** *Nature*. 1991; **352**: 126–31.
34. Lai FPL, Szczodrak M, Block J, Faix J, Breitsprecher D, Mannherz HG, et al. **Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia.** *The EMBO Journal*. 2008; **27**, 982–92.
35. Pellegrin S, Mellor H. **Actin stress fibres.** *Journal of Cell Science*. 2007; **120**: 3491–9.
36. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. **Actin stress fibers assembly, dynamics and biological roles.** *Journal of Cell Science*. 2012; **125**:1855–64.
37. Small JV, Rottner K, Kaverina I, Anderson KI. **Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1998; **1404**: 271–81.
38. Hotulainen P, Lappalainen P. **Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells.** *The Journal of Cell Biology*. 2006; **173**: 383–94.
39. Cramer LP, Siebert M, Mitchison TJ. **Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: Implications for the generation of motile force.** *Journal of Cell Biology*. 1997; **136**:1287–305.
40. Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P. **Mechanisms of actin stress fiber assembly.** *Journal of Microscopy*. 2008; **231**: 446–54.
41. Warrick HM, Spudich JA. **Myosin structure and function in cell motility.** *Annual Review of Cell Biology*. 1987; **3**: 379–421.
42. Goffin JM, Pittet P, Csucs G, Lussi JW, Meister J-J, Hinz B. **Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers.** *The Journal of Cell Biology*. 2006; **172**: 259–68.
43. Shemesh T, Bershadsky AD, Kozlov MM. **Physical model for self-organization of actin cytoskeleton and adhesion complexes at the cell front.** *Biophysical Journal*. 2012; **102**:1746–56.
44. Cramer LP. **Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration.** *Nature Cell Biology*. 2010; **12**: 628–32.
45. Ingram VM. **A side view of moving fibroblasts.** *Nature*. 1969; **222**: 641–4.
46. Burnette DT, Manley S, Sengupta P, Sougrat R, Davidson MW, Kachar B et al. **A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells.** *Nature Cell Biology*. 2011; **13**: 371–81.

47. Nagayama K, Yahiro Y, Matsumoto T. **Stress fibers stabilize the position of intranuclear DNA through mechanical connection with the nucleus in vascular smooth muscle cells.** FEBS Letters. 2011; **585**: 3992–7.
48. Faix J, Rottner K. **The making of filopodia.** Current Opinion in Cell Biology. 2006; **18**: 18–25.
49. Yang C, Svitkina T. **Focus on the Arp2/3 complex and formins Filopodia initiation.** Cell Adhesion & Migration. 2011; **5**: 402–8.
50. Edwards M, Zwolak A, Schafer DA, Sept D, Dominguez R, Cooper JA. **Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics.** Nature Reviews Molecular Cell Biology. 2014; **15**: 677–89.
51. Wear MA, Cooper JA. **Capping protein: new insights into mechanism and regulation.** Trends in Biochemical Sciences. 2004; **29**: 418–28.
52. Krause M, Bear JE. **The Ena/VASP enigma.** Journal of Cell Science. 2002; **115**: 4721–6.
53. Breitsprecher D, Kieseewetter AK, Linkner J, Vinzenz M, Stradal TEB, Small JV, et al. **Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation.** The EMBO Journal. 2011; **30**: 456–67.
54. Zigmond SH, Evangelista M, Boone C, Yang C, Dar AC, Sicheri F, et al. **Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins.** Current Biology. 2003; **13**: 1820–3.
55. Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, Schleicher M, Faix J. **The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia.** Nature Cell Biology. 2005; **7**: 619–26.
56. Pellegrin S, Mellor H. **The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2.** Current Biology. 2005; **15**: 129–33.
57. Block J, Stradal TE, Hänisch J, Geffers R, Köstler SA, Urban E, et al. **Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3.** Journal of Microscopy. 2008; **231**: 506–17.
58. Mejillano MR, Kojima SI, Applewhite DA, Gertler FB, Svitkina TM, Borisy GG. **Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: Pivotal role of the filament barbed end.** Cell. 2004; **118**: 363–73.
59. Winkelman JD, Bilancia CG, Peifer M, Kovar DR. **Ena/VASP Enabled is a highly processive actin polymerase tailored to self-assemble parallel-bundled F-actin networks with Fascin.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2014; **111**: 4121–6.
60. Reymann A-C, Martiel J-L, Cambier T, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Théry M. **Nucleation geometry governs ordered actin networks structures.** Nature Materials. 2010; **9**: 827–32.

61. Letort G, Politi A, Ennomani H, They M, Nedelec F, Blanchoin L. **Geometrical and mechanical properties control actin filament organization.** PLOS Computational Biology. 2015; 11(5): e1004245.
62. Haviv L, Brill-karniely Y, Mahaffy R, Backouche F, Ben-shaul A, Pollard TD, et al. **Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system.** Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 2006; **103**: 4906-11.
63. Brill-Karniely Y, Ideses Y, Bernheim-Groswasser A, Ben-Shaul A. **From branched networks of actin filaments to bundles.** Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry. 2009; **10**: 2818–27.
64. Steffen A, Faix J, Resch GP, Linkner J, Wehland J, Small JV, et al. **Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes.** Molecular Biology of the Cell. 2006; **17**: 2581–91.
65. Suraneni P, Rubinstein B, Unruh JR, Durnin M, Hanein D, Li R. **The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration.** Journal of Cell Biology. 2012; **197**: 239–51.
66. Wu C, Asokan SB, Berginski ME, Haynes EM, Sharpless NE, Griffith JD, et al. **Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis.** Cell. 2012; **148**: 973–987.
67. Steffen A, Ladwein M, Dimchev GA, Hein A, Schwenkmezger L, Arens S, et al. **Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation.** Journal of Cell Science. 2013; **126**: 4572–88.
68. Suraneni P, Fogelson B, Rubinstein B, Noguera P, Volkmann N, Hanein D, et al. **A Mechanism of leading edge protrusion in the absence of Arp2/3 complex.** Molecular Biology of the Cell. 2015; **26**: 901-912.
69. Burke TA, Christensen JR, Barone E, Suarez C, Sirotkin V, Kovar DR. **Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers.** Current Biology. 2014; **24**:579–85.
70. Nedelec F, Foethke D. **Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers.** New Journal of Physics. 2007; **9**:
71. Faix J, Grosse R. **Staying in Shape with Formins.** Developmental Cell. 2006; **10**: 693–706.
72. Liu AP, Richmond DL, Maibaum L, Pronk S, Geissler PL, Fletcher DA. **Membrane-induced bundling of actin filaments.** Nature Physics. 2008; **4**: 789–93.
73. Nemethova M, Auinger S, Small JV. **Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella.** The Journal of Cell Biology. 2008; **180**:1233–44.

74. Anderson TW, Vaughan AN, Cramer LP. **Retrograde flow and myosin II activity within the leading cell edge deliver F-Actin to the lamella to seed the formation of graded polarity actomyosin II filament bundles in migrating fibroblasts.** *Molecular Biology of the Cell.* 2008;**19**: 5006–18.
75. Skau CT, Plotnikov SV, Doyle AD, Waterman CM. **Inverted formin 2 in focal adhesions promotes dorsal stress fiber and fibrillar adhesion formation to drive extracellular matrix assembly.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA,* 2015; E2447–E2456
76. Chan C, Beltzner CC, Pollard TD. **Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments.** *Current Biology.* 2009; **19**: 537–45.
77. Gandhi M, Smith BA, Bovellan M, Paavilainen V, Gelles J, Lappalainen P. **GMF is a cofilin homologue that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation.** *Current Biology.* 2010; **20**: 861–7.
78. Ydenberg CA, Padrick SB, Sweeney MO, Gandhi M, Goode BL. **GMF severs actin-Arp2/3 complex branch junctions by a cofilin-like mechanism.** *Current Biology.* 2013; **23**:1037–45.
79. Shemesh T, Verkhovskiy AB, Svitkina TM, Bershadsky AD, Kozlov MM. **Role of focal adhesions and mechanical stresses in the formation and progression of the lamellipodium-lamellum interface.** *Biophysical Journal.* 2009; **97**:1254–64.
80. Zimerman B, Volberg T, Geiger B. **Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading.** *Cell Motility and the Cytoskeleton.* 2004; **58**:143–59.
81. Breitsprecher D, Koestler SA, Chizhov I, Nemethova M, Mueller J, Goode BL. **Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments.** *Journal of Cell Science.* 2011; **124**: 3305–18.
82. Koestler SA, Auinger S, Vinzenz M, Rottner K, Small, JV. **Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front.** *Nature Cell Biology.* 2008; **10**: 306-13.
83. Lim JI, Sabouri-Ghomi M, Machacek M, Waterman CM, Danuser G. **Protrusion and actin assembly are coupled to the organization of lamellar contractile structures.** *Experimental Cell Research.* 2010; **316**: 2027–41.

Figures:

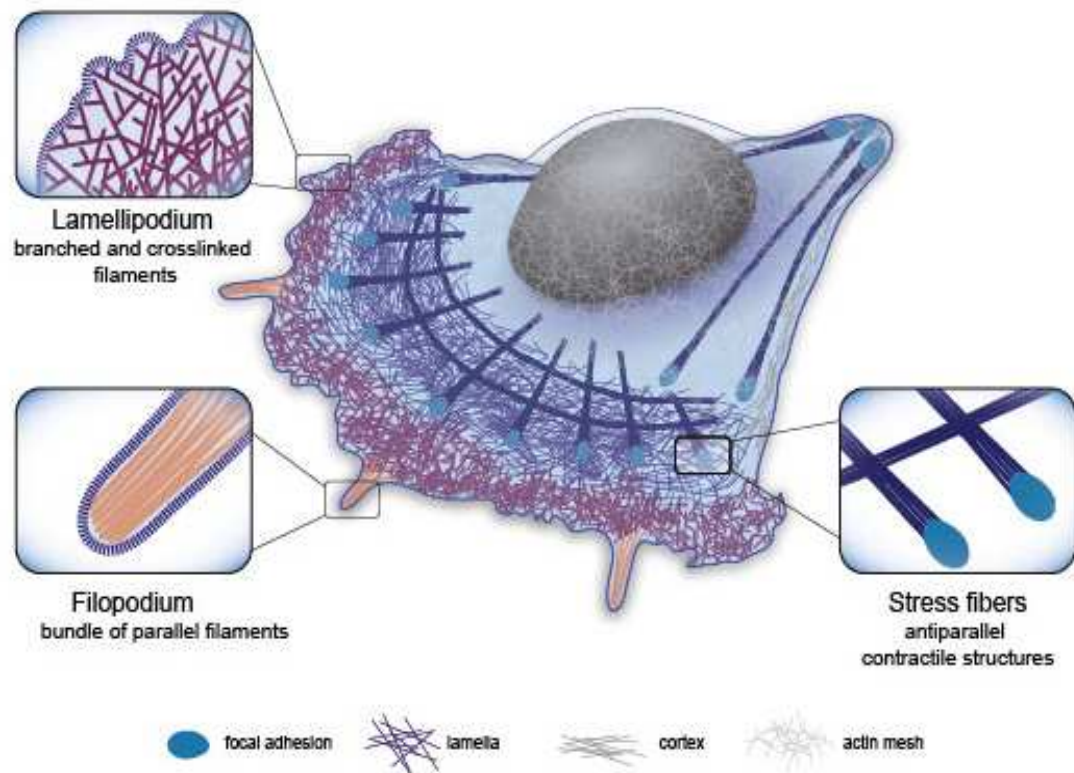


Figure 1: Cellular actin organization.

Schematic representation of the three main actin structures found in the cell:

1-Lamellipodium: dense, branched network involved in cell protrusion.

2-Filopodium: a finger-like structure located at the leading edge of the motile cell composed of aligned filaments. Filopodia sense the extracellular environment and influence the direction of cell motility.

3-Contractile structure: dynamic structure made of antiparallel and/or mixed-polarity actin filaments associated with myosin. These structures play an important role in mechanical responses, providing force generation for different cellular functions.

Zoomed regions highlight the specific actin organization of the different cellular actin structures.

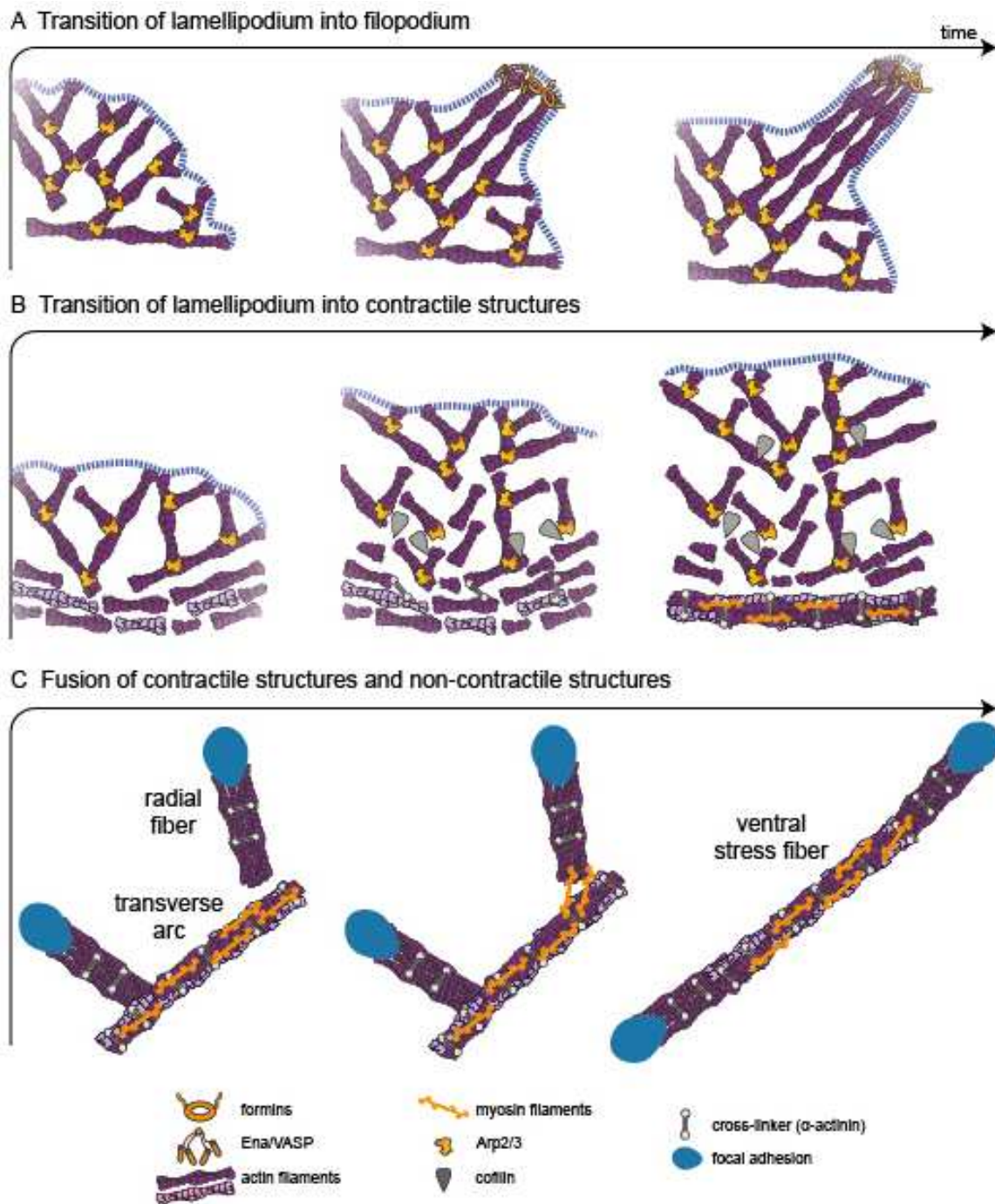
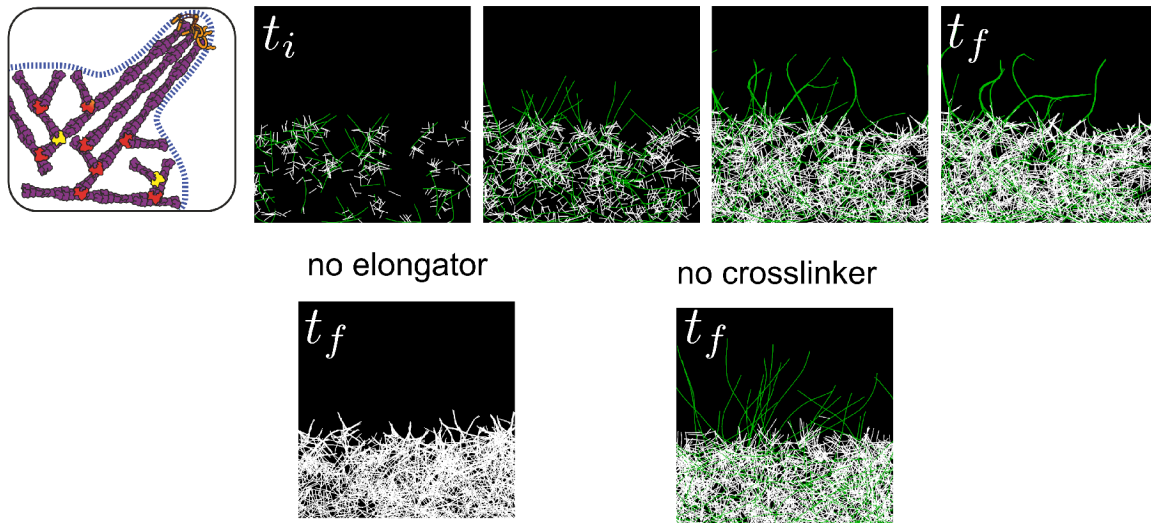


Figure 2: Actin architecture transitions.

(A) In the convergent-elongation model, the transition from lamellipodium to filopodium involves the formation of parallel actin filaments from a branched network created by Arp2/3 complex. Elongation factors like Ena/VASP or formin protect barbed ends from capping protein and induce the rapid polymerization of parallel bundles. (B) The transition from lamellipodium to contractile structures is triggered by the disassembly of the branched network at the rear of the lamellipodium by ADF/cofilin and myosin. Myosin induces actin-filament alignment and the formation of fibers stabilized by crosslinkers such as α -actinin. (C) The fusion of contractile structures, the transverse arcs, and non-contractile structures, the radial fibers, can lead to the formation of ventral stress fibers. In this scheme, myosins connect a transverse arc and two radial fibers and after contraction align the radial fibers with the transverse arc, creating a ventral stress fiber. This contractile antiparallel fiber is anchored at its two ends to focal adhesions.

A Lamellipodium into filopodia



B Lamellipodium into contractile structures

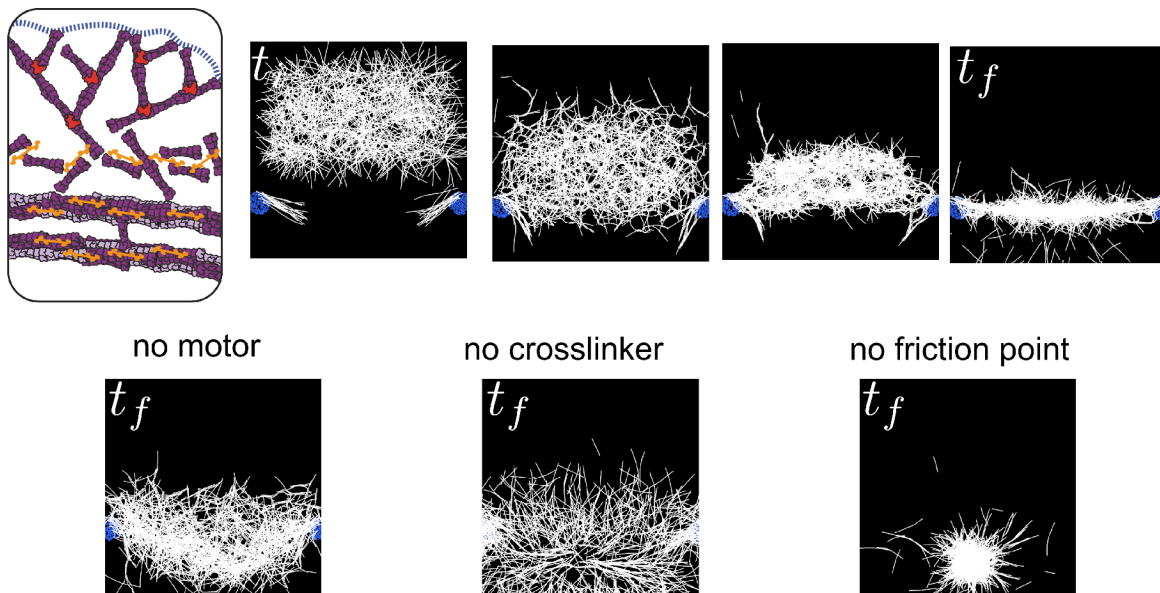


Figure 3: Simulation of transitions between actin structures.

(A) Emergence of filopodia-like protrusions from a lamellipodium-like network. Simulations were performed using the Cytosim software. Top panel, the actin network grows by branched nucleation via the Arp2/3 complex, and a proportion of actin filaments grow longer due to capture of their growing barbed ends by an elongation factor (formin/VASP, green filaments). Actin filaments contact each other by chance due to thermal fluctuations and are stabilized in bundles by crosslinkers (fascin). Bottom panel, the presence of elongation factors in the simulation is essential for the emergence of protrusions (left), while the crosslinkers are necessary to group the protrusions into one rigid bundle (right). (B) Transition between lamellipodium-like and stress-fiber like networks. Simulations were performed using the Cytosim software. Top panel, a branched network is formed and moved towards friction points (mimicking focal adhesions nucleating dorsal fibers)

associated with parallel filaments. In the contact zone, the action of crosslinkers and myosins induces the disassembly of the branched network leading to the formation of a contractile structure of anti-parallel filaments. This structure is further compacted by a slow vertical flow (~centripetal actin flow) until it co-aligns with the friction points to form one contractile fiber. Bottom panel, in the absence of motors, the network has no tension and is thus highly curved and spread (left). The crosslinkers are essential to maintain the connectivity between the filaments and in their absence, a hole structure is formed (middle). The friction points are essential to keep the network elongated at a given length, otherwise the network collapses to one point in the middle due to the tension (right). and indicate initial time and final time of simulations (empirical).

Supplemental movie legends:

Movie S1 (related to Figure 3A)

Transition of lamellipodium into filopodium: assembly of parallel bundles (Filopodia) triggered by the dense branched network (lamellipodium)

<https://www.dropbox.com/s/77xg5zoezp7mlow/BlanchoinVideo1.10.04.15.mov?dl=0>

Movie S2 (related to Figure 3B)

Transition of lamellipodium into contractile structures: Formation of a contractile structure generated by the combined action of 3 parameters: actin flow, molecular motors and crosslinkers.

<https://www.dropbox.com/s/xu6mcwufd7y9xag/BlanchoinVideo2.10.04.15.mov?dl=0>

L'assemblage de différents types d'architectures d'actine dans la cellule nécessite le plus souvent l'intervention de différents nucléateurs d'actine permettant d'initier la formation de ces structures (le complexe Arp2/3, les formines... [Skau et Waterman(2015)]). Le complexe Arp2/3 génère un réseau dit dendritique de filaments d'actine qui va être notamment impliqué dans la construction du lamellipode, nécessaire à l'avancée du bord avant cellulaire [Pollard et Borisy(2003)]. Les formines sont plus particulièrement impliquées dans la formation de structures parallèles ou antiparallèles d'actine, nécessaires à la formation des filopodes ou de certaines structures contractiles [Letort et al.(2015a)]. Cependant des données récentes montrent qu'une synergie peut s'établir entre ces 2 types de nucléateurs favorisant notamment une élongation rapide de structures initiées par le complexe Arp2/3 (élongation du lamellipode, [Block et al.(2008)]). La revue ci-dessus nous a permis de mettre en avant cette action synergistique notamment dans le cas de transitions dynamiques entre les différents types d'architectures cellulaires. Une des questions que soulève la présence de ces différentes organisations dans la cellule est de savoir comment elles se coordonnent temporellement et spatialement à l'échelle cellulaire pour permettre une réponse physiologique macroscopique adaptée. Une des réponses à cette question vient de la dynamique intrinsèque de ces structures qui, pour la plupart, ont un temps de renouvellement de l'ordre de la minute.

Dynamique des structures d'actine

La dynamique des structures repose sur un assemblage rapide nécessitant l'intervention de facteurs de nucléation mais aussi un large réservoir de monomères d'actine [Pollard et al.(2000)]. Elle requiert un désassemblage rapide nécessaire au renouvellement de ces architectures dynamiques d'actine et au maintien de la concentration cellulaire de monomères [Pollard et al.(2000)]. Cet assemblage et désassemblage des structures de filaments d'actine doivent être coordonnés dans l'espace et le temps et pour cela le nucléotide lié au filament d'actine joue un rôle crucial. En effet, l'assemblage des structures va se faire le plus souvent à un état nucléotide des filaments d'actine ATP ou ADP-Pi alors que le désassemblage va se faire lorsque les filaments sont chargés en ADP. On peut comparer le nucléotide lié à ces structures à un marqueur temporel permettant de différencier les sites d'assemblage et de désassemblage des filaments d'actine.

Cependant, il existe une autre façon de moduler dynamiquement les structures d'actine en réorganisant les filaments d'actine qui les composent. Ce sont ces aspects que nous avons plus particulièrement détaillés dans notre revue. Le remodelage des structures d'actine peut être dû à l'action de protéines facilitant cette réorganisation (ADF/cofiline, moteurs moléculaires, protéines de pontage...) ou de contraintes extérieures (flux rétrograde cellulaire, compression cellulaire, contact avec la membrane...).

Pour comprendre ces réorganisations, il semble essentiel d'étudier l'architecture des réseaux d'actine permettant l'agencement macroscopique des différentes organisations d'actine que l'on peut rencontrer dans les cellules. Cette problématique a été un des aspects que j'ai plus particulièrement étudié dans le cadre de cette thèse. De même il m'a semblé important de comprendre comment un même mécanisme peut conduire à des organisations différentes en fonction de la nature du polymère biologique qui la constitue. C'est pourquoi j'ai mené en parallèle des études sur la dynamique des filaments d'actine et celle des microtubules.

1.4.2 Rôles des microtubules

Contrairement aux filaments d'actine, les microtubules étant considérés comme des polymères rigides à l'échelle cellulaire, ils peuvent explorer l'espace cellulaire et résister à d'éventuelles forces intra-cellulaires. La formation de structures spécifiques n'est donc pas nécessaire, mais l'organisation spatiale des microtubules est cruciale à l'agencement interne de la cellule. Ceci explique que ces polymères soient en majorité organisés en une unique structure, un aster (Figure 1.11 (A), vert). Ainsi, le déplacement du centre de l'aster, appelé centre organisateur des microtubules (MTOC, ou centrosome sous certaines conditions), permet de repositionner tous les microtubules rattachés à ce centre. Cette réorganisation définit ensuite le ré-agencement des différents organites de la cellule. La participation des microtubules aux processus cellulaires est ainsi principalement déterminée par le positionnement de ce centre organisateur.

L'organisation des microtubules et leur dynamique leur permettent d'être des mécanosenseurs de la forme de la cellule et d'en relier dynamiquement les différentes parties. Ils participent ainsi à plusieurs processus cellulaires :

- **Polarité cellulaire** : Par leurs interactions avec le noyau, les différents organites et le cytosquelette d'actine, les microtubules vont jouer un rôle déterminant d'intégration pour coordonner la séquence d'évènements permettant l'acquisition de polarité par les cellules ([Kirschner et Mitchison(1986), Gotlieb et al.(1981)], Figure 1.11 (A)). Notamment leur rôle lors du positionnement du MTOC sera déterminant pour la polarisation de la cellule au cours de sa migration ou de son développement (voir partie 9.1).
- **Transport interne de vésicules** : Les microtubules sont des "rails", formant un réseau intra-cellulaire qui va être utilisé par des moteurs moléculaires (types kinésines et dynéines) pour se déplacer, permettant le transport de cargos qui leur sont associés [Gross(2004)]. Ce transport peut se faire depuis l'appareil de Golgi (l'organite principal permettant le tri et le transport des protéines) vers les différentes parties de la cellule ou l'inverse selon la nature des moteurs impliqués (Figure 1.11 (B)). Son assemblage étant contrôlé par les microtubules centrosomaux [Rogalski et Singer(1984)], l'appareil de Golgi sera en effet la plupart du temps à proximité du centrosome.
- **Division cellulaire** : Les microtubules sont essentiels pour assurer que l'information génétique de la cellule mère soit correctement transmise aux 2 cellules filles. En effet, lors de la division, le centrosome se sépare en 2 asters qui vont se positionner en 2 pôles opposés de la cellule. Certains des microtubules nucléés depuis ces 2 asters se superposent entre eux-ci, formant avec ces MTOCs le fuseau mitotique. Cette formation est importante dans la recherche et la capture des chromosomes [Kirschner et Mitchison(1986)] et assure la répartition du matériel génétique dans 2 cellules filles (Figure 1.11 (C)). Les microtubules durant la mitose sont très dynamiques comparés aux microtubules des cellules en interphase [Piehl et Cassimeris(2003)] et essentiels au bon positionnement du fuseau mitotique dans la cellule.
- **Cils cellulaires** : Les microtubules peuvent aussi s'organiser pour former des saillies cellulaires composées de microtubules parallèles, d'une dizaine de micromètres de long, appelés cils cellulaires (Figure 1.11 (D)). Ils sont présents dans presque toutes les cellules humaines. Une cellule peut avoir un (cil primaire) ou plusieurs cils, qui peuvent servir soit de moteurs, soit de senseurs pour la cellule [Marshall et Nonaka(2006)]. Certains cils, étant mobiles, peuvent en effet créer des mouvements dans le fluide environnant la cellule, pour par exemple nettoyer les muqueuses de l'appareil respiratoire,

les fluides des sinus ou définir une asymétrie lors du développement embryonnaire. Leur longueur leur permet aussi de servir d'antenne à la cellule et ainsi de sentir la composition chimique de l'environnement ou son stress mécanique. Étant donné toutes ces fonctions, de nombreuses maladies humaines (par exemple la polykystose rénale, défaut de nettoyage des muqueuses, obésité...) proviennent de défauts de fonctions ou de formation des cils [Marshall et Nonaka(2006)].

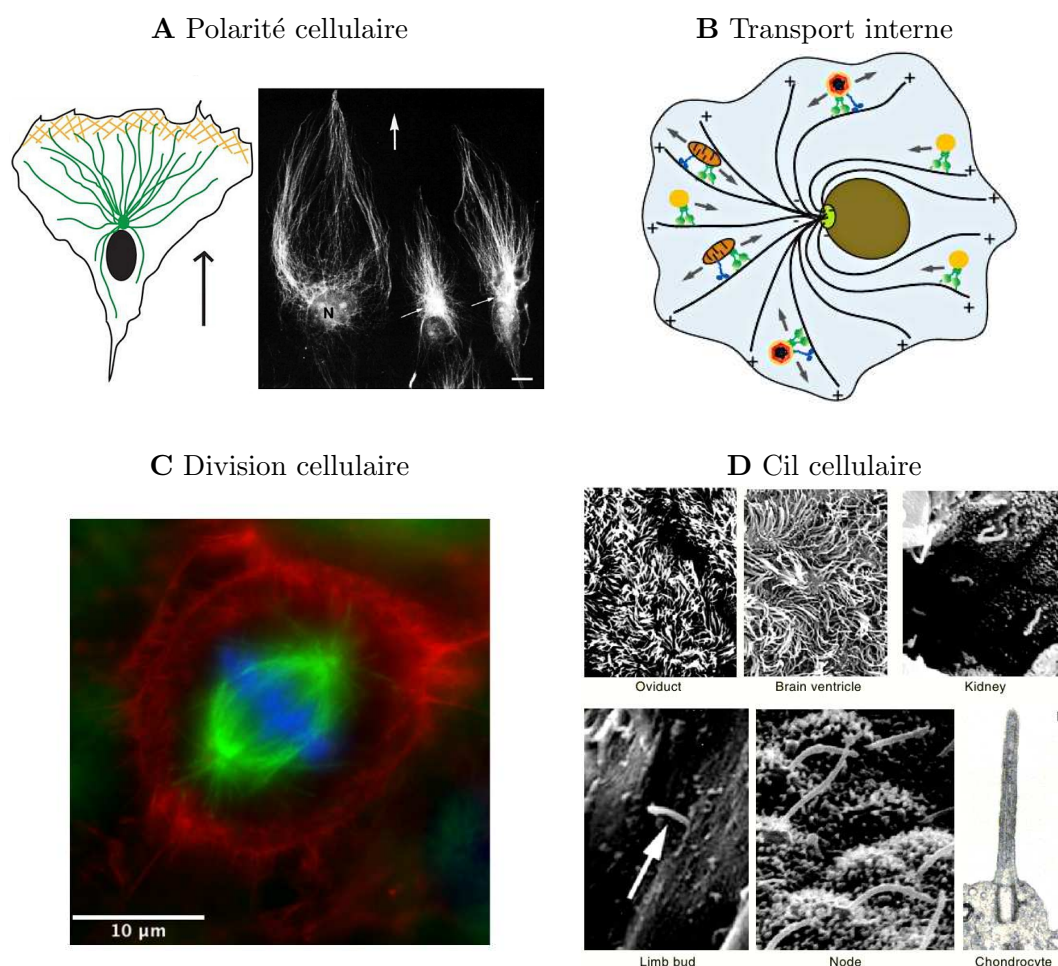


Fig. 1.11 : Différentes fonctions des microtubules dans la cellule

(A) Polarité cellulaire. Représentation schématique de l'organisation d'une cellule mésoenchymale en migration (gauche). Tiré de [Kadir et al.(2011)]. Organisation des microtubules de cellules endothéliales en migration (droite). Tiré de [Gotlieb et al.(1981)], l'échelle représente 10 μm. (B) Transport interne. Les microtubules (noirs) servent de "rails" aux moteurs moléculaires, les kinésines (bleu) et dynéines (vert) qui transportent des vésicules. Tiré de [Gross(2004)]. (C) Formation du fuseau mitotique durant la division cellulaire. Image prise par Mithila Burute (équipe Cytomorpho). En bleu les chromosomes, en vert les microtubules. (D) Cils cellulaires de différentes cellules. Tiré de [Marshall et Nonaka(2006)].

Suite aux observations ci-dessus sur la dynamique des organisations du cytosquelette, les points qui nous ont paru importants d'étudier dans cette thèse sur le comportement de ces 2 polymères sont les suivants : l'organisation et la réorganisation collective des filaments d'actine et le rôle du positionnement des microtubules dans la cellule. Néanmoins, la cellule est un environnement d'une grande complexité. Il en résulte que l'étude de ces phénomènes à un niveau de compréhension moléculaire est très difficilement réalisable avec les outils

technologiques actuels. Il est donc intéressant d'aborder ces questions à l'aide d'une approche dite réductionniste pour limiter ou contourner la complexité des systèmes expérimentaux étudiés. Ceci permet ainsi la mise en évidence de règles fondamentales d'auto-organisation du cytosquelette. L'approche réductionniste ou l'utilisation de systèmes bio-mimétiques semble aussi très intéressante car très compatible avec des approches théoriques sur le même type de questions. Ma formation d'ingénieur en mathématiques et informatiques appliquées me permet de pouvoir aborder, grâce à ces approches expérimentales, une réflexion théorique qui est nécessaire non seulement à la compréhension des systèmes expérimentaux étudiés mais aussi comme outil prédictif pour élaborer de nouvelles approches expérimentales.

Dans le chapitre ci-dessous, je vais détailler les différentes méthodes permettant de contourner la complexité du vivant afin d'en établir les règles d'organisation fondamentales.

2. MÉTHODES D'ÉTUDES

2.1 Méthodes d'études possibles

Pour étudier un système biologique si complexe, plusieurs approches sont possibles :

- *in-vivo* : cette approche consiste à étudier la cellule ou son squelette, dans son environnement physiologique, soit dans un tissu soit directement sur des organismes entiers. L'intérêt de cette approche est qu'elle permet l'observation du comportement cellulaire dans son environnement naturel. Le désavantage est qu'il y a *in-vivo* une grande diversité de comportements possibles, donc il peut être difficile de tirer des lois générales à partir des observations. De plus, le système étudié est souvent trop complexe pour être sûr que la réponse obtenue s'explique à partir des seuls paramètres envisagés.
- *in-vitro* : dans un système *in-vitro*, le système étudié est isolé dans un environnement contrôlé, généralement dans une boîte de Pétri ou sur une lamelle. L'avantage de cette méthode est de permettre une plus grande modularité du système étudié (possibilité d'observation ou de manipulation) et de pouvoir contrôler précisément son environnement. Néanmoins, le fait que l'objet étudié soit séparé de son environnement physiologique peut changer son comportement et donc les conclusions obtenues *in-vitro* peuvent ne plus être extrapolables *in-vivo*.
- *in-silico* : pour expliquer les observations faites lors des études *in-vivo* ou *in-vitro*, il est souvent nécessaire d'utiliser des méthodes théoriques qui peuvent être des analyses statistiques des données (analyses d'images...), des modèles analytiques ou des simulations numériques. Ces approches permettent de quantifier la probabilité des observations, de tester la compréhension du système ou de prédire ou d'explorer des comportements expérimentaux. Le problème de cette approche est que l'on ne peut pas toujours être certain de sa validité (cf partie 2.1.1). Malgré cela, cette approche est un apport très important pour expliquer ou diriger des études *in-vivo* ou *in-vitro*. La combinaison de ces approches peut permettre de comprendre les comportements cellulaires malgré leurs complexités et les limitations techniques.

Mon travail de thèse consistant en une approche *in-silico*, je vais ci-dessous présenter plus particulièrement les méthodes associées.

2.1.1 Étude *in-silico*

L'étude théorique d'un système biologique est une étude complémentaire aux observations expérimentales qui peuvent avoir été faites. Il peut s'agir d'analyse mathématique des résultats obtenus expérimentalement. Par exemple pour évaluer si les observations révèlent un comportement particulier ou pourraient en fait être dues au hasard ([Falconer et al.(2010), Freida et al.(2013)], voir annexe A.1), ou pour déceler des corrélations entre des paramètres et les observations. Ces approches sont très utiles pour l'étude de systèmes générant une grande quantité d'information : les méthodes statistiques sont particulièrement utilisées de nos jours dans les approches omiques ou dans le cadre de criblages utilisant des petites molécules chimiques, siRNA... Ces études ont permis d'identifier des gènes responsables de dysfonctionnements cellulaires responsables de pathologies, ou d'identifier des cascades

d'évènements biologiques conduisant à une réponse spécifique. Elles ont aussi permis d'identifier des réseaux de régulations ou d'interactions.

Outre l'analyse de résultats expérimentaux, une étude théorique peut permettre d'expliquer ou prédire le comportement d'un système expérimental : pour cela nous pouvons utiliser des approches déterministes ou stochastiques.

- **Méthode déterministe :**

Cette méthode consiste à décrire par une série d'équations le système étudié. Cela nécessite une très bonne connaissance du phénomène ou des hypothèses précises sur son comportement. On peut ensuite résoudre analytiquement (ou numériquement lorsque ce n'est pas possible) ce système d'équations afin d'avoir le comportement final du système pour une condition initiale donnée. L'avantage de cette méthode est que l'on obtient une réponse unique pour une condition donnée. On peut ensuite faire varier les paramètres du modèle pour explorer le plus largement possible les différents comportements. Cette méthode est aussi généralement peu exigeante en ressources informatiques puisque l'on peut souvent apporter des conclusions générales par l'étude théorique du système d'équations (en analysant les conditions aux limites ou d'équilibre), et que les méthodes de résolution numérique sont en général assez directes. Le système étudié est souvent considéré comme un gradient continu (par exemple la concentration d'une protéine), dont l'évolution spatiale et temporelle est calculée à l'aide d'équations différentielles (modèles dynamiques).

Le problème de cette méthode est qu'elle demande une compréhension très poussée du système. De plus lorsque le système est très complexe, nous allons souvent observer une grande variabilité dans sa réponse à partir de conditions identiques (ceci à cause de la complexité qui souvent cache des effets que l'on peut difficilement expliquer). En outre, si les évènements modélisés sont rares (par exemple si une molécule dont l'effet est important est rare dans le système), l'approximation de continuité ne permet pas d'étudier ce système correctement. Dans de nombreux cas, aux méthodes déterministes, il est nécessaire d'ajouter une composante aléatoire au modèle afin d'intégrer la variabilité des systèmes biologiques [Stewart-Ornstein et El-Samad(2012)].

- **Méthode stochastique :**

Les méthodes stochastiques intègrent cette composante aléatoire. Soit le système est considéré globalement et un bruit aléatoire est ajouté à la description du système, soit on considère chaque composant individuellement (souvent appelé modèle basé sur agents). L'avantage de ces modèles est qu'ils sont souvent plus "proches" des comportements expérimentaux [Mogilner et al.(2012)]. En revanche, ils sont souvent exigeants en ressources informatiques, en particulier lorsque l'évolution de chaque composant du système est calculé individuellement [Mogilner et Odde(2011), Mogilner et al.(2006)]. L'utilisation de la simulation permet d'explorer l'évolution du système complexe lorsque l'on connaît les lois physiques qui régissent le comportement d'un individu. Dans ce cas, les simulations (ou expériences numériques) permettent de tester différentes hypothèses concernant l'effet de différents paramètres sur le comportement collectif permettant à plusieurs individus de s'organiser en structures élaborées.

Un modèle peut donc rester très conceptuel ou essayer de se rapprocher le plus possible d'un comportement physiologique. Dans ce cas, il est nécessaire que la personne en charge d'élaborer le modèle ait elle-même une bonne connaissance du système expérimental ou soit

en proche interaction avec des expérimentalistes.

Le problème de l'éléphant

Lorsque Freeman Dyson a rencontré le physicien Enrico Fermi pour lui montrer un modèle qu'il avait développé afin d'expliquer les observations expérimentales de Fermi, celui-ci lui a demandé combien de paramètres arbitraires étaient utilisés dans son modèle. Lorsque Dyson lui a répondu 4, Fermi lui a déclaré : **"I remember my friend Johnny von Neumann used to say, with four parameters I can fit an elephant, and with five I can make him wiggle his trunk."** [Dyson(2004)]. Cette phrase est restée célèbre en modélisation car elle révèle le danger de construire des modèles reposant sur un trop grand nombre d'hypothèses arbitraires : il est tout à fait possible de reproduire les observations que l'on veut étudier à partir d'un modèle totalement erroné, en calibrant les paramètres pour obtenir ce que l'on veut. Ainsi, si l'on cherche à modéliser un éléphant, on peut en reproduire la forme en utilisant seulement 4 paramètres complexes [Mayer et al.(2010)]. Toutefois, ce modèle est totalement arbitraire et n'a rien à voir avec un éléphant réel : il ne permet donc d'apprendre que peu de choses sur l'éléphant (seulement que l'on peut abstraitement décrire sa forme), et surtout cela ne permet aucune prédiction. Il faut donc être prudent lorsque l'on construit un modèle et vérifier sa pertinence.

Même si un modèle repose sur plusieurs paramètres arbitraires ou abstraits, il peut néanmoins être très intéressant, selon les hypothèses sur lesquelles il a été construit : le modèle de l'éléphant ici ne cherche qu'à reproduire sa forme, mais un modèle pouvant expliquer comment les éléphants obtiennent cette morphologie ou pourquoi ils se comportent ainsi pourrait être instructif même s'il contient plusieurs paramètres arbitraires [Ditlev et al.(2013)]. Ainsi, si par exemple il explique la dynamique du système, peut en prédire l'évolution, ou identifier les facteurs importants contrôlant son évolution, le modèle peut être très utile.

Le problème de l'éléphant nous montre donc que l'utilisation d'approche théorique demande de bien réfléchir à ce que l'on veut en obtenir et de ne pas chercher seulement à "coller" aux données expérimentales.

Réflexion et simplicité avant tout...

Dans tous les cas, l'important est de définir ce que l'on attend du modèle. Il ne faut donc pas juger un modèle/des simulations sur leur exactitude (sachant qu'un système plus simple est souvent préférable), mais sur leur apport à la question posée [Mogilner et al.(2012)], ainsi que l'a suggéré Einstein : *"A scientific theory should be as simple as possible, but not simpler"*. S'il est important de vérifier que le modèle colle au système biologique étudié, il faut être attentif à ne pas chercher à reproduire le système biologique dans sa complexité, car dans ce cas un modèle (ou des simulations) n'apporterait pas grand chose de plus que l'expérience elle-même [Mogilner et al.(2006)]. Ce raisonnement est d'ailleurs transférable à un système *in-vitro* : il faut être attentif à construire un système dont le contenu permet d'expliquer des phénomènes *in-vivo*, tout en cherchant la simplicité pour pouvoir y comprendre le comportement dynamique.

Il faut aussi noter qu'un résultat négatif (si l'on obtient pas les comportements expérimentaux avec les hypothèses faites pour le modèle) est souvent aussi important que si le modèle colle parfaitement aux expériences. En effet, cela permet de montrer que les hypothèses utilisées ne sont pas suffisantes pour expliquer les observations [Mogilner et al.(2006)]. La

démarche utilisée peut donc souvent apporter autant d'informations que le modèle lui-même, puisqu'elle permet d'identifier les paramètres principaux contrôlant les phénomènes mis en jeu et ainsi d'avancer dans la compréhension du système biologique [Mogilner et al.(2006)].

Ainsi, le plus important dans une étude théorique est la question biologique que l'on cherche à élucider. Ceci détermine quelle est la meilleure approche pour la résoudre et l'apport possible du modèle par rapport aux possibilités expérimentales. La construction d'un modèle demande donc une réflexion intense avant tout, ce qui permet aussi de le simplifier autant que possible et donc de gagner du temps de calcul [Mogilner et al.(2006), Mogilner et Odde(2011)].

Remarque : J'ai été en particulier confrontée à ce genre de considérations durant ma thèse. Notamment, j'ai commencé à développer un logiciel permettant de simuler la croissance de filaments d'actine lors de mes premiers mois de thèse. Le modèle que nous construisions était, je pense, tout à fait correct, mais dans un esprit plus orienté vers l'aspect théorique que cherchant à simplifier pour en faciliter l'implémentation. Mes premières simulations ont vite révélé ce problème puisqu'il me fallait presque 3 heures pour observer la croissance de 8 filaments seulement. En cherchant à optimiser mon code (la tâche la plus gourmande en ressources de calcul était dans le calcul des interactions entre les filaments et dans les contraintes trop strictes que nous mettions sur la proximité des paramètres des simulations aux valeurs réelles), j'ai réalisé que l'implémentation d'un tel modèle exige une réflexion sérieuse en amont sur les simplifications possibles afin d'éviter ce genre de situation. Toutefois, en parcourant le code de *Cytosim*, le logiciel que j'ai utilisé par la suite (cf chapitre 3), j'ai pu constater l'exemple inverse où le modèle et le code étaient fort bien conçus dans un souci d'optimisation numérique, qui en fait un outil performant permettant d'attaquer différents problèmes biologiques sans être trop un frein important à ces études (bien que cela reste une contrainte à intégrer).

De plus, travaillant en très proche interaction avec les expériences, j'ai souvent été amenée à remettre en cause l'apport possible de mes simulations du fait de leur précision limitée. Les simulations qui sont présentées dans ce manuscrit sont en général le résultat d'un compromis entre une proximité avec les comportements réels pour leur validité et une simplification du système pour gagner à la fois en temps de simulation et en compréhension des phénomènes mis en jeu.

2.2 Approche utilisée dans le cadre de ma thèse

Dans l'équipe Cytomorpho, nous cherchons à élucider le comportement dynamique du cytosquelette et son implication dans différents processus cellulaires.

2.2.1 Niveaux de complexité

Pour cela, nous étudions *in-vitro* la dynamique du cytosquelette, en combinant une approche "top-down" et une approche "bottom-up". L'approche "top-down" consiste à étudier le comportement cellulaire en simplifiant les conditions aux limites, notamment en imposant des contraintes géométriques permettant de moduler la forme des cellules et donc d'imposer une organisation au cytosquelette. L'approche "bottom-up" consiste à reconstituer à partir d'un système minimum fait de protéines purifiées une organisation cellulaire ou un comportement dynamique physiologique du cytosquelette (Figure 2.1).

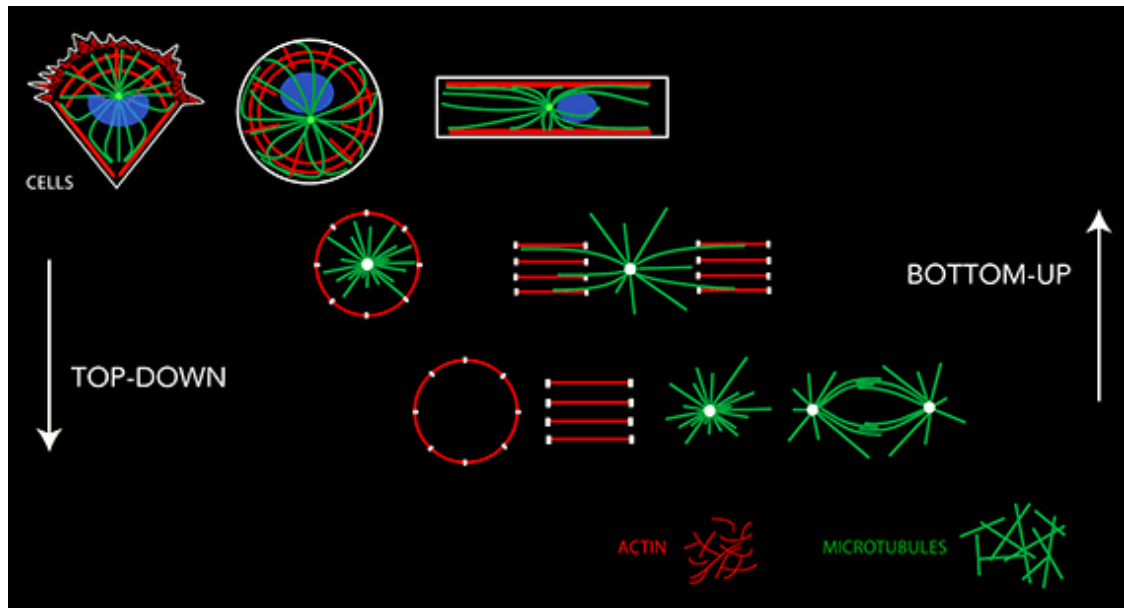


Fig. 2.1 : Approche utilisée pour étudier le cytosquelette au sein du laboratoire
Image tirée du site web de l'équipe : www.cytomorpholab.com

Certaines de ces études expérimentales nécessitent d'être combinées à une étude théorique (*in-silico*) pour décrire les résultats quantitativement, pour expliquer les comportements observés, tester les hypothèses émises ou prédire la dynamique du système. Mon travail de thèse s'inscrit dans cette complémentarité entre la théorie et les expériences. Mon but est d'utiliser les simulations, ou "expériences numériques", pour comprendre et analyser les évolutions du système étudié mais aussi pour proposer de nouvelles pistes expérimentales menant à une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu.

Je vais donc dans un premier temps présenter l'approche *in-vitro* utilisée dans l'équipe Cytomorpho, approche qui m'a semblé pertinent d'étudier de façon approfondie à l'aide de simulations numériques.

2.2.2 Étude *in-vitro* du cytosquelette

Pour étudier et comprendre les différents processus cellulaires, de nombreuses méthodes *in-vitro* ont été développées afin de simplifier les systèmes expérimentaux. Notamment certaines permettent de contrôler l'environnement géométrique des cellules : les méthodes de "micropatterning" [Carter(1967), Harris(1973)]. Le principe de ces méthodes est de contraindre l'adhésion des cellules à une zone géométriquement contrôlée [Théry(2010)]. Cette technique permet de contrôler la forme cellulaire et ainsi de réduire la variabilité cellulaire intrinsèque. Ainsi il a été possible d'obtenir un grand nombre de données permettant une analyse statistique de l'organisation du cytosquelette en fonction de la géométrie cellulaire et notamment son effet sur la répartition des organites dans la cellule [Théry et al.(2006)]. Notamment, les filaments d'actine et les microtubules formeront des organisations spécifiques en réponse à des géométries d'adhésion distinctes (Figure 2.2). Cette adaptation remarquable du cytosquelette à la géométrie cellulaire a pu être révélée par cette technique de "micropatterning". Par contre, les mécanismes responsables de ces auto-organisations sont difficilement identifiables à ce niveau de complexité.

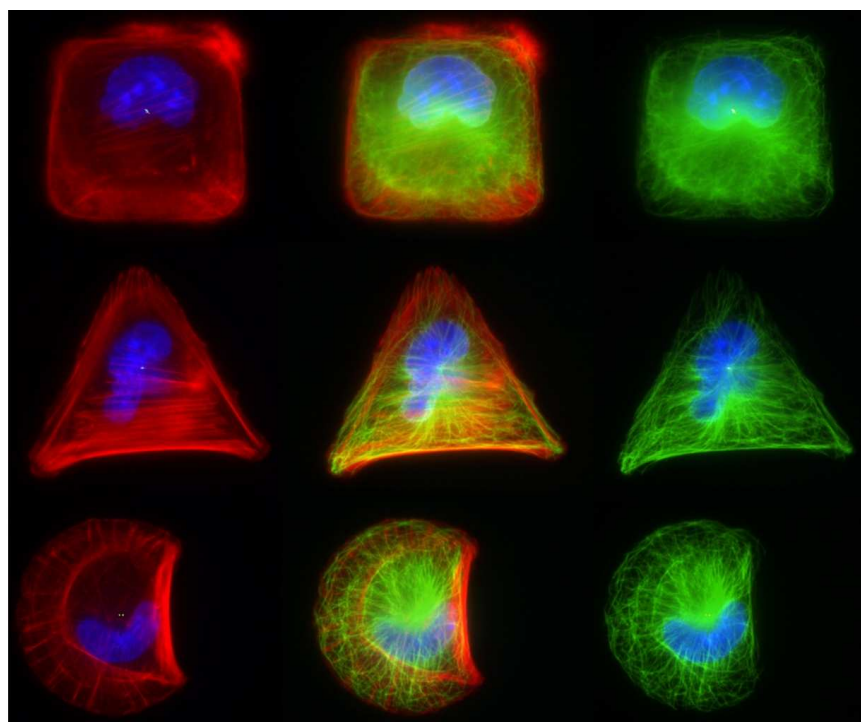


Fig. 2.2 : Organisation du cytosquelette selon la géométrie cellulaire

La forme de cellule adhérente est contrôlée par la technique de "micropatterning". Les composants du cytosquelette (les filaments d'actine en rouge et les microtubules en vert) s'organisent de façon spécifique en réponse aux différentes géométries cellulaires. Le noyau est montré en bleu. Montage et images de Stefan Biedzinski et Ana Joaquina Jimenez (équipe Cytomorpho).

Ces travaux ont permis d'identifier des lois d'organisation cellulaire qui étaient jusque là masquées par la diversité des formes que peut adopter une cellule. Malgré ce contrôle, le système cellulaire reste très complexe et il est très difficile d'avoir accès aux mécanismes moléculaires contrôlant l'organisation du cytosquelette en se bornant à une étude au niveau cellulaire. C'est pourquoi, afin de contourner ses limitations, nous utilisons aussi des approches *in-vitro* basées sur des systèmes reconstitués basés sur des protéines purifiées (système acellulaire). L'intérêt d'utiliser des systèmes biomimétiques est que l'on va limiter le nombre de composés permettant de reproduire un comportement physiologique du cytosquelette et ainsi avoir accès aux mécanismes moléculaires [Achard et al.(2010)].

Récemment dans l'équipe, nous avons adapté la méthode de "micropatterning" utilisée pour contraindre la forme des cellules afin de contrôler géométriquement l'assemblage du cytosquelette ([Reymann et al.(2010), Portran et al.(2013)], cf 4.1). Ces études ont permis de montrer que la géométrie de la zone de nucléation contrôle la formation de structures d'actine similaires à celles observées *in-vivo*. Cependant, dans ces travaux, les mécanismes impliqués dans la formation spécifique d'organisations d'actine à partir d'une géométrie déterminée n'étaient pas élucidés. Cette question a fait l'objet d'une grande partie des travaux réalisés au cours de ma thèse ([Letort et al.(2015b)], cf partie II).

Un aspect intéressant qui a été étudié dans l'équipe suite à la formation de ces structures est de comprendre si/comment des protéines interagissant avec le cytosquelette étaient sensibles à l'organisation architecturale du cytosquelette. Les premiers travaux réalisés se sont intéressés aux moteurs moléculaires du type des myosines. Dans ces travaux, les architectures

obtenues ont été utilisées comme substrat pour l'action des moteurs moléculaires. Il a été ainsi possible de montrer que les myosines sont sensibles aux organisations des réseaux d'actine et qu'elles vont agir de façons différentes sur des filaments parallèles ou antiparallèles [Reymann et al.(2012)]. Cette sélection des moteurs moléculaires vis à vis de l'architecture des filaments d'actine confère aux différentes structures de filaments d'actine des propriétés contractiles distinctes. Ainsi il est possible grâce à ces travaux de concevoir pourquoi dans un environnement cellulaire certaines structures se contractent plus ou moins rapidement, voire ne se contractent pas du tout.

Ce travail a aussi mis en évidence l'importance de comprendre les lois d'organisation géométrique d'actine puisqu'elles vont avoir une influence majeure sur les comportements cellulaires. C'est dans ce cadre que j'ai commencé mes travaux de thèse.

2.3 Objectifs et contenu

Le but principal de ma thèse est d'expliquer les comportements collectifs du cytosquelette observés dans des expériences d'assemblage de l'actine dans des conditions géométriquement contrôlées. Pour cela, il est nécessaire de développer un outil de simulation adapté à la question posée et à la démarche expérimentale utilisée.

Nous avons choisi une approche s'appuyant sur des simulations stochastiques plutôt que sur une approche de modélisation déterministe car même au niveau des systèmes biomimétiques le nombre de paramètres mis en jeu reste très élevé donc difficilement modélisable. En particulier, notre compréhension des phénomènes contrôlant le comportement collectif des filaments du cytosquelette n'est pas assez poussée pour construire un modèle général les décrivant. Il est donc plus naturel de simuler la croissance des filaments sous contraintes géométriques afin d'explorer leur comportement et ainsi déduire les propriétés régissant leur organisation dynamique. De plus, cela permet de disposer d'un outil générique pouvant être utilisé dans un large éventail de conditions expérimentales et d'applications en biologie, alors qu'un modèle déterministe risquait d'être plus restreint à une condition donnée.

2.3.1 Outil utilisé

Plusieurs logiciels ont déjà été développés afin de simuler les processus biologiques selon l'approche stochastique. Par exemple, Smoldyn [Andrews et al.(2010)] permet de simuler la diffusion et les réactions moléculaires dans une cellule ou un autre environnement confiné. VirtualCell [Moraru et al.(2008)] est un outil très général pour simuler les processus cellulaires (diffusion, flux, réseaux de signalisation, morphogénèse...) et fournit un environnement pour construire et résoudre de nombreux modèles, avec l'implémentation de nombreuses méthodes utiles (Équations Différentielles Ordinaires, Équations Différentielles Partielles, estimation de paramètres...). Le but de VirtualCell est de permettre de disposer d'un outil de simulation cellulaire commun aux biologistes expérimentaux et théoriciens.

Dans notre équipe, pour expliquer la rupture spontanée de symétrie du réseau d'actine entourant un objet mobile, des simulations ont été développées en considérant les filaments d'actine comme un réseau de ressorts. Cela a permis d'explorer les conditions permettant la brisure de symétrie, événement pré-requis avant un mouvement orienté [Kawska et al.(2012)]. De même, des études ont permis de montrer les paramètres contrôlant la forme d'une comète d'actine propulsant une bille et mimant ainsi le mouvement intra-cellulaire de bactéries ou virus [Dayel et al.(2009)]. Cependant, dans ces modèles les filaments d'actine sont considérés comme des structures rigides. Seule la mécanique globale du système est analysée.

Des simulations stochastiques considérant les filaments d'actine comme des polymères semi-flexibles ont permis d'étudier la formation de l'anneau de cytokinèse par un phénomène de "Recherche et Capture" [Vavylonis et al.(2008)].

Ces exemples montrent la variété d'utilisations possibles de modèles stochastiques pour explorer les phénomènes cellulaires. Néanmoins ces différents outils ne permettent pas de simuler et d'expliquer la croissance de filaments du cytosquelette à partir de contraintes géométriques. De plus ils sont en général limités dans les aspects de couplage entre les propriétés cinétiques et mécaniques des polymères étudiés.

Finalement, un logiciel de simulation du cytosquelette, **Cytosim** (cf chapitre 3), permet de simuler la croissance des filaments d'actine et des microtubules dans de nombreuses conditions biochimiques. Une partie de mon travail de thèse a été d'adapter **Cytosim** pour lui permettre de simuler la croissance du cytosquelette dans des conditions géométriques contrôlées.

2.3.2 Objectifs

Le but de ma thèse est donc d'étudier la dynamique du cytosquelette en reliant les observations expérimentales aux prédictions et analyses théoriques. Ceci afin de comprendre les mécanismes moléculaires et les comportements macroscopiques mis en jeu lors de l'obtention d'architectures spécifiques du cytosquelette.

Pour cela, une majeure partie de mon travail consiste à adapter et utiliser le logiciel **Cytosim** afin d'explorer par simulations l'auto-organisation des filaments d'actine ou des microtubules. Les différents points que nous avons choisi d'aborder sont les suivants :

- **La formation de structures d'actine** : pour comprendre les différentes structures cellulaires d'actine, nous avons étudié les propriétés biochimiques et mécaniques qui permettent d'expliquer la formation de ces structures spécifiques (partie II). Plus précisément, nous nous sommes concentrés sur l'étude de l'auto-organisation des filaments sous des conditions de nucléation géométriquement contrôlées.
- **La contractilité des structures d'actine** : la réorganisation dynamique de ces structures et en particulier leur contractilité étant essentielles aux processus cellulaires, nous avons cherché à explorer comment l'architecture des réseaux d'actine et leur composition biochimique déterminent leurs propriétés contractiles (partie III).
- **Le positionnement du centre organisateur des microtubules** : le contrôle du positionnement du centre organisateur des microtubules dans la cellule selon les différents états cellulaires n'est pas encore élucidé. Nous avons donc entrepris de tester par simulations différents facteurs pouvant influencer ce positionnement (partie IV). Comme ce sujet est très vaste, nous avons poursuivi cette étude en l'appliquant à 2 événements cellulaires particulier : le décentrage du centrosome au cours de la ciliogénèse (cf 11.1), et lors des fluctuations du fuseau mitotique monopolaire (cf 11.2).

Après une présentation rapide du logiciel **Cytosim** utilisé par la suite pour toutes les simulations (chapitre 3), je vais plus particulièrement exposer les différents points étudiés de façon chronologique comme présenté ci-dessus.

3. CYTOSIM : SIMULATION DU CYTOSQUELETTE

3.1 Cytosim : présentation générale

Cytosim (www.cytosim.org) est un logiciel de simulation du cytosquelette, développé en C++ [Stroustrup(1997)] par l'équipe de François Nédélec, à l'EMBL d'Heidelberg. Basé sur une modélisation brownienne de la dynamique du cytosquelette, Cytosim permet de simuler les polymères du cytosquelette et leurs interactions avec différentes protéines (protéines de pontage, moteurs moléculaires...) [Nedelec et Foethke(2007)].

3.1.1 Principe

Un polymère biologique est discrétisé en un ensemble de points équidistants (Figure 3.1).

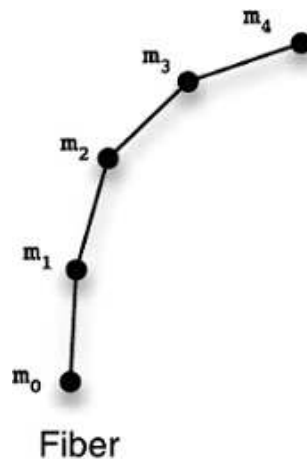


Fig. 3.1 : Modélisation d'un filament dans Cytosim

Discrétisation d'un filament en un ensemble de points m_i équidistants.

Tiré de [Nedelec et Foethke(2007)].

L'équation du mouvement brownien des extrémités de chaque segment est calculée selon l'équation de Langevin :

$$d\vec{x} = \mu \vec{F}(\vec{x}, t) dt + dB(t)$$

où \vec{x} est un vecteur contenant les coordonnées des points m_i , \vec{F} contient les valeurs des forces appliquées aux points m_i (forces de courbure, interactions entre objets...) et $dB(t)$ représente le mouvement brownien du filament.

La force de courbure dépend de la rigidité du filament. Elle est calculée entre 2 segments consécutifs, comme une force cherchant à minimiser l'angle entre ces 2 segments :

$$F = L_p k_B T \frac{1}{a^3} (m_{i-1} + 2m_i + m_{i+1})$$

a est la longueur d'un segment. Cette force est appliquée sur chacun des points modèles avec les coefficients $(-F, 2F, -F)$.

Exemple de simulation

Il est ainsi possible de reproduire *in-silico* le comportement de polymères de différentes longueurs et de différentes rigidités comme discuté dans la section 1.3.2. Dans l'exemple ci-dessous, nous avons simulé 3 filaments de différentes longueurs de persistance (brin d'ADN, bleu, $L_p = 45 \text{ nm}$; filament d'actine, rouge $L_p = 15 \mu\text{m}$; et microtubule, vert, $L_p = 5000 \mu\text{m}$), mais de même longueur ($5 \mu\text{m}$, Figure 3.2). Ces simulations permettent de comprendre en quoi la longueur des polymères en relation avec leurs propriétés mécaniques peut induire des comportements très différents sous agitation thermique.

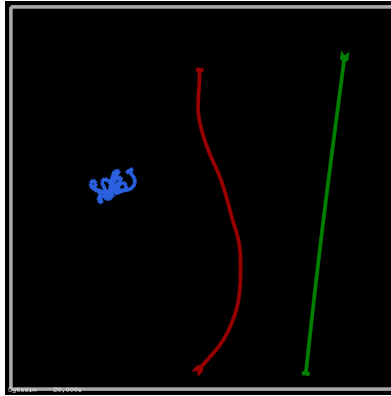


Fig. 3.2 : Simulation de polymères avec différentes longueurs de persistance

Simulation illustrant le comportement de polymères soumis aux seules fluctuations thermiques selon leurs longueurs de persistance. Les filaments ont tous ici la même longueur de $5 \mu\text{m}$. La longueur de persistance du filament bleu (resp. rouge, vert) est de 50 nm (resp. $15 \mu\text{m}$, $5000 \mu\text{m}$).

Espace de simulation

La simulation se fait dans un espace défini par l'utilisateur. De nombreuses formes géométriques sont disponibles et il est aussi possible de définir n'importe quel polygone en 2D comme espace en entrant les coordonnées dans un fichier texte. Cela permet d'imposer des limites au déplacement des filaments et des protéines. Si l'on impose un confinement, une force de rappel hookéenne sera appliquée aux segments des filaments qui sortent de l'espace :

$$f_c = k_c (p(x) - x)$$

où k_c est la force de confinement (raideur du ressort) et $p(x)$ le projeté du point x du segment sur l'espace.

Interactions électrostatiques

Outre les interactions imposées par les protéines interagissant avec le cytosquelette, les filaments sont soumis à des interactions électrostatiques, qui auront un effet particulièrement important dans des environnements confinés, notamment dans le cas qui nous intéresse plus particulièrement où l'assemblage du cytosquelette va être contraint par les micropatrons. Ces interactions peuvent avoir 2 origines :

- la répulsion due aux volumes des objets (répulsion hard-core) : la présence d'un objet à un endroit donné se traduit par une forte force de répulsion : un autre objet ne peut y pénétrer. Physiquement l'objet est entouré d'un nuage électronique très dense.

Lorsque les nuages électroniques de ces 2 objets entrent en contact, cela crée une force électrostatique répulsive interdisant aux 2 objets de s'interpénétrer. Cette force n'agit que lorsque les objets sont en contact, donc à très faible distance.

- l'attraction due à la présence de contre-ions : 2 objets de nature identique ont la même charge électrostatique et donc devraient se repousser. Mais la présence de contre-ions dans la solution (provenant par exemple de l'ajout de $MgCl_2$ dans le tampon utilisé *in-vitro*) permet d'équilibrer la charge électrique autour des objets et ainsi permet l'existence de forces attractives [Fazli et Golestanian(2007), Yu et Carlsson(2003), Biron et al.(2004)]. Cette force n'est effective que lorsque les objets sont suffisamment proches pour que les charges électrostatiques puissent interagir.

Dans *Cytosim*, les filaments subissent ces forces d'interaction. Un filament possède un rayon stérique qui correspond à sa structure tridimensionnelle (il est modélisé comme un cylindre). Ce rayon définit la distance à partir de laquelle les objets seront considérés comme inter-pénétrants, soit en répulsion. Il faut aussi imposer une distance maximale d'interaction d_m (à partir de laquelle un filament n'influencera plus son voisin). Ces forces sont calculées pour chaque point modèle discrétisant le filament. La force entre 2 points modèles a et b est modélisée par un ressort hookéen selon la formule :

$$f_a = -f_b = -k\left(1 - \frac{d}{|\delta|}\right)\delta$$

où k est la raideur du ressort, soit l'amplitude de l'interaction, d est la distance d'équilibre entre ces 2 points et δ la distance actuelle entre les points.

La valeur de k est dépendante d'une force attractive ou répulsive, donc de la distance δ entre les 2 points :

$$k = \begin{cases} k_{push} & \text{if } 0 \leq \delta < d \\ k_{pull} & \text{if } d \leq \delta \leq d_m \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}$$

L'ensemble de ces paramètres va en quelque sorte définir le comportement collectif des polymères.

3.2 Objets utilisés

Plusieurs classes d'objets sont proposées dans *Cytosim* pour simuler les filaments et les protéines associées. L'utilisation de ces différentes classes permet de pouvoir simuler avec une grande flexibilité différents processus biologiques.

3.2.1 Fiber

Cette classe permet de simuler les polymères du cytosquelette. Un polymère est modélisé comme un cylindre non extensible, semi-flexible, discrétisé en un ensemble de points équidistants. Il peut subir des interactions avec les autres filaments, ou avec d'autres objets. Un filament est polarisé et chaque extrémité peut avoir plusieurs états dynamiques (polymérisation, stable, dépolymérisation).

La dynamique des filaments peut aussi être influencée par les différentes protéines associées, simulées à l'aide de différentes entités.

Dynamique d'un filament

Ainsi que nous l'avons vu dans la partie 1.2, les polymères peuvent être très dynamiques et leurs extrémités peuvent passer d'un état à un autre :

- **Polymérisation** : La vitesse de polymérisation est calculée selon le modèle du cliquet brownien ([Peskin et al.(1993), Mogilner et Oster(1996), Dogterom(1997)], cf 1.3.3) :

$$v_p = v_0 e^{f/f_s}$$

avec $f < 0$ la force opposée (le load), f_s la force d'arrêt d'un filament et v_0 la vitesse de polymérisation d'un filament libre (sans force opposée).

- **Dépolymérisation** : La vitesse de dépolymérisation, considérée indépendante des forces extérieures [Dogterom(1997)], est modélisée comme une constante, v_d .
- **Catastrophe** : Le changement d'état de polymérisation à dépolymérisation est très fréquent pour les microtubules (1.2.2). Le taux de catastrophe augmente lorsque la force appliquée sur l'extrémité augmente. Ainsi le taux de catastrophe d'un microtubule rencontrant un obstacle (c_{stall}) est supérieur à celui d'un microtubule isolé (en absence de force, c_0) [Janson et al.(2003)]. Pour tenir compte de cet effet, le taux de catastrophe c est calculé dans *Cytosim* ainsi :

$$c = \frac{c_{stall}}{1 + (c_{stall}/c_0 - 1) v_p/v_0}$$

- **Sauvetage** : Inversement, un polymère en état de dépolymérisation peut reprendre sa croissance. Le passage de l'état dépolymérisation à l'état polymérisation est appelé sauvetage (rescue) et la fréquence d'un sauvetage τ_r est constante.

3.2.2 Hand

La classe **Hand** est la base utilisée pour simuler toutes les différentes protéines. Une **Hand** peut s'associer et se dissocier d'un filament et agir sur son comportement dynamique. Il est possible d'ajouter des contraintes spatiales (cf 3.2.3) ou de faire interagir des **Hands** ensemble. La dynamique d'association dépend des paramètres cinétiques et de la distance à partir de laquelle la **Hand** peut s'accrocher au filament. La vitesse de dissociation v_u dépend de la force f subie par la **Hand**, selon la théorie de Kramer :

$$v_u = \tau_d e^{f/f_d}$$

où τ_d et f_d sont le taux de dissociation et la force de dissociation.

Motor

Cette spécialisation de la classe **Hand** permet d'imposer un mouvement à une **Hand** accrochée à un filament. Ainsi l'entité peut se fixer et se déplacer sur le filament avec une cinétique paramétrable. Cet outil est utile notamment pour simuler des moteurs moléculaires comme la kinésine pour les microtubules [Loughlin et al.(2010)] ou la myosine pour l'actine (cf 6.1.1 et 7.1.1). La vitesse de déplacement du moteur sur le filament est contrôlée par la force subie par le moteur :

$$v = v_{max} \left(1 - \frac{f}{f_{sm}}\right)$$

v_{max} est la vitesse de déplacement du moteur sans charge ou force opposée. f_{sm} est la force à partir de laquelle le moteur est bloqué et ne peut plus avancer. Le signe de v_{max} donne la direction du mouvement du moteur (positif vers l'extrémité \oplus).

Nucleator

Cette spécialisation permet de générer un nouveau filament à partir de cette **Hand**. La **Hand** va en effet créer un nouveau filament avec un taux temporel donné.

3.2.3 Single

Cet objet contient une **Hand**. Il permet de gérer la diffusion de cette **Hand** lorsqu'elle est libre. Il est possible de contraindre cette entité à un endroit donné de l'espace à l'aide de la spécialisation **Picket**.

Picket

Cet objet permet de contraindre la **Hand** à rester à une position imposée. Cette contrainte est modélisée par un ressort hookéen : $f = k(p - h)$, où k est la raideur du ressort, qui définit la force de la contrainte, p est la position imposée et h la position actuelle de la **Hand**.

3.2.4 Couple

Un objet **Couple** est l'association de 2 **Hand** ensembles. On peut faire interagir ces 2 entités (activer l'une seulement si l'autre **Hand** est attachée à un filament par exemple), imposer une distance d'équilibre entre les 2 **Hands** ou imposer un angle entre les 2 filaments reliés à chacune des 2 entités.

CrossLink

Les 2 **Hands** de l'objet sont reliées par un ressort hookéen. La force subie par l'objet est calculée comme la différence entre la distance entre les 2 **Hands** actuelle et la distance de repos : $f = k(h_2 - h_{2eq})$, où f est la force du lien, k la raideur du ressort, h_2 la position actuelle d'une des 2 **Hand** et h_{2eq} la position qu'elle devrait avoir, connaissant la position de l'autre **Hand** si le ressort était à sa longueur d'équilibre.

Fork

Cet objet permet aussi de relier 2 filaments, comme un **Crosslink**, mais rajoute une contrainte d'angle entre les 2 filaments au niveau du lien. Il est possible de préciser le moment de la force entre les 2 filaments. Cette classe, développée seulement récemment par Antonio Politi (EMBL Heidelberg), est utile pour simuler les branchements générés par le complexe Arp2/3.

3.3 Utilisations précédentes de Cytosim

Cytosim a déjà été utilisé dans plusieurs études impliquant la dynamique des microtubules. Des simulations de cette dynamique dans la levure ont permis de comprendre la distribution des points de contact entre les microtubules et la membrane interne observée expérimentalement [Foethke et al.(2009)]. De même la simulation de microtubules générés par un aster a permis de reproduire les oscillations et le centrage du faisceau mitotique dans des embryons de *C.elegans* [Kozlowski et al.(2007)]. En variant le diamètre de l'espace de

confinement, il a été montré comment cette contrainte affecte l'auto-organisation des microtubules par des moteurs moléculaires en structures spécifiques : aster, semi-aster, ou des faisceaux le long du cortex [Pinot et al.(2009)]. Il a été aussi étudié comment la présence d'une zone de stabilisation des microtubules (par l'ADN) modifie le positionnement d'aster de microtubules guidés par des moteurs moléculaires [Athale et al.(2014)].

Cytosim a aussi permis d'étudier la formation du fuseau mitotique [Loughlin et al.(2010)] et de montrer que l'architecture de ce fuseau est essentielle pour lui permettre de résister aux forces compressives [Ward et al.(2014)]. Le positionnement du noyau dû aux interactions entre les microtubules et le moteur moléculaire Kar3 permet de contrôler le mouvement des noyaux chez la levure pour entraîner une fusion nucléaire lors de la caryogamie [Gibeaux et al.(2013)].

Les exemples cités ci-dessus montrent l'utilité des simulations, notamment grâce à l'utilisation de **Cytosim**, pour étudier des phénomènes reposants sur la dynamique des microtubules. Cependant **Cytosim** peut aussi être utilisé comme outil prédictif ou conceptuel. En effet une étude très élégante [Rupp et Nedelec(2012)] utilise des simulations générées par **Cytosim** comme base d'un algorithme génétique afin de construire des approches expérimentales permettant de trier les microtubules selon des critères choisis. Ces approches pourraient servir de base conceptuelle pour comprendre certains phénomènes d'auto-organisation du réseau microtubulaire.

Ces études montrent l'intérêt de choisir un logiciel tel que **Cytosim** pour comprendre la dynamique du cytosquelette dans différentes conditions. Néanmoins il n'a jamais été utilisé pour étudier le comportement du cytosquelette d'actine dans des conditions géométriquement contrôlées. Une importante partie de mon travail de thèse a donc été de développer des simulations permettant de comprendre la croissance des filaments d'actine sous différentes contraintes (cf partie 5.1).

Deuxième partie

ORGANISATION DES FILAMENTS D'ACTINE

4. Formation de structures d'actine : observations in-vitro	58
4.1 Méthode de "micropatterning" du cytosquelette d'actine	58
4.2 Observations	58
4.3 Questions soulevées	61
5. Formation de structures d'actine : explications in-silico	62
5.1 Simulation de micropatrons	62
5.2 Auto-organisation des filaments d'actine à partir de micropatrons : résultats .	66

4. FORMATION DE STRUCTURES D'ACTINE : OBSERVATIONS IN-VITRO

Comme présenté dans l'introduction (2.2.2), pour élucider les règles fondamentales contrôlant l'auto-organisation des filaments d'actine en structures élaborées, il a été développé dans notre équipe une méthode de "micropatterning" permettant le contrôle géométrique de l'assemblage de l'actine.

4.1 Méthode de "micropatterning" du cytosquelette d'actine

La méthode de "micropatterning" consiste à rendre une zone de géométrie définie accessible à une protéine d'intérêt. Dans le cas ci-dessous, cette protéine d'intérêt va être nécessaire et suffisante pour déclencher l'assemblage du cytosquelette d'actine. Pour réaliser des géométries de protéines définies sur une lamelle de verre, celle-ci est tout d'abord rendue non adhésive en la recouvrant de polylysine-L-g-polyéthylèneglycol (PLL-PEG) qui permet de rendre la surface hydrophobe et donc le plus souvent répulsive pour les protéines. La deuxième étape consiste à exposer aux UVs la lamelle à travers un masque de chrome qui contient une série de géométries (Figure 4.1). Cette approche ressemble à la méthode du pochoir. Ainsi le PLL-PEG qui recouvre la surface de la lamelle se retrouve brûlée par les UVs en accord avec la géométrie contenue dans le masque, rendant ainsi des zones à géométries bien définies adhésives aux protéines. Pour initier la nucléation de l'actine à partir de ces géométries, nous utilisons dans l'équipe un peptide, pWA, qui correspond à la partie acide de WASP (Wiskott-Aldrich Syndrom Protein). Ce peptide est nécessaire et suffisant pour activer un nucléateur de la polymérisation de l'actine, le complexe Arp2/3. Ce complexe va créer un réseau dendritique de filaments d'actine sur le micropatron en présence de monomères d'actine. L'ensemble des protéines utilisées dans ces essais est donc en solution. Seul le peptide pWA se trouve attaché à la surface avec une géométrie bien définie (Figure 4.1). Cette méthode permet donc d'initier de façon géométriquement contrôlée la polymérisation de l'actine. C'est une méthode originale qui a été développée et brevetée dans l'équipe [Reymann et al.(2010)].

Pour me familiariser avec les systèmes expérimentaux que je souhaitais modéliser, j'ai passé une période de ma thèse à utiliser cette méthode expérimentale dans le laboratoire. J'ai pu ainsi mieux comprendre les limitations de cette technique mais aussi par la suite rapidement assimiler les similitudes et les différences entre le système expérimental et les simulations que j'ai réalisées. Bien que ce temps passé dans le laboratoire m'ait semblé essentiel au bon déroulement de mon projet de thèse, les résultats que j'ai obtenus (Figure 4.2) justifient que la majorité des données expérimentales montrées dans ce manuscrit de thèse ont été faites par Hajer Ennomani avec qui j'ai collaboré tout au long de ma thèse.

4.2 Observations

L'utilisation de diverses géométries de micropatrons a permis de mettre en évidence plusieurs points particulièrement importants :

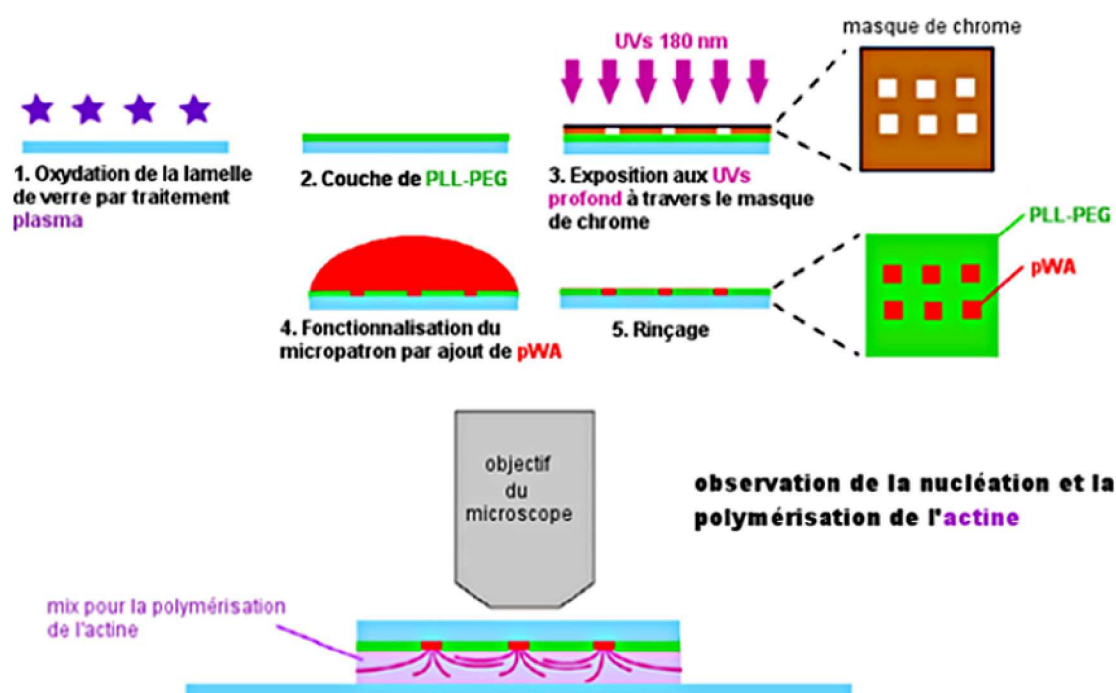


Fig. 4.1 : Principe de la méthode de "micropatterning" *in-vitro*

Différentes étapes nécessaires pour construire des micropatrons sur une lamelle de verre. Adapté de [Reymann et al.(2010)]

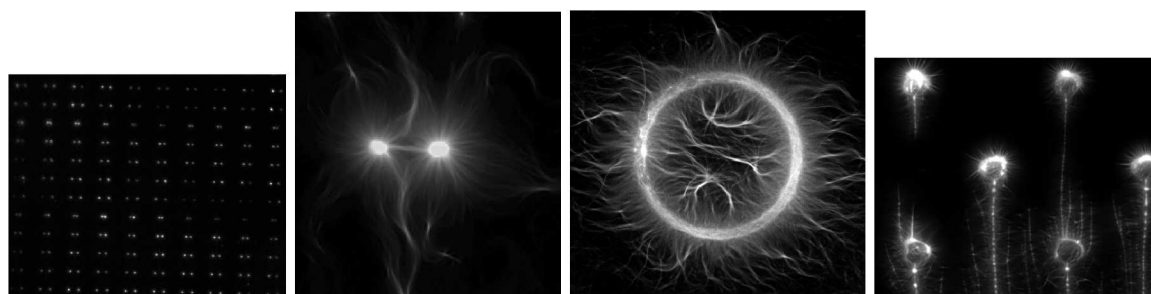


Fig. 4.2 : Exemples de micropatrons que j'ai pu obtenir *in-vitro*

- L'organisation finale des filaments d'actine dans des conditions de biochimie identiques est spécifique à la géométrie des micropatrons et reproductible pour une même géométrie. Les filaments d'actine sur la zone de nucléation sont organisés en réseau branché et suite à leur croissance émergent de la zone nucléatrice avec une orientation parallèle entre eux (Figure 4.3 (A)). Ceci suggère que des lois déterministes régissent le comportement collectif des filaments.
- L'utilisation de cette méthode permet de séparer dans le temps et l'espace différentes architectures du cytosquelette d'actine. Elle permet aussi d'étudier le comportement de filaments générés à partir de 2 zones de nucléation en fonction de la distance et de la géométrie de ces 2 zones. Dans le cas d'une géométrie en V, il est ainsi possible de générer un faisceau d'actine sur la bissectrice de l'angle et de proposer un parallèle entre ce comportement et l'émergence d'une structure d'actine impliquée dans la formation de filopodes à partir d'un réseau dendritique dans la cellule. (Figure 4.3 (C)).

- L'apparition de ce faisceau se fait au niveau d'une zone de transition où les filaments se répartissent entre une structure de filaments antiparallèles et le faisceau parallèle.
- En utilisant des cercles concentriques ou décentrés, nous pouvons remarquer que les filaments provenant d'un des cercles semblent être stoppés par les barrières géométriques que représentent les réseaux adjacents. Pourtant lorsqu'ils sont plus courts cette barrière ne semble pas bloquer leur élongation. La longueur des filaments est donc un paramètre important pour expliquer l'interpénétration de réseaux (Figure 4.3 (B)).
- La création de faisceaux de filaments se fait spontanément, sans ajout de protéines de pontage. Les interactions électrostatiques et la présence d'agents entassant (crowding agents) doivent donc être essentielles dans l'organisation collective des filaments d'actine observée dans ces conditions expérimentales.
- L'ajout de protéines de pontage (fascin par exemple) peut modifier les structures obtenues en fonction des concentrations utilisées. Les propriétés mécaniques collectives des filaments d'actine sont donc aussi très importantes à la formation de structures spécifiques.

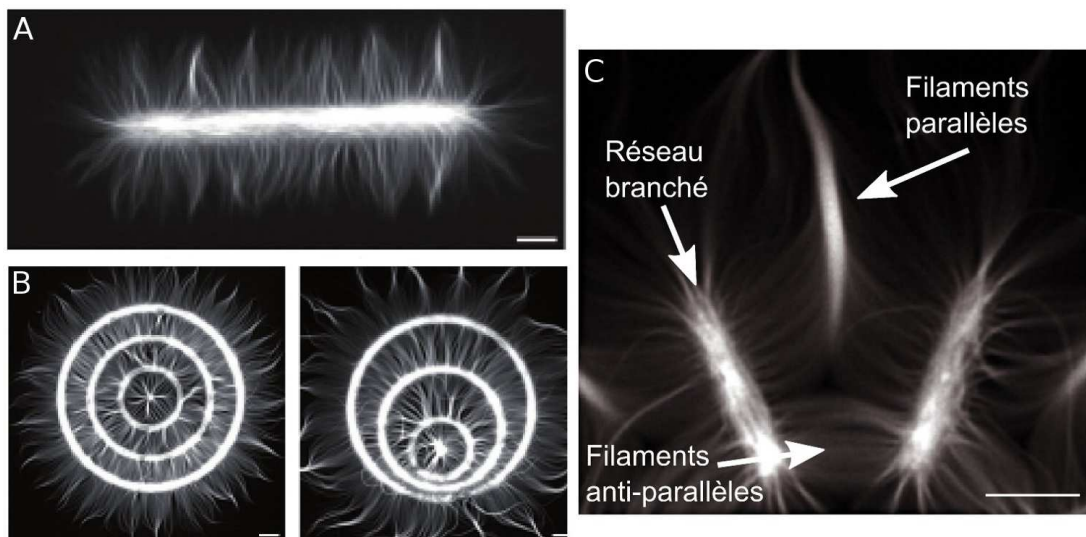


Fig. 4.3 : Organisation des filaments d'actine à partir de patterns

(A) Organisation des filaments à partir d'un micropatron rectangulaire horizontal. (B) Micropatrons en forme de cercles concentriques ou décentrés. (C) Micropatrons formant un angle en V. Tiré de [Reymann et al.(2010)].

4.3 Questions soulevées

A partir de l'ensemble de ces observations, plusieurs questions sur les paramètres contrôlant l'assemblage géométriquement contrôlé de structures d'actine peuvent être soulevées :

- Quels sont les paramètres essentiels pour expliquer la croissance collective des filaments ?
- Comment la géométrie de la zone de nucléation influe sur la formation de structures spécifiques ?
- Quelle est l'influence de 2 micropatrons adjacents sur l'organisation finale des filaments d'actine ?
- Comment la composition biochimique du milieu affecte la formation de ces structures (ajout des protéines de pontage en particulier) ?

L'intérêt de développer des simulations permettant de contrôler *in-silico* l'assemblage de l'actine à partir de géométries définies va nous permettre de tester un grand nombre de paramètres permettant d'apporter des réponses à l'ensemble de ces questions. Cela va aussi nous permettre de proposer de nouvelles séries d'expériences permettant de valider ou d'infirmer les conclusions obtenues à partir de ces simulations. C'est cet aller-retour entre simulations et expériences qui a nourri le travail que j'ai réalisé pendant ma thèse et qui va faire l'objet du paragraphe suivant.

5. FORMATION DE STRUCTURES D'ACTINE : EXPLICATIONS IN-SILICO

Pour comprendre la formation de différentes structures observées *in-vitro* et les contraintes physiques la contrôlant, nous avons développé une configuration de *Cytosim* afin de pouvoir reproduire la croissance collective de filaments à partir de micropatrons fonctionnalisés.

5.1 Simulation de micropatrons

La géométrie de la zone de nucléation est un facteur important à étudier, mais les propriétés mécaniques des filaments semblent aussi importantes à prendre en compte. Nous avons donc décidé de faire varier non seulement la géométrie des micropatrons mais aussi la rigidité des filaments.

Pour l'élaboration de simulations avec *Cytosim*, il faut définir les séquences de réactions qui vont permettre de déclencher l'assemblage et la croissance des filaments d'actine à partir de géométries données. Nous avons utilisé un grand nombre de géométries correspondantes aux géométries utilisées le plus souvent expérimentalement mais nous avons également proposé de nouvelles géométries qui ont été ensuite réalisées expérimentalement (cf 5.2). La biochimie du système a été maintenue le plus souvent constante. Il nous a toutefois semblé intéressant d'étudier comment ou en quoi les propriétés mécaniques du polymère influencent le comportement collectif et donc l'architecture finale des réseaux d'actine.

5.1.1 Implémentation d'un filament d'actine

Un filament est implémenté comme un objet de la classe `Fiber` (cf 3.2.1) dont les paramètres sont choisis pour reproduire le comportement de filaments *in-vitro*. Les principaux paramètres nécessaires pour simuler un filament d'actine sont présentés dans la table 5.1. Pour simuler la nucléation de filaments à partir de zones fonctionnalisées, il faut ensuite définir comment et où ces filaments sont créés dans la simulation.

5.1.2 Implémentation des micropatrons avec *Cytosim*

Pour reproduire la croissance des filaments à partir de micropatrons fonctionnalisés d'actine, il a fallu configurer *Cytosim* et ainsi introduire la notion de comportement collectif des filaments d'actine.

Afin de reproduire l'organisation branchée *in-vitro* des filaments sur les micropatrons, les filaments sont nucléés à partir d'entités mimant les propriétés de nucléation du complexe Arp2/3 (cf 1.2.1).

Pour cela, on utilise un `Torque` (cf 3.2.4), dont une `Hand` s'attache au filament déjà existant et ne s'en détache pas. Lorsque cette `Hand` est attachée, l'autre `Hand` (de la classe `Nucleator`, cf 3.2.2) nucléé un nouveau filament (Figure 5.1). L'angle entre les 2 filaments

Fiber actin		
Rigidité	0.06 $pN \cdot \mu m^2$	<i>Correspond à une longueur de persistance de 15 μm (cf 1.3.2)</i>
Segmentation	0.2 μm	<i>Longueur des segments décomposant le filament, choisie comme compromis entre temps de simulation et exactitude</i>
Vitesse d'élongation	0.033 $\mu m \cdot s^{-1}$	<i>Vitesse d'élongation du filament v_0 à l'extrémité barbée sans force appliquée (correspond à une concentration comprise entre 1 et 2 μM d'actine [Pollard(1986)]).</i>
Cinétique de l'extrémité pointue	stable	<i>Négligeable dans nos conditions in-vitro comparé à la dynamique de l'extrémité barbée.</i>

Tab. 5.1 : Principaux paramètres pour la simulation d'un filament d'actine

est imposé constant par le Torque. La table 5.2 résume les paramètres principaux utilisés pour simuler ce complexe. Il est important de noter que les paramètres dynamiques tels que les taux d'association, de dissociation ou de nucléation ont été fixés empiriquement étant donné que les détails de la phase d'initiation ne sont pas essentiels pour notre étude.

Hand arp_bind		
Taux d'association	7 s^{-1}	<i>Association rapide</i>
Distance d'association	0.02 μm	<i>Distance au filament à partir de laquelle la Hand peut essayer de s'attacher</i>
Taux de dissociation	0 s^{-1}	<i>Complexe permanent</i>
Hand arp_nuc		
Taux de dissociation	0 s^{-1}	<i>Complexe permanent</i>
Taux de nucléation	0.7 s^{-1}	<i>Nucléation rapide</i>
Couple arp23		
Longueur	0 μm	<i>Les 2 Hands sont collées</i>
Raideur	200 $pN \cdot \mu m^{-1}$	<i>Fort lien entre les 2 Hands</i>
Angle	0.13 rad	<i>Angle entre les 2 filaments, 71°, d'après [Blanchoin et al.(2000)]</i>
Raideur angulaire	1.24 $pN \cdot \mu m \cdot rad^{-1}$	<i>Force de contrainte de l'angle d'après [Blanchoin et al.(2000)]</i>
Diffusion	0 $\mu m^2 \cdot s^{-1}$	<i>Complexe fixé sur le micropatron</i>

Tab. 5.2 : Principaux paramètres pour simuler le complexe Arp2/3

L'activation du complexe Arp2/3 par la zone micropatronée se fait en disposant des entités mimant ce complexe dans une zone géométrique définie. Au contact de filaments, les "primers" [Achard et al.(2010)], introduits de façon aléatoire sur la zone de nucléation, les entités mimant les complexes Arp2/3 vont générer de nouvelles branches. Enfin, afin de tenir

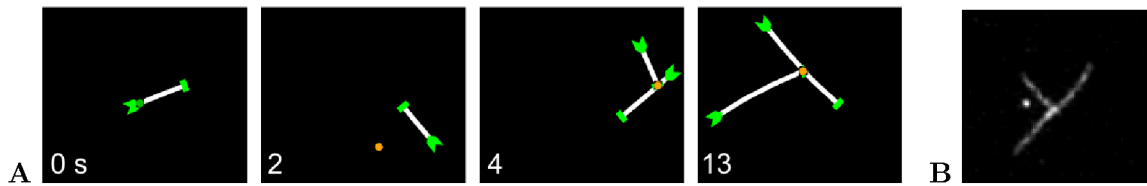


Fig. 5.1 : Simulation d'une entité mimant le complexe Arp2/3

(A) Exemple de simulation d'une entité mimant le complexe Arp2/3 (disque orange) : la première Hand (arp_bind) s'attache au filament lorsque celui-ci est suffisamment proche, puis active la deuxième Hand (arp_nuc) qui nucléée ensuite un nouveau filament. Les 2 filaments gardent un angle constant de 71° entre eux, imposé par le complexe. (B) Observation de 2 filaments reliés par le complexe Arp2/3 in-vitro. Tiré de [Blanchoin et al.(2000)].

compte de la friction importante au niveau du micropatron dans les expériences, des Picket (cf 3.2.3) sont rajoutés sur la zone micropatronée. Ces ressorts, appelés "binders" dans la suite, ont une raideur faible et un taux de dissociation important lorsque soumis à une force. Ainsi les filaments peuvent quitter la zone contenant les "binders" et la force d'interaction entre les filaments et les "binders" va permettre de moduler la friction du réseau d'actine avec le micropatron.

Une fois définies les unités de base utilisées pour simuler la formation des micopatrons, il reste à définir les paramètres généraux de la simulation.

5.1.3 Paramètres globaux

Certains paramètres de la simulation sont imposés par les conditions utilisées pour le "micropatterning" *in-vitro*. C'est le cas en particulier de la température qui est de 25°C environ (soit $k_B T = 0.0042 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}$). De même la viscosité du milieu, contrôlée par la concentration de méthylcellulose dans la solution, vaut entre 150 et 200 *cP* (soit $\eta = 0.18 \text{ pN}\cdot\text{s}\cdot\mu\text{m}^{-2}$).

D'autres proviennent de la modélisation du système et sont à définir par l'utilisateur :

- le pas de temps : l'équation de Langevin est discrétisée en temps (cf 3.1.1), donc plus le pas de temps est petit, plus la solution numérique sera proche de la solution exacte. Un pas de temps trop petit exigerait néanmoins un temps de simulation bien trop important. Nous avons donc fait plusieurs simulations avec des pas de temps différents et déterminé quel est le pas de temps maximum (0.01 s ici) permettant une approximation satisfaisante des simulations par rapport aux résultats expérimentaux. La façon dont les simulations sont comparées aux expériences est plus particulièrement décrite dans la Figure 1 de la publication associée à ce chapitre [Letort et al.(2015b), Figure 1, p. 4].
- la quantité de filaments simulés : les micopatrons *in-vitro* contiennent un nombre non simulable de filaments d'actine. En effet, le temps de simulation est rapidement limité par le nombre de filaments (typiquement entre 300 et 2000) qu'il est possible de simuler dans un temps qui nous a semblé raisonnable (4-5 h). Cependant pour vérifier que ce nombre limité n'avait pas une influence déterminante sur l'organisation collective des filaments d'actine nous avons aussi réalisé des simulations en présence d'un nombre beaucoup plus grand de filaments (10000).
- la durée simulée. Cette durée est contrainte par la croissance des filaments d'actine dans nos simulations. Typiquement, la nucléation des filaments d'actine démarre dès le temps 0 et les filaments atteignent une longueur moyenne de 8 à 16 micromètres au

bout de 250 à 500 secondes respectivement. Cette fenêtre de longueur des filaments représente les valeurs que nous avons utilisées lors de nos simulations.

Les différents éléments présentés ci-dessus permettent de simuler le comportement de nucléation des filaments sur les micropatrons. Les principaux paramètres utilisés dans mes simulations sont résumés dans la table S1 de l'article [Letort et al.(2015b), S1 Table, p. 6]. Il reste donc à agencer ces différentes entités afin de créer la simulation globale.

5.1.4 Implémentation générale de la simulation

En utilisant les différentes briques étudiées ci-dessus, la configuration de base permettant la création des objets nécessaires à la simulation de la nucléation de filaments à partir de micropatrons est donnée ci-dessous :

```

1 %% Creation d'un micropatron
2
3 set space cell
4 {
5     geometry = (square 15 15)    %% taille de la zone simulee
6 }
7 new 1 space cell
8
9 %% mise en place de "primers" aleatoirement repartis sur le
10 %% micropatron, un rectangle de taille 8 (4*2) * 1.5 (0.75*2)
11 new 10 single primer (rectangle 4 0.75 at 0 0)
12 %% mise en place des "binders" aleatoirement repartis sur le
13 %% micropatron pour creer la friction
14 new 400 single pattern_binder (rectangle 4 0.75 at 0 0)
15 %% mise en place des complexes Arp2/3, aleatoirement repartis
16 %% sur le micropatron
17 new 500 couple arp23 (rectangle 4 0.75 at 0 0)
18
19 %% Lance la simulation
20 run simul *
21 {
22     nb_steps=25000    %% Simule 250 s
23     nb_frames = 200    %% Enregistre 200 positions
24     temporelles des filaments et des proteines
25 }

```

Listing 5.1 : Simulation d'un micropatron rectangulaire

Ci-dessus nous avons illustré la partie de la configuration dans *Cytosim* permettant de créer un micropatron consistant en une barre horizontale de 8 μm par 1.5 μm avec 510 filaments. Avec cette configuration, la simulation permet la croissance d'un réseau branché dense sur la zone micropatronnée (Figure [Letort et al.(2015b), Figure supplémentaire 3, p. 3]). Nous avons donc ensuite pu simuler et étudier la croissance des filaments d'actine à partir de zones fonctionnalisées.

5.2 Auto-organisation des filaments d'actine à partir de micropatrons : résultats

Nous avons développé un formalisme dans *Cytosim* nous permettant de simuler la croissance des filaments d'actine à partir de zones fonctionnalisées, présenté dans la partie 5.1. Nous l'avons utilisé afin d'expliquer les observations expérimentales et répondre aux questions soulevées par celles-ci présentées dans la partie 4.3.

5.2.1 Lois physiques régissant la formation des architectures d'actine

Un des paramètres qui nous a semblé plus particulièrement important pour obtenir un comportement comparable à celui observé est l'interaction électrostatique entre filaments d'actine (partie 3.1.1). La modélisation de ces interactions nécessite de déterminer 2 paramètres cruciaux : le coefficient d'attraction k_{pull} et le coefficient de répulsion k_{push} entre 2 filaments avoisinants.

Pour déterminer les valeurs optimales de ces 2 coefficients, nous avons utilisé plusieurs valeurs de k_{push} et k_{pull} lors de simulations et comparé l'organisation obtenue *in-silico* avec celle obtenue expérimentalement [Letort et al.(2015b), Figure 1, p. 4]. Cette étude nous a permis de conclure les points suivants :

- L'organisation finale des filaments est très fortement dépendante de la valeur de ces 2 paramètres. Les interactions électrostatiques entre les filaments sont donc un paramètre déterminant pour la formation d'architectures spécifiques. La composition du milieu, notamment la concentration d'ion $MgCl_2$, va moduler ce phénomène.
- Dans le cas où la répulsion entre les filaments est faible, les simulations montrent que seuls des faisceaux denses entremêlés se forment sur le micropatron.
- Si la répulsion entre les filaments est trop forte, les filaments s'agencent de manière à s'éloigner le plus possible les uns des autres. Ils vont donc occuper tout l'espace disponible autour du micropatron et ne formeront pas de structure collective.
- Si l'attraction entre les filaments est faible, aucun comportement collectif n'est observé et un ensemble de filaments se comporte de façon similaire à un filament isolé, ne pouvant donc résister efficacement aux forces extérieures.
- Pour une fenêtre définie de valeurs des coefficients d'attraction et de répulsion, les filaments simulés adoptent un comportement similaire à celui des filaments *in-vitro*. Ces conditions nous permettent donc d'étudier la formation dynamique de structures de filaments d'actine à partir de zones définies de nucléation.

En imposant ces paramètres (k_{push} , k_{pull}) identiques dans toutes nos simulations, nous avons ensuite étudié la formation des architectures d'actine à partir de géométrie de nucléation.

La première question à laquelle nous nous sommes intéressés est de comprendre comment la variation d'angle entre 2 régions micropatronées opposées influence l'architecture du réseau d'actine. En effet, les expériences ont montré que la proportion de filaments parallèles et antiparallèles le long de la bissectrice de l'angle varie en fonction de ce dernier [Reymann et al.(2010)]. Il nous semblait intéressant d'étudier l'influence de la propriété mécanique du polymère selon sa longueur au cours de ce processus. Nous avons alors testé 3 différentes conditions : une longueur de persistance de $15 \mu m$ correspondant à celle du filament d'actine, une inférieure ou égale à $2 \mu m$ qui pourrait correspondre à un filament d'actine décoré par des protéines qui le rendent plus souple (en particulier ADF/cofilin

[McCullough et al.(2008)]) et une longueur de persistance de $1000 \mu m$ qui pourrait correspondre à des filaments organisés en faisceau (par exemple 8-10 filaments pontés par fascine [Mogilner et Rubinstein(2005)]).

Les filaments flexibles ($L_p = 2 \mu m$) se déforment au premier contact avec des filaments provenant du micropatron opposé sans créer d'organisation collective [Letort et al.(2015b), Figure 2, p.8].

Les filaments semi-flexibles ($L_p = 15 \mu m$) provenant de la partie inférieure du micropatron sont courts lorsqu'ils rencontrent les filaments du micropatron opposé, et il est donc énergiquement plus coûteux pour eux de se courber que de garder leur direction initiale [Letort et al.(2015b), Figure 2, p.8]. Ils vont donc former une structure antiparallèle, en s'alignant les uns contres les autres. À partir d'une certaine distance le long de la bissectrice, les filaments devenant plus longs au moment de la rencontre, leur longueur leur permet de se déformer sous l'action des filaments en croissance provenant du micropatron opposé. Il se forme ainsi un faisceau de filaments parallèles le long de la bissectrice. Changer l'angle entre les micropatrons modifie l'angle de rencontre des filaments et par conséquent la position de la transition entre filaments antiparallèles et parallèles. Plus l'angle est aigu, plus la structure antiparallèle est favorisée.

Les filaments rigides ($L_p = 1000 \mu m$) se comportent comme des structures non déformables dans les conditions étudiées. Ils vont donc essentiellement garder leur direction initiale de croissance. Nous obtenons donc dans nos simulations majoritairement des formations antiparallèles, et pas de formation de faisceau parallèle [Letort et al.(2015b), Figure 2, p.8].

Ces comportements s'expliquent donc par la valeur du ratio entre la longueur de persistance et la longueur des polymères. Ces considérations sont donc transférables au cas de filaments bien plus longs mais aussi plus rigides (ou inversement), selon la valeur de ce ratio [Letort et al.(2015b), Figure S4, p.4].

En utilisant des micropatrons composés de cercles concentriques ou de cercles décentrés, il avait été décrit expérimentalement que la distribution des filaments d'actine représentée par l'intensité de fluorescence sur les micropatrons varie selon ces 2 conditions de contraintes géométriques [Reymann et al.(2010)]. Ce phénomène peut s'expliquer par le fait que les filaments provenant d'un micropatron opposé sont bloqués et s'entremêlent dans le réseau branché présent sur le pattern, et donc augmentent sa densité locale en filaments d'actine [Letort et al.(2015b), Figure 3, p.10].

Cependant un deuxième phénomène pourrait intervenir. En effet il a été observé *in-vitro* que des filaments d'actine en solution venant contacter une zone nucléatrice vierge pouvaient initier la nucléation d'actine suivant un effet appelé "primer" [Achard et al.(2010)]. Dans le système expérimental décrit dans le schéma [Letort et al.(2015b), Figure 3 (A), p.10], la zone nucléatrice a déjà permis la nucléation d'un réseau d'actine. Cependant, si les filaments d'actine provenant de la zone nucléatrice adjacente pénètrent ou traversent ce réseau, ils pourraient, en contactant des complexes Arp2/3 activés dans cette zone, initier une polymérisation supplémentaire. Ainsi la densité de filaments d'actine sur 2 zones de nucléation adjacentes serait influencée par la croissance des filaments d'actine mais aussi par leur effet sur la nucléation de nouveaux filaments.

Nous avons donc testé ces 2 scénarios en jouant sur la possibilité des filaments d'actine de 2 zones nucléatrices adjacentes de pouvoir ou non pénétrer le réseau d'actine opposé et y initier la nucléation de nouveaux filaments. Comme la capacité des filaments d'actine à

pénétrer une zone dense de réseau d'actine est influencée par leur longueur, nous avons fait varier la distance entre les 2 zones nucléatrices. Nous avons pu montrer ainsi que l'influence du micropatron adjacent sur la densité des filaments d'actine créés sur un micropatron diminuait avec la distance entre les 2 zones nucléatrices [Letort et al.(2015b), Figure 3, p.10]. Ceci a permis de montrer en quoi le comportement collectif des filaments d'actine peut influencer leur propre nucléation et donc moduler la densité de la structure d'actine générée.

Cette étude a en particulier permis d'identifier les paramètres fondamentaux contrôlant la croissance collective des filaments d'actine en fonction de la géométrie des zones de nucléation [Letort et al.(2015b), Figure 4, p.13]. Nous avons aussi utilisé cet outil de simulation pour prédire l'organisation des filaments d'actine selon différentes conditions géométriques de nucléation. En réalisant les expériences correspondant à certaines des géométries testées *in-silico*, nous avons pu vérifier que nous disposons d'un outil de simulation performant et prédictif [Letort et al.(2015b), Figure 4, p. 13]. De plus, nous avons pu mettre en évidence certaines lois de comportement collectif des filaments d'actine, qui peuvent rendre compte de l'émergence de structures définies de filaments d'actine dans les cellules. En effet dans le modèle de convergence-élongation (présenté dans la revue [Letort et al.(2015a)]), la formation des filopodes se fait à partir d'une réorganisation du réseau branché. À la fois l'angle de rencontre mais aussi la longueur des filaments d'actine va influencer cette transition. Grâce à nos simulations, nous avons pu estimer en quoi ce modèle de convergence-élongation peut en effet décrire la transition lamellipode-filopode observée au front avant de la cellule [Letort et al.(2015a), Figure 3, p.15]. Nous pourrions envisager d'utiliser cet outil de simulation pour comprendre la dynamique collective de filaments d'actine dans d'autres processus cellulaires [Letort et al.(2015a), Figure 2 et 3, p.14-15], rajouter de nouveaux paramètres comme le flux et estimer en quoi ces paramètres affectent ce comportement collectif, comme nous l'avons fait pour illustrer la transition du lamellipode aux fibres de stress [Letort et al.(2015a), Figure 3, p.15].

RESEARCH ARTICLE

Geometrical and Mechanical Properties Control Actin Filament Organization

Gaëlle Letort^{1,2*}, Antonio Z. Politi^{3*}, Hajer Ennomani¹, Manuel Théry¹, Francois Nedelec^{3*}, Laurent Blanchoin^{1*}

1 Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, CNRS/CEA/UGA, Grenoble, France, **2** Laboratoire d'Imagerie et Systèmes d'Acquisition, CEA, LETI, MINATEC Campus, Grenoble, France, Univ. Grenoble-Alpes, Grenoble, France, **3** Cell Biology and Biophysics Unit, EMBL, Heidelberg, Germany

☉ These authors contributed equally to this work.

* nedelec@embl.de (FN); Laurent.blanchoin@cea.fr (LB)



 OPEN ACCESS

Citation: Letort G, Politi AZ, Ennomani H, Théry M, Nedelec F, Blanchoin L (2015) Geometrical and Mechanical Properties Control Actin Filament Organization. *PLoS Comput Biol* 11(5): e1004245. doi:10.1371/journal.pcbi.1004245

Editor: Yaakov Koby Levy, Weizmann Institute of Science, ISRAEL

Received: September 25, 2014

Accepted: March 17, 2015

Published: May 27, 2015

Copyright: © 2015 Letort et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by Agence Nationale de la Recherche Grants ANR-12-BSV5-0014-02; the European Commission Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under grant agreements no. 241548 and 258068; Labex Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology; and CTBU Grant from CEA to Gaëlle Letort. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

The different actin structures governing eukaryotic cell shape and movement are not only determined by the properties of the actin filaments and associated proteins, but also by geometrical constraints. We recently demonstrated that limiting nucleation to specific regions was sufficient to obtain actin networks with different organization. To further investigate how spatially constrained actin nucleation determines the emergent actin organization, we performed detailed simulations of the actin filament system using Cytosim. We first calibrated the steric interaction between filaments, by matching, in simulations and experiments, the bundled actin organization observed with a rectangular bar of nucleating factor. We then studied the overall organization of actin filaments generated by more complex pattern geometries used experimentally. We found that the fraction of parallel versus antiparallel bundles is determined by the mechanical properties of actin filament or bundles and the efficiency of nucleation. Thus nucleation geometry, actin filaments local interactions, bundle rigidity, and nucleation efficiency are the key parameters controlling the emergent actin architecture. We finally simulated more complex nucleation patterns and performed the corresponding experiments to confirm the predictive capabilities of the model.

Author Summary

Many cellular processes or morphological changes, for example division and migration, strongly depend on the cytoskeleton. For successful completion of these processes in higher cells, thousands of cytoskeletal filaments need to be organized into precise higher-order structures. Identifying the most important parameters governing the emergent organization of large systems of filaments is thus a crucial step in understanding cytoskeletal systems. However, due to the complexity of these systems and the limits of imaging, this has proven to be a difficult task. To overcome this limitation we previously established an *in vitro* assay for actin filament assembly that allows controlling both the chemical components and geometrical boundaries. Here we used detailed computer simulations to

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

rationalize the experimental observations and identify some of the physical principles governing actin organization. Such approach will ultimately allow one to predict actin network formation under various constraints.

Introduction

Actin assembles to form higher order structures [1] that are essential to cell morphogenesis, adhesion and motility [2]. A single filament can either resist or generate forces according to its local environment [3,4], but most physiological processes require the assembly of a higher ordered network [5,6]. Therefore, one needs to study the collective behavior of system composed of many thousands of actin filaments to understand their physiological functions. Indeed, whereas one actin filament could not sustain forces higher than a few pN [4], a bundle of actin filaments can resist hundreds of pN [7] and larger structures are able to bear even higher forces (nN range) [8]. In addition to the number of filaments, the architecture of the network is also adapted to achieve different cellular functions. At the edge of the cell, in the lamellipodium, actin filaments form a dense branched network [9–11], that seems optimal to push the membrane forward during actin-based motility [12,13]. Actin filaments are oriented with their elongating ends near the membrane, at an optimum angle of $\pm 35^\circ$ with respect to the membrane [14, 15, 16], and being present in high density close to the membrane [17], they can efficiently sustain the protrusive force [13]. Actin filaments can also form bundles of parallel filaments, creating finger-like protrusions in the membrane called filopodia [18] that explore the extracellular matrix [19]. Actin bundles can be also used as tracks for protein or cargo transport [20,21]. These bundles can be formed by branched organization that merged into elongated parallel actin filaments [22,23]. Finally, actin filaments can form aligned structures of anti-parallel filaments in stress fibers or transverse arcs, that are site of active contraction driven by myosin motors [24,25] and are responsible for the cellular mechanical response [26]. Overall, the architecture of an actin network is expected to be directly related to its physiological function. The binding partners guide the organization of actin filaments, and conversely the binding of actin-associated proteins is sensitive to the architecture of the actin network [27,28]. Deciphering the principles governing the assembly of the different actin structural architectures is an important step towards a better understanding of the variety of cellular processes. Many excellent studies have focused on identifying the biochemical composition of the different actin organizations [6], but the physical and geometrical laws governing their architecture are still largely unknown.

In a previous work, we developed an *in vitro* method to control actin filaments assembly with a designed pattern composed of areas with different surface properties [1]. In these experiments, the geometry of the nucleation zone dictated the collective behavior of the actin filaments with some patterns resembling *in vivo* like structures [1]. The system was built from a minimal set of purified proteins, and avoiding the biochemical complexity of an *in vivo* system, it provided a well-controlled and reproducible assay to study the assembly of actin filaments in a variety of structures. Although, our study revealed how geometrical constraints affect actin assembly, the key components responsible for the formation of defined structural organizations remained poorly defined. The stochastic model developed in this study [1] helped to describe the observation but did not bring additional information on the properties of the system dictating the collective behavior. To better identify these parameters and ultimately understand the higher order architecture, we need to be able to predict the emergent actin organization, based on the microscopic properties such as the rates of actin assembly, the mechanical

properties of actin filaments, the geometry of the nucleation region, and the biochemical composition of the experimental system.

Different types of modeling are available for this purpose [29]. Collective cytoskeleton behavior has been studied at macroscopic scale with ordinary or partial differential equations [30–32]. Stochastic methods (Monte Carlo simulations) can take into account the variability arising from the intrinsic randomness of the microscopic processes [15,33–35]. The potential drawback of such detailed modeling is that they can be computationally expensive, but with modern methods [29], one can simulate systems containing thousands of filaments over hundreds of seconds. We used Cytosim [36], a versatile cytoskeleton simulation software, which can be used for a diverse range of cytoskeleton simulations. Actin filaments can be simulated with different growth and shrinkage rates and bending elasticities. Associated proteins can be added (e.g. molecular motors, crosslinkers, severing proteins, capping proteins, nucleators), and environmental constraints can be imposed (confinement, asters, solid objects, laser cutting, flow. . .). Cytosim polymer has been used to study microtubule systems: self-organization [37,38], effect of confinement [39], spindles [40], asters positioning [41], nuclear positioning [42] but also to predict experimental design [43]. Nonetheless, Cytosim had never been used to study actin assembly under geometrical constraints.

Numerical experiments based on similar modeling have already been used to study the parameters controlling the global organization of cytoskeleton components. Recently, it was shown how different modes and efficiency of actin filament crosslinking would affect the self-organization of actin structures such as the contractile ring and actin cables [44, 45]. Similarly, simulations of taxane-stabilized microtubules [46] showed that geometrical constraints (cell confinement) combined with the bending properties of the filament was sufficient to create the bundling effect observed *in vitro*.

In this work, we first designed a simulation of actin organization from a nucleation region with a defined geometry, and reproduced the *in vitro* collective actin assembly behavior, with a minimum set of parameters. We then used this system to investigate how these parameters control the network organization in a range of experimental conditions. This study showed that we have identified the key parameters that define geometrically-controlled actin assembly and are able to reproduce a variety of actin organization *in silico*. Thus we believe that we have in hand a powerful predicting tool, and that numerical simulations in combination with *in vitro* experiments will help understand more complex actin processes.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388829>

Results

To study geometrically-controlled actin assembly, we previously developed an assay where actin nucleation is triggered from a micropatterned surface coated with an Nucleation Promoting Factor (NPF) (Fig 1A and [1]). The assay includes crowding agents constraining the filaments parallel to the glass. In this assay, actin nucleation occurs near the glass surface, and the growing actin structures never exceed 7 μ m in height, as revealed by confocal imaging (S1 Fig). The highest rise occurs immediately above the nucleating regions, while most of the network that extends away from them seems to be within 200 nm of the glass surface. This is confirmed by the fact that confocal and TIRF images of the system are comparable. The 2D model (S2 Fig) developed in Cytosim seems therefore appropriate to simulate the layer of actin assembly that is directly in contact with the glass, which is the part of the network that is most interesting in our experimental condition.

To simulate a geometrically constrained actin nucleation as used in experiments [1] we randomly disposed non-diffusible Arp2/3-like entities within the desired area (see S2, S3 Figs and

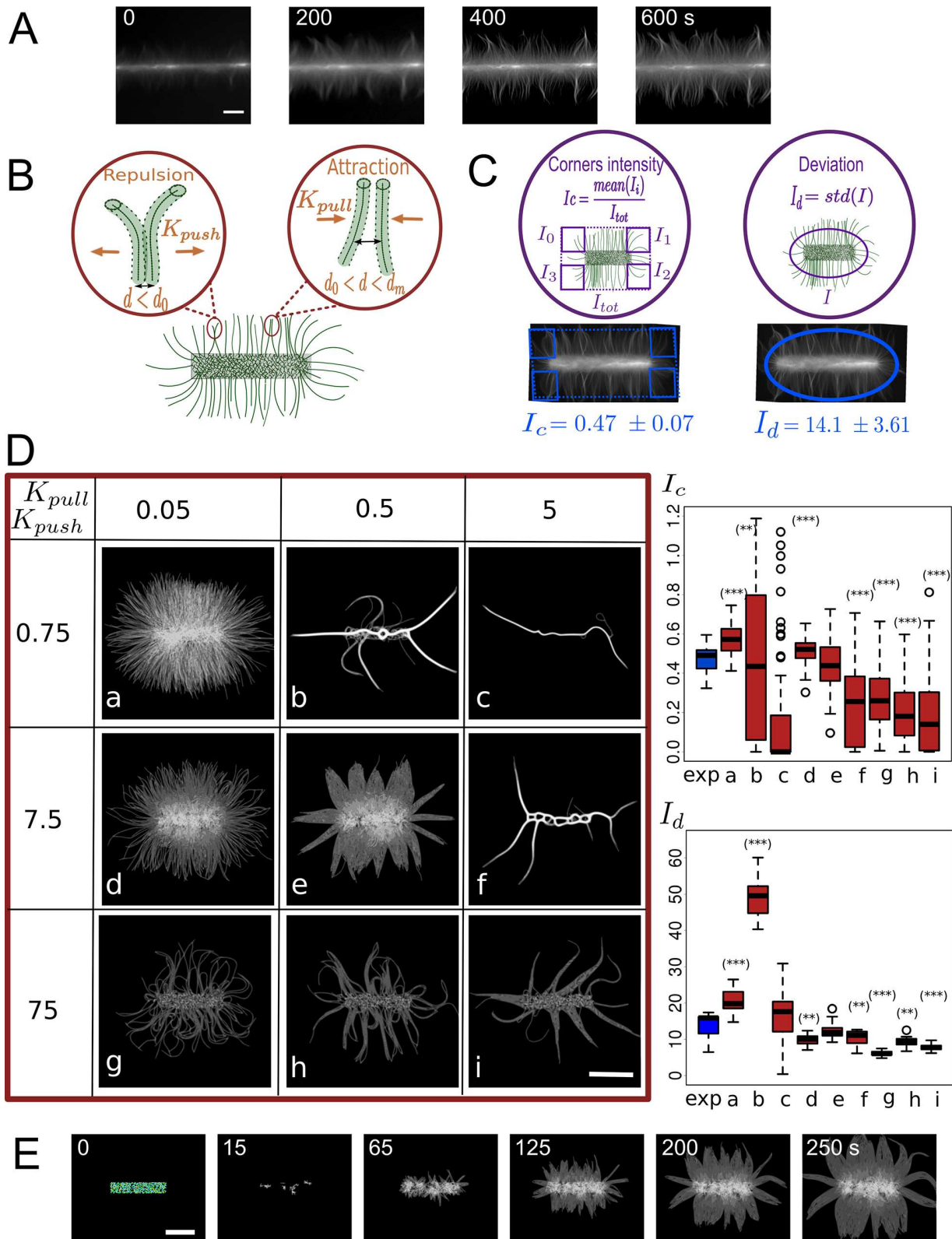


Fig 1. Parameter calibration for actin growth on patterns. (A) *In vitro* actin filaments growing from an horizontal bar coated with the nucleation promoting factor pWA. Scale bar is 10 μm . (B) Schematic of steric interactions: the filaments repulse each other at short distance ($d < d_0$), and attract each other at medium range ($d_0 < d < d_m$), and do not interact at longer range ($d > d_m$). Attractive and repulsive interactions are characterized by different stiffness (K_{pull} , K_{push}) that are applied to points distributed every 0.2 μm along the filaments. (C) To compare simulated and experimental data we used (left panel) the ratio I_c of average intensities in areas adjacent to pattern corner (I_i) by the total image intensity (I_{tot}). Both values are normalized by area size. To compare the bundling behavior, we measured I_d the standard deviation of the intensity along an ellipse around the pattern (thus giving us the fluctuations of the distribution of filaments, right panel). Average corners intensity I_c and intensity deviation I_d from 10 experimental images (below images). (D) Variation of steric parameters and comparison of simulated and experimentally estimated I_c and I_d . Left: Three values were tested for K_{pull} (0.05, 0.5 and 5 pN/ μm) and three values for K_{push} (0.75, 7.5 and 75 pN/ μm), resulting in 9 combinations. The nucleating bar is 8 μm long and each image shows grey levels of actin density from one simulation at 250 s (scale bar is 5 μm). Right: Intensity ratio I_c and intensity deviation I_d for each set of parameters (a-i, red, from 20 simulations each) and experimentally estimated ratio (exp, blue). Based on their intensity ratios, the simulations shown on d and e agree well with experiment, while the ones shown on b, c, f, g, h, i are significantly different from experimental results (p-value < 0.001 (***) , 0.005 (**), 0.01 (*), Kolmogorov-Smirnov test). With the same test, conditions a, b, d, f, g, h, i are significantly different from experimental results based on intensity deviation analysis. (E) Simulated growth of filaments using set e ($K_{pull} = 0.5$ pN/ μm , $K_{push} = 7.5$ pN/ μm). Actin filament nucleation is triggered by contact between primers with Arp2/3-like objects placed in the central rectangle (see S1 Fig). Scale bar is 5 μm . The pattern is 8 μm wide and time in seconds is indicated.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004245.g001

Material and Methods. These Arp2/3 complexes are able to nucleate a new (daughter) filament, but only if they are already bound to an existing (mother) filament. Because they do not move by diffusion, and thus remain in the nucleating region, the Arp2/3 complexes can generate branches within the nucleation area, but not outside. This mimics the activation of the Arp2/3 complex by the pWA-peptide coated on the pattern (S2 Fig). The Arp2/3 complex acts as a mechanical link between mother and daughter filaments, constraining them relative to each other in position and in orientation, such that the pointed end of the daughter filament remains on the side of the mother filament, and the daughter barbed end grows out making a $\sim 70^\circ$ angle with the mother filament [47, 48]. In the same area, we also added fixed nucleators, which initiate the process by generating the primer filaments, and fixed binders, which may bind to any actin filament within their range, and are anchored at a fixed position with a Hookean spring. These “fixed binders” have a non-zero unbinding rate and thus they effectively create some friction acting on any filament entering the micro patterned region. This friction accounts for the constrained nucleation processes and is necessary to maintain a dense patterned area (S2 Fig).

The simulated filaments are not meant to only represent individual actin filaments, but may also represent bundles of several crosslinked filaments. We will thus refer to them as fibers. Similarly, the ‘steric’ interaction between fibers is meant to be effective, representing the different forces that may act between neighboring F-actins. These parameters can be varied experimentally by modifying the type and concentration of actin binding proteins, the buffer solution or fiber confinement, conditions that have been shown to induce different actin organizations [1]. Our first task was to calibrate the effective parameters of the simulation, by comparing simulations and experiments obtained with a simple pattern.

Role of actin filament steric interactions in determining the actin organization

Input of Cytosim is a configuration file specifying the values of all parameters of the model: some represent physical quantities (e.g. temperature, viscosity), some are associated with the algorithm of the simulation (e.g. time step, segmentation) and were set to get an appropriate precision. Yet, most parameters are characteristics of the real components of the system (e.g. F-actin growing speed and bending rigidity). We adopted measured values when possible, using for example the measured persistence length of 15 μm of actin filaments [6] and a rate of elongation of 0.033 $\mu\text{m}/\text{s}$ (actin concentration of 1–2 μM [49]). Finally, a few parameters are associated with effective interactions for which a molecular implementation is not necessarily feasible. This is the case in particular for filament-filament interactions, which are essential to

capture the collective behavior of growing filaments [50,51]. Actin filaments are physically not able to interpenetrate each other and within distances equal to their diameter must experience strong repulsive force. Moreover, although similarly charged, actin filaments attract each other at short range, due to the presence of counterions in the solution [50,51]. Moreover, the presence of chemically neutral polymers in the solution creates a depletion effect that also induces neighboring filaments to pack together [51, 52]. This explains how we could observe bundles *in vitro* without adding any actin filament crosslinkers to the solution. It also means that changing the experimental conditions (pH of buffer, ionic strength, concentration of polymers, etc.) may affect how actin filaments interact. Rather than trying to simulate these processes in details, we have used an ad-hoc steric interaction between simulated filaments, and calibrated the parameters of this interaction to best reproduce the behavior of the *in vitro* system. In Cyto-sim, a ‘steric’ filament-filament interaction can include both attractive and repulsive forces (Figs 1B and S2):

$$F_s = k (d - d_0), \text{ with } k = \begin{cases} K_{push} & \text{if } d < d_0 \\ K_{pull} & \text{if } d_0 \leq d \leq d_m \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

where d is the distance between the two interacting elements, d_0 is the distance at which the fibers are at equilibrium (this is an effective fiber diameter, which is larger than the real diameter), d_m is the maximal interaction distance between fibers (the choice of these values is discussed in Material and Methods). To fix the two stiffness values, K_{push} and K_{pull} (Fig 1B), we tested a range of values and compared systematically the simulation outputs with experimental results at first using a simple pattern configuration: a horizontal bar (Fig 1A, 1C and 1D). On this pattern actin filaments assembled into a dense network on the patterned bar, with their barbed ends growing away from the pattern, filaments align parallel to each other and generate bundles growing out perpendicularly to the bar (Fig 1A and [1]). In the simulations we found that a balance between repulsing and attracting steric interactions strongly affects the organization of actin (Fig 1D). When the attractiveness was similar or higher than repulsion (Fig 1D panel b, c, f) actin fibers collapsed together. On the contrary, when the repulsion dominates ($K_{push} = 75 \text{ pN}/\mu\text{m}$, Fig 1D, panel g, h, i), actin fibers are disorganized and do not generate bundle-like structure. For a quantitative comparison of simulations and experiments we computed the average local intensity in the corners of the patterned bar normalized by the total average intensity (I_c , Fig 1C). This quantity gives a measure of the spatial distribution of the filaments: when organized in bundle-like structures, fibers are less dense in the corners of the pattern thus I_c is lower than 1. A bar plot of I_c in experiment ($N = 10$) and for the 9 simulation scenarios ($N = 20$) is shown in Fig 1D. We found that the corner intensities corresponding to panels a, b, c, f, g, h, i (Fig 1D) were significantly different from experimental ones (p -value < 0.005 , Kolomogorov-Smirnov test), whereas the ones corresponding to panels d and e were not (p -value > 0.1). To further compare simulations and experiments, we also measured the variation of intensity along the perimeter of an ellipse around the pattern (I_d). This gives a measure of the bundling of the filaments: a high value indicates the presence of intense bundles, whereas a low value accounts for spread filaments all over the pattern. With this measurement, we found that the deviation of intensity corresponding to panels a, b, d, f, g, h, i were significantly different from experimental ones. Thus, panel e ($K_{push} = 7.5 \text{ pN}/\mu\text{m}$, $K_{pull} = 0.5 \text{ pN}/\mu\text{m}$) quantitatively reproduced the *in vitro* actin filaments behavior most accurately. Indeed, the actin network growing from the micro-pattern in simulation (Fig 1E and S1 Movie) was fully consistent with our experimental observations [1]. All following simulations thus used these calibrated parameters.

Geometrical conditions and mechanical properties of filaments both impact on their structural organization

When more than one area of nucleation is present on the pattern, the distance between them, and their relative orientation have a major impact on the emergent organization [1]. Indeed, actin filaments coming from two different actin networks may change their initial direction when contacting each other. A typical example illustrating this behavior is the global organization of actin filaments initiated by V-shaped branches of an eight-fold radial array (Fig 2A). Growing actin filaments elongating outward from each ray formed parallel bundles on the bisecting line between adjacent rays (Fig 2A, left panel). These parallel bundles originate from a transition point that separates the assembly of antiparallel bundles in the proximal part of the rays and the assembly of parallel bundles in their distal part (Fig 2A and cartoon Fig 2B). Depending on the angle θ between two patterns creating a V-shape motif (Fig 2B), actin filaments contact each other differently [1]. We also noticed that addition of a crosslinker (fascin) from the beginning of the experiment changed the final organization of the filaments thereby increasing the proportion of anti-parallel structures. A likely explanation for this is that cross-linked actin filaments generated by fascin behave differently than isolated actin filament (Fig 2A, right panel). One property affected by crosslinking is the stiffness of the resulting bundle. We therefore simulated V-shape patterns with different angles and varied the persistence length L_p of the simulated filaments, a quantity proportional to the bending stiffness K ($K = k_B T L_p$) (the results of varying the bending rigidity are further discussed in Material and Methods).

For a native persistence length of $L_p = 15 \mu\text{m}$ (Fig 2C, middle panels and S2 Movie), fibers meeting with a shallow angle usually grow past each other and form anti-parallel structures ($\theta = 0^\circ$, meeting angles $> 160^\circ$). On the contrary, fibers growing from two bars disposed at right angle ($\theta = 90^\circ$) tend to bend as they meet, resulting in parallel structures (meeting angles $< 20^\circ$). For an intermediate angle ($\theta = 45^\circ$), the two types of arrangement coexist: as in experiment (Fig 2A) antiparallel structures are found in the bottom part between the two bars, and parallel structures in the top part. We found that the rigidity of the fibers (relative to the filament length) controls the proportion of parallel and anti-parallel structures. At high persistence length ($L_p = 1000 \mu\text{m}$, Fig 2C bottom panels and S4 Movie) corresponding to bundles of 8–10 F-actins [53], anti-parallel structures are more prominent, compared to the structures simulated with a native persistence length $L_p = 15 \mu\text{m}$. This behavior is reminiscent of the effect of fascin (Fig 2A, right panel). At small persistence length ($L_p = 2 \mu\text{m}$), corresponding to actin filaments decorated by ADF/cofilin [54], the distance between the bars is much greater than the persistence length and thus the fiber brushes deform upon interaction (Fig 2C top panels and S3 Movie).

We next analyzed the local orientation of actin fibers along the bisecting lines when we varied both the angles between the two bars and the polymer persistence length. We classified fibers whose orientation compared to the x -axis was around $90^\circ \pm 20^\circ$ as parallel filaments, and those whose orientation was of $0^\circ \pm 20^\circ$ as anti-parallel. The graphs (Fig 2C, right panel) show the proportion of different actin fibers orientations as function of the angle θ between the patterns (for an angle varied from 0° to 120°) for the 3 different persistence lengths. This analysis demonstrated the continuous dependence of the structures on the pattern angle.

These results can be rationalized as follows: since filaments initially grow primarily perpendicular to the bar, they need to bend by an angle $\theta/2$ to enter an antiparallel structure, and by $90^\circ - \theta/2$ to enter a parallel structure. For $\theta < 90^\circ$, the bending angle required to form an antiparallel structure is smaller than the one required for a parallel structure, which makes it unfavorable for stiff filaments to form a parallel structure, all the more if they are short. This is

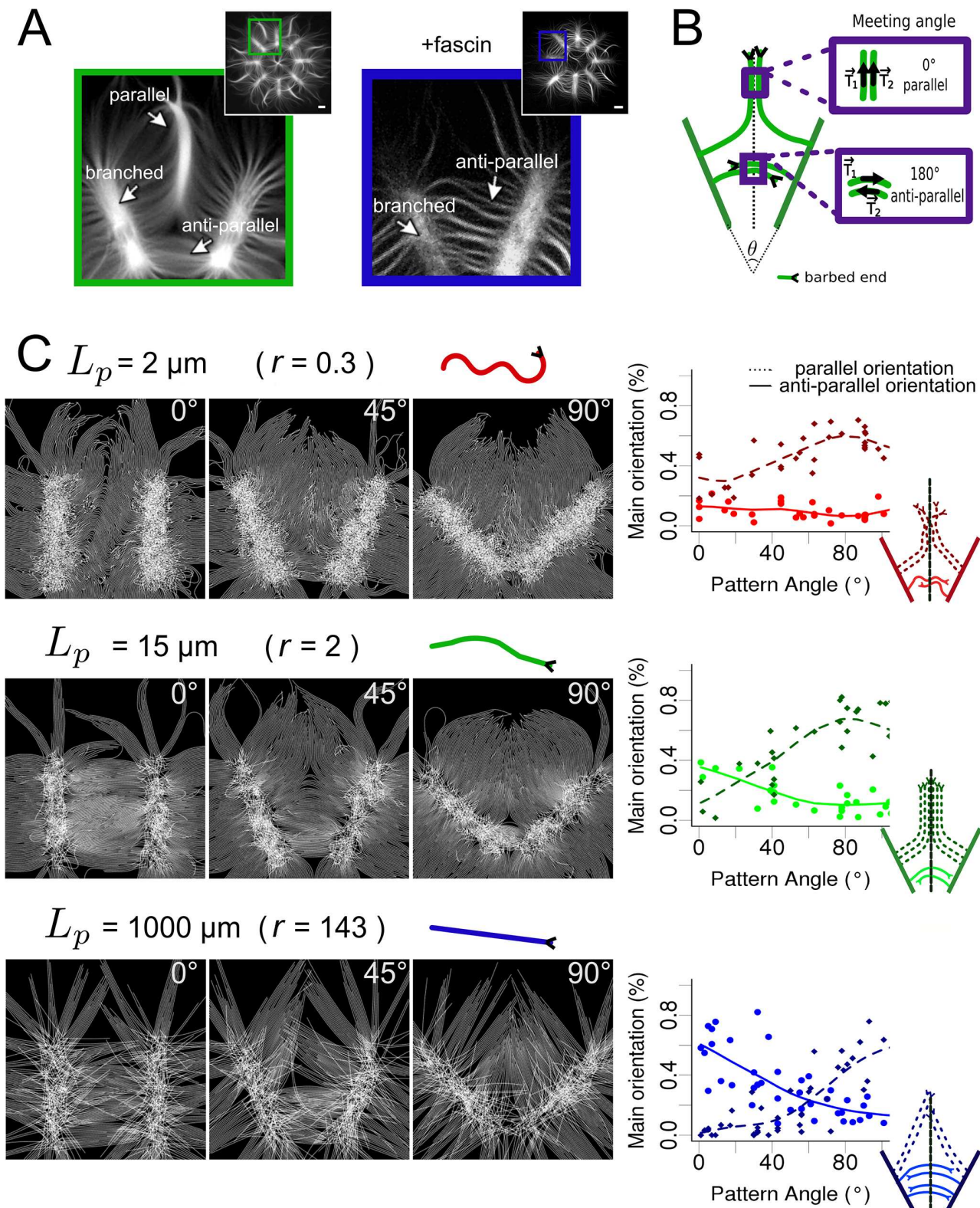


Fig 2. Effect of geometrical constraints and fiber mechanical properties on fiber organization. (A) *in vitro* actin filament organization from a star eight-fold radial array pattern coated with pWA activator, in absence (green) or presence (blue) of fascin, an actin filament cross-linker. A portion of the pattern

containing the V-shaped submotif is shown at higher magnification in both cases. (B) Schematic representation of the actin organization on two adjacent rays (V-shaped configuration): parallel (top) and anti-parallel filament structures (bottom). The presence of these two patterns is assessed from the meeting angle between filaments from opposing patterns on the middle line. (C) Left: Simulated filament growth on patterns with 3 different angles (0° , 45° , 90°) and 3 different filament persistence lengths ($L_p = 2 \mu\text{m}$, $r = L_p/L = 0.3$, red; $L_p = 15 \mu\text{m}$, $r = 2$, green; $L_p = 1000 \mu\text{m}$, $r = 143$, blue) (one simulation is shown in each case). Right: Proportions of the main orientation (percentage of filaments crossing the median line with a particular orientation) of filaments (dashed lines: parallel filaments, full lines anti-parallel filaments) on the median line, as a function of the angle between the two patterns.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004245.g002

because given a certain force F applied transversally at the growing tip of the filament, its bending angle will scale as $\theta \sim FL^2/K$, where K is the filament bending stiffness ($K = k_B T L_p$) and L the length of the actin filament. At the bottom of the pattern, actin filaments meet while they are short, the bending required to enter a parallel structure is consequently unfavorable, and anti-parallel structures are created instead. On the top of the pattern however, actin filaments are longer as they contact opposite filaments; and consequently are easier to bend leading to parallel bundles (Fig 2B and 2C).

To further confirm this analysis, we repeated these simulations with fibers of $15 \mu\text{m}$ persistence length and varied the length of the fibers (and thus the distance between the patterns and the simulated time as well). The analysis of the presence of structures (S4 Fig) revealed that indeed the ratio between the polymer persistence length and their length will determine their collective behavior. Indeed, short actin fibers with a persistence length of $15 \mu\text{m}$ will have the same behavior than shorter fibers with $2 \mu\text{m}$ persistence length or longer fibers with $1000 \mu\text{m}$ persistence length (S4 Fig). The definition of the persistence length makes this relation between filament length and rigidity obvious for isolated filaments, but was necessary to demonstrate in the context of collective filaments behavior.

Thus, both the geometrical conditions of nucleation and the mechanical properties of the simulated filaments are key parameters controlling the formation of anti-parallel or parallel structures.

Actin filaments reaching a branched network can cross it and/or generate new filaments by nucleation

We next simulated a pattern containing two parallel pWA (Arp2/3 activator) bars of width $3 \mu\text{m}$ to study the “primer effect”. This effect is based on the ability of a drifting actin filament to contact the nucleation area and trigger actin assembly (S2 and S3 Figs). The *in vitro* experiment was constructed such that a growing actin filament coming into contact with a virgin patterned region will nucleate new actin filament on its side [55]. However, when two or more patterned regions are in close proximity, a region of pWA may already be covered by an actin network (Fig 3A). We therefore have two possible scenarios for the fate of a filament reaching a pattern of pWA on which a branched network is already present (Fig 3A): (i) the filament gets entangled in this network and stop growing, (ii) the filament can nucleate new filaments as if the pattern was virgin (and get entangled or not). To find which scenario is correct, we compared simulations and *in vitro* experiments by systematically varying the distance between the two bars. As control condition, i.e. non-interaction between the two patterns, we selected cases where the distance d between adjacent bars is above ($d_\infty = 80 \mu\text{m}$). In this case filaments from one bar do not reach the other bar.

To assess the contribution of a neighboring pattern on the overall actin network we computed:

$$\rho_{ext}(d) = \frac{I(d, t_f)}{I(d, t_i)} - \frac{I(d_\infty, t_f)}{I(d_\infty, t_i)},$$

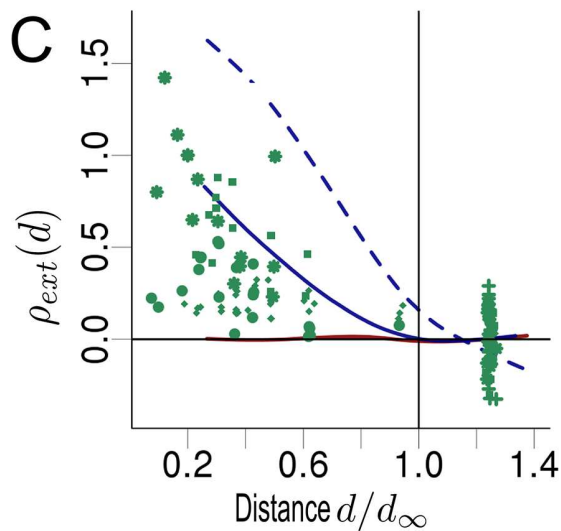
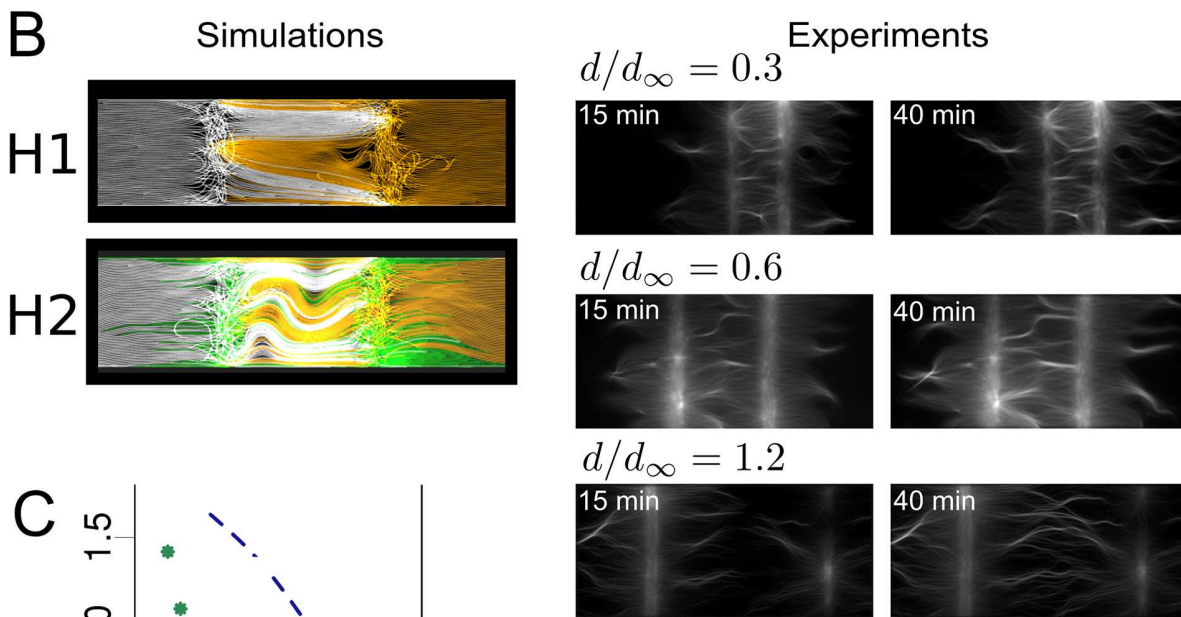
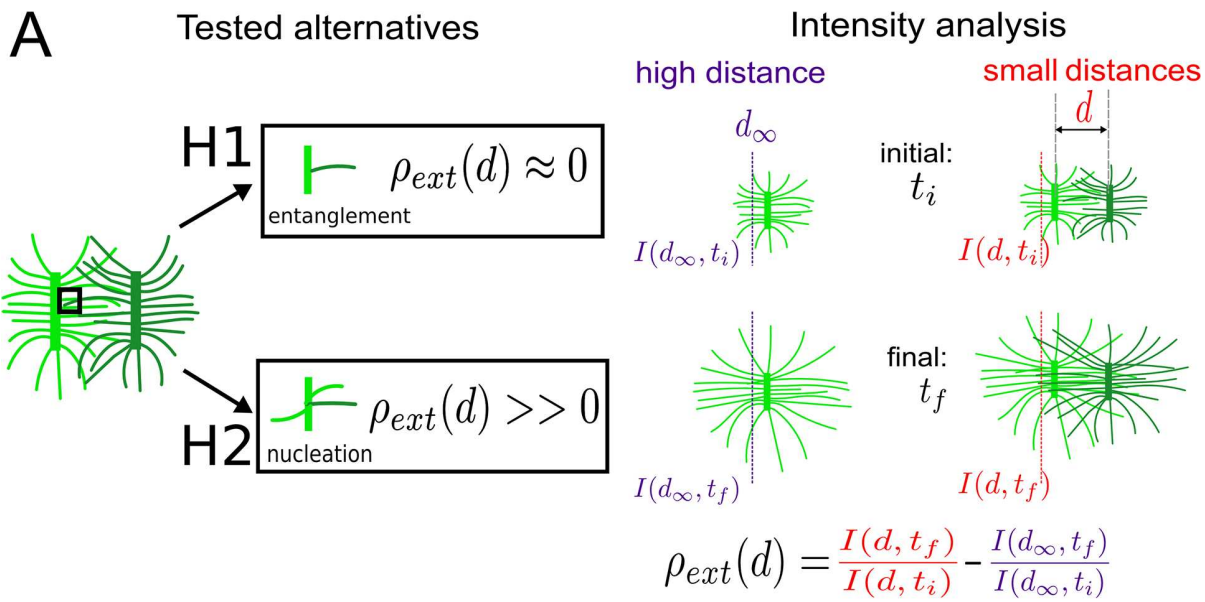


Fig 3. Actin fibers growing from adjacent patterns influence the overall actin organization. (A) Assumptions tested and analysis performed. Left: Two different hypotheses concerning the activity of a filament reaching a nucleated pattern were tested: H1 (“entanglement”) and H2 (“nucleation”). Under H1, filaments stop growing and do not induce new nucleation. Under H2, filaments induce the nucleation of new filaments on the pattern that they reach. To determine which hypothesis is valid, we measured the variation of intensity in an area close to the pattern (in the outer side), and compare this variation with a control case corresponding to an isolated pattern (in the experiments, patterns separated by a distance $d > = 80 \mu\text{m}$ are considered as isolated; in the simulation the threshold distance is $d_\infty = 10 \mu\text{m}$) (right). This variation (ρ_{ext}) indicates the amount of new filaments generated by the arrival of filaments coming from the other pattern (so it indicates the contribution of the second pattern). (B) Results of simulations and experiments. (Left) Simulations with a distance of $d = 7 \mu\text{m}$ between the two patterns for hypothesis H1 and H2. Filaments coming from opposite patterns are differently colored (white and yellow); filaments generated by the primer effect are depicted in green. (Right) Results of experiment for 3 different normalized distances between patterns d/d_∞ : 0.3 (top), 0.6 (middle) and 1.2 (bottom). The actin organization is shown for two different times. (C) Comparison between the simulation and experiment outputs. Quantification of the experimental results, where the distance between the two patterns was varied from 5 to 120 μm (green points). Different symbols correspond to four different experiments. Quantification derived from 100 simulations for each case, as a function of d/d_∞ where d was randomly chosen between 2 and 12 μm (lines). Under H1 (red line), ρ_{ext} does not depend on d and is near 0. On the contrary, under H2, (blue lines), ρ_{ext} is a decreasing function of d that is positive for $d < d_\infty$. Under H2, two different nucleation efficiencies were tested: a full efficiency (dashed blue line), and a 2.5% nucleation efficiency (percent of filaments reaching the opposing pattern able to trigger new nucleation; solid blue line). The vertical bar indicates the threshold where patterns were considered to be isolated.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004245.g003

which measures to what extent the outer (away from the neighboring bar) intensity is made different by the presence of the second bar (Fig 3A). For this we calculated the intensity of the network (\approx density of filaments) close to the pattern (7 μm away from the pattern center; a pattern is 3 μm wide), at two different times t_i and $t_f = t_i + 1h$ (Fig 3B). If the filaments cannot cross the pattern and get entangled, the variation of intensity at the outer sides of the pattern should be independent of the distance between the bars (Fig 3A) and thus similar to the control case ($\rho_{ext}(d) \approx 0$). On the other hand in case the filaments cross and/or nucleate on the other bar we expect the outer intensity to be higher than in the control case ($\rho_{ext}(d) > 0$) and $\rho_{ext}(d)$ would be a decreasing function of d . Because the computational costs were too high, we simulated shorter and closer pattern bars than experimental ones. To allow comparison of the results, we looked at normalized distances (d/d_∞).

We performed 100 simulations with the two different hypotheses, using a random distance d for each simulation (Fig 3B, and S5 Movie). We calculated $\rho_{ext}(d)$ for each simulation and analyzed its dependency on the normalized distance (Fig 3C) for the assumptions of entanglement (H₁ solid red line) and nucleation (H₂ dashed blue line). We then analyzed the results of four *in vitro* experiments (Fig 3B and 3C). The results are significantly positive for distances smaller than d_∞ (with 95% confidence with Wilcoxon rank test for comparison of experimental results with null distribution), and decreasing with d (p -value $< 10^{-12}$ with Spearman's rho test). We therefore found that the second hypothesis (H₂, nucleation) best matches the experimental behavior. However, a simulated nucleation efficiency of 100% was too high according to the experimental data (Fig 3C). Thus, we decreased the efficiency down to 2,5% (Fig 3C, solid blue line). This predicted low value for “primer activation” is consistent with experimental quantification of the nucleation in presence of the Arp2/3 complex [48]. We therefore can conclude that *in vitro*, actin filaments may cross over neighboring bars, nucleate new filaments, and thus influence the network on the distal side of another patterned region.

Discussion

To unveil how actin filaments can be organized into higher structures, a lot of efforts went into analyzing the role of actin-associated proteins [2,6,56]. While largely justified by the importance of protein effectors, this was also due to the lack of tools that allowed one to dissect how geometrical or physical parameters affect the overall actin architecture. However, recent technological developments such as microfluidics [57], micropatterning [1,58,59] or cytoskeleton growth into defined volumes [39] have highlighted some of the key features of biochemical-independent parameters in controlling the cytoskeleton architecture. Examples of applications

include showing how chromatin shapes the mitotic spindles organization [60] or how actin nucleators of the formin family respond to mechanical stress [61]. Using a micro-printing technique, it was also possible to demonstrate that geometry is a key parameter in controlling the macroscopic architecture of actin filaments during assembly [1]. This made it possible to document the emergent behavior by which actin assembly organizes at higher scale, depending on the initial localization of the actin nucleation-promoting factors.

Using Cytosim, we developed a model of a geometrically-constrained actin assembly, in which actin filaments/fibers are initiated from defined regions where branched nucleation occurs. This framework allowed us to study how the biophysical properties of actin filaments and their environment determine the organization of the final network. It is a tool with which one may study actin dynamics in more complicated systems. We were able to reproduce a diversity of actin organizations obtained from an initial geometry of nucleating promoting factor (Figs 1–3). We identified a combination of three essential components that determines the actin organization (Fig 4A and 4B and S6 Movie). The first one is the steric interaction between filaments, this is essential to obtain an aligned distribution of actin filaments growing away from the nucleating pattern (Figs 1 and 4B). In absence of steric interaction actin filaments have a tendency to buckle (Fig 4B1) preventing them from extending away from the nucleating region, and thus limits the contact between filaments nucleated from two different areas (Fig 4B1). These interactions are modulated *in vitro* by the chemical properties of the media. The second key component is the bending elasticity of actin bundles [62]. A persistence length of $L_p \approx 15 \mu\text{m}$, close to the experimentally reported persistence length for single actin filaments [62], resulted in patterns with parallel and antiparallel actin organizations similar to the patterns observed *in vitro* (Figs 2 and 4B3). The model predicted the effect of regulatory proteins, such as ADF/cofilin [54] or crosslinkers [53] that modify the persistence length, on the observed patterns. Actin filaments decorated by ADF/cofilin are softer (L_p of $2 \mu\text{m}$ [54]) and will buckle under small force and we predicted that this would preclude the efficient formation of parallel or antiparallel organizations. On the contrary, a high persistence length ($L_p = 1000 \mu\text{m}$) induced for example by bundling of actin filaments in the presence of crosslinkers, limited the deformation of the growing polymers. In this case we predicted that the original geometry imposed by the micropattern is maintained, indicating that this is the main parameter that defines the final macroscopic organization during actin assembly. The effect of adding fascin in our system could be simulated by adapting only the fiber persistence length, without having to change the fiber steric interactions. This suggests that the electrostatic properties of the interaction could be negligible compared to the change in elastic property of the fibers, which arise from the capacity of fascin to generate stiff bundles [63]. For the native $L_p \approx 15 \mu\text{m}$, the situation is more complex and the resulting actin macroscopic organization resulted from a combination of the boundary imposed by the geometry of the micropattern and the deformation induced on growing actin filament when contacting each other (Figs 2C, S4 and 4B3). Finally, a third component that is important in defining the overall actin macroscopic organization is the ability of growing actin fibers to contact the nucleating pattern and therefore trigger additional actin assembly following the ‘primer’ activation [55]. By doing so, the density of the actin organization will be modulated according to the efficiency of the ‘primer’ activation (Figs 3 and 4B4). The accessibility of the nucleating region is therefore a key parameter in controlling the overall actin organization. As demonstrated in Fig 4, the combination of these three components is sufficient to capture most of the actin organization observed *in vitro*, with the geometrically constrained actin nucleation assay.

To further test the power of our simulation tool, we predicted the overall collective behavior of actin initiated from more complex pattern geometry (Fig 4C). We simulated the actin filaments organization obtained from square and diamond dotted patterns (Fig 4C). We then

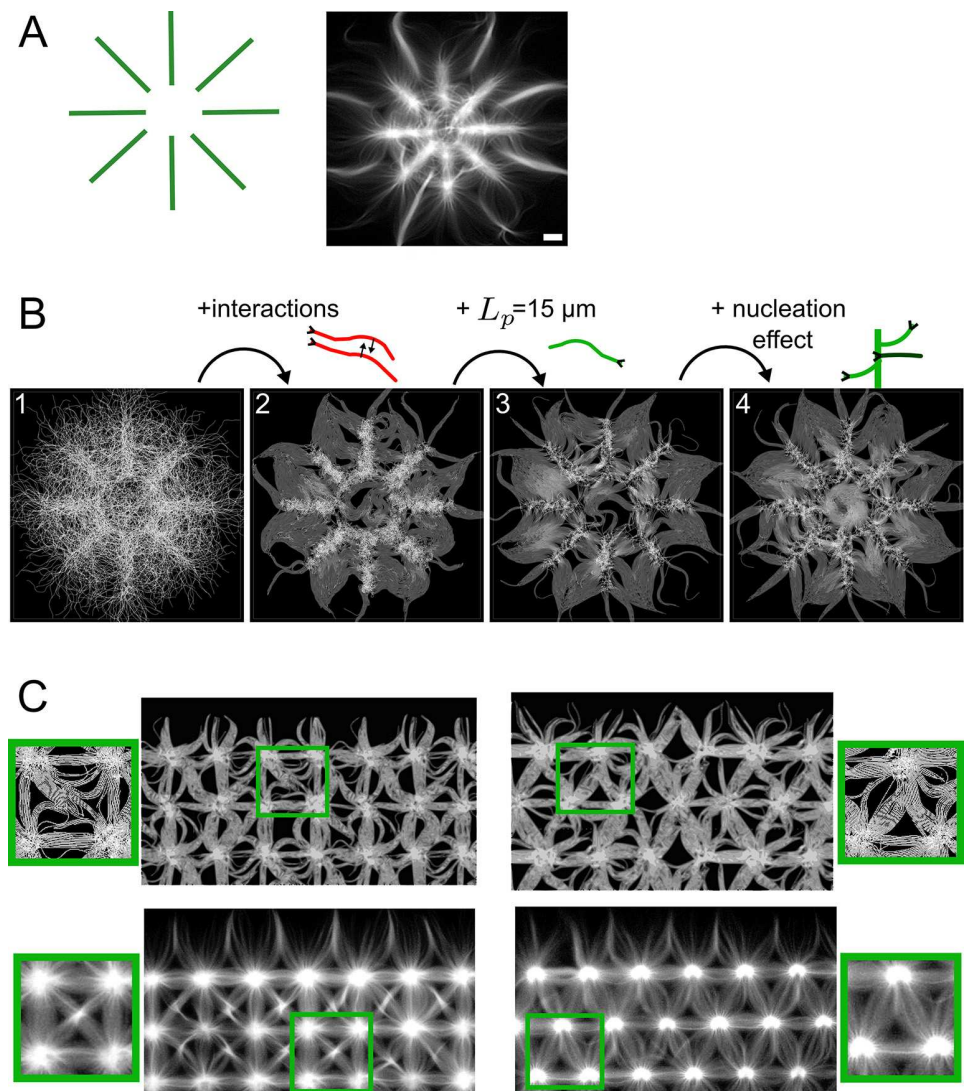


Fig 4. Contribution of studied parameters on actin organization. (A) Schematic of a micropattern, and the corresponding *in vitro* actin organization observed with TIRF microscopy. Scale bar is 10 μm . (B) The contribution of the key elements of the model on the final organization of fibers in the simulation. (B1) Fibers that are nucleated locally but do not interact with each other fail to extend away from the micropattern, (B2) Adding the steric interaction with the parameters as calibrated in Fig 1 allows filaments to co-align and extend away from the nucleation zone. (B3) Setting the persistence length to 15 μm (cf. Fig 2) makes them extend further. (B4) Adding the nucleation effect (cf. Fig 3, H2) finally leads to realistic overall densities (final time is 250 s). (C) Predictions of the actin filament organization for novel nucleation patterns. Simulations (Top) were done on a set of 8 points, distant by 6 μm , and positioned on a square (left) or triangular (right) lattice. The 8-point units were repeated 9 times using periodic boundaries. (Bottom) Experimental verification of actin organization for the geometries used.

doi:10.1371/journal.pcbi.1004245.g004

constructed the same geometries experimentally (Fig 4C). In both simulations and experiments the network were organized similarly (See Fig 4C zoomed panel). This shows that our simulation framework is predictive. In its present form our simulations with Cytosim have a number of limitations. Firstly, the high computational demands (S2 Fig), lead us to simulate the model in 2D using a reduced number of effective filaments. This likely explains why the model could not fully reproduce the formation of very thick parallel actin bundles at the bisecting line

between each ray of the 8 branched radial arrays (Fig 4). A 3D model, possibly reduced in size, but one in which single F-actin are simulated, could be used in the future to explore this further. However, even with these limitations, our current model is already useful to test a variety of geometrical configurations and predict the macroscopic organization of actin filaments. Cytosim was used here to mimic branched actin nucleation via Arp2/3, with minor modifications we could study other modalities such as formin dependent nucleation [64], the role of processive elongation induced by Vasp [65], or predict actin organization obtained by mixing several nucleation mechanisms. In the future we could investigate how myosin motors deform specific actin architectures [27] or study the movement of single myosin or myosin-driven cargo on established networks. Thus the present study sets the foundation of future research, where one will attempt to realistically reproduce *in silico* the emergent actin organization observed *in vitro*.

Materials and Methods

Simulation of filament growth from pattern

Actin filaments are simulated with Cytosim, following a Brownian dynamics approach [36]. Filaments may bend following linear elasticity, and are surrounded by an immobile viscous fluid; they grow and interact with each other (see Figs 1 and S2). Considering the low Reynolds number of a filament at this scale, inertia can be neglected and the mass of the objects is not a parameter that appears in the equations [37]. The parameters of the model were chosen to reflect the characteristics of *in vitro* actin filaments (see S1 Table). Notably, actin growth is force dependent, and the assembly speed is reduced exponentially by any antagonistic force [66] present at the barbed end:

$$v = v_0 \exp\left(\frac{\mathbf{f} \cdot \mathbf{t}}{f_s}\right), \text{ if } \mathbf{f} \cdot \mathbf{t} < 0 \text{ and } v = v_0 \text{ otherwise,}$$

with $f_s = 0.8$ pN ([67]). \mathbf{f} and \mathbf{t} are respectively the force vector and the normalized tangent vector at the barbed end. Moreover, considering the extensive supply of monomers in the system, depletions effects were neglected, and it was not necessary to simulate actin monomers to correctly model the increase of “polymer mass” in the system.

To simulate the formation of patterns, three entities were used: nucleator objects, Arp2/3-like complexes, and binder objects (see S2 and S3 Fig). First, we placed randomly few nucleators on the pattern area, which will nucleate new ‘primer’ filaments. These nucleators can trigger the nucleation of one filament each, and have a fixed position so that they remain on the pattern. To simulate the branched network generated by activated Arp2/3 on the pattern, we placed Arp2/3-like objects in the pattern, which bind to any filament that is sufficiently close. Bound Arp2/3 object will then nucleate a new filament with an angle of 70° with respect to the other filament on which it is bound. These complexes are placed in a fixed position on the pattern, but will move with the filaments after binding, without inducing any constraint. The link between the mother and daughter filament is modeled as a Hookean spring, with a torque to constrain the angle between the branches. To add some friction on the pattern, we also placed on the pattern fixed binders that may bind and unbind to the filaments, thus restraining their motion. These binders are also modeled as Hookean springs between the fixed anchoring point, and the attachment location on the fiber.

S1 Table shows the important parameter values used in the simulations. The complete configuration file used to simulate a horizontal pattern (see Fig 1) is given in Supplementary Data.

Simulation of steric interaction between filaments

The interaction between filaments is assumed to come from both depletion and electrostatic interactions. These are modeled in Cytosim as Hookean springs acting between the modeled segments, with an equilibrium distance d_0 corresponding to the diameter of a fiber. Because of excessive computational costs (S2 Fig), we could not simulate all the filaments present in the system, and reduced their number by lowering the density by roughly a factor 10. For this, we used an effective diameter $d_0 = 100 \text{ nm}$ (while the diameter of one actin filament is around 7 nm), and a maximum interaction range of $d_m = 200 \text{ nm}$ (while interactions between actin filaments mediated by electrostatic or depletion forces would be limited to tens of nm). Choosing d_0 and d_m , as well as the scale of the simulated system (length of the filaments, simulated time. . .) resulted from an empirical tradeoff between computational expenses and accuracy. With the chosen values, one filament usually interacts with its first and 2nd neighbors, and any modification of this aspect of the model can strongly affect the emergent organization. For example changing the value of d_r (defined from $d_m = d_0 + 2 d_r$, see S5A and S5B Fig) indicated a strong effect on filament bundling. Thus the adjustment between the filament radius, interaction range, and steric coefficient values is delicate, and the calibration procedure is essential to find appropriate values of those parameters. Note that with our parameter set, each simulated filament may represent ~10 neighboring actin filaments, and one should be careful while interpreting the results at a molecular scale.

Simulation of different rigidities of actin filaments

We computed fibers of 3 different persistence lengths (2 μm , 15 μm , 1000 μm) to account for the effect of actin binding proteins. We calibrated the steric parameters for filaments having a native persistence length (15 μm), and kept these values fixed for the other persistence lengths. Indeed, we considered that the repulsive force, due to hard-core repulsion, should not be strongly affected by the addition of other proteins, so K_{push} could be kept constant for all rigidities. The electrostatic interaction term, K_{pull} , could be affected by the addition of actin binding proteins if they do change the electronic charge of the filaments, or the depletion force. However, we do not have any measure of this potential effect to recalibrate this value, and keeping the same value was sufficient to explain the experimental observations in the presence of fascin. Moreover, we found that the range of steric parameters giving patterns similar to the one observed *in vitro* was minimally affected by the value of the persistence length (S6A and S6B Fig).

The increased persistence length due to fascin addition could have been modeled by true addition of crosslinker in our simulation, or by increasing the value of K_{pull} . However, to be able to compare the behavior of fibers with different persistence lengths, we preferred to keep as many parameters as possible constant, and to vary instead the persistence length.

In all simulations we kept the same density of fibers. Therefore we do not explicitly model the decrease in fiber number that is expected from bundling. This choice was motivated by the computational costs of simulating large number of fibers. For native persistence lengths we simulated 300 to 1700 fibers, a 10 times decrease in case of bundling, i.e. 30 to 170 fibers, will not allow for comparison of the actin organizations. Instead we compared the behavior of single fibers against bundle of fibers for a same density of fibers/bundle of fibers.

We also tested how sensitive the simulations were to the chosen value of the filament persistence length, by varying it between 2 μm and 1000 μm (S7 Fig). We noticed that above a threshold, around 10 μm for the persistence length, the collective behavior of actin filaments was mostly similar with the same tendency of forming bundles (S7 Fig). Thus the choice of a precise value of 15 μm while actin persistence length is evaluated to be between 10 and 20 μm is acceptable.

Simulation of entanglement and primer effect

To simulate the entanglement effect on the pattern and its effect on actin elongation (Fig 3), we defined two different fiber types in Cytosim. Their parameters are identical, but this allowed us to define an entity in the pattern that could bind at the barbed end of actin filaments coming only from the other pattern. When a filament has one or more of these entities bound close to its end, it will stop growing. For the second scenario (primer effect), we added the possibility for these entities to nucleate a new filament when bound. By mixing the two types of entities (capping one and nucleating one), we could control the nucleation efficiency.

Supporting Information

S1 Fig. *In vitro* organization on 3D view. (A) 3D reconstruction of filaments organization done with the software Chimera from confocal microscopy imaging. Color code illustrates the Z dimension. (B) Imaging in TIRF mode limits fluorescence to the filaments that are within ~200 nm of the coverglass surface plane. Scale bar: 10 μ m (TIF)

S2 Fig. Description of the main processes that were simulated: patterning, nucleation, elongation, interaction. Cartoon representing the processes *in vitro* (left column), their implementation in Cytosim (middle column), and examples of simulations with a different implementation (right column). **Patterning:** The coverglass is covered by non-adhesive PLL-PEG polymer, and only the insulated area coated with pWA can activate the nucleation by Arp2/3 complex. Thus the patterned area is adhesive and creates friction on the filaments. We added binders (in blue) in the simulations to account for this friction (middle). We also added pre-activated complexes (orange) to initiate the nucleation. When the binders are removed, the region of high fiber density is not confined to the activated region (right). **Nucleation:** The contact between the inactive diffusing Arp2/3 complex, a pre-existing filament (primer) and the pWA allows the nucleation of a new filament by addition of diffusing monomer (left). Contact between pre-activated Arp2/3-like complex on the pattern and a filament generates nucleation of a new filament in Cytosim (middle). If the filaments are all nucleated without Arp2/3-like process (with fixed nucleators similar to those used as primers), we obtained a network that is very dense in the center, and all filaments are of similar lengths (right). **Elongation:** Under the *in vitro* conditions, with the concentration of 1–2 μ M of actin, the elongation speed of filaments stayed approximately constant during the experiment (left). The growth is thus simulated with a constant rate (middle). If we added the constraint of limited amount of monomers, the filament growth slowed down during the simulation, and we obtained shorter filaments, but the global organization remained similar (right). **Interaction:** Filaments are attracting each other by electrostatic interactions due to the presence of counterions in solution and depletion force due to polymers (left). This is modeled by short range interactions calculated for each segment of a fiber in Cytosim (middle). If we remove this interaction, filaments remain disorganized (right). **Simulation:** Computation time needed to simulate a network of filaments for 150 s, as a function of the number of filaments in this network (middle). Final organization of filaments from a horizontal pattern bar with default parameters of our system (control, right). (TIF)

S3 Fig. Simulation of actin nucleation from pattern. Time-course of a simulation with actin filament nucleated from a rectangular area. Arp2/3-like entities are represented as small orange dots. Binders are represented as blue dots. At early times ($t = 1$ s), few nucleators entities randomly distributed generate short actin filaments (primers, shown in white). Upon contact with

Arp2/3-like entities ($t \geq 10$ s), these filaments are amplified by triggering the nucleation of new filaments; daughter filaments make a 70° angle with the mother filament. A zoom of a small part of the pattern is shown below. Scale bar is $1 \mu\text{m}$.

(TIF)

S4 Fig. Effect of the ratio between fiber length and persistence length on the collective organization. Proportion of parallel fibers as function of pattern angle θ , with a persistence length L_p of $2 \mu\text{m}$ and $1000 \mu\text{m}$, while the lengths of filaments is $L = 7 \mu\text{m}$. The ratio is defined as $r = L_p/L$. (B) Proportion of parallel filaments as a function of pattern angle θ for different fiber lengths and native persistence length. (C) Illustration of the collective organization for different ratios r (bottom).

(TIF)

S5 Fig. Effect of steric parameters. (A) Effect of varying the steric range d_r , between 10 and 100 nm. All other parameters are identical to [Fig 1E](#). Scale bar is $4 \mu\text{m}$. (B) Effect of varying the steric range d_r , around its set value of 50 nm.

(TIF)

S6 Fig. Effect of steric parameters on non-native persistence length of fibers. Variation of steric parameters for filaments with a persistence length of $1000 \mu\text{m}$ (A) or $2 \mu\text{m}$ (B). Three values were tested for K_{pull} (0.05, 0.5 and $5 \text{ pN}/\mu\text{m}$) and three values for K_{push} (0.75, 7.5 and $75 \text{ pN}/\mu\text{m}$), resulting in 9 combinations. The nucleating bar is $8 \mu\text{m}$ long and the image shows in grey levels the simulated actin density at 250 s (scale bar is $6 \mu\text{m}$).

(TIF)

S7 Fig. Sensitivity of actin organization on the fiber persistence length. Organization of actin fibers with 5 different persistence lengths: $2 \mu\text{m}$, $5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $15 \mu\text{m}$ and $1000 \mu\text{m}$ (from left to right). Pattern bar length is $8 \mu\text{m}$ and the image shows in grey levels the simulated actin density at 250 s.

(TIF)

S1 Movie. Growth of actin filaments from pattern after calibration. Growth of filaments nucleated from a rectangle, with parameters chosen as discussed in [Fig 1](#). Pattern bar length is $8 \mu\text{m}$, 510 actin filaments are nucleated on the pattern. Simulation runs for 250 s.

(MP4)

S2 Movie. Growth of actin filaments from a V-shape with persistence length of $15 \mu\text{m}$. Filament persistence length is $15 \mu\text{m}$; each rectangle is $8 \mu\text{m}$ long, nucleating 360 actin filaments. Simulations run for 250 s. Angle between pattern is 20° (left), 45° (middle) and 90° (right).

(MP4)

S3 Movie. Growth of filaments from a V-shape with persistence length of $2 \mu\text{m}$. Actin filament persistence length is $2 \mu\text{m}$; each rectangle is $8 \mu\text{m}$ long, nucleating 360 actin filaments. Simulations run for 250 s. Angle between pattern is 20° (left), 45° (middle) and 90° (right).

(MP4)

S4 Movie. Growth of actin filaments from a V-shape with persistence length of $1000 \mu\text{m}$. Actin filament persistence length is $1000 \mu\text{m}$; each rectangle is $8 \mu\text{m}$ long, nucleating 360 actin filaments. Simulations run for 250 s. Angle between pattern is 20° (left), 45° (middle) and 90° (right).

(MP4)

S5 Movie. Growth of actin filaments from pattern under entanglement and nucleation assumptions. Growth of actin filaments from two parallel rectangles; each rectangle is 5 μm wide, nucleating 135 actin filaments. Simulations run for 500 s. The top panel was simulated under the entanglement assumption. The bottom panel was simulated under the nucleation assumption. Additional actin filaments whose nucleation is triggered when actin filaments reach the neighboring rectangles are shown in green.
(MP4)

S6 Movie. Growth of actin filaments from a star-like shaped pattern. Growth of actin filaments from a star-like pattern based on the calibrated parameters of this study. The pattern is composed of 8 rectangles 8 μm in length, nucleating 230 or more actin filaments each. Simulation time is 250 s.
(MP4)

S1 Table. Main parameters used in the simulation.
(DOCX)

Acknowledgments

We wish to acknowledge A. Kawska, B. White, F. Vaggi and CH. Tan who first simulated this system during the EMBO practical course Microscopy, Modeling and Biophysical Methods in 2010. We are grateful to Fabrice Senger for his help in the elaboration of [S1 Fig](#).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GL AZP HE MT FN LB. Performed the experiments: GL AZP HE. Analyzed the data: GL. Contributed reagents/materials/analysis tools: GL AZP HE FN. Wrote the paper: GL AZP FN LB.

References

1. Reymann A-C, Martiel J-L, Cambier T, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Théry M. Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat Mater*. 2010; 9: 827–832. doi: [10.1038/nmat2855](#) PMID: [20852617](#)
2. Pollard TD, Cooper JA. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 2009; 326: 1208–1212. doi: [10.1126/science.1175862](#) PMID: [19965462](#)
3. Mogilner A, Oster G. Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys J*. 1996; 71: 3030–3045. PMID: [8968574](#)
4. Mogilner A, Oster G. Force generation by actin polymerization II: the elastic ratchet and tethered filaments. *Biophys J*. 2003; 84: 1591–1605. PMID: [12609863](#)
5. Fletcher DA, Mullins RD. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*. 2010; 463: 485–492. doi: [10.1038/nature08908](#) PMID: [20110992](#)
6. Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, Plastino J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol Rev*. 2014; 94: 235–263. doi: [10.1152/physrev.00018.2013](#) PMID: [24382887](#)
7. Bathe M, Heussinger C, Claessens MM, Bausch AR, Frey E. Cytoskeletal bundle mechanics. *Biophys J*. 2008; 94: 2955–2964. PMID: [18055529](#)
8. Deguchi S, Ohashi T, Sato M. Tensile properties of single stress fibers isolated from cultured vascular smooth muscle cells. *J Biomech*. 2006; 39: 2603–2610. PMID: [16216252](#)
9. Svitkina TM, Borisy GG. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*. 1999; 145: 1009–1026. PMID: [10352018](#)
10. Small JV. Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J Cell Biol*. 1995; 129: 1275–1286. PMID: [7775574](#)
11. Iwasa JH, Mullins RD. Spatial and Temporal Relationships between Actin-Filament Nucleation, Capping, and Disassembly. *Curr Biol*. 2014; 17: 395–406.

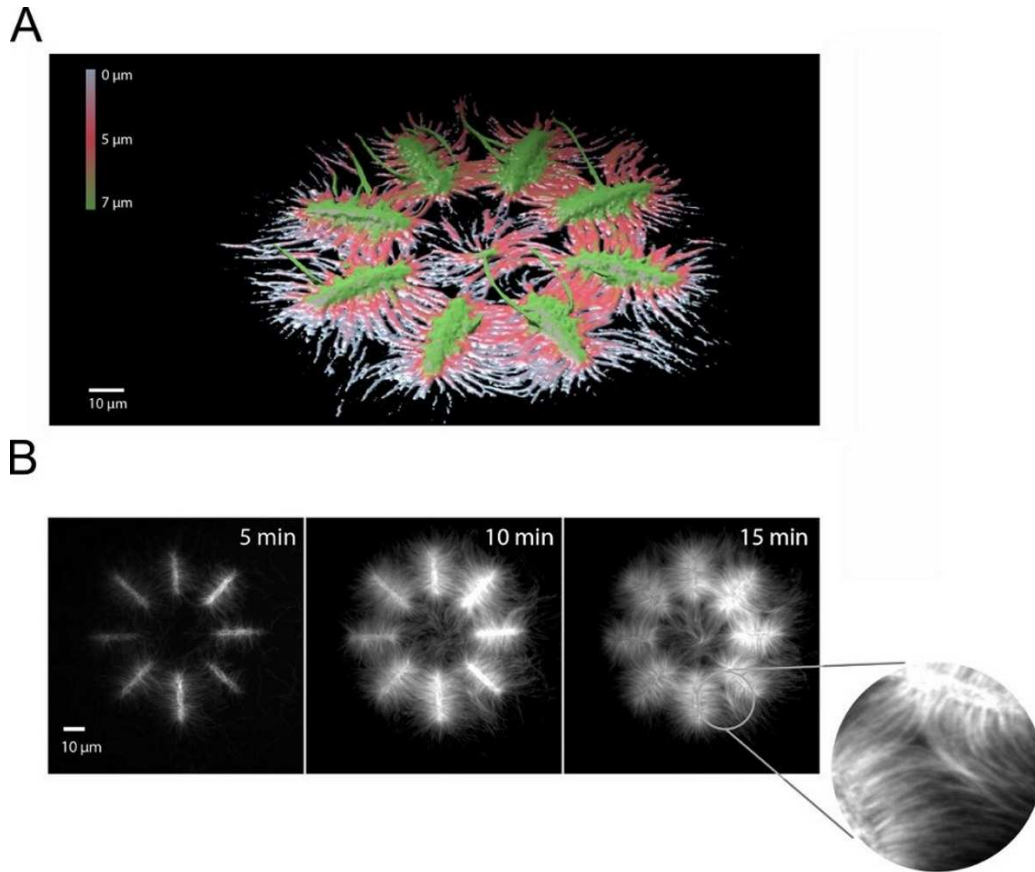
12. Keren K, Pincus Z, Allen GM, Barnhart EL, Marriott G, Mogilner A, et al. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature*. 2008; 453: 475–480. doi: [10.1038/nature06952](https://doi.org/10.1038/nature06952) PMID: [18497816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18497816/)
13. Mogilner A. Mathematics of cell motility: have we got its number? *J Math Biol*. 2009; 58: 105–134. doi: [10.1007/s00285-008-0182-2](https://doi.org/10.1007/s00285-008-0182-2) PMID: [18461331](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18461331/)
14. Quint DA, Schwarz JM. Optimal orientation in branched cytoskeletal networks. *J Math Biol*. 2011; 63: 735–755. doi: [10.1007/s00285-010-0389-x](https://doi.org/10.1007/s00285-010-0389-x) PMID: [21140151](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21140151/)
15. Schaus TE, Taylor EW, Borisy GG. Self-organization of actin filament orientation in the dendritic-nucleation/array-treadmilling model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 7086–7091. PMID: [17440042](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17440042/)
16. Weichsel J, Urban E, Small JV, Schwarz US. Reconstructing the orientation distribution of actin filaments in the lamellipodium of migrating keratocytes from electron microscopy tomography data. *Cytometry A*. 2012; 81: 496–507. doi: [10.1002/cyto.a.22050](https://doi.org/10.1002/cyto.a.22050) PMID: [22499256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22499256/)
17. Zimmermann J, Brunner C, Enculescu M, Goegler M, Ehrlicher A, Käs J, et al. Actin filament elasticity and retrograde flow shape the force-velocity relation of motile cells. *Biophys J*. 2012; 102: 287–295. doi: [10.1016/j.bpj.2011.12.023](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.12.023) PMID: [22339865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22339865/)
18. Small J V, Isenberg G, Celis JE. Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*. 1978; 272: 638–639. PMID: [565473](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/565473/)
19. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9: 446–454. doi: [10.1038/nrm2406](https://doi.org/10.1038/nrm2406) PMID: [18464790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18464790/)
20. Zhuravlev PI, Minakova MS, Papoian GA. Theory of active transport in filopodia and stereocilia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109:10849–54. doi: [10.1073/pnas.1200160109](https://doi.org/10.1073/pnas.1200160109) PMID: [22711803](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22711803/)
21. Howard J. Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature*. 2012; 389: 561–567.
22. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, et al. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*. 2003; 160: 409–421. PMID: [12566431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12566431/)
23. Vignjevic D, Yarar D, Welch MD, Peloquin J, Svitkina T, Borisy GG, et al. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol*. 2003; 160: 951–962. PMID: [12642617](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12642617/)
24. Hotulainen P, Lappalainen P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol*. 2006; 173: 383–394. PMID: [16651381](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16651381/)
25. Burnette DT, Manley S, Sengupta P, Sougrat R, Davidson MW, Kachar B, et al. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol*. 2011; 13: 371–381. doi: [10.1038/ncb2205](https://doi.org/10.1038/ncb2205) PMID: [21423177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21423177/)
26. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P. Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci*. 2012; 125: 1855–1864. doi: [10.1242/jcs.098087](https://doi.org/10.1242/jcs.098087) PMID: [22544950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22544950/)
27. Reyman A-C, Boujemaa-Paterski R, Martiel J-L, Guérin C, Cao W, Théry M, Blanchoin L. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science*. 2012; 336: 1310–1314. doi: [10.1126/science.1221708](https://doi.org/10.1126/science.1221708) PMID: [22679097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22679097/)
28. Hayakawa K, Tatsumi H, Sokabe M. Actin filaments function as a tension sensor by tension-dependent binding of cofilin to the filament. *J Cell Biol*. 2011; 195: 721–727. doi: [10.1083/jcb.201102039](https://doi.org/10.1083/jcb.201102039) PMID: [22123860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22123860/)
29. Pollard TD, Berro J. Mathematical models and simulations of cellular processes based on actin filaments. *J Biol Chem*. 2009; 284: 5433–5437. doi: [10.1074/jbc.R800043200](https://doi.org/10.1074/jbc.R800043200) PMID: [18940808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18940808/)
30. Mogilner A, Edelstein-keshet L. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophys J*. 2002; 83: 1237–1258. PMID: [12202352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12202352/)
31. Carlsson AE. Stimulation of actin polymerization by filament severing. *Biophys J*. 2006; 90: 413–422. PMID: [16258044](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16258044/)
32. Fallqvist B, Kulachenko A, Kroon M. Modelling of cross-linked actin networks—Influence of geometrical parameters and cross-link compliance. *J Theor Biol*. 2014; 350: 57–69. doi: [10.1016/j.jtbi.2014.01.032](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2014.01.032) PMID: [24491254](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24491254/)
33. Lan Y, Papoian GA. The stochastic dynamics of filopodial growth. *Biophys J*. 2008; 94: 3839–3852. doi: [10.1529/biophysj.107.123778](https://doi.org/10.1529/biophysj.107.123778) PMID: [18234810](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18234810/)
34. Kawska A, Carvalho K, Manzi J, Boujemaa-Paterski R, Blanchoin L, Martiel JL, et al. How actin network dynamics control the onset of actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012; 109: 14440–14445. doi: [10.1073/pnas.1117096109](https://doi.org/10.1073/pnas.1117096109) PMID: [22908255](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22908255/)
35. Friedrich BM, Fischer-Friedrich E, Gov NS, Safran SA. Sarcomeric pattern formation by actin cluster coalescence. *Plos Comput Biol*. 2012; 8: e1002544. doi: [10.1371/journal.pcbi.1002544](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002544) PMID: [22685394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22685394/)
36. Nedelec F, Foethke D. Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers. *New J Phys*. 2007; 9: 427–427.

37. Kozłowski C, Srayko M, Nedelec F. Cortical microtubule contacts position the spindle in *C. elegans* embryos. *Cell*. 2007; 129: 499–510. PMID: [17482544](#)
38. Foethke D, Makushok T, Brunner D, Nedelec F. Force and length dependent catastrophe activities explain interphase microtubule organization in fission yeast. *Mol Syst Biol*. 2009; 5: 241. doi: [10.1038/msb.2008.76](#) PMID: [19293826](#)
39. Pinot M, Chesnel F, Kubiak JZ, Arnal I, Nedelec FJ, Gueroui Z. Effects of confinement on the self-organization of microtubules and motors. *Curr Biol*. 2009; 19: 954–960. doi: [10.1016/j.cub.2009.04.027](#) PMID: [19427215](#)
40. Loughlin R, Heald R, Nedelec F. A computational model predicts *Xenopus* meiotic spindle organization. *J Cell Biol*. 2010; 191: 1239–1249. doi: [10.1083/jcb.201006076](#) PMID: [21173114](#)
41. Athale CA, Dinarina A, Nedelec F, Karsenti E. Collective behavior of minus-ended motors in mitotic microtubule asters gliding toward DNA. *Phys Biol*. 2014; 11: 16008.
42. Gibeaux R, Politi AZ, Nedelec F, Antony C, Knop M. Spindle pole body-anchored Kar3 drives the nucleus along microtubules from another nucleus in preparation for nuclear fusion during yeast karyogamy. *Genes Dev*. 2013; 27: 335–349. doi: [10.1101/gad.206318.112](#) PMID: [23388829](#)
43. Rupp B, Nedelec F. Patterns of molecular motors that guide and sort filaments. *Lab Chip*. 2012; 12: 4903–4910. doi: [10.1039/c2lc40250e](#) PMID: [23038219](#)
44. Laporte D, Ojkić N, Vavylonis D, Wu JQ. α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly. *Mol Biol Cell*. 2012; 23: 3094–3110. doi: [10.1091/mbc.E12-02-0123](#) PMID: [22740629](#)
45. Tang H, Laporte D, Vavylonis D. Actin cable distribution and dynamics arising from cross-linking, motor pulling, and filament turnover. *Mol Biol Cell*. 2014; 25: 3006–3016. doi: [10.1091/mbc.E14-05-0965](#) PMID: [25103242](#)
46. Kim M, Rejniak KA. Mechanical aspects of microtubule bundling in taxane-treated circulating tumor cells. *Biophys J*. 2014; 107: 1236–1246. doi: [10.1016/j.bpj.2014.07.009](#) PMID: [25185559](#)
47. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 6181–6186. PMID: [9600938](#)
48. Blanchoin L, Amann KJ, Higgs HN, Marchand J-B, Kaiser DA, Pollard TD. Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature*. 2000; 404: 1007–1011. PMID: [10801131](#)
49. Pollard TD. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*. 1986; 103: 2747–2754. PMID: [3793756](#)
50. Yu X, Carlsson AE. Multiscale Study of Counterion-Induced Attraction and Bundle Formation of F-Actin Using an Ising-like Mean-Field Model. *Biophys J*. 2003; 85: 3532–3543. PMID: [14645048](#)
51. Biron D, Moses E, Borukhov I, Safran SA. Inter-filament Attractions Narrow the Length Distribution of Actin Filaments. *Europhys Lett*. 2004; 73: 5.
52. Hosek M, Tang J. Polymer-induced bundling of F actin and the depletion force. *Phys Rev E*. 2004; 69: 51907.
53. Mogilner A, Rubinstein B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J*. 2005; 89: 782–795 PMID: [15879474](#)
54. McCullough BR, Blanchoin L, Martiel JL, De la Cruz EM. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol*. 2008; 381: 550–558. doi: [10.1016/j.jmb.2008.05.055](#) PMID: [18617188](#)
55. Achard V, Martiel J-L, Michelot A, Guérin C, Reymann A-C, Blanchoin L, et al. A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol*. 2010; 20: 423–428. doi: [10.1016/j.cub.2009.12.056](#) PMID: [20188562](#)
56. Mullins RD, Hansen SD. In vitro studies of actin filament and network dynamics. *Curr Opin Cell Biol*. 2013; 25: 6–13. doi: [10.1016/j.ceb.2012.11.007](#) PMID: [23267766](#)
57. Jégou A, Carlier M-F, Romet-Lemonne G. Microfluidics pushes forward microscopy analysis of actin dynamics. *Bioarchitecture*. 2011; 6: 271–276. PMID: [22545179](#)
58. Portran D, Gaillard J, Vantard M, Theyry M. Quantification of MAP and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks. *Cytoskeleton*. 2013; 70: 12–23. doi: [10.1002/cm.21081](#) PMID: [23027541](#)
59. Pugieux C, Dmitrieff S, Tarnawska K, Nedelec F. Spindle assembly on immobilized chromatin micro-patterns. *Methods Enzymol*. 2014; 540: 435–448. doi: [10.1016/B978-0-12-397924-7.00024-8](#) PMID: [24630121](#)

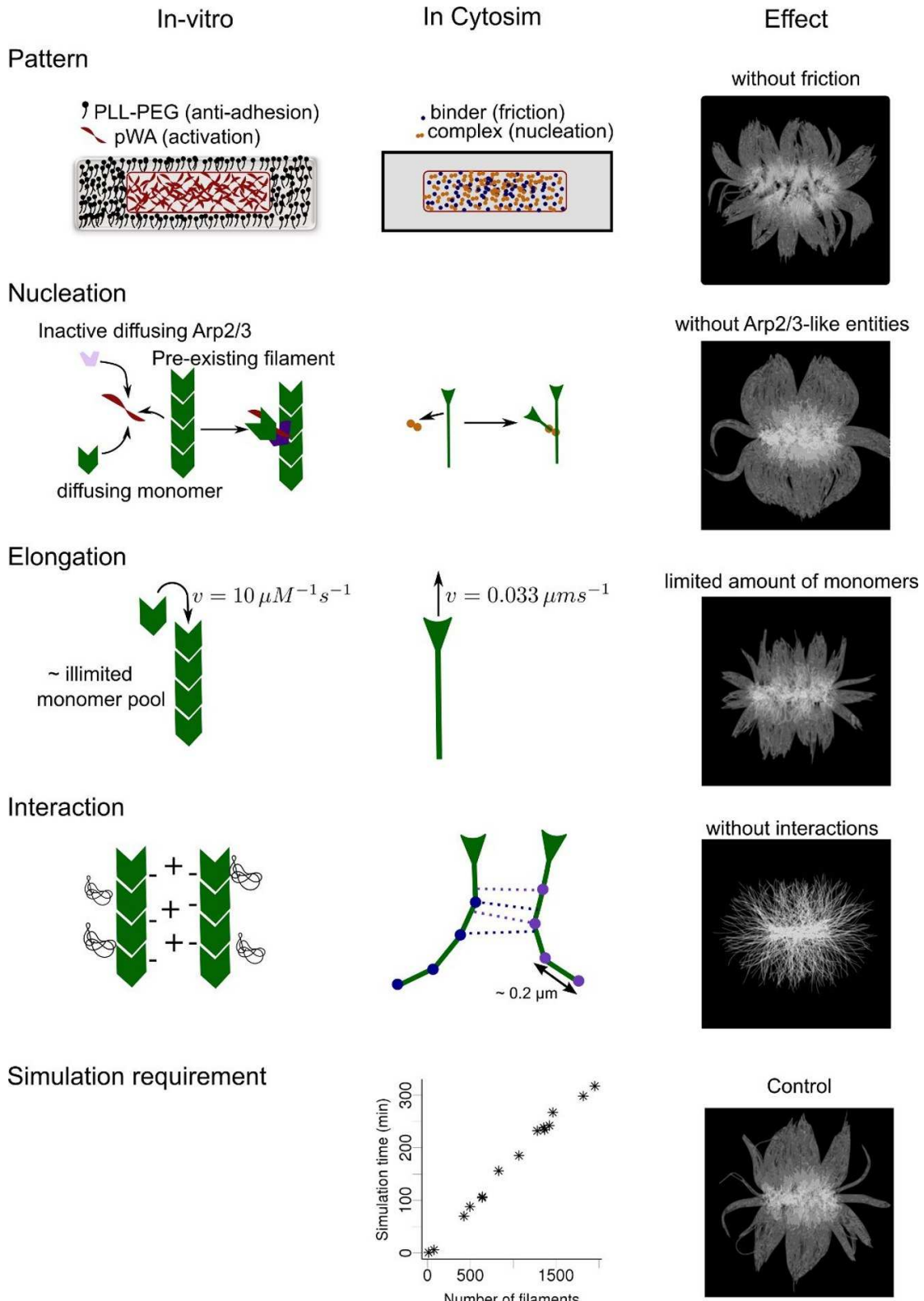
60. Dinarina A, Pugieux C, Corral MM, Loose M, Spatz J, Karsenti E, et al. Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell*. 2009; 138: 502–513 doi: [10.1016/j.cell.2009.05.027](https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.027) PMID: [19665972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19665972/)
61. Jégou A, Carlier M-F, Romet-Lemonne G. Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments. *Nat Commun*. 2013; 4: 1883. doi: [10.1038/ncomms2888](https://doi.org/10.1038/ncomms2888) PMID: [23695677](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23695677/)
62. Isambert H, Venier P, Maggs AC, Fattoum A, Kassab R, Pantaloni D, et al. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem*. 1995; 270: 11437–11444. PMID: [7744781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7744781/)
63. Claessens M, Bathe M, Frey E, Bausch A. Actin-binding proteins sensitively mediate F-actin bundle stiffness. *Nat Mat*. 2006; 5: 748–753.
64. Pruyne D, Evangelista M, Yang C, Bi E, Zigmund S, Bretscher A, et al. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 2002; 297: 612–615. PMID: [12052901](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12052901/)
65. Krause M, Bear JE, Loureiro JJ, Gertler FB. The Ena/VASP enigma. *J Cell Sci*. 2002; 10: 4721–4726.
66. Peskin C, Odell G, Oster G. Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys J*. 2002; 65: 316–324.
67. Footer MJ, Kerssemakers JWJ, Theriot JA, Dogterom M. Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104: 2181–2186. PMID: [17277076](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17277076/)

Supporting Information

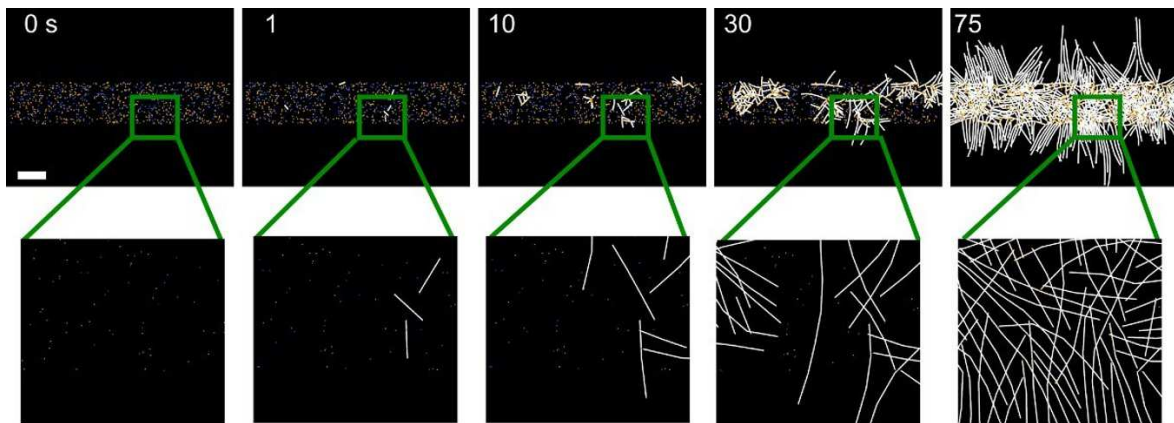
S1 Fig.



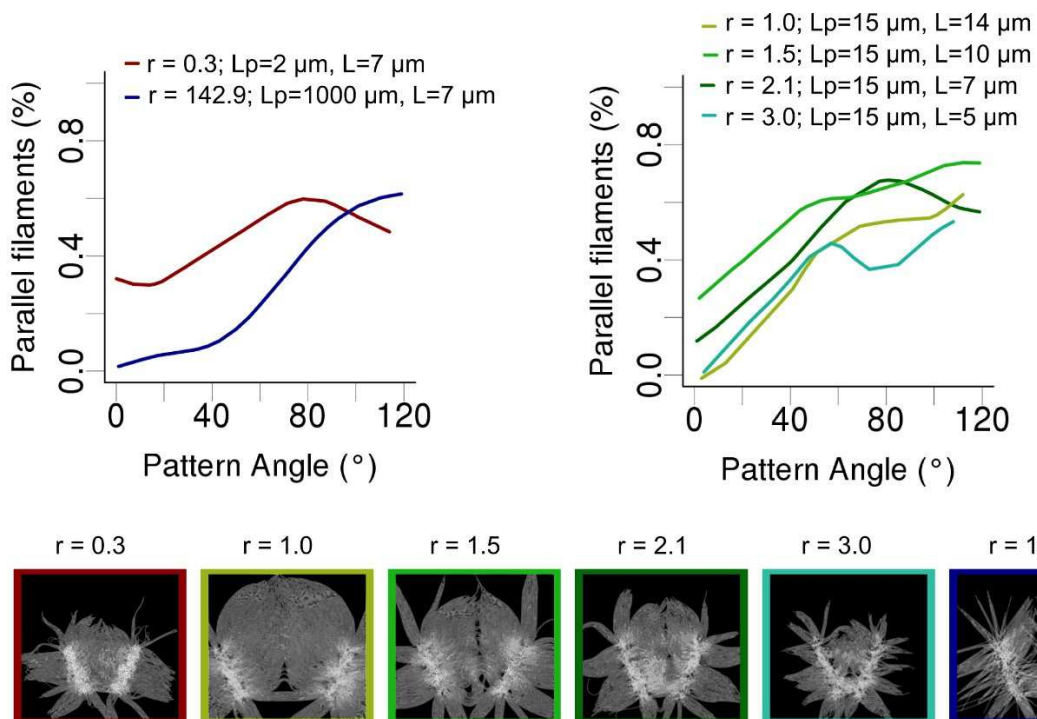
S2 Fig.



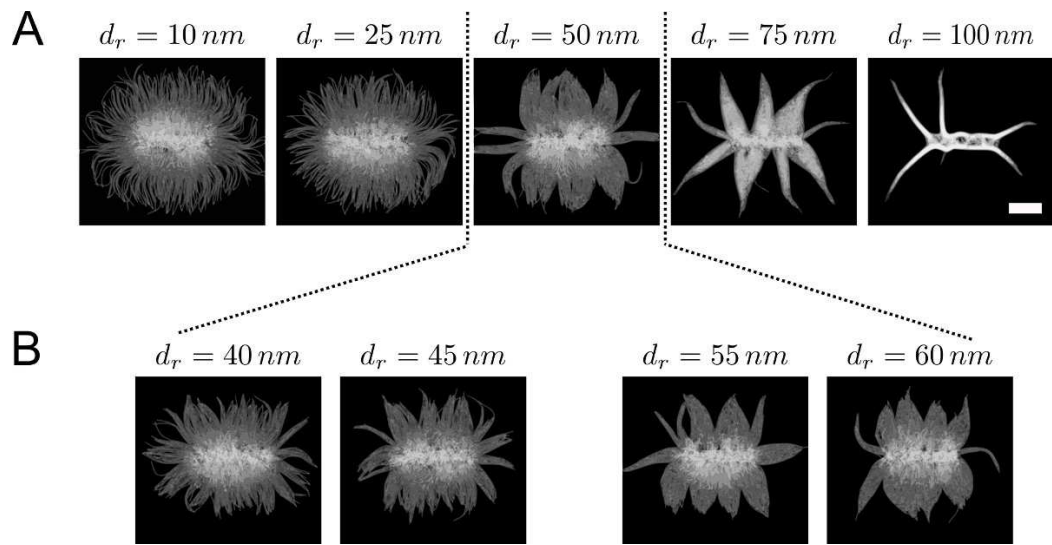
S3 Fig.



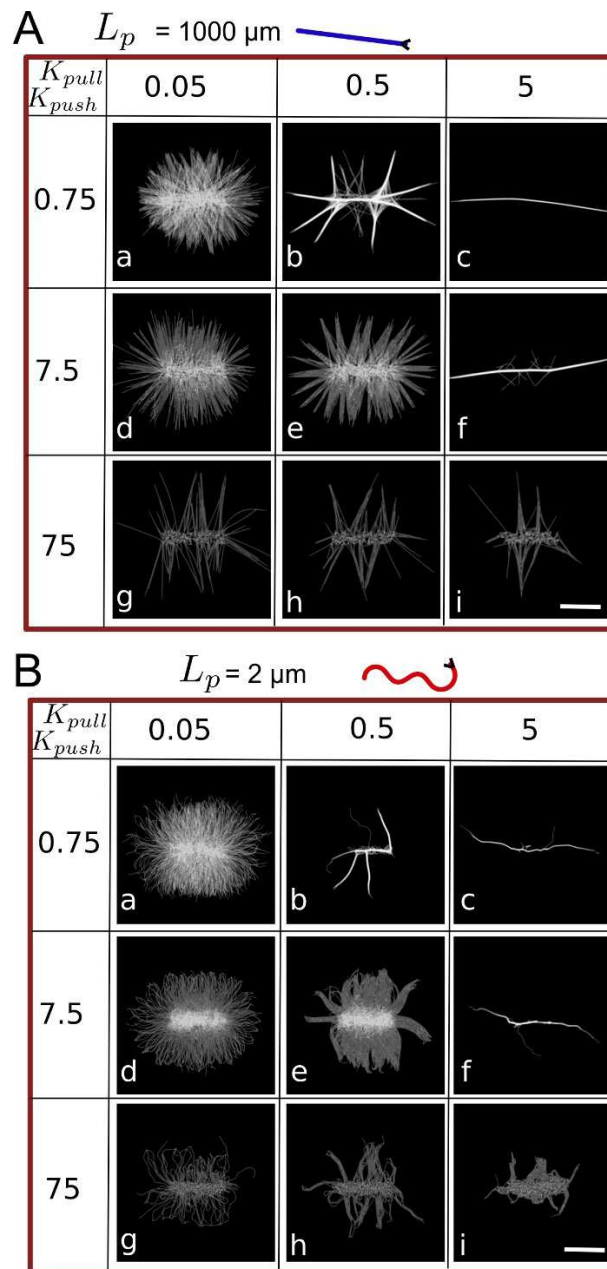
S4 Fig.



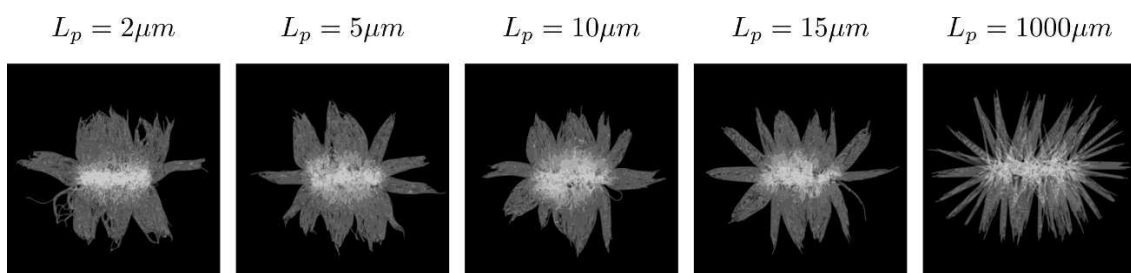
S5 Fig.



S6 Fig.



S7 Fig.



S1 Table. Main parameters used in the simulation.

Name	Value	Description
Global		
Time step	0.01 s	Computational parameter
Viscosity	0.18 pN s/ μm^2	Viscosity of the solution containing methylcellulose
kT	0.0042 pN μm	Thermal energy at 25°C
Actin filaments		
Rigidity	0.06 pN μm^2	Flexural rigidity: $L_p * kT$, with L_p , actin persistence length, chosen as 15 μm [62]. Varied in Figure 2 and Figure S6.
Segmentation	0.2 μm	Computational parameter
Growing speed	0.033 $\mu\text{m/s}$	Elongation speed under no force (v_0), for 1 μM of actin monomers [49].
Growing force	0.8 pN	Stall force (F_0) [67]. Growing velocity is slowed down by loading force on barbed end:
Steric diameter	100 nm	Simulated fiber diameter d , discussed in Material and Methods
Steric maximal range	200 nm	Maximal interacting distance, r , discussed in Material and Methods
Steric parameters		See Figure 1, S2 and Material and Methods
Fixed nucleator		
Nucleation rate	1 s^{-1}	Rate of nucleation, fast to simulate primers. Empirical
Unbinding rate	0	No detachment
Stiffness	30 pN/ μm	Stiffness of the Hookean spring to attach the nucleator to its position. Empirical, low so that the initial position will not be a strong constraint
Number	10	Few primers
Arp2/3 complex		
Nucleation rate	0.5	Nucleation rate when bound to an existing filament
Binding rate	1	Fast binding rate for an efficient covering of the pattern area
Binding range	0.02 μm	Can bind only to a close filament
Unbinding rate	0	No Arp2/3 debranching
Equilibrium angle	1.24 rad	Equilibrium angle between the two branches (70°, [48])
Angular stiffness	0.13 pN. $\mu\text{m}/\text{rad}$	Stiffness of the torque connecting the two branches [48]
Density (or number)	Between 300 and 1700	

Binders

Binding range	0.02 μm	Maximal distance to which a binder can bind a filament. Empirical
Binding rate	7 s^{-1}	Rate of binding of a binder to any filament that is within the binding range distance. Empirical
Stiffness	100 $\text{pN}/\mu\text{m}$	Stiffness of the Hookean spring between the binder and the filament. Empirical
Unbinding rate	0.01 s^{-1}	Rate of unbinding of the binders. Empirical
Stiffness	100 $\text{pN}/\mu\text{m}$	Stiffness of the Hookean spring between the binder and the filament. Empirical
Number	400	Enough to create friction

Simulation

Number of filaments	Between 300 and 1700	Range of number of filaments simulated (nucleated from Arp2/3 complex entities)
Total time simulated	Between 250 s and 500 s	

5.2.2 Croissance des filaments d'actine dans un environnement confiné.

Au cours de cette étude, il nous a semblé intéressant d'utiliser notre système de simulation dans une démarche plus exploratoire, et notamment d'étudier la croissance de l'actine en milieu confiné. La croissance de filaments d'actine en milieu confiné a été étudiée expérimentalement *in-vitro*. Un réseau d'actine, ponté par α -actinine, confiné dans des vésicules lipidiques, peut adopter plusieurs configurations en fonction de la taille de ces vésicules. Pour de petites vésicules ($\leq 12 \mu m$), les filaments formeront un anneau de faisceaux d'actine le long de la membrane lipidique, alors que pour de grandes vésicules ($> 12 \mu m$), le réseau ressemblera à une toile d'araignée [Limozin et Sackmann(2002)].

Nous nous sommes intéressés à ce comportement des filaments en milieu confiné en simulant leur croissance dans un espace circulaire de rayon R_{out} . Dans notre configuration, les filaments sont nucléés à partir d'une zone micropatronée placée au centre d'un cercle de rayon R_{in} . Nous avons alors fait varier la rigidité des filaments (en utilisant les 3 différents longueurs de persistances étudiées précédemment), ainsi que le rayon de l'espace de confinement (Figure 5.2 (A)).

Nous avons remarqué que le ratio entre la longueur de persistance du filament et la taille du confinement ($R_{out} - R_{in}$) détermine l'organisation collective des filaments. Si la taille du confinement est supérieure à la longueur de persistance des filaments, ceux-ci vont se courber avant même d'atteindre le mur extérieur, ce qui engendre une structure désorganisée (cf Figure 5.2, $L_p = 2 \mu m$, $R_{out} = 5 \mu m$). Lorsque la taille du confinement est inférieure à la longueur de persistance des filaments, ceux-ci vont atteindre la limite du confinement et s'organiser spontanément tangentiellement à la barrière (Figure 5.2 (C), $L_p = 2 \mu m$, $L_p = 15 \mu m$). Néanmoins, si les filaments sont très rigides par rapport à la taille du confinement (Figure 5.2 (C), $L_p = 1000 \mu m$), ils ne pourront plus se déformer suite au contact avec la barrière et restent donc organisés de façon perpendiculaire à la barrière stoppant leur croissance.

Ce comportement s'explique en considérant la vitesse d'assemblage des filaments et la formule théorique d'Euler pour le flambage de ces derniers [Berro et al.(2007)]. La vitesse d'élongation des filaments est ralentie par la force appliquée à l'extrémité barbée : $v = v_0 e^{-f/f_0}$ (cf 1.3.3). De plus, mécaniquement, les filaments vont se courber lorsque la force appliquée dépasse la force limite $F_b = \pi^2 \frac{k_B T L_p}{L^2}$ (force de courbure d'Euler, en considérant les 2 extrémités libres). Ainsi si $F_b < f_0$, les filaments vont se déformer alors que si $F_b \gg f_0$, les filaments ne vont pas se déformer et leur croissance va être inhibée (Figure 5.2 (D)).

Pour valider ces considérations, nous avons caractérisé la présence d'une structure dense se formant le long de la barrière géométrique définie par le confinement, en prenant localement la moyenne de l'angle entre l'extrémité \ominus du filament et sa direction courante. Ainsi, un angle aigu correspond à un filament droit, perpendiculaire au cercle extérieur. Un angle obtus correspond à un filament courbé, tangent au cercle extérieur (Figure 5.2 (B)). On trouve une majorité d'angles obtus lorsque la longueur de persistance des filaments est d'une valeur intermédiaire ($15 \mu m$) ou lorsque le rayon de confinement est suffisamment grand ($5 \mu m$, Figure 5.2 (C)), ce qui est en accord avec l'hypothèse ci-dessus.

En conséquence, la taille du confinement en relation avec les propriétés mécaniques des filaments va être un facteur déterminant pour l'organisation collective des filaments d'actine sous confinement. Il est possible d'obtenir une formation dense (assimilable à un cortex) lorsque le ratio entre ces 2 paramètres est intermédiaire ($R_{out}/L_p \approx 0.5 (0.1 - 1)$).

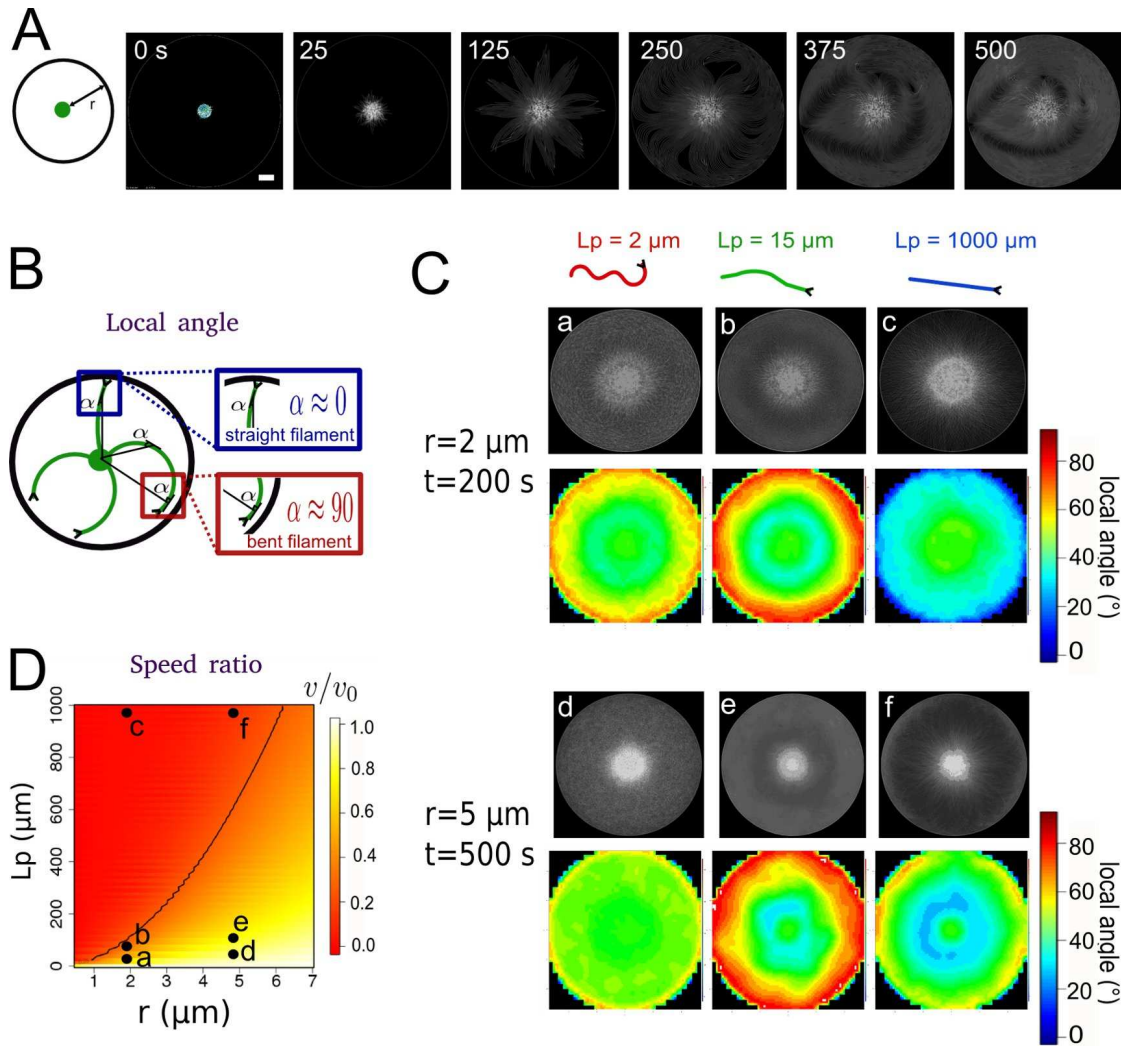


Fig. 5.2 : Croissance des filaments en milieu confiné

(A) Exemple de simulations : les filaments polymérisent à partir d'un cercle placé au centre de l'espace de confinement. Ici le rayon R_{out} est de $5 \mu m$ et les filaments ont une longueur de persistance de $15 \mu m$. (B) Angle local moyen entre les filaments et la normale au cercle de confinement. La zone rouge représente les filaments courbés (90°), qui longent le cercle de confinement (et créent donc une structure similaire à un cortex). La zone bleue représente les filaments qui ont conservé leur direction initiale (0°). (C) Les simulations de la croissance des filaments sont répétées pour 2 différents rayons de confinements : $R_{out} = 2 \mu m$ (en haut) et $R_{out} = 5 \mu m$ (en bas). (D) Valeur (couleurs) du ratio entre la vitesse v d'élongation au moment du flambage et la vitesse v_0 sans force appliquée, $\frac{v}{v_0}$ en fonction de la longueur de persistance L_p des filaments et de leur longueur au moment du flambage r . Les positions des points présentés en (C) sont représentés par les lettres a-f. La courbe noire représente la courbe de niveau à partir de laquelle les filaments sont considérés comme stoppés.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la géométrie de confinement sur l'organisation des filaments. Nous venons d'étudier l'effet du confinement lorsque celui-ci est totalement symétrique (un cercle). Si nous faisons varier cette géométrie (en prenant un carré et un triangle, de telle sorte que leurs aires soient conservées), nous constatons que pour une longueur de persistance de $15 \mu m$, les filaments vont s'accumuler aux régions les plus distantes du point de nucléation (distance pour laquelle les filaments seront le plus

longs et donc pourront se déformer plus facilement). Ainsi on obtient une formation de réseau dense réparti uniformément le long du confinement pour une géométrie circulaire et une accumulation dans les angles pour les autres géométries (Figure 5.3).

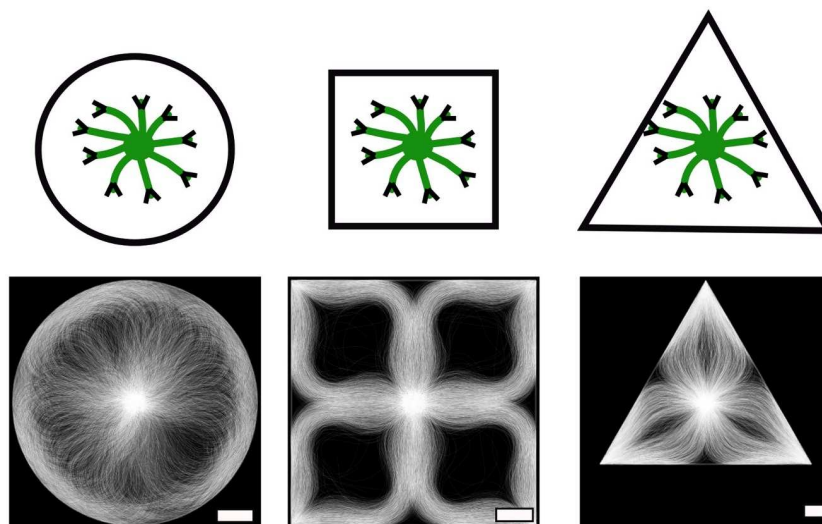


Fig. 5.3 : Variation de la géométrie du confinement

Organisation finale ($t = 500$ s) des filaments confinés dans des géométries différentes (cercle, carré, triangle) à surface égales. Échelle : $3 \mu\text{m}$.

Ce travail permet d'établir certaines lois simples de croissance sous contraintes. Ces conclusions sont un premier pas dans l'étude pour expliquer comment la forme des cellules influence le comportement collectif du cytosquelette. En effet, il y a une très bonne corrélation entre la forme d'une cellule contrainte géométriquement par un micropatron et l'organisation du cytosquelette qui en découle (Figure 2.2). Les lois qui établissent cette corrélation représentent un des enjeux majeurs d'étude de l'équipe Cytomorpha.

Troisième partie

CONTRACTILITÉ DES STRUCTURES D'ACTINE

6. Présentation générale de la contractilité	102
6.1 La contractilité dans la cellule	102
6.2 Études de la contractilité	105
7. Simulations de la contractilité : réorganisation des filaments	112
7.1 Simulation des protéines nécessaires à la contractilité	112
7.2 Principes de la contraction <i>in-silico</i>	114
7.3 Contrôle de la contractilité	115
8. Étude de la contraction de structures d'actine	122
8.1 Contraction des architectures d'actine selon leur composition biochimique . .	122
8.2 Désassemblage induit par les myosines	164

6. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DE LA CONTRACTILITÉ

Dans le chapitre précédent, nous nous sommes intéressés à la formation de structures spécifiques de filaments d'actine. Néanmoins la revue présentée dans l'introduction (cf 1.4.1) souligne l'importance de la dynamique de ces structures, qui permet à la cellule de contrôler spatialement et temporellement la présence et l'architecture de ces réseaux d'actine. La dynamique des filaments d'actine dans la cellule peut être contrôlée par des protéines interagissant avec les filaments d'actine qui vont soit favoriser leur assemblage soit favoriser leur désassemblage. Je me suis particulièrement intéressée à une troisième classe de protéines : les moteurs moléculaires (plus spécifiquement les myosines), qui vont interagir avec les filaments d'actine et permettre la génération de forces en déplaçant les filaments d'actine les uns par rapport aux autres.

Ayant à notre disposition une variété d'architectures d'actine, le problème que nous avons abordé dans cette partie est d'étudier si les moteurs moléculaires ont une spécificité vis à vis des structures d'actine et si cette spécificité induit des propriétés contractiles¹ particulières pour différentes organisations d'actine.

6.1 La contractilité dans la cellule

De nombreux processus cellulaires reposent sur la production ou la transmission de forces. Il est possible de caractériser les forces exercées par le cytosquelette dans la cellule de 2 façons : forces induites par son assemblage (polymérisation) ou forces induites par les moteurs moléculaires. Dans ce chapitre je vais m'intéresser uniquement aux forces générées par les moteurs moléculaires qui s'exercent sur les filaments d'actine constituant les différentes architectures rencontrées dans la cellule.

6.1.1 Les moteurs moléculaires : les myosines

Les myosines sont des protéines interagissant avec l'actine. Leur rôle peut être de transmettre les forces et d'induire la contraction, ou de transporter des cargos moléculaires le long des filaments.

Parmi les différents types de myosine, nous pouvons en trouver avec une ou plusieurs têtes, mais elles ont toutes une structure similaire [Clarke et Spudich(1977)] : on appelle tête l'extrémité de la chaîne de protéines qui peut se lier à l'actine et bras de levier la partie de la chaîne plus "fine" qui relie la tête au reste de la myosine (Figure 6.1 (A)). Il existe de très nombreuses variétés de myosines. Certaines sont sous forme de mini-filament, c'est à dire que de nombreuses têtes de myosines s'assemblent en un filament, comme par exemple la myosine II qui est le type le plus courant de myosine (Figure 6.1 (B)). D'autres ont seulement 2 têtes reliées ensemble, par exemple la myosine V et la myosine VI (Figure 6.1 (C)).

1. Nous appelons contractilité le phénomène de raccourcissement d'un réseau d'actine ou la présence d'une tension de compression

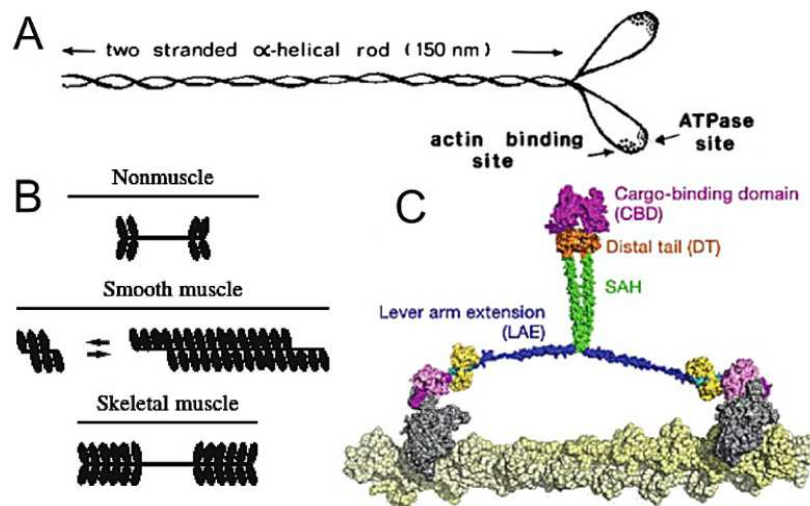


Fig. 6.1 : Différents types de myosines

(A) Représentation d'une tête de myosine. Tiré de [Clarke et Spudich(1977)]. (B) Représentation schématique des isoformes de mini-filaments de myosine II. Tiré de [Thoresen et al.(2013)]. (C) Représentation d'une myosine VI à 2 têtes. Tiré de [Sweeney et Houdusse(2010)].

Le mouvement du bras de levier de la myosine (généré par le cycle d'hydrolyse de l'ATP attaché à la myosine), dont la structure dépend du type de la myosine (Figure 6.2 (A), [Spudich et Sivaramakrishnan(2010)]), permet de faire glisser le filament d'actine par rapport à la myosine (Figure 6.2 (B), [Huxley(1969)]).

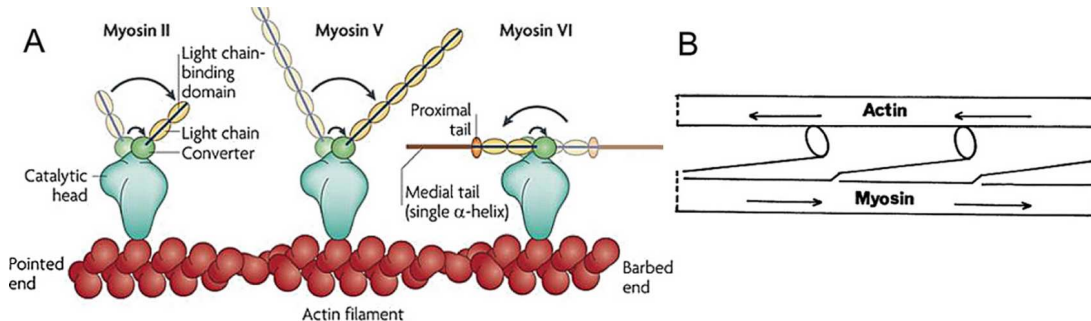


Fig. 6.2 : Mouvement de la myosine et action sur les filaments d'actine

(A) Mécanisme du bras de levier pour une tête de myosine selon son type. Tiré de [Spudich et Sivaramakrishnan(2010)]. (B) Contraction : glissement des filaments d'actine par rapport aux filaments de myosines produit par le mouvement du bras de levier. Tiré de [Huxley(1969)].

Un aspect important de l'interaction entre les moteurs moléculaires et les filaments d'actine est le temps de résidence du moteur sur les filaments qui illustre la probabilité d'avoir une tête de myosine attachée à un filament d'actine ("duty ratio"). Comme illustré dans la figure 6.3, pour obtenir un "duty ratio" de 1 avec des myosines II de muscle, il faut environ 150 têtes ce qui illustre bien la nécessité de la propriété d'auto-assemblage des myosines en mini-filaments pour exercer leurs fonctions physiologiques. Dans le cadre de myosines non musculaires (IIA ou IIB), un "duty ratio" de 1 nécessitera environ 15 têtes de myosine. Dans ce cas l'assemblage bien que nécessaire se fera à un niveau inférieur à celui des myosines de muscle. Dans le cadre de l'étude que j'ai réalisée nous avons utilisé un moteur moléculaire qui permettait d'obtenir un "duty ratio" de 1 sans nécessiter un auto-assemblage des myosines, la myosine VI.

Ces moteurs moléculaires vont ainsi affecter les différentes structures de filaments d'actine en déplaçant ces filaments et sont donc à l'origine des comportements contractiles cellulaires.

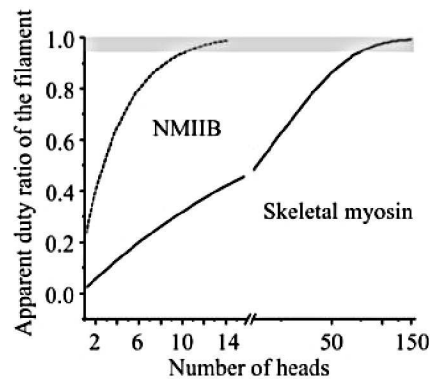


Fig. 6.3 : "Duty ratio" de différents types de myosine

"Duty ratio" des filaments de myosine IIB non musculaire (pointillé) ou de myosine de muscle (trait plein), selon le nombre de têtes par filament de myosine. La zone de processivité ("duty ratio" proche de 1) est indiquée en gris. Tiré de [Nagy et al.(2013)]

6.1.2 Les structures contractiles cellulaires

Nous pouvons distinguer différentes structures contractiles cellulaires (Figure 6.4). Elles peuvent être organisées sous la forme de réseau désordonné² au niveau du cortex ou du lamella, sous la forme de fibres ordonnées dans des cellules musculaires types sarcomériques ou sous la forme de fibres désordonnées notamment au niveau de l'anneau de cytokinèse (cf 1.4.1). En accord avec ces propriétés architecturales distinctes, leurs propriétés contractiles vont être très différentes.

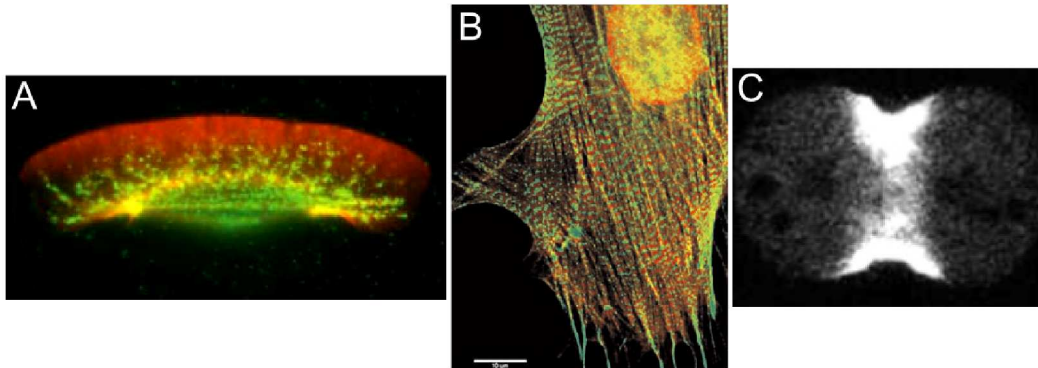


Fig. 6.4 : Exemples de structures contractiles cellulaires

(A) Distributions de la myosine (présente majoritairement à l'arrière de la cellule, en vert) et de l'actine (rouge) dans une cellule de Kératocyte. Tiré de [Barnhart et al.(2011)]. (B) Fibres de stress sarcomériques dans une cellule de fibrocyte. Alternance de bandes de myosines (rouge) et d'alpha-actinine (vert). Tiré de [Peterson et al.(2004)]. (C) Anneau de cytokinèse dans une cellule de Dictyostelium. La myosine II est marquée (blanc). Tiré de [Yumura(2001)].

La plupart des expériences réalisées *in-vitro* afin de mimer ces systèmes cellulaires contractiles ont été faites à partir de structures d'actine n'ayant pas d'architectures bien

2. Nous appelons désordonné un réseau dans lequel la polarité des filaments est aléatoire; un réseau ordonné aura une organisation de polarité spécifique.

définies [Bendix et al.(2008), Thoresen et al.(2011)]. Il est donc difficile avec les données de la littérature d'émettre un consensus entre l'architecture des filaments d'actine, l'effet des moteurs moléculaires et la propriété contractile qui en découle.

Les structures présentées ci-dessus sont toutes formées par un ensemble de filaments d'actine et de moteurs moléculaires mais d'autres protéines (les protéines de pontage en particulier) peuvent être présentes. Il nous a donc semblé particulièrement important d'étudier comment le couplage entre l'architecture des réseaux d'actine et leur composition biochimique module la contraction des structures d'actine cellulaires. Ces travaux s'intègrent dans l'étude plus générale des mécanismes permettant d'expliquer les phénomènes contractiles.

6.2 Études de la contractilité

Le mécanisme de contraction des structures cellulaires de filaments d'actine soulève 2 questions principales :

- Pourquoi certaines structures contractent ? Quelles sont les conditions nécessaires pour générer cette contractilité ?
- Quelles sont les caractéristiques (vitesse, force, stabilité) de cette contraction ?

6.2.1 Les modèles illustrant la contractilité

La contraction a été étudiée dans un premier temps au niveau des cellules musculaires. L'organisation des filaments à l'intérieur de ces cellules a été établie comme un paramètre essentiel à leur contractilité. En effet, les fibres musculaires sont organisées de telle sorte que les filaments d'actine sont agencés avec une polarité bien définie. Cette organisation dite sarcomérique est la base architecturale de la contractilité. En effet les filaments d'actine associés aux 2 extrémités des mini-filaments de myosines étant de polarités opposées (Figure 6.5), les moteurs moléculaires vont pouvoir les faire glisser les uns par rapport aux autres dans des directions opposées, ce qui engendre une contraction, selon le modèle introduit dans [Huxley(1969)] (Figure 6.2 (B)). Néanmoins, des protéines de pontage étant intercalées entre les unités contractiles, la fibre sarcomérique ne peut coalescer et se met sous tension (Figure 6.5).

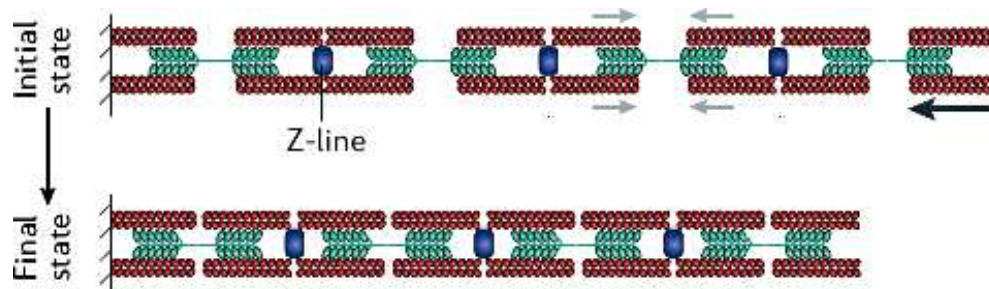


Fig. 6.5 : Organisation et contraction des fibres de stress sarcomériques

Organisation sarcomérique (alternance de zones d'ancrage des filaments d'actine ("Z-line", en bleu), contenant notamment des protéines d' α -actinine et de mini-filaments de myosine II, en vert). Filaments de polarités alternées (en rouge). Adapté de [Murrell et al.(2015)].

À l'échelle macroscopique la fibre musculaire est composée d'unités contractiles ou mini-sarcomères qui se trouvent en série les unes par rapport aux autres. Pourtant, dans de nombreuses structures contractiles, la polarité des filaments est plus aléatoire et donc le

mécanisme de la réponse contractile à une échelle macroscopique est moins évident. En effet, si on considère 2 filaments antiparallèles déplacés par un moteur moléculaire, selon la position de celui-ci par rapport aux extrémités barbées, leur réorganisation entraînera une contraction ou une expansion du système³ (Figure 6.6, [Lenz et al.(2012)]).

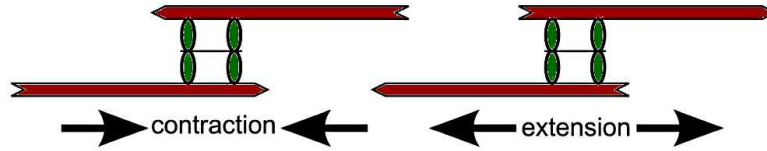


Fig. 6.6 : Effet expansif ou compressif de la myosine sur une paire de filaments

2 filaments d'actine antiparallèles (rouge) sont soit regroupés par la myosine (vert), soit éloignés, selon la position de la myosine sur ces filaments par rapport à leurs extrémités barbées. Adapté de [Lenz et al.(2012)].

Toutefois, des reconstitutions *in-vitro* d'un système minimal de faisceaux d'actine non organisés [Thoresen et al.(2011), Thoresen et al.(2013)] révèlent un comportement contractile et non expansif (Figure 6.7), qui dépend seulement de la concentration et du type des myosines. De même, des filaments d'actine en présence d'une forte concentration de Methylcellulose vont créer spontanément des faisceaux d'actine non organisés (par forces d'interaction, voir partie précédente). Ces faisceaux contractent sous l'action de la myosine pour former un état d'équilibre d'un aster de faisceaux de filaments parallèles [Takiguchi(1991)]. **Quelles sont donc les conditions dans lesquelles la contractilité est favorisée par rapport à l'expansion ?**

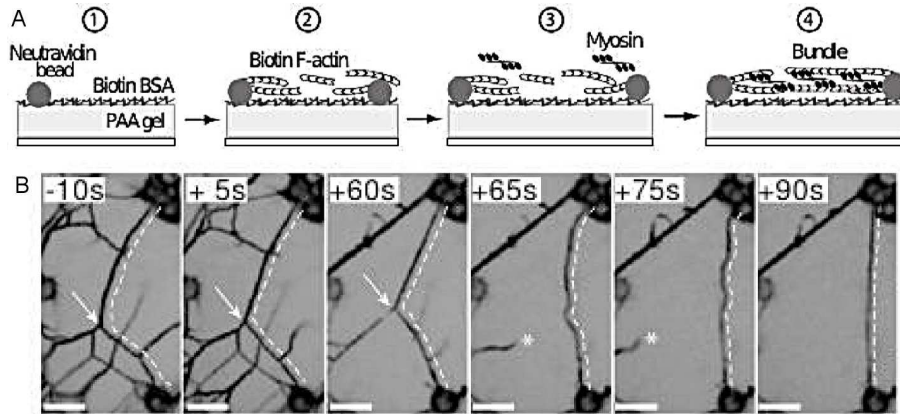


Fig. 6.7 : Contraction *in-vitro* d'un faisceau désorganisé d'actine

(A) Méthode expérimentale pour construire un faisceau désorganisé d'actine. (B) Contraction (mise sous tension) d'un faisceau ainsi créé, par l'action des mini-filaments de myosines. Tiré de [Thoresen et al.(2011)].

De nombreuses études théoriques ont cherché à explorer les conditions expliquant la contractilité pour des réseaux ou des faisceaux désorganisés. Je présente ci-dessous les points qui me semblent être les plus importants.

Dans l'étude de [Kruse et Jülicher(2000)], le faisceau est décrit comme un champ en 1D de densité de filaments désorganisés. Les paramètres décrivant le réarrangement induit par

3. Il faut néanmoins noter que l'organisation finale est la même : le moteur moléculaire regroupe les 2 extrémités des filaments.

les moteurs moléculaires sur une paire de filaments parallèles et sur une paire de filaments antiparallèles (Figure 6.8 (A)) vont déterminer si l'équilibre de l'état homogène du faisceau sera déstabilisé ou non. En particulier, le réarrangement des filaments antiparallèles conduit à une séparation des extrémités pointues et barbées. Si une paire de filaments parallèles n'est pas affectée par l'action des moteurs, nous obtenons alors seulement un tri de polarité des filaments mais le faisceau ne se contracte pas (Figure 6.8 (B), cas 2). En revanche si les moteurs agissent sur les filaments parallèles pour en aligner les extrémités \oplus (les moteurs modélisés allant vers les extrémités \oplus ici), nous obtenons alors un régime de contraction du faisceau (Figure 6.8 (B), cas 1).

Les moteurs moléculaires pourraient faire glisser les filaments parallèles les uns par rapport aux autres s'ils restent associés à ces derniers via leurs extrémités (Figure 6.8 (A)).

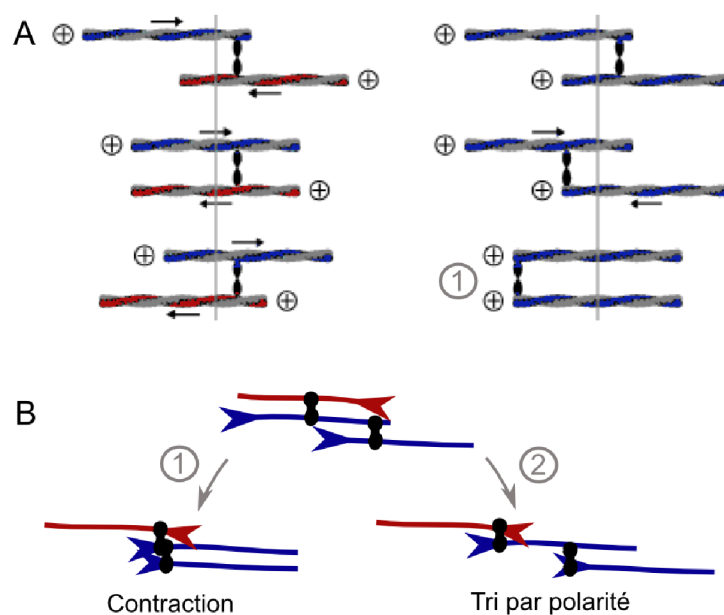


Fig. 6.8 : Effet des moteurs sur les paires de filaments parallèles et antiparallèles : implications pour la contraction du faisceau

(A) Effet d'un moteur sur une paire de filaments antiparallèles (à gauche). Les 2 extrémités barbées des filaments vont être regroupées par le moteur. Dans le cas d'une paire de filaments parallèles (à droite) si les moteurs restent accrochés à l'extrémité barbée (cas 1), les 2 extrémités barbées des filaments vont se retrouver alignées. Tiré de [Kruse et Jülicher(2000)].

(B) Implication pour la contraction/expansion du faisceau. Configuration initiale d'un faisceau désorganisé contenant 3 filaments et 2 moteurs. Un moteur est sur une paire de filaments parallèles, l'autre sur une paire de filaments antiparallèles (en haut). Configuration finale dans le cas (1) où les filaments parallèles sont affectés par l'action du moteur (en bas à gauche). Toutes les extrémités barbées sont alignées, ayant pour conséquence une contraction globale. Configuration finale dans le cas (2) où les filaments parallèles ne sont pas réarrangés par l'action du moteur (en bas à droite). Ils gardent donc leurs positions relatives. Les filaments sont triés selon leur polarité et nous obtenons globalement une expansion du faisceau. Les filaments bleus représentent les filaments orientés vers la gauche, les filaments rouges ceux orientés vers la droite.

Ainsi, en supposant que les moteurs se dissocient aussitôt qu'ils atteignent les extrémités des filaments, les filaments parallèles vont garder leurs positions relatives les uns par rapport aux autres. Ils sont alors déplacés par l'action des moteurs pour être triés, créant une expansion du faisceau (Figure 6.8 (B), cas 2). Les simulations numériques développées dans [Zemel et Mogilner(2009)] montrent que dans ce cas, la transmission des forces (vitesses de

glissement des filaments) dépend en particulier de la connectivité des filaments (contrôlée par la concentration de myosines). Si cette connectivité est importante, les forces seront transmises d'un bout à l'autre de la fibre. Dans le cas d'une connectivité faible, les moteurs moléculaires agiront uniquement localement. Il est intéressant de noter que dans le cas de faisceau plus long ($800 \mu m$), le tri de polarité se fait alors localement, conduisant à une organisation de type sarcomérique.

Ce tri de polarité a aussi été expliqué par le modèle de [Nakazawa et Sekimoto(1996)] sur les faisceaux désorganisés en une dimension par la différence d'action des myosines sur les paires de filaments parallèles et celles de filaments anti-parallèles. Notamment, les auteurs ont constaté qu'il est nécessaire d'ajouter dans leur modèle une force de friction entre les filaments pour obtenir un tri de polarité "sarcomérique".

Le modèle développé dans [Lenz et al.(2012)] montre que créer une asymétrie entre les paires de filaments compressives ou expansives permet d'établir la contraction, même dans le cas où les filaments parallèles ne sont pas réorganisés par les moteurs moléculaires. L'hypothèse principale de cette étude repose sur le principe que l'asymétrie est générée par la capacité des filaments d'actine à se courber sous l'action de force. Bien que les filaments soient en général courts dans les fibres de stress ($\approx 1 \mu m$), la différence de vitesses de déplacement des protéines de pontage et celle des moteurs créerait une tension suffisamment forte pour courber les filaments (Figure 6.9).

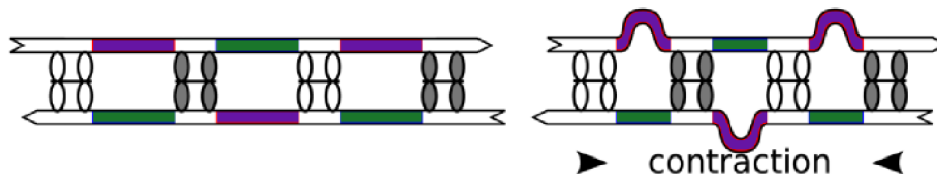


Fig. 6.9 : Modèle de contraction par brisure de symétrie entre les états compressifs et expansifs

Équilibre entre les états expansifs (vert) et contractiles (violet) dans un faisceau désorganisé (à gauche). Le faisceau contient 2 types différents de moteurs, rapides (gris) et lents (ou des protéines de pontage, blanc). Cet équilibre est brisé si les filaments peuvent flamber et nous obtenons alors la contraction du faisceau (à droite). Tiré de [Lenz et al.(2012)].

Pourtant, Dasanayake et al. montrent par des simulations que la contraction dans un réseau désorganisé serait possible même si les myosines ne restent pas associées aux extrémités, ou si l'on n'a pas d'effet de non linéarité comme la courbure des filaments. En effet, dans leur modèle les paires de filaments en expansion seraient moins stables que les paires en contraction. Et par conséquent un filament de myosine associé à un état expansif va se réorganiser afin de provoquer un état contractile [Dasanayake et al.(2011)].

Finalement, une étude par simulations numériques, dont le principe est très proche de *Cytosim*, a permis de montrer que la contraction d'un faisceau désorganisé dépend de l'interaction entre les protéines de pontage et les moteurs moléculaires [Kim(2014)]. En effet, sans protéine de pontage, des concentrations de moteurs élevées sont nécessaires pour propager de façon macroscopique les contractions locales exercées par les moteurs. De plus les moteurs, ne rencontrant que peu de résistance, exercent une force limitée. En revanche, en présence de protéines de pontage, les moteurs vont exercer des forces bien plus efficaces pouvant se propager à toute la fibre. Les concentrations relatives de ces 2 acteurs sont donc

cruciales pour déterminer l'efficacité de la contraction. Enfin les auteurs ont remarqué que dans leurs simulations les événements de rotation des moteurs ne sont pas observés, mais que le phénomène de flambage des filaments semble dominant.

6.2.2 Caractéristiques de la contraction

Un des aspects importants dans l'étude des structures contractiles est d'estimer les forces qui peuvent être transmises ou produites par ces structures au reste de la cellule, ou à la matrice extra-cellulaire et les conséquences de ces forces sur le comportement cellulaire. Les études de la tension présente dans les fibres de stress de cellules adhérentes (par ablation laser en évaluant la relaxation induite au niveau de la fibre), ont notamment permis de constater que les fibres de stress d'une même cellule ne sont pas soumises à la même tension selon leur localisation cellulaire [Kumar et al.(2006)] et selon la concentration locale de protéines [Colombelli et al.(2009)].

Lorsque la structure contractile n'est pas contrainte par des points focaux d'adhésion (fibres de stress) ou des tensions internes (arcs transverses), la tension générée par les moteurs provoque la coalescence de la structure. C'est en particulier le cas de l'anneau de cytokinèse. La valeur de la tension dans ce cas est corrélée à l'observation de la vitesse de la contraction de l'anneau. Lorsqu'il se forme, des moteurs moléculaires sont recrutés et s'accumulent sur celui-ci. Lorsque la concentration des moteurs atteint une certaine valeur limite, une phase de contraction à vitesse élevée et constante apparaît. Cette vitesse de contraction de l'anneau est proportionnelle à sa taille [Calvert et al.(2011)]. Ainsi, pour des cellules de différentes tailles, le temps nécessaire à la contraction de l'anneau de cytokinèse est similaire [Carvalho et al.(2009)]. Ceci est expliqué dans ces travaux par le fait que le nombre total d'unités contractiles formant l'anneau est proportionnel à son rayon (Figure 6.10).

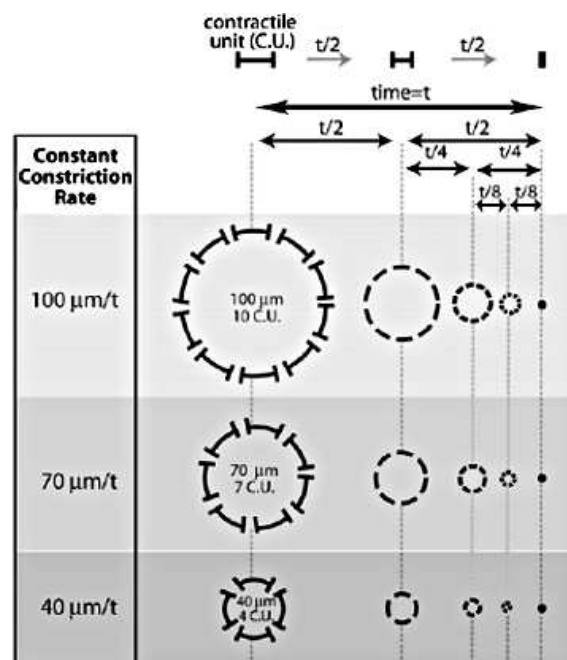


Fig. 6.10 : Contraction de l'anneau de cytokinèse selon son rayon initial

Modèle de la contraction d'anneaux de cytokinèse de différentes tailles. Un anneau est composé d'unité contractile de taille fixe. Un cercle de plus grand rayon est donc composé de plus d'unités contractiles. Le désassemblage des unités contractiles provoquent leur raccourcissement et donc la contraction de l'anneau, avec une vitesse constante. Tiré de [Carvalho et al.(2009)].

Cependant, les études réalisées récemment dans notre équipe montrent que la loi du "plus grand, plus fort" n'est pas conservée quelque soit la taille de la structure contractile étudiée et que des limites existent.

6.2.3 Les conditions biochimiques pour la contractilité

La composition biochimique des réseaux d'actine affecte leurs propriétés contractiles [Calvert et al.(2011), Colombelli et al.(2009), Carvalho et al.(2009)]. En particulier, la reconstitution *in-vitro* de réseaux désorganisés d'acto-myosine a permis d'explorer les concentrations de myosines et d' α -actinine nécessaires à la contraction et a pu identifier que celle-ci n'est effective que dans un domaine de concentration particulier ([Bendix et al.(2008)], Figure 6.11 (A)). Des simulations numériques ont corroboré ce diagramme de phase, montrant ainsi l'importance de l'équilibre entre les liens passifs (les protéines de pontage) et les liens actifs (les moteurs) dans le contrôle de la réponse contractile ([Wang et Wolynes(2012)], Figure 6.11 (B)).

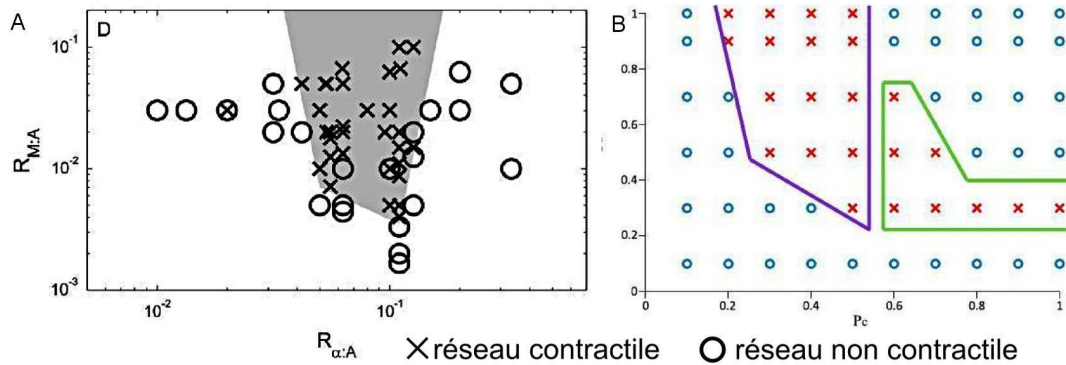


Fig. 6.11 : Diagramme de phase de la contraction de réseaux d'acto-myosine désorganisés

(A) Diagramme de phase de contraction de réseaux *in-vitro*. En abscisse, le ratio de concentration d' α -actinine sur la concentration d'actine. En ordonnée, le ratio de concentration de myosines sur la concentration d'actine. Tiré de [Bendix et al.(2008)]. (B) Diagramme de phase de contraction de réseaux simulés. En abscisse, connectivité du réseau (probabilité de connexion entre 2 nœuds). En ordonnée, concentration de moteurs (probabilité de lien actif). Tiré de [Wang et Wolynes(2012)]. Les régimes contractiles sont indiqués par les croix, les cercles désignant les régimes non contractiles.

Le comportement contractile des réseaux affecte aussi leurs propriétés élastiques : en effet la réorganisation des filaments par les moteurs leur permet de s'adapter ou de résister à une déformation imposée. Ainsi, des études sur des gels d'actine (des réseaux désorganisés composés de nombreux filaments reliés par des protéines de pontage) ont montré des comportements visco-élastiques différents en fonction de leurs organisations et compositions biochimiques [Mizuno et al.(2007), Kim et al.(2011), Fallqvist et al.(2014)].

Une propriété importante des réseaux de filaments d'actine repose sur le degré de connectivité entre les filaments qui le composent. En effet, les filaments peuvent être connectés en sous groupes plus ou moins indépendants. Ce phénomène a pour conséquence de générer des comportements collectifs qui vont se propager plus ou moins dans le gel d'actine [Köhler et al.(2011)]. Ainsi, on pourra observer un nombre plus ou moins important de points locaux de contraction, selon la distribution initiale de la connectivité dans le réseau

d'actine [Bendix et al.(2008)]. Une déformation macroscopique du réseau sera d'autant plus possible que la connectivité aura atteint le niveau de percolation⁴ [Alvarado et al.(2013), Sheinman et al.(2015)].

La réorganisation d'un réseau de microtubules par des moteurs moléculaires (les kinésines) a aussi été numériquement estimée [Nédélec et al.(1997)]. Selon la propriété contractile des moteurs et selon les conditions d'organisation du réseau, les microtubules peuvent se réorganiser selon des structures différentes, formant ainsi par exemple un vortex, ou des asters. Ces simulations ont aussi permis de montrer que le nombre d'asters (ou de clusters) formés dépend des paramètres cinétiques de l'assemblage des microtubules [Surrey et al.(2001), Nédélec et Surrey(2001)]. En effet, la vitesse d'assemblage des microtubules dans ces simulations affecte le phénomène de percolation du réseau. Bien que ces simulations ont uniquement exploré la réorganisation de réseaux de microtubules, le modèle présenté semble applicable au cas de la réorganisation d'un réseau d'actine sous l'action de moteurs moléculaires.

6.2.4 Questions soulevées

L'action d'un moteur moléculaire sur 2 filaments est bien connue, mais comment ce comportement se transfère de façon collective au niveau d'un réseau d'actine est moins évident. De nombreuses études *in-vivo* et *in-vitro* cherchent à comprendre et à caractériser ce phénomène, souvent complétées par des études théoriques permettant en particulier d'explorer sous quelles conditions le réseau sera effectivement contractile.

Ces études se concentrent dans l'ensemble sur une structure particulière de réseau (faisceau de filaments antiparallèles, organisé ou non, réseau désorganisé et anneau de cytocinèse), et pour des conditions biochimiques spécifiques. S'il est maintenant clair que la concentration de protéines de pontage détermine en particulier si le réseau est contractile ou non ([Bendix et al.(2008), Wang et Wolynes(2012)], Figure 6.11), la façon dont cette propriété évolue selon l'architecture du réseau n'est en revanche pas encore établie.

Il a été en effet montré *in-vitro* que différentes structures d'actine n'ont pas le même comportement contractile [Reymann et al.(2012)], ceci n'étant pas surprenant étant donné que les moteurs n'affectent pas les filaments parallèles comme les filaments antiparallèles. Donc il est essentiel d'étudier la relation entre architecture du réseau d'actine et composition biochimique pour comprendre la réponse de structures contractiles cellulaires.

Ceci représente l'objectif majeur que nous avons essayé d'atteindre dans ce chapitre en combinant des expériences *in-vitro* et des simulations numériques. Cependant avant d'étudier la contraction de systèmes complexes, j'ai préféré étudier *in-silico* le comportement d'un système d'actine plus simple, selon différentes conditions, pour mieux appréhender les différents paramètres influençant la réponse contractile d'un réseau d'actine.

4. La percolation correspond à la transition d'un réseau constitué de groupes de filaments indépendants à un réseau dans lequel tous les filaments sont connectés dans un même groupe.

7. SIMULATIONS DE LA CONTRACTILITÉ : RÉORGANISATION DES FILAMENTS

Pour étudier la contractilité de structures d'actine de différentes complexités *in-silico*, le principe et les paramètres généraux sont similaires à ceux utilisés dans la partie précédente (cf 5.1). Mais pour ces simulations, nous allons aussi devoir ajouter 2 nouveaux composants : des entités mimant les moteurs moléculaires et des entités représentant les protéines de pontage.

7.1 Simulation des protéines nécessaires à la contractilité

Pour comprendre et caractériser la contraction de structures d'actine observée *in-vitro*, les moteurs moléculaires simulés doivent mimer les comportements principaux de la myosine utilisée dans ces expériences, la myosine VI.

7.1.1 Moteurs moléculaires : \approx myosine VI

La myosine VI que l'on utilise dans le laboratoire est composée de 2 têtes seulement et a la particularité (par rapport aux autres myosines) de se déplacer vers l'extrémité pointue des filaments, due la présence d'un insert unique entre la tête de la myosine et le bras de levier [Park et al.(2007)]. Elle est simulée comme une entité composée de 2 têtes reliées par un ressort de longueur d'équilibre non nulle (cf 3.2.4). Chaque tête est implémentée comme un `motor` (cf 3.2.2) se déplaçant vers l'extrémité pointue du filament sur lequel elle s'attache. Lorsqu'elle atteint l'extrémité du filament, la tête de myosine se détache du filament et diffuse (si l'autre tête est aussi libre).

La table 7.1 résume les principaux paramètres permettant de simuler une myosine.

Les autres entités intervenant dans la contraction des structures d'actine sont les protéines de pontage. Dans notre système expérimental, nous utilisons la protéine α -actinine, dont nous allons décrire ci-dessous l'implémentation.

7.1.2 Protéines de pontage : \approx α -actinine

Par simplicité, les protéines de pontage sont simulées comme un lien statique (leur dynamique est négligée). On pourrait évidemment faire les simulations avec des paramètres dynamiques plus réalistes, mais cela nécessiterait de simuler plus d'entités pour des conclusions similaires (cf 7.3.2). Par la suite, j'utiliserais le nom de "crosslinkers" pour désigner ces entités permettant de simuler les protéines de pontage. Un "crosslinker" est considéré comme un ressort reliant 2 têtes statiques : qui se lie au filament d'actine de façon irréversible [Ennomani et al.(2015), Figure S2]. Les paramètres principaux permettant de simuler ces entités sont donnés dans la table 7.2.

En utilisant cette configuration, nous disposons à présent d'un outil de simulation nous permettant d'explorer le phénomène de contraction pour différentes structures d'actine.

Hand myo6		
Vitesse de déplacement	$-0.3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	Vitesse de déplacement v_{max} de la tête de la myosine sur un filament vers son extrémité pointue [Rock et al.(2001)] (cf 3.2.2).
Force d'arrêt	2 pN	Force f_{sm} (cf 3.2.2) nécessaire pour arrêter une tête de myosine [Altman et al.(2004), Oguchi et al.(2008)].
Distance d'attachement	$0.05 \mu\text{m}$	Cette distance est de l'ordre de grandeur de la longueur à partir de laquelle une tête peut chercher un site d'attachement.
Force de détachement	3.65 pN	Force nécessaire pour provoquer le détachement d'une tête de myosine [Oguchi et al.(2008)].
Taux d'attachement	5 s^{-1}	Taux d'attachement d'une tête de myosine à un filament. L'ordre de grandeur de ce taux est calculé d'après les données de [Cruz et al.(2001), Robblee et al.(2004)].
Couple myosin		
Longueur	$0.03 \mu\text{m}$	Longueur de repos du ressort entre les 2 têtes [Altman et al.(2004)].
Raideur du ressort	$100 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$	Raideur du ressort, doit être fort.

Tab. 7.1 : Modélisation de la myosine VI

Hand statlinkh		
Distance d'attachement	$0.1 \mu\text{m}$	Distance à partir de laquelle une tête libre peut s'attacher au filament. Empirique.
Taux de détachement	0 s^{-1}	Statique.
Taux d'attachement	10 s^{-1}	Attachement très rapide. Empirique.
Couple crosslinker		
Longueur	$0.04 \mu\text{m}$	Longueur de repos du ressort entre les 2 têtes \approx distance entre 2 filaments reliés par α -actinine [Wachsstock et al.(1993), Bao et al.(2013)].
Raideur du ressort	$100 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$	Raideur du ressort entre les 2 têtes, doit être fort.

Tab. 7.2 : Modélisation d'une protéine de pontage

Nous allons commencer par présenter les principes de la contraction dans des simulations réalisées pour des systèmes simples, pour ensuite s'intéresser à l'étude de la contraction de structures d'actine plus complexes en fonction de leur architecture et de leur composition biochimique.

7.2 Principes de la contraction *in-silico*

Pour que la myosine puisse faire glisser 2 filaments l'un par rapport à l'autre, il faut que ces 2 têtes s'attachent à des filaments distincts.

7.2.1 Au niveau de 2 filaments

Si les 2 filaments ont la même orientation, alors les têtes de la myosine se déplacent dans la même direction. Elles ne rencontrent donc pas de résistance et se déplacent simplement le long des filaments, sans exercer de force importante sur ces filaments. Ainsi comme illustré par la simulation sur la figure 7.1, à gauche, le moteur moléculaire se déplace par rapport aux filaments, mais les filaments fluctuent seulement sous l'effet du mouvement brownien. En revanche, si les 2 filaments ont une polarité opposée, les 2 têtes se déplacent dans des directions opposées, provoquant ainsi le glissement des filaments d'actine les uns par rapport aux autres (Figure 7.1, à droite).

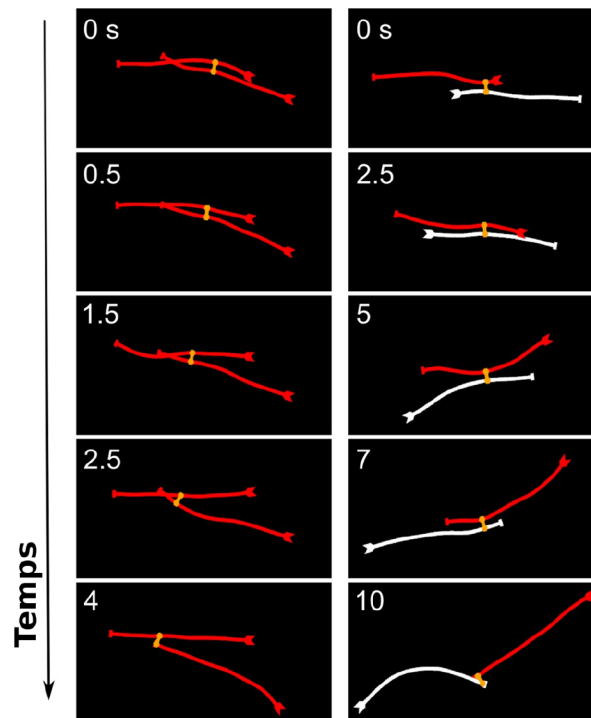


Fig. 7.1 : Simulation de l'action d'un moteur moléculaire sur 2 filaments selon leur polarité relative

Évolution au cours du temps du moteur moléculaire (orange) attaché à 2 filaments, de même polarité (parallèles, gauche) ou de polarités opposées (antiparallèles, droite).

7.2.2 Extension à plusieurs filaments

Ce principe est transférable aux réseaux de plus de 2 filaments. Ainsi un réseau parallèle ne sera que peu affecté par les moteurs moléculaires, alors qu'un réseau antiparallèle peut se contracter [Reymann et al.(2012)]. Selon l'angle formé par 2 micropatrons opposés, les filaments d'actine forment différentes organisations (cf partie 5.2). Les moteurs moléculaires vont ainsi agir sur le réseau formé en fonction de cette organisation. En effet, si l'angle

est proche de 0° , les filaments forment un réseau antiparallèle, qui sera déformé en un aster suite à l'action des moteurs moléculaires (Figure 7.2, haut). Pour un angle de 90° , les filaments sont majoritairement parallèles. Seule la zone entre les 2 micropatrons contient des filaments antiparallèles et c'est donc cette zone qui sera déformée en premier (Figure 7.2, bas). Finalement, pour un angle de 45° pour lequel les 2 structures cohabitent, la partie antiparallèle du réseau contracte (Figure 7.2, milieu) alors que la partie parallèle est majoritairement insensible à l'action des moteurs moléculaires.

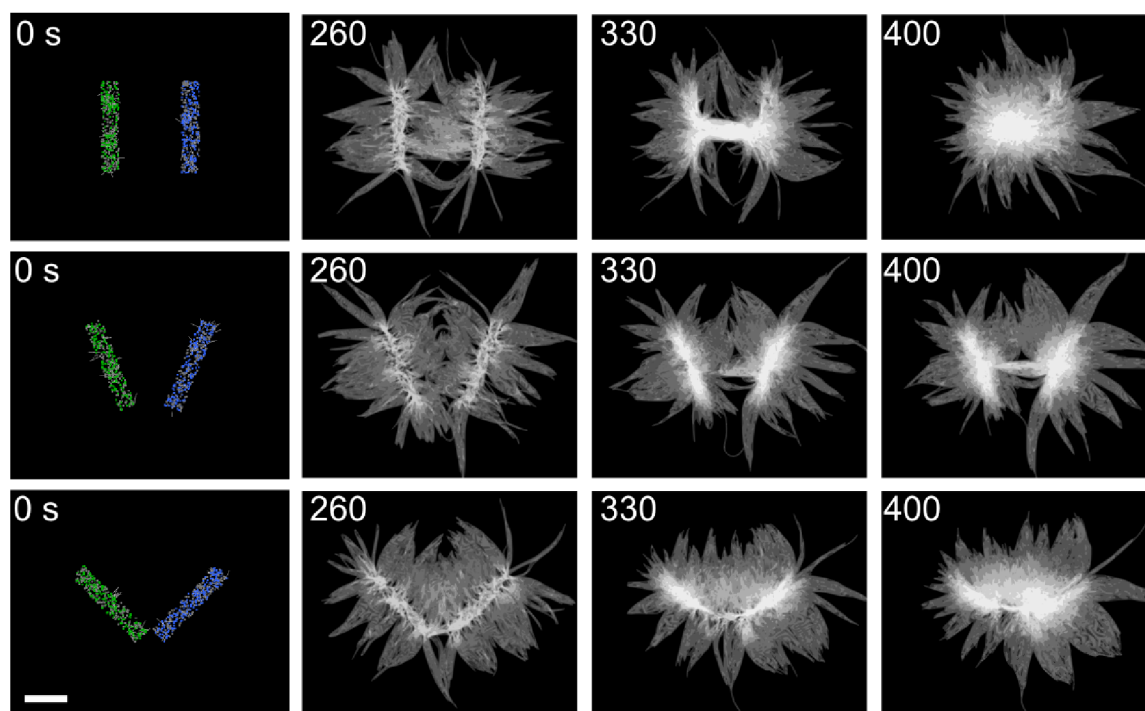


Fig. 7.2 : Contraction des différents structures d'actine

Contraction au cours du temps d'un pattern avec un angle initial de 0° (haut), de 45° (milieu) et 90° (bas). Les patterns font $8 \mu\text{m}$ de long et $1.5 \mu\text{m}$ de large. 700 filaments sont simulés avec 6000 moteurs moléculaires. Échelle : $4 \mu\text{m}$.

De plus, un troisième type de réseau est présent dans ces simulations. Un réseau branché se forme en effet sur les zones de nucléation. La contraction de ce réseau est moins évidente à considérer ici étant donné qu'il n'est pas isolé mais relié aux filaments en faisceaux parallèles ou antiparallèles. Pour éliminer les interférences possibles, la contraction d'un réseau branché seul est simulée (Figure 7.3). Les moteurs moléculaires vont entraîner la coalescence de cette structure en un aster situé au centre de gravité du réseau initial.

À présent que nous avons illustré la différence de contraction selon le type de réseau (parallèle, antiparallèle ou branché), nous allons étudier quelles sont les conditions favorisant la contraction d'un faisceau de filaments alignés mais de polarités aléatoires.

7.3 Contrôle de la contractilité

La partie 6.2 révèle l'importance des propriétés dynamiques des moteurs moléculaires lors de la contraction. J'ai donc étudié en quoi ces propriétés affectaient les simulations réalisées.

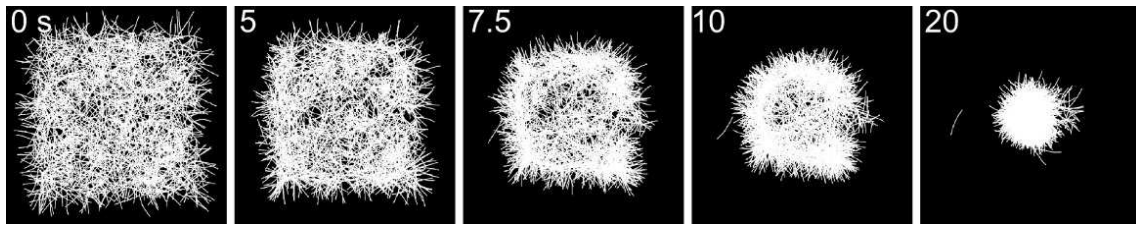


Fig. 7.3 : Contraction d'un réseau branché

Simulation de la contraction d'un réseau branché par les moteurs moléculaires. Le micropatron fait $10 \times 10 \mu\text{m}^2$, avec 2200 filaments et 1000 moteurs.

7.3.1 Effet des moteurs moléculaires

Théoriquement, si les moteurs peuvent affecter les filaments parallèles, notamment en restant accrochés à leurs extrémités, alors même un faisceau désorganisé de filaments alignés peut contracter [Kruse et Jülicher(2003)]. J'ai donc réalisé des simulations en contraignant les moteurs atteignant l'extrémité pointue d'y rester associés. Sous cette hypothèse, la contraction du réseau est totale (Figure 7.4 (A)). En effet, tous les filaments se retrouvent regroupés en un "aster", avec leurs extrémités pointues regroupées au centre de cet aster. L'observation des étapes intermédiaires conduisant cet réorganisation est particulièrement intéressante. En effet, nous pouvons remarquer que les filaments se réorganisent suivant leur polarité générant une structure ordonnée. Cette organisation intermédiaire ressemble fortement à celle décrite dans des fibres de stress sarcomériques (Figure 7.4 (A), $t = 2-5$ s). Ces résultats sont aussi en accord avec des simulations numériques développées par [Friedrich et al.(2012)], visant à expliquer la formation d'une organisation sarcomérique. Ces auteurs ont pu obtenir l'agencement des filaments en unités sarcomériques en utilisant seulement des protéines de pontage processives (restant attachées aux extrémités des filaments) et en incluant la dynamique des filaments.

Dans le cas où les moteurs se détachent aussitôt qu'ils atteignent l'extrémité visée des filaments, les filaments parallèles ne sont alors pas affectés par leur action. Le modèle de [Zemel et Mogilner(2009)] prédit dans ce cas une absence de contraction du faisceau, remplacée par un tri de polarités des filaments à l'intérieur de celui-ci. Ce comportement est en effet observé dans de nouvelles simulations, entièrement identiques aux précédentes mais en supprimant la contrainte sur la dynamique des moteurs (Figure 7.4 (B)). Ceci montre que ce simple paramètre suffit à déterminer la réponse contractile dans ces conditions.

Pour tester l'effet de l'organisation des filaments aux extrémités du faisceau, j'ai ensuite simulé le même faisceau dans le cas d'un faisceau infini. Pour cela j'ai utilisé des conditions périodiques où les entités qui sortent de l'espace de simulation sur la gauche y re-entrent sur la droite). Dans ce cas, les filaments sont seulement triés localement et forment de petits faisceaux placés en série. Le faisceau global ne se contracte pas mais sa structure adopte une répartition des filaments suivant une polarité alternée (Figure 7.4 (C)).

Les structures contractiles d'actine sont rarement composées seulement de filaments et de moteurs moléculaires. Des protéines de pontage sont en effet en général présentes dans ces structures (cf 1.4.1). Or la présence de protéines de pontage peut modifier le comportement contractile de la structure [Bendix et al.(2008)]. Il nous a donc semblé très important d'ajouter ces entités à nos simulations et d'en discuter l'effet.

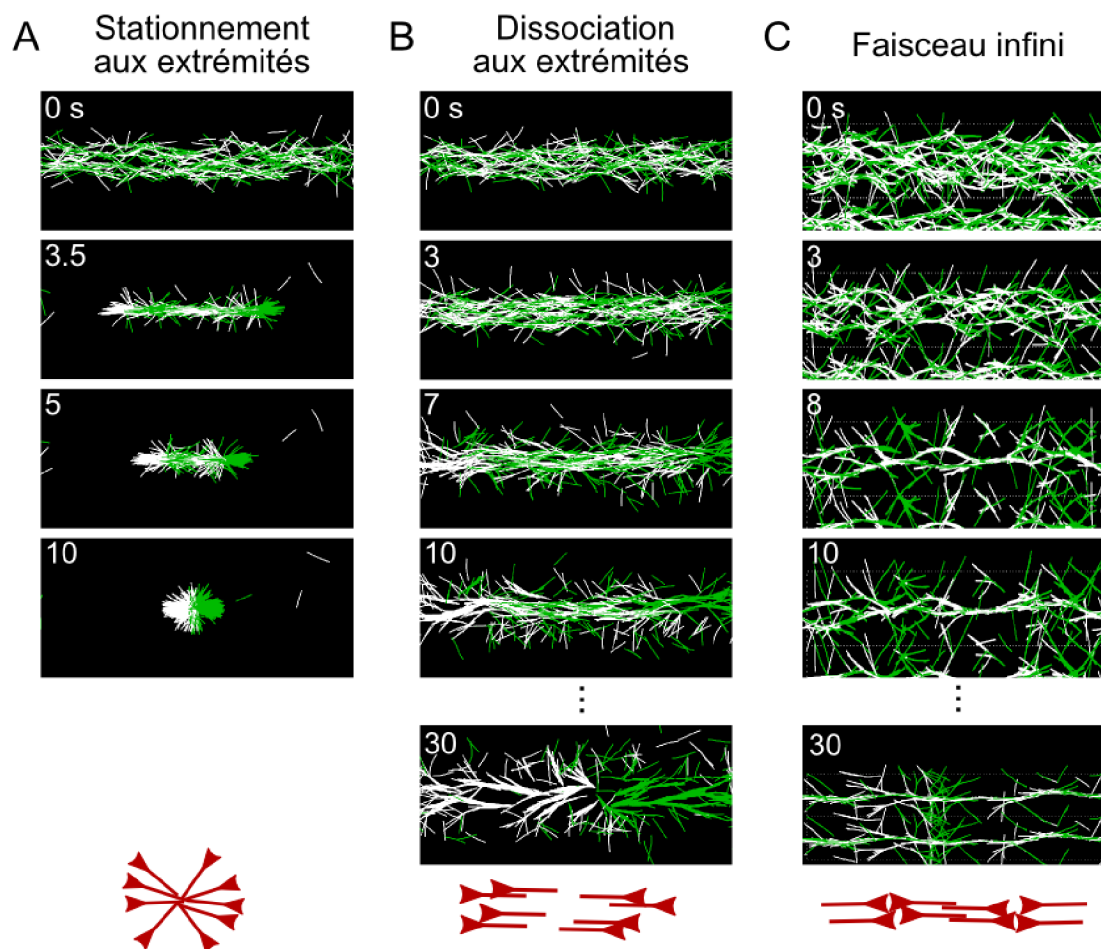


Fig. 7.4 : Simulations de la contraction d'un faisceau désorganisé selon les conditions (A) Simulation lorsque les moteurs moléculaires restent attachés aux extrémités pointues des filaments lorsqu'ils les atteignent. (B) Simulation lorsque les moteurs moléculaires se détachent lorsqu'ils atteignent les extrémités des filaments. (C) Simulation avec conditions périodiques (\approx faisceau infini). En vert, les filaments orientés vers la droite, en blanc ceux orientés vers la gauche. Simulations pour 800 filaments de $1 \mu\text{m}$ de long ($\pm 0.25 \mu\text{m}$) avec 3500 moteurs. Le faisceau fait $14 \mu\text{m}$ de long et $1.5 \mu\text{m}$ de large initialement. La polarité des filaments initiale est aléatoire.

7.3.2 Ajout de protéines de pontage

Nous allons discuter dans ce paragraphe l'effet des protéines de pontage sur la contraction d'un faisceau désorganisé.

En absence de protéines de pontage, nous avons illustré que suite à l'action des moteurs (qui ne restent pas attachés aux extrémités des filaments) les filaments sont réorganisés localement, et donnent lieu à un tri des filaments selon leur orientation (Figure 7.4 (B), Figure 7.5 (A)). L'ajout des "crosslinkers" (statiques) crée des liens entre les filaments. Les filaments ne peuvent plus être séparés en 2 groupes de différentes polarités indépendants. Les moteurs vont donc chercher à regrouper les extrémités pointues de tous les filaments, ce qui donne une déformation globale du faisceau qui se réorganise en un aster (Figure 7.5 (A)).

Néanmoins, si les "crosslinkers" ont une propriété d'attachement sélective (par exemple, la fascine ne relie que des filaments d'orientations parallèles [Courson et Rock(2010)]), le

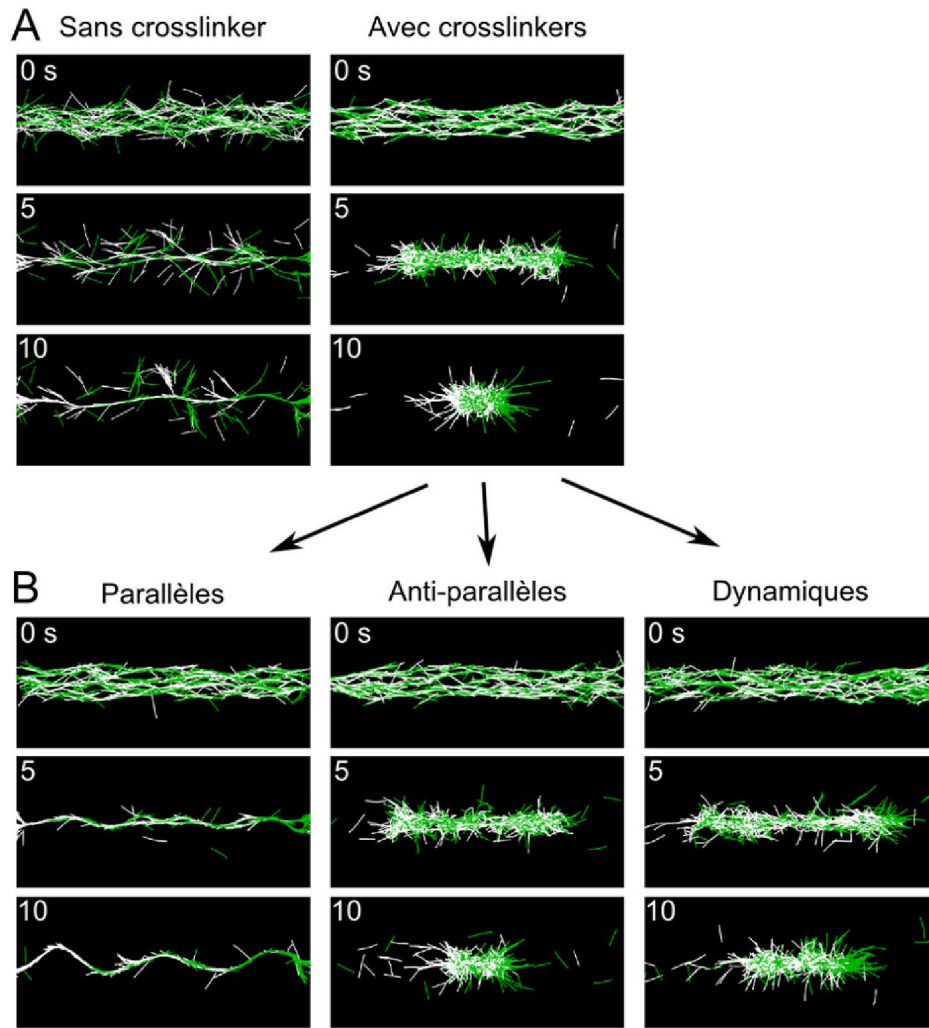


Fig. 7.5 : Effet de l'ajout de "crosslinkers" sur la contraction d'un faisceau désorganisé (A) Simulations de la réorganisation d'un faisceau désorganisé en l'absence (gauche) et en présence (droite) de "crosslinkers" statiques. (B) Mêmes simulations pour des "crosslinkers" qui s'attachent seulement aux filaments parallèles (gauche), antiparallèles (milieu) ou s'ils sont dynamiques (droite). En vert, les filaments orientés vers la droite, en blanc orientés vers la gauche. Simulations pour 800 filaments de $1 \mu\text{m}$ de long ($\pm 0.25 \mu\text{m}$) avec 3500 moteurs. Initialement, le faisceau fait $14 \mu\text{m}$ de long et $1.5 \mu\text{m}$ de large et la polarité des filaments est aléatoire.

comportement collectif se trouve affecté. En effet, dans ce cas, les "crosslinkers" vont permettre la formation de plusieurs faisceaux parallèles indépendants favorisant leur tri selon leurs polarités (Figure 7.5 (B)).

A l'inverse si les "crosslinkers" ne peuvent s'attacher qu'à des filaments antiparallèles, la contraction du faisceau est conservée (Figure 7.5 (B)). Les filaments antiparallèles étant reliés les uns aux autres, leur séparation en 2 entités (triées par leurs polarités) est impossible. Les moteurs peuvent alors induire un comportement collectif et regrouper les extrémités pointues des filaments.

Finalement, une hypothèse importante utilisée dans nos simulations repose sur la fixation irréversible des "crosslinkers". Cependant, expérimentalement les protéines de pontage (par exemple l' α -actinine) sont souvent très dynamiques. Pour vérifier que ceci n'importe pas dans

le comportement de notre système simulé, nous avons testé dans quelques simulations le rôle de "crosslinkers" dynamiques (Figure 7.5 (C)). Nous avons pu observer que le comportement global du système n'est pas changé mais par contre l'efficacité des "crosslinkers" à une concentration donnée s'en trouve fortement diminuée. Dans ce dernier cas, pour retrouver le même comportement que celui observé pour des "crosslinkers" non dynamiques, il nous a été nécessaire d'augmenter la quantité de "crosslinkers" utilisés dans nos simulations. Dans la suite de ce travail, pour limiter le temps de calcul et simplifier le modèle, nous avons utilisé des "crosslinkers" non dynamiques.

Nous avons vu dans la partie II que les propriétés mécaniques des filaments affectaient fortement leur comportement collectif. Il est donc probable que ces propriétés interviennent aussi dans le phénomène de contraction. Il m'a semblé donc nécessaire de considérer en quoi la propriété mécanique du polymère affecte la réponse contractile.

7.3.3 Propriétés mécaniques des filaments

D'après [Lenz et al.(2012)], la courbure des filaments est un facteur nécessaire de brisure de symétrie entre les comportements expansifs ou compressifs des faisceaux d'actine. Pour tester si dans notre modèle la courbure des filaments est nécessaire pour générer une contraction, j'ai donc repris les simulations avec la configuration précédente, en présence de "crosslinkers" et en faisant varier la propriété mécanique des filaments. Pour comparer ces résultats, j'ai défini le niveau de contraction du faisceau comme la différence relative entre la distance moyenne des bouts pointus des filaments à leur centre de gravité à l'instant initial et à l'instant final. Si cette mesure est proche de 1, les extrémités pointues se sont rapprochées, il y a donc eu contraction. Une valeur autour de 0 indique qu'il n'y a pas ou peu d'effet. Une valeur négative signifie que le faisceau s'est étendu.

Quelle que soit la rigidité des polymères utilisée, nous observons une tendance contractile du faisceau (Figure 7.6), le niveau de contraction étant strictement positif dans tous les cas. Néanmoins, ce paramètre affecte fortement l'efficacité de la contraction (Figure 7.6), avec un niveau de contraction diminuant d'une valeur proche de 1 à une valeur proche de 0.2 seulement. En effet, les moteurs moléculaires peuvent difficilement déplacer les filaments pontés lorsqu'ils sont trop rigides. Les moteurs vont alors majoritairement faire pivoter les filaments afin de regrouper leurs extrémités pointues.

Dans ces conditions, la courbure des filaments serait donc un moyen de réaliser la contraction plutôt qu'une cause de la contraction.

Ces simulations sont en accord avec les conclusions obtenues par les différentes études présentées précédemment (cf 6.2). Elles permettent de rassembler et comparer directement les différents points abordés en utilisant une configuration unique, dont seul le paramètre étudié est modifié pour chaque cas.

Nous avons pu ainsi appréhender comment les différents paramètres influent sur le comportement contractile d'un réseau. En particulier, la structure des réseaux est un paramètre crucial, ainsi que la façon dont les filaments sont liés entre eux (par des moteurs qui restent aux extrémités, ou par des "crosslinkers" sélectifs ou non). Les propriétés plus spécifiques des filaments (dynamique, rigidité..) ou des "crosslinkers" (dynamique) semblent plutôt déterminer l'efficacité de la contraction que la tendance contractile. Il nous semble alors important de considérer en priorité la contraction de réseaux d'actine selon leur organisation et selon leurs connexions, donc leur propriété biochimique.

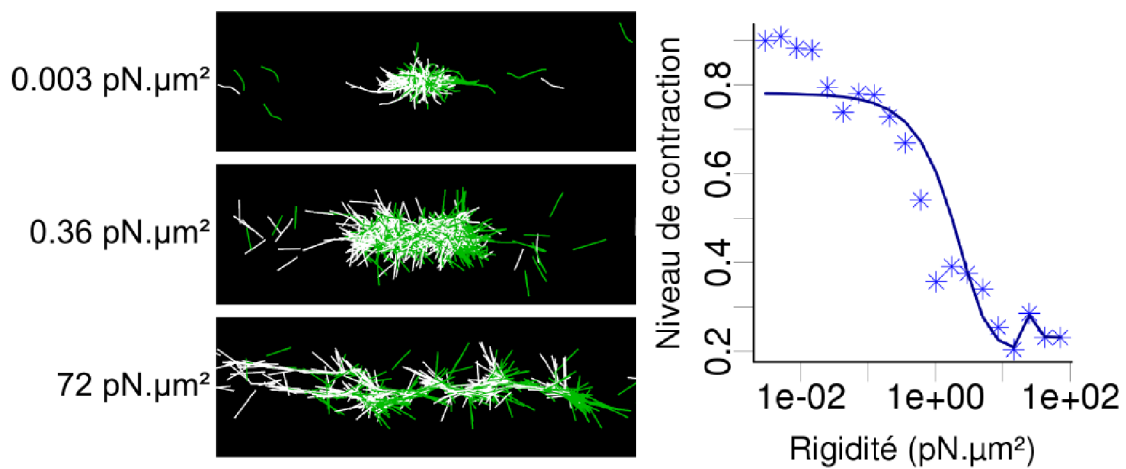


Fig. 7.6 : Effet de la rigidité des filaments sur la contraction d'un faisceau désorganisé
Simulation de la réorganisation d'un faisceau désorganisé pour des filaments de différentes rigidités. (gauche) État final (à $t = 10$ s) de 3 simulations avec des filaments de rigidités de $0.003 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^2$ (haut), $0.36 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^2$ (milieu) et $72 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^2$ (bas). En vert, les filaments orientés vers la droite, en blanc ceux orientés vers la gauche. (droite) Mesure du niveau de contraction en fonction de la rigidité des filaments simulée. L'axe des abscisses est représenté en échelle logarithmique. Le niveau de contraction est défini comme $\frac{d_i - d_f}{d_i}$, où d_i est la distance initiale moyenne des extrémités pointues à leur centre de gravité et d_f celle à l'instant final. Le niveau de contraction décroît lorsque la rigidité des filaments augmente, mais reste positif dans tous les cas. Les simulations sont faites avec 800 filaments de $1 \mu\text{m}$ de long ($\pm 0.25 \mu\text{m}$) avec 3500 moteurs et 1000 "crosslinkers". Le faisceau initial fait $14 \mu\text{m}$ de long et $1.5 \mu\text{m}$ de large. La polarité des filaments initiale est aléatoire.

8. ÉTUDE DE LA CONTRACTION DE STRUCTURES D'ACTINE

8.1 Contraction des architectures d'actine selon leur composition biochimique

L'observation attentive d'une cellule permet rapidement d'identifier la présence de structures contractiles ayant des propriétés différentes. Nous avons montré que les propriétés contractiles d'un réseau d'actine dépendent de l'organisation des filaments qui le composent (cf 7.2.2, [Reymann et al.(2012)]). Pour comprendre le comportement contractile de différentes structures cellulaires (le lamella, les fibres de stress sarcomériques, l'anneau de cytokinèse, cf 6.1.2), nous avons décidé de suivre une approche dite réductionniste en utilisant des systèmes biomimétiques permettant de reproduire *in-vitro* des structures d'actine proches de celles observées dans la cellule.

Pour cela nous avons utilisé la méthode des micropatrons (cf 4.1) qui nous permet de générer des structures en anneaux dont l'orientation des filaments d'actine va être variable [Ennomani et al.(2015), Figure 1, p.18]. L'observation de la réponse contractile de 3 différents types d'architectures (un réseau branché désordonné, une série de faisceaux ordonnés, un faisceau désordonné) montre qu'elles se comportent de façons distinctes. En particulier, la structure de faisceau désordonné ne se déforme pas sous l'action de moteurs moléculaires (article Figure 1, en bleu), alors que les 2 autres organisations (faisceaux ordonnés et réseau branché désordonné) se déforment rapidement sous l'action de ces mêmes moteurs. Pour établir certaines lois régissant ces différents comportements en fonction de l'organisation des filaments d'actine nous avons utilisé le modèle précédemment décrit dans *Cytosim* permettant la génération de structures spécifiques de filaments d'actine que nous avons complété avec des entités mimant les moteurs moléculaires. Ce modèle nous a permis d'avoir dans notre système d'étude accès à certains paramètres (nombre de filaments, nombre de protéines de pontage, nombre de moteurs) inaccessibles expérimentalement. Les simulations ont permis de montrer que dans le cas du faisceau désordonné, les filaments se déplacent les uns par rapport aux autres localement sans induire de déformation globale. Ceci s'explique par le manque de lien entre les filaments ne permettant pas de propager de façon macroscopique les forces locales.

Ces premières observations nous ont amenées à tester expérimentalement le rôle de protéines de pontage sur les 3 architectures étudiées. Nous avons donc utilisé l' α -actinine comme protéine de pontage *in-vitro*. Nous avons pu établir que la présence de cette protéine permet la contraction du faisceau désordonné [Ennomani et al.(2015), Figure 2, p.19]. Cependant l'ajout de l' α -actinine limite fortement la contraction des 2 autres structures. De façon remarquable, nous avons pu montrer qu'un même facteur chimique pouvait provoquer des comportements différents de structures d'actine. Nous avons alors essayé d'expliquer les bases moléculaires de ce phénomène.

Pour cela j'ai tout d'abord raisonné sur l'effet de la concentration des protéines de pontage sur le degré de connectivité (lien entre les filaments) de nos systèmes expérimentaux. J'ai ainsi formalisé la contribution de la concentration de protéines de pontage et de la concentration en complexe Arp2/3 sur la connectivité globale de nos organisations d'actine. En analysant la vitesse de contraction en fonction de cette connectivité, nous avons pu mettre en évidence que les comportements contractiles de ces 3 structures sont en fait

similaires [Ennomani et al.(2015), Figure 3, p.20]. En effet, à faible connectivité (<2), le réseau n'a pas encore percolé (tous les filaments ne sont pas connectés dans un seul et même groupe) et les actions des moteurs moléculaires ne sont donc pas transmises à l'ensemble du réseau. Pour une connectivité entre 2 et 3, le régime de contraction est optimal. Le réseau a en effet atteint le niveau de percolation et les forces locales engendrent une déformation globale. Finalement, pour une connectivité supérieure à 3, la percolation étant déjà atteinte, l'ajout de connexions ne fait que rigidifier le système et ralentit jusqu'à quasiment annuler la contraction.

Cependant, l'amplitude de la contraction pour une même connectivité n'est pas identique entre les 3 structures, ce qui suggère un effet important de l'organisation des filaments d'actine dans ces structures sur la réponse contractile. De plus, la connectivité est dans notre étude générée par 2 protéines, le complexe Arp2/3 (ou l'entité le simulant) et les protéines de pontage (ou les entités les simulant). Une connectivité due au seul complexe Arp2/3 est plus efficace au sens que le complexe relie 2 filaments non connectés dans tous les cas (puisqu'il en nucléé un nouveau), alors qu'une protéine de pontage peut connecter 2 filaments d'un même "cluster" (donc déjà relié directement ou non). Cette potentielle limitation permet d'expliquer que les structures n'atteignent pas la percolation pour la même valeur de connectivité, la structure de faisceaux désordonnés ne contenant pas de complexe Arp2/3. En plus de jouer sur la distribution de la connectivité inter-filaments, la nature des connecteurs modifie aussi la répartition de cette connectivité sur les filaments eux-mêmes (le complexe Arp2/3 est en effet placé au niveau de l'extrémité du filament fille), ce qui affecte aussi l'amplitude de la contraction.

Un aspect majeur de ces structures dans l'environnement cellulaire est leur dynamique. En effet, l'organisation et la connectivité des filaments dans ces structures varient temporellement et spatialement dans la cellule. En particulier, le réseau branché présent en périphérie de la cellule évolue vers des faisceaux de filaments antiparallèles connectés dans les transverses arcs [Burnette et al.(2011), Letort et al.(2015a)]. Pour étudier comment ces changements affectent le comportement contractile, il nous a semblé important de modifier en temps réel l'organisation des filaments et leur connectivité et d'étudier cet effet sur la réponse mécanique. Le problème principal pour obtenir un changement dynamique de comportement est que lorsque les structures contractent *in-vitro*, elles se déforment trop rapidement pour que l'on ait le temps d'intervenir. Il a donc fallu adapter le système expérimental et le transférer sur un gel mou [Vignaud et al.(2014)]. Hajer Ennomani a développé ce système, ce qui lui permet aussi d'avoir accès à la valeur des forces que la structure exerce sur le gel [Sabass et al.(2008)] et a ajouté la possibilité de modifier la composition biochimique dynamiquement [Ennomani et al.(2015), Figure S3]. Avec ce système, nous avons pu contrôler le changement d'état contractile de nos structures en ajoutant la protéine ADF/cofiline qui va agir comme un facteur de diminution de la connectivité (article Figure 4). Ceci nous a permis de montrer que la présence d'ADF/cofiline peut induire dans une structure peu ou non contractile, car trop connectée, une augmentation de la contraction suite à la diminution de la connectivité. ADF/cofiline peut aussi inhiber la réponse contractile d'une structure d'actine ayant une connectivité faible [Ennomani et al.(2015), Figure 4, p.21].

Cette étude révèle les paramètres importants contrôlant la contraction de réseaux d'actine, en intégrant les composantes architecturale et biochimique de ces réseaux. De plus, un point remarquable est que l'ajout d'une même protéine (protéine de pontage ou protéine ADF/cofiline) n'aura pas le même effet (inhibe ou favorise) sur le comportement contractile selon les caractéristiques du réseau d'actine. Il est donc particulièrement important de tenir compte de ces différents facteurs pour comprendre et contrôler le comportement contractile d'un réseau d'actine.

Architecture and connectivity govern actin network contractility

Hajer Ennomani*¹, Gaëlle Letort *¹, Christophe Guérin¹, Jean-Louis Martiel¹, Wenxiang Cao², François Nedelec³, Enrique M. De La Cruz², Manuel Théry^{#1,4} and Laurent Blanchoin^{#1}

1 Institut de recherches en Technologies et Sciences pour le vivant, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/UJF/INRA Grenoble, France

2 Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, 260 Whitney Avenue, New Haven, CT 06520-8114, USA

3 Cell Biology and Biophysics Unit, EMBL, Meyerhofstrasse 1, D-69117, Heidelberg, Germany

4 Unité de thérapie Cellulaire, Hopital Saint-Louis, Avenue Claude Vellefaux 75010 Paris, France

* These authors contributed equally to this work

These authors contributed equally to this work

Contact: manuel.thery@cea.fr or laurent.blanchoin@cea.fr

Summary

Actomyosin contractility plays a central role in a wide range of cellular processes including the establishment of cell polarity, cell migration, tissue integrity or morphogenesis during development [1, 2]. Contractile response involves a complex coupling between the actomyosin architecture and its biochemical composition [3-6]. To study how this coupling regulates myosin-driven contraction, we used the micropatterning method that enables the spatial control of actin assembly [7, 8]. We generated a variety of actin templates to evaluate how well defined actin structures respond to myosin-induced forces. We found that the same actin filament cross-linkers could either enhance or inhibit the contractility of a network, depending on the organization of actin within the network. We also show that filament crosslinking was necessary to sustain myosin-driven deformation and force production of dynamic actin organizations, in the presence of the disassembly factor, ADF/cofilin. Numerical simulations unified the roles of actin filament branching and crosslinking during actomyosin contraction. Specifically, we introduce the concept of “network connectivity”, and show that the contractions of distinct actin architectures are described by the same master curve when considering their degree of connectivity. This makes it possible to predict the dynamic response of defined actin structures to transient changes in connectivity. More generally, this study reveals how, for a defined set of biochemical conditions, actin network contractility depends on the organization of the filament and, hence, how dynamic actin structure rearrangements modulate contractility.

Highlights

- We generated different actin architectures that span the diversity of cellular contractile structures.
- These different actin organizations respond differently to myosin-induced contraction.
- Actin filament cross-linkers can have opposite effects on the contractility of a network, depending on its organization.
- Numerical simulations highlight the role of the actin architecture-dependent connectivity in modulating the contractile response.
- We characterized the dynamic response of defined actin structures to transient changes in connectivity.
- The variation of actomyosin contractile response results from a combination of two inter-dependent parameters: the spatial organization of actin filaments and their degree of connectivity.

eTOC Blurb

The composition, the organization and the geometry of the actomyosin network influence the production of contractile forces. Ennomani et al describe how the possibility to modulate network architecture and composition to finely tune the contractile response provides a large degree of mechanical adaptation and responsiveness to contractile networks.

Results and discussion

Contractile response of different actin organizations

Cellular actin filaments assemble into a variety of structures that are distinct with respect to the orientation of the filaments, and their connectivity [9-11]. The organization of actin filaments modulates the contractile response of a network. For example, branched networks are less contractile than bundles of anti-parallel filaments [6]. Here we investigate the factors that govern the coupling between filament spatial arrangement and the degree of crosslinking in the regulation of actomyosin contraction. We evaluated the contractile response of various *in vitro* reconstituted actin structures, that are branched or not, and in which filaments are either of mixed polarity, or prominently antiparallel (Figure 1). To obtain such diversity in actin architecture, we used surface micropatterning to initiate geometrically controlled actin assembly over 75 μm wide rings [7]. In this assay, well-defined surfaces coated with Actin Promoting Factor (NPF) trigger actin assembly in a reaction chamber containing a mixture of proteins including the Arp2/3 complex, actin and profilin. Throughout this study we varied the architecture and biochemical composition of the overall ring-like network. The perimeter was used as a simple and global readout of contractility (Figure 1).

We generated rings made of three different architectures (Figure 1A) that span the diversity of cellular contractile structures: 1) disordered branched networks (named: disordered networks), mimicking lamella-like structures, were assembled from a full ring coated with NPF (Figure 1A left panel); 2) a series of interconnected, ordered, antiparallel actin bundles (named: ordered bundles), mimicking sarcomeric-like bundles, were generated by a dotted ring where only the dots were coated with NPF (Figure 1A middle panel); and 3) disordered, mixed polarity actin bundles (named:

disordered bundles), mimicking cytokinesis ring-like bundles, were generated by debranching the disordered branched meshwork described above by addition of ADF/cofilin (Figures 1A right panel, S1 and Movie S1 (for the illustration of ADF/cofilin debranching activity)). The deformation of these actin networks was triggered by the presence of double-headed (heavy-meromyosin (HMM)-like) myosin VI in the reaction mixture. Myosin VI-HMM [6] is pointed-end directed processive molecular motor [12]. Unlike myosin II, it can trigger continuous contraction and/or filament sliding (Movie S2) without the need to assemble into minifilaments. Thus using Myosin VI-HMM has the advantage that it yields in unprecedented reproducibility of the contractile response, unlike myosin II -based minifilaments, which often vary in length when reconstituted *in vitro* [6].

The contraction of actin rings by myosins follows three phases [6]: a initial phase corresponding to actin assembly and reorganization by myosins, a second phase characterized by a constant and often fast rate of contraction, and a final phase where actin is slowly compacted at the center of the ring. We measured the contraction rate during the second phase, to quantify the contractile behavior of all systems. This readout was highly reproducible across experiments.

Two types of rings contracted: the rings made of disordered branched networks and the rings made of ordered antiparallel bundles (Figure 1B, top and middle rows). Consistent with previous observations [6], the rings made of ordered antiparallel bundles contract faster than the ones made of branched networks (Figure 1C compare green and red curves and Movie S3 compare top row, left and middle rings). In contrast, the third type

of rings, corresponding to disordered bundles, deforms only little over time (Figure 1B bottom row, 1C blue curve and Movie S3 top row right ring).

To understand how different actin architectures respond to myosin-induced contraction, we performed detailed simulations of the different types of actin rings – disordered network, disordered and ordered bundles using Cytosim (Figures 1D and S2A, Movie S4 and [13, 14]). We implemented our simulation with entities mimicking molecular motors with properties similar to myosin VI (Figures 1D and S2B top panel). Thereby, we could reproduce *in silico* the diversity of contractile response for various actin architectures (Figure 1D, S2A and Movie S4 left panel, top row), and also track individual actin filaments during ring evolution (Movie S4 left panel, bottom row). Filaments in disordered bundles slide with respect to one another without inducing a global contraction (Figure 1D and Movie S4 left panel, bottom row right ring), suggesting that myosin-produced forces are not transduced into contractile dipoles in this structure. In contrast, inter-connected filaments in disordered network and ordered bundles directly lead to whole ring contraction (Movie S4 left panel, left and middle rings).

α -actinin modulates the contractile response of different actin organizations

Filament inter-connection in cells is achieved with the help of cross-linking proteins such as α -actinin, fascin, filamin, ... [15]. Strikingly, non-deforming rings comprised of disordered fibers become contractile when α -actinin is added (Figure 2A bottom row, 2B blue curve and Movie S3 bottom row right). In marked contrast, α -actinin impairs the contraction of the other types of rings (Figure 2A top and middle rows, 2B green and red

curves, and Movie S3 bottom row left and middle rings). Therefore, the effects of α -actinin on ring deformation depend on their architecture. Ring deformation also depends on the α -actinin concentration (Figure 2C). In our experimental condition with 2 μ M actin monomers, the maximal rate of ring contraction of the disordered network (Figure 2C green curve) was first increased by low concentration (3 nM) of α -actinin, and then decreased progressively for higher α -actinin concentrations (ranging from 5 to 30 nM) displaying undetectable deformation at high α -actinin concentration (> 30 nM) over the timescale of our measurements. Increasing the concentration of α -actinin (Figure 2C red curve) progressively lowered the maximal deformation rate of ordered bundles. At high concentrations (>30 nM), α -actinin blocked the deformation of all types of actin architectures. The complex effect of α -actinin on the rate of myosin-induced contraction in different actin architectures suggests that both the filament organization and their physical interaction are key parameters governing the contractile response. Unfortunately, these parameters cannot be measured experimentally, but we could use numerical simulation to study how the amount of cross-linkers and branches affect actomyosin contraction.

Connectivity regulates network contraction in a biphasic manner

To the simulations containing myosin entities, we added structural elements connecting two actin filaments thereby representing the contribution of α -actinin to the system (Figures 3A and S2B bottom panel). From the simulations we calculated the maximal contraction velocity as a function of the crosslinker number for the three types of ring architectures (Figure 3B). The shrinking rate of the disordered networks, ordered bundles and disordered bundles (respectively, green, red and blue Figure 3B) were

qualitatively similar to those obtained experimentally (Figure 2C), validating that our simulations had correctly modeled the role of filament cross-linkers on the various actin architectures. Both cross-linkers and branches act as filaments connectors [16, 17]. We then estimated the global degree of “connectivity”, defined as the average number of connectors per actin filament (Figure 3C, generated by the Arp2/3 complex at branched point and by the bridge made by α -actinin between two filaments). By plotting the contraction velocity with respect to the connectivity for the different actin organizations (Figure 3D), we found that they all form a bell-shaped curve centered on an optimal connectivity comprised between 2 and 3 (Figure 3D). This value corresponds to the percolation threshold (transition point from which all filaments are connected together in one single cluster, Figure 3E and [4]). Below 2 (under percolation), filaments move freely inside the structure. Thus, the deformation is dominated by local events but do not lead to global network contraction. Above 3, filaments get partially or totally blocked and can no longer be moved by myosins. The first important insight gained from this analysis was that Arp2/3 complex is a more efficient connector than α -actinin. By essence, for any given pair of filaments, there can be only one Arp2/3 connection, whereas multiple α -actinin connections are possible. Thus in terms of percolating the network, Arp2/3 complex entities are more potent than α -actinin crosslinks, because some of the later may be connecting filaments that are already linked otherwise (Figure 3C, branched vs. crosslinked connectivity). The second important insight is that, in parallel to curve shape regulation, the contraction rate also depends on the actin organization, and is maximal for ordered bundles (red curve), intermediate for the disordered network (green curve) and minimal for disordered bundles (blue curve) (Figure 3D). Indeed, ordered bundles have an optimal actin architecture in which

filaments are perfectly aligned, oriented and properly anchored to transmit local myosin work throughout the entire structure. On the other hand, randomly oriented filaments in disordered branched networks resist deformation and are inefficient at propagating myosin-induced translocation. In disordered bundles, a significant fraction of the myosins are not productive, or their work is dissipated in motor displacement rather than filament sliding. Accordingly, both the degree of connectivity and the spatial organization of filaments regulate overall actomyosin response.

Dynamic modulation of actin network connectivity

Interestingly, filament connectivity and conformation in cells vary as the network evolves from filament nucleation at the cell periphery to filament alignment and crosslinking in transverse arcs, up to filament disassembly in the cell interior [18]. Our work suggests that contractility could change accordingly during these dynamic architectural transitions. Investigating the contractile response of dynamic actin organization required an experimental system where the degree of connectivity or/and the actin filament organization could be modulated over time. One limitation in our initial experimental set up described above is that ring contraction is rapid and the structure collapses when the connectivity is optimal (2-3) or disassembles with minimum deformation when the connectivity is higher than 4. Our ability to modulate the network composition with this setup is therefore limited. To circumvent this limitation, we developed a new method to assemble controlled actin organizations on soft polyacrylamide gels (Figure S3A and [8]). The behavior of actin structures on soft substrate differs drastically from what was previously described with hard substrate. On soft gels, actin rings contract and deform the underlying substrate without detaching from it (Figures 4A and S3A, B). In these conditions, actin networks do not collapse and

disassemble as on hard substrate. Rather, they are maintained in a tensed steady state. By sequentially changing the biochemical conditions, the networks in such steady states are then amenable to dynamic changes. Because the polyacrylamide gels were produced with a defined rigidity, the forces exerted by the various actin structures on the substrate upon myosin-addition could be measured with traction force microscopy (Figures 4A and S3B). Consistent with the variation of the contractile response on hard substrate (Figure 2C), increasing concentrations of α -actinin first enhances (Figure 4B, 10 nM α -actinin, disordered network) then decreases (Figure 4B, 30 nM α -actinin) the magnitude of tension forces, resulting in a bell-shape curve for the variation of the mechanical energy in function of the concentration of α -actinin (Figure 4B). To modify the connectivity in real time, we designed an open reaction chamber (Figure S3C) that is placed on top of the soft patterned surface. Because of its bell-shape response curve (Figure 3D), our numerical model predicts that a given reduction of connectivity can have opposite effects on tensional forces depending of the initial level of network connectivity (Figure 4C). Indeed, if the contractile structure has a high degree of connectivity, a decrease in connectivity should enhance contraction (Figure 4C, red arrow). In contrast, if the structure has an optimal degree of connectivity, reductions in connectivity should block the network deformation and reduce contractility (Figure 4C, blue arrow). We tested these predictions experimentally using ADF/cofilin ability to debranch Arp2/3 network and slightly sever actin filaments, in order to modulate ring connectivity as it contracted (Figure 4D and E). As predicted, addition of ADF/cofilin to a highly connected structure increased the magnitude of the contractile forces (Figure 4D). In contrast, addition of ADF/cofilin to an actin organization with optimal connectivity reduced the magnitude of tensional forces (Figure 4E). These experiments

showed how the dynamic reorganization of actin network architecture could modulate the contractile mechanical response over time.

Conclusion remarks:

Contractile actomyosin structures in cells have different abilities to generate forces [19]. We found that these variations may result from a combination of two interrelated parameters: the spatial organization of actin filaments within the network, and their degree of connectivity. The degree of connectivity regulates the type of the contractile response (local sliding, global deformation or massive freezing), whereas the actin filament organization, i.e. the degree of filament parallel vs. antiparallel alignment, governs its magnitude. The local densities of molecular motors and cross-linker have been described as key modulators of the transition from contractile to non-contractile organization [5, 16, 20-22]. Here we have demonstrated that for a defined set of biochemical parameters the spatial organization of actin filaments can strongly impinge on the rate of contraction and the magnitude of force generation. Moreover, we showed how the contractile properties of an actin network could change drastically, as its conformation is modified. Such behaviors are likely to be important since modulations of the actin architecture are often present in vivo. Modulation occurs for example following the maturation of sarcomeres in cardiomyocytes, [23, 24] during which misoriented actin filaments are transported and sorted by myosins, up to the generation of alternate distribution between myosins and crosslinkers along aligned filaments, an organization that optimizes force production at large scales. Similarly, dynamic changes of connectivity and network architecture occur in the lamella of motile cells, where the protrusive branched network of short filaments is converted to transverse arcs which are long bundles of aligned and crosslinked fibers, and probably much better suited to

produce tension [18]. The possibility to modulate network architecture and composition to finely tune the contractile response provides a large degree of mechanical adaptation and responsiveness to contractile networks. This modularity is crucial for cell shape changes during migration or tissue development where the mechanical properties and the geometry of the local environment can vary considerably in space and time [25, 26].

Supplemental Data

Supplemental Data include supporting text, three figures, four movies and supplemental references can be found with this article on line at <http://www>.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HE, GL, FN, EMDLC, MT and LB. Performed the experiments: HE and GL. Analyzed the data: HE, GL, JLM. Contributed reagents/materials/analysis tools: HE, GL, WC, CG, FN. Wrote the paper: HE, GL, FN, EMDLC, MT and LB.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Human Frontier Science Program (RGP0004/2011 awarded to L.B. and E.M.D.L.C.), Agence Nationale de la Recherche (ANR-12-BSV5-0014 awarded to L.B.), National Institutes of Health (GM097348 awarded to E.M.D.L.C) and ERC starter Grant (310472) to MT. HE was awarded with a PhD fellowship from the IRTELIS program of the CEA.

References

1. Levayer, R., and Lecuit, T. (2012). Biomechanical regulation of contractility: spatial control and dynamics. *Trends Cell Biol.* 22, 61-81.
2. Heisenberg, C.P., and Bellaïche, Y. (2013). Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell* 153, 948-962.
3. Thoresen, T., Lenz, M., and Gardel, M.L. (2011). Reconstitution of contractile actomyosin bundles. *Biophys. J.* 100, 2698-2705.
4. Alvarado, J., Sheinman, M., Sharma, A., MacKintosh, F.C., and Koenderink, G.H. (2013). Molecular motors robustly drive active gels to a critically connected state. *Nat. Phys.* 9, 591-597.
5. Kohler, S., and Bausch, A.R. (2012). Contraction mechanisms in composite active actin networks. *PLoS One* 7, e39869.
6. Reymann, A.C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.L., Guérin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Théry, M., and Blanchoin, L. (2012). Actin Network Architecture Can Determine Myosin Motor Activity. *Science* 336, 1310-1314.
7. Reymann, A.C., Martiel, J. L., Cambier, T., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., and Théry, M. (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* 9, 827-832.
8. Vignaud, T., Ennomani, H., and They, M. (2014). Polyacrylamide hydrogel micropatterning. *Methods Cell Biol.* 120, 93-116.
9. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94, 235-263.
10. Tojkander, S., Gateva, G., and Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers assembly, dynamics and biological roles. *J. Cell Sci.* 125, 1855-1864.
11. Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2010). Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492.
12. Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A., and Sweeney, H.L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401, 505-508.
13. Nedelec, F., and Foethke D. (2007). Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers. *New J. Phys.* 9, 427.
14. Letort, G., Politi, A.Z., Ennomani, H., They, M., Nedelec, F., and Blanchoin, L. (2015). Geometrical and mechanical properties control actin filament organization. *PLoS Comput. Biol.* 11, e1004245.

15. Ahmed, W.W., and Betz, T. (2015). Dynamic cross-links tune the solid-fluid behavior of living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, 6527-6528.
16. Bendix, P.M., Koenderink, G.H., Cuvelier, D., Dogic, Z., Koeleman, B.N., Brieher, W.M., Field, C.M., Mahadevan, L., and Weitz, D.A. (2008). A quantitative analysis of contractility in active cytoskeletal protein networks. *Biophys. J.* *94*, 3126-3136.
17. Wang, S., and Wolynes, P.G. (2012). Active contractility in actomyosin networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *109*, 6446-6451.
18. Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat. Cell Biol.* *13*, 371-381.
19. Murrell, M., Oakes, P.W., Lenz, M., and Gardel, M.L. (2015). Forcing cells into shape: the mechanics of actomyosin contractility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* doi: 10.1038/nrm4012.
20. Janson, L.W., Kolega, J., and Taylor, D.L. (1991). Modulation of contraction by gelation/solation in a reconstituted motile model. *J. Cell Biol.* *114*, 1005-1015.
21. Luo, T., Mohan, K., Iglesias, P.A., and Robinson, D.N. (2013). Molecular mechanisms of cellular mechanosensing. *Nat. Mater.* *12*, 1064-1071.
22. Abu Shah, E., and Keren, K. (2013). Mechanical forces and feedbacks in cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 550-557.
23. Craig, E.M., Dey, S., and Mogilner, A. (2011). The emergence of sarcomeric, graded-polarity and spindle-like patterns in bundles of short cytoskeletal polymers and two opposite molecular motors. *J. Phys. Condens. Matter.* *23*, 374102.
24. Kresh, J.Y., and Chopra, A. (2011). Intercellular and extracellular mechanotransduction in cardiac myocytes. *Pflugers Arch.* *462*, 75-87.
25. Elliott, H., Fischer, R.S., Myers, K.A., Desai, R.A., Gao, L., Chen, C.S., Adelstein, R.S., Waterman, C.M., and Danuser, G. (2015). Myosin II controls cellular branching morphogenesis and migration in three dimensions by minimizing cell-surface curvature. *Nat. Cell Biol.* *17*, 137-147.
26. DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 308-319.

Figure legends

Figure 1: Architecture-dependent contractility of actin rings

(A) Schematic representation of the different types of actin architecture: disordered networks, ordered and disordered bundles respectively. (B) Contraction dynamics of the different actin rings, induced by myosin motors. Time is indicated in each picture. Scale bar = 25 μm . (C) Measured ring perimeter divided by initial ring perimeter, for each type of ring, as a function of time. The disordered network (green) and ordered bundles (red) both contract within a few minutes following assembly, whereas disordered bundle (blue) are not contractile within the same time-span. Each curve was obtained by averaging over a dozen of different patterns. Error bars represent SEM. (D) Simulated contractility of actin rings with different architectures. The essential features of the three types of actin rings were constructed within the cytosim platform (green: disordered network, red: ordered bundles, blue: disordered bundles), and simulated (see text). The diameter of the rings is 9 μm . The simulated dynamics of ring contraction in the presence of myosin cross-linkers (right panels) were generated here from 10 simulations in each case. The measured perimeter of the ring is divided by its initial value.

Figure 2. Effects of α -actinin on the contractility of actin rings

(A) Contraction of one representative example of each actin ring, in the presence of α -actinin: (top row) 15 nM α -actinin for the disordered network, (middle and bottom rows) 20 nM α -actinin for both the ordered and disordered bundles. (B) Normalized ring perimeters as a function of time are represented. Note that addition of α -actinin induces the disordered bundle ring to contract, whereas it decelerates contraction of the

other rings. (C) Maximal perimeters decrease speed for each type of network, as a function of the concentration of α -actinin. A dozen of ring perimeters were measured as a function of time for each architecture and each α -actinin concentration, and the extracted maximum speeds were averaged. Error bars represent S.E.M.

Figure 3. Network connectivity modulates the contractile response of actin rings

(A) Snapshots of simulated actin rings with different architectures: branched network (green), ordered bundles (red), disordered bundles (blue) in presence of 2500 crosslinkers representing α -actinin. (B) Maximal rate of ring perimeter decrease, as a function of the number of crosslinkers for each type of ring. (C) Schematic illustration (left) of the connectivity C of different actin filament generated by the Arp2/3 complex (red symbols) and α -actinin (black symbols). The network connectivity is the average of all filament connectivity values. It is expected to increase as a function of the number of connecting cross-linkers present in the system (right). (D) The maximal velocity of perimeter decrease for the different actin rings as a function of the network connectivity. (E) Size of the largest percolating cluster (normalized to the total number of actin filaments) as a function of the network connectivity, for branched network (green), ordered bundles (red) and disordered bundles (blue). Vertical lines indicate the threshold at which percolation is reached (i.e. 95% of filaments are connected).

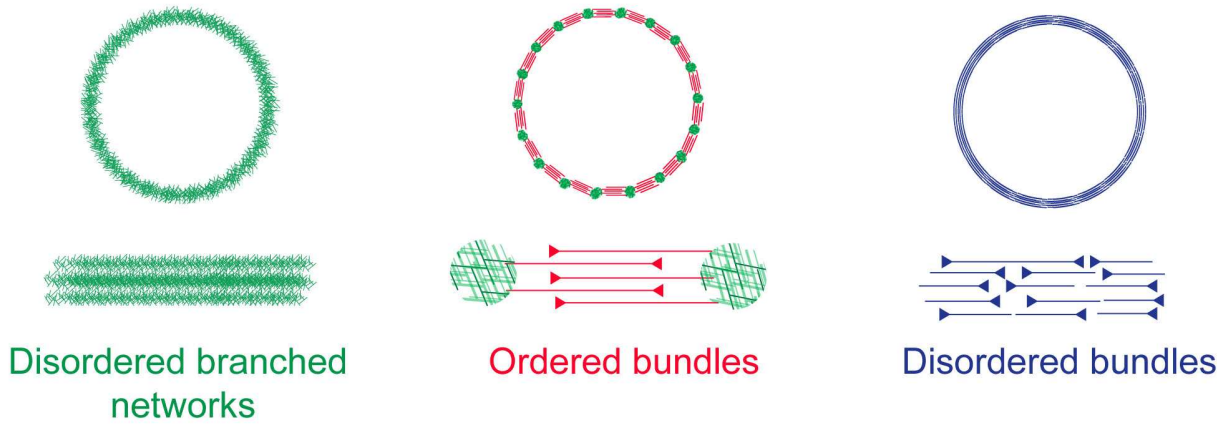
Figure 4. Dynamic variations of actin network connectivity

(A) Contraction of a branched network ring on a patterned deformable substrate. Combined fluorescence images (top row) show actin and myosin signals, while second and third rows show the corresponding vector force and the force map reconstitution.

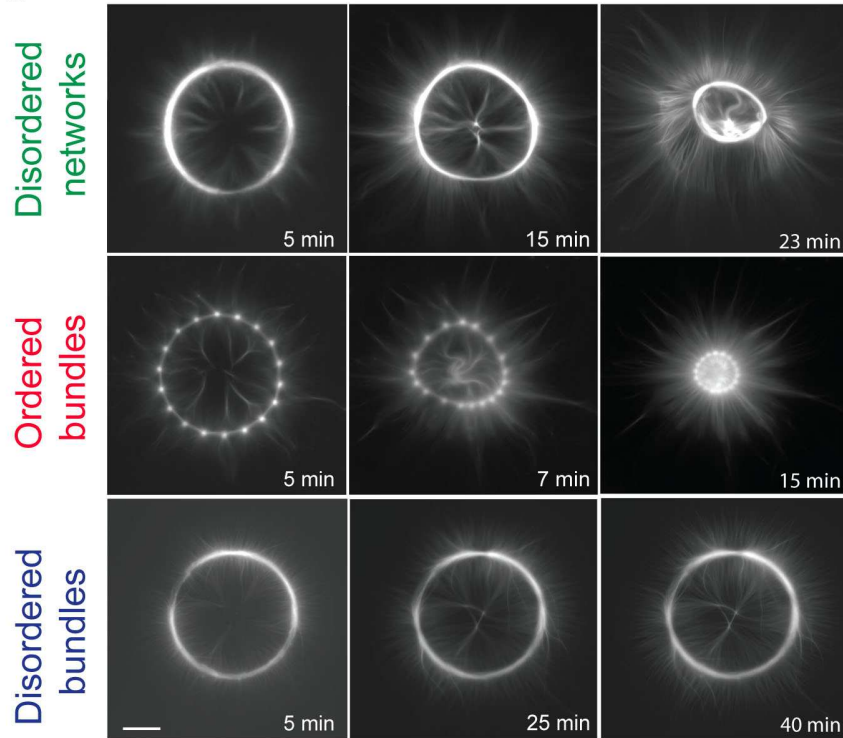
(B) Maximal mechanical energy of the actin disordered branched network, for the indicated α -actinin concentrations. The maximal mechanical energy is defined as the maximal deformation that ring contractions cause on their substrate. (C) Qualitative contractile behavior for the three different actin rings, as a function of the network connectivity, as predicted by the model (Figure 3D). The red arrow illustrates the effect of reducing connectivity in a highly connected actin network, while the blue arrow indicates a reduction of connectivity in a network with optimal connectivity. The contractility is enhanced in the shift represented by the red arrow, whereas it is reduced in the blue arrow. (D, E) Cartoon representations (top) of the actin architectures before and after addition of ADF/cofilin, and kinetic of the normalized total network mechanical energy as a function of time. In (D), a highly crosslinked branched actin network (100 nM α -actinin) was de-branched by addition of 100 nM ADF/cofilin. This configuration corresponds to the red arrow. In (E), a network with nearly optimal connectivity (10 nM α -actinin) is debranched by addition of 100nM ADF/ cofilin. This configuration corresponds to the blue arrow.

Fig 1

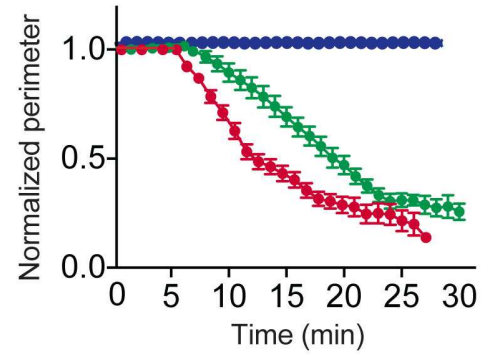
A



B



C



D

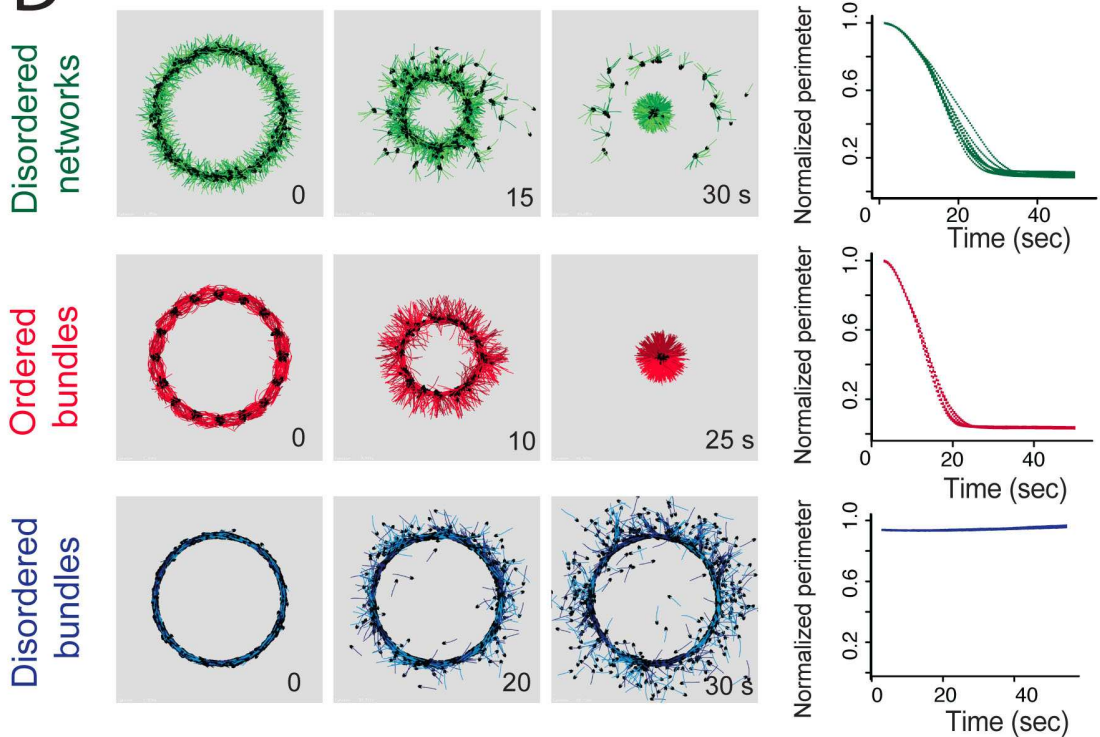
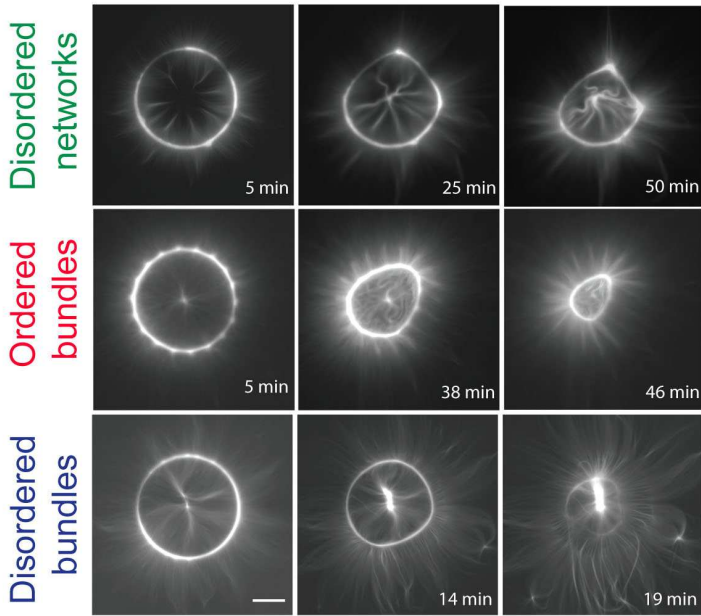


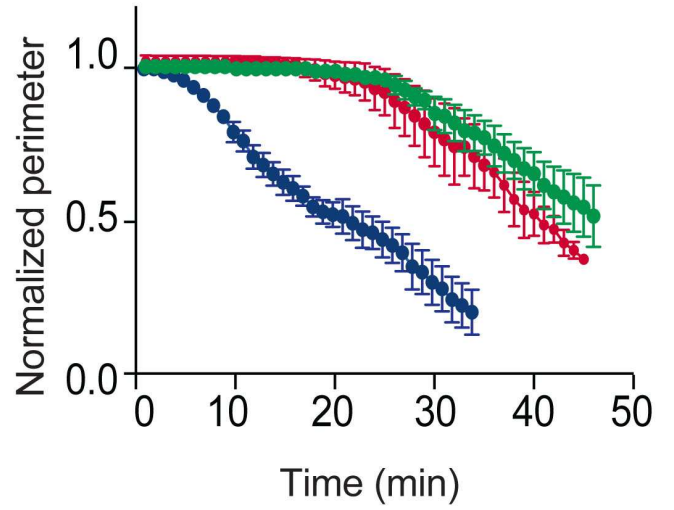
Fig 2

A

With crosslinkers



B



C

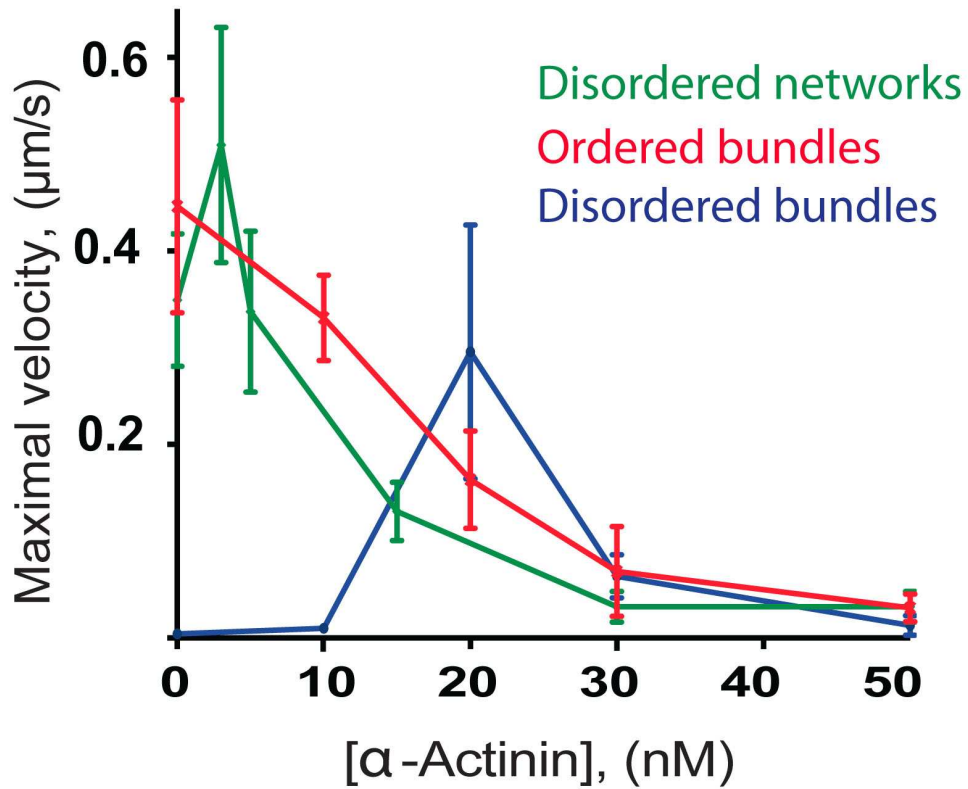


Fig. 3

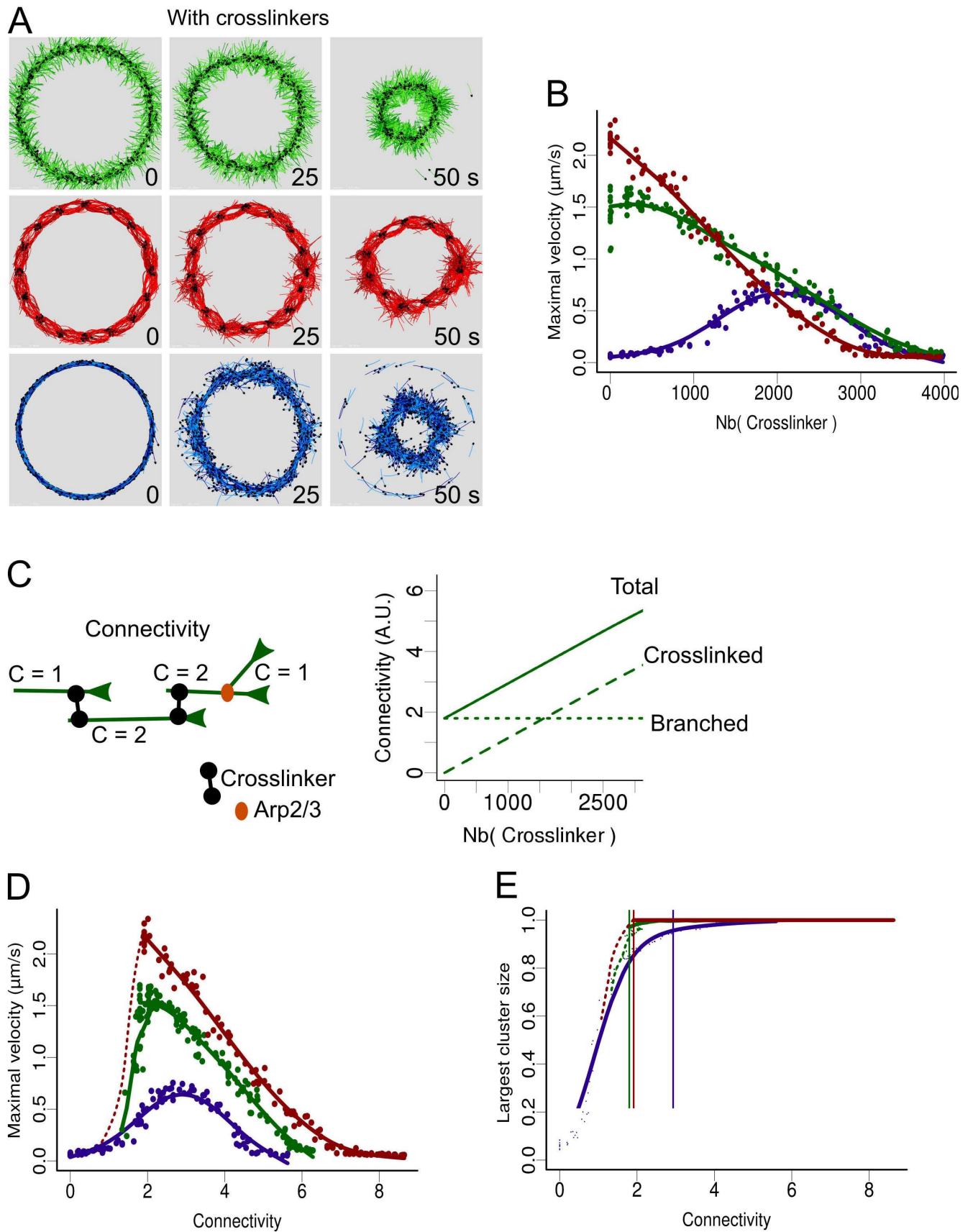
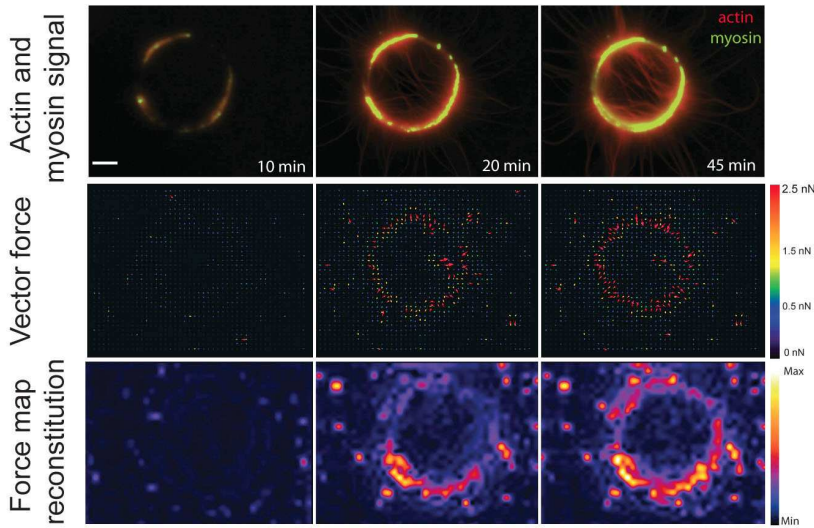


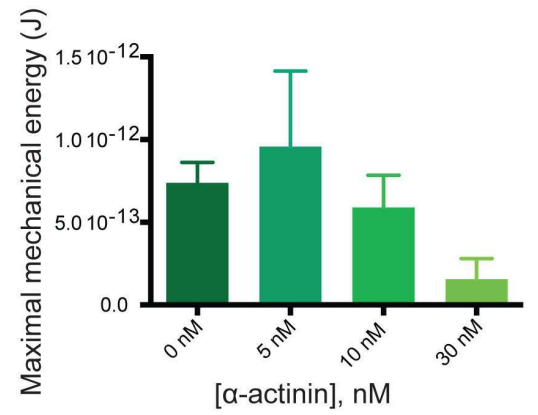
Fig 4

A

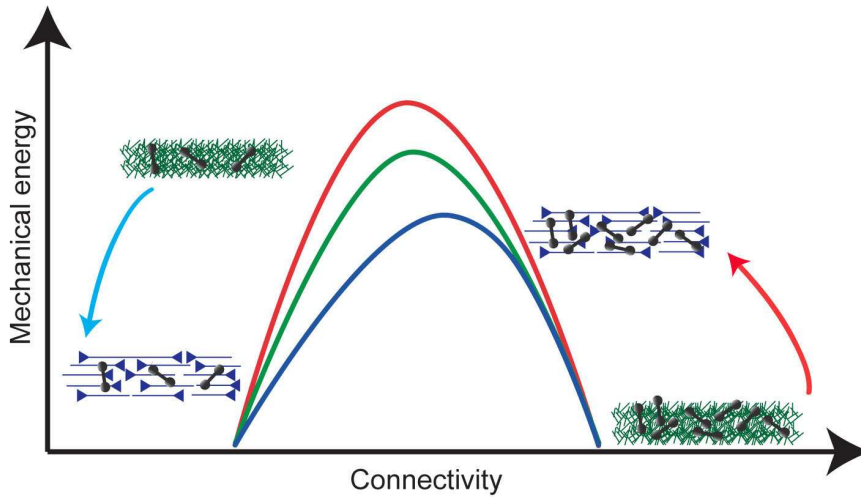
Disordered networks



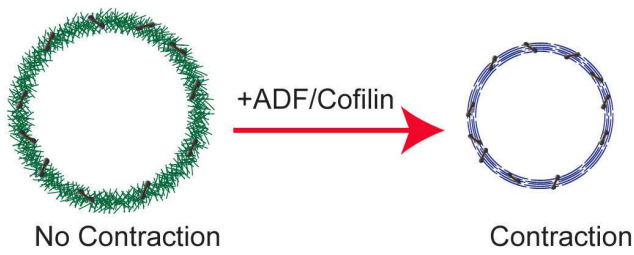
B



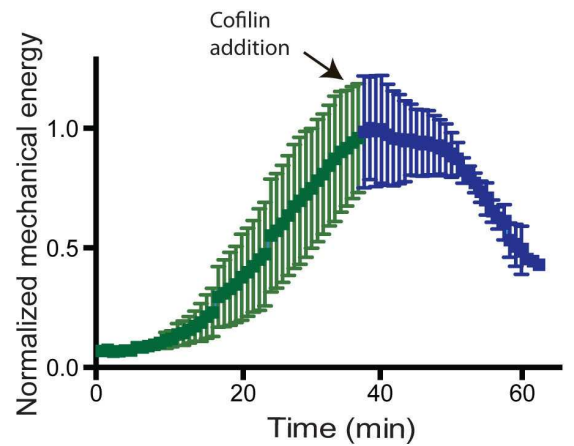
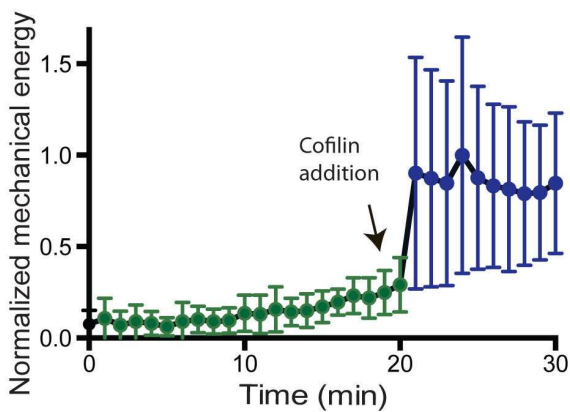
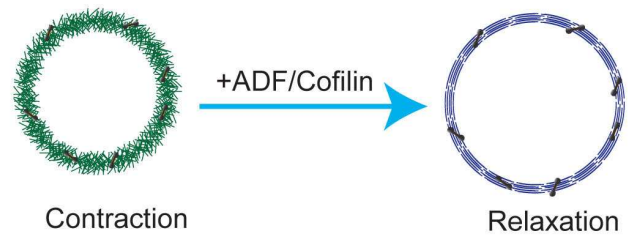
C



D



E



Supplemental Information

Inventory of Supplemental Information:

Supplemental data:

- Supplemental Figures: S1 related to Figure 1; S2 related to Figures 1, 2 and 3; S3 related to Figure 4.
- Supplemental Movies: S1 related to Figure S1; S2 related to Figure 1; S3 related to Figures 1 and 2, S4 related to Figure 3.
- 2 tables

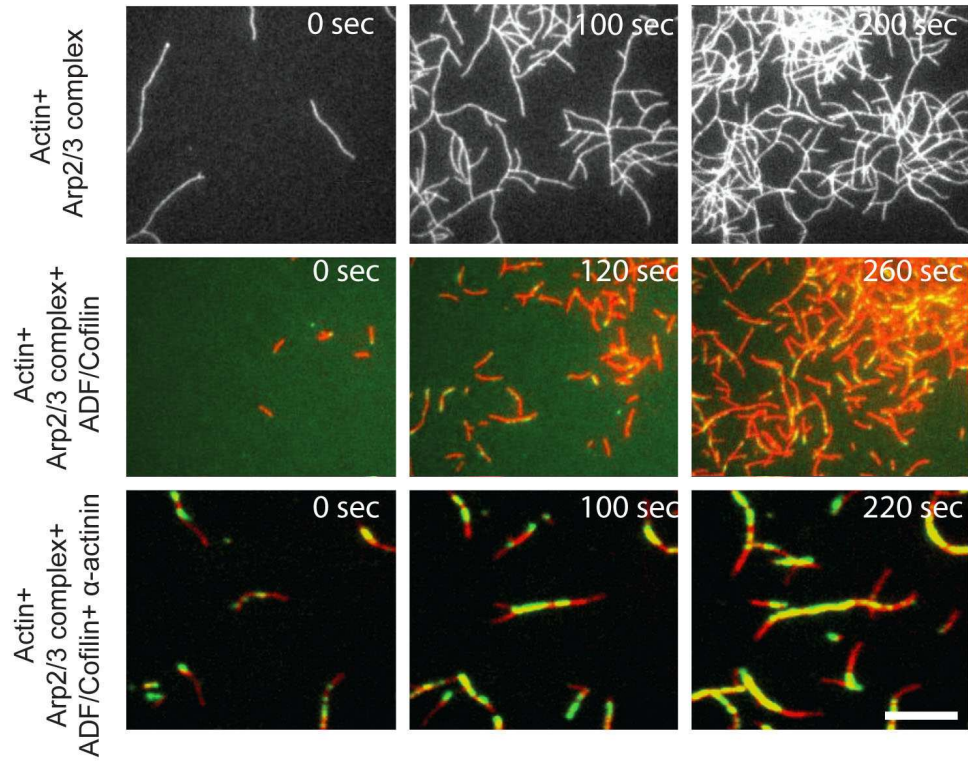
Supplemental Experimental Procedures:

- Experimental methods required to perform the experiments described in this study.
- Description of the model and the numerical simulation methods used to account for the actin network contractility.

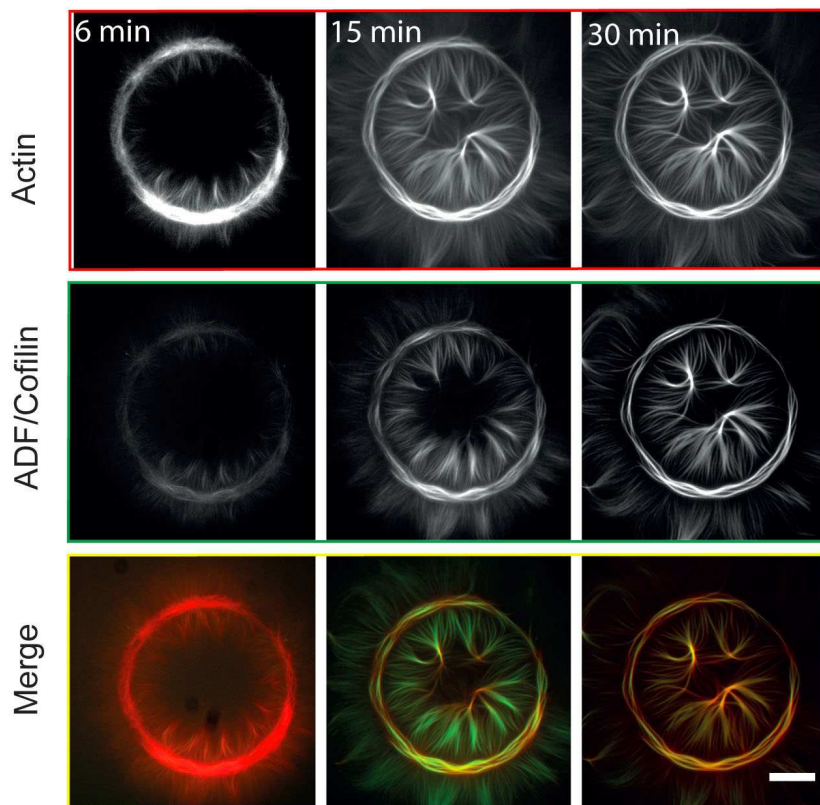
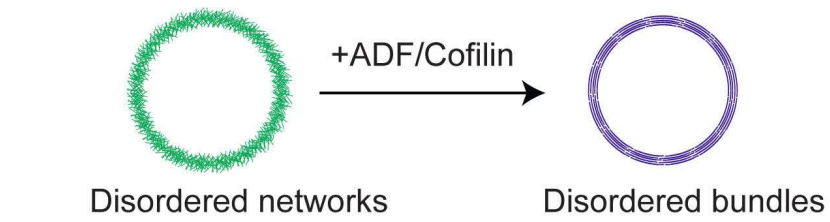
Supporting References

Fig S1

A



B



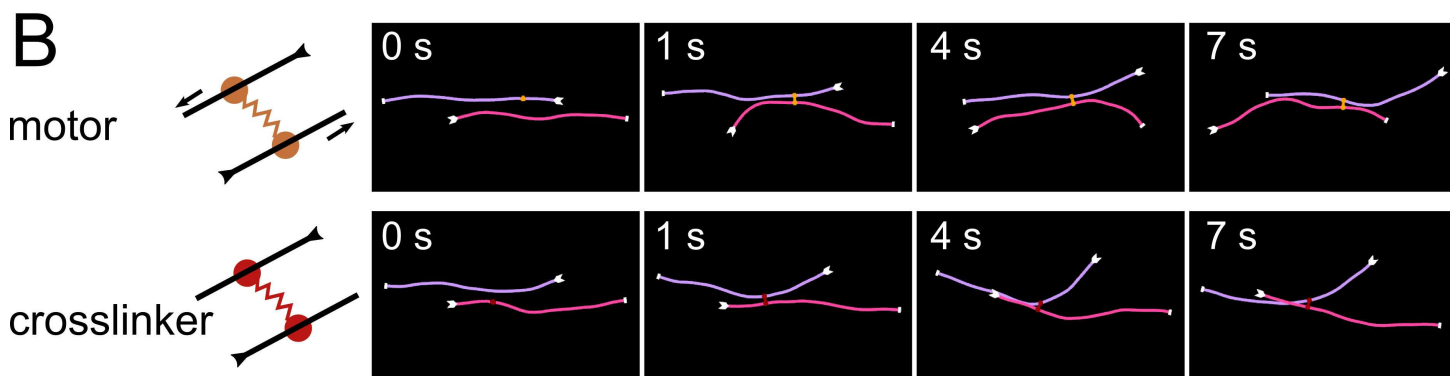
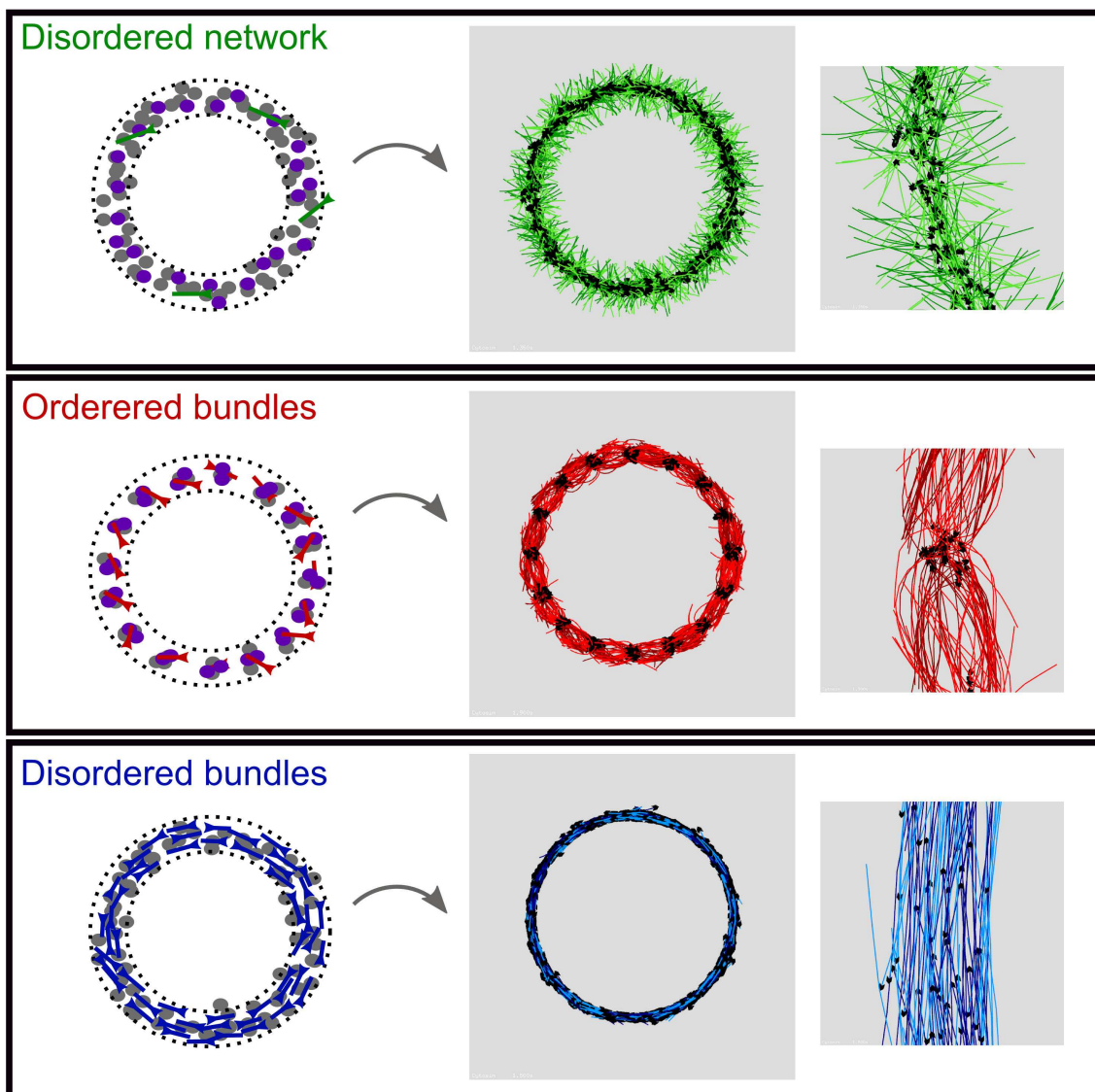
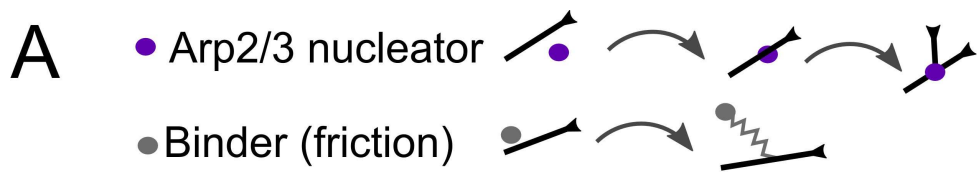


Fig S3

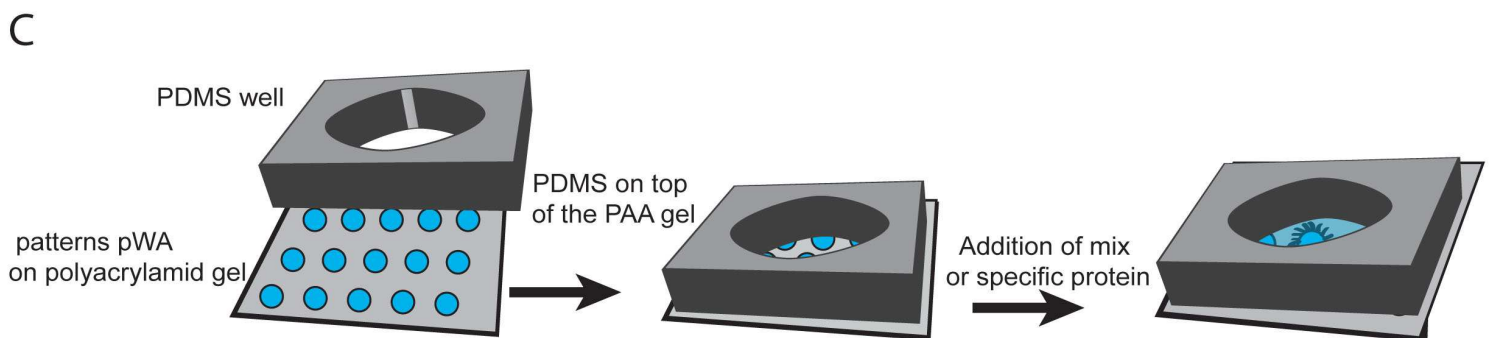
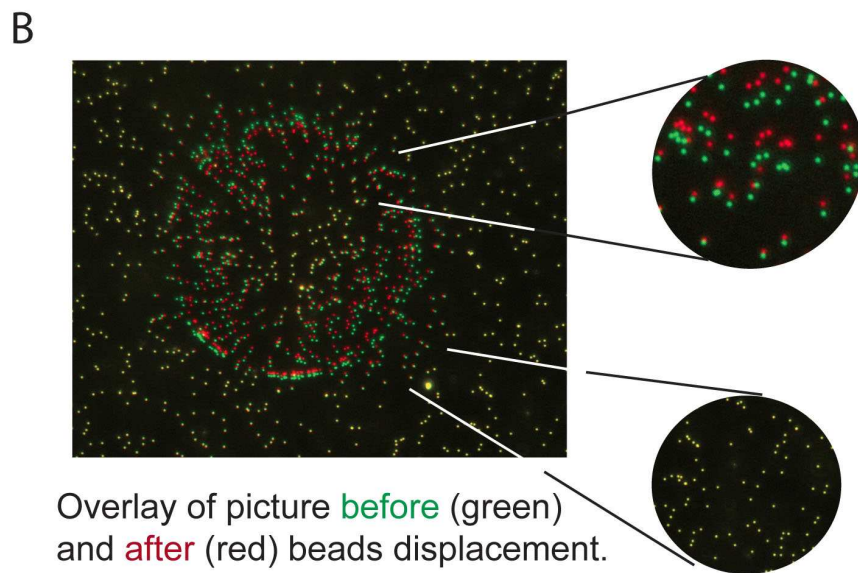
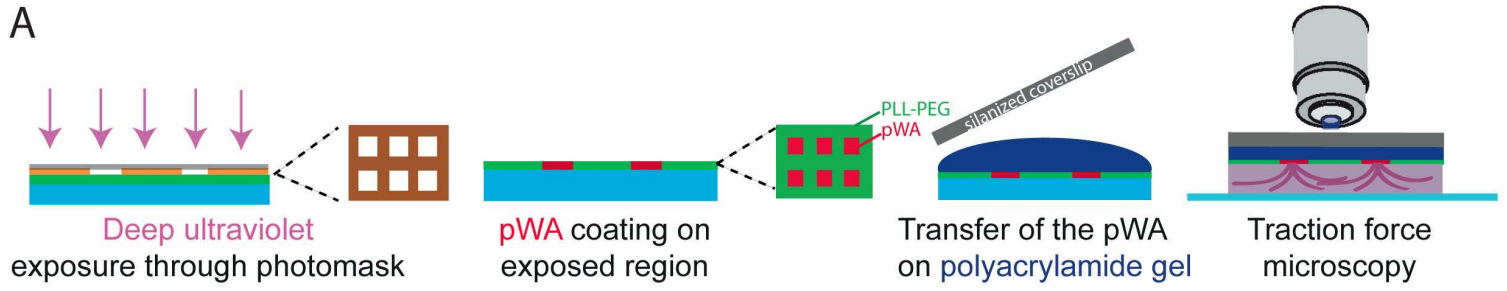


Figure S1 related to Figure 1: ADF/cofilin debranching activity allows the transition between branched actin network and disordered actin fibers.

(A) Montage of time-lapse total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) images showing the time course of assembly of 0.8 μM Alexa-568-labeled actin with 50 nM Arp2/3 complex (top panel), in presence of 200 nM Alexa-488-cofilin (middle panel) or 200 nM Alexa-488-cofilin and 80nM α -actinin (bottom panel). Alexa-568-actin filaments and Alexa-488-ADF/cofilin were color-coded in red and green respectively, and the decorated portions of filaments in yellow in the merged images. Scale bar= 10 μm

(B) (Top) Schematic representation of the reorganization of the actin filaments on a ring pattern upon addition of ADF/Cofilin. (Bottom) Time-lapse fluorescence microscopy of the effect of ADF/Cofilin on branched actin filaments nucleated on a micropatterned ring (actin monomers are labeled with Alexa-568 and ADF/Cofilin is labeled with Alexa-488). Top row represents the actin signal (red), middle row represents the ADF/Cofilin signal (green) and bottom row is the merge of the two signals. Scale bar= 25 μm

Figure S2 related to Figures 1 and 3: Main features of the simulations

(A) (Top) Arp2/3 and binders are used to create the desired actin architecture. Arp2/3 complex-like entities induce branching from the side of an existing filament. Binder entities that can dynamically bind and unbind to filament, and are anchored to a fixed position on the substrate. They are used to simulate friction between the filaments and the pattern.

The disordered branched network (green) is created by initially distributing Arp2/3 complex-like entities, binders and a few short filament seeds on a ring (left panel). Actin filament assembly and branching is simulated with artificially high rates for ~ 1 second to obtain the disordered branched network.

The rings containing a series of antiparallel bundles (red) are created by initially putting 16 dots of Arp2/3 complex-like entities, binders and few primer filaments. During the fast growth phase, actin filaments are constrained between two circles to keep them circularly oriented. Actin filaments growing from the pattern dots meet in an antiparallel fashion.

The disordered bundle rings (blue) are created by adding preformed actin filaments tangentially to the circle, randomly clockwise or anticlockwise. Binders are also distributed randomly on the ring. Light and darker shades of blue indicates opposite orientations of the actin filaments. Middle column corresponds to the simulated rings. The right column contains a detailed view of the corresponding rings.

(B, top) Schematic view of a myosin VI-like motor entity acting between two antiparallel filaments. The two identical heads move toward the minus ends of the filaments and slide the filaments apart (right).

(B, bottom) Schematic view of α -actinin like entity crosslinking two antiparallel filaments. The two static heads are linked by a spring like (Hookean) force term, constraining the filaments in their motions.

Figure S3 related to Figure 4: Soft patterning method and setup for the sequential addition of components during an experiment of ring contraction on soft pattern.

(A) Soft patterning: cartoon of the micropatterns on polyethylene glycol coated glass slide followed by their incubation with WASp-pWA to allow proteins adsorption to the micropatterned regions.

Polyacrylamide solution was added between the patterned pWA coverslip and a silanized coverslip for 20 minutes to allow the transfer of the protein from the hard to the soft substrate when the gel is fully polymerized.

(B) Overlay of beads signal before (green) and after (red) contraction illustrating beads displacement.

(C) Schematic representation of the PDMS well for the dynamic experiment.

Materials and Methods

Protein expression and purification

Actin was purified from rabbit skeletal-muscle acetone powder. Actin was labeled on lysines with Alexa-568 according to [1]. Arp2/3 complex was purified from bovine brain extracts [2]. GST-pWA, ADF/cofilin and human profilin were expressed and purified as described previously [3, 4]. Double-headed (referred to as HMM) porcine myosin VI with bound calmodulin was purified from Sf9 cells by FLAG affinity chromatography.

α -actinin: the pGex4T-1-ACTN4-6xHis construct was overexpressed in rosetta 2 DE3 pLys bacteria. The pellet was resuspended in a buffer containing 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA, 5% Glycerol and 1% Triton. After sonication, the lysate was centrifuged at 16000rpm in a JA 25.50 rotor (beckman) for 30 minutes at 4°C. The supernatant was loaded onto a glutathione sepharose 4B resin (GE Healthcare) for 2 hours at 4°C. Elution was performed by adding 100 mM glutathione buffered in 20mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA. The eluted protein was loaded onto a Ni sepharose high performance resin (GE Healthcare) for 2 hours at 4°C. The resin was washed with a buffer containing 20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA supplemented with 20 mM imidazole. Protein was eluted with 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 1 mM EDTA and 300 mM Imidazole and dialyzed against the storage buffer (20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM DTT, 1mM EDTA) over night at 4°C. Quality and concentration were estimated with a SDS-Page gel and ACTN4 was flash frozen in liquid nitrogen and then store at -80°C.

Micropatterning

Hard patterning

Deep UV exposure through a photomask creates micropatterns on polyethylene glycol coated coverslip. pWA is adsorbed on the micropatterned regions. In the presence of the actin polymerizing mix, filaments are growing on and out of the micropattern.

Soft surface patterning

Polyacrylamide gel was prepared as described in detail previously [5] with some modifications. 20 mm² coverslip were silanized in order to bind the polyacrylamide gel to it. Solution of 40% polyacrylamide and 2% bisacrylamide were mixed to have a solution that contains 4% acrylamide and 0.06% bis-acrylamide corresponding to a 1.16 kPa gel rigidity. Beads were added to this mixture and then degased for 15 minutes. The polymerization solution was added between a coverslip with patterned pWA and the silanized coverslip for 20 minutes to transfer the protein from the hard to the soft substrate.

Actin polymerization

Actin polymerization was induced in a solution containing 2 μM actin monomers (7% labeled with Alexa-568), 6 μM profilin, 100 nM Arp2/3 complex 16 nM of HMM-myosin VI (GFP labeled). These proteins mixture were diluted in freshly prepared buffer containing 15 mM imidazole-HCl (pH 7.8), 0.6 mM ATP, 55 mM DTT, 1 mM EGTA, 75 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 1.5 mg/mL glucose, 10 μg/mL catalase, 50 μg/mL glucose oxidase, and 0.25 % w/v methylcellulose. An ATP regenerating system was also added to this medium (2 mM MgATP, 2 mM phosphoenolpyruvate, 2000 U/mL pyruvate kinase).

Semi-automated analysis of data of ring contraction rates

A specific semi-automated analysis of data was developed using ImageJ and MATLAB for the analysis of myosin induced-contraction of actin networks on patterned rings as described previously [6].

Open chamber experiment

First, PDMS mixture was prepared by adding 10 g of DMS (Sylgard 184 Silicone Elastomer; Dow Corning) for each gram of curing agent. The mixture was degassed for a minimum of 45 min, spread into a thin layer of about 5 to 10 mm, and heated for 20 min at 100°C. PDMS was cooled down and attached to the soft patterning coverslip after creating a well in the middle.

Traction force microscopy

A specific semi-automated analysis of data was developed using ImageJ as explained previously [7].

Numerical simulations of architecture contractility

General features

Simulations were performed with the software Cytosim [8] as previously described [9]. Basically, actin filaments are modeled as elastic fibers surrounded by an immobile viscous fluid, and their Brownian motion is calculated following Langevin dynamics. The filaments are at steady state, as simulating their assembly dynamics is not necessary to study the contractile behavior of a network. Steric attraction and repulsion between actin filaments are included to avoid unrealistic filaments overlap, with a realistic range (20 nm, see [9] for more details). The crosslinkers are attached at fixed positions for

simplicity (Figure S2A), during the first stage of the simulation during which the system is setup. Molecular motors are made of two identical actin-binding motile “heads”. Each of them can bind and unbind stochastically to filaments and move along the filaments toward the pointed end. Motors diffuse when the two heads are unattached. A motor with two heads bound to different filaments creates a Hookean spring between these filaments. The motion of the attached heads toward the pointed end of the filament generates a contractile stress (Figure S2B). The Arp2/3 complexes also act as Hookean spring between the pointed end of one filament (daughter filament) and a random position along the mother filament, with an additional torque constraint to reproduce the characteristic angular branching (Figure S2A). Finally, Binders link the filament to random positions on the patterned area, such as to reproduce the immobilization of actin on the patterned area (binders, Figure S2A). Attached binders are also represented as Hookean springs.

The main parameters used for simulating the objects are given in Table 1.

Parameter	Value	Description
General		
Temperature	25 °C	In-vitro conditions
Viscosity	0.18 pN s / μm^2	In-vitro conditions (in the presence of methylcellulose)
Simulated time	80 s	With a time step of 10 ms
Ring diameter	9 μm	
Actin filaments		
Persistence length	10 to 15 μm	From [1, 10].
Steric radius	5 nm	~actin filament radius
Length	see table 2	Filaments are of constant length
Molecular motor		
Binding rate	5 s^{-1}	Rate at which free myosin binds to actin filaments. This value was calculated from k_+ and the concentration of actin and myosin in the sample. (4.5-9 s^{-1} , from [11])
Binding range	36 nm	Average myosin step size. The results were relatively insensitive within the range 20 to 80 nm.
Unbinding force	3.65 pN	Typical "rupture" force required to detach actomyosin VI [12].
Maximal speed	$v_m = 0.3 \mu\text{m s}^{-1}$	Velocity of motor toward the pointed end, from [13].

Stall force	$f_s = 2 \text{ pN}$	Parameter of the linear force velocity relationship $v = v_m(1 + \vec{f} \cdot \vec{d} / f_s)$, that determines how motors are stopped by antagonistic force. From [12, 14].
Stiffness	$100 \text{ pN}/\mu\text{m}$	Elastic constant of the link between the 2 heads, empirical.
Length	$0.03 \mu\text{m}$	Link resting length, \sim myosin lever arm, [11].
Crosslinker		
		Crosslinkers are created during an initial stage, and are static during the contraction phase.
Stiffness	$100 \text{ pN}/\mu\text{m}$	Elasticity constant of the link between the two extremities, same as molecular motor stiffness
Length	40 nm	Link resting length, \sim α -actinin length, [15].
Binders		
Binding rate	5 s^{-1}	Rate of attachment of a free binder to a filament. Empirical value
Binding range	30 nm	Distance of attachment. Empirical value
Unbinding rate	0.05 s^{-1}	Low detachment rate in the absence of force
Unbinding force	0.05 pN	Characteristic detachment force. A binder can easily be detached with a small force, which matches the experiments where rings detach from the substrate.
Stiffness	$2 \text{ pN}/\mu\text{m}$	Elasticity constant of the Hookean spring

Table 1: The main parameters used during simulation.

Architecture simulations

The simulations are composed of two phases: during the first “growth” phase, the system is setup into the desired configuration to represent disordered networks, ordered and disordered bundles. Then crosslinkers and molecular motors are added to the actin organizations, and the system is simulated for 60 s. In this second phase, the behavior of the system is recorded and analyzed. The first phase is different for each network, but the second phase is identical in all cases.

To form a disordered branched network (Figure S2A, green), Arp2/3-like entities are distributed along the circular pattern, and primer filaments are randomly added. Nucleation and elongation occur during the first phase so that all the patterned area is covered with short, branched actin filaments.

To create a ring made of ordered bundles (Figure S2A, red), the Arp2/3-like entities and primer filaments are distributed over 16 discs of diameter 0.5 μm , regularly distributed on the ring pattern. They are also confined between two circles of radius $R_1 = 4.25 \mu\text{m}$ radius and $R_2 = 4.75 \mu\text{m}$ radius, to force them to cover a circular area corresponding to the experimental pattern. The confinement circles are removed for the second phase.

Disordered bundles (Figure S2A, blue) are generated by randomly distributing short actin filaments of desired length on the pattern area. Table 2 gives the parameters for each architecture. These parameters are chosen to obtain the same total amount of linear polymerized actin on the ring (but the number of filaments and thus their average length vary for each architecture), and the same density of “binders” by patterned area.

Disordered network		
	Number of filaments	1744
	Filament length (μm)	Between 0.95 and 1.25 uniformly distributed.
	Number of Arp2/3 entities	1569
	Number of binders	2000
Ordered fiber		
	Number of filaments	1173
	Mean filament length (μm)	Between 1.33 and 1.67 uniformly distributed
	Number of Arp2/3 entities	1122
	Number of binders	1360
Disordered fiber		
	Number of filaments	1416
	Mean filament length (μm)	Between 1.03 and 1.37 uniformly distributed
	Number of Arp2/3 entities	0
	Number of binders	2000

Table 2: The parameters used to obtain each architecture .

Simulations analysis

The rate of contraction is determined according to the maximal velocity of ring perimeter decrease over time. Network connectivity is defined as the mean number of

static links per actin filament: e.g. if one filament has one crosslinker bound and one Arp2/3 complex entity bound, its connectivity will be 2. The connectivity indicates how one filament is locally connected to its neighbors. Filaments are connected together by crosslinkers or the Arp2/3 complex in clusters (groups of filaments all connected together). The size of the largest cluster (or the fraction of filaments that are in the largest cluster) thus gives a measure of the overall connectivity of the actin organization (when the fraction is close to 1, all filaments are connected together, and when the fraction is close to zero, the network is disconnected).

Movies legends:

Movie S1: ADF/Cofilin debranches actin filament networks created by the Arp2/3 complex. Left panel: Actin+Arp2/3 complex, middle panel: Actin+Arp2/3 complex+ ADF/cofilin, left panel: Actin+Arp2/3 complex+ ADF/cofilin+ α -actinin. Total elapsed time is 595 seconds and compressed to a 4-seconds QuickTime movie.

Movie S2: Surface-attached myosin VI slides antiparallel (red and green arrows) actin filaments. Total elapsed time is 60 seconds and compressed to a 4-seconds QuickTime movie.

Movie S3: Contraction of different ring architectures: branched network on the left, disordered bundles on the middle and ordered bundles on the right, in absence (top row) or in presence (bottom row) of α -actinin. Total elapsed time is 45 minutes and compressed to a 6-second QuickTime movie.

Movie S4: Simulation of the branched network, disordered and ordered bundles in absence (left panel) or presence (right panel) of α -actinin. (Top row) is the simulation including all filaments. (Bottom row) is the same simulation but we show only a portion of them to be able to track individual filament. Total elapsed time is 59 seconds and compressed to a 7-second QuickTime movie.

Supporting References

- S1. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. *J. Biol. Chem.* *270*, 11437-11444.
- S2. Higgs, H.N., Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* *38*, 15212-15222.
- S3. Reymann, A. C., Martiel, J. L., Cambier, T., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., and Théry, M. (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* *9*, 827-832.
- S4. Suarez, C., Roland, J., Boujemaa-Paterski, R., Kang, H., McCullough, B.R., Reymann, A.C., Guérin, C., Martiel, J.L., De la Cruz, E.M., and Blanchoin, L. (2011). Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr Biol.* *21*, 862-868.
- S5. Vignaud, T., Ennomani, H., and They, M. (2014). Polyacrylamide hydrogel micropatterning. *Methods Cell Biol.* *120*, 93-116.
- S6. Reymann, A.-C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.-L., Guérin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Théry, M., and Blanchoin, L. (2012). Actin Network Architecture Can Determine Myosin Motor Activity. *Science* *336*, 1310-1314.
- S7. Martiel, J.L., Leal, A., Kurzawa, L., Baland, M., Wang, I., Vignaud, T., Tseng, Q., and Théry, M. (2015). Measurement of cell traction forces with ImageJ. *Methods Cell Biol.* *125*, 269-287.
- S8. Nedelec F., and Foethke D. (2007). Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers. *New J Phys.* *9*, 427.

- S9. Letort, G., Politi, A.Z., Ennomani, H., They, M., Nedelec, F., and Blanchoin, L. (2015). Geometrical and mechanical properties control actin filament organization. *PLoS Comput Biol.* *11*, e1004245.
- S10. McCullough, B.R., Blanchoin, L., Martiel, J.L., and De la Cruz, E.M. (2008). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* *381*, 550-558.
- S11. Robblee, J.P., Olivares, A.O., and de la Cruz, E.M. (2004). Mechanism of nucleotide binding to actomyosin VI: evidence for allosteric head-head communication. *J. Biol. Chem.* *279*, 38608-38617.
- S12. Oguchi, Y., Mikhailenko, S.V., Ohki, T., Olivares, A.O., De La Cruz, E.M., and Ishiwata, S. (2008). Load-dependent ADP binding to myosins V and VI: implications for subunit coordination and function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *105*, 7714-7719.
- S13. Rock, R.S., Rice, S.E., Wells, A.L., Purcell, T.J., Spudich, J.A., and Sweeney, H.L. (2001). Myosin VI is a processive motor with a large step size. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *98*, 13655-13659.
- S14. Altman, D., Sweeney, H.L., and Spudich, J.A. (2004). The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell* *116*, 737-749.
- S15. Wachsstock, D.H., Schwarz, W.H., and Pollard, T.D. (1993). Affinity of alpha-actinin for actin filaments determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. *Biophys. J.* *65*, 205-214.

- Movie S1 : <http://www.editorialmanager.com/current-biology/download.aspx?id=526270&guid=00783145-ddc9-4dc4-977c-4c78602f83af&scheme=1>
- Movie S2 : <http://www.editorialmanager.com/current-biology/download.aspx?id=526271&guid=5719e315-3a6d-4883-a9b4-2436d47d0d18&scheme=1>
- Movie S3 : <http://www.editorialmanager.com/current-biology/download.aspx?id=526272&guid=7709d913-c5c1-42a3-8a45-fae013ef07cd&scheme=1>
- Movie S4 : <http://www.editorialmanager.com/current-biology/download.aspx?id=526273&guid=7657a201-84f3-42fd-a592-6cd706e61c1f&scheme=1>

8.2 Désassemblage induit par les myosines

Couplé à la contractilité, le phénomène de désassemblage est important dans l'étude de la contraction des réseaux d'actine. En effet, il a été remarqué que l'effet des myosines sur les filaments d'actine n'est pas seulement de les réorganiser, mais qu'elles provoquent aussi un fort désassemblage des filaments ([Reymann et al.(2012)], figure 8.1). De plus, la concentration de protéines de pontage ainsi que la géométrie du réseau vont fortement influencer sur l'efficacité de ce désassemblage.

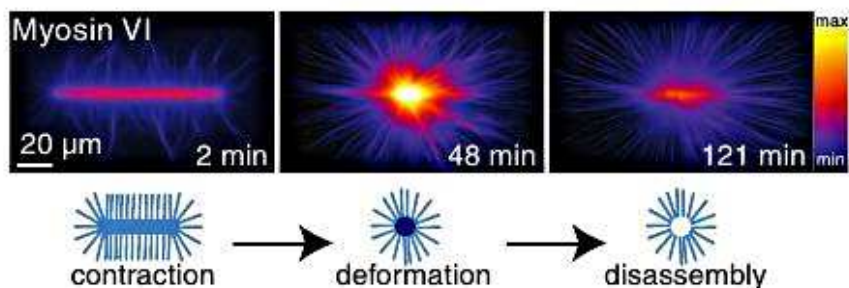


Fig. 8.1 : Contraction et désassemblage d'un réseau d'actine *in-vitro*
Tiré de [Reymann et al.(2012)].

Dans notre étude, il n'était pas nécessaire de tenir compte de ce phénomène, puisqu'un modèle plus simple était suffisant pour expliquer les observations *in-vitro*. Mais tenir compte de ce comportement peut être essentiel pour d'autres études.

8.2.1 Simulation du désassemblage par dépolymérisation

Une première version basique permettant de simuler le désassemblage consiste à considérer que lorsque les myosines sont proches des extrémités pointues des filaments les forces qu'elles exercent vont provoquer la dissociation des monomères d'actine dans cette partie du filament. Le modèle consiste donc à faire dépolymériser les filaments lorsqu'ils ont suffisamment de myosines (pour exercer une force suffisante) accrochées à leurs extrémités pointues. Une autre version de ce modèle est aussi de considérer que si l'extrémité pointue d'un filament subit une force opposée supérieure à une certaine limite, elle aura alors une forte probabilité de dépolymériser, indépendamment de la présence des moteurs (Figure 8.2). Cette modélisation n'est certes pas réaliste mais permet de reproduire la perte nette de densité de filaments observée au niveau du micropatron.

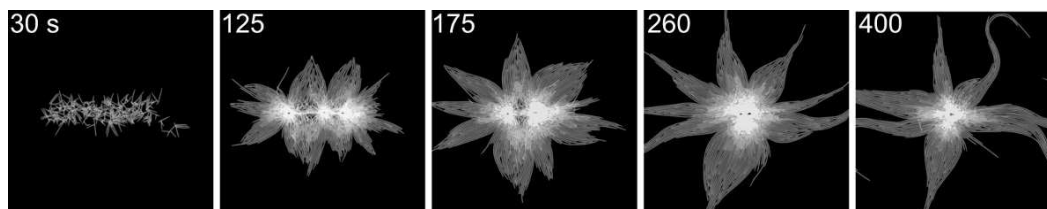


Fig. 8.2 : Simulation de la contraction et désassemblage d'un micropatron par dépolymérisation des filaments

Contraction et désassemblage d'un micropatron rectangulaire par les moteurs moléculaires, sous l'hypothèse de dépolymérisation des filaments lorsque la force exercée sur l'extrémité pointue est trop importante.

Une seconde hypothèse pour expliquer la diminution de la concentration locale des filaments d'actine au cours de la contraction pourrait être que les forces exercées par les myosines sur le complexe Arp2/3 entraîne sa dissociation.

8.2.2 Dissociation des complexes Arp2/3

Une façon de modéliser ce comportement consiste à fixer un angle limite à partir duquel les branches de filaments d'actine vont se dissocier. Il a été observé *in-vitro* que ce complexe forme des branches avec un angle de $71^\circ \pm 10^\circ$ [Blanchoin et al.(2000)]. Il est donc possible de considérer que si la force contenue dans le complexe (pour maintenir les 2 branches avec un angle proche de sa valeur d'équilibre) devient trop élevée, celui-ci aura tendance à se dissocier. Ainsi, en imposant une forte probabilité de dissociation lorsque la force dans l'entité simulant le complexe Arp2/3 est élevée, nous pouvons simuler cette possibilité. Les différentes simulations que nous avons effectuées avec ce modèle donnaient un comportement similaire à celui montré en exemple sur la figure 8.3. Les complexes Arp2/3 se dissocient sous l'action des forces exercées par les moteurs moléculaires, réduisant la connectivité du réseau. Le reste du réseau n'est donc pas affecté et l'on obtient plus de contraction.

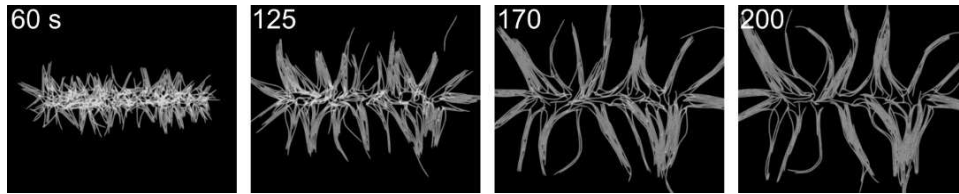


Fig. 8.3 : Contraction et désassemblage d'un micropatron par dissociation du complexe Arp2/3

Exemple de contraction et désassemblage d'un micropatron rectangulaire par les moteurs moléculaires, sous l'hypothèse de dissociation du complexe Arp2/3 si la force contenue dans ce complexe est élevée.

Ce phénomène ne semble donc pas approprié, bien qu'il soit possible qu'il intervienne toutefois, mais avec moins d'efficacité que dans les simulations précédentes.

Un autre modèle plus réaliste est envisageable : il peut en effet être nécessaire de prendre en compte la fragmentation des filaments d'actine induite par les moteurs moléculaires par flambage et/ou torsion [De La Cruz et al.(2015)].

8.2.3 Fragmentation des filaments

Nous illustrerons ici simplement l'aspect flambage et fragmentation des filaments d'actine. Le principe de la fragmentation repose sur le fait que la courbure des filaments sous l'effet de moteurs moléculaires peut atteindre une valeur limite au delà de laquelle on va imposer leur fragmentation. En effet, il a été précédemment montré qu'il était possible de briser un filament d'actine en exerçant une force dessus :

- si le filament est droit, il faut appliquer une force d'au moins 600 pN pour le briser (ce qui ne paraît guère possible pour des myosines). En revanche, si le filament est twisté, la force nécessaire est réduite à 200 pN [Tsuda et al.(1996)].
- si le filament est courbé, avec un rayon de courbure aux alentours de $0.36 \mu m$, la force nécessaire pour le briser est de l'ordre de 1 pN [Arai et al.(1999)].

J'ai donc adapté l'implémentation d'un filament dans `Cytosim` pour ajouter cette possibilité de fragmentation mécanique. Pour cela, nous avons défini une fonction de la tension présente dans le filament et du rayon de courbure local :

$$f(r, t) = t * 1/r^2$$

Cette définition est arbitraire. Le coefficient r^2 est choisi afin de donner plus de poids au rayon de courbure qu'à la tension. Le rayon de courbure peut être calculé entre chaque paires de segments consécutifs ainsi :

$$r = \frac{seg}{2} * \frac{1}{\sin(\theta/2)}$$

où seg est la valeur courante de la taille des segments.

À partir de ces valeurs, la probabilité d'avoir une brisure entre ces 2 segments peut être décrit par la loi de Weibull (choix arbitraire, avec $P_0 = 1$ et f_0 à choisir) :

$$P = P_0 * \exp\left(-\frac{f_0}{f(r, t)}\right)$$

La figure 8.4 illustre l'effet de ce modèle de fragmentation sur le réseau contractile de filaments d'actine. Nous pouvons constater que ces simulations ne reproduisent pas la perte de densité de filaments au niveau du micropatron.

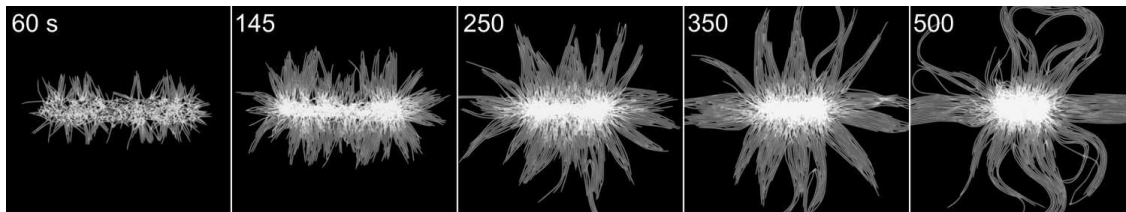


Fig. 8.4 : Contraction et désassemblage d'un micropatron par fragmentation

Simulation de la contraction et du désassemblage d'un micropatron par les moteurs moléculaires, sous l'hypothèse de fragmentation des filaments lorsque la tension et la courbure du filament sont trop importants.

La fragmentation des filaments est fortement favorisée s'il y a des discontinuités dans les propriétés mécaniques locales des filaments [De La Cruz et al.(2015)]. L'effet de twist des filaments, qui crée en particulier de telles hétérogénéités, serait donc important à ajouter à notre modèle de fragmentation. Néanmoins il n'est pas actuellement possible de considérer le twist des filaments dans `Cytosim`.

8.2.4 Conclusion du désassemblage

Dans ce chapitre nous avons illustré quelques réflexions qui nous permettraient d'intégrer le désassemblage exercé par les myosines lors de la déformation collective de structures de filaments d'actine. Cependant nous avons rencontré plusieurs limites qui ne permettent pas d'envisager toutes les hypothèses derrière le mécanisme de désassemblage avec *Cytosim*. Notamment une de ses limites vient du manque de données expérimentales permettant de contraindre certaines des hypothèses permettant d'implémenter le modèle de désassemblage. Le domaine du cytosquelette est très actif à l'heure actuelle pour essayer de comprendre plus en détails comment les contraintes mécaniques exercées sur ce dernier affecte son comportement dynamique. Il ne fait aucun doute que dans les années à venir, nous disposerons d'un plus grand nombre d'informations nous permettant de contraindre les simulations et d'implémenter *Cytosim* avec un nombre d'hypothèses réalistes sur les mécanismes impliqués dans le désassemblage des structures d'actine. Il sera ainsi possible de réévaluer à travers de nouvelles simulations quelle est la contribution du désassemblage sur le comportement collectif de structures d'actine suite à l'action de moteurs moléculaires. Ce que j'ai donc présenté dans ce chapitre est forcément incomplet mais il me semblait intéressant de le présenter comme pistes exploratoires qui pourront servir dans le futur à des modèles plus élaborés.

Quatrième partie

POSITIONNEMENT DU CENTROSOME

9. Le centrosome dans la cellule	170
9.1 Présentation générale du centrosome	170
9.2 Théories du placement du centrosome	173
10. Positionnement du centrosome : simulations	182
10.1 Configuration des simulations	182
10.2 Forces de "pushing" : simulations	184
10.3 Forces de "pulling" : simulations	192
11. Applications à des cas particuliers	198
11.1 Ciliogenèse	198
11.2 Fuseau mitotique monopolaire	201

9. LE CENTROSOME DANS LA CELLULE

Dans de nombreux types cellulaires, en particulier chez les cellules animales, l'organisation spatiale des microtubules, qui détermine ensuite l'organisation des différents organites dans la cellule (cf 1.4.2), est en majorité contrôlée par un MTOC responsable de la nucléation des microtubules, le centrosome.

9.1 Présentation générale du centrosome

Le centrosome est l'organite cytoplasmique principal permettant de nucléer les microtubules. Il est composé d'une paire de centrioles, qui sont des cylindres formés de 9 triplets de microtubules organisés sous forme de roue (Figure 9.1 (A)). Ces centrioles sont entourés d'une matrice de protéines spécifiques, appelée matériel péri-centriolaire (PCM, Figure 9.1 (B)). Ce complexe contient notamment une forte concentration de γ -tubuline autour des 2 centrioles, ce qui leur permet de nucléer les microtubules. Cependant il semblerait que seul un des 2 centrioles (le plus mature des 2 appelé centriole mère) peut ancrer les microtubules en un réseau astral [Piel et al.(2000)].

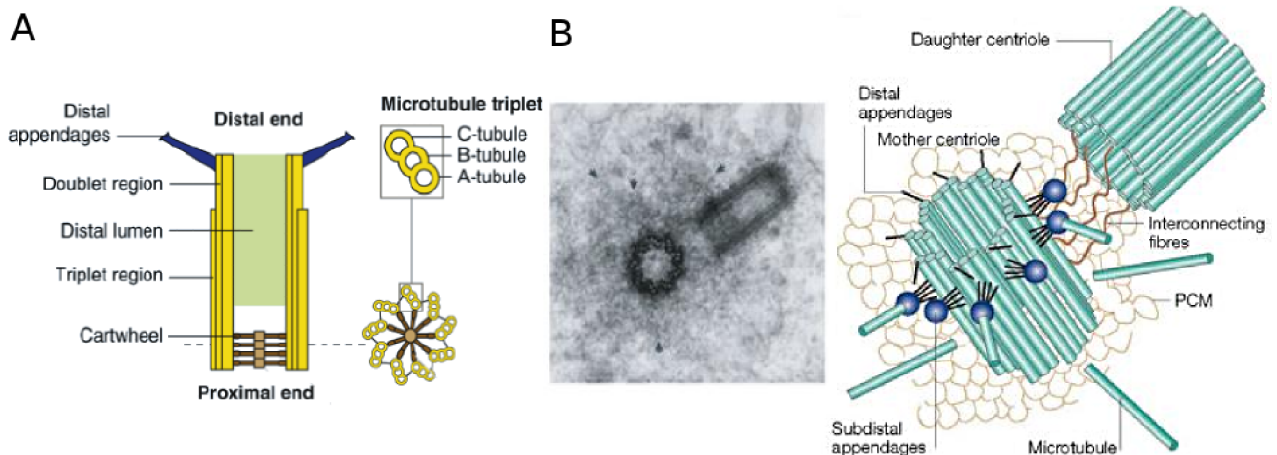


Fig. 9.1 : Composition du centrosome

(A) Structure des centrioles, composés de 9 triplets de microtubules disposés en forme de roue. Tiré de [Azimzadeh et Marshall(2010)]. (B) Composition du centrosome, formé de 2 centrioles, un centriole mère et un centriole fille, entourés d'un nuage protéique, le matériel péri-centriolaire (PCM). Vue par microscopie électronique (gauche) et schéma résumant la structure du centrosome (droite). Tiré de [Sluder(2005)].

Ainsi le centrosome génère un réseau astral de microtubules dont il est le centre, ancrant les extrémités \ominus . Cette formation lui permet d'assembler des microtubules qui vont pouvoir explorer l'espace intra-cellulaire. Les microtubules vont en retour assurer une transduction du signal vers le centrosome. Ce dernier joue un rôle essentiel dans la division cellulaire en rassemblant et positionnant correctement le fuseau mitotique, assurant ainsi la répartition du matériel génétique [Bornens(2012)] (cf 9.1.2).

Comme son nom l'indique, il est souvent placé au centre de la cellule. En fait, sa posi-

tion dans la cellule est déterminante. Les microtubules centrosomiaux formant les "rails" du trafic cytoplasmique, la position et l'orientation du centrosome déterminent la position des différents organites dans les cellules [Manneville et Etienne-Manneville(2006)] (cf 1.4.2). Le décentrage du centrosome participe en particulier à la croissance de cils dans les cellules épithéliales, à la migration de cellules neuronales ou à la délivrance de granules lytiques ([Tang et Marshall(2012)], Figure 9.2).

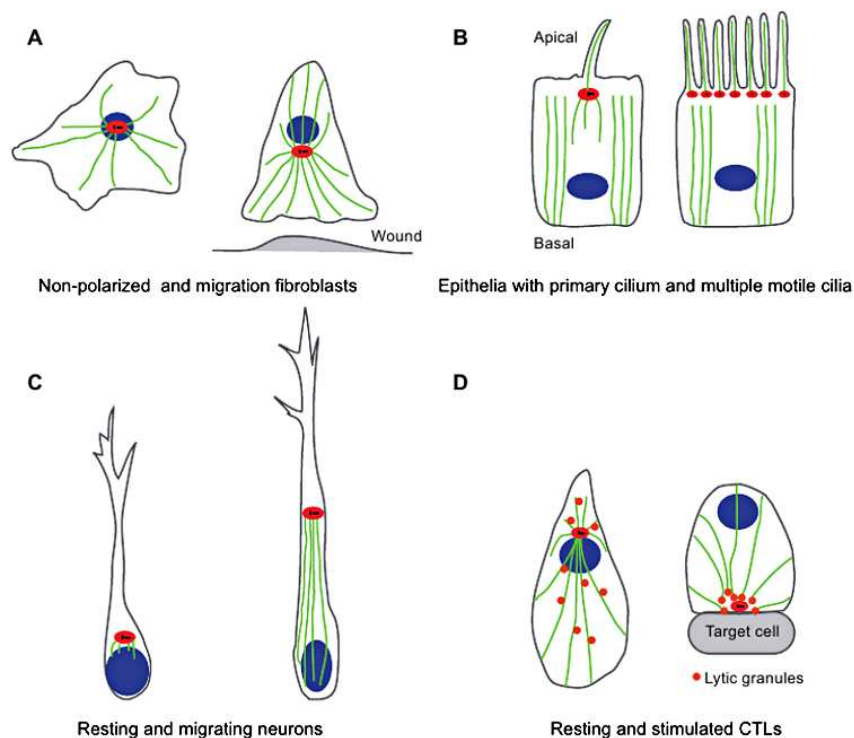


Fig. 9.2 : Positionnements du centrosome dans différents types cellulaires

(A). Le centrosome de fibroblaste non polarisé est situé au barycentre de la cellule, ancré au noyau. Il se place entre le noyau et le front de la cellule lorsqu'elle migre vers une blessure. (B). La position du centrosome proche du bord supérieur (apical) de cellules épithéliales permet la formation de cils. (C). Dans les neurones au repos, le centrosome est proche du noyau, alors que dans les neurones en migration, le centrosome est loin devant le noyau. (D). Lorsqu'une cellule T n'a pas contacté de cellules cibles, les microtubules permettent de répartir les granules lytiques dans toute la cellule. En revanche, ils les concentrent vers la cellule cible lorsque le centrosome se place proche de l'interface avec celle-ci. Tiré de [Tang et Marshall(2012)].

9.1.1 Où est le centrosome dans la cellule ?

La localisation du centrosome est un point essentiel pour les différents processus cellulaires. Pour donner une idée de l'importance et la variabilité du positionnement du centrosome, je vais citer ci-dessous plusieurs exemples de processus cellulaires et la position du centrosome associée à ces différents processus.

- Au cours la migration cellulaire, les cellules sont en général polarisées. Le centrosome peut être positionné entre le bord avant de la cellule (dans la direction du mouvement) et le noyau [Gotlieb et al.(1981)], au niveau du **barycentre** de la cellule mais aussi il peut être placé derrière le noyau, selon un mécanisme de régulation précis contrôlé par la géométrie des cellules [Pouthas et al.(2008)]. Sa position est en particulier nécessaire dans certains cas à la persistance de la direction du mouvement [Ueda et al.(1997)].

- Dans le cas des cellules en interphase, le centrosome est normalement présent **au centre** de la cellule [Burakov et al.(2003)].
- Afin d'éliminer des cellules cibles, les lymphocytes T établissent des contacts cellules-cellules, appelées synapses immunologiques. Le centrosome sera dans ce cas **décentré**, au niveau de l'interface entre les 2 cellules [Geiger et al.(1982)]. Cette position permet l'extrusion des granules lytiques dans la cellule cible. Dans le cas où les lymphocytes T contactent 2 cellules cibles en même temps, des oscillations du centrosome lui permettrait de fluctuer entre les 2 synapses et ainsi de délivrer les granules dans les 2 cellules cibles [Kim et Maly(2009)].
- Au cours du développement embryonnaire après fertilisation, le centrosome provenant du sperme introduit, initialement donc **proche de la périphérie**, se déplace **jusqu'au centre** de l'œuf [Chambers(1939)]. Lors de ce déplacement, il entraîne avec lui les noyaux mâles et femelles, ce qui permet de les rapprocher. Ce déplacement vers le centre serait dépendant des forces de poulies des moteurs moléculaires exercées le long de la longueur des microtubules [Hamaguchi et Hiramoto(1986)]. La polarité qui s'établit dans l'œuf est déterminée par la position initiale du centrosome proche du cortex [Cowan et Hyman(2004)]. Dans ce cas, la trajectoire suivie par le centrosome est donc tout aussi, voire plus, importante que sa position finale.
- L'étude de cellules adhérentes dont la forme est contrainte à l'aide de micropatrons a permis de montrer que le centrosome se place au **barycentre** de la cellule. De plus la géométrie des zones d'adhérence détermine l'orientation du centrosome par rapport au noyau et donc la polarité de la cellule [Théry et al.(2006)]. Cette polarité inhérente des cellules dans un environnement confiné est particulièrement importante pour les contacts inter-cellulaires notamment dans le cas des cellules épithéliales formant un tissu [Nelson(2003)]. En effet l'orientation de l'axe noyau-centrosome vers la jonction entre les cellules permet d'orienter la machinerie du trafic cellulaire vers cette jonction, ce qui est nécessaire à l'initiation de comportements collectifs tels que la formation de lumen [Rodríguez-Fraticelli et al.(2012)].
- Durant la ciliogenèse, le centrosome est attaché à la membrane et crée le cil primaire. Ce **décentrage** dépend des contraintes mécaniques cellulaires. Si une cellule est contrainte par un micropatron de petite taille, limitant ainsi la taille de la cellule, le centrosome se positionne à l'opposé de la zone d'adhésion, au-dessus du noyau et initie un cil. Sur un micropatron de plus grande taille la cellule va plus s'étaler et donc subir des contraintes mécaniques plus importantes. Le centrosome se positionne dans ce cas vers la zone d'adhésion et la formation du cil ne se fait pas [Pitaval et al.(2010)]. Il y a donc un lien étroit entre mécanique (contractilité cellulaire), positionnement du centrosome et formation du cil.
- De plus, lors de la division cellulaire, la position des MTOCs sera aussi déterminante.

9.1.2 Fuseau mitotique

Lors de la division cellulaire, le centrosome se duplique, puis se divise en 2 pôles, définissant l'axe de division (Figure 9.3 (B)). On appelle fuseau mitotique la structure formée par l'ensemble des 2 MTOCs et les microtubules. La membrane nucléaire se désagrège ensuite libérant ainsi les chromosomes dans le cytoplasme (Figure 9.3 (C)). L'instabilité dynamique des microtubules leur permet de chercher et capturer les chromosomes [Wollman et al.(2005), Kalinina et al.(2013)] au niveau des kinétochores [Tanaka et al.(2005)].

L'anneau de cytokinèse se forme ensuite, en général au centre de la cellule : cette position est a priori déterminée par la position des microtubules centraux du fuseau mitotique [Barr et Gruneberg(2007)]. La contraction de l'anneau permet de séparer la cellule en 2 cellules filles (Figure 9.3 (D)). Dans un même temps, les microtubules de chaque pôle associés aux chromosomes dépolymérisent, entraînant les chromosomes dans chacune des cellules filles (Figure 9.3 (E)) et contrôlant donc la répartition du matériel génétique. Ainsi le positionnement du fuseau mitotique est particulièrement important pour assurer le bon fonctionnement de la ségrégation des chromosomes lors de la division.

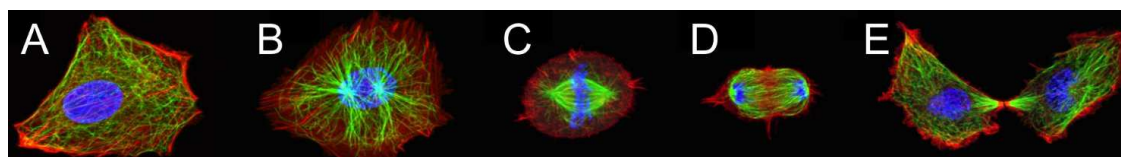


Fig. 9.3 : Le cytosquelette lors de la division cellulaire

Comportement du cytosquelette lors de la division cellulaire : en bleu l'ADN, en vert les microtubules, en rouge l'actine. Image provenant du site web de l'EMBL (prise par Joël Beaudouin).

La position du centrosome dans la cellule est donc essentielle. Il est donc très important de comprendre les mécanismes impliqués dans ce centrage. Comme plusieurs paramètres peuvent être impliqués dans le contrôle du positionnement du centrosome, il n'est pas aisé de déterminer un modèle général pour expliquer la dynamique de ce positionnement. Différentes études (présentées ci-dessous) tentent d'expliquer ou prédire les différents positionnements du centrosome et surtout d'identifier les paramètres principaux intervenant. L'étude de l'effet de ces différents facteurs par les simulations numériques nous permet d'explorer les divers phénomènes possibles contrôlant le positionnement du centrosome qui ont été abordés dans ces études. Ainsi il pourrait être possible d'identifier les paramètres pouvant expliquer pourquoi le centrosome se trouve à telle position dans un cas précis. Ces simulations sont donc ici un soutien important pour construire les hypothèses sur les acteurs du centrage/décentrage en montrant les différentes possibilités/impossibilités qui peuvent ensuite être testées éventuellement *in-vitro*.

9.2 Théories du placement du centrosome

9.2.1 Observation des forces mises en jeu

Plusieurs études combinant des approches *in-vivo* et *in-vitro* ont permis de mettre en évidence différents paramètres responsables du positionnement du centrosome. Je vais tout d'abord illustrer les résultats clés obtenus à partir des approches cellulaires.

Étude dans la cellule

Une de ces études principales effectuée directement dans des cellules en interphase a été proposée dans [Burakov et al.(2003)]. Le centrosome est présent au centre de ces cellules (Figure 9.4). Les auteurs de cette étude ont perturbé cet équilibre en injectant diverses protéines (inhibiteurs, drogues...) afin d'observer l'effet des différents acteurs potentiels du positionnement du centrosome. Les observations importantes que ces expériences ont permis de faire sont les suivantes [Burakov et al.(2003), Zhu et al.(2010)] :

1. L'inhibition de l'activité des dynéines provoque le décentrage du centrosome vers le bord le plus proche.
2. L'inhibition de l'activité des myosines n'affecte pas le centrage du centrosome.
3. Si les activités des dynéines et des myosines sont inhibées en même temps, le centrosome se décentre vers le bord le plus proche.
4. Lorsque l'activité des dynéines est inhibée et que les microtubules sont stabilisés (par ajout de taxol), le centrosome reste au centre de la cellule.
5. Quand les microtubules sont dépolymérisés localement (par injection de nocodazole), le centrosome se déplace vers la zone affectée.
6. Si de plus le noyau des cellules est absent (en utilisant des cytoplastes) le mouvement du centrosome n'est pas affecté.
7. Si les microtubules sont perturbés localement et de plus l'activité des myosines est inhibée, le centrosome se déplace dans la direction opposée à la zone affectée.

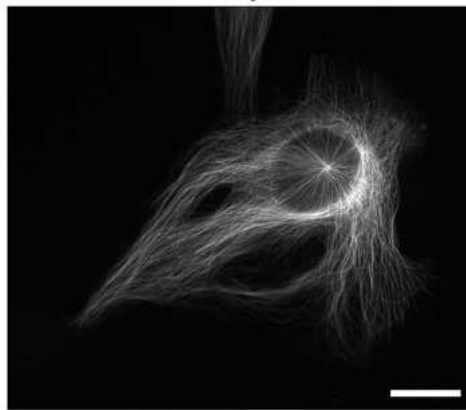


Fig. 9.4 : Centrosome au centre d'une cellule en interphase

Observation des microtubules dans une cellule en interphase non mobile, grâce à des sous unités de tubulines marquées. Échelle : 20 μm . Tiré de [Burakov et al.(2003)].

L'étude directe dans la cellule permet de révéler l'effet de plusieurs facteurs (les dynéines, la polymérisation des microtubules, le flux centripète d'acto-myosine) mais la complexité cellulaire ne permet pas une analyse aisée de ces résultats.

Observations *in-vitro*

Afin d'évaluer la contribution éventuelle des forces exercées par les dynéines corticales par rapport à celle des forces de polymérisation des microtubules, [Laan et al.(2012a)] ont développé *in-vitro* des chambres microfabriquées, à géométrie carrée. Un centrosome purifié à partir duquel les microtubules vont polymériser est placé dans ces chambres. L'ajout d'une couche d'or permet d'avoir une surface favorable à l'attachement des dynéines dont l'épaisseur contrôle la quantité de dynéines présentes. En prenant des mesures à des temps différents, 9 régimes ont pu être étudiés : absence, faible concentration et forte concentration de dynéines pour des régimes dans lesquels les microtubules sont plus petits, de mêmes tailles, ou plus grands que la demi largeur de la chambre de confinement (Figure 9.5). Cette étude a permis de faire les observations listées ci-dessous.

8. Si les microtubules sont petits, le centrosome fluctue pour toutes les concentrations de dynéines et n'est pas particulièrement centré.

9. Lorsque les microtubules ont une longueur comparable à la taille de confinement, en absence de dynéines, le centrosome bouge peu mais est proche du centre. Les forces agissant ici sont dues à la dynamique des microtubules seulement, elles semblent donc centrer dans une géométrie carrée.
10. L'ajout de dynéines rend le centrosome bien plus mobile. Si la concentration de dynéines reste intermédiaire, le mouvement de l'aster se fait autour du centre, avec une vitesse intermédiaire. En revanche, à forte concentration de dynéines, l'aster parcourt toute la chambre à des vitesses pouvant être bien plus fortes, jusqu'à $0.4 \mu m.s^{-1}$.
11. Lorsque les microtubules sont longs par rapport au confinement, ils sont majoritairement courbés et l'aster ne bouge quasiment pas. En absence de dynéines, le centrosome est décentré.
12. Pour une forte concentration de dynéines, les oscillations observées pour les microtubules de longueurs comparables au confinement ont abouti à un centrage dont l'efficacité est quasiment totale.
13. Finalement les auteurs proposent que ce positionnement est influencé par le fait que les microtubules peuvent glisser le long des murs de la chambre microfabriquée. Cela crée une distribution anisotrope des microtubules étant donné leur géométrie carrée, "à coins", dans lesquels leurs extrémités ont tendance à s'accumuler.

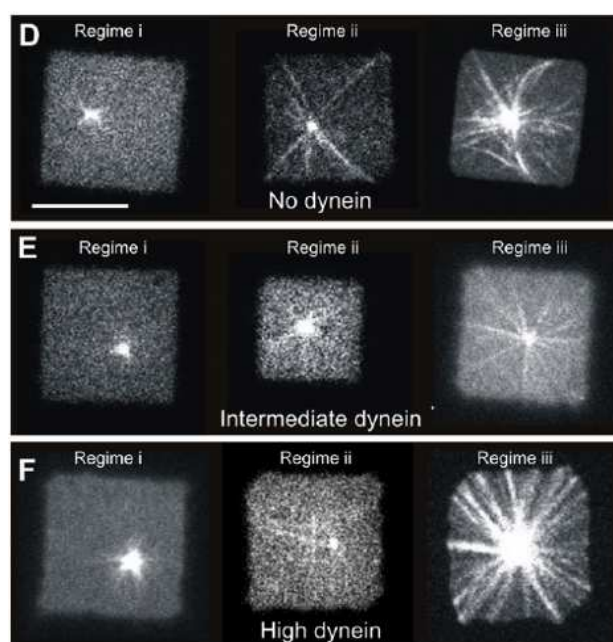


Fig. 9.5 : Système expérimental pour étudier les forces des dynéines corticales

Des centrosomes purifiés sont placés dans des chambres dont les murs contiennent aucune (D, haut), une faible concentration (E, milieu) ou une forte concentration (F, bas) de dynéines, et observés lorsque les microtubules sont petits (régime i, gauche), de mêmes tailles (régime ii, milieu) ou grands (régime iii, droite) par rapport à la demi largeur de la chambre. Tiré de [Laan et al.(2012a)]

Les observations faites dans ces études, couplées à des analyses théoriques, permettent de caractériser les forces principales intervenant dans le positionnement du centrosome.

9.2.2 Identification des forces mises en jeu

Les différentes études et observations faites sur le positionnement du centrosome ont permis d'identifier les phénomènes mis en jeu dans le contrôle de ce positionnement [Zhu et al.(2010), Kimura et Onami(2010), Manneville et Etienne-Manneville(2006)] :

- **Les forces exercées par les dynéines sur les microtubules.** Les dynéines cherchant à atteindre les extrémités \ominus des microtubules, elles vont tirer sur ceux-ci. D'où le nom de forces de "pulling" que nous utiliserons par la suite. Ces moteurs peuvent être présents majoritairement sur le cortex, auquel cas les forces de "pulling" seront exercées seulement au niveau des extrémités \oplus des microtubules. Ils peuvent aussi être répartis dans le cytoplasme. Dans ce cas, les forces de "pulling" seront exercées sur toute la longueur des microtubules.
D'après les observations 1, 3, 10 et 12 de la partie 9.2.1, ces forces sont dominantes et centrent le centrosome (Figure 9.6 A).
- **Les forces exercées par les microtubules sur le cortex.** Ces forces sont répulsives puisque les microtubules poussent contre le cortex en polymérisant (cf 1.3.3). Dans la suite, on les appellera forces de "pushing" pour simplifier.
Les forces de "pushing" ont en général un effet décentrant (cf 9.2.1 obs. 4; Figure 9.6 B) selon la répartition des microtubules dans la cellule. Dans des géométries "à coins" ces forces peuvent néanmoins avoir un effet centrant sur le centrosome (obs. 9 et 13), à condition que les microtubules ne soient pas trop longs (obs. 11).
- **Le flux d'acto-myosine.** La dynamique créée par l'action des myosines sur l'actine crée un flux dans la cellule qui peut donc déplacer le centrosome ou déplacer les filaments ou autres objets qui exerceront alors des forces sur le centrosome.
Les forces d'acto-myosine centrent mais sont de plus faible amplitude que les forces de "pushing" ou de "pulling" (cf 9.2.1 obs. 2, 4; Figure 9.6 C). Néanmoins les forces de "pushing" et d'acto-myosine additionnées peuvent contrebalancer les forces de "pulling" (obs. 5 et 7).
- **Les interactions avec le noyau.** Le centrosome et le noyau semblent être fortement liés et sont très souvent placés proches l'un de l'autre dans la cellule. Pourtant le lien entre ces 2 organites et leurs influences éventuelles ne sont pas encore déterminées [Burakov et Nadezhdina(2013)].
Cependant l'observation 6 de la partie 9.2.1 suggère que, au moins dans le cas de l'étude correspondante, l'interaction noyau-centrosome ne jouerait pas de rôle déterminant.
- **Les forces exercées par les kinésines sur les microtubules.** Ces moteurs moléculaires se déplacent vers les extrémités \oplus des filaments, donc ils exercent des forces opposées à celles de "pulling" des dynéines.
Ces forces étant décentrantes, l'observation 1 (cf 9.2.1) implique que leur amplitude est inférieure à celle des forces générées par les dynéines (Figure 9.6 D). Pour exercer des forces efficaces, les kinésines doivent avoir des points d'ancrages dans le cytoplasme, ce qui est tout à fait plausible. Toutefois, le centrage restant prévalent lorsque la dynamique des microtubules est perturbée ([Burakov et al.(2003)] obs. 4), l'effet des

kinésines semble être négligeable dans cette situation.

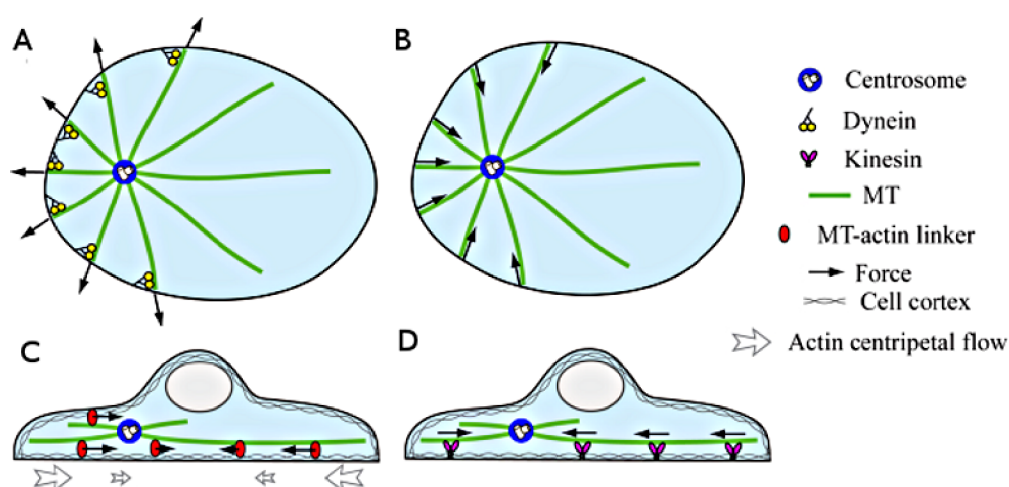


Fig. 9.6 : Effets et forces intervenant dans le positionnement du centrosome

(A) Les forces exercées par les dynéines sur les microtubules centrent le centrosome. (B) Les forces dues à la polymérisation des microtubules ont un effet déstabilisant. (C) Les forces dues au flux d'actomyosine sont orientées vers le centre de la cellule et leur amplitude est supérieure en périphérie. (D) Les forces générées par les kinésines sur les microtubules ont tendance à décentrer le centrosome. Adapté de [Zhu et al.(2010)].

Ces études ont permis d'identifier les facteurs semblant primordiaux dans ce processus de positionnement et de comparer leurs effets. Il est cependant important de garder en tête que les conclusions tirées d'une situation donnée ne seront pas forcément conservées dans d'autres environnements [Hale et al.(2011)]. Mais l'étude de ces mécanismes peut quand même permettre d'estimer ceux qui peuvent être responsables des observations faites pour un ensemble de conditions données.

A priori, les principales forces dans la majorité des cas sont celles de "pushing" et de "pulling". Il me semble donc important d'en résumer les principales conclusions.

9.2.3 Forces de "pushing"

L'effet de ces forces dépend de la répartition des points de contact entre les microtubules et le cortex. Il dépend donc de la distribution des microtubules autour du centrosome, de leur comportement lorsqu'ils atteignent la périphérie de la cellule et de la géométrie de celle-ci. Il est aussi possible que les microtubules rencontrent des obstacles à l'intérieur même de la cellule (par exemple des organites) et y exercent donc des forces de "pushing". Pour plus de simplicité, nous allons considérer la plupart du temps des cellules avec une géométrie circulaire et en absence d'obstacles dans le cytoplasme.

Si la distribution des microtubules est isotrope, le nombre de points où les forces de "pushing" seront exercées est équilibré de chaque côté du centrosome. Les microtubules du côté le plus proche du centrosome étant plus courts, ils exercent une force supérieure à celle des microtubules opposés (Figure 9.7 (A)). Ceci conduira donc à un centrage du centrosome, situation pour laquelle les forces sont équilibrées dans toutes les directions. En revanche, si les microtubules peuvent glisser le long du cortex, leur distribution autour du centrosome

devient anisotrope [Laan et al.(2012a)]. Ce déséquilibre peut conduire à un décentrage du centrosome [Pavin et al.(2012)] (Figure 9.7 (B)). De plus la géométrie a aussi un impact majeur sur la distribution des microtubules. C'est en particulier le cas pour la levure dont la forme très allongée avec 2 "coins" symétriques favorise la distribution symétrique des microtubules par rapport au centrosome. Il en découle que l'équilibre des forces de "pushing" conduit au centrage de celui-ci dans cette géométrie [Tran et al.(2001), Foethke et al.(2009)].

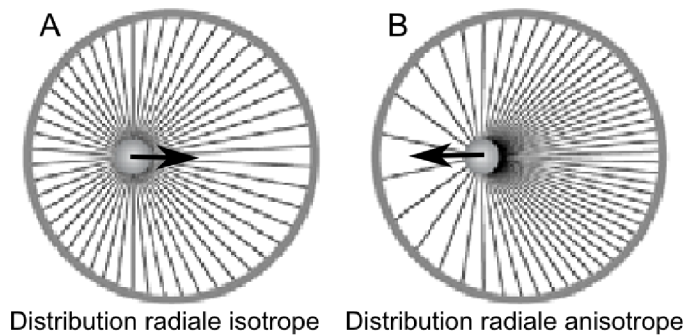


Fig. 9.7 : Forces de "pushing" selon la distribution des microtubules

(A) *Distribution radiale isotrope des microtubules. Il y a autant de points de contact entre le cortex et les microtubules de chaque côté du centrosome. Les microtubules sont plus courts à gauche et donc exercent des forces de répulsion plus importantes. La force finale est alors centrante.* (B) *Distribution radiale anisotrope. Il y a plus de microtubules du côté opposé au centrosome (droite), donc la force finale est dirigée vers la gauche. Adapté de [Pavin et al.(2012)].*

9.2.4 Forces de "pulling"

Ces forces dépendent de la distribution des microtubules, mais aussi de la distribution et de la densité des dynéines. En effet, si les dynéines sont réparties dans le cytoplasme, les forces de "pulling" dépendront de la longueur des microtubules. De plus, les moteurs peuvent être en excès auquel cas tous les microtubules qui atteignent le cortex seront tirés ou en nombre limité et seulement certains filaments interagiront avec les moteurs. Il faut donc distinguer plusieurs cas :

Distribution des microtubules	Symétrique	Asymétrique
"Pushing"	centre [Pavin et al.(2012)] Figure 9.7 (A)	décentre [Pavin et al.(2012)] Figure 9.7 (B)
"Pulling" cortical en excès	neutre [Grill et Hyman(2005)] Figure 9.8 (A)	centre [Laan et al.(2012a)] Figure 9.8 (D)
"Pulling" cortical limité	centre [Howard(2006)] Figure 9.8 (C)	centre [Pavin et al.(2012)] Figure 9.8 (D)
"Pulling" cytoplasmique	centre [Grill et Hyman(2005)] Figure 9.8 (B)	centre fortement Figure 9.8 (D)

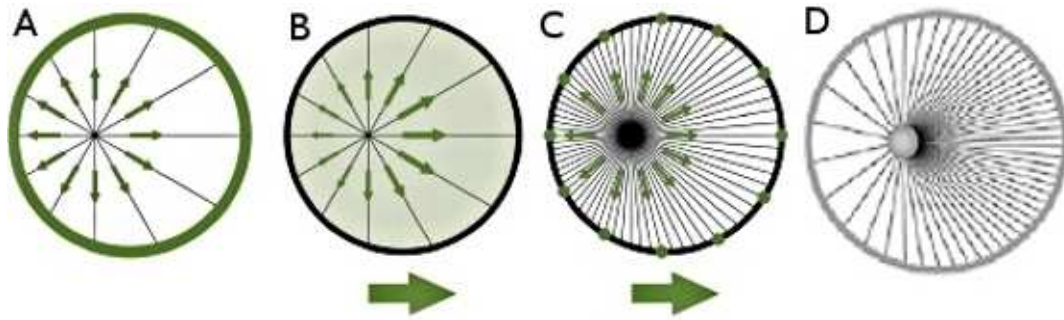


Fig. 9.8 : Forces de "pulling"

(A-C) Distribution symétrique des microtubules. (A) Distribution corticale dense de dynéines. Le nombre de microtubules entrant en contact avec le cortex est égal dans toutes les directions, il n'y a donc pas de mouvement. (B) Distribution cytoplasmique de dynéines. L'aire du cortex est plus grande à droite qu'à gauche, donc la force est dirigée vers la droite, centrant le centrosome. (C) Nombre limité de dynéines corticales. Le périmètre du cortex est supérieur à droite du centrosome qu'à gauche donc plus de dynéines peuvent tirer de ce côté. (D) Distribution radiale asymétrique des microtubules. Il y a plus de microtubules du côté opposé au centrosome (et aussi une plus grande aire). Adapté de [Grill et Hyman(2005)] et [Pavin et al.(2012)].

D'après ces différentes études, les forces de "pulling" (en notant que la géométrie de la cellule est symétrique) vont toujours centrer (mais plus ou moins efficacement) le centrosome, alors que le "pushing" peut provoquer un décentrage.

Il est de plus important de noter que les dynéines pourraient provoquer la déstabilisation des microtubules lorsqu'elles s'associent avec leurs extrémités \oplus [Laan et al.(2012a), Laan et al.(2012b)], ce qui pourrait influencer sur ces forces de positionnement du centrosome.

L'étude de ces forces révèle l'importance de la géométrie du confinement et de l'organisation des microtubules autour du centrosome. L'auto-organisation des microtubules selon la taille du confinement a été en particulier étudiée dans [Pinot et al.(2009)].

9.2.5 Effet du confinement

En changeant la taille de gouttes d'huile contenant des extraits d'œufs *Xenopus laevis*, [Pinot et al.(2009)] ont mis en évidence l'impact que le confinement peut avoir sur l'organisation des microtubules. En effet, ces extraits contiennent en outre des microtubules et des moteurs moléculaires. Si le diamètre est supérieur à $29 \mu m$ (ou s'il n'y a pas de confinement), les microtubules, par leurs interactions avec les moteurs, formeront un aster vers le centre des gouttes (Figure 9.9 (A)). Mais la diminution du diamètre des gouttes va modifier cette organisation en imposant des contraintes mécaniques aux microtubules. Ils vont ainsi former un demi aster décentré pour un diamètre entre 29 et $11 \mu m$ (Figure 9.9 (B)) et longeront la périphérie si le diamètre est encore réduit ($< 11 \mu m$, Figure 9.9 (C)). La reproduction de ces expériences par simulations avec *Cytosim* a permis de montrer que ces organisations spontanées s'expliquent par l'équilibre entre les propriétés mécaniques des microtubules et la géométrie des confinements.

De plus, les auteurs ont aussi vérifié par les simulations que si les microtubules sont contraints à être organisés en un aster, ils ne pourront briser la symétrie de celui-ci seulement dans le cas où leur rotation autour du centre de l'aster est permise. Cette étude suggère donc que l'organisation isotrope ou non des microtubules est influencée par la géométrie du confinement, en particulier sa taille et la capacité des microtubules à pivoter autour du centrosome.

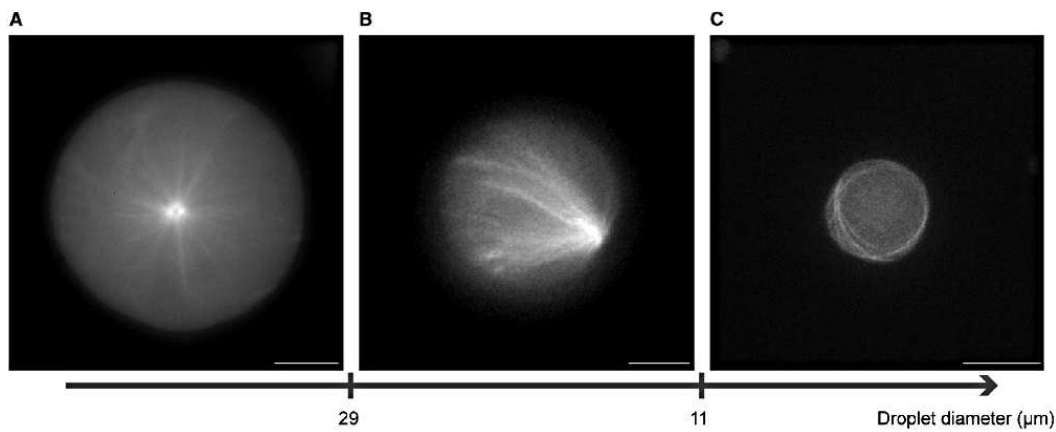


Fig. 9.9 : Auto-organisation des microtubules selon le diamètre du confinement
Organisation en différentes structures des microtubules par les moteurs moléculaires selon le diamètre de la goutte de confinement. (A) Formation d'un aster centré dans la goutte pour un diamètre de 39 μm . (B) Formation d'un demi aster décentré pour un diamètre de 25 μm . (C) Organisation le long du confinement pour un diamètre de 11 μm . Échelle : 10 μm . Tiré de [Pinot et al.(2009)].

Si plusieurs mécanismes pouvant agir sur le positionnement du centrosome ont été identifiés, leurs contributions effectives dans les différents processus (cf 9.1.1) ne sont pas évidentes. Afin d'évaluer ces différentes contributions selon les conditions et donc d'identifier les mécanismes pouvant être responsables du positionnement du centrosome, j'ai réalisé des simulations numériques de certains de ces mécanismes. L'exploration des comportements obtenus dans les simulations pour des conditions variables permet de proposer une base de réflexion théorique sur les phénomènes mis en jeu. Ces simulations permettent de tester si des hypothèses posées peuvent expliquer les comportements observés dans une situation donnée ou au contraire de les réfuter. Cela permet aussi de réfléchir aux différents mécanismes possibles, de soulever plusieurs questions et pourrait servir à désigner de nouveaux systèmes expérimentaux.

10. POSITIONNEMENT DU CENTROSOME : SIMULATIONS

Pour pouvoir explorer les mécanismes contrôlant le positionnement du centrosome par simulations numériques, il faut définir la base de ces simulations afin d'avoir un système le plus simple possible mais néanmoins biologiquement valide (suffisamment pour être informatif).

10.1 Configuration des simulations

Afin de pouvoir étudier comment son positionnement selon différentes conditions, le centrosome est simulé comme un aster nucléant des microtubules radialement répartis autour de son centre (Figure 10.1), les extrémités \ominus d'où la nucléation est initiée restant attachées à ce complexe. Initialement, les microtubules sont répartis uniformément radialement autour du centre de l'aster. À moins qu'une contrainte ne soit ajoutée, ils peuvent ensuite pivoter librement autour de ce point.

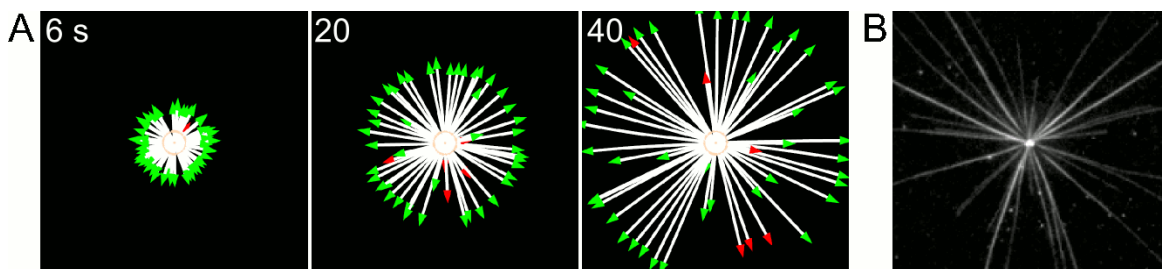


Fig. 10.1 : Simulation du centrosome : configuration

(A) Simulation de la dynamique de 50 microtubules nucléés par un centrosome. Les extrémités \oplus sont représentées en vert (resp. rouge) pour les microtubules en polymérisation (resp. dépolymérisation). (B) Observation d'un centrosome *in-vitro*. Image prise par Francesca Farina (Équipe Cytomorpo).

Par simplicité, nous ne considérons pas ici la possibilité que les microtubules se détachent du centrosome, ni la nucléation de nouveaux microtubules au cours du temps. Si un microtubule dépolymérise jusqu'à une longueur limite, il repolymérise (\approx si un microtubule dépolymérise jusqu'au bout, un autre démarre sur le même γ -TURC).

La table 10.1 résume les principaux paramètres (qui seront utilisés par la suite par défaut) permettant de simuler un centrosome et les microtubules qu'il nucléé. Dans la plupart des cas, nous utiliserons pour ces simulations un cercle de rayon $10 \mu m$ comme espace de confinement, avec une viscosité représentant celle du cytoplasme dans les cellules de $1 pNs\mu m^{-2}$ [Kimura et Onami(2010), Kole et al.(2005)].

Fiber MTs		
Rigidité	$25 \text{ pN} \cdot \mu\text{m}^2$	Longueur de persistance de $5200 \mu\text{m}$ [Gittes et al.(1993)]
Vitesse de polymérisation	$0.13 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	v_0 (voir partie 3.2.1), [Burakov et al.(2003)]
Vitesse de dépolymérisation	$-0.27 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$	v_d , [Burakov et al.(2003)]
Taux de sauvetage	0.064 s^{-1}	τ_r , [Burakov et al.(2003)]
Force d'arrêt	5 pN	Force caractéristique de la polymérisation f_s , [Dogterom(1997)]
Taux de catastrophe	$0.01 \text{ s}^{-1}, 0.04 \text{ s}^{-1}$	Taux de catastrophe libre c_0 et sous force opposée c_{stall} . L'ordre de grandeur vient de [Janson et al.(2003)], mais c_0 est augmenté pour tenir compte du fait qu'une cellule contient beaucoup d'obstacles.
Nombre de tubuline total	10000	Nombre limité
Aster centrosome		
Rayon	$0.5 \mu\text{m}$	rayon du disque représentant le centrosome
Viscosité	$200 \text{ pN} \cdot \text{s} \cdot \mu\text{m}^{-2}$	Contraint la mobilité du centrosome : modélise la friction du nuage centriolaire et des microtubules attachés. Correspond à une mobilité estimée de $0.03 \mu\text{m} \cdot \text{pN}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ [Zhu et al.(2010)].
Nombre de microtubules nucléés	100	[Zhu et al.(2010)].

Tab. 10.1 : Principaux paramètres pour simuler le centrosome

10.1.1 Ajout des moteurs moléculaires

Pour étudier les forces de "pulling", nous allons devoir aussi simuler l'action des dynéines sur les microtubules. Ces moteurs sont implémentés comme une tête dynamique de la classe `motor` de `Cytosim` (cf 3.2.2) reliée par un ressort à sa position initiale (cf 3.2.3). La tête cherche à se déplacer vers l'extrémité \ominus du filament mais comme elle est par ailleurs rattachée à sa position initiale, elle va tirer sur le microtubule pour avancer. La table 10.2 donne les paramètres principaux nécessaires pour simuler une dynéine.

Selon les cas, ces moteurs sont placés le long de la surface de l'espace de simulation pour simuler les dynéines présentes dans le cortex, ou aléatoirement répartis dans tout l'espace pour simuler les dynéines cytoplasmiques.

Avec cette configuration, nous pouvons à présent utiliser ces simulations pour étudier l'effet de différents mécanismes impliqués dans le positionnement du centrosome.

Hand dyneinH		
Vitesse de déplacement	$-1.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$	<i>Vitesse maximale, v_{max} (cf 3.2.2) [Soppina et al.(2009), Gross et al.(2000)].</i>
Force d'arrêt	1.1 pN	<i>Force maximale d'une dynéine, f_{sm} [Toba et al.(2006), Soppina et al.(2009), Mallik et al.(2004)].</i>
Distance d'attachement	$0.02 \mu\text{m}$	<i>Distance à partir de laquelle la Hand peut s'attacher au filament, ordre de grandeur des pas de la dynéine [Mallik et al.(2004)].</i>
Taux d'attachement	5 s^{-1}	<i>Taux à laquelle la Hand s'attache, empirique.</i>
Taux de détachement	0.1 s^{-1}	<i>Fréquence de détachement de la Hand, empirique</i>
Force de détachement	3 pN	<i>Force qui provoque le détachement d'une Hand attachée.</i>
Single dynein		
Raideur du ressort	$100 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$	<i>Raideur du ressort contraignant la Hand à sa position initiale.</i>

Tab. 10.2 : Implémentation de la dynéine

10.2 Forces de "pushing" : simulations

D'après les études précédentes (cf 9.2), la direction des forces de "pushing" est déterminée par la distribution des microtubules dans la géométrie du confinement. 2 facteurs contrôlent cette distribution. Le premier est la capacité ou non des microtubules à pivoter autour du centrosome : si les microtubules sont contraints à garder leur direction initiale, ils resteront alors uniformément radialement répartis autour du centrosome. Le second est la possibilité que les microtubules glissent le long du cortex ou si les extrémités \oplus des microtubules contactant le cortex y restent bloquées. S'ils peuvent glisser, ils vont notamment s'accumuler dans les "coins" de la géométrie si elle en a [Laan et al.(2012a)]. Nous avons donc dans un premier temps testé par simulations comment ces 2 paramètres déterminent la tendance de centrage/décentrage.

10.2.1 Répartition des microtubules

Seulement dans le cas où les microtubules ne peuvent pas pivoter autour du centrosome ni glisser le long du cortex, les microtubules seront uniformément répartis et donc aussi les forces de polymérisation qu'ils exercent. Les simulations en faisant varier la capacité des microtubules à pivoter et/ou à glisser le long du cortex illustrent bien ce phénomène (Figure 10.2 (A)).

Ainsi les forces de "pushing" auront un effet centrant uniquement dans le cas où les microtubules ne peuvent ni pivoter autour du centrosome ni glisser le long du confinement. La variation de la distance entre la position initiale du centrosome et le centre de la cellule montre que ces comportements ne dépendent pas de cette distance (Figure 10.2 (B)). Outre confirmer les effets supposés des contraintes ajoutées aux microtubules, ces simulations montrent que dans le cas où le glissement des microtubules est permis, le centrosome se décentre toujours vers le bord le plus proche. Il est intéressant de remarquer que ce déplacement est en accord avec les observations de [Burakov et al.(2003)] dans le cas où l'activité

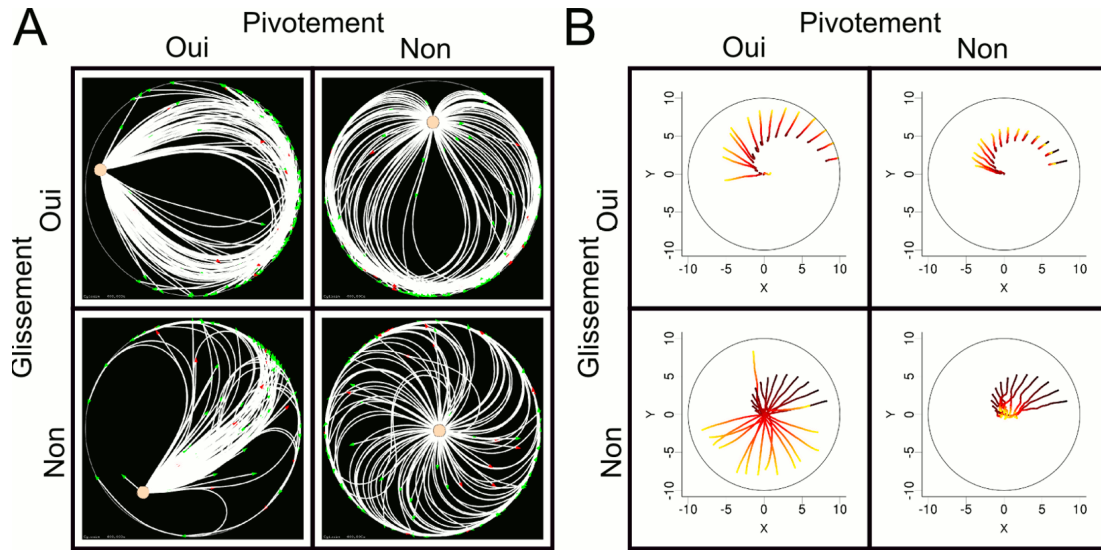


Fig. 10.2 : (Dé)centrage du centrosome selon la distribution radiale des microtubules et la position initiale du centrosome

(A) État final des simulations pour chacune des situations : pivotement permis & glissement permis (haut gauche), pivotement interdit & glissement permis (haut droit), pivotement permis & glissement interdit (bas gauche) et pivotement interdit & glissement interdit (bas droit). 400 s sont simulées, le rayon du cercle est de 10 μm et il y a 100 microtubules. (B) Trajectoires du centrosome pour les simulations dans chaque condition. Les couleurs indiquent les différents temps : de noir (0 s) à jaune (400 s). La distance entre la position initiale du centrosome et le centre augmente pour les trajectoires placées de la gauche vers la droite.

des dynéines est inhibée.

Ce résultat peut s'expliquer par de simples considérations géométriques : si l'on observe un microtubule sortant du centrosome C, à une certaine distance positive du centre de la cellule O, alors l'angle avec lequel il atteint le cortex θ déterminera dans quelle direction le microtubule préférera se courber (Figure 10.3 A). En effet, si $\theta > \pi/2$, le microtubule se courbera vers "le bas", dans le sens concave, qui est dans la même direction que le microtubule. Si $\theta < \pi/2$, le microtubule se courbera plutôt dans le sens convexe et dans le cas où $\theta = \pi/2$ (ce qui est le cas lorsque le centrosome est au centre de la cellule), le microtubule peut se plier dans les 2 directions avec la même probabilité. Il faut donc déterminer θ . Si l'on considère un microtubule partant avec un angle $\alpha \in]0, \pi/2[$ avec l'axe (OC) (Figure 10.3 A), alors l'angle β entre le rayon atteignant le point de contact du microtubule et le cortex et l'axe (OC) sera plus petit que α (les 2 angles intersectent le même arc de cercle, mais O est plus loin que C que l'on a supposé positif). Comme le rayon est perpendiculaire au cortex (à la tangente), nous avons :

$$\begin{aligned}\beta &= \pi/2 - \gamma = \pi/2 - (\pi - \alpha - \theta) \\ \beta &= \alpha + \theta - \pi/2 < \alpha \\ \theta &< \pi/2\end{aligned}$$

Donc le microtubule préférera se courber dans le sens convexe (vers le haut), où l'angle est obtus. En généralisant ce raisonnement à tous les angles autour du centrosome et aux différentes positions du centrosome par rapport au centre de la cellule, on en déduit que les

microtubules proches du cortex vont s'écartier de l'axe (OC) en se pliant dans la direction convexe pour ceux au dessus de l'axe et concave pour ceux en dessous (Figure 10.3 B). Comme ils s'écartent, il y a donc un vide et ils vont s'accumuler du côté opposé au centrosome d'où ils pousseront le cortex opposé (Figure 10.3 C).

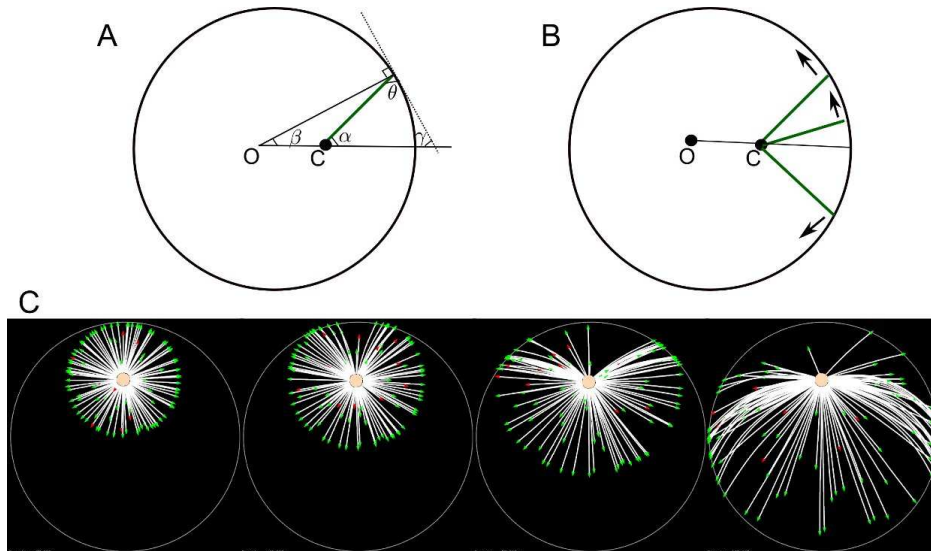


Fig. 10.3 : Directions des microtubules selon la position du centrosome

(A) Représentation graphique de la situation : O est le centre de la cellule, C est le centrosome. Un microtubule (en vert) faisant un angle α avec l'axe (OC) est considéré. La tangente au cortex est indiquée en pointillée. Le microtubule fait un angle θ avec cette tangente. Le rayon jusqu'au point de contact du microtubule fait un angle β avec l'axe (OC). On note γ l'angle entre la tangente et l'axe (OC). (B) Direction théorique de courbure des microtubules selon leur position par rapport à l'axe (OC). (C) Instantanés d'une simulation dans le cas rotation libre et glissement libre illustrant ce comportement.

A l'inverse, lorsque le glissement des microtubules n'est pas permis, les premiers microtubules qui atteignent le cortex et y seront donc coincés, sont du côté du bord le plus proche. Ils vont donc pousser sur le cortex à cet endroit, d'où la tendance du centrosome à partir du côté opposé. Si le pivotement des microtubules est permis, les autres microtubules vont venir s'accumuler à ceux déjà coincés, créant ainsi un pilier qui continuera à pousser (Figure 10.4).

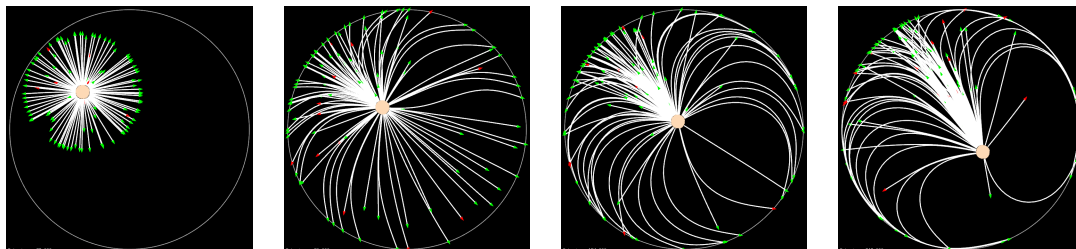


Fig. 10.4 : Création d'un "pilier" lorsque le pivotement mais pas le glissement est permis
Instantanés d'une simulation sous la condition pivotement permis et glissement interdit. Nous pouvons voir la formation d'un pilier au cours du temps qui va pousser le centrosome vers le côté opposé.

L'observation de trajectoires d'extrémités \oplus de microtubules dans des cellules de mammifères [Komarova et al.(2009)] révèle des mouvements de ces extrémités le long de la pé-

riphérie. Cette observation semble en faveur de l'hypothèse de glissement des microtubules le long du cortex. De plus, l'observation de ces trajectoires dans le cas de cellules fixées sur des géométries d'adhésion non uniformes suggère que les microtubules glissent en effet lorsqu'ils atteignent la périphérie de la cellule dans les zones non adhérentes où sont présentes des fibres de stress d'actine. Mais lorsqu'ils atteignent les zones d'adhérence dans lesquelles est présent un cortex dense d'actine, ils vont s'y accumuler (et donc ne plus glisser) [Théry et al.(2006)]. La capacité des microtubules à glisser pourrait donc être déterminée par l'organisation locale du réseau d'actine en périphérie de la cellule et en particulier ne serait pas forcément uniforme. L'état de la cellule (adhérente ou en suspension) pourrait ainsi être un facteur important contrôlant ce phénomène. Toutefois, nous ne disposons actuellement d'aucun argument certain pour confirmer ou infirmer l'hypothèse de la capacité des microtubules à glisser.

La mesure des fluctuations angulaires des microtubules autour du centrosome lors de la recherche de chromosomes [Kalinina et al.(2013)] laisse à penser que les mouvements angulaires des microtubules ne sont pas fortement contraints, s'ils le sont. Dans les simulations suivantes, nous n'ajouterons donc pas de contraintes angulaires aux microtubules autour du centrosome.

Par défaut, nous nous placerons dans le cas où la rotation et le glissement des microtubules sont permis. Ce cas est en effet celui pour lequel l'effet de décentrage est le plus direct, donc le plus visible.

10.2.2 Efficacité des forces

Ces forces étant dues à la polymérisation des microtubules, les facteurs qui influent sur leur dynamique et leur élasticité vont modifier l'amplitude de ces forces. Pour comprendre comment ces facteurs modulent le déplacement du centrosome, nous avons étudié tout d'abord l'effet de la longueur de persistance des microtubules relativement à la taille de la cellule.

Rigidité relative des microtubules

La courbure des filaments est en général décrite selon le modèle d'Euler (et c'est le cas dans *Cytosim*), c'est à dire que la force nécessaire pour courber un filament de longueur L et de rigidité L_p est :

$$f_B = \pi^2 \frac{k_B T L_p}{L^2}$$

Ainsi lorsqu'un microtubule rencontre le cortex, s'il est suffisamment long relativement à sa longueur de persistance, il va plutôt se courber qu'exercer des forces efficaces sur le centrosome. La force générée par un microtubule sur le centrosome est donc limitée par la force f_B de courbure d'Euler (pour une longueur de la taille de la cellule) et par la force de polymérisation f_s d'un microtubule (car au-delà de cette valeur, la croissance du filament est quasiment arrêtée, cf 1.3.3 et 3.2.1).

Les simulations présentées dans la figure 10.5 illustrent ces considérations : un microtubule isolé est simulé dans des cellules de rayons croissants et la force qu'il exerce au niveau de son extrémité \ominus est mesurée (en bleu) ainsi que son degré de courbure (en rouge). On voit bien que la force qu'il peut subir et transmettre au centrosome est limitée par f_B et f_s (5 pN). De plus, si cette force est proche de f_B , le microtubule va se courber et la pression qu'il exerce sur le centrosome va donc diminuer fortement (Figure 10.5, droite). En

revanche, si le confinement est petit (donc f_B est grande), la polymérisation du microtubule est "arrêtée" par la force de polymérisation f_s . Le microtubule aura alors tendance à dépolymériser, conduisant à un relâchement brutal de la force exercée (Figure 10.5, gauche).

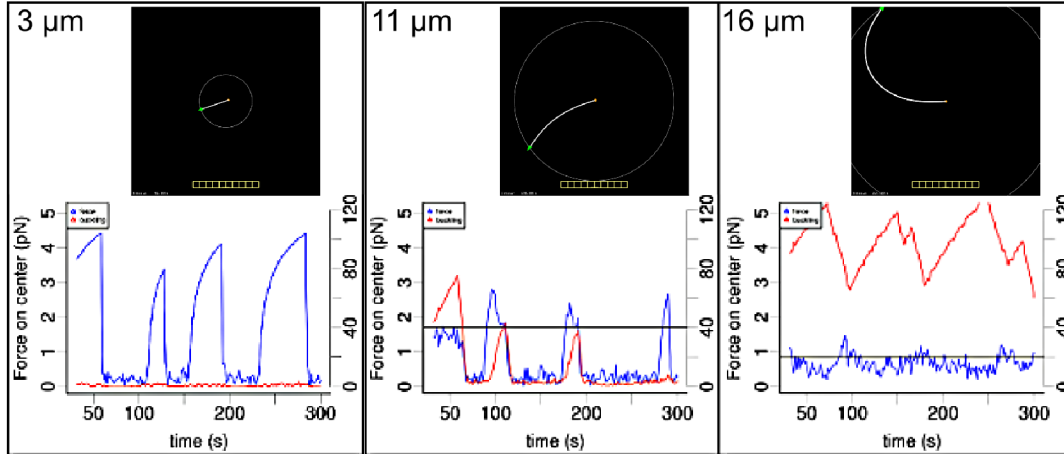


Fig. 10.5 : Force et courbure d'un microtubule seul selon sa longueur

Simulations de la croissance d'un filament selon la taille de la cellule et mesure de la force de "pushing" qu'il exerce au niveau de son extrémité \ominus (en bleu). Mesure du niveau de courbure du filament (angle moyen entre les segments, en rouge). Ligne horizontale : force de courbure d'Euler.

La taille de la cellule et la rigidité des filaments influencent donc l'amplitude des forces de "pushing" d'un microtubule. Nous pouvons à présent étudier comment ceci s'applique dans le cas du centrosome, où l'on a de nombreux microtubules exerçant des forces dans des directions différentes.

L'efficacité des microtubules à pousser sur la membrane est modulée par leur rigidité. Celle-ci n'affecte pas l'organisation spatiale des microtubules, donc la tendance de (dé)centrage. Ainsi, pour une faible rigidité, les microtubules vont se courber plutôt que de pousser, donc le centrosome restera proche de sa position initiale (Figure 10.6). À l'inverse, les microtubules plus rigides vont pousser efficacement afin de minimiser leur courbure et donc le centrosome sera déplacé rapidement (Figure 10.6).

Ainsi que nous l'avons vu, théoriquement, ces forces dépendent aussi de la force de polymérisation f_s et de la taille du confinement. La figure 10.7 montrant l'effet de ces 2 facteurs sur le déplacement du centrosome permet d'appréhender comment cette dépendance se traduit en pratique. Comme attendu, la force de polymérisation peut limiter l'action des microtubules en bloquant leur croissance si elle est trop faible (Figure 10.7 (A)). Au dessus de la valeur de la force de courbure d'Euler f_B (déterminée par la taille du confinement et la rigidité des microtubules), c'est alors la courbure qui devient le facteur limitant des forces de "pushing" et donc augmenter la valeur de f_s ne change rien au comportement obtenu (Figure 10.7 (A)). En pratique, la valeur de cette force dépend de la concentration de tubuline [Dogterom(1997)], donc ceci peut être un moyen *in-vitro* de moduler l'amplitude des forces de "pushing".

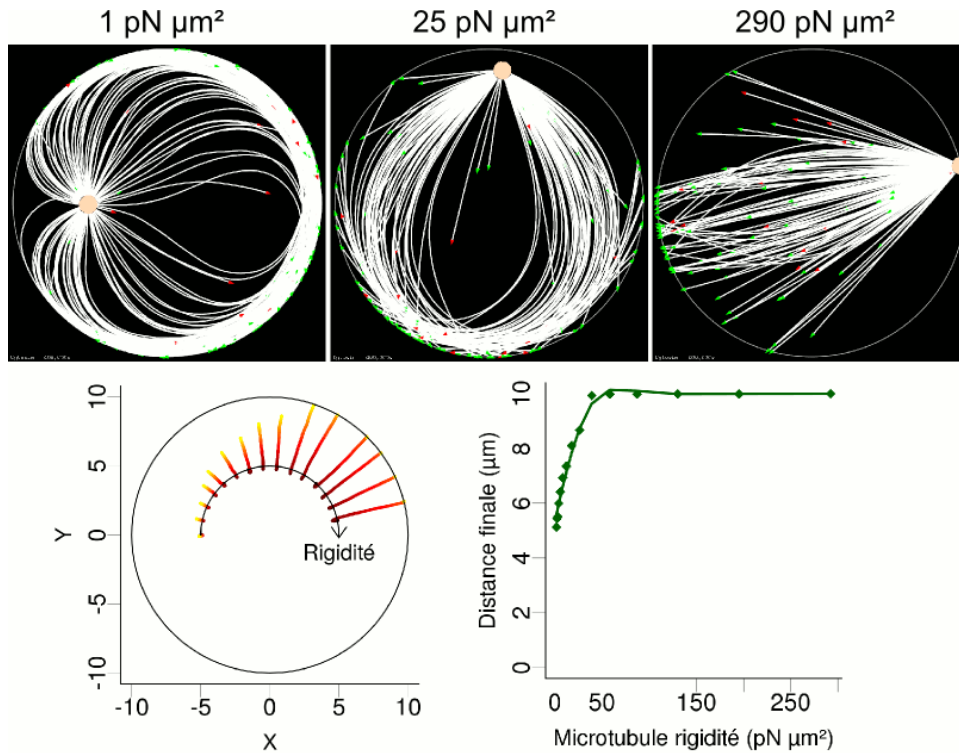


Fig. 10.6 : Efficacité du décentrage du centrosome selon la rigidité des microtubules

Temps final des simulations pour des microtubules (haut) d'une rigidité de 1 (gauche), 25 (milieu) et 290 (droite) $pN\mu m^2$. Analyse de la trajectoire du centrosome (bas gauche) pour 15 simulations. La rigidité des microtubules est croissante de gauche à droite sur l'axe en arc de cercle et varie de 1 à 290 exponentiellement. Les couleurs représentent les différents temps de la simulation, de noir (0 s) à jaune (400 s). Distance finale du centrosome au centre de la cellule (bas droite) pour les mêmes simulations en fonction de la rigidité des microtubules.

De même la variation de la taille de la cellule permet de contrôler l'amplitude des forces de "pushing" (Figure 10.7 (B)) et en particulier de les rendre négligeables en prenant un grand confinement (rayon $\geq 15 \mu m$ dans les conditions utilisées par défaut). Ainsi lorsque la taille des chambres microfabriquées augmente, un aster de microtubules en absence de dynéines se décentrera de moins en moins [Laan et al.(2012a)].

Remarque importante : Il faut noter que le comportement élastique des microtubules, qui peut être décrit par la force Eulérienne en conditions *in-vitro*, est supposé être visco-élastique dans les cellules. Dans ce cas, la force de courbure est de la forme [Brangwynne et al.(2006)]

$$f_c = \pi^2 \frac{k_B T L_p}{\lambda^2}$$

où λ est la longueur d'onde de la courbure qui a été estimée à environ $3 \mu m$ dans la cellule [Brangwynne et al.(2006), Soheilypour et al.(2015)]. Avec cette description, les forces de "pushing" peuvent donc être efficaces même pour des cellules de rayon supérieur à $15 \mu m$ et ne dépendent pas de la taille du confinement. Il serait intéressant de rajouter cette description aux simulations précédentes afin de pouvoir comparer l'importance des forces de "pushing" selon le régime visco-élastique des filaments.

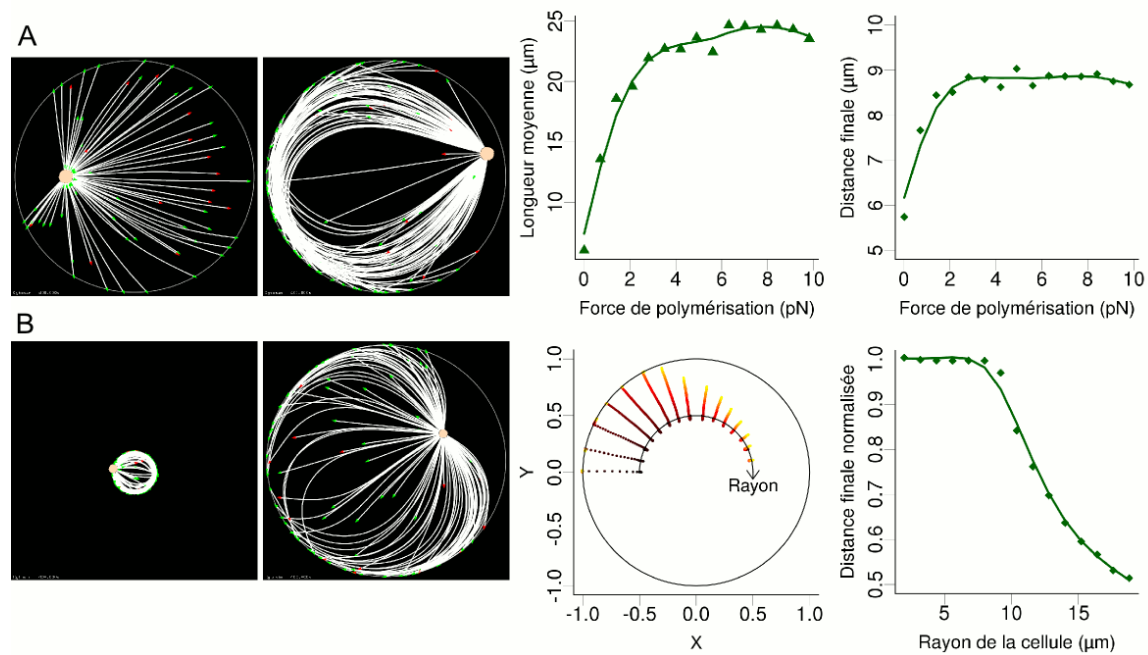


Fig. 10.7 : Modulation de l'amplitude des forces de "pushing" selon la force de polymérisation et la taille de confinement

(A) Effet de la variation de la force de polymérisation f_s . Temps final (400 s) des simulations pour $f_s = 0.01 \text{ pN}$ et $f_s = 10 \text{ pN}$ (gauche). Longueur moyenne des microtubules selon la force de polymérisation et distance finale du centrosome au centre de la cellule selon la force de polymérisation (droite). Les cellules ont un rayon de $10 \mu\text{m}$. (B) Effet de la variation du rayon de la cellule. Temps final (400 s) des simulations pour un rayon de $3 \mu\text{m}$ et $18 \mu\text{m}$ (gauche). Trajectoires (normalisées par le rayon de la cellule) du centrosome pour des rayons de cellules de plus en plus grand de la gauche vers la droite sur l'axe en arc de cercle. Les couleurs représentent les différents temps de la simulation (noir=début, jaune=fin). Distance finale normalisée par le rayon du centrosome au centre de la cellule, selon le rayon de la cellule.

Dynamique des microtubules

Comme le flambage des microtubules dépend de leur longueur (dans la description Eulérienne), la dynamique des microtubules va aussi jouer un rôle important dans la production de forces. De plus, la tendance des microtubules à dépolymériser ou non lorsqu'ils rencontrent des obstacles contrôle aussi l'amplitude des forces de polymérisation. Ainsi il a été observé *in-vitro* que les catastrophes permettent aux microtubules d'explorer la géométrie du confinement [Faivre-Moskalenko et Dogterom(2002)] et d'en trouver le centre. Un point important pour ce processus est que le taux de catastrophe est dépendant des forces subies par le microtubule. En effet, si la force opposée au microtubule est importante, les dimères de tubuline ne peuvent pas s'insérer et le microtubule a donc plus de chance de dépolymériser. Le taux de catastrophe observé dans une cellule est ainsi beaucoup plus important près de la membrane [Janson et al.(2003)].

Pour étudier l'effet de la dynamique des microtubules, nous avons donc fait varier les 2 paramètres définissant le taux de catastrophe des microtubules, c_0 et c_{stall} (cf 3.2.1), en gardant le même rapport de proportionnalité entre ces 2 facteurs. Donc on ne donnera par la suite que la valeur de c_0 . Il faut néanmoins noter que d'après [Janson et al.(2003)], le taux de catastrophe libre est 10 fois plus petit que celui sous force. Mais nous prenons un ratio de 4 seulement car dans la cellule il y a aussi de nombreux obstacles dans le cytoplasme, qui

font que les microtubules sont plus souvent soumis à des forces que dans les simulations.

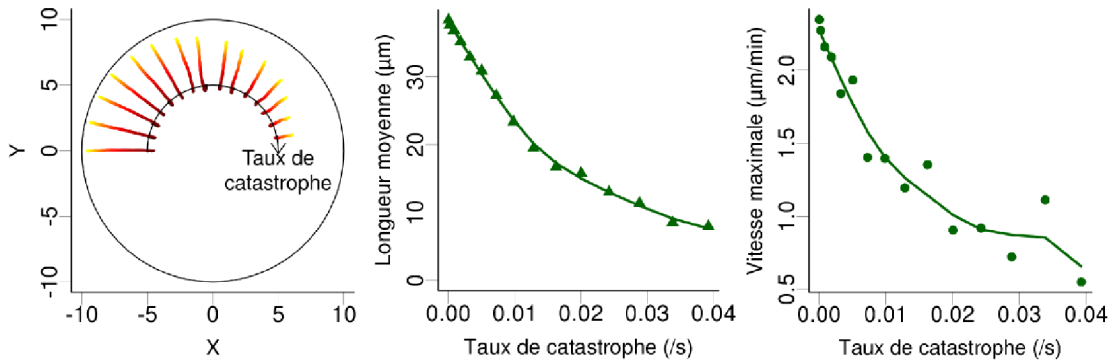


Fig. 10.8 : Amplitude des forces de "pushing" selon la dynamique des microtubules

Trajectoires du centrosome pour des taux de catastrophes de plus en plus grands de la gauche vers la droite sur l'axe en arc de cercle (gauche). Les couleurs représentent les différents temps de la simulation (noir=début, jaune=fin). Longueur moyenne finale des microtubules selon le taux de catastrophe (milieu). Vitesse maximale du centrosome au centre de la cellule selon le taux de catastrophe (droite).

Si les microtubules sont trop dynamiques (pour un grand taux de catastrophe), alors ils ne vont pas pousser efficacement et seront plus courts en moyenne (Figure 10.8). Dans tous les cas, la position centrale du centrosome est déstabilisée par les forces de polymérisation, mais les forces que les microtubules peuvent exercer sont limitées par leur dynamique.

Nombre de microtubules

Un autre paramètre pouvant influencer sur l'efficacité des forces de "pushing" est le nombre de microtubules nucléés par le centrosome. En effet, le taux de nucléation des microtubules par le centrosome n'est pas forcément le même dans toutes les cellules. En particulier, il est 5 fois plus grand durant de la division cellulaire qu'en dehors de la mitose [Piehl et al.(2004)]. L'étude théorique de [Dogterom et Yurke(1998)] a montré que dans le cas d'une géométrie rectangulaire (un centrosome placé entre 2 barrières est modélisé) la dynamique des microtubules permet le centrage du centrosome, dont la stabilité augmente avec le nombre de microtubules. De plus, [Zhu et al.(2010)] ont aussi observé un centrage plus stable du centrosome en augmentant le nombre de microtubules simulés. Toutefois, dans ces 2 modèles, la distribution des microtubules (le nombre de chaque côté du centrosome dans le premier cas et la distribution radiale pour le second) est considérée comme symétrique, d'où le centrage obtenu.

Nous avons donc vérifié l'effet de la variation du nombre de microtubules dans nos simulations où leur distribution radiale peut être asymétrique. En accord avec nos simulations précédentes, les microtubules vont pivoter et déplacer le centrosome vers le bord le plus proche. L'augmentation du nombre de microtubules permet de renforcer l'efficacité de ce processus en augmentant le nombre de générateurs de forces (Figure 10.9). Lorsque le nombre de microtubules est très élevé, la force initiale qu'ils exercent contre le bord le plus proche avant de pivoter est forte. Nous pouvons donc observer un déplacement initial vers le centre plus important dans ce cas. De plus le nombre de microtubules à déplacer peut aussi ralentir le centrosome, ce qui pourrait expliquer que la vitesse de son déplacement atteigne un maximum (Figure 10.9).

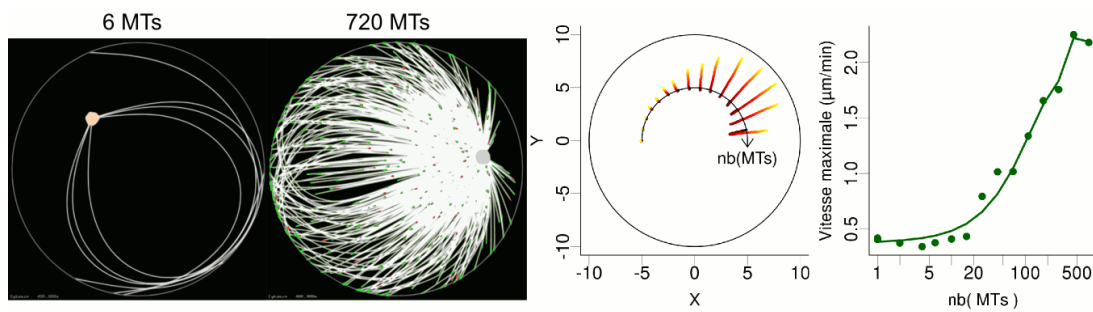


Fig. 10.9 : Effet du nombre de microtubules sur les forces de "pushing"

État final des simulations pour 6 et 720 microtubules (MTs) (à gauche). Trajectoires suivies par le centrosome dans les simulations (milieu). Le nombre de microtubules utilisé augmente de gauche à droite sur l'axe en arc de cercle de 1 à 720. Les couleurs indiquent les différents temps de la simulation, en partant du noir (0 s) au jaune (400 s). Vitesses maximales mesurées en fonction du nombre de microtubules simulés (à droite). L'axe des "x" est présenté en échelle logarithmique.

Ces différentes simulations nous ont permis d'étudier les facteurs importants pouvant moduler l'effet des forces de "pushing" des microtubules. D'après nos résultats, la capacité des microtubules à pivoter autour du centrosome et celle à glisser le long du cortex, couplées à la géométrie de la cellule déterminent la position que le centrosome cherchera à atteindre. Les paramètres tels que la rigidité des microtubules, leur dynamique, leur nombre, leur force de polymérisation ou la taille de la cellule vont quant à eux définir l'amplitude que ces forces peuvent atteindre et donc le déplacement effectif du centrosome.

10.3 Forces de "pulling" : simulations

Les forces dues à l'action des moteurs moléculaires ont tendance à centrer le centrosome quelque soit l'orientation des microtubules (cf 9.2). On va donc étudier leur effet seulement dans le cas où les microtubules peuvent pivoter autour du centrosome et glisser le long du cortex (cas où le décentrage est le plus direct, cf 10.2.1). Les forces de "pulling" vont donc s'opposer aux forces de "pushing" qui elles provoquent un décentrage.

10.3.1 Le duel "pushing" vs "pulling"

Les amplitudes de ces 2 forces vont dépendre de la taille de la cellule et de la répartition des dynéines. Nous avons donc simulé des cellules de 3 rayons différents (5, 10 et 15 μm), qui vont affecter l'amplitude des forces de "pushing" (cf 10.7) et varié la répartition des dynéines (corticale ou cytoplasmique, Figure 10.10). Afin de comparer l'amplitude des forces de "pulling" par rapport à celle de "pushing", le nombre de dynéines est aussi varié, de 0 à 7000 par pas de 500. On compare donc les répartitions cytoplasmiques et corticales à nombres de dynéines égaux et non à densités égales.

Une première remarque que permettent de faire ces simulations est que lorsqu'on rajoute la présence des dynéines, la distribution des microtubules peut rester certes asymétrique, mais l'anisotropie finale est bien moins marquée que dans les simulations précédentes (Figure 10.10). La distribution uniforme des dynéines qui vont capturer les microtubules explique ce résultat.

Comme attendu, si le rayon est petit, les forces de "pushing" sont importantes et peuvent déstabiliser le centrage des dynéines lorsque celles-ci sont réparties sur le cortex et selon leur

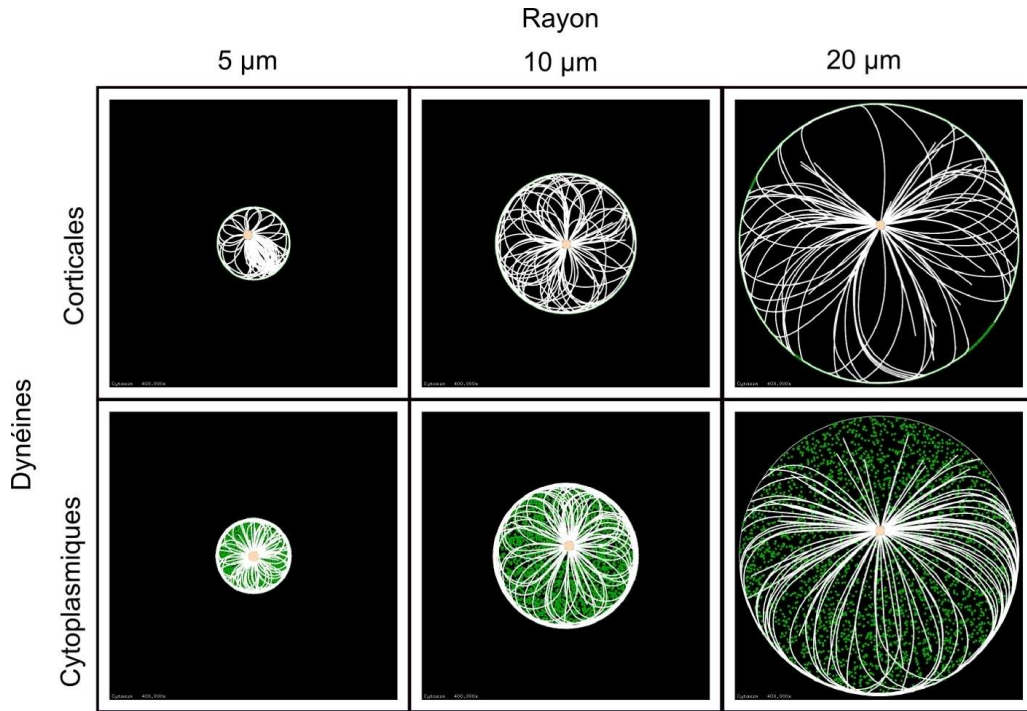


Fig. 10.10 : Variation de la taille de la cellule et de la distribution des moteurs
Temps final (400 s) des simulations pour 3 rayons différents et une répartition des dynéines cytoplasmique ou corticale.

nombre (Figure 10.11). Lorsque le rayon est intermédiaire, les forces générées par les dynéines vont être plus importantes et donc le centrosome sera centré. Si le rayon est vraiment grand, les forces de "pushing" (dans la description eulérienne) sont inefficaces et seules les forces de "pulling" comptent. De plus dans ce cas, moins de microtubules sont en contact avec le cortex. Si le nombre de dynéines est faible (trajectoires bleues), la répartition cytoplasmique est alors plus efficace à centrer le centrosome (Figure 10.11).

Étonnamment, lorsque le nombre de dynéines corticales est vraiment important (trajectoires de couleurs claires, Figure 10.11), le centrage est moins efficace que pour un nombre intermédiaire, car cela donne lieu à des oscillations très importantes du centrosome (qui parcourt plusieurs fois toute la cellule en cercle). Cependant ces oscillations conduisent toujours à un centrage final. Ce comportement est similaire à celui observé dans l'étude de [Laan et al.(2012a)] (observations 10 et 12 de la partie 9.2.1).

On peut aussi remarquer que les dynéines cytoplasmiques conduisent le centrosome au centre de la cellule d'une manière très directe, alors que pour une distribution corticale, les trajectoires sont moins optimales. La mesure des vitesses maximales du déplacement du centrosome et de la tortuosité de la trajectoire ([Athale et al.(2014)], $\chi = d_{net}/L$, rapport de la distance effective sur la distance totale parcourue par le centrosome) permettent de quantifier ces différences de comportement (Figure 10.12). Une tortuosité de 1 indique une trajectoire directe et efficace, alors qu'une trajectoire proche de 0 indique des oscillations importantes.

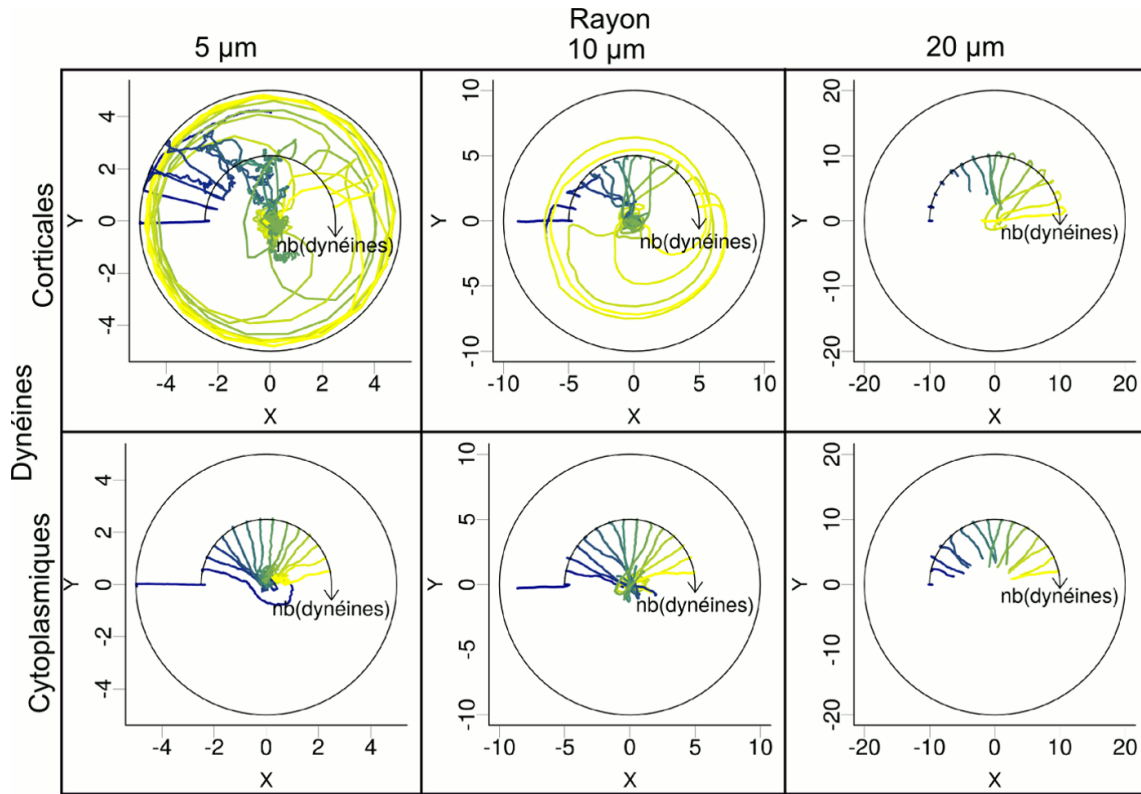


Fig. 10.11 : Trajectoires selon la taille de la cellule et la distribution des moteurs

Trajectoires du centrosome pour les simulations précédentes, avec une cellule de rayon $5 \mu\text{m}$ (gauche), $10 \mu\text{m}$ (milieu) ou $20 \mu\text{m}$ (droite). Les dynéines sont soit distribuées sur le cortex (en haut) soit dans le cytoplasme (en bas). Une couleur représente une simulation selon son nombre de dynéines. Le nombre de dynéines augmente de gauche à droite sur l'axe en arc de cercle de 0 (bleu) à 7000 (jaune). Les points initiaux des trajectoires sont sur l'axe en arc de cercle.

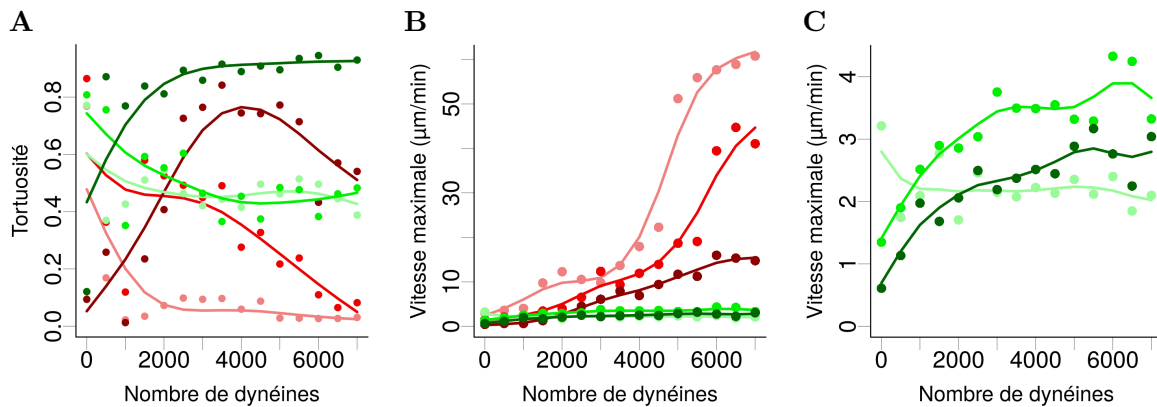


Fig. 10.12 : Efficacité du positionnement du centrosome par les forces de "pulling"

(A) Tortuosité χ de la trajectoire du centrosome en fonction du nombre de dynéines pour les 6 différentes conditions. (B) Vitesse maximale de déplacement du centrosome selon le nombre de dynéines. (C) Vitesse maximale pour le cas des dynéines cytoplasmiques seulement. En rouge les distributions de dynéines corticales, en vert les dynéines cytoplasmiques. Les couleurs claires correspondent au rayon de $5 \mu\text{m}$, intermédiaires pour $10 \mu\text{m}$ et foncées pour $20 \mu\text{m}$.

Ces mesures permettent de constater que les cas où l'on a de nombreuses dynéines sur le cortex, pour des petits confinements (courbes vertes, Figure 10.12) donnent des résultats

semblant très irréalistes avec des vitesses de déplacement du centrosome énormes (jusqu'à $50 \mu m/min$ ¹). Toutefois, [Laan et al.(2012a)] ont observé *in-vitro* des vitesses pouvant aller jusqu'à $24 \mu m/min$ (cf obs. 10.9.2.1). Ces résultats ne sont donc pas totalement aberrants. Lorsque les dynéines sont réparties sur le cortex, nous observons bien plus d'oscillations en général (la tortuosité est plus petite) et avec des vitesses bien plus importantes que pour une répartition cytoplasmique. En particulier, la tortuosité dans le cas d'une distribution cytoplasmique est toujours supérieure à 0.4, illustrant le fait qu'il n'y a pas dans ce cas de grandes oscillations circulaires. En effet, les trajectoires dans cette distribution sont toujours droites, avec seulement des petites oscillations autour du centre.

On peut aussi remarquer que la tortuosité diminue lorsque le nombre de dynéines augmente (Figure 10.12 ; donc les oscillations augmentent, ces oscillations pouvant être proches du centre en particulier), sauf dans le cas d'un grand confinement (courbes foncées), possiblement parce qu'il faut plus de temps au centrosome pour atteindre le centre et donc osciller autour de cette position. D'ailleurs, dans le cas de la distribution corticale de dynéines (courbe rouge foncée), la tortuosité décroît après avoir atteint un maximum lorsque le nombre de dynéines augmente. En effet, si on regarde la trajectoire du centrosome dans ce cas (Figure 10.11, rayon $20 \mu m$, dynéines corticales), on constate que lorsque le nombre de dynéines est grand, le centrosome atteint le centre et oscille (courbes vertes-jaunes).

La différence de vitesses (Figure 10.12) entre les 2 distributions pourrait s'expliquer par le fait que l'on compare un même nombre de dynéines et non pas une même densité, donc dans le cas du cortex la densité est bien plus importante. Mais cela demanderait de simuler énormément de dynéines pour avoir la même densité dans le cas d'une répartition cytoplasmique (350 000 pour avoir une densité comparable au cas de 7 000 dynéines sur le cortex), ce qui risque de prendre un peu de temps.

Toutes les considérations ci-dessus ont été faites pour un confinement circulaire. Néanmoins les cellules sont rarement circulaires (elles le sont en général seulement au moment de la mitose). En particulier, du fait du glissement des microtubules à la périphérie, la présence de "coins" peut affecter le centrage/décentrage [Laan et al.(2012a)]. J'ai donc trouvé important d'explorer aussi l'effet d'un changement de géométrie du confinement (ainsi que nous l'avons fait pour étudier le confinement des filaments d'actine dans la partie 5.2.2).

10.3.2 Variation de la géométrie cellulaire

Pour pouvoir comparer les comportements dans les diverses géométries, j'ai gardé l'aire de ces géométries constante, identique à celle du cercle de rayon de $10 \mu m$ utilisée précédemment. J'ai choisi de simuler des géométries classiques : un carré (de côté $17.7 \mu m$) et des triangles de base et de hauteur constantes ($25 \mu m$) mais de propriétés variables (rectangle, quelconque, isocèle). Étant donné que ces géométries n'ont plus les mêmes propriétés de symétrie, la position initiale du centrosome est à présent prise aléatoire et j'ai gardé un nombre constant de dynéines (4000).

De même que pour la géométrie circulaire, les dynéines permettent le centrage du centrosome dans la géométrie carrée (Figure 10.13). Nous pouvons aussi noter la présence de grandes oscillations des trajectoires lorsque les dynéines sont placées au niveau du cortex

1. pour comparaison, la vitesse de déplacement mesurée dans les expérience *in-vivo* de [Burakov et al.(2003)] est de $0.3 \mu m.min^{-1}$

pour toutes les géométries.

La variation de la forme de la géométrie triangulaire permet de disposer de géométries dans lesquelles le centre du cercle inscrit et le centre de gravité ne sont pas identiques. Pour une distribution cytoplasmique de dynéines, les trajectoires se dirigent toujours vers le centre de gravité. Le cas d'une distribution corticale de dynéines est différent. Le centrosome se déplacerait en direction du milieu du côté du triangle le plus long. Ce résultat est compréhensible puisque ce côté contient alors plus de dynéines que les autres. Ainsi lorsque le triangle est isocèle (Figure 10.13 à droite), nous pouvons remarquer que les trajectoires peuvent finir sur chacun des 2 côtés de même longueur (supérieure à celle du troisième côté).

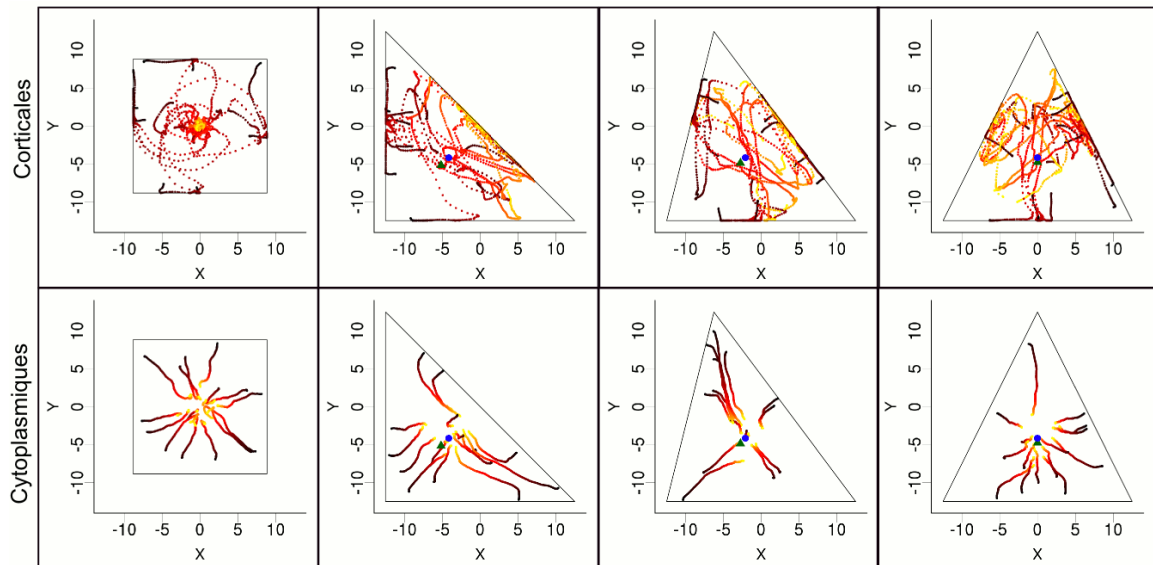


Fig. 10.13 : Effet de la géométrie du confinement selon la répartition des dynéines

Trajectoires du centrosome partant d'une position initiale aléatoire. 4000 dynéines sont placées soit au niveau du cortex (haut) soit dans le cytoplasme (bas). La géométrie de l'espace est variée. Les couleurs indiquent les temps de la simulation (noir=0 s, jaune=400 s). Les triangles verts dans les géométries triangulaires indiquent les centres des cercles inscrits, les cercles bleus indiquent leurs centres de gravité.

Les résultats ci-dessus montrent que l'effet des forces de "pulling" dépend de la distribution des points où ces forces sont exercées. Ainsi si les dynéines sont présentes dans tout le cytoplasme, le centrosome sera déplacé vers le centre de gravité de cette distribution. En revanche, lorsque la distribution des dynéines est corticale, l'interaction entre les microtubules et ces moteurs se fait seulement au niveau de leurs extrémités \oplus . Cette "discrétisation" des forces provoque des trajectoires bien plus instables, avec de grandes oscillations. La position finale du centrosome dépendra alors dans ce cas de la symétrie de la distribution des moteurs (il sera centré si la distribution est symétrique et atteindra le bord contenant le plus de moteurs sinon).

Nous avons étudié ici les effets de différents paramètres qui nous semblaient importants pour expliquer le positionnement du centrosome dans des conditions assez générales. Nous avons ensuite appliqué ces conclusions à des situations précises pour déceler si un mécanisme donné peut en effet être responsable des observations faites.

11. APPLICATIONS À DES CAS PARTICULIERS

11.1 Ciliogenèse

Nous avons en particulier chercher à adapter nos conclusions précédentes au cas de la ciliogenèse. Des observations *in-vitro* faites dans l'équipe Cytomorpho montrent que la position du centrosome est modulée par les conditions géométriques et donc aussi la formation du cil primaire.

11.1.1 Observations *in-vitro*

Pour former un cil primaire, le centrosome doit se déplacer près d'un bord de la cellule et y être ancré. Pour étudier la migration du centrosome conduisant à ce phénomène, des cellules RPE1 ont été placées sur des micropatrons de différentes tailles. Le retrait du sérum de facteur de croissance permet d'arrêter le cycle cellulaire et d'avoir des cellules en phase G0, qui correspond à la phase où les cils peuvent être formés. [Pitaval et al.(2010)] ont montré que lorsque le micropatron est petit, la cellule ne s'étale pas et sera donc en forme de cloche (Figure 11.1). Dans ce cas, pour la plupart des cellules, le centrosome, initialement sous le noyau, va migrer vers le haut de la cellule et y former un cil, dans les 24h suivant le retrait de sérum. Au contraire, si le micropatron est grand, la cellule est étalée et plate. Dans cette situation, le centrosome reste en dessous du noyau et le cil ne se forme pas (Figure 11.1).

Pour comprendre ce qui permet au centrosome de migrer vers le haut de la cellule dans le cas des petits micropatrons, Amandine Pitaval (Laboratoire Biopuce, CEA/iRTSV) étudie pendant sa thèse cette migration sur les micropatrons, en quantifiant les différentes protéines impliquées et l'état de la cellule. La plausibilité de certaines hypothèses que lui permet de faire cette étude peut être testée en adaptant les simulations précédentes à son système. En particulier, elle a remarqué une stabilisation (donc un changement de dynamique) des microtubules 2 heures après le retrait du sérum, correspondant au départ du centrosome vers le haut de la cellule (Figure 11.2). Puis entre 3h et 4h après le retrait du sérum, elle observe un recrutement de dynéines vers le haut de la cellule et la dynamique des microtubules est normale à nouveau (Figure 11.2).

Ces observations laissent à supposer que le changement de dynamique des microtubules peut provoquer la déstabilisation de la position du centrosome, par des forces de "pushing". Puis les dynéines vont être recrutées et les forces de "pulling" pourrait être responsable de la fin de la migration du centrosome ou de son ancrage au niveau du cortex. Le changement de dynamique des microtubules peut en effet changer l'efficacité des forces de "pushing" des microtubules (cf 10.2.2). Il faut cependant vérifier que ce phénomène est toujours valide si on tient compte de la géométrie de la cellule (donc en 3D) et de la présence du noyau. J'ai donc adapté les simulations précédentes à cette situation.

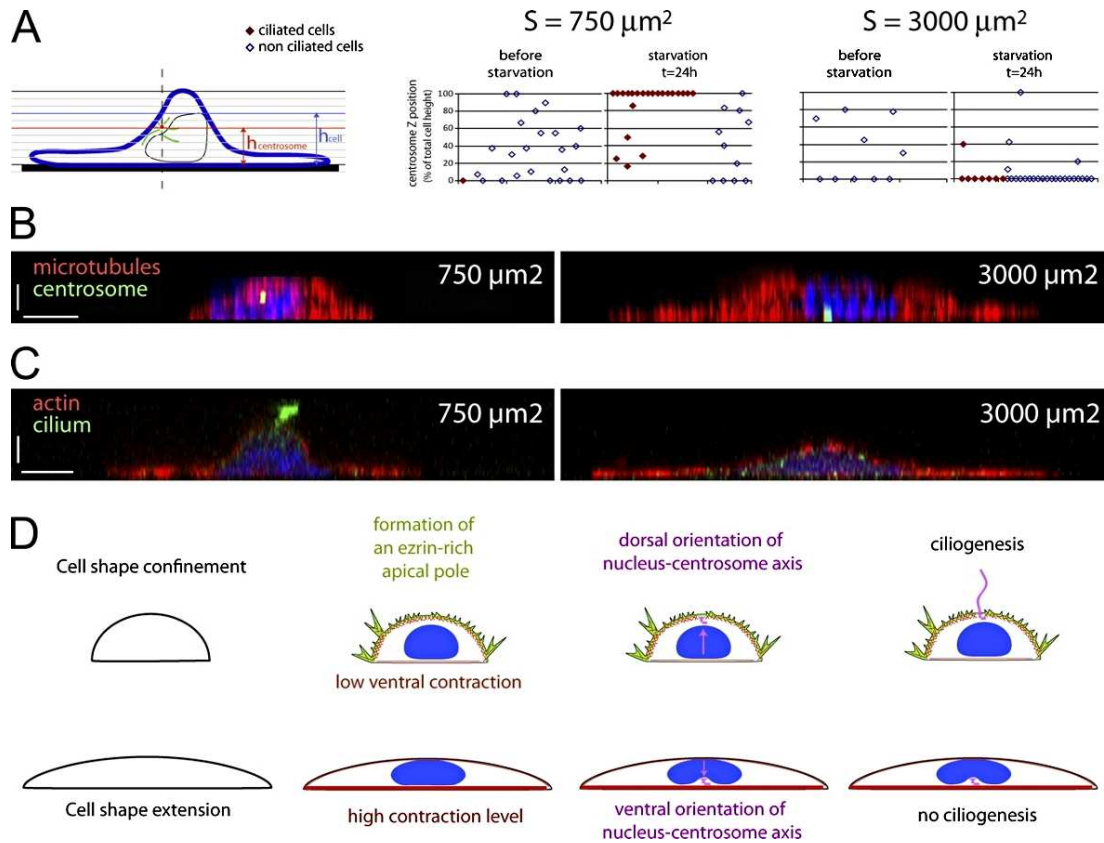


Fig. 11.1 : Formation de cils et positionnement du centrosome

Tiré de [Pitaval et al.(2010)]. (A) Hauteur du centrosome par rapport à la hauteur de la cellule pour des cellules sur des petits micropatrons ($S = 750 \mu\text{m}^2$) et des larges micropatrons ($S = 3000 \mu\text{m}^2$). (B-C) XZ images des cellules micropatronées pour chacun des 2 types de micropatrons (petit, gauche; large droite), avec les microtubules et le centrosome marqués (haut) ou l'actine et le cilium marqués (bas). (D) Modèle des conclusions de l'étude.

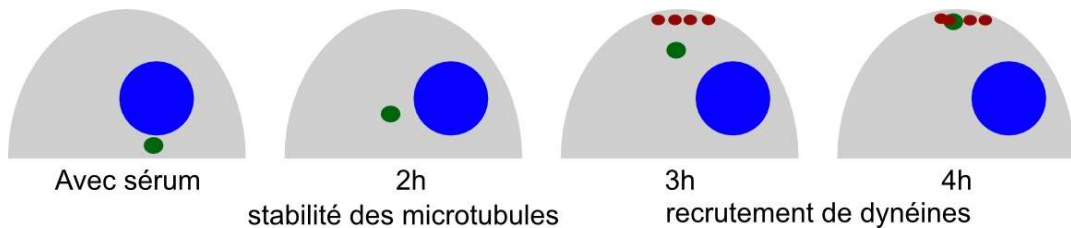


Fig. 11.2 : Etapes de la migration du centrosome lors de la ciliogenèse

La cellule micropatronée est représentée en gris. Le noyau est en bleu, le centrosome (initialement sous le noyau), en vert. Après retrait du sérum, il va migrer vers le haut (de gauche à droite). Autour de 2h après le retrait, les microtubules sont plus stables. Après 3h ou 4h, des dynéines (en rouge) sont recrutées en haut de la cellule.

11.1.2 Simulations du décentrage du centrosome

Les simulations en 3D du décentrage du centrosome selon le taux de catastrophe montrent que l'on a bien encore un décentrage plus efficace lorsque le taux de catastrophe diminue (Figure 11.3). Néanmoins, le centrosome ne va pas forcément se placer au milieu en haut de la cellule comme dans les expériences, mais peut partir vers un côté. Pour vérifier si cela est dû à l'absence du noyau dans les simulations, j'ai rajouté une sphère au milieu de la cellule

représentant celui-ci. Si le taux de catastrophe des filaments est trop petit, ceux-ci seront trop longs pour pouvoir pousser efficacement le centrosome hors de sa position entre le bas de la cellule et le noyau. Seulement pour un taux de catastrophe intermédiaire le centrosome va partir vers le haut (Figure 11.3, mais là encore il va partir vers un côté. Il manque donc à tenir compte de l'interaction entre le noyau et les microtubules qui peut être responsable de diriger le centrosome.

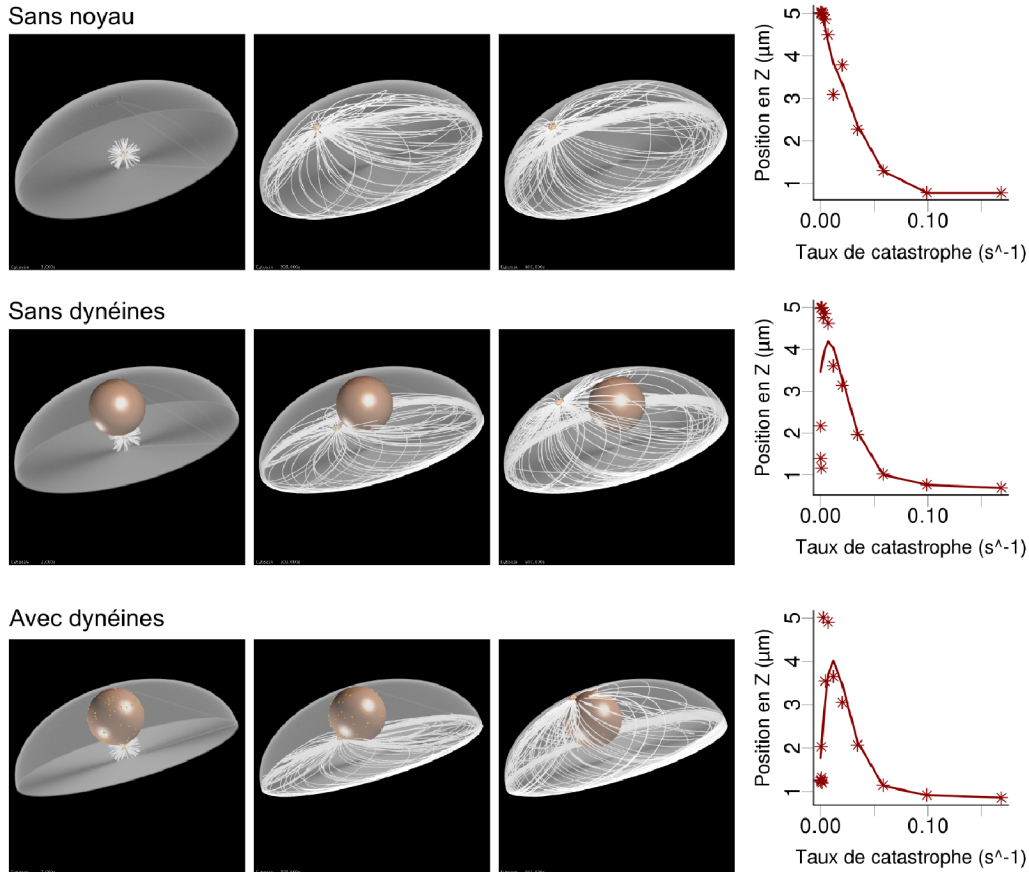


Fig. 11.3 : Décentrage du centrosome dans une cellule 3D selon la présence ou non du noyau

Instantanés de simulations du décentrage du centrosome pour un taux de catastrophe de 0.007 s^{-1} , dans le cas où il n'y a pas de noyau (haut), où il y a un noyau mais pas de dynéines sur ce noyau (milieu) et où il y a un noyau et des dynéines (bas). Analyse de la position en Z du centrosome à la fin de la simulation selon le taux de catastrophe simulé pour chacune des 3 conditions (droite).

Lien avec le noyau

Le noyau et le centrosome sont très proches dans la plupart des cas et leurs mouvements sont en général corrélés. Il semble donc qu'ils interagissent fortement ensemble, même si cette relation n'est pas totalement comprise encore. Les hypothèses actuelles sont qu'il n'y a pas de réelles interactions mais que les corrélations viennent du fait qu'ils subissent les mêmes forces (par exemple le flux d'acto-myosine), ou que le noyau et le centrosome s'attirent comme des aimants par les forces générées par des dynéines présentes sur la membrane nucléaire et tirant sur les microtubules provenant du centrosome ou enfin que ces interac-

tions se fassent via les filaments d'actine et les protéines des familles KLASH/SUN qui sont connues pour lier le noyau et le cytosquelette [Burakov et Nadezhdina(2013)].

La nature de ce lien n'est donc pas évidente, mais pour simplifier nous avons utilisé ici l'hypothèse de dynéines présentes sur le noyau afin d'imposer une interaction proche. On constate que dans ce cas, le centrosome étant relié au noyau, il le "longe" lorsqu'il se décentre et monte en Z dans la cellule. Le centrosome finit alors (quand il y arrive) en haut au centre de la cellule (Figure 11.3).

Ces simulations montrent donc que le changement de stabilité peut en effet être responsable de l'initiation du mouvement du centrosome. Si dans notre cas les moteurs moléculaires sont seulement placés sur le noyau afin de stabiliser le déplacement du centrosome vers le milieu du haut de la cellule (d'où il pourrait initier un cil), un recrutement local de dynéines à cet endroit pourrait aussi bien permettre d'obtenir cette stabilisation. Donc il est possible que dans ce cas, les forces de "pushing" permettent d'initier le mouvement et la capture des microtubules par les dynéines présentes vers le haut de la cellule permet de finir en stabilisant la direction du mouvement vers la zone d'ancrage.

11.2 Fuseau mitotique monopolaire

Un autre exemple de situation pour laquelle nous avons cherché à appliquer nos simulations est le mouvement du fuseau mitotique monopolaire. Des défauts lors de la division cellulaire peuvent en effet conduire à la formation d'un fuseau mitotique monopolaire (un seul centrosome) [Tillement et al.(2009)].

Il a été observé que lors de la mitose, si la cellule échoue à s'arrondir comme c'est le cas normalement, le fuseau mitotique va échouer à s'assembler et à se positionner correctement. Ainsi la forme de la cellule joue un rôle essentiel dans l'évolution du fuseau mitotique [Lazaro-Dieguez et al.(2015)]. Remarquablement, dans des cellules larges et plates en mitose, un fuseau monopolaire oscille sans trouver de position d'équilibre. Ce phénomène serait dû à un dynamisme entre le fuseau et les dynéines associées aux protéines LGNs sur le cortex. Andrea Dimitracopoulos étudie ce problème dans sa thèse dans l'équipe de Buzz Baum à Londres. Pour tester différentes hypothèses sur les phénomènes mis en jeu dans ces situations, nous développons les simulations correspondantes pour en valider/infirmer la plausibilité. Le but est de comparer le comportement d'un fuseau monopolaire à celui d'un fuseau bipolaire dans le cas de cellules rondes et plates, avec ou en absence des filaments d'ADN reliés au fuseau. Mon implication dans cette étude consiste à aider Andrea à mettre en place les différentes simulations permettant de tester ses hypothèses. Je ne vais donc pas présenter ici l'étude complète, mais seulement les premières simulations que nous avons développées dans ce cadre.

Les protéines LGNs sont présentes sur le cortex et déterminent la localisation des dynéines corticales [Kiyomitsu et Cheeseman(2012)]. Par un mécanisme non déterminé, les LGNs sont repoussées par les microtubules. Ceci donne une dynamique particulière au système : les dynéines tirent sur les microtubules et les approchent donc de leur position. Ils créent en retour un effet de rejet sur les protéines LGNs, qui vont alors s'accumuler vers les autres parties du cortex. Les dynéines seront alors actives dans ces zones et y attireront les microtubules. Ces interactions provoquent donc une instabilité qui pourrait expliquer les oscillations observées.

Cette situation reprend donc l'étude des forces de "pulling" précédente, mais rajoute

à présent la dynamique des dynéines. Le couplage entre le réseau des microtubules et les moteurs moléculaires pourrait être à la base d'oscillations importantes. Pour intégrer cet effet dans les simulations précédentes, j'ai rajouté aux moteurs moléculaires la contrainte de se détacher de leur position courante lorsqu'ils subissent/exercent une force trop importante. Ainsi ils vont tirer sur les microtubules jusqu'à atteindre la valeur limite autorisée. Puis ils se détacheront du microtubule et du cortex et diffuseront jusqu'à un endroit proche du cortex aléatoirement choisi. Ceci permet de modéliser le comportement du système {LGNs, dynéines, microtubules}.

Les simulations préliminaires de ce système présentent effectivement des oscillations du fuseau monopolaire (Figure 11.4). Nous retrouvons donc le comportement précédent des forces de "pulling" corticales : elles positionnent le centrosome à proximité du bord sur lequel il y a le plus de dynéines. Par contre ici la distribution des dynéines est dynamiquement régulée par la position du centrosome. La rétroaction entre ces 2 composants suffit donc à expliquer les oscillations observées.

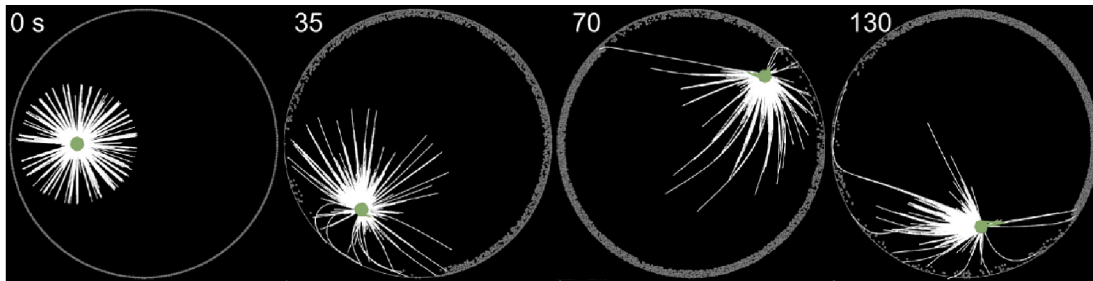


Fig. 11.4 : Oscillations du fuseau mitotique monopolaire

Simulations des forces de "pulling" lorsque les moteurs sont de plus expulsés par les microtubules. Le couplage entre le réseau microtubulaire et les moteurs moléculaires engendre des oscillations de la trajectoire du centrosome. 200 microtubules dynamiques sont simulés pendant 150 s. Le cercle de confinement a un rayon de $10 \mu m$.

Ces simulations peuvent donc être à présent utilisées afin d'explorer le comportement du fuseau monopolaire selon la géométrie de la cellule (ronde ou plate). Ensuite le but est de comparer ces comportements à celui d'un fuseau bipolaire, avec ou sans un filament représentant la présence d'ADN entre les 2 pôles. De plus il est possible que la zone d'ADN engendre un gradient de répulsion des protéines LGNs, ce qui serait un autre paramètre à ajouter aux simulations.

L'étude présentée dans cette dernière partie sur les forces intervenant dans le positionnement du centrosome est très exploratoire. Elle permet de poser les bases d'une réflexion théorique sur les mécanismes mis en jeu. Cela permet ensuite d'extrapoler les conclusions à différentes situations et d'en tirer des hypothèses sur les paramètres importants pour expliquer un comportement donné.

Cinquième partie

CONCLUSION

12. Bilan et perspectives	204
12.1 Bilan	204
12.2 Perspectives	205

12. BILAN ET PERSPECTIVES

12.1 Bilan

La cellule est un système extrêmement complexe et la variabilité énorme de cette entité n'aide pas à comprendre son fonctionnement. Elle utilise différentes organisations du cytosquelette lui permettant de réaliser les différents processus nécessaires à son fonctionnement. Les aspects de comportement collectifs et dynamiques de ces architectures du cytosquelette sont cruciaux à la formation, au fonctionnement et au désassemblage de ces structures. L'agencement interne de la cellule dépend de la dynamique de son cytosquelette. De nombreuses protéines interagissent avec les polymères du cytosquelette pour en contrôler leur dynamique, contrôlant éventuellement leurs propriétés cinétiques mais aussi mécaniques. Pour rajouter un niveau de complexité, toutes ces protéines sont interdépendantes, par exemple la déplétion d'une protéine peut entraîner la sur-expression d'une autre...

Ceci met en avant l'intérêt d'utiliser des systèmes simplifiés et contrôlés permettant d'isoler les protéines d'intérêt et contourner la complexité cellulaire. Les observations et conclusions que ces systèmes permettent de tirer pourront être ensuite intégrées au niveau du système cellulaire plus complexe. Les méthodes *in-vitro* à base de protéines purifiées utilisées dans l'équipe Cytomorpho utilisent ainsi la microfabrication de surface pour assurer le contrôle géométrique de l'environnement et permettre de déterminer les lois régissant certains comportements collectifs du cytosquelette. Ces systèmes biomimétiques permettent de révéler l'existence de différents mécanismes précis gouvernant l'auto-organisation des polymères. Néanmoins les comportements observés restent complexes et souvent pour pouvoir identifier ou caractériser ces mécanismes, l'utilisation de méthodes *in-silico* peut être un apport majeur dans l'exploration de ces systèmes.

C'est dans ce contexte que j'ai utilisé durant ma thèse les simulations numériques afin d'explorer différents mécanismes d'auto-organisation du cytosquelette. Notamment nous avons pu approfondir les points suivants :

L'organisation collective des filaments d'actine est dictée par leurs propriétés mécaniques (rigidité, longueur), leurs interactions stériques (et donc la composition biochimique du milieu) mais aussi par les contraintes géométriques (contraintes d'espace, rencontre entre différents réseaux...). La combinaison de ces propriétés suffit à prédire le comportement des filaments d'actine et les structures qui en émergeront. Ainsi nous avons pu déterminer certaines règles fondamentales impliquées dans le contrôle et la formation de structures d'actine dont l'organisation est similaire à celle des structures observées *in-vivo* (partie II). Ce qui nous a permis ensuite d'explorer le comportement des réseaux d'actine cellulaires selon leur architecture.

Nous avons pu montrer notamment que la contraction des structures d'actine sous l'action de moteurs moléculaires ne se fait pas de façon identique suivant leur architecture. En effet, le degré de connectivité entre les filaments d'actine qui forment une architecture définie détermine le régime de contraction. De plus l'amplitude de cette contraction est contrôlée par l'organisation des filaments d'actine et la nature des entités connectant les filaments ensembles. Le contrôle en temps réel de la biochimie des réseaux d'actine et de leur archi-

teature que nous avons développé dans notre système *in-vitro* et dans nos simulations permet d'appréhender le comportement dynamique des structures d'actine cellulaires. Ainsi nous avons mis en évidence que la réorganisation des structures d'actine observée dans les cellules et les variations de concentrations de protéines vont fortement affecter les comportements contractiles de ces organisations (partie III).

Je me suis aussi intéressée à comprendre comment le comportement collectif du cytosquelette pouvait influencer le positionnement du centrosome. La position du centrosome dans la cellule détermine l'organisation spatiale des microtubules autour de ce centre. En retour, leur distribution spatiale contrôle la répartition des forces exercées et transmises au centrosome, dirigeant son repositionnement. En effet, les principales forces dirigeant son positionnement sont les forces dues à la polymérisation des microtubules et les forces dues à l'action des moteurs moléculaires sur les microtubules. Les premières ont en général tendance à décentrer le centrosome. Leur efficacité est de plus fortement dépendante de leurs propriétés mécaniques et dynamiques. Les deuxièmes tendent à centrer le centrosome dans le cas d'une répartition homogène. Ces forces générées par les moteurs moléculaires sont en général d'effet supérieur à celui des autres forces intervenant. Néanmoins, la présence d'autres organites dans la cellule (notamment le noyau) pourrait aussi contribuer à déterminer ce positionnement (partie IV).

Outre les principales conclusions résumées ci-dessus, ces travaux ont aussi permis de montrer les possibilités que nous offrent les études *in-silico* et plus particulièrement **Cytosim** comme outil prédictif. Ceci suggère que de telles simulations pourraient être utilisées pour étudier de nombreux autres points. Ainsi que l'a déclaré Alan Turing, "We can only see a short distance ahead, but we can see plenty there that needs to be done". Je vais donc suggérer dans le chapitre suivant plusieurs propositions d'études pouvant être conduites dans la continuité de mon travail de thèse.

12.2 Perspectives

12.2.1 Combinaison *in-vitro* et *in-silico*

Durant cette thèse, j'ai cherché à utiliser les simulations avec **Cytosim** afin de comprendre différents comportements du cytosquelette observés *in-vitro*. En combinant les 2 approches, nous essayons d'améliorer notre connaissance du cytosquelette et d'intégrer ces conclusions au niveau cellulaire. Je pense que cette approche pourrait encore être utilisée pour étudier les phénomènes suivants par exemple :

- La dynamique de désassemblage et la transition dynamique d'une structure du cytosquelette à une autre. Nous avons effleuré ces concepts dans la revue présentée dans l'introduction (cf 1.4.1). Les simulations numériques présentées dans cette revue pourraient être reprises et développées afin d'explorer plus en détails ces transitions.
- Les interactions entre les filaments d'actine et les microtubules. J'ai dans ma thèse présenté et étudié le comportement de ces 2 polymères séparément. Cependant les réseaux formés par chacun de ces polymères ne sont pas indépendants et comprendre comment ils s'influencent mutuellement est un des défis actuels dans le domaine du cytosquelette.
- Le désassemblage des filaments d'actine par la myosine. Comme présenté dans cette thèse, j'ai commencé à explorer ce phénomène mais l'étude n'est pas complètement

aboutie (cf 8.2). La compréhension de ces mécanismes représente une démarche importante pour comprendre comment le cytosquelette d'actine arrive à se coordonner dans le temps et dans l'espace pour assurer l'intégrité de la réponse cellulaire.

- Tester la validité de systèmes *in-vitro* par rapport au système cellulaire. En particulier, dans l'étude du positionnement du centrosome, nous avons vu que le mode de courbure des microtubules *in-vitro* et dans nos simulations est Eulérien (cf 10.2.2), alors qu'il est supposé être visco-élastique dans la cellule. Développer des simulations avec l'hypothèse d'un mode de courbure visco-élastique et en comparer les comportements obtenus avec les résultats précédents pourrait permettre d'évaluer la validité des conclusions obtenues *in-vitro*.
- Pour optimiser des développements technologiques (comme par exemple la création de structures 3D d'actine conductrices [Galland et al.(2013)]), en restreignant le champ d'investigation ou en prédisant des designs efficaces [Rupp et Nedelec(2012)].

Pour ces différentes études, il serait intéressant d'intégrer de nouvelles possibilités dans *Cytosim*.

12.2.2 Évolution de *Cytosim*

Les nouvelles possibilités qui me paraîtraient intéressantes d'intégrer à *Cytosim* sont les suivantes :

- La possibilité de différencier les états chimiques ADP/ATP des sous-unités dans un filament, ce qui peut déterminer la distribution de certaines protéines dépendantes de cet état chimique le long d'un polymère biologique (par exemple pour l'ADF/cofiline qui s'attache de préférence sur les monomères à l'état ADP).
- Pouvoir ajouter une déformation dynamique de la géométrie des espaces de simulations selon les forces qui sont exercées (par exemple pour tenir compte de la déformation de la membrane lorsque les filaments exercent des forces à son contact).
- Pouvoir changer le mode de courbure des filaments pour tenir compte du mode visco-élastique et non Eulérien. Cependant, il est peut être possible de simuler ce comportement "à la main" dans *Cytosim* en rajoutant de nombreux ressorts dans l'espace de simulation.
- Avoir la possibilité d'imposer différentes valeurs des forces d'interactions selon les objets interagissant (pour l'interaction entre filaments d'actine et microtubules ou entre filaments et noyau...).
- Éventuellement, avoir le choix entre utiliser la version normale et une version parallélisée (sur GPU). Toutefois, la version non parallélisée permet de faire beaucoup de simulations en même temps.

12.2.3 Perspective générale

Nous avons exploré au cours de cette thèse différents mécanismes basés sur l'auto-organisation soit des filaments d'actine soit des microtubules intervenant dans les processus cellulaires. La cellule utilise en effet chacun de ces polymères de façon indépendante pour des tâches précises. Néanmoins leur combinaison (et éventuellement leurs interactions) permet la réalisation de processus fort complexes. De même s'il est important de développer en parallèles chacun des domaines théoriques et expérimentaux indépendamment, la combinaison de ces 2 approches permet d'aborder des problèmes plus complexes que ne l'aurait

permis une approche isolée. Les études en interface entre plusieurs disciplines sont donc de plus en plus développées et nécessaires. Il est encore malgré tout difficile de faire communiquer ces mondes assez différents. Le développement d'équipes de recherche composées de scientifiques de formations diverses permet d'avancer dans cette direction. De nouvelles formations plus multi-disciplinaires commencent aussi à être proposées afin de former une nouvelle génération de scientifiques. Toutefois jongler entre différents domaines ne permet pas une expertise aussi approfondie que celle exigée dans les formations uni-disciplinaires. Cela demande donc d'adapter le système scientifique pour intégrer au mieux cette nouvelle génération de scientifiques.

Annexe

A. ANNALYSE STATISTIQUE

A.1 Ségrégation asymétrique de l'ADN

Lors de la division cellulaire, les 2 copies de chaque chromosome sont répartis dans chacune des 2 cellules filles (par le fuseau mitotique). Parfois cette ségrégation peut être asymétrique : les chromosomes originaux (provenant de la cellule mère) vont majoritairement être placés dans une des 2 cellules filles, alors que leurs copies vont être transmis à la seconde cellule fille. Cette asymétrie de la ségrégation de l'ADN peut en particulier générer une différenciation asymétrique de cellules souches.

Un facteur pouvant expliquer cette distribution asymétrique pourrait être les contraintes géométriques de l'environnement de la cellule en division. Ainsi nous avons étudié comment des cellules souches mésenchymales humaines vont se diviser symétriquement lorsque confinés à un micropatron symétrique, alors que l'on obtiendra une ségrégation asymétrique sur un micropatron asymétrique (article [Freida et al.(2013)] ci-dessous).

Même si la ségrégation des chromosomes n'est pas biaisé par le micropatron (donc aléatoire), la répartition obtenue des chromosomes peut être asymétrique, juste due au hasard. Pour déterminer si la répartition des chromosomes que l'on observe est due ou non au hasard, il est nécessaire de comparer statistiquement la distribution des observations avec la distribution qu'aurait donné une répartition aléatoire ([Falconer et al.(2010)]). J'ai donc généré par une méthode de Monte-Carlo la distribution de ségrégations asymétriques obtenue pour une ségrégation non biaisée, et utilisé ces résultats pour déterminer si les observations expérimentales peuvent être incluses dans ces résultats ou présentent un biais trop important pour être expliqué par un phénomène aléatoire. Cette méthode est détaillée dans les données supplémentaires de l'article [Freida et al.(2013), SI, p. 7] donné ci-dessous.

Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Regulate Biased DNA Segregation in Response to Cell Adhesion Asymmetry

Delphine Freida,^{1,2,3,4,5,6} Severine Lecourt,^{4,5,6} Audrey Cras,^{4,5,6} Valérie Vanneau,^{4,5,6} Gaelle Letort,^{1,2,7,8} Xavier Gidrol,^{1,2,3} Laurent Guyon,^{1,2,3} Jerome Larghero,^{4,5,6,9,*} and Manuel They^{1,2,7,8,9,*}

¹CEA, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France

²University Grenoble-Alpes, F-38041 Grenoble, France

³INSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France

⁴AP-HP, Hôpital Saint Louis, Unité de Thérapie Cellulaire et Centre d'Investigation Clinique en Biothérapies (CBT501), F-75475 Paris, France

⁵Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75475 Paris, France

⁶INSERM, UMRS940, Institut Universitaire d'Hématologie, Hôpital Saint-Louis, F-75475 Paris, France

⁷INRA, USC1359, F-38054 Grenoble, France

⁸CNRS, UMR5168, F-38054 Grenoble France

⁹These authors contributed equally to this work

*Correspondence: jerome.larghero@sls.aphp.fr (J.L.), manuel.they@cea.fr (M.T.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.019>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

SUMMARY

Biased DNA segregation is a mitotic event in which the chromatids carrying the original template DNA strands and those carrying the template copies are not segregated randomly into the two daughter cells. Biased segregation has been observed in several cell types, but not in human mesenchymal stem cells (hMSCs), and the factors affecting this bias have yet to be identified. Here, we have investigated cell adhesion geometries as a potential parameter by plating hMSCs from healthy donors on fibronectin-coated micropatterns. On symmetric micropatterns, the segregation of sister chromatids to the daughter cells appeared random. In contrast, on asymmetric micropatterns, the segregation was biased. This sensitivity to asymmetric extracellular cues was reproducible in cells from all donors but was not observed in human skin-derived fibroblasts or in a fibroblastic cell line used as controls. We conclude that the asymmetry of cell adhesion is a major factor in the regulation of biased DNA segregation in hMSCs.

INTRODUCTION

A doubled-strand DNA molecule forms the core of a chromosome. One of these strands has served as a template for the assembly of the copy. During S phase and mitosis, strands are separated and duplicated, and then the two resulting chromosomes are spatially segregated. One daughter cell will inherit the chromosome carrying the template strand and the other

the copy strand. According to the biased DNA segregation hypothesis, most or all of the chromosomes carrying the original template strand will be segregated into only one of the two daughter cells (Tajbakhsh and Gonzalez, 2009). Biased DNA segregation has been proposed to affect the distribution of epigenetic marks and therefore the differential gene expression between daughter cells (Evano and Tajbakhsh, 2013). Indeed, biased DNA segregation has been shown to regulate asymmetric stem cell fate (Rocheteau et al., 2012).

Biased DNA segregation has been documented in various species ranging from bacteria to mammals, most generally in the context of asymmetric stem cell divisions (Tajbakhsh and Gonzalez, 2009). It has been observed both *in vivo* and *in vitro* in several mammalian progenitor or stem cell types for striated muscle (Shinin et al., 2006), mammary gland (Smith, 2005), colon (Falconer et al., 2010), intestine (Potten et al., 2002), cardiac muscle (Kajstura et al., 2012), and neurons (Karpowicz et al., 2005). However, the absence of biased DNA segregation in various types of stem cells (Kiel et al., 2007; Sotiropoulou et al., 2008; Escobar et al., 2011) and its occurrence in tumor-derived or immortalized cells (Merok et al., 2002; Pine et al., 2010) have fueled the debate on the relationship among stemness, asymmetric division, and biased DNA segregation.

Biased DNA segregation has been explored experimentally in a variety of ways, but each of the different procedures used have specific limitations (Tajbakhsh and Gonzalez, 2009). Cell division cannot be monitored directly *in vivo*; the clear identification of all daughter cells and the detection of rare events are hampered when using fixed tissues (Falconer et al., 2010). Cell division can be video-recorded *in vitro*, but the critical regulation that the *in vivo* microenvironment would potentially have on the division of stem cells is excluded (Marthiens et al., 2010; Chen et al., 2013). Finally, both *in vivo* and *in vitro*, it can be challenging to distinguish between random and biased DNA segregation

(Falconer et al., 2010). Hence, one way to reconcile conflicting observations on the occurrence of biased DNA segregation is to identify the underlying mechanism and the parameters that regulate the process. However, the mechanism and regulatory parameter remain to be defined (Maiato and Barral, 2013).

In the stem cell niche, stem cell interactions with neighboring cells and with the surrounding extracellular matrix (ECM) regulate their fate (Marthiens et al., 2010; Chen et al., 2013). Adhesion to ECM provides both biochemical and physical signals to stem cells (Rozario and DeSimone, 2010; Brizzi et al., 2012). The spatial distribution of cell adhesion is a key physical signal, in addition to mechanical stimulation (Guilak et al., 2009). It not only defines cell shape but also provides directional cues during asymmetric cell division. Adhesion asymmetry is a fundamental characteristic of asymmetric division (Ellis and Tanentzapf, 2010; Yamashita, 2010). Differences in spatial distribution of the cell's adhesions biases the spontaneous polarization of actin and microtubule networks in interphase (Li and Gundersen, 2008). Further interplay between the actin network and dynamic microtubules leads to metaphase spindle off-centering toward the adhesion-associated cues during cell division (Gönczy, 2008). The consequential asymmetric positioning of the cytokinetic plane generates daughter cells of unequal sizes and unequal contents of adhesion-associated cues, which further determines their distinct fates (Morin and Bellaïche, 2011; Inaba and Yamashita, 2012). We hypothesize that segregation of template and newly synthesized DNA strands can be directed by cell adhesion asymmetry as well and contribute to distinct cell fate determination. To test this hypothesis, we have used surface micropatterning to control the spatial distribution of cell-ECM adhesion and examine biased DNA segregation in primary human mesenchymal stem cells (hMSCs).

RESULTS

Asymmetric Metaphase Plate Position during Mitosis in Response to Adhesion Anisotropy

Modulation of HeLa cell adhesion to ECM with substrate micropatterning has revealed that a slight accumulation in adhesion along one side of the cell is sufficient to induce asymmetric spindle orientation with one of the spindle poles in proximity of the major adhesion-associated cue (Théry et al., 2007). Hence, we first tested the effect of asymmetric distribution of fibronectin on the symmetry of mitotic spindle positioning in hMSCs. hMSCs were isolated from human bone marrow (see [Experimental Procedures](#)) and characterized as previously described (Arnulf et al., 2007). To increase the proportion of cells that undergo mitosis during the observation period (<50% cells divide during 40 hr), hMSCs were blocked in early S phase with 1 mM of thymidine for 24 hr. After block release by thymidine washout, and just before entry into mitosis, cells were trypsinized and plated on ECM micropatterns. Elongated micropattern geometries were designed to guide cell division and daughter cell positioning along the mother cell's long axis (Théry et al., 2005). Dumbbell-shaped micropatterns were designed to provide two large and symmetric adhesion areas at the cell extremities (Figure 1A). To provide an asymmetric adhesion geometry and to reduce cell adhesion on one side of the cell without changing the cell's

overall shape, one of the two large adhesive areas of the dumbbell shape was substituted by a Y shape (Figure 1A). Cells were fixed 12 hr after block release (Figure 1).

Actin and microtubule networks appeared asymmetrically organized on asymmetric micropatterns, which is a sign of stably polarized cell (Li and Gundersen, 2008). The microtubule network was more concentrated above the large adhesive area and the actin network formed radial and small concentric arcs of actin fibers. Above the smaller Y-shaped adhesive area, the microtubule network was less concentrated and the actin network formed peripheral stress fibers (Figure 1Aii). Mitotic cells also appeared polarized on asymmetric micropatterns, with asymmetric tear-drop-like shapes, and were off-centered toward the large adhesive area (Figure 1Bii). Cell division asymmetry was also visible during telophase and cytokinesis. Daughter cells seemed to have unequal size and distinct microtubule organizations on asymmetric micropatterns (Figures 1Cii and 1Dii). In contrast, cell division on symmetric micropatterns appeared quite symmetric with respect to all of the above criteria (Figures 1Ai, 1Bi, 1Ci, and 1Di).

The observations made on fixed cells were confirmed with live-cell video recording during which rare mitotic events were easier to capture and quantify. Cell divisions were monitored during 20 hr using phase contrast video microscopy (Figure S1). Chromosome alignment along the metaphase plate was visible in phase contrast. On both symmetric and asymmetric micropatterns, metaphase plates were oriented orthogonally to the long cell axis (Figure S1). This corresponded to an asymmetric orientation on asymmetric micropatterns because the two spindle poles were in proximity of parts of the cell cortex that were not symmetrical. In addition, as previously observed, the metaphase plate was off-centered toward the large adhesive area on the asymmetric micropattern (95% confidence interval [CI] was between 3.6 and 9.7 μm away from the center) and centered on symmetric micropatterns (95% CI was between -4.7 and 1.6 μm around the center) (Figure 1E). Thus, spindle positioning on asymmetric micropatterns displayed most of the typical features associated with asymmetric cell division (Morin and Bellaïche, 2011; Inaba and Yamashita, 2012).

Asymmetric Adhesive Microenvironments Promote Asymmetric Chromatid Segregation in hMSCs

We then tested whether asymmetric spindle position affected DNA segregation. A short pulsed EdU exposure was used to label a single chromatid of a chromatid pair and observe its spatial segregation from the unlabeled chromatid (Figure 2). hMSCs were synchronized in S phase and exposed to 1 μM EdU for 9 hr. To follow the fate of the labeled strands, cells were fixed and immunostained. The partition of labeled strands was estimated by measuring the relative EdU fluorescence intensity in the two daughter cells (Figure S2). After the first division following the pulsed EdU labeling, the daughter cells displayed similar levels of fluorescence in all conditions tested, because, as expected, all chromosomes carried an EdU-labeled DNA strand (Figure S3). Although the sister chromatid segregation was expected to be symmetric, the proportions of labeled DNA between the two daughter cells were not all 50:50 and were as much as 55:45 (Figure S3). This 10% margin of error was

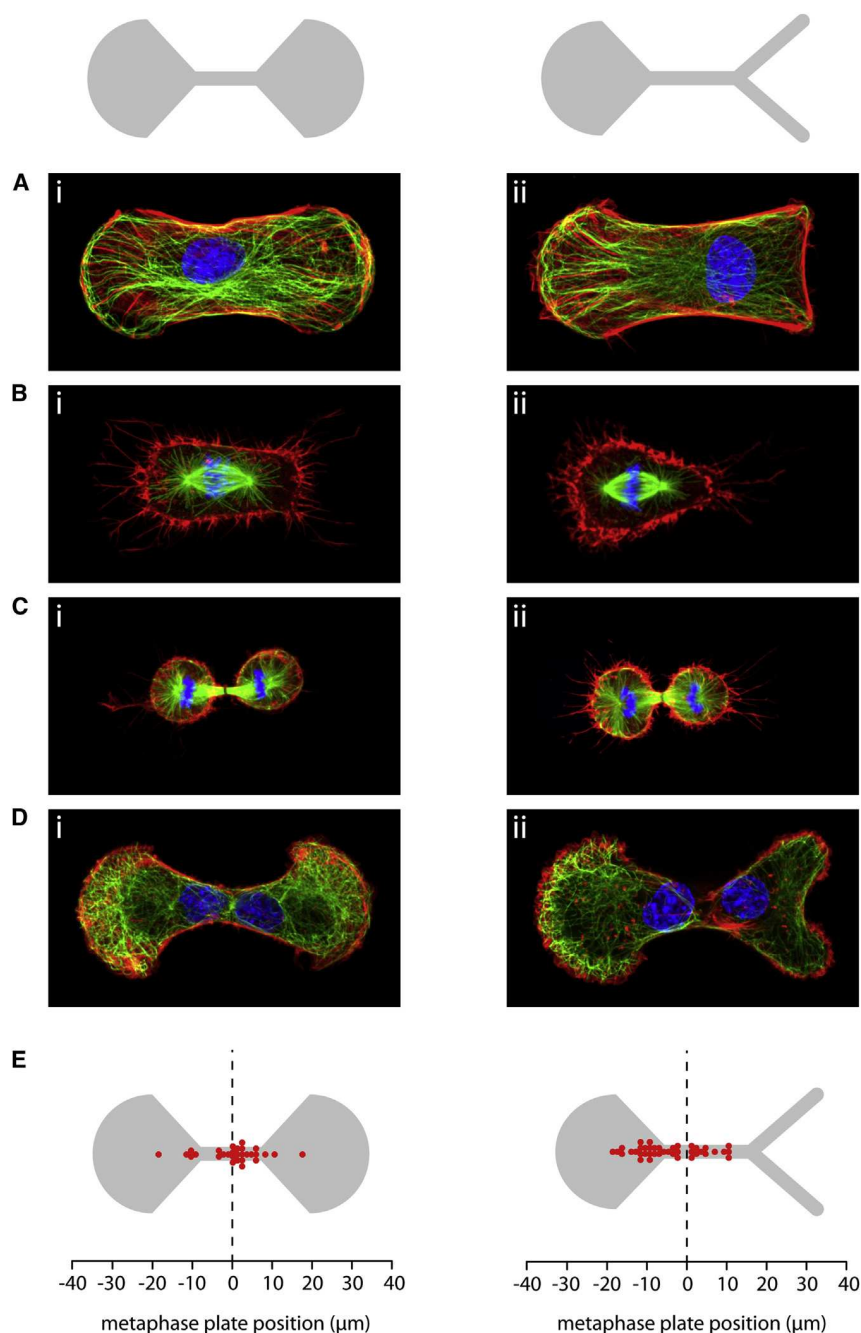


Figure 1. hMSC Division on Fibronectin Micropatterns

(A–D) Primary cultures of hMSCs were plated on symmetric (i) and asymmetric (ii) fibronectin micropatterns (gray drawings above images). Cells were fixed and stained for actin (red) and tubulin (green). Images show cells in interphase (A), metaphase (B), telophase (C), and cytokinesis (D). (E) Metaphase plate positions were manually measured with respect to the underlying micropattern on phase contrast movies (see Figure S1). Each red dot corresponds to the longitudinal position of a metaphase plate.

matid. Prior to this division, cells were plated on ECM-micropatterns to test the role of cell adhesion on this chromosome segregation. Cell divisions were monitored in video microscopy to ensure that cell doublets actually corresponded to daughter cells (Figure 2B). The low rate of division in these cells was overcome by monitoring a thousand of individual cells in parallel for each donor sample. After the observation period, cells were fixed and stained. About 10% of cells divide during the 20 hr observation period and only about 20% were labeled during the EdU pulse, which corresponded to a dozen of positive cell divisions among a thousand individual cells monitored on the micropatterns. By comparing the fluorescence of the two daughter cells, we could indirectly measure the proportion of DNA carrying the parental, unlabeled strand and neo-synthesized, labeled strand in each cell (Figures 2B and S2). In Figure 2 and in the following, we report the proportion of labeled DNA in the most fluorescent daughter cell, which ranged from 50% (symmetric segregation of labeled DNA) to 100% (asymmetric segregation with all labeled strands in one of the daughter). Asymmetric DNA segregation was observed on both symmetric and asymmetric micropatterns. However, it seemed more frequent on asymmetric micropatterns (Figure 2C). Because the margin of error for symmetric DNA segregation was 10% (Figure S3), only values above 55% were considered as asymmetric DNA segregation (see blue dashed line in Figure 2D). The distributions of asymmetric DNA segregation rates on symmetric and asymmetric micropatterns were significantly different (Wilcoxon test) and the degree of asymmetric DNA segregation was significantly higher on asymmetric micropatterns (Figure 2D). The same tendency was observed in cells obtained from each of the four healthy donors (Figure 2E).

probably due to the limitations of our quantification method due to 3D chromosome organization and nonlinear relationship between DNA staining and the fluorescent signal. However, as illustrated below, the precision for quantifying labeled DNA was sufficient to identify asymmetric segregation.

During the second division, the labeled and unlabeled strands were separated during DNA replication and incorporated into distinct sister chromatids (Figure 2A). So for each chromosome, daughter cells inherited either the labeled or the unlabeled chro-

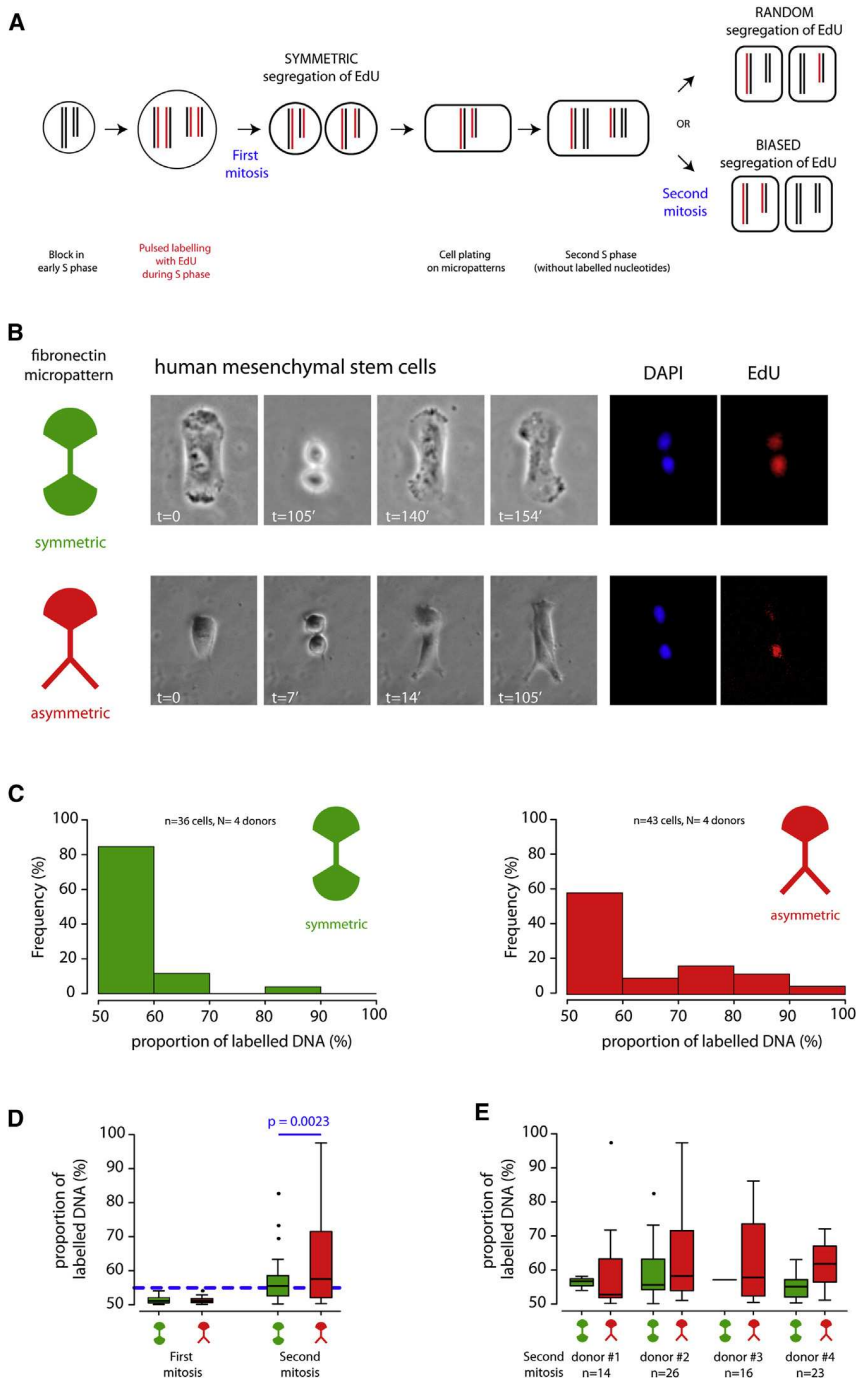


Figure 2. Quantification of DNA Segregation Asymmetry in hMSCs

(A) Pulsed EdU labeling and chromatid segregation. Chromosomes are represented as two bars corresponding to the two chromatids. Red bars correspond to EdU labeled chromatids. In the case of random DNA segregation, daughters receive a similar amount of labeled DNA strands. In the case of biased DNA, one of the two daughters receives most, if not all, labeled strands.

(B) Primary cultures of hMSCs were plated on symmetric (upper panel) and asymmetric (lower panel) fibronectin micropatterns. Cell divisions were monitored using phase contrast microscopy over 20 hr and further examined after fixation. Cells were immunostained to reveal DNA with DAPI (blue) and the DNA strands that had incorporated EdU (red).

(C) EdU staining was measured in both cells. Histograms show the frequency distribution of the EdU proportion in the more fluorescent daughter (i.e., the DNA segregation rate; between 50% and 100% in 10% intervals) when plated on symmetric (left) and asymmetric (right) micropatterns.

(D) Box plot representations of the distributions of after the first, symmetric mitosis and second mitosis (same data set as in C). Asymmetric DNA segregation rates were defined as rates superior to the threshold of 55% (blue dotted line) defined by the highest DNA segregation rate observed after the first mitosis. Asymmetric DNA segregation rates after the second mitosis were compared with a Wilcoxon test.

(E) Box plot representations of the distributions of DNA segregation rates on symmetric and asymmetric micropatterns for each of the four donors that contributed to the pooled data in (C) and (D).

only less than 0.6% of divided cells had asymmetric DNA segregation rates superior to 70% (Figure 3A). Therefore, 70% was set as a reasonable limit above which DNA segregation rates were considered as biased and not due to a random process. Noteworthy, longer chromosome could give a greater contribution to the EdU signal than a shorter one and impinge on fluorescence ratios. We performed similar simulations by taking into account the specific chromosome sizes and found that although the probability distribution was slightly changed, the

probability to observe asymmetric DNA segregation rates superior to 70% was not affected (Figure S4). Therefore, this threshold was used to further analyze the distributions of DNA segregation on symmetric and asymmetric micropatterns.

On symmetric micropatterns, biased DNA segregation was observed in only 2 out of 36 divided hMSCs. Similar frequencies of divided cells were observed when the cells were plated on homogeneously adhesive substrata. In contrast and on asymmetric

Asymmetric Adhesive Microenvironments Bias Chromatid Segregation in hMSCs

Numerical simulations were used to explore whether asymmetric DNA segregation was due to a random process or a bias process. The probability distribution defined by the random segregation of 46 pairs of chromatids showed that all DNA segregation rates, although not equally frequent, are possible (see Supplemental Experimental Procedures). Hence, from this simulation,

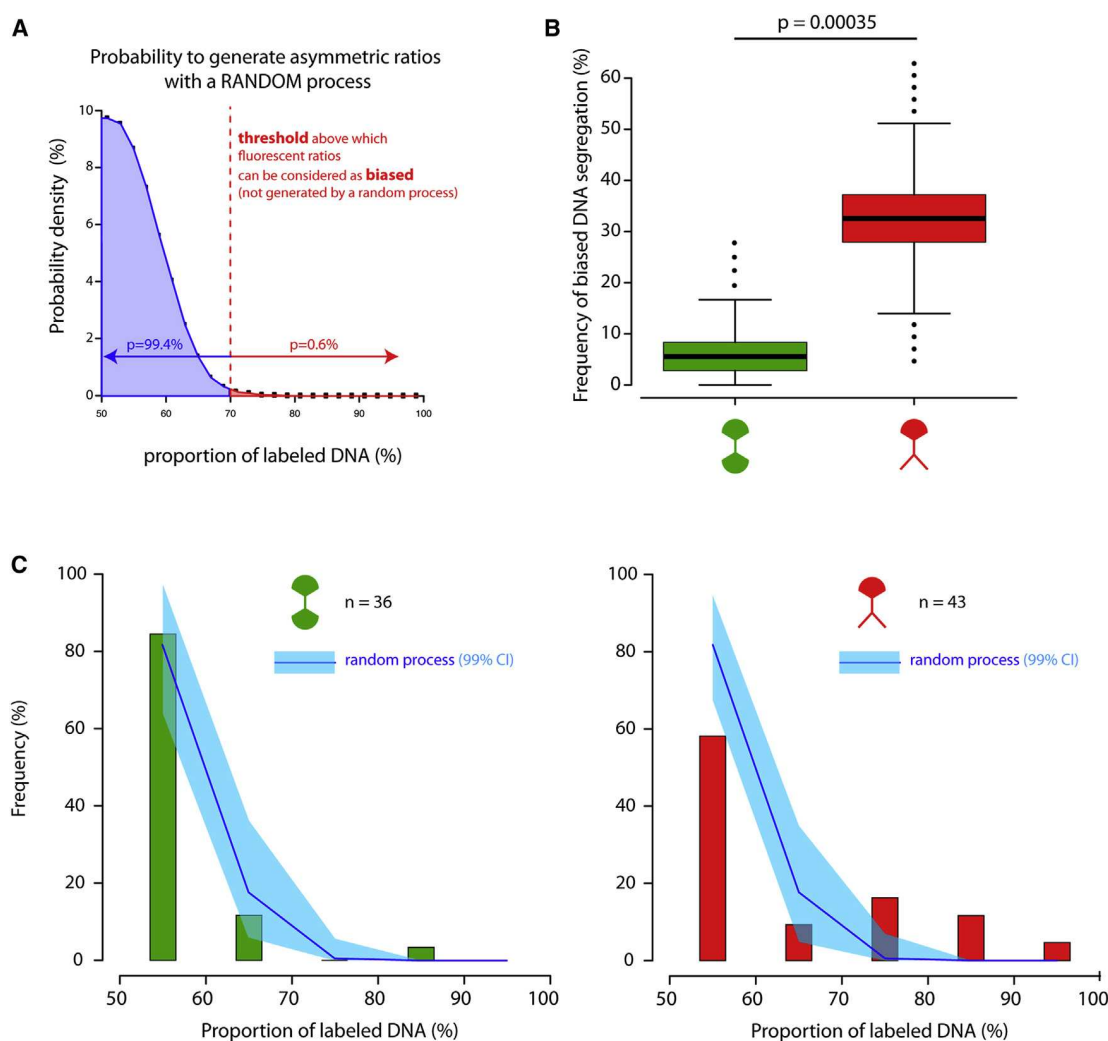


Figure 3. Quantification of DNA Segregation Bias in hMSCs

(A) Numerical simulation of the probability distribution defined by the random, unbiased segregation of 46 pairs of chromatids. According to this random process, only 0.6% of the observations (red) would give DNA segregation rates > 70%. Hence, a DNA segregation rate > 70% was considered biased DNA segregation.

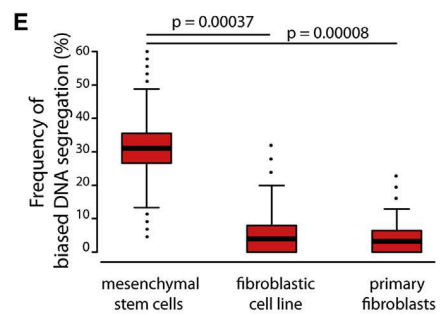
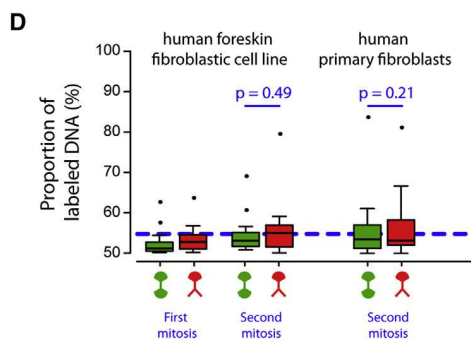
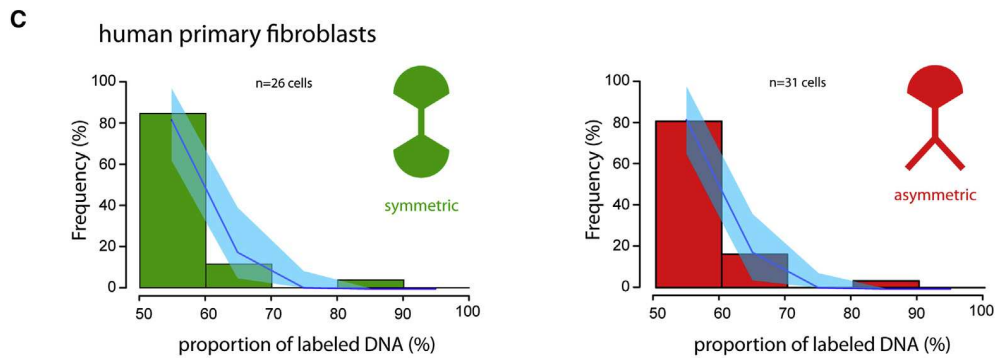
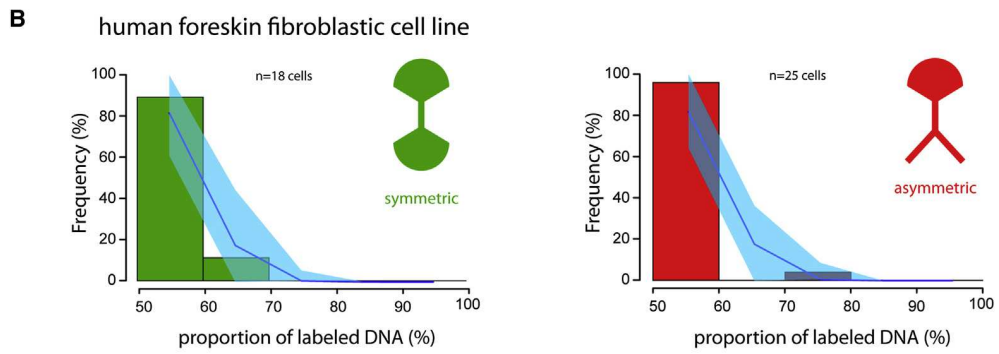
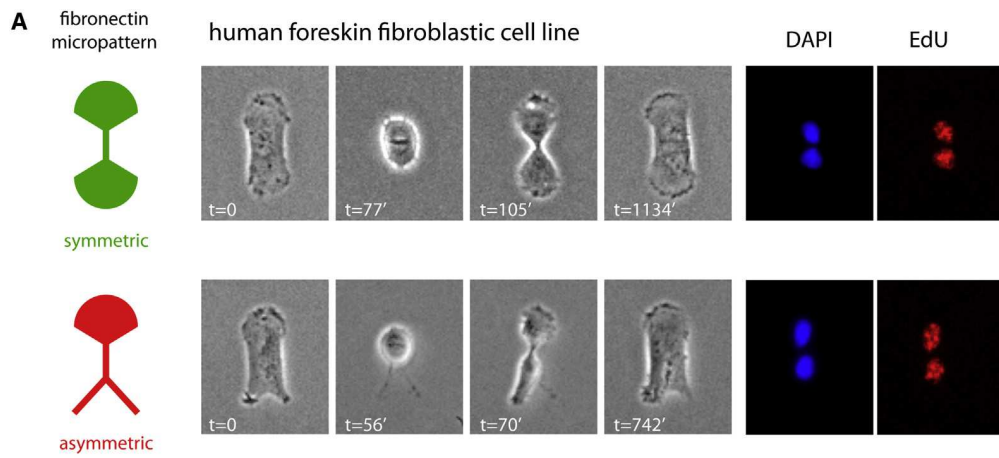
(B) Estimation of the mean and SD of the proportion of divided hMSCs displaying biased DNA segregation using a bootstrap method based on data shown in Figure 2C. The mean frequency of biased DNA segregation was a significantly higher (t test) for divided cells on asymmetric micropatterns than on symmetric micropatterns.

(C) Histograms of the observed frequencies for DNA segregation rates (in 10% intervals) shown in Figure 2C overlaid with line graphs describing the numerical simulation of DNA segregation rates of random chromatid segregation in the same number of cells (see Supplemental Experimental Procedures). Light blue areas indicate the 99% confidence intervals. Note that the part of the observed distribution (red bars, right histogram) on asymmetric micropatterns is not compatible with the random process.

micropatterns, biased DNA segregation was observed in 14 out of 43 divided cells. Bootstrapping methods have been developed to estimate the confidence interval of data set with “not-quite large samples” (Tukey, 1958; Davison, 1997). They are based on resampling with replacements of the actual data set keeping the number of observations constant. These new data can then be used to estimate the actual mean and SD of the few measurements. We used a bootstrapping method to compare the frequencies of biased DNA segregation in cells plated on symmetric and asymmetric micropatterns (Figure 3B). It appeared that the estimated difference between cells on sym-

metric and asymmetric micropatterns (6% and 33%, respectively) was highly significant ($p = 0.00035$).

The prominent segregation bias in cells plated on asymmetric micropatterns was also highlighted by the direct comparison between the observed distribution of DNA segregation rates with the numerical simulation of random segregation (Figure 3C) (see Methods in Supplemental Information) (Falconer et al., 2010). On symmetric micropatterns, almost all DNA segregation measurements were within the 99% CI defined by random segregation, whereas on asymmetric micropatterns, the bias DNA segregation measurements appeared as a distinct



(legend on next page)

(secondary) distribution (Figure 3C). These analyses confirmed the existence of a nonrandom mechanism directing chromosome segregation in hMSCs in response to asymmetric extracellular signals associated with cell adhesion.

We then examined the cells displaying asymmetric DNA segregation ratios to identify whether the labeled, chromatids were preferentially segregated in the daughter cell positioned on the more-adhesive or less-adhesive side of the micropattern. However, cells were generally fixed and labeled several hours after division, during which time they could have repositioned with respect to the micropattern geometry. Moreover, it was difficult to retrospectively identify from the video recordings the original position of the nonlabeled cells immediately after they emerged from cell division. Nevertheless, in four out of the five videos in which this analysis was feasible, the labeled chromatids were segregated in the daughter cell located on the less adhesive side of the micropattern (as illustrated in Figure 2B). This supported the existence of a correlation between the greater concentration of localized cell adhesions at one part of the cell and the directed segregation of older chromatids toward this part (Tajbakhsh and Gonzalez, 2009).

Cell Adhesion Asymmetry Had No Effect on DNA Segregation in Normal Fibroblasts

To test whether the role of adhesion asymmetry on biased DNA segregation was specific to stem cells, we performed the same EdU segregation test on BJ1, a normal human foreskin fibroblast cell line (Figure 4A). Asymmetric DNA segregation ratios were observed but were infrequent and largely consistent with random chromatid segregation (Figure 4B). Similar distributions of DNA segregation rates were observed in fibroblasts derived from the skin of two healthy donors (Figure 4C). In addition, no difference in the frequency distributions of different DNA segregation ratios could be detected between cells plated on symmetric and asymmetric micropatterns for both type of fibroblasts (Figure 4D; Wilcoxon test). Biased DNA segregation was observed in 1/26 divided primary fibroblast cell on symmetric micropatterns and in two divided cells on asymmetric micropatterns (1/25 in BJ1, 1/31 in primary fibroblasts). However, the frequencies of biased segregation on symmetric micropatterns were significantly lower than in hMSCs (14/43) (Figure 4E).

DISCUSSION

Together, these results have led us to the formulation of two important conclusions: the spatial distribution of cell adhesion is a major parameter in the regulation of biased DNA segrega-

tion, and mesenchymal stem cells are more sensitive to this parameter than fibroblasts.

It should first be noted that this study extends the previous observations of biased DNA segregation previously made in mouse stem cells and transformed, or immortalized, human cell lines to human primary stem cells. Our work on human cells was motivated by the interest this extension constitutes for basic research and potential therapeutic applications.

However, there were two main limitations to the experimental procedures used in this study. Cells had to be cultured in vitro. Individual cell proliferation was infrequent and variable. In addition, EdU staining is less precise than counting labeled chromosomes to evaluate a bias in chromatid segregation (Falconer et al., 2010; Sauer et al., 2013). Nevertheless, the relatively low numbers of measurements were obtained from four different donors and analyzed with three distinct statistical tests, all of which validate the significance of the observed differences.

In the following paragraphs, we discuss the conditions in which these experiments were performed as well as their biological relevance and physiological implications.

Cell Adhesion and Tissue Geometry

Cell culture on ECM-coated micropatterns obviously does not mimic the actual in situ conditions, but it does offer the potential to manipulate the spatial distribution of cell adhesions and thereby the potential to provide mechanistic insights to cell behavior in vivo (Morin and Bellaïche, 2011). The geometries of the micropatterns in this study probably have no exact counterparts in tissues. However, in many tissues, cells encounter irregular patterns of adhesion contacts. This is notably the case in the highly structured and heterogeneous niches in which stem cells are confined (Ellis and Tanentzapf, 2010; Marthiens et al., 2010; Brizzi et al., 2012). Our results suggest that in these conditions, a local clustering of adhesion in one part of the cell could trigger biased DNA segregation.

Biased DNA segregation also occurred at low frequency in divided hMSCs on symmetric adhesion patterns. This may be in accordance with the absence of clear biased segregation in hematopoietic stem cells (Kiel et al., 2007) where the weak adhesion of hematopoietic stem cells may not be sufficient to stimulate biased DNA segregation. But this does not exclude the possibility that in defined conditions hematopoietic stem cells could transiently develop asymmetric adhesion contacts (Ehninger and Trumpp, 2011) and then have the potential to promote biased DNA segregation. Hence, stem cells have a mechanism supporting bias DNA segregation that operates at a basal level in all conditions but is selectively amplified when stem cells form asymmetric adhesion contacts.

Figure 4. Quantification of DNA Segregation in Fibroblasts

(A) BJ1 cells were plated on symmetric (upper panel) and asymmetric (lower panel) fibronectin micropatterns, and examined as described in Figure 2B. (B and C) Histograms of the frequencies for DNA segregation rates (in 10% intervals) of (B) BJ1 cells or (C) human primary fibroblasts when plated on symmetric (left) and asymmetric (right) micropatterns, overlaid with numerical simulations of ratios expected from random chromatid segregation in the same number of cells (see Supplemental Experimental Procedures). Light blue areas indicate the 99% confidence interval. (D) Box plot representations DNA segregation rates after the first and the second division on symmetric and asymmetric micropatterns for BJ1 and primary fibroblast. The frequencies of asymmetric DNA segregation rates (those superior to the threshold of 55% shown by the blue dotted line) were compared with a Wilcoxon test, which revealed no significant difference between DNA segregation on symmetric and asymmetric micropatterns. (E) Estimation of the mean and SD of the proportion of divided BJ1 or primary fibroblasts displaying biased DNA segregation using a bootstrap method. On asymmetric micropatterns, the mean frequency of biased DNA segregation was a significantly higher (t test) for divided hMSCs than for BJ1 or primary fibroblasts.

Notably, stem cells can develop anisotropic interactions with the ECM and with neighboring cells (Marthiens et al., 2010; Chen et al., 2013). Whether the regulation of DNA segregation by the geometry of the ECM we described here also applies to the geometry of cell-cell interactions remains to be investigated. Considering the shared characteristics in the mechanism of spindle orientation by cell-matrix and cell-cell adhesions (Morin and Bellaïche, 2011), it would not be surprising to observe similarities in the regulation of DNA segregation. Indeed variations of the density of cell-cell contacts in culture have been shown to affect asymmetric DNA segregation ratios (Pine et al., 2010).

Interestingly, the role of cell adhesion symmetry suggests that biased DNA segregation is promoted along the boundaries of a tissue, but not within internal aspects of the tissue. The symmetrical environment cells encounter within the tissue stroma may inhibit biased DNA segregation, whereas at the tissue periphery, interfaces between cell types with distinct adhesion properties, and frontiers between distinct organs, may be particularly suited to promote it. All boundaries may not be capable to induce biased DNA segregation, but the asymmetry they constitute may be a required condition. Interestingly, tissue boundaries are the preferential location of stem cells. Do stem cells move toward tissue boundaries, or do the physical properties of boundaries activate stem cell traits? This is an interesting debate in which the specific activation of biased DNA segregation at the tissue boundary could be also considered.

Proportions of Asymmetric DNA Segregation

Although we clearly identified a bias in DNA strand segregation, the segregation of all labeled strands in one of the daughter cells, as it has been described in muscle stem cells (Conboy et al., 2007; Rocheteau et al., 2012), was rarely observed (1/43 in hMSCs plated on asymmetric micropatterns). This could be a consequence of working with primary cells *in vitro*. Indeed, the proportion of asymmetric DNA segregation in muscle stem cells is also lower when the cells are maintained in culture (Conboy et al., 2007; Rocheteau et al., 2012; Shinin et al., 2006). In addition, we followed the procedure recommended by the European Group for Blood and Marrow Transplantation to isolate hMSCs (Le Blanc et al., 2008). The selection process is based on differential cell adhesion and did not include any further immunosorting step. So the population of hMSCs we used was probably heterogeneous and may have contained some differentiated cells in which biased DNA segregation is less active.

Indeed, biased DNA segregation was observed at low frequencies in fibroblasts. It could be due to the presence of few stem cells in the population or to a vestigial mechanism in differentiated cells. Both hypotheses suggest that the capacity to bias DNA segregation is progressively lost as cells differentiate.

Considered together, the reduction of biased DNA segregation in stem cells during cell culture and during cell differentiation suggests that the cell's capacity to bias DNA segregation is not an on-off process but is subject to a graded regulation. Depending on the cell's capacity, the degree of the DNA segregation bias would reflect the degree of external asymmetry.

How the capacity to bias DNA segregation is coupled to cell differentiation state is an interesting question. One hypothesis is that this capacity is related to the regulation of cytoskeleton

polarization. Interestingly, cytoskeleton polarization is not an on-off process either, and the well-known intrinsic polarization capacities of the actin cytoskeleton by symmetry break (Mullins, 2010) can be modulated and stabilized by additional microtubule-associated signaling pathways (Wang et al., 2013). Whether similar pathways are coregulated with stemness pathways and render the stem cell cytoskeleton more responsive to external changes is an exciting hypothesis. Another nonexclusive hypothesis is that the capacity is acquired by prolonged exposure to environmental asymmetries. Stem cells at tissue boundaries are permanently exposed to asymmetric conditions and thereby may become more activated and responsive than fibroblasts in the stroma, which are exposed to symmetric conditions. When stem cells are removed from their niche and placed in a relatively homogeneous environment in culture, they suddenly become exposed to symmetric conditions and start losing their capacity to undergo biased DNA segregation. In accordance with such a mechanism, the level of activation would not be directly related to stemness but to a progressive adaptation to the degree of symmetry in the cell's microenvironment.

The two points we discussed above, the spatial regulation associated with tissue boundaries and the temporal regulation of the level of activation allowing cells to respond to external asymmetry, offer insights into the regulation of biased DNA segregation. The capacity of a cell to bias DNA segregation may not be predetermined, but it may be reprogrammable. Therefore, microenvironment geometry could dynamically modulate cell responsiveness and the degree of biased DNA segregation. Accordingly, the alteration of the cell's position within the tissue, during development, tissue renewal, or malignant transformation, would affect the cell's capacity to bias DNA segregation. In addition, sudden changes in cell microenvironment geometry, like tissue injury, would rapidly modulate the cell's activation level and trigger biased DNA segregation. This hypothesis is consistent with the observation that muscle stem cells undergo biased DNA segregation upon muscle injury only. It suggests that stem cells, like hair follicle stem cells (Sotiropoulou et al., 2008) or intestinal epithelial stem cells (Escobar et al., 2011), may not bias DNA segregation in normal conditions but could do so punctually in response to local tissue changes such as a wound, an inflammation, or a local variation of cell density. Thus, the dynamic regulation of biased DNA segregation by local asymmetries would be proficient for tissue repair after wounding and for proper tissue homeostasis in rapidly growing tissue during development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bone Marrow Samples

Bone marrow (BM) samples were harvested from washed filters used during BM graft processing for allogeneic BM transplantation. All samples were taken after receiving informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique, Hôpitaux de Paris, Paris, France).

hMSC Culture and Characterization

BM hMSCs were isolated and expanded as previously described (Arnulf et al., 2007). Briefly, healthy donor BM cells were cultured at the initial density of 5.10^4 cells/cm² in Minimum Essential Medium- α (Invitrogen), supplemented

with 10% fetal bovine serum (HyClone), Glutamax-I (2 mM; Invitrogen), basic fibroblast growth factor (1 ng/mL; R&D Systems), and antibiotic/antimycotic (1%, Invitrogen). After 24–48 hr, nonadherent cells were removed and medium was changed. Adherent cells were then trypsinized, harvested, and cultured by seeding 5×10^3 cells/cm². Cultures were fed every 2 to 3 days and trypsinized every 5 days. In all experiments, hMSCs were used at passage 3 to 4.

Monoclonal antibodies conjugated with either fluorescein isothiocyanate or phycoerythrin and directed to CD34, CD45, CD73, CD90, CD13, CD29, CD105, or matched isotype control (all purchased from Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) were used for hMSC immunophenotyping according to the manufacturer's protocol. Data were acquired and analyzed on a five-parameter flow cytometer (FACSscalibur, Becton Dickinson) with CellQuestPro software (Becton Dickinson). In accordance with the literature, the BM hMSCs used in our study did not express hematopoietic antigens, such as CD14, CD34, and CD45, and were found positive for CD73, CD90, CD29, CD44, and CD105 expression.

Fibroblast Culture

Primary cultures of dermal fibroblasts were derived from skin biopsy specimens obtained during mammoplasty surgery. All samples were taken after receiving informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique, Hôpital de Paris, France). Cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum (HyClone), 100 U/ml penicillin, and 1 mg/ml streptomycin. Fibroblasts were used between the third and fourth passages.

Human foreskin fibroblast BJ1 (ATCC) cells were cultured in Minimum Essential Medium- α (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (HyClone), Glutamax-I (2mM; Invitrogen), nonessential amino acid (1x; Invitrogen), and 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin (Invitrogen).

Both cell types were cultured in a humidified incubator at 37°C with 5% CO₂ atmosphere.

Micropatterns

Micropatterns coated with native and Alexa 650-labeled fibronectin were purchased from Cyto. They were fabricated on thin (170- μ m-thick) glass slides compatible with fluorescence imaging and video recording.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and four figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.019>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Steven McKinney and Peter Lansdorp for sharing their codes for numerical simulations and Shahragim Tajbakhsh for interesting and stimulating discussions. M.T. and J.L. acknowledge the support of the European Research Council (starting grant ERC-310472) and the Agence National pour la Recherche (ANR-05PRIB01103, ANR-10-IBHU-0002). M.T. is a founder and shareholder of CYTOO.

Received: January 11, 2013

Revised: July 12, 2013

Accepted: September 12, 2013

Published: October 17, 2013

REFERENCES

Arnulf, B., Lecourt, S., Soulier, J., Ternaux, B., Lacassagne, M.-N., Crinquette, A., Dessoly, J., Sciani, A.-K., Benbunan, M., Chomienne, C., et al. (2007). Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 21, 158–163.

Brizzi, M.F., Tarone, G., and Defilippi, P. (2012). Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 645–651.

Chen, S., Lewallen, M., and Xie, T. (2013). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development* 140, 255–265.

Conboy, M.J., Karasov, A.O., and Rando, T.A. (2007). High incidence of non-random template strand segregation and asymmetric fate determination in dividing stem cells and their progeny. *PLoS Biol.* 5, e102.

Davison, A.C. (1997). *Bootstrap Methods and Their Application* (Cambridge: Cambridge University Press).

Ehninger, A., and Trumpp, A. (2011). The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *J. Exp. Med.* 208, 421–428.

Ellis, S.J., and Tanentzapf, G. (2010). Integrin-mediated adhesion and stem-cell-niche interactions. *Cell Tissue Res.* 339, 121–130.

Escobar, M., Nicolas, P., Sangar, F., Laurent-Chabalier, S., Clair, P., Joubert, D., Jay, P., and Legraverend, C. (2011). Intestinal epithelial stem cells do not protect their genome by asymmetric chromosome segregation. *Nat. Commun.* 2, 258.

Evano, B., and Tajbakhsh, S. (2013). Sorting DNA with asymmetry: a new player in gene regulation? *Chromosome Res.* 21, 225–242.

Falconer, E., Chavez, E.A., Henderson, A., Poon, S.S., McKinney, S., Brown, L., Huntsman, D.G., and Lansdorp, P.M. (2010). Identification of sister chromatids by DNA template strand sequences. *Nature* 463, 93–97.

Gönczy, P. (2008). Mechanisms of asymmetric cell division: flies and worms pave the way. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 355–366.

Guilak, F., Cohen, D.M., Estes, B.T., Gimble, J.M., Liedtke, W., and Chen, C.S. (2009). Control of stem cell fate by physical interactions with the extracellular matrix. *Cell Stem Cell* 5, 17–26.

Inaba, M., and Yamashita, Y.M. (2012). Asymmetric stem cell division: precision for robustness. *Cell Stem Cell* 11, 461–469.

Kajstura, J., Bai, Y., Cappetta, D., Kim, J., Arranto, C., Sanada, F., D'Amario, D., Matsuda, A., Bardelli, S., Ferreira-Martins, J., et al. (2012). Tracking chromatid segregation to identify human cardiac stem cells that regenerate extensively the infarcted myocardium. *Circ. Res.* 111, 894–906.

Karpowicz, P., Morshead, C., Kam, A., Jervis, E., Ramunas, J., Cheng, V., van der Kooy, D., and van der Kooy, D. (2005). Support for the immortal strand hypothesis: neural stem cells partition DNA asymmetrically in vitro. *J. Cell Biol.* 170, 721–732.

Kiel, M.J., He, S., Ashkenazi, R., Gentry, S.N., Teta, M., Kushner, J.A., Jackson, T.L., and Morrison, S.J. (2007). Haematopoietic stem cells do not asymmetrically segregate chromosomes or retain BrdU. *Nature* 449, 238–242.

Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., et al. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 371, 1579–1586.

Li, R., and Gundersen, G.G. (2008). Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 860–873.

Maiato, H., and Barral, Y. (2013). Unbiased about chromosome segregation: give me a mechanism and I will make you "immortal". *Chromosome Res.* 21, 189–191.

Marthiens, V., Kazanis, I., Moss, L., Long, K., and Ffrench-Constant, C. (2010). Adhesion molecules in the stem cell niche—more than just staying in shape? *J. Cell Sci.* 123, 1613–1622.

Merok, J.R., Lansita, J.A., Tunstead, J.R., and Sherley, J.L. (2002). Cosegregation of chromosomes containing immortal DNA strands in cells that cycle with asymmetric stem cell kinetics. *Cancer Res.* 62, 6791–6795.

Morin, X., and Bellaïche, Y. (2011). Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev. Cell* 21, 102–119.

Mullins, R.D. (2010). Cytoskeletal mechanisms for breaking cellular symmetry. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003392.

Pine, S.R., Ryan, B.M., Varticovski, L., Robles, A.I., and Harris, C.C. (2010). Microenvironmental modulation of asymmetric cell division in human lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 2195–2200.

- Potten, C.S., Owen, G., and Booth, D. (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J. Cell Sci.* *115*, 2381–2388.
- Rocheteau, P., Gayraud-Morel, B., Siegl-Cachedenier, I., Blasco, M.A., and Tajbakhsh, S. (2012). A subpopulation of adult skeletal muscle stem cells retains all template DNA strands after cell division. *Cell* *148*, 112–125.
- Rozario, T., and DeSimone, D.W. (2010). The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev. Biol.* *341*, 126–140.
- Sauer, S., Burkett, S.S., Lewandoski, M., and Klar, A.J.S. (2013). A CO-FISH assay to assess sister chromatid segregation patterns in mitosis of mouse embryonic stem cells. *Chromosome Res.* *21*, 311–328.
- Shinin, V., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., and Tajbakhsh, S. (2006). Asymmetric division and cosegregation of template DNA strands in adult muscle satellite cells. *Nat. Cell Biol.* *8*, 677–687.
- Smith, G.H. (2005). Label-retaining epithelial cells in mouse mammary gland divide asymmetrically and retain their template DNA strands. *Development* *132*, 681–687.
- Sotiropoulou, P.A., Candi, A., and Blanpain, C. (2008). The majority of multipotent epidermal stem cells do not protect their genome by asymmetrical chromosome segregation. *Stem Cells* *26*, 2964–2973.
- Tajbakhsh, S., and Gonzalez, C. (2009). Biased segregation of DNA and centrosomes: moving together or drifting apart? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 804–810.
- Théry, M., Racine, V., Pépin, A., Piel, M., Chen, Y., Sibarita, J.-B., and Bornens, M. (2005). The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis. *Nat. Cell Biol.* *7*, 947–953.
- Théry, M., Jiménez-Dalmaroni, A., Racine, V., Bornens, M., and Jülicher, F. (2007). Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* *447*, 493–496.
- Tukey, J.W. (1958). Bias and confidence in not quite large samples. *Ann. Math. Stat.* *29*, 614.
- Wang, Y., Ku, C.-J., Zhang, E.R., Artyukhin, A.B., Weiner, O.D., Wu, L.F., and Altschuler, S.J. (2013). Identifying network motifs that buffer front-to-back signaling in polarized neutrophils. *Cell Rep.* *3*, 1607–1616.
- Yamashita, Y.M. (2010). Cell adhesion in regulation of asymmetric stem cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 605–610.

**Human bone-marrow mesenchymal stem cells
regulate biased DNA segregation
in response to cell adhesion asymmetry**

Delphine Freida, Severine Lecourt, Audrey Cras, Valérie Vanneaux, Gaelle Letort, Xavier Gidrol, Laurent Guyon, Jerome Larghero, and Manuel Theyry

Supplemental Information

Supplemental Figures S1, S2, S3, S4
Supplemental Experimental Procedures

Supplemental figures

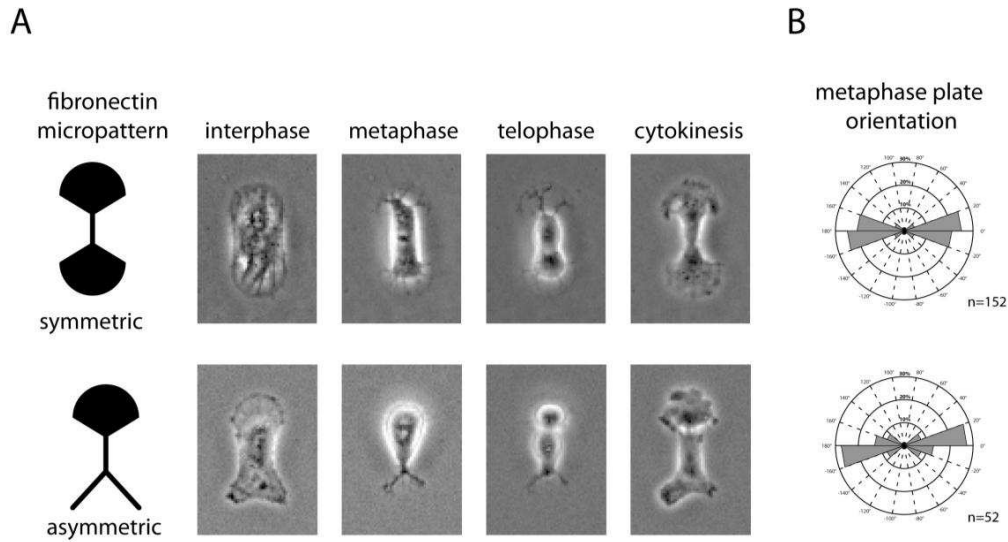


Figure S1 Mitotic spindle orientation.

Primary cultures of hMSCs were plated on symmetric (top) and asymmetric (bottom) fibronectin micropatterns (A). Images show time-lapse acquisitions in phase contrast of the main mitotic stages. (B). Metaphase plates orientations were measured manually and displayed as a rose diagram showing the proportion of metaphase plates in each angular sector in the plane of the culture dish surface. On both micropatterns, metaphase plates were orthogonal to the long cell axis. This resulted in asymmetric disposition of the two daughter cells on asymmetric micropatterns.

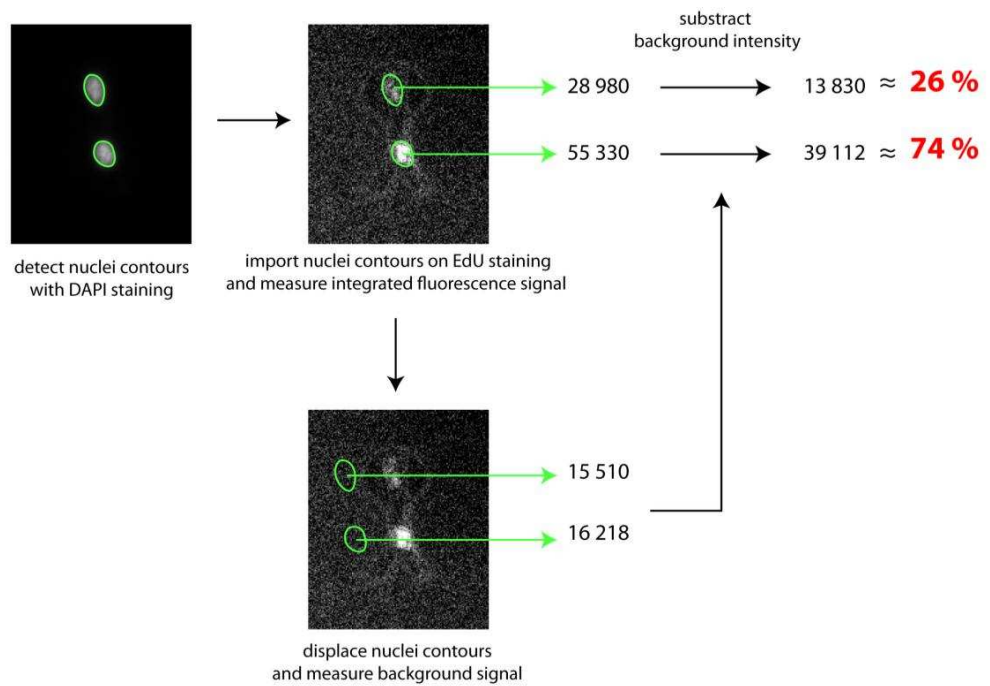


Figure S2. Measurement of EdU positive DNA proportions in daughter cells.

The DAPI staining is used to detect nuclei contours. These contours are then reported on the image corresponding to the EdU staining. The total fluorescence intensity in the two regions is measured. In order to get rid of the region size effect, the fluorescence of the same regions of interest translated over the background is subtracted from the nuclei values. The two specific intensities are then used to measure the relative proportions of fluorescence in the two daughters. The highest value is used for the calculation of the frequency distributions shown in Figure 2.

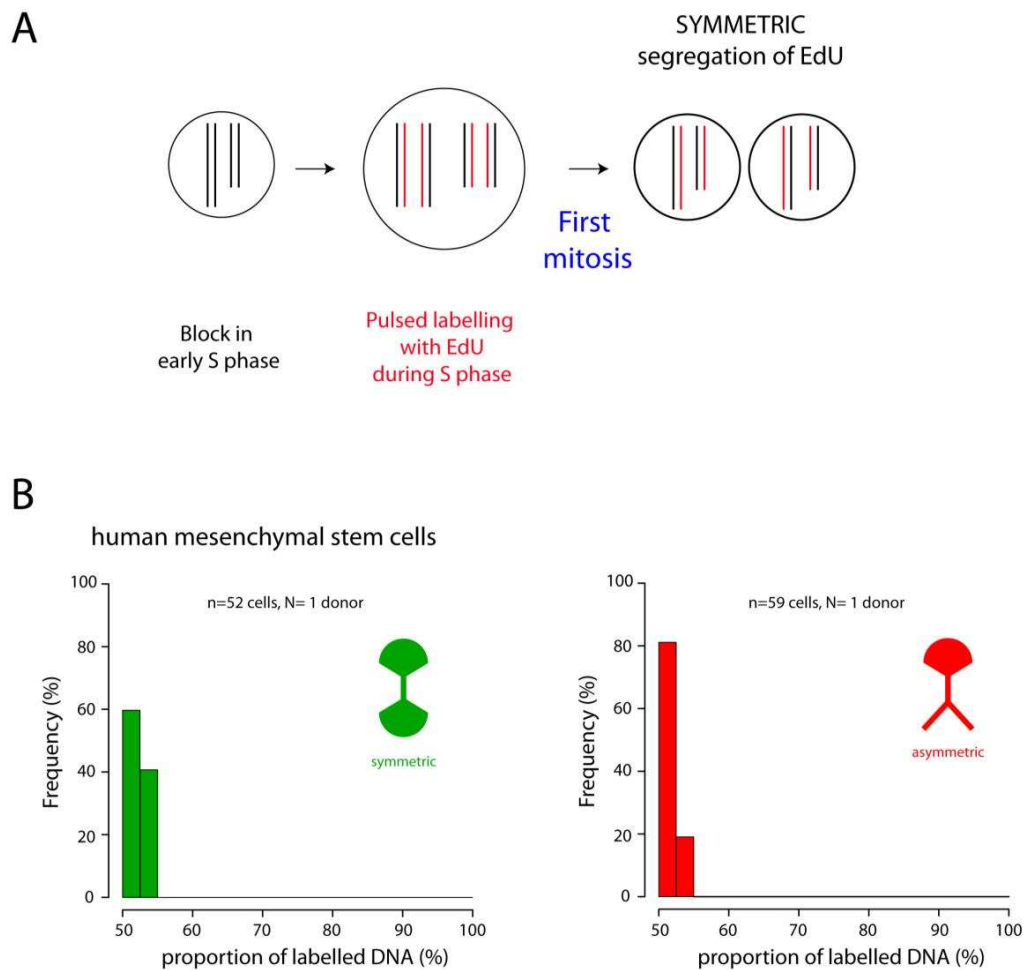


Figure S3 Quantification of EdU proportions during symmetric DNA strand segregation in hMSCs.

(A) Pulsed EdU labeling and chromatid segregation. Chromosomes are represented as two bars corresponding to the two chromatids. Red bars correspond to EdU labeled chromatids. During the pulsed labeling, all new strands are labeled and therefore the two daughter cells receive the same amount of labeled DNA.

(B) EdU staining was measured in both cells. Histograms show the frequency distribution of the EdU proportion in the more fluorescent daughter (between 50 and 100%) when plated on symmetric (left) and asymmetric (right) micropatterns. EdU proportions were not exactly 50% as theoretically expected. Proportions up to 55 % were observed suggesting that the precision of our estimation of DNA content based on EdU staining was 10%.

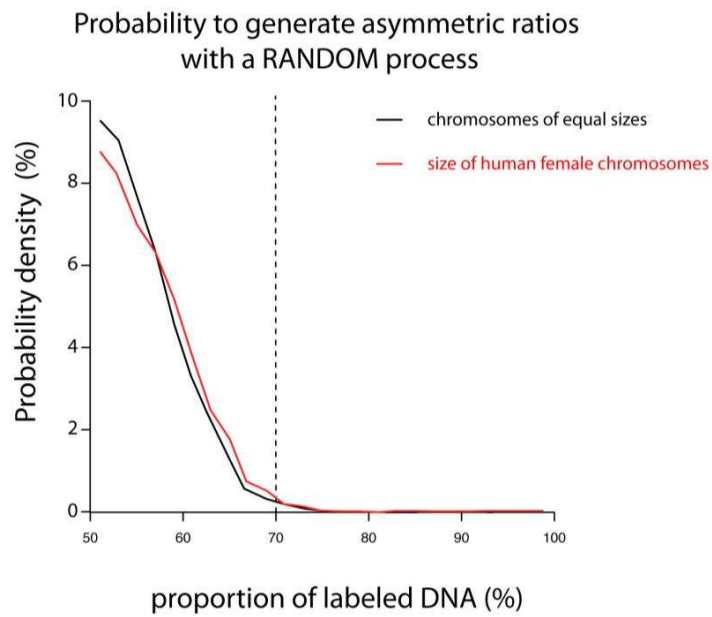


Figure S4 Numerical simulation of random DNA segregation.

Numerical simulations of the probability distribution defined by the random, unbiased, segregation of 46 pairs of chromatids of equal length (black, identical to Figure 3A) or of the actual length of human female chromatids (according to the Vertebrate Genome Annotation database) (red). The probability densities above 70% were identical.

Supplemental Experimental Procedures

Fixation and staining

Cytoo micropatterned coverslips with cultured cells were immersed in a permeabilization/fixation solution made of 0.1% Triton X-100 and 0.5 % glutaraldehyde in Cytoskeleton Buffer at pH=6.1 during 10 min. Coverslips were then washed 3 times with PBS. Glutaraldehyde was further reduced with a pinch of NaBH₄ during 10 minutes. Coverslips were washed again 3 times with PBS.

Fixed cells were saturated with a solution of 3% BSA during 45 min at room temperature. Then, there were washed 3 times with PBS. After, the fixed cells were immunostained with primary monoclonal mouse antibodies against alpha-tubulin (1:2000, Abd Serotec). The secondary antibodies Cy3 conjugated AffiniPure Goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch Laboratories) was used at a dilution of 1:500 in 3% BSA and 0,1% Tween-20. In the meantime, coverslips were incubated with 1 µg/mL FITC-conjugated-phalloidin (Sigma-Aldrich) 45 min in the dark at room temperature. Cells were incubated in 0.1 µg/mL Hoechst for 10 min in PBS before mounting in Mowiol.

Cell imaging

Time-lapse acquisitions were taken with an inverted microscope (Axiovert 200M; Carl Zeiss, Inc.). The temperature, CO₂, and humidity control were performed using a Box and Brick system (Life Imaging Services). Multiple positions were recorded using an XY motorized stage (Marzhauser). Images were acquired through a 10x magnification phase contrast objective (Plan Neofluar, Ph1, NA= 0.3, Zeiss).

Images have been acquired on a Nikon Ti Eclipse inverted microscope equipped with a Yokogawa spinning disk CSUX1-A1N and the following laser lines 405 nm 100mW Vortran, 491 nm 100mW COBOLT, 560 nm 100 mW COBOLT, 642 nm 110 mW Vortran, through a Nikon CFI Plan APO VC 60X oil immersion objective (NA : 1,4 ; WD : 0,13 mm) and a CoolSNAP HQ2 (Photometrics). The imaging system was controlled via Metamorph 7.7.10 software (Molecular Devices).

Algorithm for construction of curve-wise envelopes

The construction of curve-wise envelopes was done by a boot-strap method following the one given in Falconer et al. (Falconer et al., 2010). Let n the number of cells (independent realisations), m the number of chromosomes (46 here), α the precision of the envelope, b the number of histogram classes.

First, we created a set of N_{sim} (here $N_{sim} = 10000$) data, following the assumed law (folded binomial law of probability $p = 0.5$ and m trials, for n values). In each simulation, a vector X of n values was generated according to the binomial law $B(m = 46, p = 0.5)$. Each value of X was translated to the interval $[0, 1]$, and the maximum values between X and $1-X$ were taken (with respect to considering the cell with maximum fluorescence). Then, we extracted from this set of generated data the superior and inferior envelope. Let M be the matrix of generated data (b rows and N_{sim} columns). M_{ij} is the height of the i -th histogram class for the j -th simulations. Let M_s be the matrix of the sorted rows of M , in decreasing order. The superior envelope with $1-\alpha$ confidence is the first column c of M_s such that $\alpha/2$ of the columns of M (simulated histograms) has at least one value M_{ij} larger than M_{sic} . With this construction, $\alpha/2$ simulated histograms have at least one value outside of the superior envelope. The construction of the inferior envelope was done using a similar approach.

Supplemental References

Falconer, E., Chavez, E. a, Henderson, A., Poon, S. S. S., McKinney, S., Brown, L., ...
Lansdorp, P. M. (2010). Identification of sister chromatids by DNA template strand
sequences. *Nature*, 463(7277), 93–7. doi:10.1038/nature08644

Bibliographie

- [Achard et al.(2010)] V. Achard, J.-L. Martiel, A. Michelot, C. Guérin, A.-C. Reymann, L. Blanchoin et R. Boujemaa-Paterski. *A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility*. *Current Biology*, vol. 20, n° 5, p. 423–8, 2010.
- [Altman et al.(2004)] D. Altman, H. Sweeney et J. A. Spudich. *The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring*. *Cell*, vol. 116, p. 737–49, 2004.
- [Alvarado et al.(2013)] J. Alvarado, M. Sheinman, A. Sharma, F. C. MacKintosh et G. H. Koenderink. *Molecular motors robustly drive active gels to a critically connected state*. *Nature Physics*, vol. 9, p. 591–597, 2013.
- [Andrews et al.(2010)] S. S. Andrews, N. J. Addy, R. Brent et A. P. Arkin. *Detailed simulations of cell biology with Smoldyn 2.1*. *PLoS Computational Biology*, vol. 6, 2010.
- [Arai et al.(1999)] Y. Arai, R. Yasuda, K. Akashi, Y. Harada, H. Miyata, K. Kinoshita et H. Itoh. *Tying a molecular knot with optical tweezers*. *Nature*, vol. 399, n° 6735, p. 446–8, 1999.
- [Athale et al.(2014)] C. A. Athale, A. Dinarina, F. Nedelec et E. Karsenti. *Collective behavior of minus-ended motors in mitotic microtubule asters gliding toward DNA*. *Physical Biology*, vol. 11, n° 1, p. 16 008, 2014.
- [Azimzadeh et Marshall(2010)] J. Azimzadeh et W. F. Marshall. *Building the Centriole*. *Current Biology*, vol. 20, n° 18, p. R816–R825, 2010.
- [Bao et al.(2013)] J. Bao, D. Huck, L. Gunther, J. Sellers et T. Sakamoto. *Actin structure-dependent stepping of myosin 5a and 10 during processive movement*. *PloS One*, vol. 8, n° 9, p. 22–25, 2013.
- [Barnhart et al.(2011)] E. L. Barnhart, K. C. Lee, K. Keren, A. Mogilner et J. A. Theriot. *An adhesion-dependent switch between mechanisms that determine motile cell shape*. *PLoS Biology*, vol. 9, n° 5, 2011.
- [Barr et Gruneberg(2007)] F. A. Barr et U. Gruneberg. *Cytokinesis : Placing and Making the Final Cut*. *Cell*, vol. 131, n° 5, p. 847–860, 2007.
- [Bendix et al.(2008)] P. M. Bendix, G. H. Koenderink, D. Cuvelier, Z. Dogic, B. N. Koeleman, W. M. Briehar, C. M. Field, L. Mahadevan et D. A. Weitz. *A Quantitative Analysis of Contractility in Active Cytoskeletal Protein Networks*. *Biophysical Journal*, vol. 94, n° 8, p. 3126–3136, 2008.
- [Berro et al.(2007)] J. Berro, A. Michelot, L. Blanchoin, D. R. Kovar et J.-L. Martiel. *Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces*. *Biophysical Journal*, vol. 92, n° 7, p. 2546–58, 2007.
- [Biron et al.(2004)] D. Biron, E. Moses, I. Borukhov et S. A. Safran. *Inter-filament Attractions Narrow the Length Distribution of Actin Filaments*. *Europhysics Letters*, vol. 73, n° 3, p. 5, 2004.
- [Blanchoin et al.(2000)] L. Blanchoin, K. J. Amann, H. N. Higgs, J.-B. Marchand, D. A. Kaiser et T. D. Pollard. *Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins*. *Nature*, vol. 404, n° 6781, p. 1007–1011, 2000.

- [Blanchoin et al.(2014)] L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski, C. Sykes et J. Plastino. *Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility*. *Physiological Reviews*, vol. 94, p. 235–63, 2014.
- [Block et al.(2008)] J. Block, T. E. B. Stradal, J. Hänisch, R. Geffers, S. A. Köstler, E. Urban, J. V. Small, K. Rottner et J. Faix. *Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3*. *Journal of Microscopy*, vol. 231, n° 3, p. 506–517, 2008.
- [Bornens(2012)] M. Bornens. *The Centrosome in Cells and Organisms*. *Science*, vol. 335, n° 6067, p. 422–426, 2012.
- [Bovellan et al.(2014)] M. Bovellan, Y. Romeo, M. Biro, A. Boden, P. Chugh, A. Yonis, M. Vaghela, M. Fritzsche, D. Moulding, R. Thorogate, A. Jégou, A. J. Thrasher, G. Romet-Lemonne, P. P. Roux, E. K. Paluch et G. Charras. *Cellular control of cortical actin nucleation*. *Current Biology*, vol. 24, n° 14, p. 1628–1635, 2014.
- [Brangwynne et al.(2006)] C. P. Brangwynne, F. C. MacKintosh, S. Kumar, N. A. Geisse, J. Talbot, L. Mahadevan, K. K. Parker, D. E. Ingber et D. A. Weitz. *Microtubules can bear enhanced compressive loads in living cells because of lateral reinforcement*. *Journal of Cell Biology*, vol. 173, n° 5, p. 733–741, 2006.
- [Burakov et al.(2003)] A. Burakov, E. Nadezhdina, B. Slepchenko et V. Rodionov. *Centrosome positioning in interphase cells*. *Journal of Cell Biology*, vol. 162, n° 6, p. 963–969, 2003.
- [Burakov et Nadezhdina(2013)] A. V. Burakov et E. S. Nadezhdina. *Association of nucleus and centrosome : Magnet or velcro ?* *Cell Biology International*, vol. 37, n° 2, p. 95–104, 2013.
- [Burnette et al.(2011)] D. T. Burnette, S. Manley, P. Sengupta, R. Sougrat, M. W. Davidson, B. Kachar et J. Lippincott-Schwartz. *A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells*. *Nature Cell Biology*, vol. 13, n° 4, p. 371–81, 2011.
- [Calvert et al.(2011)] M. E. K. Calvert, G. D. Wright, F. Y. Leong, K.-H. Chiam, Y. Chen, G. Jedd et M. K. Balasubramanian. *Myosin concentration underlies cell size-dependent scalability of actomyosin ring constriction*. *The Journal of Cell Biology*, vol. 195, n° 5, p. 799–813, 2011.
- [Carter(1967)] S. Carter. *Haptotactic islands : A methode of confining single cells to study individual cell reactions and clone formation*. *Experimental Cell Research*, vol. 48, p. 189–193, 1967.
- [Carvalho et al.(2009)] A. Carvalho, A. Desai et K. Oegema. *Structural memory in the contractile ring makes the duration of cytokinesis independent of cell size*. *Cell*, vol. 137, n° 5, p. 926–37, 2009.
- [Chambers(1939)] E. L. Chambers. *The movement of the egg nucleus in relation to the sperm aster in the echinoderm egg*. *Journal of Experimental Biology*, vol. 16, n° 4, p. 409–424, 1939.
- [Clarke et Spudich(1977)] M. Clarke et J. A. Spudich. *Nonmuscle contractile proteins : the role of actin and myosin in cell motility and shape determination*. *Annual Review of Biochemistry*, vol. 46, p. 797–822, 1977.
- [Colombelli et al.(2009)] J. Colombelli, A. Besser, H. Kress, E. G. Reynaud, P. Girard, E. Caussinus, U. Haselmann, J. V. Small, U. S. Schwarz et E. H. K. Stelzer. *Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization*. *Journal of Cell Science*, vol. 122, n° Pt 10, p. 1665–79, 2009.

- [Courson et Rock(2010)] D. S. Courson et R. S. Rock. *Actin cross-link assembly and disassembly mechanics for alpha-Actinin and fascin*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 285, n° 34, p. 26 350–7, 2010.
- [Cowan et Hyman(2004)] C. R. Cowan et A. A. Hyman. *Centrosomes direct cell polarity independently of microtubule assembly in C. elegans embryos*. Nature, vol. 431, n° 7004, p. 92–96, 2004.
- [Cruz et al.(2001)] E. D. L. Cruz, E. M. Ostap et H. L. Sweeney. *Kinetic mechanism and regulation of myosin VI*. The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, p. 32 373–81, 2001.
- [Dasanayake et al.(2011)] N. L. Dasanayake, P. J. Michalski et A. E. Carlsson. *General Mechanism of Actomyosin Contractility*. Physical Review Letters, vol. 107, n° 11, p. 118 101, 2011.
- [Dayel et al.(2009)] M. J. Dayel, O. Akin, M. Landeryou, V. Risca, A. Mogilner et R. D. Mullins. *In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility*. PLoS Biology, vol. 7, n° 9, 2009.
- [De La Cruz et al.(2015)] E. M. De La Cruz, J.-L. Martiel et L. Blanchoin. *Mechanical Heterogeneity Favors Fragmentation of Strained Actin Filaments*. Biophysical Journal, vol. 108, n° 9, p. 2270–2281, 2015.
- [Ditlev et al.(2013)] J. A. Ditlev, B. J. Mayer et L. M. Loew. *There is More Than One Way to Model an Elephant. Experiment-Driven Modeling of the Actin Cytoskeleton*. Biophysical Journal, vol. 104, n° 3, p. 520–532, 2013.
- [Dogterom(1997)] M. Dogterom. *Measurement of the Force-Velocity Relation for Growing Microtubules*. Science, vol. 278, n° 5339, p. 856–860, 1997.
- [Dogterom et Yurke(1998)] M. Dogterom et B. Yurke. *Microtubule Dynamics and the Positioning of Microtubule Organizing Centers*. Physical Review Letters, vol. 81, n° 2, p. 485–488, 1998.
- [Dyson(2004)] F. Dyson. *A meeting with Enrico Fermi*. Nature, vol. 427, p. 297, 2004.
- [Engler et al.(2006)] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney et D. E. Discher. *Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification*. Cell, p. 677–689, 2006.
- [Ennomani et al.(2015)] H. Ennomani, G. Letort, C. Guérin, F. Nédélec, E. De La Cruz, M. Théry et L. Blanchoin. *Architecture and connectivity govern actin network contractility*, 2015. Soumis à Current Biology.
- [Faivre-Moskalenko et Dogterom(2002)] C. Faivre-Moskalenko et M. Dogterom. *Dynamics of microtubule asters in microfabricated chambers : the role of catastrophes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, n° 26, p. 16 788–16 793, 2002.
- [Falconer et al.(2010)] E. Falconer, E. a. Chavez, A. Henderson, S. S. S. Poon, S. McKinney, L. Brown, D. G. Huntsman et P. M. Lansdorp. *Identification of sister chromatids by DNA template strand sequences*. Nature, vol. 463, n° 7277, p. 93–7, 2010.
- [Fallqvist et al.(2014)] B. Fallqvist, A. Kulachenko et M. Kroon. *Modelling of cross-linked actin networks – Influence of geometrical parameters and cross-link compliance*. Journal of Theoretical Biology, vol. 350, p. 57–69, 2014.
- [Fazli et Golestanian(2007)] H. Fazli et R. Golestanian. *Aggregation kinetics of stiff polyelectrolytes in the presence of multivalent salt*. Physical Review E, vol. 76, n° 4, p. 041 801, 2007.

- [Foethke et al.(2009)] D. Foethke, T. Makushok, D. Brunner et F. Nédélec. *Force- and length-dependent catastrophe activities explain interphase microtubule organization in fission yeast*. *Molecular Systems Biology*, vol. 5, n° 1, 2009.
- [Footer et al.(2007)] M. J. Footer, J. W. J. Kerssemakers, J. A. Theriot et M. Dogterom. *Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, n° 7, p. 2181–6, 2007.
- [Freida et al.(2013)] D. Freida, S. Lecourt, A. Cras, V. Vanneaux, G. Letort, X. Gidrol, L. Guyon, J. Larghero et M. Thery. *Human bone marrow mesenchymal stem cells regulate biased DNA segregation in response to cell adhesion asymmetry*. *Cell Reports*, vol. 5, p. 601–610, 2013.
- [Friedrich et al.(2012)] B. M. Friedrich, E. Fischer-Friedrich, N. S. Gov et S. A. Safran. *Sarcomeric pattern formation by actin cluster coalescence*. *PLoS Computational Biology*, vol. 8, n° 6, p. e1002544, 2012.
- [Galland et al.(2013)] R. Galland, P. Leduc, C. Guérin, D. Peyrade, L. Blanchoin et M. Théry. *Fabrication of three-dimensional electrical connections by means of directed actin self-organization*. *Nature Materials*, vol. 12, n° 5, p. 416–21, 2013.
- [Geiger et al.(1982)] B. Geiger, D. Rosen et G. Berke. *Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells*. *Journal of Cell Biology*, vol. 95, n° 5, p. 135–143, 1982.
- [Gibeaux et al.(2013)] R. Gibeaux, A. Z. Politi, F. Nédélec, C. Antony et M. Knop. *Spindle pole body-anchored Kar3 drives the nucleus along microtubules from another nucleus in preparation for nuclear fusion during yeast karyogamy*. *Genes & Development*, vol. 27, n° 3, p. 335–49, 2013.
- [Girard et al.(2004)] K. D. Girard, C. Chaney, M. Delannoy, S. C. Kuo et D. N. Robinson. *Dynacortin contributes to cortical viscoelasticity and helps define the shape changes of cytokinesis*. *The EMBO Journal*, vol. 23, n° 7, p. 1536–1546, 2004.
- [Gittes et al.(1993)] F. Gittes, B. Mickey, J. Nettleton et J. Howard. *Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape*. *The Journal of Cell Biology*, vol. 120, n° 4, p. 923–34, 1993.
- [Goley et Welch(2006)] E. D. Goley et M. D. Welch. *The ARP2/3 complex : an actin nucleator comes of age*. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 7, n° 10, p. 713–26, 2006.
- [Gotlieb et al.(1981)] A. I. Gotlieb, L. M. May, L. Subrahmanyam et V. I. Kalnins. *Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells*. *Journal of Cell Biology*, vol. 91, p. 589–594, 1981.
- [Grill et Hyman(2005)] S. W. Grill et A. A. Hyman. *Spindle Positioning by Cortical Pulling Forces*. *Developmental Cell*, vol. 8, n° 4, p. 461–465, 2005.
- [Gross(2004)] S. P. Gross. *Hither and yon : a review of bi-directional microtubule-based transport*. *Physical Biology*, vol. 1, p. R1–R11, 2004.
- [Gross et al.(2000)] S. P. Gross, M. A. Welte, S. M. Block et E. F. Wieschaus. *Dynein-mediated Cargo Transport In Vivo : A Switch Controls Travel Distance*. *The Journal of Cell Biology*, vol. 148, n° 5, p. 945–955, 2000.
- [Hale et al.(2011)] C. M. Hale, W.-C. Chen, S. B. Khatau, B. R. Daniels, J. S. H. Lee et D. Wirtz. *SMRT analysis of MTOC and nuclear positioning reveals the role of EB1 and LIC1 in single-cell polarization*. *Journal of Cell Science*, vol. 124, p. 4267–4285, 2011.

- [Hamaguchi et Hiramoto(1986)] M. S. Hamaguchi et Y. Hiramoto. *Analysis of the role of astral rays in pronuclear migration in sand dollar eggs by the colcemid-UV method*. Development Growth Differentiation, vol. 28, p. 143, 1986.
- [Harris(1973)] A. Harris. *Behavior of cultured cells on substrata of variable adhesiveness*. Experimental cell research, vol. 77, p. 285–297, 1973.
- [Howard(2006)] J. Howard. *Elastic and damping forces generated by confined arrays of dynamic microtubules*. Physical Biology, vol. 3, n° 1, p. 54–66, 2006.
- [Huxley(1969)] H. E. Huxley. *The Mechanism of Muscular Contraction*. Science, vol. 164, p. 1356–1366, 1969.
- [Inoué et Salmon(1995)] S. Inoué et E. D. Salmon. *Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements*. Molecular Biology of the Cell, vol. 6, p. 1619–1640, 1995.
- [Isambert et al.(1995)] H. Isambert, P. Vernier, A. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni et M. Carlier. *Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins*. Journal of Biological Chemistry, vol. 270, n° 19, p. 11 437–11 444, 1995.
- [Janson et al.(2003)] M. E. Janson, M. E. de Dood et M. Dogterom. *Dynamic instability of microtubules is regulated by force*. The Journal of Cell Biology, vol. 161, n° 6, p. 1029–34, 2003.
- [Job et al.(2003)] D. Job, O. Valiron et B. Oakley. *Microtubule nucleation*. Current Opinion in Cell Biology, vol. 15, n° 1, p. 111–117, 2003.
- [Kadir et al.(2011)] S. Kadir, J. W. Astin, L. Tahtamouni, P. Martin et C. D. Nobes. *Microtubule remodelling is required for the front-rear polarity switch during contact inhibition of locomotion*. Journal of Cell Science, vol. 124, p. 2642–2653, 2011.
- [Kalinina et al.(2013)] I. Kalinina, A. Nandi, P. Delivani, M. R. Chacón, A. H. Klemm, D. Ramunno-Johnson, A. Krull, B. Lindner, N. Pavin et I. M. Tolić-Nørrelykke. *Pivoting of microtubules around the spindle pole accelerates kinetochore capture*. Nature cell biology, vol. 15, p. 82–7, 2013.
- [Kawska et al.(2012)] A. Kawska, K. Carvalho, J. Manzi, R. Boujemaa-Paterski, L. Blanchoin, J.-L. Martiel et C. Sykes. *How actin network dynamics control the onset of actin-based motility*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 109, n° 36, p. 14 440–14 445, 2012.
- [Kim et Maly(2009)] M. Kim et I. V. Maly. *Deterministic mechanical model of T-killer cell polarization reproduces the wandering of aim between simultaneously engaged targets*. PLoS Computational Biology, vol. 5, n° 1, 2009.
- [Kim(2014)] T. Kim. *Determinants of contractile forces generated in disorganized actomyosin bundles*. Biomechanics and Modeling in Mechanobiology, 2014.
- [Kim et al.(2011)] T. Kim, W. Hwang et R. D. Kamm. *Dynamic role of cross-linking proteins in actin rheology*. Biophysical Journal, vol. 101, n° 7, p. 1597–603, 2011.
- [Kimura et Onami(2010)] A. Kimura et S. Onami. *Modeling Microtubule-Mediated Forces and Centrosome Positioning in Caenorhabditis elegans Embryos*. Methods in Cell Biology, vol. 97, n° C, p. 437–453, 2010.
- [Kirschner et Mitchison(1986)] M. Kirschner et T. Mitchison. *Beyond self-assembly : from microtubules to morphogenesis*. Cell, vol. 45, p. 329–342, 1986.
- [Kirschner et al.(1975)] M. W. Kirschner, L. S. Honig et R. C. Williams. *Quantitative electron microscopy of microtubule assembly in vitro*. Journal of Molecular Biology, vol. 99, n° 2, p. 263–276, 1975.

- [Kiyomitsu et Cheeseman(2012)] T. Kiyomitsu et I. M. Cheeseman. *Chromosome- and spindle-pole-derived signals generate an intrinsic code for spindle position and orientation*. *Nature Cell Biology*, vol. 14, n° 3, p. 311–317, 2012.
- [Köhler et al.(2011)] S. Köhler, V. Schaller et A. R. Bausch. *Collective dynamics of active cytoskeletal networks*. *PLoS ONE*, vol. 6, n° 8, 2011.
- [Kole et al.(2005)] T. Kole, Y. Tseng et I. Jiang. *Intracellular mechanics of migrating fibroblasts*. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16, p. 328–338, 2005.
- [Kollman et al.(2011)] J. M. Kollman, A. Merdes, L. Mourey et D. A. Agard. *Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, p. 709–721, 2011.
- [Komarova et al.(2009)] Y. Komarova, C. O. De Groot, I. Grigoriev, S. M. Gouveia, E. L. Munteanu, J. M. Schober, S. Honnappa, R. M. Buey, C. C. Hoogenraad, M. Dogterom, G. G. Borisy, M. O. Steinmetz et A. Akhmanova. *Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth*. *Journal of Cell Biology*, vol. 184, n° 5, p. 691–706, 2009.
- [Kozlowski et al.(2007)] C. Kozlowski, M. Srayko et F. Nedelec. *Cortical Microtubule Contacts Position the Spindle in *C. elegans* Embryos*. *Cell*, vol. 129, n° 3, p. 499–510, 2007.
- [Kruse et Jülicher(2000)] K. Kruse et F. Jülicher. *Actively Contracting Bundles of Polar Filaments*. *Physical Review Letters*, vol. 85, n° 8, p. 1778–1781, 2000.
- [Kruse et Jülicher(2003)] K. Kruse et F. Jülicher. *Self-organization and mechanical properties of active filament bundles*. *Physical Review E*, vol. 67, n° 5, p. 051 913, 2003.
- [Kumar et al.(2006)] S. Kumar, I. Z. Maxwell, A. Heisterkamp, T. R. Polte, T. P. Lele, M. Salanga, E. Mazur et D. E. Ingber. *Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics*. *Biophysical Journal*, vol. 90, n° 10, p. 3762–73, 2006.
- [Laan et al.(2012a)] L. Laan, N. Pavin, J. Husson, G. Romet-Lemonne, M. van Duijn, M. P. López, R. D. Vale, F. Jülicher, S. L. Reck-Peterson et M. Dogterom. *Cortical dynein controls microtubule dynamics to generate pulling forces that position microtubule asters*. *Cell*, vol. 148, n° 3, p. 502–14, 2012a.
- [Laan et al.(2012b)] L. Laan, S. Roth et M. Dogterom. *End-on microtubule-dynein interactions and pulling-based positioning of microtubule organizing centers*. *Cell Cycle*, vol. 11, n° 20, p. 3750–7, 2012b.
- [Lazaro-Dieguez et al.(2015)] F. Lazaro-Dieguez, I. Ispolatov et A. Musch. *Cell shape impacts on the positioning of the mitotic spindle with respect to the substratum*. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 26, n° 7, p. 1286–1295, 2015.
- [Lenz et al.(2012)] M. Lenz, M. L. Gardel et A. R. Dinner. *Requirements for contractility in disordered cytoskeletal bundles*. *New Journal of Physics*, vol. 14, p. 1–20, 2012.
- [Letort et al.(2015a)] G. Letort, H. Ennomani, L. Gressin, M. Théry et L. Blanchoin. *Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton*, 2015a. In Press dans F1000 Reports.
- [Letort et al.(2015b)] G. Letort, A. Z. Politi, H. Ennomani, M. Théry, F. Nedelec et L. Blanchoin. *Geometrical and mechanical properties control actin filament organization*. *PLoS Computational Biology*, vol. 11, n° 5, 2015b.
- [Limozin et Sackmann(2002)] L. Limozin et E. Sackmann. *Polymorphism of Cross-Linked Actin Networks in Giant Vesicles*. *Physical Review Letters*, vol. 89, n° 16, p. 168 103, 2002.

- [Loughlin et al.(2010)] R. Loughlin, R. Heald et F. Nédélec. *A computational model predicts Xenopus meiotic spindle organization*. The Journal of Cell Biology, vol. 191, n° 7, p. 1239–49, 2010.
- [Mallik et al.(2004)] R. Mallik, B. C. Carter, S. A. Lex, S. J. King et S. P. Gross. *Cytoplasmic dynein functions as a gear in response to load*. Nature, vol. 427, n° 6975, p. 649–652, 2004.
- [Mandelkow et al.(1991)] E.-m. Mandelkow, E. Mandelkow et R. A. Milligan. *Microtubule dynamics and microtubule caps : a time-resolved cryo- electron microscopy study*. The Journal of Cell Biology, vol. 114, n° 5, p. 977–991, 1991.
- [Manneville et Etienne-Manneville(2006)] J.-B. Manneville et S. Etienne-Manneville. *Positioning centrosomes and spindle poles : looking at the periphery to find the centre*. Biology of the Cell, vol. 98, p. 557–565, 2006.
- [Marshall et Nonaka(2006)] W. F. Marshall et S. Nonaka. *Cilia : tuning in to the cell's antenna*. Current Biology, vol. 16, n° 15, p. R604–14, 2006.
- [Matsubayashi et al.(2011)] Y. Matsubayashi, W. Razzell et P. Martin. *'White wave' analysis of epithelial scratch wound healing reveals how cells mobilise back from the leading edge in a myosin-II-dependent fashion*. Journal of Cell Science, vol. 124, p. 1017–1021, 2011.
- [Mayer et al.(2010)] J. Mayer, K. Khairy et J. Howard. *Drawing an elephant with four complex parameters*. American Journal of Physics, vol. 78, p. 648, 2010.
- [McCullough et al.(2008)] B. R. McCullough, L. Blanchoin, J.-L. Martiel et E. M. De La Cruz. *Cofilin Increases the Bending Flexibility of Actin Filaments : Implications for Severing and Cell Mechanics*. Journal of Molecular Biology, vol. 381, n° 3, p. 550–558, 2008.
- [Mitchison et Kirschner(1984)] T. Mitchison et M. Kirschner. *Dynamic instability of microtubule growth*. Nature, vol. 312, p. 237–242, 1984.
- [Mizuno et al.(2007)] D. Mizuno, C. Tardin, C. F. Schmidt et F. C. Mackintosh. *Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks*. Science, vol. 315, n° 5810, p. 370–3, 2007.
- [Mogilner et al.(2012)] A. Mogilner, J. Allard et R. Wollman. *Cell Polarity : Quantitative Modeling as a Tool in Cell Biology*. Science, vol. 336, n° 6078, p. 175–179, 2012.
- [Mogilner et Odde(2011)] A. Mogilner et D. Odde. *Modeling cellular processes in 3D*. Trends in Cell Biology, vol. 21, p. 692–700, 2011.
- [Mogilner et Oster(1996)] A. Mogilner et G. Oster. *Cell motility driven by actin polymerization*. Biophysical Journal, vol. 71, n° 6, p. 3030–45, 1996.
- [Mogilner et Rubinstein(2005)] A. Mogilner et B. Rubinstein. *The physics of filopodial protrusion*. Biophysical Journal, vol. 89, p. 782–795, 2005.
- [Mogilner et al.(2006)] A. Mogilner, R. Wollman et W. F. Marshall. *Quantitative Modeling in Cell Biology : What Is It Good for ?* Developmental Cell, vol. 11, p. 279–287, 2006.
- [Moraru et al.(2008)] I. I. Moraru, J. C. Schaff, B. M. Slepchenko, M. L. Blinov, F. Morgan, A. Lakshminarayana, F. Gao, Y. Li et L. M. Loew. *Virtual Cell modelling and simulation software environment*. IET Systems Biology, vol. 2, p. 352–362, 2008.
- [Murrell et al.(2015)] M. Murrell, P. W. Oakes, M. Lenz et M. L. Gardel. *Forcing cells into shape : the mechanics of actomyosin contractility*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015.

- [Nagy et al.(2013)] A. Nagy, Y. Takagi, N. Billington, S. A. Sun, D. K. T. Hong, E. Homsher, A. Wang et J. R. Sellers. *Kinetic characterization of nonmuscle myosin IIB at the single molecule level*. Journal of Biological Chemistry, vol. 288, n° 1, p. 709–722, 2013.
- [Nakazawa et Sekimoto(1996)] H. Nakazawa et K. Sekimoto. *Polarity Sorting in a Bundle of Actin Filaments by Two-Headed Myosins*. Journal of the Physical Society of Japan, vol. 65, n° 8, p. 2404–2407, 1996.
- [Nedelec et Foethke(2007)] F. Nedelec et D. Foethke. *Collective langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers*. New Journal of Physics, vol. 9, n° 11, 2007.
- [Nédélec et al.(1997)] F. J. Nédélec, T. Surrey, a. C. Maggs et S. Leibler. *Self-organization of microtubules and motors*. Nature, vol. 389, n° 6648, p. 305–8, 1997.
- [Nelson(2003)] W. J. Nelson. *Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity*. Nature, vol. 422, n° 6933, p. 766–774, 2003.
- [Nédélec et Surrey(2001)] F. Nédélec et T. Surrey. *Dynamics of microtubule aster formation by motor complexes*. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series {IV} - Physics-Astrophysics, vol. 2, n° 6, p. 841 – 847, 2001.
- [Oguchi et al.(2008)] Y. Oguchi, S. V. Mikhailenko, T. Ohki, A. O. Olivares, E. M. De La Cruz et S. Ishiwata. *Load-dependent ADP binding to myosins V and VI : implications for subunit coordination and function*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 105, n° 22, p. 7714–7719, 2008.
- [Ott et al.(1993)] A. Ott, M. Magnasco, A. Simon et A. Libchaber. *Measurement of the persistence length of polymerized actin using fluorescence microscopy*. Physical Review E, vol. 48, n° 3, p. R1642–R1645, 1993.
- [Park et al.(2007)] H. Park, A. Li, L.-Q. Chen, A. Houdusse, P. R. Selvin et H. L. Sweeney. *The unique insert at the end of the myosin VI motor is the sole determinant of directionality*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 104, n° 3, p. 778–83, 2007.
- [Pavin et al.(2012)] N. Pavin, L. Laan, R. Ma, M. Dogterom et F. Jülicher. *Positioning of microtubule organizing centers by cortical pushing and pulling forces*. New Journal of Physics, vol. 14, n° 10, p. 105025, 2012.
- [Peskin et al.(1993)] C. S. Peskin, G. M. Odell et G. F. Oster. *Cellular motions and thermal fluctuations : the Brownian ratchet*. Biophysical Journal, vol. 65, p. 316–324, 1993.
- [Peterson et al.(2004)] L. J. Peterson, Z. Rajfur, A. S. Maddox, C. D. Freel, Y. Chen, M. Edlund, C. Otey et K. Burridge. *Simultaneous stretching and contraction of stress fibers in vivo*. Molecular Biology of the Cell, vol. 15, n° 7, p. 3497–3508, 2004.
- [Piehl et Cassimeris(2003)] M. Piehl et L. Cassimeris. *Organization and dynamics of growing microtubule plus ends during early mitosis*. Molecular Biology of the Cell, vol. 14, n° 3, p. 916–925, 2003.
- [Piehl et al.(2004)] M. Piehl, U. S. Tulu, P. Wadsworth et L. Cassimeris. *Centrosome maturation : measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 101, n° 6, p. 1584–8, 2004.
- [Piel et al.(2000)] M. Piel, P. Meyer, A. Khodjakov, C. L. Rieder et M. Bornens. *The Respective Contributions of the Mother and Daughter Centrioles to Centrosome Activity and Behavior in Vertebrate Cells*. The Journal of Cell Biology, vol. 149, n° 2, p. 317–330, 2000.

- [Pinot et al.(2009)] M. Pinot, F. Chesnel, J. Z. Kubiak, I. Arnal, F. J. Nedelec et Z. Gueroui. *Effects of confinement on the self-organization of microtubules and motors*. Current Biology, vol. 19, n° 11, p. 954–60, 2009.
- [Pitaval et al.(2010)] A. Pitaval, Q. Tseng, M. Bornens et M. Théry. *Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells*. Journal of Cell Biology, vol. 191, n° 2, p. 303–312, 2010.
- [Pollard et Borisy(2003)] T. Pollard et G. Borisy. *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, vol. 112, p. 453–465, 2003.
- [Pollard(1986)] T. D. Pollard. *Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments*. The Journal of Cell Biology, vol. 103, n° 6, p. 2747–2754, 1986.
- [Pollard et al.(2000)] T. D. Pollard, L. Blanchoin et R. D. Mullins. *Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells*. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure, vol. 29, p. 545–576, 2000.
- [Pollard et Cooper(2009)] T. D. Pollard et J. A. Cooper. *Actin, a central player in cell shape and movement*. Science, vol. 326, n° 5957, p. 1208–12, 2009.
- [Portran et al.(2013)] D. Portran, J. Gaillard, M. Vantard et M. They. *Quantification of MAP and molecular motor activities on geometrically controlled microtubule networks*. Cytoskeleton, vol. 70, n° 1, p. 12–23, 2013.
- [Pouthas et al.(2008)] F. Pouthas, P. Girard, V. Lecaudey, T. B. N. Ly, D. Gilmour, C. Boulin, R. Pepperkok et E. G. Reynaud. *In migrating cells, the Golgi complex and the position of the centrosome depend on geometrical constraints of the substratum*. Journal of Cell Science, vol. 121, n° 14, p. 2406–2414, 2008.
- [Reymann et al.(2012)] A.-C. Reymann, R. Boujemaa-Paterski, J.-L. Martiel, C. Guérin, W. Cao, H. F. Chin, E. M. De La Cruz, M. Théry et L. Blanchoin. *Actin network architecture can determine myosin motor activity*. Science, vol. 336, n° 6086, p. 1310–4, 2012.
- [Reymann et al.(2010)] A.-C. Reymann, J.-L. Martiel, T. Cambier, L. Blanchoin, R. Boujemaa-Paterski et M. Théry. *Nucleation geometry governs ordered actin networks structures*. Nature Materials, vol. 9, n° 10, p. 827–32, 2010.
- [Robblee et al.(2004)] J. Robblee, A. Olivares et E. D. L. Cruz. *Mechanism of nucleotide binding to actomyosin VI : Evidence for allosteric head-head communication*. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, n° 37, p. 38 608–17, 2004.
- [Rock et al.(2001)] R. Rock, S. Rice, A. Wells, T. Purcell, J. Spudich et H. Sweeney. *Myosin VI is a processive motor with a large step size*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, n° 24, p. 13 655–9, 2001.
- [Rodríguez-Fraticelli et al.(2012)] A. E. Rodríguez-Fraticelli, M. Auzan, M. A. Alonso, M. Bornens et F. Martín-Belmonte. *Cell confinement controls centrosome positioning and lumen initiation during epithelial morphogenesis*. Journal of Cell Biology, vol. 198, p. 1011–1023, 2012.
- [Rogalski et Singer(1984)] A. A. Rogalski et S. J. Singer. *Associations of elements of the Golgi apparatus with microtubules*. Journal of Cell Biology, vol. 99, n° 3, p. 1092–1100, 1984.
- [Rupp et Nedelec(2012)] B. Rupp et F. Nedelec. *Patterns of molecular motors that guide and sort filaments*. Lab on a Chip, vol. 12, n° 22, p. 4903–4910, 2012.

- [Sabass et al.(2008)] B. Sabass, M. L. Gardel, C. M. Waterman et U. S. Schwarz. *High resolution traction force microscopy based on experimental and computational advances*. Biophysical Journal, vol. 94, n° 1, p. 207–220, 2008.
- [Sheinman et al.(2015)] M. Sheinman, A. Sharma, J. Alvarado, G. H. Koenderink et F. C. MacKintosh. *Anomalous Discontinuity at the Percolation Critical Point of Active Gels*. Physical Review Letters, vol. 114, 2015.
- [Skau et Waterman(2015)] C. T. Skau et C. M. Waterman. *Specification of Architecture and Function of Actin Structures by Actin Nucleation Factors*. Annual Review of Biophysics, vol. 44, n° 1, p. 285–310, 2015.
- [Sluder(2005)] G. Sluder. *Two-way traffic : centrosomes and the cell cycle*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, vol. 6, n° 9, p. 743–748, 2005.
- [Soheilypour et al.(2015)] M. Soheilypour, M. Peyro, S. J. Peter et M. R. Mofrad. *Buckling Behavior of Individual and Bundled Microtubules*. Biophysical Journal, vol. 108, n° 7, p. 1718–1726, 2015.
- [Soppina et al.(2009)] V. Soppina, A. K. Rai, A. J. Ramaiya, P. Barak et R. Mallik. *Tug-of-war between dissimilar teams of microtubule motors regulates transport and fission of endosomes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 106, n° 46, p. 19381–19386, 2009.
- [Spudich et Sivaramakrishnan(2010)] J. A. Spudich et S. Sivaramakrishnan. *Myosin VI : an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis*. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, vol. 11, p. 128–137, 2010.
- [Stewart-Ornstein et El-Samad(2012)] J. Stewart-Ornstein et H. El-Samad. *Stochastic modeling of cellular networks*. Methods in Cell Biology, vol. 110, p. 111–137, 2012.
- [Stroustrup(1997)] B. Stroustrup. *The C++ Programming Language - Third Edition*. Addison Wesley, 1997.
- [Surrey et al.(2001)] T. Surrey, F. Nedelec, S. Leibler et E. Karsenti. *Physical properties determining self-organization of motors and microtubules*. Science, vol. 292, n° 5519, p. 1167–71, 2001.
- [Svitkina et al.(2003)] T. M. Svitkina, E. A. Bulanova, O. Y. Chaga, D. M. Vignjevic, S.-i. Kojima, J. M. Vasiliev et G. G. Borisy. *Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network*. The Journal of cell biology, vol. 160, n° 3, p. 409–21, 2003.
- [Svitkina et al.(1997)] T. M. Svitkina, A. B. Verkhovsky, K. M. Mcquade et G. G. Borisy. *Analysis of the Actin–Myosin II System in Fish Epidermal Keratocytes : Mechanism of Cell Body Translocation*. The Journal of Cell Biology, vol. 139, n° 2, p. 397–415, 1997.
- [Sweeney et Houdusse(2010)] H. L. Sweeney et A. Houdusse. *Myosin VI Rewrites the Rules for Myosin Motors*. Cell, vol. 141, p. 573–582, 2010.
- [Takiguchi(1991)] K. Takiguchi. *Heavy meromyosin induces sliding movements between antiparallel actin filaments*. Journal of Biochemistry, vol. 109, n° 4, p. 520–527, 1991.
- [Tanaka et al.(2005)] K. Tanaka, N. Mukae, H. Dewar, M. van Breugel, E. K. James, A. R. Prescott, C. Antony et T. U. Tanaka. *Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules*. Nature, vol. 434, p. 987–994, 2005.
- [Tang et Marshall(2012)] N. Tang et W. F. Marshall. *Centrosome positioning in vertebrate development*. Journal of Cell Science, vol. 125, p. 4951–61, 2012.

- [Théry(2010)] M. Théry. *Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions*. Journal of Cell Science, vol. 123, n° Pt 24, p. 4201–13, 2010.
- [Théry et al.(2006)] M. Théry, V. Racine, M. Piel, A. Pépin, A. Dimitrov, Y. Chen, J.-B. Sibarita et M. Bornens. *Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, p. 19 771–19 776, 2006.
- [Thoresen et al.(2011)] T. Thoresen, M. Lenz et M. L. Gardel. *Reconstitution of contractile actomyosin bundles*. Biophysical Journal, vol. 100, n° 11, p. 2698–705, 2011.
- [Thoresen et al.(2013)] T. Thoresen, M. Lenz et M. L. Gardel. *Thick filament length and isoform composition determine self-organized contractile units in actomyosin bundles*. Biophysical Journal, vol. 104, n° 3, p. 655–65, 2013.
- [Tillement et al.(2009)] V. Tillement, M.-H. Remy, B. Raynaud-Messina, L. Mazzolini, L. Haren et A. Merdes. *Spindle assembly defects leading to the formation of a monopolar mitotic apparatus*. Biology of the Cell, vol. 101, n° 1, p. 1–11, 2009.
- [Toba et al.(2006)] S. Toba, T. M. Watanabe, L. Yamaguchi-Okimoto, Y. Y. Toyoshima et H. Higuchi. *Overlapping hand-over-hand mechanism of single molecular motility of cytoplasmic dynein*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 103, n° 15, p. 5741–5, 2006.
- [Tojkander et al.(2012)] S. Tojkander, G. Gateva et P. Lappalainen. *Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles*. Journal of Cell Science, vol. 125, n° Pt 8, p. 1855–64, 2012.
- [Tran et al.(2001)] P. T. Tran, L. Marsh, V. Doye, S. Inoué et F. Chang. *A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing*. Journal of Cell Biology, vol. 153, n° 2, p. 397–411, 2001.
- [Tsuda et al.(1996)] Y. Tsuda, H. Yasutake, A. Ishijima et T. Yanagida. *Torsional rigidity of single actin filaments and actin-actin bond breaking force under torsion measured directly by in vitro micromanipulation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 93, n° 23, p. 12 937–42, 1996.
- [Ueda et al.(1997)] M. Ueda, R. Gräf, H. K. MacWilliams, M. Schliwa et U. Euteneuer. *Centrosome positioning and directionality of cell movements*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, n° 18, p. 9674–9678, 1997.
- [Vavylonis et al.(2008)] D. Vavylonis, J.-Q. Wu, S. Hao, B. O’Shaughnessy et T. D. Pollard. *Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast*. Science, vol. 319, p. 97–100, 2008.
- [Verkhovskiy et al.(1999)] A. B. Verkhovskiy, T. M. Svitkina et G. G. Borisy. *Self-polarization and directional motility of cytoplasm*. Current Biology, vol. 9, n° 1, p. 11–20, 1999.
- [Vignaud et al.(2014)] T. Vignaud, H. Ennomani et M. Théry. *Polyacrylamide Hydrogel Micropatterning*. Methods in Cell Biology, vol. 120, p. 93–116, 2014.
- [Wachsstock et al.(1993)] D. H. Wachsstock, W. H. Schwartz et T. D. Pollard. *Affinity of alpha-actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels*. Biophysical Journal, vol. 65, n° 1, p. 205–14, 1993.
- [Walker et al.(1988)] R. A. Walker, E. T. O’Brien, N. K. Pryer, M. F. Soboeiro, W. A. Voter, H. P. Erickson et E. D. Salmon. *Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy : rate constants and transition frequencies*. Journal of Cell Biology, vol. 107, p. 1437–1448, 1988.

- [Wang et Carlsson(2014)] R. Wang et A. E. Carlsson. *Load sharing in the growth of bundled biopolymers*. *New Journal of Physics*, vol. 16, n° 11, p. 113047, 2014.
- [Wang et Wolynes(2012)] S. Wang et P. Wolynes. *Active contractility in actomyosin networks*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 109, p. 6446–6451, 2012.
- [Ward et al.(2014)] J. J. Ward, H. Roque, C. Antony et F. Nédélec. *Mechanical design principles of a mitotic spindle*. *eLife*, vol. 4, 2014.
- [Wen et Janmey(2011)] Q. Wen et P. A. Janmey. *Polymer physics of the cytoskeleton*. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, vol. 15, n° 5, p. 177–182, 2011.
- [Wollman et al.(2005)] R. Wollman, E. N. Cytrynbaum, J. T. Jones, T. Meyer, J. M. Scholey et A. Mogilner. *Efficient chromosome capture requires a bias in the 'search-and-capture' process during mitotic-spindle assembly*. *Current Biology*, vol. 15, p. 828–832, 2005.
- [Yu et Carlsson(2003)] X. Yu et A. E. Carlsson. *Multiscale Study of Counterion-Induced Attraction and Bundle Formation of F-Actin Using an Ising-like Mean-Field Model*. *Biophysical Journal*, vol. 85, n° 6, p. 3532–3543, 2003.
- [Yumura(2001)] S. Yumura. *Myosin II dynamics and cortical flow during contractile ring formation in Dictyostelium cells*. *Journal of Cell Biology*, vol. 154, n° 1, p. 137–145, 2001.
- [Zemel et Mogilner(2009)] A. Zemel et A. Mogilner. *Motor-induced sliding of microtubule and actin bundles*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 11, n° 24, p. 4821–33, 2009.
- [Zhu et al.(2010)] J. Zhu, A. Burakov, V. Rodionov et A. Mogilner. *Finding the cell center by a balance of dynein and myosin pulling and microtubule pushing : a computational study*. *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21, n° 24, p. 4418–4427, 2010.

Abstract

Cytoskeleton's components, actin filaments and microtubules, are assemblages of proteins in filamentous forms. They play an essential role in cellular processes (division, migration, morphogenesis. . .). Actin filaments contribution to these processes relies on the formation of specific structures, whose architectures are crucial to their physiological functions. Proteins interacting with the filaments deform those structures, allowing cellular dynamical behavior. Spatial distribution of microtubules, spanning the entire cell, will determine cellular components organisation. Being in most cases generated from one complex (centrosome), its position controls cell organisation. An in-vitro method used in my laboratory, through addition of geometrical constraints and use of purified proteins, allows to gain insight on those cytoskeleton behavior. I used numerical simulations to rationalize the experimental observations and identify the physical laws governing cytoskeleton behavior.

Résumé

Le squelette cellulaire est formé de polymères biologiques dynamiques les filaments d'actine et les microtubules. Il est essentiel aux processus cellulaires (division, migration, morphogénèse..). Pour assurer leurs fonctions biologiques, les filaments d'actine forment des structures organisées. De plus, des protéines interagissant avec les filaments permettent de contrôler la formation dynamique de ces structures. Les microtubules, recouvrant le volume cellulaire, organisent les différents organites de la cellule. La position du complexe à partir duquel ils sont formés, le centrosome, détermine l'organisation de la cellule. Une méthode in-vitro utilisée dans mon laboratoire permet d'étudier ces comportements du cytosquelette en imposant des contraintes géométriques et utilisant des protéines purifiées. J'ai utilisé des simulations numériques pour expliquer ces observations expérimentales et identifier les principes physiques qui déterminent le comportement du cytosquelette.