



HAL
open science

Désassemblage de réseaux de filaments d'actine : rôle de l'architecture et du confinement

Laurène Gressin

► **To cite this version:**

Laurène Gressin. Désassemblage de réseaux de filaments d'actine : rôle de l'architecture et du confinement. Biophysique. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAY068 . tel-01592597

HAL Id: tel-01592597

<https://theses.hal.science/tel-01592597>

Submitted on 25 Sep 2017

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 LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Physique pour les Sciences du Vivant**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Laurène GRESSIN

Thèse dirigée par **Laurent BLANCHOIN**
et co-encadrée par **Alphée MICHELOT**

préparée au sein du **CytoMorphoLab, Laboratoire de
Physiologie Cellulaire et Végétale**
dans l'**École Doctorale de Physique**

Désassemblage de réseaux de filaments d'actine : rôle de l'architecture et du confinement.

Thèse soutenue publiquement le **18 Novembre 2016**,
devant le jury composé de :

M. Franz BRUCKERT

Professeur des Universités à l'Institut National Polytechnique de
Grenoble, Président

M. Enrique DE LA CRUZ

Professeur à l'Université Yale (New Heaven, USA), Rapporteur

M. Guillaume ROMET-LEMONNE

Chargé de Recherches au CNRS (Paris), Rapporteur

M. Zohar GUEROUI

Chargé de Recherches au CNRS (Paris), Membre

M. Alphée MICHELOT

Chargé de Recherches au CNRS (Marseille), Membre

M. Laurent BLANCHOIN

Directeur de Recherches au CNRS (Grenoble), Membre



Table des matières

Liste des Abréviations	3
Remerciements.....	5
INTRODUCTION	9
Partie 1 : Description cellulaire du cytosquelette.....	11
1. Le cytosquelette.....	12
1.1. Les microtubules	14
1.2. Les filaments intermédiaires	15
1.3. Le cytosquelette d'actine	16
2. L'organisation géométrique des filaments d'actine	17
3. La dynamique des réseaux d'actine	19
Partie 2 : Les propriétés biochimiques de l'actine.....	23
1. Les propriétés du filament d'actine	23
1.1. Structure du monomère et du filament d'actine	23
1.2. Description biochimique de la réaction de polymérisation de l'actine	25
1.3. Limitations de la polymérisation de l'actine isolée.....	31
2. Les protéines régulatrices de l'actine	32
2.1. La profiline.....	32
2.2. Le complexe Arp2/3 et ses activateurs	33
2.3. Protéines de coiffe ou capping proteins.....	35
2.4. Protéine de fragmentation : ADF/Cofiline	36
2.4.1. Fixation à l'actine G.....	37
2.4.2. Fixation sur l'actine F.....	38
2.4.3. Régulation de l'activité de l'ADF/cofiline	44
2.4.4. Localisation et rôle de l'ADF/cofiline dans la cellule.....	47
3. Modèle de référence : le modèle de nucléation dendritique	49
3.1. Localisation des protéines étudiées dans le lamellipode	49
3.2. Modèle de nucléation dendritique.....	50
Partie 3 : Dispositifs expérimentaux pour l'étude du cytosquelette d'actine <i>in vitro</i>	52
1. L'approche Bottom-Up : faire simple avant de faire compliqué	52
2. Reconstitution des architectures de filaments d'actine <i>in vitro</i> : le micropatron	53
3. Reconstitution de la motilité cellulaire <i>in vitro</i>.....	55
3.1. Modèle <i>in vivo</i> : La bactérie <i>Listeria monocytogenes</i>	55
3.2. Reconstitution <i>in vitro</i> : Essais de motilité sur billes pWA	57
3.3. Génération des forces dans un réseau d'actine : concepts physiques	58
4. L'imagerie adaptée au niveau d'organisation des filaments d'actine	61
4.1. Le microscope à épifluorescence pour imager les structures organisées.....	62
4.2. Microscopie à Onde Evanescente ou Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy (TIRF) ...	63

Partie 4 : Limitations des modèles biologiques et des dispositifs expérimentaux au commencement de ma thèse.....	65
1. Le turnover <i>in vitro</i>.....	66
2. Limitations des modèles actuels du désassemblage.....	67
2.1. Efficacité du désassemblage <i>in vivo</i> non élucidée.....	67
2.2. Modèle et limitations de la dépolymérisation des filaments d'actine par l'extrémité pointue.....	68
2.3. Nouveaux cofacteurs du désassemblage	69
2.3.1. Aip1, Actin Interacting Protein 1	70
2.3.2. Les autres facteurs du désassemblage : Coronine et Srv2/CAP	72
3. Limitations du système expérimental : de la chambre à flux au micropuits.....	74
3.1. Comparaison Cellules <i>in vivo</i> / Chambre à flux.....	75
3.1.1. Quantité des protéines	75
3.1.2. Diffusion	76
3.2. Reconstitution <i>in vitro</i> des dimensions cellulaires.....	77
3.2.1. Exemples connus : les vésicules.....	77
3.2.2. Micropuits.....	78
3.2.3. Avantages et limitations des différents systèmes expérimentaux existants	79
4. Le recyclage de l'actine	80
4.1. Aspects biochimiques de la problématique du recyclage	80
4.2. Maintien de l'équilibre Actine G / Actine F.....	81
RÉSULTATS.....	85
Position du Sujet.....	87
Étude n°1 : Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly	89
Étude n°2 : Les micropuits : Etude de la dynamique de l'actine à deux échelles.....	119
Étude n°3 : Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton	135
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	149
L'Approche Bottom-Up.....	151
Désassemblage des structures de filaments d'actine	152
Les micropuits.....	163
REFERENCES	169
RÉSUMÉ	190

Liste des Abréviations

ADF	Actin depolymerizing factor
Aip1	Actin interacting protein 1
Arp	Actin related protein
ADP	Adénosine Diphosphate
ATP	Adénosine Triphosphate
CP	Capping Protein
Cor	Coronine
FI	Filaments intermédiaires
GDP	Guanosine Diphosphate
GTP	Guanosine Triphosphate
MAPs	Microtubule associated proteins, protéines qui interagissent directement ou indirectement avec les microtubules
MT	Microtubules
MTOC	Microtubules organising center, centre d'organisation des microtubules ou centrosome, situé à proximité du noyau qui nucléé les microtubules
N-WASP	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
Pi	Phosphate inorganique, relâché après l'hydrolyse de l'ATP
Pi(4,5)P2	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate
Twf	Twinfiline
VCA	Domaine Verproline-Central-Acidic appartenant aux facteurs promoteurs de nucléation tels que WASP ou Scar, et permettant l'activation du complexe Arp2/3
pWA	Domaine VCA additionné d'une région polyproline, utilisée in vitro afin d'activer le complexe Arp2/3 et d'initier la nucléation de branches en présence de profiline – actine

Remerciements

Après ces trois ans passés, après la rédaction du manuscrit, et le début de mes études de médecine, il me reste une dernière chose à faire : remercier tous les gens qui m'ont entourés et ont ajoutés leur grain de folie, de soutien, de patience, et de bonne humeur pour rendre ces 3 années inoubliables.

D'abord j'aimerais remercier mes chefs, Laurent, Alphée et Manuel. Merci Laurent et Manu de m'avoir accueillis au CytoMorphoLab, au sein de cette équipe soudée et chaleureuse. Merci Alphée pour ton encadrement et ta détermination qui nous ont permis de sortir un premier papier assez rapidement (même si tu aurais aimé qu'il sorte avant !).

Merci ensuite Laurent d'avoir pris le relais, de m'avoir aidé à prendre confiance en moi, de m'avoir poussée mais aussi soutenue dans les moments où la démotivation prenait le pas. Bien que tu aies été rude avec les étudiants, je sais que tu as toujours été de notre côté, et même si tu le caches bien, tu as le cœur sur la main. Et finalement, comme le disait fort bien Hajer, tu étais notre coach : toujours là pour nous pousser en avant, donner le meilleur de nous même et viser toujours plus haut. Je n'oublierai jamais de faire mon contrôle, et franchement tu es têtue, j'ai failli l'accepter ce post doc...

Merci aussi Manu de m'avoir confié ce 2^{ème} projet plus tourné vers la techno, c'était exactement ce dont j'avais besoin pour continuer, merci pour tes conseils avisés et surtout ta motivation débordante et communicative !

Bien sûr un grand merci à TOUTE l'équipe, je vous adore, c'est grâce à vous que j'ai passé trois années magnifiques !

D'abord merci à Audrey, ma roommate de paillasse et soutien inconditionnel, sans qui les premières années n'auraient pas été les mêmes ! Puis bien sûr, les étudiants, qui traversaient les mêmes épreuves ! Hayer, la bonne humeur du labo, toujours un mot bienveillant et apaisant. Boss (Gaëlle), ma pote geek ! Celle avec qui je pouvais partager mon penchant pour les macros. Même si, en cherchant bien, on en trouve pas mal des petits geeks au labo ! Aleks, pote de thèse, arrivées en même temps. Grands moments de rigolade, la phrase que j'ai du dire le plus souvent les derniers mois était à Aleks : "Est ce qu'elles marchent tes billes ??" avec un ton plein de désespoir ! Laura, without who the microwells would never have been created ! The funniest were the fabrication of SU8 slides, especially when we were starting 6 timers in parallel and trying not to get lost. Mithila, with whom I went in US and shared really nice burritos, margaritas and time at ASCB conference. You are always motivated, and happy to live life to the full ! Merci aussi Amandine, surtout pour le soutien sur la fin de ma thèse et pour nos discussions décontractées au coin d'un couloir. Et enfin la dernière recrue, Sarah, super sympa, toujours à fond et avec qui je suis sûre que j'aurais pu passer des années fantastiques !

A part les étudiants qui endurent les mêmes choses, il y a bien sûr les post docs et permanents, qui restent l'appuis indispensables pour traverser monts et marrées ! D'abord mes mamans du labo : Fra et Charlotte. Fra toujours à veiller sur "les petites", à donner de bons conseils pour ne pas céder à la pression ou améliorer notre présentation de lab meeting. Quels bons souvenirs que les soirées passées à bosser jusqu'à 22 h (ou pas), ayant chacune un TIRF ou un Spinning au fond du labo et ne sachant même plus ce qu'on calculait !

Charlotte, my second mum of the lab. A true force of nature, you have time for everything, your family, your job, even going out and always with smile ! And anyway, you were here for me everytime I needed, thank you !

Merci Emily, ma pote de sport intensif : water polo pendant deux mois, escalade en progression du 5b au 5c et enfin course à pied 10 min par tranche de 30s,... les grandes sportives du labo ! Sans compter ton grain de folie indispensable à la bonne humeur générale ! Merci Ila, ma pote de paillasse, d'une gentillesse incroyable et toujours prête à m'aider (notamment pour les vésicules lipidiques) avec qui je me suis serrée les coudes ces 2 dernières années. Je garderai le souvenir de nos longues discussions, de nos sorties via ferrata, apéro/restos,... Thank you Pavi, it was a really pleasure to share the same bench ! Your smile and your enthusiasm were perfect in the bad days ! Merci à Yoran pour ta disponibilité et ta bonne humeur !

Et bien entendu, je voudrais remercier tous les permanents, ou plutôt les piliers du labo : Cricri, Yérémié, Fab, plus récemment Leua et Ben, et bien entendu Danielle et Sophie !

Merci Cricri qui m'a tout appris et qui a été d'une patience incroyable. Il suffisait de te demander "je ne sais pas pourquoi ça ne marche pas" pour que tu me répondes "teste 80 nM Arp avec 120 pWA, ça devrait marcher"... et ça marchait. Je ne sais pas ce que j'aurais fait sans tes conseils avisés et ton soutien moral ! Leua, la patience incarnée, capitaine en chef de la plateforme, toujours là pour nous aider, et partager des tuyaux sur illustrator et les macros ImageJ ! Yérémié, l'esprit farceur, toujours la bonne humeur, la bonne idée et surtout le coup de main : informatique, problème au labo, coup de mou,... suffisait de demander ! Fab, au risque de me répéter, merci à toi aussi pour ton aide précieuse sur la microscopie et le traitement des données, ton soutien moral tout particulier (consistant en lancés de boules de papier), ton humour bizarre mais qui me fait maintenant beaucoup rire ! Et enfin Ben, qui a été d'une aide inestimable dans mon projet micropuits. Merci avant tout pour ta disponibilité, même à 500 km; il suffisait de t'appeler, tu étais toujours prêt à prendre 2h de ton temps pour répondre à mes questions. Merci à Danielle et Sophie pour votre disponibilité et votre gentillesse, ça change la vie d'avoir des personnes comme vous pour nous aider à gérer le côté administratif auquel souvent je ne comprends rien !

Merci à tous les parisiens : Stefan, Ana, Thomas, Jérémie, Daisuke, Dmitry et Stéphane, avec qui j'ai partagé les LM et JC, les retraites de labo, mais aussi les soirées de retraites, des conférences pour certains, des journées au ski, via ferrata,... que de bons souvenirs !

Et enfin merci à tous les anciens du CytoMorphoLab que j'ai connus plus ou moins longtemps : Théo (qui m'a initié à la microflu et apportait sa joie de vivre au labo), Magali (qui nous faisait bien rigoler avec ses pamplemousses et ses 15 pulls !), Tobias (ou Bobias, le cœur sur

la main), Tim, Andy, Jean-Louis, Rajaa et James qui ont tous participés à l'ambiance générale du labo entre entraide et bonne humeur !

Bien entendu, au delà du côté professionnel, je me souviendrai avec émotion de tous ces moments partagés avec vous tous : nos soirées, nos sorties ski ou escalade, nos danses au milieu du labo, nos apéros à la Gazetta, nos repas chez les uns ou les autres, nos citations, notre mur des lamentations, ... et bien d'autres.

À ma famille maintenant, je voudrais dire un grand merci pour son soutien et ses conseils. En particulier à ma famille proche et à mon copain de l'époque, Guillaume, à qui je racontais toute ma vie de labo et qui ont vécu en partie cette thèse avec moi (finissant par connaître le nom des gens du labo, mes habitudes, mes hauts et mes bas,...). Bien sûr merci à mes parents, Carine et Rémy, à mes sœurs, Loïse et Cyrielle, et à Stéphane pour m'avoir aidé à tenir tête et à reprendre mes études de médecine !

Merci à ma tante Aude pour le soutien moral, ça faisait du bien d'entendre régulièrement "oui une thèse ce n'est pas facile, les chefs c'est normal qu'on les déteste un moment donné, la rédaction non plus c'est pas facile,..." !

Et enfin un remerciement spécial pour ma grand-mère Manou, qui a eu le courage de relire et corriger 3 fois ma thèse dans son ensemble. Je remercie quand même tous les gens qui m'ont proposé leur aide pour la relecture à la fin de ma rédaction !

Je voudrais enfin remercier quelques professeurs de mon école d'ingénieur. D'abord M. Franz Bruckert, qui m'a fait découvrir la biologie cellulaire et moléculaire, m'avait conseillé à l'époque le CytoMorphoLab comme lieu de stage et a accepté récemment de présider mon jury de thèse. Comme j'ai pu le dire le jour de ma soutenance, j'ai vraiment l'impression que la boucle est bouclée !

Et je voudrais aussi remercier Laurent Riou, dont j'avais adoré le cours de physiologie en école d'ingénieur, qui m'a soutenu dans toutes mes décisions, que ce soit de partir en thèse ou de reprendre mes études de médecine.

En somme, cette thèse a été pour moi l'occasion de rencontrer des personnes extraordinaires, qui m'ont apporté énormément, qui m'ont faite évoluer, m'ont aidée à prendre confiance en moi, m'ont soutenue dans les moments difficiles et ont partagé les moments heureux. Comme le disait fort bien Mithila, la vie est comme un tableau qui se dessine à mesure que les personnes que l'on rencontre ajoutent leur marque de couleur et je suis vraiment enchantée des dernières nuances que chacun d'entre vous a pu ajouter. Merci pour ces trois ans et demi... je ne les oublierai pas de sitôt !

INTRODUCTION

Partie 1 : Description cellulaire du cytosquelette

Au cours de ses trois dernières années, la question « en quoi consiste ta thèse ? » m'a été posée assez régulièrement. Je répondais souvent « je travaille sur le cytosquelette d'actine, c'est un des trois polymères qui forment le squelette de la cellule. Et oui, les cellules ont un squelette... ». Une fois sur quatre, environ, le néophyte en question s'interrogeait : « l'actine ? oui je connais, et avec la myosine, ce n'est pas ce qu'on a dans nos muscles ? ».

J'en conclus que l'existence de l'actine n'est pas inconnue du grand public. Cependant, les muscles, ce n'est pas tout. L'actine, aussi bien que les microtubules et les filaments intermédiaires forment le squelette de toutes les cellules de notre corps, et plus largement de tous les eucaryotes.

Cette première partie sera dédiée à une description *in vivo* du cytosquelette et plus particulièrement du cytosquelette d'actine. Je parlerai dans un premier temps des trois polymères du cytosquelette puis me focaliserai sur les structures organisées d'actine et leur dynamique.

1. Le cytosquelette

Le cytosquelette est un assemblage de protéines cytoplasmiques qui forment une structure rigide au sein de la cellule. Cet assemblage permet d'abord à la cellule de maintenir sa forme en résistant aux contraintes extracellulaires; sa forme sera spécifique de ses besoins et donc différentes pour chaque type cellulaire (Figure 1). Le cytosquelette permet, de plus, d'organiser l'espace intracellulaire : les composants du cytoplasme sont positionnés par le cytosquelette (Toivola et al. 2005), et lorsqu'ils doivent migrer, le cytosquelette sert de support pour leur transport (Ashkin et al. 1990). Outre l'organisation intracellulaire, le cytosquelette permet de créer des liens entre la cellule et son extérieur proche (d'autres cellules ou la matrice extracellulaire) (Herrmann et al. 2007; Gardel et al. 2010).

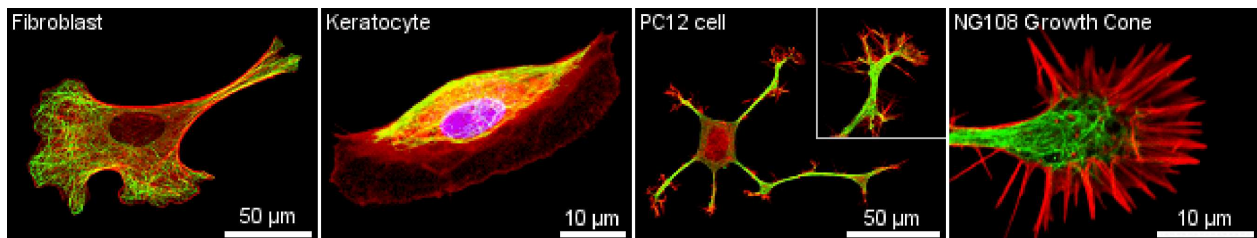


Figure 1 : Observation du cytosquelette dans différents organismes.

De gauche à droite : fibroblaste, kératocyte de poisson, cellule neuronale PC12 et cône de croissance neuronale NG108 dont l'actine est marquée en rouge et les microtubules en vert (Tiré de la thèse de Daniel Koch 2007, <http://home.uni-leipzig.de/pwm/web/?section=introduction&page=cytoskeleton>).

L'organisation spatiale du cytosquelette est très variable d'une cellule à une autre (Figure 1). Contrairement à ce que l'on pourrait penser, le cytosquelette est aussi très dynamique temporellement (Figure 2). Il a en effet la capacité de se déformer, ce qui permet à la cellule d'exercer des forces et ainsi de changer sa forme et de bouger (Ananthakrishnan & Ehrlicher 2007; Fletcher & Mullins 2010). Ainsi le cytosquelette entre en jeu dans de nombreux processus intracellulaires tels que la division cellulaire (Figure 2) et la morphogénèse (Lecuit et al. 2011).

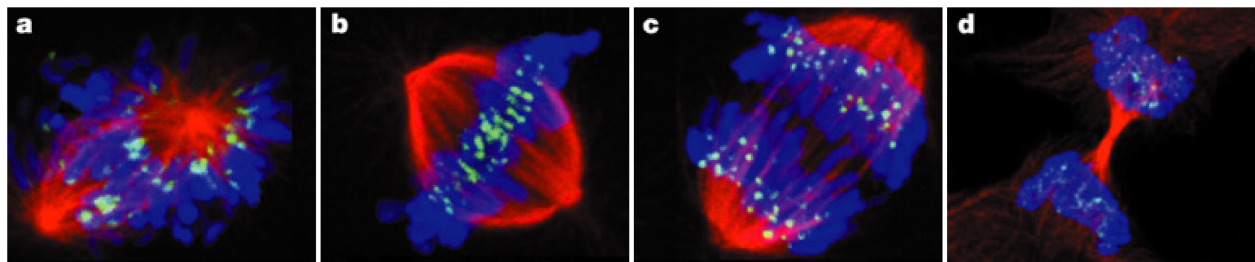


Figure 2 : Observation de la dynamique du cytosquelette.

Image de fluorescence des microtubules (rouge), chromosomes (bleus) et kinétochores (vert) d'une cellule de U2OS à différentes étapes de sa mitose : a) prométaphase, b) métaphase, c) anaphase et d) télophase (Kelling et al. 2003; Jordan & Wilson 2004)

Le cytosquelette est composé de trois filaments : les microtubules, les filaments intermédiaires (FI) et les microfilaments d'actine (Figure 3). Ces filaments sont des polymères linéaires, c'est-à-dire qu'ils sont formés de nombreuses briques de bases identiques (monomères ou dimères) associées bout à bout pour former des filaments. La dynamique du cytosquelette vient de la propriété de ces filaments à ajouter ou enlever ces briques de bases de leurs extrémités. Ces trois polymères ont des fonctions bien distinctes mais peuvent aussi interagir les uns avec les autres (Chang & Goldman 2004; Gaillard et al. 2011; Nejedla et al. 2016). Nous verrons dans un premier temps les propriétés de chacun d'entre eux, puis je me focaliserai sur les filaments d'actine, sujet d'étude de ma thèse.

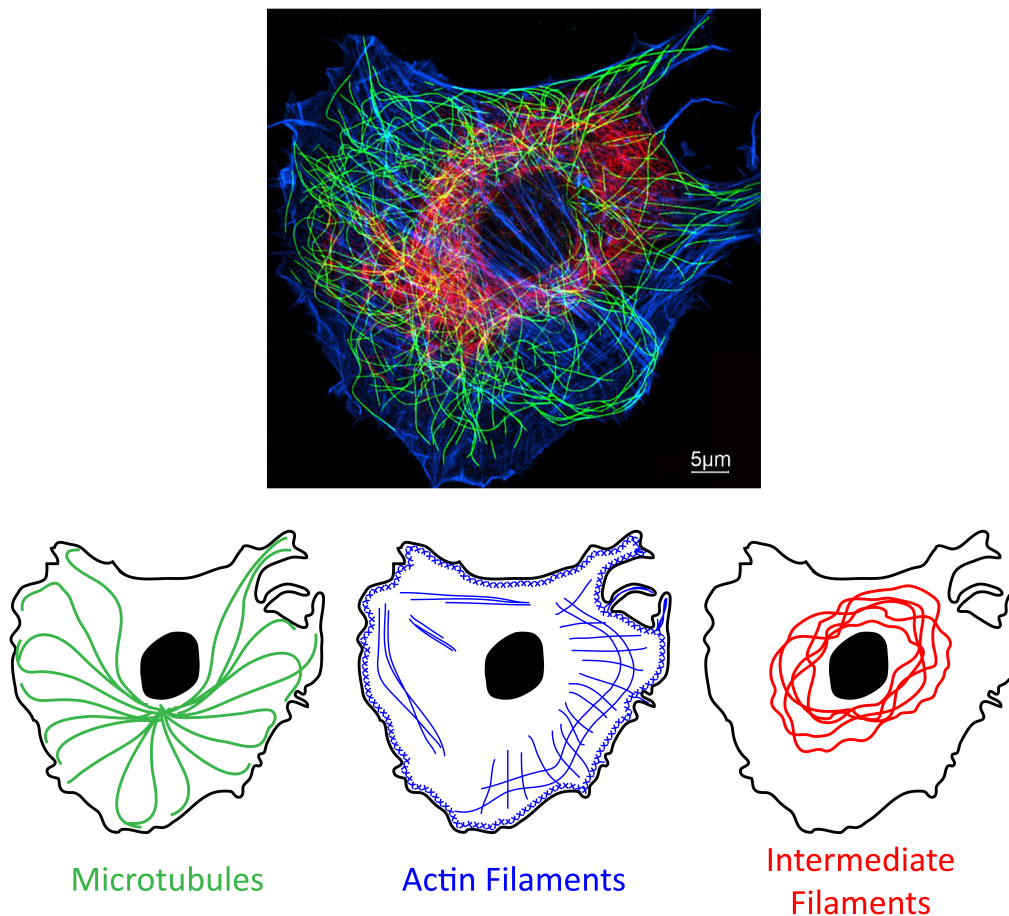


Figure 3 : Observation du cytosquelette d'une cellule de mammifère formé de trois biopolymères : les microtubules (vert), les microfilaments d'actine (bleu) et les filaments intermédiaires (rouge).

Le cytosquelette s'étend dans toute la cellule mais chaque polymère a une répartition spatiale différente. Les microfilaments d'actine se trouvent principalement sur le cortex de la cellule. Les microtubules sont majoritairement nucléés au niveau du centrosome, au centre de la cellule. Les filaments intermédiaires sont localisés dans toute la cellule, avec une plus forte densité autour de noyau. (Image réalisée par le laboratoire du Dr. Cora-Ann Schoenenberger).

1.1. Les microtubules

Présent chez tous les eucaryotes, le microtubule est, comme son nom l'indique, un "micro" tube (Figure 4) d'environ 25 nm de diamètre. La brique de base est l'hétérodimère de tubuline formé de deux polypeptides : l' α et la β tubuline (Nogales et al. 1998). La polymérisation du microtubule se fait par l'ajout de dimères le long d'un protofilament. Treize protofilaments s'agencent ensuite parallèlement pour former le tube.

Le microtubule est polarisé, c'est-à-dire que ses deux extrémités ne sont pas identiques. Bien qu'il polymérise des deux côtés, l'extrémité "plus" (+ end sur la Figure 4) est beaucoup plus dynamique que l'extrémité "moins" (- end) : l'extrémité "plus" va pouvoir polymériser ou dépolymériser très rapidement suivant l'état du nucléotide associé au dimère. En effet, le dimère de tubuline est associé à un nucléotide de type GTP, Guanosine TriPhosphate, ou GDP, Guanosine DiPhosphate. Lorsque l'extrémité + est principalement composée de dimères GTP, elle est stable et polymérise avec une constante de vitesse d'association de $4 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ (VanBuren et al. 2005). Cependant le GTP s'hydrolyse en GDP et lorsque l'équilibre est inversé et que l'extrémité + se retrouve recouverte de dimères GDP, elle dépolymérise rapidement entre 10 et 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Kinoshita et al. 2001; Walker et al. 1988) : c'est ce qu'on appelle la catastrophe (Kirschner & Mitchison 1986).

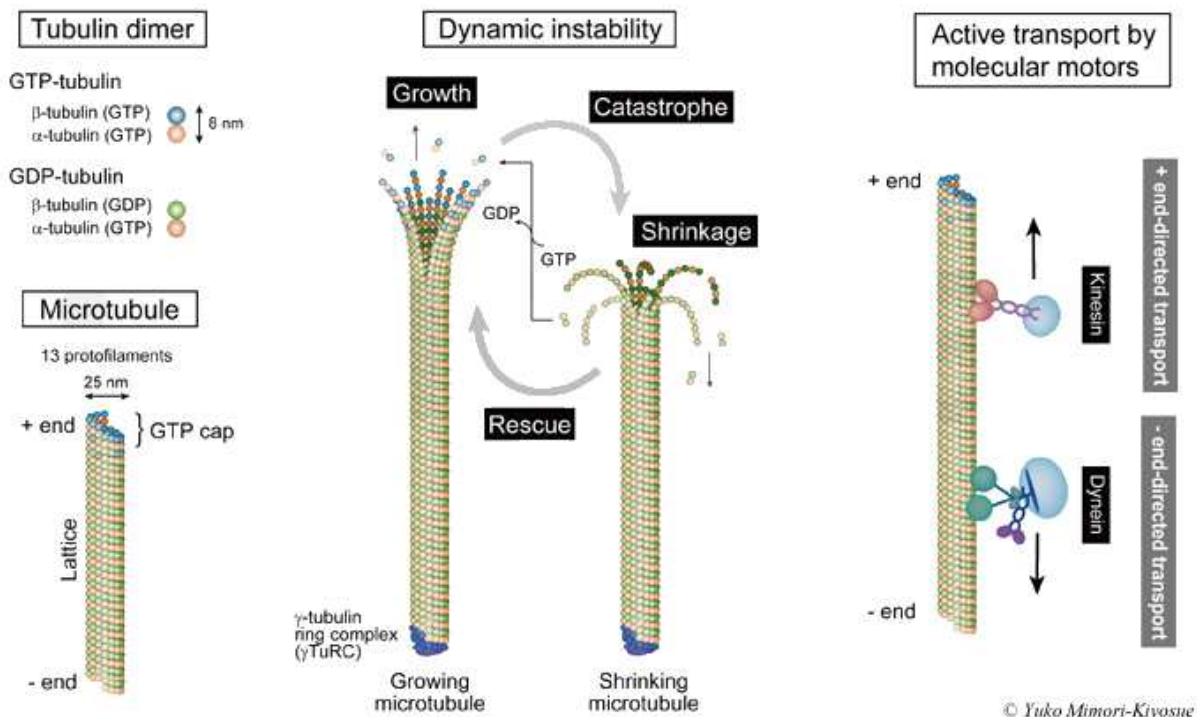


Figure 4 : Structure et dynamique des microtubules.

Le microtubule est formé de dimères associés à un nucléotide GTP ou GDP. Il est composé de 13 protofilaments agencés en un tube de 25 nm. La dynamique des microtubules est un équilibre entre une phase de polymérisation (growth) et une phase de dépolymérisation (shrinkage). Des moteurs moléculaires, tels que les kinésines ou les dynéines, assurent le transport cellulaire en se déplaçant le long

des microtubules. (Tiré et modifié à partir du site internet du Dr. Mimori-Kiyosue : http://www2.clst.riken.jp/celldy/Mimori-Kiyosue%20Lab.%20research_en.html)

Le microtubule est le plus rigide des trois composants du cytosquelette. On caractérise généralement la rigidité des polymères par leur longueur de persistance L_p , définie comme la longueur à partir de laquelle la position d'un point dans le polymère est totalement décorrélée de celle de l'origine. Les différentes rigidités sont classées de la manière suivante :

si $L_p < \text{longueur du polymère}$, le polymère est flexible

si $L_p = \text{longueur du polymère}$, le polymère est semi-flexible

si $L_p > \text{longueur du polymère}$, le polymère est rigide

Les microtubules ont une longueur de persistance de quelques millimètres (Van Mameren et al. 2009; Venier et al. 1994), ce qui est considérable comparé à la taille des cellules (de l'ordre de 10 – 100 μm) dans lesquelles ils sont confinés. Grâce à cette propriété, ils jouent le rôle de rails rigides sur lesquels les moteurs moléculaires tels que les dynéines et les kinésines se déplacent pour assurer le transport intracellulaire d'organelles et de vésicules (Hirokawa 1998). Les microtubules sont aussi utilisés dans la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire ou encore dans la motilité cellulaire grâce au flagelle et au cilium.

1.2. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont appelés ainsi car leur diamètre de 8 à 12 nm (Mücke et al. 2005) est compris entre celui des microtubules de 25 nm et celui des filaments d'actine de 7 nm. On les trouve uniquement chez les animaux métazoaires, organismes pluricellulaires organisés en tissus (Herrmann et al. 2007).

Les filaments intermédiaires sont constitués de protéines fibreuses, qui dimérisent puis tétramérisent en quinconce et forment des protofilaments qui s'autoassemblent parallèlement en filaments comme les microtubules (Figure 5). L'unité de base peut être de plus de 65 types différents et est spécifique de chaque type cellulaire (Herrmann et al. 2007; Chang & Goldman 2004), la plus commune étant la vimentine.

Les filaments intermédiaires ne sont pas aussi dynamiques que les microtubules. En revanche, ces filaments se distinguent par leur flexibilité et leur élasticité exceptionnelles. En effet, leur longueur de persistance est de l'ordre de 1 μm (Mücke et al. 2004) et leur structure fibreuse et leur assemblage en quinconce leur assurent une extensibilité pouvant aller jusqu'à 2,5 fois leur taille sous tension (Kreplak et al. 2005). Ainsi les filaments intermédiaires forment une toile extrêmement flexible et extensible au sein de la cellule, et relient les différents éléments cellulaires (noyau, organites, les deux autres cytosquelettes et la membrane). Cette toile permet à la cellule de garder son intégrité en absorbant les contraintes mécaniques qui s'exercent sur elle (Herrmann et al. 2007).

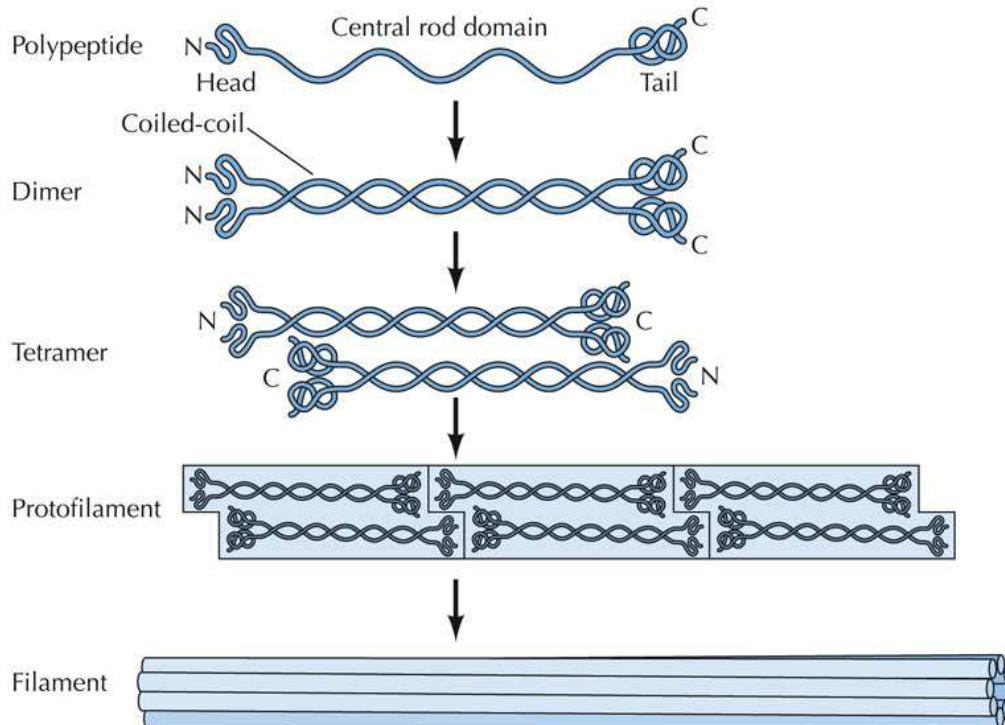


Figure 5 : Structure des filaments intermédiaires.

Les filaments intermédiaires sont formés de polypeptides fibrillaires, qui s'autoassemblent en dimères. Deux dimères se lient de manière antiparallèle pour former des tétramères, unité de base du protofilament. Les protofilaments s'organisent parallèlement les uns par rapport aux autres pour former les filaments. (tiré de Alberts et al. 2002)

1.3. Le cytosquelette d'actine

L'actine, que l'on trouve chez tous les eucaryotes, est le dernier composant du cytosquelette. Le filament d'actine est un polymère linéaire semi-flexible, de longueur de persistance de 10 μm et de 7 nm de diamètre (Blanchoin et al. 2014). Les microfilaments sont formés de deux chaînes enroulées hélicoïdalement dont le pas est de 71.5 nm, ce qui correspond à environ 28 sous-unités d'actine (Pollard & Cooper 1986). La polymérisation des filaments se fait par l'addition de monomères d'actine aux deux extrémités, bien que, de la même manière que chez les microtubules, ces deux extrémités se distinguent par leurs dynamiques différentes : l'extrémité dite « barbée » polymérise beaucoup plus vite que l'extrémité dite « pointue ».

In vivo, les filaments s'organisent en structures et permettent ainsi à la cellule d'exercer des forces. Dans les cellules musculaires, les filaments d'actine assurent la contractilité en servant de support pour les moteurs moléculaires myosines. Dans les cellules non musculaires, ces myosines sont impliquées dans le transport intracellulaire ainsi que dans la déformation locale de la membrane qui entre en jeu dans la motilité cellulaire (lamellipode et filopodes), l'endocytose (patch d'endocytose) et dans la division cellulaire (anneau contractile).

2. L'organisation géométrique des filaments d'actine

Au sein des cellules les filaments d'actine sont organisés en trois architectures principales (Figure 6). On trouve les réseaux branchés et les faisceaux ou câbles parallèles et antiparallèles. Chaque réseau présente des caractéristiques mécaniques et biochimiques adéquates pour les fonctions auxquelles elles sont dédiées.

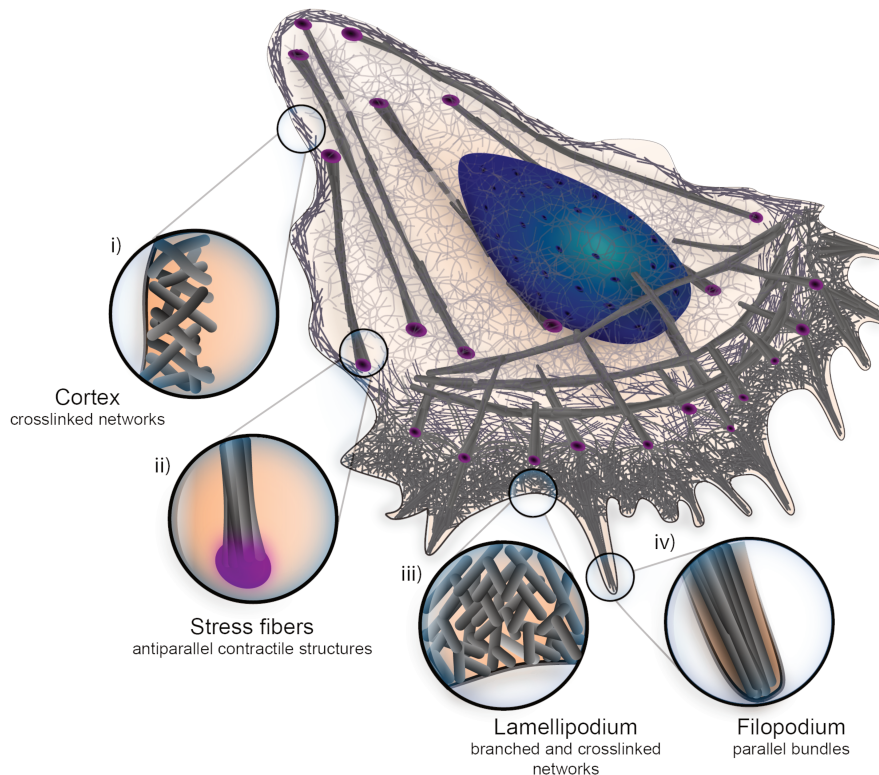


Figure 6 : Principales architectures de filaments d'actine *in vivo*.

Le schéma montre une cellule en mouvement représentant différentes architectures cellulaires : i) le cortex, ii) les fibres de stress, iii) le lamellipode et iv) les filopodes (Blanchoin et al. 2014).

Chez les vertébrés, le réseau branché est présent au sein de la cellule au niveau du golgi et du réticulum endoplasmique assurant la communication entre ces deux organites (Goley & Welch 2006; Luna et al. 2002), mais on le trouve principalement sous la membrane plasmique, dans le cortex cellulaire, fine structure d'actine située juste sous la membrane (i, Figure 6). Les réseaux branchés sont aussi présents dans le lamellipode (iii Figure 6), une protrusion qui vient déformer la membrane et participer à la motilité cellulaire (Figure 7). Dans le lamellipode, le réseau branché est très fin (quelques centaines de nanomètres d'épaisseur pour quelques microns de large) et très dense, car les filaments font en moyenne 100 nm (Svitkina & Borisy 1999). Chez la levure, qui ne possède pas de lamellipode, on rencontre le réseau branché dans les patches d'endocytose (Figure 8b).

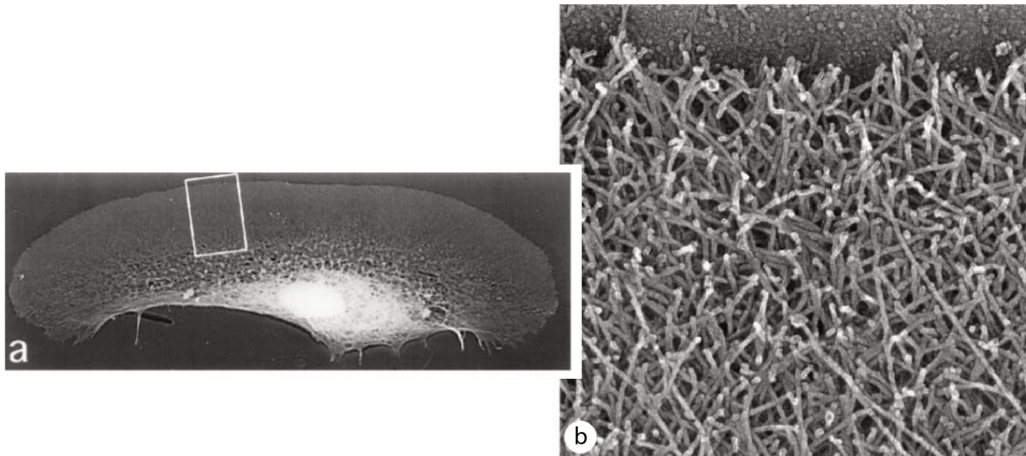


Figure 7 : Organisation des filaments d'actine dans le lamellipode de kératocyte observé par microscopie électronique.

a) Vue générale d'un kératocyte dans lequel le lamellipode représente plus de 60% de la cellule.

b) Zoom sur le haut du lamellipode, observation des structures branchées par microscopie électronique. (Svitkina et al. 1997)

Les deux autres architectures sont les câbles ou faisceaux d'actine au sein desquels les filaments sont organisés linéairement. On différencie les câbles en fonction de la polarité des filaments qui les composent. Si les filaments d'actine pointent tous dans la même direction, sont dits parallèles; s'ils pointent dans des directions opposées, les faisceaux seront antiparallèles (ou "mixtes" puisqu'ils sont composés aussi de filaments parallèles). On trouve par exemple des filaments longs et parallèles dans les filopodes de cellules de vertébrés (Figure 8A) (Svitkina et al. 2003). Ces filopodes sont les antennes de la cellule, qui lui permettent de sonder littéralement son environnement et entrent potentiellement en jeu dans la motilité cellulaire. Les fibres de stress, le deuxième type de fibres, permettent à la cellule de maintenir son intégrité grâce à leur point d'attache et leur contractilité, et sont quant à elles composées de filaments courts et antiparallèles (Letort et al. 2015).

Chez la levure, les câbles permanents sont formés de filaments parallèles (Figure 8B), tandis que l'anneau contractile, qui permet de séparer le bourgeon de la cellule mère à la fin de la mitose, est formé de filaments parallèles en début de cytokinèse, qui se réarrangent en faisceaux de polarité mixtes pour assurer la contraction par la myosine en fin de cytokinèse (Kamasaki et al. 2005; Kamasaki et al. 2007)

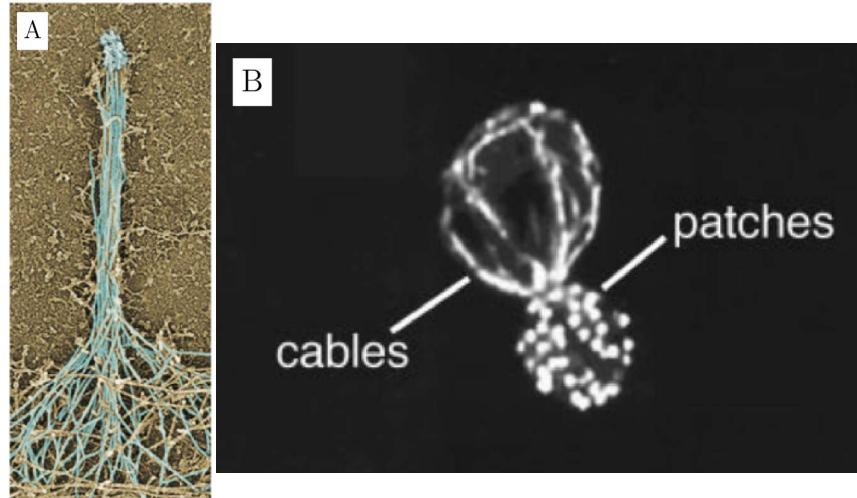


Figure 8 : Câbles parallèles de filaments d'actine et réseau branché chez les vertébrés et la levure.
 A) Observation en microscopie électronique dans un filopode de cellule de souris (Svitkina et al. 2003).
 B) Observation de câbles parallèles chez la levure bourgeonnante, ainsi que des réseaux branchés au niveau des patches d'endocytose (tiré et modifié à partir de (Moseley & Goode 2006))

3. La dynamique des réseaux d'actine

Bien que les structures décrites précédemment semblent fixes, elles sont en réalité soumises au « turnover » de l'actine et donc en perpétuel renouvellement. Le turnover est en quelque sorte le cycle de vie d'une sous-unité d'actine au sein d'une structure d'actine (Figure 9). Les monomères d'actine polymérisent en filaments qui s'agencent en structures organisées. Une fois leur fonction accomplie, ces structures sont désassemblées et recyclées ; les monomères qui les composent retournent dans le "réservoir de monomères", prêts à être à nouveau polymérisés. Les cellules ont mis en place un système dynamique tel que celui-là pour pouvoir répondre rapidement aux stimuli intra ou extracellulaire. En effet, la concentration cellulaire en monomères d'actine pouvant atteindre $300 \mu\text{M}$, soit une vitesse de polymérisation de 3000 sous-unités par seconde, les filaments d'actine peuvent avoir une longueur significative pour la cellule en moins de deux secondes (Blanchoin et al. 2014).

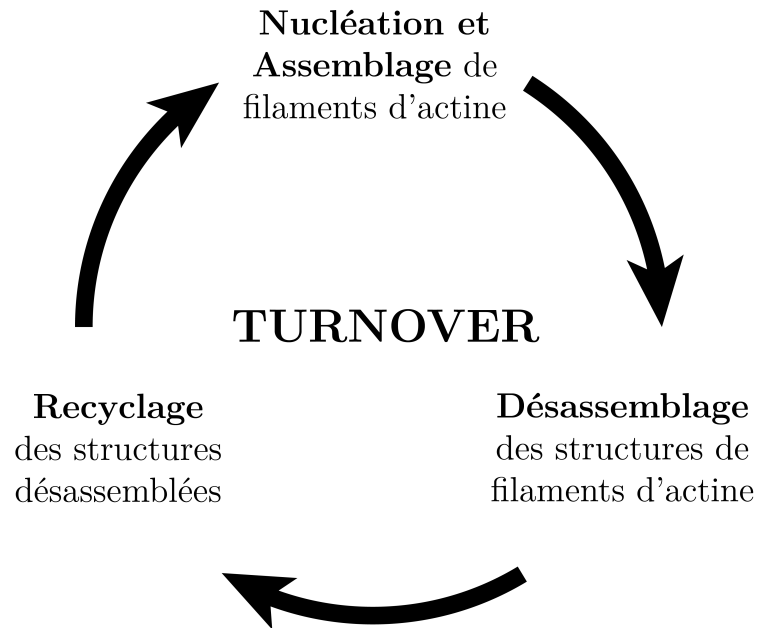


Figure 9 : Turnover des filaments d'actine *in vivo*.

Le turnover est composé de 3 étapes, d'abord la nucléation et l'assemblage de filaments d'actine, puis le désassemblage des structures et enfin le recyclage des structures désassemblées.

Le lamellipode est un modèle intéressant à étudier de par sa taille (180 nm d'épaisseur (Abraham et al. 1999)) et sa dynamique. En effet, il est l'exemple parfait pour illustrer le turnover au sein de la cellule (Wang 1985). Bien que la première expérience ait été réalisée par Theriot et Mitchison en 1991 (Theriot & Mitchison 1991), je prendrai ici l'exemple de M. Lai qui parvient à imager clairement le turnover du lamellipode grâce à la technique de photo-activation (Figure 10). Pour cela, il marque l'actine avec un fluorophore EGFP (enhanced-green fluorescent protein) photo-activable, capable de changer de couleur sous illumination laser. Il photo-convertit donc une partie des fluorophores du lamellipode en vert et observe dans un premier temps la polymérisation de filaments à l'avant du lamellipode, sous la membrane plasmique. La zone photo-activée reste fixe par rapport à la cellule, c'est donc la membrane qui bouge sous la pression du lamellipode. La polymérisation de nouveaux filaments est directement liée au mouvement du lamellipode et de la cellule, qui peut atteindre 1 $\mu\text{m/s}$ (Pollard et al. 2000). Une sous-unité d'actine reste donc en moyenne 20 à 30 secondes dans le lamellipode (Theriot & Mitchison 1991). A l'arrière du lamellipode, la disparition des fluorophores verts montre le désassemblage très rapide du lamellipode (Figure 10).

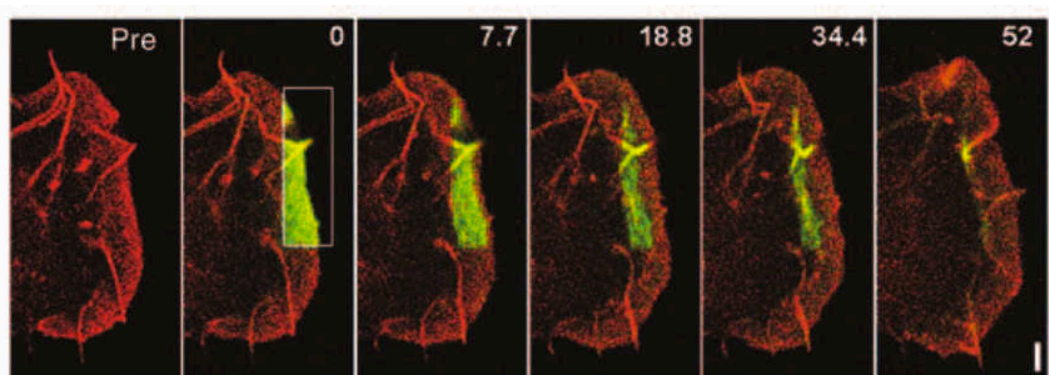


Figure 10 : Turnover du lamellipode.

La zone encadrée est photo-blanchie afin d'observer le mouvement relatif du lamellipode. La polymérisation de nouveaux filaments d'actine se produit vers l'avant de la cellule, vers la membrane plasmique, tandis qu'à l'arrière les filaments sont désassemblés, échelle 2 μm , unités : secondes (Lai et al. 2008).

Il est aussi possible d'observer la dynamique des structures linéaires parallèles telles que les filopodes (Figure 11), dont le turnover n'est pas visible spatialement mais temporellement. On remarque d'abord la croissance de filopodes (Figure 11) pendant 90 s, puis la rétraction pendant 180 s. En moyenne la vitesse d'élongation du filopode est de 2 à 30 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Breitsprecher et al. 2011). Chez la levure, les câbles d'actine qui supportent les myosines pour le transport intracellulaire sont eux aussi formés de filaments parallèles. Leur vitesse de polymérisation est de 0,29 $\mu\text{m}/\text{s}$ (Yang & Pon 2002) et subissent donc un turnover complet de 10 à 20 secondes (Moon et al. 1993).

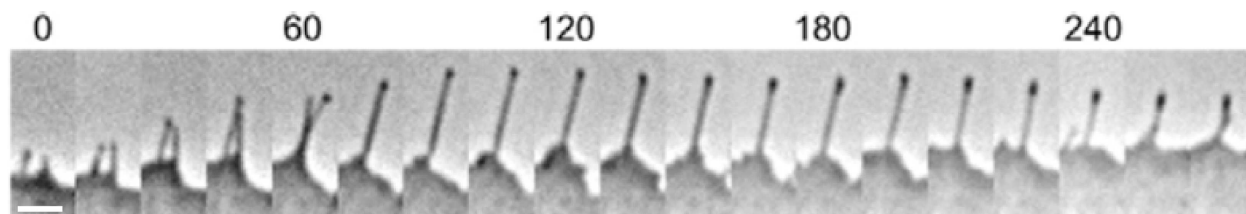


Figure 11 : Dynamique du filopode.

Dans cet exemple, le filopode de cellule de mélanome se forme à partir du lamellipode pendant environ 90 secondes puis se rétractent. Echelle temporelle : 1 image toutes les 15 s, échelle spatiale : 2 μm (Breitsprecher et al. 2011).

La dynamique des fibres de stress est moins évidente mais essentielle. Ces fibres, attachées au substrat par l'intermédiaire d'adhésions focales, sont parcourues par des moteurs moléculaires, les myosines, qui les rendent contractiles et extensibles. La vitesse de croissance d'une fibre de stress (que ce soit les fibres dorsales, formées à partir d'une adhésion focale ou des fibres transverses, formées à partir des fragments d'actine désassemblés du lamellipode) est beaucoup plus faible que le lamellipode et les filopodes, puisqu'elle atteint seulement 0,25 $\mu\text{m}/\text{min}$ (Hotulainen & Lappalainen 2006). Malgré sa dynamique plus faible, les fibres de stress permettent à la cellule de répondre mécaniquement aux forces qu'elle subit.

Les trois structures principales de filaments d'actine (les réseaux branchés, les faisceaux parallèles et les faisceaux antiparallèles) sont la base des différentes architectures du cytosquelette d'actine (lamellipode, filopode,...). Maintenant que nous avons décrit l'agencement interne de chaque structure et leur dynamique, je me concentrerai dans une deuxième partie sur les propriétés biochimiques de l'actine. Notre objectif sera de comprendre les principes moléculaires permettant aux cellules de générer et de réguler une telle diversité d'organisation et une telle dynamique.

Partie 2 : Les propriétés biochimiques de l'actine

1. Les propriétés du filament d'actine

1.1. Structure du monomère et du filament d'actine

Découvert en 1942 par Straub (Straub 1942), le monomère d'actine est l'unité de base des filaments d'actine. Cette protéine globulaire de 5 nm et de 42 kDa (Blanchoin et al. 2014) est très conservée parmi les eucaryotes, avec plus de 90% d'identité entre l'homme et la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Gunning et al. 2015). L'actine est appelée actine G lorsqu'elle est dans l'état monomérique ou globulaire et actine F lorsqu'elle est polymérisée sous forme de filaments.

Le monomère d'actine est composé de quatre sous-domaines (Figure 12).

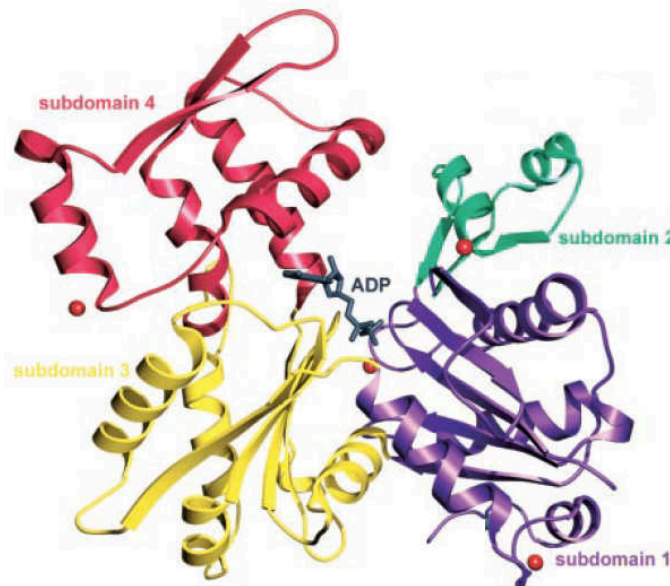
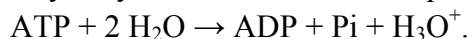


Figure 12 : Structure tridimensionnelle d'un monomère d'actine.

Sont représentés les 4 sous-domaines du monomère de différentes couleurs : 1 (violet), 2 (vert), 3 (jaune), 4 (rouge). Les sous-domaines 2 et 4 sont à l'extrémité pointue du filament, tandis que les sous-domaines 1 et 3 sont du côté barbé. Entre les 4 sous-domaines, le monomère lie un nucléotide, ici de type ADP et un ion divalent, ici un Ca^{2+} . (Modifié à partir de Otterbein et al. 2001)

Les sous-domaines 2 et 4 sont à l'extrémité pointue du filament, tandis que les sous-domaines 1 et 3 sont du côté barbé. Les sous-domaines 2 et 4 forment une poche dans laquelle viennent se loger un nucléotide et un ion divalent (Figure 12). Le nucléotide peut être une Adénosine TriPhosphate (ATP), ou une Adénosine DiPhosphate (ADP). L'ATP est une molécule de stockage de l'énergie, universelle chez les organismes vivants. Elle transfère son énergie en s'hydrolysant et en relâchant un phosphate inorganique (Pi) :



En conditions physiologiques (Mg^{2+} en excès), les monomères d'actine ont une affinité plus grande pour l'ATP que pour l'ADP (Pollard & Cooper 1986) et sont de très mauvais hydrolyseurs de l'ATP (Dominguez & Holmes 2011).

Les monomères d'actine lient aussi un ion divalent de type Ca^{2+} ou Mg^{2+} qui est déterminant pour la polymérisation. À l'état Ca^{2+} , la polymérisation des monomères est très défavorable; en revanche, à l'état Mg^{2+} , la polymérisation est possible. L'actine monomérique Mg^{2+} forme ainsi de nouveaux filaments dix fois plus vite que l'actine Ca^{2+} , et la réaction de polymérisation à l'extrémité des filaments est aussi plus rapide (Pollard & Cooper 1986). En conditions physiologiques, les concentrations d'ATP et de Mg^{2+} sont tellement importantes (la concentration du Mg^{2+} est de l'ordre du millimolaire, contre $0,1 \mu M$ de Ca^{2+} (Pollard et al. 2000; Pollard & Borisy 2003)) que les monomères sont en permanence à l'état ATP- Mg^{2+} , donc prêts à être polymérisés (Pollard & Cooper 1986).

Le monomère d'actine a d'autres sites de fixation d'ions (points rouges, Figure 12). En effet, les cations tels que Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , H^+ peuvent interagir de manière non covalente avec le filament d'actine mais jouer un rôle important sur les propriétés mécaniques et sur les interactions avec les protéines régulatrices de l'actine (Kang et al. 2013).

Les sous-domaines 1 et 3, forment eux aussi une petite enclave dont la conformation sera modulée par le type de nucléotide fixé et dans laquelle la plupart des protéines régulatrices vont venir se fixer (Dominguez & Holmes 2011). Ce changement de conformation pourrait expliquer la différence de fixation entre les protéines associées à l'actine, telles que la cofiline qui lie les monomères ADP avec une affinité quarante fois plus forte que les monomères ATP (Blanchoin & Pollard 1998).

Lors de la polymérisation, le monomère s'aplatit (Figure 13), entraînant un changement de conformation qui favorise l'activité ATPase de l'actine. Les monomères s'assemblent suivant deux brins qui s'enroulent hélicoïdalement (Figure 14). Une sous-unité est en contact avec quatre sous-unités voisines : deux longitudinalement, le long du simple brin et deux en vis-à-vis sur le deuxième brin.

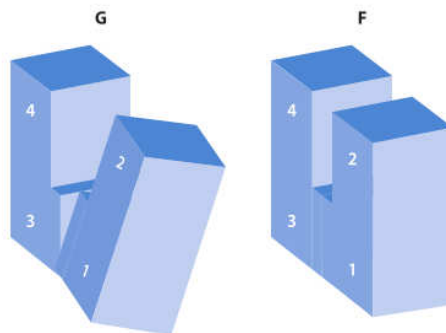


Figure 13 : Changement de conformation du monomère d'actine.

Lors de la transition de l'actine G à l'actine F une rotation des sous-domaines 1 et 2 par rapport aux sous-domaines 3 et 4 se produit (Dominguez & Holmes 2011).

Le filament est polarisé, c'est-à-dire que les deux extrémités ne sont pas semblables. En effet le monomère n'est pas symétrique (Figure 12) et s'insère dans le filament avec une orientation définie, représentée sur la Figure 14A par la poche nucléotidique visible. Les deux extrémités sont donc distinctes. Elles sont appelées "barbée" et "pointue" en référence à la fixation de la myosine II, observée en microscopie électronique (Figure 14) qui va former un angle avec le filament et créer l'impression que le filament est une flèche (Woodrum et al. 1975).

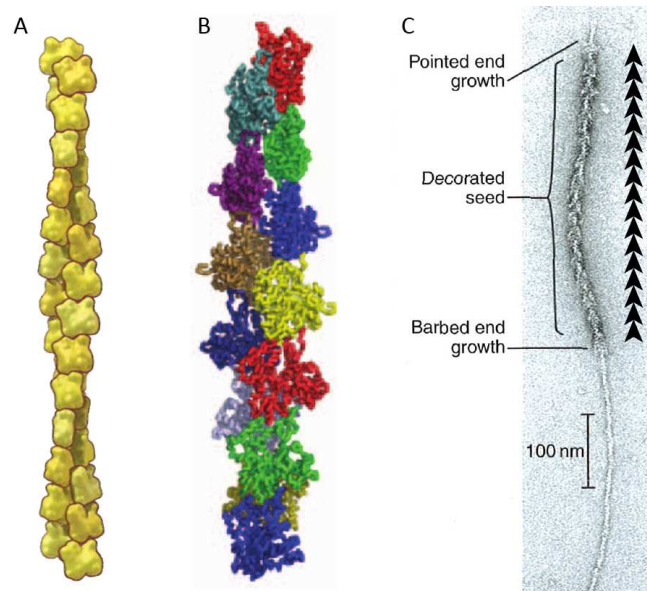


Figure 14 : Structure du filament d'actine.

A) Le filament est composé de deux brins enroulés en formation hélicoïdale. B) Structures des sous-unités d'actine au sein du filament. C) La décoration du filament d'actine par des myosines II, observé au microscope électronique montre la polarité du filament et donne leur nom aux deux extrémités : "barbée" et "pointue". A) et C) tiré et modifié de Pollard & Earnshaw 2002, B) tiré de Bugyi & Carlier 2010.

1.2. Description biochimique de la réaction de polymérisation de l'actine

In vivo, les monomères d'actine sont polymérisés en filaments d'actine en suivant les quatre étapes suivantes (Figure 15):

1. l'activation du monomère : fixation du Mg^{2+} et changement de conformation
2. la nucléation : formation de nucléus stables
3. l'élongation : l'addition de monomères aux extrémités des filaments
4. l'état d'équilibre : état dynamique dans lequel la polymérisation et le désassemblage des filaments d'actine se compensent

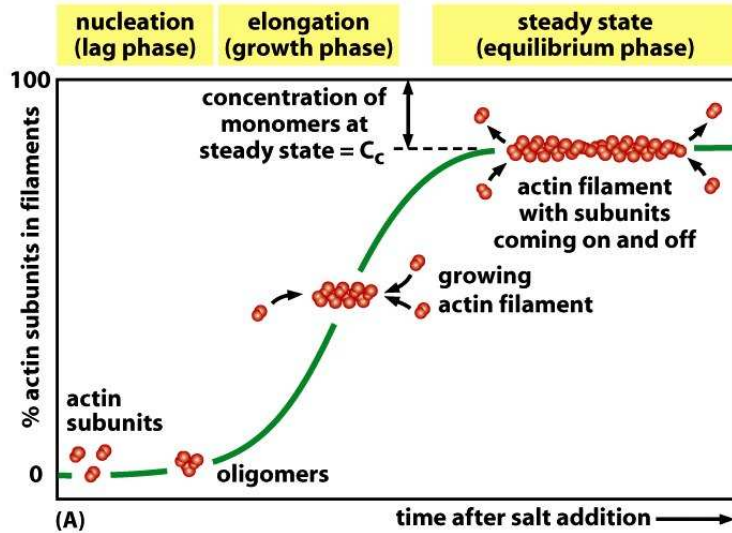


Figure 15 : Dynamique d'assemblage des filaments d'actine.

Courbe du pourcentage des monomères ayant polymérisé en fonction du temps. L'assemblage se fait en trois temps après l'activation des monomères : la nucléation, l'élongation et l'équilibre (Alberts et al. 2002).

1. L'activation du monomère a été décrite dans la partie précédente. Liée à un Ca^{2+} , l'actine G ne peut pas polymériser, c'est seulement dans des conditions physiologiques, en présence d'excès de Mg^{2+} et d'ATP que l'actine est activée et va pouvoir former des nucléus dix fois plus vite que les monomères Ca^{2+} (Pollard & Cooper 1986).
2. La deuxième étape est la nucléation (Figures 15 et 16). Elle consiste à former des oligomères stables, qui statistiquement auront plus de chances de polymériser en filament que de se dissocier. Le plus petit oligomère stable d'actine est un trimère. Les monomères d'actine passent d'abord par un état dimérique instable avant de former un trimère stable capable de s'allonger en filament. Sous forme dimérique, l'actine a plus de chances de se dissocier que de lier un troisième monomère qui va le stabiliser, d'où le délai observé Figure 15.

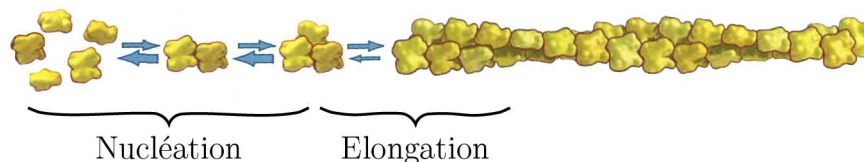


Figure 16 : Formation des filaments d'actine.

Les monomères d'actine s'assemblent en dimère et trimère avant d'être suffisamment stables pour polymériser en filaments (modifié à partir de Pollard & Earnshaw 2002).

3. Les filaments vont ensuite polymériser, en ajoutant des monomères à leurs deux extrémités (Figures 15 et 17). En milieu cellulaire, l'actine monomérique étant en solution en présence d'un large excès d'ATP, les monomères qui s'insèrent dans le filament sont usuellement associés à un ATP. On constate à partir des paramètres biochimiques indiqués Figure 17 que la polymérisation se produit majoritairement à l'extrémité barbée des filaments d'actine par l'association de monomères ATP avec une constante de vitesse d'association de $k_+ = 11,6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

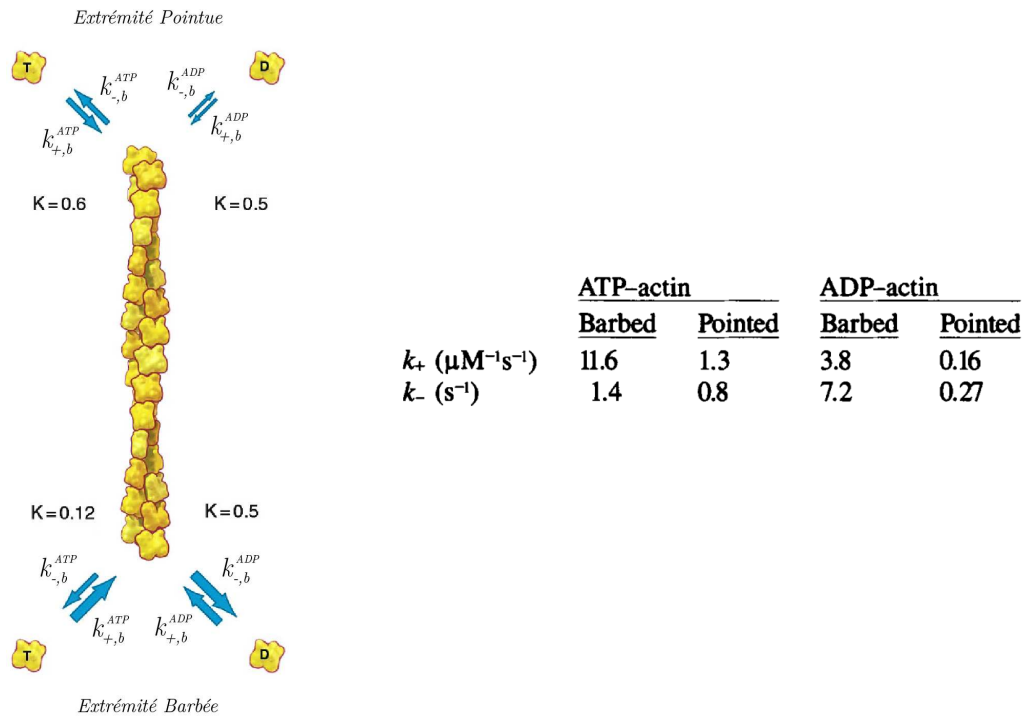


Figure 17 : Cinétique de polymérisation du filament d'actine.

La dynamique de croissance des filaments d'actine dépend de la nature du nucléotide fixé sur les monomères en solution et de l'extrémité du filament. Le schéma décrit les constantes d'association (+) et de dissociation (-) des monomères ATP (T) ou ADP (D) sur l'extrémité pointue (p) ou barbée (b). (Le schéma est modifié à partir de Pollard & Earnshaw 2002 et les valeurs sont tirées de Pollard 1986).

L'ATP est rapidement hydrolysée après l'entrée de la sous-unité d'actine dans le filament, avec un temps caractéristique de 2 s (Blanchoin & Pollard 2002) (Figure 18). Le phosphate qui en résulte n'est pas relâché immédiatement (Pollard et al. 2000). Pendant ce temps, la sous-unité est dans un état dit ADP-Pi où le phosphate inorganique n'est plus lié au nucléotide mais reste dans la poche nucléotidique.

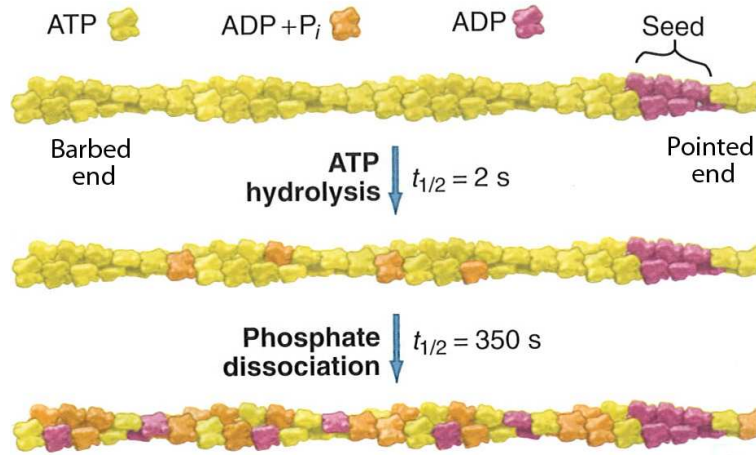


Figure 18 : Hydrolyse de l'ATP et dissociation du phosphate inorganique au sein du filament d'actine.

L'ATP est hydrolysée dès la fixation du monomère sur le filament, cependant le phosphate inorganique n'est relâché que quelques minutes plus tard (avec un temps caractéristique d'environ 6 min) (Pollard & Earnshaw 2002).

L'hydrolyse de l'ATP joue un rôle important dans la régulation des filaments, notamment leur affinité pour les protéines associées. Les sous-unités ADP-Pi se comportent pratiquement comme des sous-unités ATP. De plus, l'hydrolyse de l'ATP entraîne un changement de conformation du filament qui réduit l'affinité de la sous-unité concernée pour ses voisines et favorise ainsi le désassemblage (Alberts et al. 2002).

Le temps caractéristique de relâchement du phosphate est beaucoup plus long, de l'ordre de 6 minutes (Carlier 1987). Une fois le phosphate libéré, les sous-unités sont dites dans l'état ADP. Les sous-unités du filament ne peuvent pas échanger leur nucléotide contrairement à l'actine monomérique. Le nucléotide est donc un marqueur de l'âge du filament. Les sous-unités "jeunes" sont les sous-unités ATP et ADP-PI qui viennent d'être insérées dans le filament à l'extrémité barbée, tandis que les "vieilles" sous-unités sont les sous-unités ADP.

4. La dernière étape est un état stationnaire (Figure 15), qui correspond au moment où la concentration d'actine monomérique restante en solution devient limitante. Cette concentration en monomère, appelée concentration critique, correspond à la situation où la réaction de polymérisation aux extrémités ne compense plus la cinétique de dépolymérisation.

Calculons maintenant la valeur de cette concentration critique si chaque extrémité était indépendante. A chaque instant, la vitesse d'assemblage de l'actine à une extrémité donnée est indiquée par l'équation 1 :

$$V = k_+[monomères][extrémités] - k_-[extrémités] \quad (1)$$

V	Vitesse de polymérisation en $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$
[monomères]	Concentration en actine monomérique en μM ($\mu\text{mol/L}$)
[extrémités]	Concentration en extrémités de filament en μM
k_+	Constante de vitesse d'association en $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$
k_-	Constante de vitesse de dissociation en s^{-1}

A l'équilibre, $V = 0$, la concentration critique est alors donnée par l'expression suivante :

$$[monomères]_{critique} = \frac{k_-}{k_+} \quad (2)$$

Remarquons que la concentration critique en monomères est indépendante de la concentration initiale en monomères ou de la quantité de filaments (notée [extrémité]).

Comme nous venons de le voir, les deux extrémités sont différentes : l'extrémité barbée où se produit la polymérisation, est principalement ATP, alors que l'extrémité pointue est composée de sous-unités ayant déjà hydrolysé leur ATP en ADP. La concentration critique sera donc différente pour chaque extrémité. On note respectivement $C_{c,b}$ et $C_{c,p}$ les concentrations critiques à l'extrémité barbée et à l'extrémité pointue.

$$C_{c,b} = \frac{k_{-,b}^{ATP}}{k_{+,b}^{ATP}} = \frac{1,4}{11,6} = 0,12 \mu\text{M} \text{ à l'extrémité barbée (en excès en ATP)}$$

$$C_{c,p} = \frac{k_{-,p}^{ATP}}{k_{+,p}^{ATP}} = \frac{0,8}{1,3} = 0,62 \mu\text{M} \text{ à l'extrémité pointue (en excès en ATP)}$$

On peut voir maintenant la phase d'élongation comme un état de déséquilibre où la concentration en monomères n'avait pas encore atteint la concentration critique, et où la balance penchait vers la polymérisation :

Polymérisation :

$$V \approx k_+[monomères][extrémités] \text{ pour } [monomères] > [monomères]_{critique} \quad (3)$$

Dépolymérisation :

$$V \approx k_-[extrémité] \text{ pour } [monomères] < [monomères]_{critique} \quad (4)$$

Cependant le nombre d'extrémités barbées étant égal au nombre d'extrémités pointues, la concentration en monomères atteindra en réalité à l'équilibre une valeur intermédiaire entre les concentrations critiques aux extrémités barbée et pointue. Cette concentration à l'équilibre est calculée à partir de l'expression de la vitesse de polymérisation faisant intervenir les concentrations critiques aux deux extrémités :

$$V_{polym} = k_{+,b}^{ATP} (c - C_{c,b}) + k_{+,p}^{ATP} (c - C_{c,p}) = 0 \text{ à l'équilibre} \quad (5)$$

d'où
$$C_{c,eq} = \frac{k_{-,b}^{ATP} + k_{-,p}^{ATP}}{k_{+,b}^{ATP} + k_{+,p}^{ATP}} = \frac{1,4+0,8}{11,6+1,3} = 0,17 \mu\text{M} \quad (6)$$

L'état stationnaire est donc un équilibre dynamique. Macroscopiquement, la concentration de monomères et de filaments reste stable (0,17 μM) mais à l'échelle moléculaire la polymérisation et la dépolymérisation continuent et se compensent exactement à la vitesse suivante :

$$V_{pol/depol} = k_{+,b} (C_{c,b} - C_{c,eq}) = -k_{-,b} (C_{c,p} - C_{c,eq}) = 0,58 \text{ sous unités/s}$$

A chaque événement de dissociation, l'ADP complexé à la sous-unité d'actine est libéré et échangé contre un ATP. Cette sous-unité devient donc à nouveau disponible pour un nouveau cycle d'assemblage à l'extrémité barbée. Cette dynamique de polymérisation aux extrémités barbées, hydrolyse de l'ATP, dépolymérisation aux extrémités pointues et échange du nucléotide est appelé *treadmilling* de l'actine (Figure 19).

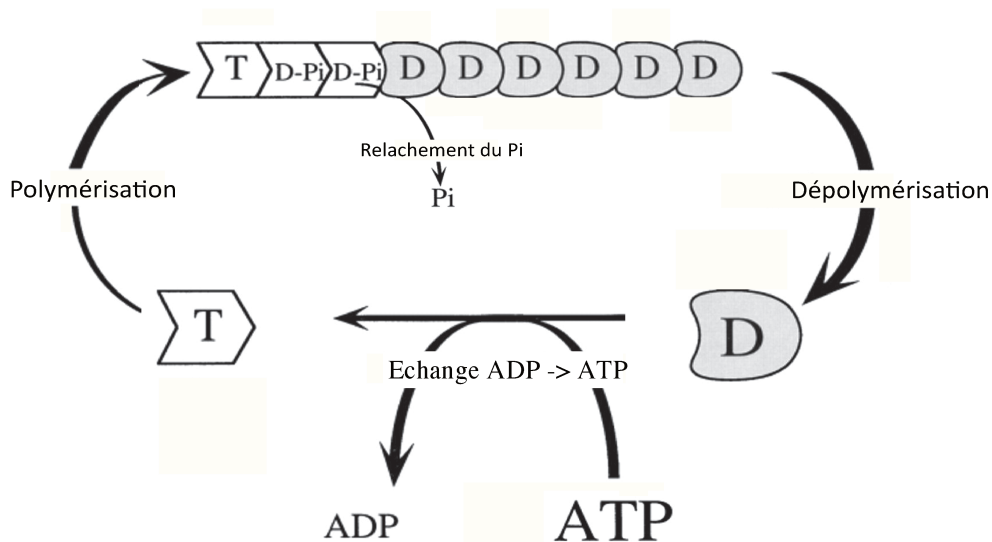


Figure 19 : Treadmilling d'un filament d'actine.

La polymérisation du filament d'actine se passe préférentiellement à l'extrémité barbée par ajout de monomères ATP. Après l'hydrolyse de l'ATP au sein du filament et la libération du phosphate inorganique, le filament dépolymérise à l'extrémité pointue. En solution les monomères vont relâcher leur ADP et fixer un nouvel ATP afin d'être à nouveau disponible pour la polymérisation (Modifié à partir de Carlier & Pantaloni 1997).

1.3. Limitations de la polymérisation de l'actine isolée

Le treadmilling que nous venons de voir est un bon modèle pour expliquer la polymérisation d'un réservoir d'actine purifiée *in vitro*. Cependant il n'est pas du tout adapté à la situation *in vivo* qui correspond obligatoirement à un état d'équilibre. En effet, *in vivo* le réservoir d'actine monomérique est en équilibre constant avec l'actine filamenteuse : il y a autant de filaments d'actine qui s'assemblent que de filaments qui se désassemblent, ce qui veut dire que les vitesses de polymérisation et de désassemblage sont du même ordre. Le treadmilling ne peut cependant pas expliquer cet équilibre car les vitesses de polymérisation à l'extrémité barbée et de dépolymérisation à l'extrémité pointue sont soit différentes, lors de l'élongation ($k_{+,b} = 11,6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, correspondant à 110 sous-unités/s à la concentration cellulaire d'actine $10 \mu\text{M}$, contre $k_{-,p} = 0,3 \text{ s}^{-1}$), soit équivalentes à l'état stationnaire, mais trop faibles ($V_{pol/depol} = 0,58 \text{ sous-unités/s}$) pour expliquer la dynamique rapide *in vivo* (un filament de $3 \mu\text{m}$ est totalement désassemblé et réassemblé en 1 minute, ce qui est cent fois plus rapide que l'actine pure *in vitro* (Pantaloni et al. 2001)). La cellule se trouve donc dans un état stationnaire mais dynamique, dans lequel la concentration d'actine monomérique est maintenue élevée afin d'assurer un turnover efficace de l'actine.

Outre la vitesse du turnover des filaments d'actine *in vivo* qui ne peut être expliquée par le treadmilling *in vitro*, on remarque qu'*in vitro* les filaments d'actine ne s'organisent pas spontanément en structures de filaments d'actine telles que je les ai décrites (réseaux branchés et faisceaux de filaments alignés). La cellule a donc besoin de facteurs supplémentaires pour former ces architectures de filaments d'actine. On appelle ces protéines régulatrices les Actine Binding Proteins ou ABPs. Afin de contrôler le turnover, la cellule doit être capable :

- 1) de maintenir son réservoir de monomères d'actine (profiline)
- 2) de déclencher la nucléation de nouveaux filaments et former des structures de filaments d'actine spécifiques tels que les réseaux branchés, et faisceaux parallèles et mixtes (complexe Arp2/3, formines)
- 3) d'inhiber la polymérisation des extrémités barbées afin d'éviter l'épuisement du stock d'actine G (capping protein)
- 4) d'accélérer le désassemblage des vieux filaments d'actine afin de maintenir un réservoir de monomères élevé (ADF/cofiline)
- 5) de recycler l'actine provenant du désassemblage des vieux filaments pour les rendre à nouveau polymérisables (profiline)

Ces différentes fonctions sont assurées par les ABPs que je décrirai dans la partie qui suit.

2. Les protéines régulatrices de l'actine

2.1. La profiline

La profiline est une petite protéine de 14 kDa très abondante dans la cellule, qui interagit avec l'actine monomérique (Pollard et al. 2000). Elle forme un complexe avec les monomères à un ratio 1:1 appelé complexe profiline-actine, permettant la régulation du réservoir d'actine monomérique (Staiger et al. 1994) (Figure 20).

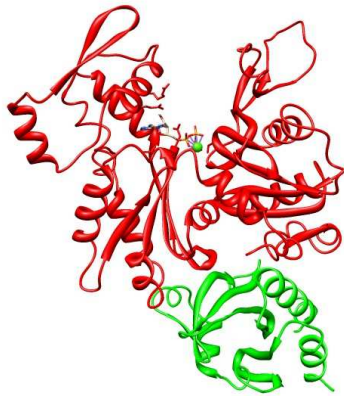


Figure 20 : Structure du complexe profiline-actine déterminée par cristallographie.
La profiline (vert) est liée au côté barbé du monomère d'actine (rouge) (Schutt et al. 1993).

De prime abord, les fonctions de la profiline semblent contradictoires : d'une part elle vient se lier au monomère pour l'empêcher de polymériser à l'extrémité pointue et inhiber la nucléation, et d'autre part elle favorise la polymérisation en abaissant la concentration critique (Shekhar et al. 2016). C'est en fait une protéine qui assure le bon fonctionnement du turnover de l'actine.

La profiline lie avec une grande affinité les monomères d'actine du côté barbé ($K_d = 0,1 \mu\text{M}$ pour les monomères ATP (Vinson et al. 1998)) (Figure 20). Cette configuration empêche donc le monomère de se lier à l'extrémité pointue des filaments, inhibant complètement la polymérisation à l'extrémité pointue et la nucléation spontanée (Vinson et al. 1998). En revanche la polymérisation du complexe profiline-actine à l'extrémité barbée se fait à la même vitesse que l'actine seule (Smith & Portnoy 1997). La profiline n'inhibe donc pas la polymérisation à l'extrémité barbée. Une fois le complexe lié au filament, l'affinité de la profiline pour l'actine chute ($K_D = 28 \mu\text{M}$, (Jégou et al. 2011)) et se détache du filament. La profiline favorise donc la polymérisation à l'extrémité barbée déclenchée par des facteurs de nucléation (comme le complexe Arp2/3 ou les formines).

La profiline a aussi une affinité plus forte pour l'actine G ATP que ADP. Lorsqu'elle se fixe aux monomères ADP, elle induit un changement de conformation permettant de libérer l'ADP et de fixer une ATP à la place (Baek et al. 2008). Le fait d'accélérer l'échange de nucléotide permet

d'abaisser la concentration en monomère ADP "en latence", non disponible à la polymérisation et donc de diminuer la concentration critique (Pantaloni & Carlier 1993). Cet effet est accentué par le fait qu'elle empêche l'hydrolyse de l'ATP, tout en maintenant le réservoir de monomère disponible pour la polymérisation.

2.2. Le complexe Arp2/3 et ses activateurs

Le complexe Arp2/3 est le nucléateur de l'actine permettant la formation des réseaux branchés que l'on retrouve dans le lamellipode et les patches d'endocytose. Il est isolé pour la première fois chez *Acanthamoeba* par (Machesky et al. 1994) et est conservé parmi les animaux, les plantes et les champignons (Welch et al. 1997a). Le filament nouvellement nucléé forme un angle de 70° avec le filament mère (Figure 21 B). Le complexe Arp2/3 se situe à la base de la branche et les extrémités barbées des deux filaments s'allongent à 70° l'une de l'autre. Le complexe Arp2/3 est formé de sept sous-unités, dont deux sous-unités Arp2 et Arp3 qui sont structurellement proches du monomère d'actine (Figure 21 A).

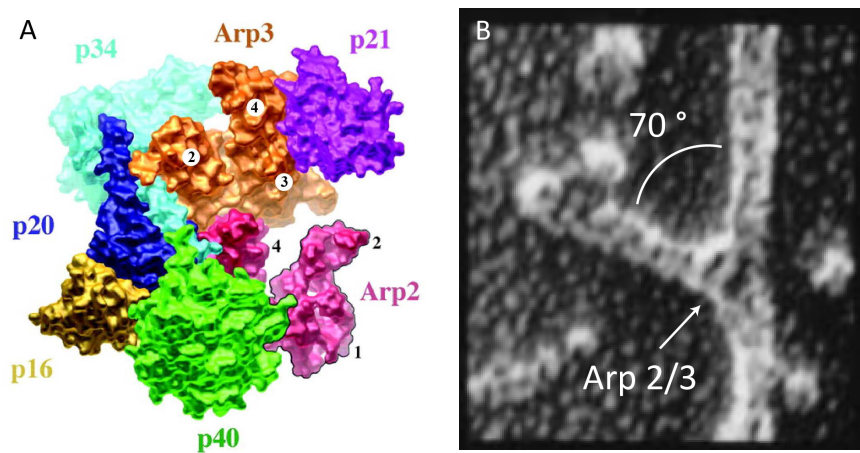


Figure 21 : Propriété de branchement du complexe Arp2/3.

A) La structure tridimensionnelle du complexe Arp2/3, déterminée par cristallographie, montre les 7 sous-unités dont Arp2 et Arp3 qui ont des structures très proches du monomère d'actine (on reconnaît les sous-domaines de l'actine notés sur le schéma) (modifié à partir de Robinson et al. 2001). B) Branche formée à partir du complexe Arp2/3 lié sur un filament préexistant (modifié à partir de Mullins et al. 1998).

Cette homologie avec le monomère d'actine permet au complexe Arp2/3 de mimer par un dimère d'actine l'extrémité barbée d'un filament d'actine sur lequel les monomères d'actine vont venir se fixer et former un filament. Cette propriété de nucléation nécessite deux éléments extérieurs : 1) l'activation par un facteur promoteur de la nucléation (ou NPFs, Nucleation Promoting Factors) et 2) la présence d'un filament préexistant, appelé filament mère, sur lequel le complexe Arp2/3 va se lier et initier la nucléation (Blanchoin et al. 2000a).

Tandis que le complexe Arp2/3 est le seul facteur cellulaire à pouvoir former des branches, il existe de nombreuses familles de NPFs capables de promouvoir son action. La première à avoir

été découverte est l'ActA (Welch et al. 1998). Elle se trouve à la surface des bactéries *Listeria monocytogenes* et lui permet de nucléer les monomères d'actine de son hôte en un réseau branché pour se déplacer et infecter les cellules voisines. Ont ensuite été isolées les protéines de la famille WASp/scar chez les mammifères et Las17 chez la levure. Tous ces NFPs présentent les trois domaines communs suivants (Figure 22): le domaine "WASP homology 2" ou WH2, qui lie le monomère d'actine, le domaine C "connecteur" ou "central", et le domaine A "acide" qui lie le complexe Arp2/3. Ces trois domaines vont permettre 1) d'activer le complexe Arp2/3 par un changement de conformation du complexe Arp2/3, en le faisant passer de sa position "fermée" à sa position "ouverte" (Rodal et al. 2005) et 2) de mettre en contact le premier monomère du filament fille avec le complexe Arp2/3 via le domaine WH2 (Higgs & Pollard 1999; Rodal et al. 2003). *In vivo*, les NFPs sont elles aussi inactives car la partie N-terminale est repliée sous la partie C-terminale. Leur activation se fait à la membrane par les protéines de la famille Rho, Rac et Cdc42, entraînant leur dépliement et la libération de leur domaine VCA. Leur activation localisée à la membrane permet la nucléation spatialement contrôlée des architectures branchées.

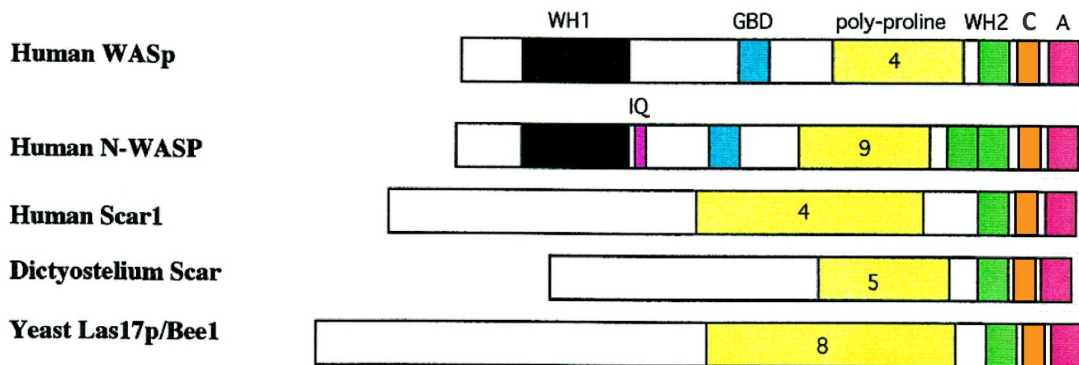


Figure 22 : Séquence protéique des membres de la famille WASP/scar.

Le domaine VCA, commun chez les NFPs, se lie au monomère, au complexe Arp2/3 et déclenche la formation de la branche (Higgs & Pollard 1999).

Une fois le WASP activé, la formation de la branche se déroule de la manière suivante (Figure 23) : le WASP actif dimérise (Boczkowska et al. 2014) et se lie au complexe Arp2/3 et à un monomère d'actine via son domaine VCA. Il active ainsi le complexe Arp2/3 qui va pouvoir se lier sur le côté d'un filament préexistant, appelé filament mère. Dans la plupart des cas le complexe Arp2/3 se dissocie du filament, mais parfois le WASP libère le complexe Arp2/3 et déclenche ainsi la polymérisation du filament fille, jusqu'ici inhibée (Smith et al. 2013a).

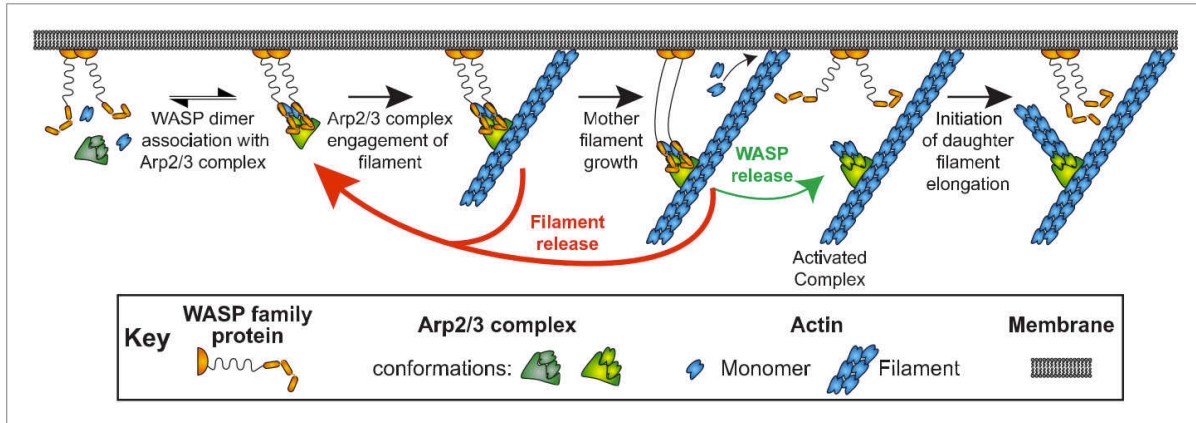


Figure 23 : Activation du complexe Arp2/3 par le facteur promoteur de nucléation WASP.

La nucléation passe par 5 étapes. WASP dimérise et se lie au complexe Arp2/3, puis à un filament d'actine préexistant, appelé filament mère. Ce dernier polymérise jusqu'au relâchement du complexe Arp2/3 par WASP, permettant ainsi la croissance de la branche. Dans la plupart des cas cependant, le complexe que forme le WASP avec Arp2/3 se dissocie du filament avant la libération de Arp2/3 par WASP, ce qui contribue à contrôler la densité de branche (Smith et al. 2013a).

2.3. Protéines de coiffe ou capping proteins

Si les filaments de la cellule pouvaient pousser indéfiniment, le réseau ne serait pas assez dense pour résister à la tension de la membrane (les longs filaments se plieraient sous la pression, absorbant l'énergie déployée pour déformer la membrane). Ainsi pour être en mesure d'exercer des forces, les filaments doivent rester courts et donc leur extrémité barbée doit être bloquée par des protéines appelées protéines de coiffe ou capping proteins.

La capping protein (CP), connue aussi sous le nom CapZ, est un hétérodimère formé des sous-unités α et β , toutes deux d'environ 30 kDa (Figure 24). Découverte dans les années 60 (Maruyama & Obinata 1965), elle est très fortement conservée chez tous les eucaryotes, dont les champignons, les plantes et les vertébrés (Cooper et al. 1999). Les capping protéines ou protéines de coiffe doivent leur nom à leur faculté d'inhiber la croissance des filaments d'actine du côté barbé, i.e. de « coiffer » cette extrémité (Isenberg et al. 1980). La fixation de CP, de très forte affinité sur l'extrémité barbée ($K_d = 1nM$), empêche l'addition ou la dissociation de sous-unités d'actine du filament (Caldwell et al. 1989; Schafer & Cooper 1995).

Les capping proteins sont utiles dans plusieurs processus cellulaires (Edwards et al. 2014), mais dans notre étude nous nous intéressons uniquement à son rôle dans la motilité cellulaire (David et al. 1998). Au sein d'un réseau branché, lors de la formation d'une nouvelle branche, celle-ci doit être rapidement coiffée : d'abord, pour stopper la polymérisation des filaments, afin de produire un réseau dense formé de filaments courts et réticulés (par le complexe Arp2/3); ensuite pour maintenir la polarité du réseau d'actine, c'est-à-dire la croissance à proximité de la membrane plasmique en empêchant l'élongation des filaments en dehors de la zone de nucléation; et enfin pour maintenir l'équilibre entre le réservoir de monomères et la quantité de filaments, en

d'autres termes conserver une concentration critique haute, afin de favoriser la nucléation de nouvelles branches plutôt que l'élongation (Loisel et al. 1999; Blanchoin et al. 2000b). La capping protein est très importante pour la formation du lamellipode, puisque sans elle, la taille du lamellipode est réduite (Iwasa & Mullins 2007).

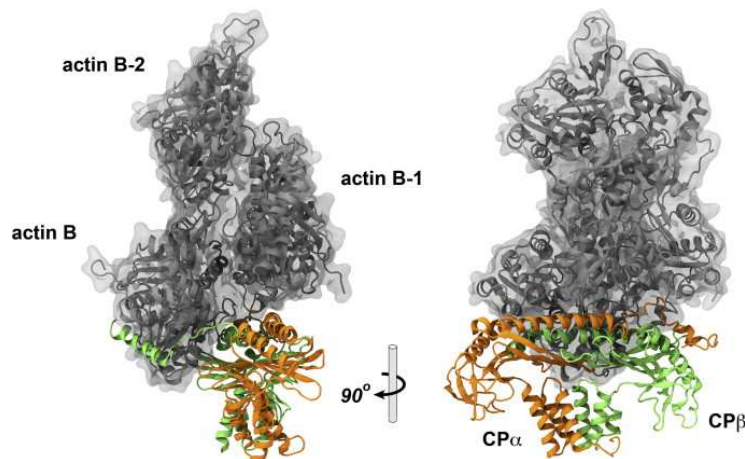


Figure 24 : Capping Protein fixée à l'extrémité barbée d'un filament d'actine.

Deux vues, tournées à 90°, montrant le filament d'actine avec trois sous-unités en gris et les deux sous-unités de Capping protein α en orange et β en vert. Tiré de (Kim et al. 2010).

L'action de la profiline et des capping proteins permet de maintenir un réservoir d'actine monomérique élevé. En effet, la capping protein va réguler la polymérisation à l'extrémité barbée, tandis que la profiline la régule du côté pointu. Ainsi, travaillant de concert avec les protéines de nucléation, l'assemblage des filaments d'actine est assuré : la nucléation est localisée, les architectures sont contrôlées, l'élongation est limitée aux nouveaux filaments et les monomères sont recyclés rapidement pour favoriser la polymérisation. Cependant la dépolymérisation à l'extrémité pointue étant très lente ($k_{-ADP} = 0,3 \text{ s}^{-1}$, cf. Figure 17), des facteurs supplémentaires sont nécessaires pour assurer le désassemblage des « vieux » filaments d'actine, qui pourront être réutilisés après recyclage par la profiline.

2.4. Protéine de fragmentation : ADF/Cofiline

La famille d'ADF/cofilin est un facteur clé dans le désassemblage des filaments d'actine. Elle comprend l'ADF, la cofiline, l'actophorine, la dépectine et la destrine. Le premier membre de cette famille à avoir été découvert est l'ADF ou « actin depolymerizing factor » en 1980 (Bamburg et al. 1980), nommé d'après sa capacité à désassembler de faibles quantités d'actine F en actine G. En parallèle, la cofiline est isolée et nommée comme telle car elle co-sédimente avec l'actine (co-filamentous with actin) (Maekawa et al. 1984). On la trouve chez tous les eucaryotes. Les organismes unicellulaires, tels que la levure *Saccharomyces cerevisiae*, n'ont qu'un isoforme (cof1), alors que les vertébrés en possèdent trois : l'ADF, la cofiline 1 ou cofiline

non-musculaire et la cofiline 2, ou cofiline musculaire. Les plantes, quant à elles, possèdent jusqu'à dix isoformes (ADF-1 à ADF-10) (Poukkula et al. 2011).

L'ADF/cofiline est une petite protéine de 15 à 21 kDa, formée par un domaine ADF-H, ou domaine homologue de l'ADF, que l'on retrouve chez tous les membres (Bamburg et al. 1999). Elle est composée de cinq feuillets β , entourés de trois hélices α (Figure 25).

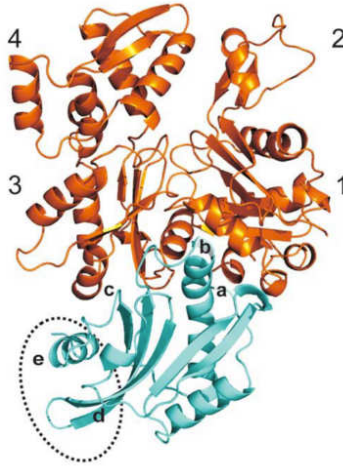


Figure 25 : Structure de l'ADF/cofiline (bleu) complexée à un monomère d'actine (orange).

Structure tridimensionnelle du domaine d'homologie ADF-H (de la twinfiline) en bleu lié aux sous-domaines 1 et 3 du monomère d'actine en orange (Poukkula et al. 2011; Paavilainen et al. 2008).

L'ADF/cofiline est capable de se lier à l'actine G et à l'actine F. Les structures tridimensionnelles de l'ADF/cofiline complexée au monomère ou au filament d'actine, n'ont pas été déterminées. Cependant en comparant les structures résolues par résonance magnétique nucléaire (Fedorov et al. 1997) et les tests de mutagenèse (consistant à muter aléatoirement le gène et à observer le phénotype de la protéine), on parvient à déterminer les sites de fixation. Les sites de fixation au monomère d'actine (a, b et c, Figure 25) se trouvent sur les domaines 1 et 3, donc du côté barbé (Lappalainen et al. 1997). Au sein du filament, l'ADF/cofiline interagit aussi avec la sous-unité voisine par les sites d et e (Figure 25) (Paavilainen et al. 2002). Nous allons voir d'abord les caractéristiques de ces interactions, puis le mécanisme de fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/cofiline.

2.4.1. Fixation à l'actine G

L'ADF/cofiline étant capable de lier deux monomères d'actine, il serait donc probable qu'elle puisse stabiliser le dimère et favoriser la nucléation de nouveaux filaments. La nucléation a effectivement été observée lorsque la concentration en ADF/cofiline est élevée (Andrianantoandro & Pollard 2006). Les expériences menées par microscopie à onde évanescente ou microscopie TIRF (cf. partie 4.2 pour plus d'explications sur l'imagerie TIRF) ont montré que le nombre de filaments d'actine était anormalement élevé à forte concentration d'ADF/cofiline.

Cependant ce résultat pourrait aussi être expliqué par la fragmentation des filaments d'actine invisibles, c'est-à-dire plus petits que la résolution du microscope (< 200 nm).

La fixation de l'ADF/cofiline sur les monomères d'actine dépend de l'état du nucléotide. En effet, l'ADF/cofiline a une affinité 40 fois plus forte pour les monomères d'actine liés à une ADP qu'à une ATP ($K_{d,ADP} = 0,15 \mu\text{M}$, $K_{d,ATP} = 5,9 \mu\text{M}$) (Blanchoin & Pollard 1998; Carlier et al. 1997). De plus, l'ADF/cofiline stabilise le monomère ADP dans une position fermée, inhibant l'échange du nucléotide (Blanchoin & Pollard 1998; Nishida 1985). La profiline, qui se fixe aussi sur le côté barbé du monomère, est en compétition avec l'ADF/cofiline. L'actine G ATP ayant une plus grande affinité pour la profiline que pour l'ADF/cofiline (Blanchoin & Pollard 1998), elle va rapidement se dissocier de l'ADF/cofiline et se fixer à la profiline. La poche nucléotidique est ouverte par la fixation de la profiline qui va pouvoir recycler l'actine en échangeant l'ADP contre de l'ATP.

2.4.2. Fixation sur l'actine F

L'ADF/cofiline se lie au filament d'actine avec un ratio 1:1, sur le côté du filament (Figure 26). La structure de l'ADF/cofiline liée au filament d'actine n'a pas encore pu être déterminée expérimentalement. Cependant la technique de simulation basée sur la microscopie électronique a permis de reconstruire un filament décoré par ADF/cofiline à une résolution de 9 \AA (Galkin et al. 2011). Cette représentation est similaire aux structures tridimensionnelles des homologues de l'ADF/cofiline ayant été résolues, comme l'ADF (Paavilainen et al. 2008) ou la twinfiline (Dominguez & Holmes 2011) complexées au monomère d'actine par un domaine d'homologie d'ADF.

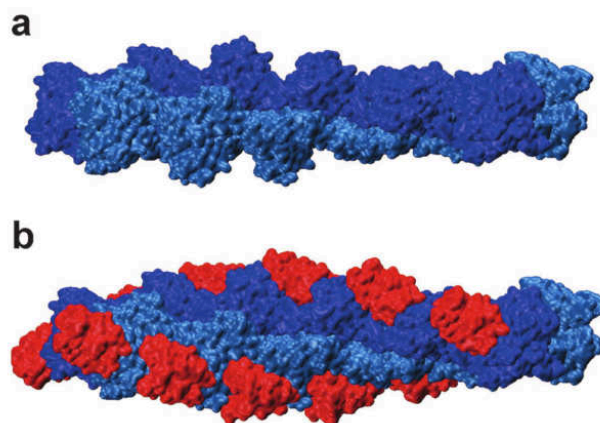


Figure 26 : Représentation de la structure a) d'un filament d'actine b) d'un filament d'actine entièrement décoré par ADF/cofiline

Structures déterminées à partir de simulation coarse-grain (code PDB : EJ0S). L'ADF/cofiline (rouge) se lie entre deux sous-unités d'actine du même brin (en bleu clair ou bleu foncé) (Kim et al. 2015).

La fixation de l'ADF/cofiline sur le filament d'actine ne modifie pas la vitesse de polymérisation des filaments (Andrianantoandro & Pollard 2006). Cependant, de même que pour l'attache au monomère d'actine, la fixation de l'ADF/cofiline sur le filament dépend de l'état nucléotidique de l'actine. L'ADF/cofiline lie dix fois mieux les sous-unités ADP du filament que ATP (les constantes de dissociation sont $K_{d,ATP} > 10 \mu\text{M}$ et $K_{d,ADP} = 0,3 \mu\text{M}$) (Carlier et al. 1997; Maciver et al. 1991). Le changement d'affinité de l'ADF/cofiline vient donc soit de l'hydrolyse de l'ATP, soit de la libération du phosphate inorganique. Etant donné que la vitesse de fixation de l'ADF/cofiline est quinze fois plus grande sur les sous-unités ADP que sur les sous-unités ADP-Pi, on en conclut que la différence provient du relâchement du phosphate. Cette étape est la plus longue (avec une constante caractéristique de 6 min, contre 2 s pour l'hydrolyse de l'ATP, cf. Figure 18) et joue le rôle de retardateur de la fixation de l'ADF/cofiline sur le filament. La zone ATP du filament est donc protégée contre la fixation et le désassemblage de l'ADF/cofiline (Suarez et al. 2011).

a. Changement conformationnel induit par la fixation de l'ADF/cofiline

Dans le filament d'actine, l'ADF/cofiline est en contact avec deux sous-unités, par l'intermédiaire de quatre sites de fixation. On trouve d'abord les sites de liaison aux sous-domaines 1 et 3 du monomère d'actine (Figure 27), appelés "sites de liaison à l'actine G"; puis deux sites de fixation aux sous-domaines 1 et 4 de la sous-unité d'actine adjacente (Galkin et al. 2003; Galkin et al. 2011). L'association de l'ADF/cofiline sur le filament d'actine déstabilise le filament. En effet, on observe qu'un espace s'est formé entre deux monomères adjacents suite à la fixation de l'ADF/cofiline (Figure 27 a et c). L'ADF/cofiline n'a pas d'effet sur les interactions des sous-domaines 3 et 4 des sous-unités adjacentes, par contre elle affaiblit les liaisons entre les sous-domaines 1 et 2 et entraîne leur séparation (Figure 27 c).

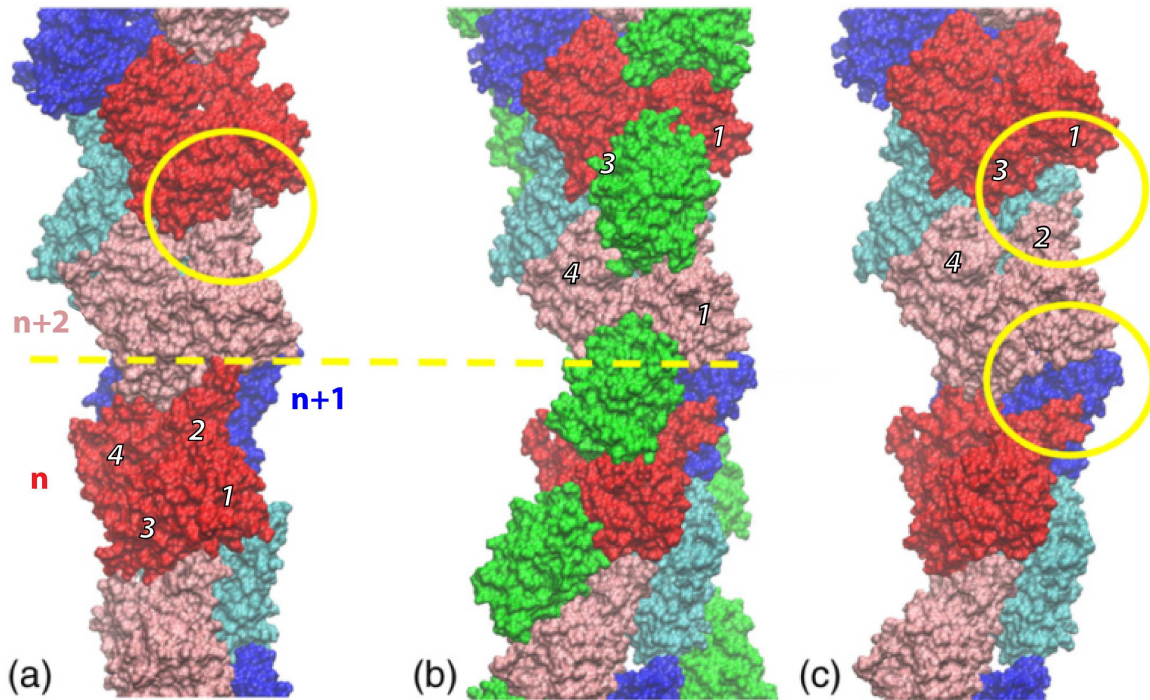


Figure 27 : Changement de conformation de l'actine F suite à la fixation de l'ADF/cofiline.

a) Filament d'actine (sous-unités colorées en rouge et rose pour le premier brin et bleu clair et foncé pour le 2^{ème} brin). b) et c) Filament d'actine entièrement décoré par l'ADF/cofiline, c) l'ADF/cofiline n'est pas affiché, pour observer l'écartement entre deux sous-unités d'actine adjacentes engendré par ADF/cofiline (cercle jaune) (Fan et al. 2013)

Le changement de conformation du filament se propage le long du filament (De La Cruz & Sept 2010; Ngo et al. 2015; Umeki et al. 2016), c'est-à-dire que le mouvement interne de la sous-unité liée à l'ADF/cofiline va modifier la conformation de la sous-unité adjacente sans qu'elle-même soit en contact avec l'ADF/cofiline.

Ce changement conformationnel du filament d'actine est la source des propriétés de l'ADF/cofiline, notamment sa fixation coopérative, l'accélération de la dissociation du phosphate inorganique, et son mécanisme de désassemblage.

b. Accélération de la dissociation du phosphate inorganique

En présence d'ADF/cofiline, le phosphate inorganique se dissocie du filament avec une constante de dissociation dix fois plus forte qu'en absence d'ADF/cofiline ($k_- = 0,035 \text{ s}^{-1}$ en présence d'ADF/cofiline contre $0,0019 \text{ s}^{-1}$ en absence) (Blanchoin & Pollard 1999; Roland et al. 2008). Cette propriété était jusqu'à maintenant expliquée par le changement de conformation du filament qui, en se propageant, atteignait les sous-unités ADP-Pi et accélérât le relâchement du phosphate. Mais, en 2015, Ngo a montré par microscopie à force atomique rapide (fast AFM) que cette propagation se faisait seulement vers l'extrémité pointue (Ngo et al. 2015), invalidant ce

modèle. La constante d'association de l'ADF/cofiline sur les sous-unités ADP-Pi étant faible mais pas nulle, l'accélération de la dissociation du phosphate inorganique pourrait s'expliquer par une interaction directe de l'ADF/cofiline avec ces sous-unités.

Quoiqu'il en soit, cette libération accélérée du Pi entraîne un vieillissement prématuré des filaments. La fixation de nombreuses protéines associées à l'actine dépend de la conformation du filament et notamment du nucléotide associé (Chan et al. 2009; Kardos et al. 2009). Le vieillissement induit par l'ADF/cofiline peut donc jouer un rôle important dans l'affinité d'attache d'autres protéines sur le filament et donc dans la dynamique de régulation des filaments d'actine.

c. Fixation coopérative de la cofiline

In vitro, l'observation de la décoration des filaments d'actine par ADF/cofiline en microscopie à onde évanescente montre la formation de clusters d'ADF/cofiline le long du filament plutôt qu'une décoration discontinue et aléatoire (Suarez et al. 2011; Chaudhry et al. 2013). Cela peut être expliqué par la coopérativité (Hayakawa et al. 2014). Cela signifie que la fixation de l'ADF/cofiline se fait en deux temps : d'abord l'attache d'une molécule sur le filament avec une certaine affinité, améliorant ensuite la fixation des ADF/cofilines suivantes sur le filament (Blanchoin & Pollard 1999). Cette propriété a d'abord été observée (McGough et al. 1997) avant d'être modélisée et quantifiée (Ressad et al. 1998; Blanchoin & Pollard 1999; De La Cruz 2005). L'efficacité de la coopérativité dépend tout de même de l'origine des protéines (De La Cruz 2005).

La coopérativité est basée sur le changement de conformation induit par l'ADF/cofiline. En effet, par propagation, les sous-unités adjacentes acquièrent une plus grande affinité pour l'ADF/cofiline. Un modèle mathématique pourrait décrire la coopérativité (De La Cruz 2005) (Figure 28) en introduisant un "facteur de coopérativité" ω . La première ADF/cofiline fixe le filament avec une certaine constante de dissociation K_d , tandis que les suivantes se fixeraient plus facilement en fonction du nombre de sous-unités adjacentes liées à une ADF/cofiline : une, K_d/ω et deux, K_d/ω^2 (De La Cruz & Sept 2010).

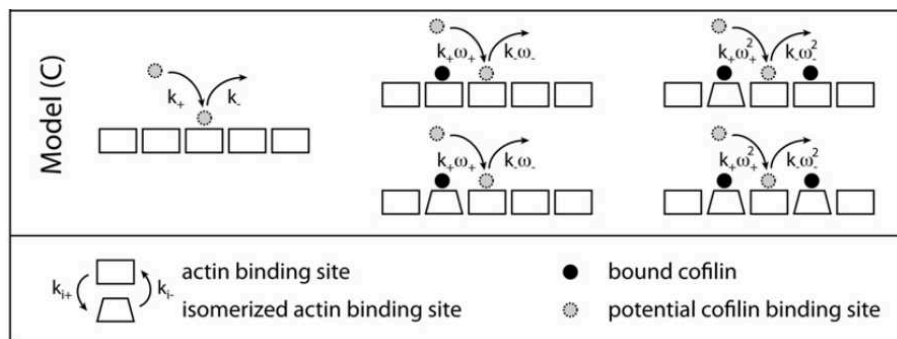


Figure 28 : Modèle de coopérativité de l'ADF/cofiline sur le filament d'actine.

Modèle qui décrit l'augmentation de la constante d'association de l'ADF/cofiline sur le filament d'actine si une ou deux ADF/cofilines sont déjà liées aux sous-unités adjacentes (De La Cruz & Sept 2010).

Pour ce modèle, une seule molécule d'ADF/cofiline est suffisante pour déclencher la coopérativité. Il a cependant été montré qu'une seule ADF/cofiline n'était pas capable de déclencher la propagation du changement conformationnel (Ngo et al. 2015).

d. Mécanisme de fragmentation par l'ADF/cofiline

La dernière conséquence du changement de conformation du filament d'actine par ADF/cofiline, mais pas des moindres, est le mode de fragmentation spécial de l'ADF/cofiline. *In vivo*, l'ADF/cofiline est impliquée dans de nombreux processus nécessitant le désassemblage des filaments d'actine (David et al. 1998). De manière intuitive on pourrait penser que plus il y a d'ADF/cofilines sur les filaments plus ils sont désassemblés. En réalité ce n'est pas le cas, car le désassemblage par ADF/cofiline dépend de sa concentration (Andrianantoandro & Pollard 2006) (Figure 29). La décoration par l'ADF/cofiline est linéaire : plus la concentration augmente, plus la fixation de l'ADF/cofiline sera importante, jusqu'à saturation du filament d'actine. L'efficacité de fragmentation, quant à elle, est maximale lorsque le filament est décoré à 50 % par l'ADF/cofiline (Figure 29, encadré). À concentration plus faible, le filament ne sera ni décoré ni fragmenté. À concentration plus forte, l'ADF/cofiline fixera coopérativement l'ensemble du filament mais ne le fragmentera pas. *In vivo*, l'action de la capping protein empêchera la repolymérisation des fragments désassemblés par ADF/cofiline, participant au désassemblage complet des filaments.

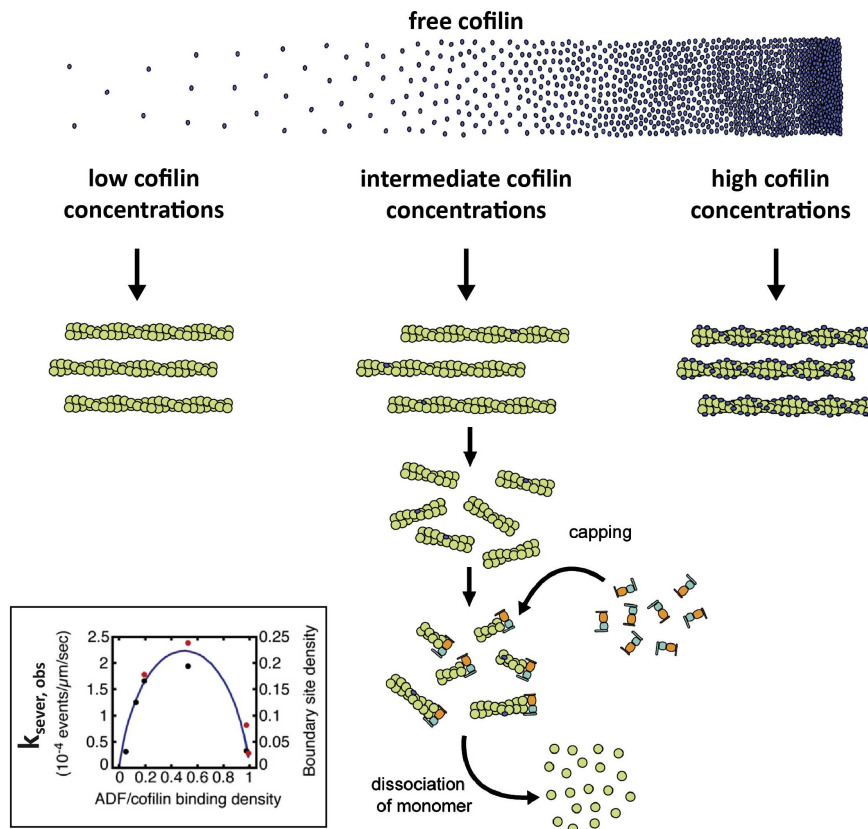


Figure 29 : Fragmentation des filaments d'actine par ADF/cofiline.

L'efficacité de fragmentation de l'ADF/cofiline dépend de sa concentration. (Andrianantoandro & Pollard 2006). Encadré : L'efficacité du désassemblage par ADF/cofiline est maximale lorsque le filament d'actine est à moitié décoré (Suarez et al. 2011).

Comment expliquer le mécanisme contre-intuitif de désassemblage de l'ADF/cofiline ?

Il est à noter d'abord que la décoration par ADF/cofiline perturbe significativement les propriétés mécaniques du filament d'actine. En effet, la fixation de l'ADF/cofiline déstabilise le filament et engendre :

- 1) une augmentation de la flexibilité "longitudinale" du filament : la longueur de persistance est réduite cinq fois et passe donc de 10 μm pour les filaments d'actine à 2 μm pour les filaments entièrement décorés par l'ADF/cofiline (McCullough et al. 2008; De La Cruz 2009)
- 2) une augmentation de la flexibilité "transversale" du filament : la rigidité de torsion est réduite, entraînant une rotation interne du filament de 5° , passant de 162° à 167° (McGough et al. 1997; Prochniewicz et al. 2005; Kuhn & Bamberg 2008)
- 3) une diminution de la taille du pas de l'hélice du filament d'actine (ou "pitch") de 74 à 57 nm (Figure 30) (De La Cruz 2009; Ngo et al. 2015)

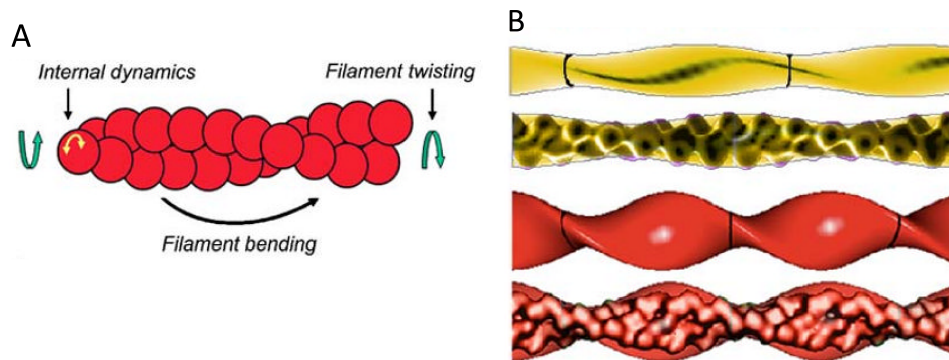


Figure 30 : Propriétés mécaniques du filament d'actine et de cofilactine.

A) Représentations schématisées des degrés de liberté du filament d'actine. (Adapté de Prochniewicz et al. 2005). B) Représentation de la structure d'un filament d'actine (jaune) et de cofilactine, c'est-à-dire un filament entièrement décoré par l'ADF/cofiline (rouge). L'ADF/cofiline entraîne un changement de conformation du filament d'actine, le pas de l'hélice du filament est réduit à 57 nm (De La Cruz 2009).

Bien que l'ADF/cofiline déstabilise le filament et détruise l'interaction entre les sous-domaines 1 et 2 de deux sous-unités adjacentes, la nouvelle conformation du filament est stabilisée directement par l'ADF/cofiline qui interagit avec les deux sous-unités en question. Cette nouvelle conformation, forcée par la présence de nombreuses ADF/cofilines, est donc stable et non propice à des événements de fragmentation. Les régions du filament décorées par ADF/cofiline et les régions nues ont donc des propriétés mécaniques différentes mais stables. De plus, le changement de conformation se propage le long du filament dans les zones non décorées par l'ADF/cofiline (Galkin et al. 2011; Ngo et al. 2015). Les zones les plus fragiles sont donc les frontières entre les régions décorées et les régions nues, là où la conformation "ADF/cofiline" se propage au-delà de la zone décorée par l'ADF/cofiline mais où celle-ci n'est pas présente pour stabiliser le filament d'actine. Pour conforter ce raisonnement, il a été montré que la

fragmentation du filament est maximale lorsque la décoration par ADF/cofiline est intermédiaire, donc lorsque le nombre de frontières entre zones nues et décorées par ADF/cofiline est le plus grand (Suarez et al. 2011). À la lumière de ces observations, on peut expliquer le désassemblage par ADF/cofiline avec un modèle où l'accumulation de la contrainte favoriserait la fragmentation aux discontinuités mécaniques, comme les frontières entre les zones décorées par ADF/cofiline et les zones vides du filament d'actine (Figure 31).

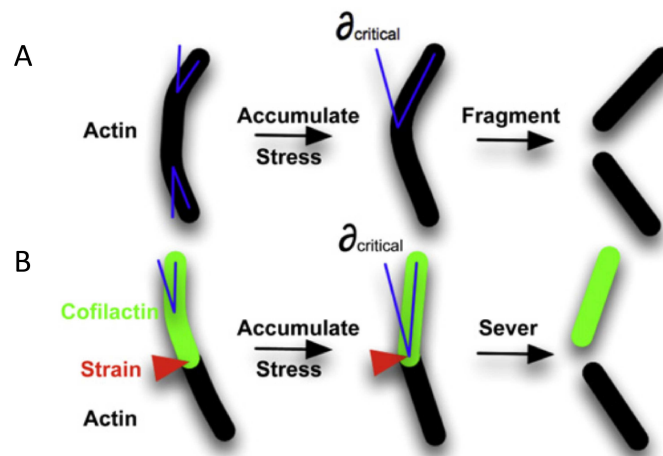


Figure 31 : Modèle de la fragmentation d'un filament par l'ADF/cofiline.

A) La fragmentation d'un filament d'actine se produit lorsqu'un angle critique de flexion du filament est atteint. B) Les propriétés de flexion du filament changent le long d'un filament décoré en partie par ADF/cofiline, ce qui localise les contraintes dues aux fluctuations thermiques à la frontière entre la région nue et la région décorée par ADF/cofiline, favorisant la fragmentation à cet endroit (McCullough et al. 2011).

2.4.3. Régulation de l'activité de l'ADF/cofiline

a. Régulation directe de l'ADF/cofiline

L'ADF/cofiline peut être régulée d'abord par phosphorylation d'un acide aminé près de sa terminaison N, la sérine-3 (Morgan et al. 1993; Goyal et al. 2013) ou la sérine-6 chez les plantes (Bamburg et al. 1999), ce qui inhibe sa fixation sur l'actine G ou F (Blanchoin et al. 2000c). La phosphorylation est induite par les kinases LIM 1 et 2 chez les vertébrés, elles-mêmes régulées par la famille de GTPases Rho. On trouve aussi les kinases TES ou encore la kinase MRCK (Sumi et al. 1999; Bamburg & Bernstein 2008). La phosphorylation est réversible, les phosphatases de la famille des slingshots ou chronophines peuvent en effet déphosphoryler, et donc activer l'ADF/cofiline. La phosphorylation n'affecte pas directement l'activité de fragmentation de l'ADF/cofiline, mais diminue vingt fois son affinité pour l'actine (Ressad et al. 1998). Chez la levure, cette inhibition n'existe pas, l'ADF/cofiline est toujours active.

L'ADF/cofiline déphosphorylée, donc active, peut être inactivée par la fixation au phosphatidylinositol-biphosphate (PiP₂) (van Rheenen et al. 2007). PiP₂ est un phospholipide contenu dans la membrane plasmique qui entre en jeu dans le signallement cellulaire, le trafic membranaire (endocytose/exocytose), ou encore dans l'attache du cytosquelette à la membrane (Czech 2000; Bezanilla et al. 2015). Cette inhibition est localisée à la membrane, propriété utile pour certaines cellules non polarisées, qui se polariseront sous l'effet d'un relâchement d'ADF/cofiline à la membrane. Des facteurs de croissance, tels que l'EGF, activent localement la phospholipase C qui détache PiP₂ de la membrane et libère l'ADF/cofiline (Bamburg & Bernstein 2008).

In vitro, nous pouvons jouer sur des constantes stables *in vivo*, telles que le pH. À un pH inférieur à 7, l'ADF/cofiline se lie à l'actine mais a une faible activité de désassemblage alors qu'à un pH égal ou supérieur à 7, elle désassemble fortement les filaments d'actine (Hawkins et al. 1993; Ono 2007). Une fois de plus cette inhibition n'existe pas chez la levure (Pavlov et al. 2006).

L'ADF/cofiline peut être régulée indirectement par des facteurs interagissant avec le filament d'actine. À concentration de l'ordre du millimolaire, le **phosphate inorganique** peut inhiber la fixation de l'ADF/cofiline en se liant aux sous-unités ADP du filament d'actine (Maciver et al. 1991; Blanchoin & Pollard 1999; Combeau & Carlier 1988). Enfin les **cations** qui lient l'actine peuvent aussi avoir un effet inhibiteur. Un des sites de fixation des cations sur l'actine G est situé du côté pointu du monomère, sur le sous-domaine 2 (Figure 12). Appelé "stiffness site" ou "site de rigidité", il a un effet sur les propriétés mécaniques du filament d'actine (Kang et al. 2012), ce qui influe sur l'interaction de l'ADF/cofiline avec les filaments (Kang et al. 2014).

b. Régulation par compétition avec d'autres protéines

La compétition pour le filament d'actine peut aussi entrer en jeu dans la régulation d'une protéine. Il y a compétition de deux protéines pour le monomère ou le filament d'actine lorsque ces deux acteurs ne peuvent pas se lier en même temps, pour différentes raisons, ce qui peut amener à l'inhibition ou au contraire à l'amplification de leur activité.

Les protéines en compétition avec l'ADF/cofiline pour le monomère ou le filament d'actine sont nombreuses et jouent un rôle important dans sa régulation.

La première protéine avec laquelle l'ADF/cofiline entre en compétition pour le filament d'actine est la tropomyosine. La tropomyosine est une protéine filamenteuse qui dimérise et se lie coopérativement autour du filament d'actine, dans le même sens que l'hélice d'actine. Il existe plus de 40 isoformes de tropomyosine cependant seulement certains d'entre eux entrent en compétition avec l'ADF/cofiline (Ono & Ono 2002), tandis que d'autres au contraire co-localisent avec celle-ci (Bryce et al. 2003).

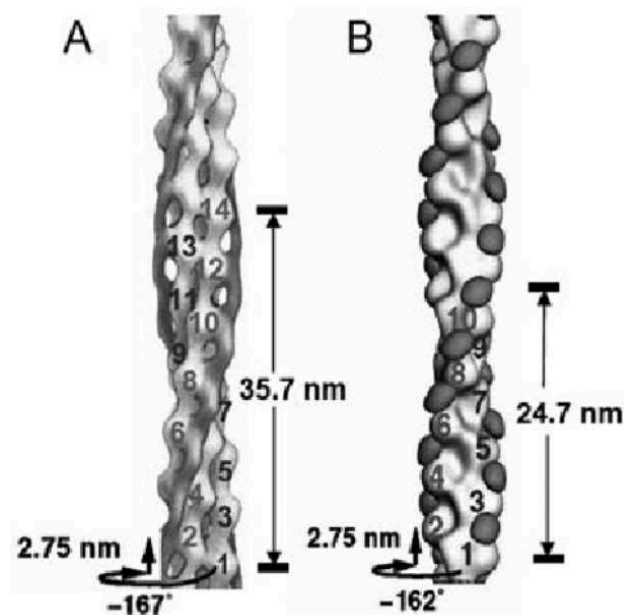


Figure 32 : Structure d'un filament d'actine décorée par A) tropomyosine ou B) ADF/cofiline.

Les deux protéines se fixent sur des filaments d'actine de conformation différente, ce qui explique leur compétition (Kuhn & Bamberg 2008).

Les isoformes de tropomyosine qui sont en compétition avec l'ADF/cofiline se fixent préférentiellement sur la conformation "normale" (sans ADF/cofiline) du filament d'actine (Figure 32A), le stabilisant dans cette conformation alors que l'ADF/cofiline se lie sur des filaments de conformation modifiée (Figure 32B). Bien que les sites d'interaction de la tropomyosine et de l'ADF/cofiline ne correspondent pas, c'est la différence de conformation qui va engendrer la compétition entre les protéines. Lorsque la tropomyosine et l'ADF/cofiline sont mises en présence de filaments d'actine au même moment, les filaments ne sont plus protégés du désassemblage par l'ADF/cofiline, ce qui signifie que la tropomyosine doit se lier en amont pour inhiber l'ADF/cofiline. Un ajout de concentration élevé d'ADF/cofiline parvient cependant à dissocier la tropomyosine (Nishida et al. 1984). Certains isoformes de la tropomyosine ont donc des effets stabilisateurs opposés à ceux de l'ADF/cofiline. *In vivo*, la fixation de ces deux protéines sur des filaments d'actine va permettre de définir des "familles" de filaments, ceux à stabiliser et ceux à recycler, comme par exemple chez la levure bourgeonnante dont les structures principales sont les patches d'endocytose, réseaux branchés très dynamiques et les câbles stables formés de filaments parallèles. Logiquement, on retrouve l'ADF/cofiline sur les patches d'endocytose et la tropomyosine sur les câbles (Liu & Bretscher 1989; Moon et al. 1993). De la même manière dans les cellules de vertébrés, on trouve l'ADF/cofiline dans le lamellipode (partie branchée et très dynamique) qui débranche le réseau, puis la tropomyosine vient stabiliser les filaments à l'arrière, dans le lamellum (réseau provenant du lamellipode repoussé en arrière par un flux rétrograde, qui ne comporte plus de branches et d'où l'ADF/cofiline et le complexe Arp2/3 sont absents) (Iwasa & Mullins 2007).

In vivo, l'ADF/cofiline entre en compétition avec la myosine II (moteur moléculaire que l'on trouve dans les fibres de stress contractiles) et inhibe sa fixation sur les filaments d'actine (Wiggin et al. 2012). De plus, l'ADF/cofiline est capable de désassembler seulement les fibres de stress transverses non contractiles (qui ne contiennent pas de myosine), mais les fibres de stress ventrales contractiles semblent être protégées (Tojkander et al. 2015). Comme pour la tropomyosine, la myosine pourrait servir de marqueur pour ségréguer l'ADF/cofiline hors des zones contractiles.

In vitro, il a été montré que l'ajout en grande quantité de myosine pouvait dissocier l'ADF/cofiline du filament d'actine. La conséquence directe est la diminution de la décoration du filament par ADF/cofiline et la création de frontières entre des zones décorées et non décorées par ADF/cofiline. L'efficacité de fragmentation de l'ADF/cofiline est donc accrue (Elam et al. 2013). Des chercheurs ont trouvé des résultats similaires avec la phalloïdine (Elam et al. 2013) et la fascine (Breitsprecher et al. 2011) et émettent l'hypothèse que n'importe quel ligand qui entre en compétition avec l'ADF/cofiline pourrait être capable, suivant sa concentration, d'augmenter son activité de désassemblage (Elam et al. 2013; Breitsprecher et al. 2011) ou au contraire de l'inhiber (Maciver et al. 1991).

L'ADF/cofiline interagit aussi directement avec le monomère d'actine. Sa régulation peut donc aussi se faire par compétition pour la fixation à l'actine G, ce qui a généralement pour conséquence la favorisation du turnover. En effet, étant donné que l'ADF/cofiline a une plus forte affinité pour les monomères ADP que ATP et qu'elle inhibe l'échange du nucléotide, la dissociation de l'ADF/cofiline, par compétition avec une autre protéine, accélèrera le recyclage des monomères.

Comme nous l'avons vu précédemment, la profiline entre en compétition avec l'ADF/cofiline pour les monomères et aide au recyclage en prenant la place de l'ADF/cofiline et en facilitant l'échange du nucléotide (cf. plus haut).

2.4.4. Localisation et rôle de l'ADF/cofiline dans la cellule

In vivo, l'ADF/cofiline favorise le turnover des structures d'actine. On la retrouve dans de nombreux processus impliquant le désassemblage des filaments d'actine tels que la division cellulaire dans le désassemblage de l'anneau contractile (Pelham & Chang 2002), la motilité cellulaire, pour le désassemblage du lamellipode ou des comètes d'actine des bactéries (Sidani et al. 2007; David et al. 1998), le trafic membranaire, dans l'endocytose (Lappalainen & Drubin 1997), ou encore la dynamique des filopodes (Breitsprecher et al. 2011).

L'ADF/cofiline est localisée sur les trois types de structure de filaments d'actine : le réseau branché, les faisceaux parallèles et les faisceaux antiparallèles. Un modèle intéressant pour l'étude du réseau branché est le kératocyte de poisson, étant donné que la majeure partie de la cellule est composée de son lamellipode. Il est donc aussi utilisé comme modèle pour visualiser

l'ADF/cofiline. L'ADF/cofiline décore de manière inhomogène le lamellipode (Figure 33) : de la membrane jusqu'à l'intérieur de la cellule, l'ADF/cofiline est d'abord exclue, ensuite elle décore intensément le lamellipode, puis se détache progressivement.

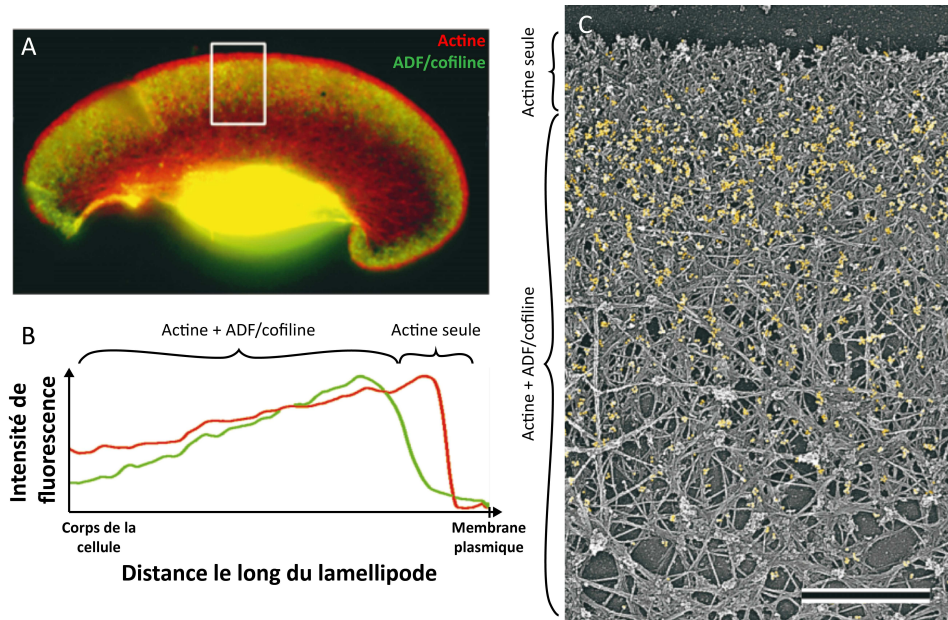


Figure 33 : Répartition de l'ADF/cofiline dans le lamellipode.

En A) un kératocyte dont l'actine et l'ADF/cofiline ont été marquées respectivement en rouge et vert. En B) l'intensité de fluorescence de l'ADF/cofiline et de l'actine dans le lamellipode montre une zone d'exclusion de l'ADF/cofiline de la zone la plus périphérique. En C), zoom sur le lamellipode observé en microscopie électronique (Svitkina & Borisy 1999).

Une première explication de l'exclusion de l'ADF/cofiline peut être que les filaments ATP, qui ne lient pas l'ADF/cofiline, sont nucléés à la membrane. Cependant, des kératocytes ralents, chez qui l'ensemble des filaments d'actine du lamellipode est lié à l'ADP, présentent aussi une zone d'exclusion pour l'ADF/cofiline (Svitkina & Borisy 1999). Des facteurs supplémentaires seront nécessaires pour comprendre. A l'arrière du réseau, la décroissance de la concentration de l'ADF/cofiline est due à la fragmentation qui réduit la densité du réseau et donc la fixation de l'ADF/cofiline (Svitkina & Borisy 1999). L'ADF/cofiline désassemble le réseau par son action de fragmentation, mais aussi par "débranchage" dans le cas du réseau branché, c'est-à-dire en dissociant les branches d'actine. Le complexe Arp2/3, à l'origine de la formation des branches d'actine, se dissocie du filament d'actine avec une constante de demi-vie de 500s et de seulement 30s en présence d'ADF/cofiline (Blanchoin et al. 2000b). En effet, le complexe Arp2/3 ayant une affinité plus grande pour les sous-unités d'actine ATP ($K_d \sim 40$ nM) que ADP ($K_d \sim 1\mu$ M), l'action de l'ADF/cofiline accélérant la dissociation du phosphate inorganique permet d'accélérer le détachement du complexe Arp2/3 du réseau et donc stimule le débranchage. De plus, la concentration optimale d'ADF/cofiline pour le débranchage est une forte concentration. Lorsqu'elle décore entièrement les filaments, elle entraîne un changement de conformation du filament d'actine ce qui réduit l'affinité du complexe Arp2/3 et résulte à sa dissociation du

filament d'actine (Chan et al. 2009). Deux autres protéines sont connues pour participer au débranchage : la GMF et la coronine qui interagissent directement avec le complexe Arp2/3 et dissocient la branche du filament mère (Gandhi et al. 2010; Ydenberg et al. 2013; Humphries et al. 2002; Rodal et al. 2005)

L'ADF/cofiline se fixe aussi aux faisceaux d'actine. Bien que la localisation de l'ADF/cofiline soit faible sur les faisceaux de filaments parallèles, tels que les filopodes ou les câbles d'actine chez les levures de fission ou bourgeonnantes (Figure 8), il a été montré que l'ADF/cofiline entre en jeu dans leur désassemblage (Yonezawa et al. 1987; Okada et al. 2006). De plus, la fragmentation par l'ADF/cofiline des réseaux parallèles semble être favorisée par la présence de protéines de réticulation, protéines qui se fixent et relient deux filaments (Breitsprecher et al. 2011).

Enfin l'ADF/cofiline est observée sur les structures de filaments antiparallèles. L'ADF/cofiline est en effet localisée sur les fibres de stress, dans les cellules de mammifères, et dans l'anneau de cytokinèse chez la levure et participe dans les deux cas à leur turnover (Kanellos et al. 2015; Tojkander et al. 2015)

3. Modèle de référence : le modèle de nucléation dendritique

3.1. Localisation des protéines étudiées dans le lamellipode

Les quatre protéines présentées sont localisées au niveau du lamellipode afin de contrôler la dynamique de croissance et de désassemblage du réseau branché. En partant du front migrant, on trouve d'abord le complexe Arp2/3 et la capping protein sur les premiers micromètres (Iwasa & Mullins 2007; Lai et al. 2008) (Figure 34) formant le réseau branché dense qui exerce une pression et déforme la membrane plasmique. La capping protein "disparaît" à l'endroit où l'ADF/cofiline commence à désassembler le réseau (Iwasa & Mullins 2007). Enfin la tropomyosine vient stabiliser l'arrière du réseau de filaments d'actine qui ont été débranchés par l'ADF/cofiline. Cette zone est appelée le lamellum (LM).

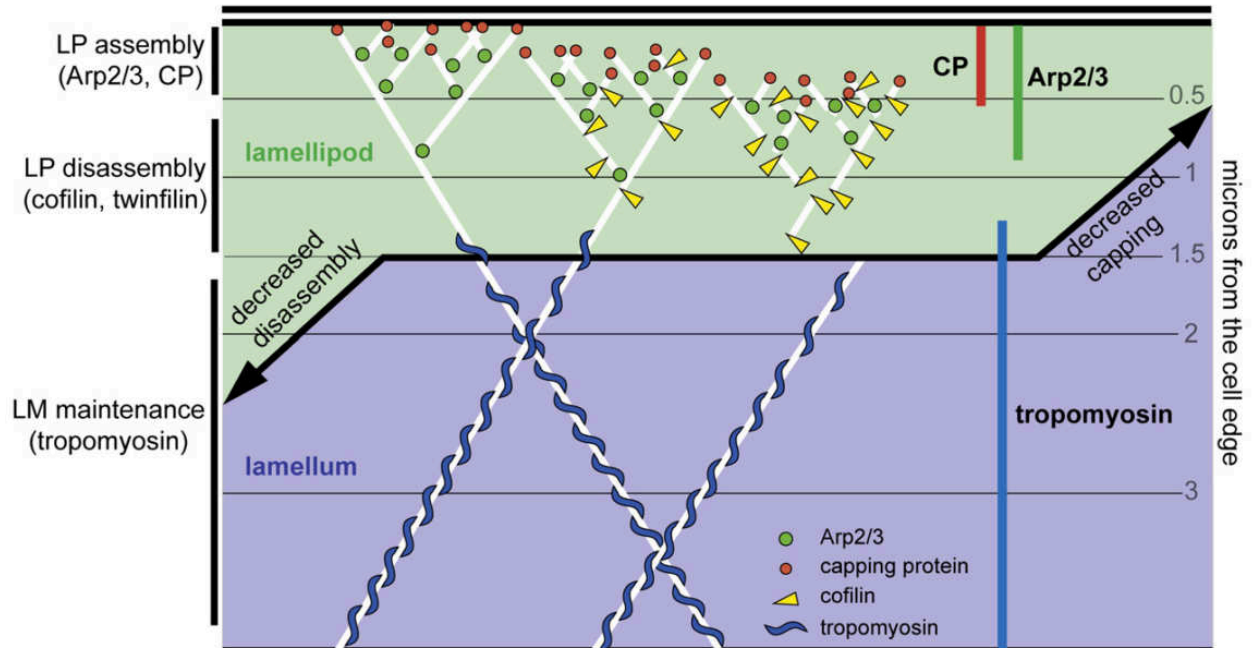


Figure 34 : Localisation de la capping protein, du complexe Arp2/3, de l'ADF/cofiline et de la tropomyosine dans le lamellipode (LP) et le lamellum (LM). (Tiré de Iwasa & Mullins 2007).

3.2. Modèle de nucléation dendritique

Le modèle qui explique et synthétise l'interaction entre ces différentes protéines est le modèle de nucléation dendritique, proposé pour la première fois par Pollard (Pollard et al. 2000) (Figure 35). Le modèle décrit l'assemblage, le désassemblage et le recyclage des filaments d'actine en 12 étapes.

Suite à un stimulus extracellulaire (1), les récepteurs membranaires impliqués dans l'assemblage de l'actine sont activés. La cascade de signalisation permet le recrutement de PIP_2 (un lipide essentiel dans les voies de signalisation de l'actine) et active des GTPases de la famille des Rho (2). Ces GTPases viennent activer les protéines de la famille WASP/Scar (3). Ces dernières mettent en contact un monomère d'actine et le complexe Arp2/3 avec un filament d'actine préexistant pour nucléer de nouvelles branches (4). L'élongation de ces filaments (5) va permettre d'exercer des forces sur la membrane pour la déformer vers l'avant (6). La capping protéine stoppe rapidement l'élongation des filaments (7) afin de densifier le réseau et créer un support sur lequel les nouveaux filaments s'appuient pour pousser la membrane. Les filaments d'actine du réseau vieillissent en hydrolysant leur ATP et dissociant leur phosphate (8) et se font décorer puis désassembler par l'ADF/cofiline (9). La profiline dissocie l'ADF/cofiline, catalyse l'échange du nucléotide (10) afin de créer un réservoir d'actine complexée à la profiline disponible pour la polymérisation à l'avant du réseau (11). Le désassemblage de la structure de filaments d'actine branchés est contrôlé par les inhibiteurs de l'ADF/cofiline, les kinases LIM (12).

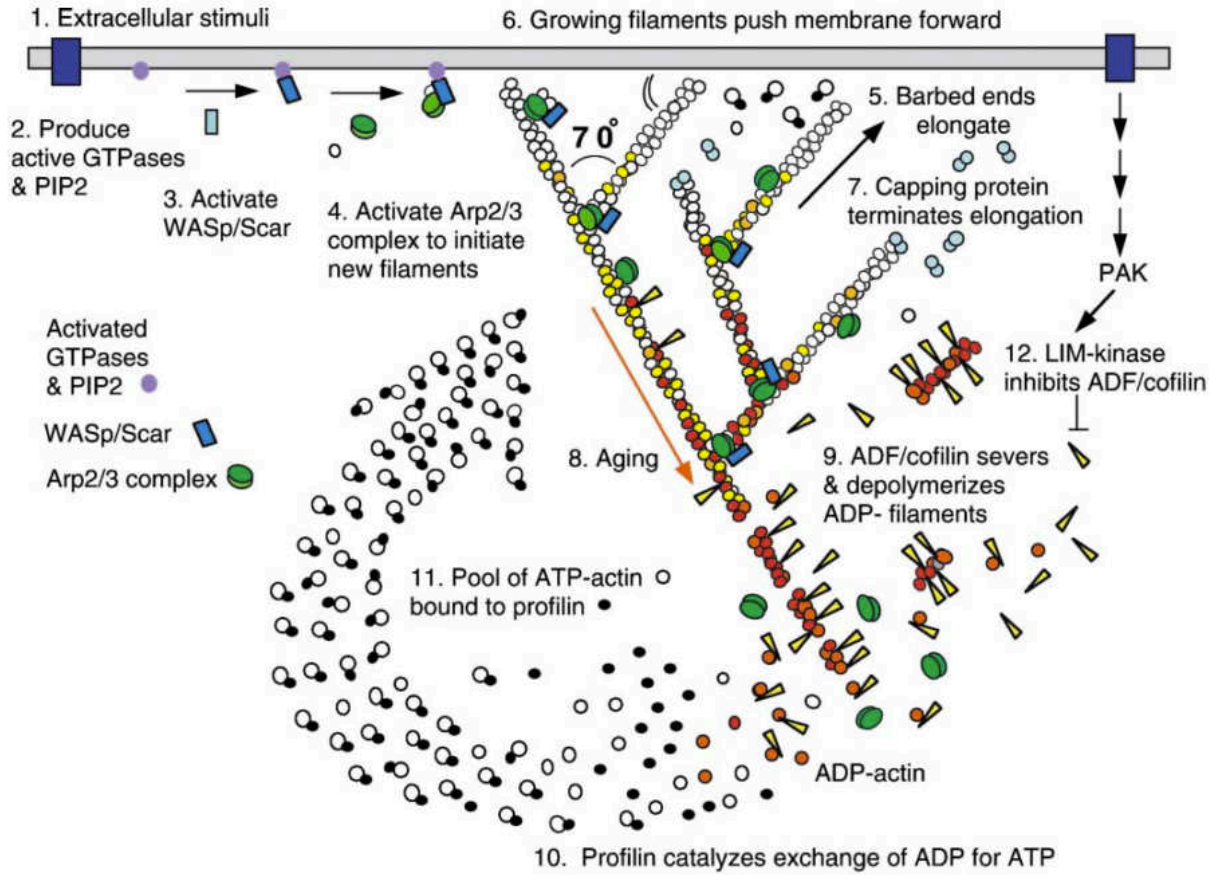


Figure 35 : Modèle de nucléation dendritique qui récapitule l'assemblage et le désassemblage d'un réseau d'actine branché formé à proximité de la membrane plasmique (Pollard et al. 2000).

Partie 3 : Dispositifs expérimentaux pour l'étude du cytosquelette d'actine *in vitro*

1. L'approche Bottom-Up : faire simple avant de faire compliqué

Historiquement, l'étude des processus biologiques a naturellement débuté par l'observation macroscopique du vivant pour aller vers le microscopique, grâce aux avancées technologiques. Cette approche, appelée approche descendante, dite "Top-Down", décrit un système dans sa globalité pour s'intéresser petit à petit à ses composants individuels. On pourrait prendre l'exemple de la sculpture qui dessine la forme générale avant de former les détails. Inversement, l'approche ascendante, ou "Bottom-Up", consiste à étudier les détails pour représenter le système global.

L'étude *in vitro* de la biologie moléculaire peut être abordée à partir de ces deux approches. L'approche "Top-Down", consiste à étudier les processus cellulaires à partir d'extraits cellulaires que l'on dissèque progressivement afin de connaître leur composition (Michelot et al. 2010) ou à partir d'organelles purifiées, afin de comprendre leur rôle (Wu et al. 2010; Heald et al. 1996). Cette démarche permet à mon sens de comprendre les phénomènes principaux. Cependant la meilleure façon de savoir si on comprend, c'est de le réaliser soi-même. Et nous n'aurons pas compris le fonctionnement d'une cellule, tant que nous ne serons pas capables d'en fabriquer une. Je me suis donc tournée vers une démarche "Bottom-Up", consistant à reconstituer des systèmes biologiques à partir de protéines purifiées, appelés "systèmes biomimétiques" (Loisel et al. 1999). Le but est de mettre en relation un jeu de protéines restreint, puis d'augmenter le degré de complexité :

- en variant le nombre, la concentration et l'activité des protéines (Blanchoin & Pollard 1998; Amann & Pollard 2001)
- en organisant les filaments d'actine en structures (comètes d'actine, micropatrons, Figure 36 c, d, e et f) (Loisel et al. 1999)
- en contrôlant spatialement la nucléation (micropatrons, Figure 36 e) (Michelot et al. 2007; Reymann et al. 2010)
- en modifiant la rigidité du substrat (vésicules, Figure 36 f) (Giardini et al. 2003; Delatour et al. 2008)

Parmi les différents systèmes biomimétiques actuels (Figure 36), j'ai choisi d'utiliser les deux dispositifs suivants : les comètes d'actine, pour reconstituer la motilité cellulaire et les micropatrons pour reconstituer les différentes architectures de filaments d'actine que l'on trouve dans la cellule (Michelot et al. 2007; Reymann et al. 2010).

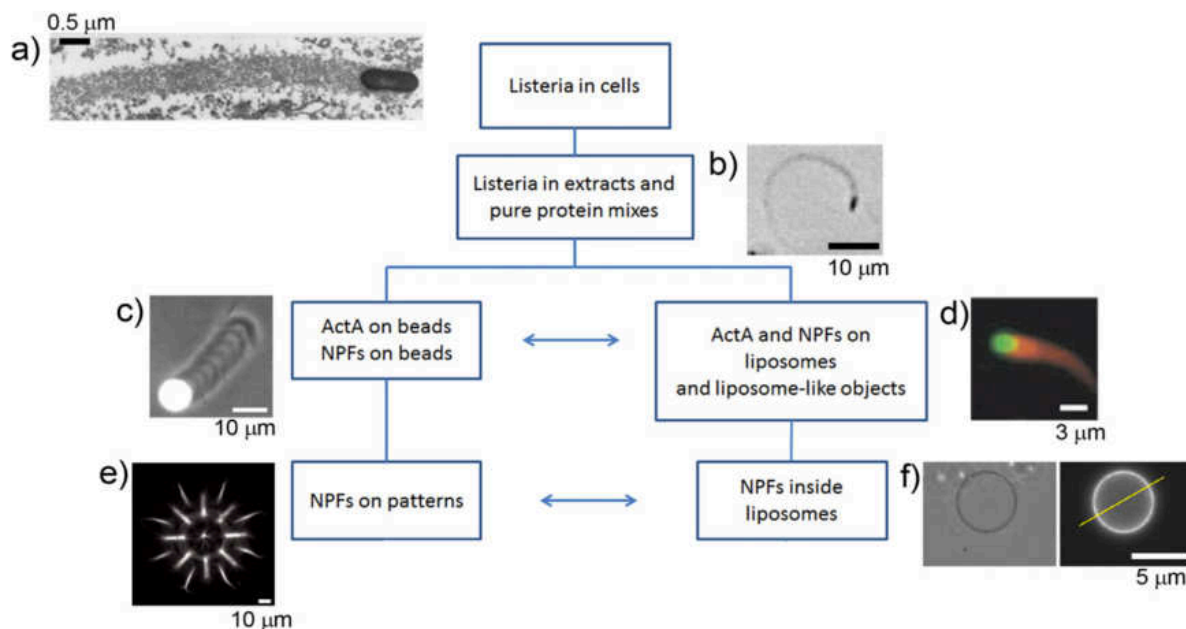


Figure 36 : Systèmes biomimétiques de la dynamique et la motilité basée sur l'actine.

La motilité cellulaire reconstituée *in vitro* (b) a été inspirée au départ par la bactérie *Listeria monocytogenes* (a). La famille de systèmes reconstitués peut être divisée en deux sous-groupes : la reconstitution sur substrat dur comme des billes (c) ou souple, comme des liposomes (d), impliquant dans les deux cas la nucléation de réseaux branchés par des facteurs promoteurs de nucléation (NPFs). L'innovation suivante a été dans un cas, la reconstitution des différentes structures sur micropatterns (e) et la reconstitution du cortex d'actine dans l'autre (f). Tiré de a) Kocks et al. 1992 b) Loisel et al. 1999 c) Bernheim-Groswasser et al. 2002 d) Giardini et al. 2003 e) Mendes Pinto et al. 2012 f) Pontani et al. 2009

Cette partie constituera une synthèse des systèmes biomimétiques que j'ai pu utiliser (les micropatrons et les essais de motilité sur billes), ainsi que les techniques d'imagerie adaptées.

2. Reconstitution des architectures de filaments d'actine *in vitro* : le micropatron

La première étude de ma thèse a porté sur la différence de décoration et d'efficacité de désassemblage de l'ADF/cofiline en fonction des différentes structures de filaments d'actine. Afin de pouvoir étudier *in vitro* les structures d'actine, j'ai appris la technique des micropatrons, un système biomimétique qui permet de reconstituer les trois grandes architectures cellulaires : le réseau branché, les filaments parallèles et les filaments antiparallèles (Reymann et al. 2010).

Les micropatrons ont été développés au départ pour la biologie cellulaire afin de reproduire les contraintes physiologiques (mécaniques et biochimiques) pour les cellules cultivées *in vitro* (Théry et al. 2006; Théry 2010). Ils ont été adaptés à l'échelle moléculaire pour contraindre spatialement la nucléation de filaments d'actine. La fabrication des deux types de micropatrons est donc similaire. Les lamelles en verre sur lesquelles les micropatrons sont développés sont d'abord lavées puis activées par un traitement plasma (Figure 37a). Un agent répulsif, le PLL-

PEG, est ensuite déposé sur la surface afin d'éviter les interactions non spécifiques des protéines sur le verre (Figure 37b). Des formes géométriques prédéfinies sont ensuite imprimées sur le PLL-PEG par insolation aux ultraviolets profonds à travers un masque en chrome opaque empreint de zones transparentes (Figure 37c). La surface est fonctionnalisée avec le facteur promoteur de nucléation pWA (domaine VCA additionné d'une région polyproline), qui vient s'adsorber uniquement sur le PLL-PEG dégradé (Figure 37d). La nucléation est ainsi spatialement contrôlée et contrainte aux "zones pWA" ou zone de nucléation (Figure 37 e et f).

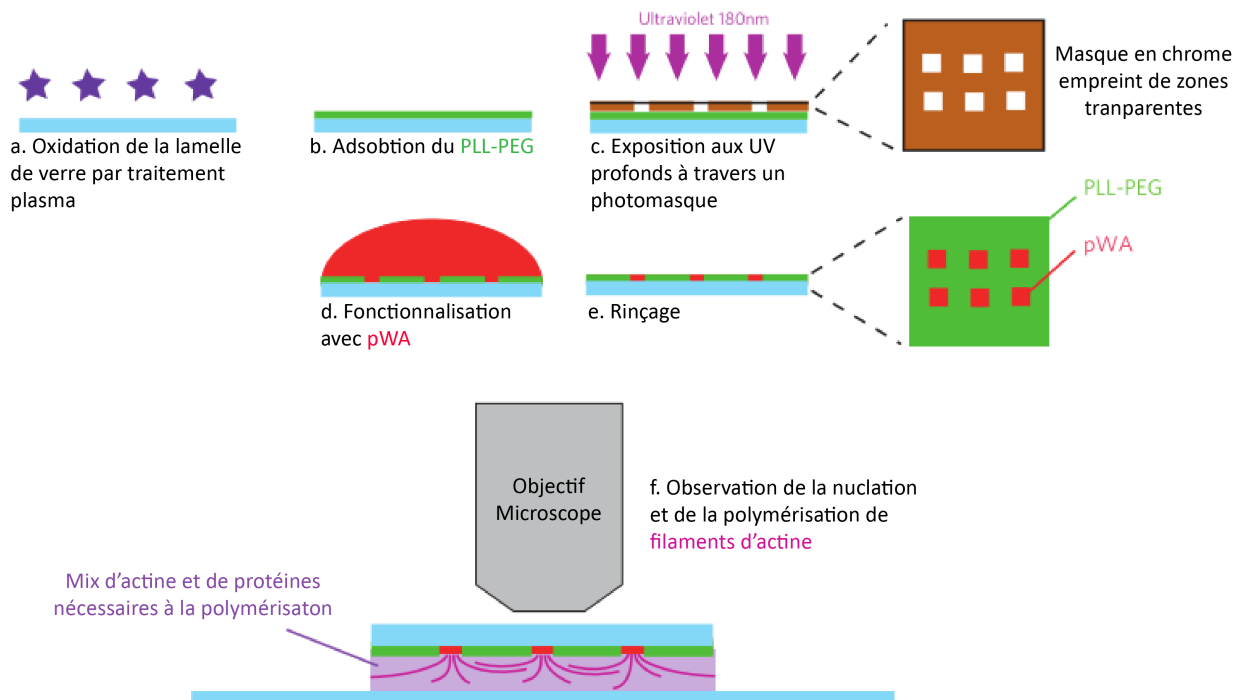


Figure 37 : Fabrication des micropatrons (Reymann et al. 2010).

Maintenant, comment obtenir les trois organisations de filaments d'actine à partir du micropatron ?

Le réseau branché est obtenu directement sur les zones de nucléation, puisque le complexe Arp2/3 ne pourra être activé et nucléer de nouvelles branches qu'à cet endroit. Les filaments nucléés forment un support pour de nouvelles branches tant qu'ils sont dans ces zones de nucléation, mais dès qu'ils en sortent, ils polymérisent linéairement et donc parallèlement puisque leur extrémité barbée est tournée vers l'extérieur. Un choix judicieux des formes géométriques permet alors de former des structures de filaments antiparallèles, comme par exemple un V avec un angle faible (Figure 38, 22°).

Le choix de la forme géométrique nous permet donc d'étudier la génération des différentes structures non pas en fonction du type de nucléateur, mais de la forme, l'orientation ou encore la distance entre deux zones de nucléation. Il a ainsi été reproduit la formation de faisceaux parallèles, en l'absence de formine (Figure 38, 112°).

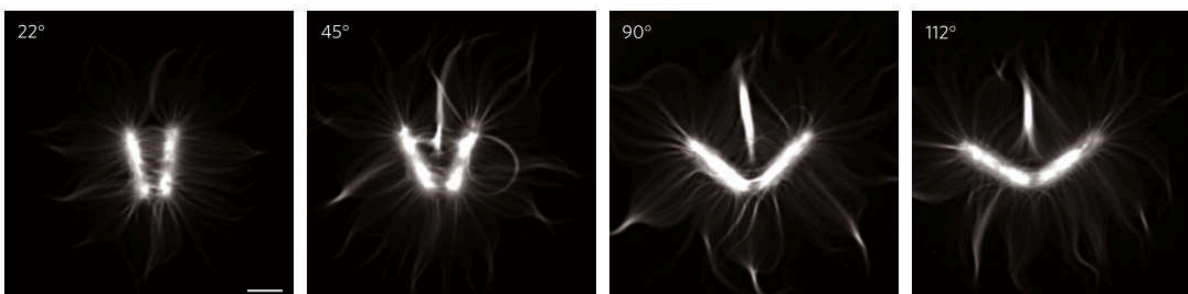


Figure 38 : Génération des trois organisations cellulaires de filaments d'actine.

Les filaments d'actine polymérisent à partir des deux zones de nucléation rectangulaires formant un angle variant de 22° à 112° et se rencontrent en filaments antiparallèles à la base du V et en filaments parallèles à l'extérieur. La proportion de filaments antiparallèles et de filaments parallèles est déterminée par l'angle que forme les zones de nucléation. Echelle 10 μm (Reymann et al. 2010).

Le micropatron est un très bon outil pour reproduire *in vitro* les architectures de filaments d'actine présentes *in vivo*, cependant des limitations sont à prendre en compte. En effet, les zones de nucléation sont fixes, contrairement aux zones de nucléation *in vivo*, telles que les patches d'endocytose ou le lamellipode qui évoluent dans le temps en fonction des stimuli extérieurs. De plus, les micropatrons sont réalisés sur une surface solide, du verre, alors que *in vivo* la membrane plasmique est souple et se déforme sous l'effet des réseaux d'actine. Enfin, la structure même des câbles d'actine générée par les micropatrons ne reflète pas la réalité cellulaire puisque *in vivo* les faisceaux d'actine sont composés de filaments très courts contrairement à ceux du micropatron.

Pour la première étude de ma thèse, les micropatrons ont été mis à profit pour une tout autre approche. Des architectures prépolymérisées ont servi de support pour mettre en évidence le tri de protéines suivant ces architectures et leur efficacité de fragmentation.

3. Reconstitution de la motilité cellulaire *in vitro*

3.1. Modèle *in vivo* : La bactérie *Listeria monocytogenes*

La bactérie *Listeria monocytogenes* est le modèle de base pour l'étude de la motilité cellulaire dépendante de l'actine de par ses similarités avec le lamellipode (Tilney et al. 1992).

Listeria monocytogenes est un organisme unicellulaire qui infecte les cellules de mammifères (Figure 39a) (Tilney & Portnoy 1989). Une fois que la bactérie a pénétré dans le cytoplasme de la cellule hôte, la bactérie ne se déplace pas grâce à un flagelle mais en détournant à son profit les éléments du cytosquelette d'actine présent dans son environnement. La *Listeria* a en surface un peptide d'activation du complexe Arp2/3, qui lui donne la capacité de nucléer des filaments d'actine à sa surface grâce à l'actine monomérique disponible dans le cytoplasme. Ces filaments s'organisent en un réseau branché qui propulse la bactérie, appelé "comète d'actine"

(Cáceres et al. 2015) (Figure 39b). La comète d'actine est une structure de filaments d'actine polarisés, avec leur extrémité barbée orientée vers la surface du pathogène (Tilney & Portnoy 1989). La polymérisation de la comète peut propulser la bactérie à des vitesses pouvant atteindre 1 μm par seconde (Dabiri et al. 1990).

La comète de *Listeria monocytogenes* ressemble à un lamellipode simplifié. En effet, la surface de la bactérie se comporte comme la membrane plasmique au front migrant du lamellipode. Les monomères d'actine de la cellule hôte s'incorporent préférentiellement à proximité de la surface de la bactérie (Tilney et al. 1992). Les filaments d'actine de la comète sont fixes et forment un réseau dense sur lequel les filaments nouvellement nucléés s'appuient pour faire avancer la bactérie, de la même façon que le lamellipode (Theriot & Mitchison 1991; Theriot et al. 1992). Ces points communs entre la comète et le lamellipode viennent du fait que leurs mécanismes de nucléation sont analogues. En effet, la protéine exprimée à la surface de la bactérie, ActA, fonctionne d'une manière semblable à WASP, c'est-à-dire en mettant en contact le complexe Arp2/3 activé, un monomère et un filament d'actine préexistant par son domaine VCA (Boujemaa-Paterski et al. 2001; Zalevsky et al. 2001). La protéine de coiffe va ensuite arrêter la polymérisation des extrémités barbées pour densifier le réseau et favoriser la nucléation de nouveaux filaments. Les "vieux" filaments sont déplacés vers l'arrière de la comète, puis désassemblés par ADF/cofiline (Rosenblatt et al. 1997).

La comète de *Listeria monocytogenes* a été prise pour référence pour l'étude de la motilité cellulaire, de par sa structure et sa dynamique similaires à celles du lamellipode (Bugyi et al. 2008). Elle a d'abord été étudiée pour comprendre le lamellipode (David et al. 1998; Cameron et al. 2000) puis imitée pour reconstruire *in vitro* la motilité basée sur le cytosquelette d'actine (Loisel et al. 1999).

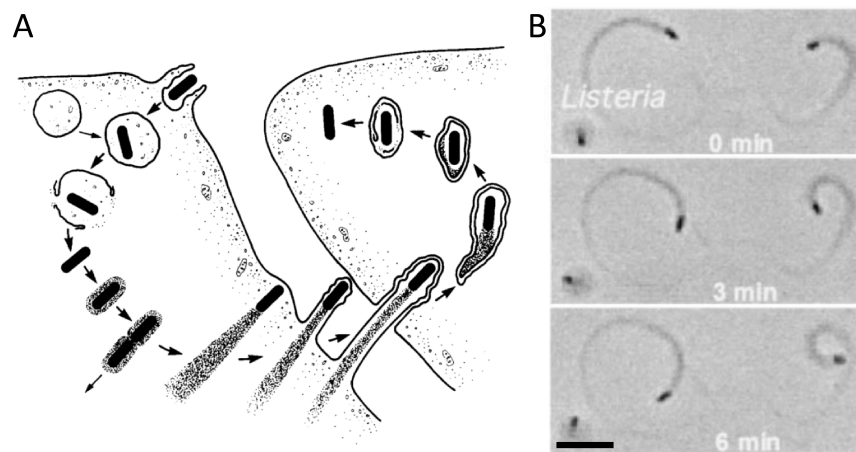


Figure 39 : Infection et dynamique de la bactérie *Listeria monocytogenes*.

A) La bactérie est phagocytée par la cellule, détruit la membrane phagosomale qui l'entoure, se divise et forme une comète d'actine, un réseau branché grâce auquel elle se propulse et infecte la cellule suivante (Tilney & Portnoy 1989). B) Dynamique de *Listeria monocytogenes*. Echelle 10 μm (Loisel et al. 1999).

3.2. Reconstitution *in vitro* : Essais de motilité sur billes pWA

La comète d'actine a été reconstituée *in vitro* par l'approche Bottom-Up à partir de protéines purifiées pour la première fois par Loisel en 1999. Des *Listeria monocytogenes* (qui expriment la protéine ActA à leur surface) ont été mises en présence de quatre protéines pour déclencher et maintenir la polymérisation de la comète d'actine : F-actine, Arp2/3, capping protein et ADF/cofiline. Parmi ces protéines, toutes sont essentielles à la motilité excepté l'ADF/cofiline qui accélère le mouvement des bactéries.

Par la suite, les bactéries ont même pu être remplacées par des microbilles recouvertes d'ActA, les comètes étant ainsi reconstituées dans un système complètement artificiel (Bernheim-Groswasser et al. 2002; Cameron et al. 1999). Il a été montré qu'un jeu de quatre protéines était suffisant pour mimer *in vitro* une comète d'actine de *Listeria* (Figure 40) : l'actine, le complexe Arp2/3, la capping protein et un activateur du complexe Arp2/3 tel que Acta.

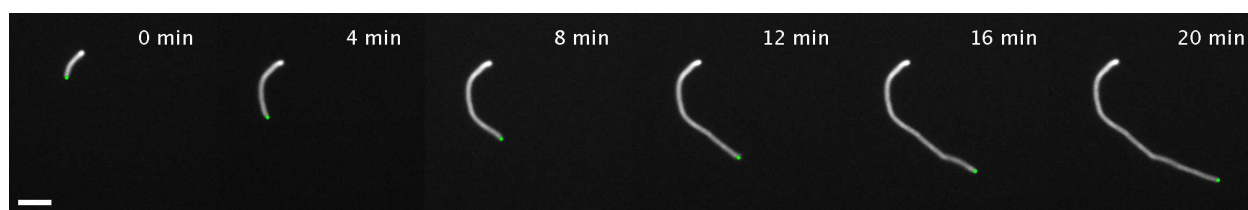


Figure 40 : Reconstitution *in vitro* d'une comète d'actine par imitation de la motilité de la bactérie *Listeria monocytogenes*.

Les billes (vert), sur lesquelles ont été adsorbées des protéines activatrices du complexe Arp2/3, sont mises en présence d'actine monomérique, de complexe Arp2/3 et de capping protein, échelle 10 μm .

Contrairement aux *Listeria monocytogenes*, qui expriment ActA à leur surface de façon inhomogène pour contrôler la direction du mouvement (Lambrechts et al. 2008), les microbilles sont fonctionnalisées uniformément. La polymérisation, et donc le réseau branché, induits à leur surface sont homogènes et forment une coque de filaments d'actine rigide (Figure 41 à 70 s). Les forces internes au réseau en croissance amènent à la rupture de la structure, appelée "brisure de symétrie" (Figure 41 à 106 s), de la même manière qu'un ballon trop gonflé éclaterait. L'addition de nouvelles sous-unités d'actine sur les filaments à la surface de la bille, rendue possible grâce au mouvement brownien (Peskin et al. 1993), propulse la bille dans la direction de la brisure de symétrie : la motilité est enclenchée (Figure 41 à 344 s).

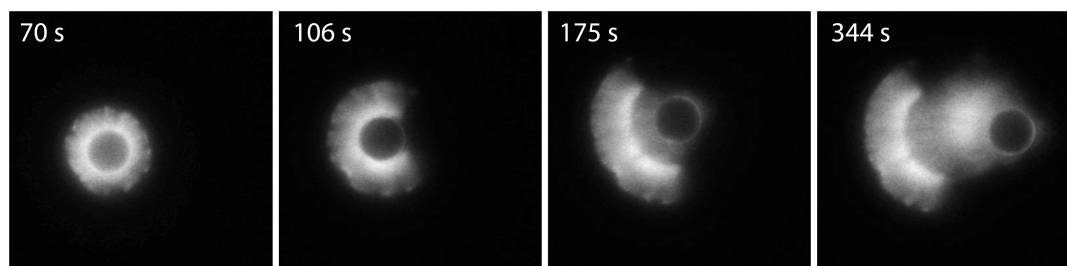


Figure 41 : Brisure de symétrie engendrée par la création de forces internes (Dayel et al. 2009).

L'équilibre entre les concentrations des protéines, greffées sur la bille ou en solution, est essentiel pour la formation de la comète. En effet, les variations de concentrations donnent des "courbes en cloche", avec pour chacune une concentration optimale (Loisel et al. 1999). Prenons l'exemple de la capping protein (CP) : en absence de CP, les filaments sont libres de pousser, le réseau branché est peu dense et se transforme rapidement en filaments parallèles inefficaces pour la motilité (Figure 42a). À faible concentration de CP, même si la coque est brisée, la plupart des monomères sont ajoutés sur les filaments dont les extrémités barbées sont libres, empêchant une motilité rapide (Figure 42b). À concentration intermédiaire et donc optimale de CP, tous les filaments sont bloqués par CP, les monomères sont recrutés pour la nucléation de nouveaux filaments à la surface de la bille, permettant sa motilité (Figure 42c). Enfin, en présence de trop de CP, la polymérisation est totalement inhibée (Figure 42d). Pour chacune des protéines mises en jeu, il faut trouver sa concentration optimale pour la motilité.

La comète d'actine est structurellement et dynamiquement semblable à la comète de *Listeria* et donc du lamellipode. Cela fait d'elle le système biomimétique le plus adapté pour étudier la dynamique du turnover. J'ai donc choisi de l'utiliser dans ma deuxième étude, qui porte sur la reconstitution du turnover en milieu confiné.

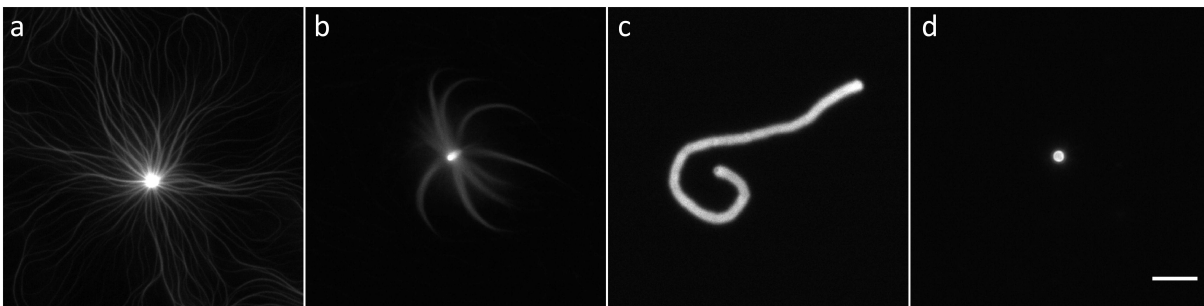


Figure 42 : Formation de différentes structures de filaments d'actine en fonction de la concentration de capping protein.

Une seule concentration de CP va permettre de déclencher une motilité efficace (c). En absence (a), à trop faible (b) ou à trop forte (d) concentration de CP, les conditions pour la motilité ne sont pas requises. Echelle 20 μm .

3.3. Génération des forces dans un réseau d'actine : concepts physiques

La combinaison adéquate des bonnes protéines aux bonnes concentrations permet de reconstituer la motilité cellulaire des comètes d'actine de *Listeria* et du lamellipode des cellules de vertébrés. Cependant, comment les forces déployées sont-elles générées ? Pour le comprendre, la recherche s'est d'abord tournée vers des modèles physiques décrivant la motilité cellulaire, la technologie n'étant pas assez poussée à l'époque pour mesurer les forces *in vitro*. En 1993, Peskin propose que la force générée par les comètes d'actine vienne directement de la polymérisation

d'un filament d'actine qui exerce une force axiale sur la surface avec laquelle il est en contact (Figure 43 A) (Peskin et al. 1993).

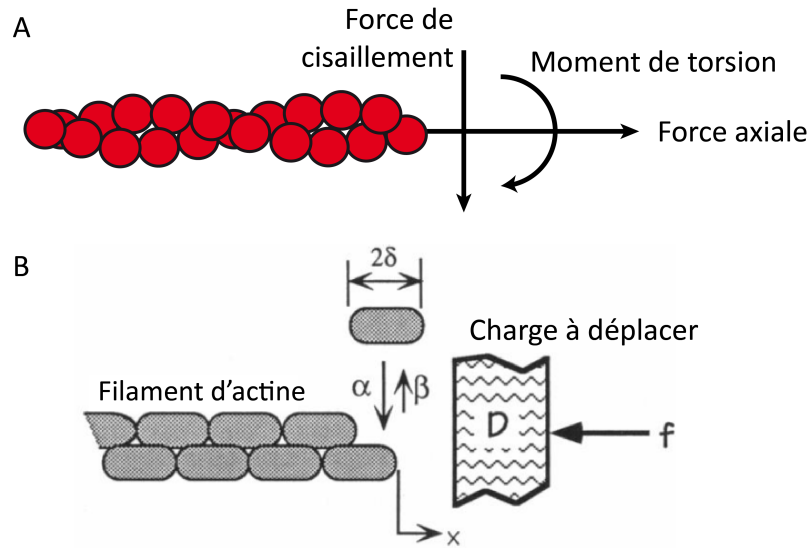


Figure 43 : Modèle du cliquet brownien.

A) Forces exercées sur un filament d'actine : la force axiale, alignée avec l'axe du filament, le moment de torsion relié à la flexibilité et donc à la longueur de persistance du filament et la force de cisaillement exercée perpendiculairement au filament. B) Description du modèle de cliquet brownien. Un filament d'actine est capable d'exercer une force axiale sur une charge grâce à l'ajout de sous-unités entre l'extrémité du filament et la charge. La place est donnée par la fluctuation thermique de la charge. α et β sont les constantes de polymérisation et de dépolymérisation, 2δ est la longueur d'une sous-unité, D la constante de diffusion et f la force qui résiste au filament d'actine (Peskin et al. 1993).

Le filament est modélisé comme un bâton rigide et fixe, au bout duquel viennent s'ajouter des sous-unités d'actine. A chaque sous-unité ajoutée, le filament exerce une force sur la surface à déplacer (membrane ou bactérie). Pour que cette sous-unité puisse s'ajouter, il faut créer un gap suffisant entre le filament et la surface pour qu'elle ait la place de se fixer à l'extrémité du filament. Pour cela, le mouvement brownien des particules, c'est-à-dire le déplacement aléatoire dû au choc avec de plus petites particules, est pris en compte. Comme le filament est considéré rigide, c'est la charge à pousser (surface) qui subit le mouvement brownien et se décale suffisamment pour permettre à une sous-unité de s'attacher au filament d'actine entre l'extrémité et la charge (Figure 43 B).

Cependant ce premier modèle n'est pas suffisant pour expliquer pourquoi les vitesses des bactéries *Listeria* et *Shigella* sont les mêmes alors que leur masse est différente. En effet, la vitesse devrait normalement dépendre de la masse de la charge à déplacer, ce qui n'est pas le cas (Goldberg & Theriot 1995). De plus le réseau branché n'est pas formé de faisceaux linéaires poussant tous dans la même direction, mais de filaments approximativement orthogonaux (Hartwig 1992). Mogilner and Oster 1996 ont donc proposé un modèle plus complet "elastic brownian ratchet", qui donne la vitesse de polymérisation effective en prenant en compte le poids de la charge à pousser et l'angle que forme le filament par rapport à la charge (Mogilner & Oster 1996) (Figure 44).

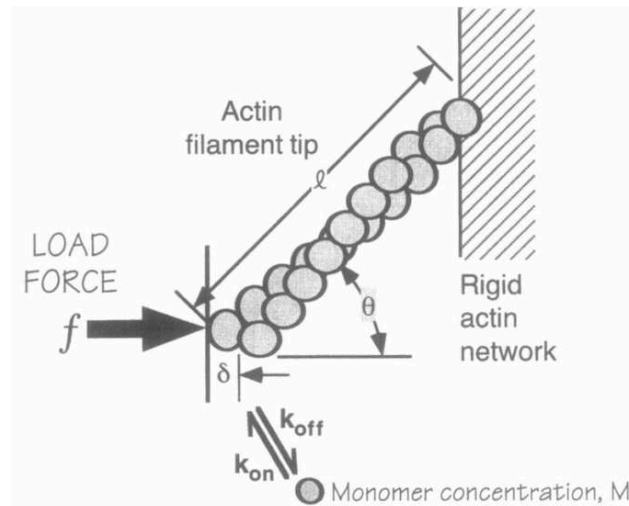


Figure 44 : Modèle du cliquet brownien élastique.

Dans ce modèle, la force exercée par un filament d'actine est modélisée sur la même base que le cliquet brownien (Figure 43), mais en prenant en compte la flexibilité du filament et l'angle θ qu'il forme avec la charge à pousser f ("load force"). Le réseau d'actine est considéré comme rigide après le premier pontage (par un complexe Arp2/3 ou une protéine de réticulation). Le filament a une longueur l , la vitesse de polymérisation est donnée par $k_{on} M - k_{off}$ et 2δ est la taille d'une sous-unité d'actine (donc δ est le gap minimum nécessaire pour intercaler une nouvelle sous-unité à l'extrémité du filament). (Tiré de Mogilner & Oster 1996).

Ce modèle de cliquet brownien élastique se rapproche des modèles mésoscopiques, tels que le modèle de Bernheim-Groswasser, qui considère le réseau d'actine dans son ensemble comme un matériau viscoélastique : il se déforme, emmagasine de l'énergie et la restitue en reprenant sa forme initiale et en exerçant la force nécessaire pour la motilité. La vitesse de la bille est donnée par la balance entre la force élastique du réseau qui propulse la bille et la force de friction à la surface de la bille (Bernheim-Groswasser et al. 2005). Le comportement viscoélastique a aussi été prouvé plus tard *in vitro*, en exerçant deux forces de traction aux extrémités de la comète (Figure 45 A et C) : à faible déformation, la force exercée est d'abord proportionnelle à la longueur de la comète (Figure 45 B), ce qui est typique d'un matériau élastique, puis lorsque la traction dépasse un seuil, la force diminue alors que la longueur continue à augmenter, montrant que le réseau se déforme de manière irréversible (Figure 45), puis se scinde en deux, ce qui est caractéristique d'un matériau visqueux, tel un caramel mou.

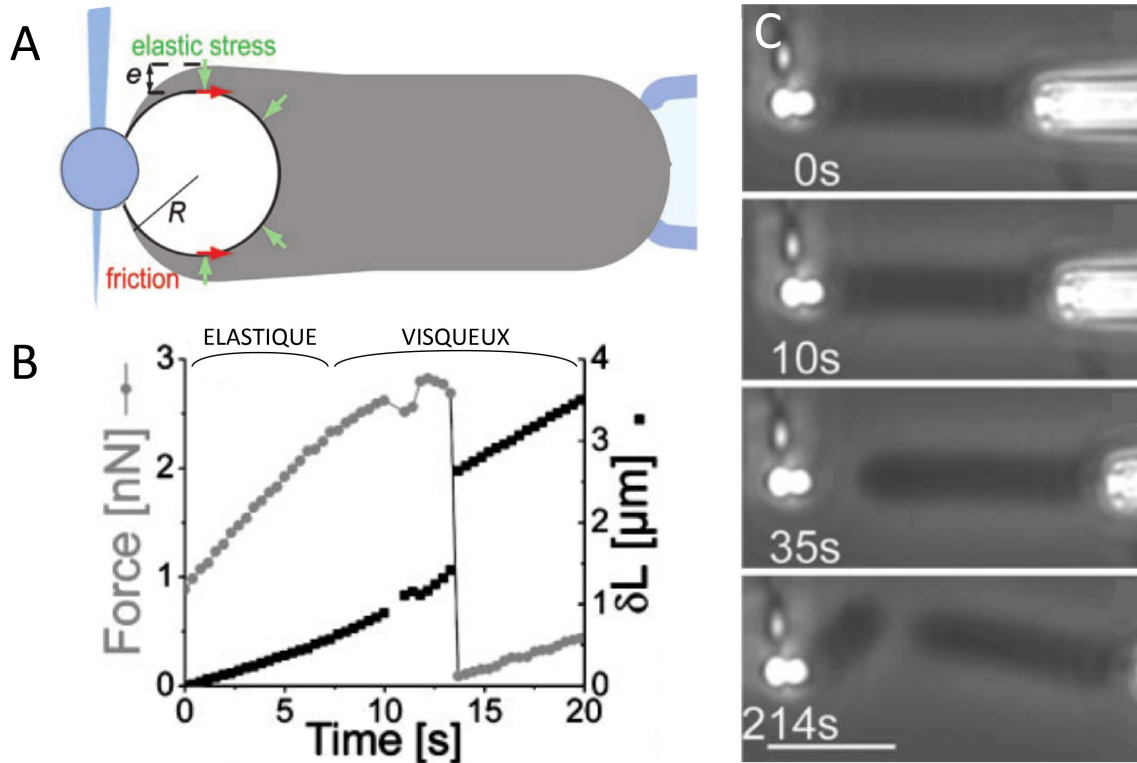


Figure 45 : Modèle viscoélastique d'un réseau d'actine branché et réticulé.

A) Le réseau d'actine croît à partir d'une bille de rayon R accrochée à une sonde de force (rond bleu) et attachée à l'autre extrémité à une micropipette. B) Représentation de la force et du déplacement (longueur de la comète moins la longueur initiale) en fonction du temps montrant que la comète suit un comportement viscoélastique. C) Time-lapse de la comète au cours du temps subissant une traction sur ses deux extrémités. Echelle 10 μm . Tiré et modifié à partir de (Marcy et al. 2004).

4. L'imagerie adaptée au niveau d'organisation des filaments d'actine

L'observation du cytosquelette peut se faire à plusieurs échelles : à l'échelle atomique (Schutt et al. 1993; Paavilainen et al. 2002), à l'échelle moléculaire (Rodal et al. 2005), à celle du filament d'actine (Kamasaki et al. 2007; Suarez et al. 2011) ou encore à celle de la structure de filaments (Lai et al. 2008; Ennomani et al. 2016). Chaque échelle d'observation va nécessiter un système d'imagerie adapté, de la cristallographie jusqu'au microscope à épifluorescence en passant par le microscope électronique (EM) ou le microscope à onde évanescente (TIRF).

Je détaille ici les deux techniques d'imagerie utilisées durant ma thèse : la microscopie à onde évanescente (TIRF) pour l'étude des filaments d'actine individuels et le microscope à épifluorescence pour celle des structures de filaments.

4.1. Le microscope à épifluorescence pour imager les structures organisées

Au sein de notre laboratoire, la visualisation des protéines se fait par microscope à fluorescence. Pour être visibles, celles-ci sont marquées par des fluorophores, molécules chimiques qui émettent de la lumière après excitation par une onde électromagnétique de longueur d'onde adaptée (en d'autres mots, de la lumière). Le microscope à épifluorescence est le microscope le plus simple pour imager ces molécules. Son principe repose sur la propriété des fluorophores d'être excités à une certaine longueur d'onde et de réémettre de la lumière à une autre longueur d'onde. Le microscope va donc, par le jeu de miroirs et de filtres, envoyer de la lumière à la longueur d'onde d'excitation du fluorophore et capter, par un autre chemin optique, la lumière émise du fluorophore (Figure 46).

Ce système d'imagerie est adapté à l'observation des organisations de filaments d'actine. En effet, sa résolution de 200 nm permet tout à fait de visualiser la dynamique de ces structures de plusieurs dizaines de microns (Figure 40). Sa résolution devrait en théorie nous permettre d'observer des filaments d'actine de plusieurs microns, cependant la lumière émise par les fluorophores d'un filament individuel est noyée dans le bruit de fond généré par les fluorophores en solution. Pour pallier ce problème, les filaments sont polymérisés en présence de phalloïdine qui les stabilise et empêche leur dépolymérisation même en présence d'une concentration d'actine G inférieure à la concentration critique de $0,1 \mu\text{M}$ (Blanchoin et al. 2000a). Une fois polymérisés et stabilisés, les filaments peuvent donc être dilués et imagés au microscope à épifluorescence sans bruit de fond. Cette solution permet d'observer la fluctuation des filaments à l'équilibre, contrairement au microscope électronique. Cependant il n'est pas possible d'observer la dynamique de polymérisation et de désassemblage des filaments. Il a fallu pour cela attendre le microscope à onde évanescente.

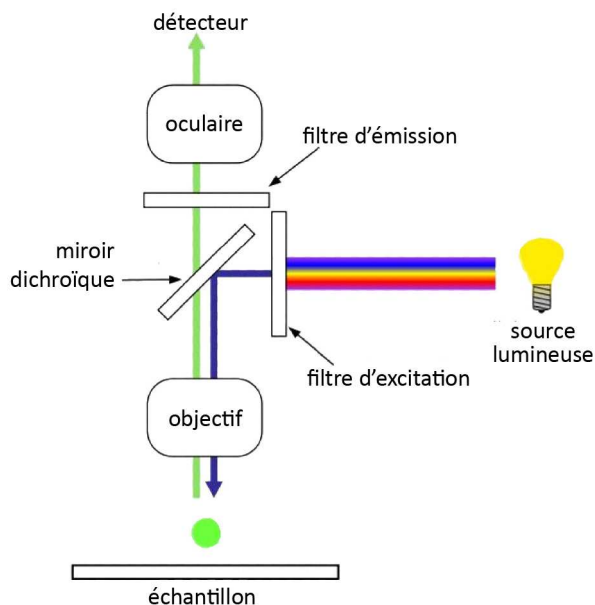


Figure 46 : Principe du microscope à épifluorescence.

(Tiré et modifié du site internet : <http://scsharpei.com/component/epifluorescence-microscope>)

4.2. Microscopie à Onde Evanescente ou Total Internal Reflexion Fluorescence Microscopy (TIRF)

Le microscope à onde évanescente ou Total Internal Reflexion Fluorescence microscopy (TIRFm) permet l'observation d'objets microscopiques à la surface d'un échantillon. Pour ce faire, un faisceau laser est envoyé en réflexion totale sur la surface de la lamelle, créant ainsi une onde évanescente dans l'échantillon qui diminue exponentiellement et disparaît en moins de 200 nm (Figure 47A). Seuls les fluorophores qui se trouvent dans les 200 premiers nanomètres de l'échantillon seront excités et émettront de la lumière, permettant ainsi d'éviter le bruit de fond engendré par les fluorophores en solution (Ambrose 1956). Le TIRFm est donc adapté à la visualisation d'événements dynamiques, tels que la polymérisation de filaments d'actine à proximité de la surface. (Figure 47B).

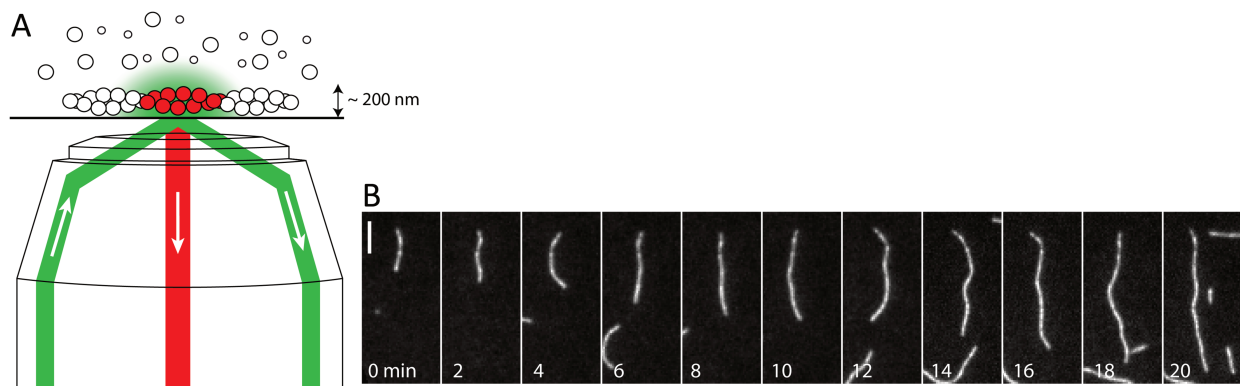


Figure 47 : TIRFm ou microscope à onde évanescente.

A) Principe du TIRFm : le faisceau laser d'excitation (vert) vient en incidence totale sur la lamelle et crée une onde évanescente (auréole verte). Celle-ci excite uniquement les fluorophores en surface (rouge) qui émettent une lumière d'une autre longueur d'onde (rouge). B) Observation de filaments individuels en TIRFm, échelle 5 μm .

Sur la Figure 47, on remarquera que l'extrémité pointue non dynamique se trouve en haut tandis que l'extrémité barbée dynamique se trouve en bas. À partir de ces images et de la concentration d'actine monomérique, il est possible de déterminer la constante de vitesse d'association de l'actine k_+ .

En reprenant l'équation (3) et en l'adaptant pour un filament :

$$V = k_+ [\text{monomères}] L_{\text{monomère}}$$

V k_+ $[\text{monomères}]$ $L_{\text{monomère}}$	Vitesse de polymérisation d'un filament d'actine en $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ Constante de vitesse d'association en $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ Concentration en actine monomérique en μM ($\mu\text{mol/L}$) Longueur d'un monomère d'actine en μm
---	---

Le filament d'actine montré en Figure 47B polymérise à la vitesse de $14,8 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$. La concentration en monomère est de $0,7 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,8 \text{ }\mu\text{M}$ - concentration critique $0,1 \text{ }\mu\text{M}$) et il y a 360 sous-unités dans $1 \text{ }\mu\text{m}$ de filament (soit une sous-unité tous les $2,77 \text{ nm}$ environ), ce qui donne une constante de vitesse d'association égale à $7,2 \text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Mise à part l'observation de la polymérisation de filaments d'actine, la technologie TIRF est aussi adaptée pour visualiser l'interaction des filaments avec d'autres protéines. Dans le cadre de ma première étude, j'ai ainsi pu étudier le mécanisme de désassemblage d'un filament d'actine par l'ADF/cofiline. Ce mécanisme particulier m'a amenée à vouloir compter le nombre de molécules d'ADF/cofiline nécessaires à la fragmentation d'un filament. Cependant compter des molécules signifie pouvoir détecter une molécule de l'ordre du nanomètre, ce que la résolution de 200 nm ne permet pas. J'ai donc mis en place un protocole expérimental pour pousser la microscopie jusqu'à l'observation de molécules uniques.

La technique d'imagerie de molécule unique est basée sur l'optimisation des conditions expérimentales et des paramètres d'acquisition du microscope. Les molécules à imager doivent au départ être fixées sur leur substrat afin de pouvoir augmenter la puissance du laser et le temps d'exposition pour capter un signal supérieur au seuil de détection. De nombreuses applications de cette technique ont pu être mises en place telles que l'observation de myosines sur des filaments stabilisés (Funatsu et al. 1995), la localisation et le compte de molécules (Wu & Pollard 2005; Cocucci et al. 2012), ou encore l'interaction moléculaire (Jain et al. 2012). L'amélioration des systèmes de détection a aussi permis de discerner des molécules uniques en mouvement, comme par exemple la diffusion de lipides marqués par un fluorophore au sein d'une membrane lipidique (Schmidt et al. 1996).

Pour notre étude, nous avons adapté notre microscope TIRF pour l'observation de molécules uniques afin de pouvoir compter le nombre de molécules d'ADF/cofiline nécessaires à la fragmentation d'un filament d'actine.

Partie 4 : Limitations des modèles biologiques et des dispositifs expérimentaux au commencement de ma thèse.

Le but de ma thèse était de comprendre les différentes étapes du turnover (Figure 48) et pouvoir *in fine* reconstituer le turnover de l'actine *in vitro*. Avant que je commence ma thèse, seuls les mécanismes de nucléation et d'assemblage des filaments d'actine en structures organisées étaient clairs et acceptés par la communauté. Comme nous le verrons, les bases du mécanisme de désassemblage et du recyclage de l'actine étaient connues mais plusieurs points restaient en suspens. On ne savait toujours pas clairement comment la cellule désassemble efficacement ses structures d'actine à une vitesse supérieure à 1-2 μm par minute (Lai et al. 2008), ni exactement quels étaient tous les facteurs moléculaires impliqués. Enfin, nous ne savions pas comment les sous-unités d'actine provenant du désassemblage pouvaient être recyclées pour reconstituer le réservoir de monomères ATP.

Une deuxième difficulté qui se posait était celle du dispositif expérimental. Les systèmes biomimétiques actuels cherchent à mimer de plus en plus l'environnement cellulaire, et la problématique de la taille du système émerge. En effet, nos dispositifs expérimentaux sont des chambres à flux, contenant quelques dizaines de microlitres de réactifs (entre 10 et 30 μl). Les cellules cependant sont des environnements restreints et confinés, de volume pouvant être jusqu'à 100 000 fois plus faible que celui des chambres à flux. Cette nouvelle dimension pose alors les questions de la quantité restreinte de protéines disponible pour les cellules et de la diffusion des protéines dans le milieu, qui sont souvent des facteurs qui ne sont pas pris en compte dans nos expériences actuelles, mais qui à l'échelle de la cellule n'ont pas le même impact.

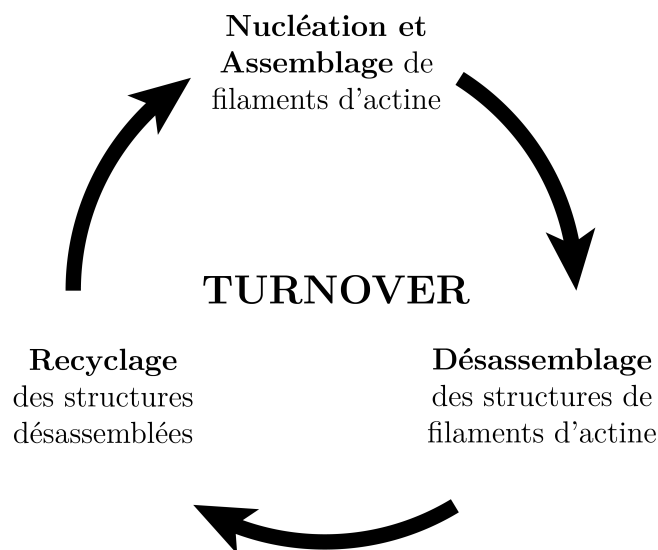


Figure 48 : Turnover de l'actine en 3 étapes : l'assemblage, le désassemblage et le recyclage des filaments d'actine.

1. Le turnover *in vitro*

L'étude du turnover a débuté par l'observation *in vivo* d'un cycle d'assemblage et de désassemblage des structures de filaments d'actine, par exemple chez les cellules motiles comme les fibroblastes et les *Listeria monocytogenes* ou encore les patches d'actine chez les levures bourgeonnantes (Welch et al. 1997b). Il a vite été mis en évidence que des facteurs supplémentaires étaient nécessaires pour expliquer la rapidité du turnover en comparaison avec la vitesse de désassemblage *in vitro* (Lappalainen & Drubin 1997). L'ADF/cofiline a été une des premières protéines impliquées dans le turnover en améliorant la vitesse de désassemblage des structures de filaments d'actine, par exemple celle des patches d'endocytose chez la levure bourgeonnante (Lappalainen & Drubin 1997). Les recherches se sont ensuite tournées vers les systèmes *in vitro* pour comprendre comment cette machinerie fonctionnait.

La biochimie a pu confirmer l'action de l'ADF/cofiline dans l'accélération du désassemblage mais seulement aux extrémités pointues des filaments d'actine (Carlier et al. 1997; Ressad et al. 1999). La reconstitution de la motilité *in vitro*, avec par exemple des *Listeria* plongées dans des extraits cellulaires, a mis en évidence le fait que la déplétion de l'ADF/cofiline augmentait la taille des comètes, déséquilibrant ainsi le système. L'ADF/cofiline n'ayant par contre aucun effet sur l'assemblage, elle était ainsi impliquée dans le désassemblage (Rosenblatt et al. 1997). De plus, le temps de vie des filaments d'actine est dépendant de l'état du nucléotide (Rosenblatt et al. 1997), de par l'action de l'ADF/cofiline régulée par celui-ci comme nous l'avons vu précédemment. Plus récemment, la reconstitution de la motilité sur billes à partir d'un jeu de protéines limité, nous a permis d'observer que l'ADF/cofiline seule était aussi capable d'augmenter le turnover en fragmentant aléatoirement le réseau branché et en détachant des morceaux de réseau visibles macroscopiquement (Reymann et al. 2011). Enfin, un deuxième système de motilité reconstitué à partir de formines adsorbées sur des billes (Romero et al. 2004; Michelot et al. 2007) montre que l'action de l'ADF/cofiline dépend de la nature du faisceau d'actine. En effet, l'ADF/cofiline est capable de fragmenter un filament individuel qui subit les fluctuations thermiques, mais dès lors que les filaments sont compactés en faisceaux, leur rigidité augmente et l'ADF/cofiline n'est plus en mesure de les désassembler (Michelot et al. 2007). Lorsque des filaments polymérisent à la surface d'une bille, l'ADF/cofiline va sélectionner les filaments individuels et laisser polymériser les câbles d'actine, créant ainsi un réseau polarisé (Figure 49). La formation d'oligomères d'actine provenant du désassemblage renforce d'autant plus la polymérisation des câbles d'actine. L'ADF/cofiline entraîne donc une brisure de symétrie en favorisant l'élongation des câbles d'actine plutôt que les filaments individuels et ainsi la production de forces. L'ADF/cofiline, qui instaure ce turnover, est donc essentiel à la motilité (Michelot et al. 2007).

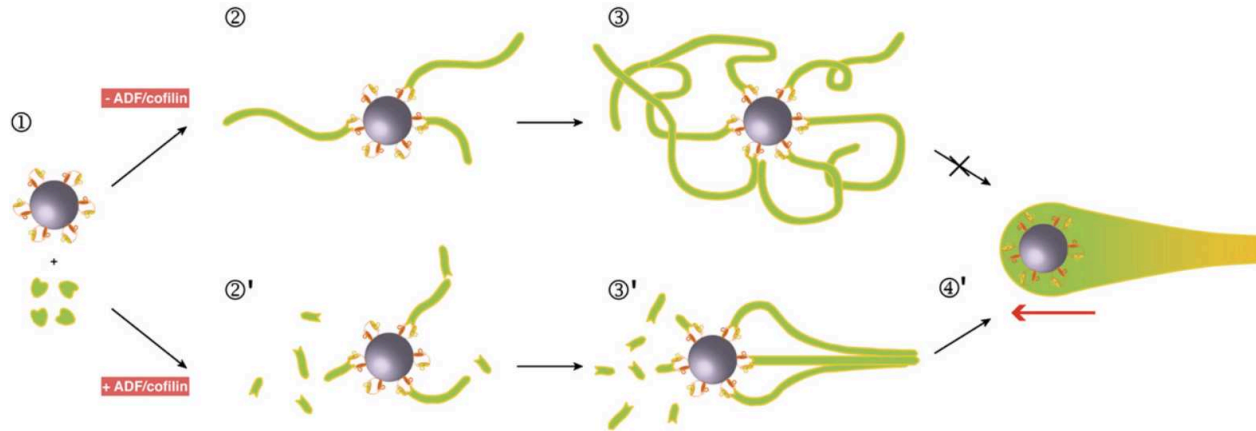


Figure 49 : Turnover et motilité déclenchés par l'ADF/cofiline.

En l'absence d'ADF/cofiline, les formines adsorbées sur les billes nucléent des filaments d'actine (1), qui polymérisent de façon aléatoire autour de la bille (2), formant un nuage homogène autour de la bille (3). En présence d'ADF/cofiline, celle-ci fragmente les filaments individuels (2'), favorisant la formation de faisceaux de filaments, que leur stabilité, renforcée par leurs contacts latéraux, protègent de l'ADF/cofiline (3'). Ce processus amène à la brisure de symétrie et à la production de force (4') (Michelot et al. 2007).

Au début de ma thèse le turnover commençait donc à être étudié *in vitro*, mais le mécanisme sous-jacent n'était pas et n'est toujours pas clair. D'autres protéines ont été identifiées *in vivo* comme accélérateurs du turnover telles que l'Aip1 (Okada et al. 2006) ou la myosine qui peut non seulement contracter les filaments d'actine antiparallèles mais aussi participer à leur désassemblage, et augmenter ainsi l'élongation des structures parallèles non contractées par la myosine (Reymann et al. 2012). Nous allons voir par la suite les modèles existants qui tentent d'expliquer le turnover et leurs limitations.

2. Limitations des modèles actuels du désassemblage

2.1. Efficacité du désassemblage *in vivo* non élucidée

In vivo, les cellules reçoivent des stimuli extérieurs et se doivent d'être en mesure d'adapter leur cytosquelette en fonction. Nous avons vu qu'un assemblage de filaments d'actine, dirigé et favorisé *in vivo* par les facteurs de nucléation, était nécessaire pour y répondre. Le désassemblage est de la même importance, puisque les cellules sans ADF/cofiline fonctionnelle, facteur essentiel du désassemblage, ne sont pas viables (Lappalainen et al. 1997). *In vivo* le désassemblage est très efficace. À l'arrière du lamellipode, si l'on considère que les filaments sont tous désassemblés au même endroit, le désassemblage devrait être de plusieurs sous-unités par seconde étant donné que les cellules avancent à plus de 1 $\mu\text{m/s}$ (Theriot & Mitchison 1991; Lai et al. 2008) (Figure 10). Cependant, le désassemblage s'effectue sur une large zone du lamellipode. On ne connaît donc pas la vitesse exacte de désassemblage *in vivo* mais elle reste très efficace par rapport à celle observée *in vitro*.

In vitro, à l'échelle du filament d'actine, le désassemblage des filaments individuels se fait très lentement ($k_{-p} = 0,3 \text{ s}^{-1}$ et $k_{-b} = 7 \text{ s}^{-1}$). En présence d'ADF/cofiline, l'efficacité du désassemblage n'augmente pas beaucoup. En effet la fragmentation par ADF/cofiline a une constante k_{severing} égale à 10^{-5} s^{-1} sous-unité⁻¹ (Suarez et al. 2011), ce qui correspond à 6×10^{-4} évènements de fragmentation par sous-unité et par seconde, soit une fragmentation toutes les 2500 sous-unités, ou encore une fragmentation tous les 7 μm chaque seconde, ce qui est loin, même combiné avec la dépolymérisation des extrémités pointues créée par fragmentation, de la vitesse de désassemblage nécessaire *in vivo*. De plus, en-dessous d'une certaine longueur l'ADF/cofiline n'est plus capable de fragmenter les filaments d'actine (McCullough et al. 2011).

L'efficacité de désassemblage ne peut donc pas être expliquée seulement par la dépolymérisation des extrémités pointues et de l'action d'ADF/cofiline. Une polémique existe actuellement sur la part de désassemblage effectuée par l'extrémité pointue et par fragmentation. Nous allons donc voir, dans un premier temps, les modèles proposés pour un désassemblage par l'extrémité pointue et leurs limitations. Dans un deuxième temps, nous verrons que des facteurs supplémentaires entrent en jeu dans le désassemblage des filaments d'actine comme l'Aip1, la coronine et Srv2/CAP.

2.2. Modèle et limitations de la dépolymérisation des filaments d'actine par l'extrémité pointue

Plusieurs hypothèses ont été proposées soutenant que le désassemblage de l'actine était déclenché à partir de l'extrémité pointue.

La première théorie explique que l'ADF/cofiline désassemble les filaments d'actine par leur extrémité pointue en accélérant la dissociation des sous-unités à cette extrémité (Carlier et al. 1997; Maciver et al. 1998). Par des expériences de light scattering, Maciver démontre que l'ADF/cofiline augmente la fragmentation, mais pas la nucléation des filaments. Cependant, la fragmentation produit autant de nouvelles extrémités barbées que pointues et devrait donc participer de manière égale à l'élongation et au désassemblage, les expériences ayant été réalisées sans capping protein. Si l'augmentation de l'efficacité d'ADF/cofiline était expliquée uniquement par la fragmentation, l'activité de nucléation d'ADF/cofiline serait elle aussi augmentée. Or ce n'est pas le cas, donc l'augmentation de la vitesse de dépolymérisation des filaments ne peut pas être expliquée seulement par une augmentation de la dissociation des sous-unités à l'extrémité pointue.

Carlier démontre par une mesure de turbidité que l'ADF/cofiline augmente la vitesse de dépolymérisation de l'extrémité pointue. Pour cela, les filaments sont prépolymérisés en présence de gelsoline qui bloque la polymérisation aux extrémités barbées. Carlier considère que la dépolymérisation observée est due simplement à l'accélération de la dissociation des sous-unités de l'extrémité pointue. Cependant, la même étude montre que l'élongation des extrémités barbées augmente aussi vingt fois, ce qui ne peut être expliqué que par l'augmentation du nombre

d'extrémités (Sept et al. 1999). L'accélération de la dépolymérisation à l'extrémité pointue reste donc ambiguë/controversée et pourrait être expliquée en partie par l'augmentation du nombre d'extrémités pointues dues à la fragmentation des filaments.

Une deuxième théorie de dépolymérisation des filaments par leurs extrémités a été proposée par Breiher (Kueh et al. 2008) : le désassemblage par éclatement (ou bursting) (Figure 50). Les expériences montrent un désassemblage des deux extrémités par phases très rapides, appelées "bursting". Ce modèle propose deux explications. D'abord, le bursting peut être expliqué par la séparation des deux brins de l'actine, à partir de l'une des deux extrémités ou à partir du centre du filament, puis le désassemblage très rapide des simples brins. Une deuxième explication pourrait être la fragmentation ponctuelle le long du filament. Briehier privilégie l'hypothèse de la séparation des deux brins qui expliquerait mieux le fait que le bursting se produit préférentiellement aux extrémités et plus précisément sur l'extrémité qui a déjà eu une phase de bursting.

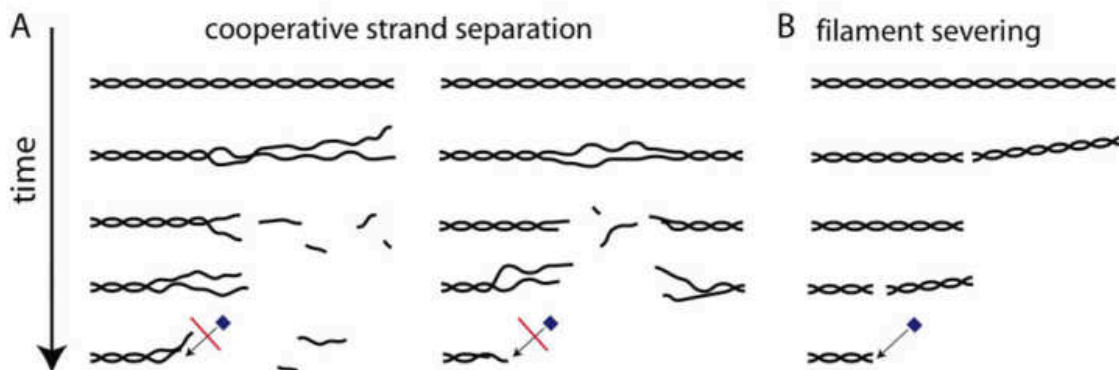


Figure 50 : Modèle de désassemblage des filaments d'actine par l'extrémité pointue.

Le désassemblage pourrait être expliqué A) par la séparation des deux brins de l'hélice de l'actine par l'une des extrémités ou par le centre du filament, puis par désassemblage des simples brins ou B) par la fragmentation ponctuelle le long du filament (Kueh et al. 2008).

2.3. Nouveaux cofacteurs du désassemblage

Afin d'expliquer le paradoxe entre la vitesse de désassemblage *in vivo* et *in vitro*, les recherches récentes se sont portées sur les autres facteurs qui pouvaient être impliqués. On trouve entre autres, l'Aip1, ou Actin Interacting Protein 1, un très proche cofacteur d'ADF/cofiline, la coronine, la Srv2/CAP, la twinfiline, la GMF et la capping protein (Figure 51).

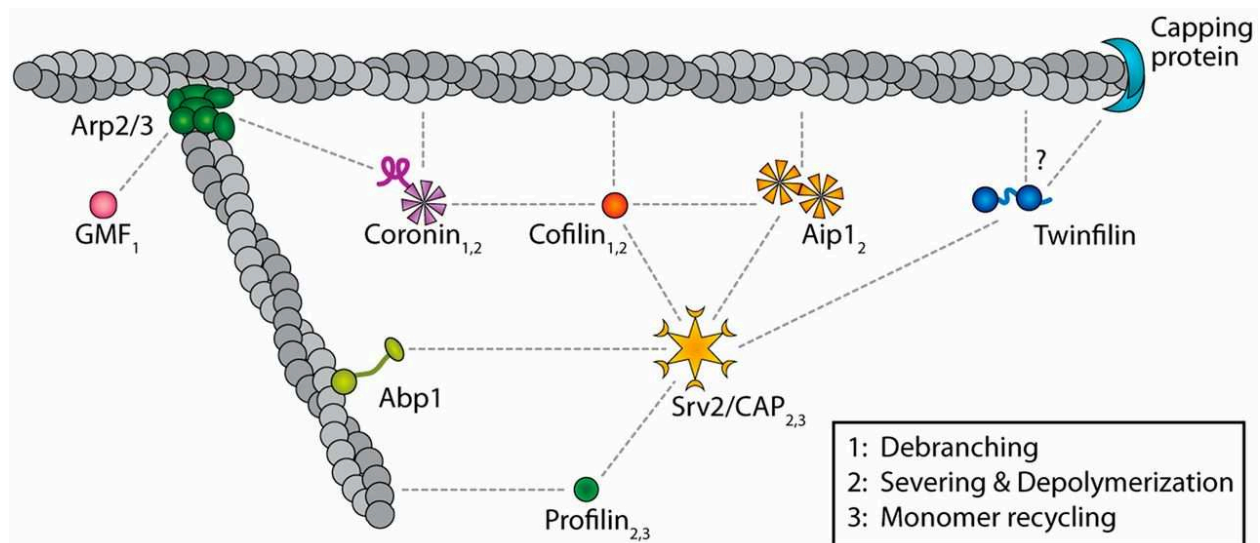


Figure 51 : Principaux facteurs impliqués dans le désassemblage et le recyclage des filaments d'actine.

Le désassemblage des filaments d'actine peut se faire (1) par débranchage ou (2) par fragmentation et dépolymérisation. Suite au désassemblage les monomères d'actine sont recyclés (3) pour pouvoir être réutilisés pour la polymérisation de nouveaux filaments. Les pointillés montrent une interaction entre deux éléments. (Tiré et modifié de Goode et al. 2015)

L'interaction entre ces différentes protéines a été étudiée grâce à la génétique de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cet organisme est en effet facile à manipuler génétiquement et, contrairement aux mammifères qui possèdent trois gènes codants pour l'ADF/cofiline, sept gènes pour la coronine, deux pour la twinfiline, deux pour la Srv2/CAP et deux pour la GMF, la levure n'a qu'un gène qui code pour chacune de ses protéines (Ydenberg et al. 2015). Des simples, doubles, triples voire quadruples mutants des protéines impliquées dans le désassemblage ont été générés pour observer leur importance. En simple mutant, seule la déplétion de l'ADF/cofiline est létale, alors que *srv2Δ* et *crnΔ* (déplétion de Srv2/CAP et de coronine) montrent des défauts de croissance et que *aip1Δ*, *cap2Δ*, *twf1Δ* et *gmf1Δ* (déplétion de Aip1, capping protein, twinfiline et GMF) ne présentent aucun défaut. Parmi les doubles et les triples mutants on trouve cependant des combinaisons de protéines secondaires létales telles que *srv2Δ/aip1Δ*, *cap2Δ/aip1Δ/crn1Δ* ou encore *crn1Δ/srv2Δ/twf1Δ*, ce qui montre qu'elles remplissent des fonctions similaires (ou partiellement similaires) dans la cellule.

L'ADF/cofiline est donc la seule protéine essentielle à la vie cellulaire, mais un certain niveau de redondance semble présent parmi les fonctions des protéines secondaires (Ydenberg et al. 2015).

2.3.1. Aip1, Actin Interacting Protein 1

Aip1 est une protéine de 65 kDa, découverte chez la levure bourgeonnante en 1995 (Amberg et al. 1995) et présente probablement chez tous les eucaryotes (Ono 2003). Elle est

formée d'une répétition de quatorze domaines WD, domaines retrouvés dans d'autres protéines se terminant généralement par les acides aminés Trp-Asp (WD) (Neer et al. 1994). Ces domaines sont agencés en deux β -propellers, des structures circulaires en forme d'hélice de bateau (Figure 52) (Voegtli et al. 2003).

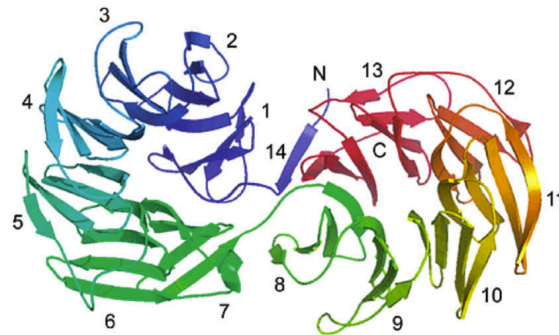


Figure 52 : Structure tridimensionnelle d'Aip1.

Ses 14 domaines WD s'agencent en deux cercles, lui donnant la forme de deux hélices. La structure est colorée du N-terminus (bleu) au C-terminus (rouge) (Ono 2003).

Aip1 est connue en tant que partenaire de l'ADF/cofiline pour améliorer le désassemblage de l'actine (Okada et al. 1999; Rodal et al. 1999), comme par exemple dans le désassemblage des comètes de bactéries *Listeria monocytogenes* (Talman et al. 2014). Le mécanisme moléculaire du désassemblage synergique par ADF/cofiline et Aip1 n'est cependant pas connu. *In vitro*, Aip1 seule a peu d'effets sur les filaments d'actine mais combinée à l'ADF/cofiline, elle permet de désassembler complètement les filaments en monomères ou en petits oligomères (Okada et al. 1999; Okreglak & Drubin 2010). De plus, la déplétion d'Aip1 *in vivo* ne cause que des effets mineurs, mais devient létale lorsqu'elle est couplée à certaines mutations de l'ADF/cofiline ou à une mutation de l'actine qui ralentit le désassemblage *in vivo* (Rodal et al. 1999). Aip1 n'est donc pas essentielle pour la viabilité des cellules et a besoin de l'ADF/cofiline pour exercer son rôle. Cependant elle est nécessaire pour un désassemblage efficace et le maintien de taux d'actine monomérique dans le cytoplasme.

Une première hypothèse sur le mécanisme a été proposée : Aip1 augmenterait la vitesse de désassemblage par capping, c'est-à-dire blocage, de l'extrémité barbée des filaments décorés par l'ADF/cofiline. L'augmentation du désassemblage viendrait du fait que les filaments ne peuvent plus se rabouter ou polymériser après fragmentation par ADF/cofiline (Okada et al. 2002). Il a cependant été montré que le seul effet de capping ne pouvait pas expliquer le désassemblage, car des protéines de coiffe telles que la gelsoline ou la cytochalasine D inhibent l'élongation et le raboutage, mais n'augmentent pas la fragmentation en présence d'ADF/cofiline (Ono et al. 2004). Aip1 a donc certainement un effet de capping de l'extrémité barbée des filaments (Michelot et al. 2013) mais qui n'est pas suffisant pour expliquer l'accélération de la fragmentation.

Aip1 joue aussi un rôle à l'échelle des structures de filaments d'actine *in vivo*. Chez la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae*, ADF/cofiline est localisée seulement sur les patches d'endocytose et ne décore pas les câbles d'actine (les faisceaux de filaments d'actine

parallèles). Cependant, lorsqu'Aip1 est supprimée, l'ADF/cofiline se relocalise sur les faisceaux parallèles (Iida & Yahara 1999; Rodal et al. 1999). Aip1 pourrait donc être impliquée dans la localisation d'ADF/cofiline sur des structures d'actine spécifiques. Cependant la localisation même d'Aip1 dépend de l'ADF/cofiline. En effet, la co-localisation d'Aip1 avec ADF/cofiline sur les patches d'endocytose résulte d'un lien avec l'ADF/cofiline ou l'actine car nombre de mutations de ces deux protéines ramènent Aip1 dans le cytosol (Rodal et al. 1999).

Les premières recherches sur Aip1 ont donc laissé de nombreuses questions en suspens. L'action de coiffe d'Aip1 est encore en débat et on ne sait par quel mécanisme moléculaire elle agit. De plus une question émerge : l'ADF/cofiline et l'Aip1 sont-elles suffisantes pour assurer un désassemblage efficace ?

2.3.2. Les autres facteurs du désassemblage : Coronine et Srv2/CAP

Deux autres facteurs interagissant avec ADF/cofiline et amplifiant le désassemblage ont été découverts et étudiés récemment : coronine et Srv2/CAP.

a. La coronine : Implication dans le turnover en amont de l'ADF/cofiline

La coronine découverte en 1991 chez *Dictyostelium discoideum*, est une protéine de 55 kDa qui se localise dans les zones dynamiques du cytosquelette d'actine (de Hostos et al. 1991). Elle est composée de deux domaines : un domaine N-terminal β -propeller formé de la répétition de cinq domaines WD et un domaine superhélicoïdal en C-terminus à partir duquel la coronine dimérise ou trimérise (Gandhi & Goode 2008).

La coronine est impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine à deux niveaux : l'assemblage et le désassemblage des filaments d'actine. Elle entre en jeu, d'abord, dans la régulation du complexe Arp2/3 auquel elle se lie par son domaine en superhélice, inhibant ainsi son activité de nucléation (Humphries et al. 2002). Cette inhibition est marquée surtout en l'absence de filaments d'actine préformés, indiquant que la coronine a probablement un effet négatif sur la fixation du complexe Arp2/3 sur le filament d'actine (Humphries et al. 2002).

La coronine est ensuite connue pour participer au désassemblage des filaments d'actine. En effet, la coronine favorise le désassemblage des comètes de *Listeria* en synergie avec ADF/cofiline et Aip1 (Brieher et al. 2006). Coronine et Aip1 diminuent la quantité d'ADF/cofiline nécessaire au désassemblage des comètes. L'activité de coronine est néanmoins dépendante de l'état du nucléotide. La coronine a une forte affinité pour le filament d'actine ATP/ADP-Pi et inhibe la fragmentation de ces "jeunes" filaments par l'ADF/cofiline alors qu'elle a une très faible affinité pour les "vieux" filaments ADP, mais augmente leur fragmentation par ADF/cofiline (Cai et al. 2007; Gandhi et al. 2009). Le mécanisme moléculaire de la coronine n'est cependant pas encore très bien compris.

b. La Srv2/CAP : Implication dans le turnover en aval de l'ADF/cofiline

La Srv2/CAP, Srv2 chez la levure et Cyclase-Associated Protein (CAP) chez les mammifères, a d'abord été identifiée comme une protéine impliquée dans l'activation de l'adénylate cyclase, une enzyme membranaire qui produit de l'AMP cyclique à partir d'ATP (Fedor-Chaiken et al. 1990) mais elle joue aussi un rôle dans la régulation du cytosquelette d'actine. Elle est formée de deux domaines appelés simplement domaines N- et C-terminal et s'assemble en un hexamère (Figure 53 A et B).

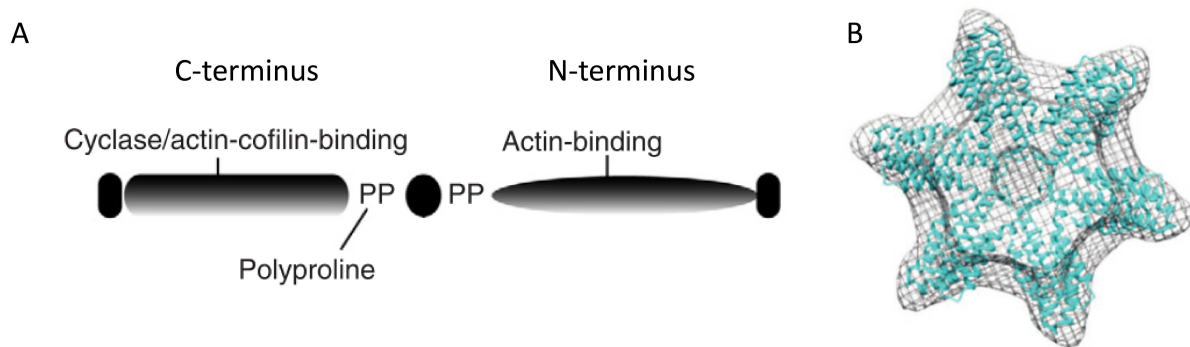


Figure 53 : Caractéristique de Srv2/CAP.

A) Séquence de Srv2/CAP formée des domaines N-terminal et C-terminal, séparés par des zones riches en proline, permettant l'attache de l'Abp1 (Tiré de Ono 2007) B) Hexamère de Srv2/CAP (Tiré de Chaudhry et al. 2013).

Son interaction avec l'actine filamenteuse est très forte sur les sous-unités ADP ($K_d = 0.02 \mu\text{M}$) (Mattila et al. 2004) et se fait par l'intermédiaire de la protéine Abp1 ou Actin Binding Protein 1, un activateur du complexe Arp2/3 qui se fixe sur l'actine-F par son domaine d'homologie ADF-H (Goode et al. 2001) (Figure 51). Une fois liée au filament d'actine, Srv2/CAP en compétition avec l'ADF/cofiline pour le monomère d'actine, se fixe au monomère et accélère la dissociation de l'ADF/cofiline (Figure 54). La profiline se fixe alors sur une région polyproline de Srv2/CAP, formant un trimère Srv2/CAP – actine ADP – profiline et catalyse l'échange du nucléotide (Bertling et al. 2007). La Srv2/CAP ayant une affinité cent fois moins forte pour l'actine ATP, elle libère le monomère qui retourne dans le réservoir cytoplasmique d'actine disponible pour la polymérisation (Mattila et al. 2004; Balcer et al. 2003).

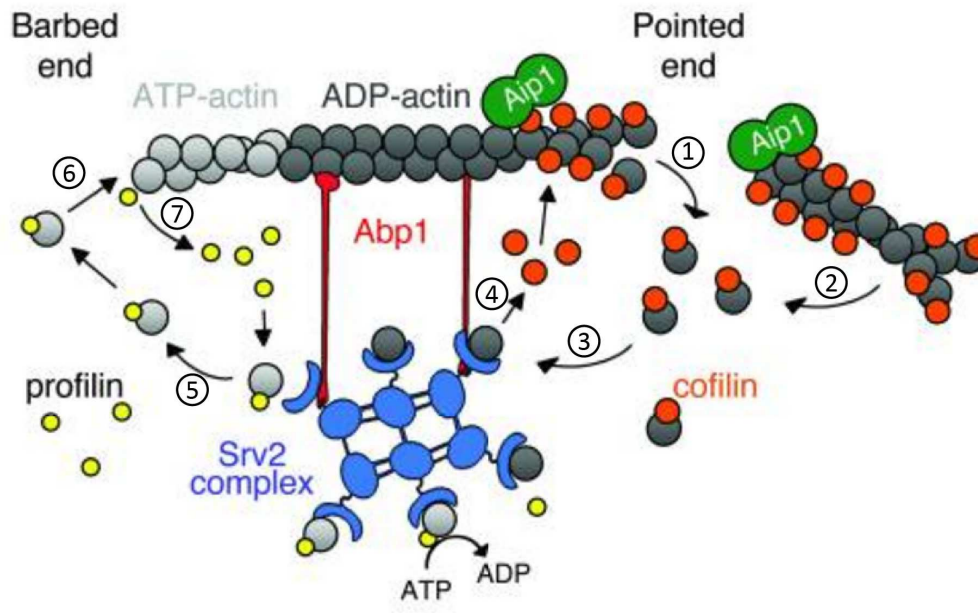


Figure 54 : Régulation du turnover par Srv2/CAP.

Après fragmentation par l'ADF/cofiline (1), potentiellement favorisée par Aip1 (2), les complexes actine ADP – ADF/cofiline se lient à l'hexamère de Srv2/CAP (3), lui-même arrimé au filament par l'intermédiaire de l'Abp1. Srv2 catalyse la dissociation de l'ADF/cofiline (4) et permet à la profiline d'échanger le nucléotide (5). Les complexes profiline – actine ATP sont ainsi disponibles pour la polymérisation de nouveaux filaments (6). Une fois le monomère ATP lié sur une nouvelle extrémité, la profiline est relâchée pour former de nouveaux complexes profiline – actine ATP. Tiré et modifié de (Moseley & Goode 2006).

3. Limitations du système expérimental : de la chambre à flux au micropuits

Les expériences *in vitro* actuelles sont réalisées en système ouvert, c'est-à-dire en milieu en constante interaction avec son environnement. Que ce soit en microscopie ou en mesure de pyrène, en utilisant des protéines purifiées ou des extraits, en visualisation de filaments individuels ou de structures complexes, la taille du système expérimental n'est pas du tout représentative de la dimension d'une cellule. La plupart du temps les réactions biologiques sont contraintes localement dans la cellule, par exemple à la membrane, au noyau ou encore sur le cytosquelette d'actine ou de microtubules. De plus les propriétés biochimiques, mécaniques et dynamiques des filaments d'actine ont très peu été étudiées en milieu restreint et fermé, dont les frontières biologiques (la membrane plasmique, ou les structures de polymères) limiteraient la quantité de protéines et la diffusion et contraindraient physiquement le cytosquelette.

3.1. Comparaison Cellules *in vivo* / Chambre à flux

3.1.1. Quantité des protéines

La cellule est un système fermé dont la quantité de monomères d'actine est fixe au cours du temps. En effet sur une minute, soit l'échelle de temps du turnover des structures d'actine, si la cellule a besoin de polymériser de nouvelles structures de filaments d'actine, elle ne synthétise pas de nouveaux monomères d'actine, mais réutilise les monomères déjà présents dans son cytosol. La quantité de protéines est donc fixe, mais elle aussi est limitée et les différentes architectures de la cellule doivent se partager le réservoir de monomères. Burke montre en effet chez la levure à fission que lorsque le réseau branché est affecté, les faisceaux de filaments parallèles grossissent et vice versa, indiquant que le réservoir de monomères est en équilibre avec les structures et que la formation des structures est limitée par la quantité restreinte en monomères d'actine (Burke et al. 2014) (Figure 55). La capacité de la cellule à garder un équilibre entre l'actine G et F, appelée l'homéostasie entre l'actine G et l'actine F, n'est possible qu'en milieu fermé.

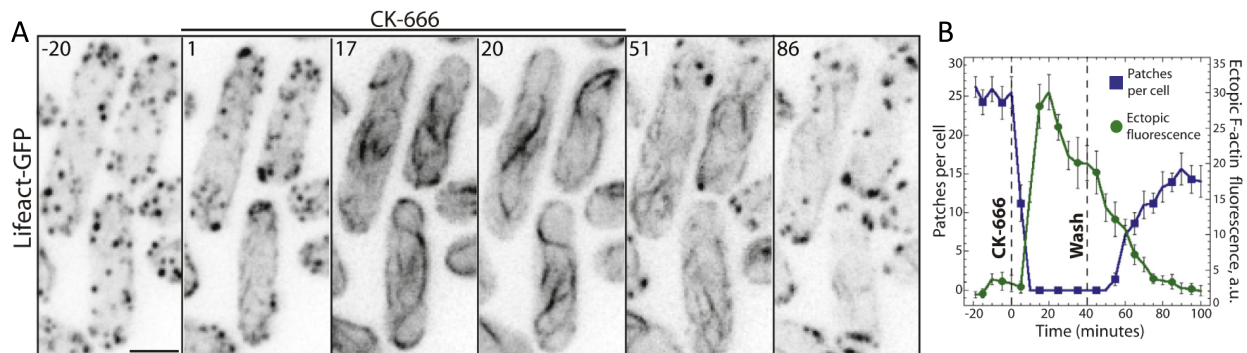


Figure 55 : Exemple *in vivo* du partage de l'actine G entre les différentes structures d'actine chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*.

A) L'actine, marquée par Lifact-GFP, est localisée principalement sur les patches d'endocytose. À $t = 0$ s, l'ajout de CK-666, un inhibiteur du complexe Arp2/3, détruit les patches d'endocytose et relocalise l'actine sur les câbles linéaires. Après 40 minutes d'incubation, le CK-666 est lavé, entraînant le réarrangement de l'actine qui se dissocie des câbles pour alimenter la formation de patches, échelle 5 μ m B) Quantification de A) (Burke et al. 2014).

Actuellement, les expériences de biologie moléculaire *in vitro*, sont réalisées dans des systèmes expérimentaux d'un volume de quelques microlitres tels les chambres à flux ou les cuves de mesure de fluorimétrie ou de turbidité, appelés systèmes ouverts. En comparaison, une cellule de 10 à 100 μ m a un volume de 10^{-5} - 10^{-7} μ l, soit jusqu'à un million de fois plus petit que les systèmes expérimentaux actuels (Figure 56). La quantité d'actine dans les systèmes expérimentaux ouverts est considéré comme infinie, limitant l'étude de la formation des structures d'actine à des considérations biochimiques (quelles protéines sont mises en jeu, quelle

concentration,..) mais ne permet pas de tester l'impact d'une quantité de protéines limitée : on peut augmenter les concentrations pour être dans des conditions physiologiques, soit quelques dizaines de micromolaires d'actine, mais le nombre de protéines sera infini au regard de la taille des zones de nucléation. Au contraire, la concentration peut être diminuée pour avoir un nombre de protéines semblables à celui de la cellule, mais la diffusion des protéines dans le milieu sera un facteur limitant de la réaction et ne représentera pas les conditions *in vivo*.

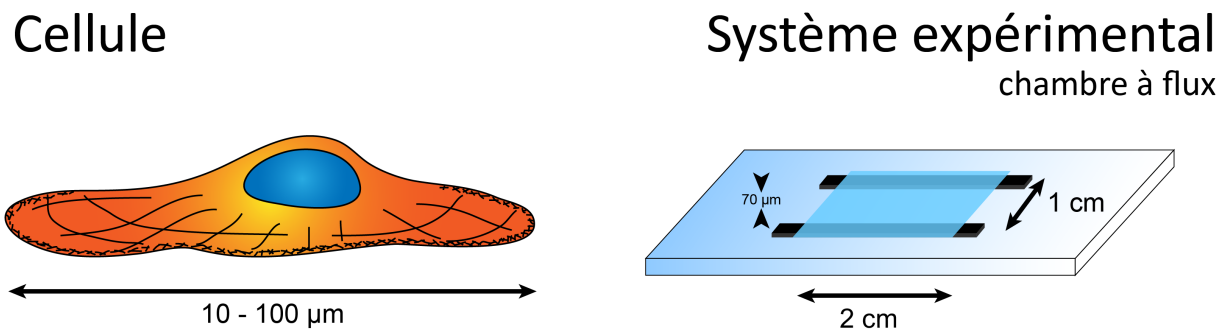


Figure 56 : Comparaison des dimensions des systèmes *in vivo* et *in vitro*.

La cellule est un milieu fermé de 10 à 100 μm de diamètre. En comparaison une chambre à flux, formée par une lame et une lamelle de verre, séparées par deux bandes adhésives de 70 μm de hauteur, représente un volume un million de fois plus grand que la cellule.

Pour la deuxième partie de ma thèse, je souhaitais reproduire le turnover des structures d'actine, grâce à la reconstitution *in vitro* des comètes d'actine. Le but est de désassembler les comètes grâce aux protéines de fragmentation, de recycler les monomères et de poursuivre l'élongation grâce aux monomères recyclés. La taille du système expérimental ne pose pas de problème pour l'assemblage et le désassemblage des structures, à partir du moment où les conditions biochimiques sont remplies (un jeu de protéines optimisé, ainsi que leur concentration, pour déclencher la formation des comètes d'actine puis leur désassemblage). Cependant l'étape de recyclage est dépendante de la taille du système. En effet, dans le système expérimental actuel, la chambre à flux, la quantité d'actine est trop importante pour pouvoir discriminer la partie de l'élongation des comètes due aux monomères recyclés après désassemblage et celle due à l'actine G présente initialement. Un système fermé est donc nécessaire pour étudier le recyclage.

3.1.2. Diffusion

La deuxième limitation d'un système ouvert est la diffusion des protéines dans le milieu. La viscosité du cytoplasme est comparable à celle de l'eau pure. Cependant la diffusion des molécules y est quatre fois plus faible, limitée par la collision avec des macromolécules qui encombrent le cytoplasme (Verkman 2002). Nous reproduisons expérimentalement cet encombrement par l'addition d'un agent réticulé, la méthyl cellulose.

En milieu cellulaire, la diffusion des protéines n'est pas limitante. En effet, le coefficient de diffusion des monomères d'actine dans le cytosol de $5,8 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (McGrath et al. 1998) montre que le temps de diffusion d'une protéine dans la cellule est suffisamment rapide pour ne pas limiter les phénomènes dynamiques. Dans le cas de l'actine, la concentration d'actine monomérique cellulaire qui diffuse librement semble très importante (Pollard et al. 2000) et localement le réservoir d'actine devrait pouvoir être réapprovisionné par le réservoir global avant de s'épuiser. Cependant, des résultats récents (Suarez et al. 2015; Rotty et al. 2015) montrent que la concentration des monomères d'actine dans la cellule est limitante et détermine la taille des différentes architectures d'actine. Il semble donc important *in vitro* de travailler dans des conditions expérimentales similaires si l'on veut comprendre la dynamique globale de l'actine et le couplage qu'il peut exister entre les différentes architectures d'actine.

Dans nos systèmes reconstitués classiques, de dimensions 10^5 fois plus élevées que les cellules, le temps de diffusion des protéines devient une donnée importante à prendre en compte. Bien que la vitesse de diffusion soit la même qu'en milieu cellulaire (car l'encombrement est reproduit avec la méthyl cellulose), les distances à parcourir, et donc le temps de diffusion, sont multipliées par 10^4 , et ne sont donc plus négligeables devant la durée de nos expériences. Les dimensions de nos dispositifs expérimentaux sont donc inadaptées à l'étude des phénomènes cellulaires et il devient donc à présent nécessaire de repenser nos expériences pour reproduire au mieux les conditions physiologiques et en particulier les dimensions réduites des cellules.

3.2. Reconstitution *in vitro* des dimensions cellulaires

3.2.1. Exemples connus : les vésicules

Actuellement les systèmes confinés les plus utilisés sont les vésicules formées d'une phase aqueuse encapsulée par une frontière lipidique. Il existe de nombreuses façons de les fabriquer. Une méthode simple est l'émulsion d'une phase aqueuse et d'une phase lipidique (Klyachko & Levashov 2003; Griffiths & Tawfik 2006) ou, s'il l'on veut contrôler la taille des vésicules, par un système microfluidique libérant goutte à goutte une phase aqueuse dans de l'huile (Jimenez et al. 2011). Ces deux méthodes conduisent à la formation de gouttes aqueuses nageant dans un milieu lipidique. On trouve aussi des liposomes ou encore GUVs (giant unilamellar vesicles) formés d'une simple couche ou d'une bicouche lipidique qui flottent dans un milieu aqueux (Tsai et al. 2011) (Figure 57). Plus rarement on peut trouver l'inverse : des vésicules lipidiques, c'est-à-dire des gouttes d'huile immergées dans une phase aqueuse (Giardini et al. 2003).

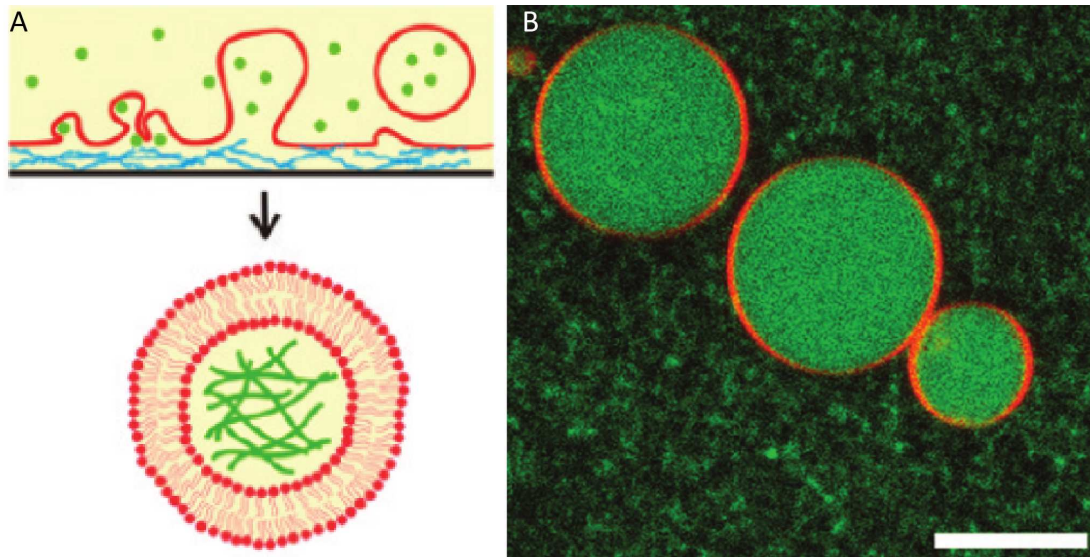


Figure 57 : Visualisation d'un liposome.

A) Le liposome est formé ici d'une bicouche de lipides organisés sphériquement contenant un milieu aqueux. La structure des lipides est composée de deux régions, les régions hydrophiles (cercles rouges) tournées vers l'extérieur de la membrane, et les régions hydrophobes (deux traits ondulés) tournées vers le centre de la membrane. B) Visualisation d'un liposome contenant un mélange de protéines purifiées, échelle 10 µm. (Modifié à partir de Tsai et al. 2011).

En général, la phase aqueuse de la vésicule contient le mélange réactif, tel qu'un mix de polymérisation de filaments d'actine (Figure 57). Ce système permet de reconstituer *in vitro* des phénomènes cellulaires tels que la formation et la propagation de plaques amyloïdes β (Saha et al. 2013), d'étudier des phénomènes internes comme le flot intracellulaire (Pinot et al. 2012) ou la mécanique des filaments d'actine en milieu confiné (Claessens et al. 2006). Grâce à sa bicouche de lipides, le liposome mime la structure de la membrane plasmique cellulaire (Alberts et al. 2002), et permet l'étude de l'interaction membrane – cytosquelette, comme le contrôle de la forme de la membrane plasmique par le cytosquelette (Pinot et al. 2009; Tsai & Koenderink 2015; Loiseau et al. 2016).

Parfois, le mix réactionnel se trouve à l'extérieur de la vésicule, comme par exemple lors de l'étude de la déformation de la membrane par une comète d'actine polymérisée sur des vésicules lipidiques (Giardini et al. 2003).

3.2.2. Micropuits

Les micropuits sont des chambres de quelques dizaine voire centaines de micromètres, fabriquées généralement en résines photosensibles ou en PDMS (Deshpande & Pfohl 2015; Holy et al. 1997; Soares e Silva et al. 2011). Jusqu'à maintenant les micropuits ont été utilisés pour visualiser par exemple la formation spontanée de structures d'actine dans des chambres closes (Deshpande & Pfohl 2015; Soares e Silva et al. 2011) ou l'étude de la dynamique des microtubules (Holy et al. 1997; Faivre-Moskalenko & Dogterom 2002).

Pour nous, l'importance des micropuits est de pouvoir combiner les approches moléculaires de la première étude avec un système fermé. Le micropuits a donc été développé dans le but de pouvoir étudier les processus biologiques étudiés au laboratoire, comme la dynamique d'un réseau branché, reconstitué grâce au micropatron ou sur bille pWA ou encore la dynamique et les interactions biochimiques des filaments individuels avec les protéines associées à l'actine en milieu confiné.

Dans le temps de ma thèse, le but a été *in fine* de reconstituer du turnover de l'actine *in vitro*. J'ai utilisé à cet effet, les comètes d'actine permettant d'étudier le turnover des réseaux d'actine branchés. La quantité d'actine étant limitée dans les micropuits, la polymérisation des comètes se voit rapidement limitée. En milieu cellulaire pourtant la polymérisation du lamellipode ne s'arrête pas lorsque l'actine vient à manquer, car le désassemblage et le recyclage de l'actine fournissent de nouveaux monomères pour la polymérisation. Le micropuits sera donc utilisé pour limiter la polymérisation et pouvoir observer le recyclage de l'actine en présence des protéines de désassemblage et de recyclage.

3.2.3. Avantages et limitations des différents systèmes expérimentaux existants

Parmi tous les systèmes limitant la quantité de protéines, chacun possède des avantages et des inconvénients intrinsèques. Il convient donc de choisir l'outil adapté à la question biologique posée.

Les avantages communs des vésicules et des micropuits sont leur taille comparable à celle d'une cellule et l'isolation complète du système, empêchant toute interaction (diffusion de protéines, action mécanique,...) par les éléments extérieurs, et ce qui en découle naturellement : la quantité restreinte et finie des protéines injectées. De plus, dans les deux cas, il est possible de contrôler la taille, par lithographie pour les micropuits (Aoyama et al. 2013), et par systèmes microfluidiques pour les vésicules (Jimenez et al. 2011). Si le but de l'expérience est d'enfermer des protéines dans un volume comparable au volume cellulaire, les deux systèmes seront adaptés et le choix se fera sur d'autres critères.

L'avantage principal des vésicules est leur souplesse, procuré par leur frontière lipidique. En effet, cela permet d'étudier la déformation de la membrane plasmique par le cytosquelette (Pinot et al. 2009; Tsai & Koenderink 2015; Loiseau et al. 2016). De plus, les lipides qui forment sa membrane font écho à la bicouche lipidique de la membrane plasmique, et nous permettent donc d'étudier *in vitro* l'interaction entre le cytosquelette et la membrane plasmique (Pontani et al. 2009). Enfin l'avantage des vésicules est l'homogénéité de la surface, formée de lipides, qui permet de voir apparaître des phénomènes synergétiques tels que la production d'un flux d'actine produit par la nucléation d'actine à la membrane et la contraction des filaments au centre de la vésicule (Pinot et al. 2012).

L'étude de structures de taille comparable à la vésicule, de l'ordre de quelques dizaines de microns, est donc tout à fait adaptée à ce système biomimétique. Cependant, l'imagerie de plus petites structures, telles que des filaments individuels, devient difficile.

Le micropuits serait une solution à l'imagerie de filaments d'actine individuels car il rend possible l'utilisation du microscope à onde évanescente. De plus, contrairement aux vésicules fermées, les systèmes microfluidiques ont l'avantage de pouvoir ajouter séquentiellement des protéines (Cambier et al. 2015). On peut aussi choisir la forme des micropuits en fonction du besoin de nos expériences (Ochsner et al. 2007). Enfin la rigidité des parois crée un obstacle permettant au cytosquelette de s'auto-organiser, comme le positionnement du centrosome (Holy et al. 1997). Ce dernier avantage des micropuits peut cependant aussi en être un pour les vésicules, qui montrent les mêmes résultats lorsque la rigidité de leur membrane est accrue (Pinot et al. 2009).

En contrepartie, la rigidité des micropuits est aussi une limitation, car tout ce qui touche à la déformation de la membrane ne peut pas être étudié. De plus, sa surface n'étant pas formée de lipides, il est aussi difficile d'étudier l'interaction de la membrane avec le cytosquelette.

Comme expliqué précédemment, le but de mon étude est d'observer le turnover à deux échelles : celle des structures de filaments d'actine et celle des filaments individuels. Le système le mieux adapté dans mon cas est donc le micropuits, développé à cette fin.

4. Le recyclage de l'actine

4.1. Aspects biochimiques de la problématique du recyclage

L'étape cruciale du turnover est le recyclage. Le recyclage est le fait de réutiliser les protéines qui proviennent du désassemblage des structures d'actine, telles que le monomère d'actine, mais aussi les protéines associées. La première étape est donc d'avoir un désassemblage réellement efficace, pour que les filaments qui se désassemblent se dissocient jusqu'au monomère. La deuxième étape est par conséquent de dissocier toutes les protéines qui pourraient être complexées avec le monomère, telles que l'ADF/cofiline, l'Aip1, la capping protein ou encore le complexe Arp2/3 et d'échanger du nucléotide.

Lorsque le filament se désassemble, il se trouve principalement sous sa forme ADP. En présence d'ADF/cofiline, il est aussi probablement complexé à celle-ci. La phase limitante du recyclage des monomères d'actine est l'échange du nucléotide ($k = 0,08 \text{ s}^{-1}$) (Pollard et al. 2000), plus encore en présence d'ADF/cofiline qui ralentit dix fois l'échange du nucléotide ($k = 0,006 \text{ s}^{-1}$) (Carlier et al. 1997; Blanchoin & Pollard 1998). Heureusement, la profiline entre en compétition avec l'ADF/cofiline et accélère l'échange du nucléotide permettant la régénération d'un monomère prêt à la polymérisation (Blanchoin & Pollard 1998).

Concernant le complexe Arp2/3, celui-ci est dissocié de l'actine lors du débranchement, catalysé par l'hydrolyse de l'ATP de la sous-unité Arp2 et l'action de l'ADF/cofiline (Le Clainche et al. 2003; Martin et al. 2006; Blanchoin et al. 2000b) et ne sera pas complexé au monomère après le désassemblage. De plus, le recyclage du complexe Arp2/3 se fait de la même manière

que les monomères d'actine, par échange de l'ADP de la sous-unité Arp2 en ATP (et probablement de Arp3) (Goley & Welch 2006).

L'action de l'Aip1 n'étant pas encore bien connue, on ne sait pas ce qu'il advient de cette protéine après le désassemblage des filaments d'actine. Est-ce qu'elle reste complexée à l'actine et/ou à l'ADF/cofiline ?

La reconstitution du recyclage que je souhaite réaliser est basé sur les connaissances actuelles du recyclage : la nature des protéines mises en jeu, leur interaction avec l'actine ou encore leur mécanisme de recyclage propre. Cependant, ces informations proviennent d'expériences faites *in vitro* dans des systèmes très simples, comprenant deux à trois protéines. Le fait de choisir certaines protéines pour reconstituer le recyclage, dans mon cas l'ADF/cofiline, la capping protein et la profiline, et pas d'autres (Aip1, coronine, Srv2/CAP,...) est seulement une hypothèse. Il reste à montrer que ce jeu de protéines est suffisant pour reconstituer le turnover, mais il se peut tout à fait que certains mécanismes ne marchent pas de la même façon que celle prédite ou encore que les autres protéines mises à l'écart soient finalement nécessaires pour parvenir à répondre à l'hypothèse de départ.

4.2. Maintien de l'équilibre Actine G / Actine F

La problématique du turnover met en évidence l'importance de maintenir le réservoir de monomères d'actine et donc le maintien de l'équilibre entre l'actine monomérique et l'actine filamenteuse. Parmi toutes les protéines rencontrées jusqu'ici, chacune va favoriser soit la formation de filaments d'actine ou leur stabilisation, soit d'augmenter le réservoir de monomères (Figure 58).

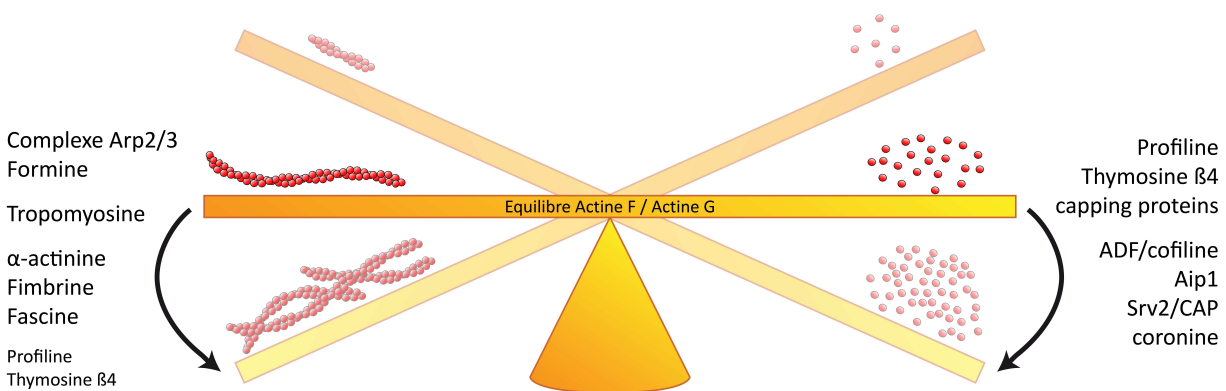


Figure 58 : Equilibre entre l'actine filamenteuse et l'actine monomérique assuré par les protéines régulatrices de l'actine.

Pour pouvoir reconstituer le turnover, nous devons être en mesure d'identifier l'action de chacune des protéines étudiées et de les combiner de façon adéquate pour maintenir l'équilibre entre l'actine G et l'actine F.

In vivo, le réservoir de monomères d'actine, qui peut atteindre 100 μM chez certains organismes (Pollard et al. 2000), est en constant équilibre avec les filaments d'actine. Compte tenu des concentrations critiques des deux extrémités ($C_{c,b} = 0,1 \mu\text{M}$ et $C_{c,p} = 0,6 \mu\text{M}$) cette quantité d'actine devrait, dans des conditions physiologiques, polymériser très rapidement et ne laisser que 0,1 μM d'actine. Cette homéostasie est possible grâce à la profiline et, dans certains organismes la thymosine $\beta 4$. Ces dernières régulent toutes deux le réservoir d'actine par interaction directe avec des monomères libres en solution dans le cytoplasme.

La profiline se lie aux monomères d'actine et inhibe la polymérisation à l'extrémité pointue. En présence de capping proteins bloquant l'extrémité barbée, la profiline séquestre les monomères et permet de maintenir le réservoir d'actine G. Cependant dans les zones où la capping protein est absente et permet l'élongation de nouveaux filaments, le complexe profiline – actine G peut se lier aux extrémités barbées, à la même vitesse que les monomères libres, et participe à la polymérisation (Pollard & Borisy 2003; Kang et al. 1999). La profiline peut même favoriser l'élongation se fixant sur les régions poly-proline de certains facteurs de nucléation comme la formine.

La thymosine $\beta 4$, une petite protéine de 5 kDa (Safer & Nachmias 1994), régule aussi le réservoir d'actine. Contrairement à la profiline, la thymosine $\beta 4$ empêche complètement la polymérisation du filament aux deux extrémités par inhibition de la dissociation du nucléotide du monomère d'actine. La thymosine $\beta 4$ a une plus faible affinité pour les monomères d'actine que la profiline, ce qui permet de libérer le monomère de la thymosine, même en présence d'une faible concentration de profiline et de déclencher l'échange du nucléotide (Pantaloni & Carlier 1993; Goldschmidt-Clermont et al. 1992). Le réservoir de monomères est donc divisé entre les monomères disponibles pour la polymérisation, complexés à la profiline et le reste des monomères stockés par la thymosine $\beta 4$ (Pollard & Borisy 2003). Chez certains eucaryotes, tels que les champignons, la thymosine $\beta 4$ est absente et la régulation n'est assurée que par la profiline (Pollard et al. 2000). Il a été montré que la thymosine peut aussi participer à la formation de nouveaux filaments : en effet, la thymosine participe à la localisation des monomères d'actine provenant du réservoir cytoplasmique au front migrant pour la polymérisation de nouveaux filaments par formine en empêchant les monomères d'interagir avec le complexe Arp2/3 (Vitriol et al. 2015).

Le blocage des extrémités barbées est indispensable pour la régulation du réservoir d'actine G. La capping protein se lie aux extrémités barbées et prévient l'élongation incontrôlée des filaments d'actine et la déplétion totale du réservoir d'actine. *In vivo*, la plupart des extrémités barbées sont bloquées par la capping protein, permettant à la cellule le maintien d'une quantité d'actine suffisante pour fournir les monomères d'actine là où ils sont requis.

Enfin les protéines de désassemblage entrent en jeu dans la régulation de l'équilibre actine G – actine F. Même en présence de profiline, de thymosine $\beta 4$ et de capping protein, les filaments d'actine sont nucléés, polymérisent et diminuent donc progressivement le réservoir de

monomères. Pour le remplir, les protéines de désassemblage, telles que l'ADF/cofiline entrent en jeu. Bien qu'après fragmentation des filaments d'actine l'ADF/cofiline puisse séquestrer les monomères d'actine, la profiline est capable, par compétition, de la dissocier.

Inversement, les facteurs de nucléation tels que le complexe Arp2/3, formine ou encore Ena/VASP vont faire pencher la balance du côté de la formation de nouveaux filaments, de même les protéines telles que les tropomyosines ou les protéines de réticulation (α -actinine, fimbrine, fascine) vont favoriser les filaments d'actine par leur action stabilisatrice.

Le turnover est en somme un équilibre dynamique que la cellule a réussi à atteindre. L'ambition de pouvoir le reconstituer *in vitro* avec un jeu de protéines restreint nous met au défi de comprendre exactement la fonction et l'importance de chaque protéine connue pour choisir celles qui seront nécessaires et suffisantes pour déclencher la polymérisation, et instaurer un équilibre entre assemblage et désassemblage des filaments d'actine.

RÉSULTATS

Position du Sujet

La dynamique des structures de filaments d'actine est régie par le turnover de ces filaments. En milieu cellulaire, la quantité d'actine est limitée, la cellule n'a donc d'autres choix que de recycler ses monomères d'actine afin de poursuivre la polymérisation de nouveaux filaments. Mon projet de thèse s'est axé sur deux étapes fondamentales du turnover : le désassemblage et le recyclage des filaments d'actine.

Ma première étude (Gressin et al. 2015) s'est portée sur le désassemblage des filaments d'actine par l'ADF/cofiline et un de ses cofacteurs, l'Aip1. Cette étude a permis pour la première fois d'observer la fragmentation des structures de filaments d'actine *in vitro* et de mieux comprendre l'action de l'ADF/cofiline et d'Aip1 au niveau moléculaire.

Ma deuxième étude (en cours) a pour but de comprendre le recyclage des filaments d'actine. La cellule doit avoir recours au recyclage de ses vieux filaments d'actine car la quantité d'actine est restreinte. Afin d'étudier cet aspect j'ai recréé un environnement confiné semblable au milieu cellulaire : le micropuits. Cet outil permet d'étudier les filaments d'actine en milieu fermé à deux échelles : l'échelle moléculaire et l'échelle des structures d'actine.

En parallèle, j'ai travaillé sur une revue synthétisant la formation des différentes structures d'actine et leur interaction (Letort et al. 2015). Nous avons pu détailler la formation du lamellipode et des structures linéaires telles que les fibres de stress et les filopodes. De plus, cette revue explique, la transition de chaque structure à partir d'une autre préexistante, comme par exemple la naissance des filopodes à partir du lamellipode.

Étude n°1 : Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly (Gressin et al. 2015)

Laurène Gressin¹, Audrey Guillotin¹, Christophe Guérin¹, Laurent Blanchoin^{1,*}, and
Alphée Michelot^{1,*}

¹ Physics of the Cytoskeleton and Morphogenesis Group, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble 38054, France

*Correspondence: laurent.blanchoin@cea.fr (L.B.), alpee.michelot@cea.fr (A.M.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.011>

Cette publication fait l'objet d'un court article dans *Current Biology* (Winterhoff & Faix 2015) donné en annexe de cette première étude.

La dynamique du cytosquelette d'actine permet à la cellule d'exercer des forces qui entrent en jeu dans la motilité, la division cellulaire ou encore la morphogénèse. La nucléation et la polymérisation des filaments d'actine sont temporellement et spatialement contrôlées. Les filaments d'actine, qui *in vitro* sont stables pendant plusieurs minutes (cf introduction, Figure 41), suivent *in vivo* un cycle complet d'assemblage et de désassemblage de l'ordre de la minute. Ce sont des protéines supplémentaires, parmi lesquelles l'ADF/cofiline, qui permettent de désassembler rapidement les vieux filaments d'actine.

In vivo, l'ADF/cofiline est localisée sur la plupart des structures d'actine : on la trouve dans les réseaux branchés du lamellipode (Svitkina & Borisy 1999), dans les structures de filaments parallèles des filopodes (Breitsprecher et al. 2011) et dans la dynamique de l'anneau de cytokinèse composé de filaments de polarité aléatoire (Pelham & Chang 2002). L'ADF/cofiline est donc une protéine centrale du désassemblage de l'actine. Des études *in vitro* montrent que l'action de l'ADF/cofiline sur des filaments d'actine individuels est de les fragmenter (De La Cruz 2005; Andrianantoandro & Pollard 2006; Suarez et al. 2011). Le mécanisme de fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/cofiline a été partiellement expliqué : l'ADF/cofiline se lie de manière coopérative en cluster le long du filament d'actine, formant une frontière instable entre une région nue et une région décorée par l'ADF/cofiline. Cette frontière est alors le point de fragmentation du filament (Andrianantoandro & Pollard 2006; Suarez et al. 2011). Cette fragmentation se produit à concentration intermédiaire d'ADF/cofiline. Cependant, même à son efficacité maximale, seule une fragmentation se produit tous les 7 μm par seconde (d'après la constante de fragmentation de Suarez et al. 2011). Cette valeur ne suffit pas à expliquer le désassemblage efficace *in vivo* du lamellipode entier en moins d'une minute. Nous avons donc essayé de mieux comprendre comment l'ADF/cofiline pouvait désassembler les structures de filaments d'actine cellulaires en reconstituant ces différentes structures *in vitro* grâce à la

technique du micropatron. L'étude a été réalisée à deux niveaux, puisque nous avons approfondi ensuite le mécanisme à l'échelle du filament individuel.

Nous avons basé notre étude sur des travaux préliminaires menés aux niveaux cellulaire et moléculaire. *In vivo*, outre la localisation de l'ADF/cofiline, l'interaction entre l'ADF/cofiline et ses cofacteurs a été observée. La levure *saccharomyces cerevisiae*, modèle génétique permettant de modifier aisément *in vivo* le niveau d'expression des protéines, a en effet permis de repérer Aip1, ou Actin interacting protein 1, comme un des facteurs contribuant potentiellement au désassemblage efficace des filaments d'actine (Rodal et al. 1999). De plus, l'Aip1 présente des sites de fixation à l'actine et à l'ADF/cofiline.

Avant cette étude, les questions qui restaient néanmoins en suspens étaient : si l'ADF/cofiline ne semble pas suffisante pour désassembler des filaments d'actine individuels, serait-elle par contre suffisante pour démanteler certaines structures de filaments d'actine ? Sinon, l'ADF/cofiline et l'Aip1 collaborent-elles pour le désassemblage des structures et des filaments individuels, et si oui, par quel mécanisme ?

Dans un premier temps, nous avons étudié l'interaction de l'ADF/cofiline avec différentes structures de filaments d'actine. Les trois sortes de réseaux ont été artificiellement reconstituées *in vitro* à partir de micropatrons. Le pWA, composé du domaine VCA de la protéine WASP additionné d'un domaine polyproline, a été adsorbé sur deux barres parallèles, permettant l'activation du complexe Arp2/3 et donc la nucléation d'un réseau branché sur ces deux barres. En sortant des zones adsorbées avec le pWA, les filaments d'actine s'alignent pour former un faisceau de filaments parallèles. Les filaments parallèles provenant de chacune des deux barres se rejoignent finalement en faisceaux de filaments de polarité aléatoire, c'est-à-dire mixant des filaments parallèles et des filaments antiparallèles. De même qu'en milieu cellulaire, l'ADF/cofiline se lie sur les trois structures présentes. Elle décore entièrement les câbles d'actine et les stabilise, indépendamment de leur polarité. Elle se lie cependant avec une stoechiométrie beaucoup plus faible sur les réseaux branchés. Curieusement, cela s'accompagne d'un désassemblage du réseau branché nettement plus prononcé, potentiellement par débranchement du complexe Arp2/3 (Blanchoin et al. 2000b), et de la réorganisation du réseau en structures linéaires. Aip1 ayant montré des qualités de désassemblage efficace en présence d'ADF/cofiline (Okreglak & Drubin 2010), j'ai pu observer que cet effet est valable sur les trois types de structures d'actine que j'ai assemblées en moins de 30 s, mais est totalement inefficace en l'absence d'une des deux protéines.

Pour comprendre le fonctionnement macroscopique de l'effet synergique de l'ADF/cofiline et d'Aip1 sur les structures de filaments, j'ai étudié leur interaction avec le filament d'actine individuel grâce à la microscopie à onde évanescente. J'ai d'abord pu observer que, non seulement l'ADF/cofiline se lie de manière coopérative sur le filament, mais la fragmentation a lieu lorsqu'un seuil d'environ 23 ADF/cofilines liées au filament d'actine est atteint. De plus, la fragmentation est polarisée et se produit à la frontière entre le cluster d'ADF/cofiline et la zone non décorée située du côté de l'extrémité pointue. Ce résultat est en accord avec les expériences

d'AFM rapide qui montrent que le changement de conformation du filament d'actine induit par l'ADF/cofiline se propage uniquement vers l'extrémité pointue du filament (Ngo et al. 2015).

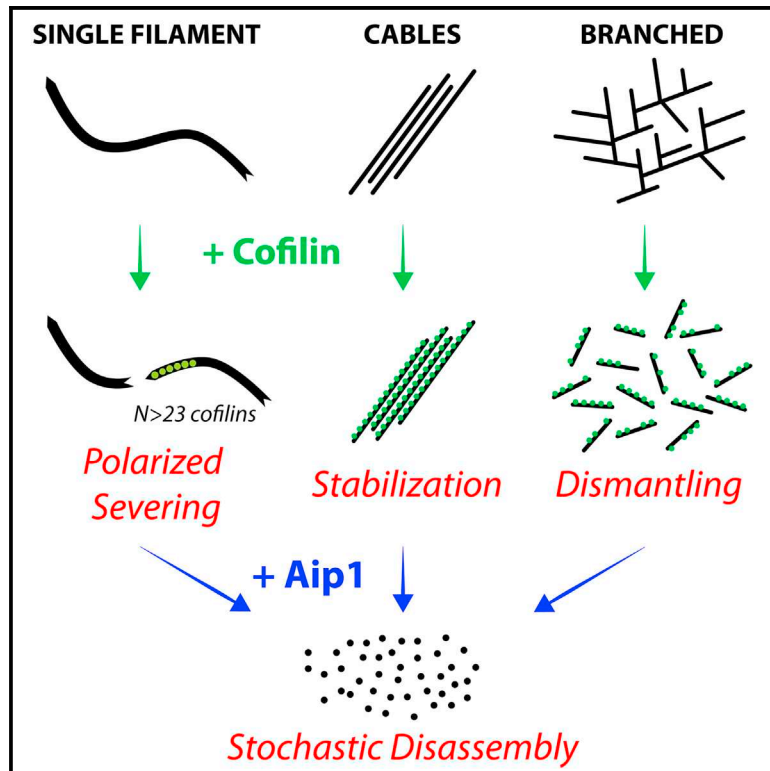
Aip1 n'interagit pas avec le filament d'actine non décoré par l'ADF/cofiline. Vingt-trois ADF/cofilines doivent se lier au filament pour qu'Aip1 soit capable d'interagir avec l'actine et de déclencher la fragmentation du filament d'actine. L'effet d'Aip1 est drastique : à forte concentration d'ADF/cofiline, où le filament est entièrement décoré par ADF/cofiline, Aip1 désassemble le filament en moins de 10 secondes en espèces moléculaires d'actine qui ne sont plus discernables par microscopie de fluorescence.

Cette étude montre que l'ADF/cofiline et l'Aip1 travaillent de concert pour désassembler les filaments d'actine. L'ADF/cofiline ne parvient à changer la conformation du filament d'actine qu'à partir d'un nombre minimal de molécules. Ce changement de conformation permet à l'Aip1 de désassembler efficacement le filament décoré par l'ADF/cofiline. À l'échelle des structures de filaments d'actine, l'ADF/cofiline peut désassembler le réseau branché par débranchement, mais l'intervention de l'Aip1 est nécessaire pour les câbles de filaments d'actine. *In vivo*, l'absence d'Aip1 délocalise partiellement l'ADF/cofiline des patches d'endocytose sur les câbles d'actine (Iida & Yahara 1999; Rodal et al. 1999), signifiant que l'Aip1 serait, en effet, nécessaire pour désassembler les structures linéaires.

Current Biology

Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly

Graphical Abstract



Authors

Laurène Gressin, Audrey Guillotin, ..., Laurent Blanchoin, Alphée Michelot

Correspondence

laurent.blanchoin@cea.fr (L.B.),
alphee.michelot@cea.fr (A.M.)

In Brief

Gressin et al. reveal that ADF/cofilin is not sufficient to disassemble all the different actin architectures. Cooperation between ADF/cofilin and Aip1 is therefore essential to trigger the full disassembly of all actin networks. Aip1 targets the ADF/cofilin-bound sections of actin filaments and triggers their stochastic disassembly.

Highlights

- The activity of ADF/cofilin depends on actin network architecture
- Aip1 rapidly and completely disassembles actin networks marked by ADF/cofilin
- 23 ADF/cofilins create mechanical stress and sever individual actin filaments
- Aip1 stochastically disassembles filaments decorated with $N > 23$ ADF/cofilins

Architecture Dependence of Actin Filament Network Disassembly

Laurène Gressin,¹ Audrey Guillotin,¹ Christophe Guérin,¹ Laurent Blanchoin,^{1,*} and Alphée Michelot^{1,*}

¹Physics of the Cytoskeleton and Morphogenesis Group, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble 38054, France

*Correspondence: laurent.blanchoin@cea.fr (L.B.), alphee.michelot@cea.fr (A.M.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.011>

SUMMARY

Turnover of actin networks in cells requires the fast disassembly of aging actin structures. While ADF/cofilin and Aip1 have been identified as central players, how their activities are modulated by the architecture of the networks remains unknown. Using our ability to reconstitute a diverse array of cellular actin organizations, we found that ADF/cofilin binding and ADF/cofilin-mediated disassembly both depend on actin geometrical organization. ADF/cofilin decorates strongly and stabilizes actin cables, whereas its weaker interaction to Arp2/3 complex networks is correlated with their dismantling and their reorganization into stable architectures. Cooperation of ADF/cofilin with Aip1 is necessary to trigger the full disassembly of all actin filament networks. Additional experiments performed at the single-molecule level indicate that this cooperation is optimal above a threshold of 23 molecules of ADF/cofilin bound as clusters along an actin filament. Our results indicate that although ADF/cofilin is able to dismantle selectively branched networks through severing and debranching, stochastic disassembly of actin filaments by ADF/cofilin and Aip1 represents an efficient alternative pathway for the full disassembly of all actin networks. Our data support a model in which the binding of ADF/cofilin is required to trigger a structural change of the actin filaments, as a prerequisite for their disassembly by Aip1.

INTRODUCTION

Cells change shape at a microscopic or mesoscopic scale by exerting internal forces based on dynamical actin networks [1]. The turnover of actin is characterized by a rapid, organized, and localized polymerization of actin filaments, followed by their controlled disassembly. However, in an apparent contradiction, actin is a very stable polymer, with a limited capacity to disassemble by itself [1]. The assembly of different types of actin networks in vitro indicates that actin structures can remain stable for long periods of time [2, 3]. Therefore, an essential requirement for cells to perform a rapid actin turnover is to be able to trigger a fast disassembly of aging actin net-

works, which can only be performed with the contribution of accessory proteins [1, 4].

A central player in actin disassembly is ADF/cofilin, a 13- to 21-kDa protein conserved in all eukaryotes [5]. ADF/cofilin binds to the side of actin filaments and induces important structural changes, which renders them more compliant to bending and twisting [6, 7]. A large body of literature describes how important these structural changes are for the activity of ADF/cofilin. Current models propose that actin filaments fully decorated by ADF/cofilin are stable; however, actin filaments decorated by sub-stoichiometric densities of ADF/cofilin are severed because they accumulate some mechanical stress at the boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated segments [6–8].

Severing, by itself, is not sufficient to explain how every actin network can be disassembled in cells (reviewed in [4]). Therefore, other molecular players, including Aip1, have been suggested to cooperate with ADF/cofilin to disassemble actin networks efficiently [9–19]. Aip1 has binding sites for both actin and ADF/cofilin and was recently identified as a crucial factor to destabilize freely fluctuating cofilin-saturated actin filaments [17, 18]. However, (1) how these proteins interact with organized actin networks and how they contribute, individually or together, to their disassembly, have yet to be determined, and (2) how the activities of ADF/cofilin and Aip1 are coordinated at the molecular level to disassemble actin filaments remains unclear.

Here we studied the impact of these families of disassembly factors on actin networks of various architectures. We performed this characterization by using protein micropatterning technologies, which permit the geometrical-control of defined actin organization, combined with total internal reflection fluorescence microscopy and triple-color imaging. We found that the efficiency of actin disassembly factors is dependent on the organization of the filaments. Hence, rather than identifying a unique and general mechanism for the disassembly of actin networks in cells, our work suggests that cells may have alternative pathways for the disassembly of actin networks. In addition, our work at the molecular level indicates a possible unidentified function for ADF/cofilin, as marker to maintain actin filaments or networks in a pre-disassembly state.

RESULTS

ADF/Cofilin-Induced Actin Disassembly Depends on Actin Architecture

We first aimed to characterize the effects of critical components of actin disassembly on different actin architectures. Recently, protein micropatterning has been developed to reconstitute

in vitro, within the same field of observation, the three main cellular actin organizations (i.e., Arp2/3 branched networks, parallel cables, or cables of mixed polarity) [20]. In this study, we micropatterned motifs of Las17 at the surface of coverslips (Figure 1A). Las17 is the homolog of WASP in yeast, a nucleation-promoting factor (NPF) of the Arp2/3 complex able to trigger the formation of actin networks in the presence of a polymerizing mixture containing the Arp2/3 complex and actin [21, 22]. We chose a type of geometry with two parallel bars (of 20- μm length) of Las17 separated by 30 μm . With this motif, branched networks are assembled on the patterns and parallel cables emerged from the free elongation of the filaments away from the patterned areas (Figures 1B and 1C and Movie S1). Cables of mixed polarity are formed between the bars, whereas parallel cables are assembled in other areas. We also pasted on top of the coverslips a 6-mm-thick layer of polydimethylsiloxane (PDMS) pinched with a 6-mm-diameter hole (Figure 1A). PDMS created wells and gave the possibility to bring sequentially additional factors in solution. Actin networks were imaged at the surface of the coverslips with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) in order to limit the noise generated by the other fluorescent molecules present in solution [23–25].

When actin assembly from the micropatterned area reached a steady state, we added 2- μM Alexa-488-labeled yeast ADF/cofilin to the reaction mixture (Figure 1D). Although ADF/cofilin interacted with all actin networks, it bound more sparsely on the Arp2/3 networks than on the different populations of cables (Figures 1D and S1A). Binding of ADF/cofilin was correlated with a decrease of the actin fluorescence signal, corresponding to actin disassembly (Figure S1B). The level of disassembly was architecture dependent. Indeed, the actin fluorescence signal after 450 s had decreased more on branched networks than on parallel cables or on cables of mixed polarity (Figures 1D, S1B, and S1C). Experiments performed at different concentrations of ADF/cofilin revealed that even for equivalent binding densities of ADF/cofilin, branched actin networks disassembled better than all the actin cables (Figure S1C). Together, these results indicate a strong dependence of the actin architectures in ADF/cofilin-driven actin network disassembly. ADF/cofilin binding is able to destabilize branched networks but is not sufficient to disassemble bare parallel or antiparallel bundles.

ADF/Cofilin and Aip1 Collaborate to Disassemble Actin Networks Rapidly and Completely

Genetic and biochemical observations indicate that additional disassembly factors, including Aip1, cooperate with ADF/cofilin in vivo [9–11, 13, 18, 26]. Therefore, we tested the synergy between ADF/cofilin and Aip1 on actin network disassembly (Figure 2A). In our experimental system, Aip1 alone was able to bind slowly and homogeneously to actin networks (Figures S2A and S2B), but it did not contribute to their disassembly, as revealed by constant fluorescence actin intensity (Figure S2C). The presence of ADF/cofilin on actin networks accelerated the binding of Aip1 (Figures 2B and S2B and Movie S2). In these conditions, Aip1 was able to trigger the disassembly of all actin networks, including parallel and antiparallel actin organizations. Actin network disassembly was very rapid, as >98% of the actin fluorescence signal had disappeared after 20 s. The fluorescence signal of Aip1 was correlated with the amount of

ADF/cofilin bound to actin networks during disassembly (Figure 2B). This suggests that the simultaneous presence of actin and ADF/cofilin is required for a fast and efficient binding of Aip1 to actin networks and their disassembly.

We compared the previous experimental situation, where Aip1 disassembles ADF/cofilin bound actin networks (Figures 2 and S2C), with an experimental condition in which ADF/cofilin and Aip1 are introduced simultaneously (Figure S3). While the extent of disassembly is equivalent for both conditions, disassembly occurred over several minutes, on average 15 times more slowly. This suggests that the binding of ADF/cofilin to actin networks is the limiting factor for fast disassembly in this system.

Severing of Actin Filaments Requires the Clustering of a Threshold Number of ADF/Cofilin Molecules

Our observations performed at the whole-network level indicate that ADF/cofilin binding is a pre-requisite for the Aip1-enhanced disassembly of actin structures. Therefore, a deeper understanding of how actin networks are disassembled by the coordination of ADF/cofilin and Aip1 must come from single-filament-scale observations. For that purpose, we updated our TIRFM setup to the observation of single molecules [27]. Calibration of the fluorescence intensity of individual Alexa molecules was performed prior to every experiment, with the measurement of the fluorescence intensity loss of molecules bound to the coverslips during their photobleaching (Figure S4). As a control of our measurement, we compared the average intensity of individual Alexa-labeled actin monomers with the total intensity of actin filaments with different degrees of labeling (data not shown).

We focused our analysis first on the effect of ADF/cofilin on actin filaments. ADF/cofilin binds cooperatively to the side of actin filaments (Figure 3A, white arrows; [6, 8, 28]). At a low concentration of ADF/cofilin (180 nM; Movie S3), the accumulation of ADF/cofilin was slow (about $1.4 \text{ molecules} \cdot \text{min}^{-1}$), reaching a maximum of 5 ± 1 molecules, and fragmentation of the filaments rarely occurred (Figures 3A and 3B). At an intermediate concentration of ADF/cofilin (360 nM; Movie S4), it accumulated faster ($32 \pm 18 \text{ molecules} \cdot \text{min}^{-1}$), and fragmentation occurred when the intensity of the ADF/cofilin spots reached a threshold level (Figure 3A, blue arrows; Figure 3B). We quantified the intensity of the spots on the last images before fragmentation, and determined that a number of $N_c = 23 \pm 8$ ADF/cofilins was necessary at the time of severing (Figure 3C). At a high concentration of ADF/cofilin (2 μM), growing actin filaments were fully decorated with ADF/cofilin and were resistant to fragmentation as described previously in the literature (Figure 3A, Movie S5, and [2, 29]).

Actin Filament Severing by ADF/Cofilin Is Polarized

When we performed actin filament severing experiments at an intermediate concentration of ADF/cofilin (360 nM), we noticed that fragmentation events occurred systematically in a polarized manner (Figure 3A, blue arrows). In other words, for every part of the filaments decorated by a stretch of ADF/cofilin, severing systematically occurred at one of the boundaries between decorated and bare sections of the filaments. After severing, one fragment remained practically free of ADF/cofilin at its severed end (<4% of the ADF/cofilin present before severing), while the other

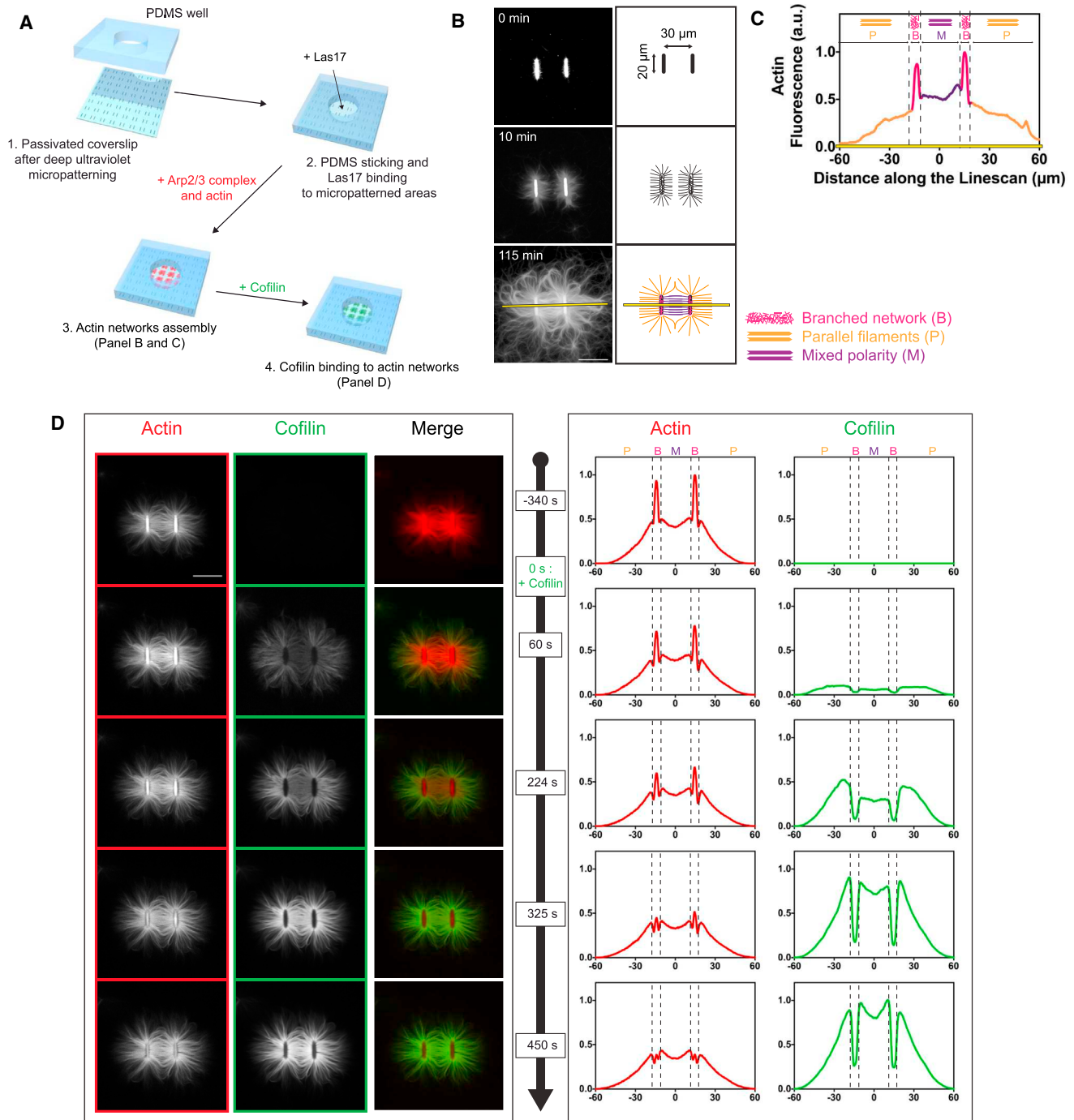


Figure 1. Effect of ADF/Cofilin on Different Actin Network Architectures

(A) Schematic description of the experiment performed in [Figure 1](#).

(B) Left: time course of Alexa-568-labeled actin (2 μ M) assembly on Las-17-coated micropatterns in the presence of Arp2/3 complex (20 nM), prior to the addition of ADF/cofilin. Right: color-coded cartoon of actin network architectures.

(C) Quantification of (B). Actin network normalized fluorescence intensity along the yellow linescan indicated in (B) after a 115 min polymerization time is shown.

(D) Left: time course of Alexa-488-labeled ADF/cofilin (2 μ M; green) binding to actin networks (red). Right: quantification of actin (red) and ADF/cofilin (green) fluorescence intensities, normalized to their peak intensities.

Scale bars represent 30 μ m. See also [Figure S1](#) and [Movie S1](#).

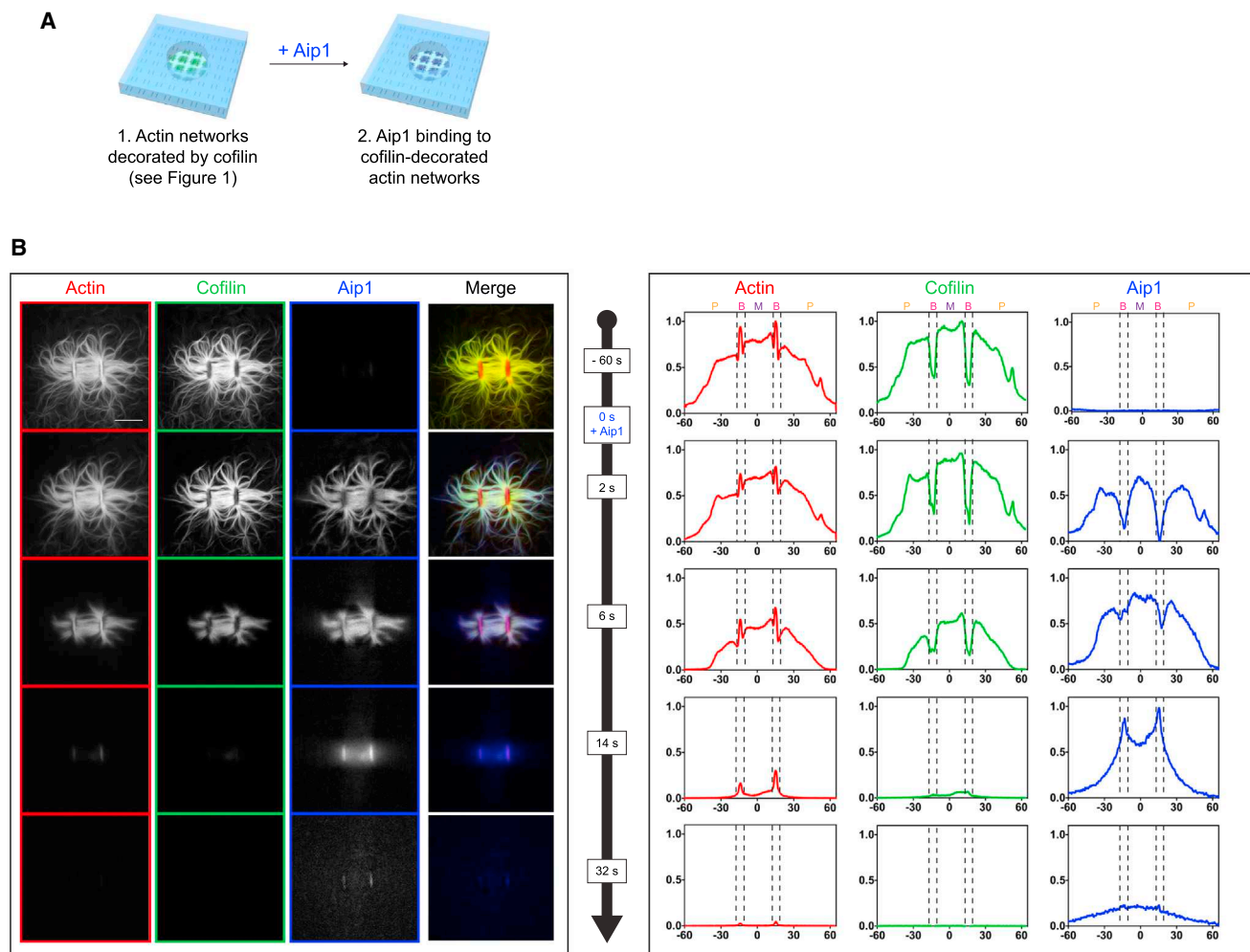


Figure 2. Effect of Aip1 on ADF/Cofilin-Bound Actin Networks

(A) Schematic description of the experiment performed in Figures 2A and 2B and 2C.

(B) Left panels: Time course of Aip1-SNAP-Alexa-647 (1 μ M; in blue) binding to ADF/cofilin-decorated actin networks. Right panels: Quantification of actin (in red), ADF/cofilin (in green) and Aip1 (in blue) fluorescence intensities, normalized to their peak intensities. Scale Bar represents 30 μ m.

See also Movie S2.

fragment kept the majority of the ADF/cofilin molecules (>88% of the ADF/cofilin present before severing). After many severing events, a large number of fragments decorated with a stretch ADF/cofilin at one of their ends remained on the coverslips (Figure 3D). Photobleaching (FRAP) of the ADF/cofilin stretches showed an absence of fluorescence recovery (Figure 3E). This indicates that ADF/cofilin molecules are bound to actin filaments for long periods of time, without any exchange with the ADF/cofilin molecules in solution [6, 8].

Next, we aimed to determine the nature of the actin filament ends after fragmentation. We imaged the elongation of the fragments, and we observed that actin monomer addition always occurred at the end of the filaments that was left free of ADF/cofilin (Figures 3F and 3G). Altogether, these observations indicate that the fragmentation of actin filaments by ADF/cofilin is a polarized event. After severing, the ADF/cofilin molecules remain on the pointed end of the new fragments, whereas the barbed ends are bare and free to elongate.

The Number of ADF/Cofilin Bound to Actin Regulates Aip1-Induced Disassembly

We focused next on the effect of Aip1 at the filament scale. We polymerized actin filaments in the presence of different concentrations of ADF/cofilin for 5 min, and then injected 1- μ M Aip1 (Figure 4A). Our results indicate that the number of ADF/cofilin molecules that accumulated along the actin filaments modulated the activity of Aip1. In the absence or at a low concentration of ADF/cofilin, Aip1 did not show any effect, and ADF/cofilin stretches remained stable along the actin filaments over long periods of time (>2 min) (Figures 4B and 4C and Movie S6). At an intermediate concentration of ADF/cofilin, Aip1 did not catalyze the severing reaction (Figure 4D). However, when a severing event occurred, we observed a progressive decrease of the number of ADF/cofilins bound at the pointed ends of the actin fragment (Figures 4B and 4C and Movie S7). Since the ADF/cofilin stretches are stable in the absence of Aip1, this decrease indicates that Aip1 unloads several ADF/cofilin molecules from

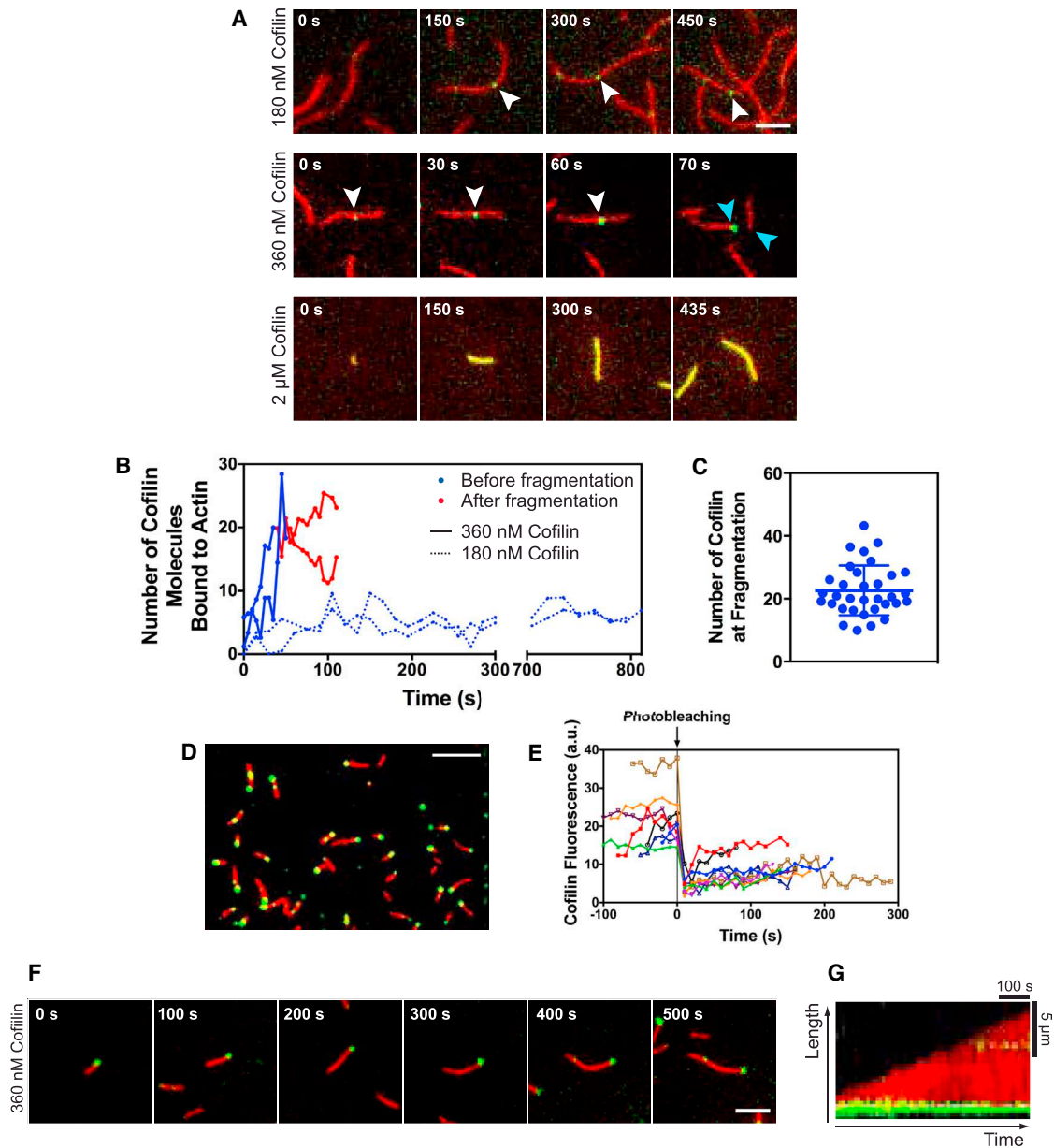


Figure 3. Quantitative Measurement of ADF/Cofilin Accumulation along the Side of Individual Actin Filaments

(A) Time course of Alexa-488-labeled ADF/cofilin (green) binding to individual actin filaments (800 nM; red), at the indicated concentrations. White arrowheads show representative examples of ADF/cofilin cooperative binding to actin filaments. Blue arrowheads show a representative example of a severing event, where ADF/cofilin molecules remain mainly on one end of the fragments. The scale bar represents 5 μ m.

(B) Quantification of (A). A time course of four representative molecular accumulations of ADF/cofilin along actin filaments for 180 nM (dotted lines) or 360 nM (continuous lines) of ADF/cofilin is shown. Curves are plotted in blue prior to fragmentation and in red after fragmentation occurred.

(C) Quantification of (A) and (B). Distribution of the number of ADF/cofilin molecules bound to actin filaments prior to severing is shown (23 ± 11 molecules; $n = 46$). Error bars indicate the SD.

(D) Representative field of observation after many fragmentation events with 360-nM ADF/cofilin. The scale bar represents 10 μ m.

(E) Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) of ADF/cofilin accumulations after severing.

(F) Time course of actin filament elongation after severing. The scale bar represents 5 μ m.

(G) Kymograph of (D), plotted along the axis of the filament.

See also [Figures S2–S4](#) and [Movies S3, S4, and S5](#).

the severed ends or triggers the disassembly of a short part of the filament. Aip1 showed its most dramatic effect at a high concentration of ADF/cofilin, where it was very effective in disas-

sembling actin filaments fully decorated with ADF/cofilin ([Figure 4B](#) and [Movie S8](#)). Disassembly was complete within 4 s. Overall, these results were confirmed with a measurement of

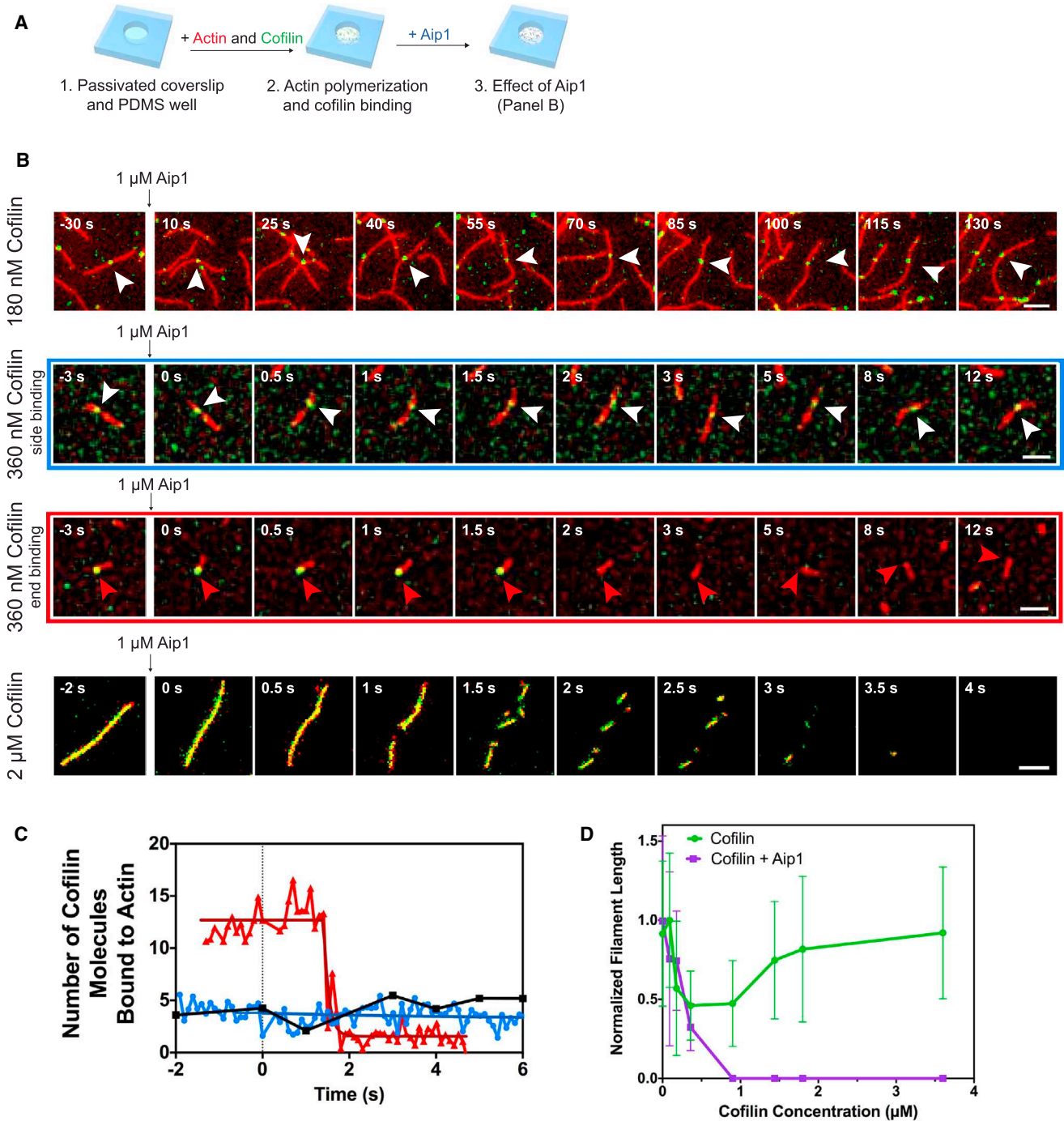


Figure 4. Effect of Aip1 on Individual ADF/Cofilin-Bound Actin Filaments

(A) Schematic description of the experiment performed in Figure 4.

(B) Time course of Aip1's (1 μ M) effect on individual actin filaments (800 nM; red) decorated with various amounts of ADF/cofilin (green). White arrowheads track representative examples of ADF/cofilin stretches bound to the side of actin filaments (non-severing events). Red arrowheads track representative examples of ADF/cofilin stretches bound to the pointed end of actin filaments (subsequent to a severing event). Scale bars represent 5 μ m.

(C) Quantification of (B). A time course of three representative ADF/cofilin stretches along actin filaments at 180 nM (black curve) and 360 nM (red and blue curves) of ADF/cofilin after injection of Aip1 is shown. Clusters of ADF/cofilin are observed either before (blue curve) or after (red curve) the fragmentation occurred. Fluorescence signal decrease of end-binding ADF/cofilin clusters were fitted with a monoexponential decay ($T_{\text{decay}} = 1.3 \pm 1.1$ s; $n = 14$).

(D) Quantification of the filament lengths as a function of ADF/cofilin concentration, in the presence of 800 nM actin alone or in the presence of 800 nM actin and 1 μ M Aip1, normalized to the maximum values. Error bars indicate the SD.

See also Figures S4 and S5 and Movies S6, S7, and S8.

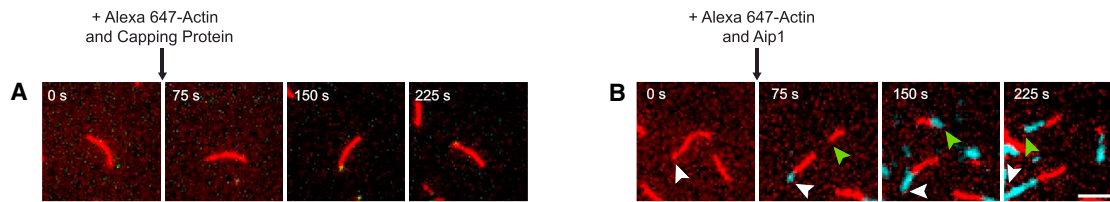


Figure 5. Actin Filament Elongation Assay in the Presence of ADF/Cofilin and Aip1

(A) Time course of Alexa-568-actin filament (800 nM; red) elongation in the presence of 360 nM ADF/cofilin after injection of 800 nM Alexa-647-actin monomers (blue) and 20 nM capping protein.

(B) Time course of Alexa-568-actin filament (800 nM; red) elongation in the presence of 360 nM ADF/cofilin after injection of 800 nM Alexa-647-actin monomers (blue) and 1 μ M Aip1. The scale bar represents 5 μ m.

the average length of the actin filaments. The length of the filaments was comparable for concentrations of ADF/cofilin up to 300 nM, whether Aip1 was present in solution or not. However, the length of the filaments rapidly dropped to sizes below the diffraction limit of our microscope for higher concentrations of ADF/cofilin in the presence of Aip1 (Figure 4D).

The effect of Aip1 on ADF/cofilin-bound actin filaments was dose dependent. Indeed, a low concentration of Aip1 (5 nM) changed the kinetic of actin filament disassembly, but not its extent (Figure S5). Slower disassembly allowed us to track the fate of the disassembling filaments. We observed a frequent severing of the filaments until they were too short to be detected, but we did not convincingly observe any fast depolymerization or bursting of the filaments ends as previously reported [18, 30].

We also performed these experiments with various concentrations of Alexa-labeled Aip1, but we failed to detect any interaction of Aip1 with either ADF/cofilin or single actin filaments prior to disassembly (data not shown). This suggests that a very transient interaction of a low number of Aip1 molecules with ADF/cofilin and/or actin is sufficient to trigger the disassembly of the filaments.

Effect of ADF/Cofilin and Aip1 on Actin Filaments Barbed Ends

In the past, a number of genetic and biochemical observations suggested that ADF/cofilin and Aip1 may have the ability to inhibit the elongation of actin filament barbed ends [11, 31, 32]. However, whether these two proteins are sufficient for this effect remains controversial [17, 18, 33]. A difficulty in detecting such an inhibition arises from the simultaneous efficiency of ADF/cofilin and Aip1 in disassembling filaments into non-polymerizable low-molecular-weight species [34]. Therefore, in this study, we could only test barbed-end capping on Alexa-568-actin filaments pre-assembled in the presence of an intermediate concentration of ADF/cofilin (Figures 5A and 5B). Although simultaneous addition of Alexa-647-actin monomers and 20-nM capping protein induced a rapid and strong capping of the Alexa-568-actin filaments (Figure 5A), simultaneous addition of Alexa-647-actin monomers and 1- μ M Aip1 (which corresponds roughly to the concentration of Aip1 in cells [32]) did not induce barbed-end capping, even at sites where fragmentation events occurred (Figure 5B). In these conditions, the simultaneous presence of ADF/cofilin and Aip1 did not modify the elongation rate of actin filaments (data not shown).

In vivo, capping protein sterically limits the barbed-end elongation of actin filaments before they are disassembled. Two publications questioned a potential inhibitory effect of barbed-end capping for the fast disassembly of actin filaments, leading to contradictory results [30, 33]. We tested this hypothesis in our system by adding capping protein to a solution of actin filaments polymerizing in the presence of 2- μ M Alexa-488-cofilin (Figure 6). We verified that actin filament elongation was interrupted before addition of Aip1. Actin filaments disassembled in the presence of capping protein and in its absence, showing that barbed-end capping is not an obstacle to filament disassembly.

DISCUSSION

In this study, we have detailed the interplay between ADF/cofilin and Aip1 to disassemble actin, both at the filament scale and at the level of the different cellular actin organizations.

Actin Disassembly and Network Architecture Specificities

Several lines of evidence indicate that *in vivo*, disassembly factors act on different actin networks with variable efficiency and provide disassembly rates over different time scales. One example comes from observations in yeast, which contain three types of actin organizations. At the cell cortex, endocytic actin patches are composed of Arp2/3 branched networks. Their average lifetime is about 15 s, with a disassembly phase of about 6 s [35–37]. Inside the cell body, actin cables are composed of short parallel actin filaments, mostly of identical orientations [38]. Actin cables are very dynamic and disappear within seconds [36, 39]. At the division site, a cytokinetic ring is composed of short parallel actin filaments, with identical orientations or mixed polarities depending on the stage of cell division [40]. Most recent works indicate turnover values for the ring ranging from 11 s to several minutes [36, 41, 42]. ADF/cofilin and Aip1 are mainly detected on actin patches, indicating an apparent affinity of these proteins that is higher for branched networks than for linear networks [10, 43]. Interestingly, depletion of Aip1 in budding yeast partially relocalizes ADF/cofilin from actin patches to cables. In these mutants, decoration of actin cables by ADF/cofilin is correlated with their stabilization [10, 13].

These cellular observations indicate the existence of important rules linking actin structural organization with its disassembly. Previous works have demonstrated that the effects of actin binding proteins are not necessarily the same when they interact with

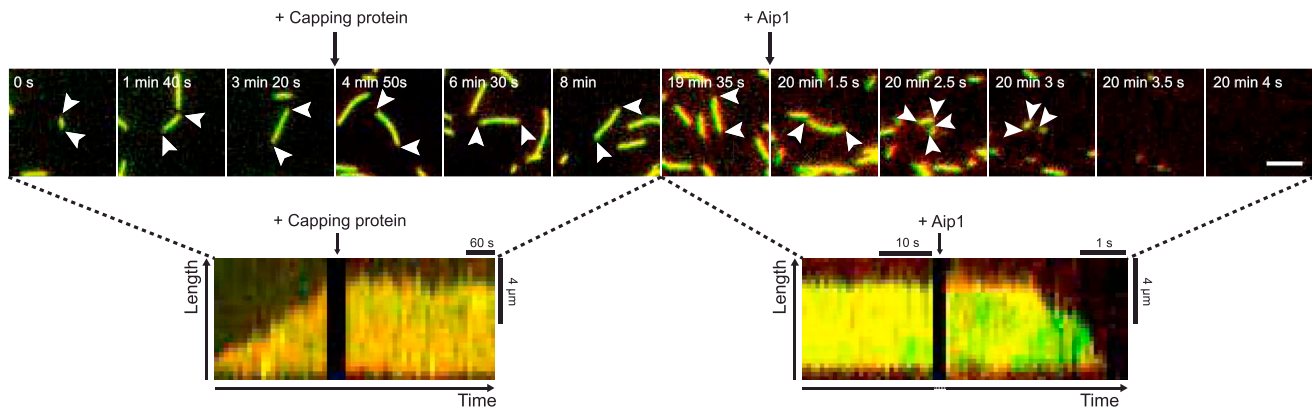


Figure 6. Effect of ADF/Cofilin and Aip1 on Actin Filaments Blocked by Capping Protein

Top: time course of actin filament (800 nM) elongation in the presence of 2- μ M Alexa-488-ADF/cofilin for 4 min, followed by a first injection of 20-nM capping protein for 16 min and a second injection of 1- μ M Aip1. The scale bar represents 5 μ m. Bottom: kymograph of the experiment plotted along the axis of a representative actin filament.

individual actin filaments or with different types of actin architectures [36, 44]. Therefore, we hypothesized that network geometrical organization could be one of the key parameters to explain how actin disassembly is regulated in cells. Our results now indicate that ADF/cofilin binding to actin is architecture dependent (Figures 1 and 7A). ADF/cofilin can disassemble branched actin networks but is unable to disassemble parallel cables or cables of mixed polarity. A probable explanation arises from the fact that ADF/cofilin's binding accelerates the debranching of the Arp2/3 complex [45, 46], which is expected to induce a progressive loss of structural integrity of branched networks and their faster dismantling (Figure 7A). However, even for branched actin networks, ADF/cofilin is unable to fully convert actin networks into actin monomers. At steady state, a population of fragments loaded with ADF/cofilin remains stable over long periods of time (Figures 1 and 7A). Moreover, on parallel cables or cables of mixed polarity, ADF/cofilin induces only a marginal disassembly and these structures remain highly decorated by ADF/cofilin. In previous studies, this effect has been proposed to have a physiological relevance for the stabilization of some cellular actin structures [2]. Our work now suggests that ADF/cofilin loading on to actin filaments could also be an essential prerequisite for Aip1-mediated actin disassembly. From these results, we can now propose a simple interpretation of the *aip1 Δ* phenotypes observed in cells. Our explanation is that ADF/cofilin-loaded actin cables become unable to disassemble in the absence of Aip1, whereas actin patches may still use debranching as an efficient alternative for disassembly.

New Insights about the Interaction of ADF/Cofilin with Actin Filaments

At the filament scale, we found unexpected properties of ADF/cofilin's interaction with actin. Our single-molecule detection imaging capacity enabled us to quantify the number of ADF/cofilin molecules bound to the side of actin filaments in real time. We demonstrate that severing induced by ADF/cofilin is a much more efficient and regulated mechanism than previously thought. We measured that a minimal cluster of 23 ADF/cofilin molecules along an actin filament is necessary for efficient

severing (Figures 3 and 7B). A large body of literature details how the binding of ADF/cofilin to actin filaments modifies their ultra-structural and -mechanical properties [6, 7, 47, 48]. We propose that a threshold number of 23 ADF/cofilin molecules in a cluster is required to trigger a conformational change on actin filaments and to provide enough mechanical stress for their fragmentation (Figure 7B).

Moreover, the dissymmetry in severing suggests that the mechanical stress created by the ADF/cofilin stretches is polarized. These results are in line with observations performed at the ultra-structural level. High-speed atomic force microscopy has recently revealed that the helical pitch of ADF/cofilin-decorated actin filaments is 25% shorter compared to bare filaments [49]. This conformational change is only propagated to the neighboring bare segments on the pointed end side of the clusters, but not on the barbed-end side. Consequently, this study found that ADF/cofilin clusters only grow toward the pointed end of actin filaments. This observation explains why clusters do not accumulate more ADF/cofilin molecules at the pointed ends of the fragments after a successful severing event in our experiments.

A Step Forward in our Understanding of Actin Filament Disassembly by ADF/Cofilin and Aip1

ADF/cofilin and Aip1 work in tandem to fully disassemble any type of actin organization. In this study, we used triple-color single-molecule imaging to dissect the effect of Aip1 on individual actin filaments decorated by variable numbers of ADF/cofilin molecules (Figure 4). We have integrated our results into a model based on the observation that Aip1 requires the same minimal stretch of 23 ADF/cofilins bound to actin filaments to disassemble them efficiently (Figure 7B). We propose that Aip1-stimulated disassembly requires the conformational change on actin filaments induced by a minimal local density of ADF/cofilin. In this model, actin filaments or higher-ordered organizations fully decorated by ADF/cofilin become ideal substrates for Aip1.

How destabilization of actin filaments by Aip1 occurs remains to be determined at the structural level, but an interesting hypothesis is that actin filaments could disassemble through

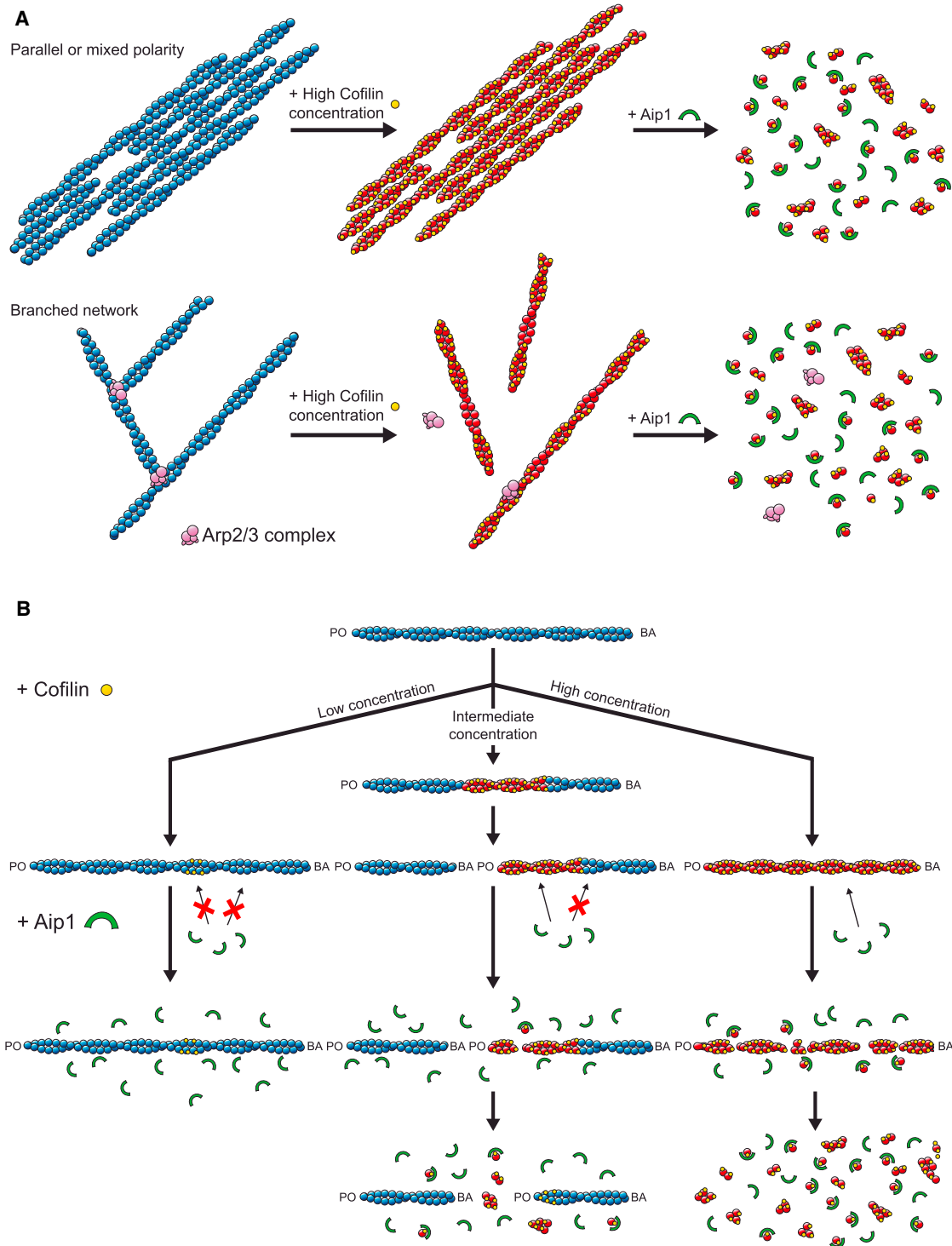


Figure 7. Models for the Disassembly of Actin by ADF/Cofilin and Aip1

(A) Disassembly at the whole-network scale: architecture dependence. In this model, binding of ADF/cofilin to actin cables does not trigger their disassembly, but switches actin filaments (blue filaments) to a pre-disassembly state (red filaments) (top). However, ADF/cofilin has an important effect for the dismantling of branched networks, through its de-branching activity (bottom). For all actin networks, presence of Aip1 turns these stable ADF/cofilin-decorated structures into unstable assemblies, prone to stochastic disassembly.

(B) Severing and disassembly at the single-filament scale. In this model, binding of ADF/cofilin needs to reach a threshold level of 23 molecules to trigger a conformational change of the filaments (represented by a change in their color, from blue to red). At a low concentration of ADF/cofilin (left), the threshold level is not reached. At an intermediate concentration of ADF/cofilin (center), actin filaments decorated by sub-stoichiometric densities of ADF/cofilin but with $N > 23$

(legend continued on next page)

cooperative strand separation [30]. Such mechanism was described to induce in vitro shortening of actin filaments by bursts at their ends. In our work, we have not been able to detect any bursting event from the ends of the filaments and capping protein was not an inhibitor of disassembly. Therefore, our results do not support the existence of any end bursting for the fast disassembly of yeast actin filaments, although we do not rule out the possibility that bursting could come from some isoform specificity. Nevertheless, the fact that Aip1 is sufficient in our system to induce a disassembly of actin networks at cellular rates does not support the necessity of any end bursting to describe the synergy between ADF/cofilin and Aip1.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Protein expression, purification, and labeling are detailed in the [Supplemental Experimental Procedures](#).

Sample Preparation

Glass Cleaning

Glass slides and coverslips were cleaned by sonication at room temperature for 15 min in 1 M aqueous NaOH and for 15 min in ethanol. They were extensively rinsed with deionized Milli-Q (Millipore) filtered water after each sonication step and were eventually dried and stored for up to 2 weeks at room temperature.

Glass Passivation

Slides and coverslips were plasma treated for 3 min at 80–90 W (Femto; Diener Electronic) and immediately incubated with a passivation agent. For the micropatterning-based experiments, slides and coverslips were incubated with 0.1 mg/ml Poly(L-lysine)-poly(ethyleneglycol) in 10 mM HEPES (pH 7.4) for 30 min at room temperature, washed gently in water, dried, and stored at 4°C for up to 1 week. For the single-filament-scale experiments, slides and coverslips were incubated with 1 mg/ml Silane-PEG 5K in a solution of ethanol complemented with 0.1% HCl for 18 hr at room temperature under gentle shaking, washed extensively in ethanol and water, dried, and stored at 4°C for up to 1 week.

PDMS Wells

PDMS wells were prepared by mixing 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 7-mm-thick layers, and heated at 100°C until it hardened (i.e., for about 20 min). PDMS was cooled down, cut to appropriate shapes, and stuck to the coverslips. An additional cover of PDMS was placed on top of the wells to avoid evaporation.

Las17 Micropatterning

Surface patterns were created by the deep UV micropatterning method as previously described [20, 50]. 10 μ l of a 200-nM solution of Las17 in its purification buffer was incubated with the micropatterned areas inside the wells for 15 min at 4°C.

Actin Assembly

Yeast actin, rabbit actin, and labeled rabbit-muscle actin were mixed in G buffer (5 mM Tris-HCl [pH 8], 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, and 1 mM Na₂S₂O₈) to a final ratio of 1:4 (rabbit actin:yeast actin), with an overall 10% labeling percentage. Actin polymerization was initiated by mixing the proteins of interest in F buffer (10 mM imidazole-HCl [pH 7.0], 75 mM KCl, 1 mM EGTA, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 70 mM DTT, 2.5 mg/ml glucose, 15 μ g/ml catalase, 70 μ g/ml glucose oxidase, 0.1% BSA, and 0.3% methylcellulose).

TIRF Microscopy and Data Analysis

Time course of actin assembly was acquired on a Nikon Eclipse Ti microscope, equipped with a 60 \times objective and an Evolve EMCCD camera (Photometrics)

using Metamorph v.7.7.10.0. Data were analyzed with ImageJ v.1.48 and plotted with GraphPad Prism 6.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, five figures, and eight movies and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.011>.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Shirin Hashem for her comments and corrections on the manuscript. L.G. was supported by an Irtelise PhD fellowship (CEA). This project was supported by Labex GRAL and ANR grant number ANR-12-BSV5-0014 (Contract) to L.B. and number ANR-14-CE11-0011-01 (DiANE) to A.M.

Received: January 1, 2015

Revised: March 6, 2015

Accepted: April 8, 2015

Published: April 23, 2015

REFERENCES

1. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* **94**, 235–263.
2. Michelot, A., Berro, J., Guérin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., and Blanchoin, L. (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* **17**, 825–833.
3. Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* **20**, 423–428.
4. Briehner, W. (2013). Mechanisms of actin disassembly. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2299–2302.
5. Poukkula, M., Kremneva, E., Serlachius, M., and Lappalainen, P. (2011). Actin-depolymerizing factor homology domain: a conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics. *Cytoskeleton (Hoboken)* **68**, 471–490.
6. De La Cruz, E.M. (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* **1**, 51–59.
7. Elam, W.A., Kang, H., and De la Cruz, E.M. (2013). Biophysics of actin filament severing by cofilin. *FEBS Lett.* **587**, 1215–1219.
8. 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.
9. Okada, K., Obinata, T., and Abe, H. (1999). XAIP1: a *Xenopus* homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins. *J. Cell Sci.* **112**, 1553–1565.
10. Rodal, A.A., Tetreault, J.W., Lappalainen, P., Drubin, D.G., and Amberg, D.C. (1999). Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J. Cell Biol.* **145**, 1251–1264.
11. Okada, K., Blanchoin, L., Abe, H., Chen, H., Pollard, T.D., and Bamburg, J.R. (2002). *Xenopus* actin-interacting protein 1 (XAip1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends. *J. Biol. Chem.* **277**, 43011–43016.

molecules of ADF/cofilin are prone to an asymmetric severing event. After fragmentation, ADF/cofilin stretches remain near the pointed ends (PO), while barbed ends (BA) remain free to elongate. At a high concentration of ADF/cofilin (right), filaments decorated by stoichiometric densities of ADF/cofilin are stable. In this model, the conformation of actin filaments regulates the activity of Aip1. Only actin filaments decorated with $N > 23$ molecules of ADF/cofilin undergo a fast stochastic disassembly.

12. Rogers, S.L., Wiedemann, U., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J. Cell Biol.* **162**, 1079–1088.
13. Okada, K., Ravi, H., Smith, E.M., and Goode, B.L. (2006). Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2855–2868.
14. Kato, A., Kurita, S., Hayashi, A., Kaji, N., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2008). Critical roles of actin-interacting protein 1 in cytokinesis and chemotactic migration of mammalian cells. *Biochem. J.* **414**, 261–270.
15. Augustine, R.C., Pattavina, K.A., Tüzel, E., Vidali, L., and Bezanilla, M. (2011). Actin interacting protein1 and actin depolymerizing factor drive rapid actin dynamics in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* **23**, 3696–3710.
16. Chu, D., Pan, H., Wan, P., Wu, J., Luo, J., Zhu, H., and Chen, J. (2012). AIP1 acts with cofilin to control actin dynamics during epithelial morphogenesis. *Development* **139**, 3561–3571.
17. Chen, Q., Courtemanche, N., and Pollard, T.D. (2015). Aip1 promotes actin filament severing by cofilin and regulates constriction of the cytokinetic contractile ring. *J. Biol. Chem.* **290**, 2289–2300.
18. Nadkarni, A.V., and Brieher, W.M. (2014). Aip1 destabilizes cofilin-saturated actin filaments by severing and accelerating monomer dissociation from ends. *Curr. Biol.* **24**, 2749–2757.
19. Talman, A.M., Chong, R., Chia, J., Svitkina, T., and Agaisse, H. (2014). Actin network disassembly powers dissemination of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Sci.* **127**, 240–249.
20. 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. Mater.* **9**, 827–832.
21. Rodal, A.A., Manning, A.L., Goode, B.L., and Drubin, D.G. (2003). Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins. *Curr. Biol.* **13**, 1000–1008.
22. Michelot, A., Costanzo, M., Sarkeshik, A., Boone, C., Yates, J.R., 3rd, and Drubin, D.G. (2010). Reconstitution and protein composition analysis of endocytic actin patches. *Curr. Biol.* **20**, 1890–1899.
23. Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., and Ishiwata, S. (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nat. Cell Biol.* **4**, 666–673.
24. Kuhn, J.R., and Pollard, T.D. (2005). Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* **88**, 1387–1402.
25. Michelot, A., Derivery, E., Paterski-Boujemaa, R., Guérin, C., Huang, S., Parcy, F., Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2006). A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr. Biol.* **16**, 1924–1930.
26. Balcer, H.I., Goodman, A.L., Rodal, A.A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J.E., and Goode, B.L. (2003). Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1. *Curr. Biol.* **13**, 2159–2169.
27. Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S., and Kirchhausen, T. (2012). The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell* **150**, 495–507.
28. Hayakawa, K., Sakakibara, S., Sokabe, M., and Tatsumi, H. (2014). Single-molecule imaging and kinetic analysis of cooperative cofilin-actin filament interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 9810–9815.
29. Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* **24**, 13–23.
30. Kueh, H.Y., Charras, G.T., Mitchison, T.J., and Brieher, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* **182**, 341–353.
31. Tsuji, T., Miyoshi, T., Higashida, C., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2009). An order of magnitude faster AIP1-associated actin disruption than nucleation by the Arp2/3 complex in lamellipodia. *PLoS ONE* **4**, e4921.
32. Michelot, A., Grassart, A., Okreglak, V., Costanzo, M., Boone, C., and Drubin, D.G. (2013). Actin filament elongation in Arp2/3-derived networks is controlled by three distinct mechanisms. *Dev. Cell* **24**, 182–195.
33. Ono, S., Mohri, K., and Ono, K. (2004). Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 14207–14212.
34. Okreglak, V., and Drubin, D.G. (2010). Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J. Cell Biol.* **188**, 769–777.
35. Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D.G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475–487.
36. Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 605–645.
37. Okreglak, V., and Drubin, D.G. (2007). Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* **178**, 1251–1264.
38. Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M., and Mabuchi, I. (2005). Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat. Cell Biol.* **7**, 916–917.
39. Yu, J.H., Crevenna, A.H., Bettenbühl, M., Freisinger, T., and Wedlich-Söldner, R. (2011). Cortical actin dynamics driven by formins and myosin V. *J. Cell Sci.* **124**, 1533–1541.
40. Kamasaki, T., Osumi, M., and Mabuchi, I. (2007). Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J. Cell Biol.* **178**, 765–771.
41. Mendes Pinto, I., Rubinstein, B., Kucharavy, A., Unruh, J.R., and Li, R. (2012). Actin depolymerization drives actomyosin ring contraction during budding yeast cytokinesis. *Dev. Cell* **22**, 1247–1260.
42. Stachowiak, M.R., Laplante, C., Chin, H.F., Guirao, B., Karatekin, E., Pollard, T.D., and O’Shaughnessy, B. (2014). Mechanism of cytokinetic contractile ring constriction in fission yeast. *Dev. Cell* **29**, 547–561.
43. Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* **388**, 78–82.
44. 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.
45. Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* **10**, 1273–1282.
46. Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* **19**, 537–545.
47. Galkin, V.E., Orlova, A., VanLoock, M.S., Shvetsov, A., Reisler, E., and Egelman, E.H. (2003). ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J. Cell Biol.* **163**, 1057–1066.
48. Galkin, V.E., Orlova, A., Kudryashov, D.S., Solodukhin, A., Reisler, E., Schröder, G.F., and Egelman, E.H. (2011). Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 20568–20572.
49. Ngo, K.X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T., and Uyeda, T.Q. (2015). Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife* **4**, 1–22.
50. Reymann, A.-C., Guérin, C., Théry, M., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2014). Geometrical control of actin assembly and contractility. *Methods Cell Biol.* **120**, 19–38.

Current Biology

Supplemental Information

Architecture Dependence of Actin

Filament Network Disassembly

Laurène Gressin, Audrey Guillotin, Christophe Guérin, Laurent Blanchoin and Alphée Michelot

Figure S1, related to Figure 1: Effect of ADF/cofilin on Different Actin Network Architectures

(A) Ratio of ADF/cofilin fluorescence intensity over actin fluorescence intensity after a 450 s binding time for different actin network architectures. Error bars indicate standard deviations.

(B) Kinetics of actin disassembly for different actin network architectures after injection of ADF/cofilin.

(C) Normalized actin fluorescence decrease as a function of cofilin binding density for different actin network architectures. Density equals to 1 when a molecule of ADF/cofilin decorates every actin subunit.

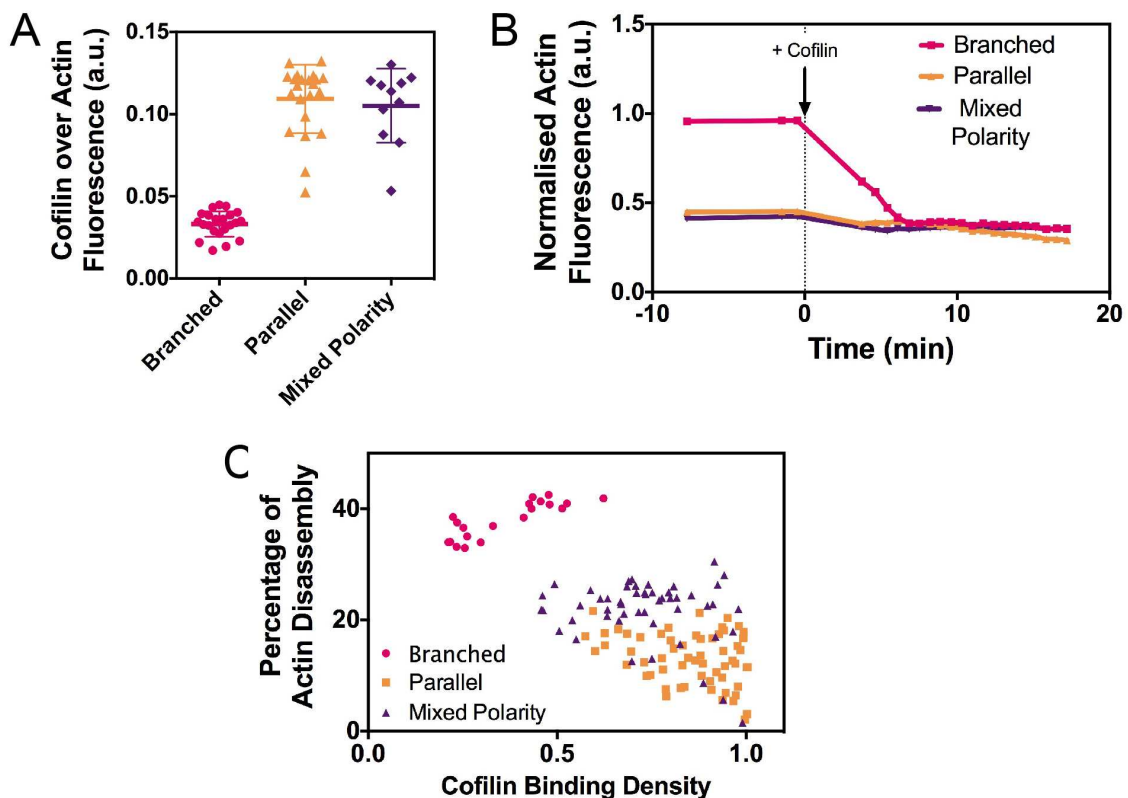
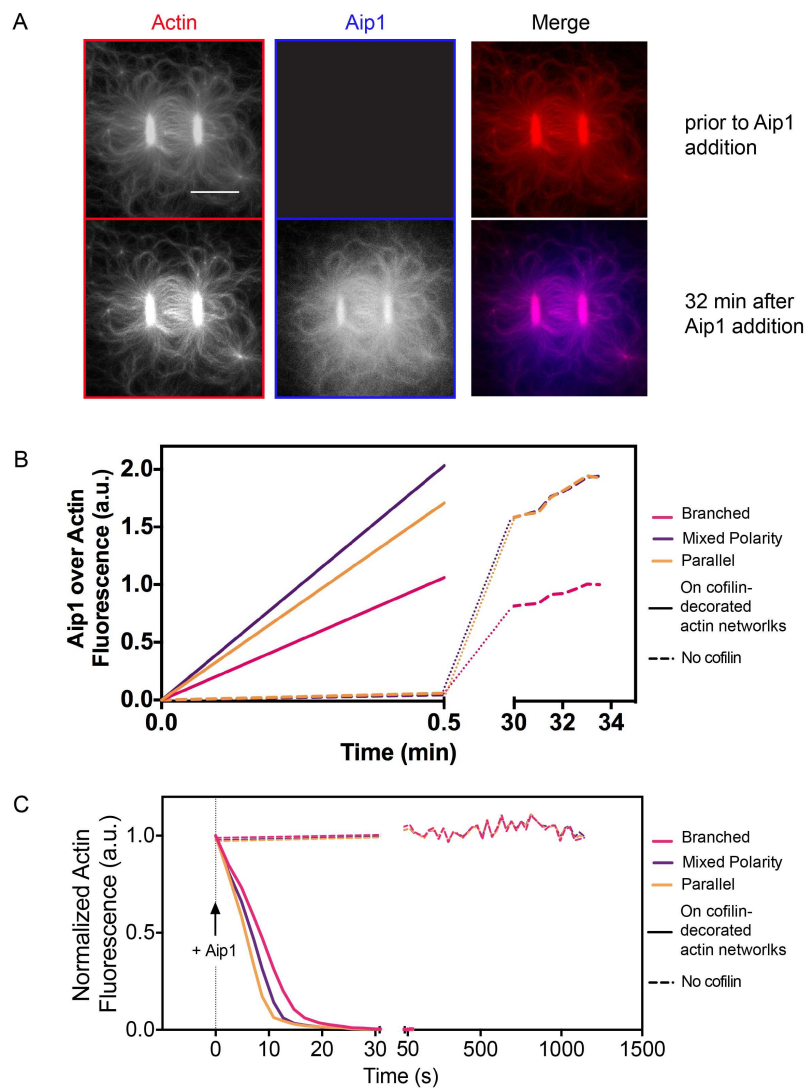


Figure S2, related to Figure 2: Binding of Aip1 to Actin Networks in the Absence of ADF/cofilin

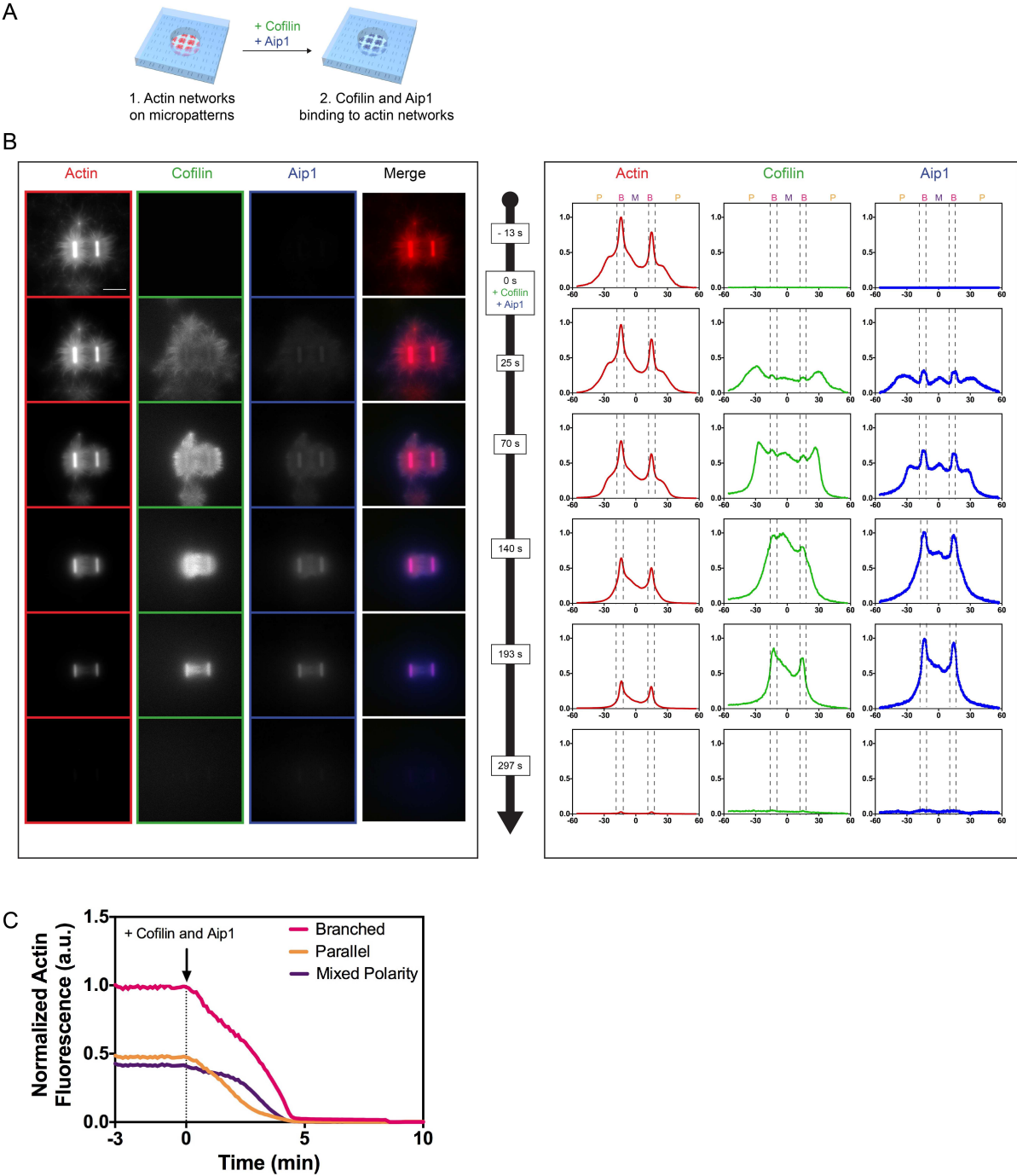


(A) Binding of Aip1-SNAP-Alexa 647 (1 μM ; in blue) to actin networks (in red) assembled from Las-17 coated micropatterns. Scale Bar represents 30 μm .

(B) Kinetics of Aip1 (1 μM) binding to different actin network architectures, normalized to the actin intensity, and comparison to actin networks decorated by 2 μM of ADF/cofilin.

(C) Kinetics of actin disassembly for different actin network architectures in the presence of 1 μM Aip1, for actin networks non-decorated or decorated by 2 μM of ADF/cofilin.

Figure S3, related to Figure 2: Effect of a simultaneous binding of ADF/cofilin and Aip1 on Actin Networks



(A) Schematic description of the experiment performed in Figure S2.

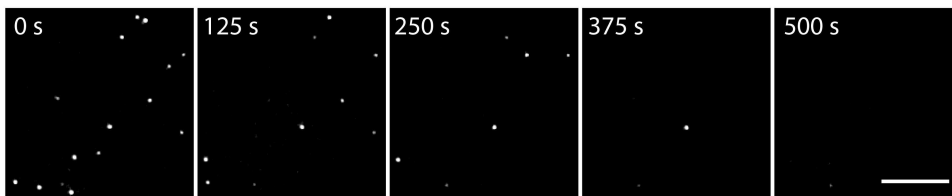
(B) Left panels: Time course of Alexa 488-labeled ADF/cofilin (2 μ M; in green) and Aip1-SNAP-Alexa 647 (1 μ M; in blue) binding to actin networks (in red). Right panels:

Quantification of actin (in red), ADF/cofilin (in green) and Aip1 (in blue) fluorescence intensities, normalized to their peak intensities. Scale Bar represents 30 μm .

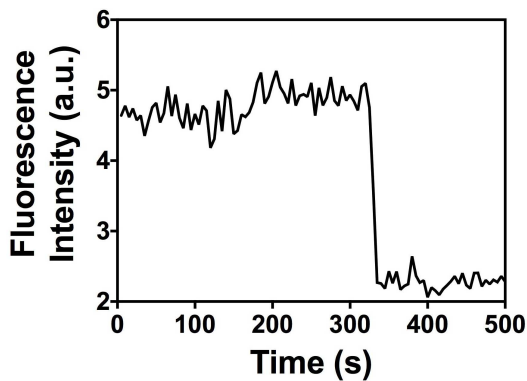
(C) Kinetics of actin disassembly for different actin network architectures after a simultaneous injection of 2 μM of ADF/cofilin and 1 μM of Aip1.

Figure S4, related to Figures 3 and 4: Calibration of the Intensity of Single Alexa Fluorescent Molecules in Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy (TIRFM)

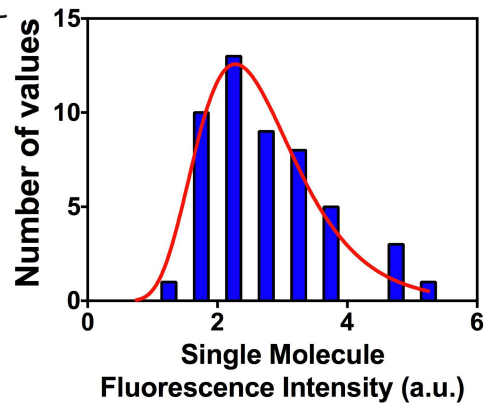
A



B



C

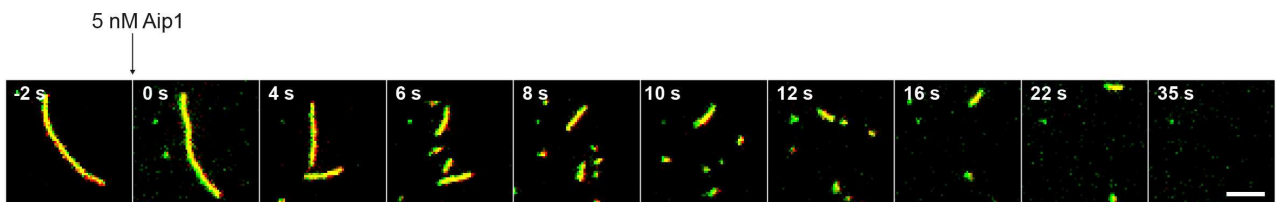


(A) Alexa 488-ADF/cofilin molecules were bound non-specifically to the surface of a coverslip, and photobleached by a high laser intensity. Scale Bar represents 20 μm .

(B) Fluorescence intensity of a representative fluorescent molecule over time. The average height of the step represents the average fluorescence of the molecule.

(C) Distribution of the fluorescence intensities for a population of molecules. Red curve represents a semi-gaussian fit. The mean value of the distribution is taken into account for the average intensity value of a molecule.

Figure S5, related to Figure 4: Time course of individual actin filament disassembly at a low concentration of Aip1



Actin filament (800 nM) were polymerized for 5 min in the presence of 2 μ M of Alexa 488-ADF/cofilin, and disassembled with the injection of 5 nM Aip1. Scale Bar represents 5 μ m.

Supplemental Experimental Procedures

Protein Expression, Purification, and Labeling

Actin

Saccharomyces cerevisiae actin was purified from commercially purchased baker's yeast (Kastalia, Lesaffre, Marcq-en-Baroeul, France) as described in [S1]. Rabbit muscle actin was purified as described in [S2], and was labeled with Alexa dyes as described in [S3].

Profilin, Cofilin, Capping Protein and Las17

S. cerevisiae profilin, the D34C mutant of *S. cerevisiae* cofilin, CapZ and Las17 were overexpressed from *Escherichia coli* and purified as described in [S4], [S5] and [S6].

Aip1

S. cerevisiae's Aip1 and Aip1-SNAP were overexpressed from multicopy plasmids (2 μ URA3 *Pgal1-AIP1-9xHIS* and 2 μ URA3 *Pgal1-AIP1-SNAP-9xHIS*) in yeast (*MATa*, *leu2*, *ura3-52*, *trp1*, *prb1-1122*, *pep4-3*, *pre1-451*) under the control of a GAL1 promoter. Protein expression was induced for 12 h at 30°C with 2 % galactose. Cells were harvested by centrifugation, frozen in liquid nitrogen and grinded in a steel blender (Waring, Winsted, CT, USA). For protein purification, 5 g of ground yeast powder was mixed with 45 ml of HKI10 buffer (20 mM Hepes, pH 7.5; 200 mM KCl; 10 mM Imidazole, pH 7.5) supplemented with 50 μ l of protease inhibitors (Set IV, Calbiochem, Merck4Biosciences, Darmstadt, Germany), and thawed on ice. The mixture was centrifugated at 370,000 g for 40 min, and the supernatant was incubated with 500 μ l bed volume of Ni-Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA) for 2 h at 4°C. Bound protein was batch purified with HKI20 buffer (20 mM Hepes, pH 7.5; 200 mM KCl; 20 mM Imidazole, pH 7.5), SNAP-tagged proteins were fluorescently labeled for 2 h at 4°C with SNAP-Surface

Fluorophores (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), and the free dye was washed off. Proteins were eluted with HKI500 buffer (20 mM Hepes, pH 7.5; 200 mM KCl; 500 mM Imidazole, pH 7.5), concentrated with an Amicon Ultra 4 ml device (Merck4Biosciences, Darmstadt, Germany), dialyzed for 2 h in HKG buffer (20 mM Hepes, pH 7.5; 200 mM KCl; 6 % glycerol), aliquoted and flash-frozen in liquid nitrogen.

Arp2/3

S. cerevisiae Arp2/3 complex was purified from yeast as described in [S7].

Supplemental References

- S1. Goode, B. L. (2000). Purification of Yeast Actin and Actin-Associated Proteins. *Methods Enzymol.* 351, 433–441.
- S2. Spudich, J. A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* 246, 4866–4871.
- S3. 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. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* 270, 11437–11444.
- S4. Falck, S., Paavilainen, V. O., Wear, M. A., Grossmann, J.G., Cooper, J. A., and Lappalainen, P. (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin – capping protein interaction. *EMBO J.* 23, 3010–3019.
- S5. 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.
- S6. Feliciano, D., and Di Pietro, S. M. (2012). SLAC, a complex between Sla1 and Las17, regulates actin polymerization during clathrin-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell* 23, 4256–4272.
- S7. Martin, A. C., Xu, X. P., Rouiller, I., Kaksonen, M., Sun, Y., Belmont, L., Volkman, N., Hanein, D., Welch, M., and Drubin, D. G. (2005). Effects of Arp2 and Arp3 nucleotide-binding pocket mutations on Arp2/3 complex function. *J. Cell Biol.* 168, 315–328.

Annexe de l'étude 1

8. Graziano, M.S., and Botvinick, M.M. (2002). How the brain represents the body: insights from neurophysiology and psychology. In *Common Mechanisms in Perception and Action: Attention and Performance XIX*, W. Prinz, and B. Hommel, eds. (Oxford: Oxford University Press), pp. 136–157.
9. Blanke, O., and Metzinger, T. (2009). Full-body illusions and minimal phenomenal selfhood. *Trends Cogn. Sci.* 13, 7–13.
10. Serino, A., Alsmith, A., Costantini, M., Mandrigin, A., Tajadura-Jimenez, A., and Lopez, C. (2013). Bodily ownership and self-location: components of bodily self-consciousness. *Conscious. Cogni.* 22, 1239–1252.
11. Tsakiris, M. (2010). My body in the brain: a neurocognitive model of body-ownership. *Neuropsychologia* 48, 703–712.
12. Guterstam, A., Björnsdotter, M., Gentile, G., and Ehrsson, H.H. (2015). Posterior cingulate cortex integrates the senses of self-location and body ownership. *Curr. Biol.* 25, 1416–1425.
13. Botvinick, M., and Cohen, J. (1998). Rubber hands 'feel' touch that eyes see. *Nature* 391, 756–756.
14. Ehrsson, H.H., Spence, C., and Passingham, R.E. (2004). That's my hand! Activity in premotor cortex reflects feeling of ownership of a limb. *Science* 305, 875–877.
15. Lenggenhager, B., Tadi, T., Metzinger, T., and Blanke, O. (2007). Video ergo sum: manipulating bodily self-consciousness. *Science* 317, 1096–1099.
16. Ionta, S., Heydrich, L., Lenggenhager, B., Mouthon, M., Fornari, E., Chapuis, D., Gassert, R., and Blanke, O. (2011). Multisensory mechanisms in temporo-parietal cortex support self-location and first-person perspective. *Neuron* 70, 363–374.
17. Petkova, V.I., Björnsdotter, M., Gentile, G., Jonsson, T., Li, T.Q., and Ehrsson, H.H. (2011). From part-to whole-body ownership in the multisensory brain. *Curr. Biol.* 21, 1118–1122.
18. O'Keefe, J., and Nadel, L. (1978). *The Hippocampus as a Cognitive Map*. (Oxford: Clarendon Press.)
19. Moser, E.I., Kropff, E., and Moser, M.B. (2008). Place cells, grid cells, and the brain's spatial representation system. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 69–89.
20. Fransson, P., and Marrelec, G. (2008). The precuneus/posterior cingulate cortex plays a pivotal role in the default mode network: Evidence from a partial correlation network analysis. *Neuroimage* 42, 1178–1184.

Actin-Filament Disassembly: It Takes Two to Shrink Them Fast

Moritz Winterhoff and Jan Faix*

Institute for Biophysical Chemistry, Hannover Medical School, Carl-Neuberg Str. 1, 30625 Hannover, Germany

*Correspondence: faix.jan@mh-hannover.de

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.04.050>

Actin-filament disassembly is indispensable for replenishing the pool of polymerizable actin and allows continuous dynamic remodelling of the actin cytoskeleton. A new study now reveals that ADF/cofilin preferentially dismantles branched networks and provides new insights into the collaborative work of ADF/cofilin and Aip1 on filament disassembly at the molecular level.

The highly dynamic and tightly regulated remodelling of the actin cytoskeleton is an essential requirement for many cellular processes, including endocytosis, cytokinesis and cell migration. These processes are accompanied by a constant turnover of actin structures to provide the cells with the required plasticity to quickly alter specific actin architectures in response to signalling cues and, additionally, to replenish the pool of assembly-competent, ATP-bound actin monomers to fuel new assembly reactions [1]. A paper in this issue of *Current Biology* now adds to our understanding of the molecular mechanisms behind actin-filament disassembly mediated by the combined

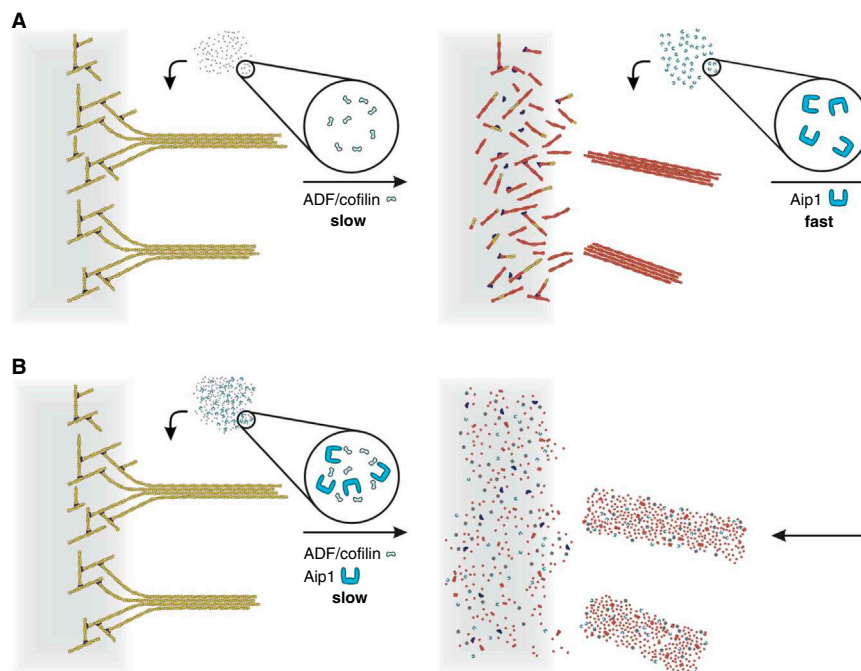
action of the actin-binding proteins ADF/cofilin and Aip1 [2].

Key players known to accelerate filament disassembly are a family of small and ubiquitous proteins collectively called actin depolymerization factor (ADF)/cofilin [3]. Vertebrate cells express three different ADF/cofilins (ADF, cofilin 1 and cofilin 2), whereas yeast expresses a single ADF/cofilin isoform. ADF/cofilin binds in a cooperative manner preferentially to aged ADP-F-actin and mediates severing by altering the mechanical properties of the filament [4,5]. Structural and biochemical analyses revealed that cofilin binding changes the subunit tilt and increases the helical twist of the filament [4], thereby weakening

lateral contacts between actin monomers [6] and decreasing the persistence length of the filament [7]. Severing occurs preferentially at boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filament segments, thereby controlling the overall filament length, depending on ADF/cofilin-binding density [8]. ADF/cofilin remains bound to dissociated ADP-actin monomers and inhibits nucleotide exchange (ATP for ADP) on monomeric actin [9]. Thus, profilin and other accessory proteins, such as Srv2/cyclase-associated protein (CAP), are required to efficiently recycle ADF/cofilin-bound ADP-actin monomers back into an assembly-competent, ATP-bound state [10,11].

In vitro, severing of actin filaments is observed only at low ADF/cofilin:actin ratios [12]. Notably, the resulting fragments do not disassemble quickly into monomers, but remain rather stable. However, at high ADF/cofilin:actin ratios, ADF/cofilin instead fully decorates actin filaments and suppresses severing [12]. Intriguingly, the cellular concentrations of ADF/cofilin exceed micromolar values and are therefore formally more than sufficient to stabilize instead of sever the filaments. Since the disassembly of F-actin mediated by ADF/cofilin alone simply is too inefficient and undirected to explain the rapid turnover of actin networks in living cells [13], additional actin-binding proteins, such as Aip1, coronin or Srv2/CAP, must synergize with ADF/cofilin to markedly accelerate actin disassembly [14,15].

Aip1 (actin interacting protein 1) was identified in a two-hybrid screen for yeast actin-binding proteins [16]. This 65 kDa WD40 domain repeat protein consists of two seven-bladed β -propeller domains and contains binding sites for actin and cofilin. Aip1 has been shown to enhance ADF/cofilin-mediated actin-filament disassembly [17], but was initially proposed to cap filament barbed ends and facilitate cofilin-mediated disassembly by preventing the reannealing of severed filaments, acting in a similar way to heterodimeric capping protein. Two recent studies from the Pollard and Brieher labs have assessed the interplay of Aip1 and ADF/cofilin in more detail and challenged this view [18,19]. They have provided conclusive evidence that Aip1 is an ADF/cofilin-dependent actin disassembly factor that can boost actin-filament disassembly by about one order of magnitude and have shown that Aip1 is not a barbed-end capping protein. Although both groups share the view that Aip1 overturns the rules of ADF/cofilin-mediated actin disassembly, such that increasing ADF/cofilin:actin ratios now result in filament destabilization through much faster severing, they diverge with respect to the issue of whether ADF/cofilin is displaced from the filaments by Aip1 or not.



Current Biology

Figure 1. Disassembly of different actin structures by ADF/cofilin and Aip1.

A branched actin network was polymerized on bar-shaped structures (light grey) coated with an activator for the Arp2/3 complex (dark blue). Filaments growing out of the coated region converged and formed loose bundles. (A) Added ADF/cofilin bound to aged ADP-actin filaments (yellow) with a higher occupancy on the bundles compared with branched networks. ADF/cofilin-decorated (red) branched actin networks were therefore partially dismantled and de-branched, whereas the filament bundles remained stable. After addition of Aip1 fast disassembly of all actin structures occurred. (B) The simultaneous addition of both factors, ADF/cofilin and Aip1, also led to complete disassembly of all actin networks, albeit with much slower kinetics when compared with Aip1 addition to ADF/cofilin-saturated actin structures, illustrating that the binding of ADF/cofilin is the rate-limiting step in this process.

The new work from Gressin *et al.* [2] published in this issue builds upon these findings and first shows that yeast ADF/cofilin preferentially disassembles branched networks rather than either parallel or antiparallel filament bundles. The authors employed an elegant micropatterning technique to induce the growth of fluorescently labelled actin filaments with a defined architecture developing from two adjacent small bars coated with an activator of the actin-nucleating Arp2/3 complex (Figure 1). Small holes in a PDMS layer placed above the bars allowed these authors to introduce additional proteins into the assay. Upon addition of yeast ADF/cofilin they observed weaker decoration of branched networks than bundles of parallel or mixed orientation. Consistently, branched actin networks generated by Arp2/3 complex on the surface of the bars disassembled

more rapidly than the filament bundles growing away from the bars (parallel orientation) or those meeting the same type of filaments emerging from the adjacent bar (mixed orientation). Interestingly, upon addition of ADF/cofilin and Aip1 all three types of actin structure disassembled rapidly, suggesting that ADF/cofilin dismantles different types of actin cytoskeleton in an architecture-dependent manner, while cooperation of ADF/cofilin with Aip1 is necessary to trigger the full disassembly of all actin-filament networks (Figure 1).

To better understand the molecular details of ADF/cofilin-mediated actin-filament disassembly, Gressin *et al.* [2] then used multi-color total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy at a single filament/single-molecule level and reported several intriguing observations. Using fluorescently labelled

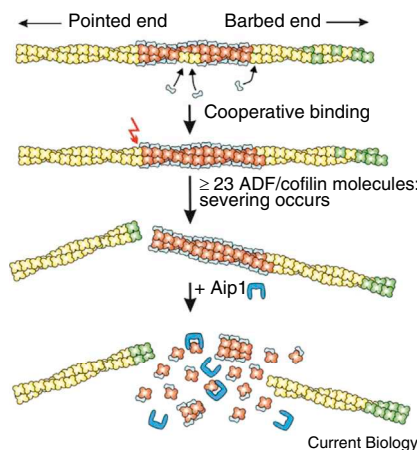


Figure 2. ADF/cofilin-mediated severing at the single filament level.

ADF/cofilin binds cooperatively to aged ADP-F-actin (yellow). Severing requires ADF/cofilin-decorated filament segments (red) with at least 23 bound ADF/cofilin molecules and occurs in a polarized manner since ADF/cofilin clusters remain bound at the pointed end. The free barbed ends of the filament fragments continue to grow by incorporation of ATP-actin (green). Addition of Aip1 induces fast disassembly of the ADF/cofilin-decorated part of the filament, whereas Aip1 does not cap the barbed ends of the growing filaments as previously proposed.

actin and ADF/cofilin, they saw cooperative binding of ADF/cofilin to actin filaments, and the results revealed that accumulation of a minimum cluster of 23 ADF/cofilin molecules on the filament is required for severing (Figure 2). Moreover, they made an exciting observation that these ADF/cofilin clusters remain associated at or near the pointed ends of severed filaments for extended periods of time. The effect of Aip1 on disassembly of single filaments was most effective when ADF/cofilin fully decorated actin filaments, which is again consistent with Gressin *et al.*'s observation that parallel and mixed-orientation actin bundles are rapidly disassembled by ADF/cofilin in the presence of Aip1 but not by ADF/cofilin alone. Interestingly, they also found some evidence for displacement of ADF/cofilin upon addition of Aip1, supporting the idea that Aip1 might promote severing by competing with ADF/cofilin to locally reduce the density of cofilin on the filaments and generate new boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filament segments [20].

This work provides substantial new insights into the biochemical reactions

that regulate ADF/cofilin-mediated actin-filament disassembly. But, as is frequently the case, a number of important questions remain to be addressed. For instance: what are the kinetics of ADF/cofilin release from the filament after addition of Aip1 and is actin released only from one end of the depolymerizing filament or from both ends, as suggested by others [19]? Probably the most important question for our future understanding of the mechanism is whether ADF/cofilin dissociates alone or in a complex with actin. On the one hand, it is possible that Aip1 unloads ADF/cofilin from the filaments to create more boundaries for better severing, but, on the other hand, it is also conceivable that Aip1 destabilizes the filament directly and releases ADF/cofilin-actin complexes for direct recycling. Thus, this work suggests an as yet unidentified function for ADF/cofilin, namely to serve as a marker that maintains actin filaments or networks in a pre-disassembly state, which in turn can be subsequently utilized by Aip1 for full disassembly.

REFERENCES

- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 36, 451–477.
- Gressin, L., Guillotin, A., Guérin, C., Blanchoin, L., and Michelot, A. (2015). Architecture dependence of actin filament network disassembly. *Curr. Biol.* 25, 1437–1447.
- Bernstein, B.W., and Bamburg, J.R. (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol.* 20, 187–195.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138, 771–781.
- McCullough, B.R., Grintsevich, E.E., Chen, C.K., Kang, H., Hutchison, A.L., Henn, A., Cao, W., Suarez, C., Martiel, J.L., Blanchoin, L., *et al.* (2011). Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophys. J.* 101, 151–159.
- Paavilainen, V.O., Oksanen, E., Goldman, A., and Lappalainen, P. (2008). Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J. Cell Biol.* 182, 51–59.
- 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.
- 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.
- Nishida, E. (1985). Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry* 24, 1160–1164.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1998). Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin. *J. Biol. Chem.* 273, 25106–25111.
- Chaudhry, F., Little, K., Talarico, L., Quintero-Monzon, O., and Goode, B.L. (2010). A central role for the WH2 domain of Srv2/CAP in recharging actin monomers to drive actin turnover in vitro and in vivo. *Cytoskeleton* 67, 120–133.
- Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* 24, 13–23.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* 27, 982–992.
- Kueh, H.Y., Charras, G.T., Mitchison, T.J., and Brieher, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed end cappers. *J. Cell Biol.* 182, 341–353.
- Normoyle, K.P., and Brieher, W.M. (2012). Cyclase-associated protein (CAP) acts directly on F-actin to accelerate cofilin-mediated actin severing across the range of physiological pH. *J. Biol. Chem.* 287, 35722–35732.
- Rodal, A.A., Tetreault, J.W., Lappalainen, P., Drubin, D.G., and Amberg, D.C. (1999). Aip1 interacts with cofilin to disassemble actin filaments. *J. Cell Biol.* 145, 1251–1264.
- Okada, K., Ravi, H., Smith, E.M., and Goode, B.L. (2006). Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol. Biol. Cell* 17, 2855–2868.
- Chen, Q., Courtemanche, N., and Pollard, T.D. (2015). Aip1 promotes actin filament severing by cofilin and regulates constriction of the cytokinetic contractile ring. *J. Biol. Chem.* 290, 2289–2300.
- Nadkarni, A.V., and Brieher, W.M. (2014). Aip1 destabilizes cofilin-saturated actin filaments by severing and accelerating monomer dissociation from ends. *Curr. Biol.* 24, 2749–2757.
- Elam, W.A., Kang, H., and De La Cruz, E.M. (2013). Competitive displacement of cofilin can promote actin filament severing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 438, 728–731.

Étude n°2 :

Les micropuits : Etude de la dynamique de l'actine à deux échelles.

L'actine est un composant essentiel de la dynamique cellulaire. Les filaments d'actine forment un des trois polymères du cytosquelette, impliqué dans la motilité cellulaire, la morphogénèse ou encore la division cellulaire. *In vivo*, ces filaments d'actine s'agencent en structures de filaments d'actine telles que les réseaux branchés du lamellipode. L'organisation et la dynamique de l'actine ont été étudiées à plusieurs niveaux, d'abord à l'échelle cellulaire (Pelham & Chang 2002; Lai et al. 2008), puis *in vitro* en solution, par l'étude de la fluorescence totale des filaments d'actine (Ressad et al. 1999; Le Clainche et al. 2003) et enfin à l'échelle des filaments individuels grâce à l'imagerie de plus en plus performante (microscopie à onde évanescente et microscopie électronique) (Vignjevic et al. 2003; Breitsprecher et al. 2011; Jansen et al. 2015). Cependant, l'effet du confinement sur la dynamique des structures de filaments d'actine a été très peu étudié. Jusqu'à maintenant, les études *in vitro* étaient le plus souvent réalisées en solution, avec une quantité de protéines immense, sans comparaison avec les quantités cellulaires. Différents systèmes se sont développés récemment pour étudier l'actine en milieu restreint, et ainsi tenter de comprendre l'effet du confinement sur l'organisation spatio-temporelle des filaments d'actine (Pinot et al. 2012; Deshpande & Pfohl 2015), sur la mécanique des filaments d'actine (Köster et al. 2005; Soares e Silva et al. 2011) ou encore sur l'interaction entre la membrane plasmique et le cytosquelette (Giardini et al. 2003; Pontani et al. 2009; Tsai & Koenderink 2015). Nous utilisons ici un environnement confiné pour montrer que la limitation du réservoir de monomères d'actine est cruciale pour la reconstitution du turnover de l'actine *in vitro*. Nous avons développé un micropuits de quelques dizaines de microns, permettant de contrôler la quantité d'actine fournie initialement au système, et d'observer ensuite les filaments d'actine à deux échelles : celle du filament individuel et celle de la structure de filaments d'actine.

Le dispositif expérimental est composé d'une succession de micropuits de 100 μm de diamètre et de 25 μm de hauteur (Figure 1A) réalisés en NOA 61, Norland Optical Adhesive 61, un polymère photosensible. Le polymère est injecté entre un moule en polydiméthylsiloxane (PDMS) présentant des piliers et une lame de verre propre, et est durci par insolation aux UV proches (Figure 1B). La fabrication des piliers en PDMS est explicitée dans les matériels et méthodes. Une fois le PDMS retiré, les micropuits sont traités au plasma O_2 afin de les rendre hydrophiles et de permettre leur remplissage (Figure 1C). Des agents répulsifs sont d'abord injectés entre les micropuits et une lamelle de verre, afin de s'adsorber sur les surfaces en NOA et en verre et éviter ainsi la précipitation des protéines. Après rinçage et séchage partiel, le mix de polymérisation est injecté dans les micropuits. Enfin la fermeture des micropuits est assurée par l'injection d'huile qui chasse le volume d'eau reliant les micropuits entre eux (Figure 1C).

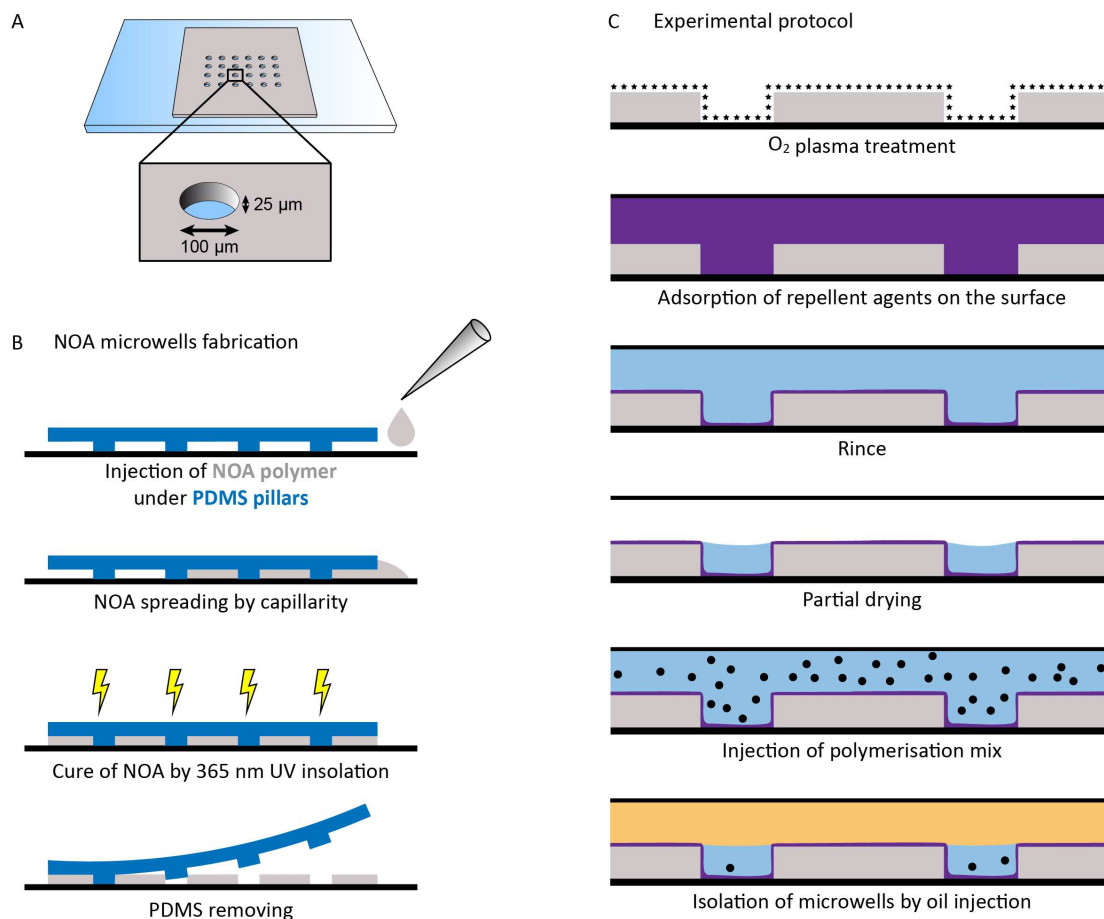


Figure 1 : Description du dispositif expérimental.

A) Schéma des micropuits, de 100 µm de diamètre et de 25 µm de hauteur. Les micropuits peuvent être réalisés à la surface d'une lame ou d'une lamelle, suivant l'observation au microscope à épifluorescence ou au microscope à onde évanescente. B) Fabrication des micropuits en polymère NOA. C) Protocole de lancement d'une expérience en micropuits.

Dans un premier temps, la caractérisation des micropuits a été réalisée. En volume restreint, tel que les micropuits, le ratio surface sur volume est quatre fois plus grand qu'entre lame et lamelle. Le traitement des surfaces par un agent répulsif pour prévenir la précipitation des protéines est donc d'autant plus important. Le traitement optimal est une incubation de 1 % de BSA et 1 % de Pluronic (Alexandridis & Alan Hatton 1995) durant 15 minutes, puis l'ajout de 1,33 % de BSA directement dans le mix de polymérisation (Figure 2 A et B). Afin de confirmer la fermeture complète des micropuits et donc de pouvoir considérer que le volume et la concentration des protéines restent inchangés au cours des expérimentations, la technique de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (ou FRAP, fluorescence recovery after photobleaching) a été utilisée (Figure 2C). L'ensemble des fluorophores d'un puits est photoblanchi par illumination laser. La fluorescence des micropuits fermés par l'huile reste stable pendant une heure après le photoblanchiment (1 ± 0.8 % de l'intensité initiale), assurant l'isolation

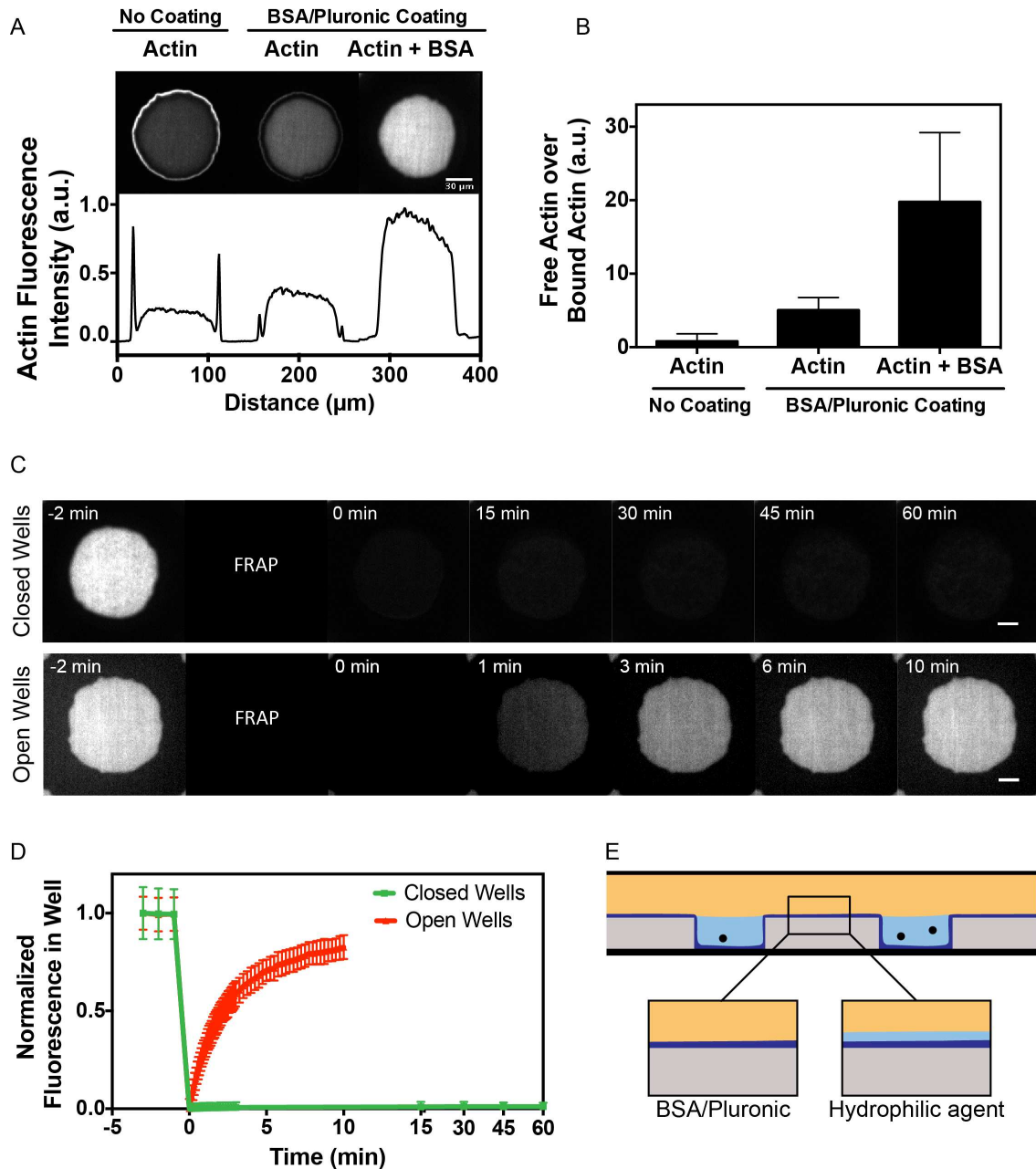


Figure 2 : Traitement de surface et fermeture des micropuits.

A et B) Trois traitements de surface ont été testés afin de réduire l'agrégation des protéines sur les surfaces du micropuits. A) Observation d'actine monomérique fluorescente dans les trois conditions de traitement de surface. B) Quantification de l'intensité de fluorescence de l'actine G libre sur l'actine G précipitée sur la surface. C et D) Fermeture des micropuits. C) Expérience de FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) sur des micropuits fermés par de l'huile et sur des micropuits contrôlés, non fermés. Echelles 20 μm . D) Quantification de l'intensité de fluorescence dans les micropuits après photoblanchiment. Seuls les micropuits fermés par de l'huile présentent une intensité de fluorescence faible et stable pendant une heure. E) La fermeture des micropuits est assurée par le greffage d'agents hydrophobes tels que le Pluronic (violet, à gauche), contrairement aux agents hydrophiles (violet, à droite) qui laissent une fine couche d'eau entre la NOA (gris) et l'huile (jaune).

des micropuits, tandis que l'intensité de fluorescence des micropuits non fermés vaut $83 \pm 5 \%$ de l'intensité initiale, 10 min après le FRAP (Figure 2D). La fermeture efficace des micropuits par l'huile est permise grâce au Pluronic. En effet, contrairement aux agents hydrophiles tels que le poly(éthylène glycol) (Israelachvili 1997; Yue et al. 2012), le Pluronic possède une région hydrophobe permettant probablement de faire le lien avec l'huile sur le dessus des micropuits et ainsi de les fermer hermétiquement (Figure 2E).

Les micropuits ont d'abord l'avantage de permettre la visualisation des filaments d'actine individuels (Figure 3A). En chambre à flux, le système expérimental classique, la dynamique des filaments d'actine individuels n'est visible qu'en microscopie à onde évanescente TIRFm (Figure 3A gauche). Les micropuits peuvent tout aussi bien être fabriqués sur des lamelles de verre plutôt que sur des lames, ce qui permet l'utilisation du TIRFm et donc l'observation de filaments individuels. En comparaison, les vésicules lipidiques, adaptées à la technologie confocale, ne permettent pas la visualisation de filaments d'actine individuels, mais seulement de faisceaux de filaments regroupés par encombrement stérique lorsque la densité de filaments d'actine est importante. L'étude des filaments d'actine étant basée sur la dynamique de polymérisation des filaments, il est nécessaire que le système expérimental en permette l'observation. La méthode d'imagerie par microscopie à onde évanescente à travers une lamelle permet l'acquisition des images avec peu de puissance laser. Combinée à des agents évitant le photoblanchiment des fluorochromes, cette méthode permet donc le suivi de la polymérisation sur 720 images minimum (soit une fréquence d'une image toutes les dix secondes pendant deux heures), ce qui est en général largement suffisant pour les expériences sur filaments individuels (Figure 3B). L'ajout de protéines régulatrices de l'actine est l'étape suivante, nécessaire à la compréhension de l'interaction de celles-ci avec le filament d'actine et la formation des réseaux. Ici les micropuits nous permettent de suivre la formation d'un réseau branché par l'addition du complexe Arp2/3 et de pWA, qui est la partie activatrice du complexe Arp2/3 de la protéine WASP (Figure 3C), de la même manière qu'en système expérimental classique (Suarez et al. 2015). Ce premier niveau d'observation est indispensable pour comprendre les interactions des ABP avec les filaments d'actine. Cependant *in vivo* les filaments ne sont pas isolés mais s'agencent en réseaux complexes et organisés. Les systèmes biomimétiques actuels, tels que la motilité de billes de polystyrène imitant la motilité de bactéries *Listeria monocytis* (Loisel et al. 1999), sont des outils très pratiques pour étudier la formation et la dynamique de ces structures. Nous montrons ici que les micropuits sont aussi adaptés pour combiner un système confiné avec l'étude de structures de filaments d'actine. En effet, la figure 3D montre la polymérisation d'une comète d'actine créée par la nucléation de filaments, branchés et coiffés par CP, à la surface d'une bille en polystyrène sur laquelle du pWA a été préalablement greffé. La structure de ce réseau étant semblable au lamellipode, elle permet l'étude de l'évolution temporelle et spatiale de celui-ci dans un milieu restreint. Les micropuits nous permettent donc d'étudier l'actine dans un milieu comparable au milieu cellulaire, mais à deux échelles : celle du filament individuel et celle du réseau de filaments d'actine. Les limites intrinsèques à l'imagerie de fluorescence ne permettent pas pour l'instant de telles observations dans une cellule ou une vésicule.

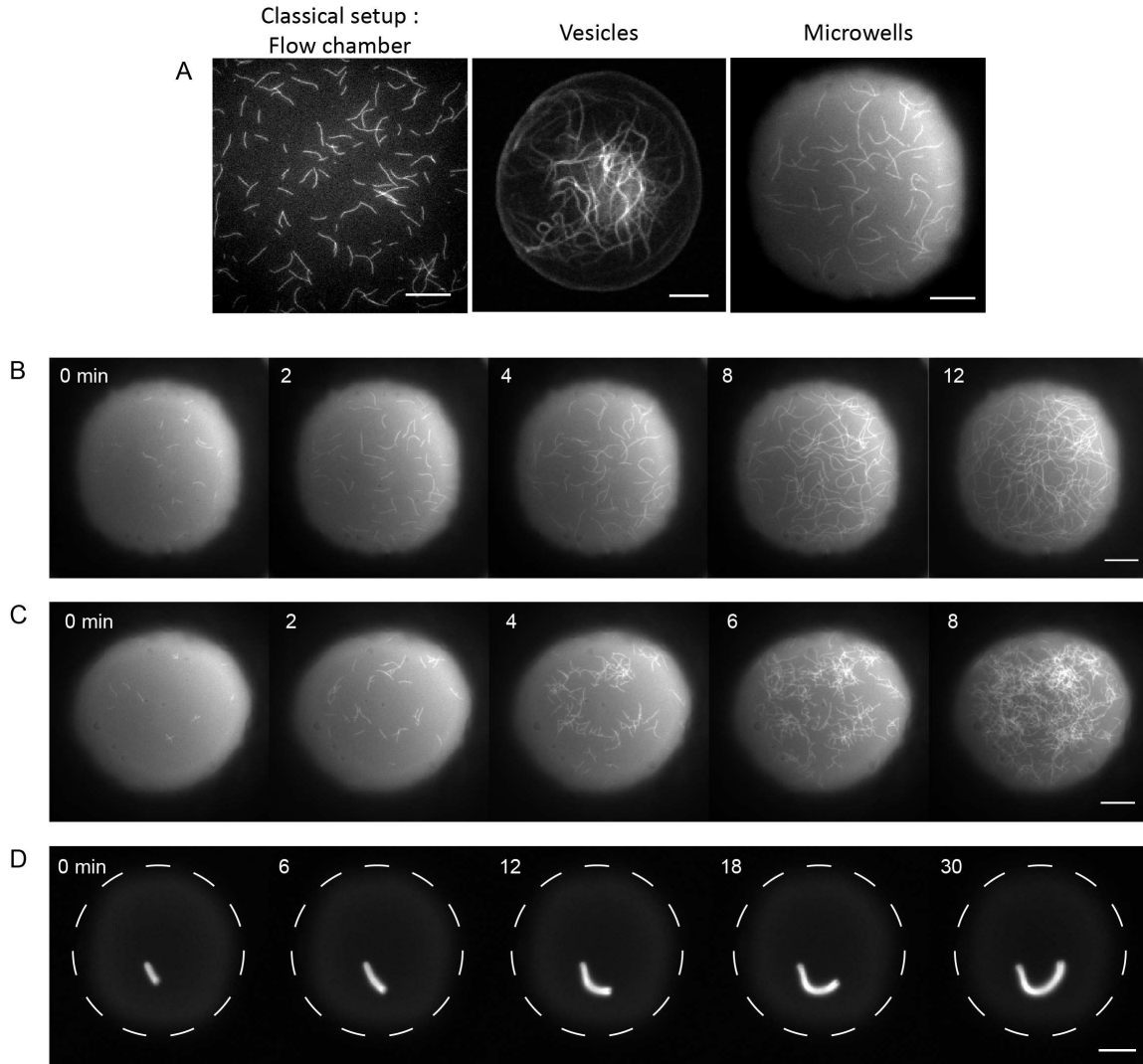


Figure 3 : Observation de l'actine en milieu confiné à deux échelles : (A, B et C) le filament individuel et (D) la structure de filaments d'actine.

A) Comparaison des dispositifs expérimentaux pour la visualisation de filaments d'actine individuels : en chambre à flux (à gauche), en vésicule lipidique (au centre), en micropuits (à droite). Les expériences en chambre à flux et en micropuits ont été réalisées par microscopie à onde évanescente, tandis que l'imagerie des vésicules se fait par technologie confocale. B) Suivi de la dynamique de polymérisation de filaments d'actine individuels en micropuits à partir de $1 \mu\text{M}$ d'actine monomérique. C) Formation d'un réseau branché en milieu confiné, après injection de $1 \mu\text{M}$ d'actine, 80 nM de complexe Arp2/3 et de 120 nM de pWA dans les micropuits. D) Polymérisation d'une comète d'actine, c'est-à-dire un réseau branché par le complexe Arp2/3 et coiffé par capping protein polymérisant à partir d'une bille de polystyrène adsorbée de pWA, l'activateur du complexe Arp2/3. Echelles $20 \mu\text{m}$.

Comme nous l'avons montré, les micropuits sont un excellent outil pour étudier *in vitro* la dynamique des réseaux d'actine en milieu confiné. On observe dans un premier temps la polymérisation de comètes d'actine réalisée à partir de billes de polystyrène sur lesquelles l'activateur du complexe Arp2/3 a été greffé. Mises en présence d'un mélange d'actine monomérique, du complexe Arp2/3 et de capping proteins, les billes nucléent à leur surface un

réseau d'actine dense appelé comète d'actine (Cameron et al. 1999). En micropuits, bien que la concentration d'actine, c'est-à-dire la quantité d'actine par unité de volume, soit identique à la concentration en milieu libre, la quantité absolue, décrite en moles, est beaucoup plus restreinte. La croissance de la comète en micropuits est donc stoppée bien avant celle en milieu libre (Figure 4 A et D). De plus, le réservoir d'actine est réparti entre les différentes structures présentes dans le milieu. En effet, la longueur des comètes après deux heures de polymérisation est d'autant plus faible que le nombre de billes, et donc le nombre de points de nucléation est important (Figure 4 B et C). En chambre à flux, la vitesse de croissance des comètes décroît au cours du temps, car logiquement la concentration en actine monomérique et en protéines régulatrices diminue. (Figure 4 D, courbe bleue). En milieu confiné (courbe rouge), on observe d'abord que la polymérisation débute avec la même vitesse puisque la concentration initiale en protéines (actine et ABP) est identique. Cependant, contrairement à un environnement libre, la diminution de la concentration locale en protéines (actine et ABP) est rapide car elle n'est pas comblée par la diffusion de protéines venant d'un système expérimental aux dimensions quasi illimitées. La vitesse de croissance des comètes en micropuits (Figure 4 D, courbe rouge) décroît donc plus vite et la polymérisation s'arrête avant les comètes en environnement ouvert. Ce phénomène est d'autant plus marqué que le nombre de billes est important dans les micropuits (Figure 4 D, courbes orange à jaune), puisque les protéines du milieu sont épuisées par plusieurs points de nucléation.

In vivo, la quantité d'actine disponible pour la polymérisation de nouveaux filaments est limitée. Les cellules doivent donc désassembler les structures de filaments d'actine et recycler les monomères et oligomères provenant du désassemblage pour qu'ils retournent dans le réservoir d'actine polymérisable et disponible. Afin d'étudier le turnover de l'actine, nous avons utilisé la propriété des micropuits de pouvoir limiter la quantité d'actine. Nous avons vu qu'en milieu restreint la polymérisation s'arrête prématurément. L'ajout de protéines de désassemblage et de recyclage devrait en théorie pouvoir créer des monomères polymérisables et maintenir la polymérisation. En milieu ouvert, l'ajout d'ADF/cofiline et de profiline, protéines respectivement de désassemblage et de recyclage, entraîne effectivement le désassemblage des comètes d'actine (Figure 4E). Cependant la quantité d'actine étant presque illimitée, la polymérisation se poursuit, et l'on ne peut dire si elle est due à l'actine en solution initialement ou à l'actine provenant du désassemblage. En milieu confiné, les comètes d'actine sont décorées, puis désassemblées par l'ADF/cofiline (Figure 4E). L'ADF/cofiline ne décorant que les vieux filaments (Suarez et al. 2011), si la polymérisation était arrêtée, les petites comètes (à partir de 16 min) seraient décorées et désassemblées par l'ADF/cofiline. Il n'en est rien puisque l'on observe de petites comètes rouges, donc non décorées par l'ADF/cofiline verte; la polymérisation est donc maintenue. La taille des comètes, beaucoup plus petites qu'en milieu libre, pousse à croire que le facteur limitant du turnover est l'étape de recyclage des monomères d'actine.

Le système confiné qu'est le micropuits a démontré son utilité pour l'étude de la dynamique des filaments d'actine à l'échelle moléculaire du filament individuel et à l'échelle de la structure de filaments d'actine. Jusqu'à maintenant les systèmes *in vitro* ont activement participé à la compréhension de nombreuses questions biologiques (Cáceres et al. 2015), telles que la motilité

cellulaire (Loisel et al. 1999; Cameron et al. 1999), la formation des différents réseaux : branchés par le complexe Arp2/3 (Blanchoin et al. 2000a) ou parallèles par formine (Kovar & Pollard 2004; Romero et al. 2004). Toutes les recherches menées jusqu'à présent ont été réalisées en milieu ouvert, c'est-à-dire dans un environnement de taille immense en comparaison avec les dimensions cellulaires. Il serait intéressant de reprendre les découvertes faites jusqu'ici et de voir dans quelle mesure le confinement dans un système aux dimensions cellulaires tel que les micropuits, impacte les résultats. En effet, on peut se demander par exemple quelle(s) protéine(s) limite(nt) en premier la formation du lamellipode (Bugyi et al. 2008) et en quoi cela influence les différentes voies de formation du lamellipode (Vitriol et al. 2015). Les micropuits pourraient être aussi utilisés pour reproduire l'équilibre entre les réseaux branchés et linéaires observés en levure à fission (Burke et al. 2014) afin d'étudier au niveau moléculaire les protéines mises en jeu et leur implication respective dans ce processus.

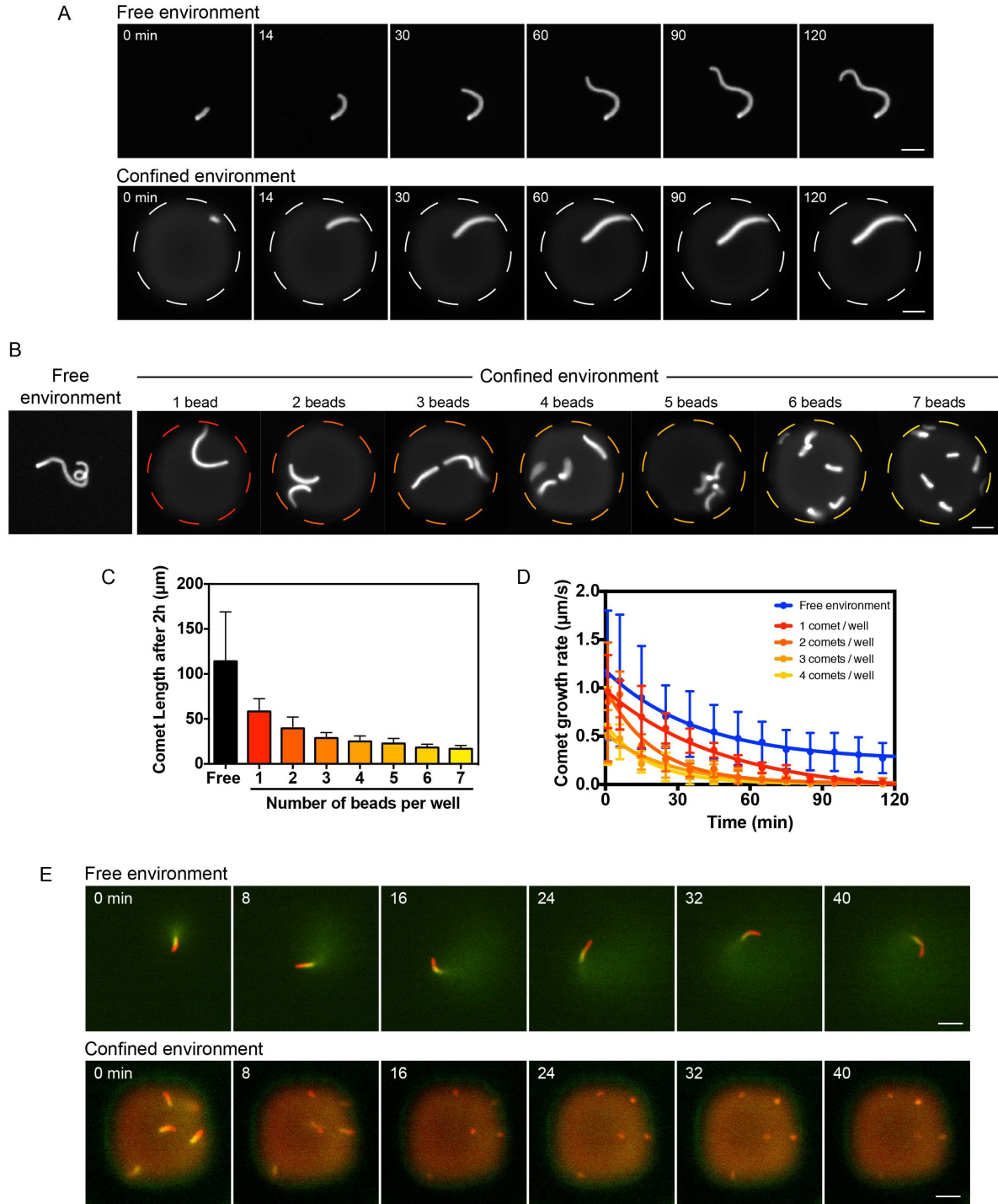


Figure 4 : Utilisation des micropuits pour l'étude de la formation et du désassemblage d'un réseau de type lamellipode en milieu *in vitro* restreint.

A) Croissance de comètes d'actine dans un environnement dit "libre", soit en chambre à flux, et dans un environnement confiné, soit dans les micropuits. B) Polymérisation de une à sept comètes d'actine en milieux libre et confiné. C) Quantification de la taille des comètes de B après deux heures de polymérisation. D) Quantification de la vitesse de croissance des comètes en environnement libre (courbe bleue) et confiné (courbes du rouge au jaune). E) Comparaison du désassemblage de comètes d'actine en milieu libre et en milieu restreint. Echelles 20 μm .

Matériel et Méthodes

1. Structures en SU8 de 50 μm (moule pour le PDMS)

Remarque : les temps indiqués doivent être respectés scrupuleusement ! Sauf si j'ai mis un ~ devant.

- a) Laver les lames à l'acétone, frotter avec un kimteck, rincer à l'isopropanol, sécher à l'azote ou argon. Les déposer sur une plaque chauffante à 120 °C environ 2min (pour enlever le film d'eau à la surface)
- b) Couche de TiPrime :
 - Programmer le spin coater : 30s 3000 rpm
 - Placer la lame, déposer environ 1 ml de TiPrime et lancer le programme
 - Mettre sur plaque chauffante à 120°C jusqu'à la prochaine étape (>2min)
- c) Couche de SU8 de 5 μm :
 - Programmer le spin coater :
2 étapes : 1/ 10 s, 500 rpm, acc = 112 (le plus petit)
2/ 30 s, 3000 rpm, acc \approx 1500 (la moitié de la vitesse)
 - Déposer environ 1 ml de SU8 3005 et lancer le programme
 - Cuisson douce (soft baking) : 3 min à 95°C (couvrir avec alu pour protéger de la lumière)
 - Exposer entièrement la lame aux UV proches 30 s, 100 % (lampe Kloe UV-KUB2, 356 nm, puissance maximale de 25 mW/cm²)
 - Cuisson post exposition (post exposure bake) en 2 étapes :
1 min à 65°C puis 2 min à 95°C
 - Facultatif : Cuisson forte (hard baking) : 15 min à 180°C
- d) Traitement au plasma (Femto; Diener Electronic) : 5 min à 80 %
- e) Couche de SU8 de 50 μm :
 - Même programme de spin coater que la couche de SU8 5 μm
 - Placer la lame sur le spin coater et déposer du SU8 3050 sur toute la surface et lancer le programme
 - Cuisson douce (soft baking) en 2 étapes : 5 min à 65°C et 18 min à 95°C (couvrir avec alu pour protéger de la lumière)
 - Insolation aux UV à travers le masque en chrome, 40 s, 100 %
 - Cuisson post exposition (post exposure bake) en 4 étapes :
2 min à 65°C
5 min à 95°C couvert
2 min à 95 °C non couvert

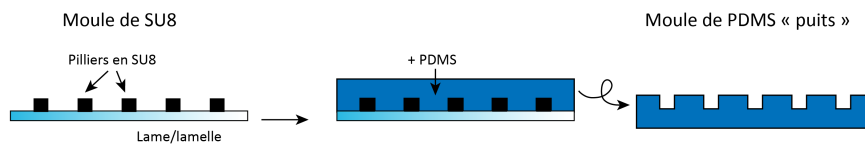
2 min à 65°C non couvert
(protéger de la lumière)

- f) Développement du SU8 non polymérisé (sous hotte) :
- 1min30 à 2 min dans du développeur (SU8-developer, MICROCHEM)
 - Rincer le développeur à l'isopropanol et sécher la lame à l' N_2 ou Ag
- g) Cuisson forte (Hard Baking) : 15 min à 180°C
- h) Garder indéfiniment à l'abri de la poussière

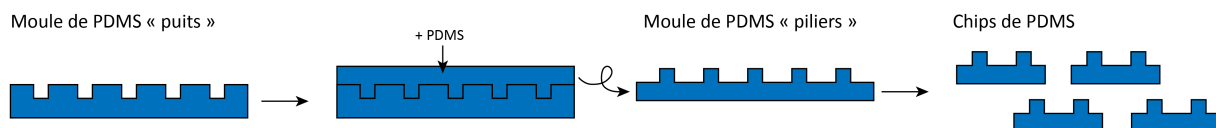
2. Fabrication des chips de PDMS

A partir du moule en SU8 (ou d'un moule de PDMS précédemment moulé sur le SU8) :

- a) Silanisation du moule en SU8 avec 20 μ l de Trichloro(1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl)silane (nommé plus couramment silane) pendant 1h minimum.
- b) Cuire 1h à 100°C
- c) Préparer 25 g de PDMS (ratio 1:10, curing agent:DMS) et le dégazer
- d) Déposer le PDMS sur le moule en SU8 et laisser reposer 1-2min
- e) Faire cuire sur plaque chauffante homogène à 70-80°C sur la nuit
- f) Démouler le PDMS, l'entreposer dans une boîte à l'abri de la poussière (parafilm)



Le 1^{er} moule en PDMS aura des puits (appelé moule "puits"), il faut donc couler un 2^{ème} moule de PDMS dans ce moule "puits" pour avoir des piliers (appelé moule "piliers" ou "chip de PDMS"). Reproduire ces 6 étapes en partant du moule de PDMS "puits" (et non pas du moule en SU8). Conseil : à l'étape 4, faire une couche de PDMS fine (2 mm) pour être plus facilement manipulable.



Une fois le moule de PDMS "pilier" réalisé, découper au scalpel les chips de PDMS.

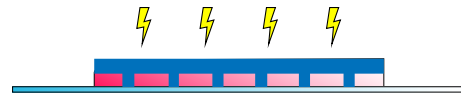
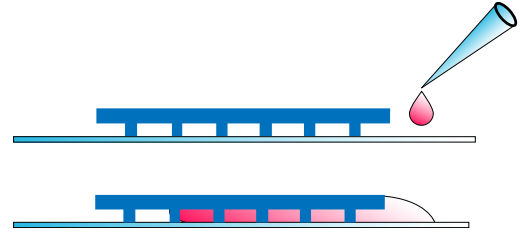
2.1. Fabrication des puits en NOA

Définition :

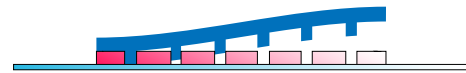
- chip de PDMS : pièce de PDMS sur laquelle sont imprimés les piliers de la taille voulue.

En salle « blanche »

- Laver les lames et/ou lamelles à l'acétone, frotter avec un kimteck, rincer à l'isopropanol, sécher à l'azote ou argon
- NOA (à faire pour chaque slide) :
 - déposer une chip de PDMS sur une lame/lamelle, piliers face au verre.
 - Déposer une goutte de NOA 61 sur un bord de la chip de PDMS.
 - Laisser la NOA s'infiltrer par capillarité à l'abri de la lumière.
- Retirer le surplus de NOA.
- Insolation aux UV proches : 12 min à 100 %

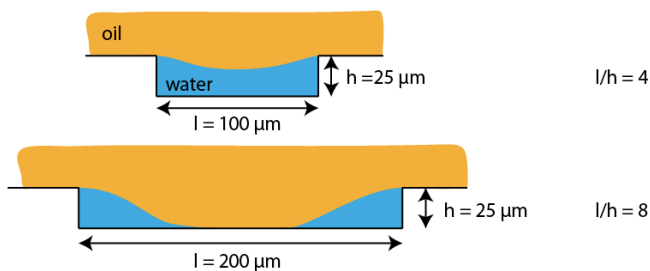


- Retirer les chips de PDMS et les nettoyer au scotch cristal.
- Découper au scalpel la NOA autour des puits
- Entreposer les lames/lamelles à RT. Peut être gardé au moins 1 mois.



Problèmes potentiels de la taille des puits :

Le ratio largeur sur hauteur du puits (l/h) est critique. Lorsque ce ratio est inférieur à 8 les puits se remplissent bien. Cependant, il faut qu'il soit inférieur à 4 pour pouvoir fermer correctement les puits avec de l'huile. Sinon l'huile entre dans le puits et chasse le liquide :



3. Expérience de filaments individuels ou essai de motilité entre lame et lamelle ou en micropuits

3.1. Biochimie

3.1.1. Polymérisation de filaments d'actine individuels observés en microscopie à onde évanescente

Protocole détaillé dans l'article Gressin et al. 2015.

3.1.2. Essai de motilité sur billes en polystyrène

a. Tampons

<u>Tampon Xb</u>	<u>15X MEI</u>
10 mM Hepes pH7.5	15 mM MgCl ₂
0.1 M KCl	15 mM EGTA
1 mM MgCl ₂	150 mM Imidazole (fluorescent blank) pH7.8
1 mM ATP	
0.1 mM CaCl ₂	

Mix ATP/KCl (10X)

240 mM KCl (2.4 µl à 2.5M)
1.76 mM DABCO (2 µl à 22 mM)
24 mM ATP / 48 mM MgCl₂ (15 µl à 40 mM ATP/80 mM MgCl₂ à pH 7.5)
40 mM DTT (1 µl à 1M)
compléter à 25 µl avec de l'eau

b. Greffage du pWA sur les billes polystyrène

Préparer des billes : voir le protocole de (Reymann et al. 2011)

- de 2 µm de diamètre avec 400 nM pWA
- de 4,5 µm de diamètre avec 2 % BSA

Préparer le mix de billes

8 µl Xb
2 µl billes BSA
1 µl billes pWA

c. Mix de polymérisation

Concentrations finales du mix de polymérisation

12 μ M Actin (5% labeled)
36 μ M Human Profilin
180 μ M complexe Arp2/3
50 nM CP
400 nM pWA (greffé sur les billes de polystyrène)
50 mM KCl (24 mM dans le Xb + 26 mM dans le mix ATP/KCl)
6.5 mM MgCl₂
2.66 mM ATP
176 μ M DABCO
4 mM DTT

Mix de polymérisation :

1 μ l Xb
1.5 μ l Mix ATP/KCl (10X)
2 μ l BSA 10%
1 μ l 15X MEI
1 μ l Human Profilin (540 μ M) dilué dans du Tampon G
1 μ l complexe Arp2/3 (2.7 μ M) dilué dans du Tampon Xb
1 μ l CP 2016 (750 nM) dilué dans du Tampon Xb
0.5 μ l Mix de Billes
4 μ l Actine (45 μ M)
2 μ l MC 2-3 % (à ajuster en fonction de la viscosité optimale pour la croissance de la comète et le remplissage des micropuits)

3.2. Technologies : chambre ouverte ou micropuits

Les deux types d'expériences présentées ci-dessus (filaments individuels et essai de motilité) peuvent être réalisés en système ouvert, soit entre lame et lamelle ou en système fermé, soit en micropuits.

3.2.1. Entre lame et lamelle

Pour l'observation de filaments individuels, les lames et lamelles sont lavées et traitées comme décrit dans l'article (Gressin et al. 2015).

Pour les essais de motilités, les lames et lamelles sont lavées à l'identique, mais le traitement de surface se fait au Silane-PEG 30K à la place du Silane-PEG 5K.

2 à 3 μ l de mix de polymérisation sont déposés entre lame et lamelle, scellés par du VALAP (mélange de 1/3 vaseline, 1/3 lanoline, 1/3 paraffine).

3.2.2. En micropuits

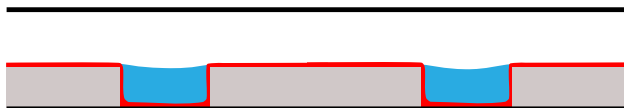
- a) Traiter les puits en NOA au plasma 3 min 80 % pour les rendre hydrophiles et permettre le remplissage



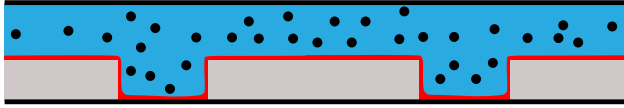
- b) Monter la chambre à flux assez étroite (<1cm)
- c) Incuber 15 min avec un mix de BSA1%/Pluronic1% (pas plus longtemps)
- d) Rincer avec 1mL de tampon utilisé dans vos expériences (GB, Xb,...)



- e) Aspirer le liquide avec un kimteck (séchage partiel, puisque le liquide reste dans les puits)



- f) Injecter au minimum 15 μ l de mix de polymérisation, avec un maximum de flux (pour que le mix entre bien dans les micropuits)



g) Injecter de l'huile (colza casino)



h) Fermer au VALAP (mélange de 1/3 vaseline, 1/3 lanoline, 1/3 paraffine)

Étude n°3 : Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton (*Letort, Ennomani 2015*)

Gaëlle Letort^{1*}, Hajer Ennomani^{1*}, Laurène Gressin¹, Manuel Théry^{1,2}, Laurent Blanchoin¹

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

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

* Equal contributors

La capacité des cellules à exercer des forces vient de l'agencement des filaments en structures organisées. Les différentes organisations de filaments d'actine que l'on trouve dans la cellule ont chacune une, voire plusieurs, fonctions propres. Le lamellipode entre en jeu dans la motilité cellulaire, tandis que les filopodes à l'avant de la cellule sondent l'environnement extracellulaire. Le cortex d'actine sert à soutenir la membrane plasmique et à générer des forces nécessaires à la déformation de la membrane, comme l'endocytose ou l'arrondissement de la cellule pré-mitotique (Stewart et al. 2011; Carvalho et al. 2013a; Sens & Plastino 2015). Les fibres de stress permettent de maintenir l'intégrité de la cellule en résistant contre les forces extérieures par l'intermédiaire des adhésions focales ou à la motilité cellulaire lors de la rétraction de l'arrière de la cellule (Cramer et al. 1997).

Pour pouvoir jouer son rôle, chaque structure est formée de filaments d'actine organisés d'une manière précise et adaptée. Le lamellipode et le cortex sont formés d'un réseau branché, qui permet un déploiement rapide et multidirectionnel de l'actine. Les filopodes et les fibres radiales sont composés de filaments alignés parallèlement, suite à une élongation rapide par des facteurs tels que les formines. Enfin, les fibres de stress sont des filaments alignés mais de polarité aléatoire leur conférant, avec l'aide des myosines II, une propriété contractile. Les outils d'études de plus en plus performants ont permis de déterminer la composition et l'organisation interne des structures de filaments d'actine. Ainsi le réseau branché du lamellipode et du cortex est formé de filaments nucléés à la membrane plasmique par le complexe Arp2/3 via l'activation par la famille de protéines WAVE. Le complexe Arp2/3 forme des branches sur les filaments d'actine préexistants avec un angle de 70°. Dans le lamellipode, l'extrémité barbée des filaments d'actine est tournée face à la membrane. La capping protein bloque l'élongation des filaments d'actine afin de les garder courts et ainsi de densifier et rigidifier le réseau. Le tout est maintenu *in vivo* par des protéines de réticulation (α -actinine, filamine et fimbrine (Honda et al. 1998; Blanchoin et al. 2014)), bien que les expériences *in vitro* aient montré que ce n'était pas indispensable pour la motilité cellulaire (Loisel et al. 1999). Le cortex a une structure proche, car les filaments sont de

la même manière branchés, coiffés par CP et réticulés; cependant ils sont orientés parallèlement à la membrane et la présence de myosines rend cette structure contractile, contrairement au lamellipode (Sens & Plastino 2015).

Les filopodes, placés sur le front migrant de la cellule, sont des faisceaux de filaments parallèles allongés et ancrés à la membrane par des protéines telles que formines et Ena/VASP (Faix et al. 2009). La compaction des filaments, et donc la rigidité de la structure, sont assurées par les protéines de réticulations (fascine, fimbrine et espine (Faix et al. 2009)). On retrouve les filaments parallèles dans les fibres radiales, elles aussi nucléées par formine (Skau et al. 2015) et réticulées par α -actinine (Tojkander et al. 2012).

Enfin, les dernières structures sont contractiles, c'est-à-dire qu'elles se raccourcissent au cours du temps en exerçant des forces sur leurs points d'ancrage. Pour cela, les filaments sont organisés avec une polarité aléatoire (Cramer et al. 1997) afin que la myosine puisse exercer son action contractile. Les protéines de réticulation tiennent le rôle de points d'ancrage intermédiaires au sein de la fibre pour transmettre les forces internes et permettre la contraction de toute la structure (Ennomani et al. 2016). Dans les fibres de stress, on trouve l' α -actinine, la fascine, l'espine et la filamine (Pellegrin & Mellor 2007), organisées de manière sarcomérique, c'est-à-dire en alternance de parties réticulées et de parties contractiles (Pellegrin & Mellor 2007). Dans l'anneau contractile, on trouve l' α -actinine et la fimbrine (Laporte et al. 2012).

Ce récapitulatif n'est bien entendu pas exhaustif, de nombreuses autres protéines composent ces structures d'actine. On peut citer entre autres la tropomyosine (Liu & Bretscher 1989; Tojkander et al. 2011) et l'ADF/cofiline (Kanellos et al. 2015).

In vivo, ces structures de filaments d'actine sont interdépendantes. En effet, bien que structurellement peu semblables, leur formation, leur croissance et leur désassemblage sont coordonnés spatialement et temporellement afin de pouvoir répondre efficacement aux stimuli extérieurs. Cette revue a donc pour objectif de comprendre et de synthétiser l'interaction entre les différentes structures. En suivant l'axe périphérie-centre de la cellule, nous verrons la transition du lamellipode au filopode, puis du lamellipode aux structures contractiles et enfin la fusion des fibres radiales et des arcs transverses en fibres de stress ventrales.

Les filopodes sont formés au front migrant de la cellule, directement à partir des filaments branchés du lamellipode. Deux modèles tentent d'expliquer cette transition. Le modèle d'élongation convergente (Vignjevic et al. 2003; Yang & Svitkina 2011) qui propose que les filaments dont l'extrémité barbée n'est pas bloquée par capping protein sortent du réseau branché face à la membrane et sont réticulés pour former des filopodes. Le deuxième modèle, dit de nucléation (Faix & Rottner 2006), explique que même sans le complexe Arp2/3, c'est-à-dire sans lamellipode, les filopodes sont formés. Ce serait donc les formines ou Ena/VASP qui nucléeraient de nouveaux filaments pour construire les filopodes.

La transition du lamellipode aux fibres linéaires aboutit à la formation de deux sortes de fibres, les fibres radiales et les arcs transverses. Les fibres radiales viennent de la polymérisation de filaments par formine à partir des adhésions focales, qui sont ensuite peignés vers le centre de la cellule, dû au flux rétrograde d'actine. Les filaments réticulés du lamellum (couche d'actine plus épaisse et dont le flot est plus lent, situé à l'arrière du lamellipode (Chhabra & Higgs 2007))

viennent ensuite prolonger les fibres radiales. Les arcs transverses sont eux formés à partir des filaments d'actine désassemblés à l'arrière du lamellipode par l'ADF/cofiline et réalignés parallèlement à la membrane en structures contractiles par la myosine II.

Enfin la fusion des fibres radiales et des arcs transverses amène à la création des fibres de stress ventrales. En effet, chaque extrémité des fibres transverses peut fusionner avec l'extrémité "libre" (qui n'est pas liée à l'adhésion focale) d'une fibre radiale, avec incorporation de myosine II. La fibre de stress centrale qui en résulte est donc fixée à deux adhésions focales et peut ainsi exercer des forces de traction et résister à des contraintes extérieures (Hotulainen & Lappalainen 2006).

La revue propose de plus une simulation numérique des transitions entre ces structures de filaments d'actine. Pour cela, le logiciel Cytosim, développé par le laboratoire de François Nédélec (Nedelec & Foethke 2007) a été utilisé. Ce logiciel permet de simuler la dynamique des filaments d'actine et leur interaction avec des protéines associées. À partir de la simulation d'un réseau branché de type lamellipode, Gaëlle Letort a pu reconstituer les filopodes grâce à la présence d'élongateurs de type formines ou Ena/VASP et de protéines de réticulation. La formation de structures contractiles à partir du désassemblage du lamellipode a ensuite été simulée à partir d'un réseau branché subissant un flux rétrograde dont les filaments se réalignent et se compactent sous l'action de moteurs moléculaires. Ces simulations ont permis de montrer que la présence de protéines de réticulation et de deux points de friction, tels que les adhésions focales, était nécessaire pour la formation de ces structures contractiles.



REVIEW

Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton [version 1; referees: 2 approved]

Gaëlle Letort^{1*}, Hajer Ennomani^{1*}, Laurène Gressin¹, Manuel Théry^{1,2},
Laurent Blanchoin¹

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

* Equal contributors

v1 **First published:** 01 Oct 2015, 4(F1000 Faculty Rev):940 (doi: [10.12688/f1000research.6374.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.6374.1))
Latest published: 01 Oct 2015, 4(F1000 Faculty Rev):940 (doi: [10.12688/f1000research.6374.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.6374.1))

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.



This article is included in the **F1000 Faculty Reviews** channel.

Open Peer Review

Referee Status:

	Invited Referees	
	1	2
version 1 published 01 Oct 2015	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
1 Klemens Rottner , Braunschweig University of Technology Germany		
2 David Kovar , The University of Chicago USA		
Discuss this article		
Comments (0)		

Corresponding author: Laurent Blanchoin (laurent.blanchoin@cea.fr)

How to cite this article: Letort G, Ennomani H, Gressin L *et al.* **Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton [version 1; referees: 2 approved]** *F1000Research* 2015, 4(F1000 Faculty Rev):940 (doi: [10.12688/f1000research.6374.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.6374.1))

Copyright: © 2015 Letort G *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution Licence](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. Data associated with the article are available under the terms of the [Creative Commons Zero "No rights reserved" data waiver](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) (CC0 1.0 Public domain dedication).

Grant information: The author(s) declared that no grants were involved in supporting this work.

Competing interests: The authors declare that they have no disclosures.

First published: 01 Oct 2015, 4(F1000 Faculty Rev):940 (doi: [10.12688/f1000research.6374.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.6374.1))

Introduction

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 functions³. 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 structures⁴. 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 polymerization⁴. Two actin-binding proteins play a major role in regulating this process: thymosin and profilin⁵. Thymosins sequester actin monomers to which they bind and thus fully block filament assembly⁶. Profilins also bind to actin monomers but only inhibit spontaneous nucleation⁷. Indeed the profilin/actin complex can add on to any pre-existing free filament barbed end and therefore participate in actin elongation⁸.

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 actin-related protein 2/3 (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 Arps, Arp2 and Arp3, that mimic an actin dimer¹¹. Other actin nucleators, including formins^{13,14} or WH2-domain containing proteins¹⁵, appear to stabilize pre-existing dimers rather than generating or mimicking new ones^{16,17}. Interestingly, profilin in yeast

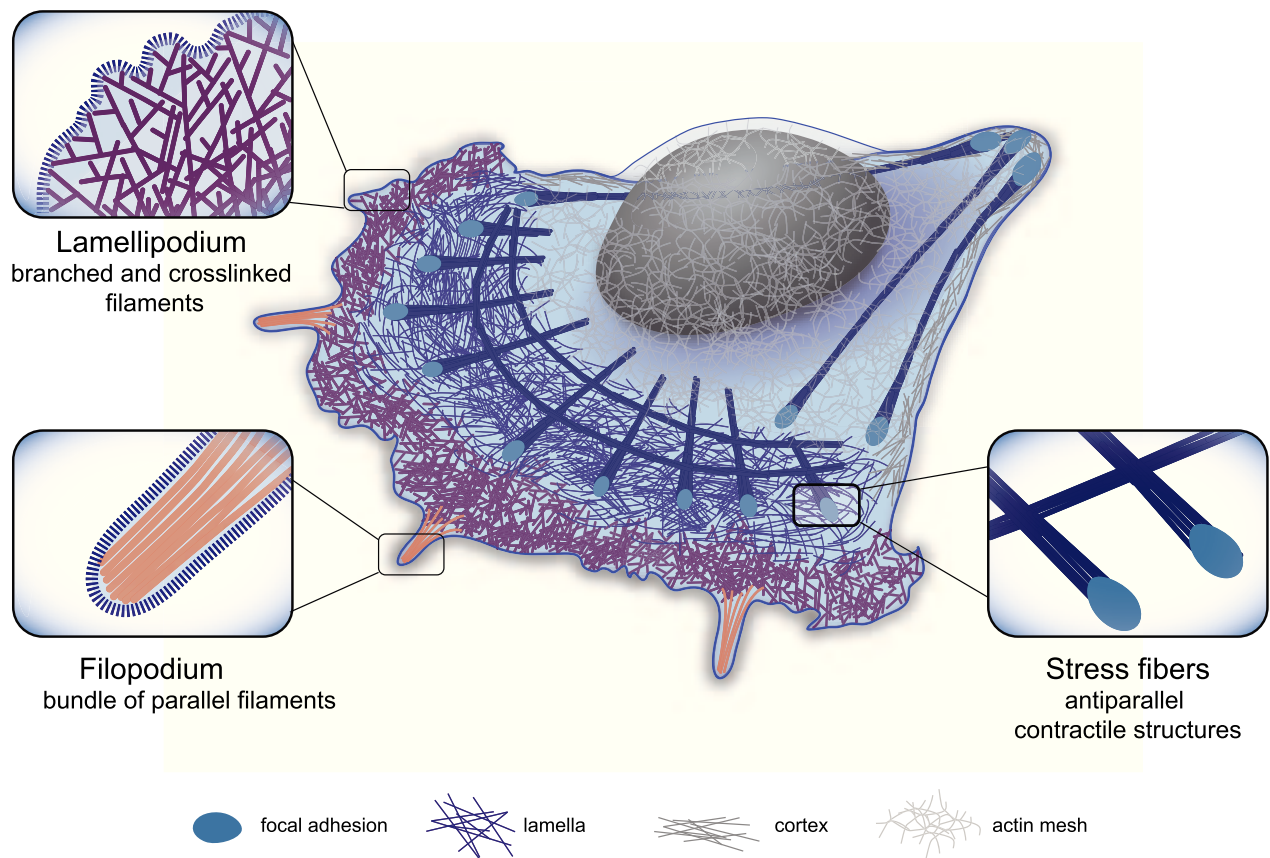


Figure 1. Cellular actin organization. Schematic representation of the three main actin structures found in the cell: 1. Lamellipodium: dense, branched network involved in cell protrusion. 2. Filopodium: a finger-like structure located at the leading edge of the motile cell composed of aligned filaments. 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.

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 the Arp2/3 complex (Figure 1 and 20). 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 extracellular matrix (ECM) (Figure 1 and 25) and control the orientation of lamellipodium²⁶. The parallel filament bundles within the filopodium also serve as tracks for protein transport²⁷. Filopodia are $\sim 1\text{--}10 \mu\text{m}$ long^{28,29}, with $10\text{--}30$ actin filaments crosslinked in parallel arrays by fascin³⁰. 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 mins³² and hence are far more stable than those filaments within the lamellipodium, which have a turnover rate of ~ 1 min³³, or even only a few seconds at the very front of the lamellipodium³⁴.

The cell can also contain actin structures assembled from short filaments that are the sites for the 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 fibers³⁵, and the perinuclear actin cap (Figure 1 and 36). Radial and ventral stress fibers, oriented parallel to the migration axis³⁷, are anchored at focal adhesions at one (radial) or both (ventral) ends³⁵. 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 $10\text{--}30$ filaments by width section³⁹. 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 other⁴¹. The equilibrium between contractile stress and adhesion strength can act as a modulator of cellular tension⁴² 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 stress³⁶. Ventral fibers allow the retraction of the motile cell's trailing edge³⁹ and may also initiate cell motility⁴⁴. By connecting the lamellipodium and the lamella, the transverse arcs, in the flattened perinuclear region⁴⁵, participate in the persistence of cell motility^{35,46}. The perinuclear cap, a structure consisting of actomyosin fibers positioned around the nucleus, regulates the shape and position of the nucleus⁴⁷.

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 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

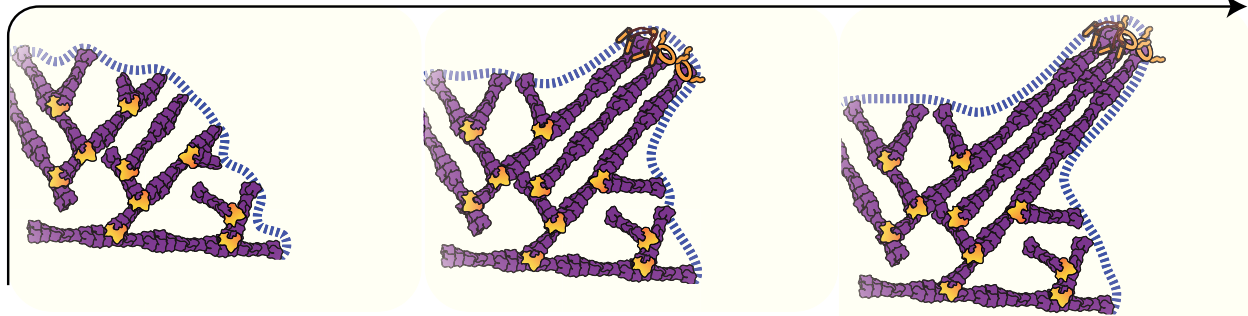
The potential for filopodia to emerge from the lamellipodium near the plasma membrane (Figure 2A) raised the question of how a structure made of parallel actin bundles can arise from a densely branched actin network. Two overlapping theoretical models have attempted to explain this transition: the convergent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

According to the convergent elongation model, filopodia are initiated by the reorganization of the branched actin network due to a fine-tuning of actin filament elongation at their growing ends²⁵. 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 formins⁵⁴ 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}.

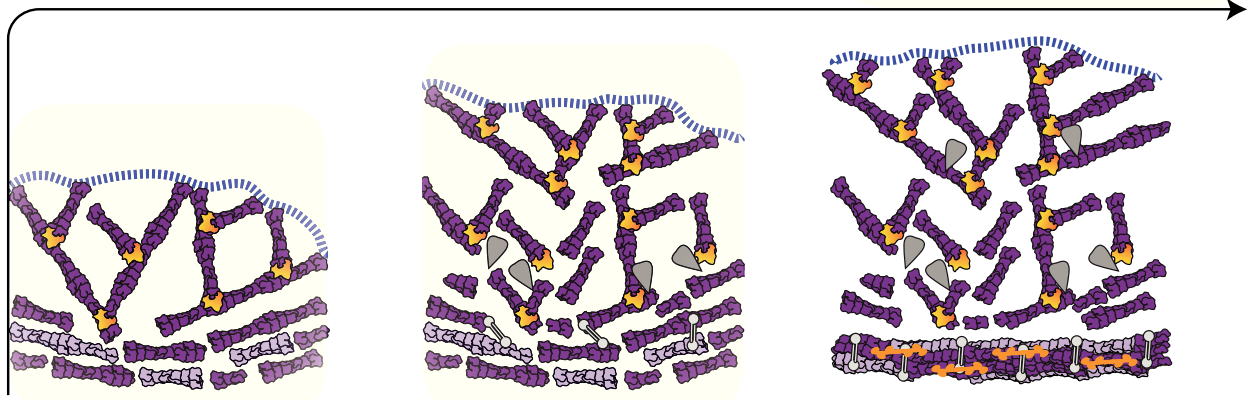
Moreover, depletion of capping protein promotes filopodia formation at the expense of lamellipodium extension, and Ena/VASP proteins have been shown to play an important role in filopodia formation⁵⁸. Indeed, Ena/VASP proteins promote the convergence of filament barbed ends and have an enhanced activity when bound to trailing barbed ends in a fascin bundle, thus allowing the trailing ends to catch up with the leading barbed ends⁵⁹. 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 growth²⁹. Convergence of actin network filaments into filopodia-like bundles can be recapitulated by both *in vitro* reconstitution^{23,62} and Monte Carlo simulation⁶³.

The nucleation model is supported by the observation that filopodia can form even when the lamellipodium is absent as a consequence of lack of the Arp2/3 complex or its activation^{64–67}. 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 cells⁶⁸. However, it is not yet clear how precisely filaments are initiated in the absence of the 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

A Transition of lamellipodium into filopodium



B Transition of lamellipodium into contractile structures



C Fusion of contractile structures and non-contractile structures

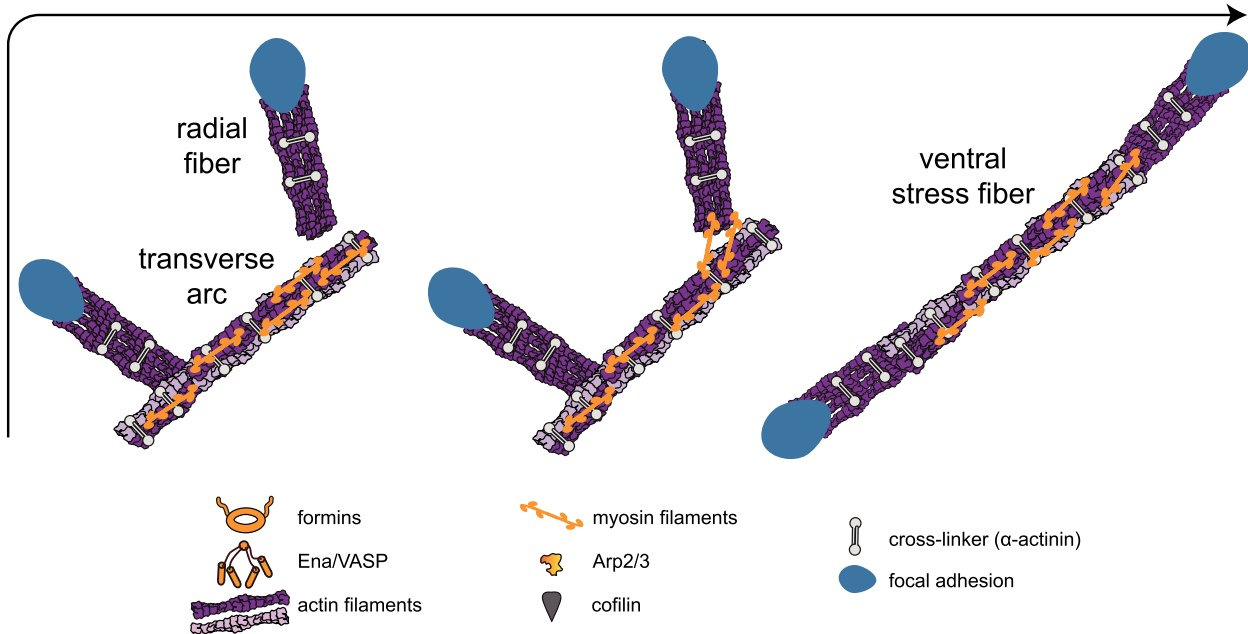


Figure 2. Actin architecture transitions. (A) In the convergent elongation model, the transition from lamellipodium to filopodium involves the formation of parallel actin filaments from a branched network created by the Arp2/3 complex. Elongation factors, like Ena/VASP or formin, protect barbed ends 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.

from the same reservoir and resulted in the enhanced formation of formin-dependent structures⁶⁹. The abundance of filopodia when the 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 cytoplasm⁶⁸. 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 the Arp2/3 complex, to promote filopodia formation⁴⁹. 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 lamellipodium to filopodia, we performed mathematical simulations using the cytoskeleton simulation software Cytosim⁷⁰. In the simulation, a lamellipodium-like branched network was grown by distributing the 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 filopodia may be simple, it is quite difficult to identify exactly 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 isoforms⁷¹. Moreover, the interactions between filaments and the membrane could also regulate this transition. The tension produced by the membrane can determine filopodia dimensions²⁹ and can induce filament alignment in protrusions, even in the absence of crosslinkers⁷².

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 adhesions⁷⁵. Following this initiation step, the growing actin filaments are brushed into parallel bundles by the retrograde flow toward the cell center³⁸. Radial fibers further recruit crosslinked filaments from the lamella, giving rise to an organization of filaments with graded polarity³⁶.

The model for the formation of transverse arcs is clearly different to that of radial fibers³⁸. Transverse arcs are assembled by the 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 and 46). The reorganization of a branched network into actin bundles of mixed polarity includes

several steps. First, disassembly factors such as ADF/cofilin and glia maturation factor (GMF) disconnect the network by debranching the 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 ECM, and by centripetal flow at the lamellipodium/lamella interface⁷⁹. Fourth, the nascent bundles are pushed away from the cell edge by the actin centripetal flow⁷⁴, 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

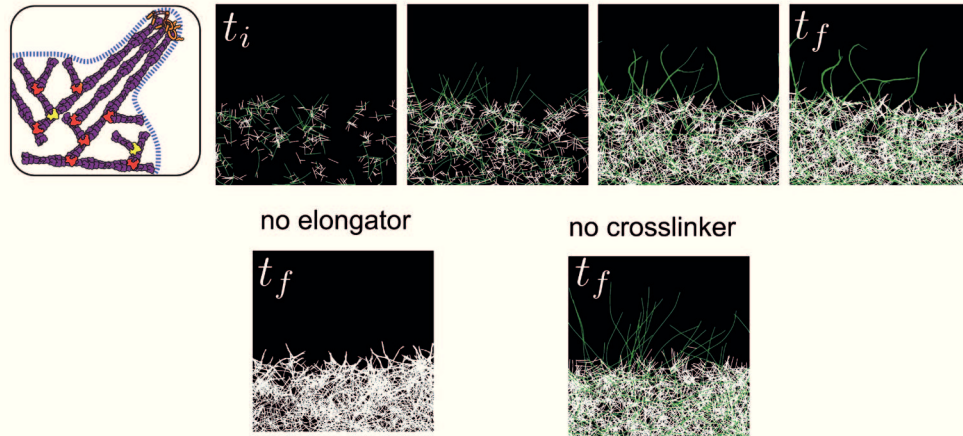
Radial fibers can associate with transverse arcs by the incorporation of myosin II filaments and subsequently develop into ventral fibers^{37,38}. During this process, first, two independent radial fibers connect with a pre-existing transverse arc that is pushed to the trailing edge of the motile cell 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 ends³⁸.

In addition, a ventral stress fiber could be formed by the fusion of two dorsal stress fibers, without transverse arc incorporation⁸⁰. This latter case has been observed in Arp2/3 complex knockdown cells³⁸.

Filopodia disassembly and their fate

The mechanisms by which filopodia disassemble remain to be determined. However, stationary filopodia can be disassembled into small bundles by ADF/cofilin⁸¹. 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

A Lamellipodium into filopodia



B Lamellipodium into contractile structures

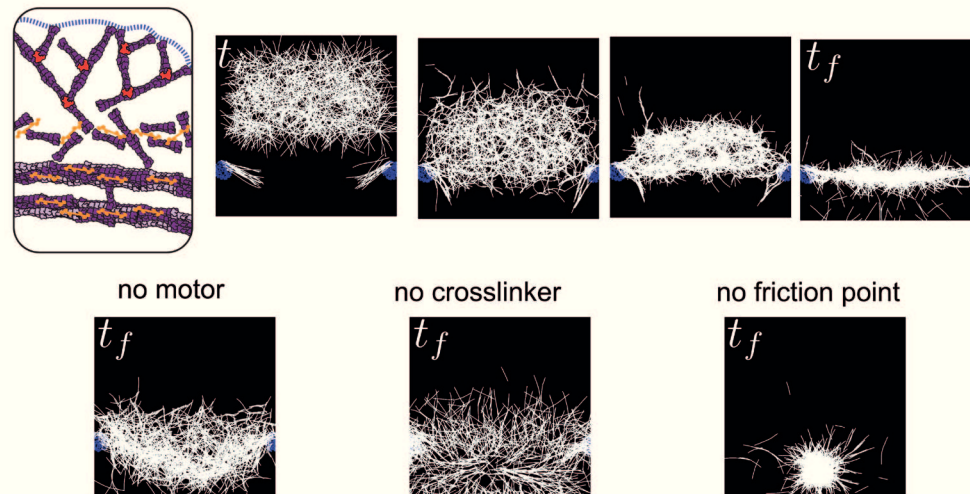


Figure 3. Simulation of transitions between actin structures. (A) Emergence of filopodia-like protrusions from a lamellipodium-like network. Simulations were performed using the Cytosim software. In the top panel, the actin network grows by branched nucleation via the Arp2/3 complex, and a proportion 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). In the 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. In the 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 (\sim centripetal actin flow) until it co-aligns with the friction points to form one contractile fiber. In the 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 form a continuous actin structure (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). t_i and t_f indicate initial time and final time of simulations (empirical).

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 pre-existing 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 migration⁸³. 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 the understanding of the complexity of cellular actin dynamics. Mathematical simulations demonstrate that only a 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 laws behind dynamic cytoskeletal reorganization.

Competing interests

The authors declare that they have no disclosures.

Grant information

The author(s) declared that no grants were involved in supporting this work.

Acknowledgments

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

Supplemental movie legends

Movie S1 (related to [Figure 3A](#))

Transition of lamellipodium into filopodia: 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>

References



- Pollard TD, Borisov GG: **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.** *Cell.* 2003; **112**(4): 453–65.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Sykes C, et al.: **Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility.** *Physiol Rev.* 2014; **94**(1): 235–63.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Fletcher DA, Mullins RD: **Cell mechanics and the cytoskeleton.** *Nature.* 2010; **463**(7280): 485–92.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD: **Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 2000; **29**: 545–76.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Carlier MF, Pantaloni D: **Actin assembly in response to extracellular signals: role of capping proteins, thymosin beta 4 and profilin.** *Semin Cell Biol.* 1994; **5**(3): 183–91.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Pantaloni D, Carlier MF: **How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4.** *Cell.* 1993; **75**(5): 1007–14.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
- Goldschmidt-Clermont PJ, Machesky LM, Doberstein SK, et al.: **Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin.** *J Cell Biol.* 1991; **113**(5): 1081–9.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
- Pollard TD, Cooper JA: **Quantitative analysis of the effect of Acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation.** *Biochemistry.* 1984; **23**(26): 6631–41.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)

9. Chesarone MA, Goode BL: **Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay.** *Curr Opin Cell Biol.* 2009; **21**(1): 28–37.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
10. Campellone KG, Welch MD: **A nucleator arms race: cellular control of actin assembly.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; **11**(4): 237–51.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
11. Machesky LM, Atkinson SJ, Ampe C, et al.: **Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from Acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose.** *J Cell Biol.* 1994; **127**(1): 107–15.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
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.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**(11): 6181–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
13. Pruyne D, Evangelista M, Yang C, et al.: **Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association.** *Science.* 2002; **297**(5581): 612–5.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
14. Sagot I, Rodal AA, Moseley J, et al.: **An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin.** *Nat Cell Biol.* 2002; **4**(8): 626–31.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
15. Paunola E, Mattila PK, Lappalainen P: **WH2 domain: a small, versatile adapter for actin monomers.** *FEBS Lett.* 2002; **513**(1): 92–7.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
16. Xu Y, Moseley JB, Sagot I, et al.: **Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture.** *Cell.* 2004; **116**(5): 711–23.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
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 (Hoboken).* 2013; **70**(11): 686–705.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
18. Rotty JD, Wu C, Haynes EM, et al.: **Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and -independent pathways.** *Dev Cell.* 2015; **32**(1): 54–67.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
19. Suarez C, Carroll RT, Burke TA, et al.: **Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex.** *Dev Cell.* 2015; **32**(1): 43–53.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
20. 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**(5): 1009–26.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
21. Keren K, Pincus Z, Allen GM, et al.: **Mechanism of shape determination in motile cells.** *Nature.* 2008; **453**(7194): 475–80.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
22. Mogilner A: **Mathematics of cell motility: have we got its number?** *J Math Biol.* 2009; **58**(1–2): 105–34.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
23. Vignjevic D, Yarar D, Welch MD, et al.: **Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network.** *J Cell Biol.* 2003; **160**(6): 951–62.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
24. Le Clairche C, Carlier MF: **Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration.** *Physiol Rev.* 2008; **88**(2): 489–513.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
25. Mattila PK, Lappalainen P: **Filopodia: molecular architecture and cellular functions.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; **9**(6): 446–54.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
26. Johnson HE, King SJ, Asokan SB, et al.: **F-actin bundles direct the initiation and orientation of lamellipodia through adhesion-based signaling.** *J Cell Biol.* 2015; **208**(4): 443–55.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
27. Zhuravlev PI, Lan Y, Minakova MS, et al.: **Theory of active transport in filopodia and stereocilia.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; **109**(27): 10849–54.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
28. Welch MD, Mullins RD: **Cellular control of actin nucleation.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002; **18**: 247–88.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
29. Mogilner A, Rubinstein B: **The physics of filopodial protrusion.** *Biophys J.* 2005; **89**(2): 782–95.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
30. Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, et al.: **Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network.** *J Cell Biol.* 2003; **160**(3): 409–21.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
31. Lan Y, Pappoian GA: **The stochastic dynamics of filopodial growth.** *Biophys J.* 2008; **94**(10): 3839–52.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
32. Mallavarapu A, Mitchison T: **Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction.** *J Cell Biol.* 1999; **146**(5): 1097–106.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
33. Theriot JA, Mitchison TJ: **Actin microfilament dynamics in locomoting cells.** *Nature.* 1991; **352**(6331): 126–31.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
34. Lai FP, Szczodrak M, Block J, et al.: **Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia.** *EMBO J.* 2008; **27**(7): 982–92.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
35. Pellegrin S, Mellor H: **Actin stress fibers.** *J Cell Sci.* 2007; **120**(Pt 20): 3491–9.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
36. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P: **Actin stress fibers—assembly, dynamics and biological roles.** *J Cell Sci.* 2012; **125**(Pt 8): 1855–64.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
37. Small JV, Rottner K, Kaverina I, et al.: **Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement.** *Biochim Biophys Acta.* 1998; **1404**(3): 271–81.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
38. Hotulainen P, Lappalainen P: **Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells.** *J Cell Biol.* 2006; **173**(3): 383–94.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
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.** *J Cell Biol.* 1997; **136**(6): 1287–305.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
40. Naumanen P, Lappalainen P, Hotulainen P: **Mechanisms of actin stress fibre assembly.** *J Microsc.* 2008; **231**(3): 446–54.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
41. Warrick HM, Spudis JA: **Myosin structure and function in cell motility.** *Annu Rev Cell Biol.* 1987; **3**: 379–421.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
42. Goffin JM, Pittet P, Csucs G, et al.: **Focal adhesion size controls tension-dependent recruitment of alpha-smooth muscle actin to stress fibers.** *J Cell Biol.* 2006; **172**(2): 259–68.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
43. Shemesh T, Bershadsky AD, Kozlov MM: **Physical model for self-organization of actin cytoskeleton and adhesion complexes at the cell front.** *Biophys J.* 2012; **102**(8): 1746–56.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
44. Cramer LP: **Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration.** *Nat Cell Biol.* 2010; **12**(7): 628–32.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
45. Ingram VM: **A side view of moving fibroblasts.** *Nature.* 1969; **222**(5194): 641–4.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
46. Burnette DT, Manley S, Sengupta P, et al.: **A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells.** *Nat Cell Biol.* 2011; **13**(4): 371–81.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
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 Lett.* 2011; **585**(24): 3992–7.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
48. Faix J, Rottner K: **The making of filopodia.** *Curr Opin Cell Biol.* 2006; **18**(1): 18–25.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
49. Yang C, Svitkina T: **Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins.** *Cell Adh Migr.* 2011; **5**(5): 402–8.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
50. Edwards M, Zwolak A, Schafer DA, et al.: **Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014; **15**(10): 677–89.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
51. Wear MA, Cooper JA: **Capping protein: new insights into mechanism and regulation.** *Trends Biochem Sci.* 2004; **29**(8): 418–28.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
52. Krause M, Bear JE, Loureiro JJ, et al.: **The Ena/VASP enigma.** *J Cell Sci.* 2002; **115**(Pt 24): 4721–6.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
53. Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linker J, et al.: **Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation.** *EMBO J.* 2011; **30**(3): 456–67.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
54. Zigmund SH, Evangelista M, Boone C, et al.: **Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins.** *Curr Biol.* 2003; **13**(20): 1820–3.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
55. Schirenbeck A, Bretschneider T, Arasada R, et al.: **The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia.** *Nat Cell Biol.* 2005; **7**(6): 619–25.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
56. Pellegrin S, Mellor H: **The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2.** *Curr Biol.* 2005; **15**(2): 129–33.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
57. Block J, Stradal TE, Hänisch J, et al.: **Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3.** *J Microsc.* 2008; **231**(3): 506–17.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
58. Mejillano MR, Kojima S, Applewhite DA, et al.: **Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end.** *Cell.* 2004; **118**(3): 363–73.
[PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)

59. **F** Winkelman JD, Bilancia CG, Peifer M, *et al.*: **Ena/VASP Enabled is a highly processive actin polymerase tailored to self-assemble parallel-bundled F-actin networks with Fascin.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; **111**(11): 4121–6. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
60. Reymann A, Martiel JL, Cambier T, *et al.*: **Nucleation geometry governs ordered actin networks structures.** *Nat Mater.* 2010; **9**(10): 827–32. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
61. Letort G, Politi AZ, Ennomani H, *et al.*: **Geometrical and mechanical properties control actin filament organization.** *PLoS Comput Biol.* 2015; **11**(5): e1004245. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
62. Haviv L, Brill-Karniely Y, Mahaffy R, *et al.*: **Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103**(13): 4906–11. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
63. Brill-Karniely Y, Ideses Y, Bernheim-Groswasser A, *et al.*: **From branched networks of actin filaments to bundles.** *Chemphyschem.* 2009; **10**(16): 2818–27. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
64. **F** Steffen A, Faix J, Resch GP, *et al.*: **Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes.** *Mol Biol Cell.* 2006; **17**(6): 2581–91. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
65. **F** Suraneni P, Rubinstein B, Unruh JR, *et al.*: **The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration.** *J Cell Biol.* 2012; **197**(2): 239–51. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
66. **F** Wu C, Asokan SB, Berginski ME, *et al.*: **Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis.** *Cell.* 2012; **148**(5): 973–87. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
67. **F** Steffen A, Ladwein M, Dimchev GA, *et al.*: **Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation.** *J Cell Sci.* 2013; **126**(Pt 20): 4572–88. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
68. **F** Suraneni P, Fogelson B, Rubinstein B, *et al.*: **A mechanism of leading-edge protrusion in the absence of Arp2/3 complex.** *Mol Biol Cell.* 2015; **26**(5): 901–12. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
69. **E** Burke TA, Christensen JR, Barone E, *et al.*: **Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers.** *Curr Biol.* 2014; **24**(5): 579–85. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
70. Nedelec F, Foethke D: **Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers.** *New J Phys.* 2007; **9**. [Publisher Full Text](#)
71. Faix J, Grosse R: **Staying in shape with formins.** *Dev Cell.* 2006; **10**(6): 693–706. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
72. **F** Liu AP, Richmond DL, Maibaum L, *et al.*: **Membrane-induced bundling of actin filaments.** *Nat Phys.* 2008; **4**: 789–93. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
73. **F** Nemethova M, Auinger S, Small JV: **Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella.** *J Cell Biol.* 2008; **180**(6): 1233–44. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
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.** *Mol Biol Cell.* 2008; **19**(11): 5006–18. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)
75. **F** Skau CT, Plotnikov SV, Doyle AD, *et al.*: **Inverted formin 2 in focal adhesions promotes dorsal stress fiber and fibrillar adhesion formation to drive extracellular matrix assembly.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; **112**(19): E2447–56. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
76. **F** Chan C, Beltzner CC, Pollard TD: **Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments.** *Curr Biol.* 2009; **19**(7): 537–45. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
77. **F** Gandhi M, Smith BA, Bovellan M, *et al.*: **GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation.** *Curr Biol.* 2010; **20**(9): 861–7. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
78. **F** Ydenberg CA, Padrick SB, Sweeney MO, *et al.*: **GMF severs actin-Arp2/3 complex branch junctions by a cofilin-like mechanism.** *Curr Biol.* 2013; **23**(12): 1037–45. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
79. **E** Shemesh T, Verkhovskiy AB, Svitkina TM, *et al.*: **Role of focal adhesions and mechanical stresses in the formation and progression of the lamellipodium-lamellum interface [corrected].** *Biophys J.* 2009; **97**(5): 1254–64. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
80. Zimerman B, Volberg T, Geiger B: **Early molecular events in the assembly of the focal adhesion-stress fiber complex during fibroblast spreading.** *Cell Motil Cytoskeleton.* 2004; **58**(3): 143–59. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
81. **F** Breitsprecher D, Koestler SA, Chizhov I, *et al.*: **Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments.** *J Cell Sci.* 2011; **124**(Pt 19): 3305–18. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#) | [F1000 Recommendation](#)
82. Koestler SA, Auinger S, Vinzenz M, *et al.*: **Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front.** *Nat Cell Biol.* 2008; **10**(3): 306–13. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#)
83. Lim JI, Sabouri-Ghomi M, Machacek M, *et al.*: **Protrusion and actin assembly are coupled to the organization of lamellar contractile structures.** *Exp Cell Res.* 2010; **316**(13): 2027–41. [PubMed Abstract](#) | [Publisher Full Text](#) | [Free Full Text](#)

Open Peer Review

Current Referee Status:



Version 1

Referee Report 01 October 2015

doi:[10.5256/f1000research.6834.r10648](https://doi.org/10.5256/f1000research.6834.r10648)



David Kovar

Department of Molecular Genetics and Cell Biology, The University of Chicago, Chicago, IL, USA

I have read this submission. I believe that I have an appropriate level of expertise to confirm that it is of an acceptable scientific standard.

Competing Interests: No competing interests were disclosed.

Referee Report 01 October 2015

doi:[10.5256/f1000research.6834.r10647](https://doi.org/10.5256/f1000research.6834.r10647)



Klemens Rottner

Division of Molecular Cell Biology, Zoological Institute, Braunschweig University of Technology, Braunschweig, Germany

I have read this submission. I believe that I have an appropriate level of expertise to confirm that it is of an acceptable scientific standard.

Competing Interests: No competing interests were disclosed.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'Approche Bottom-Up

Mon travail de thèse s'est porté sur l'étude du turnover des filaments d'actine et plus particulièrement sur le désassemblage et le recyclage des structures de filaments d'actine. Cette étude a été réalisée *in vitro* en suivant une logique basée sur une approche dite "Bottom-Up" (Figure 1) qui consiste à étudier un processus cellulaire à partir de protéines purifiées (constituant de base des cellules), puis de complexifier le système pour se rapprocher d'un modèle cellulaire.

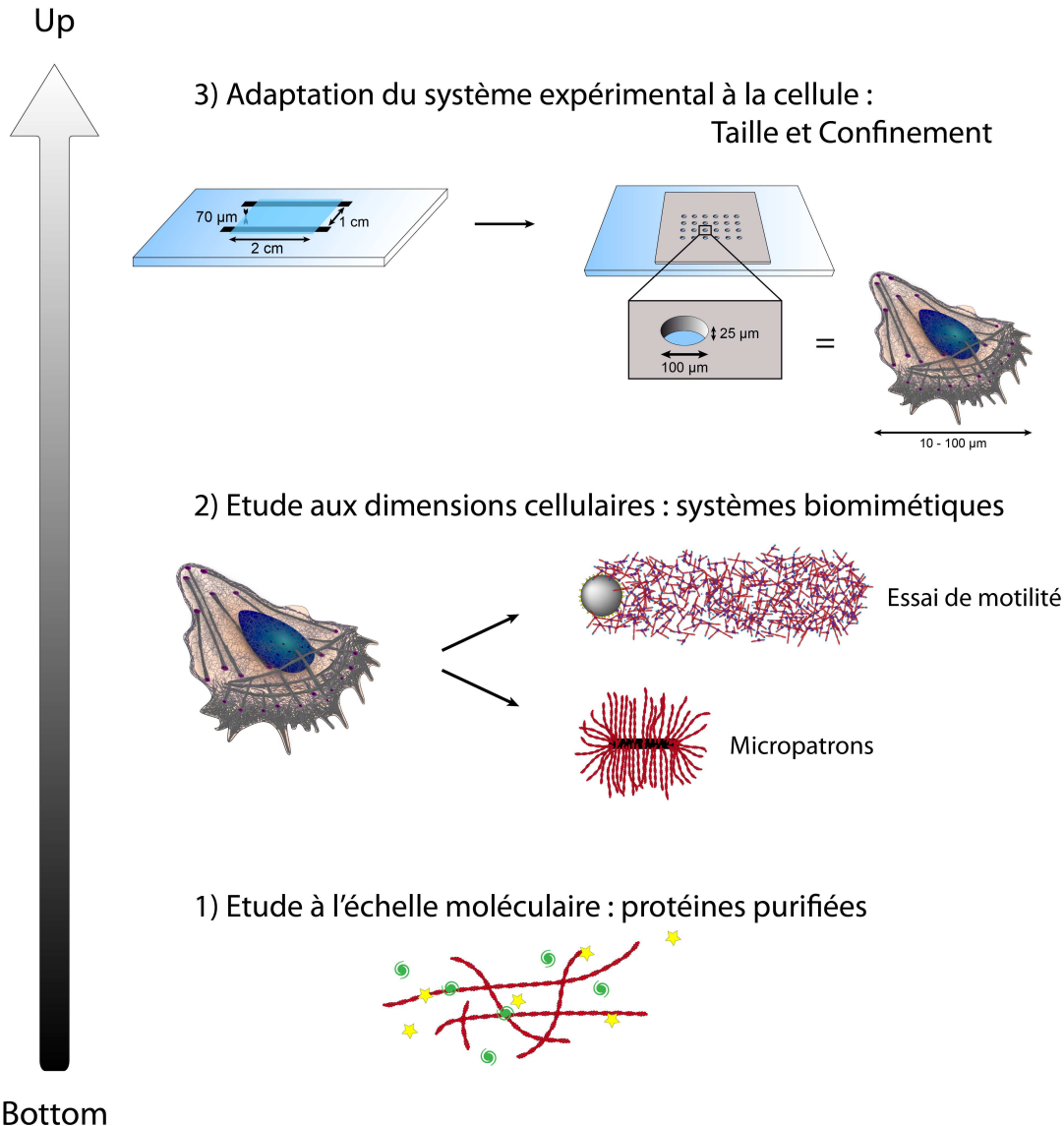


Figure 1 : Les différentes étapes de la l'approche Bottom-Up.

1) Etude de l'actine à l'échelle du filament d'actine, à partir de protéines purifiées. 2) Reconstitution *in vitro* de la motilité cellulaire et des structures de filaments d'actine grâce à des systèmes biomimétiques tels que l'essai de motilité et les micropatrons. 3) Adaptation du système expérimental basique, la chambre à flux, à la taille et au confinement d'une cellule par la création de micropuits.

Mon approche "Bottom-Up" s'est divisée en trois axes : l'étude du désassemblage des filaments d'actine à l'échelle moléculaire (Figure 1.1), puis à l'échelle de la structure de filaments d'actine (Figure 1.2) et enfin la reconstitution du turnover en milieu confiné (Figure 1.3).

En premier lieu, l'approche moléculaire est utilisée pour comprendre l'interaction entre les filaments d'actine et les protéines régulatrices du désassemblage, l'ADF/cofiline et l'Aip1 (Figure 1.1). Pour ce faire, les protéines sont purifiées et mises en contact dans un mélange dit "de polymérisation" contenant les éléments nécessaires à la polymérisation des filaments (sels, ATP, agents contre le photoblanchiment,...). Les protéines marquées avec des fluorophores sont visibles grâce au microscope à onde évanescente et nous permettent d'étudier le désassemblage des filaments individuels par l'ADF/cofiline et un de ses cofacteurs, l'Aip1.

Pour des architectures d'actine complexes, le désassemblage a pu être étudié grâce aux micropatrons, un système biomimétique permettant de reconstituer *in vitro* les différentes organisations de filaments d'actine présentes dans la cellule (Figure 1.2).

La dernière étape de l'approche Bottom-Up a consisté à mettre en place un système expérimental de taille et de confinement comparable à ceux d'une cellule. En effet, un des objectifs de l'approche Bottom-Up est de recréer idéalement une cellule synthétique *in vitro*. Pour atteindre cet objectif, il est nécessaire de recréer un environnement restreint et fermé, afin de travailler *in vitro* avec une quantité de protéines similaire aux quantités cellulaires (Figure 1.3) et (Pinot et al. 2012; Tsai et al. 2011; Rondelez et al. 2005; Deshpande & Pfohl 2015). J'ai pu utiliser un tel système par la suite pour reconstituer le turnover des structures de filaments d'actine.

Désassemblage des structures de filaments d'actine

Lorsque j'ai commencé ma thèse, le désassemblage des filaments d'actine avait beaucoup moins été étudié par la communauté scientifique que leur assemblage. Cette facette du cytosquelette était donc encore mal connue. Les différents acteurs du désassemblage étaient connus, l'ADF/cofiline, un des facteurs principaux, mais aussi l'Aip1, la coronine, la Srv2/CAP, la twinfiline, ou encore la gelsoline. Cependant les mécanismes moléculaires utilisés par ces machineries protéiques n'étaient pas encore clairement établis. On ne savait pas, par exemple, comment le désassemblage au sein de la cellule pouvait être aussi efficace avec une protéine comme l'ADF/cofiline (Suarez et al. 2011). En effet, le lamellipode se désassemble en moins d'une minute (Lai et al. 2008) mais l'activité de l'ADF/cofiline au niveau du filament individuel ne peut rendre compte de ce désassemblage rapide. L'ADF/cofiline est une protéine aux activités multiples sur les filaments d'actine ou réseaux d'actine : fragmentation, dissociation des branches, accélération de la dissociation du phosphate, changement de la longueur de persistance des filaments d'actine. Comprendre comment ses activités se trouvent impliquées dans le désassemblage de structures complexes d'actine semblait être un challenge important au début de ma thèse.

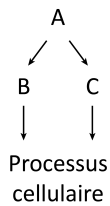
Des études génétiques, moléculaires et cellulaires ont été menées pour comprendre le désassemblage. En premier lieu, les études génétiques nous ont permis de repérer les protéines mises en jeu et leurs relations.

1. Étude génétique des protéines impliquées dans le désassemblage

Bien que la levure ne soit pas un organisme rampant et donc inadaptée à l'étude de la motilité cellulaire, elle offre un outil génétique très intéressant de par son génome, restreint à un gène par protéine étudiée, du moins pour les protéines de désassemblage. De plus, depuis que tout le génome de *Saccharomyces cerevisiae* a été entièrement déterminé, il est relativement facile de générer des mutants KO (knock-out) simples, doubles et triples de gènes potentiellement reliés (Sutherland & Witke 1999).

Les analyses génétiques nous montrent que l'ADF/cofiline est la seule protéine essentielle au désassemblage. En effet, le KO d'ADF/cofiline est létal alors que le mutant simple d'un de ses cofacteurs : Aip1, Cap2, Crn1, Srv2 et Twf1, ne présente au pire que des défauts de croissance. En outre, l'outil génétique permet de faire des doubles mutants. Mettons que le gène A soit essentiel à la survie de la levure, mais que B et C ne le soient pas.

Il est alors possible de déterminer les voies de signalisations parallèles, c'est-à-dire qui aboutissent au même processus cellulaire, ou encore quelles protéines remplissent les mêmes



fonctions. Dans l'exemple ci-contre, les gènes B et C ne sont pas essentiels mais si les deux sont supprimés, le processus biologique étudié n'est plus assuré, on parle alors de fonctions redondantes : B et C remplissent le même rôle. En partant de ce principe, nous pouvons essayer de comprendre les redondances fonctionnelles impliquées dans le désassemblage des filaments d'actine. D'abord, l'ADF/cofiline est la seule protéine essentielle du désassemblage car sa déplétion

simple est la seule à être létale (Figure 2). Pour pouvoir étudier les interactions entre l'ADF/cofiline et les autres protéines du désassemblage, des mutants ponctuels ont été générés en remplaçant en général un, deux voire trois acides aminés chargés par une alanine, acide aminé neutre (ni chargé, ni polaire). Les mutants d'ADF/cofiline viables sont sélectionnés, j'en donne quelques exemples en Figure 2 :

- cof 1-4 et cof 1-22 : mutants qui interagissent bien avec l'actine mais pas avec Aip1 (Rodal et al. 1999)
- cof1-19 : mutant défectueux dans le désassemblage induit par Aip1 (Clark et al. 2006)
- cof1-5 et cof 1-22 : mutants qui entraînent un défaut dans le désassemblage des filaments d'actine, résultant en un turnover ralenti (Lappalainen et al. 1997)

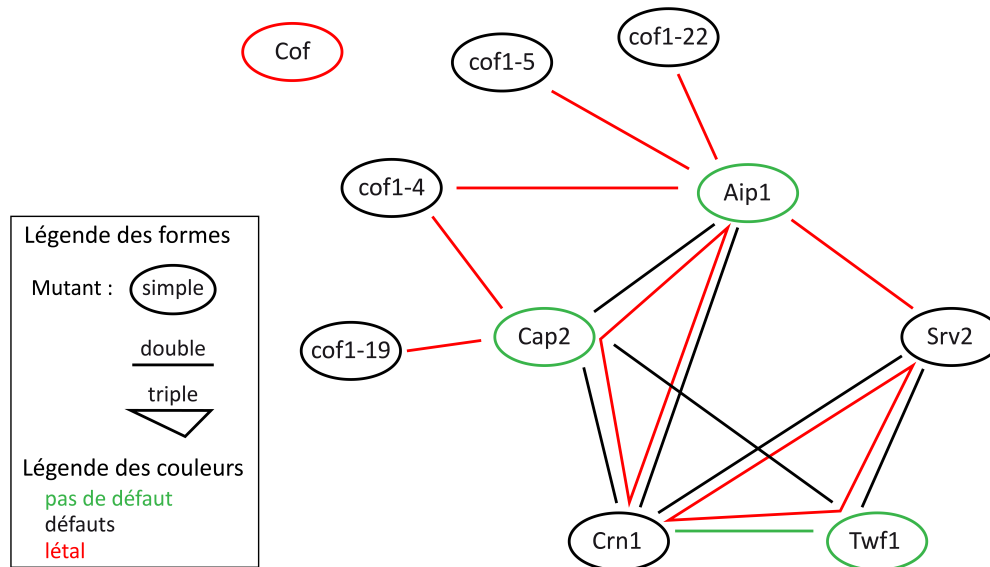


Figure 2 : Interactions génétiques entre les différents acteurs du désassemblage.

L'ADF/cofiline est la seule protéine à être essentielle, puisque le KO d'ADF/cofiline est le seul léthal. Cependant, la combinaison de KO double ou triple montre que les autres protéines impliquées dans le désassemblage assurent des fonctions similaires essentielles à la cellule (Informations tirées de Lappalainen et al. 1997; Rodal et al. 1999; Clark et al. 2006; Ydenberg et al. 2015).

Les KO de l'Aip1 et de la capping protein (Cap2), associés à des mutations ponctuelles de l'ADF/cofiline qui réduisent l'efficacité du désassemblage, sont létaux et montrent donc que ces deux protéines entrent en jeu dans ce désassemblage. Parmi les doubles mutants générés, seul le couple Aip1/Srv2 est essentiel. Ces deux protéines ont donc une fonction similaire (Ydenberg et al. 2015). Bien qu'elles n'aient pas le même mécanisme de fragmentation, elles ont en effet en commun la capacité d'accélérer le désassemblage par l'ADF/cofiline (Talman et al. 2014; Briehner et al. 2006).

Le double mutant $cap2\Delta/twf1\Delta$ n'est pas léthal, mais nous apprend que la twinfiline a potentiellement un effet de capping, supporté par des études dans d'autres systèmes que la levure (Helfer et al. 2006). De plus, la capping protein est essentielle pour la bonne localisation de la twinfiline *in vivo* (Palmgren et al. 2001).

Deux triples mutants sont à mettre en avant : $cap2\Delta/aip1\Delta/crn1\Delta$ et $crn1\Delta/srv2\Delta/twf1\Delta$. Cap2 a une fonction de blocage des extrémités barbées des filaments d'actine, il est donc probable que le couple Aip1/Crn1 ait la même fonction. Pour ce qui est du triple mutant $crn1\Delta/srv2\Delta/twf1\Delta$, peu de choses sont connues sur l'interaction entre ces protéines, si ce n'est un lien probable entre Srv2/CAP et Twinfiline qui accélérerait la dépolymérisation des deux extrémités du filament. Une telle fonction n'a cependant jamais été observée chez coronine.

Les études génétiques sont utiles pour déterminer des fonctions similaires entre les protéines, mais la levure étant un organisme très simplifié, il est important de combiner ces informations avec des études moléculaires et cellulaires afin de chercher l'existence d'autres liens chez les organismes plus complexes tels que les mammifères.

2. Le désassemblage des filaments d'actine par l'ADF/cofiline et l'Aip1 à deux échelles

Au cours de ma thèse, j'ai pu étudier en parallèle le désassemblage de filaments individuels et de structures de filaments d'actine par deux facteurs : ADF/cofiline et Aip1. Mon travail a d'abord mis en évidence la synergie entre ces deux protéines. ADF/cofiline se lie aux filaments d'actine, mais, même à une concentration optimale, la fragmentation des filaments est limitée. J'ai pu montrer qu'à une forte concentration d'ADF/cofiline, les filaments d'actine entièrement décorés étaient un excellent substrat pour l'intervention d'Aip1 permettant ainsi un désassemblage très efficace et total des filaments d'actine.

In vivo, les trois types de structures de filaments d'actine sont soumis au turnover, cependant personne n'avait encore étudié en quoi leur désassemblage pouvait différer. J'ai pu observer d'abord que, bien que l'ADF/cofiline décorait plus efficacement les structures linéaires que les réseaux branchés, elle n'était capable de désassembler que les structures branchées, tandis qu'elle stabilisait les structures linéaires. Ce phénomène peut être expliqué par l'action de débranchage connu de l'ADF/cofiline (Blanchoin et al. 2000c; Chan et al. 2009). L'Aip1 est ensuite capable de désassembler toutes les structures de filaments d'actine entièrement décorés par l'ADF/cofiline sans distinction. *In vivo*, Aip1 est localisée sur les zones plus "âgées" des réseaux branchés, là où l'ADF/cofiline se trouve de par sa plus grande affinité pour les filaments ADP (Okreglak & Drubin 2010; Michelot et al. 2013). Le mutant privé d'Aip1, ne montre pourtant pas de différence de turnover par rapport au sauvage (Michelot et al. 2013), ce qui serait en accord avec le fait qu'ADF/cofiline est capable de désassembler les réseaux de filaments branchés sans l'aide d'Aip1. De plus, à l'arrière du lamellipode, les filaments d'actine désassemblés sont réordonnés par la myosine pour former les fibres de stress transverses (Hotulainen & Lappalainen 2006), le désassemblage du lamellipode n'aurait donc pas forcément besoin d'être complet, puisque les filaments qui résultent du désassemblage peuvent être réutilisés immédiatement et sans passer par un recyclage complet (c'est-à-dire être désassemblé jusqu'au monomère, libérer des protéines régulatrices encore fixées et changer l'état de leur nucléotide) avant de participer à la formation de nouvelles structures.

L'étude du désassemblage de filaments individuels a montré que la fragmentation par l'ADF/cofiline était polarisée. En effet, suite à la fragmentation, qui a lieu à la frontière entre la décoration par l'ADF/cofiline et la partie vierge d'ADF/cofiline, celle-ci reste liée à l'extrémité pointue du nouveau filament. Cette découverte est en accord avec l'expérience d'AFM rapide réalisée par Ngo montrant que le changement de conformation du filament d'actine induit par l'ADF/cofiline ne se propage que dans une seule direction, vers l'extrémité pointue (Ngo et al. 2015). En accord avec cet article, j'ai aussi pu observer qu'une fois le filament fragmenté, le cluster d'ADF/cofiline ne se propage plus, indiquant que l'ajout de nouvelles ADF/cofilines se faisait aussi vers l'extrémité pointue du filament d'actine.

3. Discussion sur les différents modes de désassemblage du filament d'actine au niveau moléculaire

Au cours de ma thèse, la question du désassemblage était en plein débat. De nombreux laboratoires travaillent en effet sur les facteurs impliqués et leurs différentes méthodes de désassemblage : la fragmentation, le débranchage, et la dépolymérisation.

3.1. Modèle de fragmentation par l'ADF/cofiline

Un premier modèle a été proposé en faveur de la fragmentation du filament d'actine par l'ADF/cofiline. Ce mode de fragmentation est basé sur la déstabilisation du filament d'actine par l'association de l'ADF/cofiline sur le filament d'actine (McCullough et al. 2008). L'accumulation de l'ADF/cofiline entraîne un changement de conformation de l'actine et une augmentation de la flexibilité "longitudinale" (la longueur de persistance diminue) et "transverse" (la rigidité de torsion est réduite). Ce modèle explique très bien les observations à l'échelle moléculaire (McCullough et al. 2008; Suarez et al. 2011; Gressin et al. 2015; Ngo et al. 2015), cependant il montre ses limitations au niveau du désassemblage des structures de filaments d'actine où les études se contredisent. Breitsprecher explique par exemple que la déstabilisation du filament peut jouer un rôle important dans le désassemblage des faisceaux de filaments d'actine (Breitsprecher et al. 2011). En effet, les câbles d'actine qu'il étudie sont réticulés par la fascine qui 1) rigidifie les filaments et 2) entre en compétition avec l'ADF/cofiline. Il en résulte une discontinuité dans la décoration de l'ADF/cofiline et une augmentation de son activité de désassemblage. En revanche, l'accessibilité des filaments au sein des faisceaux d'actine est réduite et peut jouer l'effet inverse, c'est-à-dire réduire l'action de l'ADF/cofiline et empêcher le désassemblage des structures réticulées (Huang et al. 2005).

3.2. Modèle de débranchage des filaments d'actine

Le deuxième mode de désassemblage est le débranchage des réseaux branchés par le complexe Arp2/3. L'ADF/cofiline entre en jeu dans le débranchage (Blanchoin et al. 2000b), mais le mécanisme moléculaire est encore incertain. Plusieurs possibilités sont proposées : d'abord l'accélération de la dissociation du phosphate inorganique du filament par l'ADF/cofiline peut accélérer la dissociation du complexe Arp2/3 ayant une préférence pour les sous-unités ATP (Blanchoin et al. 2000b). Ensuite, le fait que l'ADF/cofiline change les propriétés mécaniques du filament ce qui empêcherait le complexe Arp2/3 de s'y associer (Chan et al. 2009). En outre, d'autres protéines entrent en jeu dans le débranchage : coronine et GMF. Ces deux facteurs sont connus pour interagir directement avec le complexe Arp2/3 et dissocier la branche

du filament mère (Gandhi et al. 2010; Ydenberg et al. 2013; Humphries et al. 2002; Rodal et al. 2005).

3.3. Modèle de dépolymérisation des filaments d'actine

3.3.1. Modèle d'éclatement (bursting) des extrémités du filament d'actine

L'ADF/cofiline a d'abord été connue pour fragmenter les filaments d'actine mais récemment d'autres modèles font surface, en particulier le modèle d'éclatement des extrémités de filaments d'actine proposé par Briehar. Ce modèle stipule que l'ADF/cofiline peut, en présence d'autres facteurs, participer à la dépolymérisation du filament d'actine (Kueh et al. 2008). En présence d'ADF/cofiline, d'Aip1 et de coronine, Kueh observe une dépolymérisation très rapide des deux extrémités. Le modèle suggère que les deux brins de l'hélice du filament d'actine se séparent soit à partir d'une extrémité, soit à partir du centre du filament. La dépolymérisation très rapide du filament pourrait aussi s'expliquer par la fragmentation de petits oligomères d'actine au niveau des extrémités. Kueh privilégie cependant le modèle de séparation des brins par les extrémités car un événement de bursting est plus enclin à se produire à une extrémité déjà touchée par un précédent bursting.

En comparaison avec ces résultats, il faut citer le groupe de recherche de Goode qui travaille sur les mêmes protéines (actine, ADF/cofiline, Aip1 et coronine). Contrairement à Briehar, Jansen n'observe pas de dépolymérisation des filaments d'actine par éclatement comme proposé ci-dessus, mais l'accélération de la fragmentation des filaments d'actine par l'ADF/cofiline, la coronine et l'Aip1. Il existe deux différences entre ces études. La première est l'attache des filaments sur le substrat, qui est réalisée avec 0.5 % d'actine biotine chez Jansen contre de la filamine chez Kueh. La nature de l'attache pourrait jouer en faveur du bursting ou de la fragmentation. Deuxièmement, les deux groupes ne marquent pas leurs protéines de la même façon. Kueh marque les monomères d'actine sur les lysines, et peuvent donc avoir plusieurs fluorophores. A contrario, Jansen a choisi de marquer les monomères d'actine sur leur Cys374, pour avoir seulement un fluorophore par monomère et réduire ainsi le risque de dimérisation de l'actine par photo-induction, ce qui provoque des pauses dans la dépolymérisation des filaments d'actine (Jansen et al. 2015; Niedermayer et al. 2012).

L'imagerie par fluorescence montre ici ses limites. Sa résolution spatiale n'est pas suffisante pour comprendre quel mécanisme prévaut sur l'autre et il faudra probablement des systèmes plus fins pour répondre à ces questions.

3.3.2. Dépolymérisation par Srv2/CAP et Twinfiline

En 2015, il a été montré pour la première fois une synergie entre Srv2/CAP et Twinfiline pour la dépolymérisation des filaments d'actine. La twinfiline est une protéine comportant deux domaines d'homologie d'ADF/cofiline ADF-H, et comme Srv2/CAP, est connue pour accélérer le désassemblage des filaments par ADF/cofiline (Chaudhry et al. 2013), il est logique de

s'intéresser à l'interaction entre la Srv2/CAP et twinfiline. Twinfiline est très proche structurellement de l'ADF/cofiline, cependant leur mode de fragmentation est très différent. Alors que l'action de l'ADF/cofiline entraîne une coupure au milieu du filament, la twinfiline, elle, accélère la dépolymérisation, c'est-à-dire le retrait des sous-unités l'une après l'autre aux extrémités des filaments d'actine. *In vitro*, la twinfiline seule catalyse jusqu'à 3 fois la dépolymérisation à l'extrémité barbée et jusqu'à 17 fois à l'extrémité pointue en présence de Srv2/CAP (Johnston et al. 2015). De la même manière que l'ADF/cofiline, l'action de twinfiline dépend de l'état du nucléotide : seuls les filaments ADP sont désassemblés plus rapidement. De plus, la twinfiline interagit avec capping protéine qui la localise aux patches d'endocytose chez la levure (Palmgren et al. 2001). De même que capping protein, twinfiline se lie et bloque les extrémités barbées et, bien que contre-intuitive, son action est inhibée par la présence de capping protein (Moseley et al. 2006).

4. Synthèse

Récemment, les connaissances sur l'interaction entre coronine, ADF/cofiline et Aip1 pour le filament d'actine ont fait un bond en avant, grâce à la microscopie à onde évanescente. Le mécanisme de fragmentation qui a été proposé se déroule en 3 étapes : 1) la fixation de la coronine sur le filament, 2) le recrutement de l'ADF/cofiline par la coronine et 3) la fragmentation par Aip1 (Jansen et al. 2015) et Figure 3. Ce processus est contrôlé dans le temps.

D'abord, la coronine, qui a une préférence pour les filaments ATP, se lie au réseau branché (Figure 3a). Son activité est en débat, puisque certains avancent qu'elle permet de débrancher le réseau en interagissant directement avec le complexe Arp2/3 (Humphries et al. 2002), quand d'autres pensent que son interaction avec le complexe Arp2/3 améliore la localisation de celui-ci sur les filaments plutôt que sur l'actine G et donc promeut au contraire la formation du réseau branché (Gandhi & Goode 2008).

Bien que l'ADF/cofiline puisse se lier seule à l'actine, sa coopérativité est faible (Andrianantoandro & Pollard 2006). La coronine améliore nettement le recrutement de l'ADF/cofiline car elle augmente sa vitesse de fixation (Jansen et al. 2015) et diminue la quantité d'ADF/cofiline nécessaire pour le désassemblage (Brieher et al. 2006), malgré le fait que ces deux protéines soient en compétition pour le filament d'actine (Cai et al. 2007). Coronine se lie donc aux filaments d'actine en amont de l'ADF/cofiline et la recrute (Figure 3b). Lorsque l'ADF/cofiline est fixée au filament d'actine, la coronine semble se détacher (Jansen et al. 2015). Le filament entièrement décoré par ADF/cofiline va ensuite recruter Aip1, qui se fixe sur le côté du filament (Chen et al. 2015) (Figure 3c). Des données récentes montrent que le mécanisme d'Aip1 pour augmenter le désassemblage se fait par l'action combinée des deux processus suivants : la fragmentation, c'est-à-dire par coupures le long du filament, et la dépolymérisation, dissociation des sous-unités d'actine aux deux extrémités (Nadkarni & Brieher 2014). Jansen montre, en accord avec cet article, que Aip1 fragmente les filaments d'actine décorés par

ADF/cofiline. Cependant, toujours d'après Jansen, Aip1 reste attachée à l'extrémité barbée et la bloque, ce qui est contradictoire avec l'observation de Nadkarni, qui est la dissociation accélérée des sous-unités aux deux extrémités. J'ai pu montrer que dans mes conditions expérimentales, Aip1 n'était pas capable de bloquer la polymérisation après avoir fragmenté un filament d'actine. Cependant, en extrait cellulaire (Michelot et al. 2013) et en présence d'autres facteurs comme coronine (Jansen et al. 2015), Aip1 coiffe et bloque les extrémités barbées. Aip1 semble donc avoir besoin de la présence simultanée de l'ADF/cofiline et de coronine pour bloquer les extrémités barbées, ce qui pourrait expliquer pourquoi certains observent cette fonction d'Aip1 (Okada et al. 2002; Jansen et al. 2015) et d'autres non (Nadkarni & Briehner 2014; Chen et al. 2015; Gressin et al. 2015).

Après le désassemblage par ADF/cofiline, coronine et Aip1, une autre protéine prend le relais : Srv2/CAP (Figure 3d). Comme je l'ai rappelé en introduction, Srv2/CAP est connue pour aider le recyclage des monomères d'actine après désassemblage par l'ADF/cofiline. Pour cela, Srv2/CAP est en compétition avec l'ADF/cofiline pour les monomères d'actine, permettant la dissociation de l'ADF/cofiline et catalysant l'échange du nucléotide ADP en ATP par la profiline (Balcer et al. 2003). Il a été montré ensuite qu'en plus de sa fonction de recyclage de monomères, Srv2/CAP avait aussi la propriété d'accélérer directement le désassemblage par l'ADF/cofiline (Chaudhry et al. 2013). Ces deux fonctions sont indépendantes puisque le recyclage et la catalyse du désassemblage sont orchestrés respectivement par la partie C-terminal et la partie N-terminal de la protéine.

Récemment Srv2/CAP a été impliquée d'une troisième façon dans le désassemblage des filaments d'actine, cette fois avec l'interaction de twinfiline, une protéine de la famille des ADF/cofilines (Figure 3e). Johnston a en effet montré que twinfiline était capable d'accélérer la dépolymérisation des filaments d'actine. Le mode de fragmentation du couple twinfiline – Srv2/CAP est complémentaire de l'ADF/cofiline. En effet, suite au désassemblage par l'ADF/cofiline, la coronine et l'Aip1, les filaments d'actine ne sont pas totalement désassemblés et font encore en moyenne 12 sous-unités (Jansen et al. 2015). La dépolymérisation spontanée étant très faible ($K_d = 0,27$ sous-unités par seconde), ces oligomères mettront environ une minute pour se désassembler complètement. C'est donc à ce moment que le couple twinfiline – Srv2/CAP pourrait jouer un rôle complémentaire en augmentant 17 fois la dépolymérisation des oligomères à leur extrémité pointue (Johnston et al. 2015) (l'extrémité barbée semble être bloquée par Aip1 Jansen et al. 2015) et permettre le retour à l'état monomérique en moins de cinq secondes (Figure 3e).

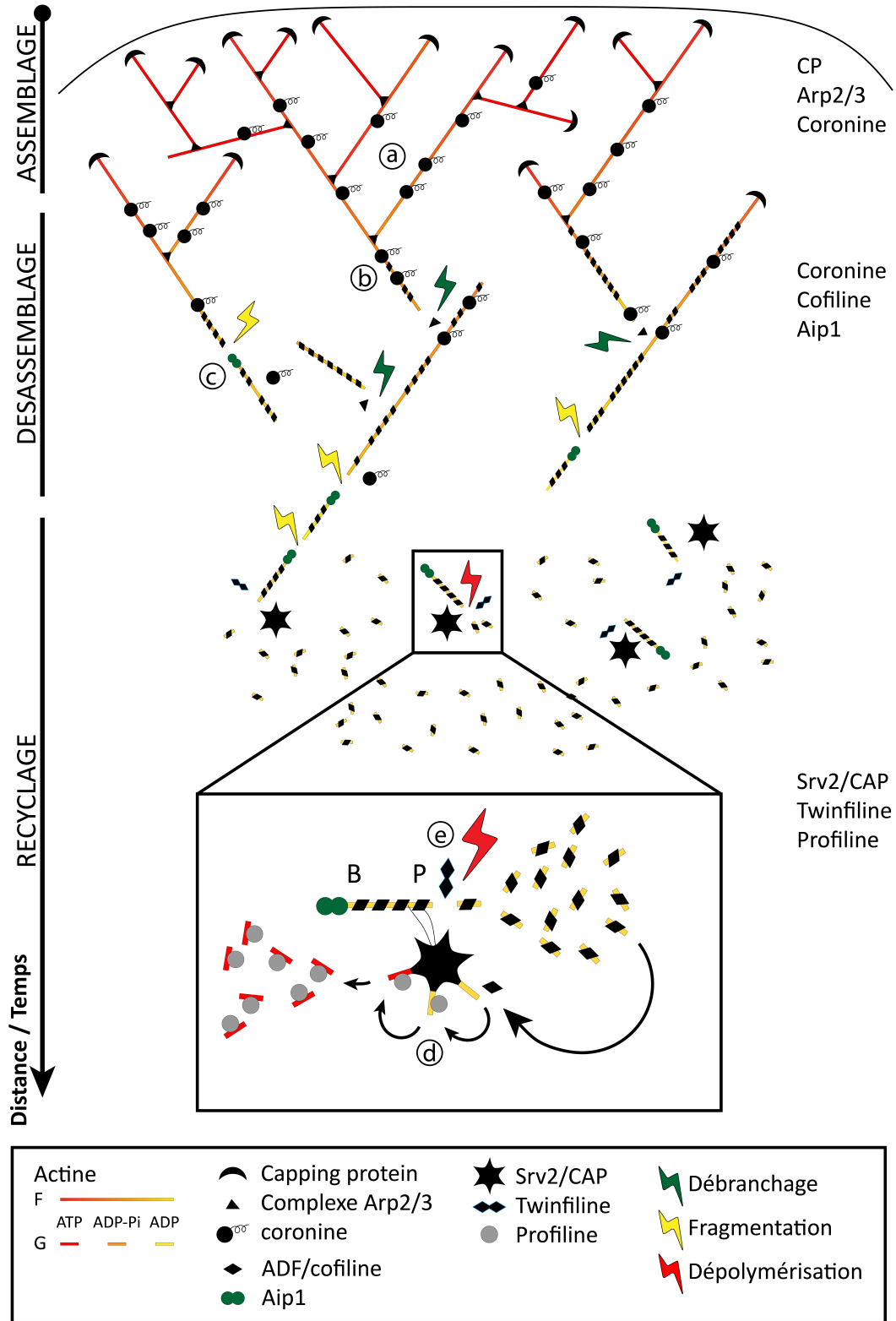


Figure 3 : Synthèse des modes de désassemblage par l'ADF/cofiline et ses cofacteurs.

Le turnover est divisé en trois étapes : l'assemblage, le désassemblage et le recyclage. L'échelle Distance/Temps décrit la succession de ces trois étapes, spatiale dans le lamellipode et temporelle dans les patches d'endocytose chez la levure.

5. Fonctions des protéines du désassemblage *in vivo*

Depuis quelques années de nombreux laboratoires s'intéressent à la question du désassemblage des filaments d'actine *in vivo*. Nos analyses *in vitro* peuvent donc permettre de comprendre les observations cellulaires.

In vivo, la plupart des études portent soit sur l'observation de cellules sauvages pour localiser les protéines, soit sur la génération de mutants pour comprendre la fonction des protéines. Les protéines du désassemblage ont été étudiées sur des structures de filaments d'actine telles que le lamellipode et les filopodes des cellules de mammifères, les comètes de bactéries telles que *Listeria monocytis* et les câbles et patches d'endocytose des levures. Les mutations réalisées ont montré que les protéines du désassemblage entraînent en jeu dans la plupart des processus cellulaires impliquant le turnover des filaments d'actine tels que la cytocinèse, l'endocytose et la migration cellulaire (Ono 2003).

En effet, il a été montré que Aip1 (Okada et al. 1999) et coronine (de Hostos et al. 1991) étaient impliquées dans la cytocinèse, leur déplétion simultanée entraînant une mauvaise formation du sillon de clivage chez *Dictyostelium* (Ishikawa-Ankerhold et al. 2010).

Pour ce qui est du trafic endocytique, qui met en jeu la formation et le désassemblage d'un réseau branché, l'ADF/cofiline, Aip1 et coronine semblent entrer en jeu dans le désassemblage de ces structures (Clark et al. 2006; Lin et al. 2010; Ishikawa-Ankerhold et al. 2010).

L'ADF/cofiline est impliquée dans la motilité cellulaire chez la *Drosophile* (Chen et al. 2001), ainsi que coronine et Aip1 dont la suppression ralentit *in vivo* les cellules de *Dictyostelium* (Ishikawa-Ankerhold et al. 2010).

La plupart de ces processus cellulaires sont communs aux cellules eucaryotes, mais les protéines de désassemblage se retrouvent aussi dans des processus spécifiques à un type cellulaire. Par exemple, dans les cellules épithéliales, il a été montré cette année que le turnover était essentiel dans la stabilité des forces qui maintiennent les cellules entre elles (Jodoin et al. 2015). La propagation des forces dans le tissu épithélial est basée sur la présence d'un réseau d'actine contractile flexible. Ce réseau est en perpétuel renouvellement, se détachant et se rattachant en permanence sur les jonctions membranaires. Cette dynamique est dépendante du turnover des filaments d'actine. En effet, pour pouvoir se remodeler, les filaments doivent pouvoir être désassemblés, et se réassembler sur d'autres adhésions focales. Le turnover et l'équilibre entre les réservoirs d'actine G et F sont donc essentiels pour la dynamique du réseau contractile et le maintien du tissu épithélial.

Un autre exemple intéressant dans lequel le turnover est impliqué est la formation d'une multicouche de myéline autour des axones neuronaux. En effet, un front migrant, poussé par la même machinerie que le lamellipode, se déplace à la surface de la cellule et l'entoure de myéline. De la même façon que le lamellipode, l'ADF/cofiline a été identifiée comme un facteur essentiel dans la maintenance du turnover rapide de ce front migrant (Nawaz et al. 2015).

D'autres facteurs que l'ADF/cofiline ont aussi été étudiés *in vivo*, comme par exemple l'Aip1, impliquée dans la régulation du cytosquelette des neutrophiles, cellules du système

immunitaire permettant de détruire les bactéries virulentes. Aip1 régule le désassemblage par l'intermédiaire de l'ADF/cofiline. Des mutations des deux allèles codants pour Aip1 entraînent une neutropénie (baisse des neutrophiles), un déficit dans la capacité de cicatriser, des stomatites (inflammation de la muqueuse buccale) et le décès des patients. Les mutations d'Aip1 peuvent entraîner une diminution de l'efficacité de désassemblage, en empêchant Aip1, soit de se lier convenablement à un filament actine-ADF/cofiline, soit de fragmenter correctement les filaments une fois liée (Kuhns et al. 2016).

De la même façon, CAP2, de la famille des Srv2/CAP, est impliquée dans la formation des épines dendritiques, protrusions à la surface des dendrites de neurones permettant de faire le lien avec le neurone voisin. Dans le cerveau, l'inactivation de CAP2 accroît le nombre d'épines dendritiques dû à une accumulation d'actine F, provenant probablement d'un défaut de désassemblage des filaments d'actine (Kumar et al. 2016).

Il est aussi possible d'observer des structures anatomiques complètes telles que les poils de *Drosophiles*. Ces poils, formés de faisceaux de filaments d'actine, sont en effet de bons modèles pour étudier facilement l'impact *in vivo* de mutations génétiques. Le désassemblage de l'ADF/cofiline, par exemple, est accéléré dix fois en présence de Mical, une enzyme qui augmente l'association de l'ADF/cofiline sur les filaments d'actine. L'observation macroscopique peut être expliquée par les conclusions des recherches *in vitro*, car l'oxydation des filaments d'actine par Mical affaiblit les propriétés mécaniques des filaments, et pourrait expliquer l'association plus rapide d'ADF/cofiline sur les filaments (Grintsevich et al. 2016). De la même manière, la mutation d'Aip1 et d'ADF/cofiline dans la *Drosophile*, entraîne une malformation des poils et plus spécifiquement l'augmentation de filaments d'actine et leur désorganisation. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que sans ces deux protéines les filaments ne sont pas bien désassemblés et ont tendance à être incorporés aux faisceaux d'actine par l'intermédiaire de la myosine II (Wu et al. 2016).

Afin de comprendre le fonctionnement des processus cellulaires, il est indispensable de combiner différentes approches. D'abord, les études *in vivo* permettent d'observer ce qui est significatif dans les cellules. Les études *in vitro* offrent ensuite la possibilité de comprendre plus en détail ce qui se passe *in vivo*. Notons que les études *in vitro* doivent dans la mesure du possible se baser sur les connaissances recueillies en biologie cellulaire pour décrire des phénomènes physiologiques.

Les micropuits

La vie a pris naissance dans l'eau il y a près de 4 milliards d'années (Bell et al. 2015). Lors de la formation des premières cellules, séquestrer des petits volumes a probablement aidé à la création de la vie. En effet, enfermer des macromolécules a pu permettre de faciliter l'interaction entre les éléments et promouvoir ainsi les réactions chimiques nécessaires à la création d'ATP, et donc de stockage d'énergie. De plus, la membrane plasmique a pu servir de protection contre les attaques extérieures : elle réduit le flux, diminue le risque de perdre des composants et maintient la concentration favorable des éléments nécessaires à la vie tels que les ions et les nutriments (Herrmann 1986). Le confinement a donc certainement été un élément essentiel à la vie. Bien que jusqu'à maintenant peu étudié, de nombreux chercheurs commencent à appréhender son intérêt (Giardini et al. 2003; Pinot et al. 2012; Carvalho et al. 2013b; Suarez et al. 2015; Letort et al. 2016). J'ai donc consacré une partie de ma thèse à fabriquer un système expérimental permettant d'étudier l'impact du confinement sur les processus biologiques. La fabrication de micropuits de 25 μm de hauteur et de 100 μm de diamètre a donc été mise en œuvre afin de pouvoir réaliser des expériences *in vitro* en milieu confiné, de taille similaire aux dimensions cellulaires. J'expliquerai d'abord l'utilité des micropuits dans mon étude du turnover des structures de filaments d'actine, puis élargirai la discussion à l'intérêt d'utiliser des systèmes confinés et les avancées récentes.

Nous avons choisi d'illustrer l'intérêt du confinement en reconstituant le turnover de structures de filaments d'actine *in vitro* en milieu fermé. Pour cela, j'ai travaillé à partir d'un réseau de filaments d'actine branchés subissant *in vivo* le turnover : les comètes d'actine, un réseau d'actine branché à la surface des bactéries *Listeria monocytis*. Nous avons fait ce choix car les comètes d'actine subissent un turnover se rapprochant de celui observé dans le lamellipode, plus facile à étudier que les autres structures cellulaires (fibres de stress, filopodes,...). En effet, les zones de polymérisation et de désassemblage sont dissociées : la polymérisation se fait à la surface des *Listeria* / au front migrant des cellules, tandis que le désassemblage n'attaque que les structures en queue de comète / à l'arrière du lamellipode. Cette structure de filaments branchés a été reconstituée *in vitro* sur des billes en polystyrène recouvertes d'activateur du complexe Arp2/3. Le jeu de protéines initial permettant la formation des comètes d'actine a consisté en un mélange d'actine monomérique, de complexe Arp2/3, de capping protein, et de pWA, l'activateur du complexe Arp2/3 greffé sur des billes en polystyrène. J'ai pu montrer que la croissance des comètes d'actine en milieu confiné conduisait à un état d'équilibre stationnaire non dynamique, dans lequel les comètes ne polymérisent plus, indiquant que le réservoir d'actine a été réduit à la concentration critique d'assemblage. Afin de reconstituer un état stationnaire dynamique, les deux étapes importantes à initier étaient le désassemblage et le recyclage des monomères d'actine. Le désassemblage des structures a été initié par l'ajout d'ADF/cofiline, et le recyclage par la présence de profiline. En milieu ouvert, le volume quasi illimité du réservoir d'actine rend difficile, voire impossible, l'obtention d'un état où la concentration en monomère est limitante et pour lequel le désassemblage de l'actine devient nécessaire pour assurer un état stationnaire dynamique (Figure 4). Les micropuits nous ont permis de rapidement atteindre cet état

stationnaire non dynamique et donc de pouvoir étudier le rôle du désassemblage dans l'obtention d'un régime stationnaire dynamique. Nous avons pu observer que le désassemblage des structures en milieu confiné, sous le contrôle de l'ADF/cofiline, aboutit à des comètes très petites, dont l'assemblage est limité, sûrement parce que le réservoir de monomères est restreint. Une portion de ces comètes reste cependant non décorée et non désassemblée par ADF/cofiline, montrant que, dans ces conditions, il y a un assemblage continu à la surface de la bille et que, à ce site d'assemblage, les filaments ATP sont faiblement décorés par l'ADF/cofiline. L'assemblage et le désassemblage ont par conséquent bien lieu en même temps. Les résultats présentés ici sont donc prometteurs, cependant l'obtention d'un état stationnaire dynamique n'a pas pu dans le cadre de cette thèse être caractérisé en détail. Il serait possible d'améliorer les conditions d'obtention de cet état dynamique et ainsi pouvoir mieux le caractériser par plusieurs moyens.

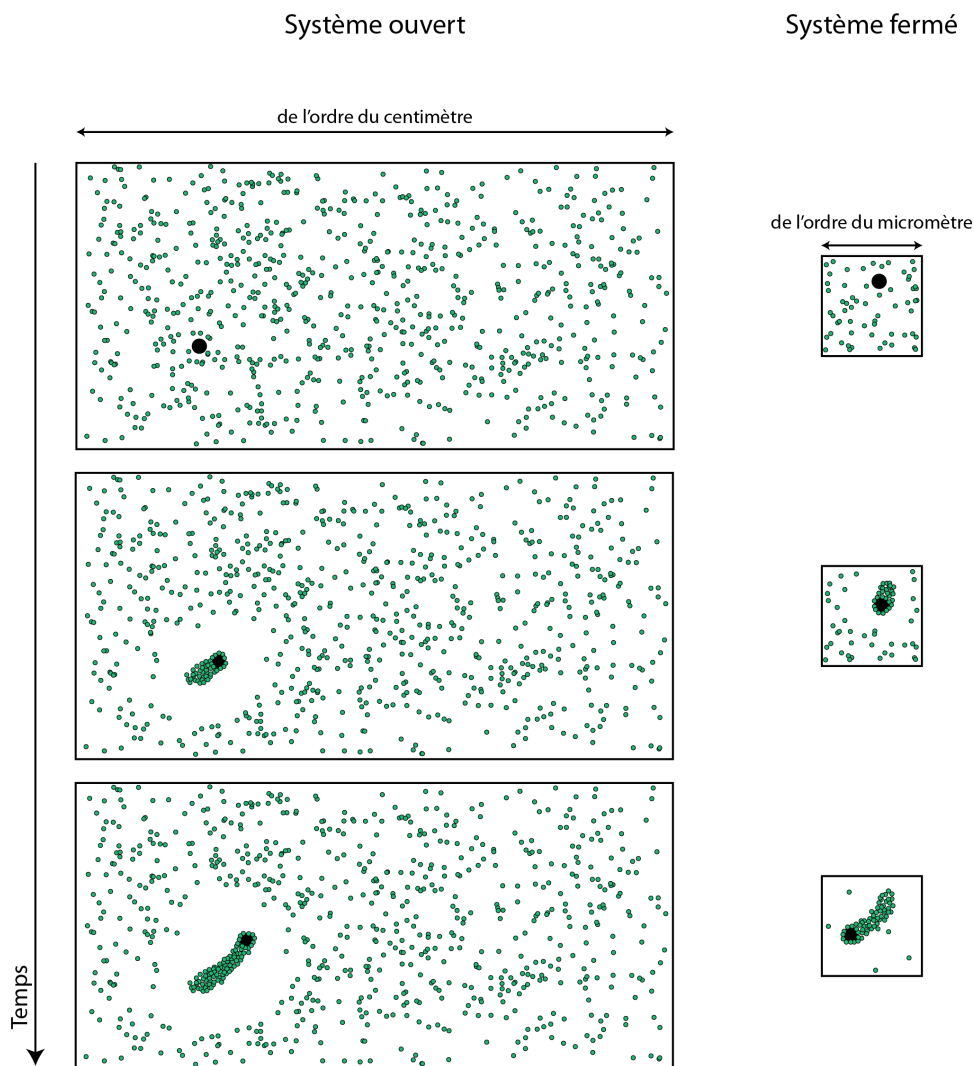


Figure 4 : Etablissement d'un état d'équilibre non dynamique en système ouvert et fermé.

En système ouvert, il est très difficile d'atteindre l'état d'équilibre non dynamique tant la quantité de protéines est importante, contrairement au système fermé.

Afin d'améliorer l'efficacité du turnover des structures d'actine, il faudrait jouer soit sur l'efficacité du désassemblage, soit sur celle du recyclage des sous-unités dissociées suite au désassemblage.

Le désassemblage a été effectué au cours de ma thèse uniquement par l'ADF/cofiline. Comme je l'ai montré dans ma première étude, l'ADF/cofiline est suffisante pour désassembler les filaments branchés et n'a normalement pas besoin de son cofacteur Aip1. Cependant les oligomères provenant du désassemblage par l'ADF/cofiline sont peut-être encore trop longs pour être recyclés et participer à la polymérisation de nouveaux filaments, et la présence d'Aip1 serait probablement importante pour assurer un désassemblage totale de ces fragments (Okreglak & Drubin 2010). D'autres études ont montré que la coronine pouvait aider à la fixation de l'ADF/cofiline sur les filaments d'actine (Jansen et al. 2015). Ici, la cinétique de fixation de l'ADF/cofiline ne semble pas être un facteur limitant mais pour obtenir un turnover extrêmement rapide, l'ajout de la coronine sera peut être indispensable. Il sera peut être aussi nécessaire d'ajouter le couple de protéines Srv2/CAP et twinfiline afin d'accélérer la dépolymérisation des oligomères à leur extrémité pointue (Johnston et al. 2015). L'ajout de ces quatre protéines aurait pour but d'améliorer l'efficacité de désassemblage des filaments d'actine et le recyclage des fragments dissociés en monomères d'actine. Il reste cependant une question ouverte sur la nécessité d'obtenir un désassemblage totale car des études récentes montrent qu'une partie des fragments d'actine obtenus à partir du désassemblage peut être recyclée directement dans la structure pour participer à l'assemblage (Smith et al. 2013b).

Le micropuits ici, ou le confinement en général, nous a donc permis de reconstituer le turnover de structures de filaments d'actine branchés dans un milieu réactionnel de composition limitée. Au-delà de cette application, l'obtention de tel système reconstitué plus « physiologique », nous ouvre des portes pour étudier *in vitro* l'impact du confinement sur de nombreux processus biologiques, notamment sur les mécanismes impliqués dans le turnover, non plus d'une structure unique, mais de plusieurs structures différentes et de déterminer comment peut se faire l'obtention d'un état stationnaire dynamique couplé entre différentes architectures d'actine.

Lorsqu'il est question de confinement, on peut penser à plusieurs échelles : le confinement de la cellule, des organites ou des protéines. Je me focaliserai ici sur le confinement des protéines purifiées, cependant on peut très bien imaginer le confinement de cellules afin d'étudier le comportement de cellules isolées (Ochsner et al. 2007; Wood et al. 2010); l'interaction d'une cellule avec le milieu extérieur tel que la matrice extracellulaire et les cellules voisines (Spaul et al. 2016); ou encore l'impact des contraintes extérieures sur une cellule, tel que la pression subie au sein d'un tissu.

Le confinement de protéines purifiées a pour objectif de recréer des frontières physiques représentant les limites imposées par la membrane cellulaire. En conditions expérimentales "normales", c'est-à-dire en chambre à flux (Figure 1.3), les protéines ne rencontrent pas "d'obstacle". En revanche le système confiné permet de créer des frontières qui influent sur la dynamique des protéines du cytosquelette. Par exemple, la présence de **contraintes physiques** de

dimensions inférieures à la longueur de persistance des microtubules a permis de comprendre le positionnement du centrosome, centre de nucléation des microtubules placés au centre de la cellule (Holy et al. 1997; Faivre-Moskalenko & Dogterom 2002; Letort et al. 2016). Le confinement a, de plus, un effet sur l'organisation spatio-temporelle des filaments d'actine. Par exemple, le confinement d'extrait cellulaire d'œuf de xenopus dans des vésicules a permis d'établir la présence d'un flux d'actine créé spontanément au sein de la vésicule grâce au confinement (Pinot et al. 2012). Récemment, il a aussi été montré que des faisceaux d'actine confinés s'organisent de façon spontanée en un anneau qui peut se contracter sous l'action des myosines (Mishra et al. 2013) semblable à un anneau contractile de cytocinèse.

Outre les limites physiques générées par le confinement, les micropuits nous permettent de **contrôler l'environnement biochimique** fourni au système tout au long de l'expérience. En chambre à flux, il nous est difficile de contrôler précisément la concentration des protéines car la taille de la chambre réactionnelle introduit nécessairement des hétérogénéités expérimentales (Figure 1.2).

In vivo, la **quantité d'actine monomérique restreinte** joue non seulement sur la taille des structures de filaments d'actine, mais doit être **partagée entre les différentes structures**. Aujourd'hui, on ne sait toujours pas comment ce partage est réalisé. Certaines études montrent que le réservoir d'actine monomérique est commun à toutes les structures et est donc en équilibre entre les différents moyens d'assemblage (Gao & Bretscher 2008; Burke et al. 2014). Par exemple lorsque le complexe Arp2/3, et avec lui les réseaux branchés, sont supprimés (principalement les patches d'actine en levure de fission), les câbles d'actine ont un plus gros réservoir d'actine G à disposition et s'assemblent donc en conséquence. La profiline apparaît comme un régulateur de cet équilibre en favorisant la nucléation par formine par rapport à celle générée par le complexe Arp2/3 (Suarez et al. 2015). En revanche chez les mammifères, il existe, de par la présence de thymosine β 4, plusieurs réservoirs d'actine monomérique qui approvisionnent chacun une zone différente de nucléation (Vitriol et al. 2015) : 1) le stock d'actine monomérique séquestré par la thymosine β 4, qui fournit les formines en monomères à l'avant du front migrant, la thymosine permettant d'éviter l'interaction des monomères d'actine avec le complexe Arp2/3, et 2) le réservoir d'actine G provenant du désassemblage du lamellipode qui approvisionne la nucléation par le complexe Arp2/3 au sein du lamellipode. Nous ne sommes qu'au début de la compréhension du mécanisme d'homéostasie qui gère le réservoir de monomères d'actine. Les micropuits ou autres systèmes confinés seront ainsi des outils intéressants et probablement indispensables pour étudier la compétition pour ce stock d'actine G grâce à l'utilisation de micropatrons (voir plus loin).

L'utilisation de **vésicules** comme milieu confiné a un avantage sur les micropuits : être **formés de lipides, principaux composants de la membrane plasmique cellulaire**. Il permet donc l'étude de l'interaction entre le cytosquelette et une couche lipidique comme la déformation de vésicules sous la pression de faisceaux de filaments d'actine polymérisant à l'intérieur (Tsai & Koenderink 2015) ou de comètes d'actine formées à leur surface (Giardini et al. 2003). Cependant, l'imagerie de fluorescence dans les vésicules est aussi limitée que dans une cellule et

l'observation de la dynamique de l'actine au niveau des filaments individuels reste difficile voir impossible.

Les systèmes confinés tels que les **micropuits** ont eux l'avantage de pouvoir être **combinés avec d'autres technologies telles que les micropatrons et les systèmes de microfluidique**. En effet, pour mon étude j'ai utilisé des billes couvertes d'activateurs du complexe Arp2/3 pour initier une comète d'actine, mais on peut tout à fait imaginer faire un micropatron circulaire (comme montré en Figure 5) au fond des micropuits afin de localiser précisément les comètes d'actine, ou même sur les parois verticales du micropuits pour générer des structures de filaments d'actine en 3D.

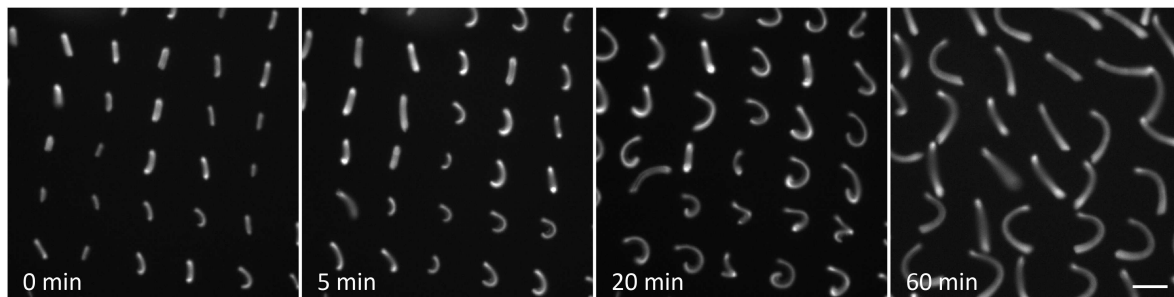


Figure 5 : Micropatrons circulaires.

Micropatrons de 3 μm de diamètre, séparés de 40 μm et couverts de pWA, un activateur du complexe Arp2/3, sur lesquels des comètes d'actine polymérisent en présence d'actine G, de complexe Arp2/3 et de capping protein. Echelle 30 μm .

Les micropuits sont aussi tout à fait adaptés à **l'étude de la compétition entre les structures de filaments d'actine**. En effet leur volume faible contraint les nucléateurs de l'actine à se partager le stock d'actine G, tandis que leurs parois rigides permettent l'utilisation de micropatrons. Afin d'avoir deux structures de filaments d'actine différentes dans le même micropuits, il est envisageable d'utiliser la technique du **micropatron double**. Pour cela, deux zones distinctes du micropuits (le fond ou les parois verticales) sont chacune adsorbées avec un nucléateur de l'actine différent, tels que formine et l'activateur du complexe Arp2/3 par exemple, afin de recréer un réseau branché et des faisceaux de filaments d'actine alignés polymérisant à partir du même réservoir d'actine monomérique. Les deux organisations sont donc en compétition pour les mêmes monomères d'actine et il devient possible d'étudier cette compétition en fonction de paramètres géométriques (taille et forme des micropuits et des micropatrons) ou biochimiques (concentration des protéines, des sels, de l'ATP, de la méthyl cellulose qui joue sur la viscosité du milieu,...).

Enfin, il serait envisageable de recouvrir le fond et les parois du micropuits avec un **micropatron de lipides** nous permettant d'étudier le comportement du cytosquelette sur un substrat fluide en milieu confiné.

Une dernière perspective serait **d'ajouter séquentiellement des protéines** grâce à la microfluidique dans les micropuits ou **de générer des gradients de protéines**. Il serait par exemple possible de former des structures de filaments d'actine en amont, puis d'ajouter une/des protéines régulatrices afin d'observer leur effet en milieu confiné. De plus les micropuits étaient

jusqu'ici circulaires mais peuvent tout à fait **avoir des formes variées** pour s'adapter à des études plus spécifiques. Il nous semble donc que cette technologie ouvre une modularité qu'aucune autre approche ne permet d'obtenir.

L'étude de la dynamique des filaments d'actine peut être entreprise par deux approches : Bottom-Up et Top-Down. Tandis que l'approche Top-Down reconstitue des processus cellulaires comme par exemple l'endocytose (Wu et al. 2010) ou la mitose (Good et al. 2013) à partir d'extraits cellulaires contenant tous les éléments cellulaires, l'approche Bottom-Up tente de comprendre ces processus à partir d'un jeu minimal de protéines purifiées. La méthode Bottom-Up complexifie ensuite le système pour se rapprocher des observations *in vivo*. Les micropuits sont une étape fondamentale pour se rapprocher d'une cellule de par leur dimension, leur volume restreint et leur versatilité (observation de l'actine à plusieurs échelles, possibilité de les combiner avec des essais de motilité sur billes ou des micropatrons et de la microfluidique). Les systèmes confinés, que ce soit les micropuits ou les vésicules lipidiques qui offrent d'autres possibilités ont donc un bel avenir devant eux.

En conclusion, cette thèse montre comment les technologies peuvent être mises au service de l'étude de la dynamique des filaments d'actine. J'ai pu grâce aux micropatrons expliquer le désassemblage des différentes structures de filaments d'actine par l'ADF/cofiline et son cofacteur Aip1. Puis le développement des micropuits, un système restreint et fermé, m'a permis d'ouvrir des portes sur la reconstitution du turnover d'une structure branchée de filaments d'actine et plus largement l'étude de phénomènes biologiques influencés par le confinement.

REFERENCES

- Abraham, V.C., Krishnamurthi, V., Taylor, D.L. & Lanni, F., (1999). **The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells.** *Biophysical Journal*, 77(3), pp.1721–1732.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P., (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. M. Anderson & S. Granum, eds., New York: Garland Science.
- Alexandridis, P. & Alan Hatton, T., (1995). **Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling.** *Colloids and Surfaces A*, 96(1–2), pp.1–46.
- Amann, K.J. & Pollard, T.D., (2001). **Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 98(26), pp.15009–15013.
- Amberg, D.C., Basart, E. & Botstein, D., (1995). **Defining protein interactions with yeast actin in vivo.** *Nature Structural Biology*, 2(1), pp.28–35.
- Ambrose, E.J., (1956). **A surface contact microscope for the study of cell movements.** *Nature*, 178(4543), p.1194.
- Ananthakrishnan, R. & Ehrlicher, A., (2007). **The forces behind cell movement.** *International Journal of Biological Sciences*, 3(5), pp.303–317.
- Andrianantoandro, E. & Pollard, T.D., (2006). **Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin.** *Molecular Cell*, 24(1), pp.13–23.
- Aoyama, S., Shimoike, M. & Hiratsuka, Y., (2013). **Self-organized optical device driven by motor proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(41), pp.16408–13.
- Ashkin, A., Schütze, K., Dziedzic, J.M., Euteneuer, U. & Schliwa, M., (1990). **Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap.** *Nature*, 348(6299), pp.346–8.
- Baek, K., Liu, X., Ferron, F., Shu, S., Korn, E.D. & Dominguez, R., (2008). **Modulation of actin structure and function by phosphorylation of Tyr-53 and profilin binding.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105(33), pp.11748–11753.
- Balcer, H.I., Goodman, A.L., Rodal, A.A., Smith, E., Kugler, J., Heuser, J.E. & Goode, B.L., (2003). **Coordinated regulation of actin filament turnover by a high-molecular-weight Srv2/CAP complex, cofilin, profilin, and Aip1.** *Current Biology*, 13(24), pp.2159–2169.
- Bamburg, J.R., Harris, H.E. & Weeds, A.G., (1980). **Partial purification and characterization of an actin depolymerizing factor from brain.** *FEBS Letters*, 121(1), pp.718–182.
- Bamburg, J.R., McGough, A. & Ono, S., (1999). **Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics.** *Trends in Cell Biology*, 9(9), pp.364–370.
- Bamburg, J.R. & Bernstein, B.W., (2008). **ADF/Cofilin.** *Current Biology*, 18(7), pp.R273-5.
- Bell, E.A., Boehnke, P., Harrison, T.M. & Mao, W.L., (2015). **Potentially biogenic carbon preserved in a 4.1 billion-year-old zircon.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 112(47), pp.14518–14521.
- Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R.M., Carlier, M.-F. & Sykes, C., (2002). **The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters.** *Nature*, 417(6886), pp.308–311.

REFERENCES

- Bernheim-Groswasser, A., Prost, J. & Sykes, C., (2005). **Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram.** *Biophysical Journal*, 89(2), pp.1411–1419.
- Bertling, E., Quintero-Monzon, O., Mattila, P.K., Goode, B.L. & Lappalainen, P., (2007). **Mechanism and biological role of profilin-Srv2/CAP interaction.** *Journal of Cell Science*, 120(7), pp.1225–1234.
- Bezanilla, M., Gladfelter, A.S., Kovar, D.R. & Lee, W.L., (2015). **Cytoskeletal dynamics: A view from the membrane.** *The Journal of Cell Biology*, 209(3), pp.329–337.
- Blanchoin, L. & Pollard, T.D., (1998). **Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin.** *Journal of Biological Chemistry*, 273(39), pp.25106–11.
- Blanchoin, L. & Pollard, T.D., (1999). **Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(22), pp.15538–46.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.-B., Kaiser, D.A. & Pollard, T.D., (2000a). **Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins.** *Nature*, 404(1994), pp.1007–1011.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D. & Mullins, R.D., (2000b). **Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks.** *Current Biology*, 10(20), pp.1273–1282.
- Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S. & Pollard, T.D., (2000c). **Phosphorylation of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure.** *Journal of Molecular Biology*, 295, pp.203–211.
- Blanchoin, L. & Pollard, T.D., (2002). **Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin.** *Biochemistry*, 41(2), pp.597–602.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J., (2014). **Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility.** *Physiological Reviews*, 94(1), pp.235–63.
- Boczkowska, M., Rebowksi, G., Kast, D.J. & Dominguez, R., (2014). **Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-bound WCAs.** *Nature Communications*, 5, p.3308.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F., et al., (2001). **Listeria protein ActA mimics WASP family proteins: It activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex.** *Biochemistry*, 40(38), pp.11390–11404.
- Breitsprecher, D., Koestler, S.A., Chizhov, I., Nemethova, M., Mueller, J., Goode, B.L., Small, J.V., Rottner, K. & Faix, J., (2011). **Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments.** *Journal of Cell Science*, 124(19), pp.3305–3318.
- Brierher, W.M., Kueh, H.Y., Ballif, B.A. & Mitchison, T.J., (2006). **Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of Listeria actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1.** *The Journal of Cell Biology*, 175(2), pp.315–24.
- Bryce, N.S., Schevzov, G., Ferguson, V., Percival, J.M., Lin, J.J.-C., Matsumura, F., Bamburg, J.R., Jeffrey, P.L., Hardeman, E.C., Gunning, P., et al., (2003). **Specification of actin filament function and molecular composition by tropomyosin isoforms.** *Molecular Biology of the Cell*, 14(3), pp.1002–1016.
- Bugyi, B., Le Clainche, C., Romet-Lemonne, G. & Carlier, M.-F., (2008). **How do in vitro reconstituted actin-based motility assays provide insight into in vivo behavior?** *FEBS Letters*, 582(14), pp.2086–2092.
- Bugyi, B. & Carlier, M.-F., (2010). **Control of actin filament treadmilling in cell motility.** *Annual Review of Biophysics*, 39, pp.449–70.
- Burke, T.A., Christensen, J.R., Barone, E., Suarez, C., Sirotkin, V. & Kovar, D.R., (2014). **Homeostatic actin cytoskeleton networks are regulated by assembly factor competition for monomers.** *Current Biology*, 24(5), pp.579–585.

- Cáceres, R., Abou-Ghali, M. & Plastino, J., (2015). **Reconstituting the actin cytoskeleton at or near surfaces in vitro.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 1853(11), pp.3006–3014.
- Cai, L., Makhov, A.M. & Bear, J.E., (2007). **F-actin binding is essential for coronin 1B function in vivo.** *Journal of Cell Science*, 120(10), pp.1779–90.
- Caldwell, J.E., Heiss, S.G., Mermall, V. & Cooper, J.A., (1989). **Effects of CapZ, an actin capping protein of muscle, on the polymerization of actin.** *Biochemistry*, 28(21), pp.8506–8514.
- Cambier, T., Honegger, T., Vanneaux, V., Berthier, J., Peyrade, D., Blanchoin, L., Larghero, J. & Théry, M., (2015). **Design of a 2D no-flow chamber to monitor hematopoietic stem cells.** *Lab on a Chip*, 15(1), pp.77–85.
- Cameron, L.A., Footer, M.J., van Oudenaarden, A. & Theriot, J.A., (1999). **Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(9), pp.4908–13.
- Cameron, L.A., Giardini, P.A., Soo, F.S. & Theriot, J.A., (2000). **Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(2), pp.110–119.
- Carrier, M.-F., (1987). **Measurement of Pi dissociation from actin filaments following ATP hydrolysis using a linked enzyme assay.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 143(3), pp.1069–1075.
- Carrier, M.-F. & Pantaloni, D., (1997). **Control of actin dynamics in cell motility.** *Journal of Molecular Biology*, 269(4), pp.459–67.
- Carrier, M.-F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G.-X., Hong, Y., Chua, N.-H. & Pantaloni, D., (1997). **Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility.** *The Journal of Cell Biology*, 136(6), pp.1307–1322.
- Carvalho, K., Lemièrre, J., Faqir, F., Manzi, J., Blanchoin, L., Plastino, J., Betz, T. & Sykes, C., (2013a). **Actin polymerization or myosin contraction: two ways to build up cortical tension for symmetry breaking.** *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 368(1629), p.20130005.
- Carvalho, K., Tsai, F.-C., Lees, E., Voituriez, R., Koenderink, G.H. & Sykes, C., (2013b). **Cell-sized liposomes reveal how actomyosin cortical tension drives shape change.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 110(41), pp.16456–16461.
- Chan, C., Beltzner, C.C. & Pollard, T.D., (2009). **Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments.** *Current Biology*, 19(7), pp.537–545.
- Chang, L. & Goldman, R.D., (2004). **Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk.** *Molecular Cell Biology*, 5(8), pp.601–13.
- Chaudhry, F., Breitsprecher, D., Little, K., Sharov, G., Sokolova, O. & Goode, B.L., (2013). **Srv2/cyclase-associated protein forms hexameric shurikens that directly catalyze actin filament severing by cofilin.** *Molecular Biology of the Cell*, 24(1), pp.31–41.
- Chen, J., Godt, D., Gunsalus, K., Kiss, I., Goldberg, M. & Laski, F.A., (2001). **Cofilin/ADF is required for cell motility during Drosophila ovary development and oogenesis.** *Nature Cell Biology*, 3(2), pp.204–9.
- Chen, Q., Courtemanche, N. & Pollard, T.D., (2015). **Aip1 promotes actin filament severing by cofilin and regulates constriction of the cytokinetic contractile ring.** *Journal of Biological Chemistry*, 290(4), pp.2289–2300.
- Chhabra, E.S. & Higgs, H.N., (2007). **The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures.** *Nature Cell Biology*, 9(10), pp.1110–1121.
- Claessens, M.M.A.E., Tharmann, R., Kroy, K. & Bausch, A.R., (2006). **Microstructure and viscoelasticity of confined semiflexible polymer networks.** *Nature Physics*, 2(3), pp.186–189.

REFERENCES

- Clark, M.G., Teply, J., Haarer, B.K., Viggiano, S.C., Sept, D. & Amberg, D.C., (2006). **A genetic dissection of Aip1p's interactions leads to a model for Aip1p-cofilin cooperative activities.** *Molecular Biology of the Cell*, 17(4), pp.1971–1984.
- Cocucci, E., Aguet, F., Boulant, S. & Kirchhausen, T., (2012). **The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit.** *Cell*, 150(3), pp.495–507.
- Combeau, C. & Carlier, M.-F., (1988). **Probing the mechanism of ATP hydrolysis on F-actin using vanadate and the structural analogs of phosphate BeF-3 and AlF-4.** *Journal of Biological Chemistry*, 263(33), pp.17429–36.
- Cooper, J.A., Hart, M.C., Karpova, T.S. & Schafer, D.A., (1999). **Capping Protein.** *Oxford University Press*, pp.62–64.
- Cramer, L.P., Siebert, M. & Mitchison, T.J., (1997). **Identification of novel graded polarity actin filament bundles in locomoting heart fibroblasts: Implications for the generation of motile force.** *The Journal of Cell Biology*, 136(6), pp.1287–1305.
- Czech, M.P., (2000). **PIP2 and PIP3: complex roles at the cell surface.** *Cell*, 100(6), pp.603–606.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A. & Southwick, F.S., (1990). **Listeria monocytogenes moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87(16), pp.6068–6072.
- David, V., Gouin, E., Van Troys, M., Grogan, A., Segal, A.W., Ampe, C. & Cossart, P., (1998). **Identification of cofilin, coronin, Rac and capZ in actin tails using a Listeria affinity approach.** *Journal of Cell Science*, 111, pp.2877–84.
- Dayel, M.J., Akin, O., Landeryou, M., Risca, V., Mogilner, A. & Mullins, R.D., (2009). **In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility.** *PLoS Biology*, 7(9), p.e1000201.
- de Hostos, E.L., Bradtke, B., Lottspeich, F., Guggenheim, R. & Gerisch, G., (1991). **Coronin, an actin binding protein of Dictyostelium discoideum localized to cell surface projections, has sequence similarities to G protein beta subunits.** *The EMBO Journal*, 10(13), pp.4097–4104.
- De La Cruz, E.M., (2005). **Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: Isoform-dependent cooperative interactions.** *Journal of Molecular Biology*, 346(2), pp.557–564.
- De La Cruz, E.M., (2009). **How cofilin severs an actin filament.** *Biophysical Reviews*, 1(2), pp.51–59.
- De La Cruz, E.M. & Sept, D., (2010). **The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament.** *Biophysical Journal*, 98(9), pp.1893–1901.
- Delatour, V., Helfer, E., Didry, D., Lê, K.H.D., Gaucher, J.-F., Carlier, M.-F. & Romet-Lemonne, G., (2008). **Arp2/3 controls the motile behavior of N-WASP-functionalized GUVs and modulates N-WASP surface distribution by mediating transient links with actin filaments.** *Biophysical Journal*, 94(12), pp.4890–4905.
- Deshpande, S. & Pfohl, T., (2015). **Real-time dynamics of emerging actin networks in cell-mimicking compartments.** *PLoS ONE*, 10(3), p.e0116521.
- Dominguez, R. & Holmes, K.C., (2011). **Actin structure and function.** *Annual Review of Biophysics*, 40(1), pp.169–86.
- Edwards, M., Zwolak, A., Schafer, D.A., Sept, D., Dominguez, R. & Cooper, J.A., (2014). **Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(September), pp.677–689.
- Elam, W.A., Kang, H. & De La Cruz, E.M., (2013). **Competitive displacement of cofilin can promote actin filament severing.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(4), pp.728–31.

- Ennomani, H., Letort, G., Guérin, C., Martiel, J.-L., Cao, W., Nédélec, F., De La Cruz, E.M., Théry, M. & Blanchoin, L., (2016). **Architecture and connectivity govern actin network contractility.** *Current Biology*, 26(5), pp.616–626.
- Faivre-Moskalenko, C. & Dogterom, M., (2002). **Dynamics of microtubule asters in microfabricated chambers: the role of catastrophes.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(26), pp.16788–16793.
- Faix, J. & Rottner, K., (2006). **The making of filopodia.** *Current Opinion in Cell Biology*, 18(1), pp.18–25.
- Faix, J., Breitsprecher, D., Stradal, T.E.B. & Rottner, K., (2009). **Filopodia: Complex models for simple rods.** *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41(8–9), pp.1656–1664.
- Fan, J., Saunders, M.G., Haddadian, E.J., Freed, K.F., De La Cruz, E.M. & Voth, G.A., (2013). **Molecular origins of cofilin-linked changes in actin filament mechanics.** *Journal of Molecular Biology*, 425(7), pp.1225–1240.
- Fedor-Chaiken, M., Deschenes, R.J. & Broach, J.R., (1990). **SRV2, a gene required for RAS activation of adenylate cyclase in yeast.** *Cell*, 61(2), pp.329–340.
- Fedorov, A.A., Lappalainen, P., Fedorov, E. V, Drubin, D.G. & Almo, S.C., (1997). **Structure determination of yeast cofilin.** *Nature Structural Biology*, 4(5), pp.366–369.
- Fletcher, D.A. & Mullins, R.D., (2010). **Cell mechanics and the cytoskeleton.** *Nature*, 463(7280), pp.485–492.
- Funatsu, T., Harada, Y., Tokunaga, M., Saito, K. & Yanagida, T., (1995). **Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution.** *Nature*, 374(6522), pp.555–559.
- Gaillard, J., Ramabhadran, V., Neumann, E., Gurel, P., Blanchoin, L., Vantard, M. & Higgs, H.N., (2011). **Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules.** *Molecular Biology of the Cell*, 22(23), pp.4575–4587.
- Galkin, V.E., Orlova, A., VanLoock, M.S., Shvetsov, A., Reisler, E. & Egelman, E.H., (2003). **ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments.** *The Journal of Cell Biology*, 163(5), pp.1057–1066.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Kudryashov, D.S., Solodukhin, A., Reisler, E., Schröder, G.F. & Egelman, E.H., (2011). **Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 108(51), pp.20568–20572.
- Gandhi, M. & Goode, B.L., (2008). **Coronin: the double-edged sword of actin dynamics.** *Sub-Cellular Biochemistry*, 48, pp.72–87.
- Gandhi, M., Achard, V., Blanchoin, L. & Goode, B.L., (2009). **Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin.** *Molecular Cell*, 34(3), pp.364–74.
- Gandhi, M., Smith, B.A., Bovellan, M., Paavilainen, V., Daugherty-Clarke, K., Gelles, J., Lappalainen, P. & Goode, B.L., (2010). **GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation.** *Current Biology*, 20(9), pp.861–867.
- Gao, L. & Bretscher, A., (2008). **Analysis of unregulated formin activity reveals how yeast can balance F-actin assembly between different microfilament-based organizations.** *Molecular Biology of the Cell*, 19(4), pp.1474–1484.
- Gardel, M.L., Schneider, I.C., Aratyn-Schaus, Y. & Waterman, C.M., (2010). **Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 26, pp.315–333.
- Giardini, P.A., Fletcher, D.A. & Theriot, J.A., (2003). **Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 136(11), pp.1165–1168.

REFERENCES

- Goldberg, M.B. & Theriot, J.A., (1995). **Shigella flexneri surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92(14), pp.6572–6576.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., Furman, M.I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V.T. & Pollard, T.D., (1992). **The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells.** *Molecular Biology of the Cell*, 3(9), pp.1015–1024.
- Goley, E.D. & Welch, M.D., (2006). **The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(10), pp.713–726.
- Good, M.C., Vahey, M.D., Skandarajah, A., Fletcher, D.A. & Heald, R., (2013). **Cytoplasmic volume modulates spindle size during embryogenesis.** *Science*, 342(6160), pp.856–860.
- Goode, B.L., Rodal, A.A., Barnes, G. & Drubin, D.G., (2001). **Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p.** *The Journal of Cell Biology*, 153(3), pp.627–634.
- Goode, B.L., Eskin, J.A. & Wendland, B., (2015). **Actin and endocytosis in budding yeast.** *Genetics*, 199(2), pp.315–58.
- Goyal, P., Pandey, D., Brünnert, D., Hammer, E., Zygmunt, M. & Siess, W., (2013). **Cofilin oligomer formation occurs in vivo and is regulated by cofilin phosphorylation.** *PLoS ONE*, 8(8), p.e71769.
- Gressin, L., Guillotin, A., Guérin, C., Blanchoin, L. & Michelot, A., (2015). **Architecture dependence of actin filament network disassembly.** *Current Biology*, 25(11), pp.1437–1447.
- Griffiths, A.D. & Tawfik, D.S., (2006). **Miniaturising the laboratory in emulsion droplets.** *Trends in Biotechnology*, 24(9), pp.395–402.
- Grintsevich, E.E., Yesilyurt, H.G., Rich, S.K., Hung, R.-J., Terman, J.R. & Reisler, E., (2016). **F-actin dismantling through a redox-driven synergy between Mical and cofilin.** *Nature Cell Biology*, 18(8), pp.876–885.
- Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D. & Robinson, R.C., (2015). **The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments.** *Journal of Cell Science*, 128(11), pp.2009–2019.
- Hartwig, J.H., (1992). **Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation.** *The Journal of Cell Biology*, 118(6), pp.1421–1442.
- Hawkins, M., Pope, B., Maciver, S.K. & Weeds, A.G., (1993). **Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments.** *Biochemistry*, 32(38), pp.9985–9993.
- Hayakawa, K., Sakakibara, S., Sokabe, M. & Tatsumi, H., (2014). **Single-molecule imaging and kinetic analysis of cooperative cofilin-actin filament interactions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(27), pp.9810–5.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. & Karsenti, E., (1996). **Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts.** *Nature*, 382(6590), pp.420–5.
- Helfer, E., Nevalainen, E.M., Naumanen, P., Romero, S., Didry, D., Pantaloni, D., Lappalainen, P. & Carlier, M.-F., (2006). **Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility.** *The EMBO Journal*, 25(6), pp.1184–95.
- Herrmann, H., (1986). **Asymmetry and symmetry in cellular organization.** *Computers & Mathematics with Applications*, 12B(1/2), pp.155–167.
- Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. & Aebi, U., (2007). **Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics.** *Molecular Cell Biology*, 8(7), pp.562–73.
- Higgs, H.N. & Pollard, T.D., (1999). **Regulation of Actin Complex and WASp/Scar Proteins.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), pp.32531–32534.

- Hirokawa, N., (1998). **Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport.** *Science*, 279(5350), pp.519–526.
- Holy, T.E., Dogterom, M., Yurke, B. & Leibler, S., (1997). **Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(12), pp.6228–6231.
- Honda, K., Yamada, T., Endo, R., Ino, Y., Gotoh, M., Tsuda, H., Yamada, Y., Chiba, H. & Hirohashi, S., (1998). **Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell Motility and cancer invasion.** *The Journal of Cell Biology*, 140(6), pp.1383–1393.
- Hotulainen, P. & Lappalainen, P., (2006). **Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells.** *The Journal of Cell Biology*, 173(3), pp.383–94.
- Huang, S., Robinson, R.C., Gao, L.Y., Matsumoto, T., Brunet, A., Blanchoin, L. & Staiger, C.J., (2005). **Arabidopsis VILLIN1 generates actin filament cables that are resistant to depolymerization.** *The Plant Cell*, 17(2), pp.486–501.
- Humphries, C.L., Balcer, H.I., D’Agostino, J.L., Winsor, B., Drubin, D.G., Barnes, G., Andrews, B.J. & Goode, B.L., (2002). **Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin.** *The Journal of Cell Biology*, 159(6), pp.993–1004.
- Iida, K. & Yahara, I., (1999). **Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in Saccharomyces cerevisiae.** *Genes to Cells*, 4(1), pp.21–32.
- Isenberg, G., Aebi, U. & Pollard, T.D., (1980). **An actin-binding protein from Acanthamoeba regulates actin filament polymerization and interactions.** *Nature*, 288(5790), pp.455–459.
- Ishikawa-Ankerhold, H.C., Gerisch, G. & Muller-Taubenberger, A., (2010). **Genetic evidence for concerted control of actin dynamics in cytokinesis, endocytic traffic, and cell motility by coronin and Aip1.** *Cytoskeleton*, 67(7), pp.442–455.
- Israelachvili, J.N., (1997). **The different faces of poly(ethylene glycol).** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(16), pp.8378–8379.
- Iwasa, J.H. & Mullins, R.D., (2007). **Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly.** *Current Biology*, 17(5), pp.395–406.
- Jain, A., Liu, R., Xiang, Y.K. & Ha, T., (2012). **Single-molecule pull-down for studying protein interactions.** *Nature Protocols*, 7(3), pp.445–52.
- Jansen, S., Collins, A., Chin, S.M., Ydenberg, C.A., Gelles, J. & Goode, B.L., (2015). **Single-molecule imaging of a three-component ordered actin disassembly mechanism.** *Nature Communications*, 6(May), p.7202.
- Jégou, A., Niedermayer, T., Orbán, J., Didry, D., Lipowsky, R., Carlier, M.-F. & Romet-Lemonne, G., (2011). **Individual actin filaments in a microfluidic flow reveal the mechanism of ATP hydrolysis and give insight into the properties of profilin.** *PLoS Biology*, 9(9), p.e1001161.
- Jimenez, A.M., Roché, M., Pinot, M., Panizza, P., Courbin, L. & Gueroui, Z., (2011). **Towards high throughput production of artificial egg oocytes using microfluidics.** *Lab on a Chip*, 11(3), pp.429–434.
- Jodoin, J.N., Coravos, J.S., Chanet, S., Vasquez, C.G., Tworoger, M., Kingston, E.R., Perkins, L.A., Perrimon, N. & Martin, A.C., (2015). **Stable force balance between epithelial cells arises from F-actin turnover.** *Developmental Cell*, 35(6), pp.685–697.
- Johnston, A.B., Collins, A. & Goode, B.L., (2015). **High-speed depolymerization at actin filament ends jointly catalysed by Twinfilin and Srv2/CAP.** *Nature Cell Biology*, 17(11), pp.1504–1511.
- Jordan, M.A. & Wilson, L., (2004). **Microtubules as a target for anticancer drugs.** *Nature Reviews Cancer*, 4(4), pp.253–265.

- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. & Mabuchi, I., (2005). **Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle.** *Nature Cell Biology*, 7(9), pp.916–917.
- Kamasaki, T., Osumi, M. & Mabuchi, I., (2007). **Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast.** *The Journal of Cell Biology*, 178(5), pp.765–71.
- Kanellos, G., Zhou, J., Patel, H., Ridgway, R.A., Huels, D., Gurniak, C.B., Sandilands, E., Carragher, N.O., Sansom, O.J., Witke, W., et al., (2015). **ADF and Cofilin1 control actin stress fibers, nuclear integrity, and cell survival.** *Cell Reports*, 13(9), pp.1949–1964.
- Kang, F., Purich, D.L. & Southwick, F.S., (1999). **Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), pp.36963–36972.
- Kang, H., Bradley, M.J., McCullough, B.R., Pierre, A., Grintsevich, E.E., Reisler, E. & De La Cruz, E.M., (2012). **Identification of cation-binding sites on actin that drive polymerization and modulate bending stiffness.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(42), pp.16923–7.
- Kang, H., Bradley, M.J., Elam, W.A. & De La Cruz, E.M., (2013). **Regulation of actin by ion-linked equilibria.** *Biophysical Journal*, 105(12), pp.2621–2628.
- Kang, H., Bradley, M.J., Cao, W., Zhou, K., Grintsevich, E.E., Michelot, A., Sindelar, C. V., Hochstrasser, M. & De la Cruz, E.M., (2014). **Site-specific cation release drives actin filament severing by vertebrate cofilin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 111(50), pp.1–6.
- Kardos, R., Pozsonyi, K., Nevalainen, E., Lappalainen, P., Nyitrai, M. & Hild, G., (2009). **The effects of ADF/cofilin and profilin on the conformation of the ATP-binding cleft of monomeric actin.** *Biophysical Journal*, 96(6), pp.2335–2343.
- Kelling, J., Sullivan, K., Wilson, L. & Jordan, M.A., (2003). **Suppression of centromere dynamics by Taxol in living osteosarcoma cells.** *Cancer Research*, 63(11), pp.2794–2801.
- Kim, J.I., Kwon, J., Baek, I., Park, H.S. & Na, S., (2015). **Cofilin reduces the mechanical properties of actin filaments: approach with coarse-grained methods.** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 17(12), pp.8148–8158.
- Kim, T., Cooper, J.A. & Sept, D., (2010). **The interaction of capping protein with the barbed end of the actin filament.** *Journal of Molecular Biology*, 404(5), pp.794–802.
- Kinoshita, K., Arnal, I., Desai, A., Drechsel, D.N. & Hyman, A.A., (2001). **Reconstitution of physiological microtubule dynamics using purified components.** *Science*, 294(5545), pp.1340–1343.
- Kirschner, M.W. & Mitchison, T., (1986). **Microtubule dynamics.** *Nature*, 324(6098), p.621.
- Klyachko, N.L. & Levashov, A. V., (2003). **Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems.** *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(2), pp.179–186.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P., (1992). **L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein.** *Cell*, 68(3), pp.521–531.
- Köster, S., Steinhauser, D. & Pfohl, T., (2005). **Brownian motion of actin filaments in confining microchannels.** *Journal of Physics: Condensed Matter*, 17(49), pp.S4091–S4104.
- Kovar, D.R. & Pollard, T.D., (2004). **Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(41), pp.14725–30.
- Kreplak, L., Bär, H., Leterrier, J.F., Herrmann, H. & Aebi, U., (2005). **Exploring the mechanical behavior of single intermediate filaments.** *Journal of Molecular Biology*, 354(3), pp.569–577.

- Kueh, H.Y., Charras, G.T., Mitchison, T.J. & Briehner, W.M., (2008). **Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers.** *The Journal of Cell Biology*, 182(2), pp.341–53.
- Kuhn, T.B. & Bamberg, J.R., (2008). **Tropomyosin and ADF/cofilin as collaborators and competitors.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 644, pp.232–249.
- Kuhns, D.B., Fink, D.L., Choi, U., Sweeney, C., Lau, K., Long Priel, D., Riva, D., Mendez, L., Uzel, G., Freeman, A.F., et al., (2016). **Cytoskeletal abnormalities and neutrophil dysfunction in WDR1 deficiency.** *Blood*, prepublsh.
- Kumar, A., Paeger, L., Kosmas, K., Kloppenburg, P., Noegel, A.A. & Peche, V.S., (2016). **Neuronal actin dynamics, spine density and neuronal dendritic complexity are regulated by CAP2.** *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, p.180.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., Dunn, G.A., Small, J.V. & Rottner, K., (2008). **Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia.** *The EMBO Journal*, 27(7), pp.982–92.
- Lambrechts, A., Gevaert, K., Cossart, P., Vandekerckhove, J. & Van Troys, M., (2008). **Listeria comet tails: the actin-based motility machinery at work.** *Trends in Cell Biology*, 18(5), pp.220–227.
- Laporte, D., Ojkic, N., Vavylonis, D. & Wu, J.-Q., (2012). **α -Actinin and fimbrin cooperate with myosin II to organize actomyosin bundles during contractile-ring assembly.** *Molecular Biology of the Cell*, 23(16), pp.3094–110.
- Lappalainen, P., Fedorov, E. V, Fedorov, A.A., Almo, S.C. & Drubin, D.G., (1997). **Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis.** *The EMBO Journal*, 16(18), pp.5520–5530.
- Lappalainen, P. & Drubin, D.G., (1997). **Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo.** *Nature*, 388(6637), pp.78–82.
- Le Clainche, C., Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., (2003). **ATP hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100(11), pp.6337–6342.
- Lecuit, T., Lenne, P.-F. & Munro, E., (2011). **Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, pp.157–184.
- Letort, G., Ennomani, H., Gressin, L., Théry, M. & Blanchoin, L., (2015). **Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton [version 1; referees: 2 approved].** *F1000Research*, 4(940).
- Letort, G., Nedelec, F., Blanchoin, L. & Théry, M., (2016). **Centrosome centering and decentering by microtubule network rearrangement.** *Molecular Biology of the Cell*, 27(18), pp.2833–2843.
- Lin, M.-C., Galletta, B.J., Sept, D. & Cooper, J.A., (2010). **Overlapping and distinct functions for cofilin, coronin and Aip1 in actin dynamics in vivo.** *Journal of Cell Science*, 123(8), pp.1329–42.
- Liu, H. & Bretscher, A., (1989). **Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton.** *Cell*, 57(2), pp.233–242.
- Loiseau, E., Schneider, J.A.M., Keber, F.C., Pelzl, C., Massiera, G., Salbreux, G. & Bausch, A.R., (2016). **Shape remodeling and blebbing of active cytoskeletal vesicles.** *Science Advances*, 2(4), p.e1500465.
- Loisel, T.P., Boujemaa-Paterski, R., Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., (1999). **Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins.** *Nature*, 401(6753), pp.613–6.
- Luna, A., Matas, O.B., Martinez-Menarguez, J.A., Mato, E., Duran, J.M., Ballesta, J., Way, M. & Egea, G., (2002). **Regulation of protein transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum by CDC42 and N-WASP.** *Molecular Biology of the Cell*, 13(3), pp.866–879.

- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J. & Pollard, T.D., (1994). **Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose.** *The Journal of Cell Biology*, 127(1), pp.107–115.
- Maciver, S.K., Zot, H.G. & Pollard, T.D., (1991). **Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*.** *The Journal of Cell Biology*, 115(6), pp.1611–1620.
- Maciver, S.K., Pope, B.J., Whytock, S. & Weeds, A.G., (1998). **The effect of two actin depolymerizing factors (ADF/cofilins) on actin filament turnover: pH sensitivity of F-actin binding by human ADF, but not of *Acanthamoeba* actophorin.** *European Journal of Biochemistry*, 256(2), pp.388–397.
- Maekawa, S., Nishida, E., Ohta, Y. & Sakai, H., (1984). **Isolation of low molecular weight actin-binding proteins from oricine brain.** *Journal of Biochemistry*, 95(2), pp.377–385.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.-F. & Sykes, C., (2004). **Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101(16), pp.5992–7.
- Martin, A.C., Welch, M.D. & Drubin, D.G., (2006). **Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation.** *Nature Cell Biology*, 8(8), pp.826–833.
- Maruyama, K. & Obinata, T., (1965). **Presence of beta-actinin in the soluble fraction of the muscle cells of the chick embryo.** *Journal of Biochemistry*, 57(4), pp.575–577.
- Mattila, P.K., Quintero-Monzon, O., Kugler, J., Moseley, J.B., Almo, S.C., Lappalainen, P. & Goode, B.L., (2004). **A high-affinity interaction with ADP-actin monomers underlies the mechanism and in vivo function of Srv2/cyclase-associated protein.** *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), pp.5158–5171.
- McCullough, B.R., Blanchoin, L., Martiel, J.-L. & De la Cruz, E.M., (2008). **Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics.** *Journal of Molecular Biology*, 381(3), pp.550–8.
- McCullough, B.R., Grintsevich, E.E., Chen, C.K., Kang, H., Hutchison, A.L., Henn, A., Cao, W., Suarez, C., Martiel, J.-L., Blanchoin, L., et al., (2011). **Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing.** *Biophysical Journal*, 101(1), pp.151–9.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W. & Weeds, A., (1997). **Cofilin changes the twist of F-actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function.** *The Journal of Cell Biology*, 138(4), pp.771–781.
- McGrath, J.L., Tardy, Y., Dewey, C.F., Meister, J.J. & Hartwig, J.H., (1998). **Simultaneous measurements of actin filament turnover, filament fraction, and monomer diffusion in endothelial cells.** *Biophysical Journal*, 75(4), pp.2070–8.
- Mendes Pinto, I., Rubinstein, B., Kucharavy, A., Unruh, J.R. & Li, R., (2012). **Actin depolymerization drives actomyosin ring contraction during budding yeast cytokinesis.** *Developmental Cell*, 22(6), pp.1247–60.
- Michelot, A., Berro, J., Guérin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L. & Blanchoin, L., (2007). **Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/Cofilin.** *Current Biology*, 17(10), pp.825–833.
- Michelot, A., Costanzo, M., Sarkeshik, A., Boone, C., Yates, J.R. & Drubin, D.G., (2010). **Reconstitution and protein composition analysis of endocytic actin patches.** *Current Biology*, 20(21), pp.1890–9.
- Michelot, A., Grassart, A., Okreglak, V., Costanzo, M., Boone, C. & Drubin, D.G., (2013). **Actin filament elongation in Arp2/3-derived networks is controlled by three distinct mechanisms.** *Developmental Cell*, 24(2), pp.182–195.
- Mishra, M., Kashiwazaki, J., Takagi, T., Srinivasan, R., Huang, Y., Balasubramanian, M.K. & Mabuchi, I., (2013). **In vitro contraction of cytokinetic ring depends on myosin II but not on actin dynamics.** *Nature Cell Biology*, 15(7), pp.853–9.

- Mogilner, A. & Oster, G., (1996). **Cell motility driven by actin polymerization.** *Biophysical Journal*, 71(6), pp.3030–45.
- Moon, A.L., Janmey, P.A., Louie, K.A. & Drubin, D.G., (1993). **Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton.** *The Journal of Cell Biology*, 120(2), pp.421–435.
- Morgan, T.E., Lockerbie, R.O., Minamide, L.S., Browning, M.D. & Bamburg, J.R., (1993). **Isolation and characterization of a regulated form of actin depolymerizing factor.** *The Journal of Cell Biology*, 122(3), pp.623–633.
- Moseley, J.B. & Goode, B.L., (2006). **The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(3), pp.605–645.
- Moseley, J.B., Okada, K., Balcer, H.I., Kovar, D.R., Pollard, T.D. & Goode, B.L., (2006). **Twinfilin is an actin-filament-severing protein and promotes rapid turnover of actin structures in vivo.** *Journal of Cell Science*, 119, pp.1547–1557.
- Mücke, N., Kreplak, L., Kirmse, R., Wedig, T., Herrmann, H., Aebi, U. & Langowski, J., (2004). **Assessing the flexibility of intermediate filaments by atomic force microscopy.** *Journal of Molecular Biology*, 335(5), pp.1241–1250.
- Mücke, N., Kirmse, R., Wedig, T., Leterrier, J.F. & Kreplak, L., (2005). **Investigation of the morphology of intermediate filaments adsorbed to different solid supports.** *Journal of Structural Biology*, 150(3), pp.268–276.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A. & Pollard, T.D., (1998). **The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95(11), pp.6181–6186.
- Nadkarni, A. V & Briehner, W.M., (2014). **Aip1 destabilizes cofilin-saturated actin filaments by severing and accelerating monomer dissociation from ends.** *Current Biology*, 24(23), pp.2749–57.
- Nawaz, S., Sánchez, P., Schmitt, S., Snaidero, N., Mitkovski, M., Velte, C., Brückner, B.R., Alexopoulos, I., Czopka, T., Jung, S.Y., et al., (2015). **Actin filament turnover drives leading edge growth during myelin sheath formation in the central nervous system.** *Developmental Cell*, 34(2), pp.1–13.
- Nedelec, F. & Foethke, D., (2007). **Collective Langevin dynamics of flexible cytoskeletal fibers.** *New Journal of Physics*, 9(11), p.427.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. & Smith, T.F., (1994). **The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins.** *Nature*, 371(6495), pp.297–300.
- Nejedla, M., Sadi, S., Sulimenko, V., Nunes De Almeida, F., Blom, H., Draber, P., Aspenström, P. & Karlsson, R., (2016). **Profilin connects actin assembly with microtubule dynamics.** *Molecular Biology of the Cell*, 27(15), pp.2381–93.
- Ngo, K.X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T. & Uyeda, T.Q., (2015). **Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy.** *eLife*, 4, p.e04806.
- Niedermayer, T., Jégou, A., Chièze, L., Guichard, B., Helfer, E., Romet-Lemonne, G., Carlier, M.-F. & Lipowsky, R., (2012). **Intermittent depolymerization of actin filaments is caused by photo-induced dimerization of actin protomers.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(27), pp.10769–74.
- Nishida, E., Maekawa, S. & Sakai, H., (1984). **Cofilin, a protein in porcine brain that binds to actin filaments and inhibits their interactions with myosin and tropomyosin.** *Biochemistry*, 23(22), pp.5307–5313.
- Nishida, E., (1985). **Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate.** *Biochemistry*, 24(5), pp.1160–1164.

REFERENCES

- Nogales, E., Wolf, S.G. & Downing, K.H., (1998). **Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography.** *Nature*, 391(6663), pp.199–203.
- Ochsner, M., Dusseiller, M.R., Grandin, H.M., Luna-Morris, S., Textor, M., Vogel, V. & Smith, M.L., (2007). **Micro-well arrays for 3D shape control and high resolution analysis of single cells.** *Lab on a Chip*, 7(8), pp.1074–1077.
- Okada, K., Obinata, T. & Abe, H., (1999). **XAIP1: a Xenopus homologue of yeast actin interacting protein 1 (AIP1), which induces disassembly of actin filaments cooperatively with ADF/cofilin family proteins.** *Journal of Cell Science*, 112(10), pp.1553–1565.
- Okada, K., Blanchoin, L., Abe, H., Chen, H., Pollard, T.D. & Bamburg, J.R., (2002). **Xenopus actin-interacting protein 1 (XAip1) enhances cofilin fragmentation of filaments by capping filament ends.** *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp.43011–43016.
- Okada, K., Ravi, H., Smith, E.M. & Goode, B.L., (2006). **Aip1 and Cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments.** *Molecular Biology of the Cell*, 17(7), pp.2855–2868.
- Okreglak, V. & Drubin, D.G., (2010). **Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway.** *The Journal of Cell Biology*, 188(6), pp.769–77.
- Ono, S. & Ono, K., (2002). **Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics.** *The Journal of Cell Biology*, 156(6), pp.1065–1076.
- Ono, S., (2003). **Regulation of actin filament dynamics by actin depolymerizing factor/cofilin and actin-interacting protein 1: new blades for twisted filaments.** *Biochemistry*, 42(46), pp.13363–13370.
- Ono, S., Mohri, K. & Ono, K., (2004). **Microscopic evidence that actin-interacting protein 1 actively disassembles actin-depolymerizing factor/Cofilin-bound actin filaments.** *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), pp.14207–12.
- Ono, S., (2007). **Mechanism of depolymerization and severing of actin filaments and its significance in cytoskeletal dynamics.** *International Review of Cytology*, 258, pp.1–82.
- Otterbein, L.R., Graceffa, P. & Dominguez, R., (2001). **The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state.** *Science*, 293(5530), pp.708–11.
- Paavilainen, V.O., Merckel, M.C., Falck, S., Ojala, P.J., Pohl, E., Wilmanns, M. & Lappalainen, P., (2002). **Structural conservation between the actin monomer-binding sites of twinfilin and actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin.** *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), pp.43089–43095.
- Paavilainen, V.O., Oksanen, E., Goldman, A. & Lappalainen, P., (2008). **Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin.** *The Journal of Cell Biology*, 182(1), pp.51–59.
- Palmgren, S., Ojala, P.J., Wear, M.A., Cooper, J.A. & Lappalainen, P., (2001). **Interactions with PIP2, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin.** *The Journal of Cell Biology*, 155(2), pp.251–260.
- Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., (1993). **How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin β 4.** *Cell*, 75(5), pp.1007–1014.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. & Carlier, M.-F., (2001). **Mechanism of actin-based motility.** *Science*, 292(5521), pp.1502–1506.
- Pavlov, D., Muhrad, A., Cooper, J., Wear, M. & Reisler, E., (2006). **Severing of F-actin by yeast cofilin is pH-independent.** *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(9), pp.533–542.
- Pelham, R.J. & Chang, F., (2002). **Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast.** *Nature*, 419(6902), pp.82–86.

- Pellegrin, S. & Mellor, H., (2007). **Actin stress fibres**. *Journal of Cell Science*, 120(20), pp.3491–3499.
- Peskin, C.S., Odell, G.M. & Oster, G.F., (1993). **Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet**. *Biophysical Journal*, 65(1), pp.316–24.
- Pinot, M., Chesnel, F., Kubiak, J.Z., Arnal, I., Nedelec, F.J. & Gueroui, Z., (2009). **Effects of confinement on the self-organization of microtubules and motors**. *Current Biology*, 19(11), pp.954–960.
- Pinot, M., Steiner, V., Dehapiot, B., Yoo, B.-K., Chesnel, F., Blanchoin, L., Kervrann, C. & Gueroui, Z., (2012). **Confinement induces actin flow in a meiotic cytoplasm**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109(29), pp.11705–11710.
- Pollard, T.D. & Cooper, J.A., (1986). **Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions**. *Annual Review of Biochemistry*, 55(1), pp.987–1035.
- Pollard, T.D., (1986). **Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments**. *The Journal of Cell Biology*, 103(6), pp.2747–54.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L. & Mullins, R.D., (2000). **Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells**. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 29(1), pp.545–76.
- Pollard, T.D. & Earnshaw, W.C., (2002). *Cell Biology* New York: W.B. Saunders, ed.
- Pollard, T.D. & Borisy, G.G., (2003). **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments**. *Cell*, 112(4), pp.453–65.
- Pontani, L.-L., Van Der Gucht, J., Salbreux, G., Heuvingsh, J., Joanny, J.-F. & Sykes, C., (2009). **Reconstitution of an actin cortex inside a liposome**. *Biophysical Journal*, 96(1), pp.192–198.
- Poukkula, M., Kremneva, E., Serlachius, M. & Lappalainen, P., (2011). **Actin-depolymerizing factor homology domain: A conserved fold performing diverse roles in cytoskeletal dynamics**. *Cytoskeleton*, 68(9), pp.471–490.
- Prochniewicz, E., Janson, N., Thomas, D.D. & De la Cruz, E.M., (2005). **Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments**. *Journal of Molecular Biology*, 353(5), pp.990–1000.
- Ressad, F., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., (1998). **Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins**. *Journal of Biological Chemistry*, 273(33), pp.20894–20902.
- Ressad, F., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., (1999). **Control of actin filament length and turnover by actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) in the presence of capping proteins and ARP2/3 complex**. *Journal of Biological Chemistry*, 274(30), pp.20970–20976.
- Reymann, A.-C., Martiel, J.-L., Cambier, T., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R. & Théry, M., (2010). **Nucleation geometry governs ordered actin networks structures**. *Nature Materials*, 9(10), pp.827–32.
- Reymann, A.-C., Suarez, C., Guérin, C., Martiel, J.-L., Staiger, C.J., Blanchoin, L. & Boujemaa-Paterski, R., (2011). **Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin**. *Molecular Biology of the Cell*, 22(14), pp.2541–2550.
- Reymann, A.-C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.-L., Guérin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Théry, M. & Blanchoin, L., (2012). **Actin network architecture can determine myosin motor activity**. *Science*, 336(6086), pp.1310–4.
- Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J., Higgs, H.N., Choe, S. & Pollard, T.D., (2001). **Crystal structure of Arp2/3 complex**. *Science*, 294(5547), pp.1679–1685.
- Rodal, A.A., Manning, A.L., Goode, B.L. & Drubin, D.G., (2003). **Negative regulation of yeast WASp by two SH3 domain-containing proteins**. *Current Biology*, 13(12), pp.1000–1008.

REFERENCES

- Rodal, A.A., Sokolova, O., Robins, D.B., Daugherty, K.M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N. & Goode, B.L., (2005). **Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation.** *Nature Structural & Molecular Biology*, 12(1), pp.26–31.
- Rodal, A. a., Tetreault, J.W., Lappalainen, P., Drubin, D.G. & Amberg, D.C., (1999). **Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments.** *The Journal of Cell Biology*, 145(6), pp.1251–1264.
- Roland, J., Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L. & Martiel, J.-L., (2008). **Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime.** *Biophysical Journal*, 94(6), pp.2082–2094.
- Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., (2004). **Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis.** *Cell*, 119(3), pp.419–429.
- Rondelez, Y., Tresset, G., Tabata, K. V, Arata, H., Fujita, H., Takeuchi, S. & Noji, H., (2005). **Microfabricated arrays of femtoliter chambers allow single molecule enzymology.** *Nature Biotechnology*, 23(3), pp.361–5.
- Rosenblatt, J., Agnew, B.J., Abe, H., Bamburg, J.R. & Mitchison, T.J., (1997). **Xenopus actin depolymerizing factor/cofilin (XAC) Is responsible for the turnover of actin filaments in *Listeria monocytogenes* tails.** *The Journal of Cell Biology*, 136(6), pp.1323–1332.
- Rotty, J.D., Wu, C., Haynes, E.M., Suarez, C., Winkelman, J.D., Johnson, H.E., Haugh, J.M., Kovar, D.R. & Bear, J.E., (2015). **Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and -independent pathways.** *Developmental Cell*, 32(1), pp.54–67.
- Safer, D. & Nachmias, V.T., (1994). **Beta thymosins as actin binding peptides.** *BioEssays*, 16(7), pp.473–479.
- Saha, A., Mondal, G., Biswas, A., Chakraborty, I., Jana, B. & Ghosh, S., (2013). **In vitro reconstitution of a cell-like environment using liposomes for amyloid beta peptide aggregation and its propagation.** *Chemical Communications*, 49(55), pp.6119–21.
- Schafer, D.A. & Cooper, J.A., (1995). **Control of actin assembly at filament ends.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 11(1), pp.497–518.
- Schmidt, T., Schütz, G.J., Baumgartner, W., Gruber, H.J. & Schindler, H., (1996). **Imaging of single molecule diffusion.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93(7), pp.2926–9.
- Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C.W. & Lindberg, U., (1993). **The structure of crystalline profilin- β -actin.** *Nature Letters*, 365, pp.810–816.
- Sens, P. & Plastino, J., (2015). **Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility.** *Journal of Physics: Condensed Matter*, 27(27), p.273103.
- Sept, D., Elcock, A.H. & McCammon, J.A., (1999). **Computer simulations of actin polymerization can explain the barbed-pointed end asymmetry.** *Journal of Molecular Biology*, 294(5), pp.1181–1189.
- Shekhar, S., Pernier, J. & Carlier, M.-F., (2016). **Regulators of actin filament barbed ends at a glance.** *Journal of Cell Science*, 129(6), pp.1085–1091.
- Sidani, M., Wessels, D., Mouneimne, G., Ghosh, M., Goswami, S., Sarmiento, C., Wang, W., Kuhl, S., El-Sibai, M., Backer, J.M., et al., (2007). **Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells.** *The Journal of Cell Biology*, 179(4), pp.777–791.
- Skau, C.T., Plotnikov, S. V., Doyle, A.D. & Waterman, C.M., (2015). **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*, 112(19), pp.E2447–E2456.

- Smith, B.A., Padrick, S.B., Doolittle, L.K., Daugherty-Clarke, K., Corrêa, I.R., Xu, M.Q., Goode, B.L., Rosen, M.K. & Gelles, J., (2013a). **Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation.** *eLife*, 2, p.e01008.
- Smith, G.A. & Portnoy, D.A., (1997). **How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force.** *Trends in Microbiology*, 5(7), pp.272–276.
- Smith, M.B., Kiuchi, T., Watanabe, N. & Vavylonis, D., (2013b). **Distributed actin turnover in the lamellipodium and FRAP kinetics.** *Biophysical Journal*, 104(1), pp.247–257.
- Soares e Silva, M., Alvarado, J., Nguyen, J., Georgoulia, N., Mulder, B.M. & Koenderink, G.H., (2011). **Self-organized patterns of actin filaments in cell-sized confinement.** *Soft Matter*, 7(22), pp.10631–10641.
- Spuul, P., Chi, P.-Y., Billottet, C., Chou, C.-F. & Génot, E., (2016). **Microfluidic devices for the study of actin cytoskeleton in constricted environments: Evidence for podosome formation in endothelial cells exposed to a confined slit.** *Methods*, 94, pp.65–74.
- Staiger, C.J., Yuan, M., Valenta, R., Shaw, P.J., Warn, R.M. & Lloyd, C.W., (1994). **Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments.** *Current Biology*, 4(3), pp.215–219.
- Stewart, M.P., Helenius, J., Toyoda, Y., Ramanathan, S.P., Muller, D.J. & Hyman, A.A., (2011). **Hydrostatic pressure and the actomyosin cortex drive mitotic cell rounding.** *Nature*, 469(7329), pp.226–230.
- Straub, F.B., (1942). **Actin.** *Studies from the Institute of Medical Chemistry University Szeged*, 2, pp.1–15.
- 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. & Blanchoin, L., (2011). **Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries.** *Current Biology*, 21(10), pp.862–868.
- Suarez, C., Carroll, R.T., Burke, T.A., Christensen, J.R., Bestul, A.J., Sees, J.A., James, M.L., Sirotkin, V. & Kovar, D.R., (2015). **Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex.** *Developmental Cell*, 32(1), pp.43–53.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Takai, Y. & Nakamura, T., (1999). **Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2.** *The Journal of Cell Biology*, 147(7), pp.1519–32.
- Sutherland, J.D. & Witke, W., (1999). **Molecular genetic approaches to understanding the actin cytoskeleton.** *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1), pp.142–151.
- Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., McQuade, K.M. & Borisy, G.G., (1997). **Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: Mechanism of cell body translocation.** *The Journal of Cell Biology*, 139(2), pp.397–415.
- Svitkina, T.M. & Borisy, G.G., (1999). **Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and Treadmilling of actin Filament array in lamellipodia.** *The Journal of Cell Biology*, 145(5), pp.1009–1026.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S.I., Vasiliev, J.M. & Borisy, G.G., (2003). **Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network.** *The Journal of Cell Biology*, 160(3), pp.409–421.
- Talman, A.M., Chong, R., Chia, J., Svitkina, T. & Agaisse, H., (2014). **Actin network disassembly powers dissemination of *Listeria monocytogenes*.** *Journal of Cell Science*, 127(1), pp.240–9.
- Theriot, J.A. & Mitchison, T.J., (1991). **Actin microfilament dynamics in locomoting cells.** *Nature*, 352(6331), pp.126–131.

REFERENCES

- Theriot, J.A., Mitchison, T.J., Tilney, L.G. & Portnoy, D.A., (1992). **The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization.** *Nature*, 357(6375), pp.257–260.
- Théry, M., Pépin, A., Dressaire, E., Chen, Y. & Bornens, M., (2006). **Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment.** *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 63(6), pp.341–355.
- Théry, M., (2010). **Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions.** *Journal of Cell Science*, 123(24), pp.4201–13.
- Tilney, L.G. & Portnoy, D.A., (1989). **Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*.** *The Journal of Cell Biology*, 109(4), pp.1597–1608.
- Tilney, L.G., DeRosier, D.J., Weber, A. & Tilney, M.S., (1992). **How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement.** *The Journal of Cell Biology*, 118(1), pp.71–81.
- Toivola, D.M., Tao, G.Z., Habtezion, A., Liao, J. & Omary, M.B., (2005). **Cellular integrity plus: Organelle-related and protein-targeting functions of intermediate filaments.** *Trends in Cell Biology*, 15(11), pp.608–617.
- Tojkander, S., Gateva, G., Schevzov, G., Hotulainen, P., Naumanen, P., Martin, C., Gunning, P.W. & Lappalainen, P., (2011). **A molecular pathway for myosin II recruitment to stress fibers.** *Current Biology*, 21(7), pp.539–50.
- Tojkander, S., Gateva, G. & Lappalainen, P., (2012). **Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles.** *Journal of Cell Science*, 125, pp.1855–1864.
- Tojkander, S., Gateva, G., Husain, A., Krishnan, R. & Lappalainen, P., (2015). **Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly.** *eLife*, 4, p.e06126.
- Tsai, F.-C., Stuhrmann, B. & Koenderink, G.H., (2011). **Encapsulation of active cytoskeletal protein networks in cell-sized liposomes.** *Langmuir*, 27(16), pp.10061–10071.
- Tsai, F.-C. & Koenderink, G.H., (2015). **Shape control of lipid bilayer membranes by confined actin bundles.** *Soft Matter*, 11(45), pp.8834–8847.
- Umeki, N., Hirose, K. & Uyeda, T.Q.P., (2016). **Cofilin-induced cooperative conformational changes of actin subunits revealed using cofilin-actin fusion protein.** *Scientific Reports*, 6, p.20406.
- VanBuren, V., Cassimeris, L. & Odde, D.J., (2005). **Mechanochemical model of microtubule structure and self-assembly kinetics.** *Biophysical Journal*, 89(5), pp.2911–26.
- Van Mameren, J., Vermeulen, K.C., Gittes, F. & Schmidt, C.F., (2009). **Leveraging single protein polymers to measure flexural rigidity.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(12), pp.3837–3844.
- van Rheenen, J., Song, X., van Roosmalen, W., Cammer, M., Chen, X., DesMarais, V., Yip, S.C., Backer, J.M., Eddy, R.J. & Condeelis, J.S., (2007). **EGF-induced PIP2 hydrolysis releases and activates cofilin locally in carcinoma cells.** *The Journal of Cell Biology*, 179(6), pp.1247–1259.
- Venier, P., Maggs, A.C., Carlier, M.-F. & Pantaloni, D., (1994). **Analysis of microtubule rigidity using hydrodynamic flow and thermal fluctuations.** *Journal of Biological Chemistry*, 269(18), pp.13353–13360.
- Verkman, A.S., (2002). **Solute and macromolecule diffusion in cellular aqueous compartments.** *Trends in Biochemical Sciences*, 27(1), pp.27–33.

- Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitkina, T.M. & Borisy, G.G., (2003). **Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network.** *The Journal of Cell Biology*, 160(6), pp.951–962.
- Vinson, V.K., De La Cruz, E.M., Higgs, H.N. & Pollard, T.D., (1998). **Interactions of Acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin.** *Biochemistry*, 37(31), pp.10871–10880.
- Vitriol, E.A., McMillen, L.M., Kapustina, M., Gomez, S.M., Vavylonis, D. & Zheng, J.Q., (2015). **Two functionally distinct sources of actin monomers supply the leading edge of lamellipodia.** *Cell Reports*, 11(3), pp.433–445.
- Voegtli, W.C., Madrona, A.Y. & Wilson, D.K., (2003). **The Structure of Aip1p, a WD Repeat Protein That Regulates Cofilin-mediated Actin Depolymerization.** *Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp.34373–34379.
- Walker, R.A., Brien, O., Pryer, K., Soboeiro, M.E., Voter, W.A., Erickson, H.P. & Salmon, E.D., (1988). **Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies.** *The Journal of Cell Biology*, 107(4), pp.1437–1448.
- Wang, Y.-L., (1985). **Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling.** *The Journal of Cell Biology*, 101(2), pp.597–602.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A. & Mitchison, T.J., (1997a). **Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of Listeria monocytogenes.** *Nature*, 385(6613), pp.265–269.
- Welch, M.D., Mallavarapu, A., Rosenblatt, J. & Mitchison, T.J., (1997b). **Actin dynamics in vivo.** *Current Opinion in Cell Biology*, 9(1), pp.54–61.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A. & Mitchison, T.J., (1998). **Interaction of human Arp2/3 complex and the Listeria monocytogenes ActA protein in actin filament nucleation.** *Science*, 281(5373), pp.105–108.
- Wiggan, O., Shaw, A.E., DeLuca, J.G. & Bamburg, J.R., (2012). **ADF/cofilin regulates actomyosin assembly through competitive inhibition of myosin II binding to F-actin.** *Developmental Cell*, 22(3), pp.530–543.
- Winterhoff, M. & Faix, J., (2015). **Actin-filament disassembly : It takes two to shrink them fast.** *Current Biology*, 25(11), pp.R450–R452.
- Wood, D.K., Weingeist, D.M., Bhatia, S.N. & Engelward, B.P., (2010). **Single cell trapping and DNA damage analysis using microwell arrays.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107(22), pp.10008–10013.
- Woodrum, D.T., Rich, S.A. & Pollard, T.D., (1975). **Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method.** *The Journal of Cell Biology*, 67(1), pp.231–237.
- Wu, J., Wang, H., Guo, X. & Chen, J., (2016). **Cofilin-mediated actin dynamics promotes actin bundle formation during Drosophila bristle development.** *Molecular Biology of the Cell*, 27(16), pp.2554–2564.
- Wu, J.-Q. & Pollard, T.D., (2005). **Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast.** *Science*, 310(5746), pp.310–314.
- Wu, M., Huang, B., Graham, M., Raimondi, A., Heuser, J.E., Zhuang, X. & De Camilli, P., (2010). **Coupling between clathrin-dependent endocytic budding and F-BAR-dependent tubulation in a cell-free system.** *Nature Cell Biology*, 12(9), pp.902–908.
- Yang, C. & Svitkina, T., (2011). **Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins.** *Cell Adhesion & Migration*, 5(5), pp.402–408.

REFERENCES

- Yang, H.-C. & Pon, L.A., (2002). **Actin cable dynamics in budding yeast.** *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(2), pp.751–756.
- Ydenberg, C.A., Padrick, S.B., Sweeney, M.O., Gandhi, M., Sokolova, O. & Goode, B.L., (2013). **GMF severs actin-Arp2/3 complex branch junctions by a cofilin-like mechanism.** *Current Biology*, 23(12), pp.1037–1045.
- Ydenberg, C.A., Johnston, A., Weinstein, J., Bellavance, D., Jansen, S. & Goode, B.L., (2015). **Combinatorial genetic analysis of a network of actin disassembly-promoting factors.** *Cytoskeleton*, 72(7), pp.349–361.
- Yonezawa, N., Nishida, E., Koyasu, S., Maekawa, S., Ohta, Y., Yahara, I. & Sakai, H., (1987). **Distribution among tissues and intracellular localization of cofilin, a 21kDa actin-binding protein.** *Cell Structure and Function*, 12(5), pp.443–452.
- Yue, H., Zhao, Y., Ma, X. & Gong, J., (2012). **Ethylene glycol: properties, synthesis, and applications.** *Chemical Society Reviews*, 41(11), p.4218.
- Zalevsky, J., Grigorova, I. & Mullins, R.D., (2001). **Activation of the Arp2/3 complex by the Listeria ActA protein: Acta binds two actin monomers and three subunits of the Arp2/3 complex.** *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), pp.3468–3475.

SUMMARY

The actin cytoskeleton is a major component of the internal architecture of eukaryotic cells. Actin filaments are organized into different structures, the dynamics of which is spatially and temporally controlled by the polymerization and disassembly of filaments. Most actin structures are in a dynamic steady state regime where the assembly is balanced by the disassembly, which maintains a high concentration of intracellular actin monomers. *In vivo* the pool of actin monomers is limited and the formation of new actin filament structures is dependent on an effective disassembly of the older structures. The goal of my thesis was to study the influence of different architectures of actin by the disassembly machinery made of ADF/cofilin and its cofactor Aip1.

Firstly, I showed that the efficiency of the disassembly was dependent on the architecture of actin filaments organizations. Although the branched networks need only ADF/cofilin to be efficiently disassembled, the actin cables require the simultaneous action of ADF/cofilin and Aip1. Further investigations at the molecular scale indicate that the cooperation between ADF/cofilin and Aip1 is optimal above a certain threshold of molecules of ADF/cofilin bound to actin filaments. During my PhD I demonstrated that although ADF/cofilin is able to dismantle selectively branched networks through severing and debranching, the stochastic disassembly of actin filaments by ADF/cofilin and Aip1 represents an efficient alternative pathway for the full disassembly of all actin networks. We propose a model in which the binding of ADF/cofilin is required to trigger a structural change of the actin filaments, as a prerequisite for their disassembly by Aip1.

Secondly, I developed an experimental system made of cell-sized microwells. This technology allowed us to develop experiments in a closed environment in which the actin pool is limited in the same way as the cellular environment. I used this experimental system to study how a limited pool of components limits both the assembly and the disassembly of a branched network.

This thesis highlights the importance of developing new tools to obtain more “physiological” reconstituted systems *in vitro* to establish some of the general principles governing actin dynamics.

RÉSUMÉ

Le cytosquelette est un assemblage de protéines intracellulaires qui assure le maintien de la forme des cellules et la production de force. Ce cytosquelette est formé de trois types de polymères, dont les filaments d'actine qui sont impliqués dans des fonctions essentielles telles que la motilité cellulaire, la division cellulaire ou encore la morphogénèse. Les filaments d'actine s'agencent en structures organisées dont la dynamique est assurée par la polymérisation et le désassemblage des filaments, contrôlés spatio-temporellement. La plupart des structures d'actine sont dans un état stationnaire dynamique où l'assemblage est compensé par le désassemblage, ce qui permet de maintenir une concentration de monomères intracellulaire élevée. En effet, le réservoir d'actine *in vivo* est limité et la formation de nouvelles structures de filaments d'actine est dépendante d'un désassemblage efficace des structures les plus âgées. Le but de ma thèse a été d'étudier comment l'organisation architecturale des structures d'actine influence le désassemblage par la machinerie protéique composée de l'ADF/cofiline et d'un de ses cofacteurs Aip1.

J'ai d'abord pu montrer que l'efficacité du désassemblage dépendait de l'agencement des filaments d'actine. Quand les réseaux branchés ne requièrent que l'action de l'ADF/cofiline pour être désassemblés efficacement, les faisceaux de filaments d'actine ont besoin de la présence simultanée de l'ADF/cofiline et de l'Aip1. Une étude à l'échelle moléculaire a ensuite été menée pour comprendre le mécanisme du désassemblage des filaments d'actine par ces deux protéines au niveau du filament individuel.

Dans un second temps, j'ai développé un système expérimental composé de micropuits de taille comparable à la cellule. Cette technologie nous a permis de réaliser des expériences en milieu confiné, dans lequel le réservoir d'actine était limité de la même manière que le réservoir d'actine cellulaire. J'ai mis ce système à profit pour reconstituer le turnover d'une comète d'actine, un réseau branché formé à la surface d'une bille recouverte de nucléateurs de l'actine.

Ce travail de thèse a permis d'établir des lois fondamentales contrôlant la dynamique de l'actine et plus particulièrement comment l'architecture de l'actine et l'environnement peuvent influencer le désassemblage de structures complexes.