



HAL
open science

Dynamique de l'actine : influence de l'architecture des réseaux d'actine sur le désassemblage par ADF/Cofiline

Tea Aleksandra Icheva

► To cite this version:

Tea Aleksandra Icheva. Dynamique de l'actine : influence de l'architecture des réseaux d'actine sur le désassemblage par ADF/Cofiline. Biologie cellulaire. Université Grenoble Alpes, 2017. Français. NNT : 2017GREAV054 . tel-01690631

HAL Id: tel-01690631

<https://theses.hal.science/tel-01690631v1>

Submitted on 23 Jan 2018

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

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



THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTÉ UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : Biologie cellulaire

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Tea Aleksandra ICHEVA

Thèse dirigée par **Rajaa BOUJEMAA-PATERSKI**, et
codirigée par **Laurent BLANCHOIN**

préparée au sein du **Laboratoire de Physiologie
Cellulaire et Végétale (LPCV)**
dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Dynamiques de l'actine : influence de l'architecture des réseaux d'actine sur le désassemblage par ADF/Cofiline.

Actin dynamics: role of actin networks architecture in disassembly by ADF/Cofilin.

Thèse soutenue publiquement le **22 septembre 2017**
devant le jury composé de :

Monsieur GREGORY GIANNONE

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION AQUITAINE,
Rapporteur

Madame JULIE PLASTINO

DIRECTRICE DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION - PARIS,
Rapporteur

Monsieur ANTOINE JEGOU

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION PARIS-VILLEJUIF,
Examineur

Madame RAJAA BOUJEMAA-PATERSKI

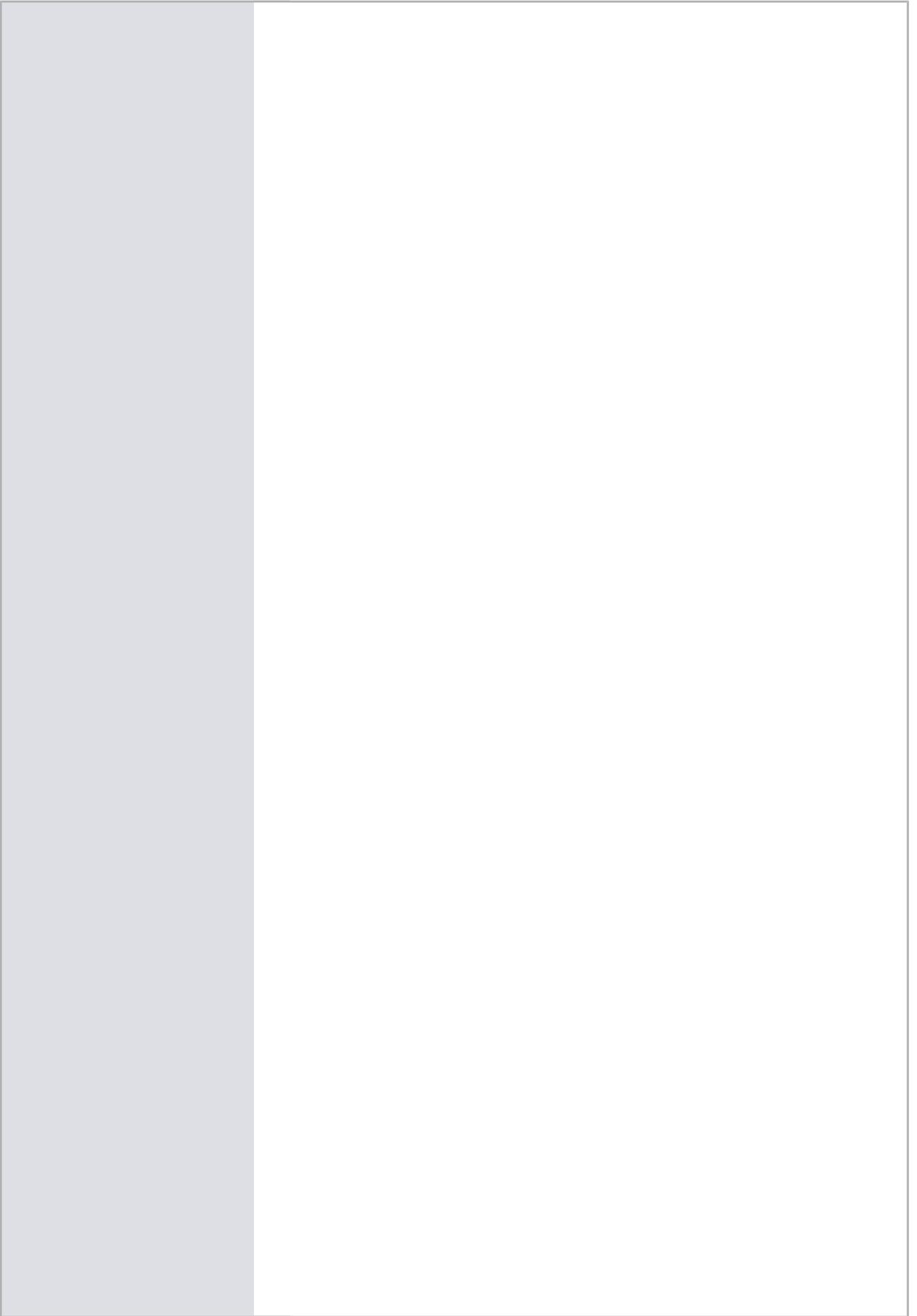
MAITRE DE CONFERENCES, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES,
Directeur de these

Monsieur LAURENT BLANCHOIN

DIRECTEUR DE RECHERCHE, CNRS DELEGATION ALPES,
CoDirecteur de these

Monsieur BERTRAND FOURCADE

PROFESSEUR, UNIVERSITE GRENOBLE ALPES, Examineur
et Président du jury



*Le commencement de toutes les sciences,
c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont.*

- Aristote

Lorsque j'étais enfant, j'aimais passer du temps à observer mon environnement et me documenter sur toutes sortes de choses. A ce jour, j'ai encore une soif insatiable de comprendre comment notre monde fonctionne, et le plus grand privilège qui m'ait été offert est celui d'étudier comment la vie elle-même, depuis notre ADN jusqu'aux organismes complexes. "Il faudrait être fou pour ne pas trouver cela fascinant", me suis-je souvent murmurée. C'est sans doute cela qui m'a tenue en haleine durant mes études, et qui m'a poussée à poursuivre par un doctorat, pour non seulement assimiler des connaissances, mais également en produire. Essayer d'apporter, à mon échelle, une pierre à l'édifice. Et pour cela, je remercie Rajaa Boujemaa-Paterski et Laurent Blanchoin de m'en avoir donné l'opportunité.

Dans l'état actuel du monde scientifique, entre l'urgence des résultats et la course à la publication, on en oublie que la science, et *a fortiori* le doctorat, est avant tout un marathon. Patience et persévérance sont les maîtres-mots. Car avouons-le: le doctorat est une chose bien difficile. Bien évidemment il y aura toujours des génies pour qui tout ira de soi, mais pour le commun des mortels, c'est un effort, et il n'est point de satisfaction sans obstacles durement franchis.

C'est dans ces moments difficiles que l'on prend la mesure de l'importance de son entourage. A commencer par ceux que l'on voit quotidiennement et qui deviennent notre seconde famille: les membres de l'équipe. J'ai eu la chance d'être dans cette atmosphère de travail où il n'y a pas de place pour la compétition, où chacun sait se rendre disponible pour aider son collègue, pour discuter de sciences, pour apporter ce grain de folie qui fait qu'au final, on est content d'être là. A ce titre, je remercie Christophe Guérin pour ses conseils et sa musique, Jérémie Gaillard pour sa gestion de... tout, Tobias Klar pour son accompagnement au démarrage de mon doctorat, Laurène Gressin pour nos discussions et nos déboires de manips du vendredi soir et son soutien moral à toute épreuve, Hajer Ennomani pour sa bonne humeur et son incroyable gentillesse, Gaëlle Letort aka Boss pour ses blagues et ses geekeries, Audrey Guillotin pour son franc-parler et sa Playlist du Vendredi, Emilie Barou pour son énergie et son humour.

Je remercie également Pavithra Singaravelu pour ses accolades quotidiennes, Ilaria Scarfone pour sa douceur, Laura Schaedel pour nos discussions au détour des déjeuners. Evidemment je remercie tous les autres membres de l'équipe même si nous avons passé moins de temps ensemble, des personnes au caractère fort comme Francesca Farina ou Fabrice Senger de qui l'on apprend beaucoup, et tous les autres qui m'ont fait sentir comme un membre à part entière de l'équipe.

Egalement, merci à Manuel Théry de nous transmettre son enthousiasme scientifique indéfectible. Je tiens à adresser un remerciement tout particulier à Christelle Breton, dont l'oreille attentive et l'action bienveillante ont été un tournant dans ce doctorat.

Après une dure journée ou semaine à la paillasse, j'ai aussi pu compter sur mon entourage personnel, des personnes au grand coeur qui m'ont soutenue dans les moments les plus difficiles d'une multitude de façons. Sans l'écoute, les encouragements et la bonne humeur de Nadya, Anna, Bruno, Geoffrey et Naila, j'aurais peut-être jeté l'éponge. Merci à Kévin car il a été un témoin quotidien de mes moments de joie mais aussi de mes frustrations et mes doutes, et il a su apporter une présence apaisante. Enfin, je remercie ma mère, Elisabeth, pour m'avoir soutenue et cocoonée dans ma bulle lors de la dernière ligne droite de la rédaction de ce manuscrit.

Manuscrit dont je n'attends pas qu'il entre dans la postérité, mais dont j'espère au moins qu'il vous montrera combien les sciences, et les mécanismes biologiques de la vie, sont formidables et valent la peine d'être explorés.

Aleksandra

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	9
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	11
1- LE CYTOSQUELETTE	13
1.1 - Les cytosquelettes : entre rigidité et plasticité	13
1.1.1 - Les filaments intermédiaires	15
1.1.2 - Les microtubules	17
1.1.3 - Les microfilaments d'actine	21
1.2 - Architectures des filaments d'actine dans les cellules non-musculaires	24
1.2.1 - Câbles : fibres de stress, arcs transverses, filopodes	25
1.2.2 - Réseaux réticulés : le cortex intracellulaire	27
1.2.3 - Réseaux dendritiques : le lamellipode	28
1.3 - Nucléation dendritique des filaments d'actine et génération de forces propulsives	30
1.3.1 - Les acteurs moléculaires de la formation d'un réseau dendritique	30
1.3.1.1 - Activation des protéines WASP/Scar	30
1.3.1.2 - Nucléation de branches d'actine par le complexe Arp2/3	31
1.3.1.3 - La coiffe des filaments par la Capping Protein et la formation d'un gel d'actine	34
1.3.2 - Les forces propulsives du réseau d'actine	34
1.4 - Les migrations cellulaires	37
1.4.1 - La motilité cellulaire : le lamellipode	40
1.4.2 - Le détournement ou « hijacking » du système de motilité cellulaire par des pathogènes : réseaux propulsifs viraux et bactériens	41
1.4.3 - Système protéique nécessaire et suffisant pour l'assemblage de réseaux branchés d'actine	43

2- DYNAMIQUES DES RESEAUX D'ACTINE	46
2.1 - Thermodynamique de l'assemblage d'un filament d'actine	46
2.1.1 - Structure et biochimie de l'actine monomérique et filamenteuse	46
2.1.2 - Thermodynamique et cinétique de la polymérisation de l'actine	48
2.1.2.1 - <i>Etapas clés de la polymérisation de l'actine</i>	48
2.1.2.2 - <i>Cinétique de polymérisation de l'actine</i>	49
2.2 - Contrôle moléculaire de la dynamique des réseaux d'actine	54
2.2.1 - Assemblage et élongation	54
2.2.2 - Désassemblage et recyclage des monomères	57
3- L'ADF/COFILINE DANS LE TURNOVER DE L'ACTINE.....	58
3.1 - Description biochimique de l'ADF/Cofiline.....	58
3.2 - Mécanisme d'action d'ADF/Cofiline dans le désassemblage	61
3.2.1 - L'état du nucléotide module l'affinité de l'ADF/Cofiline pour le filament d'actine	61
3.2.2 - Désassemblage des filaments par ADF/Cofiline	63
3.2.3 - Recyclage de l'actine, turnover et maintien de la motilité	67
3.3 - Régulation de l'activité de l'ADF/Cofiline	67
3.3.1 - Modifications biochimiques de l'ADF/cofiline	68
3.3.2 - Séquestration de l'ADF/Cofiline à la membrane	68
3.3.3 - Compétition avec d'autres protéines	69
3.3.4 - Synergie avec d'autres protéines	71
3.4 - Contrôle biophysique du désassemblage : diffusion et filtrage des molécules	72
3.4.1 - Existence de domaines intracellulaires d'exclusion de molécules	72
3.4.2 - Cas particulier : le Lamellipode	74
4- RESEAUX BIOMIMETIQUES D'ACTINE	75
4.1 - Auto-assemblage d'actine branchée en solution libre	76
4.2 - Introduction de contraintes pour diriger la polymérisation de l'actine.....	76
4.2.1 - Contraintes biochimiques	76
4.2.2 - Contraintes géométriques : surfaces fonctionnalisées avec un activateur de la nucléation	77
4.2.2.1 - <i>Particules solides</i>	77
4.2.2.2 - <i>Surfaces microstructurées</i>	80

CHAPITRE 2 : METHODES	87
1- FONCTIONNALISATION DES SURFACES.....	89
1.1 - Préparation des billes de polystyrène.....	89
1.2 - Préparation des lamelles de verre.....	91
1.2.1 - Préparation d'une surface hydrophobe	91
1.2.1.1 - <i>Lamelles avec PLL-PEG</i>	91
1.2.1.2 - <i>Lamelles avec Silane-PEG</i>	92
1.2.2 - Microgravure UV	93
1.2.2.1 - <i>Microgravure par masque de Chrome</i>	93
1.2.2.2 - <i>Microgravure par laser UV pulsé</i>	95
1.2.3 - Fonctionnalisation avec le pWA	98
2- MILIEUX DE MOTILITE RECONSTITUES	99
2.1 - Milieu minimal de polymérisation de l'actine	99
2.2 - Milieu avec FITC-Dextran pour l'étude de la diffusion	101
3- METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS.....	103
3.1 - Analyse d'images	103
3.1.1 - Mesure de la fluorescence	103
3.1.2 - Normalisation	107
3.2 - Analyse des résultats et modèles mathématiques	107
 CHAPITRE 3 : RESULTATS	 109
POSITION DU SUJET	111
RESULTATS	117
1- ASSEMBLAGE DE RESEAUX BRANCHES D'ACTINE DE DIFFERENTES DENSITES A PARTIR DE MICROPATRONS	120
2- L'ARCHITECTURE DU RESEAU D'ACTINE CONTROLE SON DESASSEMBLAGE MACROSCOPIQUE PAR ADF/COFILINE.....	123
2.1 - Désassemblage des réseaux branchés d'actine	123

2.2 - Modélisation des dynamiques de l'ADF/Cofiline au sein d'un réseau branché d'actine	128
2.2.1 - Prédiction de la quantité d'ADF/Cofiline d'un réseau d'actine	128
2.2.2 - Modélisation de la longueur du réseau d'actine à l'équilibre.	129
3- LA GEOMETRIE DU RESEAU D'ACTINE CONTROLE SON DESASSEMBLAGE MACROSCOPIQUE PAR ADF/COFILINE.....	134
3.1 - Données expérimentales	135
3.2 - Modélisation	136
4- L'HETEROGENEITE DES RESEAUX DENDRITIQUES CONTROLE LEUR DIRECTIONNALITE.....	139
5- COMMENT L'ARCHITECTURE ET LA GEOMETRIE MODULENT-ELLES LE DESASSEMBLAGE PAR ADF/COFILINE ?.....	141
5.1 - Utilisation de traceurs fluorescents, les Dextrans	141
5.2 - Evaluation de l'exclusion des Dextrans dans les réseaux d'actine	143
5.2.1 - Données expérimentales	143
5.2.2 - Modélisation	144
6- CONCLUSION ET DISCUSSION.....	147
PERSPECTIVES _____	153
1- TRANSITION LAMELLIPODE – ARCS TRANSVERSESES	155
2- CONFINEMENT 3D.....	156
3- DENSITE ET OBSTACLES.....	158
<u>ANNEXES</u>	<u>161</u>
1- DETAIL DES TAMPONS ET SOLUTIONS DU MILIEU DE MOTILITE	161
2- METHODOLOGIE DE MODELISATION	162
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	<u>165</u>
<u>ABSTRACT</u> _____	<u>189</u>
<u>RESUME</u> _____	<u>190</u>

LISTE DES ABREVIATIONS

<i>ADF</i>	Actin Depolymerizing Factor, protéine de la famille des Cofilines.
<i>Aip1</i>	Actin Interacting Protein 1
<i>Arp2/3</i>	Actin Related Proteins 2/3, complexe de sept polypeptides dont Arp2 et Arp3, nucléateur de branches sur filament d'actine
<i>ADP</i>	Adénosine Diphosphate
<i>ATP</i>	Adénosine Triphosphate
<i>CP</i>	Capping Protein, protéine de coiffe
<i>FI</i>	Filaments intermédiaires
<i>GDP</i>	Guanosine Diphosphate
<i>GTP</i>	Guanosine Triphosphate
<i>MAPs</i>	Microtubule Associated Proteins, protéines qui interagissent directement ou indirectement avec les microtubules
<i>Microscopie TIRF</i>	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy , TIRF-M ou microscopie à onde évanescente.
<i>MT</i>	Microtubules
<i>MTOC</i>	Microtubules organizing center, centre d'organisation des microtubules ou centrosome, situé à proximité du noyau qui nucléé les microtubules
<i>N-WASP</i>	Neuronal Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
<i>NPF</i>	Nucleation Promoting Factor , facteurs promoteurs de nucléation d'actine
<i>Pi</i>	Phosphate inorganique, relâché après l'hydrolyse de l'ATP
<i>Pi(4,5)P2</i>	Phosphatidylinositol 4,5-Biphosphate
<i>PLL-PEG</i>	PolyLysine-L-g-PolyEthyleneGlycol , composé hydrophobe

LISTE DES ABREVIATIONS

	qui empêche la fixation de la majorité des protéines.
VASP	VAsodilator-Stimulated Phosphoprotein, polymérase de l'actine
VCA	Domaine Verproline-Central-Acidic appartenant aux facteurs promoteurs de nucléation tels que WASP ou Scar
pWA	Domaine VCA des protéines WASp/Scar additionné d'une région polyproline, utilisée <i>in vitro</i> afin d'activer le complexe Arp2/3
Silane-PEG	Silane-PolyEthyleneGlycol , composé hydrophobe qui empêche la fixation de la majorité des protéines.
WASP/Scar	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein et la protéine Scar , activateur du complexe Arp2/3

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

1- LE CYTOSQUELETTE

1.1 - Les cytosquelettes : entre rigidité et plasticité

Lorsqu'on regarde différentes cellules animales isolées, la première observation évidente est que ces cellules sont de formes très diversifiées. Du simple fibroblaste à l'impressionnant neurone de Purkinje (**Figure 1**), ces morphologies cellulaires sont dues à l'organisation extrêmement contrôlée de leur cytosquelette.

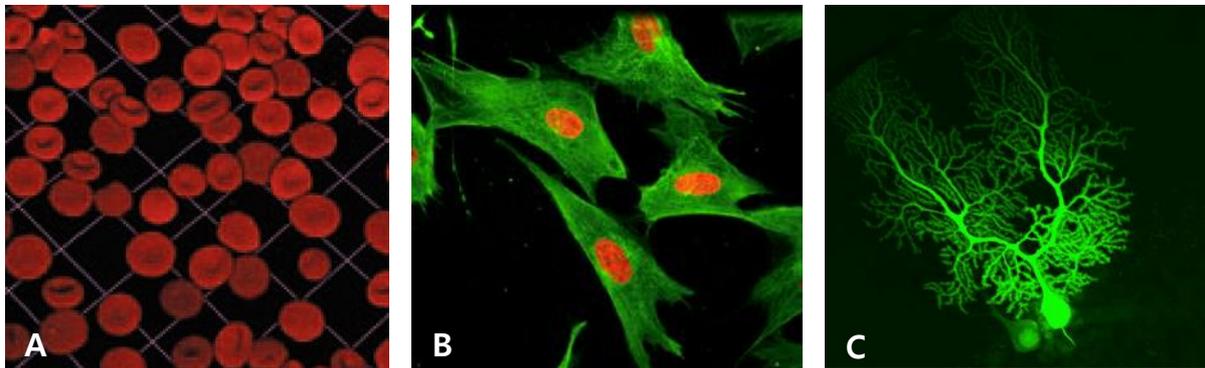


Figure 1. Exemples de la diversité des formes cellulaires.

(A) Erythrocytes, cellules énucléées et rondes. L'actine est marquée à la rhodamine-phalloïdine (Kalfa et al. 2006) . (B) Fibroblastes en culture, cellules abondantes à la forme caractéristique en fuseau. Les microtubules sont marqués en vert et le noyau en rouge dans cette observation au microscope à fluorescence. (Goodpaster et al. 2007) (C) Neurone de Purkinje, avec ses nombreuses ramifications. Projections maximales d'un neurone de souris micro-injecté au Lucifer Yellow et observé au microscope confocal (Image de Maryann Martone, fournie au le site *cellimagelibrary.org* sous la référence CIL:39953, licence Creative Commons).

Si on prend en compte les cellules dans leur environnement tissulaire, on comprend également que, pour conserver ou modifier leur morphologie, ces cellules doivent répondre aux contraintes environnementales.

Les cellules sont douées des propriétés mécaniques. Leur membrane plasmique est flexible et facilement déformable. Le cytosquelette confère aux cellules

leur résistance à la déformation. Le cytosquelette est un ensemble complexe de réseaux intracellulaires faits de polymères biologiques non covalents. Il possède des propriétés visco-élastiques : élastique car stocke et restitue de l'énergie de déformation, et visqueux car capable dissiper cette énergie au-delà d'un certain seuil. Ainsi, les cellules peuvent résister aux contraintes environnementales telles que la pression (perpendiculaire à la surface) ou les forces de cisaillement (parallèles à la surface).

Cependant, les cellules ne se contentent pas de répondre passivement à des contraintes extérieures, mais sont également capables de générer des forces et des déformations de l'intérieur. Par exemple, elles produisent des extensions membranaires pour se mouvoir de façon dirigée (cas du lamellipode) ou lors de leur adhésion à un substrat (abordé plus loin avec les fibres de stress). Ces phénomènes mettent en jeu le cytosquelette.

Contrairement à ce que laisse supposer le terme « squelette », le cytosquelette n'est donc pas statique. C'est un composant capable d'importants remodelages pour répondre à un besoin de la cellule.

Le cytosquelette comprend trois types de filaments (**Figure 2**): les filaments intermédiaires qui ne sont pas polarisés, et les filaments polarisés que sont les microtubules et les microfilaments d'actine.

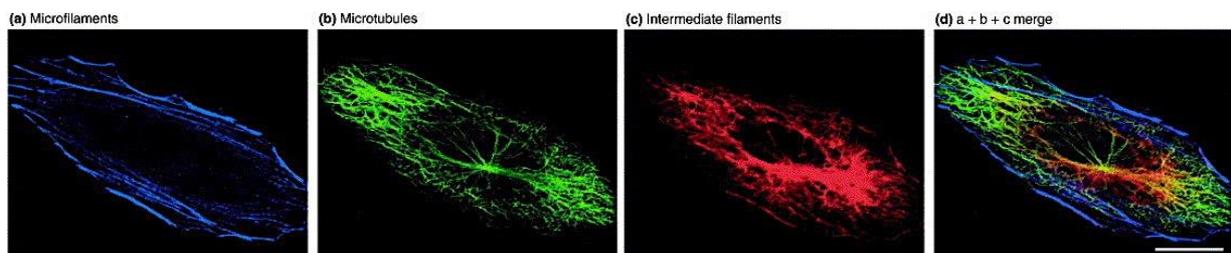


Figure 2. Filaments d'actine, microtubules et filaments intermédiaires
Marquage à la phalloïdine (a) et aux anticorps (b,c). (Omary et al. 2006)

1.1.1 - Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires portent leur nom en raison de leur diamètre de 10 nm, intermédiaire entre celui des microtubules (25 nm) et des microfilaments d'actine (8 nm). Ce sont des filaments apolaires (**Figure 3**) qui apportent un support mécanique à la cellule. Ils sont résistants aux déformations (tension, compression, torsion) et flexibles ce qui procure un degré d'élasticité aux cellules au sein d'un tissu. Par ailleurs, une étude comparative en rhéologie in vitro montre que les filaments intermédiaires sont plus résistants au stress mécanique que les microtubules et l'actine (Janmey 1991).

L'unité de base du filament intermédiaire est une protéine fibreuse constituée d'un domaine central, avec en N-terminal une tête, et une queue en C-terminal (**Figure 3**). Cette protéine s'associe en dimère. Deux protofilaments s'associent tête-bêche pour former un tétramère. Les tétramères s'associent ensuite bout à bout pour former le protofilament. Enfin, l'association de plusieurs protofilaments forment le filament intermédiaire (**Figure 3**).

C'est l'association en quinconce des tétramères qui donne ses propriétés de flexibilité et de résilience aux filaments intermédiaires.

Il existe 6 classes de filaments intermédiaires ; ici je présenterai brièvement les 4 principaux types.

- Les filaments intermédiaires présents dans le noyau de toutes les cellules (à l'exception des érythrocytes, cellules sans noyau) sont les filaments nucléaires, appelés *lamines*. D'un diamètre comparable aux microfilaments d'actine, ils forment un réseau dense appelé la lamina – ou encore nucléosquelette - qui tapisse la face interne de l'enveloppe du noyau, et qui est interrompue par les pores nucléaires. Au moment de la prophase de la mitose, ces filaments sont rapidement désassemblés par phosphorylation pour permettre la fragmentation de l'enveloppe nucléaire en vésicules et l'accessibilité des chromosomes pour les microtubules.

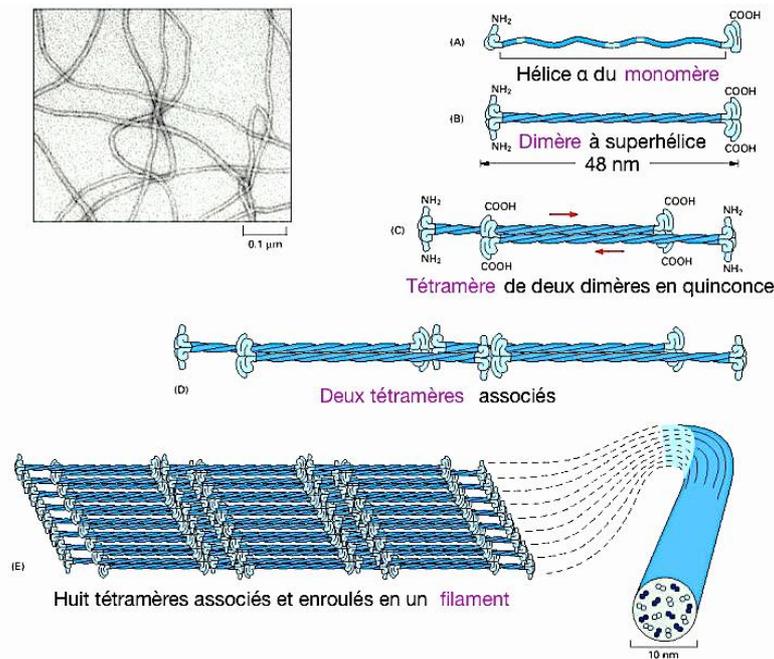


Figure 3. Structure des filaments intermédiaires.

La protéine unitaire du filament intermédiaire possède un domaine central alpha-hélicoïdal, flanqué de part et d'autre d'un domaine de tête (N-ter) et d'un domaine de queue (C-ter). Chaque protofilament est constitué de protéines fibreuses associées en dimère superenroulé. Les dimères s'associent en tétramères avec un décalage et de façon antiparallèle si bien que le filament intermédiaire est une structure apolaire. Les tétramères s'associent encore pour former le filament intermédiaire.

(Adapté de Molecular Biology of the Cell, 4th edition. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. Garland Science; 2002.)

- **Les kératines** sont les FI des les cellules épithéliales. Ils sont constitués d'hétérodimères obligatoires de kératine acide et basique. Les kératines assurent à la fois l'ancrage des cellules à la membrane basale sous-jacente par l'intermédiaire des hémidesmosomes, et l'étanchéité entre les cellules en formant un réseau de kératine. Ce réseau est formé par l'intermédiaire des desmosomes des jonctions étroites qui relient des cellules voisines de l'épiderme, par exemple.
- **Les vimentines** sont présentes dans les cellules mésenchymateuses et d'autres cellules non-épithéliales comme les neurones. Elles permettent aux cellules d'avoir une résilience lorsque soumises à un stress mécanique (Goldman et al.

1996; Lowery et al. 2015), c'est-à-dire d'absorber de l'énergie suite à une déformation élastique.

En outre, elles sont impliquées dans la migration cellulaire, et sont également un marqueur de la transition épithélio-mésenchymateuse, au cours de laquelle des cellules épithéliales perdent leur polarité et leur adhésion inter-cellulaires pour devenir des cellules mésenchymateuses avec des propriétés migratoires et invasives.

- Enfin, **les neurofilaments** sont des filaments intermédiaires spécifiques des axones neuronaux. Ils ont une structure complexe en hétéropolymères : ils sont constitués de triplets des protéines NF-L, NF-M et NF-H.

Ils permettent le contrôle du diamètre de l'axone et donc de sa conductance, c'est-à-dire la facilité avec laquelle le courant se déplace le long de l'axone (Hoffman et al. 1987). Ils participent aussi à l'ancrage d'organelles cellulaires et à la régénération axonale. Les neurofilaments semblent être relativement méconnus, mais on sait qu'ils sont transportés bi-directionnellement dans les axones, grâce à des moteurs moléculaires, le long des microtubules (Shah et al. 2000).

1.1.2 - Les microtubules

Les microtubules (MTs) sont des polymères hélicoïdaux qui forment un tube creux de 25 nm de diamètre. Ils sont constitués d'hétérodimères de tubuline α et β , protéines globulaires de 55 kDa. Les hétérodimères s'associent longitudinalement en protofilaments. Les interactions latérales des protofilaments permettraient la formation d'un feuillet précurseur de tubuline. L'incurvation et la fermeture de ce feuillet formeraient un tube de 13 protofilaments dans la structure majoritaire (**Figure 4**). Cependant il a été observé des microtubules constitués de 9 à 17 protofilaments et des hétérogénéités de nombre de protofilament au sein d'un même microtubule existent.

Les tubulines α et β lient un nucléotide GTP, qui est hydrolysable en GDP puis échangeable pour un nouveau GTP. L'arrangement des dimères $\alpha\beta$ dans le microtubule rend impossible l'hydrolyse du GTP du monomère α , alors que le GTP du

monomère β reste hydrolysable et échangeable (**Figure 4**). Dans des conditions optimales d'assemblage des microtubules, l'hydrolyse du GTP est plus lente que l'addition de nouveaux dimères $\alpha\beta$ GTP, ce qui crée une « coiffe » de tubuline-GTP à l'extrémité en croissance (**Figure 4**)(Carlier & Pantaloni 1981). Cette coiffe de tubuline-GTP a récemment été estimée à 750 sous-unités *in vivo* (Seetapun et al. 2012). □

In vitro, les microtubules s'allongent aux deux extrémités du cylindre. L'agencement des dimères de tubuline α et β au sein de la structure confère une polarité structurale à ces polymères de sorte que l'extrémité « + » expose la sous-unité β et l'extrémité « - » expose la sous-unité α (**Figure 4C**). L'extrémité « + » s'allonge plus rapidement que l'extrémité « - ».

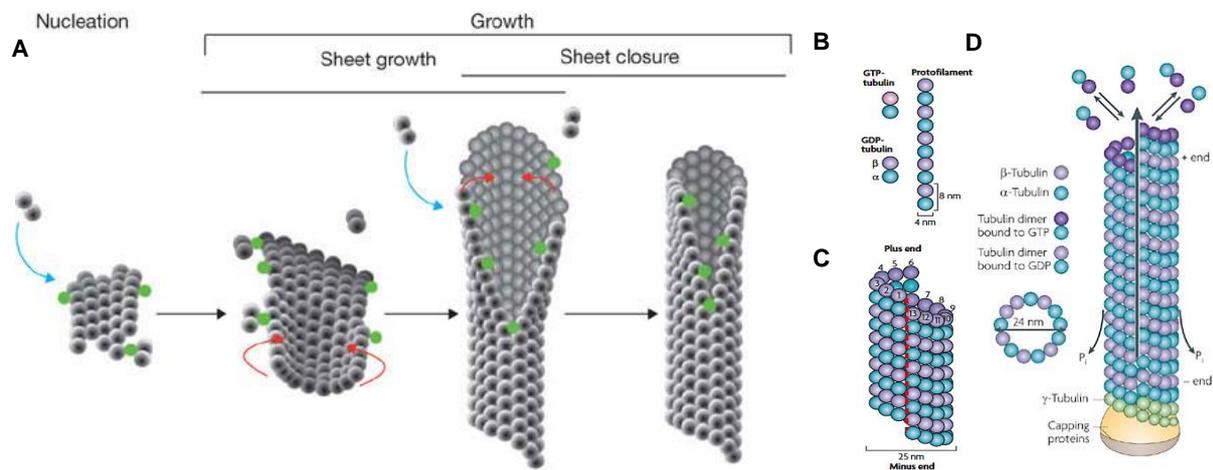


Figure 4. Assemblage et structure d'un microtubule.

Après nucléation, les protofilaments constitués de dimères α et β (B) interagissent latéralement et forment un feuillet de tubuline, incurvé. Les protéines EB1 (vert) aident à la fermeture du feuillet en tube *in vitro* (A) (Vitre et al. 2008). Au cours de l'élongation des microtubules, le GTP associé à la sous-unité β est hydrolysé en GDP. (C) Dans leur organisation canonique, les MT comptent 13 protofilaments. C'est une structure, polarisée avec une extrémité « + » et une extrémité « - ». (D) Le microtubule est stabilisé par le complexe γ -TuRC à l'extrémité « - ». L'addition de nouveaux dimères-GTP se fait alors exclusivement à l'extrémité « + ». (Adapté de Akhmanova and Steinmetz, 2008)

Les MTs peuvent nucléer spontanément lorsqu'un certain seuil de tubuline libre, appelée « concentration critique », est dépassé. *In vitro*, cette concentration critique varie en fonction des conditions expérimentales.

In vivo, les concentrations en tubuline libre ne favorisent pas la nucléation spontanée des MTs. Cette nucléation est facilitée par la formation préalable d'un complexe circulaire de γ -tubulines (γ -tubulin ring complex ou γ -TuRC) qui stabilise les interactions latérales entre dimères. L'extrémité « - » est en interaction avec le centre organisateur des microtubules (centrosome), ce qui fait que l'élongation des MTs est **polarisée** : elle a lieu uniquement par leur extrémité « + » (**Figure 4D**). Ainsi, la nucléation des MTs est spatialement contrôlée au centrosome, et l'élongation se fait radialement vers la périphérie de la cellule.

La propriété fondamentale des microtubules est leur « instabilité dynamique » : il existe en effet des cycles de croissance du MT suivie d'une rapide dépolymérisation appelée « **catastrophe** », puis de nouveau de croissance, appelée « **sauvetage** » ou « **rescue** ».

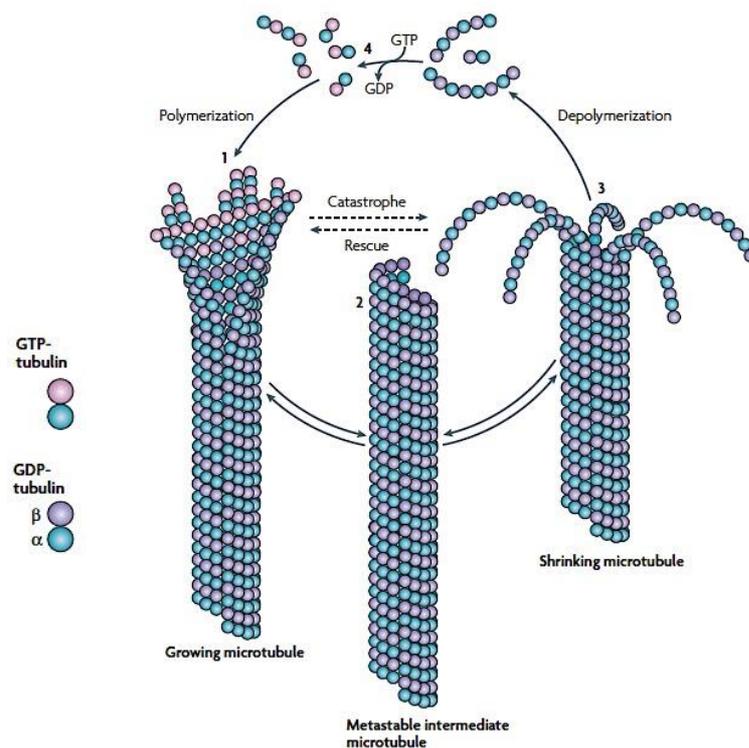


Figure 5. Instabilité dynamique des microtubules.

L'alternance de phases de polymérisation/dépolymérisation dépend l'état du nucléotide lié à la tubuline de l'extrémité dynamique. (Adapté de Akhmanova and Steinmetz, 2008)

Cette instabilité dynamique est due à l'hydrolyse du GTP associé à la sous-unité β (**Figure 5**). La vitesse d'hydrolyse du GTP au sein du MT est plus lente que sa vitesse d'élongation. Ainsi, sur le MT en élongation, il s'assemble une coiffe $\alpha\beta$ -GTP à l'extrémité +, où le β -GTP sera hydrolysé aléatoirement. L'hydrolyse du GDP induit un changement de conformation de dimère $\alpha\beta$ au sein du MT, ce qui déstabilise ponctuellement la structure.

Au delà d'une densité limite $\alpha\beta$ -GDP dans la coiffe, la contrainte physique est suffisante pour destabiliser/désassembler la coiffe. C'est le processus "catastrophe". En présence de concentration suffisante en dimères $\alpha\beta$ -GTP, l'élongation reprend. On parle alors de "sauvetage" ou "rescue". Le cycle catastrophe-rescue peut se répéter à plusieurs reprises pour un MT. Cette instabilité dite "dynamique" de l'extrémité « + » peut être contrôlée par des protéines de stabilisation, « end-binding proteins » ou protéines EB, qui sont majoritairement connues pour être processives.

Les microtubules s'organisent de différentes façons dans la cellule, en fonction de leur rôle.

- ♦ Dans les cellules en interphase, les microtubules forment un réseau rayonnant à partir du centrosome (**Figure 6A**). Ils servent de rails au trafic cellulaire de vésicules membranaires, d'organelles ou de complexes protéiques grâce à des moteurs moléculaires sélectivement dirigés vers l'extrémité « + » (kinésines), ou « - » (dynéines).

- ♦ Lors de la mitose, le centrosome est dupliqué et chaque exemplaire se place à deux pôles cellulaires opposés. Les microtubules s'organisent en fuseau mitotique et après rupture du noyau, ils participent au positionnement des chromosomes sur la plaque équatoriale (**Figure 6B**).

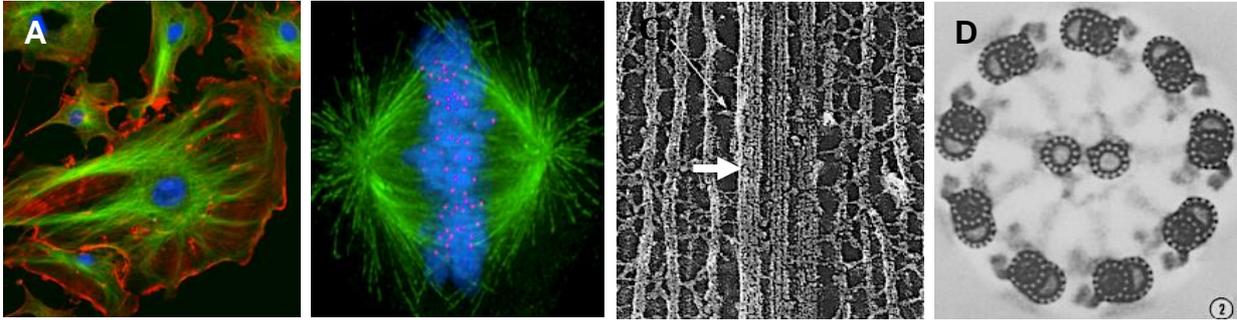


Figure 6. Diversité des organisations des microtubules.

(A) Cellule endothéliale observée à l'interphase, au microscope à fluorescence. Les MTs (vert) sont distribués radialement dans toute la cellule. (<http://rsb.info.nih.gov/ij/images/>). (B) Fuseau mitotique d'une cellule en métaphase, observé au microscope à fluorescence. Les MTs (vert) participent au positionnement des chromosomes (bleu) sur la plaque équatoriale par l'intermédiaire de kinétochores (rouge) (Image Wikimedia Commons). (C) Axone de grenouille observé en microscopie électronique. Les MTs (flèche épaisse) sont regroupés en câbles. On observe de part et d'autre des neurofilaments. (Hirokawa 1982). (D) Section d'axonème en microscopie électronique avec les doublets caractéristiques d'un MT entier et d'un MT incomplet. On voit les doublets reliés aux microtubules centraux par des protéines associées. (Afzelius et al. 1995)

- ♦ Dans les neurones, ils s'organisent en câbles (**Figure 6C**) et sont nécessaires à la formation des axones ainsi qu'à la signalisation, en étant par exemple le support d'un transport antérograde de vésicules de neurotransmetteurs depuis le soma jusqu'aux synapses où ils seront libérés.

- ♦ Enfin, dans les cils cellulaires se trouve l'axonème, un assemblage particulier de doublets de microtubules et de protéines associées (**Figure 6D**). Les flexions coordonnées de MTs de l'axonème produisent des forces responsables des battements des cils. L'axonème est maintenu en place au sein du cil par un ancrage au cytosquelette d'actine sous-jacent.

1.1.3 - Les microfilaments d'actine

L'actine, protéine globulaire de masse molaire 42 kDa, est une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes. Chez les mammifères, six gènes codent pour six différents isoformes de l'actine. Chez les vertébrés, on peut distinguer

les isoformes musculaires α et γ (entérique), et les isoformes cytoplasmiques β et γ . L'actine est l'une des protéines les plus conservées parmi les espèces avec plus de 90% d'homologie entre l'homme et la levure *Schizosaccharomyces pombe* (Gunning et al. 2015).

Structuralement, le monomère d'actine est constitué de deux lobes similaires reliés par une région charnière, et il comporte en tout 4 sous-domaines (**Figure 7**). Deux sillons sont présents entre les deux lobes : l'un pour lier un nucléotide, ATP ou ADP, et l'autre pour interagir avec d'autres monomères ou des protéines liant l'actine (ABPs, pour Actin Binding Proteins).

L'actine globulaire (actine-G) s'assemble en microfilaments (actine F, pour « filamenteuse ») de 7-8 nm de diamètre, de structure bi-hélicoïdale (**Figure 7**). L'orientation des monomères étant toujours la même au sein du filament, celui-ci possède une polarité structurale. Le filament se caractérise par une extrémité dite « **pointue** », et une extrémité dite « **barbée** ». Les sous-domaines 1 et 3 du monomère sont orientés vers l'extrémité barbée, tandis que les sous-domaines 2 et 4 sont orientés vers l'extrémité pointue (Holmes et al. 1990)

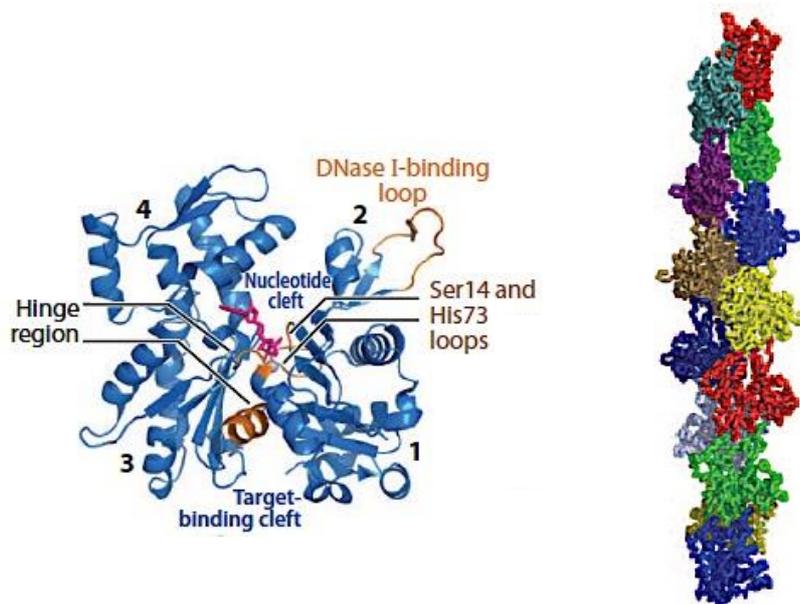


Figure 7. Structures du monomère d'actine et du filament d'actine.

Le monomère d'actine comporte 4 sous-domaines (numérotés 1 à 4). La région charnière (« hinge region ») permet la formation de deux sillons au sein de la protéine. Le sillon nucléotidique (entre les régions 2 et 4) est montré avec une molécule d'ATP. Le sillon hydrophobe (entre les régions 1 et 3) est le siège d'interactions longitudinales avec d'autres sous-unités du filament et avec des protéines de liaison à l'actine. (Dominguez & Holmes 2011) Les monomères s'assemblent en un filament bi-hélicoïdal (Bugyi & Carlier 2010)

Cette polarité structurale confère au filament sa polarité thermodynamique : l'extrémité barbée polymérise dix fois plus rapidement que l'extrémité pointue. Le détail de ce phénomène et ses implications dans les dynamiques de l'actine sera discuté dans la seconde section de ce chapitre.

L'arrangement spatial des filaments d'actine dans la cellule est relié à la fonction qu'ils doivent accomplir. Dans les cellules de muscle strié, l'actine forme avec la myosine des unités contractiles ordonnées appelées sarcomères (**Figure 8**).

Les filaments d'actine et de myosines sont arrangés en alternance, de façon à ce que lors de la contraction, un maximum de têtes de myosine puisse contacter un maximum d'actine ; cette contraction massive et coordonnée permet de générer des forces pour mouvoir un membre entier, par exemple.

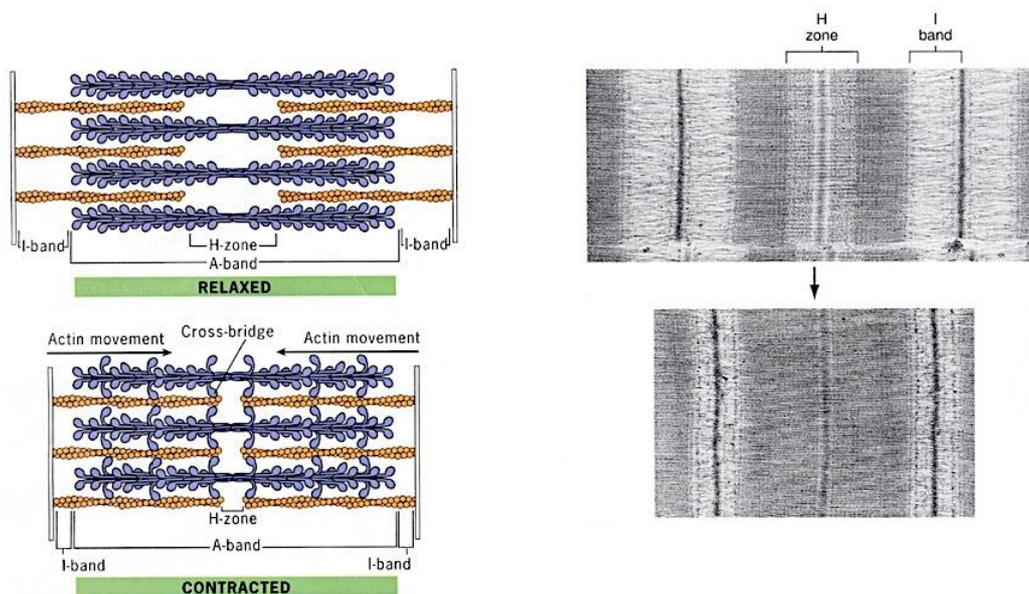


Figure 8. Organisation de l'actine dans le muscle strié

Panels hauts : L'actine et la myosine sont arrangées de façon très ordonnée dans des unités contractiles appelées sarcomères, avec alternance de filaments fins d'actine et de filaments épais de myosines dont les têtes contactent les filaments d'actine. Cet agencement permet la contraction simultanée et coordonnée des filaments d'actine par les myosines (panels bas). (*Cell and Molecular Biology* 3e édition, Gerald Karp. 2002, John Wiley & Sons)

Dans les cellules non-musculaires, les microfilaments d'actine sont capables d'une multitude d'architectures répondant à des besoins spécifiques de la cellule et dont l'action est coordonnée.

1.2 - Architectures des filaments d'actine dans les cellules non-musculaires

L'actine F forme différentes structures ordonnées dans l'espace, que j'appellerai **architectures**, et qui servent à des fonctions précises dans la cellule. Ici je vais aborder le cas des organisations de plusieurs filaments d'actine en câbles, en réseaux réticulés, ainsi que des réseaux branchés.

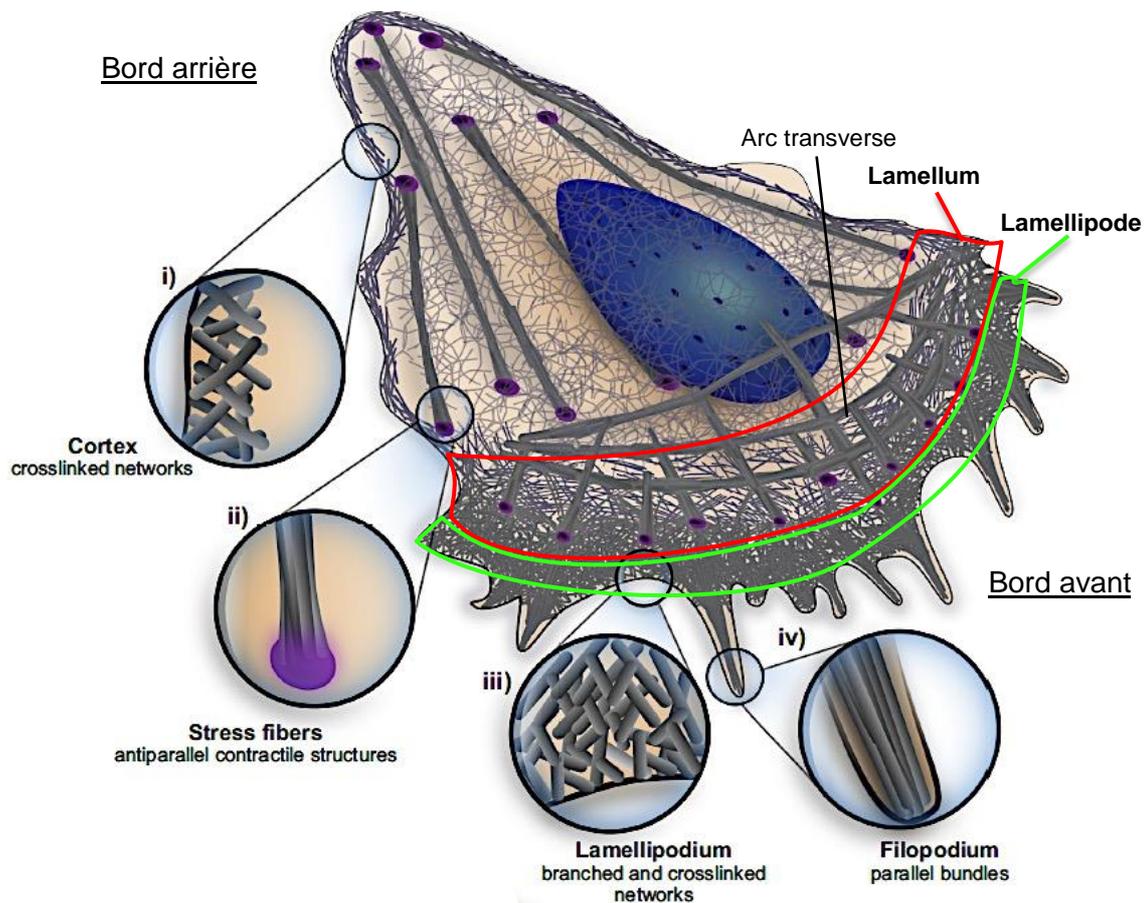


Figure 9. Les filaments d'actine d'une cellule s'organisent en une diversité d'architectures.

i) Le **cortex cellulaire** est le réseau réticulé d'actine qui tapisse l'intérieur de la membrane cellulaire. ii) Les **fibres de stress** sont des câbles d'actine antiparallèles qui maintiennent la cellule sur son substrat. iii) Parallèle au bord avant de la cellule se trouve le **lamellipode** constitué d'un réseau très dense mais peu étendu de filaments d'actine. iv) Depuis ce réseau lamellipodial peuvent se former des **filopodes** constitués de câbles d'actine parallèles. Le **lamellum**, qui fait suite au lamellipode vers l'intérieur de la cellule, comporte un réseau moins dense d'actine ainsi que des arcs transverse d'actine parallèles au bord-avant de la cellule. (Modifié de (Blanchoin et al. 2014) .

1.2.1 - Câbles : fibres de stress, arcs transverses, filopodes

Les câbles d'actine sont formés de multiples filaments d'actine alignés et empaquetés suivant des orientations parallèle ou antiparallèle. Ces différences d'orientation sont cruciales puisqu'en donnant des propriétés distinctes aux câbles, elles permettent la sélectivité de l'interaction avec d'autres protéines et dont l'action sera spécifique à ces structures.

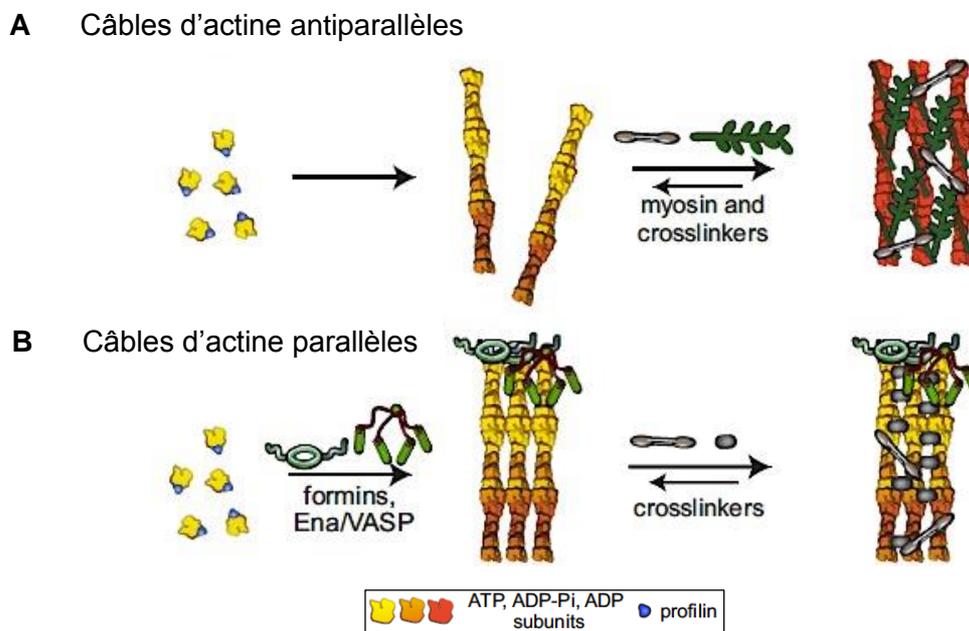


Figure 10. Structure des câbles d'actine.

Les fibres d'actine sont constituées de filaments alignés et maintenus par des protéines de pontage. L'alignement antiparallèle permet l'interaction avec des moteurs moléculaires (A) pour former les fibres de stress, tandis qu'un alignement parallèle formé par des polymérases processives (B) est retrouvé dans les filopodes. (Blanchoin et al. 2014)

- **Les fibres de stress** sont des fibres parallèles d'actine, contractiles, et localisées au niveau de la face ventrale de la cellule. Elles permettent à la cellule de se contracter et sentir l'environnement extérieur. L'assemblage et la contraction de ces fibres sont déclenchés lorsque les complexes membranaires d'adhésion (adhésions focales) lient un ligand de la matrice extracellulaire. Ces filaments antiparallèles sont pontés par l' α -actinine. Cette orientation optimiserait la contraction des fibres par les

myosines II (**Figure 10A**). Cette tension est nécessaire à la fois au maintien de l'adhésion de la cellule et à sa motilité. En effet, lors de la motilité, le bord-avant de la cellule avance tandis que le bord-arrière se rétracte de façon coordonnée.

- **Les arcs transverses** sont parallèles à la membrane plasmique du bord avant (**Figure 9**) et sont formés dans le lamellum par la coalescence de fragments d'actine F (Burnette et al. 2011). Ces fragments sont issus du désassemblage des réseaux d'actine du lamellipode adjacent. Ils sont dits de **polarité mixte**, comprenant à la fois des filaments parallèles et antiparallèles. Les arcs transverses sont un type particulier de fibres de stress qui ne sont pas en lien direct avec des adhésions focales, et qui subissent un flux rétrograde vers le centre de la cellule. Ils sont couplés aux fibres de stress dorsales, qui n'ont qu'un point d'attache avec le substrat. Ce couplage permet, lors de la contraction des arcs transverses, de maintenir la morphologie aplatie des cellules en migration sur une surface plane (Burnette et al. 2014)

- **Enfin, les filopodes** sont des extensions membranaires fines de la cellule qui ont un rôle de « senseur ». Ils contiennent des filaments d'actine **parallèles**. Ils sont allongés grâce aux formines (**Figure 10B**), polymérases processives permettant l'assemblage rapide de monomères à l'extrémité barbée et maintenant les extrémités barbées dynamiques à la membrane plasmique.

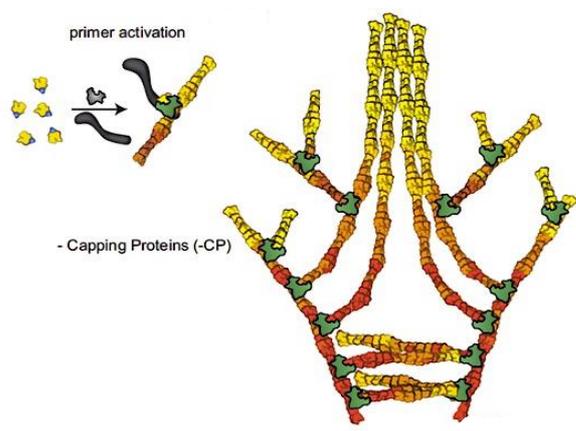


Figure 11. Transition réseau branché-filopode

Les branches d'actine (nucléées par le complexe Arp2/3) dont les extrémités barbées sont libres, sont allongées par des polymérases processives et forment un câble des filaments parallèles (Figure 9B). Ce câble constituera le filopode. (Blanchoin et al. 2014)

Ces câbles sont pontés par les fascines, protéines courtes qui maintiennent les filaments proches les uns des autres. Les filopodes prennent naissance à partir du réseau branché d'actine du lamellipode (Svitkina et al. 2003)(**Figure 11**) .

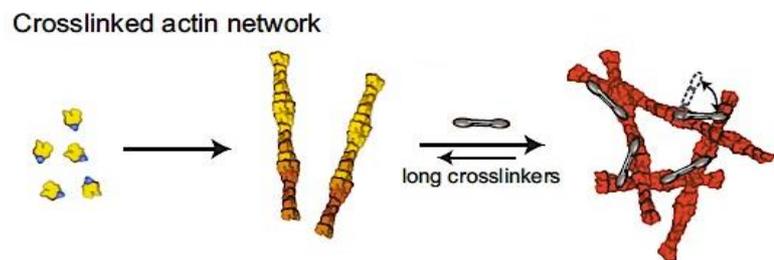
1.2.2 - Réseaux réticulés : le cortex intracellulaire

Parmi les “réseaux” d'actine, on peut distinguer deux configurations: soit un réseau formé à partir de nombreuses arborescences de filaments, décrits dans la section suivante, soit un réseau formé de filaments peu branchés et de faisceaux qui se croisent, et qui sont liés entre eux par des protéines de pontage (**Figure 12**).

Figure 12. Réseaux réticulés d'actine

Les filaments d'actine sont reliés entre eux par des protéines de pontage qui leur permettent de prendre la configuration d'un réseau semblable à un maillage.

(Blanchoin et al. 2014)



Ce réseau de filaments d'actine réticulés par des protéines de pontage constitue le **cortex cellulaire**, situé sous la membrane plasmique. Il est ancré à cette dernière par l'intermédiaire de protéines de la famille ERM (Ezrin/Radixin/Moesin). Il donne à la cellule sa forme et ses propriétés mécaniques, notamment grâce aux myosines contractiles qui lui confèrent une certaine tension ; c'est ce qu'on appelle le cortex d'actomyosine.

Bien qu'attaché à la membrane et responsable de la rigidité cellulaire, le cortex d'actomyosine est une structure hautement dynamique et plastique. Par exemple, lors de la mitose il se réorganise en un anneau de cytokinèse hautement contractile qui permettra la séparation en deux cellules distinctes. Au cours de la motilité de type amiboïde, le cortex est ponctuellement découplé de la membrane plasmique et induit

des bourgeonnements (« blebs ») à la surface de la cellule (**Figure 13** ; voir aussi **Figure 20**).

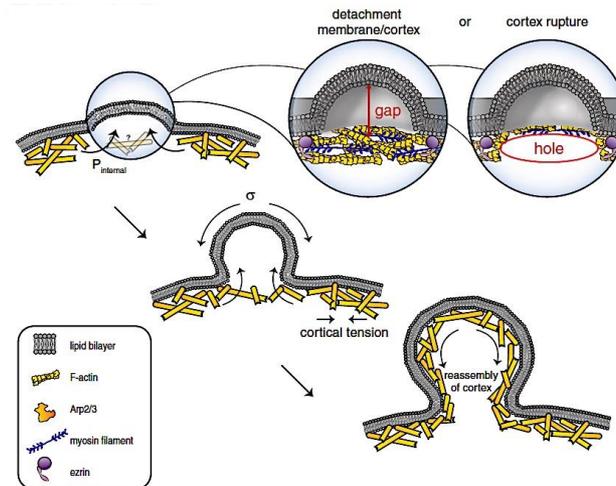


Figure 13. Mécanisme de formation des « blebs ».

Un découplage ponctuel entre la membrane cellulaire et le cortex d'actine sous-jacent induit localement une augmentation de la pression hydrostatique, et une déformation de la membrane plasmique (Sens & Plastino 2015)

1.2.3 - Réseaux dendritiques : le lamellipode

C'est l'architecture à laquelle je me suis intéressée tout au long de ma thèse. C'est un réseau d'actine constitué de l'enchevêtrement très compact de filaments arborescents (Svitkina & Borisy 1999a). Il est stabilisé par des protéines de pontage telles que l' α -actinine et la filamine mais dans une moindre mesure par rapport au cortex cellulaire.

Les branches sont nucléées grâce au complexe protéique Arp2/3 (**Figure 14**). Ce complexe se fixe sur le côté d'un filament pré-existant (filament mère) et nucléée une nouvelle branche d'actine (filament fille). Le complexe Arp2/3 (Actin-Related Protein 2/3) est constitué de sept sous-unités, dont Arp2 et Arp3. Elles ont une structure proche du monomère d'actine, ce qui facilite la formation d'un filament d'actine (tel que décrit en détail dans la section suivante). Les réseaux branchés

d'actine générés à partir de plusieurs filaments mères s'enchevêtrent et forment ainsi un gel d'actine de forte densité.

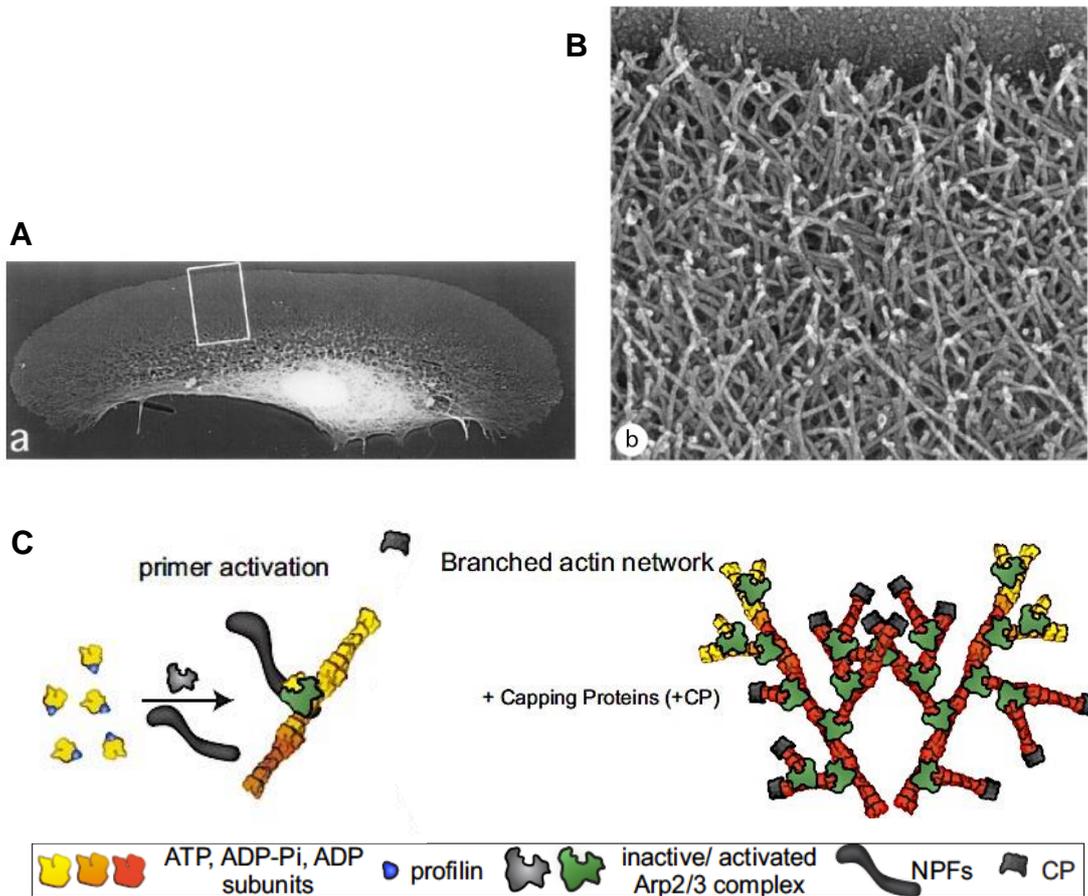


Figure 14. Réseaux branchés d'actine

Le kératocyte de poisson présente un large lamellipode (a). Celui-ci est constitué de réseaux d'actine dendritique, mise en évidence en microscopie électronique (B) (Svitkina et al. 1997). La formation de ces réseaux est schématisée en C (Blanchoin et al. 2014).

Ce réseau dendritique est localisé dans le lamellipode. Il possède des propriétés mécaniques et dynamiques propres. C'est ce réseau branché qui est à l'origine de la génération des forces propulsives nécessaires à la motilité cellulaire (Theriot & Mitchison 1991). Le détail de cette propriété est décrit dans la section suivante.

1.3 - Nucléation dendritique des filaments d'actine et génération de forces propulsives

1.3.1 - Les acteurs moléculaires de la formation d'un réseau dendritique

La formation de filaments d'actine branchés se fait en en plusieurs étapes, garantissant la régulation spatiale et temporelle de l'initiation d'un réseau d'actine. Brièvement, ces étapes sont :

- La réception d'un signal du micro-environnement et l'activation des protéines WASP/Scar ;
- L'activation du complexe Arp2/3 puis la nucléation et l'élongation d'une branche d'actine ;
- La terminaison de l'élongation par la Capping Protein.

1.3.1.1 - Activation des protéines WASP/Scar

La cascade d'activation est initiée lorsque la cellule reçoit un signal de son microenvironnement qui, par l'intermédiaire des petites protéines G de la famille Rho, Rac et CDC42, active les protéines membranaires de la famille WASP/Scar (*Wiscott-Aldrich Syndrom Protein*). Leur activation est nécessaire pour qu'elles puissent à leur tour activer le complexe Arp2/3.

Ces protéines possèdent une région N-terminale d'interaction avec le filament d'actine, suivie par une région régulatrice permettant notamment son adressage à la membrane plasmique et une région polyproline, et enfin un domaine effecteur C-terminal. Ce domaine effecteur, nommé WA ou VCA, est lui-même subdivisé en trois parties : V (ou W), C et A (**Figure 15**)

Le domaine WA est constitutivement inactif au sein des protéines WASP/Scar du fait de leur repli (**Figure 15**), et se retrouve exposé suite à la signalisation par les petites protéines G. Au cours de ma thèse, afin de contourner cette étape de régulation cellulaire, j'ai utilisé le fragment WA flanqué de la partie polyproline de la protéine WASP pour l'assemblage de réseaux dendritiques *in vitro*.

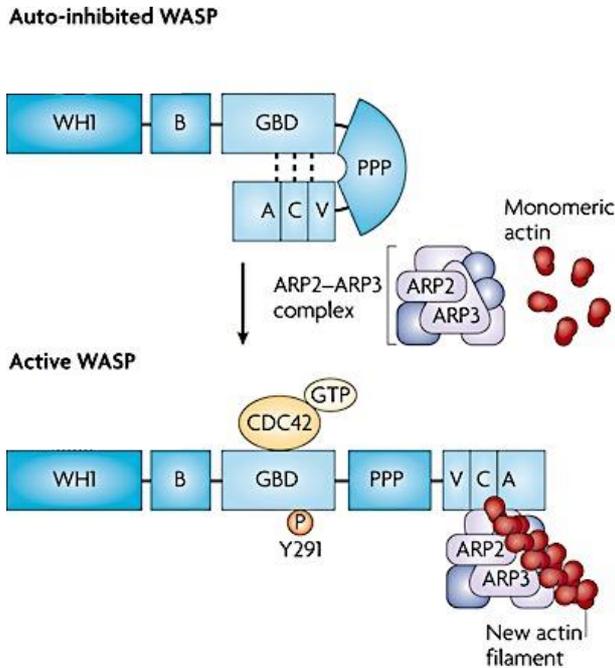


Figure 15. Domaines et activation des protéines de la famille WASP.

Les interactions intramoléculaires entre la région VCA et la région GBD confèrent à WASP un état auto-inhibé. L'interaction avec les CDC42 lève cette inhibition et permet à la protéine d'interagir avec le complexe Arp2/3 et les monomères d'actine pour former un nouveau filament. La phosphorylation sur Tyrosine 291 du domaine GBD pourrait stabiliser la conformation active de WASP. (Modifié depuis Thrasher and Burns, 2010).

La partie « V » (ou « W ») est responsable de l'interaction avec un monomère d'actine grâce à deux régions WH2 (*verprolin homology*), tandis que la seconde (« C ») est une région centrale. Enfin, la région acide « A » permet le recrutement du complexe Arp2/3. Le nombre de molécules de WASP/Scar nécessaires pour l'activation d'Arp2/3 a été sujet à débat ; cependant des études récentes confirment une activation par deux molécules de WASP/Scar (Smith et al. 2013; Boczkowska et al. 2014).

1.3.1.2 - Nucléation de branches d'actine par le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 possède sept sous-unités (**Figure 16C**) dont deux sous-unités – *Arp 2* et *Arp 3* – de structure semblable à celle des monomères d'actine. Lorsque ces deux sous-unités lient un monomère d'actine, elles forment l'amorce (ou nucléus) d'actine, indispensable à l'élongation d'un nouveau filament.

Toutefois dans la configuration native du complexe, *Arp 2* et *Arp 3* sont éloignées et n'interagissent pas. Le complexe doit être activé par WASP/Scar et interagir avec le côté d'un filament pré-existant pour changer de conformation. Cela permet de placer les sous-unités Arp2 et Arp3 sous la forme d'un hétérodimère

reproduisant l'équivalent d'une extrémité barbée d'un filament d'actine.

Dans cette configuration active, le complexe Arp2/3 possède toute sa capacité nucléatrice et l'élongation d'un nouveau filament est possible par simple addition de monomères à l'extrémité barbée.

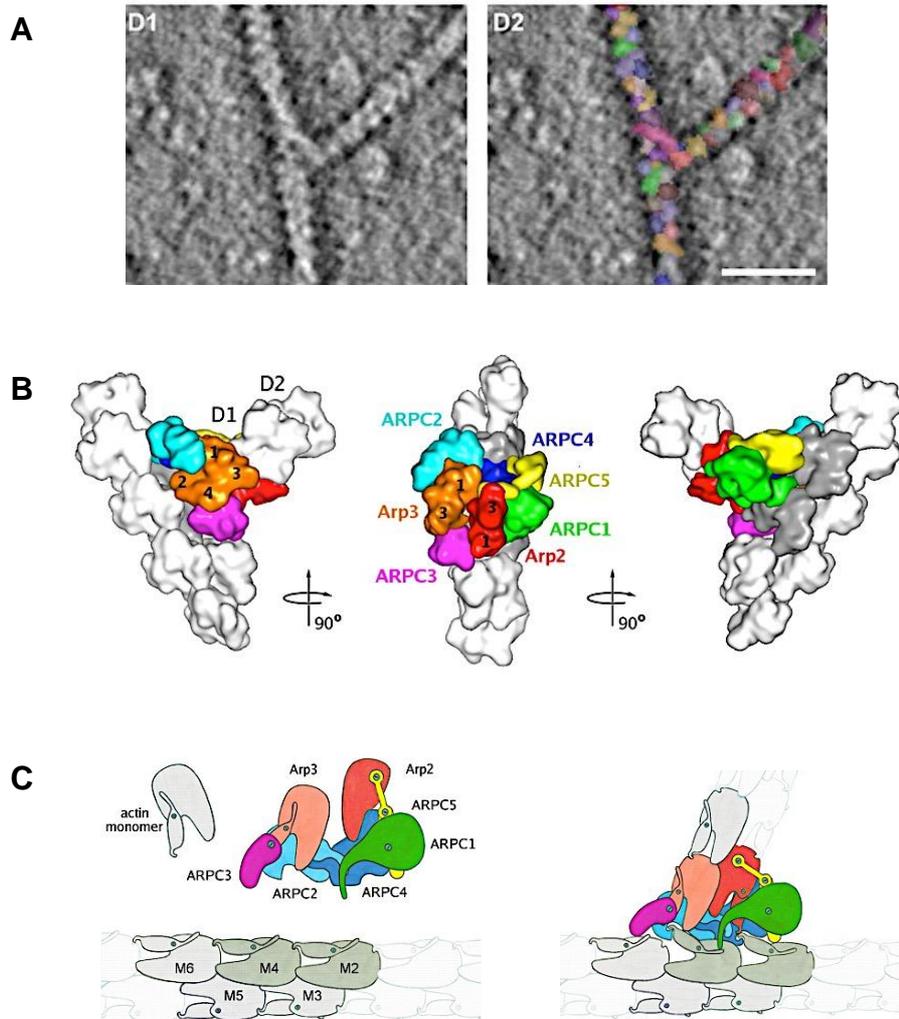


Figure 16. Le complexe Arp2/3 est à la jonction de branches d'actine-F.

A : Tomographie électronique d'une jonction filament-branche générée par le complexe Arp2/3, en forme caractéristique de Y. A droite : jonction automatiquement segmentée montrant les sous-unités individuelles d'actine et la structure de la jonction. Echelle : 20 nm. B : Représentations de surface de la jonction filament-branche ; trois vues à des rotations horaires de 90°. Les sous-unités d'actine sont en blanc ou en gris. D1 et D2 sont les deux premières sous-unités du filament-fille. C : Représentation schématique de la formation d'une jonction filament-branche. A gauche : le complexe Arp2/3 inactif, un filament d'actine et un monomère ; M1–6 sont les sous-unités du filament-mère. A droite : modèle du branchement par Arp2/3. La sous-unité M4 prend la conformation d'un monomère par rapprochement de la sous-unité Arp2 de la sous-unité Arp3 du complexe pour former les deux premières sous-unités d'un filament-mère. (Adapté de Rouiller et al., 2008)

Une étude récente en molécule unique (Smith et al. 2013) suggère un modèle dans lequel non seulement il faut un dimère de WASP pour activer le complexe, mais il faut également que les domaines *WA* se détachent du complexe Arp2/3 après interaction avec le filament. Ce détachement de WASP libère la branche naissante pour permettre son élongation (« *untethered elongation* ») (**Figure 17**).

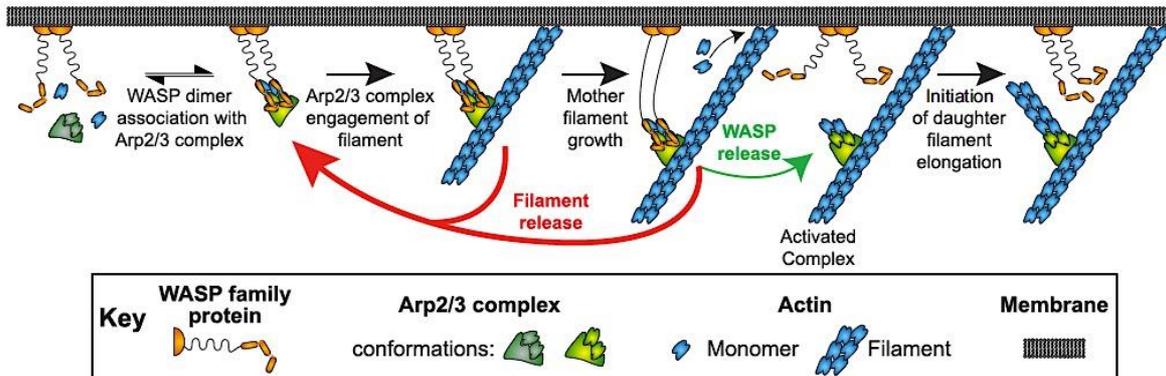


Figure 17. Modèle de détachement du dimère de WASP pour permettre l'élongation d'une nouvelle branche à partir du complexe Arp2/3 (Smith et al. 2013)

Le complexe Arp2/3 a une activité nucléatrice autocatalytique : chaque nouvelle branche formée devient le substrat pour l'activation d'autres complexes Arp2/3 et la génération d'autres branches d'actine (Svitkina & Borisy 1999a) . Ce processus génère des réseaux dendritiques, également appelés réticulés ou arborescents.

L'analyse en microscopie électronique montre que l'architecture de ces réseaux est contrôlée, caractérisée par un angle de 70° entre la branche fille formée par Arp2/3 et le filament mère comme sur la **Figure 16A**. (Machesky et al. 1994; Mullins et al. 1998; Svitkina & Borisy 1999a). De plus, la densité des réseaux formés en solution est positivement corrélée à la concentration en Arp2/3 dans le milieu : plus il y a de complexe Arp2/3, plus il y aura de branches formées par filament (Blanchoin et al. 2000a) . Cependant, le complexe Arp2/3 ne suffit pas à déterminer la densité des réseaux dendritiques *in vivo*. La longueur des filaments du réseau joue aussi un rôle déterminant ; cette longueur est contrôlée par la Capping Protein.

1.3.1.3 - La coiffe des filaments par la Capping Protein et la formation d'un gel d'actine

La coiffe des extrémités barbées des branches d'actine par la Capping Protein (CP) empêche l'addition de nouveaux monomères et permet ainsi de contrôler la longueur des filaments du réseau. Cela a deux conséquences : le contrôle de la densité du réseau, et le contrôle de la rigidité du réseau.

- Densité du réseau :

Elle est caractérisée par la maille du réseau, c'est-à-dire par l'espace entre les filaments d'actine qui constituent le réseau. Grâce à la CP, les filaments sont courts et leur enchevêtrement forme un réseau dense.

- Rigidité du réseau :

Le filament d'actine est un polymère semi-flexible, avec une longueur de persistance de $L_p=10 \mu\text{m}$. Cela signifie qu'au-delà de cette L_p , le filament est flexible. A l'inverse, en-dessous de cette L_p , le filament est rigide. En stoppant l'élongation des filaments, la CP permet d'avoir des filaments suffisamment courts pour être rigides. En conséquence, le réseau lui-même sera rigide.

Ce gel d'actine à la fois dense et rigide est optimal pour la production des forces propulsives indispensables à la motilité cellulaire.

1.3.2 - Les forces propulsives du réseau d'actine

Actuellement, deux approches complémentaires existent pour décrire la génération de force par le réseau d'actine.

❖ Premièrement, c'est l'approche du **cliquet brownien** (« brownian ratchet »). Il s'agit de considérer les extrémités barbées libres des filaments, donc encore capables d'élongation, et leur contact à la membrane en y intégrant le paramètre de mouvement brownien dû aux fluctuations thermiques.

Dans le premier modèle du cliquet brownien, le filament est considéré comme rigide et orthogonal à la charge à déplacer, soit la membrane plasmique dans le cas qui nous intéresse (**Figure 18A**). Ce sont les fluctuations thermiques de la membrane plasmique, qui permettent la création d'un espace entre extrémité barbée d'un filament et la membrane. Cet espace est suffisant pour l'incorporation d'un monomère dans ce filament (Peskin et al. 1993).

L'allongement du filament rigide empêcherait la membrane de revenir à sa position initiale, donc la pousserait en avant à chaque addition de monomère. Or ce modèle qui considère que les filaments sont orthogonaux à la membrane s'est trouvé en contradiction avec les observations in vivo du réseau lamellipodial au bord avant des kératocytes où les filaments sont orientés à 45° de la membrane plasmique. (Small et al. 1995)

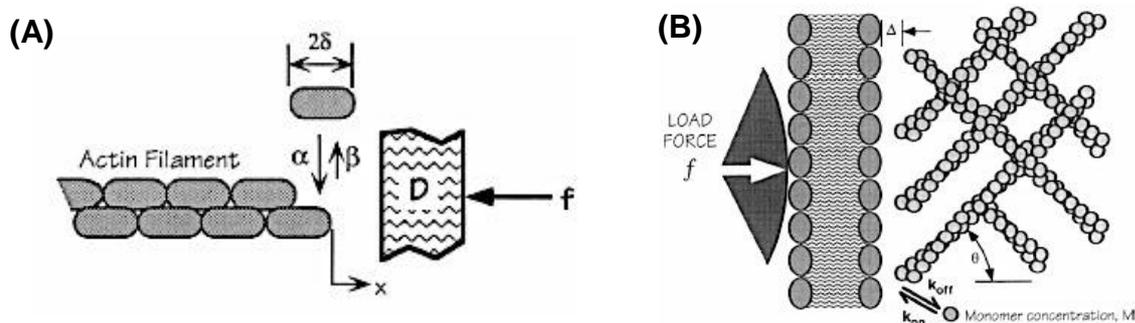


Figure 18. Modèles physiques de description du mouvement cellulaire.

(A) Modèle du cliquet brownien : le mouvement aléatoire de la charge (ou de la membrane) permet l'intercalation d'un monomère d'actine et l'élongation d'un filament rigide et orthogonal à la charge, qui déplace la charge en avant. (Tiré de Peskin et al., 1993) .

(B) Modèle du cliquet brownien élastique : les fluctuations thermiques des filaments d'actine, flexibles et orientés à un angle θ par rapport à la membrane, permettent l'insertion d'un monomère d'actine. L'élongation des filaments déplace la membrane en avant. (Tiré de Mogilner and Oster, 1996).

Ce modèle a donc dû être revu, et a donné naissance au modèle **du cliquet brownien élastique** (Mogilner & Oster 1996). Cette fois, le filament d'actine est flexible et avec un certain angle par rapport à la membrane (**Figure 18B**).

Egalement, ce sont les fluctuations aléatoires des filaments d'actine flexibles (et non de la membrane) qui permettent la création d'un espace entre la membrane plasmique et le filament pour l'incorporation de monomères. Le filament en élongation pousse alors la membrane plasmique. Dans ce modèle, la membrane plasmique n'est pas vue comme aussi flexible que dans le modèle de Peskin et al. en raison des nombreuses protéines membranaires, en particulier aux sites de polymérisation de l'actine, qui affaibliraient les fluctuations membranaires (Mogilner & Oster 1996).

❖ Le modèle de Mogilner et Oster ressemble à la deuxième approche pour décrire les forces générées par un réseau d'actine : le **modèle élastique de masse (Figure 19)**. Cette fois, il s'agit de considérer le réseau d'actine (généralisé par le complexe Arp2/3) comme un gel viscoélastique dont la composante élastique permet d'emmagasiner et de restituer la force nécessaire au déplacement de billes couvertes d'activateur d'Arp2/3 (Bernheim-Groswasser et al. 2005). Par ailleurs, le module élastique d'un tel réseau d'actine peut être mesuré grâce à des expériences de compression et d'étirement de la comète d'actine (Marcy et al. 2004).

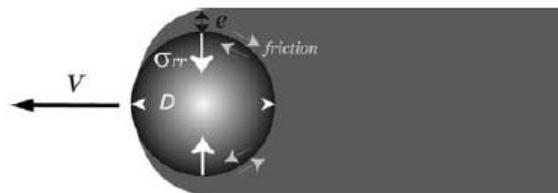


Figure 19. Modèle élastique de masse de la propulsion par un réseau d'actine.

Une bille d'un diamètre D se déplace à une vitesse V grâce à la polymérisation d'un gel d'actine (en gris) d'épaisseur e . Il existe des frictions entre la comète d'actine et la surface de la bille. L'élasticité du gel d'actine induit un stress σ_{rr} normal à la surface de la bille. La vitesse de la bille dépend de l'équilibre entre la force de propulsion élastique du gel et la friction. La force élastique développée par le gel d'actine est proportionnelle au cube de l'épaisseur du gel. (Bernheim-Groswasser et al. 2005)

In vitro, cette propriété élastique a été mise dans la perspective de la réponse à une contrainte (application de force, rigidité du substrat), et a permis de démontrer que la polymérisation d'un réseau s'adapte aux contraintes rencontrées (Parekh et al. 2005). Si on applique une force à un réseau branché en cours de polymérisation dans le sens contraire de sa croissance, la vitesse de croissance du réseau diminue et le réseau se densifie. Cela permet un recrutement accru de complexes Arp2/3 et donc l'augmentation de la force générée par la polymérisation du réseau. Si ensuite la contrainte est supprimée, ce réseau reste dense mais voit sa vitesse de croissance augmentée. Ainsi, la vitesse de croissance d'un réseau d'actine et les forces générées dépendent de l'historique de l'adaptation de ce réseau à des contraintes.

Au final, ces deux approches sont complémentaires pour décrire la génération, par un réseau croissant d'actine branchée, de forces propulsives. Ces approches ont été utilisées pour décrire la motilité cellulaire *in vivo* aussi bien que dans les essais de motilité reconstituée sur particules inertes ou avec des pathogènes.

Cependant, une étude récente des comètes d'actine propulsant le pathogène *Baculovirus* va plus dans le sens du cliquet brownien élastique que dans le sens du modèle élastique de masse. En effet, des quantifications à partir d'images de comètes en tomographie électronique et des reconstitutions *in silico* ont mis en évidence la nécessité d'avoir simultanément 4 filaments qui polymérisent face à la surface du virus (Mueller et al. 2014). Egalement, et contrairement à ce qui est proposé en **Figure 17**, les branches d'actine qui participent à la propulsion doivent être attachés à la surface du virus.

Dans la partie suivante, j'aborderai la motilité cellulaire du point de vue biochimique et physiologique.

1.4 - Les migrations cellulaires

Dès les stades précoces du développement des organismes pluricellulaires, les cellules acquièrent la capacité à répondre à leur microenvironnement (chimiotaxie pour les gradients de molécules de signalisation extracellulaires, durotaxie pour les

gradients de rigidité du substrat, etc.) et à se mouvoir vers des sites spécifiques. Cette capacité persiste chez l'organisme adulte, pour le meilleur mais parfois pour le pire : alors qu'elle est indispensable dans le processus de cicatrisation par exemple, elle devient problématique lorsque des cellules cancéreuses acquièrent la possibilité de se disséminer dans l'organisme.

La motilité cellulaire nécessite un remodelage cellulaire et l'extension de plusieurs types de protrusions. La migration la plus archaïque est de type « amiboïde » ; elle concerne les amibes mais également certains leucocytes. Ce type de locomotion se fait grâce aux pseudopodes, qui sont des extensions membranaires longitudinales. Les invadopodes sont des protrusions longitudinales spécialisées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, ce qui permet à ces cellules de devenir invasives.

Il existe un type particulier de migration cellulaire grâce à la formation de bourgeonnements (« blebs ») formés par la pression hydrostatique du cytoplasme à travers une rupture ponctuelle du cortex d'actine (**Figure 13**). C'est un type de migration où l'adhésion cellulaire est moindre, et caractéristique des environnements tissulaires en 3D (Friedl & Wolf 2009) (**Figure 20**).

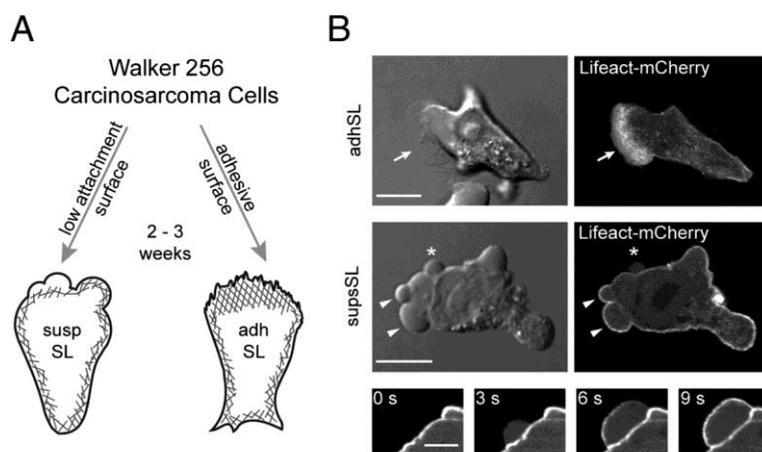


Figure 20. Migration par lamellipode vs migration par blebs

Des cellules de carcinosarcome changent leur type de migration suivant l'adhésivité du substrat : lamellipode (B, panel haut) ou blebs (panel bas) (Bergert et al. 2012)

Au contraire, la migration par émission de filopodes et de lamellipodes est caractéristique des cellules attachées à leur substrat et qui migrent essentiellement sur des surfaces planes. Cette migration en 2D se fait grâce à des cycles de protrusion/rétraction de la cellule. La cellule sonde son environnement grâce aux filopodes, puis elle se propulse en avant vers le site d'intérêt par l'extension d'un lamellipode et forme de nouveaux points d'ancrage à l'avant de la cellule. Pour équilibrer cette extension en avant, l'arrière de la cellule se rétracte par désassemblage des adhésions focales et contraction des fibres de stress (**Figure 21**)

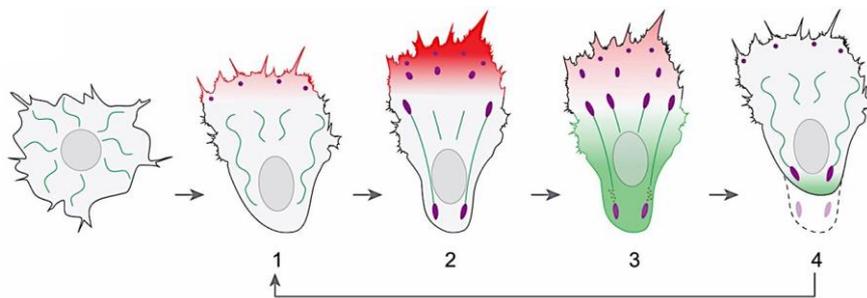


Figure 21. Le cycle de migration cellulaire par propulsion-rétraction

Cette migration met en jeu des processus actine-dépendants (en rouge), d'adhésion cellule-substrat (adhésions focales, en violet) et l'actine de la Myosine II (en vert).

Sur un surface en 2D, les cellules répètent les étapes de (1) extension du bord-avant et formation d'adhésions immatures ; (2) maturation des adhésions cellule-substrat en adhésions focales; (3) translocation en avant du corps de la cellule ; et (4) désassemblage des adhésions focales couplé à la rétraction du bord-arrière. (Reig et al. 2014)

Le lamellipode lui-même est un organe extrêmement dynamique : la polymérisation du réseau d'actine propulsif est compensée par une dégradation du réseau plus en arrière (on parle de « turnover » de l'actine). Seulement, la complexité moléculaire d'une cellule, et à fortiori d'un lamellipode, rend difficile son étude détaillée *in vivo*.

Dans le cadre de ma thèse, je me suis intéressée à la dynamique du réseau lamellipodial reconstitué *in vitro* à partir de protéines purifiées, qui permettent de s'affranchir de cette difficulté en utilisant les protéines nécessaires et suffisantes. Je me suis attachée à étudier les mécanismes moléculaires à l'origine du "turnover" du

réseau ainsi que la production de force par ce même réseau.

Dans la partie suivante, je décrirai les caractéristiques morphologiques et biochimiques du réseau lamellipodial.

1.4.1 - La motilité cellulaire : le lamellipode

Le lamellipode est l'organe moteur de la cellule ; c'est un feuillet cellulaire épais de 200 à 300 nm et s'étend généralement sur 1 μm au bord avant de la cellule. Il est constitué d'un réseau d'actine branché fin, de l'ordre de 200 nm, mais extrêmement dense. Les branches générées par le complexe Arp2/3 sont courtes et rigides du fait de l'action de Capping Protein. Dans son ensemble ce réseau se comporte alors comme un matériau rigide capable de déformer et propulser la membrane plasmique dans le sens de la migration.

Dans un organisme pluricellulaire, la motilité cellulaire débute dès l'embryogenèse. Lors d'une phase appelée gastrulation, l'émission de pseudopodes par les blastocystes permet la migration et la différenciation en différents feuillets embryonnaires (épi-, méso- et endoderme). Dans le système nerveux, les neurites en développement présentent des cônes de croissance avec des filopodes et lamellipodes dynamiques leur permettant le guidage axonal vers leur cible.

L'établissement d'un système vasculaire nécessite également une migration des cellules endothéliales. Durant la réponse immunitaire, les globules blancs sont capables d'une extraordinaire réorganisation et déformation : ils passent de cellules libres du sang à des cellules adhérentes capables de migrer à travers les capillaires jusqu'aux tissus infectés ou endommagés. Enfin, lors de la cicatrisation, les cellules épithéliales migrent en cohorte vers le site endommagé afin de reformer une couche cellulaire.

En plus de ces cas physiologiques d'établissement de la motilité cellulaire, il existe des contextes pathologiques. L'exemple le plus souvent retenu est celui de l'établissement de métastases : les cellules cancéreuses jusqu'ici quiescentes

acquièrent la capacité à migrer à travers la tumeur jusqu'aux capillaires sanguins et à se disséminer dans la circulation sanguine.

Dans le système nerveux, il semblerait qu'une mutation du gène de la Profiline1 soit impliquée dans la sclérose latérale amyotrophique. Cette mutation entraînerait des défauts dans les cônes de croissance, avec un ratio actine F/ actine G diminué (Wu et al. 2012b)

Ainsi, la compréhension des mécanismes de formation et de fonctionnement du lamellipode dans la motilité est d'une importance cruciale.

Enfin, il existe des organismes pathogènes intracellulaires, responsables de pathologies humaines sévères, capables de migrer à travers leurs cellules hôtes en détournant la machinerie de polymérisation de leur cytosquelette par un mécanisme qui sera décrit dans le paragraphe suivant.

1.4.2 - Le détournement ou « hijacking » du système de motilité cellulaire par des pathogènes : réseaux propulsifs viraux et bactériens

Plusieurs pathogènes intracellulaires ont comme stratégie le détournement de la machinerie de polymérisation de l'actine de leur cellule-hôte afin de se propulser dans le cytoplasme. Avant de décrire comment cette capacité remarquable a été déterminante pour l'accélération du développement de systèmes de motilité reconstituée *in vitro*, je souhaite mettre l'accent sur les microorganismes ayant été décrits comme de formidables « hijackers » de la motilité de leur hôte.

- ♦ **Le virus de la Vaccine** est proche cousin du virus de la variole. Après son entrée et sa réplication dans la cellule-hôte, il se propage dans les cellules voisines grâce à la formation d'une comète d'actine (Cudmore et al. 1995). En fait, le virus de la vaccine va mimer la signalisation d'un récepteur Tyrosine-kinase. Le mécanisme est le suivant : le virus possède à sa surface une protéine, A36R, qui est phosphorylée dans la cellule et interagit avec la protéine adaptatrice Nck. Nck recrute alors la protéine N-WASP et entraîne la polymérisation d'une comète d'actine à la

surface du virus (Frischknecht et al. 1999).

Cependant, il a été démontré que ce détournement du système de motilité n'est nécessaire qu'au moment où les virions doivent entrer dans une cellule voisine, au contact de la membrane de la cellule-hôte. Le virus de la vaccine est répliqué au centre de la cellule, où il s'enveloppe d'une double-membrane dérivée du Golgi. Le transport du virus depuis le centre de la cellule à la périphérie est se fait alors sur les microtubules, via les kinésines et indépendamment de l'actine (Ward & Moss 2001; Rietdorf et al. 2001).

- ♦ **Les Baculovirus** infectant les cellules d'insectes. Ce sont des virus à ADN, donc dans un premier temps ils doivent rejoindre le noyau cellulaire pour leur réplication. Ceci est possible grâce à une protéine de la capsid virale, P78/83, qui contient une région VCA similaire à celle des protéines WASP. P78/83 active le complexe Arp2/3 et permet la formation d'une comète d'actine qui leur permet d'entrer dans le noyau à travers les pores nucléaires (Ohkawa et al. 2010). Dans un second temps, la polymérisation d'une comète d'actine par le système P78/83-Arp2/3 est nécessaire pour transloquer le virus dans le cytoplasme et infecter des cellules voisines (Goley et al. 2006)

- ♦ **Listeria monocytogenes** est une bactérie pathogène intracellulaire. Elle exprime à sa surface la protéine ActA, qui possède une homologie fonctionnelle et structurale avec les protéines de la famille WASP/Scar (Boujemaa-Paterski et al. 2001; Zalevsky et al. 2001). ActA peut recruter et activer le complexe Arp2/3 à la surface de bactérie, conduisant à l'assemblage d'un réseau branché de filaments d'actine qui sert à propulser la bactérie à travers le cytoplasme (Loisel et al. 1999; Welch et al. 1997). Substantiellement, c'est la distribution asymétrique et localisée de ActA à la surface bactérienne (Kocks et al. 1993), qui induirait une croissance polarisée du réseau de filaments d'actine à un pôle de la bactérie.

Les études poussées de la propulsion actine-dépendante de *Listeria* en ont fait un organisme modèle pour la compréhension de la motilité par les réseaux d'actine, notamment par l'utilisation de protéines purifiées pour reconstituer la motilité de la

bactérie in vitro.

1.4.3 - Système protéique nécessaire et suffisant pour l'assemblage de réseaux branchés d'actine

La découverte du détournement du système de motilité actine-dépendante pour la propulsion des micro-organismes a été un tournant majeur dans l'élaboration de systèmes de motilité reconstituée. En effet, les travaux de Loisel et al en 1999 ont démontré qu'il était possible de reconstituer un système de motilité fonctionnel à l'aide de 5 molécules essentielles (Loisel et al. 1999): ActA (exprimé à la surface des *L. Monocytogenes*), l'actine (à l'équilibre entre actine F et G), le complexe Arp2/3, la Capping Protein et l'ADF/Cofiline.

Depuis, ces investigations ont été développées et appliquées à l'étude des mécanismes biochimiques de contrôle de la motilité actine-dépendante selon une approche « *bottom-up* » : partir de constituants minimaux pour recréer des systèmes simplifiés et éventuellement monter en complexité.

Dans le cadre de cette thèse, j'ai utilisé un système similaire pour former des réseaux dendritiques d'actine à partir de protéines minimales purifiées. Grâce à la manipulation de la nature et de la concentration de ces protéines, il est possible d'altérer la dynamique de ces réseaux afin d'en comprendre la régulation. Dans la partie suivante, je reviens sur les facteurs régulant la dynamique de l'actine.

Mécanisme de formation et de maintien d'un lamellipode, vue d'ensemble:

Actuellement, et grâce notamment aux expériences de motilité reconstituée, le modèle retenu des mécanismes moléculaires en jeu pour la formation du lamellipode est le **modèle dendritique** tel qu'illustré dans la **Figure 22**.

Pour des raisons de simplification, le modèle décrit ici ne prend en compte que

le cas des stimuli extracellulaires (*étape 1*).

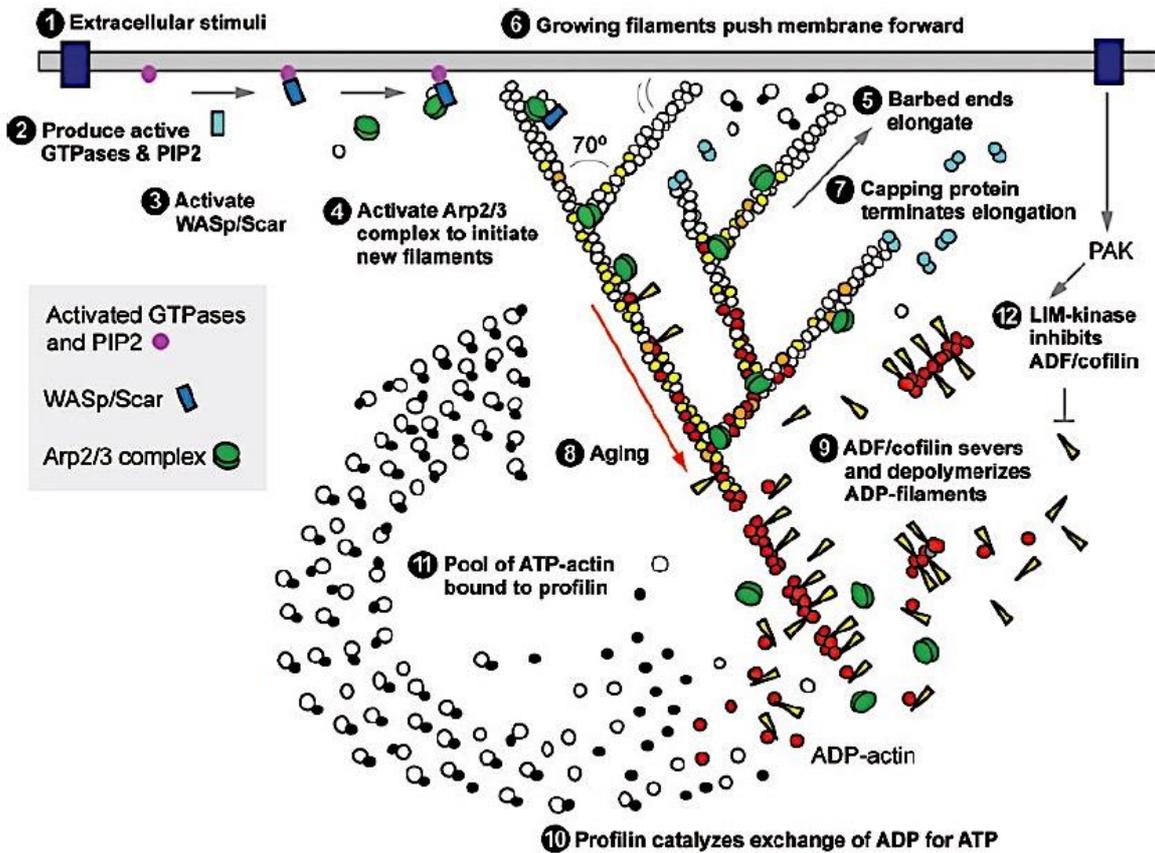


Figure 22. Modèle de nucléation dendritique et de recyclage de l'actine.

Voir dans le texte pour la description. (Pollard 2007)

Un stimulus active un récepteur, qui active des GTPases et le PIP2. Ce dernier recrute les protéines de la famille des WASP à la membrane (*étapes 2-3*), qui à leur tour recrutent et activent localement le complexe Arp2/3.

Ce complexe activé se fixe sur le côté d'un filament préexistant et initie une nouvelle branche d'actine-F (*étape 4*). L'élongation rapide des extrémités barbées des filaments (*étape 5*) déforme et pousse la membrane cellulaire vers l'avant (*étape 6*). Rapidement, l'élongation est stoppée par la fixation de la CP (*étape 7*). Il est à noter que la croissance de ce réseau nécessite un équilibre très régulé entre la nucléation autocatalytique de nouveaux filaments par le complexe Arp2/3 et l'inhibition rapide de leur croissance par la CP.

A mesure que le réseau branché d'actine croît face à la membrane, le réseau précédemment formé est éloigné en arrière. Ce réseau « vieillissant » est constitué d'actine-ATP-Pi et d'ADP (**étape 8**). La protéine d'ADF/cofiline se fixe préférentiellement sur les portions ADP des filaments, et les fragmente (**étape 9**).

Il existe une compétition entre ADF/Cofiline et Profiline pour le monomère d'actine libéré. L'affinité étant plus forte pour la Profiline (Blanchoin & Pollard 1998), celle-ci remplace l'ADF/Cofiline sur les monomères-ADP libérés et permet l'échange, au sein des monomères, du nucléotide ADP contre un ATP donc leur recyclage (**étape 10**).

Ce nouveau complexe profiline-actine-ATP, à présent disponible pour la polymérisation, s'ajoute exclusivement à l'extrémité barbée libre des filaments (**étape 11**). Enfin, le désassemblage du réseau par l'ADF/cofiline peut être inhibé par l'action de kinases, (**étape 12**) elles-mêmes activées par une cascade de signalisation en aval d'un stimulus.

Le désassemblage du réseau permet donc le recyclage des monomères et le turnover du réseau *in vivo*. Il est également responsable de la largeur constante du lamellipode dans une cellule en migration.

2- DYNAMIQUES DES RESEAUX D'ACTINE

2.1 - Thermodynamique de l'assemblage d'un filament d'actine

2.1.1 - Structure et biochimie de l'actine monomérique et filamenteuse

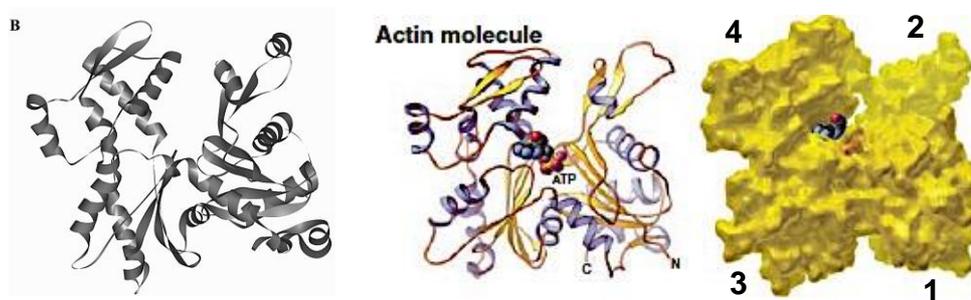


Figure 23. Le monomère d'actine est une molécule asymétrique.

Représentation de la structure sans (Dos Remedios et al. 2003) et avec une molécule d'ATP dans le sillon nucléotidique. Les sous-domaines sont numérotés (1 à 4). (Pollard & Cooper 2009).

La molécule d'actine a une structure asymétrique, composée de 4 sous-domaines. Ces sous-domaines sont structurés en hélices α et feuillets β repliés de façon à former un sillon (**Figure 23**) avec un site de liaison pour un nucléotide d'adénine (ATP ou ADP), et pour un cation divalent (Mg^{2+} ou Ca^{2+}).

La nature du nucléotide et du cation liés au monomère détermine la vitesse de polymérisation en actine F. D'une part, les monomères ont une plus grande affinité pour l'ATP que pour l'ADP. D'autre part, les monomères liant du Ca^{2+} polymérisent très lentement, tandis que les monomères- Mg^{2+} polymérisent dix fois plus vite (Pollard & Cooper 1986). En conditions physiologiques, les concentrations d'ATP et de Mg^{2+} sont telles que les monomères d'actine sont à l'état ATP- Mg^{2+} et

constituent un réservoir d'actine prêt à être polymérisé. (Pollard & Borisy 2003; Pollard & Cooper 1986; Pollard et al. 2000) .

Les monomères d'actine étant asymétriques, et assemblés suivant une orientation constante, le filament d'actine est **polarisé** : on peut distinguer une extrémité « **pointue** » et une extrémité « **barbée** ». L'extrémité barbée est dite « dynamique » : en raison de sa conformation structurale plus favorable, elle associe des monomères-ATP 10 fois plus vite que l'extrémité pointue (**Figure 25**).

Le filament d'actine est un polymère semi-flexible de structure hélicoïdale (**Figure 24**) . Il est donc caractérisé par :

- sa longueur de persistance ($L_p=10 \mu\text{m}$).
- son pas : un tour d'hélice fait 74 nm. La distance entre chaque monomère est de 27,6 Å. (Dominguez & Holmes 2011).
- sa torsion : elle peut être représentée par l'angle entre monomères adjacents.

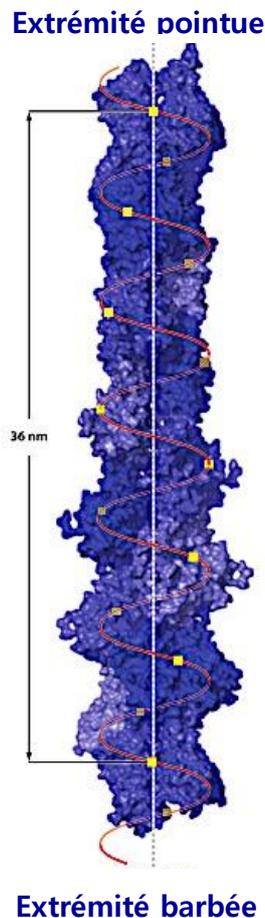


Figure 24. Structure du filament d'actine.

Le filament d'actine est une hélice gauche.

Un demi-tour d'hélice de 36 nm est constitué de 13 monomères. La distance entre chaque monomère est de 27,6 Å. Les monomères adjacents sont orientés à $-166,6^\circ$, ce qui confère l'apparence d'une double hélice à pas droit.

(Dominguez & Holmes 2011)

Enfin, l'ATP au sein des monomères est irréversiblement hydrolysé en ADP-Pi en quelques secondes puis le Pi est dissocié en 6 à 9 minutes (Blanchoin & Pollard 2002; Blanchoin & Pollard 1999). Cela signifie qu'au sein d'un filament, existe un **gradient** entre les portions « âgées » et celles nouvellement polymérisées.

Ce gradient biochimique contrôle l'interaction de protéines régulatrices avec le filament, comme par exemple l'ADF/Cofiline, qui se fixe préférentiellement aux sous-unités ADP.

2.1.2 - Thermodynamique et cinétique de la polymérisation de l'actine

2.1.2.1 - Etapes clés de la polymérisation de l'actine

La formation d'un filament d'actine se fait en plusieurs étapes : activation du monomère, nucléation, élongation jusqu'à l'état stationnaire.

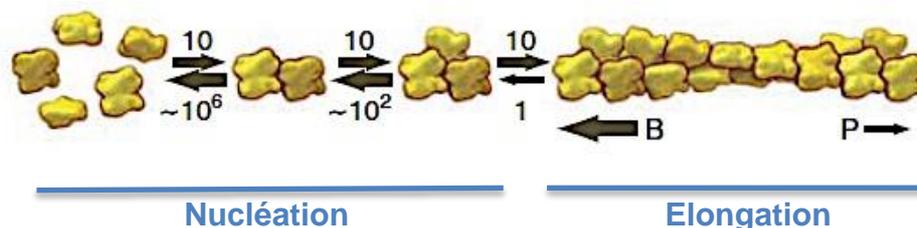


Figure 25. Les étapes de la formation d'un filament d'actine.

La nucléation est l'étape limitante car thermodynamiquement défavorable. A partir de cette formation d'un noyau constitué d'un trimère d'actine, l'élongation se poursuit (B : extrémité barbée ; P : extrémité pointue). (Modifié de Pollard and Cooper, 2009)

- ◆ Premièrement, les monomères d'actine doivent être « activés », c'est-à-dire rendus polymérisables grâce à la fixation d'ATP et de Mg²⁺ comme décrit précédemment.

- ◆ Ces monomères polymérisables peuvent alors nucléer un filament d'actine, et la nucléation est l'étape thermodynamiquement limitante de la polymérisation. Au-delà d'une **concentration critique** en monomères libres, conventionnellement C_c, il y a formation de « noyaux » d'actine, qui sont des

oligomères de 3 sous-unités d'actine (**Figure 25**). Ces 3 monomères initiaux subiraient une isomérisation qui leur donne une conformation hélicoïdale nécessaire pour l'addition thermodynamiquement favorable de nouveaux monomères.

♦ Enfin, l'élongation du filament peut se poursuivre jusqu'à ce que le polymère soit à l'état stationnaire, où il existe un équilibre dynamique entre filaments et monomères libres.

A ce stade, la concentration en monomères d'actine devient limitante : c'est la **concentration critique** en monomères libres, ou C_c . Quelle est la valeur de cette concentration critique?

2.1.2.2 - Cinétique de polymérisation de l'actine

La C_c peut être déterminée en considérant que chaque extrémité du filament est indépendante. A chaque instant, la vitesse d'assemblage de l'actine à une extrémité peut être décrite par l'équation 1 :

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

Avec :

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

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

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

Dans ce cas, la concentration critique est indépendante de la concentration en monomères ou de la quantité de filaments (notée [extrémité]).

Nous avons vu que l'extrémité barbée où se produit la polymérisation, est principalement ATP, alors que l'extrémité pointue est composée de sous-unités ADP. Néanmoins les sous-unités subterminales et terminales sont ATP à l'extrémité pointue. Cette différence de nucléotide, couplée à la différence de structure entre extrémité barbée et pointue, fait que la **concentration critique est 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:

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

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

On peut maintenant considérer la phase d'élongation comme un état de déséquilibre où la concentration en monomères n'atteint pas encore la concentration critique, et où l'équilibre est déplacé en faveur de la polymérisation. Par ailleurs, la concentration critique à l'extrémité barbée étant plus faible que celle de l'extrémité pointue, l'élongation du filament par l'extrémité barbée est favorisée.

De façon générale, d'après l'équation (1), les cinétiques du filament d'actine sont décrites par :

Polymérisation :

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

Dépolymérisation :

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

Or le nombre d'extrémités barbées est égal au nombre d'extrémités pointues. La concentration en monomères à l'équilibre atteindra en réalité 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 pour les deux extrémités :

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

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

C'est pour cela qu'on dit que l'état stationnaire correspond à un **équilibre dynamique** : bien que la concentration de monomères et de filaments reste stable macroscopiquement (0,17 μM), à l'échelle moléculaire la polymérisation et la dépolymérisation continuent et se compensent exactement à la vitesse :

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

On considère donc, dans ce modèle, qu'à chaque dissociation d'un monomère-ADP de l'extrémité pointue, l'ADP de ce monomère est libéré et échangé contre un ATP. Ce nouveau monomère-ATP est donc disponible pour un autre 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 26**).

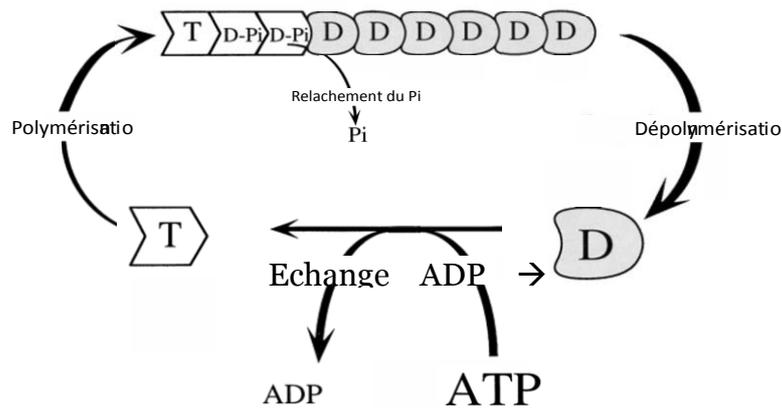


Figure 26. Modèle du treadmilling d'un filament d'actine.

Au cours de la polymérisation du filament d'actine, l'addition de monomères-ATP se fait préférentiellement à l'extrémité barbée. 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 libèrent leur ADP et fixent un nouvel ATP afin d'être à nouveau disponibles pour la polymérisation (Modifié à partir de Carlier & Pantaloni 1997).

Ce modèle du *treadmilling* peut décrire la polymérisation d'actine purifiée *in vitro*, mais il n'est pas adapté à la situation *in vivo*. 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.

Or dans le cas du treadmilling, les vitesses de polymérisation à l'extrémité barbée et de dépolymérisation à l'extrémité pointue seraient :

- 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 avec $V_{pol/depol} = 0,58 \text{ sous unités/s}$ 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 (contrairement au treadmilling) afin d'assurer un turnover efficace de l'actine.

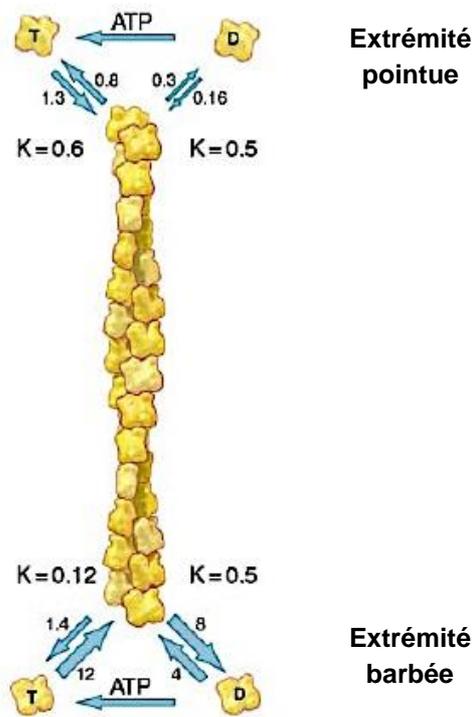


Figure 27. Cinétique de polymérisation du filament d'actine.

Les constantes d'association et de dissociation pour les deux extrémités, et en fonction de l'état nucléotidique du monomère, sont indiquées. (Pollard & Borisy 2003)

Par ailleurs, *in vitro* les filaments d'actine ne s'organisent pas spontanément en architectures de filaments d'actine telles que les réseaux branchés. La cellule a donc besoin de facteurs supplémentaires pour les former.

Alors, comment cette polymérisation est-elle contrôlée dans le temps et dans l'espace dans la cellule ? Quels sont les processus moléculaires par lesquels le filament est déstabilisé au point d'être désassemblé ? Comment un réseau entier d'actine peut-il être déstructuré ?

Dans le paragraphe suivant, je décrirai les facteurs contrôlant l'assemblage, mais également le désassemblage des filaments d'actine au sein des réseaux d'actine dendritique.

2.2 - Contrôle moléculaire de la dynamique des réseaux d'actine

2.2.1 - Assemblage et élongation

Comme nous l'avons vu dans un paragraphe précédent, les branches d'actine dans les réseaux de type lamellipodiaux sont formées grâce à l'action de **Arp2/3**, qui est un nucléateur d'actine. Ce nucléateur est activé par diverses protéines regroupées sous le nom de NPFs, pour « *nucleation promoting factors* ». Chez les mammifères il s'agit des protéines de la famille **WASP/Scar**, comme abordé précédemment.

Qu'il s'agisse du réseau branché ou des autres architectures de l'actine, une protéine-clé de régulation de l'actine est la **profiline**.

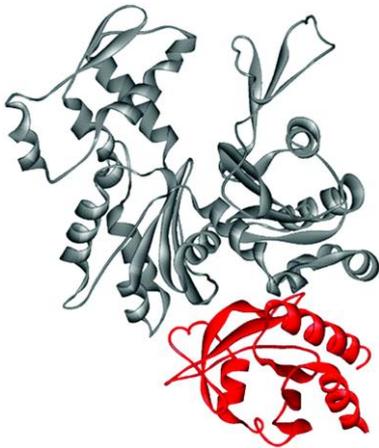


Figure 28. Structure atomique de la profiline

La profiline (rouge) est co-cristallisée avec un monomère d'actine (gris). Elle interagit avec les sous-unités 1 et 3 de l'actine.

(Dos Remedios et al. 2003)

Cette molécule de 14-19 kDa, très abondante dans la cellule (Buss et al. 1992), interagit avec l'actine monomérique-ATP avec une forte affinité ($K_d = 0,1 \mu\text{M}$) et forme un complexe profiline-actine avec un ratio 1 :1 (Staiger et al. 1994). Le réservoir d'actine est ainsi régulé : la liaison de la profiline à l'actine crée une gêne stérique qui bloque la polymérisation à l'extrémité pointue et **empêche la nucléation spontanée** de l'actine, très favorable en milieu physiologique (**Figure 29**).

D'autre part, l'élongation des filaments à l'extrémité barbée n'est pas affectée par le complexe profiline-actine (**Figure 29**). L'addition de profiline-actine à un filament fait chuter l'affinité de la profiline pour l'actine ($K_d = 28 \mu\text{M}$), ce qui libère la profiline (Jégou et al. 2011). Comme la profiline a une plus forte affinité pour les monomères ATP que les monomères ADP, elle a un rôle d'**échangeur ADP-ATP** pour renouveler le pool d'actine-ATP, polymérisable (Baek et al. 2008).

En parallèle, lorsque profiline un monomère-ATP, elle empêche l'hydrolyse du nucléotide et contribue à maintenir le pool d'actine disponible pour la polymérisation. ADF/Cofiline, qui fragmente les filaments et libère les monomères-ADP, et profiline, qui favorise l'échange ADP-ATP dans ces monomères, agissent de concert pour assurer le bon turnover de l'actine (Didry et al. 1998).

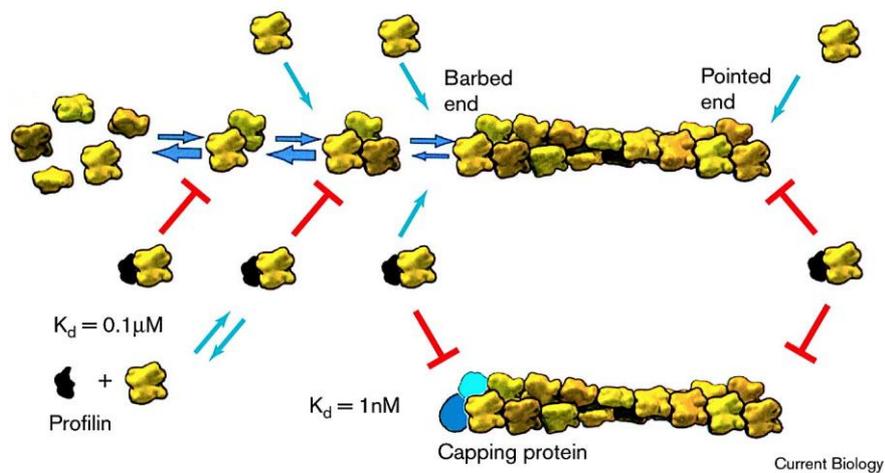


Figure 29. La profiline et la Capping Protein contrôlent l'assemblage des filaments d'actine dans les cellules.

Les monomères d'actine purs forment un trimère (noyau) qui peut s'allonger par les deux extrémités. La profiline liée au monomère inhibe à la fois la nucléation spontanée, et l'élongation par l'extrémité pointue. Le complexe profiline-actine libère la profiline par l'interaction avec l'extrémité barbée, et permet ainsi son élongation.

La Capping Protein stoppe l'élongation de l'extrémité barbée du filament de manière stable ($K_d=1 \text{ nM}$) (Amann & Pollard 2000)

Alors que la profiline maintient les monomères dans un état « latent » (elle ne les séquestre pas pour l'élongation, mais pour la nucléation), la **thymosine β 4** bloque totalement la polymérisation spontanée. Cette petite protéine de 5 kDa empêche la dissociation du nucléotide du filament. Au bord-avant de la cellule, la thymosine β 4 empêche la formation de branches par Arp2/3 tout en favorisant l'élongation de filaments par les formines, qui participent à la formation des filopodes (Vitriol et al. 2015) . Ainsi, dans le lamellipode, il existe deux types de réservoirs d'actine monomérique : l'une fournie par profiline-actine, l'autre fournie par thymosine β 4-actine.

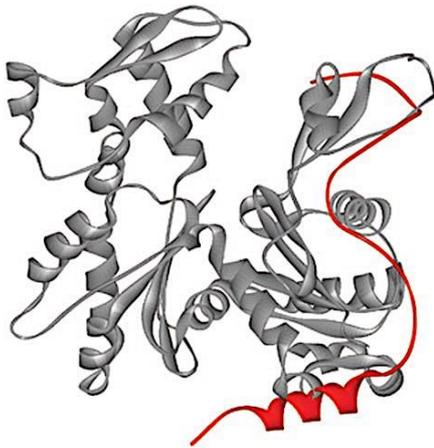


Figure 30. Interaction entre thymosine β 4 et monomère d'actine.

Modélisation de l'interaction entre thymosine β 4 (rouge) et actine (gris).

(Dos Remedios et al. 2003)

Enfin, l'élongation des filaments doit elle aussi être régulée, sous peine d'épuiser rapidement le réservoir de monomères d'actine. Dans un réseau d'actine dendritique tel que celui présent dans le lamellipode, ce rôle est exercé par les **Capping Proteins**. Ces protéines hétérodimériques ont une très forte affinité pour l'extrémité barbée des filaments ($K_d=1$ nM) donc elles bloquent totalement toute élongation à l'extrémité barbée des filaments (**Figure 29**).

Cependant, la CP a également la capacité de nucléer de nouveaux filaments *in vitro*. En effet, en liant deux monomères d'actine, elle les stabilise et favorise la formation d'un noyau d'actine (Cooper & Pollard 1985) (**Figure 31**). Le filament s'allonge alors par l'extrémité pointue. Toutefois, la présence de profiline à

l'extrémité pointue empêche cette élongation, et permet de conserver l'actine G disponible pour l'élongation de l'extrémité barbée des filaments d'actine.

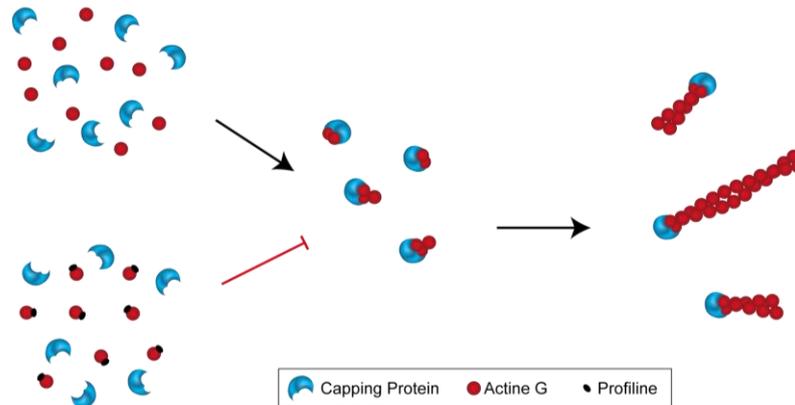


Figure 31. La CP peut nucléer des filaments.

En absence de profiline, la CP peut stabiliser un dimère d'actine disponible pour l'élongation par l'extrémité pointue. La profiline liée au monomère l'en empêche.

2.2.2 - Désassemblage et recyclage des monomères

Une protéine centrale du recyclage des filaments en monomères est l'**ADF/Cofiline**. Cette protéine, décrite en détail dans la partie 3, est recrutée par l'actine-ADP des filaments. L'accumulation d'ADF/Cofiline sur des portions de filaments âgés change les propriétés mécaniques du filament en créant des zones de fragilité à l'interface de portions décorées ou non par ADF/Cofiline. La fragmentation a lieu à cette interface. Les monomères-ADP des fragments de filaments se dissocient et retournent dans le réservoir d'actine monomérique, où ils pourront être pris en charge par la profiline pour l'échange ADP-ATP, et redevenir polymérisables.

Cependant, une partie des fragments de filaments se réarrangent par coalescence à l'arrière du lamellipode, dans le lamellum. Cette réorganisation n'a pas de polarité définie (polarité mixte) mais permet la contraction des structures par les **myosines**. L'action contractile de ces myosines participe à la fragmentation des

filaments et au recyclage de l'actine.

Au cours de ma thèse, j'ai étudié le désassemblage macroscopique par l'ADF/Cofiline des réseaux d'actine. En effet, bien que les actions biochimiques et mécaniques d'ADF/Cofiline soient bien décrites dans la littérature à l'échelle du filament d'actine, on ne sait que peu de choses sur son action à l'échelle d'un réseau d'actine dendritique (Reymann et al. 2011). Or cette protéine a un rôle fondamental dans le recyclage de l'actine et le turnover du lamellipode, donc dans la motilité cellulaire.

Dans la partie suivante, j'exposerai les propriétés de cette molécule et son action à l'échelle du filament qui mène *in fine* à la fragmentation du réseau dendritique d'actine.

3- L'ADF/COFILINE DANS LE TURNOVER DE L'ACTINE

3.1 - Description biochimique de l'ADF/Cofiline

Les protéines de la famille ADF/cofiline sont des protéines clés pour le désassemblage du réseau d'actine au sein de la cellule. Ces petites protéines de 15-20 kDa présentent plusieurs isoformes chez les organismes pluricellulaires : ADF (pour Actin Depolymerizing Factor), Cofiline-1 (non-musculaire), et Cofiline-2 (musculaire).

Toutes les protéines de la famille ADF/cofiline ont une organisation structurale similaire constituée de 5 ou 6 feuillets β à l'intérieur de 4 ou 5 hélices α (**Figure 32**) (Fedorov et al. 1997; Leonard et al. 1997; Pope et al. 2004)

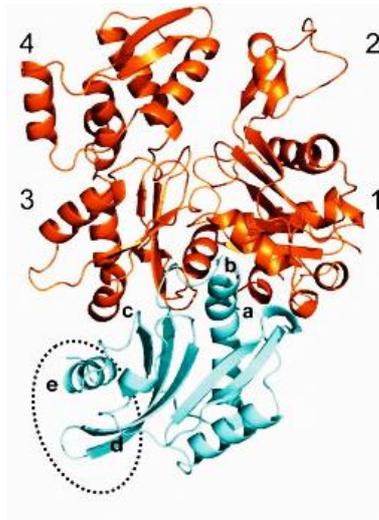


Figure 32. Structure tridimensionnelle d'ADF/Cofiline.

ADF/Cofiline (en bleu) est complexée à un monomère d'actine (en orange). L'interaction à l'actine se fait par les sous-domaines 1 et 3. (Poukkula et al. 2011)

ADF/Cofiline est capable de lier à la fois l'actine monomérique et filamenteuse avec une forte affinité ($K_d < 1 \mu\text{M}$). **Dans les deux cas, cette affinité dépend de l'état du nucléotide de l'actine.** Dans le cadre de mon projet, c'est un paramètre clé puisque je m'intéresse au désassemblage des réseaux d'actine, qui intervient sur les réseaux vieillissants, donc constitués d'actine-ADP-Pi et actine-ADP.

Lorsqu'il s'agit de fixer des monomères d'actine, l'ADF/Cofiline a une affinité 40 fois supérieure pour les monomères-ADP par rapport aux les monomères-ATP ($K_{d,ADP} = 0,15 \mu\text{M}$, $K_{d,ATP} = 5,9 \mu\text{M}$) (Blanchoin & Pollard 1998; Carlier et al. 1997). Une fois liée, l'ADF/cofiline stabilise le monomère-ADP dans une position fermée, empêchant l'échange du nucléotide (Blanchoin & Pollard 1998; Nishida 1985).

Sur le filament d'actine, l'ADF/Cofiline se fixe sur le côté du filament, avec de nouveau une plus forte affinité pour l'actine-ADP que pour l'actine-ATP : $K_{d,ATP} > 10 \mu\text{M}$ et $K_{d,ADP} = 0,3 \mu\text{M}$) (Carlier et al. 1997; Maciver 1991).

L'affinité pour de l'actine ADP-Pi ou de l'actine associée à un analogue de non-hydrolysable de l'ATP est beaucoup plus faible (Blanchoin & Pollard 1999) , et la portion actine-ATP du filament est protégée contre la fixation et le désassemblage par ADF/Cofiline en raison du temps nécessaire pour hydrolyser complètement l'ATP (Suarez et al. 2011). Dans un contexte *in vivo*, cela est adapté dans la mesure où

l'actine vieillissante à l'arrière du lamellipode a besoin d'être recyclée tandis que l'actine fraîchement assemblée participe au processus de migration cellulaire. La visualisation de l'ADF/Cofiline dans le lamellipode *in vivo* montre qu'elle est exclue du lamellipode (**Figure 33**).

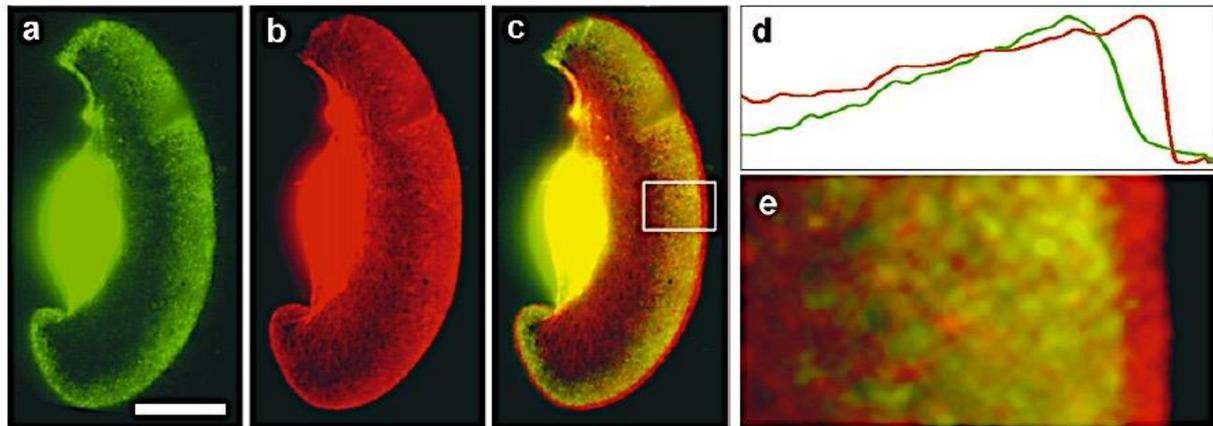


Figure 33. Localisation d'ADF/Cofiline dans le kératocyte de xénope

L'ADF/Cofiline de xénope (en vert) et l'actine (en rouge) sont distribués différemment au niveau du bord-avant de la cellule ; l'ADF/Cofiline est clairement exclue du lamellipode.(Svitkina & Borisy 1999a)

Bien que l'ADF/Cofiline soit classiquement décrite comme responsable du désassemblage des filaments d'actine, elle serait également capable de les nucléer. En effet, il existe deux sites d'interaction de l'ADF/cofiline sur le filament, ce qui pourrait stabiliser un dimère d'actine, étape limitante dans l'assemblage spontané des filaments. *In vitro*, et en présence de fortes concentrations d'ADF/Cofiline, un nombre élevé de filaments d'actine courts est formé en comparaison au cas où l'actine polymérise seule et pour lequel les filaments sont significativement peu nombreux et plus longs (Andrianantoandro & Pollard 2006).

Une hypothèse alternative serait que ces observations soient dues à la fragmentation par l'ADF/Cofiline des filaments d'actine qui se seraient assemblés spontanément dans le milieu, et qui seraient inobservables en raison de la résolution du microscope et du champ évanescent. En présence de monomères ces multiples fragments d'actine s'allongent alors. L'activité de nucléation de l'actine par ADF/Cofiline reste donc une

question qui reste en suspens, contrairement à son activité de fragmentation, qui a été largement décrite .

3.2 - Mécanisme d'action d'ADF/Cofiline dans le désassemblage

3.2.1 - L'état du nucléotide module l'affinité de l'ADF/Cofiline pour le filament d'actine

Sur le filament, ADF/cofiline **se fixe entre deux sous-unités adjacentes (Figure 34)**. Un domaine lie l'ADF/Cofiline à l'actine monomérique avec une forte affinité, tandis qu'un second permet la fixation de l'ADF/cofiline à la sous-unité d'actine adjacente sur le filament avec une plus faible affinité (Lappalainen et al. 1997; Renoult et al. 1999).

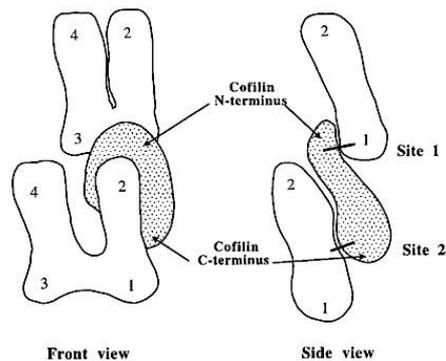


Figure 34. Modèle de l'interaction d'ADF/Cofiline entre deux sous-unités d'actine.

Vues de face (à gauche) et de côté (à droite). ADF/Cofiline s'intercale entre deux sous-unités du filament d'actine, avec deux sites d'interaction. Le Site 1 se fixe à une sous-unité d'actine avec une faible affinité, tandis que le Site 2 interagit avec la sous-unité adjacente avec une forte affinité (Renoult et al. 1999).

Le recrutement de l'ADF/cofiline sur le filament change la conformation de l'actine monomérique localement en **fermant son sillon nucléotidique**, inhibant ainsi la libération de l'ADP et son échange pour de l'ATP. De plus, cela produit un **changement local des propriétés mécaniques du polymère** en modifiant les interactions entre sous-unités d'actine, facilitant probablement la fragmentation du

filament (Pfaendtner et al. 2010). L'observation *in vitro* de filaments d'actine en présence d'ADF/Cofiline montre que ceux-ci sont décorés par des **clusters d'ADF/Cofiline** (Suarez et al. 2011; Chaudhry et al. 2013), ce qui pose la question du mode de fixation de l'ADF/Cofiline.

Il a été observé qu'ADF/Cofiline se fixe sur les filaments est de manière **coopérative** (McGough et al. 1997; Blanchoin & Pollard 1999; Hayakawa et al. 2014). La coopérativité peut s'expliquer de la façon suivante : il y a d'abord une étape lente de fixation de la première molécule d'ADF/cofiline, suivie d'une étape plus rapide correspondant à la fixation *facilitée* des autres molécules d'ADF/cofiline (Blanchoin & Pollard 1999). Les premières molécules fixées changent localement la conformation du filament et rendent plus facile le recrutement des molécules adjacentes. Dans un modèle de fixation coopérative, dite du voisin le plus proche, l'affinité K_d de l'ADF/cofiline pour une sous-unité d'actine augmente d'un facteur de coopérativité ω lorsqu'une sous-unité voisine ($K_{d1} = K_a / \omega$) ou deux ($K_{d2} = K_a / \omega^2$) sont liées à l'ADF/cofiline (**Figure 35**) (De La Cruz & Sept 2010).

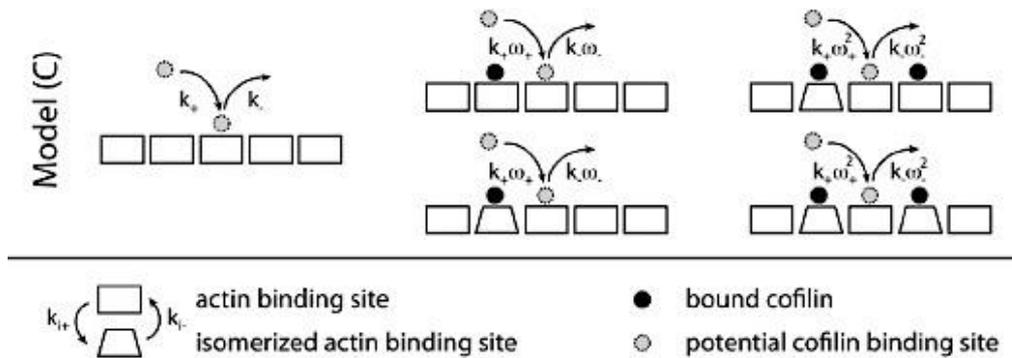


Figure 35. Modèle de fixation coopérative d'ADF/Cofiline au filament d'actine.

La fixation d'une molécule d'ADF/Cofiline est facilitée si les deux sous-unités d'actine adjacentes lient déjà une ou deux ADF/Cofiline. (De La Cruz & Sept 2010)

D'autre part, la modélisation mathématique propose l'existence d'un changement conformationnel du filament ayant fixé de l'ADF/cofiline qui irait au-delà de ces sites de fixation. De ce fait, même les sous-unités d'actine-ADP-Pi

éloignées du site de fixation d'ADF/cofiline dissocieront plus rapidement leur phosphate inorganique (Roland et al. 2008).

Toutefois, il a été montré récemment que la propagation de ce **changement de conformation** se fait **exclusivement vers l'extrémité pointue** du filament (Ngo et al. 2015), ce qui fragilise le modèle de propagation d'un changement conformationnel pour expliquer l'accélération de la dissociation du phosphate inorganique en présence d'ADF/Cofiline ($k_- = 0,035 \text{ s}^{-1}$, contre $0,0019 \text{ s}^{-1}$ sans ADF/Cofiline; (Blanchoin & Pollard 1999; Roland et al. 2008).

3.2.2 - Désassemblage des filaments par ADF/Cofiline

Actuellement, deux modèles sont proposés pour décrire le désassemblage des filaments d'actine sous l'action de l'ADF/Cofiline. Mais d'ores et déjà, les récentes données expérimentales valident le modèle basé sur la fragmentation mécanique et invalident le premier modèle basé sur la dépolymérisation.

Modèle de Fragmentation au détriment du Modèle de Dépolymérisation:

Le groupe de M.-F. Carlier proposa en 1997 que l'ADF/Cofiline catalyse la dépolymérisation des filaments par leur extrémité pointue en augmentant la constante de vitesse de dépolymérisation de l'actine à cette extrémité (Carlier et al. 1997). Des mesures de la variation de la turbidimétrie d'une solution de filaments d'actine, bloqués à leur extrémité barbée par les protéines de coiffe CP, avaient confirmé l'hypothèse de l'accélération du désassemblage par l'extrémité pointue et invalidé celle d'une fragmentation du filament (Carlier et al. 1997).

Par ailleurs, l'hypothèse de la fragmentation a été exclue grâce à une expérience avec de la DNase1, qui accélère la dépolymérisation des extrémités *barbées*, et une concentration saturante en ADF/Cofiline. L'hypothèse était que s'il y avait fragmentation des filaments par ADF/Cofiline, cela aurait généré de nouvelles extrémités barbées libres, ce qui aurait augmenté la vitesse de dépolymérisation

induite par la DNase1 (Carlier et al. 1997).

Or, dans leurs conditions expérimentales, cette vitesse de dépolymérisation reste inchangée en présence ou en absence d'ADF/Cofiline. Il a donc été proposé qu'ADF/Cofiline ne fragmente pas les filaments, mais induit une accélération de la vitesse de dépolymérisation à l'extrémité pointue.

Toutefois, cette interprétation n'est pas compatible avec les observations réalisées *in vitro* et *in vivo* (Staiger et al. 2009).

Actuellement, le modèle retenu et accepté est celui de la **fragmentation** de filaments par ADF/Cofiline. Dans ce modèle, l'ADF/Cofiline se fixe entre deux sous-unités d'actine, rompt des interactions entre celles-ci, déstabilise la structure et modifie localement les propriétés mécaniques du filament d'actine (Pfaendtner et al. 2010; McCullough et al. 2008). Cela provoque la fragmentation du filament par une rupture des interactions entre sous-unités adjacentes (Andrianantoandro & Pollard 2006; Blanchoin & Pollard 1999; De La Cruz 2005; Pavlov et al. 2007).

Quelles sont les bases moléculaires expliquant la fragmentation ?

Le filament d'actine est un polymère semi-flexible caractérisé par sa longueur de persistance. La longueur de persistance d'un filament d'actine saturé en ADF/Cofiline diminue d'un facteur 2, passant de 10 μm à 5 μm (McCullough et al. 2008) : un filament entièrement décoré d'ADF/Cofiline se déforme donc plus facilement qu'un filament nu.

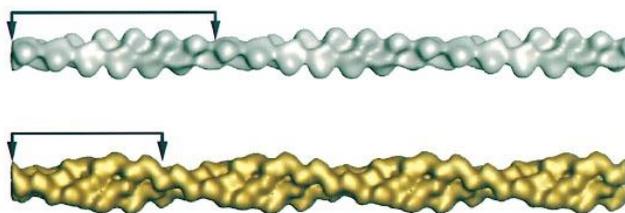


Figure 36. ADF/Cofiline change la torsion du filament.

Les reconstructions de deux filaments de 40 sous-unités sont représentées : un filament nu en haut, et un filament décoré d'ADF/Cofiline en bas. Dans le filament décoré, le pas d'hélice de l'actine (entre les deux flèches) est réduit car la torsion du filament est augmentée.

(McGough et al. 1997)

En parallèle, la rigidité torsionnelle est réduite ou autrement dit la torsion interne du filament augmente de 5°, comme représenté en **Figure 36** (McGough et al. 1997; Prochniewicz et al. 2005) . La conséquence en est que la longueur d'un pas d'hélice du filament diminue de près d'un quart en présence d'ADF/Cofiline (Ngo et al. 2015; De La Cruz 2009)

Ainsi, une portion de filament décorée par un « cluster » de molécules d'ADF/Cofiline se retrouve stabilisé dans une nouvelle conformation avec des propriétés mécaniques différentes d'un filament nu. C'est précisément à l'interface entre les portions nues des filaments moins flexibles et les portions décorées plus flexibles qu'il y a une accumulation de stress mécanique (Ngo et al. 2015; Galkin et al. 2011). Sous l'accumulation de contraintes mécaniques, le filament se rompt précisément à cette frontière (Suarez et al. 2011; Gressin et al. 2015)

Ce mécanisme de fragmentation par ADF/Cofiline explique le comportement particulier des filaments en présence de concentrations croissantes d'ADF/Cofiline (Andrianantoandro & Pollard 2006). En effet, l'efficacité de la fragmentation suit une courbe en cloche en fonction de la concentration en ADF/Cofiline (Suarez et al. 2011) telle que présentée à la **Figure 37**. En conséquence :

- à de faibles concentrations en ADF/Cofiline, le clivage du filament n'a pas lieu car trop peu de stress est accumulé ;

- le clivage du filament intervient à des concentrations intermédiaires en ADF/cofiline, et une décoration partielle (pour laquelle il y a suffisamment de contraintes mécaniques générées par des clusters d'ADF/Cofiline) (De La Cruz 2005) ; par ailleurs une étude en molécule unique suggère qu'il faut au moins 23 molécules d'ADF/Cofiline pour parvenir à une fragmentation (Gressin et al. 2015) .

- à une concentration saturante d'ADF/Cofiline, les filaments sont stables car entièrement décorés. Ils sont dans une nouvelle conformation, caractérisée par une longueur de persistance homogène le long du filament : il n'y a pas de fragmentation.

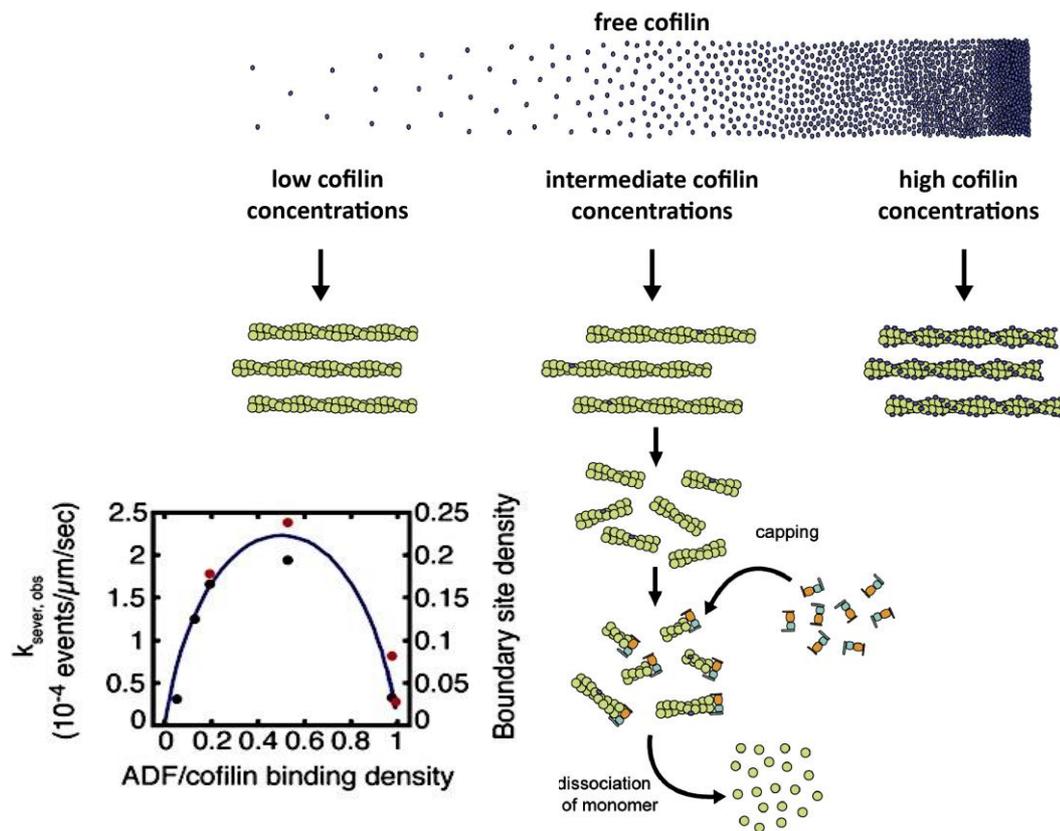


Figure 37. L'activité de fragmentation d'ADF/Cofiline dépend de sa concentration.

Il existe une fourchette de concentrations optimales en ADF/Cofiline où la fragmentation est maximale (Andrianantoandro & Pollard 2006). L'activité fragmentation est corrélée avec le nombre d'interfaces (« boundary site ») (Suarez et al. 2011)

Qu'en est-il de notre compréhension de l'action d'ADF/Cofiline sur les réseaux branchés ?

La modification de la rigidité du filament par la fixation de l'ADF/Cofiline permet au complexe Arp2/3 de se dissocier plus rapidement du côté du filament (Chan et al. 2009). Ainsi, dans le lamellipode, le débranchement interviendrait de façon concomitante avec la fragmentation des filaments pour désorganiser le réseau branché et permettre son renouvellement.

3.2.3 - Recyclage de l'actine, turnover et maintien de la motilité

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, l'état du nucléotide lié au monomère d'actine contrôle l'affinité de fixation de l'ADF/cofiline pour l'actine, et inhibe l'échange de ADP/ATP sur le monomère auquel il est associé. Or cette étape d'échange est cruciale dans le processus de recyclage des monomères d'actine nécessaires à la polymérisation de filaments d'actine aux sites de nucléation *in vivo*. Le nucléotide est renouvelé au sein du monomère d'actine grâce à l'action de la profiline. La fixation d'ADF/Cofiline ou profiline au monomère d'actine est exclusive (Blanchoin & Pollard 1999) ; le monomère d'actine ayant une plus forte affinité pour la profiline.

La fixation de la profiline sur le monomère conduit à la dissociation de l'ADF/Cofiline et l'ouverture du sillon nucléotidique de l'actine, et permet l'échange ADP-ATP (Kamal et al. 2007). Cet échange est accéléré par la protéine Srv2 (Chaudhry et al. 2013) qui fixe le monomère-ADP avec une forte affinité ($K_d = 18\text{nM}$) et contribue à la dissociation de l'ADF/Cofiline. Srv2 séquestre le monomère-ADP, et empêche son addition à l'extrémité barbée d'un filament. La profiline se fixe alors sur le complexe Srv2-actine et permet l'échange rapide du nucléotide. L'affinité de Srv2 pour le monomère-ATP étant plus faible, elle libère le complexe profiline-actine-ATP pour l'élongation de l'extrémité barbée des filaments (Mattila et al. 2004).

3.3 - Régulation de l'activité de l'ADF/Cofiline

Outre la nature du nucléotide associé l'actine, d'autres facteurs ou modifications biochimiques régulent l'activité de l'ADF/Cofiline *in vivo*. Ce sont aussi bien des modifications biochimiques (protonation, phosphorylation) que des interactions protéiques (séquestration, synergie, compétition) qui contrôlent cette activité.

3.3.1 - Modifications biochimiques de l'ADF/cofiline

- Chez les vertébrés, l'interaction d'ADF/Cofiline avec l'actine peut être inhibée par la phosphorylation réversible N-terminale, au niveau de sa Sérine 3 (Blanchoin et al. 2000b; Moriyama et al. 1996; Goyal et al. 2013), par des kinases de la famille des LIM-Kinases (Lin-11, Isl1 et Mec-3 kinases) (Arber et al. 1998). Elles sont activées en aval d'une signalisation par les récepteurs de type Tyrosine-Kinase. Cette phosphorylation d'ADF/Cofiline sur Ser-3 est réversible notamment grâce aux phosphatases de la famille Slingshot.

- Lorsqu' ADF/cofiline est phosphorylée sur tyrosine 68 par la kinase v-Src, cela génère un signal d'ubiquitination de la molécule, qui sera ensuite dirigée vers le protéasome pour sa dégradation (Yoo et al. 2010).

- L'état de protonation d'ADF/Cofiline influence également son activité. En effet, un pH 7-8 favorise l'activité d'ADF/Cofiline par rapport à des pH plus acides (Carlier et al. 1997; Hawkins et al. 1993; Ono 2007). En outre, le passage de pH 6.8 à pH 8 en présence de filaments d'actine et d'ADF/cofiline, induit une augmentation de la concentration d'extrémités d'un facteur 1.5, indiquant un nombre accru d'évènements de fragmentation (Okada et al. 2002). Cependant, le changement du pH influence également la dynamique d'assemblage du filament d'actine. Il est donc probable que ces changements de pH puissent induire la modification des caractéristiques chimiques et / ou mécaniques du filament, perturbant alors indirectement la fixation d'ADF/cofiline.

3.3.2 - Séquestration de l'ADF/Cofiline à la membrane

L'ADF/Cofiline peut être séquestrée à la membrane plasmique par les Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) membranaires (Yonezawa et al. 1991; van Rheenen et al. 2007; Zhao et al. 2010). Le phospholipide se fixe à l'ADF/cofiline par l'intermédiaire d'acides aminés polaires.

Il est intéressant de noter que l'inhibition d'ADF/Cofiline par phosphorylation de la serine 3 n'affecte pas les interactions entre ADF/Cofiline et le phospholipide membranaire (Gorbatyuk et al. 2006). L'ADF/Cofiline peut être libérée de la membrane soit par activation de la phospholipase A1 qui réduit la concentration en PI(4,5)P₂ séquestrant l'ADF/Cofiline (van Rheenen et al. 2007), soit par une augmentation du pH cytoplasmique qui diminue l'affinité du PI(4,5)P₂ pour ADF/Cofiline (Frantz et al. 2008).

3.3.3 - Compétition avec d'autres protéines

Il existe une multitude de protéines de liaison à l'actine, dont un certain nombre se lient sur des sites proches du site de liaison de l'ADF/Cofiline. De ce fait, il existe une compétition entre ces protéines pour fixer le monomère d'actine.

- **La tropomyosine** est une protéine filamenteuse qui, comme l'ADF/Cofiline, se fixe sur le filament d'actine sur le côté et de façon coopérative (Singh & Hitchcock-DeGregori 2009). Sa fixation au filament dans sa conformation native (non modifiée par ADF/Cofiline) empêche la liaison de l'ADF/Cofiline et le protège donc de la fragmentation (Bernstein & Bamburg 1982). A l'inverse, un changement de conformation du filament induit par la fixation de l'ADF/cofiline pourrait inhiber la fixation de la tropomyosine (McGough et al. 1997). Dans les cellules de vertébrés, on retrouve la tropomyosine dans le lamellum, donc au niveau des filaments sans branches générés précédemment dans le lamellipode, sous l'action d'ADF/Cofiline (Iwasa & Mullins 2007).

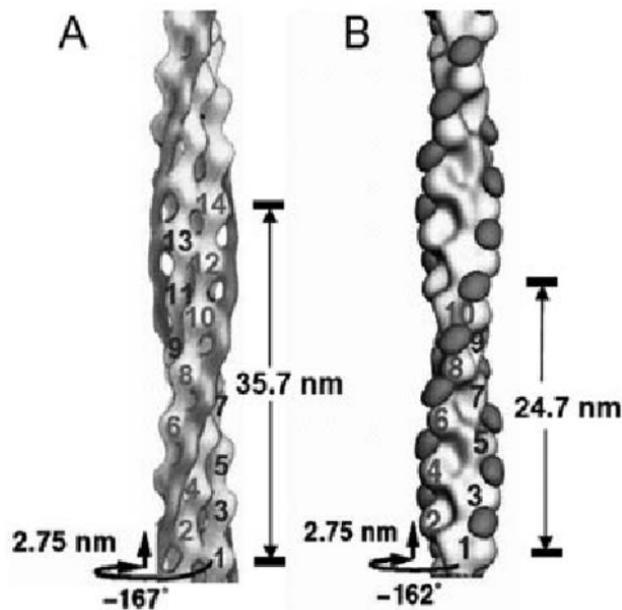


Figure 38. Structure des filaments d'actine décorés par la tropomyosine (A) ou par l'ADF/Cofiline (B).

La tropomyosine se fixe sur un filament à la conformation native (non décorée par ADF/Cofiline), ce qui explique la compétition entre les deux molécules (Kuhn & Bamberg 2008)

- Il existe également une compétition entre l'ADF/Cofiline et **la myosine II** des fibres de stress contractiles (Wiggin et al. 2012; Tojkander et al. 2015). En effet, l'ADF/Cofiline ne désassemble que les fibres de stress transverses, ne contenant pas de myosines (Tojkander et al. 2015), et un ajout de myosine à des concentrations élevées dans un système *in vitro* avec des filaments décorés d'ADF/Cofiline conduit à un déplacement de l'ADF/Cofiline des filaments (Elam et al. 2013). Paradoxalement, cette compétition entre myosines et ADF/Cofiline conduit à une plus grande fragmentation des filaments, puisqu'elle favoriserait la création de zones frontières entre portions nues et décorées des filaments (Elam et al. 2013) .

En dehors de ce cas de compétition où l'efficacité de désassemblage par ADF/Cofiline est accrue, il existe des protéines agissant de façon synergique avec elle pour faciliter le désassemblage.

3.3.4 - Synergie avec d'autres protéines

Aip1 (« Actin interacting protein 1 ») et la coronine sont des protéines agissant **en synergie** avec l'ADF/cofiline afin d'**augmenter l'efficacité** du désassemblage des filaments.

- **Aip1** est une protéine qui coiffe exclusivement l'extrémité barbée des fragments et ainsi conduit à leur dépolymérisation totale (Okada et al. 2002; Okreglak & Drubin 2010). Aip1 est réputé augmenter l'efficacité de la fragmentation des filaments d'actine (Rodal et al. 1999; Okreglak & Drubin 2010), et une étude récente montre qu'Aip1 est nécessaire pour désassembler les câbles d'actine en présence d'ADF/Cofiline (Gressin et al. 2015).

- **La coronine** quand à elle se fixe aux filaments d'actine avec une forte affinité pour les sous-unités ADP-Pi. La coronine peut fragmenter les sous-unités ADP des filaments d'actine (Gandhi et al. 2009). Sur filaments individuels (*in vitro*), la présence simultanée d'ADF/cofiline et de coronine induit fragmentation très efficace des filaments d'actine. De plus, la coronine interagit directement avec le complexe Arp2/3 et permet sa dissociation d'avec le filament-mère (Humphries et al. 2002).

La collaboration entre ADF/Cofiline, coronine et Aip1, conduit à une perte brusque (ou « burst ») d'une partie du filament d'actine (Kueh et al. 2008). Cette synergie d'actions est cohérente avec les observations *in vivo* où un lamellipode peut être désassemblé à l'échelle de quelques secondes, alors qu'*in vitro* ADF/Cofiline seule ne produirait, chaque seconde, qu'une fragmentation tous les 7 μm (Suarez et al. 2011).

3.4 - Contrôle biophysique du désassemblage : diffusion et filtrage des molécules

3.4.1 - Existence de domaines intracellulaires d'exclusion de molécules

Une cellule saine est une entité fortement organisée et compartimentalisée. Tout d'abord, la membrane plasmique elle-même possède des domaines qui se différencient par leur composition lipidique et protéique (récepteurs, etc.).

L'intérieur de la cellule est aussi structuré en divers domaines. Les plus évidents sont les organites intracellulaires comme le noyau, l'appareil de Golgi, les mitochondries. Mais les complexes macromoléculaires constituent, eux aussi, des compartiments spécialisés de la cellule, comme le protéasome, le centrosome ou le cytosquelette.

Dans une cellule, le milieu cytosolique est donc **encombré**. Cet encombrement a été l'intérêt de recherches il y a une trentaine d'années, notamment pour comprendre la diffusion de molécules à travers ce cytoplasme à la composition dense. Pour cela, les chercheurs ont utilisé des molécules neutres comme le Ficoll (polysucrose synthétique) ou les Dextrans (polyglucose) dont les propriétés étaient bien caractérisées (Laurent & Granath 1967).

Lorsque couplés à des molécules fluorescentes, ils peuvent être utilisés comme traceurs intracellulaires. Ils ont donc permis à la fois de visualiser les domaines cellulaires où il étaient exclus, et de faire des expériences de photoblanchiment pour évaluer leur diffusion (Luby-Phelps et al. 1987; Luby-Phelps & Taylor 1988). Des traceurs de différents rayons hydrodynamiques (rayon qui prend en compte l'hydratation de la molécule) ont été microinjectés dans les cellules. Il en est ressorti que la diffusion des molécules au rayon hydrodynamique supérieur à 24 nm se retrouve fortement ralentie dans le cytosol. Cela correspond à minima aux vésicules, ribosomes, complexes multienzymatiques ou grands ARN messagers (Luby-Phelps & Taylor 1988).

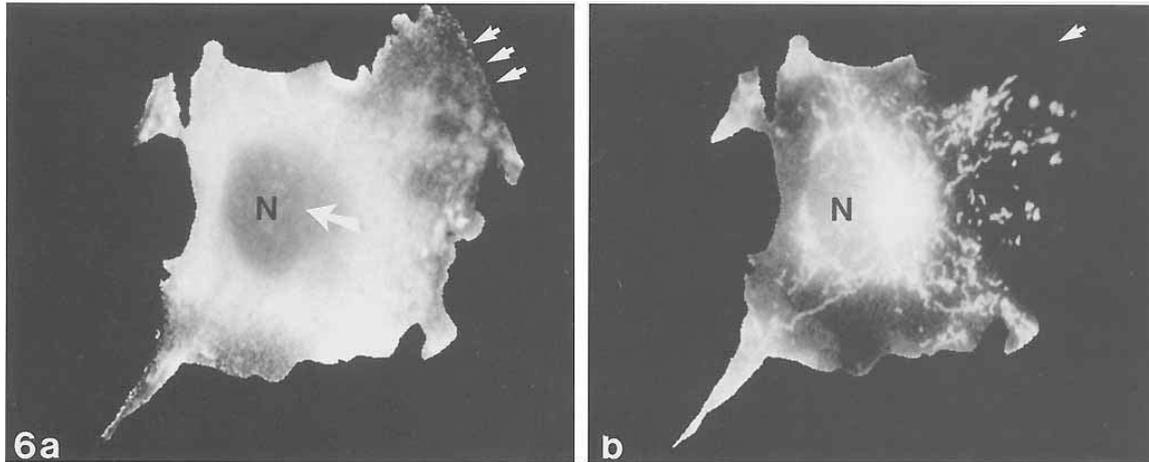


Figure 39. Compartiments intracellulaires dans des cellules Swiss 3T3

A gauche, le Ficoll fluorescent microinjecté dans la cellule est clairement exclu du bord-avant du lamellipode (3 flèches), mais aussi au niveau du centrosome (grande flèche). A droite, les mitochondries dans cette même cellule, sont également exclues du lamellipode. N : noyau. (Luby-Phelps & Taylor 1988)

Plus tard, ces recherches se sont particulièrement orientées vers la diffusion de molécules à travers le cytosquelette d'actine (Jones & Luby-Phelps 1996; Janson et al. 1996) (**Figure 40**). Aux expériences *in vivo*, se sont ajoutées des modélisations pour évaluer le comportement de molécules individuelles au sein d'un réseau macromoléculaire (Janson et al. 1996; Jones & Luby-Phelps 1996; Blum et al. 1989; Wong et al. 2004; Novak et al. 2009; Weiss et al. 2004).

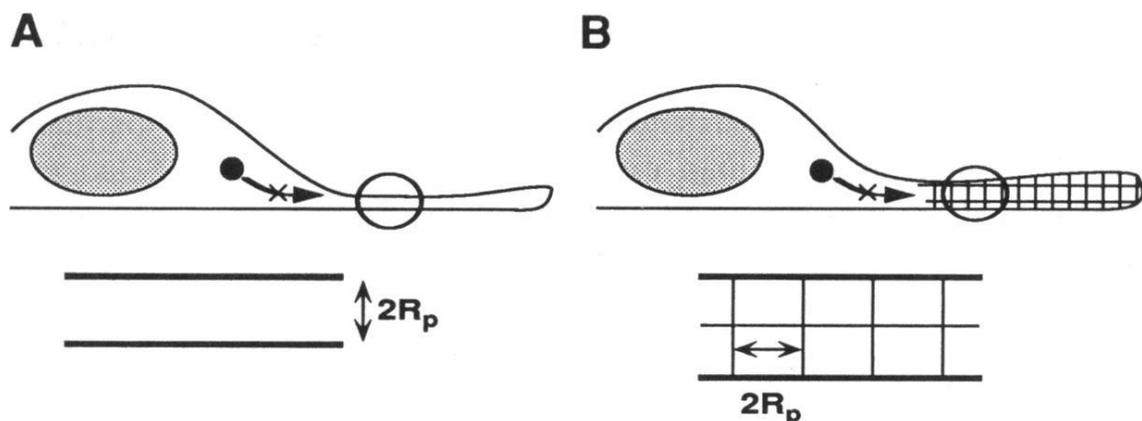
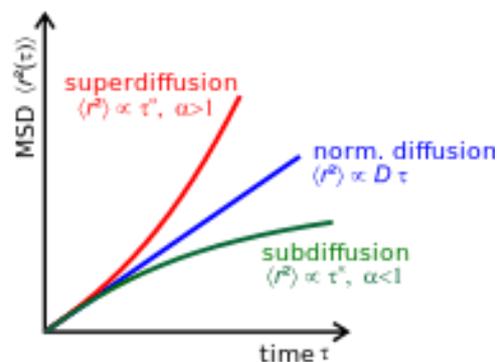


Figure 40. Modèles d'exclusion de particules du lamellipode

A : Une particule de rayon R_p sera exclue du lamellipode s'il forme un étranglement de hauteur $< 2R_p$. B : Modèle de tamis moléculaire : la particule sera exclue du lamellipode si le réseau d'actine a des mailles de dimensions $< 2R_p$. (Janson et al. 1996)

Ces études montrent que la diffusion de ces molécules au sein d'un environnement encombré tel que le cytosquelette d'actine, est *anomale*, c'est-à-dire non linéaire au cours du temps. En fait, elles présentent une sous-diffusion (*subdiffusion*), qui est caractéristique de molécules ponctuellement piégées («*trapped*») dans le milieu. Donc leur diffusion ne se fait pas comme lors d'un simple mouvement brownien, mais présente des phases de stagnation et de « sauts » moléculaires.



3.4.2 - Cas particulier : le Lamellipode

Le réseau branché extrêmement dense du lamellipode constitue un compartiment cellulaire particulier. Les protéines de liaison à l'actine sont présentes dans le lamellipode selon une distribution bien précise (Iwasa & Mullins 2007) : Arp2/3 et CP près du bord-avant, ADF/Cofiline à l'arrière, ce qui est corrélé à leur action au cours de la formation du lamellipode (assemblage vs désassemblage). ADF/Cofiline, dont l'action est antagoniste à celle d'Arp2/3, est même complètement exclue du bord-avant du lamellipode (Svitkina & Borisy 1999a). D'autres molécules, telles que les myosines, sont également exclues du maillage dense d'actine dans le lamellipode.

Dès lors, on peut se demander comment la densité du réseau d'actine est importante pour **contrôler** l'assemblage et le désassemblage de réseaux branchés

d'actine, et si en modulant cette densité on peut contrôler le désassemblage de réseaux lamellipodiaux par ADF/Cofiline.

Or la cellule est un organisme complexe, et il est difficile d'observer et manipuler très précisément le lamellipode *in vivo*. Pour s'affranchir de cette complexité, il est possible de recréer *in vitro* des réseaux branchés et quasi bidimensionnels, tels qu'ils le seraient dans un lamellipode, et d'en contrôler des paramètres comme la biochimie ou la géométrie.

4- RESEAUX BIOMIMETIQUES D'ACTINE

La reproduction *in vitro* de la motilité à partir de protéines nécessaires et suffisantes en 1999 par Loisel et al. a ouvert la porte à l'étude de phénomènes biologiques par des systèmes biomimétiques. Ce type d'études a particulièrement été intensif pour comprendre différents mécanismes de régulation de l'actine, depuis sa polymérisation jusqu'à la régulation de réseaux plus complexes.

Outre l'approche biochimique, les milieux reconstitués, en simplifiant le système et en le rendant facilement manipulable, ont permis à des théoriciens de se pencher sur des aspects biophysiques des réseaux d'actine comme les forces mises en jeu ou la brisure de symétrie nécessaire pour générer une croissance unidirectionnelle du réseau. Actuellement et de mon point de vue, pour comprendre la complexité de la motilité par polymérisation de l'actine, il est indispensable d'avoir une approche interdisciplinaire qui prend en compte la biochimie, la biophysique, la modélisation mathématique et la simulation numérique.

Dans cette dernière partie de chapitre je souhaite montrer comment en partant d'un système simple de polymérisation de l'actine, on peut y introduire des contraintes biochimiques et physiques afin de contrôler non seulement la dynamique de l'actine, mais également son architecture.

4.1 - Auto-assemblage d'actine branchée en solution libre

Un milieu de motilité tamponné supplémenté en sels en en ATP, et contenant de l'actine, du pWA (fragment actif de WASP) et du complexe Arp2/3 permet d'observer la croissance de filaments d'actine et la formation de branches. L'observation en microscopie à onde évanescente (ou TIRF-M pour *Total Internal Reflection Microscopy*) permet de suivre des filaments individuels à la surface de l'échantillon tout en s'affranchissant du reste du signal.

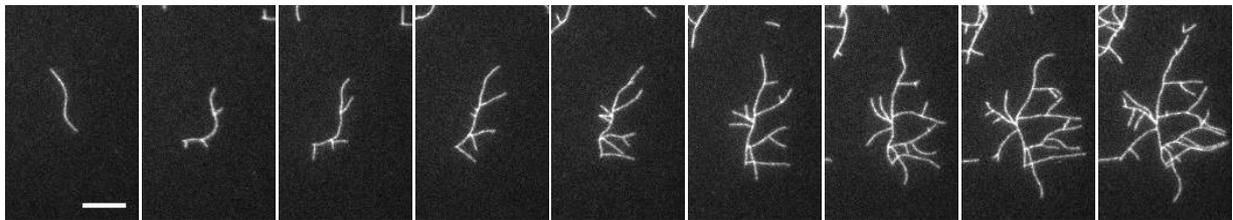


Figure 41. Formation de branches d'actine à partir d'un filament individuel

Les filaments individuels ont été marqués à l'actine-Alexa 586, et observés à la surface de la lamelle en microscopie à onde évanescente (TIRF pour *Total Internat Reflection Fluorescence Microscopy*). Barre d'échelle : 10 μ m. Intervalle entre chaque image : 100 sec.

Cette méthode d'observation permet également de de faire des études en molécule unique. Récemment, il a ainsi été observé qu'Aip1 accélère la fragmentation des filaments par ADF/Cofiline et que cette coopération se fait au-delà d'un seuil de 23 molécules d'ADF/Cofiline décorant un filament (Gressin et al. 2015).

4.2 - Introduction de contraintes pour diriger la polymérisation de l'actine

4.2.1 - Contraintes biochimiques

Pour contrôler la polymérisation de l'actine, il est nécessaire d'y ajouter des contraintes biochimiques.

L'addition de profiline en excès dans le milieu (généralement 3 fois) inhibe la nucléation spontanée de l'actine en présence de sels. La taille des filaments et des

branches peut être modulée grâce à différentes concentrations de Capping Protein : plus il y aura de CP, plus les filaments et branches seront courts.

En plus de ces contraintes biochimiques, la polymérisation de l'actine peut être contrôlée par des contraintes géométriques.

4.2.2 - Contraintes géométriques : surfaces fonctionnalisées avec un activateur de la nucléation

Au lieu de disposer librement d'activateurs de la nucléation (comme pWA) dans le milieu, on peut fonctionnaliser des surfaces afin d'apporter à la fois cette contrainte biochimique mais également une contrainte spatiale pour la nucléation. Cela peut être des particules solides pouvant être déplacées dans le milieu sous l'effet de la polymérisation de l'actine, ou alors des surfaces planes microstructurées. Je vais décrire ces deux systèmes, que j'ai utilisés au cours de ma thèse.

4.2.2.1 - Particules solides

L'analogie la plus simple à faire avec les pathogènes détournant le système de motilité cellulaire est d'associer des particules solides, en verre ou en polystyrène, à un milieu biomimétique de polymérisation de l'actine. Ces particules peuvent être fonctionnalisées avec des activateurs de la nucléation d'actine, comme pWA (fragment actif de WASP, qui active Arp2/3), mais également avec toute autre protéine associée à l'actine, comme par exemple la formine mDia.

L'assemblage de filaments dendritiques sur une surface fonctionnalisée se fait grâce à des « primers », qui sont de courts filaments d'actine (Achard et al. 2010). Ces primers serviront de filaments-mères pour la nucléation de branches par le complexe Arp2/3, à la surface de la bille couverte en activateur (**Figure 42**). Ces branches serviront à leur tour de substrat pour la nucléation d'autres branches : on parle d'**assemblage autocatalytique** du réseau branché.

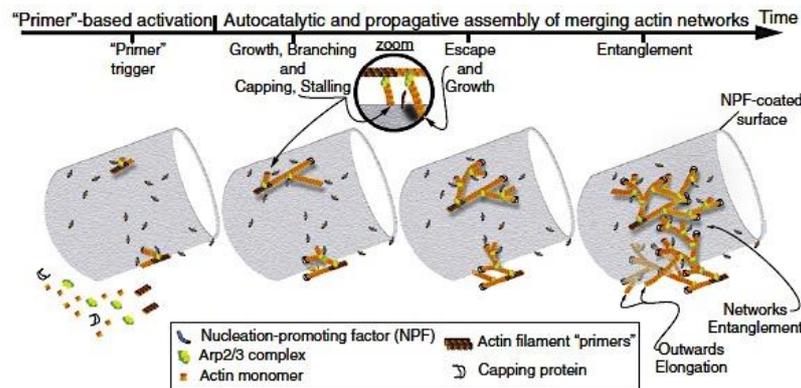


Figure 42. Mécanisme d'activation de l'assemblage des réseaux d'actine sur une surface fonctionnalisée.

Des filaments d'actine courts, appelés « primers », interagissent avec un activateur du complexe Arp2/3 sur la surface. La présence de CP stoppe l'élongation des filaments. Les branches continuent de se former par mécanisme autocatalytique. Les réseaux formés s'enchevêtrent et forment un gel d'actine à la surface. (Achard et al. 2010)

On peut observer simplement la croissance radiale des filaments en l'absence de CP, ou alors une polarisation progressive de la croissance du réseau d'actine par ajout de concentrations croissantes de CP (**Figure 44**).

Dans des conditions expérimentales optimales (concentrations en Arp2/3 et CP adéquates), l'actine polymérise d'abord de façon isotrope et homogène autour de la bille pour former un gel d'actine. La nécessité de pousser, donc d'étendre le gel déjà polymérisé pour permettre la croissance de nouveaux filaments à l'interface bille-gel, crée un stress (Bernheim-Groswasser et al. 2005).

La motilité s'établit lorsqu'il y a **une brisure de symétrie** dans le réseau qui forme le gel. Lorsqu'une hétérogénéité apparaît dans le gel, celui-ci est rompu à la surface, et sous l'effet du relâchement du stress élastique, la bille est expulsée hors de la coque d'actine (van der Gucht et al. 2005)(**Figure 43**). Ensuite, il se forme une deuxième couche d'actine dendritique à la surface de la bille, qui sera elle aussi anisotrope et subira une brisure de symétrie, et ainsi de suite (Achard et al. 2010). Ce modèle est en accord avec les régimes de motilité saltatoire observés par Bernheim-Groswasser et collègues (Bernheim-Groswasser et al. 2002; Bernheim-Groswasser

et al. 2005). Les filaments polymérisant avec l'ajout de monomères d'actine près de la surface de la bille (Peskin et al. 1993), l'effet collectif de l'élongation des filaments la propulse en avant dans la direction de la brisure de symétrie.

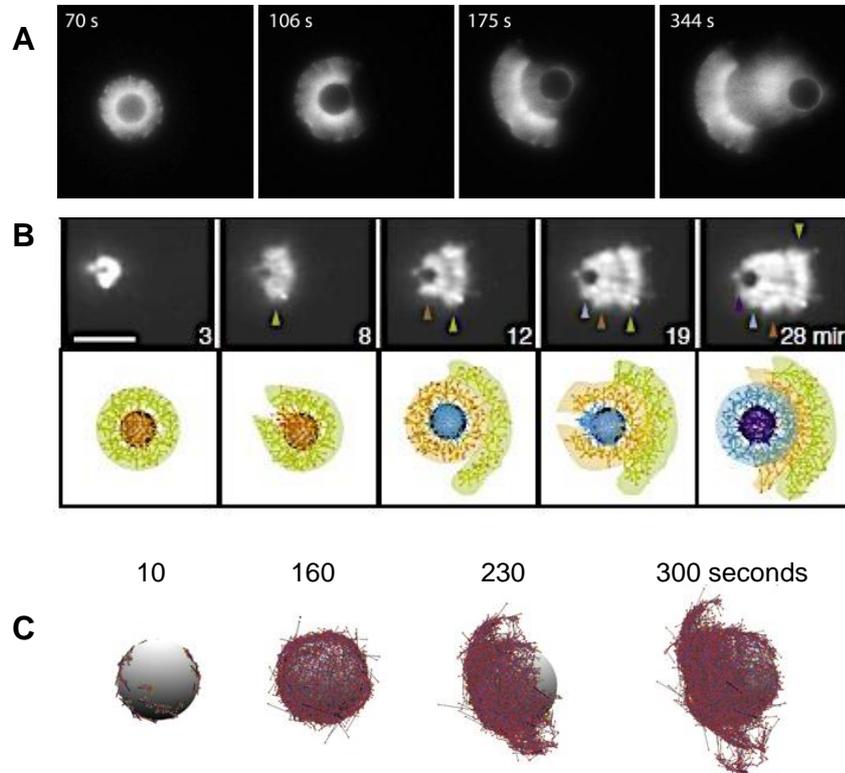


Figure 43. Brisures de symétrie engendrées par la création de forces internes

A : Rupture du gel d'actine autour de la bille et propulsion de la bille en avant.(Dayel et al. 2009). B : La propulsion de la bille se fait par brisures de symétrie de couches d'actine successives autour de la bille. C : Simulation de la brisure de symétrie (Achard et al. 2010)

Le rôle de la Capping Protein ici est d'introduire contrainte spatiale et mécanique dans le réseau, en augmentant la densité et la rigidité des branches qui le constituent. Jusqu'à un certain point, plus il y aura de branches courtes, plus la production de force sera grande, et plus la vitesse de déplacement de la bille sera grande (**Figure 44**). Cependant, une concentration trop élevée en CP bloque la croissance du gel d'actine ; celui-ci est si dense autour de la bille que la brisure de symétrie n'a pas lieu. Par ailleurs, la géométrie et la taille de la surface de nucléation sont déterminantes dans la motilité *in vitro*. Lorsque la taille des billes augmente, le déclenchement de la brisure de symétrie est retardé et la vitesse de déplacement de la bille est plus faible (Bernheim-Groswasser et al. 2002; van der Gucht et al. 2005). Par ailleurs, si on augmente la réticulation du réseau par ajout de α -actinine ou de

fascine, on observe une baisse de la vitesse de croissance du gel autour de la bille et un retard de la rupture du gel, alors que celle-ci interviendra pour une épaisseur de gel semblable entre actine réticulée ou non (van der Gucht et al. 2005).

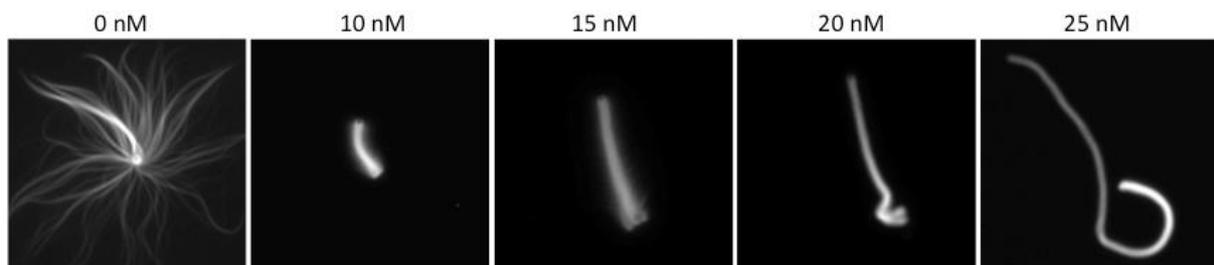


Figure 44. Assemblage de polymères d'actine sur billes de polystyrène enrobées de pWA

Sans Capping Protein, les filaments ont une croissance isotrope autour de la bille. Lorsqu'on ajoute de la CP, on commence à créer des réseaux d'actine autour de la bille. A une concentration suffisante de CP, il y a une brisure de symétrie du gel d'actine autour de la bille (flèche) et l'assemblage des nouveaux filaments n'est plus isotrope.

Les particules motiles ont été d'une grande utilité pour comprendre les principes fondamentaux de la brisure de symétrie et de la motilité. La limitation majeure de ce système de particules motiles est qu'il est peu diversifié du point de vue géométrique, même si des expériences ont été menées avec des particules de différentes formes pour étudier les brisures de symétrie (Dayel et al. 2009). Afin d'avoir des géométries d'actine plus complexes, il a été nécessaire de repenser la fonctionnalisation de la surface.

4.2.2.2 - Surfaces microstructurées

Adaptés de la photolithographie en microélectronique, les surfaces microstructurées ou encore micropatrons, peuvent être appliquées à l'étude de phénomènes biologiques. Pour cela, les micropatrons sont fonctionnalisés avec des protéines d'intérêt, principalement des molécules d'adhésion cellulaire. Ces techniques sont développées depuis une vingtaine d'années, mais connaissent un essor grandissant (Singhvi et al. 1994; Parker et al. 2002; Théry et al. 2006; Ostuni et al. 2009)

Ces micropatrons ont beaucoup été utilisés pour étudier la réponse des cellules face à des contraintes de géométrie, comme par exemple la distribution des fibres de stress (**Figure 45**) (Théry et al. 2006). Plus récemment, ils ont été appliqués à l'étude de l'actine dans des systèmes biochimiquement reconstitués (**Figure 47**) (Reymann et al. 2010; Gressin et al. 2015; Ennomani et al. 2016).

Dans l'équipe, nous sommes spécialisés dans la mise en œuvre de ce type de « patterns » de protéines. Les protéines peuvent être déposées sur des surfaces molles en gel de polyacrylamide (Vignaud et al. 2014; Ennomani et al. 2016) ou des surfaces dures en verre (Galland et al. 2013) . Je présenterai ici deux façons de faire des micropatrons sur des surfaces de verre, que j'ai utilisées au cours de ma thèse.

a) Micropatrons au masque de chrome:

Il y a une dizaine d'années, Théry et al ont mis en œuvre des techniques de structuration de la surface afin de créer des zones adhésives (fibronectine) ou non (PLL-PEG) pour des cellules en culture (Théry et al. 2006). En imposant différentes géométries aux cellules grâce aux géométries des zones adhésives elles-mêmes (**Figure 45**), ils ont pu étudier la localisation des fibres de stress en fonction de la symétrie ou non de l'adhésion.

Pour résumer, ces micropatrons ont été réalisés par une technique de « microcontact printing », en utilisant un « tampon » de PDMS couvert de protéine adhésive pour déposer cette dernière sur une surface de verre rendue non-adhésive. Ainsi, les cellules s'étalent dans les limites imposées par la géométrie des micropatrons.

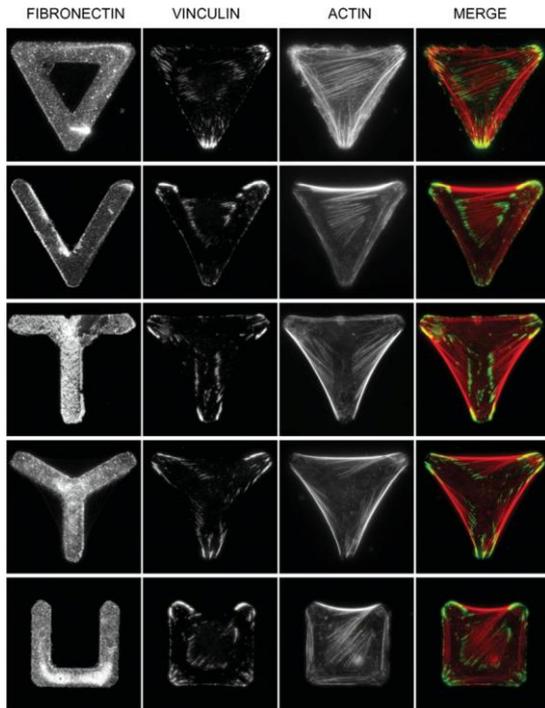


Figure 45. Cellules à géométries imposées, sur des micropatrons couverts de substrat adhésif.

Les micropatrons sont fonctionnalisés avec de la fibronectine. La distribution des fibres de stress (visibles dans le panneau « Actin ») est différente suivant la géométrie du micropatron sur laquelle elle s'étale. (Théry et al. 2006)

En 2010, Reymann et al ont publié une méthode de microstructuration de surface (Reymann et al. 2010) , mais cette fois appliquée à l'étude in vitro de l'actine (**Figure 46**). Cette microstructuration se fait simplement en opposant des surface hydrophobes de PLL-PEG à des surfaces hydrophiles où ce PLL-PEG est dégradé sous l'action des UV profonds. Pour cela est utilisé un masque de chrome où les géométries d'intérêt de l'ordre du micromètre sont transparentes aux UV. Ensuite, la protéine nucléatrice est adsorbée sur ces micropatrons. L'ajout du milieu de polymérisation permet la polymérisation d'actine branchée à la surface de ces patrons de la même façon que décrite sur les billes de polystyrène.

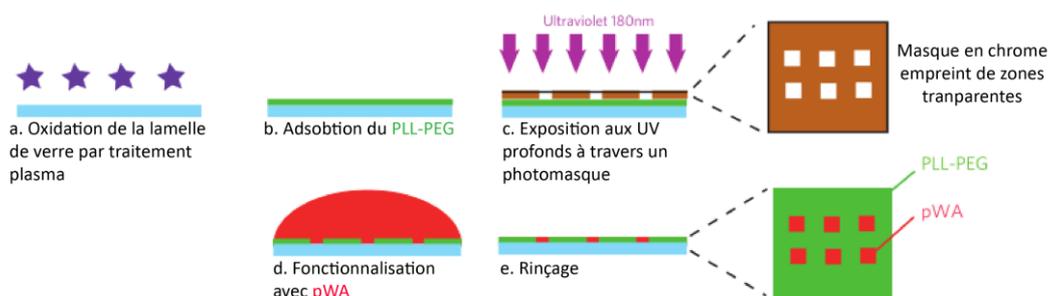


Figure 46. Méthode de fabrication de micropatrons au masque de chrome (Reymann et al. 2010)

Cette méthodologie a permis de montrer que la géométrie de la surface de nucléation peut contrôler l'architecture des réseaux d'actine et les interactions entre filaments (**Figure 47**).

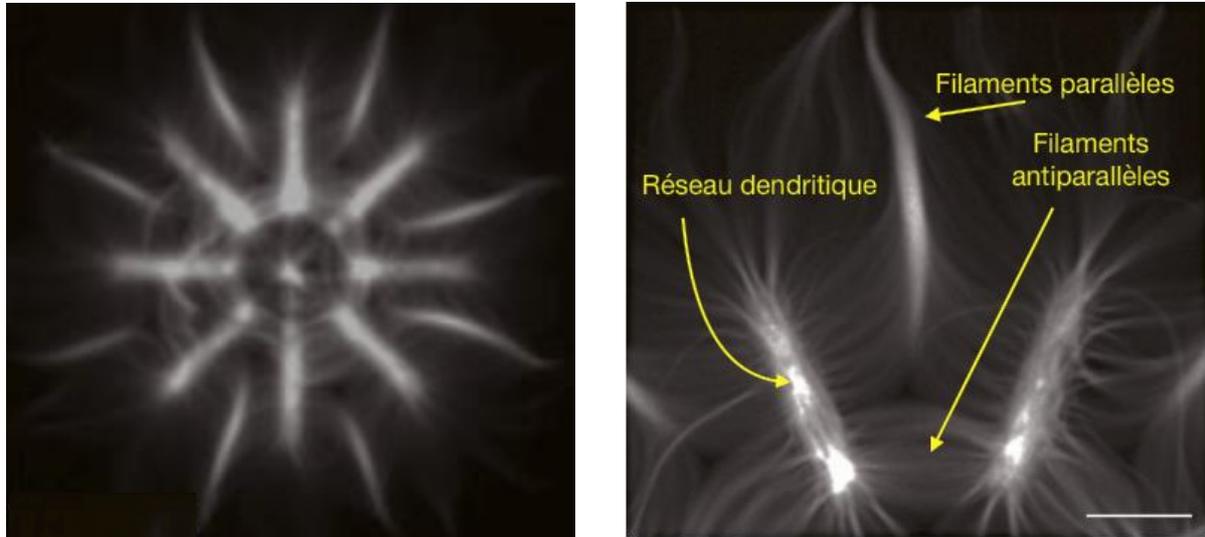


Figure 47. Reconstitution de différentes architectures d'actine à partir de micropatrons fonctionnalisés.

Un micropatron fonctionnalisé à la pWA est utilisé comme support pour contrôler spatialement la nucléation de filaments d'actine (gauche). L'orientation des barres du micropatron permet de reconstituer les différentes architectures d'actine (droite). (Modifié de Reymann et al. 2010).

Les micropatrons sont constitués de géométries simples (cercles, disques, lignes...) ou d'arrangements de celles-ci. Au cours de ma thèse, j'ai travaillé avec des micropatrons rectangulaires fabriqués par masque de chrome, ou par la technique de laser UV (décrite en détail dans le chapitre Matériel et Méthodes). De la même façon que pour les billes de polystyrène, en l'absence de la Capping Protein, les filaments s'allongent librement et dans toutes les directions.

L'ajout de la CP introduit une **contrainte structurale** : en synergie avec le complexe Arp2/3, la CP réoriente de croissance des réseaux (**Figure 48**). Ces réseaux de structure quasi bidimensionnelle sont une meilleure approche pour l'étude du réseau branché tel qu'observé dans le lamellipode, contrairement aux billes de polystyrène par exemple où la géométrie du réseau est cylindrique.

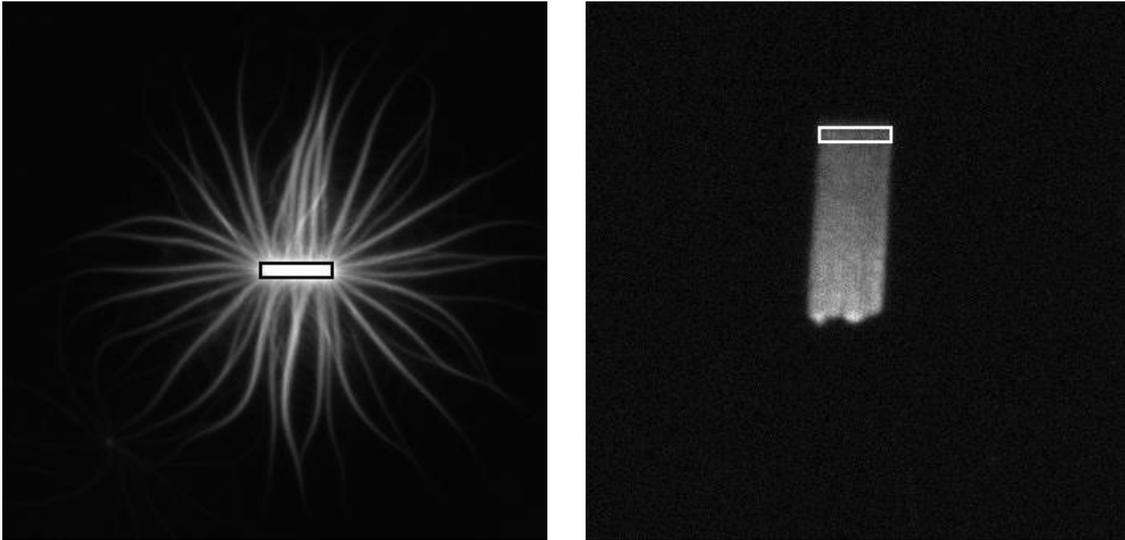


Figure 48. La Capping Protein change l'architecture des filaments d'actine

A gauche : les filaments non coiffés par la CP s'allongent de façon isotrope à partir du micropatron. A droite : l'ajout de CP réoriente les réseaux en synergie avec le complexe Arp2/3. Encadrés : régions du micropatron.

Alors que la modulation de la concentration en activateur de la nucléation sur les patterns permet de contrôler la densité des réseaux générés, il manque la capacité de moduler l'architecture au sein même de ce réseau d'actine branchée. Pour cela, la méthode de création des micropatrons a dû être adaptée, les étapes de fonctionnalisation restant similaires.

b) Micropatrons au laser UV

Pour mes travaux de thèse, j'ai principalement utilisé cette méthode, qui est décrite en détail dans le chapitre « Matériel et Méthodes ». Elle repose sur les mêmes principes de fonctionnalisation de la surface, mais sans contact avec un masque.

La surface hydrophobe est dégradée grâce à des impacts précis de laser UV pulsé. Les coordonnées de ces impacts sont codées dans un logiciel pour être précisément répartis sur la surface. Cela permet de moduler la densité des impacts pour un patron

donné. Cette fine modulation des zones de nucléation aura des implications quand à l'architecture à l'intérieur du réseau d'actine. La méthodologie mise en œuvre sera décrite en détail dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 2 : METHODES

1- FONCTIONNALISATION DES SURFACES

Classiquement, les billes de verre ou de polystyrène greffées de NPFs sont utilisées dans les essais de motilité reconstituée. Cependant la géométrie cylindrique du réseau généré sur billes s'éloigne de celle des réseaux lamellipodiaux, plats et étendus. Pour cela, j'ai généré des réseaux branchés à partir de surfaces de verre planes fonctionnalisées avec ces NPFs.

Malgré cela, j'utilise des billes de polystyrène dans mes expériences, notamment comme contrôle interne au système de motilité pour apprécier la biochimie du milieu. Ainsi, elles permettent d'ajuster cette biochimie si nécessaire, et de discriminer en cas de résultats anormaux entre problème de biochimie du milieu ou de la surface de nucléation.

1.1 - Préparation des billes de polystyrène

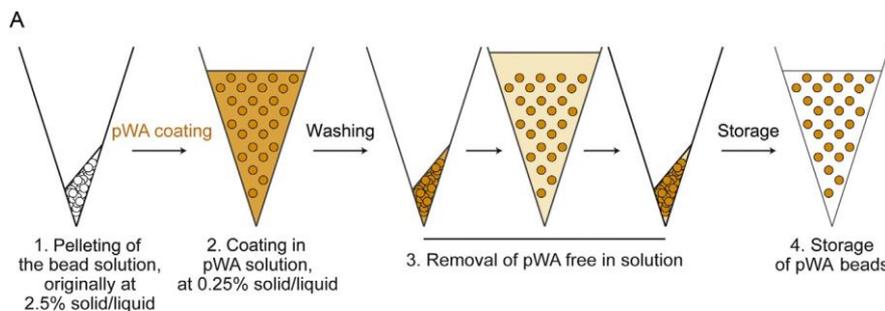
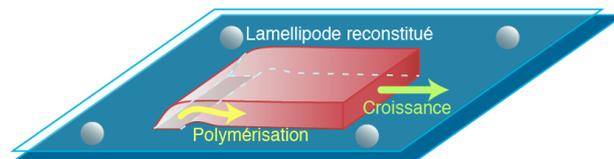


Figure 49. Résumé de la préparation de billes de polystyrène enrobées de pWA (Boujemaa-Paterski et al. 2014)

Deux tailles de microsphères de polystyrène carboxylate (Polysciences, Eppelheim, Germany) sont utilisées dans le milieu.

- **Les billes de 2,5 μm de diamètre**, greffées de GST-pWA, seront le contrôle interne pour chaque expérience.
 1. 5 μl de suspension de billes (à 2,5% solide/liquide) sont centrifugées pendant 1 minute à 13000 rpm ; le surnageant est délicatement éliminé.
 2. Les billes sont resuspendues avec 50 μl de solution de GST-pWA à 2 μM dans du tampon Xb (X buffer : 10 mM HEPES, pH 7.5 ; 0.1 M KCl ; 1 mM MgCl₂, 1 mM ATP ; et 0.1 mM CaCl₂)
 3. Incubation : pendant 15 min à 20°C dans un thermoshaker ; centrifugation à 4°C à 13000 rpm, pendant 2 minutes.
 4. Saturation: resuspension dans 200 μl de Xb avec 1% de BSA et incubation sur glace pendant 10 minutes. Puis centrifugation à 4°C à 13000 rpm, pendant 2 minutes.
 5. Suspension finale : resuspension avec 50 μl de Xb contenant 0,1% de BSA et stockage sur glace pendant une semaine au maximum.
- **Les billes de 4.5 μm de diamètre**, passivées à la BSA, serviront d'espaceur afin de contraindre la croissance en z du réseau (voir la figure ci-dessous).



Elles sont préparées suivant le même méthode que les billes-pWA, mais en remplaçant le pWA à l'étape 2 par de la BSA, 2% total.

Mix de billes (utilisé dans le milieu de motilité):

7 μl de Xb/0,1% BSA

2 μl de billes-BSA

1 μl de billes-pWA

1 μL de billes TetraSpeck, 0,5 μm , pour normaliser la fluorescence

1.2 - Préparation des lamelles de verre

Les surfaces hydrophobes empêchent les interactions non-spécifiques des protéines sur le verre. Cela a un double intérêt : la possibilité de créer des surfaces adhésives à géométries définies pour les protéines, et minimiser les frottements entre réseaux d'actine et surface. Les méthodes et quantités sont décrites pour des lamelles de verre de 20x20mm, sauf si spécifié différemment.

1.2.1 - Préparation d'une surface hydrophobe

1.2.1.1 - Lamelles avec PLL-PEG

Ces lamelles peuvent être préparées le jour même. Elles sont utilisées pour l'insolation au masque de chrome.

1. Nettoyer les lamelles à l'alcool ; frotter avec une Kimtech ; rincer à l'eau ultra-pure (Millipore) et sécher au pistolet d'air comprimé.
2. Oxydation au plasma: préchauffer la pompe du plasma 2 à 5 minutes avant utilisation. Introduire les lamelles dans l'appareil, faire le vide puis ouvrir la vanne d'air jusqu'à avoir une pression de 1MPa. Actionner le plasma pendant 3 minutes, à 80% de puissance.
3. Incubation du PLL-PEG : sur un parafilm, déposer pour chaque lamelle une goutte de 120 µl de solution de PLL-PEG 0,1mg/ml dans de l'HEPES 10 mM (pH 7,4). Déposer délicatement la lamelle côté oxydé en contact avec la goutte de PLL-PEG. Incuber pendant 30 minutes.
4. Lavage : déposer délicatement 100µl d'eau ultra pure entre lamelle et parafilm pour soulever la lamelle. Rincer la lamelle dans de l'eau ultra pure et sécher au pistolet d'air si nécessaire . Les lamelles sont conservées à 4°C dans une boîte de pétri fermée au parafilm, pendant 5 jours maximum.

Pour minimiser les frottements entre les structures d'actine et les lames, celles-ci peuvent également être traitées par ce procédé, en utilisant 300 µl de PLL-PEG pour l'incubation dans l'étape 3.

1.2.1.2 - Lamelles avec Silane-PEG

Ces lamelles doivent être préparées au plus tard la veille des expériences. Leur surface est idéale pour l'insolation au laser UV.

Jour 1 :

1. Préparation du Silane-PEG 0,1% (environ tous les deux mois) : faire chauffer à 70° une bouteille (avec un agitateur magnétique) contenant 250 mL d'éthanol 96% + 675 µL de HCl 37% . Dissoudre 250 mg de Silane-PEG 30k (PEG Works) dans la solution sous agitation. Conserver la solution à l'abri de la lumière.
2. Lavage des lamelles et des lames à la pissette d'éthanol 96% ; frotter avec un Kimtech puis rincer à l'eau ultra pure (MilliQ, Millipore) et sécher au pistolet d'air comprimé. Lames et lamelles sont disposés sur des portants spécifiques.
3. Sonication : dans de l'acétone pur, pendant 30 minutes à température ambiante.
4. Lavage dans de l'éthanol pur pendant 10 minutes, sous agitation
5. Rinçage des lames et lamelles (dans leur support) dans 3 bains d'eau MilliQ : (1) plonger plusieurs fois dans un premier bain d'eau de 500 ml ; (2) plonger et tourner plusieurs fois dans un deuxième bain d'eau de 2L ; (3) plonger plusieurs fois dans un bain d'eau de 500 ml.
6. Lavage à l'Hellmanex 2% pendant deux heures, sous agitation
7. Rinçage prolongé des lames et lamelles (toujours dans leur support) comme à l'étape 4. Séchage à l'air comprimé. A ce stade les lamelles peuvent être gardées pour poursuivre la préparation quelques jours plus tard.
8. Oxydation au plasma : préchauffer la pompe du plasma 2 à 5 minutes avant utilisation. Introduire les lamelles ou les lames dans l'appareil, faire le vide puis ouvrir la vanne d'air jusqu'à avoir une pression de 1MPa. Actionner le plasma pendant 5 minutes, à 80% de puissance.
9. Incubation au Silane-PEG : Placer les lames et lamelles dans une solution de Silane-PEG 30kDa à 0,1%. Laisser sous agitation, à température ambiante, sur la nuit (environ 18 heures)

Jour 2 :

10. Préparer 3 béchers d'eau MilliQ : (1) 500mL d'éthanol 96% ; (2) 2L d'eau MilliQ ; (3) 500 mL d'eau MilliQ
11. Rinçage individuel des lames et lamelles : (1) plonger et tourner 5 fois délicatement le verre dans l'éthanol ; (2) transférer dans le bain d'eau et rincer jusqu'à disparition de l'éthanol de la surface du verre ; (3) plonger une dizaine de fois le verre dans le second bain d'eau. Sécher à l'air comprimé si nécessaire.

Les lamelles sont conservées à 4°C dans une boîte de pétri fermée au parafilm, pendant 5-7 jours.

1.2.2 - Microgravure UV

1.2.2.1 - Microgravure par masque de Chrome

Des formes géométriques prédéfinies sont imprimées sur le PLL-PEG grâce un masque en chrome opaque empreint de zones transparentes (Photomask, Toppan). Le PLL-PEG exposé au niveau des zones transparentes est dégradé par des UV profonds et ces zones de micropatrons sont capables d'adsorber des protéines (**Figure 50**).

La surface est ensuite fonctionnalisée avec le pWA, qui vient s'adsorber uniquement sur le PLL-PEG dégradé. La nucléation sera donc spatialement contrôlée et contrainte aux zones de nucléation contenant du pWA.

Dans la pratique, les étapes sont :

1. Préchauffer l'appareil à UV profonds pendant 7 minutes
2. Placer les lamelles sur le support métallique face PLL-PEG vers le haut en face de la zone d'intérêt sur le masque de chrome.
3. Déposer délicatement le masque de chrome sur le support et actionner l'aspiration pour maintenir le masque sur le support et pour qu'il soit bien en contact avec la lamelle.

4. Insérer le support dans l'appareil et insoler pendant 5 minutes.
5. Sortir le support, arrêter l'aspiration et retourner doucement le masque pour récupérer les lamelles.
6. Procéder à la fonctionnalisation rapidement.

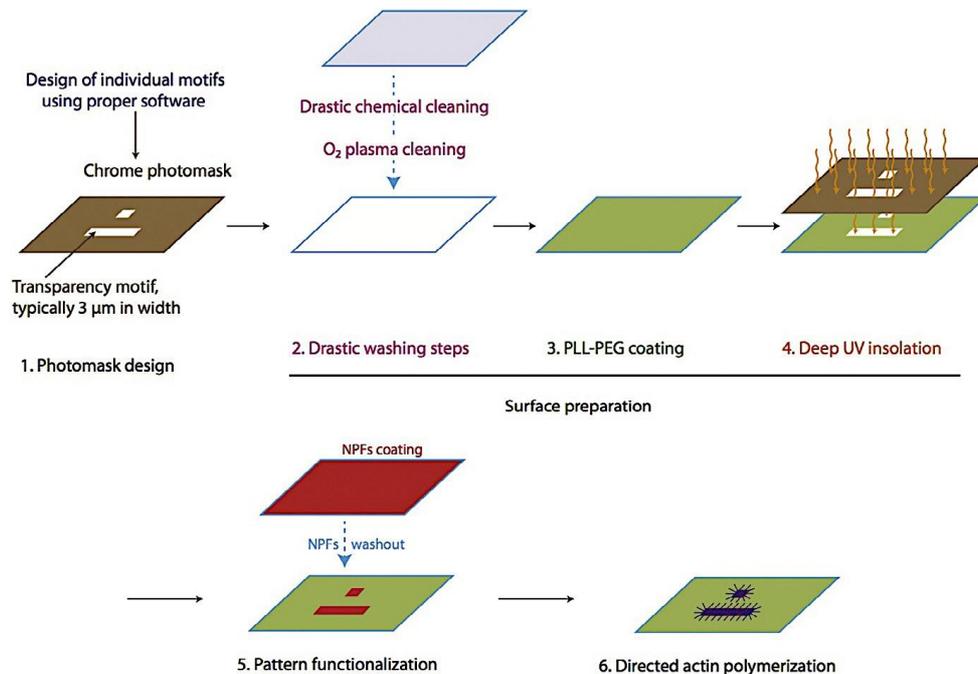


Figure 50. Méthode de fabrication de micropatrons au masque de chrome sur une surface de PLL-PEG (Reymann et al. 2014)

Dans ce type de micropatrons « UV », l'insolation est uniforme donc il existe un unique zone de nucléation. Il est possible de faire varier la concentration de pWA pour la fonctionnalisation ; toutefois l'architecture d'un réseau d'actine généré par un tel micropatron sera toujours la même.

Afin de pouvoir varier l'architecture des réseaux, il faudrait pouvoir contrôler les zones de nucléation au sein d'un micropatron. Pour cela, les micropatrons « laser » ont été développés.

1.2.2.2 - Microgravure par laser UV pulsé

Les micropatrons « laser » reposent sur les mêmes principes de dégradation d'une surface hydrophobe que les micropatrons « UV ». On utilise des lamelles Silane-PEG 30kDa afin d'obtenir une surface plus hydrophobe que le PLL-PEG grâce à la chaîne de PEG plus longue dans le Si-PEG. Ainsi, les frictions entre le réseau d'actine et les surfaces sont minimisées. Cette méthode présente aussi l'avantage d'être sans contact avec un masque de chrome, donc de ne pas abîmer la surface hydrophobe.

L'atout majeur est qu'à la différence des micropatrons au masque de chrome, uniformes sur leur surface, la gravure au laser permet de créer des micropatrons formés de points d'impact laser, ou « **spots** ». On peut alors obtenir différentes **densités** de micropatrons, définies par un nombre plus ou moins importants de spots pour une région donnée.

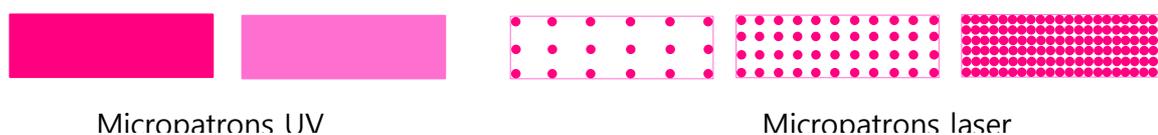


Figure 51. Différence entre microgravure au masque de chrome (« micropatrons UV ») et laser UV (« micropatrons laser »).

Les micropatrons sont générés sur une microscope inversé Nikon TE2000 équipée d'un laser UV pulsé (355 nm). Cette « station laser patterning » doit être préchauffée au moins une heure avant de graver les lamelles. Toute la procédure est pilotée par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices).

Il faudra d'abord procéder à une **calibration** :

1. Vérifier la puissance du laser : il doit être autour de 120µW en moyenne
2. Déposer une goutte d'huile adaptée sur l'objectif et monter une lamelle couverte d'une fine couche de polystyrène (pour visualiser les points d'impact du laser, car on ne les verra pas sur une surface Si-PEG)

3. Dans MetaMorph :

- Ouvrir « Laser Control » ; définir les valeurs de TIRF et de FRAP à zéro ; définir la fréquence du laser UV 355 à 2000 Hz
- Cliquer sur le bouton « Laser Ablation » puis sur « ON »
- Faire la mise au point sur la surface de polystyrène en lumière blanche, et enclencher le PFS (*Perfect Focus System*) pour conserver la mise au point
- Basculer en fluorescence pour voir le faisceau laser. Centrer le faisceau dans la fenêtre, et le focaliser.
- Procéder à la calibration : bouton « automatic calibration »

Gravure-test sur polystyrène :

Elle permet d'identifier des défauts de gravure s'il y en a (inhomogénéité...). Cette étape est importante puisque lors de la gravure sur Silane-PEG on ne voit pas les régions gravées en lumière blanche.

Une fois la calibration terminée, se placer sur une nouvelle zone de la lamelle et faire un test en exécutant le journal (script) approprié aux patrons que l'on souhaite graver. Un tel journal fait appel à des régions définies précédemment, de la taille du patron souhaité. Les positions des micropatrons et des spots qui les constituent sont définies par des coordonnées précises.

A chaque région est attribuée une densité d'impacts laser. Cette densité d'impacts est définie par la distance en pixels entre deux points d'impacts, appelée SD. Donc un micropatron dense aura un SD faible et inversement.

Dans mes expériences, mes patrons ont une largeur de 3 μ m et une longueur de 15, 30 ou 90 μ m. Dans un premier temps, j'ai gravé des trios de patrons de 15x3 μ m séparés de 50 μ m, à des « densités » différentes : SD9, SD6, SD3. Plus tard, je simplifierai cette appellation par « faible », « moyenne » et « haute » densité (**Figure 52**).

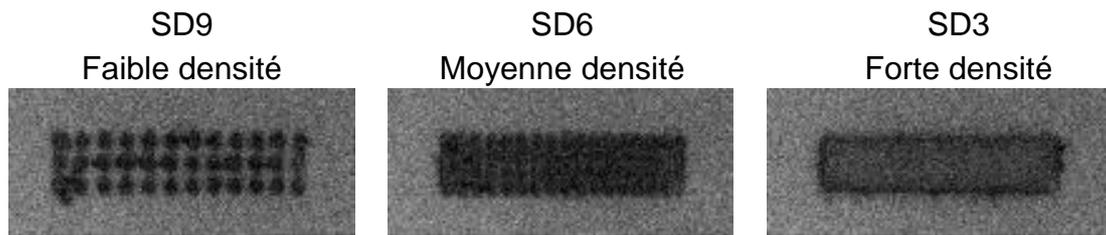


Figure 52. Gravure-test sur lame couverte de polystyrène, observée en lumière blanche.

Gravure des lames Si-PEG:

1. Chaque lamelle est montée sur une chambre hermétique Cytoo, et sur une platine adaptée.
2. En lumière blanche, faire la mise au point sur la surface grâce aux (rares !) poussières ou aspérités présentes à la surface.
3. Basculer en fluorescence UV ; focaliser le faisceau laser grâce à la molette de contrôle.
4. **Défocaliser le faisceau en faisant un tour de molette dans le sens horaire.** On présume que cela permet que le faisceau laser arrive au niveau de la couche de PEG. Il faut s'appliquer à faire ce tour de molette à une vitesse identique pour chaque lamelle sinon la variation en z diffère.
5. Définir le temps de frappe : généralement de 20 ms (mais peut être ajusté de 15 à 80 ms si un temps de 20 ms ne donne pas des résultats satisfaisants).
6. Lancer le journal adapté aux patrons que l'on souhaite graver : définir le nombre de lignes et de colonnes à graver et valider.
7. Une fois terminé, enlever le support avec la lamelle, essuyer l'huile de la lamelle avec un Kimtech puis enlever les résidus avec un Kimtech imbibé d'éthanol.

1.2.3 - Fonctionnalisation avec le pWA

Que ce soit au masque ou au laser, les lamelles gravées doivent rapidement être fonctionnalisées. Au cours de ma thèse, j'ai utilisé le GST-pWA pour obtenir mes surfaces de nucléation. La méthode est la suivante :

1. Déposer sur une feuille de Parafilm une goutte de 105 μL de solution d'incubation (100 μL de pWA dans du tampon 1x KMEI + 5 μL de BSA 10%)
2. Incuber pendant 15 minutes à température ambiante

Rinçage : Cette étape de rinçage est cruciale car mal effectuée, elle peut soit décrocher le pWA du Silane, soit être insuffisante et des résidus de sels subsistent à la surface, ce qui conduira à de la polymérisation spontanée d'actine dans le milieu en dehors des régions de nucléation.

3. Injecter doucement 1mL de 1x KMEI froid entre lamelle et Parafilm pour soulever la lamelle et diluer le pWA ; attendre 30 secondes.
4. Prendre délicatement la lamelle et la déposer dans une coupelle contenant 15 mL de Tampon G froid ; faire tourner lentement la coupelle pendant 15 secondes.
5. Reprendre la lamelle et la rincer dans de l'eau MilliQ en un aller-retour, ni trop lent ni trop rapide. Sécher doucement à l'air comprimé.

Afin de vérifier l'efficacité de la fonctionnalisation, on peut incuber les micropatterns avec un mélange 1:1 de pWA non marqué et de pWA marqué à l'Alexa488. Un exemple d'une telle incubation est montré en **Figure 53**.

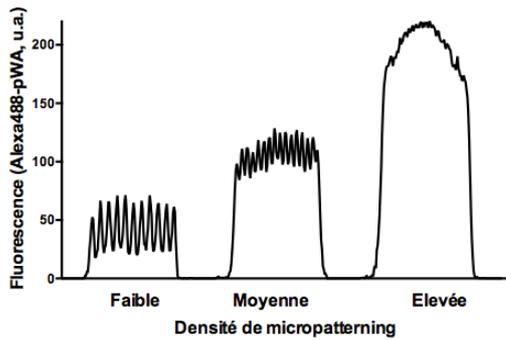
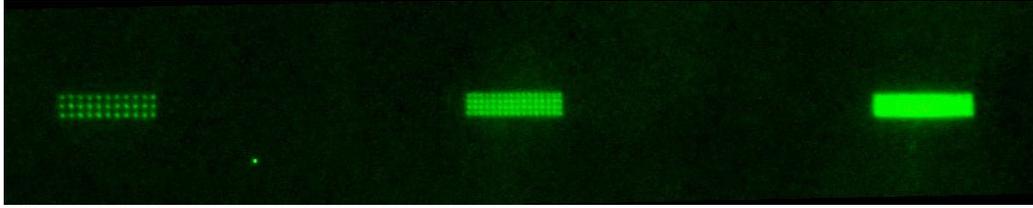


Figure 53. Trois densités de micropatrons gravés au laser UV

Les densités sont les mêmes qu'en figure 3 (SD9, SD6, SD3).

Un mélange 1:1 de pWA et de pWA-Alexa488 permet de visualiser les micropatrons après une incubation selon le protocole décrit. La mesure de fluorescence montre bien l'augmentation en pWA à mesure que le micropatron est constitué de points denses.

Une fois les micropatrons gravés et fonctionnalisés, ils sont prêts à être utilisés pour les essais de motilité.

2- MILIEUX DE MOTILITE RECONSTITUES

Les protéines utilisés dans les milieux de motilité sont purifiés tel que décrit dans Reymann et al., 2011.

2.1 - Milieu minimal de polymérisation de l'actine

Ce milieu est constitué d'un mélange des protéines nécessaires à la polymérisation de filaments d'actine, supplémenté en sels et en ATP pour déclencher et maintenir cette polymérisation. Il contient également du DABCO, un agent protecteur contre le stress oxydatif provoqué par l'excitation de l'actine fluorescente.

Mix d'Actine

45 μ M d'actine-G (monomérique)
 1,35 μ M actine-Alexa568 (3% final)

Tampon d'échange 3x

(pour 45 μ M d'actine)
 600 μ M EGTA
 120 μ M MgCl₂

Mix ATP

2 vol. ATP (30 mM)/ MgCl₂ (60 mM)
 2 vol. DABCO (2,2 mM)
 1 vol. DTT (0,1 M)

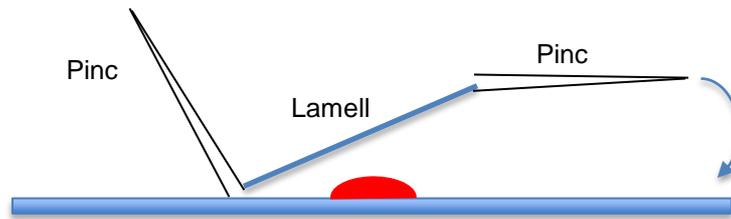
L'étape d'échange permet d'échanger le Ca²⁺ pour du Mg²⁺ au sein du monomère d'actine, puis de complexer les monomères d'actine à la profiline, ajoutée en excès pour assurer le blocage complet de la nucléation spontanée.

1. Préparer un Mix Profiline-Actine (67,5 μ M Profiline, 22,5 μ M actine)
2. Incuber pendant **5 minutes** sur glace :
 2 μ L Mix d'actine (45 μ M) + 1 μ L Tampon d'échange 3x
3. Ajouter 1 μ L de Profiline (270 μ M), incuber **5 minutes** sur glace

Pendant ce temps, préparer le milieu de motilité désiré puis ajouter le mix profiline-actine à la fin de l'incubation:

Sans CP	+CP	+CP et Cofiline
2 μ L BSA 10%	2 μ L BSA 10%	2 μ L BSA 10%
3 μ L Mix ATP	3 μ L Mix ATP	3 μ L Mix ATP
2,5 μ L Xb	1,5 μ L Xb	0,5 μ L Xb
120 nM Arp2/3	120 nM Arp2/3	120 nM Arp2/3
0,5 μ L de Mix de billes	20 nM CP	20 nM CP
2 μ L Methylcellulose 2%	0,5 μ L de Mix de billes	125-400 nM yCofilin-488
	2 μ L Methylcellulose 2%	0,5 μ L de Mix de billes
		2 μ L Methylcellulose 2%
<hr/>		
+ Mix Profiline-Actine	+ Mix Profiline-Actine	+ Mix Profiline-Actine

4. Bien mélanger (délicatement) le Mix Proflin-Actine et le reste du milieu pour bien homogénéiser les constituants, en particulier la méthylcellulose qui rend le milieu plus visqueux.
5. Prélever 2,3 μL de milieu de motilité, déposer une goutte sur la lame et déposer très délicatement la lamelle-pWA sur la goutte à l'aide de deux pinces comme indiqué ci-dessous.



6. Démarrer le minuteur et sceller la lamelle avec du VALAP fondu (préparation 1 :1 :1 de vaseline, lanoline et paraffine).
7. Mettre la lamelle sur la platine du microscope, enregistrer les positions désirées (20 au maximum) et débiter l'acquisition à +8 minutes. Les acquisitions de timelapses se font toutes les 2 minutes, durant 60 minutes.

2.2 - Milieu avec FITC-Dextran pour l'étude de la diffusion

Afin d'établir si l'accessibilité des protéines au réseau d'actine joue un rôle dans les dynamiques de désassemblage observées, du FITC-Dextran est ajouté au milieu. C'est une molécule qui n'interagit avec aucun composant du milieu de motilité.

L'intérêt est que si le réseau d'actine joue un rôle de tamis moléculaire, le Dextran n'aura pas accès à l'intérieur du réseau, et il y aura une baisse de fluorescence du FITC là où se trouve le réseau d'actine. Ces expériences sont le support de modélisations mathématiques pour décrire le comportement des molécules dans un environnement encombré tel que le réseau branché d'actine de

type lamellipodial.

Plusieurs poids de Dextrans ont été utilisées : 10 kDa, 40 kDa, 150 kDa et 500 kDa. L'hypothèse est que plus grande sera la molécule, plus elle sera exclue de l'intérieur du réseau d'actine. Cependant, les Dextrans de 150 et 500 kDa s'accumulent à la surface du réseau et ces résultats n'ont donc pas pu être exploités.

La poudre de Dextran est diluée à **6mg/mL dans du tampon Xb**. Pour intégrer le Dextran au milieu de motilité, le mix de billes standard du milieu de motilité est remplacé par un nouveau mix de billes :

Mix Billes Dextran :

8 μ L de Dextran

2 μ L de billes BSA

1 μ L de billes pWA

1 μ L de billes TetraSpeck, 0,5 μ m

Des réseaux d'actine sont polymérisés à partir de patrons laser et de patrons UV (pour les réseaux les plus denses correspondant à une densité SD1 en gravure laser, qui serait trop longue à mettre en œuvre à cette densité).

Les réseaux polymérisent pendant 60 minutes avant l'acquisition de clichés. L'acquisition ne doit pas durer plus de 15-20 minutes pour minimiser l'hétérogénéité des résultats à cause :

- de la croissance des réseaux d'actine qui est maintenue, et
- du photoblanchiment induit par les acquisitions successives.

En effet, pour un champ donné, il y a une première acquisition correspondant à la meilleure mise au point pour la comète d'actine. Cette position est enregistrée dans MetaMorph. Puis, comme les billes TetraSpeck ont tendance à fluctuer en z, plusieurs autres clichés sont nécessaires pour avoir toutes les billes du champ d'acquisition dans le bon plan.

L'opération est répétée pour le Dextran, en utilisant la position précédemment enregistrée pour la comète d'actine.

3- METHODES D'ANALYSE DES RESULTATS

3.1 - Analyse d'images

3.1.1 - Mesure de la fluorescence

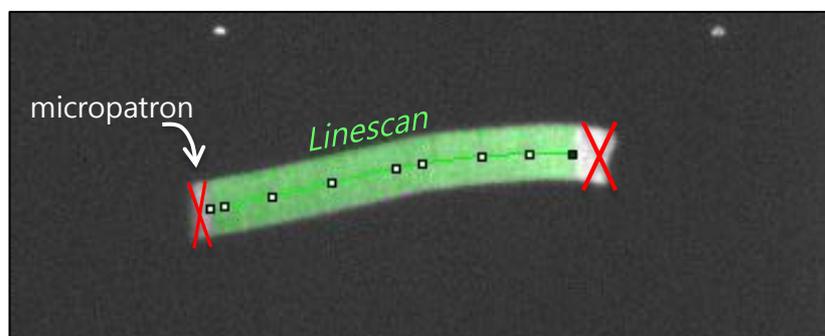
Les mesures de fluorescence sont faites avec le logiciel Fiji ; les régions d'intérêt sont sélectionnées manuellement. Les réseaux d'actine seront appelés « lamellipodes » ou « LMs » par la suite.

Pour chaque LM:

1) Dans Fiji, un **linescan segmenté** est tracé le long de la comète d'actine. Sa largeur correspond à celle du micropatron (généralement 45 pixels pour les micropatrons de 15 μm , 90 et 270 pixels pour ceux de 30 μm et 90 μm) ; cette largeur est éventuellement ajustée à la largeur de la comète.

Deux zones sont exclues de la mesure :

- la zone du micropatron,
- la portion la plus distale de la comète, correspondant à l'actine initialement assemblée verticalement et en direction de la lamelle. Cette portion présente de l'actine très dense, qui pourrait fausser les résultats.



- 2) La **fluorescence** est mesurée : soit la moyenne (**Figure 54**), soit le long du tracé.
- 3) Le tracé du linescan (ROI, *Region of Interest*) est **sauvegardé** pour la mesure dans le second canal (Cofiline ou Dextran).
- 4) Le **bruit de fond** moyen est mesuré par la même méthode. Toutefois, le canal GFP présente une forte hétérogénéité du signal dans les images de Dextran. Ceci a nécessité une adaptation de la mesure du bruit de fond. Un exemple de différences de mesures est montré **Figure 55**. La mesure la plus proche du bruit de fond a donc consisté à tracer un linescan qui encercle le réseau et d'en extraire la valeur moyenne.

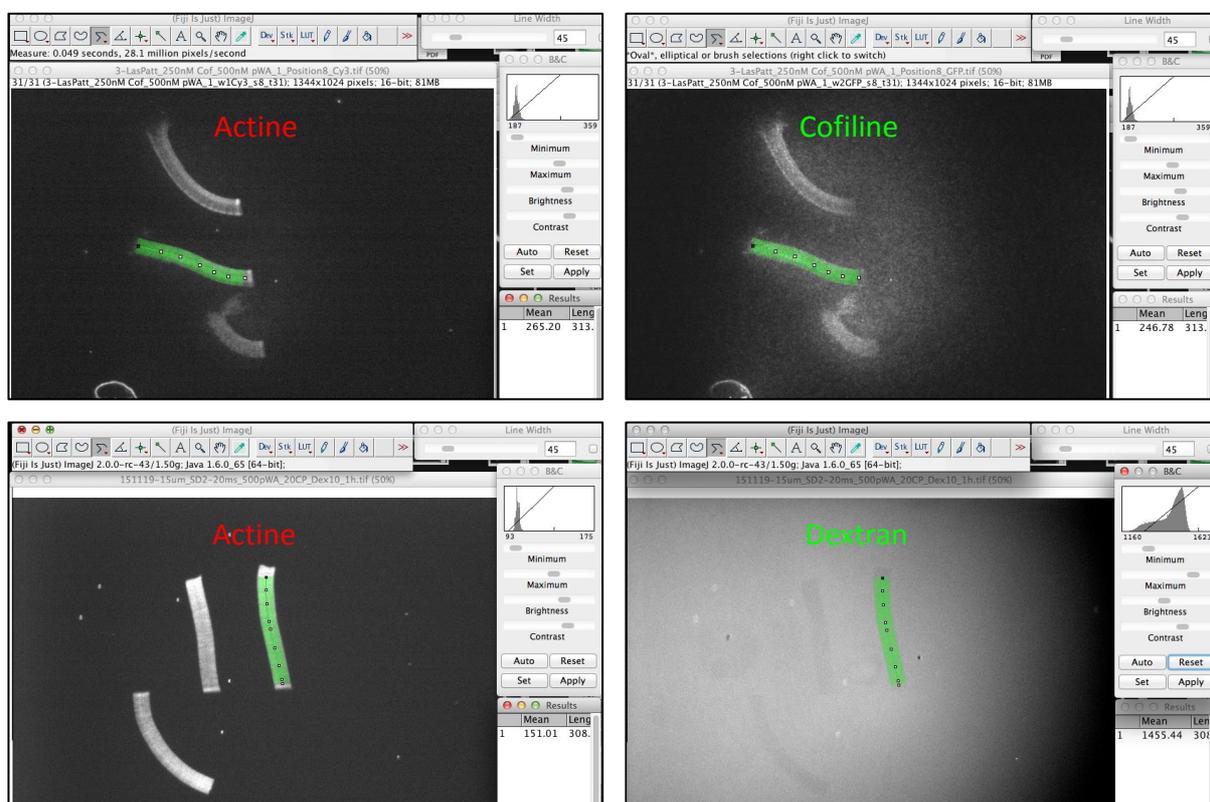


Figure 54. Mesure de différentes fluorescences sur les comètes d'actine. La fonction *linescan segmenté* du logiciel Fiji est utilisée. On peut en extraire soit une valeur moyenne pour toute la région sélectionnée, soit des valeurs le long de la région (non illustré).

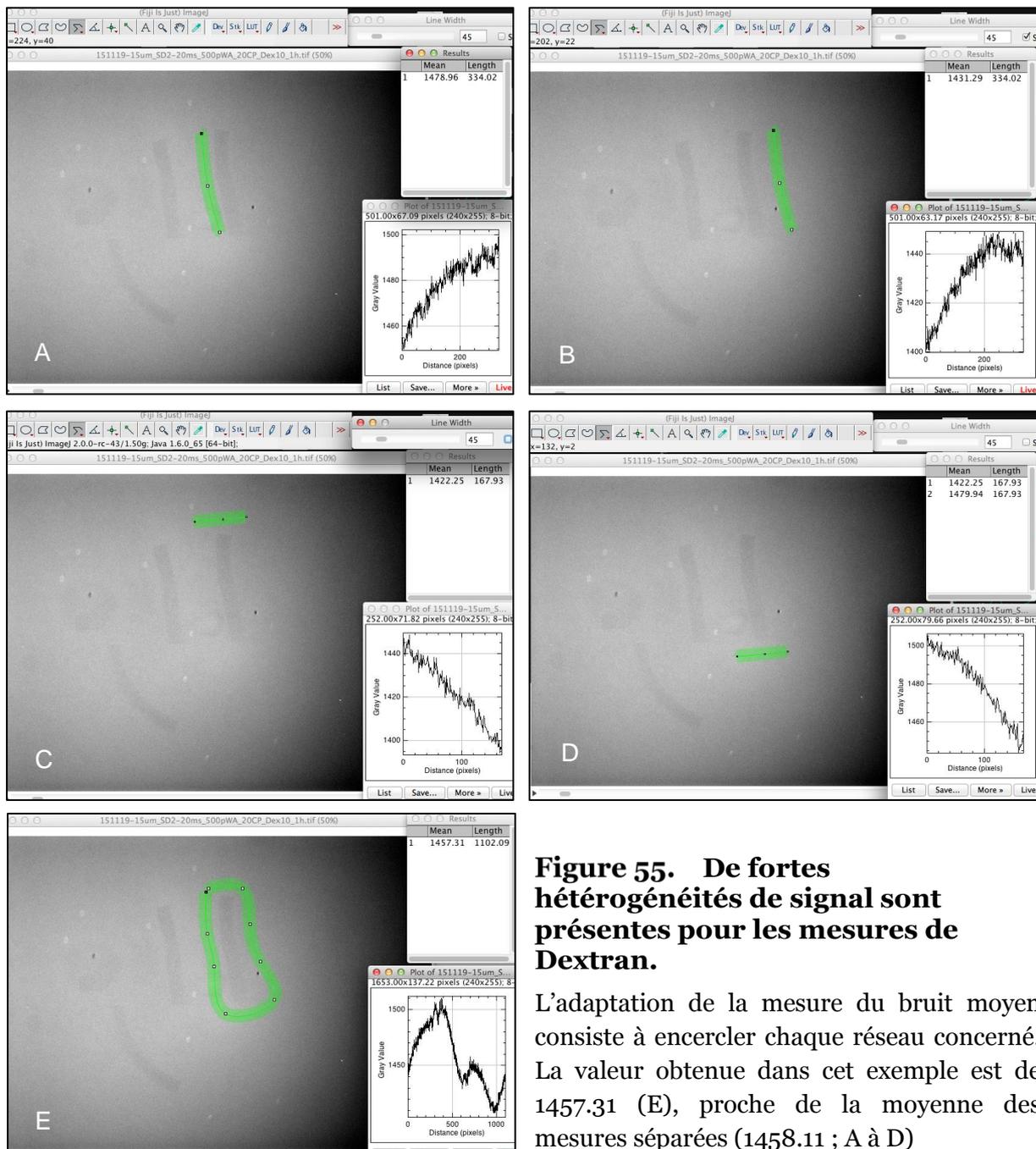


Figure 55. De fortes hétérogénéités de signal sont présentes pour les mesures de Dextran.

L'adaptation de la mesure du bruit moyen consiste à encercler chaque réseau concerné. La valeur obtenue dans cet exemple est de 1457.31 (E), proche de la moyenne des mesures séparées (1458.11 ; A à D)

5) La normalisation se fait grâce aux billes TetraSpeck (« TS », 0,5 μm). Pour chaque timelapse, j'utilise la fonction *Maximum Projection* puis j'extrais l'intensité maximale des billes TS. Toutefois il faut vérifier manuellement que la mesure correspond bien à une bille dans le plan, qu'elle ne corresponde pas un agrégat de billes ou à une poussière, etc. comme illustré en **Figure 56**.

Pour les expériences avec le Dextran, plusieurs images sont prises pour une même position, afin d'avoir plusieurs billes dans le focus.

6) Les étapes précédentes sont répétées pour le second canal d'acquisition.

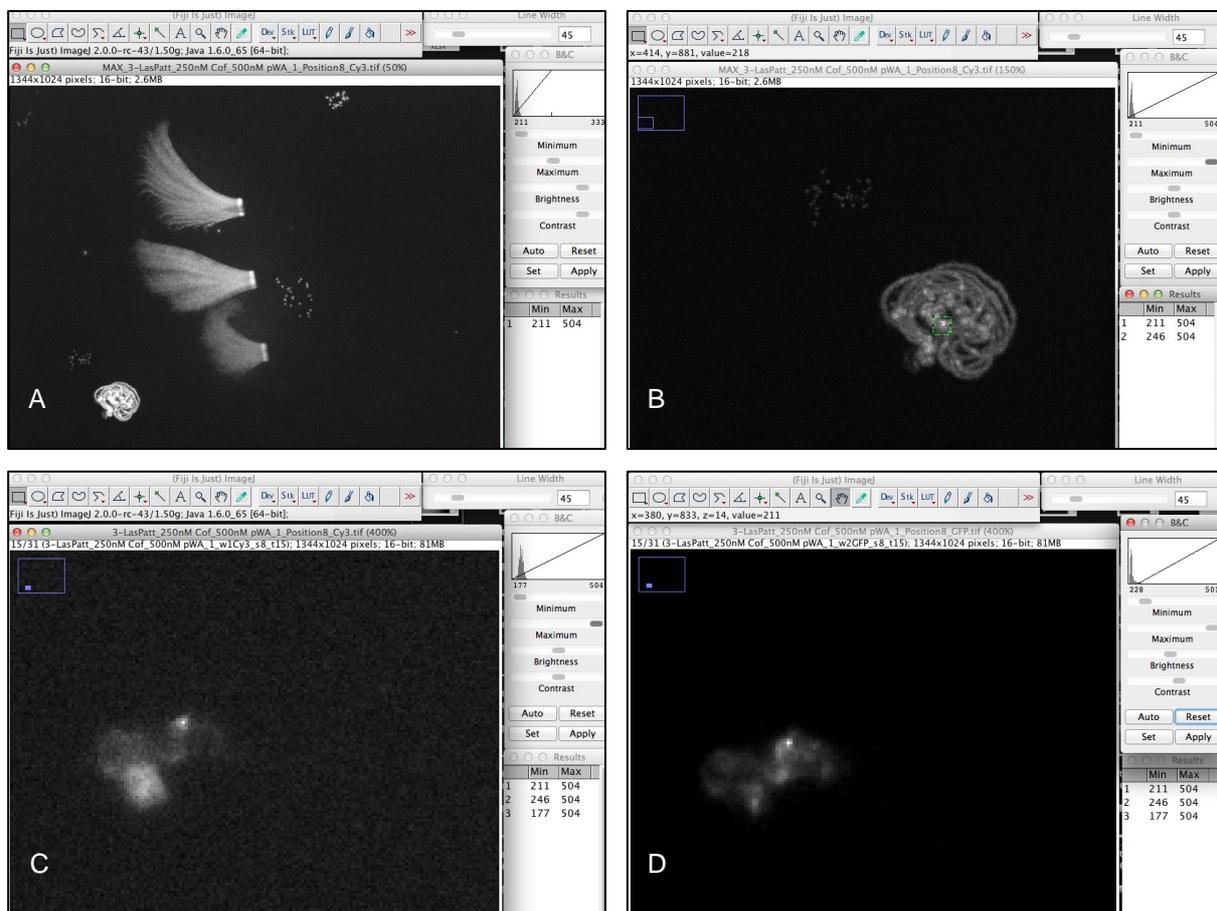


Figure 56. La normalisation par les billes TetraSpeck nécessite une vérification manuelle.

Dans cet exemple, la valeur maximale de fluorescence mesurée dans la Maximum Projection (A, B) ne correspond pas à une bille TS mais à un point sur la lamelle très fluorescent, d'où polymérisation de l'actine (C, D)

3.1.2 - Normalisation

Les valeurs sont normalisées en soustrayant le bruit de fond et en divisant par l'intensité maximale des billes TetraSpeck. Pour une lecture graphique plus claire, un multiplicateur de x1000 est appliqué. Ainsi :

$$D(\text{Actine}) = [(S_{\text{Actine}} - B_{\text{Actine}}) / TS_{\text{max}}] \times 1000$$

$$D(\text{ADF}) = [(S_{\text{ADF}} - B_{\text{ADF}}) / TS_{\text{max}}] \times 1000$$

$$D(\text{Dextran}) = [(S_{\text{Dex}} - B_{\text{Dex}}) / TS_{\text{max}}] \times 1000$$

Avec :

D : Densité normalisée

S : Signal mesuré de l'actine, de l'ADF/Cofiline, du Dextran

B : Bruit de fond des mesures d'actine, d'ADF/Cofiline, de Dextran

TS_{max} : Intensité maximale des billes TetraSpeck

3.2 - Analyse des résultats et modèles mathématiques

Les données sont traitées sous Microsoft Excel, et avec le logiciel GraphPad Prism pour les graphiques et les analyses statistiques.

Le modèle mathématique est élaboré par Angelika Manhart et Alex Mogilner, du *Courant Institute of Mathematical Sciences*, Université de New York. Il est testé avec des simulations sous MatLab (MathWorks).

CHAPITRE 3 : RESULTATS

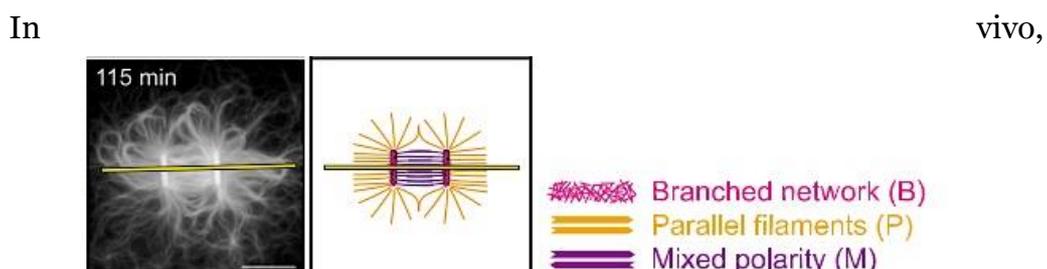
POSITION DU SUJET

Figure 57. Reconstitution *in vitro* des différentes architectures d'actine à partir de micropatrons fonctionnalisés. (Gressin et al. 2015)

Dans une cellule, les filaments d'actine s'organisent en câbles parallèles, antiparallèles ou de polarité mixte (respectivement filopodes, fibres de stress, arcs transverses,) et en réseaux réticulés ou dendritiques (e.g. cortex intracellulaire ou lamellipode).

Pour maintenir un réservoir d'actine prêt à être polymérisé, ces structures doivent être recyclées en monomères. Une protéine clé dans ce recyclage est l'ADF/Cofiline, protéine de fragmentation des filaments d'actine ou capable de dissocier les branches d'un réseau d'actine généré par le complexe Arp2/3. Récemment, il a été démontré *in vitro* que le désassemblage des filaments d'actine dépend de leur architecture (Gressin et al. 2015).

En effet, dans un système expérimental où plusieurs architectures d'actine coexistent (**Figure 57**), il apparaît que les réseaux dendritiques d'actine sont préférentiellement désassemblés par ADF/Cofiline. Au contraire, les organisations en câbles parallèles ou de polarité mixte sont faiblement fragmentés, et nécessitent la synergie entre ADF/Cofiline et une autre protéine, Aip1 pour une fragmentation et un désassemblage efficaces. Ainsi, le désassemblage des filaments d'actine dépend de leur organisation ou **architecture**.



l'établissement et la dynamique de diverses architectures de filaments d'actine sont essentiels à la génération des forces qui permettent aux cellules de se déplacer, de se déformer ou encore d'entrer en division (Pollard & Borisy 2003; Blanchoin et al. 2014). En particulier, la migration cellulaire est essentielle au développement des organismes (Scarpa & Mayor 2016).

La motilité cellulaire débute par la génération d'une protrusion membranaire au bord-avant de la cellule, par polymérisation d'un réseau dendritique d'actine. Cette protrusion de l'ordre de 200 nm d'épaisseur, quasi bidimensionnelle, est appelée **lamellipode**.

Le réseau d'actine dendritique qui constitue le lamellipode est dense, et extrêmement régulé. En effet, son organisation interne et son renouvellement nécessitent l'action coordonnée de nombreuses protéines se fixant sur l'actine. Tandis que son assemblage soutenu - près de la membrane cellulaire - est assuré par la nucléation dendritique par complexe Arp2/3 (Mullins et al. 1998), il est désassemblé à l'arrière du lamellipode par ADF/Cofiline.

Dans une cellule, le réseau d'actine dans le lamellipode peut être désassemblé en moins d'une minute (**Figure 58**) (Lai et al. 2008) et ceci dans des types cellulaires très différents (fibroblastes, neutrophiles, kératocytes). Ceci suggère qu'il existe des lois permettant à une même architecture (i.e. : un réseau branché) mais de composition ou densité variable d'atteindre un état dynamique stationnaire pour une échelle de temps similaire.

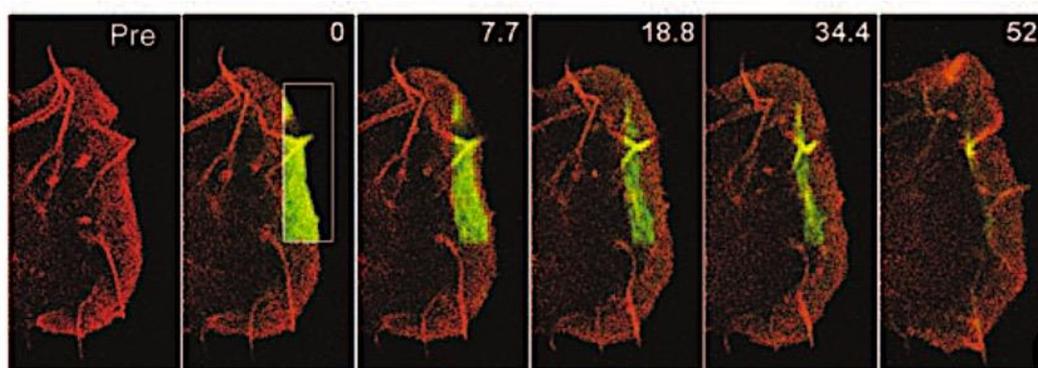


Figure 58. Turnover de l'actine observée dans le lamellipode.

La zone encadrée est photo-convertie 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. Echelle : 2 μm , unités : secondes (Lai et al. 2008)

Bien que l'action de l'ADF/Cofiline sur des filaments individuels d'actine soit bien caractérisée, elle ne suffit pas à expliquer les dynamiques rapides et adaptatives observées dans le lamellipode.

En effet, l'épaisseur d'un lamellipode (quelques centaines de nanomètres) est relativement constante entre le bord-avant et le centre de la cellule (Laurent et al. 2005), mais il existe un gradient de densité du réseau d'actine qui construit cette structure (Small et al. 1995; Lewalle et al. 2014). Ces observations sont cohérentes avec la polymérisation du réseau près de la membrane plasmique et son désassemblage à l'arrière du lamellipode. Mais pose ici aussi la question de l'obtention d'un régime stationnaire dynamique.

De plus, ce gradient de densité engendre un gradient de rigidité du lamellipode qui a été mesurée *in vivo* chez le kératocyte de poisson (Lewalle et al. 2014). Cette rigidité est importante pour produire la force nécessaire à la propulsion en avant de la cellule. Dans le même temps, la perte de rigidité à l'arrière du lamellipode (grâce que désassemblage par ADF/Cofiline) est vue comme un facteur facilitant la contraction par les myosines et donc l'ensemble de la translocation de la cellule (Lewalle et al. 2014; Svitkina et al. 1997). Cependant, le réseau lamellipodial du kératocyte de poisson, utilisé comme modèle d'étude du lamellipode, est très dense et ne reflète pas le panel de densités possibles chez d'autres types cellulaires.

En plus de la densité variable d'un lamellipode, on observe *in vivo* une variabilité dans l'étendue de ce lamellipode en périphérie de la cellule. Alors qu'il représente une grande partie du kératocyte – de l'ordre de 40-60 μm (Keren et al. 2008) - où il a un mouvement persistant mais garde une taille stationnaire au cours de la motilité, il s'étend moins chez d'autres types cellulaires. Par exemple, il est de l'ordre de 30 μm dans les cellules HL60 apparentées aux neutrophiles, hautement

motiles et dont le lamellipode subit des réorganisations morphologiques importantes. Chez les cellules de mélanome murin B16-F1, qui présentent un lamellipode stationnaire, il est de l'ordre de 15 μm (Lewalle et al. 2014).

Jusqu'à présent, l'impact de la densité du réseau dans son désassemblage par ADF/Cofiline a été très peu étudié (Reymann et al. 2011). Les paramètres permettant l'obtention d'un régime dynamique stationnaire ne sont pas non plus élucidés. Au cours de ma thèse, j'ai pu explorer ces questions en utilisant des systèmes biomimétiques combinant milieu biochimique de motilité reconstitué et fonctionnalisation de surface.

J'ai ainsi pu aborder 3 questions importantes :

- 1) Comment la densité d'un réseau branché d'actine affecte son turnover ;
- 2) Comment la taille d'un réseau branché d'actine affecte son turnover ;
- 3) Comment l'hétérogénéité d'un réseau d'actine affecte sa dynamique.

RESULTATS

En créant des micropatrons fonctionnalisés avec des zones de nucléation variables (**Figure 59A**), j'ai pu reconstituer des réseaux d'actine de différentes densités et de différentes largeurs tel qu'illustré en **Figure 59B**.

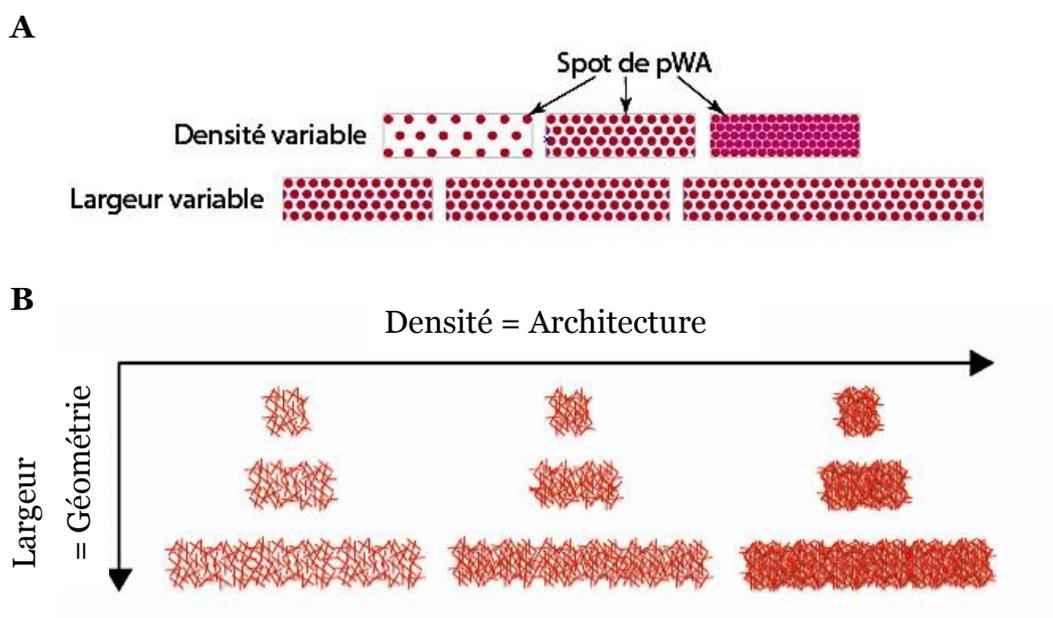


Figure 59. Reconstitution de réseaux branchés d'actine de type lamellipodial

A) Micropatrons formés de différentes densités de « spots » fonctionnalisés au pWA, qui active la nucléation d'actine F. La densité, mais également la taille des micropatrons, sont ainsi modulables. B) Grâce à ces micropatrons, on peut générer des réseaux d'actine plats, de densités (= architectures) et de largeurs (= géométries) variables.

Dans cette présentation de mes résultats, j'utiliserai les termes « **architecture** » et « **géométrie** » pour désigner respectivement la densité et la largeur des différents micropatrons et réseaux d'actine.

Grâce à ce système où je modifie les paramètres de densité et de largeur tout en ayant une biochimie contrôlée, il est possible d'observer et quantifier l'assemblage et le désassemblage macroscopique par ADF/Cofiline des réseaux d'actine. A la différence du désassemblage à l'échelle des filaments, le **désassemblage macroscopique** est défini ici comme la perte de portions entières du réseau qui

forme le lamellipode reconstitué. Ce désassemblage macroscopique est le résultat de la perte de la cohésivité au sein du réseau par désassemblage à l'échelle des filaments. Il y a donc, dans ce désassemblage, d'une part la contribution de l'interaction entre ADF/Cofiline et actine, que je quantifie par le **ratio** des fluorescences de l'ADF/Cofiline et de l'actine. D'autre part, l'action d'ADF/Cofiline sur les filaments conduit aux débranchements et aux ruptures des filaments au sein du réseau d'actine, qui peuvent être évalués par la **fluorescence** de l'actine.

1- ASSEMBLAGE DE RESEAUX BRANCHES D'ACTINE DE DIFFERENTES DENSITES A PARTIR DE MICROPATRONS

Dans un premier temps, j'ai fait varier la densité de gravure des micropatrons pour une largeur constante de 15 μm (**Figure 60**). Pour visualiser les points gravés et mesurer la quantité de pWA présent dans chaque cas, on peut incuber les micropatrons avec un mélange à parts égales de pWA non marquée et de pWA marquée à l'Alexa-488. On peut observer qu'entre les micropatrons de «Basse», «Moyenne» et «Haute» densité, on a une augmentation de la fluorescence maximale quasi linéaire (**Figure 60A**).

L'ajout du milieu de polymérisation sur ces patrons permet de générer des réseaux branchés d'actine, structurés en feuillets comme dans un lamellipode. Grâce à l'actine marquée à l'Alexa-568, ces structures sont visualisées et leur croissance enregistrée (**Figure 60B**).

L'analyse des réseaux branchés d'actine ainsi obtenus permet de valider dans un premier temps la preuve de concept. En **Figure 60C**, panel de gauche, plus la densité de gravure du micropatron est élevée (« pattern density »), plus la densité des réseaux d'actine qui en émanent est élevée. Ceci est représenté par la fluorescence normalisée moyenne de l'actine. Je suis donc capable à ce stade de générer des réseaux branchés d'actine de différentes densités.

En réalité, nous pouvons caractériser deux paramètres de ces réseaux d'actine: leur **densité** et leur **longueur**, qui reflète leur vitesse de croissance (**Figure 60C**).

La densité moyenne du réseau d'actine, mesurée par sa fluorescence normalisée, augmente bien à mesure que la densité du micropatron augmente (**Figure 60C**, panel de gauche).

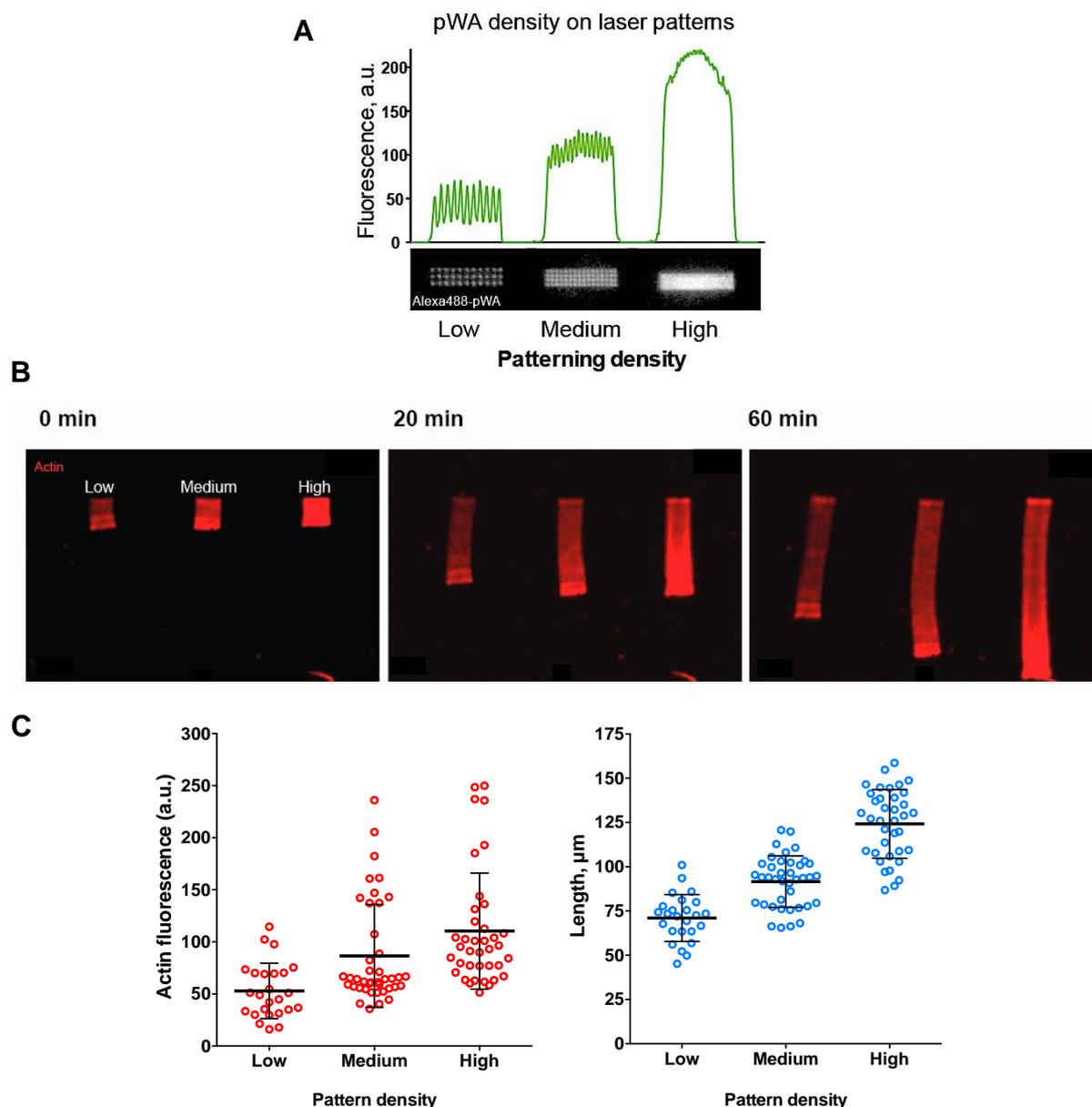


Figure 60. Assemblage de réseaux branchés d'actine à partir de micropatrons couverts de pWA

A) L'adsorption de pWA sur les micropatrons peut être visualisée grâce au pWA marqué à l'Alexa-488. La quantité de pWA adsorbé augmente avec la densité de gravure des micropatrons.

B) Les réseaux branchés d'actine obtenus sont visualisés par l'actine marquée à l'Alexa-568.

C) Densités et longueurs des réseaux d'actine générés par les trois densités de micropatrons.

On observe cependant que les fluorescences des réseaux d'actine de haute densité sont plus dispersées. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'accumulation observée de pWA (**Figure 60A**) soit en partie dû à des molécules qui ne seraient pas adsorbées à la surface du verre mais s'accumuleraient en plus des protéines adsorbées. Elles seraient donc plus susceptibles d'être enlevées par les lavages, et causeraient cette dispersion des fluorescences. Cette hypothèse n'a pas pu être vérifiée.

En ce qui concerne la longueur d'un réseau, elle suit la même tendance que précédemment : plus le réseau est dense, et plus il sera long (**Figure 60C**, panel de droite). Les réseaux plus denses fournissent plus de forces, et croissent plus rapidement que des réseaux moins denses.

En effet, dans mes micropatrons, les zones (« spots ») de nucléation et de branchement de l'actine sont séparées entre elles par une distance plus ou moins grande selon la densité du micropatron. De ce fait, les « sous-réseaux » générés par ces spots sont plus ou moins connectés.

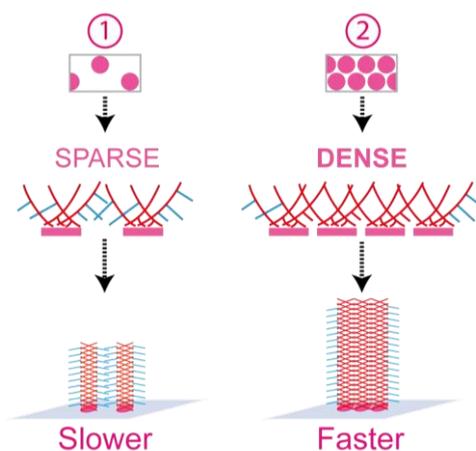


Figure 61. L'enchevêtrement des sous-réseaux génère plus de forces

Il y a deux populations de filaments branchés émanant des micropatrons : celle qui est efficace pour la production de force (rouge) et celle qui ne l'est pas (bleu). (Boujema-Paterski et al. 2017)

Comme illustré en **Figure 61**, sur un micropatron peu dense en zones de nucléation, les filaments extérieurs (en bleu) des sous-réseaux présentent peu ou pas d'enchevêtrement avec les réseaux adjacents. Au contraire, sur un micropatron dense en zones de nucléation, les filaments des sous-réseaux adjacents sont enchevêtrés et produisent donc plus de forces, d'où une croissance plus rapide du lamellipode. Ces recherches de l'équipe, appuyées par un modèle mathématique, sont l'objet d'un article soumis pour publication (Boujemaa-Paterski et al. 2017).

Nous avons donc établi que **l'architecture contrôle l'assemblage des réseaux branchés d'actine** : les réseaux de forte densité sont assemblés plus rapidement que ceux de faible densité. Qu'en est-il de leur désassemblage par ADF/Cofiline ?

2- L'ARCHITECTURE DU RESEAU D'ACTINE CONTROLE SON DESASSEMBLAGE MACROSCOPIQUE PAR ADF/COFILINE

2.1 - Désassemblage des réseaux branchés d'actine

Afin d'évaluer l'impact de l'architecture des réseaux d'actine dans leur désassemblage par ADF/Cofiline, j'ai généré les mêmes réseaux que précédemment, mais cette fois en présence d'ADF/Cofiline dans le milieu de polymérisation. L'utilisation d'ADF/Cofiline marquée à l'Alexa-488 permet de suivre simultanément l'assemblage et le désassemblage des réseaux d'actine (**Figure 62**) pour des concentrations croissantes d'ADF/Cofiline.

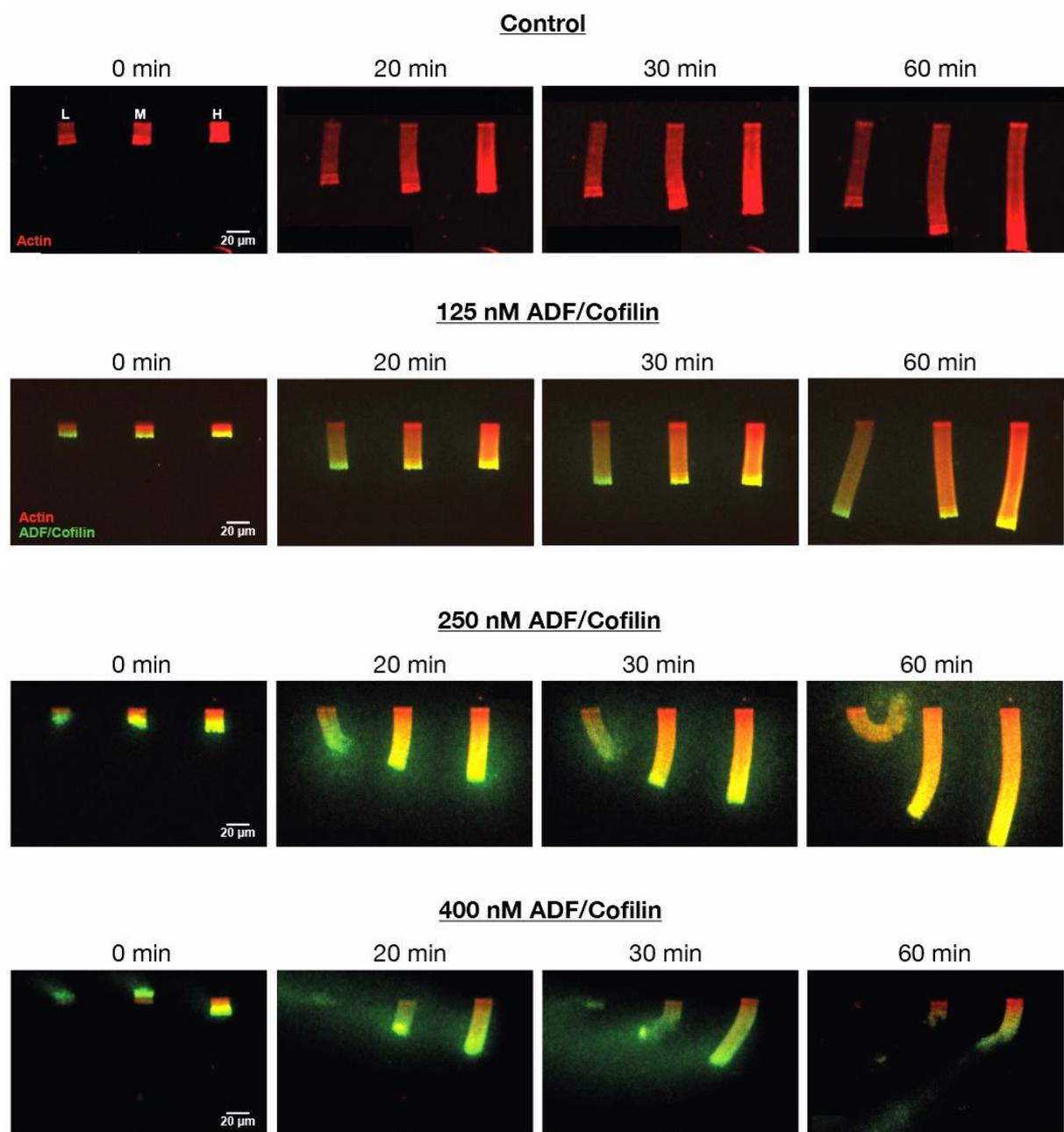


Figure 62. Désassemblage par ADF/Cofiline de réseaux d'actine de différentes densités

Les données ci-dessus nous montrent que :

- A une concentration relativement basse en ADF/Cofiline, ici 125 nM, toutes les densités de réseaux sont décorées par ADF/Cofiline et on n'observe pas de désassemblage macroscopique.

- A une concentration intermédiaire de 250 nM d'ADF/Cofiline, le réseau de faible densité est progressivement désassemblé, à la fois microscopiquement (nuage d'actine et d'ADF/Cofiline) et par délitement de ce réseau ainsi fragilisé. A ce stade, les réseaux de moyenne densité et forte densité résistent encore au désassemblage macroscopique.

- Il faut augmenter la concentration d'ADF/Cofiline à 400 nM, pour que les réseaux de moyenne et forte densité soient sensibles au désassemblage.

Ce désassemblage peut être quantifié par le raccourcissement de la longueur des différents réseaux, montré en **Figure 63**.

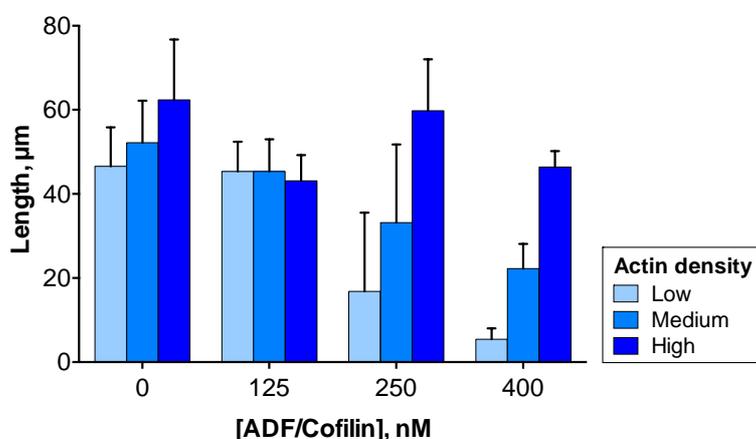


Figure 63. L'architecture des réseaux détermine leur désassemblage par ADF/Cofiline

Comment expliquer la dépendance entre densité du réseau, concentration en ADF/Cofiline et désassemblage ?

En observant les images en **Figure 62**, on remarque que les densités d'actine et d'ADF/Cofiline ne sont pas uniformes le long d'un réseau. En effet, elles sont

moins élevées près du micropatron. Pour l'actine, cela peut s'expliquer par une diminution de la concentration de monomères au cours du temps (Boujemaa-Paterski et al. 2017). Pour l'ADF/Cofiline, cela est dû à sa fixation préférentielle sur les portions ADP de l'actine, donc à distance du micropatron.

Cependant, qu'advient-il de ces densités lors du désassemblage des réseaux d'actine ? Pour répondre à cette question, j'ai mesuré les fluorescences de l'actine et de l'ADF/Cofiline le long des réseaux (**Figure 64**).

Ce que l'on observe dans un premier temps, c'est qu'en absence d'ADF/Cofiline la densité d'actine augmente le long d'une comète, comme expliqué au paragraphe précédent. Pour une concentration faible en ADF/Cofiline (125 nM), cette densité tend à être égalisée le long de la comète. La densité en ADF/Cofiline augmente linéairement le long du réseau.

En revanche, pour des concentrations d'ADF/Cofiline modérées (250 nM) à fortes (400 nM), les densités d'actine et d'ADF/Cofiline subissent une chute plus ou moins brutale au niveau de la région distale du réseau (e.g. celle qui est désassemblée).

En parallèle, on observe que le ratio des densités de Cofiline/Actine augmente brutalement. Cela signifie nécessairement que dans ces zones de désassemblage, il y a bien plus d'ADF/Cofiline que d'actine par rapport au réseau qui résiste encore le désassemblage. Une explication à envisager est que le réseau étant rendu plus lâche, l'accessibilité est facilitée pour l'ADF/Cofiline. Cette question sera abordée plus loin.

Les mesures des densités et leurs zones d'inflexion sont un point de départ pour comprendre le mécanisme de désassemblage des réseaux en fonction de leur architecture. Par des modélisations simples, nous sommes en mesure d'avoir une idée plus précise sur ces phénomènes.

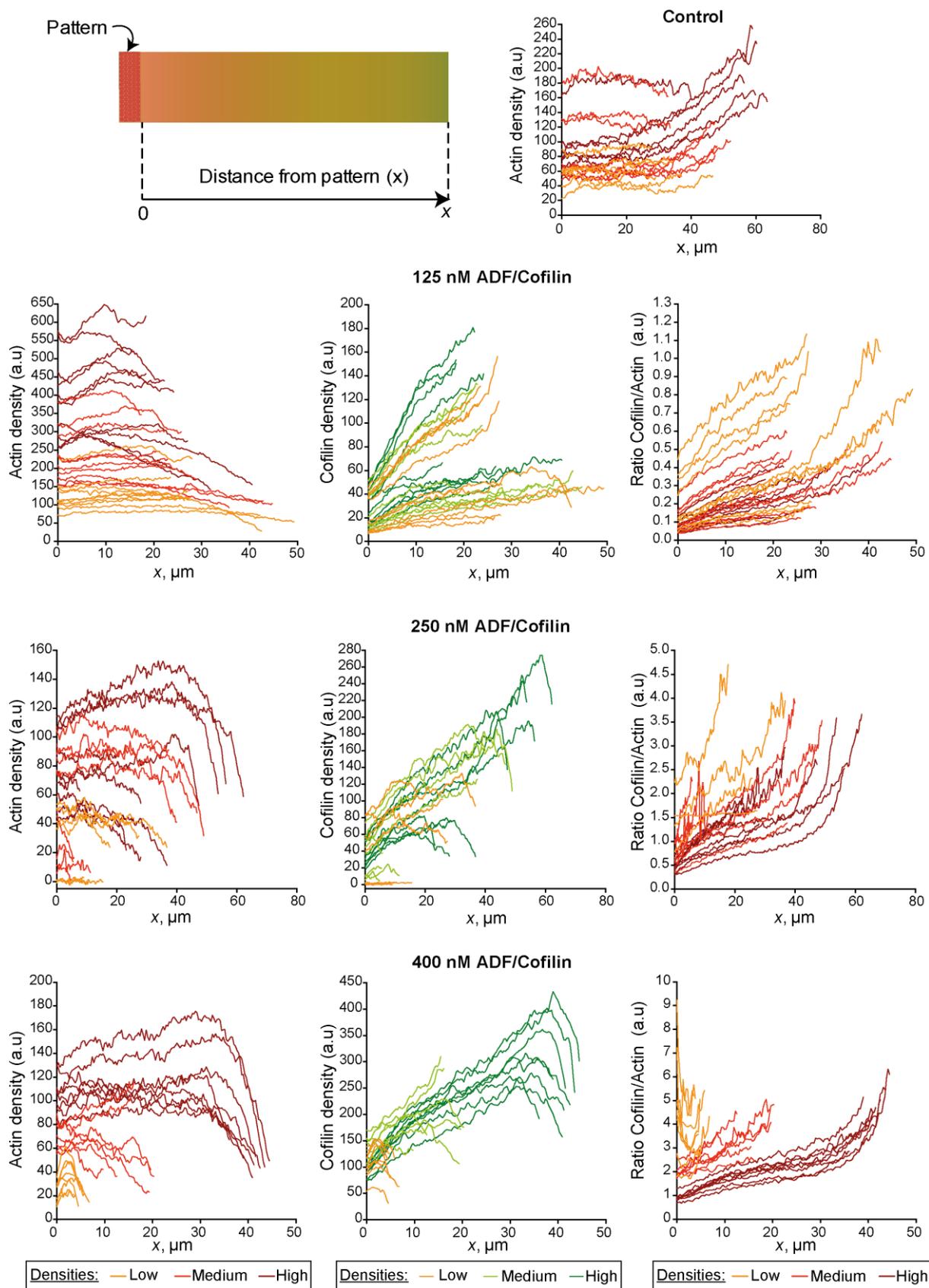


Figure 64. Densités d'actine et d'ADF/Cofiline lors du désassemblage

A 250 nM et 400 nM d'ADF/Cofiline, les fluorescences présentent un oint d'inflexion qui correspond au désassemblage macroscopique du réseau d'actine.

2.2 - Modélisation des dynamiques de l'ADF/Cofiline au sein d'un réseau branché d'actine

Nous avons vu que le désassemblage des réseaux branchés d'actine est dépendant de l'architecture des réseaux. Cependant, existe-t-il une règle générale au niveau moléculaire permettant d'expliquer les observations macroscopiques ?

L'élaboration d'un modèle mathématique permet d'avoir une idée plus claire sur la façon dont ADF/Cofiline affecte les dynamiques des réseaux d'actine. Ici, il faut distinguer deux approches :

1 : Connaissant la densité de l'actine d'un réseau, peut-on prédire la densité d'ADF/Cofiline sur ce réseau ?

2 : Quel paramètre détermine la longueur du réseau à l'équilibre ?

Dans cette partie, je vais exposer les modèles proposés par Angelika Manhart et Alex Mogilner, de l'Université de New-York, pour répondre à ces questions. Un détail des formules est donné en Annexe.

2.2.1 - Prédiction de la quantité d'ADF/Cofiline d'un réseau d'actine

Dans le modèle simple décrit ci-dessous, sont pris en compte la fixation et le détachement de l'ADF/Cofiline, sa diffusion et son déplacement par le réseau en croissance.

Diffusion of free cofilin	Binding of free cofilin to actin	Unbinding of bound cofilin
$\partial_t F = \nabla \cdot (D \nabla F) - r_{bind} A F + r_{Unbind} B$		
$\partial_t B + V \partial_y B = r_{bind} A F - r_{Unbind} B$		
Transport through network growth	Binding of free cofilin to actin	Unbinding of bound cofilin

Les densités d'actine (notées A) mesurées le long d'un réseau (comme en **Figure 64**) sont utilisées comme données d'entrée pour prédire les densités d'ADF/Cofiline (notées B) qu'on devrait obtenir sur ce réseau. (Voir en Annexe pour le détail des conditions).

Les simulations montrées en **Figure 65** concordent avec les données et ce pour toutes les largeurs de réseau. Nous sommes donc en mesure de prédire, à partir d'un réseau d'actine donné, quelle quantité d'ADF/Cofiline sera liée à ce réseau.

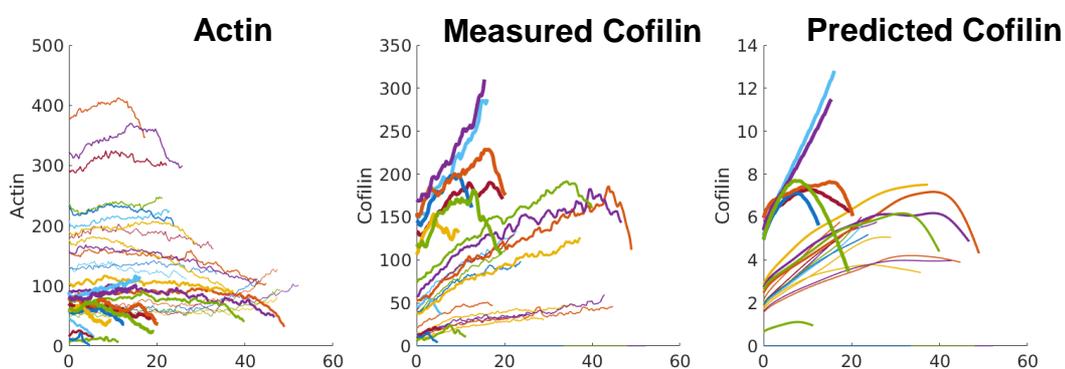


Figure 65. Modélisation des densités d'ADF/Cofiline à partir des densités mesurées d'actine

Prédiction des densités d'ADF/Cofiline à partir de densités moyennes d'actine, toutes les concentrations d'ADF/Cofiline. La largeur des lignes correspond à la concentration initiale en ADF/Cofiline (lignes épaisses pour une concentration plus élevée). Les valeurs des axes sont en unités arbitraires. Voir en Annexe pour le détail de la modélisation. (Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

2.2.2 - Modélisation de la longueur du réseau d'actine à l'équilibre.

Près de l'état d'équilibre entre assemblage et désassemblage, la longueur du réseau est (relativement) constante au cours du temps. Qu'est ce qui détermine la longueur de ce réseau à l'équilibre ? Pour répondre à cette question, trois hypothèses peuvent être formulées :

H1. La densité de l'actine n'est pas affectée :

→ Un ratio critique de Cofiline/Actine est nécessaire pour désagréger le réseau, comme montré en (Figure 66).

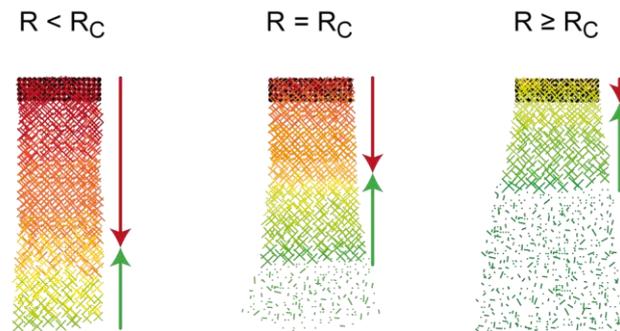


Figure 66. Désassemblage du réseau d'actine : ratio critique ADF/Actine

Lorsque le ratio R entre fluorescence de l'ADF (vert) et fluorescence de l'Actine (rouge) atteint un ratio critique R_C , le désassemblage des filaments est suffisant pour conduire au désassemblage macroscopique du réseau dendritique.

H2. L'intégrité structurale du réseau est affectée, par débranchement :

→ A une densité en branches est trop faible, le réseau est désagrégé (Figure 67)

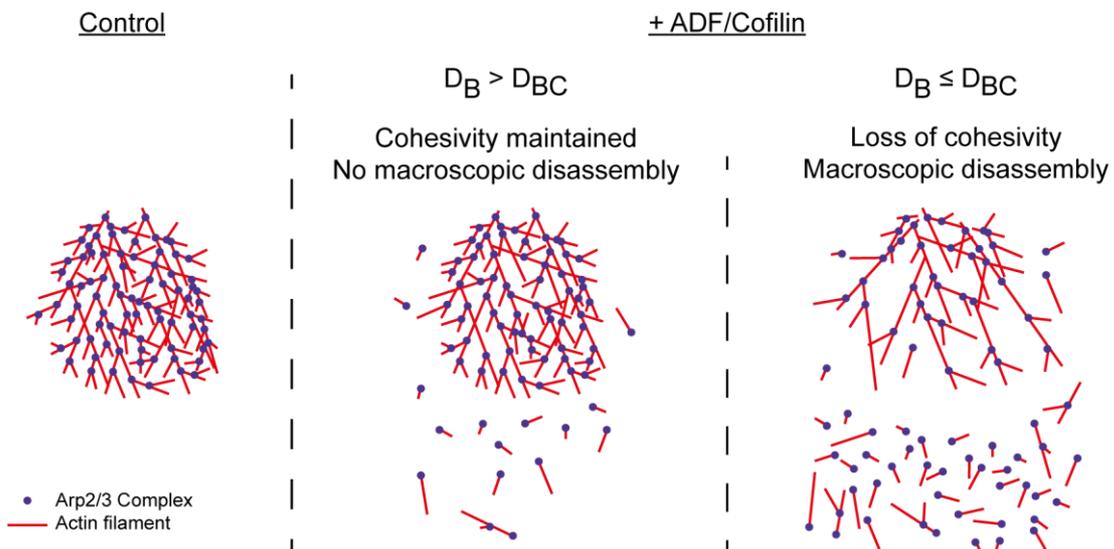


Figure 67. Désassemblage du réseau d'actine : densité de branches critique

Lorsque la densité d'actine D_B passe en dessous d'une densité de branches critique D_{BC} , le désassemblage macroscopique a lieu.

H3. La densité d'actine est réduite par section des filaments :

→ Lorsque la **densité d'actine** est trop faible, le réseau est désagrégé (**Figure 68**).

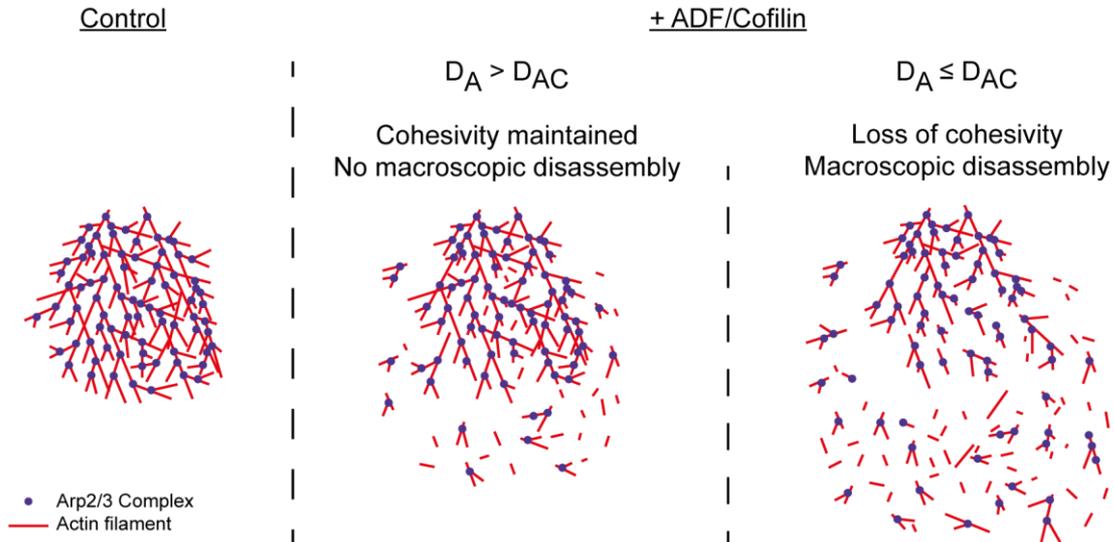


Figure 68. Désassemblage du réseau d'actine : densité d'actine critique

Lorsque la densité d'actine D_A passe en dessous d'une densité d'actine critique D_{AC} , le désassemblage macroscopique a lieu

❖ Hypothèse 1 : Ratio critique Cofiline/Actine

Pour tester cette hypothèse, les réseaux pris en compte sont les réseaux à l'équilibre entre assemblage et désassemblage macroscopiques, donc avec une concentration en ADF/Cofiline d'au moins 200 nM. Ces réseaux montrent une augmentation en ADF/Cofiline suivie d'une brusque diminution, là où le réseau est fragmenté (**Figure 65**).

Ce **point d'inflexion** correspondrait, selon l'hypothèse, à un **seuil critique**. Les valeurs prises en compte pour les calculs seront donc limitées aux valeurs d'avant l'inflexion de l'ADF/Cofiline (**Figure 69**).

Il ressort qu'un ratio Cofiline/Actine d'au moins 3,2 est nécessaire pour la désintégration macroscopique du réseau d'actine.

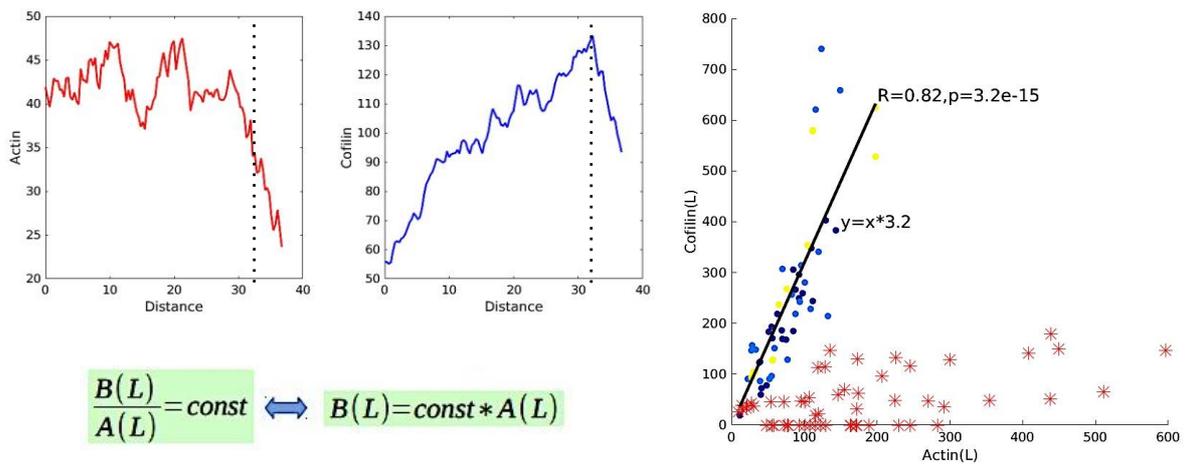


Figure 69. Le réseau dendritique ne se désassemble pas en-dessous d'un ratio Cofiline/actine.

(Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

❖ **Hypothèse 2 : Densité critique de branches**

La densité de branches a été modélisée par :

$$\frac{\partial_t I + V \partial_y I}{\text{Transport durant la croissance du réseau}} = \frac{-k R(I, A, B)}{\text{Taux de réduction en branches}}$$

Transport durant la croissance du réseau

Taux de réduction en branches

- I* : densité de branches
- A* : densité d'actine
- B* : densité de Cofiline liée
- V* : vitesse du réseau
- y* : distance le long du réseau
- k* : constante
- R* : taux de débranchement

Pour tester cette hypothèse, plusieurs scénarii ont été testés. La densité de branches serait réduite à cause :

- 1 -- De la densité de Cofiline → $R = B$ ou $R = B \times I$
- 2 -- Du ratio Cofiline/Actine → $R = B/A$ ou $R = B/A \times I$
- 3 -- D'un changement en densité de Cofiline → $R = |dB/dy|$ ou $R = |dB/dy| \times I$
- 4 -- D'un changement du ratio Cofiline/Actine → $R = |d(B/A)/dy|$ ou $|d(B/A)/dy| \times I$

La meilleure prédiction valide le scénario 4 : un changement dans la densité de branches serait provoqué par un **changement du ratio** Cofiline/Actine (B/A).

Donc à ce stade, il n'est pas possible de distinguer entre:

- H1: le réseau se désassemble à partir d'un seuil critique du ratio Cofiline/Actine ;
- H2: des changements dans le ratio Cofiline/Actine diminuent la densité de branches jusqu'à ce qu'une valeur critique soit atteinte, où le réseau ne serait plus cohésif.

❖ Hypothèse 3 : Densité critique de filaments

Pour des distributions d'ADF/Cofiline données, comment serait affectée l'actine ? Autrement dit, est-il possible de prévoir la densité d'actine à partir de la densité d'ADF/Cofiline ?

La modélisation est la suivante :

$$\frac{\partial_t A + V \partial_y A}{\downarrow} = \frac{-k G(A, B)}{\downarrow}$$

Transport durant la croissance du réseau *Taux de destruction de l'actine*

A : densité d'actine
B : densité de Cofiline liée
V : vitesse du réseau
y : distance le long du réseau
k : constante
G : taux de destruction

De nouveau, plusieurs scénarii ont été testés. La densité de l'actine peut être réduite à cause :

- 1 -- De la densité de Cofiline, $G=B$ ou $G=B \times A$
- 2 -- Des changements dans la densité de Cofiline, $G=dB/dy$ ou $G=dB/dy \times A$
- 3 -- Du ratio Cofiline/Actine, $G=B/A$
- 4 -- De changements dans le ratio Cofiline/Actine, $G=d(B/A)/dy$ ou $G=d(B/A)/dy \times A$

Cette fois-ci, la meilleure prédiction est que la densité de l'actine est réduite par le **ratio** Cofiline/Actine (scénario 3).

De plus, il est effectivement possible de prévoir la densité d'actine à partir de la densité d'ADF/Cofiline, et ces prédictions reproduisent plutôt bien les mesures expérimentales (**Figure 70**).

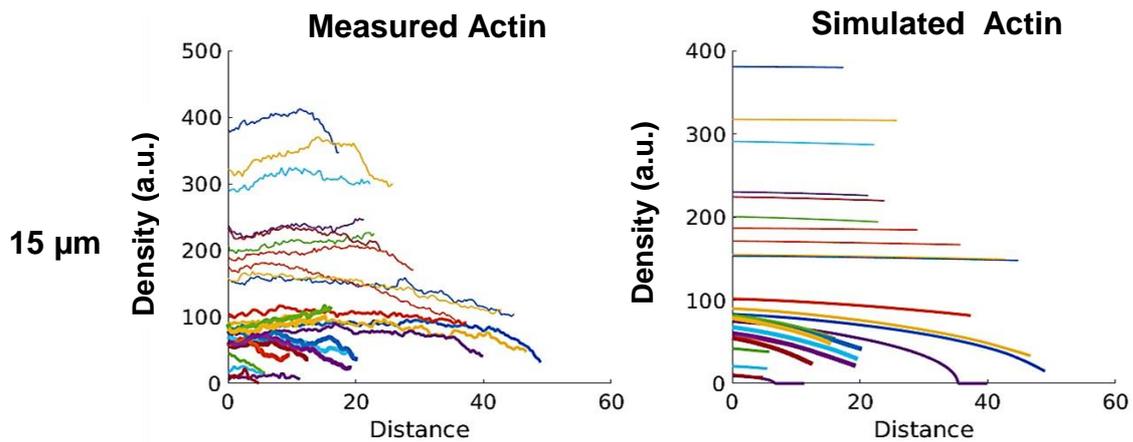


Figure 70. Densités d'actine mesurées et simulées à partir de la densité d'ADF/Cofiline.

(Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

A ce stade, on ne peut pas réellement trancher sur la meilleure hypothèse; néanmoins on peut dire que:

- H1: la nécessité de dépasser un seuil de ratio Cofiline/Actine explique très bien les données;
- H2: si elle est vérifiée, c'est probablement parce que la densité en branches est affectée par des *changements* dans le ratio Cofiline/Actine;
- H3: si elle est vérifiée, c'est probablement parce que la densité en actine du réseau est affectée par le ratio cofiline/Actine.

3- LA GEOMETRIE DU RESEAU D'ACTINE CONTROLE SON DESASSEMBLAGE MACROSCOPIQUE PAR ADF/COFILINE

L'intérêt de la méthode de microgravure au laser pulsé est de pouvoir faire une variété de tailles et de densités. Ainsi, j'ai pu utiliser cette méthode pour évaluer l'assemblage et le désassemblage de réseaux branchés d'actine plus ou moins étendus en largeur. Ces largeurs des réseaux constituent une variété de **géométries**.

3.1 - Données expérimentales

Lorsqu'on polymérise des réseaux à partir de même architecture mais de différentes géométries, on constate que la densité d'actine et la longueur des réseaux sont affectées (**Figure 71**). En effet, plus la polymérisation de l'actine se fait à partir de micropatrons étendus, plus les monomères sont consommés localement. Cela a pour effet de rendre les réseaux de moins en moins denses lorsqu'ils sont larges, mais également moins longs (**Figure 71B**), puisque la polymérisation est ralentie par la déplétion des monomères.

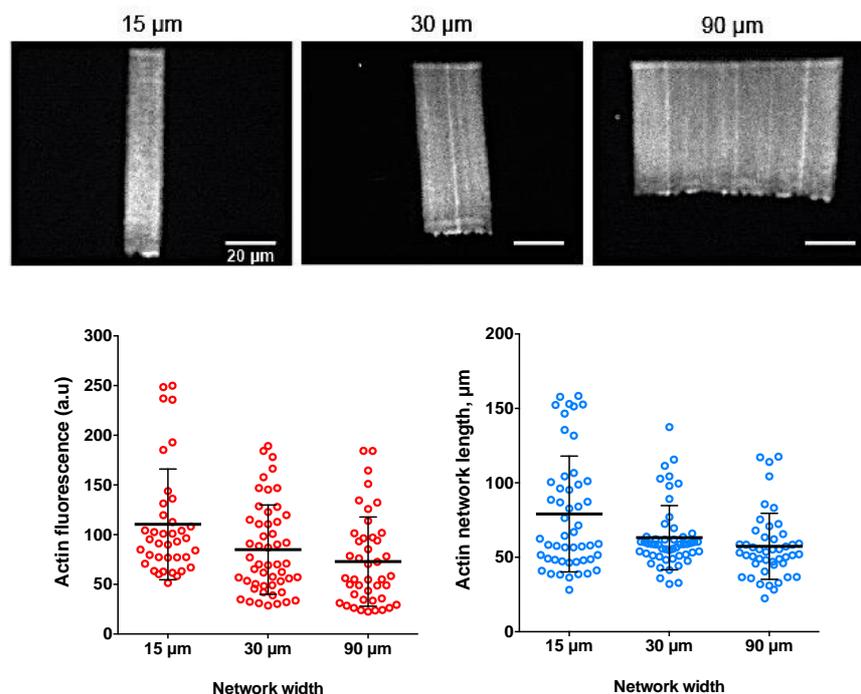


Figure 71. La croissance des réseaux dendritiques dépend de leur géométrie.

Dans ce cas, on pourrait penser qu'ADF/Cofiline désassemblerait plus facilement les réseaux moins denses de 30 μm et 90 μm. Cependant, l'action d'une concentration identique d'ADF/Cofiline sur des réseaux de 15, 30 et 90 μm donne des résultats contraires à cette idée (**Figure 72**). En effet, les réseaux les mieux désassemblés sont ceux de 15 μm ; alors que ceux de 90 μm résistent mieux au désassemblage. Les mesures de longueur des réseaux montrent une inversion des

tendances entre assemblage et désassemblage. Elles confirment que les réseaux les plus courts (dont la croissance était ralentie) sont en fait ceux qui résistent le mieux au désassemblage.

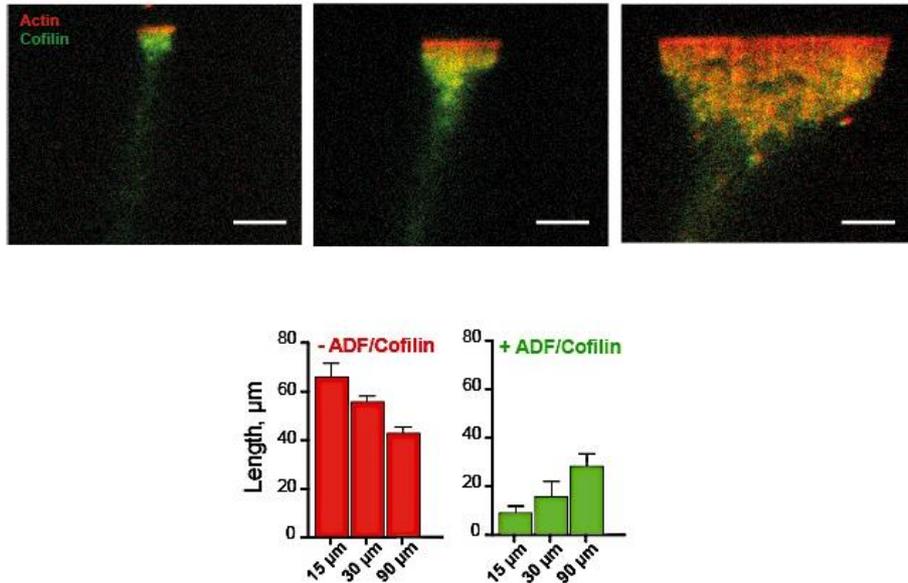


Figure 72. L'efficacité du désassemblage des réseaux d'actine par ADF/Cofiline dépend de leur géométrie.

Pour expliquer ces observations, on peut penser à l'accessibilité de l'ADF/Cofiline qui serait compromise dans les réseaux plus larges. En effet, les réseaux de 30 et 90 μm sont clairement d'abord désassemblés à partir des bords de la structure. Cette hypothèse sera décrite dans la section 5 de cette partie Résultats.

3.2 - Modélisation

Tout comme décrit dans la section 2.2.1 de ces résultats et montrées en **Figure 65** pour les réseaux de 15 μm, il est possible de prédire pour les réseaux de 30 et 90 μm la quantité d'ADF/Cofiline dans un réseau en fonction de la densité d'actine, et ces simulations concordent plutôt bien avec les données (**Figure 73**).

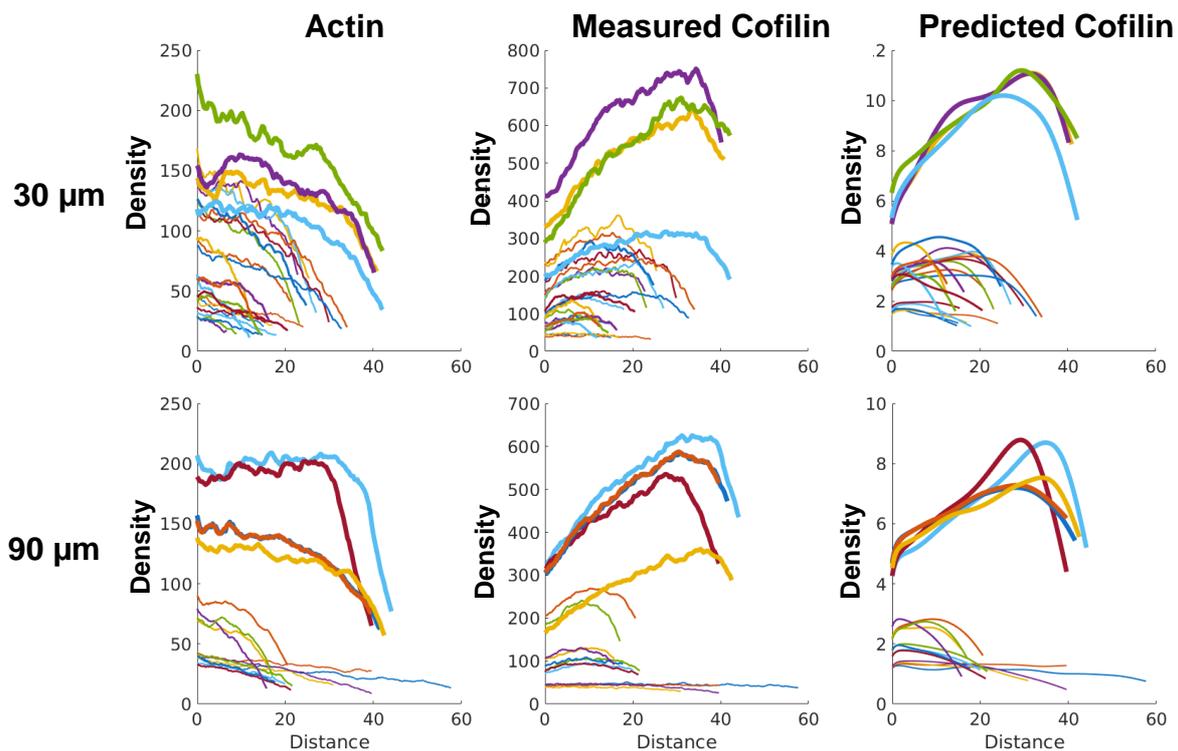


Figure 73. Modélisation des densités d'ADF/Cofilin à partir des densités mesurées d'actine dans les réseaux de 30 et 90 µm de large.

Prédiction des densités d'ADF/Cofilin à partir de densités moyennes d'actine, toutes les concentrations d'ADF/Cofilin. La largeur des lignes correspond à la concentration initiale en ADF/Cofilin (lignes épaisses pour une concentration plus élevée). Les valeurs des axes sont en unités arbitraires. Voir en Annexe pour le détail de la modélisation. (Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

En ce qui concerne les hypothèses émises pour les réseaux de 15 µm (pages **131** à **133**), elles sont également valables pour les réseaux de 30 et 90 µm, et les résultats sont similaires :

❖ **Hypothèse 1 : Ratio critique Cofilin/Actine**

Un ratio de 3,2 est nécessaire pour que le réseau soit désassemblé (**Figure 69**)

❖ **Hypothèse 2 : Densité critique de branches**

La meilleure prédiction va en faveur d'une baisse dans la densité de branches

qui serait provoqué par un changement du ratio Cofiline/Actine (B/A) (scénario 4, voir **page 132**)

❖ **Hypothèse 3 : Densité critique de filaments**

Comme dans le cas des réseaux de 15 μm , la meilleure prédiction est que la densité de l'actine est réduite par le ratio Cofiline/Actine (scénario 3, voir **page133**).

Comme montré pour les réseaux de 15 μm (**Figure 70**), il est possible de prévoir la densité d'actine à partir de la densité d'ADF/Cofiline mesurée, et ces prédictions correspondent assez bien les mesures expérimentales, comme montré à la **Figure 74**, bien que les simulations correspondent moins bien aux données pour les réseaux de 90 μm .

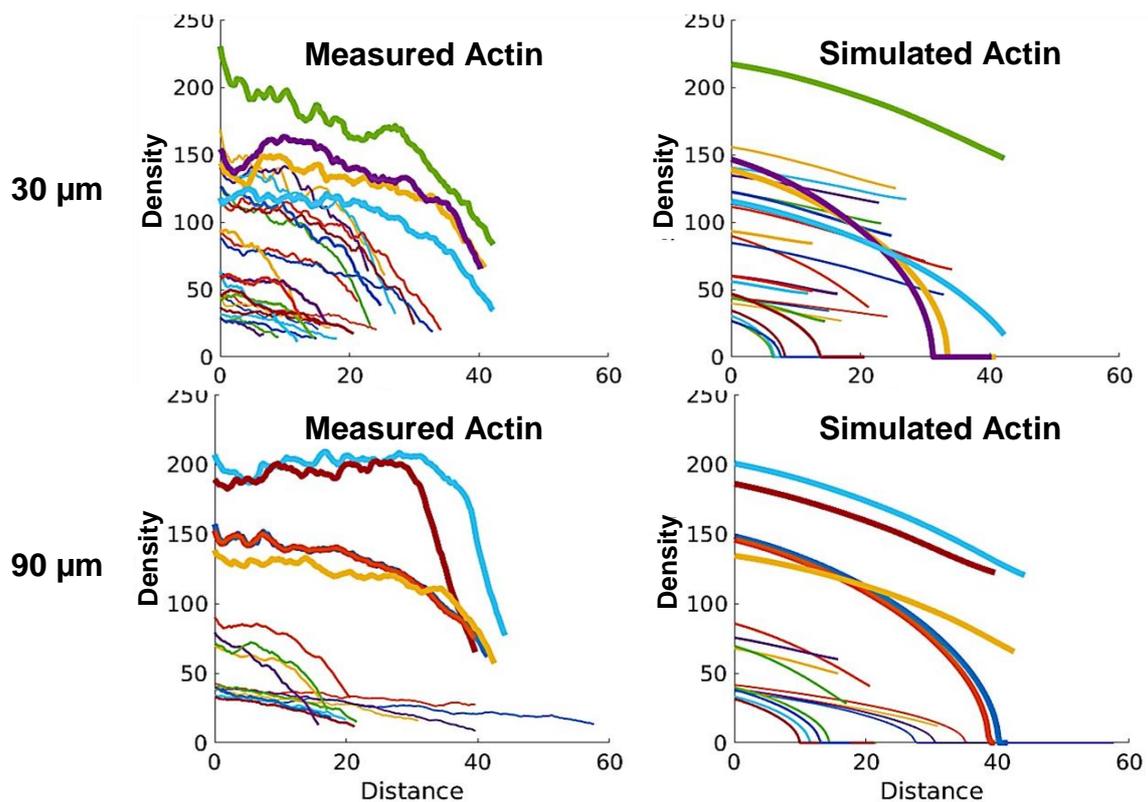


Figure 74. Densités d'actine mesurées et simulées à partir de la densité d'ADF/Cofiline dans les réseaux de 30 et 90 μm de large.
(Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

4- L'HETEROGENEITE DES RESEAUX DENDRITIQUES CONTROLE LEUR DIRECTIONNALITE

Puisque des réseaux d'actine de différentes densités n'ont pas la même vitesse de croissance, il est intéressant de considérer le cas d'un réseau hétérogène en densité, qui aurait donc des vitesses de croissance différentes au sein même du réseau.

Pour cela, il suffit de reproduire les expériences de motilité précédentes en accolant deux micropatrons de densités différentes (schéma de la **Figure 75**). Dans la configuration la plus simple, ce sera une faible densité, et une plus forte densité. Ainsi, les réseaux dendritiques nucléés par ces micropatrons sont nécessairement enchevêtrés à leur interface, et se comportent comme un seul réseau cohésif.

Ce que nous montrent ces expériences, c'est qu'un tel réseau hétérogène présente une **directionnalité de croissance vers le réseau le moins dense (Figure 75)**. Autrement dit, c'est le réseau le moins dense, à la croissance plus lente, qui impose une orientation.

Que se passerait-il si nous pouvions moduler ces densités en désassemblant les réseaux par ADF/Cofiline ? Pour répondre à cette question, l'expérience a été reproduite avec deux concentrations d'ADF/Cofiline : une qui déstabilise le réseau de faible densité, et une qui le désassemble et qui s'attaque également à celui de forte densité (**Figure 75**).

Dans un premier temps, on peut voir que le désassemblage de la partie de faible densité suffit à diminuer l'orientation de croissance du réseau, mesurée par le rayon de courbure de la partie dense du réseau. Le désassemblage total du réseau de faible densité diminue davantage cette directionnalité.

Dans un autre cas de figure, on peut générer des réseaux hétérogènes plus complexes en alternant des régions nucléatrices denses et moins denses (**Figure 76**). Si ces régions sont disposées de façon symétrique, on aura une croissance dans

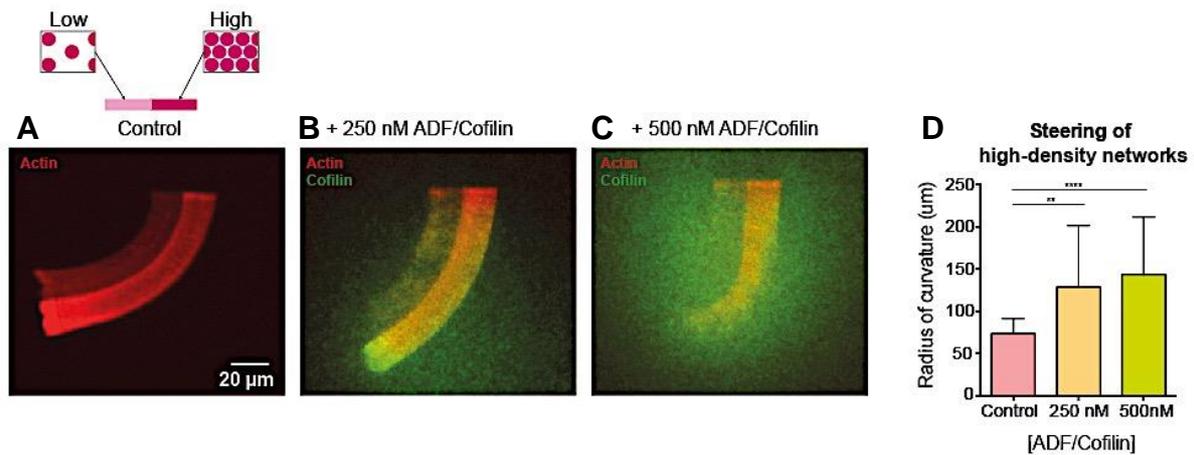


Figure 75. Le désassemblage de réseaux hétérogènes contrôle leur directionnalité

Croissance (A) et désassemblage (B,C) de réseaux dendritiques hétérogènes en densité. La directionnalité de croissance imposée à ce type de réseau hétérogène est diminuée en présence d'ADF/Cofiline, tel que mesuré en D.

l'axe, sans directionnalité gauche/droite, de tout le réseau hétérogène. Si maintenant on répète l'expérience en présence d'ADF/Cofiline, il est possible cette fois-ci d'induire une orientation dans la croissance des réseaux (Figure 76).

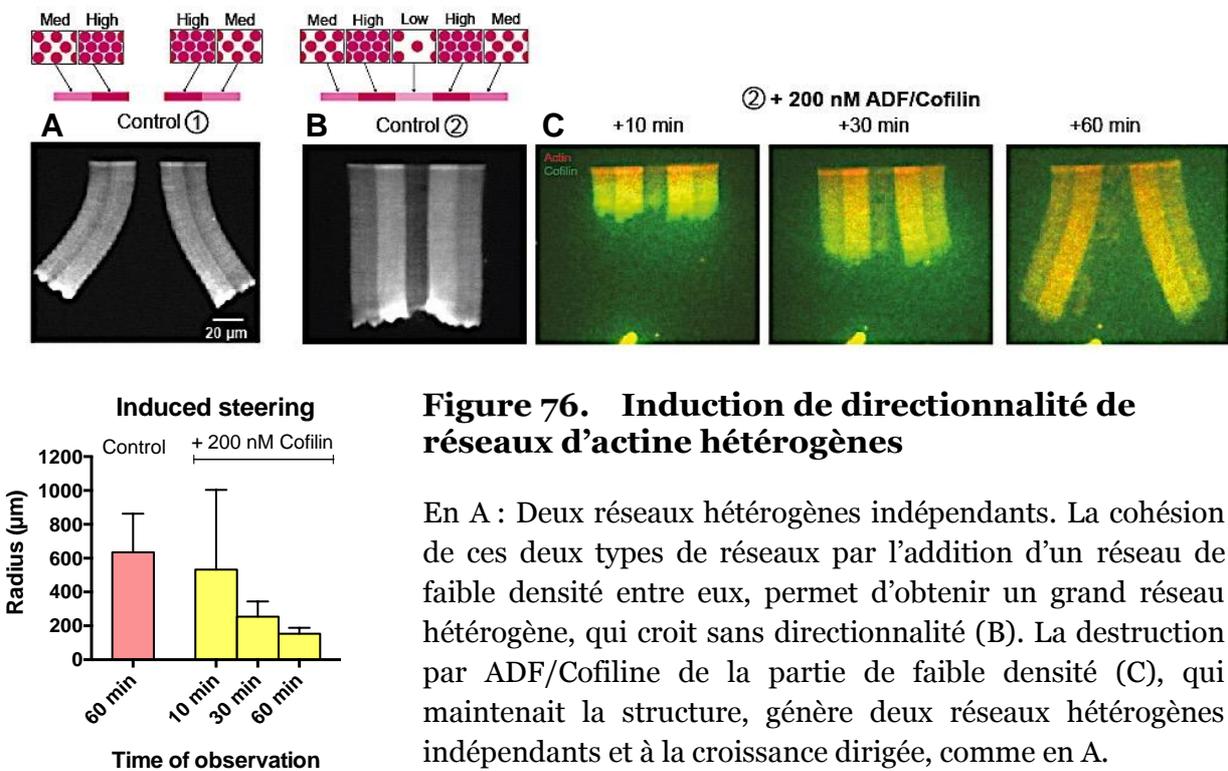


Figure 76. Induction de directionnalité de réseaux d'actine hétérogènes

En A : Deux réseaux hétérogènes indépendants. La cohésion de ces deux types de réseaux par l'addition d'un réseau de faible densité entre eux, permet d'obtenir un grand réseau hétérogène, qui croît sans directionnalité (B). La destruction par ADF/Cofiline de la partie de faible densité (C), qui maintenait la structure, génère deux réseaux hétérogènes indépendants et à la croissance dirigée, comme en A.

Au final, l'architecture des réseaux dendritiques d'actine contrôle également l'orientation de leur croissance, et cette directionnalité peut être modulée par ADF/Cofiline.

Or, nous avons vu précédemment que l'architecture du réseau branché d'actine elle-même contrôle le désassemblage par ADF/Cofiline. Il en est de même pour la géométrie du réseau. Dès lors, quels sont les phénomènes biochimiques et biophysiques mis en jeu dans ce contrôle ?

5- COMMENT L'ARCHITECTURE ET LA GEOMETRIE MODULENT-ELLES LE DESASSEMBLAGE PAR ADF/COFILINE ?

5.1 - Utilisation de traceurs fluorescents, les Dextrans

Les observations quant à la résistance des réseaux d'actine à l'ADF/Cofiline posent la question de ce qui, dans ces paramètres de densité et de largeur, rend le désassemblage macroscopique plus ou moins efficace. Une hypothèse plausible était que la diffusion de l'ADF/Cofiline est freinée au sein d'un réseau dense ou étendu.

Pour tester cette hypothèse j'ai utilisé des molécules de Dextran (polysaccharide inerte) fluorescent dans le milieu et j'ai quantifié leur accessibilité au réseau. Les deux poids de Dextran choisis (10 kDa et 40 kDa) sont proches des poids moléculaires respectifs de l'ADF/Cofiline et de l'actine. Si le réseau d'actine est un maillage non perméable pour la diffusion de ces molécules, alors il sera possible de le visualiser et le quantifier. Comme le Dextran se trouve dans tout le milieu de motilité, les régions où il est exclu, et qui correspondent aux réseaux d'actine, sont identifiables (**Figure 77**).

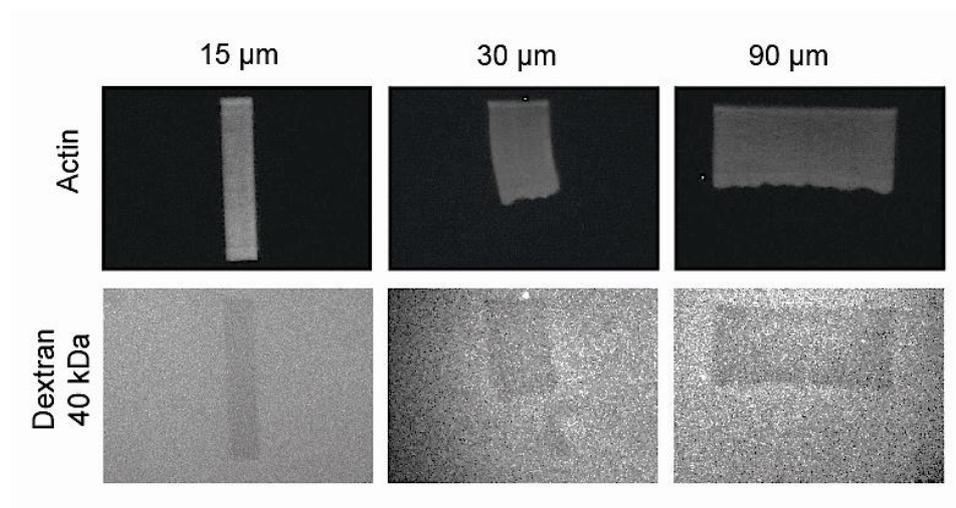


Figure 77. Exemple de visualisation des réseaux d'actine et du Dextran 40kDa dans le milieu

Pour compléter ces observations, on peut également voir en **Figure 78** que le long d'une comète d'actine, le Dextran est de plus en plus exclu à mesure que le réseau est dense.

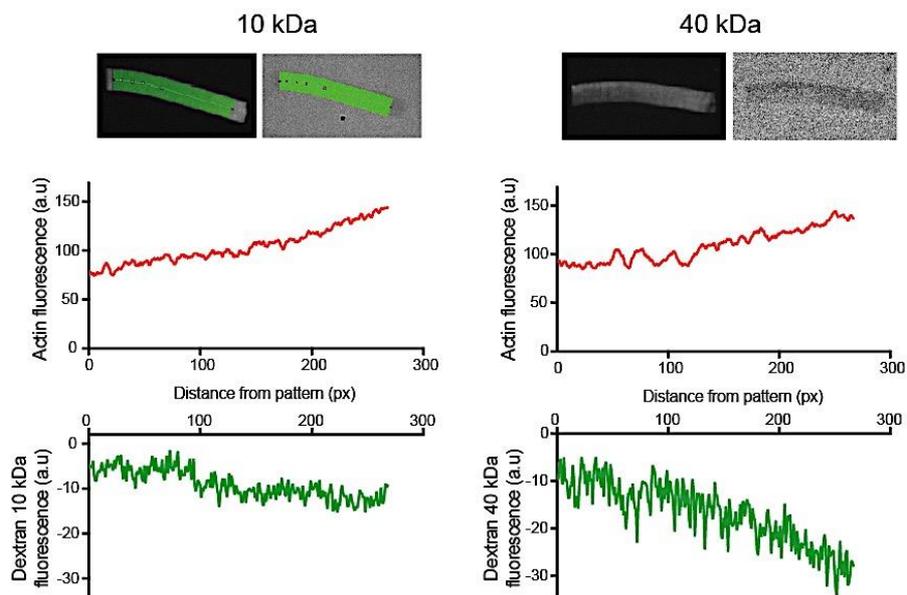


Figure 78. Exclusion du Dextran dans les réseaux branchés d'actine

Exemple de mesures de fluorescence le long d'une comète d'actine. Le tracé vert est le linescan servant à la mesure.

5.2 - Evaluation de l'exclusion des Dextrans dans les réseaux d'actine

5.2.1 - Données expérimentales

Les fluorescences moyennes de l'actine et du Dextran présents dans les lamellipodes ont été quantifiées (**Figure 79**). Il en ressort que :

- Plus un réseau d'actine de taille donnée (15, 30, 90 μm) est dense, plus le Dextran est exclu du réseau.
- Plus un réseau est large, plus le Dextran en est exclu.
- Dans tous les cas, le Dextran 40 kDa est plus fortement exclu du réseau que le Dextran 10 kDa.

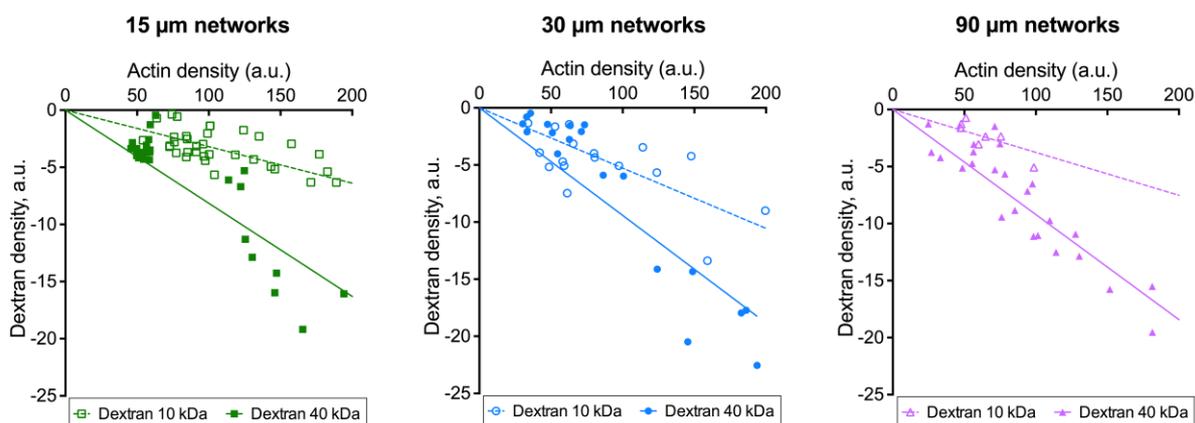


Figure 79. L'exclusion du Dextran dépend de l'architecture et de la géométrie des réseaux branchés d'actine.

Ces résultats vont en faveur de l'hypothèse que l'architecture et la géométrie contrôleraient l'accessibilité des molécules au sein du réseau, y compris pour des molécules aussi petites que 10 kDa. Cependant, en calculant l'écart entre Dextran du milieu et Dextran au niveau réseau d'actine, son exclusion est d'au maximum 4,1% pour le Dextran 10 kDa, et de 7% pour le Dextran 40 kDa (**Figure 80**). En moyenne, le Dextran 10 kDa est exclu à hauteur de 0,97%, et le 40 kDa à 2,81%.

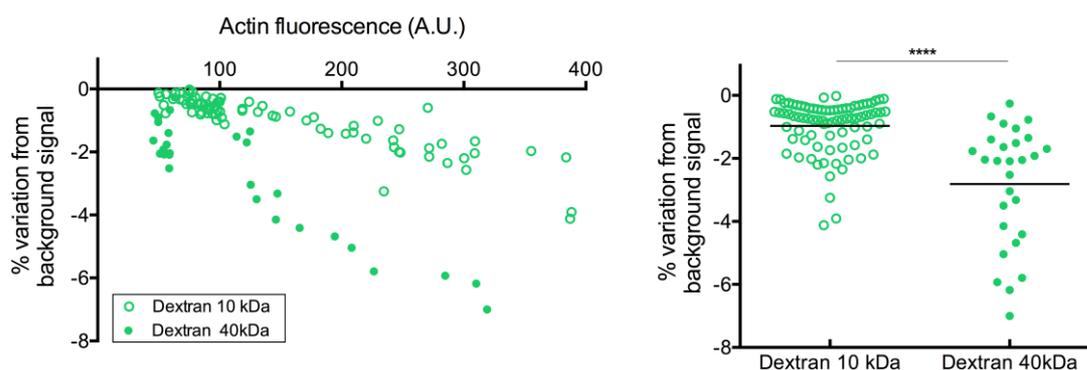


Figure 80. Part de l'exclusion du Dextran dans l'actine par rapport au milieu dans les réseaux de 15 μ m

A gauche : valeurs distribuées en fonction de la densité d'actine. A droite : Valeurs groupées ; moyenne de l'écart de densité : 0,97% pour le Dextran 10 kDa , 2,81% pour le Dextran 40kDa.

La diffusion des molécules au sein du réseau ne suffit donc pas à expliquer pourquoi un réseau d'actine plus dense, ou plus étendu, résisterait plus fortement au désassemblage par ADF/Cofiline.

5.2.2 - Modélisation

Une modélisation de ces résultats (collaboration avec Alex Mogilner de l'Université de New York) confirme que la diffusion joue un rôle limité. En effet, dans les travaux de Novak et al. 2009 , la fraction de volume inaccessible est définie comme $\phi = 1 - \exp(-V)$, avec V = la somme des obstacles individuels par unité de volume. Ici, les obstacles sont les filaments d'actine. Pour une fraction ϕ donnée, nous avons :

$$\frac{D_{network}}{D_{out}} = \frac{(1-\phi/\phi_c)^\mu}{1-\phi} \quad \text{avec :}$$

D	coefficients de diffusion de la molécule dans / en dehors du réseau
ϕ	fraction de volume inaccessible
ϕ_c	limite de percolation

$\phi_c = 0,942$ et $\mu = 1,58$

En admettant une densité de 300 filaments/ μm^2 (Novak et al. 2009), ϕ n'excéderait pas 0.06, soit $(D_{network}/D_{out}) = 0.96$ (**Figure 81**). Cela revient à dire que **la diffusion du Dextran n'est pas limitée dans ces conditions**, et nécessiterait en réalité des réseaux bien plus denses. Cependant, il faut souligner que nous n'avons pas d'estimations des densités des réseaux dans mes conditions expérimentales. Ces simulations doivent donc probablement encore être affinées pour correspondre à la réalité expérimentale.

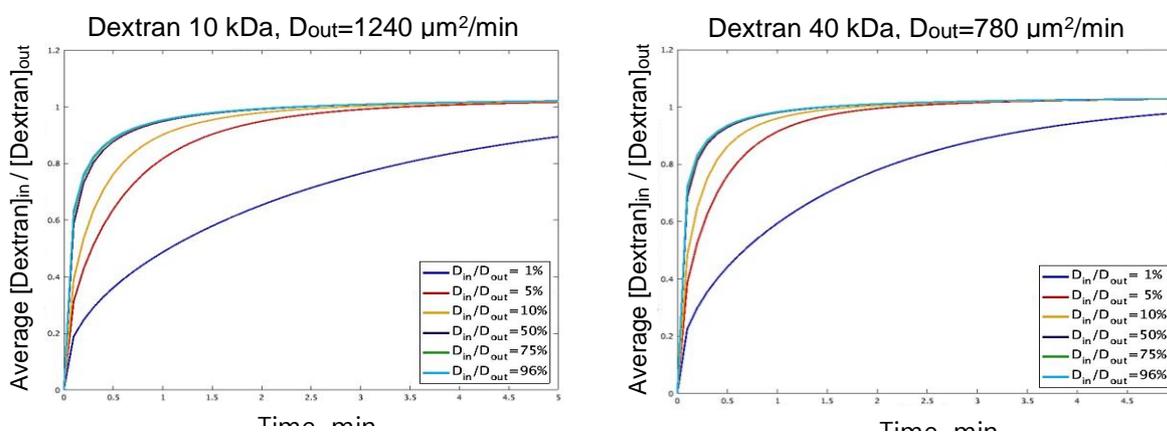


Figure 81. Simulations de la diffusion du Dextran à l'intérieur du réseau

(Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

L'explication la plus probable est qu'il y a un effet significatif de la **déplétion locale en l'ADF/Cofiline** pour les réseaux denses ou étendus. En effet, il faut aussi prendre en compte que l'ADF/Cofiline ne fait pas que diffuser à dans les réseaux, elle s'y fixe aussi. Donc comme décrit pour l'assemblage des réseaux dendritiques sur les micropatrons, l'explication la plus probable est que la déplétion locale en ADF/Cofiline ne serait pas compensée par sa diffusion **localement dans le milieu**, ce qui diminuerait *in fine* l'efficacité du désassemblage macroscopique des réseaux denses ou étendus.

Une modélisation à été élaborée, où ADF/Cofiline diffuse librement dans le milieu et se fixe aux filaments d'actine. Cette simulation montre qu'au cours de la

croissance du réseau d'actine la fixation continue d'ADF/Cofiline provoque sa déplétion locale autour du réseau (**Figure 82**).

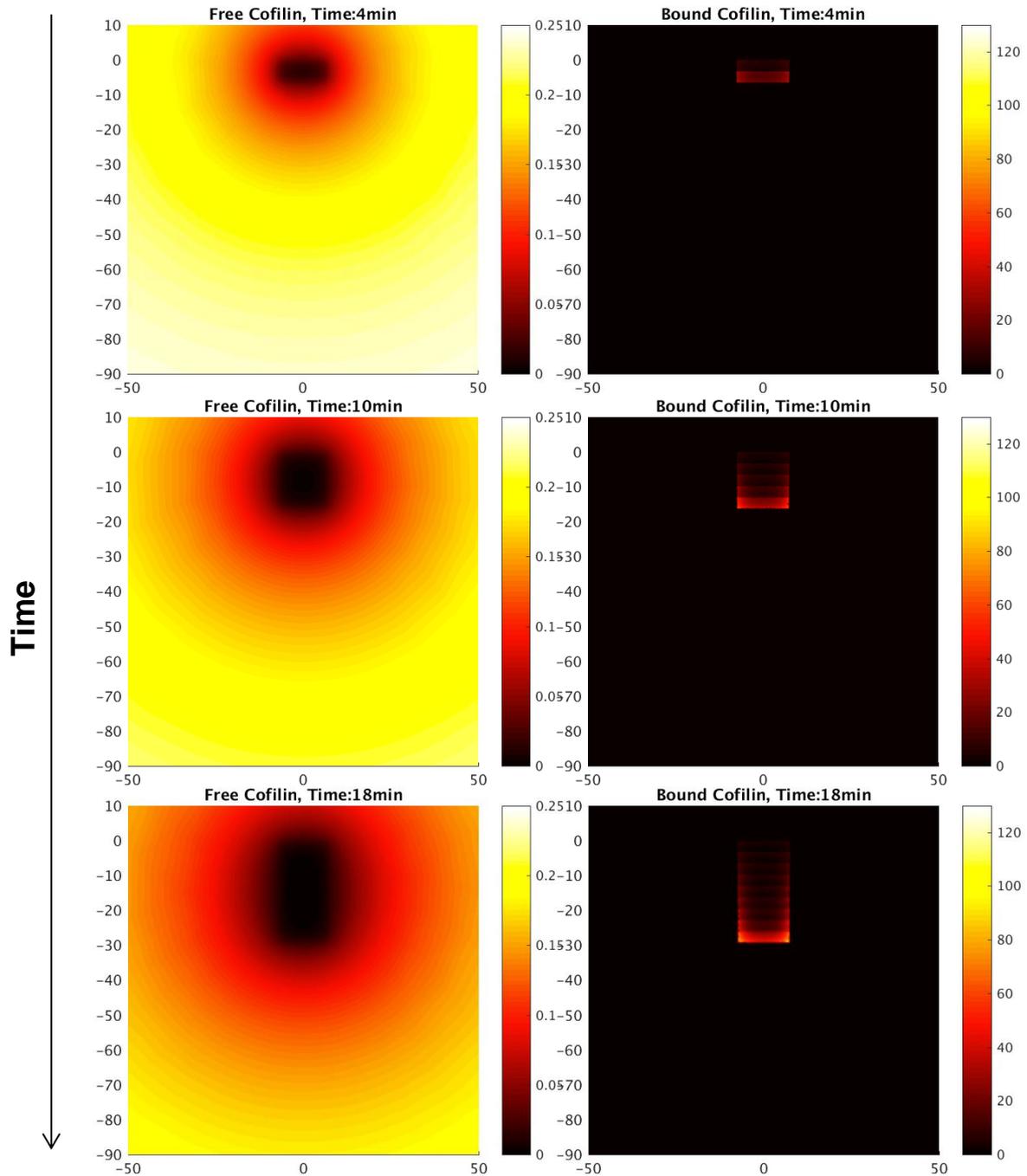


Figure 82. L'ADF/Cofiline libre est déplétée autour du réseau d'actine

Au fur et à mesure de la croissance du réseau d'actine, ADF/Cofiline est consommé dans le milieu pour se lier aux filaments. Avec le temps la déplétion locale en ADF/Cofiline augmente. (Angelika Manhart et Alex Mogilner, New York University)

6- CONCLUSION ET DISCUSSION

❖ L'architecture contrôle l'assemblage et le désassemblage des réseaux d'actine dendritiques

Dans un premier temps, les résultats montrent que l'architecture des réseaux d'actine contrôle leur croissance. En effet, plus les réseaux sont denses, plus leur croissance est rapide.

D'une part, il existe une synergie biochimique qui densifie le réseau. Le complexe Arp2/3 définit la densité en branches d'un réseau, tandis que la Capping Protein qui contrôle la longueur des filaments et la densité des réseaux (Blanchoin et al. 2000a). Dans un réseau moins coiffé, l'orientation des réseaux est moins efficace pour la production de forces.

D'autre part, mes micropatrons faits de « spots » pWA produisent un réseau plus ou moins cohésif suivant l'espacement des spots.

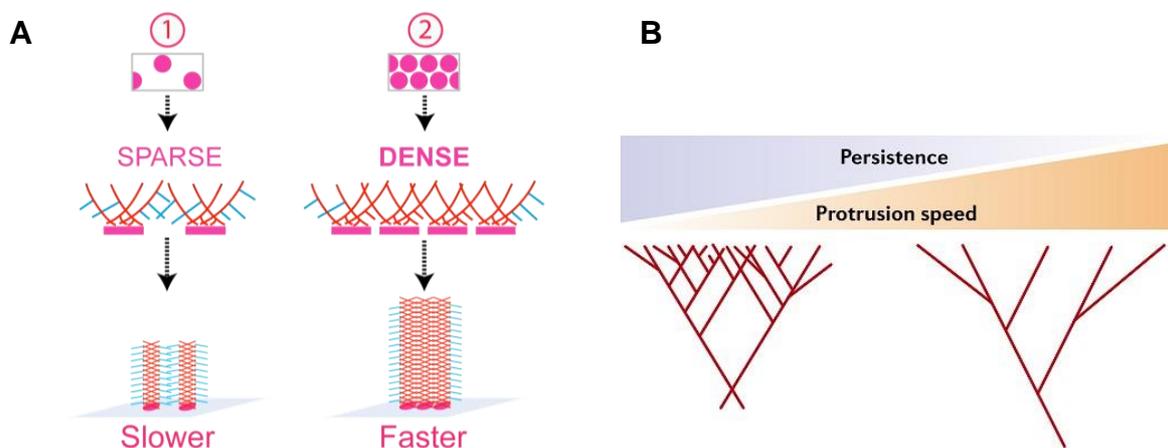


Figure 83. L'enchevêtrement des sous-réseaux génère plus de forces

In vitro (A), il y a deux populations de filaments branchés et coiffés par CP émanant des micropatrons : celle qui est efficace pour la production de force (rouge) et celle qui ne l'est pas (bleu). Un réseau dense croît donc plus rapidement qu'un réseau moins dense. Dans les cellules (B), il est admis que ce sont les réseaux moins denses qui croissent plus rapidement. Les extrémités des filaments sont alors allongés par des polymérases qui accélèrent leur vitesse d'élongation.

En effet, chaque sous-réseau polymérisé à la surface d'un spot comporte deux populations possibles de filaments branchés (**Figure 83A**). Les filaments interconnectés avec leurs voisins sont efficaces pour la production de force, alors que les filaments à l'interconnexion faible ou inexistante produisent peu ou pas de forces.

Ces résultats vont à l'encontre du concept selon lequel dans la cellule, un réseau plus dense et branché est à l'origine de protrusions lentes, alors que celles émanant d'un réseau peu dense et peu branché seraient plus rapides (**Figure 83B**) (Krause & Gautreau 2014). En effet, dans les cas décrits, les filaments des réseaux moins denses sont allongés par ENA/VASP et les formines FMNL2, connues pour augmenter la vitesse d'élongation des filaments d'actine, tout en protégeant les extrémités barbées d'être coiffées par la CP (Bear et al. 2002). En réalité cette étude résumée à la **Figure 83B** ne permet pas de conclure sur le rôle de la densité du réseau, puisque les filaments ne s'allongent pas à la même vitesse.

La vitesse de croissance des réseaux est donc régulée à la fois par la biochimie (Arp2/3, CP, formines...) et par l'architecture des filaments, qui définissent les propriétés mécaniques des réseaux d'actine dendritique.

Le turnover de ces réseaux est contrôlé par l'ADF/Cofiline. Les résultats présentés montrent que la régulation du turnover est un mécanisme complexe qui dépend de facteurs biochimiques (nature et concentration des protéines) mais aussi de facteurs architecturaux (taille et densité des réseaux). Le modèle que nous présentons dans cette thèse suggère qu'un des paramètres clés est le ratio entre l'ADF/cofiline et l'actine dans les réseaux. En effet, il semble qu'il y ait un seuil critique pour ce ratio pour engendrer le désassemblage macroscopique. Les résultats obtenus par Chan et al. en 2009 montrent que l'ADF/cofiline est plus efficace pour débrancher un réseau dendritique que pour fragmenter des filaments. Nous proposons donc que le ration entre l'ADF/cofiline et l'actine va contrôler la dissociation des branches du réseau d'actine et ainsi diminuer la cohésion du réseau et engendrer sa fragmentation macroscopique en accord avec Reymann et al. (2011). Nous sommes ici bien loin d'un mécanisme de treadmilling (Blanchoin et al. 2014) où les filaments d'actine polymérisent à leurs extrémités barbées et dépolymérisent à

l'extrémités pointues dans le réseau. Nous proposons que le turnover du réseau dendritique en croissance se fait par un mécanisme de désassemblage macroscopique contrôlé par le ratio ADF/cofiline/actine.

❖ **La géométrie contrôle l'assemblage et le désassemblage des réseaux d'actine dendritiques**

La technique de microgravure au laser UV possède l'avantage de pouvoir produire des micropatrons à façon, tant en termes de densité (architecture) qu'en termes de formes ou de tailles (géométries). Ainsi, j'ai pu produire des micropatrons de différentes largeurs et évaluer l'effet de la géométrie sur l'assemblage et le désassemblage des réseaux branchés.

Lorsqu'on génère des réseaux de 15, 30 et 90 μm d'une même architecture, la vitesse de croissance des réseaux et leur taille ont une relation inverse. Cela peut s'expliquer par **déplétion locale** des monomères d'actine du milieu, qui peut être mesurée par la fluorescence de l'actine dans les réseaux. La déplétion en monomères cause une plus faible densité de branches, donc au total le réseau produit moins de forces de propulsion.

A l'inverse, plus un réseau est large, et plus il sera résistant au désassemblage macroscopique par ADF/Cofilin, et cela malgré sa plus faible densité. On pourrait penser que soit l'étendue du réseau empêche l'accessibilité d'ADF/Cofilin au réseau, soit il y a également une déplétion locale en ADF/Cofilin; ces points sont discutés plus loin.

Ainsi, architecture et géométrie des réseaux d'actine ne sont donc pas des paramètres indépendants.

Pour ce qui est de la modélisation, les résultats préliminaires tendent également vers un ratio Cofilin/Actine à l'origine du désassemblage macroscopique, bien que les simulations ne soient pas aussi claires à ce sujet que pour les réseaux de 15 μm .

❖ **L'hétérogénéité des réseaux branchés contrôle leur directionnalité**

Dans un article publié très récemment, Rajaa Boujemaa-Paterski et al. montrent que les réseaux hétérogènes en densité imposent une directionnalité durant la motilité (Boujemaa-Paterski et al. 2017). La modélisation de cette directionnalité montre qu'il y a une interdépendance entre la déplétion locale en monomères, et l'architecture des réseaux.

Ici, je montre que le désassemblage par ADF/Cofilin des réseaux hétérogènes module leur directionnalité.

D'une part, dans un cas simple constitué d'un réseau **faible//forte** densité, la motilité sera orientée vers le réseau de plus faible densité. La destruction prioritaire du réseau de plus faible densité par ADF/Cofilin, atténue la déviation du réseau. D'autre part, dans des réseaux hétérogènes mais symétriques de type **moyenne//forte//faible//forte//moyenne** densités, la motilité continue sans déviation. Lorsque le réseau de faible densité est détruit, alors on a un gain directionnalité vers le réseau moyen.

Les cellules se déplacent en réponse à un signal de leur microenvironnement, par exemple par chimiotaxie (gradient de signalisation) ou haptotaxie (gradient de molécules d'adhésion du substrat), mais aussi grâce à des boucles de signalisation intracellulaires. Durant ces phénomènes, l'orientation des cellules met en jeu le complexe Arp2/3 (Krause & Gautreau 2014; Suraneni et al. 2012; Wu et al. 2012a)

Par ailleurs Arpin, une protéine inhibitrice du complexe Arp2/3, régule l'orientation des cellules tout en étant inutile pour la protrusion et pour l'efficacité de la migration (Dang et al. 2013). En inhibant Arp2/3, elle permettrait aux cellules de se mettre à l'arrêt plus fréquemment, pour leur permettre de changer de direction (Gorelik & Gautreau 2015).

Il a également été montré dans les cellules qu'en absence d'ADF/Cofilin, la directionnalité et la chimiotaxie sont perdues (Sidani et al. 2007).

Nous avons montré ici que le désassemblage sélectif de réseaux d'actine en fonction de leur densité est un mécanisme possible permettant de contrôler la directionnalité pendant le mouvement.

❖ La déplétion locale en ADF/Cofiline, plus que sa diffusion dans les réseaux, module le désassemblage des réseaux branchés

Les données expérimentales, ainsi que la modélisation, indiquent que la diffusion de molécules à travers un réseau d'actine dendritique n'est que faiblement limitée. Ceci reste cohérent avec les travaux de Luby-Phelps où les molécules exclues de certains domaines comme le lamellipode ont un rayon hydrodynamique > 24 nm. Or les rayons hydrodynamiques des molécules mises en jeu dans mes expériences sont inférieurs d'un ordre de grandeur : 2,3 nm pour le Dextran 10 kDa ; 4,5 nm pour le Dextran 40 kDa ; de 2,8 nm pour le monomère d'actine (Kanzaki et al. 2006; Kuznetsova et al. 1999). Il n'est donc pas très surprenant qu'on n'observe pas d'exclusion important de l'ADF/cofiline dans les lamellipodes reconstitués, d'autant plus que la densité des réseaux reproduits expérimentalement peut être inférieure à celle d'un lamellipode.

En prenant en compte la fixation d'ADF/Cofiline sur les filaments, les simulations suggèrent que les différences de désassemblage observées seraient dues à une déplétion locale en ADF/Cofiline, qui ne serait pas compensée par sa libre diffusion dans le milieu. En conséquence, la fragmentation macroscopique des réseaux denses ou étendus est retardée.

Enfin, bien qu'il ait déjà été documenté que certaines protéines sont exclues du bord-avant du lamellipode (Iwasa & Mullins 2007; Svitkina & Borisy 1999a), cet effet pourrait être majoritairement biochimique pour l'ADF/Cofiline (préférence pour ADP-Actine). Toutefois, il n'en demeure pas moins que les grandes molécules comme les Myosines II sont elles aussi exclues du lamellipode. Dès lors, il n'est pas impossible qu'ADF/Cofiline, en clairsemant le réseau, le rende plus accessible. Cette possibilité sera la première perspective que j'aborde dans la partie suivante.

Dans la cellule, le réseau d'actine est régulé par une soixantaine de facteurs (Pollard & Borisy 2003). Parmi ces facteurs se trouvent des molécules qui contrôlent l'initiation, la croissance et le recyclage des réseaux d'actine lamellipodiaux, mais également leur taille et leur densité. Par exemple, la densité du réseau dans un lamellipode décroît à mesure que l'on s'éloigne du bord-avant de la cellule (Small et al. 1995; Svitkina & Borisy 1999b; Pollard & Borisy 2003; Lewalle et al. 2014). Les fortes densités concordent avec la localisation d'Arp2/3 et de Capping Protein, tandis que les réseaux moins denses co-localisent avec ADF/Cofiline (Svitkina & Borisy 1999b).

En faisant varier les paramètres biochimiques (concentration de protéines) et architecturaux (taille et densité des réseaux), on peut atteindre un état stationnaire dynamique des réseaux d'actine, comme celui des lamellipodes de kératocyte.

PERSPECTIVES

1- TRANSITION LAMELLIPODE – ARCS TRANSVERSES

La première perspective que j’aborderai ici est la possibilité d’utiliser mon système expérimental pour reconstituer la transition entre lamellipode et arcs transverses grâce à des moteurs moléculaires. En effet, lors de mes expériences, il s’est avéré que le Dextran 500 kDa interagissait fortement avec la surface des réseaux, et ne permettait pas d’apprécier son accessibilité au sein du réseau d’actine. Toutefois, en utilisant l’hypothèse que plus une molécule est grande et moins elle aura accès à un réseau dense, on peut directement ajouter des moteurs moléculaires dans le milieu. Ceci permettrait aussi de reconstituer la transition lamellipode-arcs transverses des cellules : l’incorporation de myosine II dans le réseau distal conduirait progressivement au réarrangement de ce réseau par alignement des fragments d’actine précédemment désassemblés (Burnette et al. 2011).

A partir de là, on peut observer si oui ou non, un réseau branché d’actine très dense empêche tout accès aux moteurs moléculaires (**Figure 84**), et si, au contraire, un réseau plus lâche laisse passer quelques molécules. Enfin, dans le cas d’un réseau en cours de désassemblage, sa densité étant réduite, il pourrait donner naissance à des arcs transverses grâce à l’action facilitée des moteurs moléculaires (**Figure 84**).

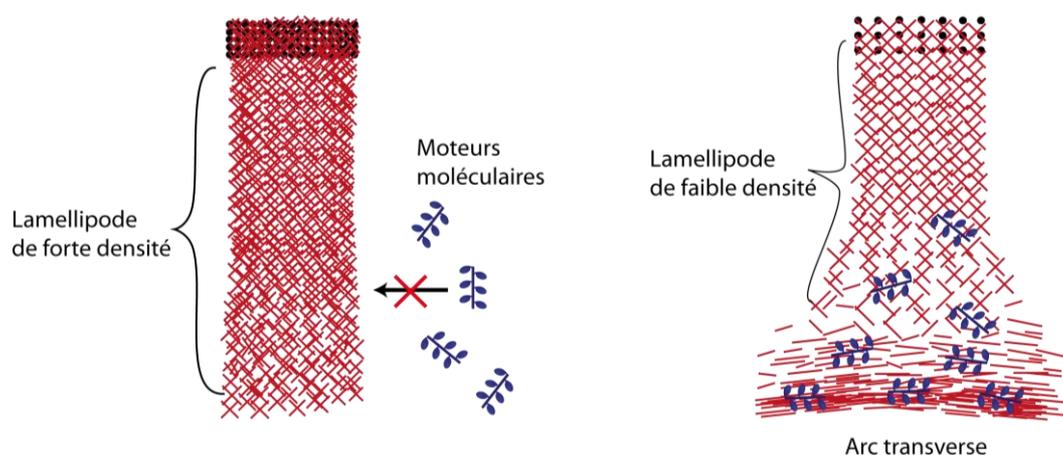


Figure 84. Détermination de l’accessibilité des moteurs moléculaires suivant la densité du réseau et établissement des arcs transverses.

2- CONFINEMENT 3D

Actuellement, les expériences de biologie moléculaire *in vitro* sont réalisées dans des systèmes expérimentaux dits « ouverts », tels que les chambres entre lame et lamelle ou les cuves de mesure de fluorimétrie ou de turbidité. De plus, les volumes mis en jeu sont de quelques microlitres à quelques dizaines de microlitres. En comparaison, une cellule de 10 -100 μm a un volume de 10^{-5} - 10^{-7} μl , soit jusqu'à un million de fois plus petit que les systèmes expérimentaux actuels (**Figure 85**).

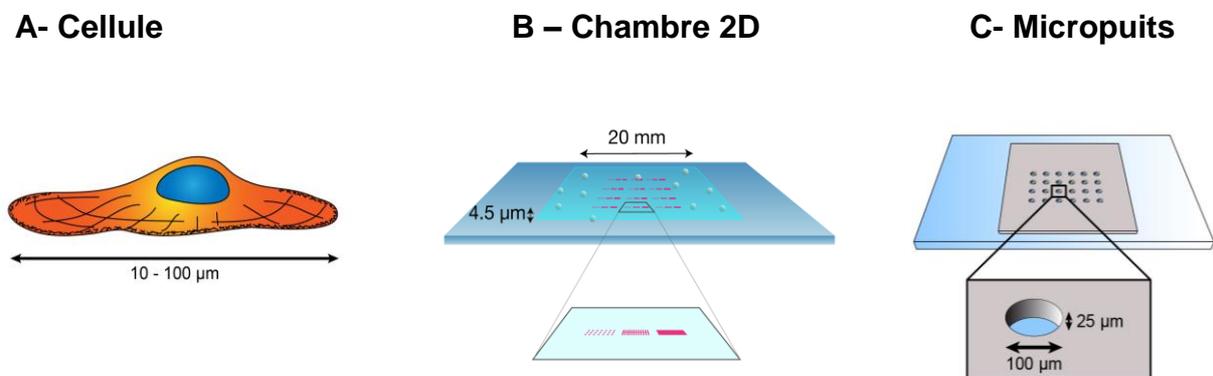


Figure 85. Les différentes échelles d'étude de l'actine : *in vivo* vs *in vitro*

La cellule est un milieu fermé de 10 à 100 μm de diamètre (A). Un système expérimental de micropuits fermés (C) confinerait le milieu d'un facteur 10'000 par rapport à la chambre 2D (B). Toutefois, un micropuits aura un volume d'au moins 25 fois supérieur à celui de la cellule.

De ce fait, l'actine disponible dans les systèmes expérimentaux ouverts est considéré comme infinie, et limite l'étude de la formation des structures d'actine à des considérations biochimiques (quelles protéines sont mises en jeu, quelle concentration,..). Elle ne permet pas de tester l'impact d'une quantité de protéines limitée : on peut augmenter les concentrations pour être dans des conditions physiologiques (quelques dizaines de μM d'actine), mais le nombre de protéines sera infini au regard de la taille des zones de nucléation. A l'inverse, la concentration peut être diminuée pour avoir un nombre de protéines semblables à celui de la cellule,

mais cette fois-ci la diffusion des protéines dans le milieu sera un facteur limitant de la réaction et ne représentera pas les conditions *in vivo*.

Ceci est particulièrement vrai dans mon propre système expérimental des chambres 2D, où malgré un confinement de la hauteur de la chambre, l'étendue est telle qu'elle représente environ 230'000 fois le volume d'une cellule. Ainsi, à proximité des zones de nucléation, peuvent se produire des déplétions locales de protéines (actine, Arp2/3, CP) si la diffusion ne compense pas la consommation de ces protéines en raison de la distance à parcourir. Par ailleurs, dans le cas du désassemblage et recyclage par ADF/Cofiline, ce système ne permet pas de savoir si l'élongation continue grâce aux monomères recyclés, ou grâce aux monomères initialement présents dans le milieu.

Enfin, des systèmes fermés de petite taille ont déjà été formés sous forme de vésicules lipidiques. En mimant la membrane cellulaire, elles sont une approche intéressante pour étudier la déformation de la membrane plasmique par le cytosquelette (Tsai & Koenderink 2015; Loiseau et al. 2016).

Dans le cadre des réseaux reconstitués d'actine, la fabrication de micropuits de PDMS (**Figure 85**) est un bon compromis entre l'expertise de l'équipe en systèmes reconstitués *in vitro*, et la nécessité de systèmes confinés. Ce dispositif expérimental a été développé par Laurène Gressin au cours de sa thèse dans l'équipe, et a permis l'observation du turnover de l'actine sur des billes motiles en présence d'ADF/Cofiline.

Idéalement, il faudrait donc réussir à combiner :

- la génération de réseaux d'actine plats à partir de divers micropatrons, et
- le confinement en micropuits

afin de se rapprocher le plus d'un turnover de réseau de lamellipode dans des conditions non limitantes en terme de diffusion.

3- DENSITE ET OBSTACLES

Lors de la migration cellulaire en 3D, le lamellipode est suffisamment malléable pour éviter des obstacles ou se déformer pour passer entre deux obstacles (Fritz-Laylin et al. 2017). Dès lors, on peut se demander comment l'architecture du réseau d'actine, sa densité, joue un rôle dans ces propriétés cellulaires.

Une façon de le tester *in vitro*, serait d'élaborer un système de micropiliers de PDMS, suffisamment rigides pour constituer des obstacles, et de les mettre en face d'un micropatron (**Figure 86**). Ainsi, le réseau va croître et venir en contact avec ces micropiliers. Dans ce dispositif, on pourrait faire varier différents paramètres (**Figure 86**), comme :

- La densité du micropatron (D), donc du réseau que l'on souhaite obtenir ;
- La distance entre micropatron et piliers (L)
- La distance entre piliers (L').

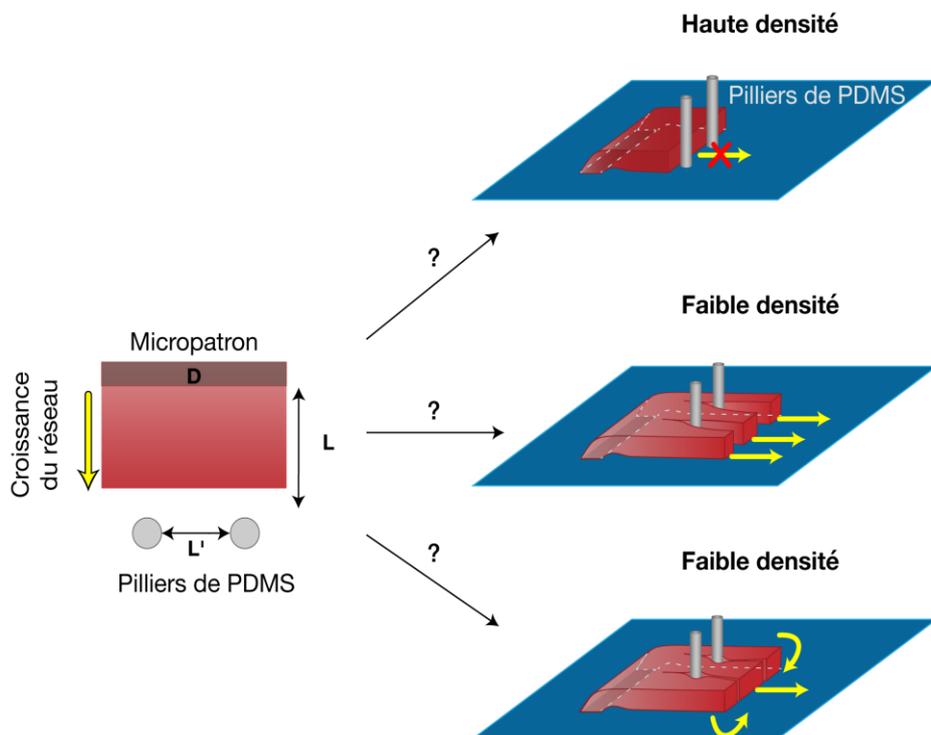


Figure 86. Comportements des réseaux d'actine face à des obstacles *in vitro*

Il serait alors possible d'observer l'adaptation du réseau à un obstacle. Dans l'exemple illustré en **Figure 86**, on peut tester si un réseau de haute densité sera arrêté par les piliers, car pas assez déformable, ou si à l'inverse un réseau peu dense se fracturerait pour passer entre les piliers. Dans ce dernier cas, on peut également observer la déformation du réseau fracturé : garde-t-il sa déformation, ou a-t-il tendance à revenir vers le milieu du réseau, peut-être sous l'effet de contraintes visco-élastiques ? (**Figure 86**).

Enfin, si on désassemble le réseau dense avec ADF/Cofiline, peut-il acquérir les propriétés du réseau moins dense et passer outre les obstacles ? Ce dernier cas serait fort intéressant puisqu'il permettrait d'estimer si, *in vivo*, l'ADF/Cofiline intervient dans l'adaptabilité morphologique du lamellipode.

ANNEXES

1- DETAIL DES TAMPONS ET SOLUTIONS DU MILIEU DE MOTILITE

Tampon G (G buffer)

5 mM Tris-HCl, pH 8.0
0.2 mM ATP
0.1 mM CaCl₂
0.5 mM dithiothreitol [DTT]
1 mM NaN₃

Tampon Xb (X buffer)

100 mM KCl
10 mM HEPES, pH7.5
1 mM MgCl₂
1 mM ATP
0.1 mM CaCl₂

10x KMEI

500 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM EGTA
100 mM Imidazole (fluorescent blank) pH7.8

2- METHODOLOGIE DE MODELISATION

Prédiction de la densité d'ADF/Cofiline sur un réseau connaissant la densité d'actine :

$$\partial_t F = \underbrace{\nabla \cdot (D \nabla F)}_{\text{Diffusion de la Cofiline libre}} - \underbrace{r_{Bind} A F}_{\text{Liaison de la Cofiline à l'actine}} + \underbrace{r_{Unbind} B}_{\text{Détachement de la Cofiline liée}}$$

$$\underbrace{\partial_t B + V \partial_y B}_{\text{Transport de la Cofiline durant la croissance du réseau}} = \underbrace{r_{Bind} A F}_{\text{Liaison de la Cofiline libre à l'actine}} - \underbrace{r_{Unbind} B}_{\text{Détachement de la Cofiline liée}}$$

Avec :

F	Concentration en Cofiline libre
B	Concentration en Cofiline liée
A	Concentration en F-actine
y	Distance le long du réseau

Et :

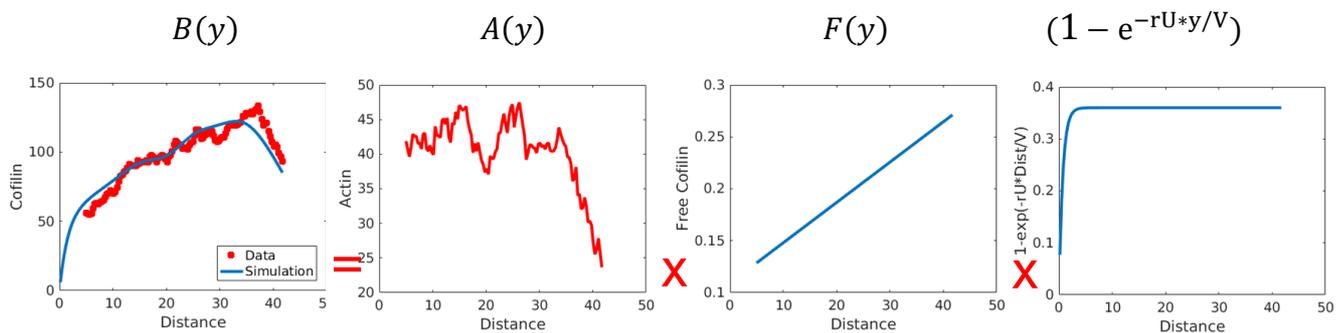
D	Constante de diffusion ($600 \mu\text{m}^2/\text{min}$)
r_{Bind}	Taux de liaison, $/\text{min}/\mu\text{M}$
r_{Unbind}	Taux de détachement, $/\text{min}$
V	Vitesse de croissance du réseau, $\mu\text{m}/\text{min}$

On peut estimer la quantité de Cofiline liée $B(y)$ comme étant le produit de trois fonctions :

Actine mesurée $A(y)$; Cofiline libre $F(y)$ et le facteur $1 - e^{-rU*y/V}$:

$$B(y) = \frac{r_{Bind}}{r_{Unind}} A(y) F(y) (1 - e^{-rU*y/V})$$

Soit approximativement:



La concentration d'ADF/Cofiline le long du réseau étant transportée avec le réseau après sa liaison à l'actine, il se crée un gradient d'ADF/Cofiline approximativement linéaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Achard, V., Martiel, J.-L.L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.-C.C., Blanchoin, L. & Boujemaa-Paterski, R., (2010). A **“Primer”-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility**. *Current Biology*, 20(5), pp.423–428.
- Afzelius, B.A., Dallai, R., Lanzavecchia, S. & Bellon, P.L., (1995). **Flagellar structure in normal human spermatozoa and in spermatozoa that lack dynein arms**. *Tissue and Cell*, 27(3), pp.241–247.
- Akhmanova, A. & Steinmetz, M.O., (2008). **Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), pp.309–322.
- Amann, K.J. & Pollard, T.D., (2000). **Cellular regulation of actin network assembly**. *Current Biology*, 10(20), pp.728–730.
- 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.
- Arber, S., Barbayannis, F.A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C.A., Bernard, O. & Caroni, P., (1998). **Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase**. *Nature*, 393(6687), pp.805–809.
- 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.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I. V, Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al., (2002). **Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility**. *Cell*, 109(4), pp.509–21.

Bergert, M., Chandradoss, S.D., Desai, R. a & Paluch, E., (2012). **Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(36), pp.14434–9.

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.

Bernheim-Groswasser, A., Prost, J. & Sykes, C., (2005). **Mechanism of actin-based motility: a dynamic state diagram.** *Biophysical Journal*, 89(2), pp.1411–1419.

Bernstein, B.W. & Bamburg, J.R., (1982). **Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF).** *Cell Motility*, 2(1), pp.1–8.

Blanchoin, L. & Pollard, T.D., (1998). **Interaction of actin monomers with Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) and profilin.** *The 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.** *The 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(6781), pp.1007–11.

Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S. & Pollard, T.D., (2000b). **Phosphorylation of Acanthamoeba actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure.** *Journal of Molecular Biology*, 295(2), 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.235–263.
- Blum, J.J., Lawler, G., Reed, M. & Shin, I., (1989). **Effect of cytoskeletal geometry on intracellular diffusion.** *Biophysical Journal*, 56(5), pp.995–1005.
- Boczkowska, M., Rebowski, 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.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.
- Boujemaa-Paterski, R., Galland, R., Suarez, C., Guérin, C., Théry, M. & Blanchoin, L., (2014). **Directed Actin Assembly and Motility.** In *Methods in enzymology*. pp. 283–300.
- Boujemaa-Paterski, R., Suarez, C., Klar, T., Zhu, J., Guérin, C., Mogilner, A., Théry, M. & Blanchoin, L., (2017). **Network heterogeneity regulates steering in actin-based motility.** *Nature Communications*, 8(1), p.655.
- Bugyi, B. & Carlier, M.-F., (2010). **Control of Actin Filament Treadmilling in Cell Motility.** *Annual Review of Biophysics*, 39(1), pp.449–470.
- Burnette, D.T., Manley, S., Sengupta, P., Sougrat, R., Davidson, M.W., Kachar, B. & Lippincott-Schwartz, J., (2011). **A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells.** *Nature Cell Biology*, 13(4), pp.371–382.

- Burnette, D.T., Shao, L., Ott, C., Pasapera, A.M., Fischer, R.S., Baird, M.A., Der Loughian, C., Delanoe-Ayari, H., Paszek, M.J., Davidson, M.W., et al., (2014). **A contractile and counterbalancing adhesion system controls the 3D shape of crawling cells.** *Journal of Cell Biology*, 205(1), pp.83–96.
- Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S. & Jockusch, B.M., (1992). **Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments.** *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 22(1), pp.51–61.
- Carlier, M.-F. & Pantaloni, D., (1997). **Control of actin dynamics in cell motility.** *Journal of Molecular Biology*, 269(4), pp.459–467.
- Carlier, M.F. & Pantaloni, D., (1981). **Kinetic analysis of guanosine 5'-triphosphate hydrolysis associated with tubulin polymerization.** *Biochemistry*, 20(7), pp.1918–24.
- Carlier, 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.1307–22.
- 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.
- 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.
- Cooper, J. a & Pollard, T.D., (1985). **Effect of capping protein on the kinetics of actin polymerization.** *Biochemistry*, 24(3), pp.793–9.
- Cudmore, S., Cossart, P., Griffiths, G. & Way, M., (1995). **Actin-based motility of vaccinia virus.** *Nature*, 378(6557), pp.636–638.

- Dang, I., Gorelik, R., Sousa-Blin, C., Derivery, E., Guérin, C., Linkner, J., Nemethova, M., Dumortier, J.G., Giger, F. a, Chipysheva, T. a, et al., (2013). **Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell migration.** *Nature*, 503(V), pp.281–4.
- 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).
- Didry, D., Carlier, M.F. & Pantaloni, D., (1998). **Synergy between actin depolymerizing factor/cofilin and profilin in increasing actin filament turnover.** *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), pp.25602–25611.
- Dominguez, R. & Holmes, K.C., (2011). **Actin Structure and Function.** *Annual Review of Biophysics*, 40(1), pp.169–186.
- Elam, W.A., Kang, H. & De La Cruz, E.M., (2013). **Biophysics of actin filament severing by cofilin.** *FEBS Letters*, 587(8), pp.1215–1219.
- 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.
- 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.
- Frantz, C., Barreiro, G., Dominguez, L., Chen, X., Eddy, R., Condeelis, J., Kelly, M.J.S., Jacobson, M.P. & Barber, D.L., (2008). **Cofilin is a pH sensor for actin free barbed end formation: role of phosphoinositide binding.** *The Journal of Cell Biology*, 183(5), pp.865–879.
- Friedl, P. & Wolf, K., (2009). **Proteolytic interstitial cell migration: A five-step process.** *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), pp.129–135.

- Frischknecht, F., Moreau, V., Röttger, S., Gonfloni, S., Reckmann, I., Superti-Furga, G. & Way, M., (1999). **Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling.** *Nature*, 401(6756), pp.926–9.
- Fritz-Laylin, L.K., Lord, S.J. & Mullins, R.D., (2017). **WASP and SCAR are evolutionarily conserved in actin-filled pseudopod-based motility.** *The Journal of Cell Biology*, p.jcb.201701074.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Kudryashov, D.S., Solodukhin, A., Reisler, E., Schroder, G.F. & Egelman, E.H., (2011). **Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), pp.20568–20572.
- Galland, R., Leduc, P., Guérin, C., Peyrade, D., Blanchoin, L. & Théry, M., (2013). **Fabrication of three-dimensional electrical connections by means of directed actin self-organization.** *Nature Materials*, 12(5), pp.416–421.
- 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.364–374.
- Goldman, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P. & Steinert, P.M., (1996). **The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity.** *Journal of Cell Biology*, 134(4), pp.971–983.
- Goley, E.D., Ohkawa, T., Mancuso, J., Woodruff, J.B., D'Alessio, J.A., Cande, W.Z., Volkman, L.E. & Welch, M.D., (2006). **Dynamic Nuclear Actin Assembly by Arp2/3 Complex and a Baculovirus WASP-Like Protein.** *Science*, 314(5798), pp.464–467.
- Goodpaster, T., Legesse-Miller, A., Hameed, M.R., Aisner, S.C., Randolph-Habecker, J. & Collier, H.A., (2007). **An Immunohistochemical Method for Identifying Fibroblasts in Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue.** *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(4), pp.347–358.

- Gorbatyuk, V.Y., Nosworthy, N.J., Robson, S.A., Bains, N.P.S., Maciejewski, M.W., dos Remedios, C.G. & King, G.F., (2006). **Mapping the Phosphoinositide-Binding Site on Chick Cofilin Explains How PIP₂ Regulates the Cofilin-Actin Interaction.** *Molecular Cell*, 24(4), pp.511–522.
- Gorelik, R. & Gautreau, A., (2015). **The Arp2/3 inhibitory protein arpin induces cell turning by pausing cell migration.** *Cytoskeleton*, 72(7), pp.362–371.
- 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).
- 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.
- van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J. & Sykes, C., (2005). **Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(22), pp.7847–7852.
- 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.
- 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*, 111(27), pp.9810–9815.

- Hirokawa, N., (1982). **Cross-linker system between neurofilaments, microtubules and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method.** *The Journal of Cell Biology*, 94(1), pp.129–142.
- Hoffman, P.N., Cleveland, D.W., Griffin, J.W., Landes, P.W., Cowan, N.J. & Price, D.L., (1987). **Neurofilament gene expression: a major determinant of axonal caliber.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84(10), pp.3472–3476.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W., (1990). **Atomic model of the actin filament.** *Nature*, 347(6288), pp.44–49.
- 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.
- 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.
- Janmey, P.A., (1991). **Viscoelastic properties of vimentin compared with other filamentous biopolymer networks.** *The Journal of Cell Biology*, 113(1), pp.155–160.
- Janson, L.W., Ragsdale, K. & Luby-Phelps, K., (1996). **Mechanism and size cutoff for steric exclusion from actin-rich cytoplasmic domains.** *Biophysical Journal*, 71(3), pp.1228–1234.
- 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).

- Jones, J.D.D. & Luby-Phelps, K., (1996). **Tracer diffusion through F-actin: effect of filament length and cross-linking.** *Biophys.J.*, 71(5), pp.2742–2750.
- Kalfa, T.A., Pushkaran, S., Mohandas, N., Hartwig, J.H., Fowler, V.M., Johnson, J.F., Joiner, C.H., Williams, D.A. & Zheng, Y., (2006). **Rac GTPases regulate the morphology and deformability of the erythrocyte cytoskeleton.** *Blood*, 108(12), pp.3637–3645.
- Kamal, J.K.A., Benchaar, S.A., Takamoto, K., Reisler, E. & Chance, M.R., (2007). **Three-dimensional structure of cofilin bound to monomeric actin derived by structural mass spectrometry data.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(19), pp.7910–7915.
- Kanzaki, N., Uyeda, T.Q.P. & Onuma, K., (2006). **Intermolecular Interaction of Actin Revealed by a Dynamic Light Scattering Technique.** *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(6), pp.2881–2887.
- Keren, K., Pincus, Z., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Marriott, G., Mogilner, A. & Theriot, J. a, (2008). **Mechanism of shape determination in motile cells.** *Nature*, 453(7194), pp.475–480.
- Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H. & Cossart, P., (1993). **Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly.** *Journal of Cell Science*, 105(Pt 3), pp.699–710.
- Krause, M. & Gautreau, A., (2014). **Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(9), pp.577–590.
- 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.341–353.

- Kuhn, T.B. & Bamburg, J.R., (2008). **Tropomyosin and ADF/Cofilin as Collaborators and Competitors.** In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. United States, pp. 232–249.
- Kuznetsova, I.M., Biktashev, A.G., Khaitlina, S.Y., Vassilenko, K.S., Turoverov, K.K. & Uversky, V.N., (1999). **Effect of Self-Association on the Structural Organization of Partially Folded Proteins: Inactivated Actin.** *Biophysical Journal*, 77(5), pp.2788–2800.
- 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.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., 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.982–992.
- 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.
- Laurent, T.C. & Granath, K. a, (1967). **Fractionation of dextran and Ficoll by chromatography on Sephadex G-200.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 136(2), pp.191–8.

- Laurent, V.M., Kasas, S., Yersin, A., Schäffer, T.E., Catsicas, S., Dietler, G., Verkhovsky, A.B. & Meister, J.-J., (2005). **Gradient of Rigidity in the Lamellipodia of Migrating Cells Revealed by Atomic Force Microscopy.** *Biophysical Journal*, 89(1), pp.667–675.
- Leonard, S.A., Gittis, A.G., Petrella, E.C., Pollard, T.D. & Lattman, E.E., (1997). **Crystal structure of the actin-binding protein actophorin from Acanthamoeba.** *Nature Structural Biology*, 4(5), pp.369–373.
- Lewalle, A., Fritzsche, M., Wilson, K., Thorogate, R., Duke, T. & Charras, G., (2014). **A phenomenological density-scaling approach to lamellipodial actin dynamics.** *Interface Focus*, 4(6), pp.20140006–20140006.
- 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, 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.
- Lowery, J., Kuczmarski, E.R., Herrmann, H. & Goldman, R.D., (2015). **Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function.** *Journal of Biological Chemistry*, 290(28), pp.17145–17153.
- Luby-Phelps, K., Castle, P.E., Taylor, D.L. & Lanni, F., (1987). **Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(14), pp.4910–4913.
- Luby-Phelps, K. & Taylor, D.L., (1988). **Subcellular compartmentalization by local differentiation of cytoplasmic structure.** *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 10(1–2), pp.28–37.

- 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.107–15.
- Maciver, S.K., (1991). **Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*.** *The Journal of Cell Biology*, 115(6), pp.1611–1620.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.-F.M.-F. & Sykes, C., (2004). **Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), pp.5992–7.
- 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.5158–71.
- 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.550–558.
- 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.
- Mogilner, A. & Oster, G., (1996). **Cell motility driven by actin polymerization.** *Biophysical Journal*, 71(6), pp.3030–3045.
- Moriyama, K., Iida, K. & Yahara, I., (1996). **Phosphorylation of Ser-3 of cofilin regulates its essential function on actin.** *Genes Cells*, 1(1), pp.73–86.

- Mueller, J., Pfanzelter, J., Winkler, C., Narita, A., Le Clainche, C., Nemethova, M., Carrier, M.-F., Maeda, Y., Welch, M.D., Ohkawa, T., et al., (2014). **Electron tomography and simulation of baculovirus actin comet tails support a tethered filament model of pathogen propulsion.** F. Hughson, ed. *PLoS Biology*, 12(1), p.e1001765.
- 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 of the United States of America*, 95(11), pp.6181–6.
- 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*, 2015(4), pp.1–22.
- 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.
- Novak, I.L., Kraikivski, P. & Slepchenko, B.M., (2009). **Diffusion in Cytoplasm: Effects of Excluded Volume Due to Internal Membranes and Cytoskeletal Structures.** *Biophysical Journal*, 97(3), pp.758–767.
- Ohkawa, T., Volkman, L.E. & Welch, M.D., (2010). **Actin-based motility drives baculovirus transit to the nucleus and cell surface.** *The Journal of Cell Biology*, 190(2), pp.187–195.
- 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.
- 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.** *Journal of Cell Biology*, 188(6), pp.769–777.

- Omary, M.B., Ku, N.-O., Tao, G.-Z., Toivola, D.M. & Liao, J., (2006). **“Heads and tails” of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights.** *Trends in Biochemical Sciences*, 31(7), pp.383–394.
- Ono, S., (2007). **Mechanism of Depolymerization and Severing of Actin Filaments and Its Significance in Cytoskeletal Dynamics.** In *International Review of Cytology*. pp. 1–82.
- Ostuni, E., Whitesides, G.M., Ingber, D.E. & Chen, C.S., (2009). **Using Self-Assembled Monolayers to Pattern ECM Proteins and Cells on Substrates.** In *Methods in Molecular Biology*. pp. 183–194.
- Pantaloni, D., Le Clainche, C. & Carlier, M.F., (2001). **Mechanism of actin-based motility.** *Science (New York, N.Y.)*, 292(5521), pp.1502–6.
- Parekh, S.H., Chaudhuri, O., Theriot, J. a & Fletcher, D. a, (2005). **Loading history determines the velocity of actin-network growth.** *Nature Cell Biology*, 7(12), pp.1219–1223.
- Parker, K.K., Brock, A.L., Brangwynne, C., Mannix, R.J., Wang, N., Ostuni, E., Geisse, N. a, Adams, J.C., Whitesides, G.M. & Ingber, D.E., (2002). **Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces.** *The FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(10), pp.1195–1204.
- Pavlov, D., Muhrad, A., Cooper, J., Wear, M. & Reisler, E., (2007). **Actin Filament Severing by Cofilin.** *Journal of Molecular Biology*, 365(5), pp.1350–1358.
- Peskin, C.S., Odell, G.M. & Oster, G.F., (1993). **Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet.** *Biophysical Journal*, 65(1), pp.316–324.
- Pfaendtner, J., De La Cruz, E.M. & Voth, G.A., (2010). **Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), pp.7299–7304.

- 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., 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.545–576.
- Pollard, T.D. & Borisy, G.G., (2003). **Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments.** *Cell*, 112(4), pp.453–65.
- Pollard, T.D., (2007). **Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins.** *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36, pp.451–477.
- Pollard, T.D. & Cooper, J.A., (2009). **Actin, a Central Player in Cell Shape and Movement.** *Science*, 326(5957), pp.1208–1212.
- Pope, B.J., Zierler-Gould, K.M., Kühne, R., Weeds, A.G. & Ball, L.J., (2004). **Solution structure of human cofilin: actin binding, pH sensitivity, and relationship to actin-depolymerizing factor.** *The Journal of Biological Chemistry*, 279(6), pp.4840–8.
- 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.
- Reig, G., Pulgar, E. & Concha, M.L., (2014). **Cell migration: from tissue culture to embryos.** *Development (Cambridge, England)*, 141(10), pp.1999–2013.

- Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V, Tsubakihara, M., Berry, D. a & Nosworthy, N.J., (2003). **Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments.** *Physiological Reviews*, 83(2), pp.433–473.
- Renoult, C., Ternent, D., Maciver, S.K., Fattoum, A., Astier, C., Benyamin, Y. & Roustan, C., (1999). **The identification of a second cofilin binding site on actin suggests a novel, intercalated arrangement of F-actin binding.** *Journal of Biological Chemistry*, 274(41), pp.28893–28899.
- 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.827–832.
- Reymann, A.-C., Suarez, C., Guerin, 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., Guérin, C., Théry, M., Blanchoin, L. & Boujemaa-Paterski, R., (2014). **Geometrical Control of Actin Assembly and Contractility.** In *Methods in cell biology*. pp. 19–38.
- 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.
- Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmström, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T. & Way, M., (2001). **Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus.** *Nature Cell Biology*, 3(11), pp.992–1000.
- Rodal, A.A., Tetreault, J.W., Lappalainen, P., Drubin, D.G. & Amberg, D.C., (1999). **Aip1p interacts with cofilin to disassemble actin filaments.** *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.
- Rouiller, I., Xu, X.-P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkmann, N. & Hanein, D., (2008). **The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex.** *The Journal of Cell Biology*, 180(5), pp.887–895.
- Scarpa, E. & Mayor, R., (2016). **Collective cell migration in development.** *The Journal of Cell Biology*, 212(2), p.143 LP-155.
- Seetapun, D., Castle, B.T., McIntyre, A.J., Tran, P.T. & Odde, D.J., (2012). **Estimating the Microtubule GTP Cap Size In Vivo.** *Current Biology*, 22(18), pp.1681–1687.
- Sens, P. & Plastino, J., (2015). **Membrane tension and cytoskeleton organization in cell motility.** *Journal of Physics. Condensed Matter : An Institute of Physics Journal*, 27(27), p.273103.
- Shah, J. V, Flanagan, L. a, Janmey, P. a & Leterrier, J.F., (2000). **Bidirectional translocation of neurofilaments along microtubules mediated in part by dynein/dynactin.** *Molecular Biology of the Cell*, 11(10), pp.3495–508.
- 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.** *Journal of Cell Biology*, 179(4), pp.777–791.
- Singh, A. & Hitchcock-DeGregori, S.E., (2009). **A peek into tropomyosin binding and unfolding on the actin filament.** *PLoS ONE*, 4(7).
- Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G.P., Stephanopoulos, G.N., Wang, D.I., Whitesides, G.M. & Ingber, D.E., (1994). **Engineering cell shape and function.** *Science*, 264(5159), pp.696–8.

- Small, J.V., Herzog, M. & Anderson, K., (1995). **Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium.** *Journal of Cell Biology*, 129(5), pp.1275–1286.
- Smith, B.A., Padrick, S.B., Doolittle, L.K., Daugherty-Clarke, K., Corrêa, I.R., Xu, M., Goode, B.L., Rosen, M.K. & Gelles, J., (2013). **Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation.** *eLife*, 2, p.e01008.
- 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.
- Staiger, C.J., Sheahan, M.B., Khurana, P., Wang, X., McCurdy, D.W. & Blanchoin, L., (2009). **Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the Arabidopsis cortical array.** *The Journal of Cell Biology*, 184(2), pp.269–280.
- 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.
- Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J.R., Durnin, M., Hanein, D. & Li, R., (2012). **The Arp2/3 complex is required for lamellipodia extension and directional fibroblast cell migration.** *Journal of Cell Biology*, 197(2), pp.239–251.
- Svitkina, T.M., Verkhovsky, 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., (1999a). **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. & Borisy, G.G., (1999b). **Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia.** , 145(5), pp.1009–1026.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E. a., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., 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.
- Theriot, J.A. & Mitchison, T.J., (1991). **Actin microfilament dynamics in locomoting cells.** *Nature*, 352(6331), pp.126–131.
- 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.
- Thrasher, A.J. & Burns, S.O., (2010). **WASP: a key immunological multitasker.** *Nature Reviews Immunology*, 10(3), pp.182–192.
- 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(DECEMBER2015), pp.1–28.
- Tsai, F.-C. & Koenderink, G.H., (2015). **Shape control of lipid bilayer membranes by confined actin bundles.** *Soft Matter*, 11(45), pp.8834–8847.
- Vignaud, T., Ennomani, H. & Théry, M., (2014). **Polyacrylamide Hydrogel Micropatterning.** In *Methods in cell biology*. pp. 93–116.

Vitre, B., Coquelle, F.M., Heichette, C., Garnier, C., Chrétien, D. & Arnal, I., (2008). **EB1 regulates microtubule dynamics and tubulin sheet closure in vitro.** *Nature Cell Biology*, 10(4), pp.415–421.

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.

Ward, B.M. & Moss, B., (2001). **Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails.** *Journal of Virology*, 75(23), pp.11651–63.

Weiss, M., Elsner, M., Kartberg, F. & Nilsson, T., (2004). **Anomalous Subdiffusion Is a Measure for Cytoplasmic Crowding in Living Cells.** *Biophysical Journal*, 87(5), pp.3518–3524.

Welch, M.D., Iwamatsu, A. & Mitchison, T.J., (1997). **Actin polymerization is induced by Arp 2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*.** *Nature*, 385(6613), pp.265–269.

Wiggin, 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.

Wong, I.Y., Gardel, M.L., Reichman, D.R., Weeks, E.R., Valentine, M.T., Bausch, a. R. & Weitz, D. a., (2004). **Anomalous Diffusion Probes Microstructure Dynamics of Entangled F-Actin Networks.** *Physical Review Letters*, 92(17), p.178101.

Wu, C., Asokan, S.B., Berginski, M.E., Haynes, E.M., Sharpless, N.E., Griffith, J.D., Gomez, S.M. & Bear, J.E., (2012a). **Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis.** *Cell*, 148(5), pp.973–987.

- Wu, C.-H., Fallini, C., Ticozzi, N., Keagle, P.J., Sapp, P.C., Piotrowska, K., Lowe, P., Koppers, M., McKenna-Yasek, D., Baron, D.M., et al., (2012b). **Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis.** *Nature*, 488(7412), pp.499–503.
- Yonezawa, N., Homma, Y., Yahara, I., Sakai, H. & Nishida, E., (1991). **A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin.** *The Journal of Biological Chemistry*, 266(26), pp.17218–21.
- Yoo, Y., Ho, H.J., Wang, C. & Guan, J.-L., (2010). **Tyrosine phosphorylation of cofilin at Y68 by v-Src leads to its degradation through ubiquitin–proteasome pathway.** *Oncogene*, 29(2), pp.263–272.
- Zalevsky, J., Grigorova, I. & Mullins, R.D., (2001). **Activation of the Arp2/3 Complex by the Listeria ActA Protein.** *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), pp.3468–3475.
- Zhao, H., Hakala, M. & Lappalainen, P., (2010). **ADF/Cofilin Binds Phosphoinositides in a Multivalent Manner to Act as a PIP2-Density Sensor.** *Biophysical Journal*, 98(10), pp.2327–2336.

ABSTRACT

Cells maintain their morphology and produce forces thanks to the cytoskeleton, which is composed of three types of protein polymers, amongst which the actin microfilaments. Actin filaments assemble into diverse architectures, which assembly and disassembly is tightly controlled in space and time. Indeed, the progressive hydrolysis of ATP in the subunits causes the actin filaments to age. Thus, actin needs to be recycled. When assembly and disassembly compensate, different actin architectures are in a dynamic steady state, in which the pool of actin monomers is renewed. Disassembly of actin structures also maintains a large reservoir of monomers ready to assemble when needed by the cell.

The lamellipodium is the locomotory organelle of a large number of cells, and is made of a thin yet very dense sheet of dendritic actin network. To maintain a rapid turnover of the lamellipodium, the pivotal protein is ADF/Cofilin. ADF/Cofilin is responsible of the disassembly of old actin filaments by fragmentation and debranching. To date, there have been extensive studies about the microscopic mechanisms, but if one wants to understand cell motility, one must decipher the collective and macroscopic disassembly of the dendritic actin network.

By combining motility media reconstituted from purified proteins, and a new surface micro-patterning technique, I was able to reconstitute lamellipodium-like dendritic networks *in vitro*. During this thesis I explored the parameters that control the macroscopic disassembly of these networks. This work shows that the disassembly of dendritic actin networks depends on their architecture (density) and geometry (size): dense or extended networks are less efficiently disassembled by ADF/Cofilin and remain cohesive longer. Simulations show that these effects can be explained by a local depletion of ADF/Cofilin in the volume surrounding the network. Besides, networks of heterogeneous densities acquire directionality. This steering could be modulated by selective disassembly of the networks by ADF/Cofilin. In parallel, these studies established a balance between assembly and disassembly at which networks are at a dynamic steady state.

This work goes further than the fundamentally important studies about ADF/Cofilin fragmentation of individual actin filaments, and establishes new parameters that control the disassembly of dendritic actin at the macroscopic scale.

RESUME

Le maintien de la morphologie et la production des forces par les cellules sont possibles grâce au cytosquelette, constitué de trois types de polymères protéiques dont les microfilaments d'actine. Les filaments d'actine s'organisent en différentes architectures, dont l'assemblage et le désassemblage sont étroitement contrôlés dans le temps et l'espace. En effet, une des caractéristiques d'un filament d'actine est son vieillissement, par l'hydrolyse progressive de l'ATP au sein des sous-unités. Pour assurer un renouvellement continu de l'actine celle-ci doit donc être recyclée. Lorsqu'assemblage et désassemblage se compensent, les architectures d'actine sont alors dans un état stationnaire dynamique, dans lequel la concentration de monomères d'actine est perpétuellement renouvelée. Le désassemblage permet également de maintenir un réservoir important d'actine monomérique polymérisable, pour répondre rapidement aux besoins cellulaires.

Le lamellipode, organe moteur de la cellule, est essentiellement composé d'un feuillet fin mais très dense d'actine dendritique ainsi que de protéines régulatrices. Une protéine essentielle dans le turnover rapide du lamellipode est l'ADF/Cofiline. Elle est responsable du désassemblage des filaments âgés par fragmentation et par débranchement. Jusqu'à présent, les études portaient le plus souvent sur les mécanismes microscopiques, à l'échelle du filament individuel. Or, pour comprendre la dynamique des réseaux branchés notamment au cours de la motilité cellulaire, il nous faut comprendre le désassemblage collectif et macroscopique du réseau d'actine dendritique.

En combinant des milieux de motilité reconstitués à partir de protéines purifiées à une nouvelle technique de micro-structuration de surfaces, j'ai pu reconstituer *in vitro* des réseaux dendritiques semblables au lamellipode. Ainsi, j'ai exploré au cours de ma thèse les paramètres qui contrôlent leur désassemblage macroscopique. Il en ressort que le désassemblage des réseaux dépend de leur architecture (densité) et de leur géométrie (taille) : les réseaux denses ou étendus sont moins efficacement désassemblés et restent cohésifs plus longtemps. Des modélisations montrent que c'est la déplétion locale en ADF/Cofiline autour du réseau d'actine qui semble responsable des effets observés. De plus, les réseaux constitués de densités d'actine hétérogènes acquièrent une directionnalité, qui peut être modulée par le désassemblage sélectif par ADF/Cofiline. Parallèlement, ces études ont permis de déterminer que pour avoir un réseau à l'état dynamique stationnaire (ou à l'équilibre), il fallait atteindre un certain ratio d'ADF/Cofiline par actine.

Ce travail a permis d'aller plus loin que les études fondamentales sur la fragmentation de filaments d'actine individuels, à l'échelle microscopique, et d'établir deux nouveaux paramètres qui contrôlent le désassemblage de réseaux d'actine dendritique à l'échelle macroscopique.