



HAL
open science

Étude par microscopie électronique des conformations structurales adoptées par la Formine durant la polymérisation des filaments d'actine.

Julien Maufront

► **To cite this version:**

Julien Maufront. Étude par microscopie électronique des conformations structurales adoptées par la Formine durant la polymérisation des filaments d'actine.. Sciences du Vivant [q-bio]. PSL Université Paris Dauphine, 2021. Français. NNT : 2021UPSLS049 . tel-04061804

HAL Id: tel-04061804

<https://hal.science/tel-04061804>

Submitted on 7 Apr 2023

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Institut Curie

**Étude par microscopie électronique des conformations
structurales adoptées par la Formine durant la
polymérisation des filaments d'actine.**

Soutenue par

Julien MAUFRONT

Le 21 juin 2021

Ecole doctorale n° 515

Complexité Du Vivant

Spécialité

Biologie Cellulaire

Composition du jury :

Anne, HOUDUSSE JUILLÉ

Directrice de Recherche, Institut Curie – Biologie Cellulaire et
Cancer (UMR 144) *Présidente*

Denis, CHRÉTIEN

Directeur de Recherche, Institut Génétique et Développement
de Rennes (UMR 6290) *Rapporteur*

Alphée, MICHELOT

Chargé de Recherche, Institut de Biologie du Développement
de Marseille *Rapporteur*

Célia, PLISSON-CHASTANG

Chargée de Recherche, Centre de Biologie Intégrative –
Laboratoire de Biologie Moléculaire Eucaryote *Examinatrice*

Rut, CARBALLIDO-LOPEZ

Directrice de Recherche, INRAE *Examinatrice*

Aurélie, BERTIN

Chargée de Recherche, Institut Curie – Laboratoire Physico-
Chimie Curie (UMR 168) *Directrice de thèse*

Guillaume, ROMET-LEMONNE

Directeur de Recherche, Institut Jacques Monod *Invité*

I. Table des matières.

I. INTRODUCTION.	9
1. LE CYTOSQUELETTE ET SES ACTEURS.	10
1.1. Les microfilaments d'actine.	12
1.2. Les microtubules.	15
1.3. Les filaments intermédiaires.	17
1.4. Les filaments de septine.	19
1.5. Le cytosquelette, une machinerie à décortiquer.	21
2. L'ACTINE, UNE PROTEINE PIVOT.	22
2.1. La dynamique intrinsèque de l'actine.	22
2.2. Diversité biochimique de l'actine.	26
2.3. Le monomère et ses protéines régulatrices.	28
2.4. Le filament d'actine comme plateforme d'interaction.	31
3. LES FORMINES.	49
3.1. Les formines à l'échelle de la cellule.	49
3.2. Les formines à l'échelle moléculaire.	51
3.3. Modèles moléculaires de la processivité.	58
3.4. Projet de thèse.	67
II. MATERIELS ET METHODES.	69
1. LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN PRINCIPE. ²¹⁹	70
1.1. Des électrons plutôt que des photons.	70
1.2. Microscope électronique en transmission classique (MET) ou à balayage (METB).	70
1.3. Résolution spatiale et rapport signal sur bruit.	72
1.4. Innovations techniques et technologiques en microscopie électronique.	73
2. LE FILAMENT D'ACTINE A LA LUMIERE DE LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.	76
2.1. Le corps du filament d'actine.	76
2.2. Les extrémités du filament d'actine.	77
3. PROTEINES UTILISEES DURANT LA THESE.	81
4. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR DES ANALYSES EN PARTICULE UNIQUE.	82
4.1. Formine, Arp2/3, Spin90.	83
4.2. Densité élevée d'extrémités barbées : contrôle positif de la nucléation.	84
4.3. Densité élevée d'extrémités barbées : contrôle négatif de la longueur des filaments.	86
5. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE EN COLORATION NEGATIVE.	89
5.1. Préparation des grilles de microscopie en coloration négative.	89
5.2. Acquisition d'images pour la microscopie électronique en transmission conventionnelle par coloration négative.	91
5.3. Acquisition d'images pour la microscopie électronique en transmission à balayage par coloration négative.	93
6. CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.	94
6.1. Préparation de grilles en cryo-microscopie électronique.	95
6.2. Modèles de grille utilisés en cryo-microscopie électronique.	96
6.3. Oxyde de Graphène pour la cryo-microscopie électronique.	97
6.4. Acquisition d'images en cryo-microscopie électronique.	99
7. ANALYSE STRUCTURALE EN PARTICULE UNIQUE.	100
7.1. Correction des images brutes.	100
7.2. Extraction des particules pour une Analyse en Particule Isolée.	101
7.3. Aligement et classification 2D de particules.	104

7.4.	<i>Reconstruction 3D.</i>	107
III.	RESULTATS.	109
1.	CARACTERISATION STRUCTURALE DE CONSTRUCTIONS DE FORMINE mDia1.	110
1.1.	<i>Construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His).</i>	110
1.2.	<i>Construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His).</i>	113
1.3.	<i>Conclusion.</i>	116
2.	PREPARATION DES ECHANTILLONS ACTINE-FORMINE POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE	117
2.1.	<i>Nucléation stimulée.</i>	117
2.2.	<i>Élongation contrôlée.</i>	121
3.	ANALYSES EN PARTICULE UNIQUE ADAPTEES POUR DES EXTREMITES DE FILAMENT D'ACTINE.	128
3.1.	<i>Analyse en Particule Isolée : Nucléation, Spectrine • Actine • Formine.</i>	128
3.2.	<i>Analyse en Particule Isolée : Sonication, Gc-globuline – Actine • Formine.</i>	129
3.3.	<i>Analyse en Particule Isolée : Sonication, Actine • Formine.</i>	137
4.	STRUCTURES 3D DU COMPLEXE FORMINE – BOUT BARBE OBTENUES EN COLORATION NEGATIVE : MODELE DE « LA MARCHÉ ENJAMBÉE ».	142
5.	VARIATION CONFORMATIONNELLE DE L'ÉTAT « OUVERT »	148
5.1.	<i>« Battement » 2D du premier domaine FH2.</i>	148
5.2.	<i>« Battement » du domaine FH2 : élaboration d'un modèle structural 3D.</i>	151
6.	DIMERE DE FORMINE ENCRCLANT LE CORPS D'UN FILAMENT D'ACTINE.	155
7.	ÉTUDE PAR CRYO-MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE LA COIFFE DES FORMINES.	158
7.1.	<i>Mise au point des conditions de réalisation des grilles de cryo-microscopie électronique.</i>	158
7.2.	<i>Analyse en Particule Isolée de données de cryo-microscopie électronique.</i>	164
8.	FORMATION D'UN COMPLEXE NUCLEATEUR FORMINE-Arp2/3-SPIN90.	167
8.1.	<i>Analyse en Particule Isolée : alignements et classifications 2D.</i>	168
8.2.	<i>Analyse en Particule Isolée : classifications et reconstructions 3D.</i>	169
9.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.	174
9.1.	<i>Modalités de génération d'une densité élevée de courts filaments d'actine adaptée à une Analyse en Particule Isolée.</i>	174
9.2.	<i>Détermination structurale en coloration négative de complexes de formine aux extrémités barbées de filaments d'actine en élongation.</i>	176
9.3.	<i>Modèle du battement de FH2 dans l'état « ouvert » et dimères de formine encerclant le corps des filaments d'actine.</i>	179
9.4.	<i>Étude du complexe extrémité barbée – formine par une approche en cryo-microscopie électronique.</i>	180
9.5.	<i>Formation d'un complexe ternaire Arp2/3-SPIN90-mDia1.</i>	181
9.6.	<i>Conclusion générale.</i>	182
IV.	ANNEXES.	185
V.	BIBLIOGRAPHIE.	187

Remerciements

Je tiens à remercier avant tout pour la réalisation de cette thèse ma bienveillante directrice Aurélie Bertin. C'est elle qui m'a accueilli à bras ouverts au Laboratoire de Physico Chimie Curie. Elle m'a chaperonné, elle m'a formé, elle m'a guidé, elle m'a encouragé et soutenu tout au long de ces quatre années de thèse. Je suis convaincu que c'est son optimisme à toute épreuve, fidèlement incarné par son sourire joyeux, qui m'a permis de garder la lueur d'espoire nécessaire pour mener à bien mon projet de recherche.

Je tiens à remercier dans un second temps Cyntia, car c'est bel et bien par son entremise que j'ai atterri à l'Institut Curie. Mais que serait Cyntia sans son associée Su-Jin, le binôme le plus tonitruant de l'équipe, notamment lorsqu'il est question de séances de karaoké..

Merci à Aurélie D de m'avoir montré ses trucs et astuces en microscopie électronique et d'avoir pris soin des infernales loupes électromagnétiques cracheuses d'électrons qui se terrent au sous-sol du bâtiment. Elles m'ont été bien utiles.

Merci à Manuela pour sa bonne humeur, son sens de l'humour et surtout de ne pas m'avoir éjecté du bureau malgré mon impertinence.

Merci au grand chef Daniel Lévy qui m'a laissé ma place dans l'équipe MMM (&M's ?) et qui nous a fait profiter chaque année de bons repas.

Merci à Eugénio d'avoir répondu à chaque fois à mes détresses Linuesques.

Merci au duo de légende Antoine et Guillaume sans qui le projet CONFORMIN n'aurait pas eu lieu.

Merci à toutes vos questions/conseils/suggestions pertinentes tout au long de ma thèse. Merci par extension aux membres de l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » avec notamment Bérengère, Lu-Yan et Sandy qui ont participé activement à la production de formine et d'actine microlitre par microlitre que j'ai pu consommer litre après litre.

Merci à John de m'avoir mis sur les rails de la sonication, c'est peut-être un détail pour vous mais pour moi ça veut dire beaucoup.

Merci à Narita et Maeda de m'avoir chaleureusement accueilli à Nagoya et d'avoir pris le temps de s'intéresser à mon projet de recherche, tout ça le temps de deux typhons, ce fut un grand honneur.

Enfin, et non des moindres, un grand merci à ma petite famille Isidora **a.k.a** concubine, Lilo **a.k.a** le chat, Mona **a.k.a** le chien. Merci Isidora de m'avoir supporté du début à la fin de ma thèse c'est une belle preuve d'amour, heureusement pour toi la thèse a une fin. Merci à Mona et Lilo d'avoir été mes co-bureaux durant ces longs mois de confinement. Merci à Mona de m'avoir rappelé régulièrement qu'il fallait faire des pauses, merci à Lilo d'avoir systématiquement tenté de déverrouiller mon ordinateur pour que je gagne du temps à chaque retour. Merci à Sylvie ma belle mère préférée. Et pour finir, merci la famille de Bretagne et merci la famille de Lille.

Préambule

Ma thèse a porté sur l'étude d'un des éléments phare du cytosquelette : l'actine. L'actine occupe un rôle fondamental dans les cellules vivantes en assurant de nombreux processus cellulaires tels que la division, la migration ou l'adhésion. Bien que l'actine possède la capacité intrinsèque de nucléer et polymériser spontanément des filaments dans des conditions biochimiques données, la régulation fine de ce comportement est indispensable dans la cellule. Les formines incarnent alors le rôle d'un régulateur clef de l'actine lui permettant de mener à bien ces activités fonctionnelles variées. Ainsi, les formines assemblent rapidement de longs filaments d'actine pour générer des ultra-structures essentielles telles que l'anneau cytokinétique et les fuseaux mitotiques^{1,2,3} pour assurer la division cellulaire, les fibres de stress, les adhésions focales et les filopodes^{2,4,5,6,7} pour permettre l'adhésion et la migration cellulaire. Un dérèglement des formines peut ainsi entraîner de nombreuses pathologies connexes incluant le développement de cancers primaires et/ou de métastases comme dans le cas du cancer du larynx, du cancer du sein, du cancer colorectal ou de la leucémie^{8,9,10,11,12}.

À l'échelle moléculaire, les formines constituent des homodimères capables de poursuivre les extrémités barbées de filaments d'actine en cours d'élongation par une interaction avec leurs domaines FH2^{13,14}. Cette traque de l'extrémité barbée s'accompagne d'une augmentation considérable de la vitesse de polymérisation du filament à travers une stimulation de l'incorporation de nouvelles sous-unités d'actine à ce filament via leurs domaines FH1 (interaction avec la réserve d'actine-profiline en solution)¹⁴.

Bien que les conformations structurales impliquées dans l'activité de la formine n'ont jamais été observées directement, des études semblent suggérer que le dimère de FH2 se déplace pas à pas à l'extrémité barbée polymérisante, à travers un équilibre rapide entre deux états dits "fermé" et "ouvert"^{14,15}. L'alternance entre ces deux états assurerait alors le maintien de la formine au bout barbé tout en permettant l'incorporation de nouvelles sous-unités d'actine.

Le domaine FH1, quant à lui, formerait une chaîne flexible qui, en fixant les unités d'actine-profiline en solution, augmenterait la concentration locale d'actine pour qu'elles soient finalement incorporées sur l'extrémité barbée où sont ancrés les domaines FH2¹⁴.

Cette description simple cependant, ne précise pas les mécanismes d'interactions de la formine à l'extrémité barbée, notamment concernant la nature des états dit « fermé » et « ouvert » et les modalités de transition entre les deux. Deux modèles de type « pas à pas » s'opposaient alors :

la « marche enjambée »^{16, 17} et le « saut enclenché »^{18, 19}. Evaluer la pertinence de ces deux modèles constitue le point de départ de ma thèse.

Au-delà de cette interaction aux extrémités barbées, la capacité singulière de formines à encercler le corps même des filaments d'actine avait également pu être observée pour certains isoformes. La mise en évidence d'un tel mode d'interaction pour la formine mDia1 a ainsi été entreprise durant cette thèse.

En parallèle de ce projet principal, j'ai pu participer à l'étude d'un point de vue structural de l'action synergique de la Formine avec Arp2/3 permise par l'intermédiaire de la protéine Spin90. À cette occasion, j'ai mis en évidence la formation d'un complexe ternaire entre ces trois protéines régulatrices.

L'ensemble de ces travaux a été réalisé par une étude *in vitro* en microscopie électronique. Mon projet de recherche a été réalisé en collaboration étroite avec l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » de Guillaume Romet-Lemonne et Antoine Jégou à l'Institut Jacques Monod. Ils m'ont procuré les protéines essentielles pour mes expériences, de même qu'ils m'ont partagé leurs précieuses connaissances dans le domaine.

I. Introduction.

1. Le cytosquelette et ses acteurs.

Le cytosquelette est un élément pilier de toutes les cellules vivantes. D'un point de vue général, le cytosquelette permet une structuration adaptative de la cellule à son environnement par l'élaboration d'un réseau dynamique interne (**Fig. 1.A**). Ce réseau dynamique est constitué de bio-polymères qui peuvent être divisés en quatre familles : les filaments intermédiaires, les microtubules, l'actine et les septines. Chaque type de filament présente des propriétés structurales, mécaniques, dynamiques et biochimiques qui lui sont propres.

Au travers de ces différents acteurs, le cytosquelette assure de multiples fonctions pour la cellule²⁰. Le cytosquelette régit la répartition d'organites dans le cytosol à l'exemple du noyau cellulaire, du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de golgi. En outre, les filaments d'actine et les microtubules matérialisent un réseau de transport emprunté par des moteurs moléculaires comme la myosine²¹ pour les premiers ou la dynéine et la kinésine²² pour les seconds. Ces moteurs peuvent alors déplacer activement du matériel cellulaire, allant de granules d'insuline dans les cellules β -pancréatiques aux mitochondries dans les axones de neurones.

Le cytosquelette régule également la forme globale de la cellule via des ancrages à la membrane plasmique²³, pouvant être assurés par les moteurs moléculaires sus-cités ou d'autres encore tels que les formines. Finalement, le cytosquelette assure la sensibilité ainsi que la réponse mécanique de la cellule face à des stimuli, en permettant la transmission et la génération de forces^{24,25}.

Cette médiation des forces est optimisée par l'assemblage des filaments du cytosquelette en des ultra-structures dédiées. On trouve ainsi dans la cellule des câbles linéaires et circulaires composés de multiples filaments liés entre eux et orientés ; des réseaux branchés ou réticulés composés de filaments non alignés connectés à travers leurs extrémités ou le corps de leur filament (**Fig 2.B**). Ce panel topologique offre au cytosquelette de multiples configurations mécaniques utiles pour autant de fonctions cellulaires.

De ce fait, l'action du cytosquelette se retrouve à l'origine de processus fondamentaux comme l'adhésion cellulaire²⁷, la migration cellulaire^{26,27,28}, la division cellulaire^{29,30,31}, et l'endocytose^{32,33}. À une plus grande échelle, le cytosquelette des cellules sous-tend l'organisation des tissus ou le développement embryonnaire³⁴.

Ces fonctionnalités pléthoriques attribuées au cytosquelette ne sont rendues possibles que par une régulation spatio-temporelle fine de la polymérisation de ses constituants ainsi que de leur assemblage en ultra-structures^{35,36,37}. Il existe ainsi une myriade de protéines qui interviennent directement auprès du cytosquelette pour orchestrer cette machinerie. Ces protéines permettent la modulation de la dynamique, de la localisation ou des interconnexions des quatre acteurs du cytosquelette. L'ensemble combiné des membres du cytosquelette et de leurs protéines régulatrices encode la capacité adaptative des cellules à leur environnement.

Dans un cas extrême comme chez *Physarum Polycephalum*, être vivant unicellulaire, le cytosquelette peut apparaître comme le premier support à l'origine d'un comportement dit « intelligent » en permettant la transduction, la transmission et la structuration des flux d'informations³⁸. Dans un autre sens et malheureusement d'une façon plus tangible pour l'homme, la dérégulation du cytosquelette est à l'origine de nombreuses maladies chez les êtres vivants³⁹ comme certaines maladies neurodégénératives, cardiovasculaires, ou bien le développement de certains cancers.

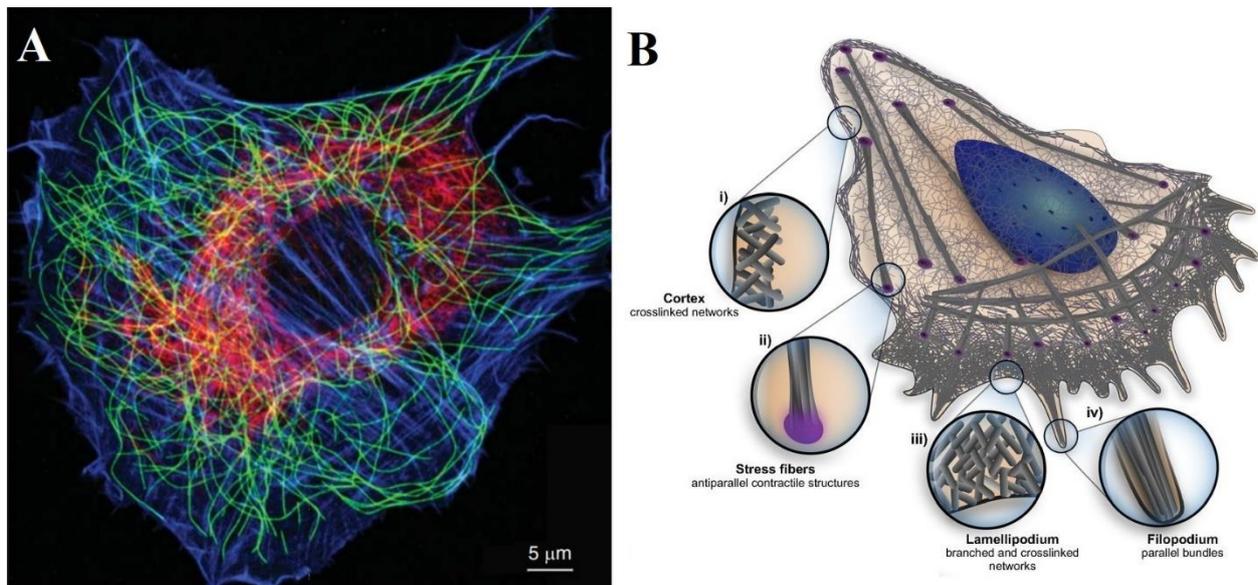


Figure 1 – A. Image colorisée d'un fibroblaste observé en microscopie de fluorescence. Phalloïdine anti F-actine (bleu), Anticorps anti-microtubule (vert), Filaments intermédiaires (rouge) (Pollard et Goldman, 2018). B. Représentation schématique d'une cellule exhibant différents types d'assemblage du cytosquelette (Blanchoin et al., 2014).

Comprendre précisément le fonctionnement du cytosquelette, sa dynamique et sa régulation reste donc de nos jours d'un intérêt et d'un enjeu majeur. Ces caractéristiques sont encodées en partie au sein même de la structure fine de chacun des composants du cytosquelette et de leurs partenaires. En effet, c'est de ces entités fondamentales et de leurs interactions qu'émergent les processus complexes indispensable au vivant. Dans ce contexte, décortiquer au mieux leurs

propriétés structurelles pour en saisir leurs comportements dynamiques et leurs qualités interactionnelles apparaît être une approche scientifique incontournable.

1.1. Les microfilaments d'actine.

Un acteur des plus dynamiques du cytosquelette est l'actine. L'actine est le composant du cytosquelette phare de ma thèse. C'est sur lui que mes travaux de recherche ont été focalisés durant ces années d'exploration.

Découvert en 1942 dans le laboratoire de Albert Szent-Györgyi⁴⁰, l'actine est une protéine ubiquitaire des cellules eucaryotes. Elle est présente en quantité importante dans les cellules de telle sorte qu'elle peut atteindre jusqu'à 20% de la masse des cellules musculaires⁴¹.

L'actine en solution, nommée G-actine pour « actine globulaire », est capable dans certaines conditions biochimiques de polymériser sous la forme de filaments, une propriété connue depuis 1943⁴⁰. On parle alors de F-actine pour actine fibrillaire.

Ces filaments d'actine dans le cytoplasme et le noyau sont engagés dans des assemblages variés. On observe ainsi des réseaux branchés comme dans le cas des lamellipodes où les filaments d'actine sont connectés entre eux par les protéines Arp2/3, une extrémité pointue d'un filament étant connectée au corps d'un autre filament. Ces lamellipodes permettent le mouvement cellulaire qui s'opère via un assemblage du réseau contre la membrane plasmique accompagné d'un désassemblage du même réseau en amont^{42,43}.

On observe de même des réseaux complexes comme dans le cas du cortex cellulaire sur la surface interne des cellules où des filaments d'actine sont parfois interconnectés par des protéines comme les fascines ou les myosines. Le cortex cellulaire contrôle la forme des cellules ainsi que la morphogenèse des tissus³⁰.

D'autre part on observe également dans la cellule des faisceaux linéaires de filaments d'actine antiparallèles comme dans les fibres de stress. Les filaments y sont interconnectés par les protéines moteurs de myosine qui leur confèrent une propriété contractile. Les fibres de stress participent ainsi à l'adhésion et la migration des cellules⁴³.

On observe aussi des faisceaux linéaires parallèles de filaments d'actine comme dans les filopodes. Dans ces assemblages, les filaments d'actine sont interconnectés entre eux en faisceaux par des protéines telle que la fascine. Les extrémités barbées quant à elles, sont ancrées à la membrane plasmique par des protéines coiffantes comme la formine. Les faisceaux de filaments

pointent ainsi orthogonalement à la membrane plasmique. Cette configuration permet la génération de protrusions cytoplasmiques depuis le cortex cellulaire. Les filopodes permettent ainsi aux cellules de sonder leur environnement, avec un rôle notable dans les interactions inter-cellulaires, de même que dans la migration cellulaire⁴⁴.

On observe enfin des structures annulaires composées de filaments d'actine interconnectés entre eux par des myosines dans un contexte de cytokinèse. Cette composition permet la constriction d'un anneau contractile d'actine qui remodèle la membrane plasmique. Pour ce faire, l'anneau contractile doit être directement ancré à la membrane plasmique. L'une des protéines jouant un rôle important pour cette fonction est la septine, 4^e acteur du cytosquelette⁴⁵.

À l'échelle moléculaire, l'actine est une protéine globulaire de 42 kDa dont la structure a pu être déterminée une première fois en 1990 par Kenneth C. Holmes en diffraction des rayons X⁴⁶. L'actine se divise en deux domaines principaux : le « petit domaine » et le « grand domaine » en référence à leur dimension respective et à l'existence de deux sillons opposés les délimitant. L'actine peut également être vue comme 4 sous-domaines où les sous-domaines 1 et 2 correspondent au petit domaine tandis que les sous-domaines 3 et 4 correspondent au grand domaine (**Fig. 2.A**). Le sillon situé entre les sous-domaines 2 et 4 accueille un nucléotide d'adénosine lié à un dication de calcium ou de magnésium. Sans nucléotide fixé, l'actine se dénature rapidement. De l'autre côté, le sillon situé entre les sous-domaines 1 et 3 est un site d'interaction pour de nombreuses protéines de liaison à l'actine^{47,48}.

En solution, l'actine s'assemble sous la forme d'une hélice d'environ 7 nm de diamètre (**Fig. 2.B-C**). Cette structure a pu être élucidée par Holmes, Wolfgang et leurs collègues, en 1990, par diffraction des rayons X sur fibres alignées⁴⁹. Le filament est caractérisé par une hélice simple présentant 13 sous-unités d'actine qui se répètent quasi exactement après 6 tours gauches de $166,7^\circ$ ⁴⁸ (**Fig. 2.B**). Il a cependant été montré qu'il existait un polymorphisme structural concernant cette structure du filament d'actine avec une torsion qui peut varier de plusieurs degrés⁵⁰ et des structures secondaires qui peuvent adopter différents états^{51,52}. Le pas angulaire repère de $166,7^\circ$ relativement proche de 180° permet également de voir le filament d'actine comme une double hélice droite dans laquelle deux brins s'enroulent lentement l'un sur l'autre avec un pas long de 36 nm. On parle alors d'interaction intra-brin pour qualifier des interactions entre des sous-unités d'un même brin ou bien d'interaction inter-brin pour qualifier des interactions entre sous-unités d'actine issues des deux brins. Les interactions intra-brin se caractérisent notamment par une boucle (D-loop) du sous-domaine 2 qui s'intercale dans le sillon hydrophobe situé entre les sous-domaines 3 et 1 de la sous-unité d'actine voisine (**Fig. 2.D, gauche**). Les

interactions inter-brins se caractérisent par une interaction à trois domaines localisés à l'intersection entre les sous-unités n , $n+2$ d'un brin et la sous unité $n+1$ du second brin (**Fig. 2.D, droite**).

Le filament d'actine possède une longueur de persistance de l'ordre de $10 \mu\text{m}^{53,54}$, entre celles des microtubules et des filaments intermédiaires. Ce filament est polarisé, avec les sous-domaines 2 et 4 pointant vers l'extrémité négative ou bout pointu, et les sous-domaines 1 et 3 pointant vers l'extrémité positive ou bout barbé.

La dynamique des filaments d'actine est régie par une activité catalytique d'hydrolyse d'ATP qui permet à terme de polariser l'élongation des filaments⁵⁵. Ce processus se traduit par une

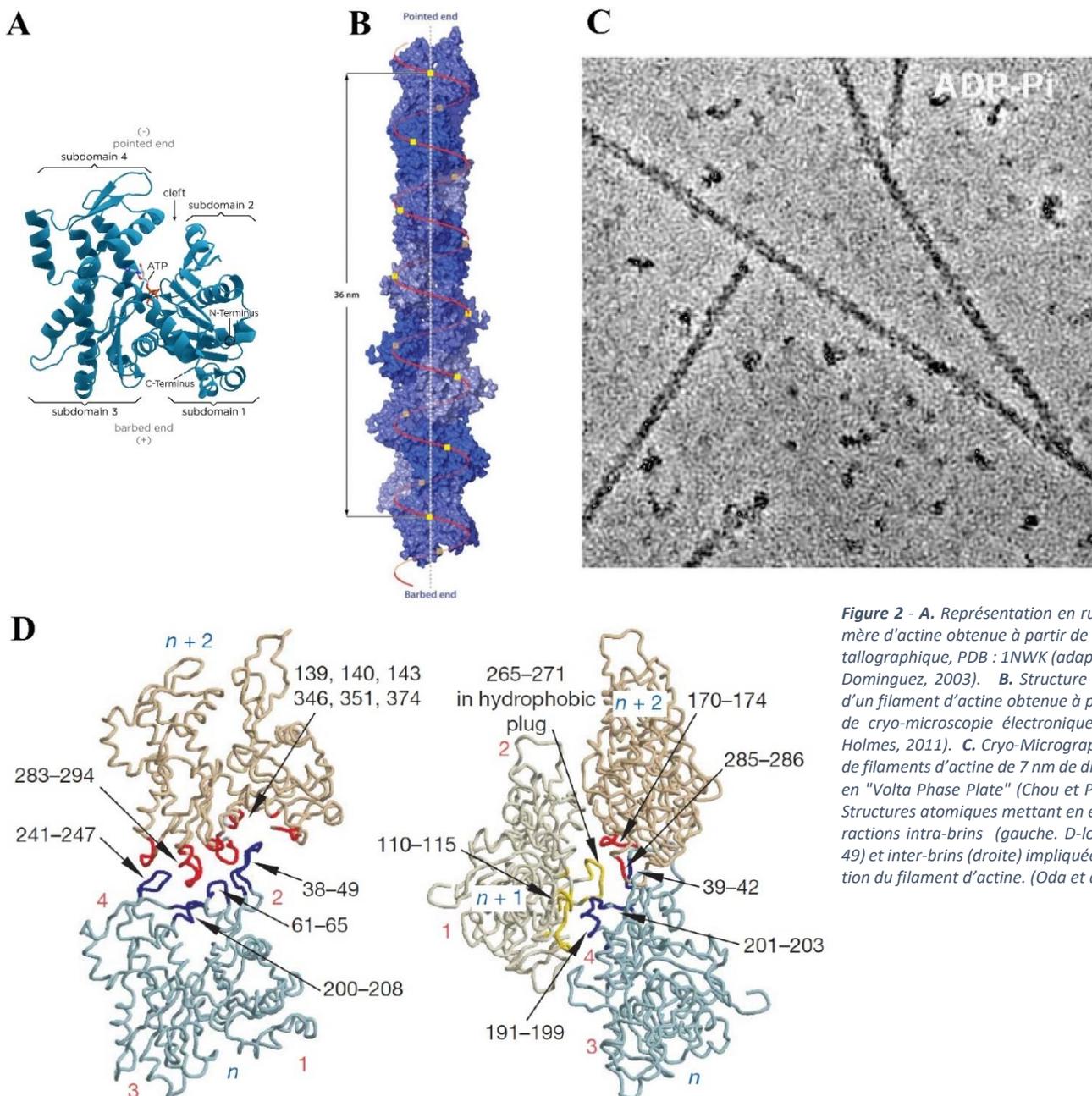


Figure 2 - A. Représentation en ruban d'un monomère d'actine obtenue à partir de sa structure cristallographique, PDB : 1NWK (adapté de Graceffa et Dominguez, 2003). B. Structure en double hélice d'un filament d'actine obtenue à partir de données de cryo-microscopie électronique (Dominguez et Holmes, 2011). C. Cryo-Micrographie électronique de filaments d'actine de 7 nm de diamètre observés en "Volta Phase Plate" (Chou et Pollard, 2019). D. Structures atomiques mettant en évidence les interactions intra-brins (gauche. D-loop, résidus : 38-49) et inter-brins (droite) impliquées dans la formation du filament d'actine. (Oda et al. 2009).

polymérisation aux extrémités barbées couplée avec une dépolymérisation aux extrémités pointues. On parle du phénomène dit de « tapis roulant »⁵⁶. Ce mécanisme clef de la dynamique de l'actine est au cœur de multiples processus cellulaires⁴³ et sera décrit plus en détail dans la section 2.1.

1.2. Les microtubules.

Les microtubules sont des filaments tubulaires du cytosquelette et, comme l'actine, elles sont dynamiques. Grâce à la microscopie électronique, ces structures filamenteuses atypiques ont pu être observées au sein des cellules dès les années 50, notamment chez les plantes par Irene Manton et Brian Clarke en 1952 et chez les animaux par Don Fawcett et Keith Porter en 1954⁵⁷.

D'un point de vue de l'organisation intracellulaire, le réseau de microtubules dans le cytoplasme des cellules non-différenciées est centralisé par le centrosome : centre cellulaire organisateur des microtubules (MOTC). C'est de cette structure située généralement à proximité du noyau que de nombreuses microtubules sont nucléées. Lors de la différenciation cellulaire, cette centralisation par le MOTC est remplacée par d'autres modes d'organisation spécifiques à chaque type de cellule. On trouve ainsi des réseaux apico-basaux dans les cellules épithéliales simples, des réseaux corticaux dans les cellules épithéliales stratifiées ou des réseaux longitudinaux dans les myoblastes fusionnés⁵⁸.

Les assemblages de microtubules dans la cellule peuvent donner naissance à des structures très actives comme les fuseaux mitotiques lors de la division cellulaire ou les axonèmes des flagelles et des cils pour la motilité cellulaire⁵⁹.

À l'échelle moléculaire, les microtubules sont constituées d'une protéine globulaire : la tubuline. La tubuline a été purifiée pour la première fois en 1967 par le groupe de Taylor via une contribution significative de Bosley⁶⁰. La tubuline forme alors en solution un hétérodimère composé de deux protéines globulaires : la tubuline α et la tubuline β d'approximativement 50 kDa chacune (**Fig. 3.A**). En 1998, la première structure d'un dimère de tubuline était obtenue par cristallographie électronique⁶¹. Ces hétérodimères de 8 nm de long s'associent longitudinalement sous la forme de protofilaments qui interagissent latéralement pour constituer un tube protéique d'un diamètre externe de 25 nm et d'un diamètre interne de 15 nm (**Fig. 3.B-C**). Une

microtubule se compose généralement de 13 protofilaments. Des données structurales concernant cet arrangement avait déjà pu être obtenues dès les années 70 par des observations en microscopie électronique⁵⁷. Le filament généré est polarisé avec des tubulines α qui pointent à l'extrémité dite négative et les tubulines β qui recouvrent l'extrémité dite positive. Il existe d'autres familles de tubulines (γ , δ , ϵ , ζ) jouant un rôle dans la nucléation ou l'organisation des centrioles.

La géométrie remarquable des microtubules implique que chaque hétérodimère au cœur d'un filament est en étroite interaction au minimum avec quatre partenaires (2 interactions longitudinales, 2 interactions latérales), ce qui participe vraisemblablement à la rigidité des microtubules, supplantant celles des autres filaments du cytosquelette. La longueur de persistance peut ainsi atteindre 1 à 8 μm pour les microtubules les plus longues⁵³.

Les microtubules sont également des filaments dynamiques, principalement à leur extrémité positive où sont exposées les tubulines β ⁵⁹. Comme les tubulines α , les tubulines β ont la capacité de fixer un GTP (guanosine triphosphate), mais contrairement aux premières, elles peuvent également catalyser son hydrolyse. Néanmoins, la capacité d'un hétérodimère libre d'hydrolyser son GTP reste limitée. Cette activité enzymatique est stimulée une fois l'hétérodimère polymérisé. En outre, les tubulines en solution liées à des GTP ont une plus grande affinité avec l'extrémité du filament. Ces caractéristiques impliquent la formation d'une coiffe de GTP-tubulines à l'extrémité positive des microtubules où des GTP-tubulines sont fraîchement ajoutées, suivie de tubulines globalement fixées par des GDP (guanosines diphosphates) dans le reste de la structure. L'existence et la taille de la coiffe de GTP-tubuline dépend de la vitesse d'élongation du filament. Si celle-ci est trop faible, les GTP-tubulines nouvellement incorporées sont hydrolysées avant que d'autres tubulines fraîches ne soient ajoutées. Or, l'hydrolyse du nucléotide d'une tubuline s'accompagne de changements conformationnels qui influent sur la stabilité du filament. Ce processus serait à l'origine des événements dits « catastrophes » au cours desquels les microtubules dépolymérisent rapidement depuis leur extrémité positive. Certains suggèrent que ce phénomène brusque s'appuie sur une forte interdépendance de l'état (nucléotidique/structural) entre hétérodimères voisins. Ce couplage entre voisins serait alors à l'origine de réactions en chaînes dont découlent les « événements catastrophes ». Dans la cellule, cette dynamique chaotique est fermement contrôlée par les « protéines d'association aux microtubules » (MAP) qui peuvent la promouvoir ou l'inhiber^{59,62}.

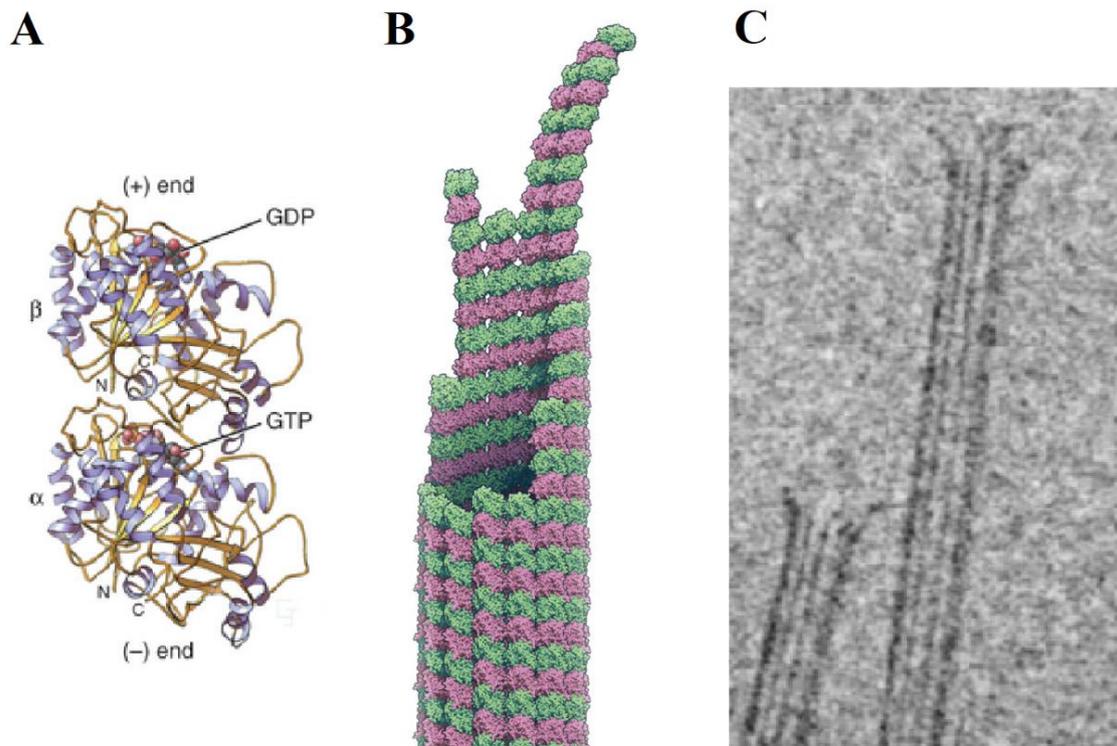


Figure 3 – **A.** Représentation en ruban d'un hétérodimère de tubuline de 8 nm de long (Pollard et Goldman, 2018). **B.** Modèle d'une microtubule en élongation (Brouhard et Rice, 2018). **C.** Cryo-Micrographie électronique de microtubules de 25 nm de diamètre (adapté de Jánosi, Chrétien et Flyvbjerg, 2002).

1.3. Les filaments intermédiaires.

Les filaments intermédiaires sont des structures filamentaires observables dans les cellules métazoaires⁶³. La kératine, constituant les cheveux en est un exemple emblématique. Cette protéine a été l'objet de nombreuses recherches depuis plus d'un siècle. Les premières informations structurales fines la concernant ont été obtenues grâce à des données de diffraction de rayons X par William T Astbury en 1932. L'avènement de la microscopie électronique a ensuite permis l'observation directe de filaments intermédiaires dans les cellules. C'est en 1968 que Holtzer et ses collègues identifient distinctement ces filaments dont le diamètre est intermédiaire entre celui de l'actine et celui des microtubules. D'autres recherches de biochimie et de biologie structurale ont permis par la suite d'étayer nos connaissances concernant cette famille importante du cytosquelette⁶⁴.

D'un point de vue général, les filaments intermédiaires forment dans la cellule un réseau qui s'étend de la membrane plasmique jusqu'au noyau. Certains filaments intermédiaires, comme la lamine, sont localisés dans le noyau même des cellules, participant à un maillage qui recouvre la membrane nucléaire interne : la lamina. Les filaments intermédiaires fournissent ainsi un support mécanique à la cellule tout en ancrant le noyau de celle-ci. Capables de s'associer aux microfilaments d'actine et aux microtubules, les filaments intermédiaires constitueraient un échafaudage permettant de moduler la transmission des signaux mécaniques au sein de la cellule.^{63,65,66}

On distingue 6 types de polypeptide à l'origine des filaments intermédiaires. Ces polypeptides sont regroupés selon leurs similarités de séquence et de structure. La nature des filaments intermédiaires varie beaucoup d'un type de cellule à l'autre avec par exemple une présence de vimentine dans les fibroblastes, de cytokératine dans les cellules épithéliales ou bien de desmine dans les cellules musculaires. La lamine située dans le noyau cellulaire, elle, est ubiquitaire. La composition structurale globale de ces polypeptides ainsi que leur principe d'assemblage en filament restent conservés. À l'origine d'un filament intermédiaire se trouve une protéine fibreuse d'environ 50 kDa et capable de dimériser (**Fig. 4.A**). Le dimère formé est constitué d'une succession d'hélices alpha assemblées en superhélices (domaines « coiled coil ») et séparées par des connecteurs flexibles. Ce dimère arbore à ses deux extrémités des domaines globalement non structurés appelés « queue » et « tête », très variables d'un polypeptide à l'autre. Deux dimères peuvent ensuite s'associer en quinconce dans un mode semi-étagé pour générer un complexe tétramérique dont le cœur structuré mesure environ 48 nm de long (**Fig. 4.A**). Le tétramère constitue la brique fondamentale des filaments intermédiaires. Ces tétramères s'assemblent latéralement puis longitudinalement pour former des filaments intermédiaires matures dont le diamètre final varie autour de 10 nm (**Fig. 4.B-C**).^{65,66}

La structure caractéristique du polypeptide ainsi que le principe d'assemblage confèrent aux filaments intermédiaires des propriétés mécaniques singulières. Les filaments intermédiaires sont apolaires, moins dynamiques que les autres membres du cytosquelette, très extensibles, et flexibles avec une longueur de persistance de l'ordre de 0.2 μm à 1 μm .⁶⁷

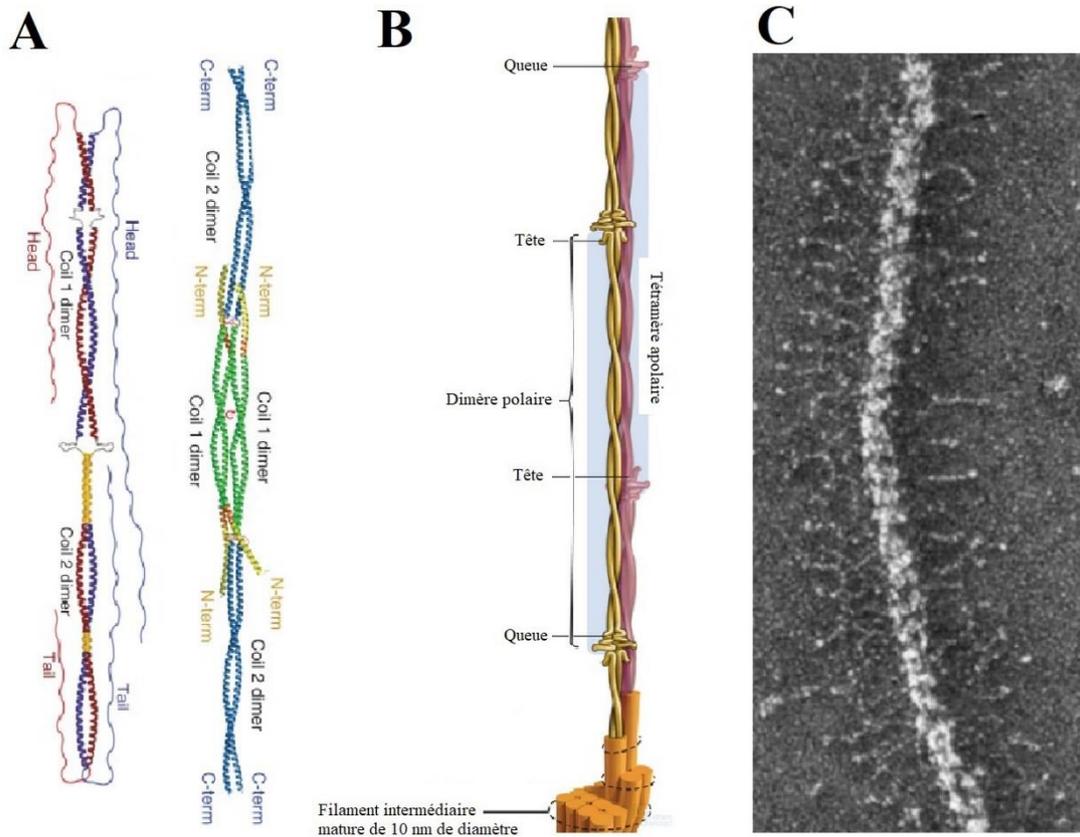


Figure 4 – A. Gauche, Structure atomique d'un homodimère de kératine. Droite, Structure moléculaire d'un tétramère de vimentine (adapté de Hermann et Aebi, 2016) B. Représentation schématique de la constitution d'un filament intermédiaire mature (adapté de Steinhert, Marekov et David, 1993). C. Micrographie électronique d'un neurofilament de 10 nm de diamètre traité par ombrage (adapté de Herrmann, Kreplak et Aebi, 2004).

1.4. Les filaments de septine.

Les septines, souvent oubliées, constituent le dernier composant du cytosquelette à avoir été observé. Cette observation a été réalisée par microscopie électronique, en 1976, par Byers et Goetsch sur le cou bourgeonnant d'une cellule en division⁶⁸. Les filaments de septine forment alors un anneau épousant ce cou bourgeonnant. Les septines interagissent directement avec les phospholipides ce qui leur permet de polymériser dans le plan de la membrane plasmique. La membrane plasmique apparaît alors comme un support facilitant la polymérisation des septines en des assemblages ordonnés. Inversement, les septines polymérisées sur la membrane, influencent sa géométrie et ses propriétés mécaniques^{69,70}.

Ainsi, les filaments de septine en tant que composant du cytosquelette capable de s'associer directement avec la membrane plasmique sont impliqués dans de multiples fonctions cellulaires. Les septines participent à l'établissement d'une rigidité membranaire tout en remodelant la forme de la cellule. Elles interviennent dans l'endocytose et la fusion de vésicules.

Leur organisation dans la membrane est exploitée par des protéines tierces comme échafaudage régulant leur localisation. Elles jouent alors le rôle de barrière de diffusion contribuant à la compartimentalisation cellulaire. Les septines interviennent également dans la motilité cellulaire avec une participation active dans les fibres de stress en association avec les microfilaments d'actine. Enfin les septines, toujours via une interaction étroite avec les microfilaments d'actine participent activement à la cytokinèse^{45,69,71}. Cependant, les microfilaments d'actine ne constituent pas l'unique partenaire du cytosquelette pour les septines. Des études montrent également une co-localisation importante des septines avec les microtubules dans la cellule. Les septines et les microtubules apparaissent co-localisées par exemple dans les fuseaux mitotiques lors de la mitose cellulaire, ou bien dans les axones de neurones au cours de leur croissance^{72,71}.

À l'échelle de la protéine, une septine se décompose en plusieurs domaines dont l'ensemble fait 30 à 65 kDa (**Fig. 5.A**). On distingue un domaine de liaison de GTP, un N-terminal riche en proline, un domaine de liaison aux lipides polybasiques et, chez les Opisthocontes, un C-terminal arrangé en superhélice (coiled coil)⁷¹. Chez l'humain, il existe 13 septines différentes divisées en quatre groupes homologues. Des septines de différents groupes peuvent s'assembler en des séquences linéaires palindromiques qui forment des oligomères de quatre, six ou huit septines (**Fig. 5.B**). Ces oligomères constituent l'unité canonique de structures plus complexes. La présence d'un nucléotide de guanine dans le domaine de liaison influe sur la stabilité des oligomères. La plupart des septines assemblées, sont en outre capables d'hydrolyser leur nucléotide lié. Cependant, lorsque c'est le cas, l'activité enzymatique mesurée est lente. Contrairement à l'actine ou la tubuline, l'intérêt biologique d'une telle activité enzymatique demeure peu comprise à ce jour⁷³. Le plan d'assemblage particulier des septines confère aux oligomères leur caractère apolaire.

Ces oligomères peuvent s'agencer sous la forme d'assemblages élaborés tels que des filaments simples, des paires de filaments (**Fig. 5.C**), des feuillettes ou des anneaux pour finalement s'intégrer dans des ultra-structures fonctionnelles.⁷⁴

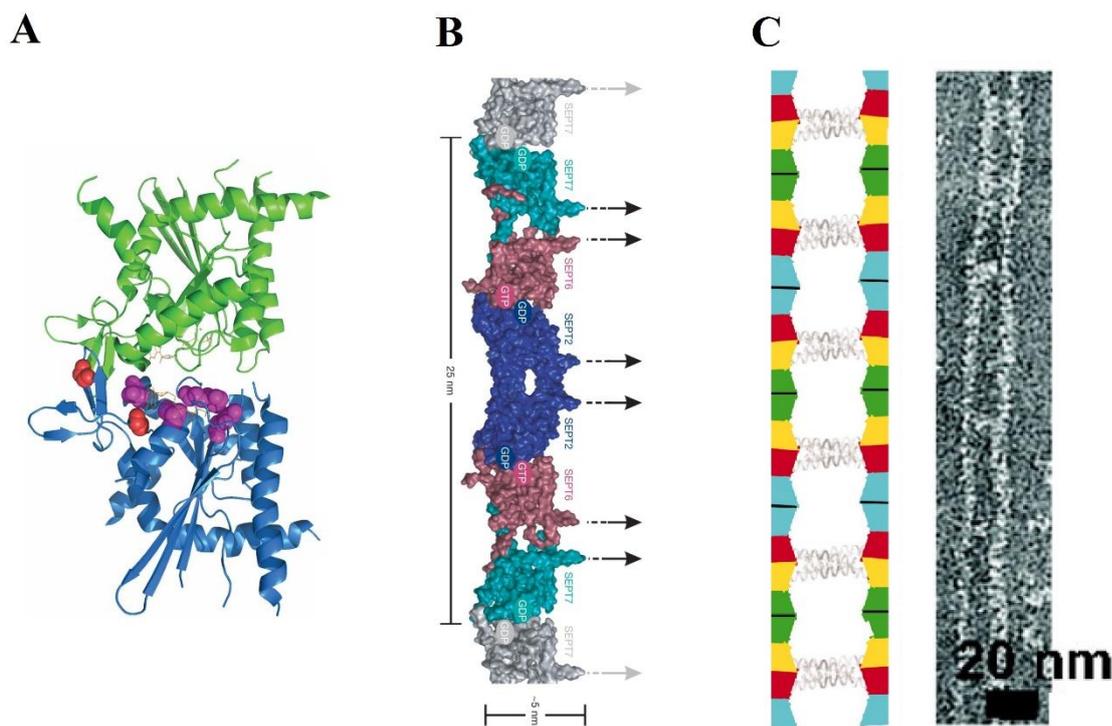


Figure 5 - A. Représentation structurale d'un homodimère de septine 2 humaine (adapté de Andrew D. Weems et al., 2014). **B.** Représentation surfacique d'un hexamère de septine. (adapté de Sirajuddin et al., 2007) **C.** Gauche, schéma d'une paire de filaments de septine de levure. Droite, Micrographie d'une paire de filaments de septine de levure observé en coloration négative (adapté de Bertin et al. 2008)

1.5. Le cytosquelette, une machinerie à décortiquer.

De ce tableau dépeignant les quatre acteurs du cytosquelette, on perçoit la diversité structurale qui est à l'origine de propriétés individuelles singulières, que ce soit d'un point de vue mécanique ou dynamique.

Chacun des acteurs du cytosquelette s'inscrit néanmoins dans un concert coordonné à l'origine des multiples processus fonctionnels pour la cellule. Cette dynamique collective est rendue possible par des propriétés intrinsèques complémentaires pouvant se conjuguer directement ou, indirectement via l'intermédiaire de diverses protéines régulatrices. On peut ainsi citer l'interaction directe existant entre la « queue » des vimentines et l'actine⁶⁶ ou bien l'affinité intrinsèque des filaments d'actine avec les septines⁷⁵. On peut également noter l'existence de protéines régulatrices capables de cibler simultanément plusieurs membres du cytosquelette. On retrouve par exemple l'anniline qui participe à l'interconnexion des septines, de l'actine et des microtubules dans l'anneau contractile de la division cellulaire⁷⁶. On peut également citer la myosine X et la dynéine corticale qui interconnectent activement les microtubules et les fila-

ments d'actine des fuseaux mitotiques⁷⁶. On notera enfin les nesprines qui associent durablement les filaments d'actine à la lamine nucléaire⁷⁷. Le cytosquelette au sein de la cellule se trouve donc largement unifié.

Avoir une connaissance pointue sur le comportement d'un acteur du cytosquelette ou d'une protéine régulatrice permet de mettre la lumière sur un rouage de cette machinerie complexe.

Au cours de ma thèse je me suis intéressé en particulier à l'actine et sa régulation par la formine d'un point de vue structurale. La connaissance déjà accumulée sur ces deux protéines complémentaires est vaste. Dans les deux chapitres suivant je tâcherai d'en exposer les informations les plus pertinentes dans le cadre de mes travaux.

2. L'actine, une protéine pivot.

2.1. La dynamique intrinsèque de l'actine.

L'actine est un polymère, ainsi elle existe sous une forme désassemblée ou assemblée. Cette polymérisation des filaments d'actine à partir de monomères dépend des conditions biochimiques en solution et notamment de la force ionique. En effet, les monomères d'actine à pH physiologique ont une charge nette négative⁷⁸. Ainsi, à basse force ionique, ils exercent les uns sur les autres une force électrostatique répulsive qui prévient l'amorçage de toute polymérisation. Lorsque la force ionique en solution augmente comme avec l'ajout de sel, la charge des monomères se retrouve écrantée. La force attractive exercée entre les structures des monomères supplante ainsi la force répulsive permettant la formation d'oligomères à l'origine de la polymérisation.

La cinétique de polymérisation des filaments d'actine a été étudiée depuis des décennies à travers différentes expériences incluant des mesures de viscosité⁷⁹, des mesures de fluorescence⁸⁰ ou des observations en microscopie électronique⁸¹. Dans le premier cas, la viscosité d'une solution d'actine est fonction de la proportion de polymères contenue en solution ce qui permet de suivre l'évolution de la polymérisation à travers la mesure de cette viscosité. Dans le second cas, les monomères d'actine sont fusionnés avec des fluorophores de pyrène dont la fluorescence augmente significativement lorsque ces derniers sont intégrés dans l'environnement biochimique des filaments. Une mesure de la fluorescence au cours du temps permet alors d'évaluer la progression de l'assemblage des filaments. Dans le dernier cas, la résolution de la microscopie électronique permet une mesure directe de la taille des filaments. La fixation et la

caractérisation de fractions prélevées à différents temps d'un échantillon d'actine en polymérisation permet d'identifier les constantes cinétiques de la polymérisation des filaments d'actine. Trois phases ont ainsi été mises en évidence pour décrire la polymérisation de l'actine : une phase de **nucléation**, une phase d'**élongation** et une **phase stationnaire**.

A. Nucléation.

La phase de nucléation correspond à la formation d'un oligomère d'actine, point de départ pour l'élongation d'un filament. En solution, les monomères d'actine diffusent et entrent aléatoirement en contact engendrant la formation ponctuelle de dimères instables. Les dimères dont les sous-unités sont correctement orientées peuvent poursuivre l'oligomérisation avec l'intégration de nouveaux monomères jusqu'à la formation d'un tétramère. Le tétramère constitue alors l'oligomère intermédiaire le moins stable avec une existence transitoire dans le processus de polymérisation. On parle de noyau de nucléation⁸². L'ajout d'un cinquième monomère stabilise l'assemblage et amorce l'élongation du filament nouvellement nucléé. Cette étape de nucléation est énergétiquement défavorable car elle nécessite la mise en contact de plusieurs monomères s'additionnant à travers des intermédiaires instables. La réussite du processus de nucléation dépend donc de la probabilité qu'un intermédiaire instable incorpore un nouveau monomère avant sa propre dissociation et ceci jusqu'à l'initiation de l'élongation à partir d'un tétramère. Cette probabilité augmente avec la concentration de monomère en solution en démultipliant la fréquence des interactions⁸².

B. Élongation.

La phase de nucléation lente est suivie d'une phase d'élongation rapide des filaments d'actine. Le filament d'actine étant polarisé, il présente à ses extrémités pointue et barbée des caractéristiques biochimiques et structurales différentes⁸³. Cette différence se traduit par un échange plus dynamique de monomères entre le filament et la solution à l'extrémité barbée qu'à l'extrémité pointue⁸⁴.

La dynamique à une extrémité est caractérisée par sa constante cinétique de dissociation k_{off} et sa constante cinétique d'assemblage k_{on} . Le rapport entre ces deux constantes donne une concentration critique d'assemblage. Si la concentration d'actine en solution est supérieure à cette concentration critique, l'extrémité polymérise. Si la concentration d'actine en solution est inférieure à cette concentration critique, l'extrémité dépolymérise. On relève d'après « Fujiwara et al., 2007 »⁸⁴ les valeurs suivantes :

À l'extrémité barbée en présence d'ATP :

$$k_{on}^{B,ATP} = 11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ et } k_{off}^{B,ATP} = 1.4 \text{ s}^{-1} \text{ d'où } C_{critique}^{B,ATP} = 0.12 \mu\text{M}$$

À l'extrémité pointue en présence d'ATP :

$$k_{on}^{P,ATP} = 1.3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1} \text{ et } k_{off}^{P,ATP} = 0.8 \text{ d'où } C_{critique}^{P,ATP} = 0.6 \mu\text{M}$$

Malgré une dynamique différenciée au bout barbé et au bout pointu, avec un taux d'assemblage d'un ordre de grandeur supérieur pour le bout barbé, les concentrations critiques d'assemblage observées restent similaires. Cette quasi-symétrie est remplacée au profit d'une asymétrie marquée grâce à l'hydrolyse de l'ATP qui s'opère au cours de la polymérisation.

C. Phase stationnaire et processus du « tapis roulant ».

Lors de la polymérisation, la structure d'un monomère d'actine nouvellement incorporé dans un filament subit des changements conformationnels. Ils se traduisent notamment par une rotation de 20° du petit domaine du monomère d'actine par rapport au grand domaine rendant la protéine plus plate^{85,86}. Ces changements de conformation stimulent l'hydrolyse d'un potentiel ATP lié dans la poche d'interaction de l'actine⁸⁷. Le taux d'hydrolyse monte alors à $1/3.3 \text{ s}^{-1}$ alors que pour la G-actine en solution il est limité à $1/4510 \text{ s}^{-1}$ ⁵⁵. Ainsi, chaque monomère d'ATP-actine incorporé dans un filament subit un cycle d'hydrolyse (**Fig. 6**). Le passage de l'ATP-actine à l'ADP-actine se fait par un état intermédiaire ADP-Pi-actine pour lequel le phosphate hydrolysé reste piégé dans la poche d'interaction de l'actine. Le taux de relargage du phosphate piégé sous la forme ADP-Pi-actine est 100 fois inférieur au taux d'hydrolyse d'une sous-unité ATP-F-actine⁵⁵. Ainsi, les filaments fraîchement polymérisés (quelques secondes) à partir d'ATP-actine restent principalement constitués d'ATP actine. Au-delà de ce temps, les filaments sont principalement constitués d'ADP-Pi actine. Enfin, les filaments vieux de plusieurs minutes sont principalement constitués d'ADP-actine. L'état nucléotidique du filament joue ainsi le rôle d'une horloge interne.

La différence structurale entre les bouts pointus et les bouts barbés engendre une dynamique différenciée de ces extrémités, avec un échange de monomères plus important aux extrémités barbées (Cf k_{on} , k_{off})⁸³. Cette caractéristique entraîne, après quelques minutes de polymérisation, la formation d'une coiffe d'ATP-actine aux bouts barbés des filaments tandis que les bouts pointus sont composés principalement d'ADP-actine. Or, la transition de l'ATP-actine vers de

l'ADP-actine entraîne des changements conformationnels qui affaiblissent les interactions intra-filaments. En ce sens, Stephan Raunser et ses collègues proposent que cette déstabilisation découle de la propension réduite de la D-loop d'une sous-unité d'ADP-actine à former une poche hydrophobe (état ouvert) capable de piéger la queue C-terminale de sa sous-unité voisine (**Fig. 6**)^{86,88}.

Il en résulte une nette différence entre la concentration critique d'assemblage des monomères au bout barbé composé d'ATP-actine et au bout pointu composé d'ADP-actine, la dernière devenant bien supérieure à la première^{89,84}.

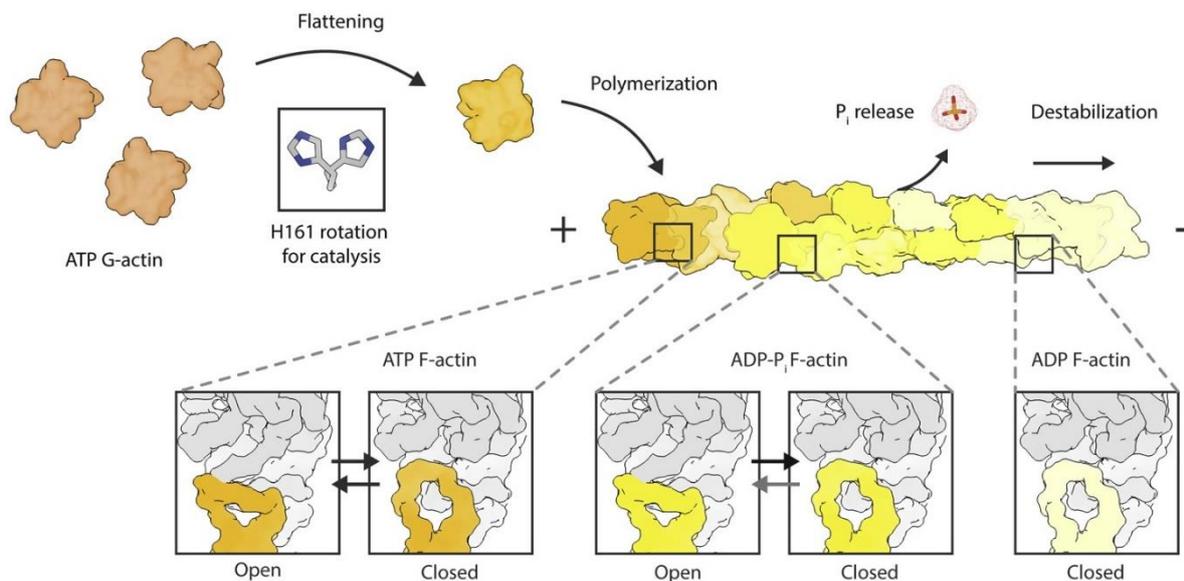


Figure 6 – Représentation schématique de la catalyse de l'hydrolyse lors de l'incorporation d'un monomère ATP-actine dans un filament et du changement structural qui l'accompagne entraînant la déstabilisation de ce même filament. (Merino et al., 2019)

Ainsi, lors de la polymérisation d'actine en solution, partant d'une concentration initiale d'ATP-actine libre supérieure aux deux concentrations critiques, un phénomène singulier se met en place. Au fur et à mesure que de l'ATP-actine libre en solution est consommée pour nucléer puis allonger des filaments et que le cycle d'hydrolyse s'opère, la concentration d'actine monomérique disponible diminue jusqu'à être inférieure à la concentration critique d'assemblage des bouts pointus d'ADP-actine. On a ainsi une dépolymérisation des filaments d'actine aux extrémités pointues. Comme cette concentration critique d'assemblage aux bouts pointus est supérieure à la concentration critique d'assemblage aux bouts barbés, toujours composés d'ATP-actine, la concentration d'actine libre disponible en solution reste supérieure à la concentration critique d'assemblage des extrémités barbées. Ainsi, en parallèle de la dépolymérisation des filaments aux bouts pointus, ces mêmes filaments continuent de polymériser à leurs extrémités barbées. On a donc un équilibre qui se forme entre les extrémités pointues dépolymérisantes et les extrémités barbées polymérisantes. Cet état correspond à un état stationnaire

du système pour lequel la taille globale des filaments ne change pas et la concentration monomérique d'actine est maintenue aux alentours de $0.15 \mu\text{M}$ ⁸⁹. On parle alors du phénomène de « tapis roulant »⁵⁶. Il a été mis en évidence que le principe du tapis roulant, mis en action par des protéines régulatrices, est à l'origine de la motilité induite par les réseaux branchés des lamellipodes^{43,90}.

Dans la cellule, ce mécanisme élégant par lequel l'hydrolyse de l'ATP polarise la polymérisation des filaments, se complexifie avec l'interaction de nombreuses protéines de liaison à l'actine.

2.2. Diversité biochimique de l'actine.

A. Génétique et modifications post-traductionnelles.

La disparité génétique de l'actine entre eukaryotes est très modérée avec une divergence qui reste inférieure à 10% entre la levure et l'homme⁸⁸. Néanmoins, de légères modifications de la composition peptidique de l'actine en des endroits clés peuvent entraîner des phénotypes foncièrement distincts. Ainsi, chez les Apicomplexa, parasites des métazoaires, les microfilaments d'actine générés présentent au niveau de l'interface inter-brin, des acides aminés différents de ceux des filaments d'actine de mammifère, les rendant instables^{88,91,92}. Cette instabilité des microfilaments chez les Apicomplexa favorise alors l'émergence d'une population de courts filaments, nécessaire pour leur motilité et leur infectivité⁹³.

Au sein même d'une classe d'animal, il existe également une certaine variabilité structurale de l'actine avec par exemple l'existence de six isoformes distincts chez les mammifères et les oiseaux : α squelettique, α cardiac, α lisse, γ lisse, β cyto, et γ cyto. Parmi ces isoformes, la β cyto-actine et la γ cyto-actine sont présentes dans la plupart des cellules⁹⁴. Bien que leurs différences structurales se limitent à quelques acides aminés, des expériences *in vivo* montrent des phénotypes différenciés après modulation de leur expression respective^{95,96}. En outre, la distribution en isoformes d'actine semble pouvoir varier selon l'ultra-structure de la cellule considérée. Des observations suggèrent par exemple que la β -actine se localise préférentiellement au front des lamellipodes⁹⁷ tandis que la γ -actine se trouverait préférentiellement au cœur du cytoplasme⁹⁸.

Cette diversité structurale encodée dans l'ADN est enrichie par des modifications post-traductionnelles⁹⁹ avec notamment l'arginylation qui, lorsque qu'elle est réalisée sur la β -actine d'une cellule, favorise la formation des lamellipodes¹⁰⁰, mais lorsqu'elle est réalisée sur la γ -actine, entraîne la dégradation de celle-ci par le protéasome¹⁰¹.

B. pH.⁷⁸

L'activité des ions hydrogènes en solution a également un impact sur la composition de l'actine en déterminant l'état de protonation/déprotonation de ses acides aminés. Cet état influe alors directement sur la nucléation et l'élongation des filaments d'actine. Il a ainsi été montré qu'une diminution du pH à une valeur proche de 6 entraîne une stimulation de la nucléation avec une réduction du temps de latence précédant la phase d'élongation⁷⁸. Cette stimulation s'appuie non pas sur des changements structuraux au sein des monomères d'actine mais sur une réduction de la charge nette en valeur absolue qui se rapproche du point isoélectrique théorique du monomère d'actine alors inférieur à 6. Cette diminution du pH permet donc de neutraliser les forces électrostatiques répulsives des monomères d'actine qui entravent la nucléation.

De la même manière, le pH a un effet sur la vitesse d'élongation des filaments nucléés en modifiant les cinétiques d'assemblage et de désassemblage aux extrémités des filaments⁷⁸.

Ce contrôle électrostatique de la polymérisation par l'intermédiaire du pH ne se limite pas à l'éprouvette mais peut avoir des implications biologiques réelles. C'est le cas pour la bactérie *Listeria* qui fonde sa motilité sur la formation d'une comète d'actine branchée à sa surface et dont la polymérisation entraîne sa propulsion⁹⁰. Il a été montré que lorsque le pH cytoplasmique de la cellule hôte est diminué de 7.4 à 7.1, la motilité de la bactérie augmente en accord avec la stimulation de la polymérisation des filaments d'actine mesurée *in vitro*⁷⁸.

C. Cations et nucléotides.

Comme évoqué en section 1.1, le monomère d'actine possède une poche de liaison pour un dication de magnésium ou calcium lié à un nucléotide d'adénine. L'affinité de cette interaction est très forte avec un K_d de l'ordre du nanomolaire¹⁰². En outre, les monomères d'actine présentent une affinité bien plus importante pour l'ATP que pour l'ADP. Lorsque qu'un ATP est lié au monomère d'actine, la liaison d'un dication entraîne des changements conformationnels. La liaison d'un magnésium ou d'un calcium influence différemment la dynamique des filaments d'actine avec une nucléation et une élongation plus importante en présence de Mg-ATP¹⁰³. Le magnésium entraîne également une hydrolyse plus rapide de l'ATP en comparaison au calcium avec des changements structuraux après hydrolyse plus marqués. Ainsi, le magnésium favorise la polarisation des filaments d'actine à travers l'hydrolyse de l'ATP (phénomène du « tapis roulant »). Dans la cellule la concentration en magnésium est supérieure à la concentration de calcium de telle sorte qu'il est communément admis que le sillon 4/2 du monomère d'actine est naturellement occupé par un dication de magnésium lié à un nucléotide d'adénine,

cela bien que l'affinité des monomères d'actine pour le calcium soit supérieure à leur affinité pour le magnésium^{103,104}.

Il existe également sur le monomère d'actine environ cinq autres sites de liaisons de cations à faible affinité (K_d de l'ordre du micro ou mili-molaire). Lorsque le filament se forme, deux sites de liaison de cation supplémentaires apparaissent à travers l'agencement des sous-unités d'actine. Ces deux sites de liaison ont pu être prédits par bio-informatique et ont été étudiés *in vitro*⁹⁹. Un premier site de liaison se situe à l'interface entre les sous-domaines 3 et 4 de deux sous-unités d'actine d'un même brin. L'occupation de ce site de liaison favorise la polymérisation du filament d'actine. Un second site de liaison se situe à l'interface entre les sous-domaines 3 et 2 (D-loop) de deux sous-unités d'actine d'un même brin. L'occupation de ce site renforce quant à lui la rigidité du filament d'actine (**Fig. 7**).

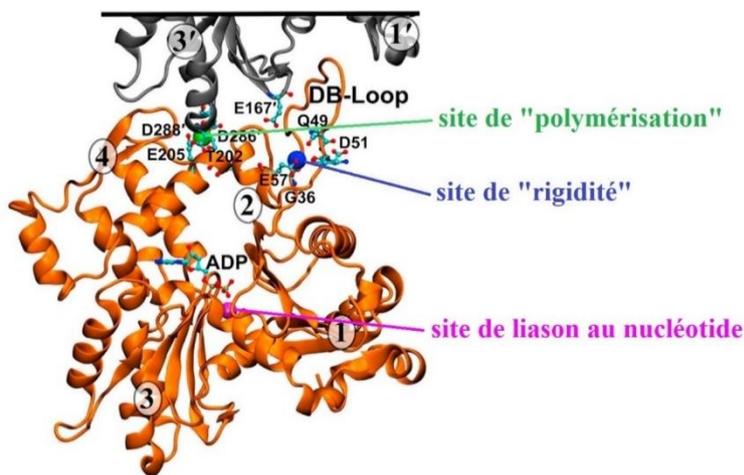


Figure 7 - Modèle structural d'une interaction intra-brin d'un filament d'actine mettant en évidence différents sites de liaison pour des cations (adapté de Kang et al., 2013).

Les nucléotides, les cations et le pH ne sont pas les seuls facteurs influençant la dynamique et la mécanique de l'actine. De nombreuses protéines tierces interagissent également avec l'actine pour en moduler son activité. Ces différents intervenants peuvent alors s'influencer mutuellement via une compétition ou une coopération sur l'actine et ses sites de liaison.

2.3. Le monomère et ses protéines régulatrices.

Une dernière source importante de variabilité dans la population d'actine monomérique des cellules vient de sa fonctionnalisation par diverses protéines de liaison. Je m'applique dans cette section à décrire de manière non exhaustive de telles actrices me paraissant représentatives de la fonctionnalisation de l'actine.

La concentration locale d'actine monomérique mesurée dans les cellules peut avoisiner 1500 fois la concentration critique de l'actine¹⁰². Cet état est rendu possible par les protéines de séquestration de l'actine comme la **thymosine β_4** (5 kDa⁴⁷) ou la **profiline** (14 kDa³⁷). L'action de ces protéines entraîne la constitution d'une réserve massive d'actine non polymérisée qui est, au besoin, intégrée dans des ultra-structures fonctionnelles de la cellule. Ces protéines permettent donc une réactivité de la cellule capitale pour un haut niveau d'adaptabilité à son environnement.

La **thymosine β_4** peut neutraliser la G-actine en se fixant simultanément aux sillons 3/1 et 4/2 de l'actine par l'intermédiaire de deux hélices alpha reliées par une chaîne peptidique étendue (**Fig. 8.A**). La **thymosine β_4** inhibe ainsi la polymérisation de l'actine que ce soit pour la nucléation ou son incorporation dans un filament. La **thymosine β_4** présente une affinité 50 fois supérieure pour de l'ATP-actine que pour de l'ADP-actine^{105,106}. En outre son mode de fixation à l'actine empêche l'échange d'un nucléotide piégé dans le sillon 4/2. Ces deux caractéristiques mises bout à bout permettent à la **thymosine β_4** de maintenir en réserve un ensemble de monomères ATP-actine prêt à être polymérisé et capable d'opérer le cycle d'hydrolyse associé³⁷.

En parallèle, la **profiline** permet également de fixer l'actine monomérique en se concentrant sur le sillon 3/1 de celle-ci (**Fig. 8.B**)³⁷. La **profiline** ainsi liée empêche la nucléation de l'actine. En outre, sa fixation entraîne un éloignement allostérique des sous-domaines 4 et 2 favorisant l'échange de nucléotide dans la poche alors ouverte. Étant donné une affinité plus importante de la structure engendrée pour la Mg-ATP, la **profiline** stimule ainsi la régénération des ADP-actine en ATP-actine¹⁰⁷.

La fixation de la **profiline** du côté « positif » de l'actine n'inhibe pas l'association de cette dernière à une extrémité barbée¹⁰⁸. Cette incorporation dans un filament d'actine peut être contrôlée à travers une affinité des **profilines** pour des protéines promotrices de l'élongation des filaments d'actine comme la **formine**¹⁴ ou **Ena/VASP**¹⁰⁹. Une **profiline** liée à un monomère d'actine fait alors le lien entre le monomère et la protéine promotrice de l'élongation qui accompagne à son tour le monomère d'actine à l'extrémité barbée d'un filament. La transition structurale de la G-actine vers la F-actine lors de la polymérisation favorise une dissociation de la **profiline** du bout barbé nouvellement allongé permettant ainsi la poursuite de l'élongation.

Enfin, des études structurales suggèrent que la **profiline** et la **thymosine β_4** peuvent former un complexe ternaire transitoire avec l'actine monomérique¹¹⁰. Cette propriété permettrait d'assurer un relais continu entre les deux protéines, limitant toute nucléation spontanée de l'actine jusqu'à l'élongation contrôlée d'un filament via les partenaires de la **profiline** sus-cités.

Il existe également des protéines de séquestration d'actine en dehors des cellules avec notamment la **gc-globuline** (52 kDa¹¹¹) circulant dans les vaisseaux sanguins¹¹². Son rôle crucial est de prévenir toute polymérisation accidentelle d'actine dans ces vaisseaux pouvant être délétère pour l'organisme. La **gc-globuline** interagit avec l'actine via le sillon 3/1 avec une surface d'interaction importante (**Fig. 8.C**)^{111,113}. Ce mode d'interaction confère à la **gc-globuline** une constante de dissociation (K_d) avec l'ATP-actine de l'ordre de 1 nM¹¹⁴ alors qu'elle est de 0.1 – 3.9 μ M pour la **thymosine β_4** et de 0.1 μ M pour la **profiline**¹¹⁰.

Le sillon 3/1 apparaît comme un domaine d'interaction clef de l'ensemble de ces protéines de liaison au monomère d'actine (**Fig. 8**). Il en résulte une conservation frappante de ses acides aminés, de la levure à l'homme⁴⁷. Cette conservation résulte certainement d'une pression évolutive colossale s'exerçant sur l'actine à travers son rôle de protéine pivot dans la cellule⁸⁸.

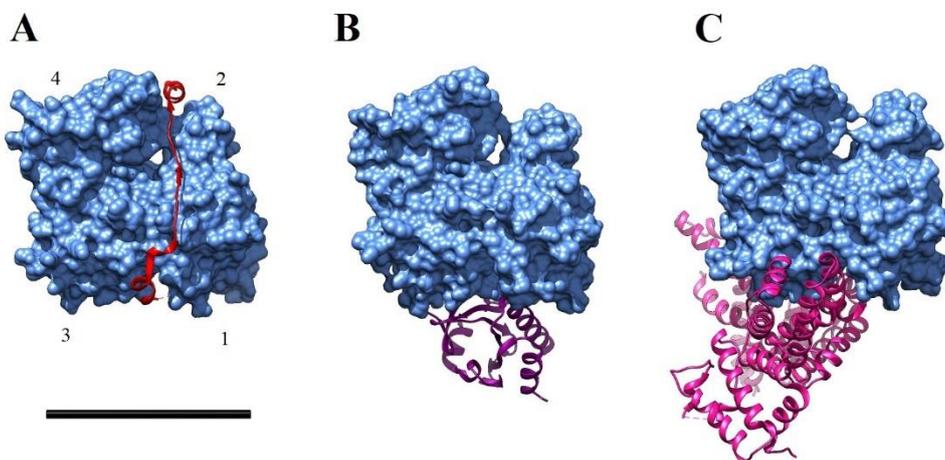


Figure 8 –

Structures cristallographiques de monomères d'actine (bleus) en interaction avec A. une thymosine β_4 (rouge) - PDB : 4PI7, B. une profiline (violet) - PDB : 2PBD, C. une gc-globuline (rose) - PDB : 1MA9. (barre d'échelle : 50 Å)

Dans la cellule, des assemblages fonctionnels très différenciés se forment à partir de l'actine monomérique, parfois séquentiellement, parfois simultanément. Ces différentes ultra-structures puisent leurs briques d'assemblages dans la réserve d'actine disponible pour créer ou maintenir leur structure tout en respectant des contraintes d'échelles strictes.

Une simple compétition sur l'utilisation de la réserve d'actine commune ne suffit pas à expliquer le renouvellement spatio-temporelle de ces ultra-structures variées^{102,115,116}. Afin d'assurer la formation contrôlée de ces ultra-structures définies par des propriétés géométriques précises, un aiguillage s'opère par la fonctionnalisation même de la réserve d'actine monomérique disponible. Cette fonctionnalisation peut en effet permettre l'assignation efficace des monomères d'actine dans les différentes ultra-structures¹⁰².

C'est ainsi par exemple, qu'un monomère d'actine lié à une **profiline** serait plus facilement incorporé dans un faisceau d'actine linéaire que dans un réseaux branchés. En effet, les réseaux branchés sont initiés par la protéine de régulation **Arp2/3** tandis que les longs filaments des

faisceaux linéaires sont favorisés par les **formines**. Or, si la **profiline** soutient l'activité élongatrice des **formines**, à l'inverse, elle contrarie l'activité nucléatrice d'**Arp2/3**^{102,117,118}.

Les protéines de liaison des monomères d'actine représentent donc la première couche de régulation de la dynamique de l'actine. La seconde couche de régulation, elle, s'opère à l'échelle des filaments déjà formés via une seconde catégorie de protéines agissant directement sur la structure hélicoïdale des microfilaments d'actine.

2.4. Le filament d'actine comme plateforme d'interaction.

Il existe dans la cellule une profusion de protéines régulatrices des microfilaments d'actine. C'est de cette diversité qu'émerge la quantité variée des modes d'organisation de l'actine et des fonctions cellulaires actine-dépendantes (**Fig. 9**)⁸⁸.

On distingue différentes protéines régulatrices selon leur modalité d'interaction principale avec les filaments d'actine. Certaines protéines décorent latéralement les filaments pour les dépolymériser, les stabiliser ou les fonctionnaliser. D'autres protéines coiffent leurs extrémités et influencent ainsi la nucléation, l'élongation ou l'ancrage des filaments.

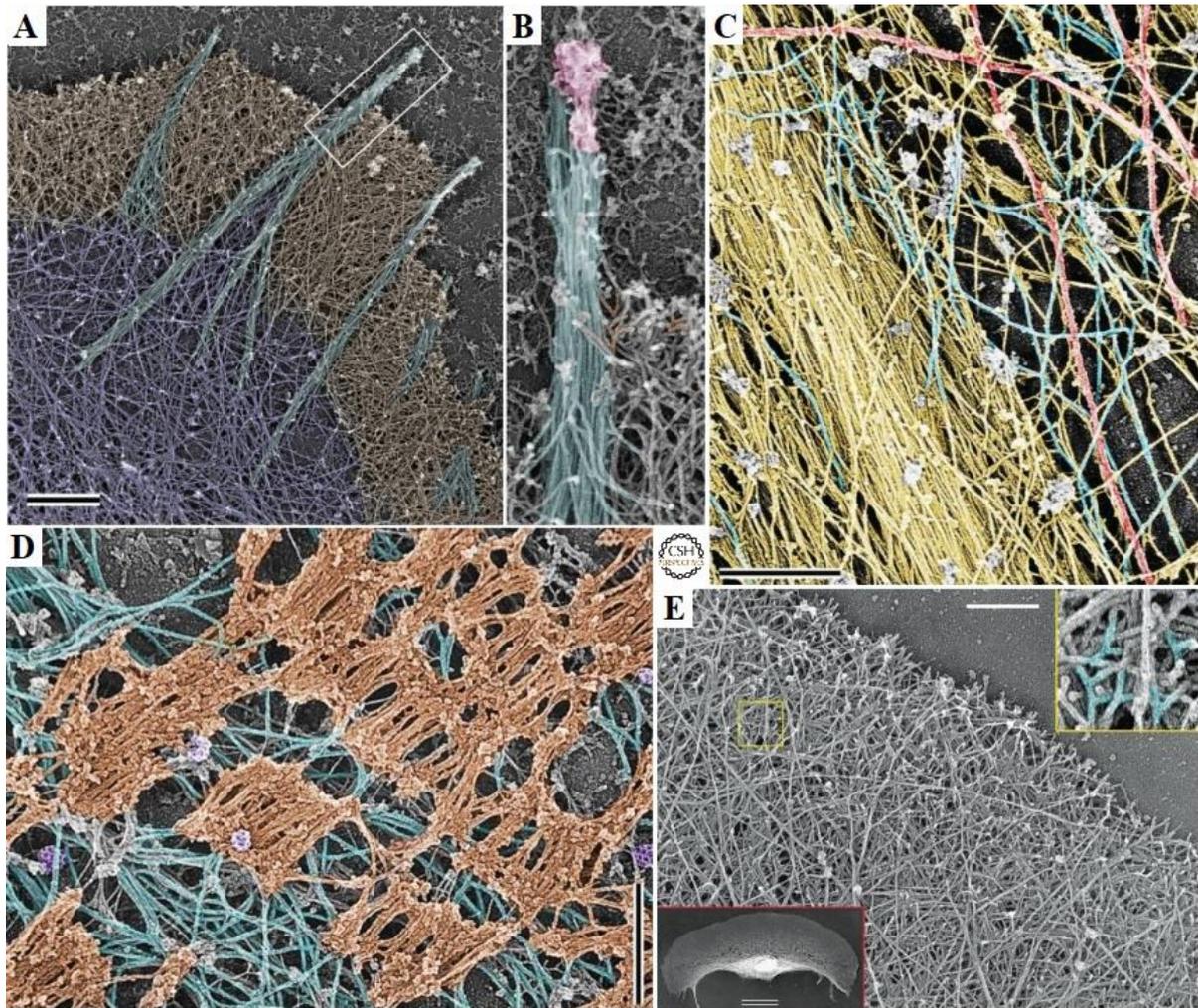


Figure 9 – **A.** Réplique de platine du front d'une cellule de mélanome de souris observée en microscopie électronique (**Bleu** : fagots d'actine constitutifs des filopodes, **Marron** : réseau dense de filaments d'actine constitutifs du lamellipode, **Violet** : réseau plus clairsemé de la lamelle cellulaire – barre d'échelle 1 μm). **B.** Région agrandie de l'encadré A (**Rose** : complexe de protéines régulatrices à l'extrémité d'un filopode). **C.** Extrait d'un fibroblaste de rat présentant un fragment d'une fibre de stress (gauche) accompagné d'un réseau d'autres composants du cytosquelette (droite) (**Jaune** : filaments d'actine, **Bleu** : filaments intermédiaires, **Rouge** : microtubules – barre d'échelle 500 nm). **D.** Mise en évidence d'un empilement de myosines II alignées après dissolution d'actine (**Rouge** : myosine II, **Bleu** : filaments intermédiaires – barre d'échelle 500 nm). **E.** Organisation des filaments d'actine dans un lamellipode de kératocyte de poisson. L'encadré jaune est agrandi, montrant la présence de filaments d'actine branchés en **bleu** – barre d'échelle 500 nm. (Svitkina. 2018)

A. Décorations déstabilisantes le long du corps des filaments d'actine.

Comme dans le cas des cations évoqué en section 2.2, il se forme le long de l'agencement hélicoïdal des filaments d'actine des sites de liaisons spécifiques pour des protéines régulatrices. Parmi ces protéines, une première catégorie permet, par leur fixation, d'influencer directement la structure et la dynamique du filament entraînant sa déstabilisation. On peut alors citer les **ADF/cofilines**^{119,120} et les **gelsolines**¹²¹, qui à travers leur interaction découpent les filaments d'actine en de plus courts fragments. Les mécanismes d'action de ces deux familles de protéine sont distincts.

Les **ADF/cofilines** sont des petites protéines de 13 – 19 kDa qui se lient, avec un ratio 1:1 et de manière coopérative aux sillons formés par les sous-domaines 2 et 1 d'une interface intra-brin

(Fig. 10.A)¹²⁰. Cette interaction coopérative entraîne la formation de sections de filaments décorées laissant d'autres sections nues. Les sections du filament décorées présentent une torsion modifiée avec un pas angulaire qui tombe à 162°. Cette différence structurale entre sections décorées et sections nues entraîne une instabilité à leur frontière qui à terme déclenche la rupture du filament¹²². La rupture a lieu préférentiellement à la frontière d'un patch décoré situé du côté pointu. Les **ADF/cofilines** peuvent également stimuler la dépolymérisation des filaments aux extrémités et elles présentent une affinité supérieure pour les ADP-actines. En fin de compte, ces propriétés permettent aux **ADF/cofilines** d'assister le recyclage actif de l'actine dans des ultra-structures établies en désassemblant les filaments à proximité des extrémités pointues principalement constituées d'ADP-actine. L'actine ainsi désassemblée pourra ensuite être réutilisée pour allonger les extrémités barbées des filaments d'actine, c'est le processus du tapis roulant régulé. Comme déjà évoqué dans la section 2.1. C'est sur ce processus que se fonde la motilité des cellules à travers les lamellipodes (Fig. 9.A,E) dans lesquels les bouts barbés pointent vers la membrane plasmique tandis que les bouts pointus pointent vers le cytoplasme. Les **gelsolines**, pour leur part, forment une famille de grandes protéines multi-domaines de l'ordre de 90 kDa. Une série de domaines se lie comme les **ADF/cofilines** aux sillons formés par les sous-domaines 2 et 1 d'une interface intra-brin (Fig. 1.D). Ces domaines conduisent à l'encerclement du filament¹²¹. D'autres sous-domaines interagissent plus en profondeur sur l'interface positive des protomères d'actine, entraînant le découpage du filament. La nouvelle extrémité barbée exposée par ce découpage reste alors coiffée de la **gelsoline**.³⁷ À l'instar des **gelsolines**, on peut d'ores et déjà évoquer au moins deux **formines** présentant cette même particularité fonctionnelle de découpage des filaments d'actine : INF2¹²³ et FRL- α ¹²⁴.

B. Décorations stabilisantes du corps des filaments d'actine.

De manière antagoniste, certaines protéines régulatrices renforcent quant à elles la stabilité des filaments d'actine. On peut alors citer la **phalloïdine**, la **jasplakinolide** et la **tropomyosine**. Les deux premières protéines sont des toxines, respectivement de champignon et d'éponge de mer, capables de se lier à l'interface inter-brin d'un filament d'actine (Fig. 10.B). Elles renforcent de ce fait les interactions inter-brins mais également intra-brins du filament. En outre, la fixation de ces protéines inhibe l'hydrolyse de l'ATP par les protomères d'actine.

De par cette activité, ces deux toxines perturbent la dynamique cellulaire des filaments d'actine^{91,125}. Fonctionnalisées avec des fluorophores, ces protéines ont souvent été utilisées pour visualiser les filaments d'actine *in cellulo*¹²⁶.

Pour sa part, la **tropomyosine**, protéine non exogène, apparaît indispensable pour certaines fonctions physiologiques avec notamment une participation dans l'édification des sarcomères musculaires¹²⁷. De plus grande dimension que la **phalloïdine** ou la **jasplakinolide**, la **tropomyosine** forme en solution un dimère tête bêche de 70 kDa via un assemblage en superhélice de 420 Å de long. Ces dimères peuvent polymériser en interaction avec les filaments d'actine. Ils suivent ainsi sensiblement le pas long du filament à travers deux rubans de **tropomyosines** parallèles et disjointes (**Fig. 10.C**). Cette décoration du filament permet, tout en stabilisant la structure, de l'habiller pour contrôler l'activité de protéines régulatrices tierces comme les **ADF/cofilines**¹²⁸ ou les **myosines**^{129, 86}.

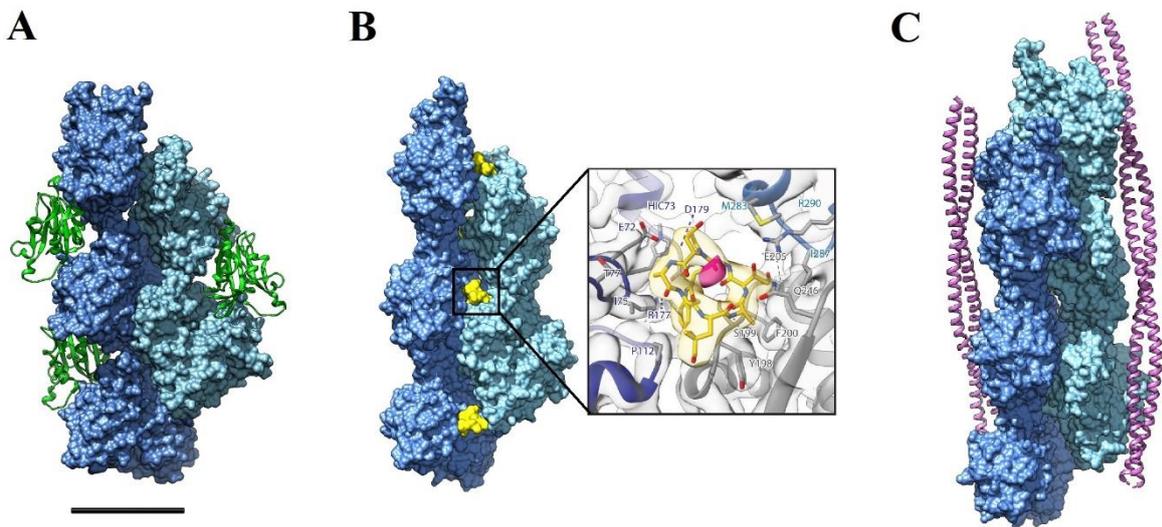


Figure 10 – Structures atomiques, déterminées par cryo-microscopie électronique, de filaments d'actine (bleus) en complexe avec **A.** des cofilines (verts) – PDB : 5YU8. **B.** des phalloïdines (jaunes) – PDB : 6T1Y, encadré : environnement d'une phalloïdine (S. Pospich, F. Merino, S. Raunser. 2020). **C.** des tropomyosines (violet) – PDB : 3J8A. (barre d'échelle : 50 Å)

C. Décorations fonctionnalisantes du corps des filaments d'actine.

Une autre catégorie de protéine est capable de fonctionnaliser les filaments d'actine pour organiser leur agencement au sein d'ultra-structures. Un premier exemple est la **fascin**, protéine essentielle pour la formation des filopodes (**Fig. 9.A-B**) ou des fibres de stress (**Fig. 9.C**)¹³⁰. Cette protéine d'environ 55 kDa¹³¹ permet de connecter deux filaments d'actine linéairement orientés. Pour se faire, cette protéine rigide expose deux sites principaux d'interaction avec l'actine distant de 5 nm et reliés par une quasi-symétrie 2. Il en résulte, après l'association des **fascines** avec des filaments d'actine, la formation de faisceaux compacts (**Fig. 11.A**)^{132,133}.

Les fagots d'actine générés peuvent ensuite être ancrés latéralement à la membrane plasmique par l'intermédiaire des protéines ERM (**e**zrine, **r**adixine, **m**oesine). La membrane plasmique est remodelée par la forme du fagot d'actine¹³⁴.

Une deuxième protéine capable d'interconnecter les filaments d'actine est l' **α -actinine**. L' **α -actinine** forme en solution un homodimère symétrique allongé de 200 kDa et 360 Å de long (**Fig. 11.B**). Ce dimère arbore à ses extrémités des domaines globulaires liés de manière flexible au corps de la protéine. Ce sont ces domaines qui assurent l'interaction avec les filaments d'actine. La flexibilité de leur liaison permet alors l'incorporation d' **α -actinine** dans des réseaux contractiles, réticulés ou linéaires, comme dans le cas du cortex cellulaire ou des fibres de stress (**Fig. 9.C**)^{135,136}.

Une troisième protéine interagissant directement avec le corps des filaments d'actine et à l'origine du caractère contractile des réseaux suscités se trouve être la **myosine** et notamment la **myosine II**. La particularité de cette protéine linéaire dont l'unité canonique mesure ~250 kDa, réside dans son rôle de moteur moléculaire et sa capacité d'assemblage sous la forme de myofilaments¹³⁷. Ces myofilaments exhibent des « têtes » mobiles, capables, à travers l'hydrolyse d'ATP, de pivoter en entraînant avec elles le corps d'un filament d'actine en contact. On retrouve alors ces filaments de **myosine** dans les sarcomères des myofibrilles, responsables de la contraction musculaire (**Fig. 9.D, 12.C**).

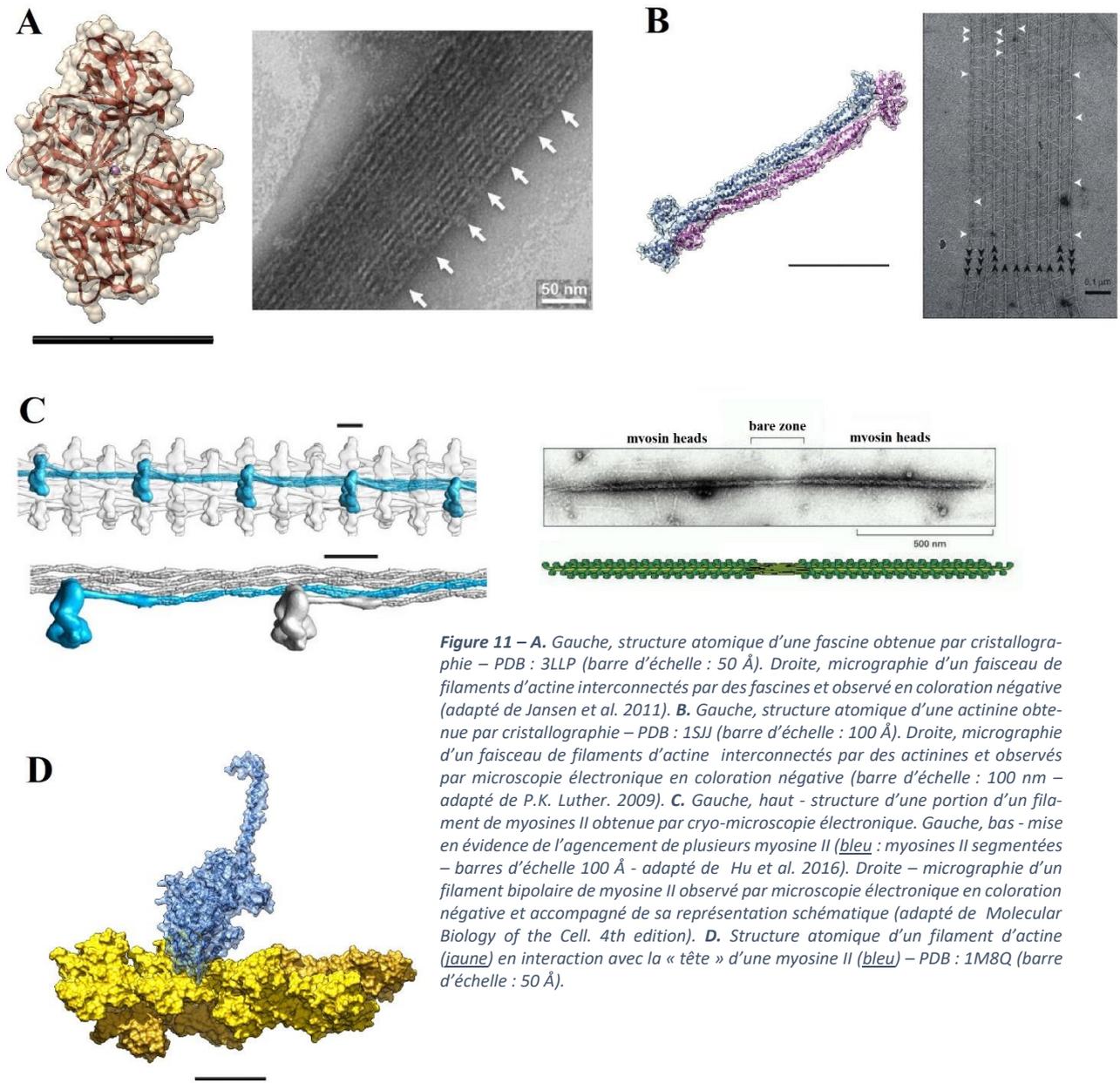


Figure 11 – A. Gauche, structure atomique d'une fascine obtenue par cristallographie – PDB : 3LLP (barre d'échelle : 50 Å). Droite, micrographie d'un faisceau de filaments d'actine interconnectés par des fascines et observé en coloration négative (adapté de Jansen et al. 2011). B. Gauche, structure atomique d'une actinine obtenue par cristallographie – PDB : 1SJJ (barre d'échelle : 100 Å). Droite, micrographie d'un faisceau de filaments d'actine interconnectés par des actinines et observés par microscopie électronique en coloration négative (barre d'échelle : 100 nm – adapté de P.K. Luther. 2009). C. Gauche, haut - structure d'une portion d'un filament de myosines II obtenue par cryo-microscopie électronique. Gauche, bas - mise en évidence de l'agencement de plusieurs myosine II (bleu : myosines II segmentées – barres d'échelle 100 Å - adapté de Hu et al. 2016). Droite – micrographie d'un filament bipolaire de myosine II observé par microscopie électronique en coloration négative et accompagné de sa représentation schématique (adapté de Molecular Biology of the Cell. 4th edition). D. Structure atomique d'un filament d'actine (jaune) en interaction avec la « tête » d'une myosine II (bleu) – PDB : 1M8Q (barre d'échelle : 50 Å).

Le corps des filaments d'actine ne représente cependant pas l'unique surface d'interaction pour des protéines régulatrices. Au contraire la dynamique intrinsèque des filaments étant localisée à ses extrémités, ces dernières apparaissent comme des sites de prédilection pour réguler la cinématique des échanges.

D. Coiffes inhibitrices de l'élongation.

Dans les ultra-structures des cellules, la taille des filaments d'actine est finement régulée. En effet, les propriétés mécaniques de ces assemblages complexes en dépendent. Les extrémités barbées dont la dynamique est élevée sont des cibles majeures pour maîtriser la cinétique d'allongement globale des filaments d'actine.

En ce sens, des protéines régulatrices se lient spécifiquement aux extrémités barbées pour bloquer tout nouvel échange de monomère d'actine. Une protéine notoire assurant cette fonction est la protéine de coiffe **CapZ** (**Fig. 12**). Cette protéine est un hétérodimère composé de deux sous-unités α et β d'environ 30 kDa chacune. La structure atomique de la protéine **CapZ** seule, déterminée par diffraction des rayons X¹³⁸, ainsi que l'enveloppe 3D du complexe **CapZ**-extrémité barbée, déterminé par cryo-microscopie électronique, ont permis d'établir un modèle d'interaction de cette protéine¹³⁹. La liaison de **CapZ** au bout barbé serait assurée dans un premier temps par l'interaction des acides aminés basiques de la queue C-terminale du domaine α avec les acides aminés des deux premières sous-unités d'actine du bout barbé. Dans un second temps, la queue C-terminale du domaine β établirait une interaction hydrophobe avec la première sous-unité d'actine de l'extrémité barbée. Cumulées, ces deux interactions confèrent à la protéine de coiffe **CapZ** une très forte affinité pour le bout barbé des filaments d'actine ($K_d \sim 1$ nM). En outre, cette configuration retient la première sous-unité du filament d'actine tout en prohibant stériquement l'addition de nouveaux monomères d'actine au bout barbé. On retrouve alors la protéine de coiffe **CapZ** dans les lignes Z des sarcomères, structures dans lesquelles les filaments d'actine doivent être les plus stables possibles pour maintenir l'activité musculaire¹⁴⁰.

À l'autre extrémité du filament d'actine, le bout pointu présente une dynamique naturellement lente, ce qui ne laisse qu'une ouverture réduite pour l'échange de monomères d'actine. Néanmoins, dans des assemblages comme les sarcomères cette dynamique doit-être limitée à son minimum pour garantir des structures pérennes. Pour assurer cette fonction, on peut citer la **tropomoduline**, protéine régulatrice de 40 – 50 kDa venant coiffer les bouts pointus des filaments d'actine en s'enroulant autour de leurs trois premiers protomères (**Fig. 12**)¹⁴¹. La **tropomoduline** limite alors l'ajout et la dissociation de sous-unités d'actine à l'extrémité pointue. Son affinité avec le bout pointu reste cependant modérée avec une constante de dissociation d'environ 0.1 - 0.2 μ M. Tout l'intérêt des **tropomodulines** se dévoile avec l'interaction de protéines régulatrices tierces comme la **tropomyosine** (**Fig. 12**). En effet, la **tropomoduline** en présence de **tropomyosine** voit sa constante de dissociation diminuer d'un ordre de grandeur¹⁴². La tropomoduline permet alors, en coopération avec les protéines de coiffe **CapZ**, de réduire

radicalement la dynamique des filaments d'actine. Elle assure en outre le bon alignement des **tropomyosines** sur les filaments⁸⁸.

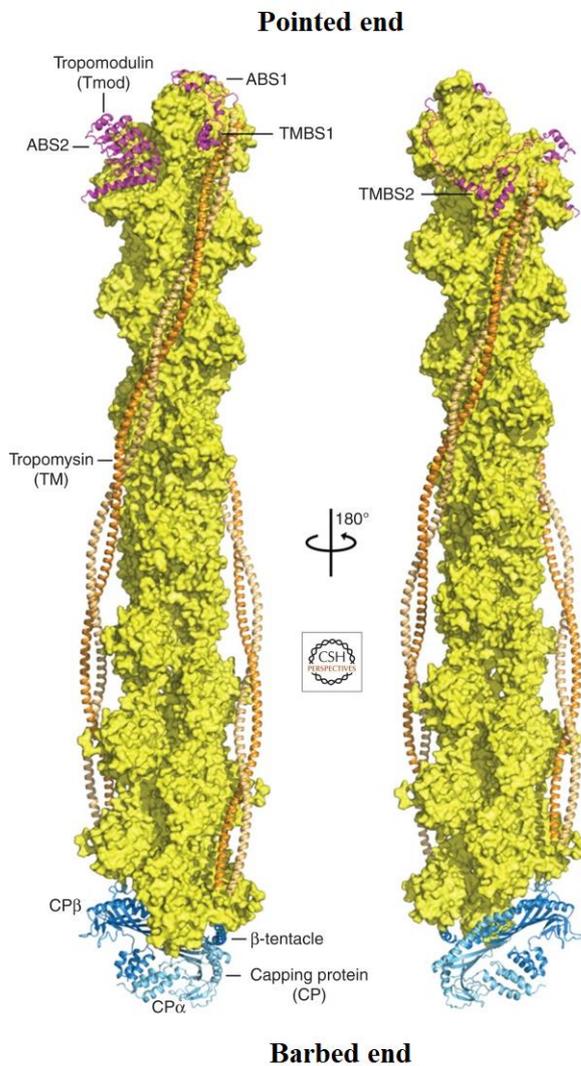


Figure 12 – Modèle structural d'un filament d'actine (jaune) décoré de tropomyosines (orange) le long de son corps et coiffé à ses extrémités d'une tropomoduline (violet) au bout pointu et d'une protéine de coiffe CapZ (bleu) au bout barbé (Thomas D. Pollard. 2016).

La **tropomoduline** se manifeste également dans le cas particulier du cytosquelette spécialisé des érythrocytes²⁴⁷. Ce cytosquelette spécialisé est constitué d'un maillage tridimensionnel dont l'ossature est assurée non pas par des filaments d'actine mais par des filaments de **spectrine**. Les **spectrines** sont des protéines filiformes d'environ 250 kDa capables d'interagir avec les filaments d'actine. Deux isoformes de spectrine, α et β , sont capables de former des filaments bipolaires qui se décomposent en deux d'hétérodimères antiparallèles, associés tête bêche en un tétramère. Dans le contexte du cytosquelette des érythrocytes, les filaments d'actine constituent les nœuds du réseau via des fragments stabilisés de 30 nm de long. La stabilisation stricte

de ces fragments aux bouts pointus est assurée comme dans les sarcomères par la **tropomoduline** en interaction avec la **tropomyosine**. D'autres protéines comme les protéines ERM décorent les fragments d'actine pour ancrer le réseau à la membrane plasmique et ainsi conférer leurs propriétés mécaniques aux hématies.

Dans ces deux types d'assemblage, sarcomères des myofibrilles ou cytosquelette spécialisé des érythrocytes, les filaments d'actine stabilisés par des protéines de coiffe jouent essentiellement le rôle de plateformes d'interactions statiques. Néanmoins, certaines protéines de coiffe interviennent également dans des assemblages d'actine très dynamiques tels que les lamellipodes.

E. Stimulation de la nucléation et coiffes promotrices de l'élongation.

Dans le cas des réseaux branchés anisotropes tels que les lamellipodes, la nucléation des filaments repose principalement sur le complexe **Arp2/3**^{248,232,233}. Ce complexe présente une activité à la croisée des chemins entre fonctionnalisation latérale d'un filament d'actine préexistant et coiffe de l'extrémité pointue d'un filament nouvellement nucléé ou préexistant. En effet, **Arp2/3** peut décorer durablement le corps d'un filament d'actine tout en nucléant à partir de celui-ci un nouveau filament qui s'allonge depuis son extrémité barbée (**Fig. 13.A**). L'assemblage créé par **Arp2/3** dessine un embranchement qui forme un angle d'environ 70° entre le filament d'actine initial « père » et le filament d'actine créé « fils » (**Fig. 9.E**, encadré). À l'échelle moléculaire, **Arp2/3** est un complexe de 224 kDa constitué de sept protéines (**Fig. 13.A**). Deux de ces protéines, **Arp2** et **Arp3**, présentent un repliement homologue à celui de l'actine. Pour assurer son activité de branchement et de nucléation le complexe **Arp2/3** nécessite l'intervention de facteurs promoteurs de la nucléation (NPFs). Ces protéines, en se liant à **Arp2/3** et en coopération avec l'interaction du filament père, entraînent des changements conformationnels dans le complexe qui à terme rapprochent les protéines **Arp2** et **Arp3**. Ces deux domaines s'agencent alors sous la forme d'un pseudo filament d'actine dont les faces positives restent exposées ce qui permet d'outrepasser l'étape de nucléation spontanée pour entamer une élongation rapide d'un nouveau filament. En outre et dans une moindre mesure, le complexe **Arp2/3** présente également la capacité de coiffer le bout pointu d'un filament d'actine préexistant sans que l'intervention de protéines tierces ne soit nécessaire²³³.

La géométrie particulière en « y » des assemblages d'actine générés par des **Arp2/3** activés permet de convertir efficacement l'énergie de la polymérisation des filaments en force de poussée contre la membrane plasmique^{130,143}. En effet, dans un premier temps, la coiffe des bouts

pointus par **Arp2/3** et donc l'ancrage des filaments fils aux filaments pères permet de limiter le glissement de ces premiers vers le cytoplasme lors de la rencontre des extrémités barbées avec la membrane plasmique. En outre, l'angle introduit par le branchement contribue à la formation d'une intersection non-orthogonale entre l'extrémité barbée d'un filament fils et la membrane plasmique. Cette particularité topologique est favorable pour générer une force soutenue¹⁴³ et, faciliterait via les fluctuations thermiques, l'incorporation de nouveaux monomères d'actine aux extrémités barbées alors plus exposées.

D'autres protéines régulatrices, comme **Ena/VASP** ou les **formines**, stimulent la nucléation de nouveaux filaments en stabilisant la formation d'oligomères d'actine. Ces protéines ont en outre la capacité de traquer l'extrémité barbée polymérisante d'un filament tout en amplifiant activement sa vitesse d'élongation. Les modalités d'interaction de ces deux protéines diffèrent sensiblement.

Ena/VASP est une protéine multi-domaine dénombrant trois régions principales^{109,144}. Une première région N-terminale, qui assigne la protéine dans différentes ultra-structures cellulaires comme les lamellipodes ou les filopodes. Une seconde région riche en proline et donc semi-flexible qui permet l'interaction avec la profiline-actine. Une dernière région C-terminale qui assure la tétramérisation des **Ena/VASP** et l'interaction avec la face positive des monomères de même que le côté des filaments d'actine. La tétramérisation est réalisée via un domaine structuré en hélice α présent dans chaque protéine. Ces domaines sont capables de s'associer latéralement en une super hélice linéaire. La tétramérisation des **Ena/VASP**, regroupe ainsi physiquement plusieurs domaines d'interaction avec l'actine filamentueuse ou monomérique qui étaient initialement indépendants. La liaison stochastique de ces domaines au filament suffit pour maintenir quelques secondes l'attachement d'**Ena/VASP** à proximité des extrémités barbées des filaments tout en y favorisant l'incorporation de nouveaux protomères (**Fig. 13.B**). L'efficacité processive d'**Ena/VASP** est renforcée lorsque plus d'une extrémité barbée est présente localement, augmentant le nombre de partenaires d'ancrage¹⁴⁴. C'est le cas à l'extrémité des filopodes ou la proximité des filaments d'actine est assurée par les fascines (**Fig. 9.B**).

L'activité des formines à travers leurs domaines est exposée plus en détail au chapitre suivant. On peut néanmoins d'ores et déjà évoquer l'architecture particulière des **formines** qui les distingue d'**Ena/VASP**. Comme **Ena/VASP**, la séquence peptidique des **formines** telles que **mDia1** peut être divisée selon trois régions distinctes¹⁴⁵. Une première région N-terminale, capable de dimériser, assure la régulation et l'ancrage des **formines** à la membrane plasmique. Une seconde région riche en proline et semi-flexible (domaine FH1) permet la fixation d'actine-

profiline. Une dernière région C-terminale permet l'interaction avec les filaments d'actine et participe à sa dimérisation (domaine FH2) et sa régulation (domaine DAD). Les domaines FH2 sont structurés à travers des hélices α qui s'associent en une structure allongée et courbe. Deux domaines FH2 peuvent ensuite s'assembler via leurs deux extrémités dans une configuration tête bêche. À terme, le dimère de FH2 constitue un anneau d'un diamètre de l'ordre de 9 nm. Cet anneau est capable d'encercler les protomères constitutifs du bout barbé via une interaction médiée par ses acides aminés internes (**Fig. 13.C**)¹⁵. En outre, des liens flexibles connectant les extrémités des FH2 entre eux, permettent une liberté de mouvement telle qu'un dimère de FH2 peut en théorie se déplacer pas à pas, de protomère à protomère sur le filament d'actine, en suivant sa structure hélicoïdale. Cette modalité d'association, favorise une interaction robuste et continue d'une formine avec le filament et permet ainsi une processivité pérenne en intégrant au fur et à mesure de nouvelles sous-unités d'actine au bout barbé.

Les formines comme les **Ena/VASP** favorisent la génération de structures linéaires via la formation rapide de longs filaments. On retrouve ainsi les formines à l'extrémité des filopodes où elles peuvent participer à l'ancrage dans la durée de cette ultra-structure à la membrane plasmique (**Fig. 9.B**). L'intersection orthogonale du fagot d'extrémités barbées avec la membrane plasmique permet une protrusion localisée, rapide et allongée, utile pour sonder efficacement l'environnement de la cellule.

Différentes architectures entrent ainsi en compétition à travers les protéines régulatrices des filaments d'actine telles que **Arp2/3** et **Ena/VASP** ou les formines. Au sein des ultra-structures, cette compétition lorsqu'elle est équilibrée peut assurer un régime stationnaire et fonctionnel. Au contraire, lorsque l'activité d'un groupe de protéines régulatrices brise l'équilibre, une transformation locale ou globale de l'ultra-structure peut s'opérer pour évoluer vers une nouvelle architecture.

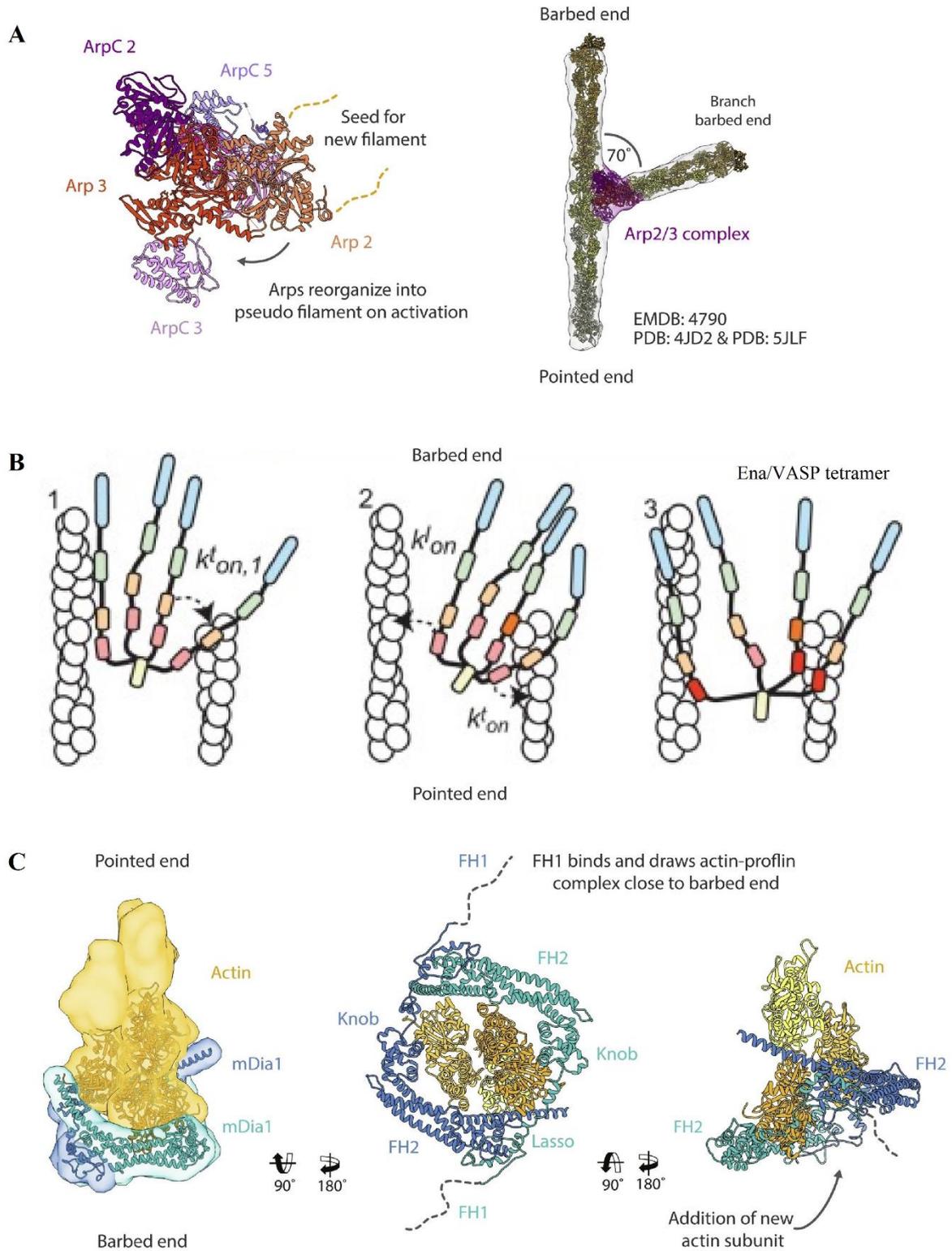


Figure 13 – A. Gauche, structure atomique d'un complexe Arp2/3 – PDB : 4JD2. Droite, ajustement de la structure atomique d'un complexe Arp2/3 (rouge) ainsi que des structures atomiques de filaments d'actine (jaune - PDB : 5JLF) dans l'enveloppe d'un branchement d'actine reconstruit par une moyenne de cryo-tomogrammes (EMDB : 4790). B. Schéma d'interaction d'un tétramère d'Ena/VASP avec deux extrémités barbées d'actine voisines (Harker et al. 2019). C. Modèle d'interaction d'une formine (bleu) à l'extrémité barbée d'un filament d'actine (jaune). (A. C. tirés de F. Merino, S. Popisch, S. Raunser. S. 2019).

F. Activité compétitive/coopérative des protéines régulatrices à travers le réseau d'actine.

Le fonctionnement des lamellipodes est un exemple représentatif d'ultra-structure dans laquelle un régime compétitif de protéines régulatrices des filaments d'actine se met en place. Le mode de fonctionnement des lamellipodes peut être en partie défini selon deux critères géométriques essentiels : la densité de branchement et la taille des filaments impliqués. Une densité de branchement importante de courts filaments permet une protrusion lente mais persistante des lamellipodes. À l'inverse, une densité de branchement plus faible de longs filaments permet une protrusion rapide mais saccadée des lamellipodes, caractérisée par des phases de rétraction dues à une plus grande probabilité de flambage des filaments au contact de la membrane plasmique^{130,146}. Cette densité de branchement dépend directement de l'activité de nucléation des complexes **Arp2/3** mais aussi de la taille des filaments d'actine mis en jeu qui est quant à elle fonction de la vitesse d'élongation aux extrémités barbées. Ce dernier paramètre est ajusté négativement par les protéines de coiffe inhibitrices de l'élongation comme **CapZ** et peut être contrebalancée positivement par les protéines de coiffe promotrices de l'élongation comme les formines. Pris individuellement et *in vitro*, la constante de dissociation des formines ($\sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) ou le temps de demi-vie des **CapZ** ($\sim 25 \text{ min}$) aux extrémités barbées apparaissent incompatibles avec la dynamique des lamellipodes observée *in cellulo*¹⁴⁷. La compétition aux bouts barbés entre ces deux types de protéines régulatrices, s'excluant l'une l'autre, pourrait expliquer en partie l'établissement d'un régime dynamique en adéquation avec celui observé dans les cellules¹⁴⁸.

La compétition des protéines régulatrices à travers le filament d'actine n'existe pas uniquement sous la forme d'une exclusion mutuelle localisée aux bouts pointus ou barbés. En effet, cette compétition peut être médiée allostériquement à travers la structure même du filament d'actine. Si le filament d'actine possède un polymorphisme structural intrinsèque avéré⁵¹, certaines protéines régulatrices favorisent par leur fixation aux filaments un état conformationnel donné, qui, en se propageant le long du filament, stimule la fixation d'autres protéines régulatrices. On parle alors d'interaction coopérative. La **cofiline**^{149,150} et la **drébrine**¹⁵¹ en sont deux exemples. À l'inverse, les états conformationnels sélectionnés par deux protéines régulatrices distinctes peuvent ne pas se recouper. Dans ce cas de figure, une ségrégation entre filaments d'actine peut se mettre en place via une exclusion mutuelle des protéines régulatrices. Cette exclusion mutuelle est médiée par la conformation qui est imposée à la F-actine. Ce phénomène a pu être observé *in vitro* entre la myosine et la cofiline¹⁵².

La sélection conformationnelle des filaments d'actine peut être induite par l'interaction de protéines régulatrices mais également par des contraintes mécaniques¹⁵³. En retour et, selon la conformation structurale mécaniquement induite, le filament devient plus ou moins propice à l'interaction des dites protéines régulatrices. Ainsi, les **myosines II** présentent une affinité plus importante dans les cellules pour les filaments d'actine sous-tension¹⁵⁴. De même, la torsion d'un filament d'actine piégé aux extrémités et induite *in vitro* par la rotation d'une **formine** à son extrémité barbée réduit l'affinité de ce filament pour la **cofiline** et le protège de la dépolymérisation²⁴⁹.

La sensibilité de certaines protéines régulatrices à la conformation structurale des filaments d'actine et, inversement, la favorisation de certaines conformations structurales des filaments d'actine par des protéines régulatrices pourraient ainsi participer à l'assignation spatiale de ces dernières dans les ultra-structures via un mécanisme rétroactif¹⁵⁵.

Dans une approche différente, la compétition entre les divers types d'architecture des ultra-structures peut être arbitrée en amont des protéines régulatrices par l'intermédiaire de protéines tierces sélectionnant leur mode d'activité. Ce phénomène a été mis en évidence dans le cas du facteur promoteur de la nucléation des **Arp2/3**, **Spin90**, qui permet en interagissant avec le complexe **Arp2/3** de nucléer non plus des filaments branchés mais des filaments linéaires^{156,157}. Cette observation a d'abord été interprétée comme un moyen de générer les premiers filaments pères nécessaires à l'activité de branchement des complexes **Arp2/3**. Une récente étude impliquant nos collaborateurs de l'IJM a pu mettre en évidence *in vitro* et *in cellulo* une action synergique de **Spin90** avec les **formines**, notamment **mDia1**, à travers le complexe **Arp2/3**. J'ai alors pu dans ce cadre, via des observations et analyses en microscopie électronique, conforter la thèse de l'existence d'un complexe ternaire transitoire impliquant **Arp2/3**, **Spin90**, **mDia1**. Cette expérience est détaillée dans la partie **III.8** du présent manuscrit. Ces nouveaux résultats indiquent que **Spin90** diminue la densité de branchement en favorisant la nucléation de filaments non branchés via **Arp2/3** et augmente la taille des filaments d'actine en favorisant le recrutement des formines **mDia1** aux bouts barbés qui allongent ces derniers plus rapidement.

Tableau 1 - Récapitulatif des caractéristiques de quelques protéines d'interaction avec l'actine.

Protéines	Masses	Cible(s) d'interaction	Affinité (K _d)	Effets principaux
Profiline	~ 14 kDa ³⁷	<ul style="list-style-type: none"> - monomère d'actine (G) - extrémité barbée (BE) 	<p>MgADP-Pi-actine (BE) : 5.96 ± 2.4 μM¹⁵⁸</p> <p>MgADP-actine (BE) : 28.1 ± 5.1 μM¹⁵⁸</p> <p>MgATP-actine (BE) : 29.25 μM¹⁵⁹</p> <p>MgATP-actine (G) : ~ 0.1 μM¹¹⁰</p> <p>MgADP-actine (G) : ~ 0.17 μM¹¹⁰</p>	Séquestration des G-actines cytoplasmiques favorisant la formation d'une réserve d'ATP-G-actine. Fonctionnalisation de la G-actine assurant ainsi le relais avec d'autres protéines régulatrices arborant des domaines poly-prolines.
Thymosine β₄	~ 5 kDa ⁴⁷	<ul style="list-style-type: none"> - monomère d'actine (G) 	<p>MgATP-actine (G) : 1.1 - 3.9 μM¹¹⁰</p> <p>MgADP-actine (G) : 80 -100 μM¹¹⁰</p>	Séquestration des G-actines cytoplasmiques favorisant la formation d'une réserve d'actine prête à polymériser.
Gc-globuline	~ 52 kDa ¹¹¹	<ul style="list-style-type: none"> - monomère d'actine (G) 	<p>MgATP-actine (G) : ~ 1 nM¹¹⁴</p> <p>MgADP-actine (G) : ~ 2 nM¹⁶⁰</p>	Séquestration des G-actines extracellulaires prévenant la polymérisation accidentelle d'actine notamment dans les vaisseaux sanguins.
Cofiline	~ 13-19 kDa ¹²⁰	<ul style="list-style-type: none"> - filament d'actine, corps (F) 	<p>actine (F) : ~ 0.1 μM¹⁶¹</p>	Décoration déstabilisante des filaments d'actine entraînant à terme leur dépolymérisation. Participe au recyclage de l'actine disponible dans la cellule.

Phalloïdine	~ 4 kDa	- filament d'actine, corps (F)	actine (F) ~20 nM ^{162,163}	Toxine stabilisante des filaments d'actine perturbant sévèrement leur dynamique.
Tropomyosine	~ 68-72 kDa ¹²⁷ (dimère)	- filament d'actine, corps (F)	actine (F) ~ 1 µM ¹²⁷	Décoration stabilisante et continue des filaments d'actine modulant l'interaction avec d'autres protéines régulatrices. Indispensable dans l'édification des sarcomères.
Fascin	~ 55 kDa ¹³¹	- filament d'actine, corps (F)	actine (F) ¹⁶⁴ ~ 0.3 µM	Interaction avec le corps des filaments d'actine permettant la formation de points de jonction solides entre deux filaments. Participe à la formation de réseaux d'actine réticulés ou linéaires.
Actinine	~ 200 kDa ¹³⁵ (dimère)	- filament d'actine, corps (F)	actine (F) ~ 0.3 µM ¹⁶⁴	Interaction avec le corps des filaments d'actine permettant la formation de points de jonction flexibles entre deux filaments. Participe à la structuration de réseaux contractiles.
Myosine II	~ 500 kDa ¹³⁷ (hexamère)	- filament d'actine, corps (F)	ND	S'assemblent en myofilaments arborant des « têtes » mobiles qui entraînent dans leur mouvement les filaments d'actine en contact.

				Moteur moléculaire à l'origine de la génération de forces dans les réseaux d'actine.
Tropomoduline	~ 50 kDa ¹⁴²	<ul style="list-style-type: none"> - extrémité pointue (PE) - monomère d'actine (G) (Tmod3) 	<p>actine (PE) ~ 0.1 – 0.2 μM ¹⁴²</p> <p>MgATP-actine (G) ~ 0.13 μM ¹⁴²</p> <p>MgADP-actine (G) ~ 0.6 μM ¹⁴²</p>	Protéine coiffante du bout pointu empêchant stériquement l'association ou la dissociation de sous-unités d'actine à cette extrémité. Interaction stabilisée par la présence de tropomyosine.
Arp2/3	~ 220 kDa	<ul style="list-style-type: none"> - extrémité pointue (PE) - filament d'actine corps (F) : nécessite des protéines tierces 	<p>MgATP-actine (PE) ~ 40 nM ¹⁶⁵</p> <p>MgADP-actine (PE) ~ 1 μM ¹⁶⁵</p> <p>Actine (F) <i>ND</i></p>	Protéine coiffante des extrémités pointues. Activée par des protéines tierces, Arp2/3 peut décorer un filament préexistant et nucléer à partir de celui-ci un nouveau filament. Génère des réseaux branchés, orientés comme dans le cadre des lamellipodes.
CapZ	~ 62 kDa ¹⁶⁶ (hétérodimère)	<ul style="list-style-type: none"> - extrémité barbée (BE) 	actine (BE) ~ 0.02 – 1 nM ^{148,138}	Protéine coiffante du bout barbé empêchant stériquement l'association ou la dissociation de sous-unités d'actine à cette extrémité.
ENA/Vasp	~ 200 kDa ¹⁶⁷ (tétramère)	<ul style="list-style-type: none"> - extrémité barbée (BE) 	actine (BE) ~ 9.2 ± 1.4 nM ¹⁶⁷	Décore latéralement les filaments d'actine à proximité directe de leur extrémité barbée.

				Favorise l'élongation des filaments d'actine. Activité stimulée par le regroupement de multiples extrémités barbées comme dans le cadre des filopodes.
Formine (mDia1)	~ 260 kDa ¹⁶⁸	- extrémité barbée (BE)	actine (BE) ~ 0.003 nM ¹⁴⁸	Protéine coiffante du bout barbé capable de traquer l'extrémité polymérisante et d'y stimuler l'incorporation d'actine-profiline. Stimule la nucléation et l'élongation des filaments d'actine. Assure l'ancrage du bout barbé à la membrane plasmique.

3. Les Formines.

Parmi l'ensemble des rouages qui constituent la machinerie actine - protéines régulatrices, mon projet de thèse a eu pour vocation de mettre la lumière sur le couple actine/formine. Ce tandem est à l'origine d'une grande partie des filaments d'actine non branchés présents dans les cellules¹⁶⁹. En effet les formines y stimulent à la fois la nucléation de nouveaux filaments d'actine^{13,170} ainsi que leur élongation par une traque des extrémités barbées polymérisantes^{13,14}.

3.1. Les formines à l'échelle de la cellule.

Découvertes dans les années 90 à travers des études en biologie du développement¹⁷¹, les formines constituent une innovation évolutive des eucaryotes enrichissant l'appareil régulateur de l'actine cellulaire. La séquence codante de la formine a pu se diversifier au cours du temps donnant naissance à de multiples isoformes (**Fig. 14**) dont les activités s'ajustent aux processus fonctionnels dans lesquels ils sont impliqués¹⁷².

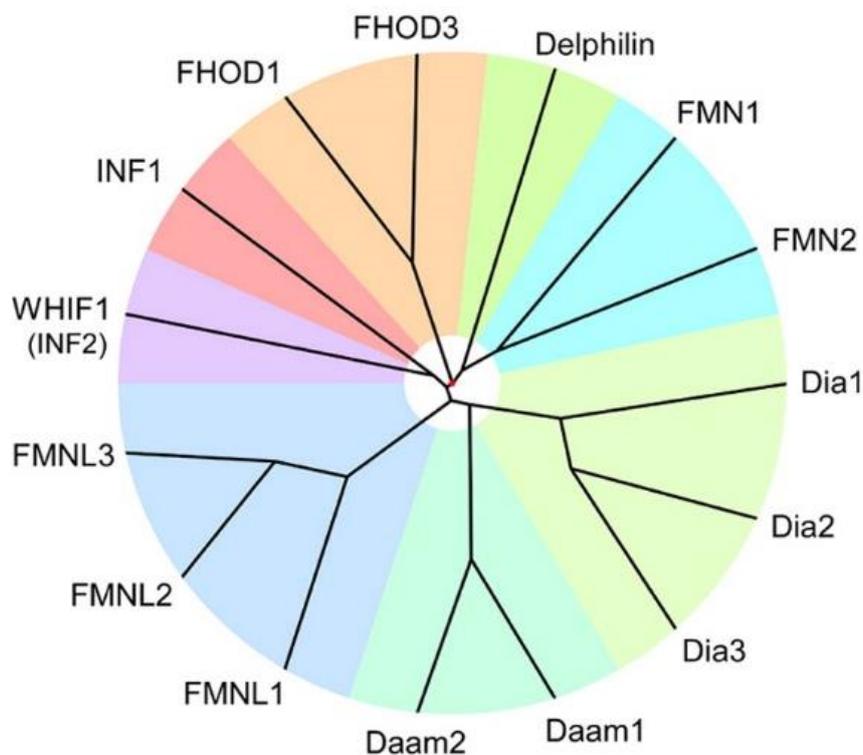


Figure 14 – Analyse phylogénétique des formines humaines. Des séquences complètes de l'isoforme le plus important de chaque orthologue de formine ont été utilisées pour déterminer les degrés de divergence. (tiré de D. Breitsprecher, B.L. Goode. 2013)

Au vu de l'activité centrale des formines qui consiste globalement à générer rapidement des filaments d'actine non branchés, on retrouve un nombre très varié de structures et fonctions spécifiques liées à l'actine pour lesquelles la contribution des formines est nécessaire. On peut ainsi évoquer, les activités des formines mDia1-3^{173,174}, DAAM^{175,176}, FMNL2/3^{177,178} dans la génération des filopodes. De même les implications des formines mDia1/2^{179,5}, Knittrig¹⁸⁰ ont pu être mises en évidence pour la génération des fibres de stress. Enfin les contributions des formines mDia1¹⁸¹, FMNL¹⁸² ont pu être établies dans le fonctionnement des lamellipodes¹⁸³. Les formines se retrouvent ainsi engagées dans diverses régions, fonctions et architectures du cytosquelette cellulaire (**Fig. 15**).

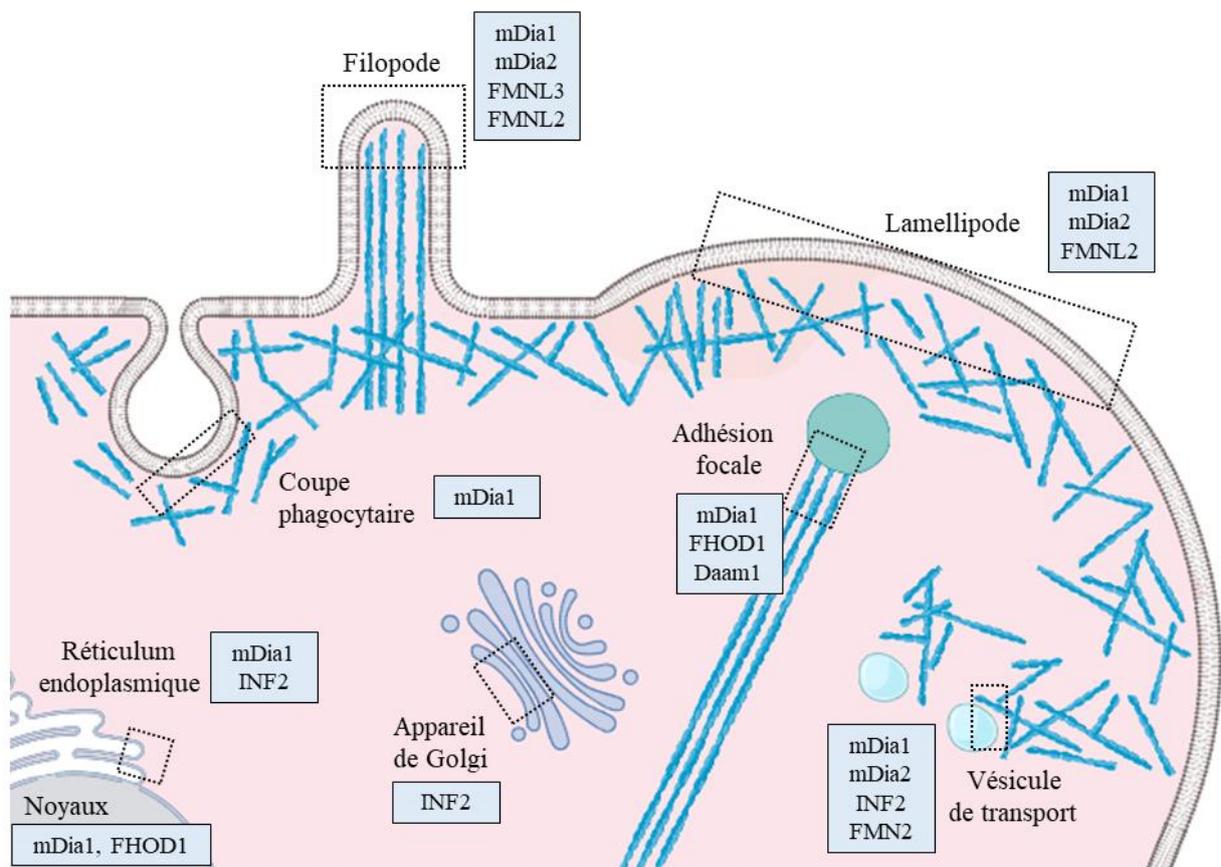


Figure 15 – Localisation intracellulaire de formines de mammifère. (Reproduction de D. Breischper et B.L. Goode, 2013. Réalisée avec BioRender).

Cette participation des formines dans des ultra-structures fonctionnelles centrales de la cellule place inéluctablement ces dernières comme des actrices clefs de nombreux processus physiologiques, comme cela a pu être évoqué dans la revue « Formins at a glance. »¹⁸³ de D. Breitsprecher et B.L. Goode. On relève, par exemple, l'importance des formines FMNL1 dans

la motilité des lymphocytes T¹⁸⁴, de zDia2 dans la gastrulation¹⁸⁵ ou bien de DAAM1 dans la morphogénèse du cœur¹⁸⁶.

Le rôle essentiel des formines à l'échelle cellulaire, mis en évidence dès les années 90, a contribué à l'émergence d'études structurales des formines à l'échelle moléculaire dans le début des années 2000.

3.2. Les formines à l'échelle moléculaire.

Au regard des premières études réalisées, l'état d'oligomérisation de l'unité fonctionnelle de la formine n'était pas clairement identifié initialement. En effet, une tendance notable de la formine Bni1p à former des tétramères avait pu être observée dans un premier temps¹⁸⁷, et par la suite, des trimères, tétramères et autres oligomères ont pu être observés avec la formine INF2¹⁸⁸. Néanmoins, les études biochimiques et structurales s'accordent aujourd'hui sur le fait que l'unité fonctionnelle canonique de la formine se compose d'un homodimère.

La séquence d'une formine comporte ainsi plusieurs domaines protéiques dont deux régions de dimérisation (**Fig. 16.A**). Parmi l'ensemble des domaines fonctionnels, on note deux domaines omniprésents, fédérant la super-famille des formines : les domaines **FH2** et **FH1** (*Formin Homology Domain 1/2*). Si le domaine **FH2** est présent dans la totalité des formines, il existe une exception en ce qui concerne le domaine **FH1**, absent de la formine ForC¹⁸⁹ du *Dictyostelium Discoideum* (mycétozoaire).

Les domaines **FH1** et **FH2**, lorsqu'ils sont tous deux présents, se retrouvent accolés dans la séquence peptidique et encadrés par d'autres domaines variables qui modulent l'activité et la localisation de l'isoforme considéré (**Fig. 16.A**). On dénombre des dizaines de combinaisons de ces domaines avec notamment quinze séquences de la famille des formines identifiées chez l'Homme ou chez la souris (**Fig. 14**) et deux chez *Saccharomyces Cerevisiae*. La plus grande famille des formines regroupe les formines DRFs (*Diaphanous Related Formins*) telle que mDia1, la formine de souris étudiée dans ce projet de thèse. On y retrouve également la formine Bni1p de *Saccharomyces Cerevisiae*, formine largement étudiée dans la littérature. Cette famille de formine se distingue par la composition de sa région N-terminale qui regroupe dans l'ordre le domaine **GBD** (*rhoGTPase Binding Domain*), le domaine **DID** (*Diaphanous Inhibitory Domain*), le domaine **DD** (*Dimerization Domain*) et un domaine en superhélice **CC** (*Coil-coiled Domain*). De l'autre côté, la région C-terminale accueille le domaine **DAD** (*Diaphanous Autoregulatory Domain*) (**Fig 17.A**).

Dans les paragraphes suivant je m'efforcerais de décrire l'ensemble des domaines protéiques énumérés ci-dessus du point de vue de leur structure, de leur interaction et de leur fonction.

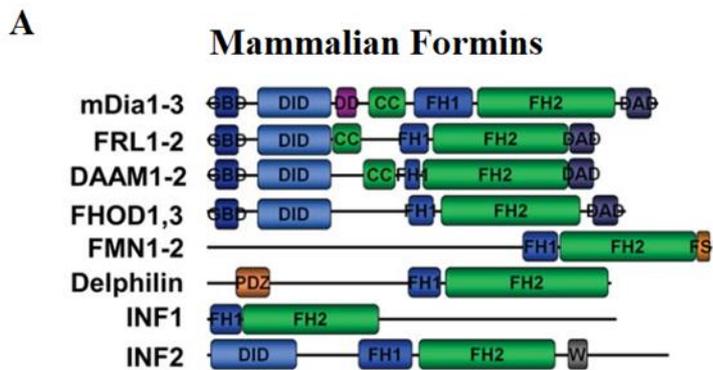
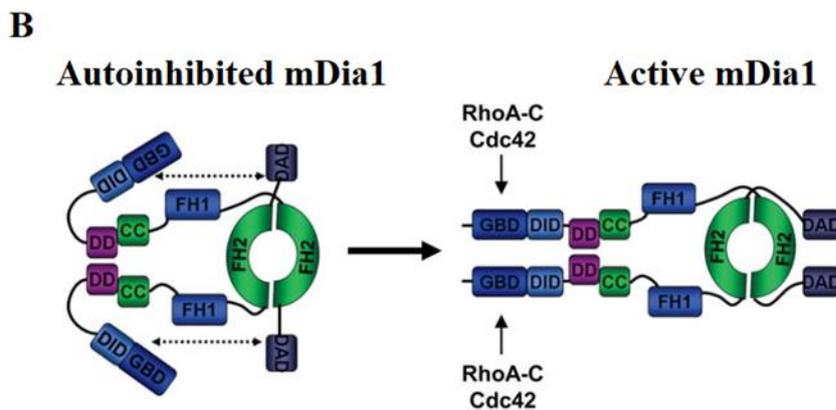


Figure 16 – A. Représentation multi-domaines de diverses formines de mammifères B. Schéma représentatif de la formine mDia1 dans ses états autoinhibé (gauche) et activé (droite) (Adapté de K.G. Campellone, M. D.) Welch, 2010)



A. Domaine FH2.

Le domaine FH2 est le domaine protéique principal des formines dans le sens où il assure l'interaction directe de ces dernières avec l'actine globulaire ou fibrillaire. Ce domaine protéique se compose essentiellement d'hélices α . Malgré d'importantes variations dans les séquences des domaines FH2 existants, le repliement caractéristique de ces domaines sous la forme de bâtonnets courbés d'environ 40 kDa¹⁹⁰ s'avère être largement conservé. Ce repliement offre une géométrie toute particulière à un assemblage anti-parallèle d'un dimère de FH2 sous la forme d'un anneau d'environ 9 nm de diamètre (**Fig. 17.A**). Une telle configuration permet au dimère de FH2 de retenir des sous-unités d'actine en son sein. Cette modalité d'interaction apparaît primordiale pour la fonction des formines. Ainsi, l'ensemble des acides aminés assurant la dimérisation et l'interaction des domaines FH2 avec l'actine est plus significativement conservé en comparaison au reste de la séquence peptidique des formines¹⁷². Ces acides aminés clés se répartissent selon quatre motifs du domaines FH2 : le sous-domaine « knob », le sous-domaine « linker », le sous-domaine « lasso » et le sous-domaine « post ». Diverses structures

de domaines FH2 cristallisés seuls ou en présence de tétraméthylrhodamine-actine mettent en évidence l'importance de ces sous-domaines^{190,15,191,192,193,194} (**Fig. 17**). La tétraméthylrhodamine-actine utilisée pour ces expériences altère la capacité de l'actine à polymériser sous la forme d'un filament dont la symétrie n'est pas compatible avec le processus de cristallisation^{195,196}.

Dans ces structures, les corps des domaines FH2 en « bâtonnets courbés » constitués de superhélices (*coil-coiled*) exhibent les sous-domaine « knob » et « post » à leurs extrémités N-terminale et C terminale. Le sous-domaine « knob » est prolongé par le sous-domaine « linker ». À la suite de ce sous-domaine « linker » on trouve le sous-domaine « lasso » qui s'enroule sur un motif du sous-domaine « post » d'un second héli-dimère. Cette liaison est assurée par des résidus aromatiques du sous-domaine « lasso » venant s'insérer dans une poche hydrophobe du sous-domaine « post ». (**Fig. 17.A**)

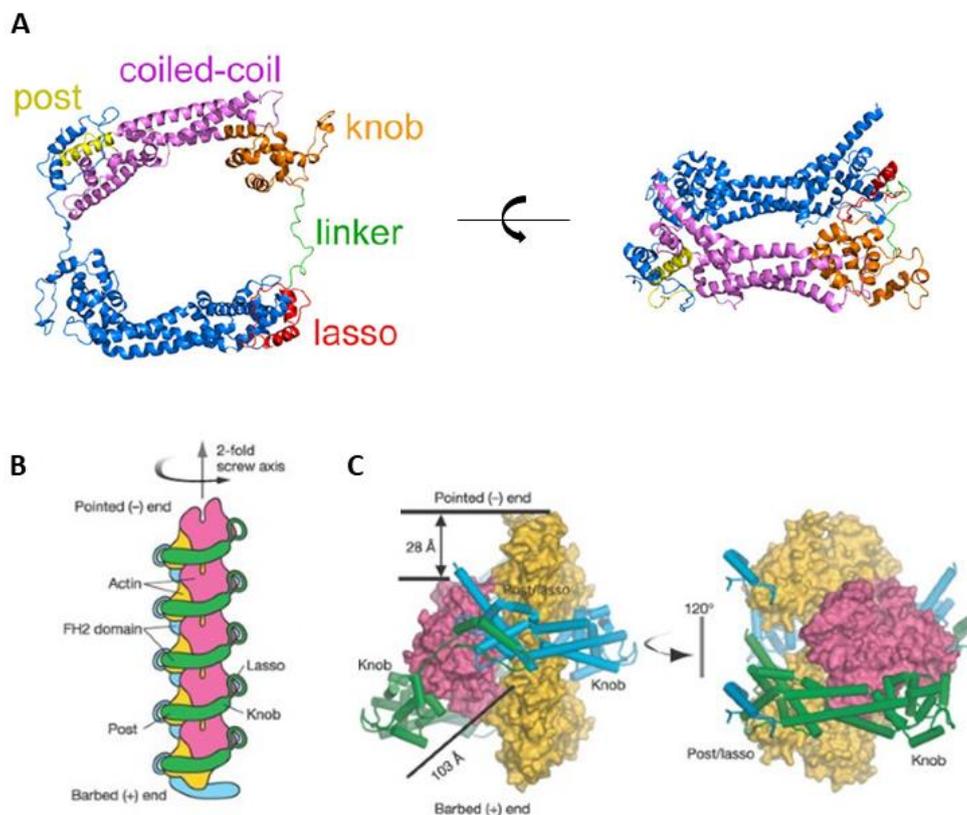


Figure 17 – A. Modèle atomique du dimère FH2 de Bni1p (PDB : 1Y64, Otomo et al., 2005, Dynamique moléculaire : Baker et al., 2015, Représentation : Naomi Courtemanche, 2018). B. Représentation de l'empilement cristallin obtenu par co-cristallisation de FH2 de Bni1p et de TMR-actine. C. Structure atomique sous différents angles d'un trimère d'actine encerclé par deux domaines FH2 dans le contexte cristallin. (B, C : Otomo et al., 2005)

Les trois sous-domaines « linker », « lasso » et « post » participent ainsi à la dimérisation des domaines FH2 dans un mode antiparallèle. Le sous-domaine « linker » situé en position central

dans cette interaction dimérisante, offre, de par sa flexibilité, une liberté de mouvement relative entre les deux héli-dimères qui composent la formine. En effet, dans des structures où les deux domaines FH2 apparaissent rapprochés, le sous-domaine « linker » peut présenter une structuration partielle sous la forme d'une hélice α chez Bni1p ou d'un feuillet β chez Daam1^{193,194} tandis que dans des structures où les domaines FH2 sont plus éloignés, ce sous-domaine apparaît étendu ou désordonné^{15,192}. Le sous-domaine « linker » rend ainsi envisageable une mobilité « pas à pas » de deux domaines FH2 à l'extrémité barbée d'un filament d'actine en élongation. Des études biochimiques montrent que la structuration et la longueur de ce domaine « linker » sont directement corrélées à cette capacité processive du dimère de formine. Des constructions chimériques remplaçant les sous-domaines « linker » de Bni1p par des séquences de tailles différentes montrent que le taux de dissociation de la formine est directement proportionnel à la taille de son sous-domaine « linker »^{19,197}. En outre, des mutations neutralisant la formation du feuillet β chez Daam1 favorisent l'élongation des filaments d'actine par la formine^{193,197}.

En parallèle, l'interaction de l'actine avec l'anneau formé par les domaines FH2 est assurée par les sous-domaines « post » et « knob ». Ces sous-domaines lient directement les monomères d'actine alors maintenus au centre de l'anneau¹⁹². Le dimère de FH2 pourrait ainsi stabiliser durablement des assemblages d'actine sous la forme de dimères ou de trimères autrement éphémères en solution. Ce mécanisme pourrait expliquer la nucléation active de nouveaux filaments d'actine opérée par les dimères de FH2. Le sous-domaine « knob », en particulier, présente des résidus basiques à l'origine d'interactions électrostatiques nécessaires dans ce mécanisme de nucléation mais dispensable dans le cadre d'un dimère de FH2 à l'extrémité barbée d'un filament d'actine¹⁸⁹. La nucléation d'un nouveau filament et la coiffe de l'extrémité barbée d'un filament préexistant semblent ainsi impliquer des interactions différentes bien que ces deux processus nécessitent tous deux le sous-domaine « knob ».

En 2005, Takanori Otomo et ses collègues sont parvenus à co-cristalliser des domaines FH2 de Bni1p en présence de TMR-actine. De manière inattendue l'empilement cristallin alors obtenu induit une configuration toute particulière avec des TMR-actines ordonnées selon des pseudo-filaments double brins (**Fig 17.B**). Dans ces pseudo-filaments, les monomères sont associés à travers une rotation de 180° et une translation de 28 \AA (**Fig. 17.C**) alors que ces paramètres sont respectivement de 166.7° et 27.5 \AA dans le filament d'actine classiquement observé. En outre

chaque pseudo-filament de cet empilement cristallin est encerclé par un ruban unique de domaines FH2 qui s'enroule continuellement selon le pas court du pseudo-filament d'actine (**Fig. 17.B**)¹⁵.

Un assemblage similaire de FH2 en interaction avec un filament d'actine a pu être observée *in vitro* par microscopie électronique avec la formine INF2¹²³. De même, des observations par microscope à force atomique ont également pu mettre en évidence une telle organisation chez INF2 en présence et en absence d'un filament d'actine au sein des domaines FH2¹⁸⁸. Néanmoins, dans ces observations, la distinction entre un ruban unique de FH2 ou un empilement de dimères de FH2 n'est pas évidente.

La structure cristalline obtenue par Takanori Otomo et ses collègues a offert des informations cruciales dans la caractérisation des interactions existantes entre un dimère de FH2 et un filament d'actine (**Fig 17.C**). On sait ainsi que le sous-domaine globulaire « knob » peut s'associer à proximité de l'interface intra-brin du filament, au sillon hydrophobe formé par le sillon 1/3 d'une sous-unité d'actine. Simultanément, le sous-domaine allongé « post » enroulé par le sous-domaine « lasso » s'associe via une interaction principalement électrostatique au niveau du sous-domaine 1 de l'actine, à proximité de l'interface inter-brin du filament d'actine^{15,191}. La force ionique en solution a alors une très forte influence sur le taux de dissociation des formines à l'extrémité barbée d'un filament d'actine en élongation avec une corrélation positive reliant ces deux paramètres¹⁹⁸.

Les domaines FH2 participent ainsi à la nucléation de nouveaux filaments d'actine et assurent la processivité des formines à l'extrémité barbée d'un filament en élongation. En parallèle, un second domaine phare des formines participe également à la nucléation et la stimulation de l'élongation des filaments d'actine : le domaine FH1.

B. Domaine FH1.

Le domaine FH1 est présent dans la quasi-totalité des formines mises en évidence jusqu'à présent. Ce domaine se compose de multiples segments riches en proline. Ces motifs riches en proline sont capables de fixer de la profiline complexée ou non avec de l'actine. Ces domaines FH1 permettent ainsi de stimuler la nucléation de nouveaux filaments d'actine en présence de profiline, ce qui n'est plus le cas lorsque seuls les domaines FH2 sont présents^{18,197}.

La fixation de complexes actine-profiline aux motifs riches en proline permettrait d'augmenter localement la concentration d'actine à proximité des domaines FH2. Lorsque les domaines FH2 se maintiennent à l'extrémité barbée d'un filament d'actine, leurs domaines FH1 chargés en actine-profiline pourraient ainsi favoriser l'ajout de nouvelles sous-unités d'actine à l'extrémité du filament, outrepassant la limite de diffusion de l'actine en solution^{199,14}. De multiples expériences de microscopie de fluorescence montrent ainsi une vitesse d'élongation des filaments d'actine décuplée en présence de profiline et de formine^{14,199,18,19,200,201,16}. La dépendance de cette vitesse d'élongation à la concentration en profiline est biphasique. La vitesse d'élongation augmente dans un premier temps au fur et à mesure que l'actine en solution est liée par de la profiline. Puis cette vitesse d'élongation diminue lorsque qu'un surplus de profiline entre en compétition avec les complexes actine-profiline pour la liaison des motifs riches en proline des domaines FH1²⁰².

Ces domaines FH1 observés parmi les formines ont des tailles très variables avec une séquence peptidique allant de 15 à 229 acides aminés et une proportion de segments riches en proline représentant entre 35% et 100% du domaine FH1²⁰³. On note alors une corrélation entre la quantité de segments riches en proline présents sur les domaines FH1 d'une formine et sa capacité à augmenter la vitesse d'élongation des filaments en présence d'actine-profiline¹⁸.

La propension des prolines présents dans les domaines FH1 à empêcher le repliement de la chaîne polypeptidique en des structures ordonnées laisse suggérer que ces domaines sont flexibles par parties²⁰⁴. Cette flexibilité rend permise l'existence d'un « anneau complexe » à l'extrémité barbée d'un filament d'actine coiffé d'une formine (**Fig. 18**)²⁰². Dans cette structure transitoire, le bras FH1 serait replié de sorte à amener un segment riche en proline à proximité du bout barbé du filament d'actine. Ce segment riche en proline serait fixé par une profiline, elle-même complexée avec une sous-unité d'actine. Cette dernière serait finalement incorporée sur l'extrémité barbée du filament d'actine. Une boucle fermée est alors formée par l'ensemble FH1-Profiline-Actine-FH2-(FH1).

Une étude mesurant le taux de dissociation de la formine au cours de l'élongation de filaments d'actine suggère que l'occurrence de cet état transitoire participe à maintenir le dimère de formine à l'extrémité barbée¹⁹⁸.

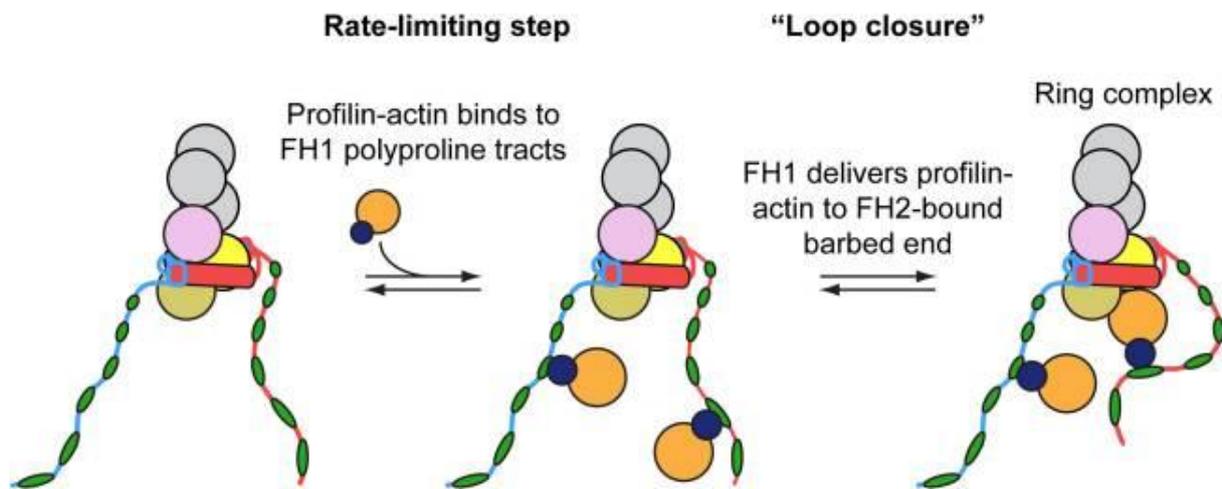


Figure 18 – Représentation graphique de l’extrémité barbée d’un filament d’actine coiffé d’une formine. Cinétique de formation d’un « anneau complexe » par l’un des domaines FH1. (Naomi Courtemanche, 2018)

D’autres domaines variés s’ajoutent aux domaines FH2 et FH1 enrichissant les modalités de régulation des formines, la palette de leurs protéines cibles et la nature de leurs activités.

C. Régions N/C-terminales.

La région N-terminale des formines de la famille des DRF s’articule autour d’un domaine de dimérisation DD. Ce domaine est prolongé par un domaine en super-hélice CC (*coil-coiled*) de son côté C-terminal et le domaine DID puis GBD de son côté N-terminal. La région C-terminale quant à elle abrite le domaine DAD. (**Fig. 16.B**)

Le domaine FH1 flexible situé en aval de la région N-terminale offre une large amplitude de mouvement entre cette première région et la région C-terminale. Ces deux régions peuvent ainsi se retrouver physiquement éloignées ou en interaction directe selon le contexte biochimique. Or, il se trouve que le couple DID/DAD de la chaîne polypeptidique incarne le système d’auto-régulation de la formine. En effet, le domaine DAD situé à proximité directe de l’anneau de FH2 est capable de lier le domaine DID de la région N-terminale ramenant cette dernière vers l’anneau de FH2 (**Fig 16.B**). Une telle disposition du complexe N-terminal entraîne l’obstruction stérique de l’interaction des domaines FH2 avec de l’actine^{205,168,206}. Cette configuration adoptée naturellement par les formines DRF assure l’auto-inhibition de la protéine. Pour lever cette autoinhibition la neutralisation de l’interaction DID/DAD est nécessaire. On peut citer les protéines de la famille Rho qui en se liant au domaine GBD voisin de DID participent à briser cette interaction DID/DAD entraînant une levée de l’auto-inhibition, bien que celle-ci reste partielle. Cette interaction participe à l’ancrage des formines à la membrane. Il a également pu être mis en évidence une interaction

des phospholipides avec la région N-terminale des formines mDia1/2 participant également à leur ancrage à la membrane^{207,208}.

Le domaine DAD, au-delà de participer à l'auto-régulation des formines, est capable de se lier à l'actine et ainsi d'assister les domaines FH2 à la fois dans la nucléation de nouveaux filaments²⁰⁹, et dans leur stabilisation à l'extrémité barbée polymérisante d'un filament d'actine²¹⁰. En outre chez certaines formines comme Cappucino le domaine DAD de la région C-terminale est remplacé par une queue capable de lier latéralement les filaments, loin des extrémités, via des interactions principalement électrostatiques²¹⁰. Ce mode d'interaction latéral avec le corps des filaments d'actine est également médié par les domaines FH2 de certaines formines comme chez FRL1, mDia2 ou AFH1^{211,212}. Un tel mode d'interaction permet à des isoformes de formine comme Bnr1 d'associer des filaments voisins sous la forme d'un fagot.

En outre, certaines queues C-terminales de formines comme celle de INF2 permettent de couper les filaments d'actine via une potentielle interaction déstabilisante du domaine C-terminal avec le sillon 1/3 des sous-unités d'actine du filament¹²³.

Enfin, il a pu être montré que pour des formines comme mDia2 le domaine C-terminal supporte également une interaction directe avec les microtubules⁷⁶.

Cette description structurale fine de l'interaction des formines avec l'actine, associée à des études biochimiques et biophysiques, ont permis l'échafaudage de modèles structuraux et cinétiques pour décrire l'activité processive des formines à l'extrémité barbée de filaments d'actine en élongation.

3.3. Modèles moléculaires de la processivité.

Dès l'année 2003, des études en microscopie de fluorescence ont permis de mettre en évidence la capacité d'une protéine recombinante, constituée des domaines FH1 et FH2, de coiffer durablement l'extrémité barbée des filaments d'actine tout en permettant l'ajout de sous-unités d'actine à cette même extrémité, bien que la vitesse d'élongation y soit réduite¹⁷⁰. Une seconde étude a démontré la capacité de cette coiffe processive des formines à protéger l'extrémité barbée de la liaison d'autres protéines de coiffe comme CapZ¹⁸⁷. L'expression « bouchon fuyant » avait alors été introduite en opposition avec les protéines de coiffes qui par leur fixation inhibent totalement l'élongation. En conséquence de ces observations, une marche « pas à pas »

des formines à l'extrémité barbée des filaments d'actine en élongation avait pu être évoquée pour expliquer la coiffe processive des formines¹⁴. L'année suivante, la structure de domaines FH2 de Bni1p sous la forme d'un dimère tête bêche connecté par des liens flexibles avait pu conforter le concept de marche « pas à pas ». Dans ce modèle, un domaine FH2 reste lié pendant que le second domaine FH2 se déplace plus loin sur l'extrémité barbée et ainsi de suite¹⁹¹.

A. Modèle à deux états : « marche enjambée »¹⁵.

La question des conformations adoptées par ce dimère de FH2 à l'extrémité barbée restait cependant très ouverte jusqu'en 2005 et la parution de l'article de Takanori Otomo et ses collègues¹⁵. La co-cristallisation des domaines FH2 de Bni1p avec de la TMR-actine avait en effet permis de proposer un modèle plus détaillé de cette marche processive. Bien que la structure atomique alors obtenue à travers l'empilement cristallin ne présentait ni dimère de formine, ni véritable filament d'actine, ni extrémité barbée à proprement parler, Takanori Otomo et ses collègues ont su élaborer un modèle astucieux décrivant la processivité des formines à l'extrémité barbée selon deux états caractérisés structuralement. Dans cette structure cristallographique chaque domaine FH2 est lié à deux monomères d'actine voisins (**Fig. 17**). Lorsque l'on considère deux domaines FH2 consécutifs, ce duo engage une interaction avec trois sous-unités d'actine, la sous-unité d'actine centrale étant partagée entre les deux domaines FH2 (**Fig. 19.A**). Les auteurs ont alors envisagé une réorientation de la région « linker » pointant vers l'extérieur du couple de FH2 pour que celle-ci viennent enrouler son domaine « lasso » autour de la région « post » libre du second domaine FH2 (**Fig. 19.A**). Alors que le domaine « linker » parcourt 40 Å dans sa position initiale, il devrait s'étendre sur une distance de 34 Å après une telle réorganisation, rendant cette dernière parfaitement envisageable. Un dimère de FH2 tête bêche serait alors créé à travers cette réorganisation, ramenant la structure observée à l'unité fonctionnelle de la formine en interaction avec trois sous-unités d'actine agencées selon la symétrie d'un pseudo-filament. Dans ce complexe, quatre domaines d'interaction actine/formine ont pu être identifiés. Deux domaines d'interaction pour les deux régions « post/lasso » du dimère de FH2 ainsi que deux domaines d'interaction pour les deux régions « knob ». L'importance de chacun de ces domaines de liaison dans la fonction de nucléation et la capacité processive du dimère de FH2 a alors pu être validée à travers la conception de mutants¹⁵.

Lorsque le complexe formé par le dimère de FH2 et les trois sous-unités d'actine est ramené au contexte de l'extrémité barbée d'un filament d'actine coiffée par un dimère de formine, plusieurs états peuvent être envisagés.

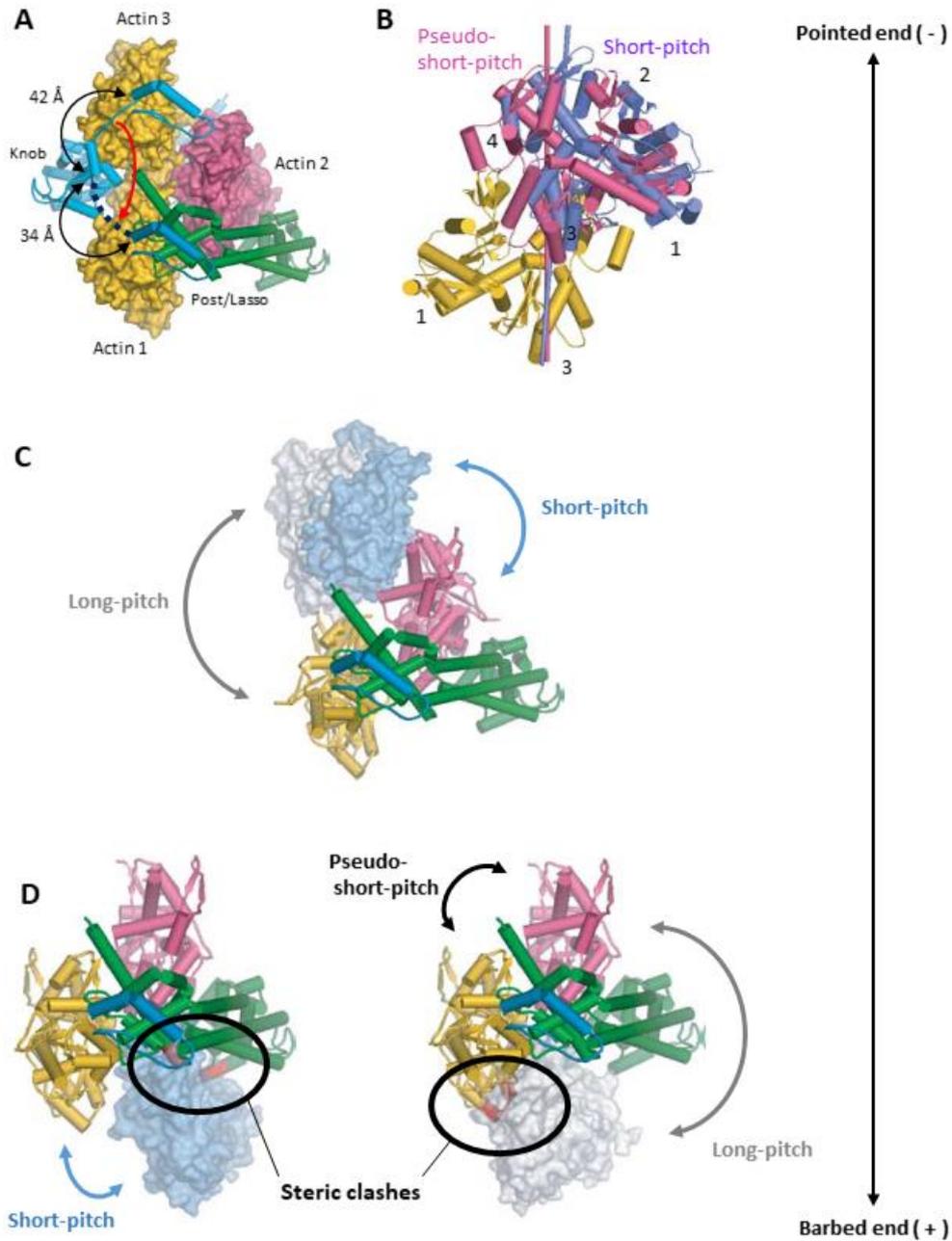


Figure 19 – A. Structure de trois sous-unités d'actine (jaune/rose) liées par deux domaines FH2 consécutifs (bleu/vert) agencés selon le modèle cristallin de Takatori Otomo : 1Y64. Le sous-domaine « linker » du domaine FH2 bleu peut être réorienté selon la flèche rouge pour reconstituer la topologie en anneau d'un dimère de FH2. B. Orientation relative des sous-unités d'actine selon celle observée dans le cristal 1Y64 (jaune/rose) et celle observée dans un filament d'actine classique décrit par Holmes (jaune/bleu). C. Positionnement d'un monomère d'actine au bout pointu d'un dimère d'actine du cristal 1Y64, complexé par un domaine FH2. Le monomère est orienté selon le pas long (blanc) ou court (bleu) du filament d'actine classique décrit par Holmes. D. Mise en évidence d'exclusions stériques lors du positionnement d'un monomère d'actine orienté selon le filament d'actine classique et ajouté au bout barbé d'un dimère d'actine du cristal, complexé par un domaine FH2. (Otomo et al., 2005)

État fermé

Dans le premier état envisagé par les auteurs, l'ensemble des quatre domaines de liaison du dimère de FH2 est occupé par les trois premières sous-unités d'actine du filament (**Fig. 19.A**). Dans cette conformation, l'ensemble des trois sous-unités d'actine en interaction directe avec les domaines FH2 est supposé être défini par un angulaire de 180° , observé au sein de la structure cristalline (**Fig. 19.B**). Cette configuration maximiserait ainsi les interactions avec les domaines FH2. Cependant, une telle configuration offre une très faible surface d'interaction entre les sous-unités d'actine qui est ici de 450 \AA^2 alors qu'elle est de 1700 \AA^2 dans les filaments d'actine classiquement observés. Cette configuration est donc supposée défavorable pour maintenir des oligomères d'actine en interaction.

L'interaction des sous-unités d'actine de l'extrémité barbée avec les domaines FH2 apparaît ici nécessaire pour stabiliser l'assemblage. Les sous-unités d'actine situées en amont du complexe formine - extrémité barbée et ne bénéficiant pas d'interaction supplémentaire avec les domaines FH2 sont donc supposément dans une configuration proche de celle de l'actine classiquement observée. Une telle orientation des sous-unités d'actine situées du côté pointu du complexe est permise que ce soit en se référant au pas court ou au pas long de la structure classique du filament d'actine (**Fig. 19.C**).

À l'inverse, une telle orientation des sous-unités d'actine du côté barbé du complexe n'est pas stériquement permise (**Fig. 19.D**). En effet, l'ajout d'un monomère d'actine selon l'orientation du pas court du filament serait prohibée stériquement par l'extrémité N-terminale du premier domaine FH2. De même, l'ajout d'un monomère d'actine selon l'orientation du pas long du filament serait prohibée stériquement par le sous-domaine « post » du premier domaine FH2. Cet état correspondant aux trois premières sous-unités d'actine du filament liées par le dimère de FH2 est ainsi considéré comme « fermé ». De fait, aucun monomère d'actine supplémentaire ne devrait pouvoir se maintenir à l'extrémité barbée ainsi présentée.

État ouvert

Un deuxième état dit « ouvert » a alors été envisagé. Dans cet état la première sous-unité d'actine de l'extrémité barbée précédemment observée est absente, laissant libre le domaine de liaison « post/lasso » du premier domaine FH2. Ainsi, lorsque l'extrémité barbée coiffée d'une formine se trouverait dans cet état, elle pourrait incorporer un monomère d'actine supplémentaire passant de l'état « ouvert » à l'état « fermé » précédemment décrit (**Fig. 20.A**). Il a alors

été proposé que l'extrémité barbée d'un filament d'actine coiffé par une formine peut alterner spontanément entre ces deux états « fermé » et « ouvert ».

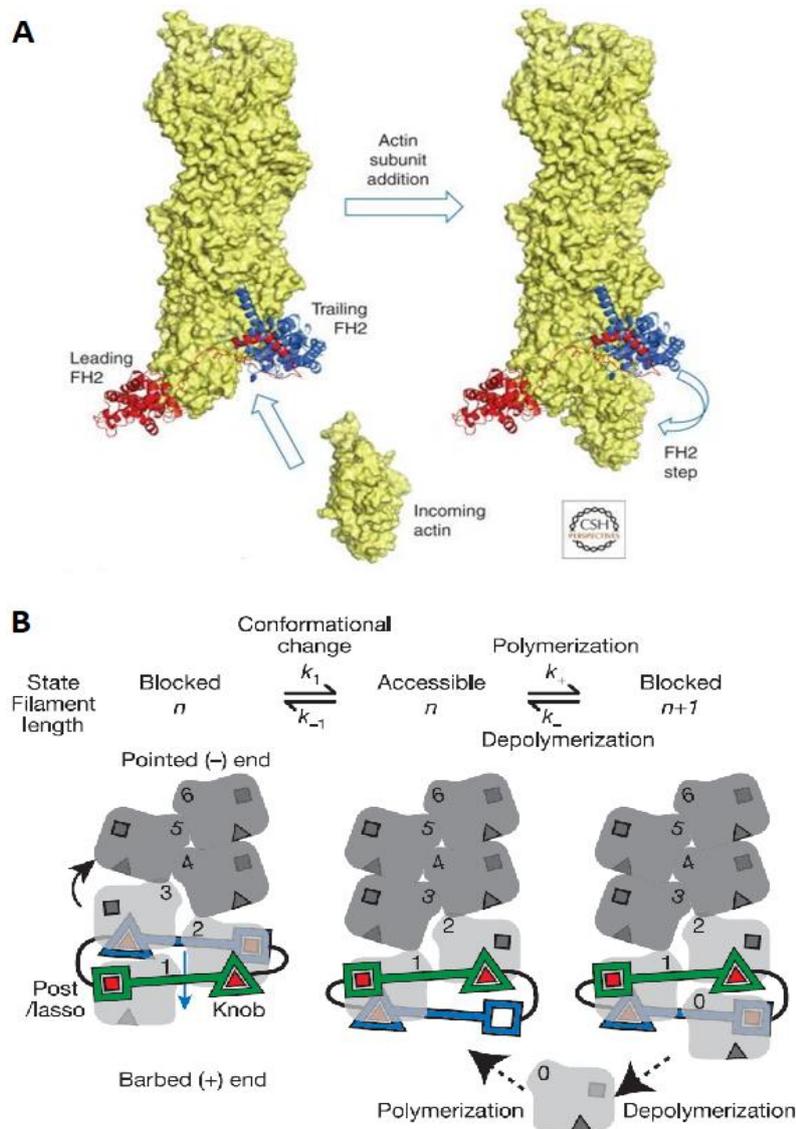


Figure 20 – A. Modèle de l'élongation d'un filament d'actine coiffé d'un dimère de formine, selon le mécanisme de la « marche enjambée » (actine : jaune ; FH2 : rouge/bleu, Thomas D. Pollard, 2016). B. Modèle cinétique de la « marche enjambée » (Otomo et al., 2005).

Modèle cinétique

L'alternance entre l'état « fermé » et « ouvert » s'opèrerait dans un premier temps à travers le repositionnement dynamique d'un des deux domaines FH2. Pendant que le premier domaine FH2 reste lié aux deux premières sous-unités d'actine de l'extrémité barbée, le second domaine FH2 lierait alternativement la troisième sous-unité d'actine en plus de la deuxième sous-unité d'actine de l'extrémité barbée, ou bien, uniquement la première sous-unité d'actine en exposant

au solvant sa région « post/lasso » (**Fig. 20.B**). Il existerait ainsi un équilibre dynamique entre « état fermé » et « état ouvert » à travers ce repositionnement continu du second domaine FH2. À l'incorporation d'un nouveau monomère d'actine dans l'état « ouvert », un nouvel équilibre dynamique s'établirait en intervertissant les rôles, fixe ou mobile, des deux domaines FH2. Ce modèle à deux états pourrait ainsi décrire la processivité des formines à l'extrémité des filaments d'actine²⁰². On parle ici du modèle de la « marche enjambée ».

Dans ce modèle aucun facteur externe ne déclenche le mouvement des domaines FH2. Le dimère de formine agit ici comme un cliquet brownien à l'extrémité barbée du filament d'actine¹⁵. En effet, la liaison alternée des domaines FH2 avec des monomères d'actine nouvellement incorporés permet l'avancée pas à pas du dimère à l'extrémité barbée en élongation. À l'inverse, un mouvement des domaines FH2 en direction de l'extrémité pointue est supposée thermodynamiquement défavorable car ce mouvement impliquerait une réorientation des sous-unités d'actine du filament nouvellement liées vers un pas angulaire de 180°. Cette configuration est énergétiquement moins favorable que celle existante dans les filaments d'actine classiquement observés. Or, cette reconfiguration ne serait pas compensée par une énergie de liaison supplémentaire d'un domaine FH2 initialement dissocié, comme c'est le cas lors de l'incorporation de nouveaux monomères à l'extrémité barbée.

Plusieurs hypothèses sont faites à travers ce modèle de la « marche enjambée ». Premièrement, il est supposé que le domaine FH2 partiellement dissocié ne perturbe pas stériquement la liaison d'un nouveau monomère d'actine. Deuxièmement, le pas angulaire de 180° adopté par les trois premières sous-unités d'actine de l'extrémité barbée ne prohiberait pas l'association d'un nouveau monomère d'actine. L'alignement imparfait des acides aminés entre le nouveau monomère et les sous-unités du filament d'actine dans cette configuration serait ici compensé par la nouvelle liaison générée avec la région du domaine FH2 initialement dissociée. Finalement, l'état « fermé » serait matérialisé par une exclusion stérique exercée par le domaine FH2 recouvrant l'extrémité barbée dans cet état.

Pour soutenir ce modèle de procession « pas à pas » des formines aux extrémités barbées en croissance, des expériences réalisées en microscopie polarisée ont permis d'observer un pas de rotation des domaines FH2 en adéquation avec la structure hélicoïdale des filaments d'actine²¹³.

Facteur d'ouverture

Le ralentissement de l'incorporation de nouveaux monomères d'actine aux extrémités coiffées de formines s'expliquerait par l'occurrence de l'état « fermé » évoqué précédemment. La fraction de temps qu'une formine coiffant l'extrémité barbée d'un filament d'actine passerait dans l'état « ouvert » dépendrait de son interaction avec cette extrémité barbée et donc de sa composition structurale¹⁵. L'importante différence observée entre chaque formine concernant le ralentissement de l'élongation des filaments d'actine coiffés a ainsi été interprétée comme une différence de la fraction de temps passé dans l'état « ouvert » pour chacune de ces formines¹⁹⁹. On parle de « facteur d'ouverture » auquel on associe la constante d'équilibre $K_{O/C}$ qui définit l'équilibre entre les états « ouvert » et « fermé ». Ce facteur d'ouverture a pu être évalué à une valeur de ~ 0.0 pour la formine Cdc12p, ~ 0.7 pour Bni1p et ~ 0.9 pour mDia1¹⁹⁹.

B. Modèle à deux états : « Saut enclenché ».

Bien que le modèle de la « marche enjambée » puisse décrire la cinétique d'élongation des filaments d'actine coiffés de formines observés *in vitro*²⁰², d'autres modèles s'appuyant également sur la structure de Takanori Otomo et ses collègues ont pu être proposés par la suite^{214,18}.

Dans ces autres modèles, la nature des états « fermé » et « ouvert » diffèrent de ceux de la « marche enjambée », de même que le facteur déclenchant la transition de l'un à l'autre.

En 2008, Aditya Paul et Thomas Pollard proposent un nouveau modèle à deux états en partant du principe que le repositionnement des domaines FH2 s'accompagne d'une probabilité accrue de dissociation des formines¹⁸. Après avoir observé que le taux de dissociation des formines aux extrémités barbées de filaments d'actine en élongation augmente avec la fréquence d'incorporation de nouveaux monomères, ils proposent que le repositionnement des domaines FH2 est directement corrélé avec l'incorporation d'un nouveau monomère d'actine. Ainsi, dans leur nouveau modèle, c'est l'incorporation d'un nouveau monomère d'actine qui déclenche ce repositionnement, ce dernier ne correspondant plus à un équilibre intrinsèque du complexe comme dans le cas de la « marche enjambée ».

Dans ce nouveau modèle dit du « saut enclenché » la nature des états « fermé » et « ouvert » diffère du modèle de la « marche enjambée ». Entre chaque incorporation de nouveaux monomères d'actine, le dimère de FH2 est supposé être constamment en interaction avec les trois

premières sous-unités de l'extrémité barbée. Les auteurs proposent alors qu'il existe une oscillation de l'orientation de ces trois premières sous-unités d'actine qui varie entre une configuration « fermée » correspondant à un pas angulaire de 180° et une configuration « ouverte » cor-

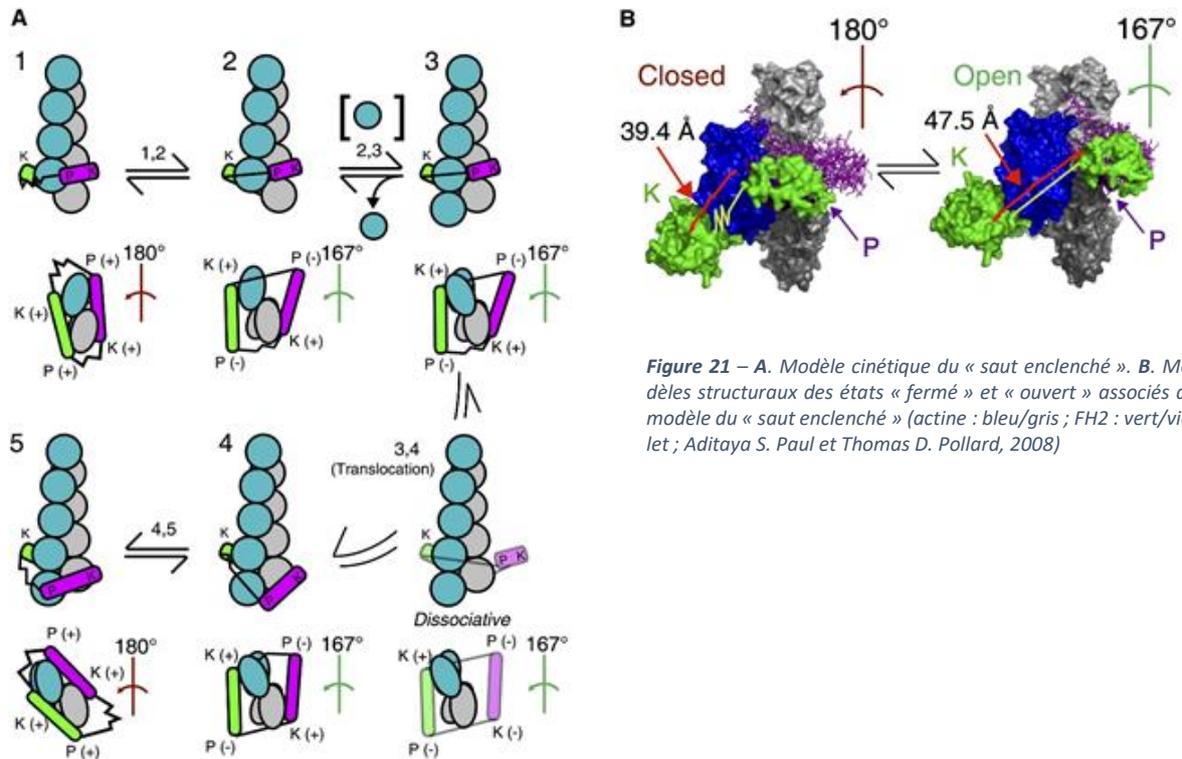


Figure 21 – A. Modèle cinétique du « saut enclenché ». B. Modèles structuraux des états « fermé » et « ouvert » associés au modèle du « saut enclenché » (actine : bleu/gris ; FH2 : vert/violet ; Aditaya S. Paul et Thomas D. Pollard, 2008)

respondant au pas angulaire de 167° classiquement observé dans les filaments d'actine (**Fig. 21.B**).

Dans cet état « ouvert » l'interaction entre les domaines FH2 et les sous-unités d'actine sont plus laches tandis que l'un des domaines « linker » du dimère de FH2 se retrouve étiré (**Fig. 21.A-B**). Les auteurs associent alors une énergie de liaison du dimère de FH2 avec l'actine moins favorable dans cette configuration tandis que l'énergie d'interaction entre sous-unités d'actine est supposée plus favorable avec un pas angulaire de 167° . En outre, les auteurs supposent que l'agencement des sous-unités d'actine selon un pas angulaire de 180° , l'orientation qui permet une relaxation énergétique du complexe actine-formine, n'est adoptable que par les sous-unités d'actine situées juste à l'extrémité du filament, celle-ci étant moins contraintes.

Il a alors été proposé que lors de la liaison d'un nouveau monomère d'actine à l'extrémité coiffée du filament d'actine ayant adopté la configuration « ouverte », seul le repositionnement rapide du dernier domaine FH2 vers les premières sous-unités d'actine de l'extrémité peut permettre la relaxation énergétique du complexe actine-formine grâce à une ré-orientation vers un pas angulaire de 180° de ces sous-unités nouvellement liées. On comprend ainsi le mécanisme

par lequel la liaison d'une nouvelle sous-unité d'actine pourrait déclencher le repositionnement d'un domaine FH2 selon le modèle du « saut enclenché ».

Pour résumer, dans le modèle de la « marche enjambée », les états « fermé » et « ouvert » se distinguent par un repositionnement dynamique d'un des deux hémidimères FH2 au bout barbé. L'état ouvert correspond alors à une dissociation partielle du premier domaine FH2 (**Fig. 22.A**). Dans le modèle dit du « saut enclenché », les deux états « fermé » et « ouvert » correspondent à deux torsions différentes de l'extrémité barbée en interaction avec le dimère de FH2. L'état ouvert correspond alors à une torsion proche de celle observée classiquement dans le filament d'actine (**Fig. 22.B**).

Ainsi, les deux états « ouverts » proposés par ces deux modèles présentent des conformations structurales radicalement différentes tandis que les deux états « fermés » restent similaires.

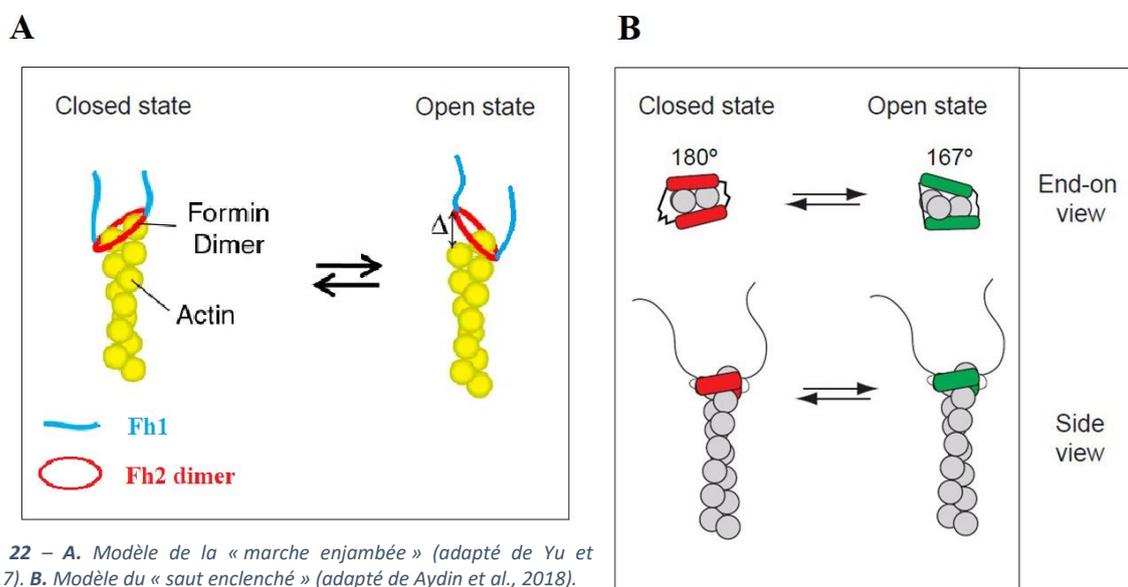


Figure 22 – A. Modèle de la « marche enjambée » (adapté de Yu et al., 2017). B. Modèle du « saut enclenché » (adapté de Aydin et al., 2018).

C. Modèles à deux états et au-delà.

D'autres études, notamment en dynamique moléculaire²¹⁵, ont pu proposer des versions ajustées des modèles à deux états. L'ouverture de l'état « fermé » pourrait correspondre à des fluctuations restreintes du domaine FH2 lié aux deux premières sous-unités de l'extrémité barbée, accompagné ou non de variations de la symétrie de l'extrémité barbée.

L'hypothèse d'un troisième état transitoire instable a également pu être proposée pour enrichir le modèle de la « marche enjambée » et ainsi prendre en compte l'augmentation du taux de dissociation des formines avec la fréquence d'incorporation des sous-unités d'actine^{198,192}.

Pour aller plus loin, plusieurs études ont pu montrer que l'application de forces sur des formines coiffant les extrémités barbées de filaments en élongation influence directement la vitesse de cette élongation^{216,16,201,17,217}. Ainsi, Guillaume Romet-Lemonne, Antoine Jégou (collaborateurs directs de cette thèse) et Marie-France Carlier ont pu montrer en 2013 que l'application d'une force de traction de l'ordre du piconewton sur les domaines FH2 de la formine mDia1 augmente significativement la vitesse d'élongation des filaments d'actine que ce soit en présence ou en absence de profiline¹⁶. Ces observations ont pu être interprétées dans le cadre du modèle de la « marche enjambée » avec une force de traction qui favoriserait la dissociation partielle du domaine FH2 tiré et donc l'état « ouvert ». Néanmoins, d'autres isoformes semblent suivre des comportements différents. Ainsi, bien que la formine Bni1p présente un comportement similaire à celui de mDia1 en présence de profiline, ce comportement s'inverse en l'absence de profiline avec un ralentissement observé de l'élongation en présence de force²⁰¹.

3.4. Projet de thèse.

Au regard de l'ensemble des informations obtenues ces vingt dernières années sur l'activité des formines à l'échelle moléculaire, de grandes avancées ont été réalisées sur la compréhension mécanistique et cinétique du fonctionnement de ces dernières. Néanmoins, depuis l'introduction des modèles de la « marche enjambée » et du « saut enclenché » il y a une quinzaine d'années, aucune expérience à ce jour n'a permis de trancher en faveur d'un modèle plus que l'autre²⁰³.

Si une grande partie des informations structurales à l'échelle moléculaires ont été apportées via des expériences de cristallographie, cette méthode présente des limites pour l'étude de l'extrémité barbée des filaments d'actine coiffés de formines. En effet, dans un premier temps, la périodicité intrinsèque des cristaux ne permet pas d'étudier des discontinuités tels que des extrémités de filaments. En outre, les contraintes de symétrie imposées par le processus de cristallisation ne permettent pas d'incorporer des filaments d'actines intacts au sein de cristaux 3D²¹⁸.

Une autre méthode de biologie structurale pourrait alors prendre la relève sur la cristallographie : la microscopie électronique⁸⁸. C'est ainsi que j'ai pu entreprendre durant ma thèse une étude par microscopie électronique des états conformationnels des formines adoptées durant l'élongation de filaments d'actine.

La forme mDial a été choisie pour cette étude. Cette forme affiche un facteur d'ouverture de l'ordre de 0.9^{199} ce qui suggère pour cet isoforme une surrepresentation de l'état « ouvert » vis-à-vis de l'état « fermé » lors de son interaction avec les extrémités barbées de filaments d'actine.

Une telle configuration facilitera alors la distinction structurale entre le modèle dit de « la marche enjambée » et le modèle dit du « saut enclenché » évoqués précédemment.

II. Matériels et Méthodes.

1. La Microscopie électronique en principe.²¹⁹

1.1. Des électrons plutôt que des photons.

Mis au point en 1931 par le physicien Ernst Ruska et l'ingénieur électrique Max Knoll²²⁰, le microscope électronique a la particularité de créer une image agrandie d'un objet à partir d'une source d'électrons, à la différence du microscope optique qui utilise une source de photons. Ainsi, si le principe général de la formation d'une image reste le même pour ces deux types de microscope, la nature des lentilles utilisées pour manipuler les faisceaux de photons ou d'électrons diffèrent, avec des lentilles en verre utilisées en microscopie optique contre des lentilles électro-magnétiques utilisées en microscopie électronique (**Fig. 23.A**). L'intérêt d'utiliser un faisceau d'électrons en tant que sonde de la matière réside dans le fait que les lentilles magnétiques développées permettent de travailler avec des électrons accélérés dont les longueurs d'onde sont de plusieurs ordres de grandeurs inférieures à celles associées aux photons du spectre visible. Or, s'il existe des sources d'émission de photons dont les longueurs d'onde sont largement inférieures à celles associées au spectre visible à l'exemple des rayons X, il n'existe pas de lentilles optiques capables de manipuler de tels faisceaux. Sachant que la résolution théorique d'une image obtenue à partir d'un faisceau de particules est du même ordre de grandeur que celui de la longueur d'onde associée aux particules du faisceau incident, on comprend l'avantage que présente l'utilisation d'électrons accélérés. Les microscopes électroniques accélèrent classiquement les électrons à travers des différences de potentiels de 100, 200, 300 kiloVolts ce qui équivaut à des électrons dont la longueur d'onde est de l'ordre du picomètre. Néanmoins, la résolution effectivement atteignable à travers un microscope électronique reste inférieure en raison des propriétés optiques limitées des lentilles magnétiques utilisées. On observe alors une limite de résolution inférieure à l'angström sur les microscopes électroniques en transmission.

1.2. Microscope électronique en transmission classique (MET) ou à balayage (METB).

Il existe deux modes d'imagerie en microscopie électronique en transmission : le microscope électronique en transmission classique (MET) et le microscope électronique en transmission à balayage (METB).

Dans le cas du **MET**, un faisceau parallèle d'électrons est transmis à travers l'échantillon à l'aide d'un système de lentilles condenseur. L'image de l'échantillon est alors reconstituée à partir des électrons transmis grâce à un système de lentilles objectif situé en aval de l'échantillon. L'image formée est finalement agrandie par un système de lentilles projecteur pour être enregistrée par un détecteur situé à la fin du trajet optique (**Fig. 23.A**). Le contraste de l'image résultante repose sur l'interaction locale des électrons avec les éléments constitutifs de l'échantillon. Dans le cas d'éléments lourds (ex : U), cette interaction peut entraîner l'absorption des électrons incidents ou la diffusion des électrons transmis à des angles élevés qui seront alors interceptés par le diaphragme objectif situé juste en aval du système de lentilles objectifs (**Fig. 23.A**). Dans ce contexte l'amplitude de l'onde électronique transmise au détecteur se retrouve localement réduite, on parle de contraste d'amplitude. Dans le cas d'éléments légers (ex : C,H,O,N), l'onde électronique transmise subit principalement un déphasage local qui entraîne lors de la formation de l'image finale des interférences à l'origine d'un contraste de phase.

Dans le cas du **METB**, le faisceau d'électron est focalisé en un point de l'échantillon par un système de lentilles situé en amont de celui-ci (**Fig. 23.B**). Le faisceau d'électron transmis est redirigé vers un détecteur qui mesure l'intensité du signal transmis puis amplifié. Le point de focalisation du faisceau d'électrons sur l'échantillon est séquentiellement déplacé grâce à des bobines de déflexion jusqu'à balayer l'ensemble de l'échantillon. Ainsi, chaque point de l'échantillon est associé à un signal transmis permettant à terme de reconstruire une image point par point de l'échantillon à travers un contraste d'amplitude. (**Fig. 23.B**).

Le **MET** a été le mode d'imagerie de routine tout au long de ma thèse. Néanmoins, une expérience réalisée avec un **METB** a également pu être menée en collaboration avec l'équipe de Yuichiro Maeda et Akihiro Narita du « Structural Biology Research Center » de l'université de Nagoya.

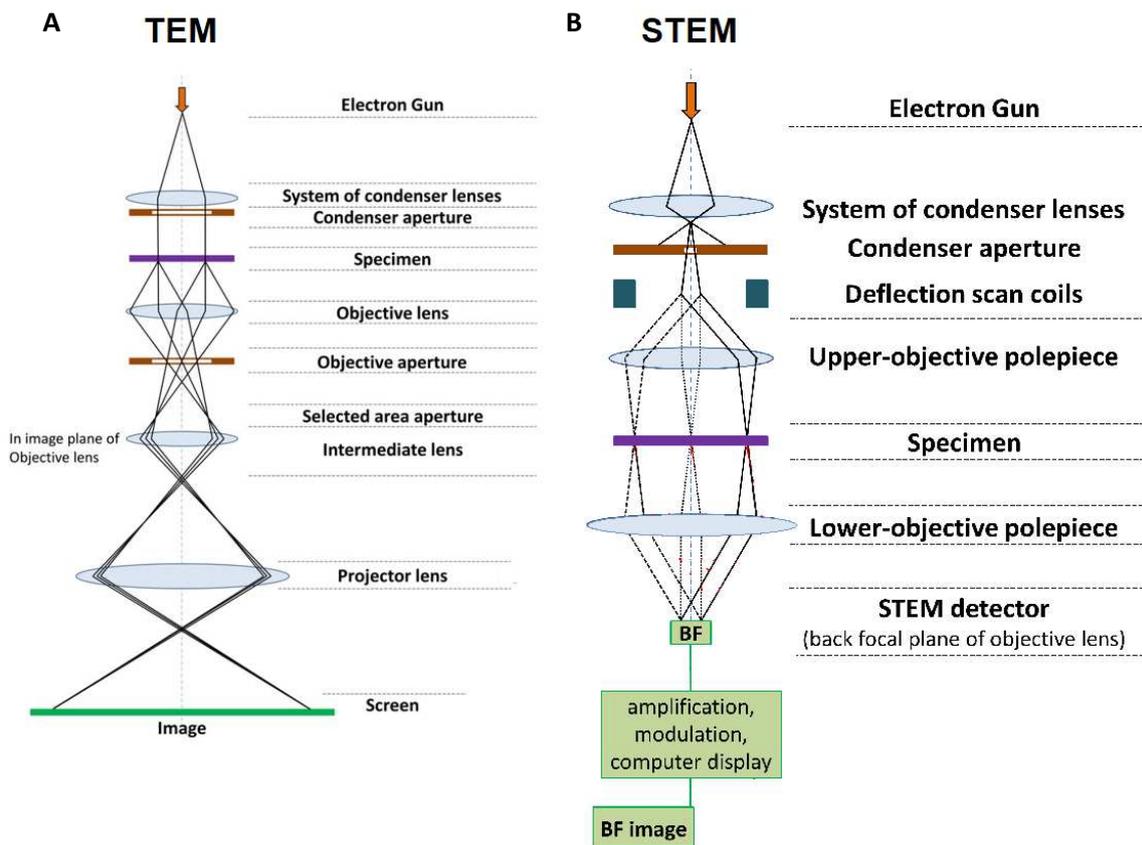


Figure 23 – A. Schéma de principe de la formation d'une image en TEM. B. Schéma de principe de la formation d'une image en METB. (tiré de <https://en.wikipedia.org/>)

1.3. Résolution spatiale et rapport signal sur bruit.

Bien que l'image formée par un microscope électronique en transmission contienne des informations structurales pouvant aller jusqu'à l'angström, la détermination de la structure d'une protéine par ces images avec une telle précision dépend en grande partie d'un autre facteur : le rapport signal sur bruit. En effet, lorsque les hautes fréquences spatiales associées à l'objet observé sont noyées dans le bruit, les structures fines de cet objet ne peuvent pas être déterminées. En biologie, la matière est principalement constituée d'atomes légers : carbone ($Z=6$), hydrogène ($Z=1$), azote ($Z=7$), oxygène ($Z=8$). Ces constituants introduisent un contraste limité vis-à-vis de leur environnement classiquement constitué d'eau. Ainsi, des astuces doivent être mises en œuvre pour améliorer le rapport signal sur bruit des protéines observées par microscopie électronique.

La première méthode permettant d'améliorer le rapport signal sur bruit est computationnelle. Dans cette approche, l'orientation de chaque protéine imagée est déterminée, puis, toutes les

protéines affichant la même orientation sont additionnées²²¹. On parle d'Analyse en Particule Isolée (*Single Particle Analysis*). Cette approche est décrite plus en détail dans les sections **7.3** et **7.4** où les deux programmes d'analyse d'image SPIDER et RELION qui ont été utilisés durant ma thèse sont décrits.

Dans ce contexte, la résolution qui pourra être obtenue dépend de multiples paramètres. Dans un premier temps on peut évoquer la densité massique de la protéine, qui peut varier selon les domaines de sa structure. Ce paramètre influe directement sur le rapport signal sur bruit des images brutes. Dans un second temps on peut évoquer la précision computationnelle du tri des particules orientées identiquement ainsi que de leur alignement les unes avec les autres. Dans un troisième temps, le nombre de particules orientées identiquement et moyennées influe directement sur l'augmentation du rapport signal sur bruit. Enfin, le dernier critère correspond à la variabilité structurale qui existe entre les protéines alignées et moyennées. Cette variabilité peut être due à des variations conformationnelles natives des protéines observées ou bien à une dégradation structurale d'une partie des protéines alignées.

La seconde méthode permettant d'améliorer le rapport signal sur bruit consiste à introduire des atomes lourds dans l'environnement direct des protéines observées. Dans cette approche un important contraste est créé entre les protéines qui interagissent faiblement avec le faisceau d'électrons incident et leur environnement comprenant des atomes lourds. On parle de coloration négative. Cette approche est décrite plus en détail dans la section **II.5.1**. Dans une approche par coloration négative, la résolution structurale est limitée la finesse de l'enveloppe d'atomes lourds épousant la silhouette des protéines. Ainsi l'approche par coloration négative est à double tranchant : si elle permet une amélioration significative du rapport signal sur bruit, cette méthode introduit également une limite sur la résolution des structures pouvant être obtenues avec une valeur limite de l'ordre de 20 Å²²².

1.4. Innovations techniques et technologiques en microscopie électronique.

Depuis l'invention du premier microscope électronique en 1931, le domaine de la microscopie électronique a connu de multiples avancées techniques et technologiques facilitant la détermination de structures protéiques complexes et repoussant la limite des résolutions structurales pouvant être obtenues.

Une avancée majeure dans le domaine de la microscopie électronique pour la biologie a été la mise au point dans les années quatre-vingt de la cryo-microscopie électronique²²³. Les électrons étant très sensibles aux molécules d'air, un vide poussé est nécessaire dans l'enceinte d'un microscope électronique en transmission. Cette contrainte limite l'introduction dans le microscope d'eau liquide constitutive de la majeure partie des échantillons biologiques. Ainsi, les échantillons biologiques avant l'avènement de la cryo-microscopie étaient systématiquement déshydratés et traités par coloration négative. Comme évoqué dans le paragraphe précédent, l'inconvénient d'un tel traitement est l'introduction d'une limite sur la résolution des structures pouvant être déterminées. L'astuce qui a alors été proposée est celle de vitrifier l'échantillon biologique avant son observation. Cette technique est décrite plus en détail dans la section **II.6.1**.

Le faible rapport signal sur bruit des images de microscopie électronique, et notamment de cryo-microscopie, s'est révélé être un défi central du domaine. Une avancée notable dans ce sens a été l'utilisation de nouveaux types de sources d'électrons plus brillantes que les sources initialement utilisées. Alors que les premières sources d'électrons reposent sur une émission purement thermoïonique, ces nouvelles sources d'électrons reposent sur une émission à effet de champs²²⁴. Dans le cas de l'émission thermoïonique, un cristal comme l'hexaborure de lanthane (LaB_6) est chauffé par un courant électrique pour en extraire des électrons qui seront accélérés par un champ électrique. Dans le cas de l'émission à effet de champs (FEG) utilisée par les dernières générations de microscope, les électrons sont extraits dans un vide poussé par l'intermédiaire d'un champ électrique. L'avantage de ce dernier type d'émission sur le premier, au-delà de sa brillance, est que la dispersion en énergie des électrons extraits ainsi que la dimension de leur zone d'émission sont bien plus limitées. Ces deux critères participent à réduire les aberrations chromatiques et spatiales qui nuisent à l'imagerie des microscopes électroniques.

Dans un second temps, une amélioration au niveau des détecteurs utilisés en microscopie électronique a pu être réalisée avec l'apparition de caméras à détection directe²²⁵. Les anciennes générations de détecteurs couplent des scintillateurs qui convertissent les électrons incidents en photons eux mêmes guidés par des lentilles ou des fibres optiques vers des capteurs CCD (« *dispositif à transfert de charges* ») ou CMOS (« *métal-oxyde-semiconducteur complémentaire* »). La nouvelle génération de détecteur s'affranchit de cette étape de conversion d'électrons en photons pour directement convertir les électrons transmis en un signal électrique exploitable. Ces détecteurs ont dû être modifiés pour supporter l'irradiation directe du faisceau d'électrons incident. De tels capteurs offrent une sensibilité et une vitesse d'acquisition qui permet lors de

l'acquisition de réaliser un film constitué d'une série d'images. La traversée du faisceau incident d'électrons chargés induit à son passage dans l'échantillon une dérive des protéines observées. Ce mouvement des protéines entraîne un floutage pour des images dont le temps d'acquisition est de plusieurs secondes. Un tel floutage masque le signal correspondant aux hautes fréquences spatiales des structures protéïques. Dans le mode d'acquisition par dose fractionnée permis par les caméras à détection directe, chaque image constitutive du film correspond à un temps d'acquisition de quelques dizaines de millisecondes. Ces images peuvent alors être alignées entre elles avant qu'une moyenne soit calculée. Ce procédé permet de prendre en compte le phénomène de dérive tout au long de l'acquisition et ainsi préserve le signal à haute résolution.

L'une des dernières avancées ayant facilité la détermination de structures protéïques par microscopie électronique a été réalisée du côté de l'analyse computationnelle. Une nouvelle méthode d'analyse des images de microscopie électronique a ainsi été implémentée introduisant une approche par inférence Bayésienne²²⁶. L'inférence Bayésienne est une méthode d'inférence statistique utilisée pour actualiser la probabilité d'une hypothèse à mesure que des informations supplémentaires sont disponibles. Ce cadre Bayésien offre une meilleure appréhension du bruit inhérent aux images de microscopie électronique avec une caractérisation plus robuste des variables cachées telles que l'orientation aléatoire des protéines imagées ou leur hétérogénéité structurale. En effet, alors que les approches computationnelles classiques comme SPIDER s'appuient sur une description déterministe de ces variables cachées, l'approche par inférence Bayésienne propose une description probabiliste de ces variables cachées. On obtient ainsi une caractérisation plus fiable du signal associé aux protéines imagées. Une telle approche est incarnée par le programme d'analyse d'image RELION (**RE**gularised **LI**kelihood **Optimisation**) détaillé plus loin.

2. Le filament d'actine à la lumière de la microscopie électronique.

2.1. Le corps du filament d'actine.

L'historique des structures de corps de filaments d'actine obtenues par microscopie électronique ces dernières décennies témoignent fidèlement des avancées qui ont été réalisées dans le domaine²¹⁸. La première enveloppe obtenue par cryo-microscopie électronique en 1990 par Milligan et ses collègues affichait une résolution de 25-30 Å²²⁷ (**Fig. 24.A**). Treize ans plus tard, une reconstruction d'un filament d'actine en complexe avec des myosines a pu être obtenue à une résolution de 13,8 Å²²⁸. Les avancées technologiques qui ont suivi en microscopie électronique ont permis de diviser cette résolution par deux en 2010 avec la détermination d'un filament d'actine seul à 6,6 Å de résolution⁵² (**Fig. 24.B**). L'avènement des caméras à détection directe a permis d'atteindre des résolutions de 3,7 Å en 2015 pour un filament d'actine en complexe avec de la tropomyosine, puis des structures de filaments d'actine à 3,1 et 3,0 Å de résolution respectivement en 2019²²⁹ et 2020²³⁰.

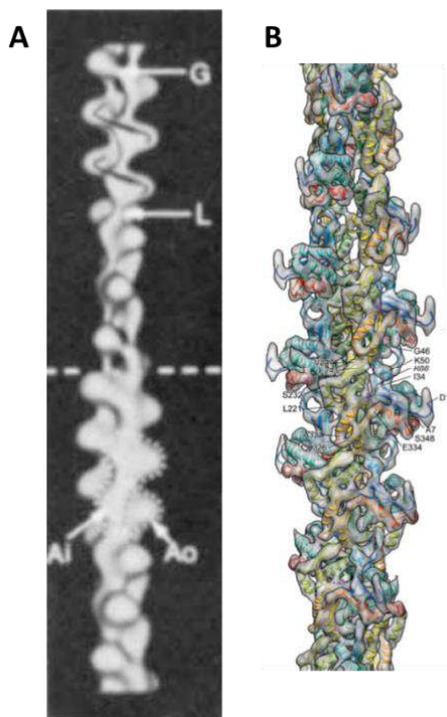


Figure 24 – A. Structure du filament d'actine à 25 – 30 Å de résolution, obtenue par cryo-microscopie électronique en 1990 (Milligan et al., 1990). B. Structure du filament d'actine à 6.6 Å de résolution obtenue en 2010 (Fujii et al., 2010).

L'amélioration de la résolution des structures de corps de filaments d'actine obtenues par cryo-microscopie électronique a permis d'obtenir de meilleures connaissances sur les interactions moléculaires qui se jouent au sein du filament d'actine. Ces avancées remarquables s'appuient non seulement sur une amélioration des instruments associés à la microscopie électronique

mais également sur l'optimisation des méthodes d'analyse computationnelle propres aux filaments hélicoïdaux. Ces méthodes tirent notamment profit de l'agencement répétitif de la double hélice du filament d'actine. Ainsi, chaque sous-unité d'actine d'un filament est considéré comme une particule à aligner et une moyenne peut être obtenue avec les autres sous-unités de son filament ou les sous-unités d'autres filaments. Cette moyenne intra- et inter-filament est guidée par la symétrie préalablement déterminée de l'agencement hélicoïdal du filament d'actine et permet de compenser le signal sur bruit faible inhérent aux images de microscopie électronique.

2.2. Les extrémités du filament d'actine.

L'approche computationnelle développée pour l'analyse du corps des filaments d'actine n'est plus exploitable pour l'étude des extrémités au niveau desquelles la symétrie hélicoïdale est interrompue. En outre, la cinétique de polymérisation des filaments d'actine observée n'est pas favorable à la génération d'une quantité importante d'extrémités pouvant être moyennées par la suite. En effet, comme évoqué dans la section **I.2.1**, la polymérisation des filaments d'actine en solution s'opère selon deux étapes : une nucléation lente suivie d'une élongation rapide. Ce contexte favorise la génération d'un nombre limité de longs filaments d'actine et par conséquent d'une densité faible d'extrémités.

Ainsi, bien que les extrémités des filaments d'actine, et notamment leurs extrémités barbées, représentent les régions clefs pour la compréhension de la dynamique des filaments, il n'existe à ce jour qu'une poignée de structures obtenues par microscopie électronique ayant pu apporter des informations structurales sur ces régions.

La première structure qui a pu être obtenue à ce sujet est l'extrémité barbée coiffée de la protéine CapZ. Cette structure a été déterminée par cryo-microscopie électronique en 2006 par l'équipe d'Akihiro Narita et Yuichiro Maeda à une résolution de 23 Å (**Fig. 25.A**)¹³⁹. Dans ce système, la protéine de coiffe CapZ offre l'avantage de neutraliser la dynamique des filaments d'actine aux bouts barbés ce qui favorise la génération d'une densité suffisante d'extrémités (**Fig. 25.C**). Pour déterminer cette structure les auteurs ont développé leur propre méthode d'analyse²³¹. Ils ont mis en place pour l'occasion un protocole permettant de déterminer la polarité des filaments afin de distinguer les extrémités barbées des extrémités pointues. Akihiro

Narita et Yuichiro Maeda ont pu par la suite réutiliser le système actine/CapZ pour déterminer la structure des extrémités pointues à une résolution de l'ordre de 20 Å (**Fig. 25.B**)⁸³.

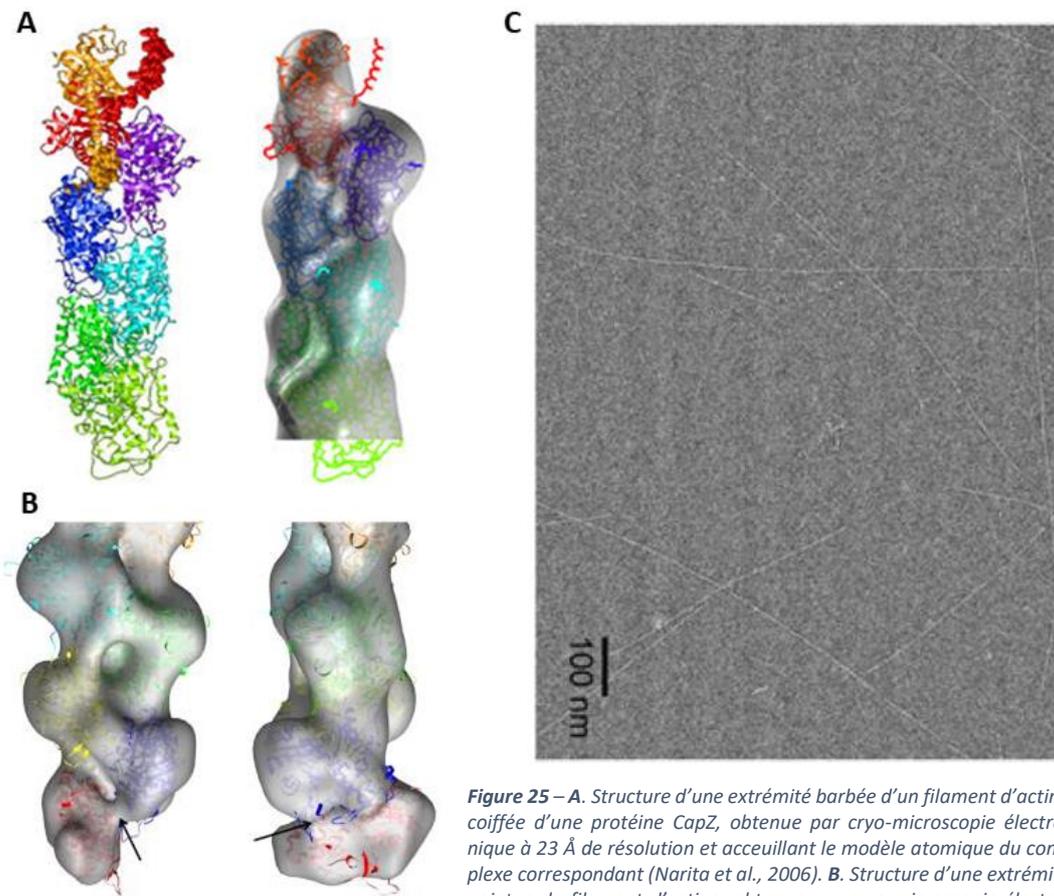


Figure 25 – **A.** Structure d'une extrémité barbée d'un filament d'actine coiffée d'une protéine CapZ, obtenue par cryo-microscopie électronique à 23 Å de résolution et accueillant le modèle atomique du complexe correspondant (Narita et al., 2006). **B.** Structure d'une extrémité pointue de filament d'actine, obtenue par cryo-microscopie électronique à 20 Å de résolution et accueillant le modèle atomique d'un bout pointu (Narita et al., 2011). **C.** Cryo-micrographie de filaments d'actine coiffés par la protéine CapZ à leur extrémité barbée (Narita et al., 2006).

En 2020, la protéine de coiffe a de nouveau été utilisée, cette fois pour neutraliser la dynamique de filaments d'actine générés par des complexes Arp2/3 préalablement activés par Dip1 (protéine de *S. Pombe*, appartenant à la famille des WHISH/DIP/SPIN)²³². Cette combinaison de protéines régulatrices neutralise efficacement la dynamique des filaments d'actine. Dans un premier temps les complexes Arp2/3-Dip1 stimulent la nucléation de nouveaux filaments avant de coiffer durablement leurs extrémités pointues nouvellement générées. Dans un second temps l'élongation des filaments nouvellement générés est rapidement arrêtée par la présence de protéines de coiffe qui viennent inhiber l'échange d'actine aux extrémités barbées. Ce cocktail de protéines permet de générer une densité importante de courts filaments d'actine. La densité d'extrémités observée par image est alors équivalente à la densité recherchée pour une « Analyse en Particule Isolée » classique (**Fig. 26.B**). En outre le poids moléculaire du complexe

compact formé par Arp2/3 et Dip1 étant supérieur à 300 kDa, il introduit un rapport signal sur bruit conséquent aux extrémités pointues des filaments. Ces conditions ont permis à l'équipe de Brad Nolen de déterminer la structure du complexe Arp2/3-Spin90-bout pointu à une résolution de 3.9 Å (**Fig. 26.A**).

On constate, au regard de ces différentes structures qu'un des critères ayant permis leur détermination est la neutralisation de la dynamique rapide des filaments d'actine, notamment à leurs extrémités barbées.

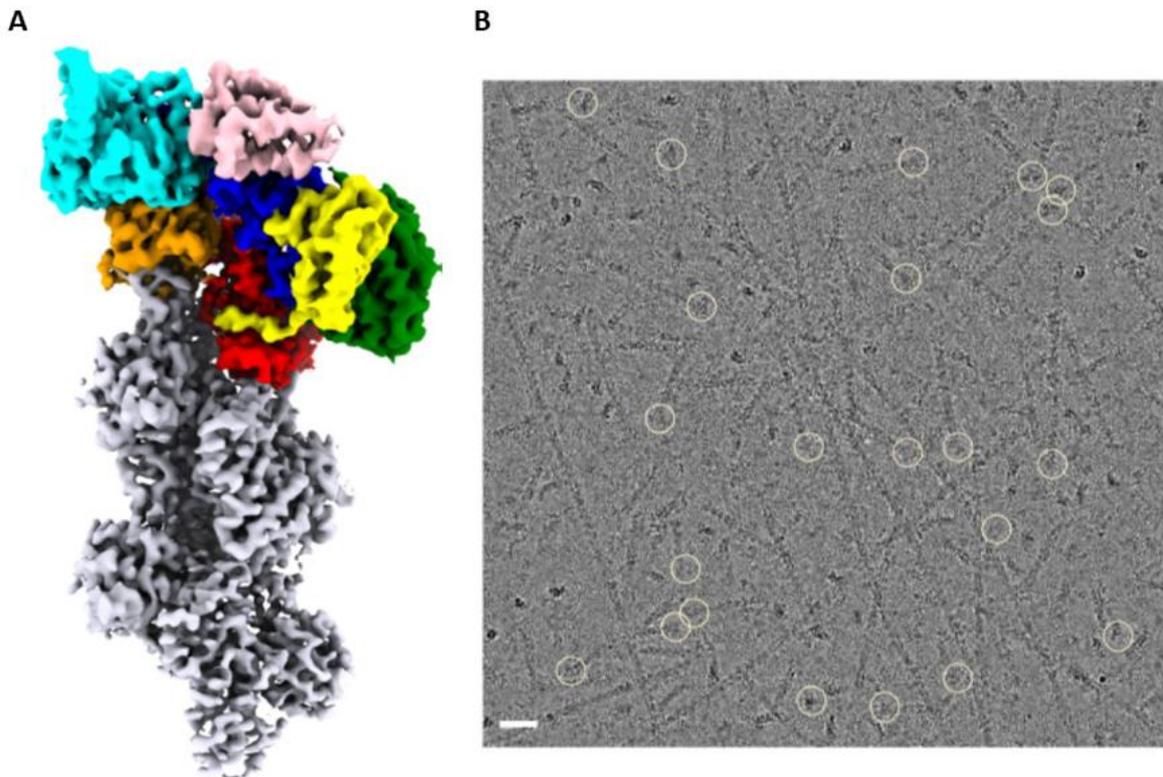


Figure 26 - A. Structure d'une extrémité pointue d'un filament d'actine (gris) coiffée du complexe Arp2/3 (bleu, rouge, orange, cyan, jaune, vert) – Dip1 (rose), obtenue par cryo-microscopie électronique à 3.9 Å de résolution. **C.** Cryo-micrographie de filaments d'actine liés par la protéine de coiffe à leur extrémité barbée et par le complexe Arp2/3-Dip1 à leur extrémité pointue. (Shaaban et al., 2020)

L'objectif de ma thèse étant de caractériser les conformations structurales adoptées par la forme durant l'élongation des filaments d'actine, une telle inhibition de la dynamique des extrémités barbées n'est pas envisageable.

En 2014, la structure d'une extrémité pointue coiffée de la protéine Arp2/3 avait pu être obtenue en coloration négative en s'affranchissant de la coiffe des extrémités barbées²³³. Dans cette expérience, les auteurs avaient utilisé des filaments d'actine stabilisés par de la phalloïdine. Ces filaments ainsi stabilisés sont mélangés en présence de complexes Arp2/3. Le mélange est ensuite soumis à des bains de sonication pour finalement être incubés une minute à température

ambiante avant leur dépôt sur grille de microscopie (**Fig. 27.D**). Une structure à une résolution de 35 Å avait pu être obtenue par la moyenne de sous-tomogrammes (**Fig. 27.A-C**).

Cette dernière expérience conforte la faisabilité de l'étude conformationnelle des formines aux extrémités barbées.

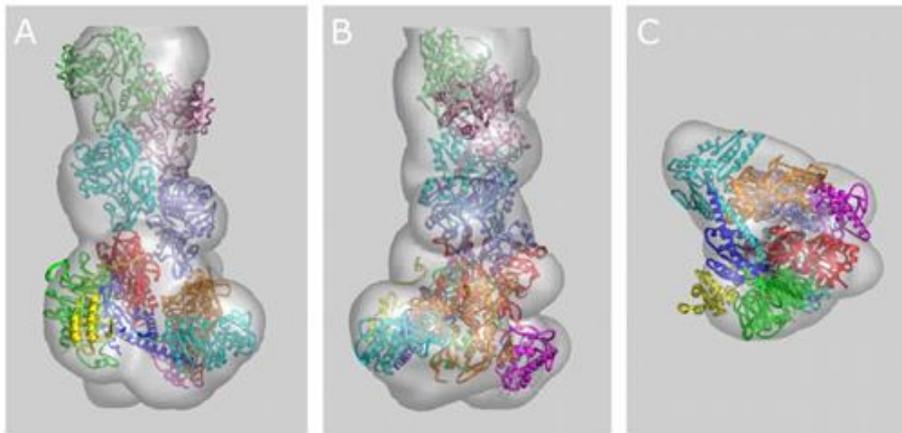
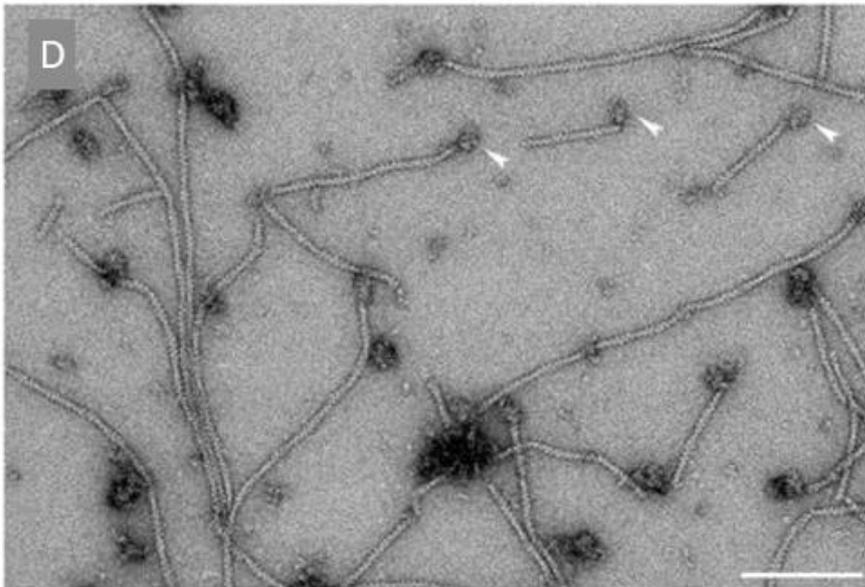


Figure 27 – A-C Structure d'une extrémité pointue d'un filament d'actine coiffée du complexe Arp2/3 et obtenue en coloration négative par moyennage de sous-tomogramme (résolution : 35 Å). Un modèle atomique du complexe Arp2/3 lié à l'extrémité pointue d'un filament d'actine est ajusté dans la structure. **B.** Micrographie de filaments d'actine coiffés de complexes Arp2/3 observés en coloration négative. (Volkman et al., 2014)



Néanmoins, trois paramètres apparaissent plus défavorables dans mon projet de recherche. Premièrement, les régions structurées des deux domaines FH2 devant être identifiées sur l'extrémité barbée des filaments d'actine présentent chacune un poids moléculaire relativement faible de 40-45 kDa, équivalent au poids moléculaire des sous-unités d'actine (42 kDa). Cette première observation rend l'identification de ces domaines aux extrémités barbées délicate. Deuxièmement, la phalloïdine utilisée pour stabiliser les filaments d'actine dans l'expérience présentée ci-dessus altère la structure hélicoïdale des filaments ce qui a priori interférerait avec l'activité des formines aux extrémités barbées. Troisièmement, la variabilité structurale des domaines FH2 positionnés à l'extrémité barbée des filaments d'actine limite le gain en rapport signal sur bruit obtenu par la moyenne d'un nombre donné de particules.

3. Protéines utilisées durant la thèse.

Les purifications d'actine et de formine mDia1 utilisées tout au long de ma thèse ont été assurées par l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » de l'Institut Jacques Monod (IJM), co-dirigée par nos collaborateurs directs Antoine Jegou et Guillaume Romet-Lemonne. On notera en particulier les contributions marquées de Bérengère Guichard, LuYan Cao et Sandy Jouet.

L'actine a été purifiée à partir de muscles de lapin. Les aliquotes obtenues ont été stockées en chambre froide, dans de la glace, en tampon-G non polymérisant : 5 mM TRIS pH 7.8, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 1mM DTT et 0.01% NaN₃. Dans ces conditions, l'actine se trouve solutée sous forme monomérique (actine-G globulaire).

La protéine recombinante mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) issue de souris a été exprimée en système E.Coli. Cette protéine a été purifiée à travers une chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés à travers l'étiquette Histidine (HisTrap) suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique (HiLoad 16/60 Superdex 200). Après purification les protéines ont été stockées à -80°C en tampon 50 mM Hepes pH 7.8, 200 mM KCl, 10% glycerol et 1 mM DTT. Cette protéine recombinante de formine est dépourvue de sa région N-terminale qui assure en temps normale son autoinhibition.

La construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) est ainsi nativement active. Le domaine SNAP de 20 kDa présent à l'extrémité N-terminale de cette protéine recombinante est utilisé par l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » pour son ancrage lors d'expériences réalisées en microfluidique. Les domaines FH1, FH2 et DAD représentent respectivement 18.5 kDa, 46 kDa, et 12 kDa.

La protéine recombinante nativement active mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His) a également pu être purifiée à l'Institut Curie par mes soins ou ceux d'Aurélien Bertin et de John Manzi. Cette purification a été entreprise suite à l'observation par microscopie électronique d'anciennes aliquotes (purification réalisée en 2011 par John Manzi) présentant a priori une bonne structuration sur grille de microscopie électronique. Le plasmide alors utilisé avait été donné à Julie Plastino par l'équipe de Laurent Blanchoin. La protéine a été exprimée en système E. coli. Cette protéine a été purifiée via deux chromatographies d'affinités réalisées à travers le domaine GST (26 kDa) et l'étiquette Histidine suivie d'une chromatographie d'exclusion stérique et/ou une ultra-centrifugation. Une étape supplémentaire de purification par chromatographie à

échange d'ions (MonoQ) avait pu être introduite sans succès. De même, l'insertion d'un domaine TEV dans la construction avait pu être réalisée par la plateforme BMBC afin de cliver les domaines GST qui pourraient favoriser l'agrégation des protéines en solution. Malheureusement, cette précaution avait été infructueuse avec un clivage apparemment inopérant.

D'autres protéines de liaison avec l'actine ont également pu être utilisées dans le but de contrôler la dynamique de la polymérisation des filaments d'actine.

Des complexes spectrine-actine ont ainsi été utilisés comme noyaux de nucléation pour la polymérisation des filaments d'actine. Ces complexes spectrine-actine ont été purifiés à partir d'érythrocyte humains puis stockés à -20°C en tampon 0.3 mM NaPO₄ pH 7.6, 0.1 mM PMSF, 2 mM DTT et 50% glycérol.

De la gc-globuline issue de plasma humain (Sigma-Aldrich) a été utilisée afin de neutraliser rapidement la réserve d'actine-G lors d'expériences en condition polymérisante d'actine. De même, de la tropomoduline de souris mTmod3 purifiée à l'IJM à partir d'un plasmide de chez Addgene a été utilisée. Cette protéine avait pour objectif d'occuper les extrémités pointues des filaments d'actine afin de limiter de potentiels raboutages de filaments. Dans le même but, des complexes Arp2/3 issus de cerveaux porcins (Tebu-bio) ont également pu être utilisés.

Enfin, dans le cadre de la caractérisation structurale du complexe ternaire formé par les protéines Spin90, Arp2/3 et mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His), la protéine Spin90 avait été obtenue par nos collaborateurs en partant d'une séquence nucléotidique de souris issue de la librairie I.M.A.G.E..

4. Préparation des échantillons pour des Analyses en Particule Unique.

L'objectif de ma thèse étant de déterminer les conformations structurales adoptées par la formine lors de l'élongation de filaments d'actine, l'ensemble des échantillons a été réalisé en condition polymérisante pour l'actine. Le tampon correspondant à cette condition est le tampon-F. Ce tampon contient 5 mM de TRIS à pH 7.8, 0.2 mM de mg-ATP, 1 mM de MgCl₂, 0.2 mM d'EGTA, 1 mM de DTT et une concentration en KCl de 20 mM, 50 mM ou 100 mM. Dans ces conditions, l'agent chélateur que représente l'EGTA favorise la substitution des dications

calcium initialement en interaction avec les monomères d'actine globulaire, au profit des dications magnésium. En effet, l'EGTA possède une affinité d'un ordre de grandeur supérieur pour les dications calcium en comparaison à son affinité pour les dications magnésium. En outre, l'ajout d'ions KCl augmente la force ionique en solution entraînant la polymérisation de l'actine. Dans ces conditions, les formines se fixent efficacement aux bouts barbés des filaments d'actine et traquent ces extrémités en élongation.

4.1. Formine, Arp2/3, Spin90.

La première étape de mon projet de recherche a été de caractériser structurellement par microscopie électronique les différentes constructions de formine utilisées durant ma thèse. Pour ce faire, les constructions mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) et mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His) ont été déposées sur grille de microscopie électronique rapidement après décongélation et dilution en tampon-F pH 7.0 - 7.8 (Tris, Tris-HCl), et à des concentrations de 100 - 400 nM. Les grilles réalisées présentant un bon contraste et une bonne répartition de protéines ont été sélectionnées pour étudier à travers des Analyses en Particule Unique les constructions correspondantes.

Dans le cadre de la caractérisation structurale d'un complexe ternaire formé entre Arp2/3 et mDia1, par l'intermédiaire de Spin90, des mélanges d'Arp2/3 incubé avec mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His), Spin90 ou les deux ont été réalisés en tampon-F, pH 7.8. Des concentrations élevées de protéines ont été incubées pour favoriser la formation de complexes (Arp2/3 : 220 nM ; DIP : 1000 nM ; mDia1 : 500 nM). Ces mélanges Arp2/3-Spin90, Arp2/3-mDia1 et Arp2/3-Spin90-mDia1 ont été dilués dix fois avant d'être déposés sur grille pour atteindre une concentration en protéines compatible avec une observation par microscopie électronique.

L'analyse structurale du mélange Arp2/3-Spin90 vise à confirmer la possibilité d'identifier dans les conditions d'imagerie la formation de complexes Arp2/3-Spin90. L'analyse structurale du mélange Arp2/3, Spin90, mDia1 vise quant à elle à mettre en évidence la formation du complexe ternaire Arp2/3-Spin90-mDia1. Enfin, l'analyse structurale du mélange Arp2/3, mDia1 vise à mettre en évidence l'absence de formation de complexes Arp2/3-mDia1 sans l'intervention de Spin90.

4.2. Densité élevée d'extrémités barbées : contrôle positif de la nucléation.

Comme évoqué dans la partie **II.2**, la difficulté de l'analyse structurale par microscopie électronique d'un complexe formé à l'extrémité barbée de filaments réside dans l'obtention d'un nombre conséquent d'images de ces d'extrémités d'actine (de l'ordre d'une dizaine de milliers en coloration négative et plus encore en cryo-microscopie électronique). L'enjeu ici est de trouver les conditions de réalisation des grilles de microscopie électronique telles que la densité de filaments d'actine adsorbés sur la grille soit élevée tandis que la taille de ces filaments reste limitée afin de ne pas encombrer le champ d'observation. À titre d'indication, une image à un grossissement de $\times 50\,000$ correspond à un champ d'observation de l'ordre de $1\ \mu\text{m}^2$ tandis que la constante d'association de l'actine est de l'ordre de $10\ \mu\text{M}^{-1}\ \text{s}^{-1}$ pour des sous-unités d'actine de dimension $\sim 6 \times 4 \times 4\ \text{nm}^3$. La mise au point de conditions optimales pour l'obtention d'une densité satisfaisante de bouts barbés a mené à un travail exploratoire où plusieurs stratégies, évoquées ci-dessous, ont été testées. Les observations résultantes sont présentées dans la partie **Résultats**, section **2**.

Afin d'éliminer de potentiels agrégats d'actine-G formés dans les solutions stocks, les aliquotes sont systématiquement centrifugées à $250\,000\ \text{g}$ pendant 45 minutes avant chaque expérience de polymérisation d'actine ou seul le surnageant est utilisé.

A. Nucléation reposant sur la formine.

La première approche mise en œuvre pour stimuler la nucléation d'un nombre important de filaments d'actine a été de s'appuyer sur la capacité nucléatrice des formines. Pour favoriser l'interaction des formines avec l'actine, une concentration élevée de formines ($500\ \text{nM}$) placées dans du tampon-**F** ont été mises en contact avec une quantité faible d'actine dont la concentration est augmentée progressivement. En pratique, la concentration d'actine en solution a été augmentée de $0.5\ \mu\text{M}$ toutes les 2 minutes jusqu'à atteindre une concentration finale de $5\ \mu\text{M}$. Cette concentration supplémentaire se situe juste au-dessus de la concentration critique mesurée pour un bout barbé coiffé de la formine mDia1 qui est de $\sim 0.4\ \mu\text{M}^{190}$. Le ratio final actine:formine utilisé ici est de 10:1. Le mélange est ensuite dilué dix fois pour être déposé sur grille de microscopie électronique.

B. Complexes de spectrine comme grains de nucléation.

Des complexes spectrine-actine ont été utilisés pour stimuler la nucléation des filaments d'actine. Ces complexes sont supposés être composés de courts oligomères d'actine réticulés par des tétramères de spectrine. Ces assemblages peuvent jouer le rôle de noyaux de nucléation d'actine²³⁴. L'avantage de l'utilisation de tels noyaux de nucléation est la coiffe de l'extrémité pointue des filaments d'actine par des complexes dont la structure est a priori reconnaissable. Cette configuration permet a priori d'écarter dès la première étape de l'analyse des extrémités pointues superflues pour l'étude des formines aux extrémités barbées.

L'approche envisagée ici afin d'obtenir une population dense de courts filaments d'actine sur les grilles de microscopie électronique est l'adsorption rapide de filaments créés, peu de temps après l'initiation stimulée de leur nucléation par les complexes spectrine-actine. En pratique, de l'actine-G est diluée à une concentration finale de 1 ou 2 μM dans une solution de tampon-**F** contenant 135 nM de formines et 150 pM de complexes spectrine-actine. Une série d'aspiration-expulsion vigoureuse est effectuée pendant 10 secondes à l'aide d'une micropipette P10. La solution de polymérisation est alors déposée sur grille de microscopie électronique.

Expérience de sélection des complexes spectrine-actine actifs

Au cours de ces expériences de nucléation stimulée, de nombreux complexes spectrine-actine apparaissent non branchés à des filaments d'actine sur grille de microscopie électronique. Une expérience visant à sélectionner les complexes spectrine-actine actifs a alors été réalisée.

Dans cette expérience, une aliquote de complexes spectrine-actine est dialysée pour retirer le glycérol en solution qui peut être néfaste pour la coloration négative (2h à 4°C avec 16 μL d'échantillon contre 2L d'une solution de tampon stock sans glycérol).

Une polymérisation de 1.5 μM d'actine est réalisée à température ambiante dans 20 μL de tampon-**F** en présence de 18.75 nM de complexes spectrine-actine (rapport 80:1).

Les filaments polymérisés sont dilués 10 fois afin d'atteindre un volume final adapté pour une ultracentrifugation. Une quantité de 0.17 μM d'actine (concentration critique de l'actine) est ajoutée en solution afin de limiter la dépolymérisation des filaments d'actine après dilution. Les filaments d'actine sont ultra-centrifugés durant 1h30 à 150 000 g afin de faire tomber ces derniers dans le culot. L'objectif ici est de faire tomber uniquement les complexes spectrine-actine qui se seraient accrochés aux filaments d'actine.

Après ultra-centrifugation, le surnageant est retiré et le culot est resuspendu dans du tampon-**G** afin de dépolymériser les filaments d'actine.

Une expérience de polymérisation d'actine à température ambiante est réalisée avec l'ajout en une fois de 0.2 mM d'EGTA, 1 mM de MgCl₂ et de 50 mM de KCl. Les filaments nouvellement polymérisés (~10 secondes) sont déposés sur grille de microscopie électronique pour être observés.

4.3. Densité élevée d'extrémités barbées : contrôle négatif de la longueur des filaments.

A. Maitrise électrostatique de l'élongation.

Au regard de l'article « Electrostatics Control Actin Filament Nucleation and Elongation Kinetics »⁷⁸ paru en 2013, une modulation de la cinétique de polymérisation des filaments d'actine a été entreprise à travers la variation de la force ionique ou du pH du tampon-F utilisé. Le premier paramètre permet de moduler l'écrantage des charges électrostatiques portées par les protéines en solution tandis que le second paramètre influence directement la valeur de ces charges électrostatiques en régissant l'état de protonation des acides aminés de ces protéines.

Dans un premier temps trois concentrations en KCl (20 mM, 50 mM, 100 mM) ont pu être testées à pH 7.8 (Tris-HCl).

Dans un second temps, trois valeurs de pH : 5.6 (MES), 5.9 (MOPS), 8.5 (Tris), ont pu être utilisées pour moduler la dynamique des filaments d'actine. Ces expériences de polymérisation ont été réalisées à une concentration de 50 mM de KCl et 2 µM d'actine en présence de 750 pM de complexes spectrine-actine ou 3 µM d'actine en l'absence de complexes spectrine-actine.

B. Découpage de filaments d'actine par sonication.

Une seconde approche a été envisagée pour réguler la densité et la taille des filaments d'actine déposés sur grille de microscopie électronique. Dans cette approche, des filaments d'actine amenés à leur état stationnaire sont générés à partir de 5-10 µM d'actine polymérisée pendant 30 - 60 minutes en tampon-F (50 mM KCl, pH 7.8). Ces filaments sont ensuite dilués 5 fois en tampon-F juste avant leur sonication. La dilution permet de réduire momentanément la réserve d'actine G en solution pour limiter temporairement la repolymérisation des filaments. La sonication réalisée à pour but de segmenter les longs filaments d'actine initiaux en de multiples morceaux pour créer une population importante de courts filaments.

C. Appareils de sonication.

Plusieurs appareils de sonication ont pu être testés au cours de ma thèse. Dans un premier temps, les filaments d'actine polymérisés ont été soumis à un bain de sonication pendant 30 à 180 secondes avec le sonicateur Branson Ultrasonic Bath (80W, 40 kHz).

Dans un second temps, les filaments d'actine polymérisés ont été soniqués à l'aide d'un sonicateur à sonde (Sonicator XL2020) équipé d'une pointe de 2 mm de diamètre et présentant une fréquence de 20 kHz avec une puissance de 600 Watts alors utilisée à 20% avec un paramètre d'amplitude de 3 (valeur indicative caractérisant l'amplitude des vibrations ultrasoniques à l'extrémité de la pointe). Pour limiter l'agrégation des protéines par échauffement de la solution, la sonication a été réalisée à travers 5 pulsations de 0.5 s de temps de sonication suivi de 3.5 s de temps de repos.

Dans un troisième temps, les filaments d'actine polymérisés ont été soniqués grâce à un sonicateur à sonde (Sonicator Vibracell 75041) équipé d'une pointe de 3 mm de diamètre et présentant une fréquence de 20 kHz avec une puissance de 750 Watts utilisée à 20%. La sonication a été réalisée à travers 10 pulsations de 0.1 s de temps de sonication suivies de 3.9 s de temps de repos. La surface de pointe plus large permet d'agrandir le volume traité et ainsi de réduire l'intensité de l'énergie transmise dans l'échantillon. Ce facteur permet théoriquement de mieux traiter l'ensemble de l'échantillon tout en limitant de potentielles agrégations des filaments dues à des pics de température localisés.

Après la dernière pulsation, de la formine est introduite en solution à une concentration finale de 100 - 200 nM. Un échantillon est prélevé après 20 secondes ou 1 minute d'interaction pour être déposé sur grille de microscopie électronique. Différentes concentrations en formine et différents temps d'interaction ont été utilisés ici afin de moduler le ratio d'extrémités barbées liées par des formines. Les formines sont ajoutées après sonication afin de préserver leur intégrité structurale. Des expériences de sonication en présence de formine avaient pu montrer sur grille de microscopie électronique la formation d'agrégats.

L'ajout de formines en solution et le prélèvement d'une fraction de l'échantillon sont réalisés grâce à un Hamilton de diamètre interne d'aiguille de 0.13 mm. Des échantillons de 500 μ L ont été utilisés pour les expériences de sonication. Une attention particulière a été portée sur l'immersion de la pointe du sonicateur (environ 1 cm) et sur l'absence de contact avec la paroi de l'ependorf contenant l'échantillon afin d'optimiser le transfert d'énergie vers l'échantillon.

Tout au long de la sonication, l'échantillon est immergé dans de la glace pour réduire l'échauffement.

D. Inhiber la reprise de l'élongation.

Après arrêt de la sonication, une redistribution de la taille des filaments d'actine vers de plus longs assemblages a pu être observée par microscopie électronique.

Cette redistribution de la taille des filaments pourrait avoir lieu au cours même de la sonication, notamment durant les temps de relaxation qui séparent chaque pulse. Un tel phénomène pourrait limiter la taille des plus petits filaments d'actine créés par sonication. Deux mécanismes pourraient être impliqués dans ce phénomène. Premièrement, les courts filaments créés pourraient se rabouter les uns aux autres pour s'assembler rapidement en de plus longs filaments²³⁵. Ce mécanisme entraînerait une diminution nette de la densité d'extrémités. Un tel mécanisme serait prépondérant pour des filaments courts diffusant rapidement en solution. Le second mécanisme qui expliquerait la redistribution en taille des filaments d'actine implique une dépolymérisation partielle ou complète de filaments d'actine soumis aux pulses de sonication²³⁶. Cette dépolymérisation qui augmenterait fortement la réserve d'actine monomérique disponible en solution participerait à une repolymérisation rapide des filaments d'actine restant en solution.

Pour tenter de prévenir cette redistribution rapide de la taille des filaments d'actines, plusieurs protéines régulatrices de l'actine ont été utilisées.

Ainsi j'ai pu évaluer la capacité de coiffe des extrémités pointues par les complexes spectrine-actine (750 pM), les complexes Arp2/3 (20 nM) ou la tropomoduline Tmod3 (1 μ M) dans le but de limiter le réallongement par raboutage des filaments d'actine au cours de la sonication.

D'autre part de la gc-globuline (300 nM) a été utilisée dans le but de neutraliser la réserve d'actine monomérique générée en solution durant les expériences de sonication.

5. Microscopie électronique en coloration négative.

Au vu des difficultés que peut présenter l'étude conformationnelle des formines aux extrémités barbées de filaments d'actine par microscopie électronique, un criblage par coloration négative a été réalisé dans un premier temps afin de déterminer les conditions adéquates de préparation des échantillons. Dans un second temps, une Analyse en Particule Isolée a été réalisée en coloration négative sur les échantillons d'intérêt identifiés.

En amont, les constructions de formine mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) et mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His) ont également pu être observées et analysées.

La coloration négative présente l'avantage d'être simple de réalisation, avec l'introduction d'un contraste important permettant d'identifier des densités de protéine autrement difficiles à observer par cryo-microscopie électronique.

5.1. Préparation des grilles de microscopie en coloration négative.

En pratique, les protéines solutées dans leur tampon sont adsorbées sur des grilles de microscopie électronique pour être traitées en coloration négative (**Fig. 28**). Les grilles utilisées sont des grilles commerciales. Ces grilles sont constituées d'un réseau de cuivre de 3 mm de diamètre recouvert d'une membrane de carbone. Le réseau de cuivre assure la stabilité mécanique de la membrane tandis que cette dernière laisse traverser le faisceau d'électron incident pour une observation par microscopie électronique en transmission.

La membrane de carbone est préalablement traitée par décharge ionisante via une exposition de 30 secondes et 1 mA d'intensité avec un *plasma cleaner*. Cette ionisation permet de rendre la membrane de carbone hydrophile et donc d'améliorer l'adsorption de l'échantillon humide. Ce traitement est systématiquement réalisé dans la demie-heure qui précède le dépôt des échantillons afin de préserver le potentiel hydrophile recherché.

Un volume de 4 μ l d'échantillon est ensuite déposé sur grille pendant 30 secondes, pour permettre l'interaction des protéines en solution avec la membrane carbonée. Une fois ce temps écoulé, le surplus de solution présent sur la grille est aspiré à l'aide d'un papier filtre Whatman® n°1 mis en contact avec la bordure de la grille. Cette aspiration permet de définitivement

adsorber les protéines sur la membrane carbonée. Un volume de 4 μl de colorant est aussi tôt déposé sur grille puis aspiré à l'aide d'un papier filtre. Un dernier volume de 4 μl de colorant est déposé pour une durée de 30 – 60 secondes avant que la grille ne soit définitivement déshydratée au contact du papier filtre. Etant donné la présence de sels d'atomes lourds dans la solution de colorant utilisée, ces dernières étapes permettent d'introduire des molécules très diffusante aux électrons tout autour des protéines préalablement adsorbées. On introduit ainsi un contraste d'amplitude par diffusion des électrons, entre les protéines et leur environnement local. En outre l'enveloppe de colorant déposée sur les protéines leur assure une meilleure résistance à l'irradiation par le faisceau d'électron du microscope ainsi qu'une stabilité structurale dans le vide poussé de l'enceinte du microscope. Néanmoins, l'un des risques d'un tel traitement (déshydratation en présence de sels d'atomes lourds) est la formation d'artéfact structuraux de part une trop forte interaction des molécules du colorant avec les protéines. Ce phénomène doit systématiquement être considéré lors d'une approche par coloration négative.

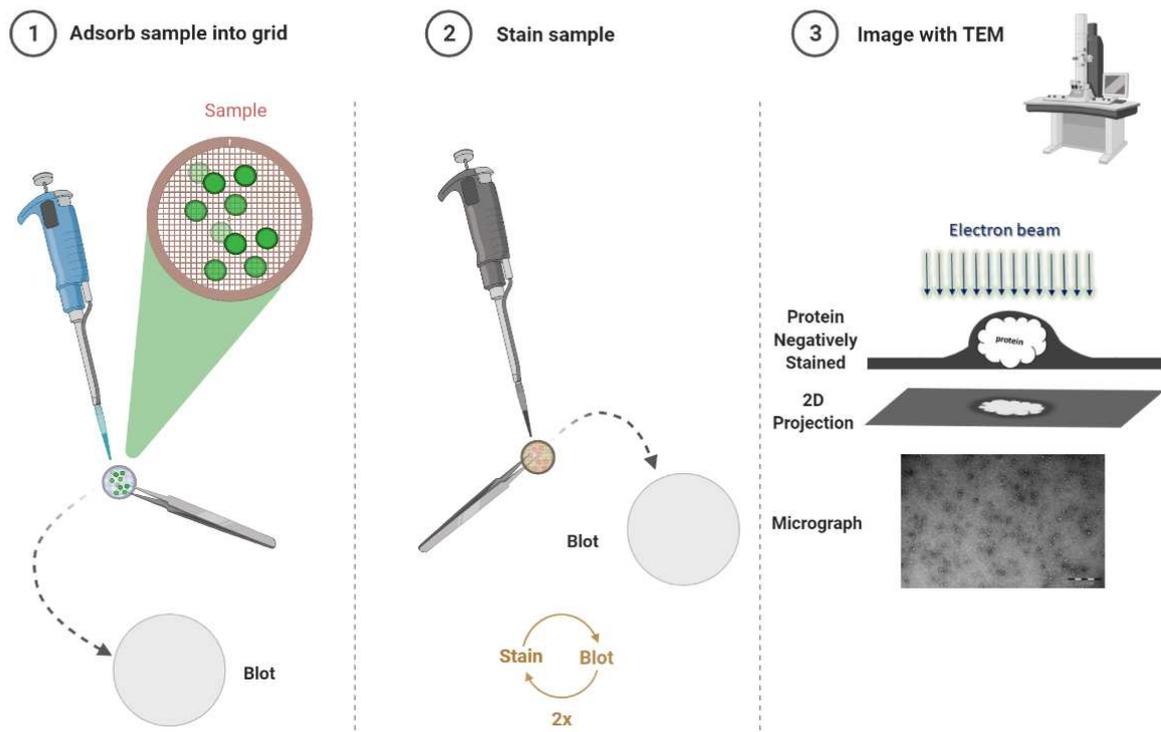


Figure 28 – Schéma du processus de coloration négative pour la microscopie électronique en transmission. (Créé avec BioRender)

Le colorant qui a été utilisé dans le cadre de ma thèse est le formiate d'uranyle à 1%. Ce composé présente un atome d'uranium ($Z=92$). Le formiate d'uranyle de formule $\text{UO}_2(\text{HCOOH})_2$ est l'homologue de l'acétate d'uranyle de formule $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$ couramment utilisé en microscopie électronique pour la coloration négative. Le formiate d'uranyle en comparaison à l'acétate d'uranyle forme sur grille une enveloppe de coloration présentant un grain plus fin que l'acétate d'uranyle ce qui repousse la limite de résolution atteignable via ce composé. L'inconvénient du formiate d'uranyle est qu'il est beaucoup moins stable en solution que son homologue avec une tendance importante à précipiter sous la forme de cristaux. Cette tendance impose la préparation de formiate d'uranyle frais quelques dizaines de minutes avant son utilisation en coloration négative.

Pour ce faire, une quantité de 10 mg de formiate d'uranyle en poudre est introduite dans 1 ml d'eau déionisée et préalablement portée à ébullition. L'ébullition de l'eau permet de désacidifier la solution. Le mélange est ensuite soumis à un agitateur vortex pendant 5 minutes. Après quoi 10 – 15 μl d'une solution de 1 M de NaOH est introduit afin de faciliter la dilution du formiate d'uranyle. Le pH ne doit pas dépasser une valeur de 4.5 auquel cas le formiate d'uranyle précipiterait²³⁷. La solution de formiate d'uranyle est de nouveau soumise à un agitateur vortex durant 5 minutes avant d'être centrifugée pendant 5 minutes à 12 000 g afin d'éliminer le formiate d'uranyle qui aurait précipité. Le surnageant est alors prélevé et filtré à travers un filtre de pores de 0.22 μm de diamètre pour en éliminer les derniers cristaux présents. Durant l'ensemble de ces étapes, la solution est maintenue à l'obscurité à l'aide de feuilles d'aluminium, la lumière pouvant stimuler la cristallisation du formiate d'uranyle.

5.2. Acquisition d'images pour la microscopie électronique en transmission conventionnelle par coloration négative.

Afin de mettre au point les conditions d'observation en coloration négative, des images ont été réalisées en routine sur un microscope à transmission Tecnai 120 Spirit de FEI. La caméra utilisée est une caméra Eloïse CCD. Les images ont été réalisées avec une tension d'accélération des électrons de 80 kV et un grossissement variant entre x21 000 (6.28 Å/pixel) et x52 000 (2.54 Å/pixel).

Une fois l'identification de conditions compatibles avec l'acquisition d'images pour une Analyse en Particule Isolée, des acquisitions automatiques ont été réalisées sur un microscope Tecnai G2 de FEI. Ce microscope est équipé d'une caméra TVIPS F416 CMOS. Les images ont été réalisées via les logiciels d'acquisition EM Tools et EM Menu de TVIPS avec une tension d'accélération des électrons de 200 kV et un grossissement de x50 000. La taille du pixel correspondant à ces paramètres est de 2.13 Å. Une défocalisation variant de -1000 nm à -2500 nm par incrément de 500 nm entre chaque image a été utilisée. Lors des acquisitions automatiques, l'intensité du faisceau est ajustée afin obtenir une dose faible limitant les dégâts d'irradiation ($\sim 15\text{-}20 \text{ e}/\text{Å}^2$ après 800 – 900 ms de temps d'acquisition).

Les deux microscopes de travail utilisent un faisceau d'électron créé par émission thermoïonique à partir d'un filament d'hexaborure de lanthane (LaB₆).

Différentes expériences ont pu faire l'objet d'acquisition automatique d'images. Toutes ces expériences ont été réalisées en tampon-F (50 mM KCl, pH 7.8) excepté pour l'observation de mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His) réalisée à pH 7.

Tableau 2 – Récapitulatif des acquisitions automatiques d'images réalisées en coloration négative.

Type d'expérience	Concentrations de protéines	Nombre d'images
Protéine seule, construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His).	400 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	141
Protéine seule, construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His).	150 nM mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His),	180
Polymérisation d'actine à temps court (~ 10 secondes). Nucléation par des complexes spectrine-actine en présence de formine.	1 μM actine 150 pM complexe spectrine-actine 135 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	362
Sonication de filaments d'actine en présence de Gc-globuline suivie d'ajout de formines 1X, 20 secondes. (<i>Sonicator XL2020</i>)	1 μM actine 300 nM Gc-globuline 100 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	444

Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines 1X, 20 secondes. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 μM actine 100 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	1404
Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines 2X, 20 secondes. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 μM actine 200 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	120
Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines 1X, 2 minutes. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 μM actine 100 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	108
Sonication de filaments d'actine seuls. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 μM actine	271
Mise en contact Arp2/3, Formine	22 nM Arp2/3 50 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His)	125
Mise en contact Arp2/3, Spin90	22 nM Arp2/3 100 nM Spin90	58
Mise en contact Arp2/3, Formine, Spin90	22 nM Arp2/3 50 nM mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) 100 nM Spin90	86

5.3. Acquisition d'images pour la microscopie électronique en transmission à balayage par coloration négative.

J'ai pu au cours de ma thèse réaliser l'acquisition d'images sur un microscope électronique en transmission à balayage au *Structural Biology Research Center* de Nagoya au sein de l'équipe d'Akihiro Narita et Yuichiro Maeda. L'avantage d'un tel microscope utilisé en coloration négative réside dans la possibilité d'obtenir des images avec un contraste supérieur à celui obtenu par un **MET** pour une résolution équivalente (la limite de résolution est imposée

ici par la coloration négative). Une telle propriété permet d'identifier plus facilement des structures de faible densité comme les domaines FH2 à l'extrémité des filaments d'actine. Ainsi, ces

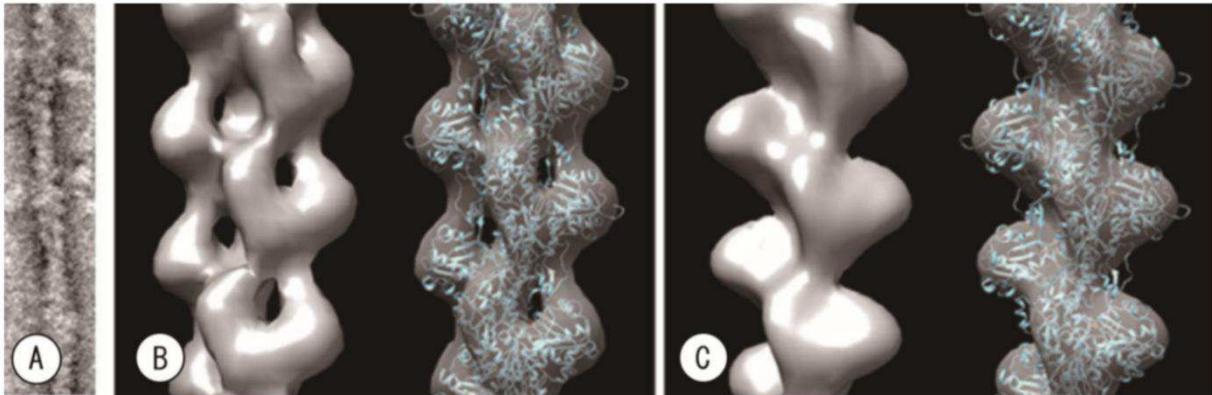


Figure 29 – A. Image d'un filament d'actine observé en coloration négative par **METB**. B. Structure d'un filament d'actine obtenue à partir de 4 filaments d'actine (508 sous-unités d'actine) observés par **METB** à 30 kV. C. Structure d'un filament d'actine obtenu à partir de 20 filaments d'actine (3547 sous-unités d'actine) observés par **MET** à 100 kV. (Usukura et al., 2018)

images plus contrastées offrent un meilleur rendement résolutif. Autrement dit, à nombres de particules égaux, une meilleure résolution est obtenue par des images issues d'un **METB** plutôt qu'un **MET** (**Fig. 29.B-C**)²³⁸.

Le microscope qui a été utilisé est le modèle SU9000. Ce microscope est équipé d'une source à émission de champ, à une tension d'accélération de 30 kV et une intensité de 2 μ A pour un grossissement de x70 000. La taille du pixel correspondant à ces paramètres est de 4.96 Å.

Un total de 218 images ont été acquises manuellement sur une grille de microscopie électronique réalisée par coloration négative suite à la sonication (sonicator XL2020) de filaments d'actine (1 μ M) en présence de gc-globuline (300 nM) mis en contact 20 secondes avec de la formine (100 nM).

6. Cryo-microscopie électronique.

La cryo-microscopie électronique consiste à vitrifier des protéines dans leur tampon de solubilisation pour pouvoir les observer au microscope électronique. Cette technique permet de s'affranchir des limitations évoquées lors de la coloration négative des échantillons. Au-delà de lever la limitation sur la résolution introduite par la coloration négative, la cryo-microscopie électronique permet également de se prémunir de la potentielle formation d'artefacts structuraux.

6.1. Préparation de grilles en cryo-microscopie électronique.

Les échantillons sont déposés sur des grilles métalliques recouvertes d'une membrane de carbone. Contrairement à une approche par coloration négative, la membrane de carbone est percée de trous qui peuvent retenir par capillarité la solution de protéine déposée. Cette configuration permet d'imager des protéines solutées en l'absence de membrane de carbone dans l'axe du faisceau d'électrons. Une telle interaction du faisceau d'électrons avec la membrane de carbone occulterait ici l'interaction existante avec les protéines par l'introduction d'un bruit de fond trop élevé. En effet, le contraste qui existe entre les protéines et leur environnement local aqueux est drastiquement réduit en l'absence de colorant.

En pratique, un volume de 4 μL est déposé sur grille pendant une durée allant de quelques secondes à 1 minute afin de permettre une répartition homogène des protéines à la surface de la grille. Au préalable, les grilles sont soumises à une décharge ionisante d'une intensité de quelques milli-ampères pendant 15 - 30 secondes. Cette ionisation permet à la fois de rendre les grilles hydrophiles et de « nettoyer » leur surface. L'intensité utilisée ici est supérieure en comparaison à l'approche par coloration négative de sorte à contraindre l'introduction de solvant dans les trous présents sur la grille. Le surplus de solution est ensuite aspiré grâce à un papier filtre Whatman® n°1 mis en contact avec la face de la grille ayant reçu l'échantillon. Le contact est maintenu pour une durée de 1 - 3 secondes afin d'obtenir la formation d'un film fin de solution dans les trous de la membrane. Une attention particulière a été portée sur la force du contact afin d'obtenir une épaisseur correcte des films de solution sur la grille. Un film d'eau trop fin exclurait les particules des trous tandis qu'un film trop épais limiterait le contraste des images.

La grille retenue par une pince elle-même fixée dans un système de guillotine est rapidement plongée dans de l'éthane liquide refroidit par de l'azote à $-186\text{ }^{\circ}\text{C}$. L'éthane ayant une capacité calorifique élevée, les molécules d'eau sont figées avant la formation de cristaux de glace. La glace ainsi obtenue est dite amorphe ou vitreuse. Cette condition est essentielle pour prévenir la détérioration des protéines par le réarrangement des molécules d'eau voisines.

L'ensemble de ces étapes est réalisé par l'intermédiaire d'un plongeur Leica EM-GP. Une humidité supérieure à 80 % est maintenue dans l'enceinte du plongeur afin de prémunir l'évaporation de l'échantillon déposé sur grille.

Les échantillons ainsi vitrifiés sont maintenus à basse température afin de prémunir tout échauffement de l'eau vitreuse pouvant amorcer sa cristallisation. Les grilles ainsi réalisées sont soit stockées dans de l'azote liquide et/ou des vapeurs d'azote soit directement transférées dans le microscope électronique pour leur observation.

La cryo-microscopie électronique est techniquement plus contraignante à mettre en œuvre avec à la clef l'obtention d'un contraste limité en comparaison à une approche par coloration négative. Ainsi, cette technique est utilisée essentiellement après avoir préalablement identifié par coloration négative des conditions d'observation adaptées. Néanmoins, la nature de l'interaction des protéines avec les grilles utilisées en coloration négative ou les grilles utilisées en cryo-microscopie diffère. Ainsi un criblage supplémentaire est parfois nécessaire en cryo-microscopie électronique afin de pouvoir transposer des résultats préalablement observés par une approche en coloration négative. C'est notamment le cas pour des objets allongés tels que les filaments d'actine généralement difficilement retenus dans les trous des grilles de cryo-microscopie électronique. Dans ce sens, différentes grilles destinées à la cryo-microscopie électronique ont pu être testées pour l'imagerie de filaments d'actine en présence de formine.

6.2. Modèles de grille utilisés en cryo-microscopie électronique.

Les premières grilles de cryo-microscopie électronique qui ont été testées sont les grilles de cuivre Quantifoil R 1.2/1.3, avec un paramètre de réseau de 200. Ces grilles présentent des trous circulaires de 1.2 μm de diamètre espacés de 1.3 μm . Ces deux paramètres contrôlent la ratio membrane/trous de la surface de la grille. Ce ratio peut influencer sur la répartition des protéines à la surface de la grille ainsi que sur la stabilité mécanique de la membrane. Le second paramètre influant sur la stabilité mécanique de la membrane est le paramètre de réseau qui indique le nombre de barreaux composant le réseau métallique de la grille.

J'ai également pu tester des grilles de cuivre « Lacey » avec un paramètre de réseau de 300. Dans ces grilles la membrane forme un fin réseau amorphe. Les grilles « Lacey » ont ainsi la particularité de présenter des trous de tailles et de formes variées, allant de moins de un micron à plus de dix microns. Ces grilles présentant un ratio membrane/trous très faible, l'aspiration à

l'aide d'un papier filtre de l'échantillon déposé sur la grille est réalisé du côté opposé de ce dernier afin de favoriser la répartition des filaments d'actine dans les trous.

Finalement j'ai pu utiliser des grilles de cuivre C-Flat R1.2/1.3 ou 2/2 avec un paramètre de réseau de 300. Ces grilles ont la particularité de présenter une surface extrêmement plane en comparaison aux grilles Quantifoil. Ce paramètre peut influencer sur la répartition de l'eau à la surface de la grille après contact avec un papier filtre.

6.3. Oxyde de Graphène pour la cryo-microscopie électronique.

La présence de trous au sein des grilles de cryo-microscopie électronique a tendance à réduire la densité des protéines observées. En effet, c'est le support continu présent dans les grilles utilisées en coloration négative qui participe fortement à adsorber les protéines de l'échantillon. Pour pallier à cet effet, la réalisation de grilles de cryo-microscopie électronique recouvertes de feuilles d'oxyde de graphène a pu être mise en place (**Fig. 30**). Les feuilles d'oxyde de graphène ont l'avantage d'être en grande partie transparentes aux électrons tout en présentant une bonne stabilité mécanique. Les échantillons déposés sur grilles peuvent ainsi bénéficier de l'interaction procurée par le support additionnel d'oxyde de graphène tout en conservant un bon contraste de travail.

Le protocole utilisé est adapté du protocole de Thomas G. Martin et al., du « *Laboratory of Molecular Biology* » de Cambridge²³⁹ et du protocole de Eugene Palovkac et al., du *Department of Biochemistry and Biophysics* de l'Université de Californie²⁴⁰.

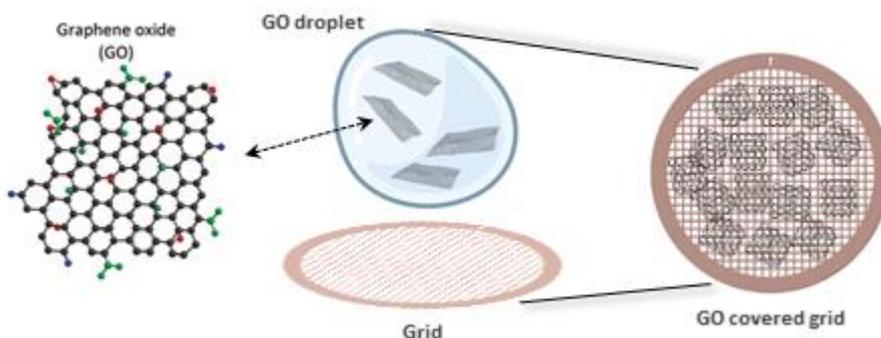


Figure 30 - Schéma de principe de la réalisation d'une grille de microscopie électronique recouverte de feuilles d'oxyde de graphène. (Créé avec BioRende)

En pratique, les grilles de microscopie électronique sont préalablement rincées dans du chloroforme afin de retirer tout résidu plastique. Une fois sèches, les grilles sont soumises à une décharge ionisante de 20 mA pendant 1 minute. Un volume de 3 μL de solution de graphène-oxide est déposé du côté carboné de la grille à une concentration de 0.2 mg/ml pendant 1 minute. Le surplus de solution est ensuite aspiré à l'aide d'un papier filtre Whatman® n°4 et le côté carboné de la grille est rincé à travers une goutte d'eau déionisée. Le surplus d'eau est aussi tôt aspiré. Cette opération de rinçage est réalisée trois fois en prenant soin de rincer le côté métallique de la grille à la dernière itération. Les grilles ainsi traitées sont laissées à sécher le temps d'une nuit. Avant leur utilisation, les grilles sont exposées à une décharge ionisante. Des intensités de 1 à 7.5 mA pendant 15 secondes ont été testées afin d'optimiser la répartition des protéines et l'épaisseur d'eau retenue sur ces grilles après contact avec un papier filtre.

La préparation de la solution d'oxide de graphène est réalisée à partir d'une solution commerciale concentrée à 2 mg/ml. Deux protocoles homologues ont pu être utilisés pour préparer la solution d'oxide de graphène à 0.2 mg/ml. Le premier protocole consiste simplement à diluer dix fois la solution initiale d'oxide de graphène dans de l'eau. Ce mélange est ensuite centrifugé à environ 500 g pendant 1 minute afin d'en éliminer les plus gros agrégats. Le surnageant obtenu est finalement utilisé pour recouvrir les grilles de cryo-microscopie électronique.

Dans le second protocole, des étapes supplémentaires sont ajoutées. Dans un premier temps, la solution d'oxide de graphène stock de 2 mg/ml est diluée dix fois dans une solution de méthanol ($\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$, 1:5). Le mélange obtenu est immergé pendant 10 minutes dans un bain à sonication dans le but de dissocier des potentiels feuillets d'oxide de graphène. La solution est centrifugée pendant 10 minutes à 4000 g afin de séparer les plus petites feuilles d'oxide de graphène des autres. Les feuilles d'oxide de graphène suffisamment grandes pour se retrouver dans le culot sont resuspendues dans de l'eau. La solution est à nouveau soniquée durant 1 minute puis centrifugée à 500 g pendant 1 minute afin d'éliminer de potentiels agrégats. La concentration du surnageant en oxide de graphène est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre et le mélange est dilué dans de l'eau à une concentration d'environ 0.2 mg/ml. Ce mélange fraîchement obtenu est utilisé pour tapisser des grilles de cryo-microscopie électronique.

6.4. Acquisition d'images en cryo-microscopie électronique.

Afin de vérifier les conditions d'observation des échantillons d'actine-formine en cryo-microscopie électronique, des images ont été réalisées sur le microscope électronique à transmission Tecnai G2 de FEI. Les images ont été réalisées avec une tension d'accélération des électrons de 200 kV et un grossissement variant entre x2700 et x50 000. L'intensité du faisceau d'électron a été ajustée afin d'obtenir une dose de 15-20 $e^-/\text{Å}^2$ après 800 – 900 ms de temps d'acquisition.

Une fois l'identification de conditions compatibles avec l'acquisition d'images pour une Analyse en Particule Isolée, des acquisitions automatiques ont été réalisées sur un microscope Glacios de FEI situé à l'Institut Pasteur. Ce microscope est équipé d'une source à émission de champs et d'une caméra à détection directe Falcon 2. Les images ont été réalisées en dose fractionnée avec une acquisition automatique via le logiciel d'acquisition EPU, en sélectionnant au préalable un total de 4233 positions. Les paramètres utilisés pour l'acquisition sont résumés dans le tableau suivant (**Tableau 2**).

Tableau 3 – Paramètres d'acquisition utilisés sur le microscope Glacios de l'institut Pasteur

Spherical Aberration Coefficient	2.7 mm
Defocus Values	- 1.0 to -3.0 μm
Frames	60
Exposure Time	2,22 sec
Dose	60 $e^-/\text{Å}^2$
Pixel Size	2,5 Å

Ces images ont été réalisées sur une grille de cryo-microscopie électronique recouverte d'oxide de graphène (C-Flat R2/2, protocole n°1) réalisée à partir d'une expérience de sonication (Sonicator Vibracell 75041) de filaments d'actine (1 μM) mis en contact 20 secondes avec de la formine (125 nM).

7. Analyse Structurale en Particule Isolée.

7.1. Correction des images brutes.

En microscopie électronique par transmission conventionnelle, l'intensité des images ($I(r)$) n'est pas directement égale au potentiel des objets sondés ($\Phi(r)$) mais dépend des réglages du microscope (sous focalisation, longueur d'onde, astigmatisme) et de ses caractéristiques techniques (aberrations sphériques, diaphragme de l'objectif)²¹⁹. On parle de fonction de transfert de contraste ($C(k)$ dans l'espace de Fourier). L'information est également altérée par les défauts de chromaticité et l'extension spatiale de la source qui limitent la résolution. On parle de fonction d'enveloppe ($E(k)$) dans l'espace de Fourier. La fonction d'enveloppe est de la forme $E(k)=\exp(-k^2B/4)$. On a alors l'équation suivante dans l'espace de Fourier :

$$\mathbf{F}[I(\mathbf{r})](k)=\mathbf{F}[\Phi(\mathbf{r})](k)\mathbf{C}(k)\mathbf{E}(k) \text{ avec } F() \text{ la fonction transformée de Fourier}$$

La fonction de transfert de contraste (**CTF**) qui sous-tend le contraste de phase des images est de la forme suivante :

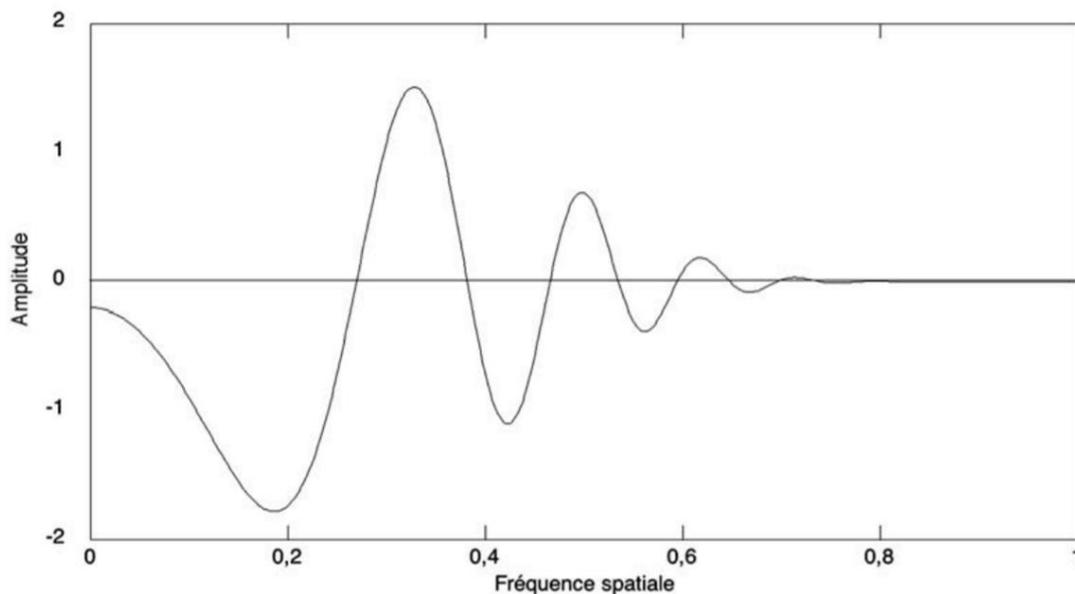


Figure 31 - Graphe représentatif de l'allure d'une fonction de transfert. (Grégory Effantin, 2005).

Dans les conditions d'observation utilisées avec le microscope Tecnai G2, le premier zéro de la fonction de transfert correspond à une résolution supérieure à la résolution limite imposée par la coloration négative. En outre, une part non négligeable du contraste est assurée par le

colorant qui introduit un contraste d'amplitude supplémentaire. Dans ce contexte, la fonction de transfert n'altère pas formellement l'analyse des images obtenues dans ces conditions.

Cette affirmation n'est plus vraie dans le cadre d'images acquises en cryo-microscopie électronique sur le microscope Glacios de l'Institut Pasteur. Dans cette configuration, la modulation du signal transmis à travers la fonction de transfert doit être prise en compte dans l'analyse des images acquises dans ces conditions. En pratique, la fonction de transfert de chaque image acquise est estimée via sa transformée de Fourier. Chaque image est ensuite corrigée à travers un filtre de Wiener consistant en la division de la transformée de Fourier par la fonction de transfert estimée²⁴¹, préalablement réhaussée d'une constante. Cette opération permet de rehausser les composantes du signal transmis dont les fréquences spatiales se situent à proximité des zéros de la fonction de transfert. En outre une telle opération permet de compenser, aux plus hautes fréquences spatiales, l'atténuation du signal transmis par la fonction d'enveloppe.

Pour réaliser ce traitement préliminaire des images, le programme dédié CTFFIND4 a été utilisé. Cette opération est réalisée après l'alignement préalable des images de cryo-microscopie acquises en dose fractionnée. Pour réaliser cet alignement, le programme MotionCor2 a été utilisé. Les images ont été visualisées à travers l'environnement d'analyse Scipion et les images inexploitable ont été mises de côté (graphène/protéines agrégées, membrane cassée, glace cristallisée). Au total, 3405 images ont été conservées pour en extraire des particules.

7.2. Extraction des particules pour une Analyse en Particule Isolée.

Les particules de chacune des micrographies ont été sélectionnées manuellement. Cette sélection consiste en l'extraction d'un ensemble de boîtes correspondant à des sous-images de taille définie, chacune centrée sur une particule d'intérêt de la micrographie considérée. Les logiciels Eman2 ou Xmipp ont été utilisés dans cette opération.

Dans le cadre d'expériences visant à étudier l'interaction des formines à l'extrémité barbée des filaments d'actine, des signaux ponctuels pouvant correspondre à des dimères de FH2 ont également pu être observés le long de ces filaments d'actine. Ainsi, en plus des extrémités de filaments d'actine (**EF**), des particules correspondant à ces signaux sus-cités, situés le long du corps des filaments (**CF**), identifiés à l'œil nu, ont également pu être extraites.

Dans le cadre de l'étude structurale du complexe ternaire Arp2/3-mDia1-Spin90, pour l'ensemble des mélanges réalisés, seules les particules de taille observée supérieure ou équivalente à celle du complexe Arp2/3 ont été sélectionnées.

Tableau 4 – Récapitulatif des particules extraites

Type d'expérience	Nombre de particules extraites	Dimensions d'une boîte
Protéine seule, construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His).	12 869	99x99 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Protéine seule, construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His).	2 637	94x94 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Polymérisation d'actine à temps court (~10 secondes). Nucléation par des complexes spectrine-actine en présence de formine.	1 904 (EF)	EF : 135x135 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Sonication de filaments d'actine en présence de Gc-globuline suivie d'ajout de formines 1X, 20 secondes. (<i>Sonicator XL2020</i>)	7553 (EF) 6 653 (EF)	EF : 110x110 pixel ² (2.13 Å/pixel) EF : 180x180 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines 1X, 20 secondes. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	18 266 (EF) 2031 (CF) (CF, 45% des images traitées)	EF : 180x180 pixel ² (2.13 Å/pixel) CF : 170x170 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines 2X, 20 secondes. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 327 (EF)	EF : 180x180 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines 1X, 1 minute. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 329 (EF)	EF : 180x180 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Sonication de filaments d'actine seuls.		EF : 180x180 pixel ²

(<i>Sonicator Vibracell 75041</i>)	1 033 (EF)	(2.13 Å/pixel)
Mise en contact Arp2/3, Formine.	7 572	140x140 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Mise en contact Arp2/3, Spin90.	6 568	140x140 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Mise en contact Arp2/3, Formine, Spin90.	10 044	140x140 pixel ² (2.13 Å/pixel)
Sonication de filaments d'actine suivie d'ajout de formines (125 nM), 20 se- condes. (<i>Sonicator Vibracell 75041</i>) Cryo-ME	12 112 (EF)	EF : 154x154 pixel ² (2.5 Å/pixel)

Dans le cas particulier des analyses réalisées au *Structural Biology Research Center* de Nagoya à partir d'images réalisées en **METB**, des rectangles de 400 pixels de largeur (4.96 Å/pixel) et de longueurs variables ont été utilisés pour extraire des filaments d'actine en partant d'une de leur extrémité. Pour ce faire, le début du rectangle est positionné à une extrémité d'un filament d'actine visible sur la micrographie et la fin de ce rectangle est positionné à l'autre extrémité du filament d'actine (si celle-ci est également visible sur la micrographie) ou sur un point du corps du filament d'actine prolongeant l'extrémité.

Ces filaments ainsi extraits sont étirés computationnellement afin d'obtenir des filaments droits. La polarité des filaments est alors déterminée à travers l'environnement de calcul Eos (Extendible and object-oriented system) développé par l'équipe du *Structural Biology Research Center*^{242,231}. Pour ce faire, chaque filament est alors comparé aux projections d'un modèle d'actine orienté dans un sens ou l'autre. Les scores de corrélation obtenus permettent ainsi d'identifier la polarité du filament extrait. Les polarités de 1600 filaments ont ainsi pu être obtenues. Les extrémités des rectangles associés aux filaments sont alors extraites en distinguant les extrémités correspondant au côté pointu, des extrémités correspondant au côté barbé. 900 particules associées à des extrémités pointues ont été extraites contre un total de 700 particules associées aux extrémités barbées.

7.3. Alignement et classification 2D de particules.

Les alignements et les classifications 2D des particules extraites ont été réalisées à l'aide des logiciels SPIDER et/ou RELION.

SPIDER est un logiciel d'analyse d'images qui fonctionne par l'implémentation de scripts faisant appel à des opérations paramétriques développées pour son propre environnement. SPIDER offre une grande liberté quant à la combinaison des opérations utilisées et permet ainsi de créer une séquence d'analyse spécialement adaptée à l'échantillon observé. À l'inverse, RELION est un logiciel qui fonctionne à travers une interface utilisateur plus conviviale mais qui en contrepartie limite la flexibilité de l'analyse. Néanmoins, RELION offre une approche statistique robuste de l'analyse des données en opposition à SPIDER qui s'appuie sur une description déterministe susceptible de sur-représenter du bruit dans les classes générées. Une combinaison de ces deux logiciels d'analyse a donc pu être utilisée. Ainsi, l'ensemble des analyses a été réalisé avec une première approche sous SPIDER suivi d'une analyse complémentaire sous RELION.

L'alignement des particules globulaires comme les formines ou les complexes ternaires Arp2/3-SPIN90-Formine ont été réalisées à travers une séquence computationnelle pré-établie.

La configuration particulière des extrémités de filaments d'actine ou des extraits de corps de filaments d'actine ont fait le fruit d'une optimisation des séquences d'alignement et de classification 2D utilisées sous SPIDER et détaillées dans la section **III.3**.

Les principes généraux de l'analyse 2D à travers SPIDER sont évoqués dans les sections suivantes.

A. Alignement 2D sous SPIDER : principes.

La première partie de l'analyse consiste en l'alignement 2D des particules afin qu'elles puissent être comparées une à une pour une classification par critère structural. L'ensemble des images est dit aligné lorsque toutes les paires possibles d'images de cet ensemble sont dans une orientation relative qui maximise la fonction de corrélation croisée. Un critère équivalent pour évaluer la qualité de l'alignement consiste à sommer un à un l'intensité des pixels de l'ensemble des images orientées. L'intensité de chaque pixel résultant dans l'image ainsi moyennée est alors élevée au carré. Finalement, l'ensemble de ces valeurs est sommé pour donner un score qui définit la qualité de l'alignement (plus ce score est élevé, plus l'alignement est correct).

Alignement sans référence

Un premier alignement des particules sans référence est réalisé. L'absence de référence évite de biaiser l'analyse dès le départ via une information externe trop contraignante. L'alignement sans référence est réalisé selon deux étapes.

Premièrement, une approximation aléatoire de la moyenne globale est réalisée. Deux particules sont sélectionnées aléatoirement, orientées et moyennées. La moyenne obtenue est utilisée pour orienter une nouvelle particule qui est à son tour incorporée dans la moyenne globale. Cette opération est poursuivie itérativement jusqu'à prendre en compte dans la moyenne globale la totalité des particules.

Ce processus est répété plusieurs fois en parallèle en utilisant d'autres séquences aléatoires d'inclusion d'image. Toutes les moyennes globales obtenues sont alors sommées pour donner une unique moyenne représentative de l'estimation.

Deuxièmement, un raffinement itératif de cette moyenne globale est réalisé. À chaque étape, une particule est retirée de la moyenne globale puis réalignée avec la sous-moyenne résultante. Cette opération est réalisée pour chacune des particules de manière séquentielle. Le processus est terminé lorsque plus aucune particule n'a besoin d'être réalignée.

Les fonctions SPIDER utilisées pour ce premier alignement permettent, tout en déterminant les orientations relatives des particules, de les rassembler selon leurs similarités dans un nombre de groupe N spécifié par l'utilisateur. On choisit généralement N tel que $N=0.01*(\text{nombre de particules totales})$. Les groupes obtenus sont représentatifs du jeu de données utilisé.

Alignement multi-références

L'alignement sans référence est limité par l'importance du bruit présent dans les images brutes. Un nouvel alignement prenant comme référence les moyennes des groupes obtenus précédemment permet de limiter cet aspect. Ainsi, l'orientation et la position de chaque particule brute sont comparées à chacun de ces groupes moyennés qui présentent un rapport signal sur bruit élevé. En outre, un masque créé à partir de la moyenne globale obtenue précédemment (filtrée, seuillée, dilatée) est appliqué aux références. Cette opération permet de restreindre l'analyse aux pixels d'intérêt. Un nouvel alignement plus fin des particules (rotations et translations) est alors obtenu à partir de ce second traitement.

B. Classification 2D sous SPIDER : principes.

Une fois les particules alignées, elles sont classifiées selon leurs caractéristiques structurales. Pour ce faire, une analyse multivariée (analyse en composantes principales) est réalisée. Dans cette analyse, chaque particule est associée à un point dans un espace de dimension correspondant au nombre de pixels d'une boîte. Les coordonnées du point correspondent aux intensités de chacun des pixels de la particule. L'ensemble des particules constitue donc un nuage de points dans cet hyperespace. On comprend intuitivement que plus l'information contenue dans deux particules est similaire, plus les points correspondants seront « proches » dans l'hyperespace. Un nouveau système de coordonnées est alors défini. Dans ce système, les axes (vecteurs propres, orthogonaux entre eux) sont associés à des variances inter-images. Les vecteurs propres sont rangés selon l'évaluation du « rapport signal sur bruit » par ordre décroissant. Ces vecteurs propres permettent de définir les caractéristiques structurales des particules. Des « images propres » leur sont associées. Le calcul et l'observation de ces « images propres » permet d'identifier les vecteurs propres qui relèvent de détails structuraux caractéristiques de la particule. Ces vecteurs propres sont alors sélectionnés.

Un dendrogramme est calculé en agrégeant séquentiellement les différents éléments du nuage de points par distance croissante. L'agrégation séquentielle et donc le dendrogramme résultant dépend de la métrique choisie. Cette métrique repose sur les vecteurs propres sélectionnés précédemment. Un seuil est appliqué au dendrogramme afin de regrouper les classes les plus proches.

Une première étape clef de cette analyse repose sur le choix du masque appliqué aux particules permettant de cibler les pixels utilisés dans l'analyse.

Une deuxième étape importante de l'analyse repose dans le choix des vecteurs propres. Plusieurs combinaisons de vecteurs propres ont pu être explorés afin de faire ressortir certaines caractéristiques structurales en 2D.

À l'issue de ces classifications 2D, les particules associées à des classes d'intérêts sont sélectionnées, soit afin d'affiner leur caractérisation structurale 2D à travers de nouvelles classifications 2D, soit afin de poursuivre l'analyse sur une caractérisation structurale 3D.

7.4. Reconstruction 3D.

A. Principe.

Chaque particule extraite correspond à une projection 2D de la structure 3D de l'objet imagé. Ainsi, il est possible de reconstruire la structure 3D de l'objet en assignant à chaque particule l'orientation de la projection correspondante. Pour obtenir les paramètres d'orientation de ces particules (angles d'Euler), les images sont comparées aux projections d'un modèle de référence. Une approche itérative est réalisée, à chaque étape, les projections 2D du modèle 3D obtenu sont comparées aux données expérimentales permettant d'obtenir un nouveau modèle 3D affiné. Ce procédé est réalisé jusqu'à l'obtention d'un modèle 3D stable.

Durant ce procédé, l'approche Bayésienne proposée par RELION permet de générer plusieurs classes 3D en parallèle à travers un tri des particules utilisées. Le nombre de classes générées est choisi a priori par l'utilisateur. Une sélection des particules d'intérêt peut ainsi être réalisée à l'issue d'une classification 3D, afin d'affiner l'analyse 3D.

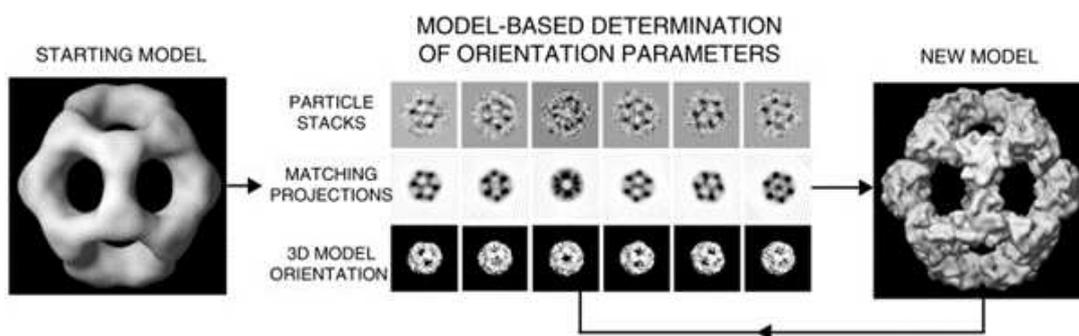


Figure 32 – Schéma de principe de la reconstruction d'une structure 3D à partir d'un modèle de référence initial comparé aux images 2D d'un objet. (Peter B. Rosenthal, John Rubinstein, 2005)

B. Modèles de référence utilisés.

Les modèles de références utilisés pour réaliser les reconstructions 3D ont été générés à partir de SPIDER²⁴³ pour des formes géométriques basiques (sphère, cylindre) ou à partir de UCSF Chimera²⁴⁴ pour des modèles s'appuyant sur des structures atomiques filtrées en résolution de la *Protein Data Bank* (Annexe 1).

C. Paramètres clefs.

Au-delà du modèle de référence initial utilisé pour générer une structure 3D, trois paramètres supplémentaires apparaissent essentiels dans la reconstruction 3D.

Le premier paramètre correspond au diamètre du masque circulaire utilisé a priori durant l'analyse. La dimension de ce masque est cruciale notamment pour l'analyse d'extrémités de filaments d'actine. Ce masque est centré au milieu de la boîte, au niveau duquel les extrémités de filaments d'actine ont été préalablement alignées au cours de l'analyse 2D. Ainsi, plus le masque est grand, plus de bruit de fond sera intégré dans l'analyse mais également une plus grande part des sous-unités d'actine situées en amont de l'extrémité. Un équilibre doit donc être trouvé entre ces deux facteurs.

Le second paramètre essentiel est le nombre de classes choisies afin de réaliser une classification 3D des particules. Un nombre de classe trop faible pourrait mélanger des particules inhomogènes pour la génération d'une structure 3D non consistante tandis qu'un nombre de classe trop élevé pourrait conduire à diviser le nombre de particules utilisées pour la reconstruction d'une structure 3D donnée, réduisant de ce fait le rapport signal sur bruit associé.

Le troisième paramètre correspond au paramètre de régularisation T^{226} , inhérent à l'approche computationnelle par inférence Bayésienne de RELION. Ce paramètre attribue un coût à la fonction d'optimisation utilisée durant l'analyse, afin de limiter les phénomènes de sur-ajustement (intégration de signal associé au bruit dans la structure 3D générée). Un paramètre T faible aura tendance à générer une structure moins détaillée structuralement mais plus fiable. Une valeur de T élevée pourra générer des structures à plus haute résolution mais avec une potentielle sur-représentation du bruit des données dans la structure générée.

Pour chaque reconstruction 3D réalisée, les valeurs de ces trois paramètres ont été ajustées empiriquement à travers diverses combinaisons.

La visualisation des structures 3D générées ainsi que l'ajustement de structures atomiques dans ces enveloppes 3D ont été réalisées à travers le programme UCSF Chimera.

III. Résultats.

1. Caractérisation structurale de constructions de formine mDia1.

1.1. Construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His).

A. Observations en microscopie électronique par coloration négative.

Les premières observations réalisées en microscopie électronique par coloration négative de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) montrent sur grille une population hétérogène de particules adsorbées (**Fig. 33**). En effet, des objets de tailles variables sont visibles. La population observée est constituée d'agrégats globulaires de plus de 15 nm de diamètre, de fragments protéiques de quelques nanomètres et de particules intermédiaires dont les dimensions peuvent correspondre à celles d'un dimère de formine (~9 nm). Ces observations suggèrent une oligomérisation variée de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) sur grille de microscopie électronique. À ce stade, il est difficile de savoir s'il existe une structuration dans l'architecture des oligomères observés.

À l'échelle de la grille, la répartition des protéines est elle-même hétérogène et on observe un dépôt inhomogène du colorant utilisé selon les carreaux considérés.

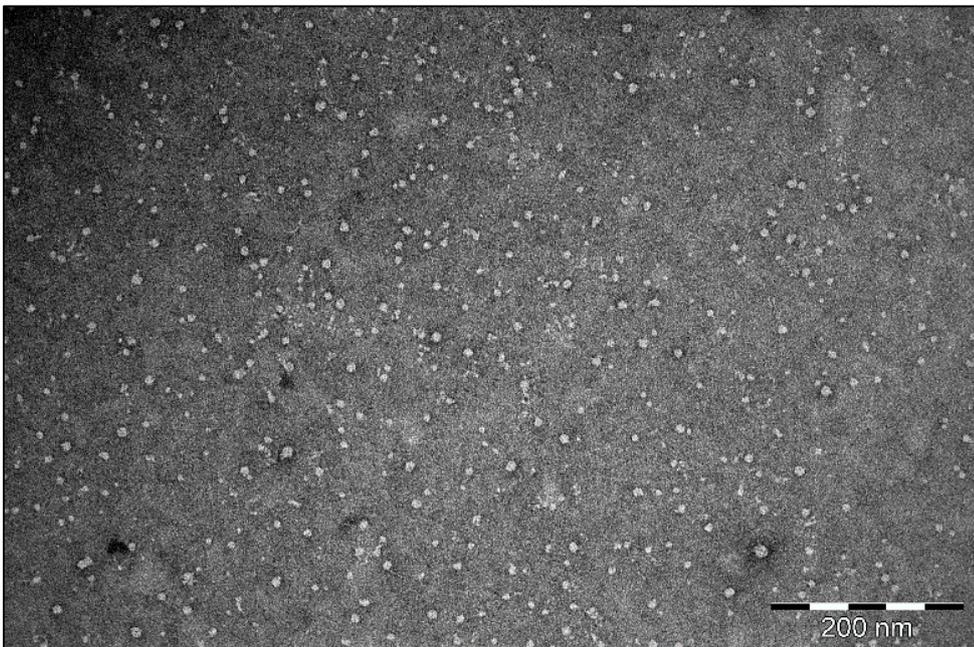


Figure 33 –

Micrographie de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His), traitée en coloration négative. (Tampon-F, pH7.8 | 80 kV | x52 000).

B. Classification 2D.

Des classifications 2D réalisées avec SPIDER sur des images de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD) confirment l'hétérogénéité oligomérique précédemment observée à travers des images brutes de microscopie électronique (**Fig. 34**).

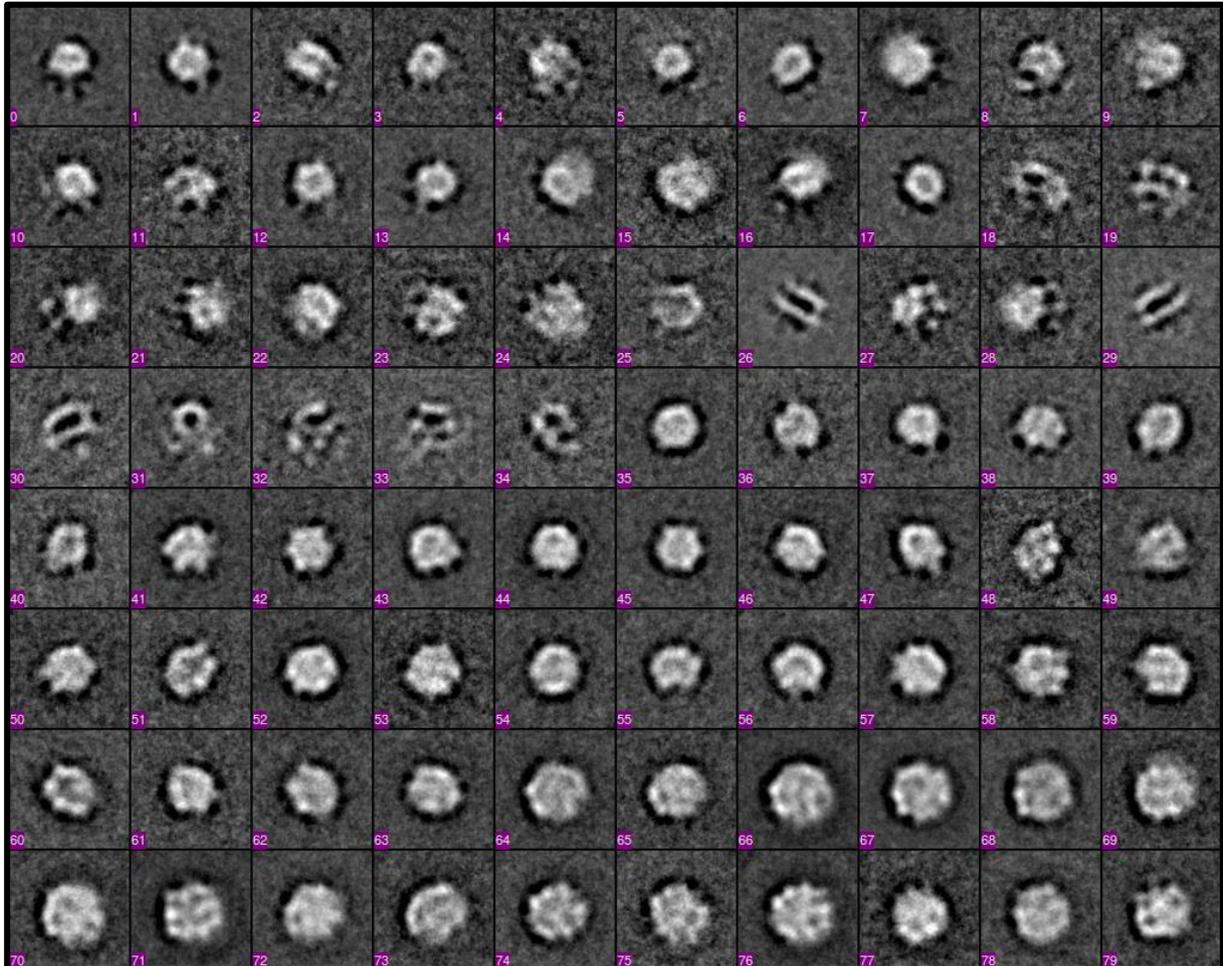


Figure 34 – Résultat d'une classification 2D SPIDER de particules extraites d'une micrographie réalisée à partir de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) (dimensions des boîtes : 21 nm²).

Les particules extraites des micrographies (12 869 particules) ont été sélectionnées manuellement en s'affranchissant de tout critère de taille défini a priori. Un nombre important de classes présente des dimensions nettement supérieures à celles escomptées pour un dimère de formine (**Fig. 34**, classes n° 64 -79). Aucune structuration n'est clairement identifiable au sein de ces plus gros assemblages. D'autres classes présentent, quant-à-elles, des dimensions pouvant correspondre à des protéines dimérisées (**Fig. 34**, exemples : classes n° 6, 17, 35, 39, 45, 54,...). Parmi les classes de dimensions attendues on observe, avec un fort signal, des objets en forme de « pinces » (**Fig. 34**, classes n° 26, 29, 30).

Pour affiner la caractérisation structurale de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His), une analyse 2D a été effectuée en parallèle avec RELION. Une identification automatisée des particules au sein des micrographies suivie d'une série de classifications/sélections 2D ont été réalisées afin de trier drastiquement les objets imagés pour recentrer l'analyse sur des particules associées à des classes moyennes sous forme de « pince ». Trois classes ont finalement été sélectionnées (**Fig. 35**), représentant un sous-total réduit de 519 particules.

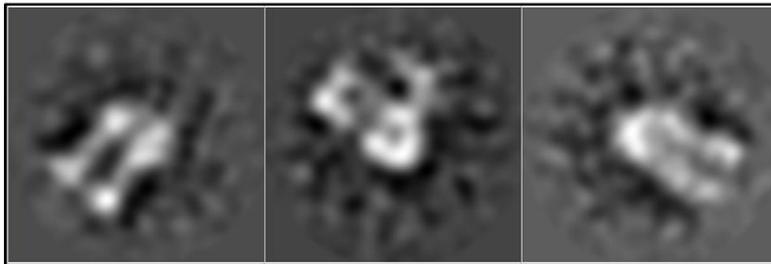


Figure 35 – Classes moyennes obtenues sous RELION à partir de particules extraites d'une micrographie réalisée avec la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) (dimensions des boîtes : 21 nm²).

C. Reconstruction 3D.

Pour aller plus loin, une reconstruction 3D a été réalisée sur le jeu de 519 particules sélectionnées computationnellement.

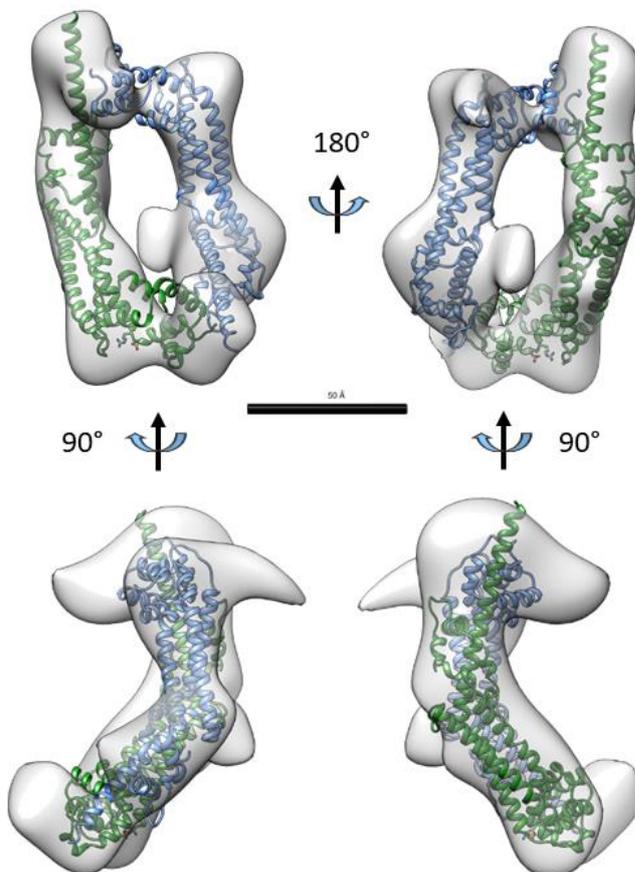


Figure 36 - Structure 3D à 26 Å de résolution (gris) d'un dimère de mDia1 généré par RELION et dans lequel les structures atomiques des domaines FH2 de mDia1 (PDB : 1V9D) ont été ajustées (bleu, vert).

La reconstruction 3D générée à partir d'un modèle de référence constitué d'un dimère de FH2 filtré à 50 Å de résolution a permis de converger, malgré le peu de particules utilisées, vers une structure à 26 Å de résolution cohérente avec le modèle d'un dimère de FH2 (**Fig. 36**).

On note ici que seuls les domaines FH2 de la formine mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) sont mis en évidence par la reconstruction 3D obtenue. Cette observation est en accord avec la flexibilité et la taille des autres domaines dont le signal initialement faible est perdu durant le processus de moyennage des particules.

1.2. Construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His).

A. Observations en microscopie électronique par coloration négative.

Les observations effectuées sur des grilles de microscopie électronique réalisées en coloration négative à partir d'aliquotes de construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His) montrent une population de particules dont la taille moyenne est inférieure à celle observée avec la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) (**Fig. 37**).

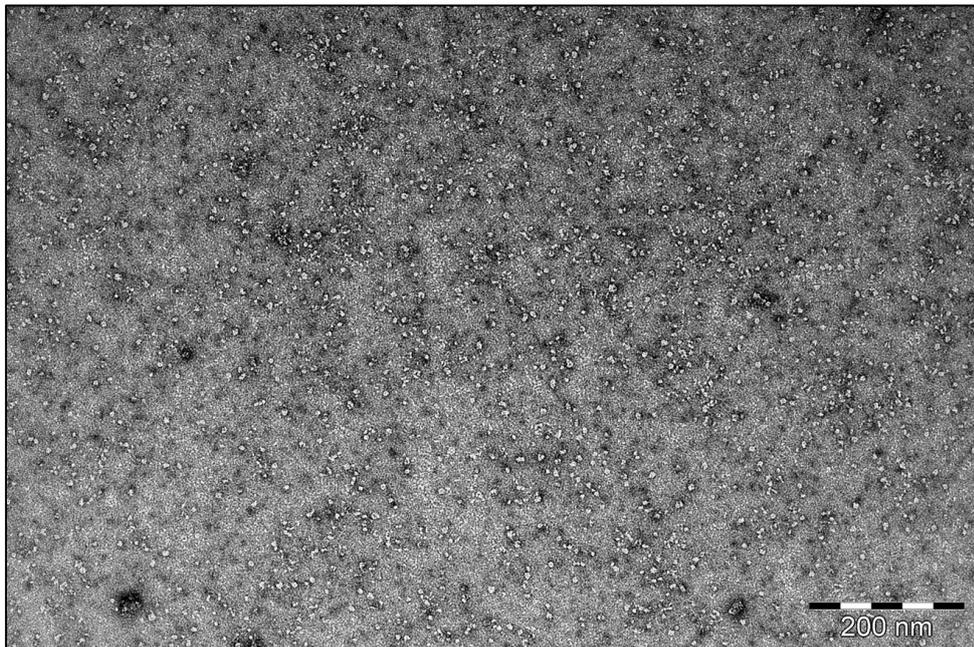


Figure 37 - Micrographie de la construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His), traitée en coloration négative. (Tampon-F, pH7.0 | 80 kV | x42 000).

Ces premières observations ont été effectuées à partir d'aliquotes d'une purification réalisée en 2011 par John Manzi et stockées depuis à -80°C. De nouvelles purifications ont été entreprises avec le plasmide correspondant de cette construction afin d'obtenir des protéines fraîchement purifiées. On observe après deux étapes de purification par chromatographies d'affinité l'agrégation d'une partie des protéines (**Fig. 38. A**). Les agrégats sont partiellement éliminés après

une étape d'ultracentrifugation de la protéine (**Fig. 38. B**). Néanmoins, on observe toujours des regroupements de protéines sur grille pouvant traduire l'existence d'agrégats instables partiellement dissociés. Ces agrégats pourraient avoir été induits par les étiquettes GST des constructions de formine, connus pour leur capacité à dimériser.

Ces observations nous ont poussé à utiliser les grilles réalisées directement à partir de la purification de 2011 afin d'effectuer une analyse 2D des particules.

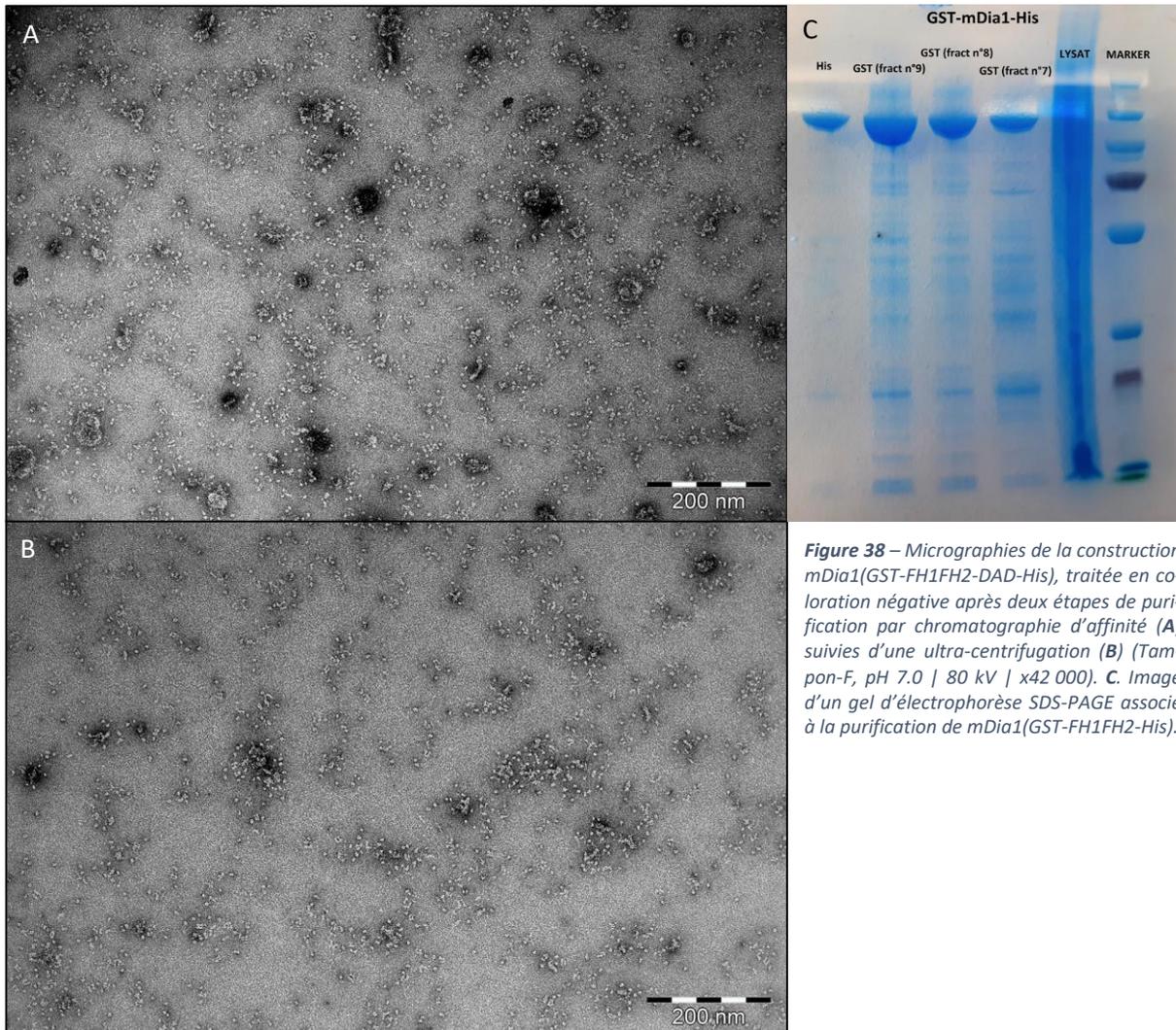


Figure 38 – Micrographies de la construction *mDia1*(GST-FH1FH2-DAD-His), traitée en coloration négative après deux étapes de purification par chromatographie d'affinité (A) suivies d'une ultra-centrifugation (B) (Tampon-F, pH 7.0 | 80 kV | x42 000). C. Image d'un gel d'électrophorèse SDS-PAGE associé à la purification de *mDia1*(GST-FH1FH2-His).

B. Classification 2D.

Une analyse 2D réalisée sur RELION à partir de 2637 particules extraites manuellement de micrographies de la construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD) montre une majorité de classes dont la taille moyenne est inférieure à celle escomptée pour un dimère de formine (**Fig. 39**).

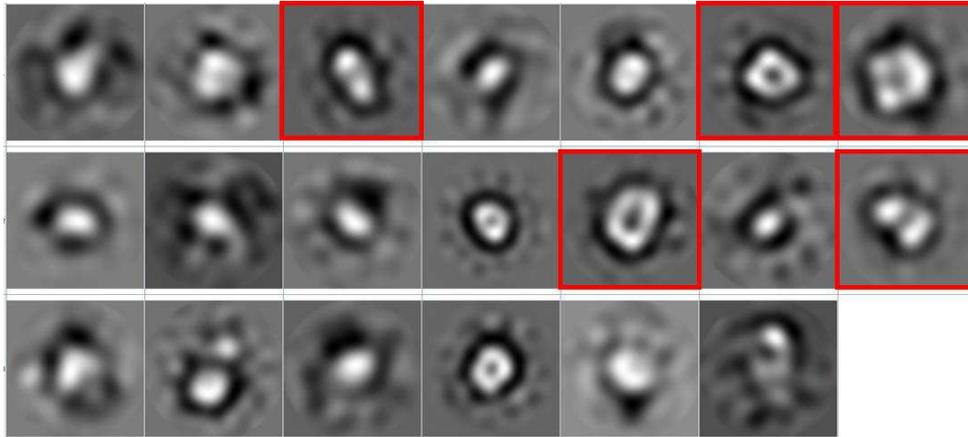


Figure 39 - Résultat d'une classification 2D RELION de particules extraites d'une micrographie réalisée à partir de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His). Encadrés rouges : classes moyennes associées aux particules utilisées pour une reconstruction 3D. (Dimensions des boîtes : 21 nm²).

C. Reconstruction 3D.

Une reconstruction 3D a été réalisée à partir des particules associées aux classes dont les dimensions peuvent correspondre à un dimère de FH2 (**Fig. 39**, encadrés rouges, 696 particules). Une reconstruction cohérente à 23 Å de résolution a pu être générée en prenant pour référence le modèle atomique filtré à 50 Å d'un dimère de FH2. Cette reconstruction 3D dessine une enveloppe pouvant accommoder des domaines FH2 selon des orientations relatives distinctes de celles observées avec les données de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) (**Fig. 40**). Une telle différence d'orientation des domaines FH2 est permise par l'interaction flexible qui existe au sein d'un dimère de formine (**I.3.2.A**). Cette différence d'orientations pourrait avoir été induite par la différence du pH utilisé dans le cas de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) et mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His). En effet, alors que dans le premier cas une valeur de pH 7.8 a été utilisée, dans le second cas une valeur de pH 7.0 a été utilisée. La valeur de pH 7.8 ou 7.0 ne semblait pas au premier abord changer radicalement l'aspect des grilles de microscopie électronique réalisées avec la construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His). Néanmoins, la grille de microscopie électronique présentant une répartition sensiblement meilleure des protéines et du colorant avait pu être réalisée à partir d'une solution de protéine à pH 7.0, et c'est pourquoi une telle condition avait été choisie pour l'analyse.

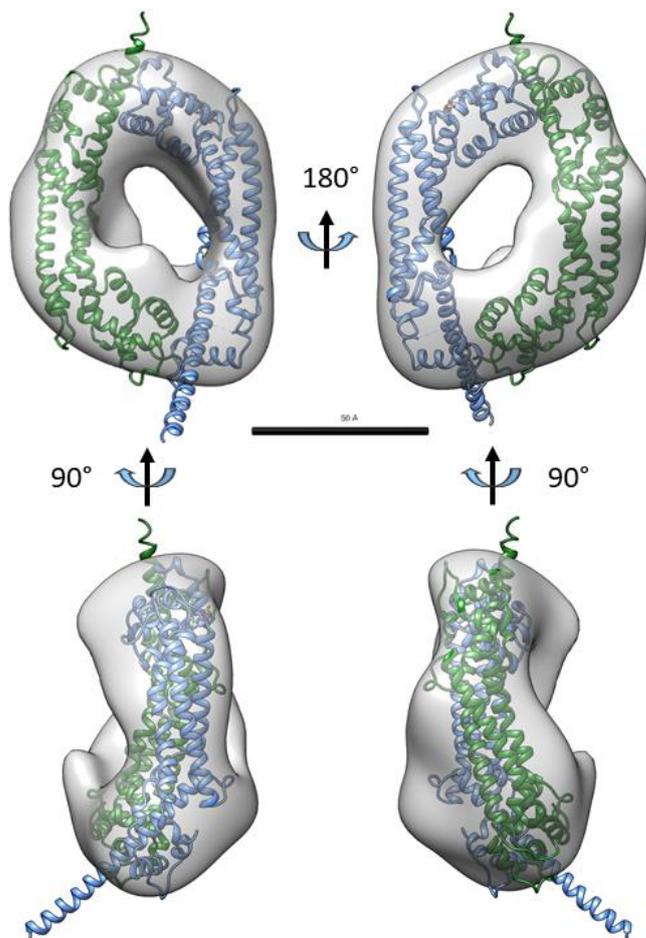


Figure 40 - Structure 3D à 23 Å de résolution (gris) d'un dimère de mDia1 généré par RELION et dans lequel les structures atomiques des domaines FH2 de mDia1 (PDB : 1V9D) ont été ajustées (bleu, vert).

1.3. Conclusion.

L'oligomérisation élevée observée sur grille de microscopie électronique de la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) peut avoir été induite par le processus de coloration négative, mais peut également être représentative de propriétés biochimiques intrinsèques de cette construction.

En effet, dans le premier cas, l'agrégation peut être une conséquence de la déshydratation inhérente à la coloration négative et/ou peut résulter d'une interaction artéfactuelle des protéines avec le colorant utilisé. Un tel phénomène a déjà pu être observé pour d'autres protéines traitées en coloration négative²²².

Deuxièmement, l'hétérogénéité observée sur grille pourrait être représentative d'un équilibre en solution entre différents états oligomériques. Comme évoqué en section **I.3.2**, une telle propension à l'oligomérisation au-delà d'un dimère a déjà pu être observée pour des constructions de formines INF2 ou Bni1p. En outre, la capacité des domaines FH2 de mDia1 à

cristalliser sous la forme de tétramères suggère qu'il existe des contacts d'interaction plus ou moins faibles entre dimères de FH2 pouvant médier cet état d'oligomérisation élevé.

D'autre part, dans le cadre des grilles de microscopie électronique obtenues à partir de la construction mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His), la présence d'objets dont la taille est inférieure à celle attendue pour un dimère de formine peut être interprétée aussi bien par une protéolyse des protéines que par une dissociation partielle des dimères de formine.

Malgré cette ambiguïté concernant la variabilité des états structuraux observés par microscopie électronique pour les deux constructions mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) et mDia1(GST-FH1FH2-DAD-His), on peut supposer qu'une partie non négligeable des formines se trouvent en solution sous leur forme dimérique active. En effet, et en particulier pour la construction mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His), des expériences réalisées parallèlement par l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » à l'**IJM** attestent de cette activité des protéines purifiées.

De ce fait, les constructions mDia1(SNAP-FH1FH2-DAD-His) purifiées à l'**IJM** ont été utilisées pour une analyse structurale de leur interaction avec les extrémités barbées d'actine.

2. Préparation des échantillons Actine-Formine pour la microscopie électronique.

Différentes stratégies ont été testées afin de générer une densité satisfaisante de courts filaments d'actine (quelques centaines de nanomètres de long) mis en contact avec des formines. Ces différentes approches, plus ou moins fructueuses, sont présentées ci-dessous.

2.1. Nucléation stimulée.

A. Formines : une nucléation limitée.

Dans un premier temps, il a été entrepris de s'appuyer sur la capacité intrinsèque des formines, utilisées dans le système, à stimuler la nucléation de nouveaux filaments d'actine. L'ajout progressif de monomères d'actine dans une solution de formine en tampon-**F** génère de longs filaments d'actine en quantité relativement faible (**Fig. 41**). Cette observation indique que

la capacité nucléatrice des formines ne permet pas de compenser le déficit cinétique de la nucléation lente de nouveaux filaments d'actine vis-à-vis de l'élongation rapide de filaments d'actine pré-existants.

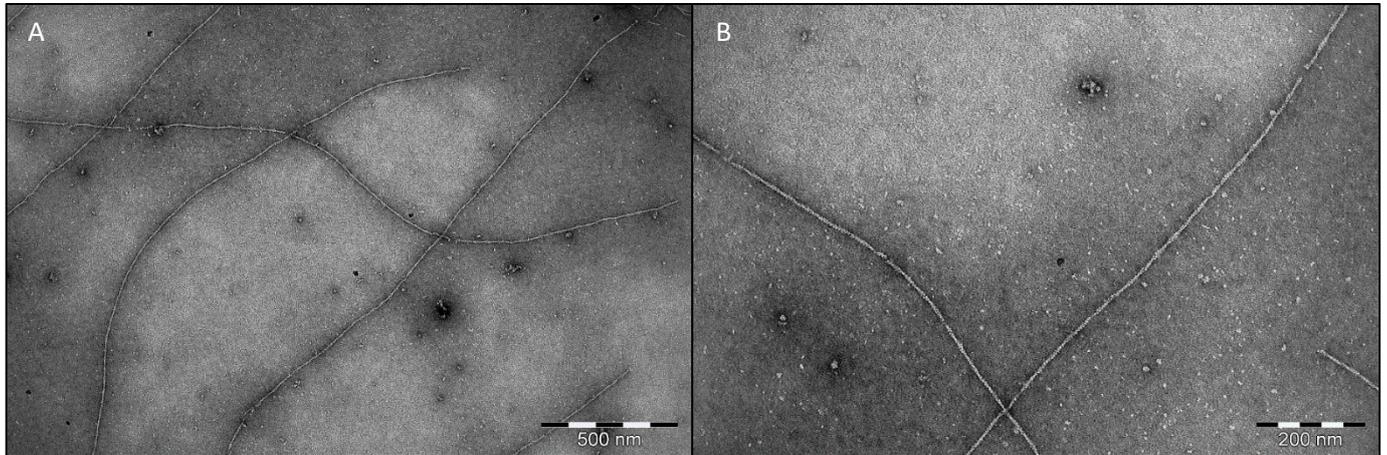


Figure 41 - Micrographie issue d'une expérience de nucléation d'actine (concentration finale : 1 μ M) par de la formine (concentration finale 100 nM) traitée en coloration négative. (Tampon-F, pH7.8 | 80 kV, A. x21 000, B. x42 000).

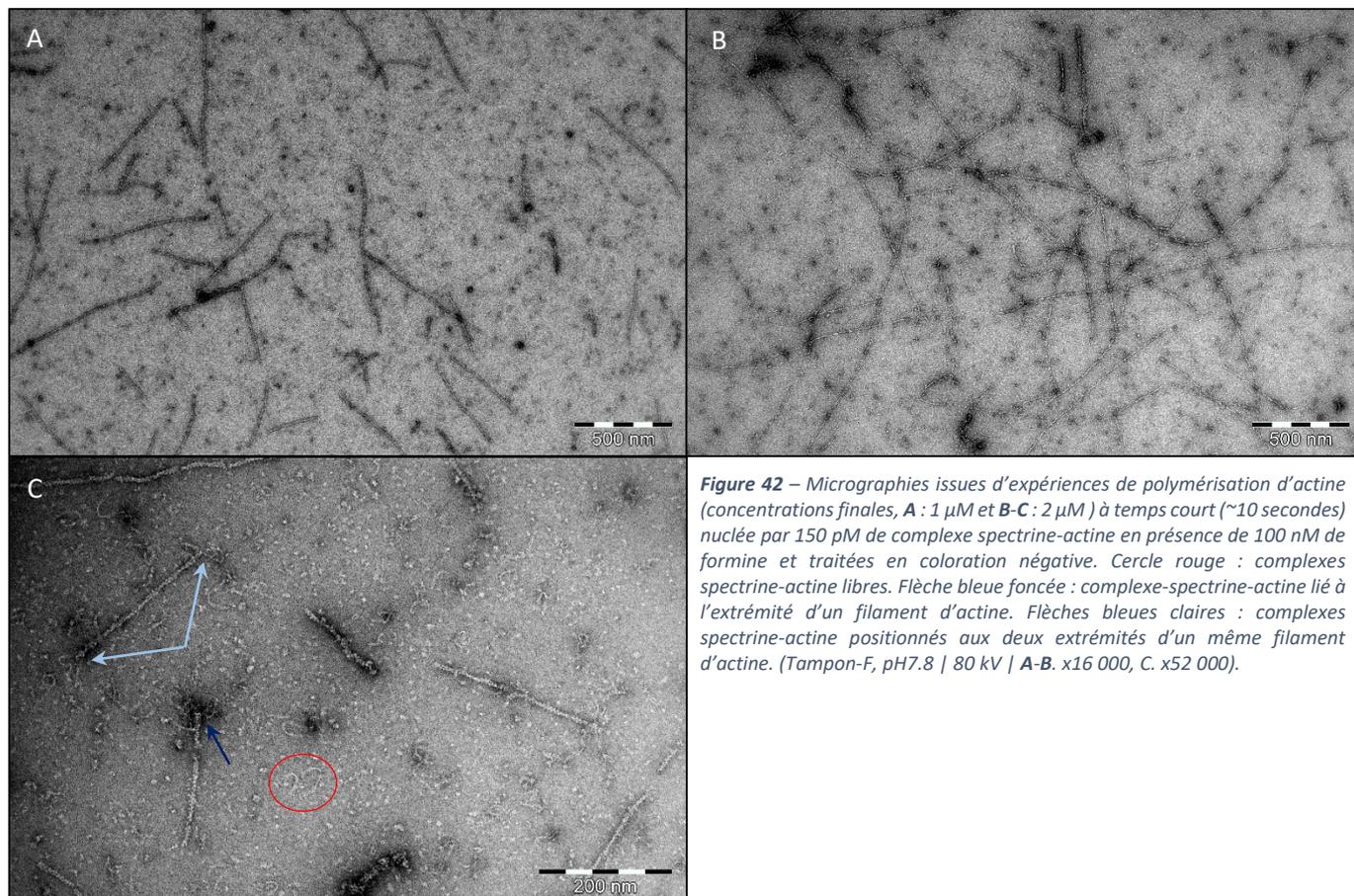
Partant de cette observation, l'ajout de noyaux de nucléation spectrine-actine a été envisagé afin de stimuler la génération d'un plus grand nombre de courts filaments d'actine à des temps courts de polymérisation.

B. Complexes de spectrine-actine.

En présence de complexes spectrine-actine, une nucléation rapide de filaments d'actine s'opère en solution dans les premières secondes de mise en contact de ces noyaux de nucléation avec de l'actine en tampon-F (**Fig. 42**). La taille des filaments adsorbés est dépendante de la concentration d'actine utilisée (1 ou 2 μ M) qui régit principalement ici la vitesse d'élongation des filaments d'actine. On observe sur grille de microscopie électronique une densité moyenne de l'ordre de cinq extrémités de filaments d'actine par image à un grandissement de travail de l'ordre de x50 000. Cette densité reste relativement très faible pour une Analyse en Particule Isolée.

En outre, on observe sur les micrographies réalisées un bruit de fond non négligeable introduit par des complexes spectrine-actine libres reconnaissables par leur forme en « crochet flexible » (**Fig. 42.C**, flèches et cercles). Le tapissage du fond des images par ces complexes-spectrine actine peut introduire une ambiguïté quant à la liaison des extrémités de filaments d'actine observés avec ces complexes. Dans ce contexte, la polarité de filaments d'actine observés dans

leur totalité n'est pas toujours clairement identifiable (**Fig. 42.C**). De plus, les signaux de complexes spectrine-actine localisés à proximité d'extrémités de filaments d'actine peuvent altérer l'analyse computationnelle réalisée ultérieurement.



La quantité de complexes spectrine-actine utilisée ici reste faible avec une concentration affichée de 150 pM pour 1 μM d'actine. Cette concentration est estimée via des expériences de nucléation d'actine pratiquées par l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » à l'IJM. Ainsi cette concentration apparente n'inclue pas la potentielle présence de complexes spectrine-actine inactifs. En ce sens, une tentative de sélection des complexes actifs par ultra-centrifugation de filaments d'actine générés par des noyaux de nucléation spectrine-actine a été réalisée. Les résultats sont présentés en **Figure 43**.

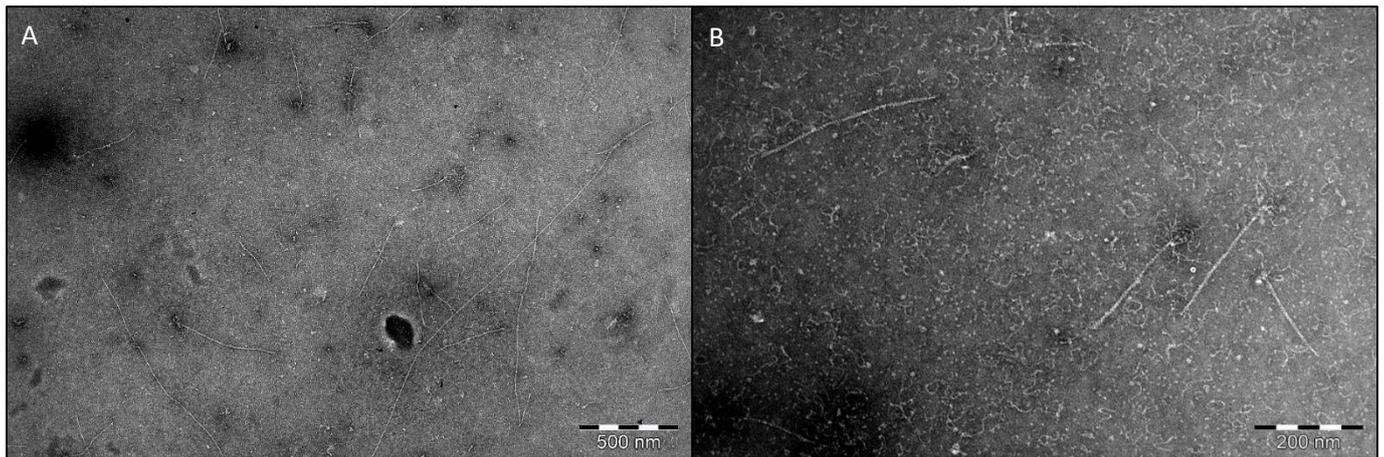


Figure 43 - Micrographies réalisées en coloration négative et issues d'une expérience de polymérisation d'actine (concentration finale <math>< 1.5 \mu\text{M}</math>) à temps court (~10 secondes) en présence de 135 nM de formine et nucléé par des complexes spectrine-actine préalablement ultra-centrifugés avec de l'actine-F. (Tampon-F, pH7.8 | 80 kV | A. x16 000, B. x42 000).

On remarque sur les grilles de microscopie électronique réalisées qu'un tapis important de complexes spectrine-actine libres persiste (**Fig. 43.B**). Par ailleurs, la densité des filaments d'actine observés n'est pas augmentée. Ces observations peuvent suggérer que l'ultra-centrifugation réalisée n'a pas permis de séparer, entre surnageant et culot, les complexes spectrine-actine libres présumés inactifs des complexes spectrine-actine liés présumés actifs. Il peut également être supposé ici que la liaison de ces complexes spectrine-actine soit régit par un équilibre dynamique, l'activité à l'échelle moléculaire de ces complexes restant peu détaillée dans la littérature.

Finalement, des acquisitions d'image automatisées ont été réalisées à partir d'une expérience de polymérisation à temps courts en présence de 1 μM d'actine, 150 pM de complexes spectrine-actine non-centrifugés et 125 nM de formine.

2.2. Élongation contrôlée.

A. Approche électrostatique.

Sur des temps courts de polymérisation, aucune influence marquée de la force ionique sur la longueur des filaments d'actine générés par des complexes de spectrine-actine n'a pu être mise en évidence par microscopie électronique dans la gamme de concentration saline utilisée (25 mM – 100 mM). Une caractérisation par microfluidique plus aboutie de l'impact de la force ionique sur la processivité des formines et sur la vitesse d'élongation des filaments d'actine avait pu être réalisée par LuYan Cao en 2018 démontrant que ce paramètre ne pouvait en effet pas être utilisé pour contrôler efficacement la taille des filaments d'actine générés (**Fig. 44**). Une concentration intermédiaire de 50 mM de KCl a alors été choisie pour le reste des expériences réalisées.

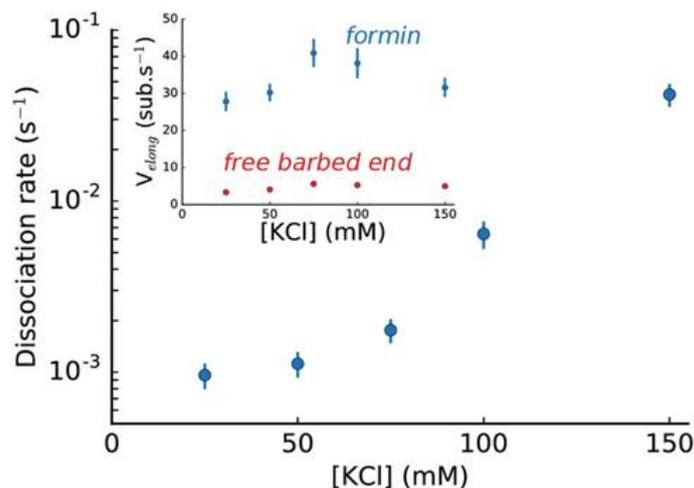


Figure 44 - Impact de la concentration saline sur les taux de dissociation de la formine ainsi que sur les taux d'élongation des extrémités barbées. (Luyan Cao et al., 2018)

En ce qui concerne l'utilisation de pH extrêmes dans le but de moduler la cinétique de polymérisation des filaments d'actine, des effets directs sur l'agrégation et l'intégrité structurale des assemblages de protéine en solution ont pu être mis en évidence. On observe ainsi une agrégation sévère des complexes actine-spectrine à bas pH (**Fig. 45.A-B**, pH 5.6). Cette agrégation s'accompagne d'une diminution de leur activité nucléatrice suggérée par un nombre réduit de filaments d'actine observés sur grille de microscopie électronique. Un pH réduit ne permet donc pas de stimuler suffisamment la nucléation des filaments d'actine pour compenser la perte d'activité des complexes spectrine-actine observée.

À pH élevé (**Fig. 45.C-D**, pH 8.5), les filaments d'actine apparaissent ondulés avec une tendance à l'agrégation plus élevée sur grille de microscopie électronique. Cette observation suggère une altération de la structure même des filaments d'actine, ce qui n'est pas compatible avec l'étude structurale de leur interaction avec les formines.

Dans ce contexte, une valeur de pH de 7.8 a été conservée pour l'ensemble des expériences réalisées.

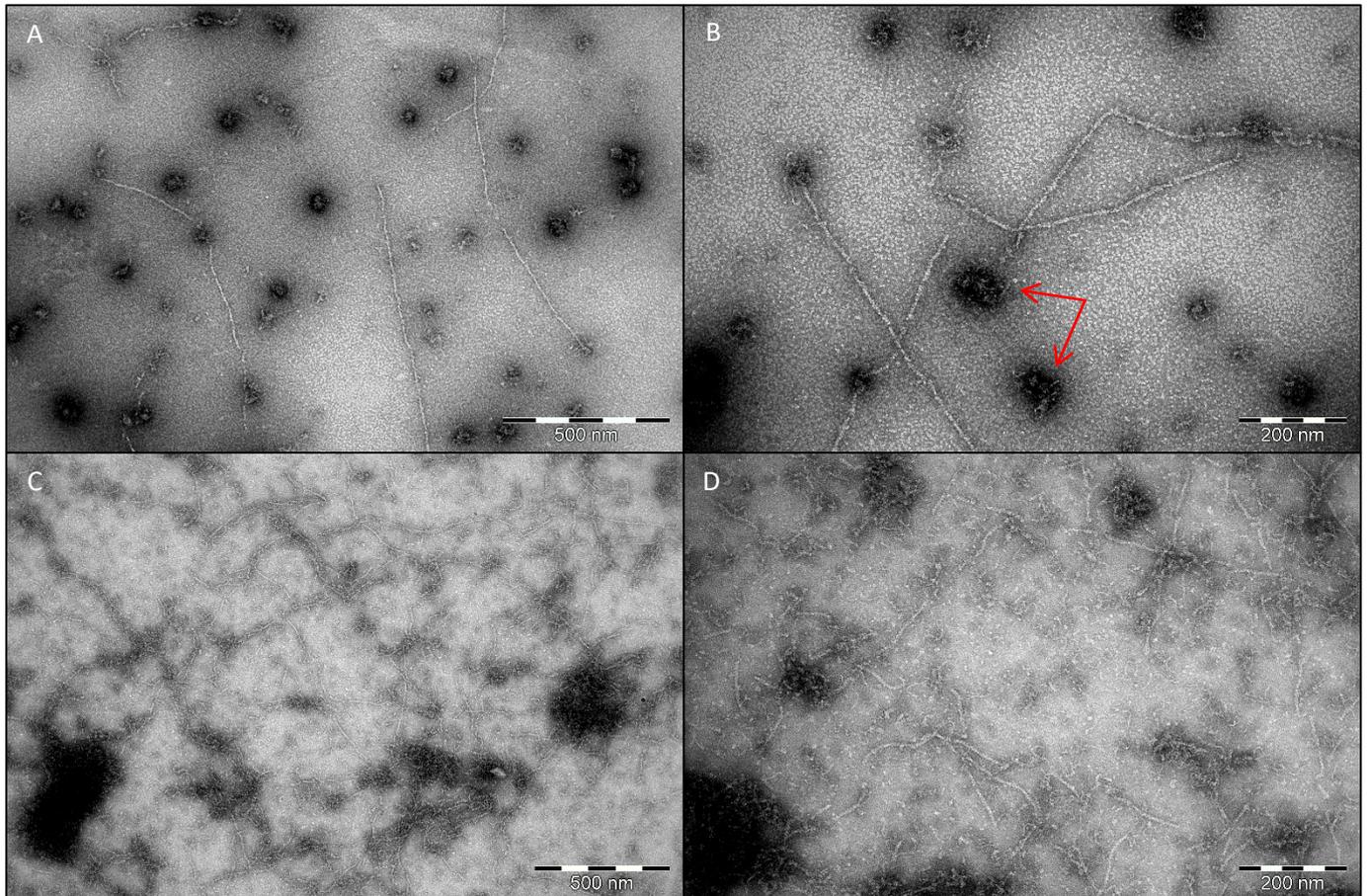


Figure 45 - Micrographies issues d'expériences de polymérisation de 1 μM d'actine nucléée par 750 pM de complexes spectrine-actine en présence de 100 nM de formine et traitées en coloration négative. Flèches rouges (**B**) : complexes spectrine-actine fortement agrégés (Tampon-F, **A-B** : pH 6.5, **C-D** : pH 8.5 | 80 kV | **A-C**. x21 000, **B-D**. x42 000).

B. Sonication de filaments en état stationnaire.

Les filaments d'actine traités par bain à sonication n'apparaissent pas segmenter dans les conditions utilisées (**Fig. 46.A-B**). Cette observation peut traduire une énergie trop faible transférée de la chambre de sonication à l'échantillon immergé et maintenu dans un eppendorf. Pour pallier à cela une sonication par sonde introduite directement dans l'échantillon a été réalisée à l'aide d'un sonicateur XL2020 équipé d'une pointe de 2 mm de diamètre. On constate la génération de nano-filaments d'actine dont la longueur est inférieure à 200 nm (**Fig. 46.D**).

La densité en filaments d'actine observée reste cependant limitée avec la persistance de plus longs filaments.

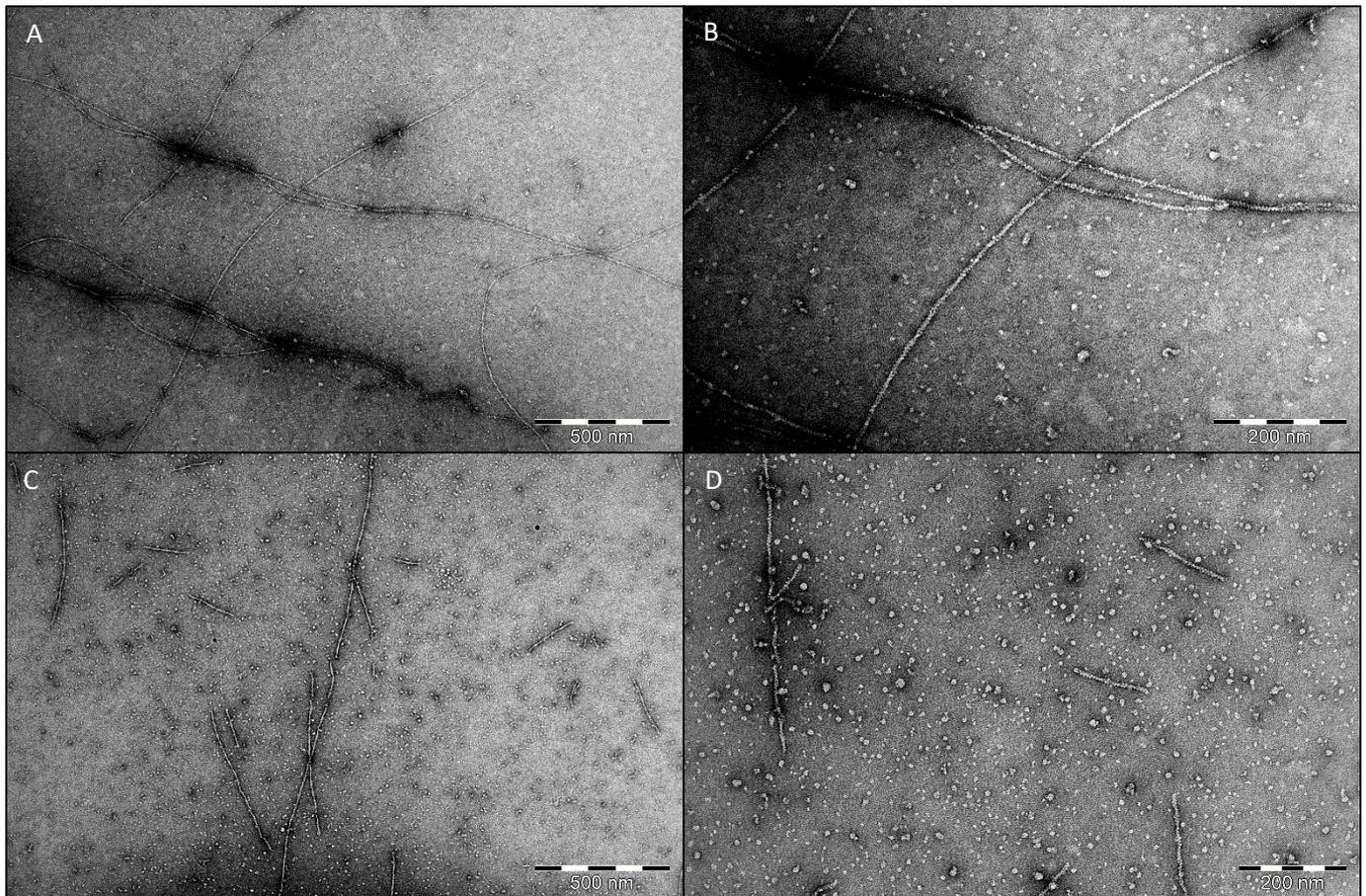


Figure 46 – Micrographies issues d'expériences de sonication d'actine-F (2 μ M, **A-B** : bain à sonication Branson Ultrasonic Bath, **C-D** : sonicateur à sonde XL2020). (Tampon-F, pH7.8 | 80 kV | **A-C**. x16 000, **B**. x52 000, **D**. x42 000).

Dans le but de limiter la redistribution de la taille des filaments d'actine vers des valeurs plus élevées, pendant ou après sonication, l'usage de protéines régulatrices de l'actine a été explorée.

L'introduction combinée de 750 pM de complexe spectrine-actine (coiffe des extrémités barbées et nucléation de nouveaux filaments) et 300 nM de Gc-globuline (sequestration de l'actine-G en solution) durant la sonication de 2 μ M d'actine-F permet de maintenir une bonne densité en nano-filaments d'actine jusqu'à l'adsorption sur grille de microscopie électronique (**Fig. 47.A-B**). La présence de complexes spectrine-actine en quantité élevée introduit néanmoins un signal parasite pouvant perturber l'analyse des extrémités de filament d'actine.

D'autres protéines régulatrices de l'actine ont alors été testées pour remplacer la coiffe des extrémités pointues précédemment assurée par les complexes spectrine-actine. Des complexes Arp2/3 sans activateur ou de la tropomoduline ont ainsi été utilisées.

Dans le cas des complexes Arp2/3, on observe un effet limité de ces derniers sur la taille des filaments d'actine adsorbés sur grille de microscopie électronique après sonication (**Fig. 47.E**). Peu de filaments d'actine apparaissent coiffés d'un complexe Arp2/3 dans les conditions utilisées. Il faut noter ici que seulement 20 nM d'Arp2/3 avait pu être utilisé pour une constante d'équilibre associée au bout pointu variant entre 40 nM et 1 μ M selon l'état d'hydrolyse des nucléotides des sous-unités d'actine constitutives de l'extrémité pointue (**Tableau 1**).

Dans le cas de la tropomoduline, une quantité importante de cette dernière (1 μ M) a dû être utilisée au regard de la constante d'équilibre élevée associée avec l'extrémité pointue (~ 0.1 μ M). Cette concentration élevée en tropomoduline introduit un signal parasite important dans les images de microscopie électronique réalisées sans pour autant préserver une population élevée de courts filaments d'actine (**Fig. 47.E-F**).

L'introduction de formines au cours même de la sonication a également pu être testée. Un effet positif sur la densité des extrémités observées a pu être identifié (**Fig. 47. G-H**). Néanmoins, cette observation s'accompagne de la formation d'agrégats pouvant traduire une dénaturation des constructions de formine utilisées lors d'une telle sonication (**Fig. 47. G-H**).

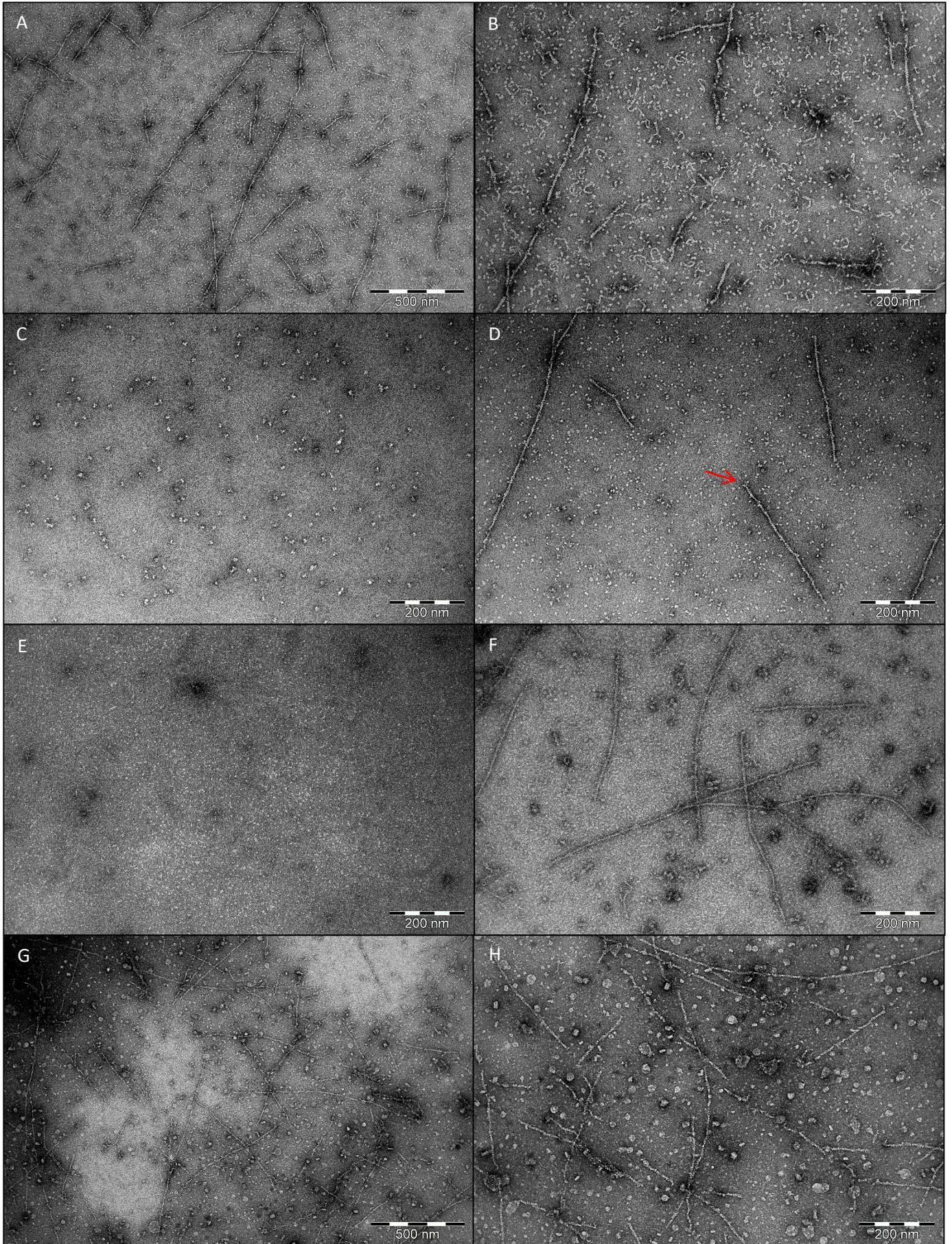
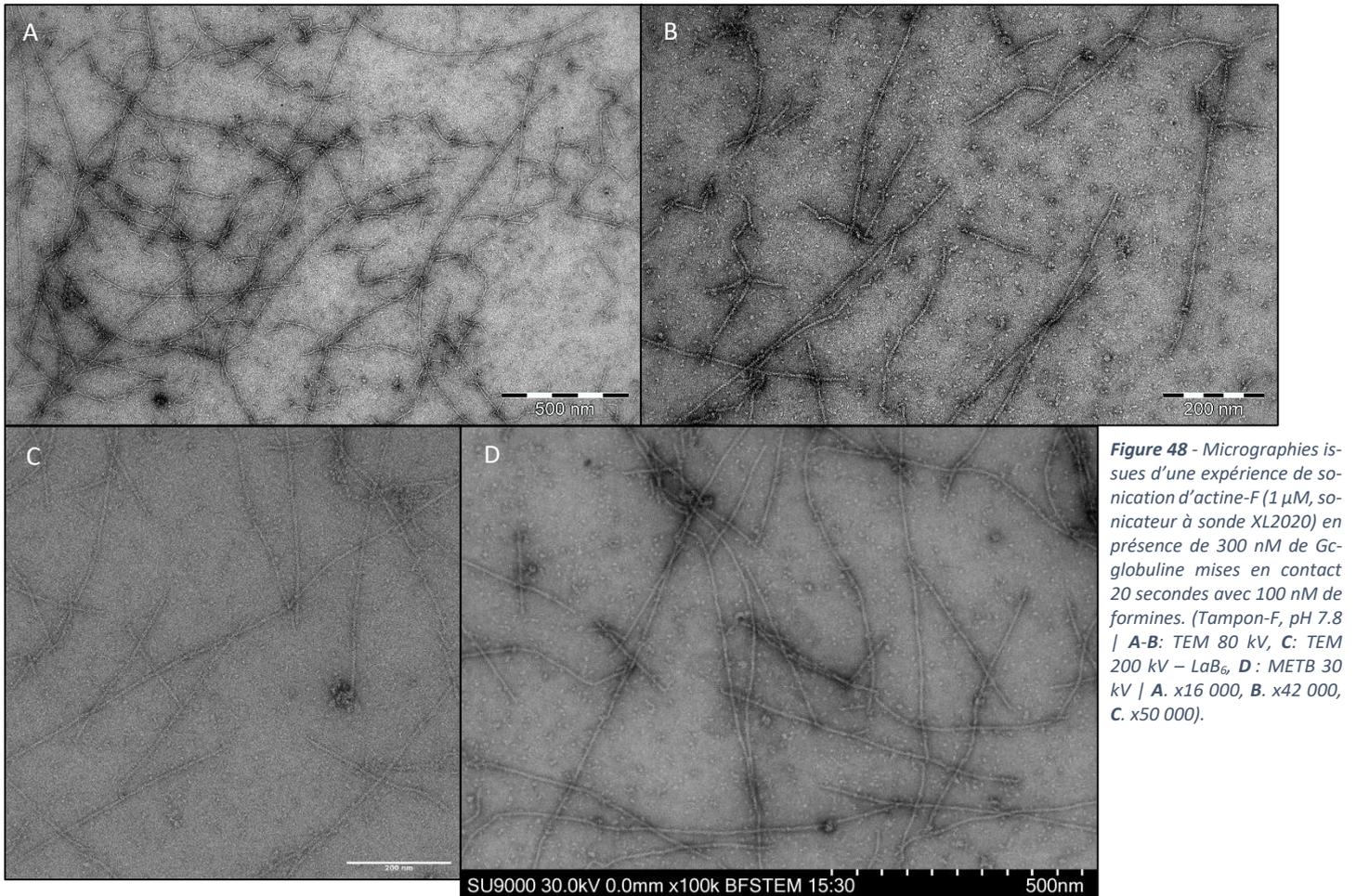


Figure 47 – A,B,D,F,G,H. Micrographies issues d'expériences de sonication d'actine-F (2 μM , sonicateur à sonde XL2020) en présence de **A-B** : 750 μM de complexe spectrine-actine et 300 nM de Gc-globuline, **D** : 20 nM Arp2/3 (flèche rouge : Arp2/3 lié à une extrémité pointue) et 300 nM de Gc-globuline, **F** : 1 μM de tropomoduline et 300 nM de Gc-globuline, **H** : 100 nM de formine et 300 nM de Gc-globuline. **C.** Micrographie réalisée à partir de 50 nM de complexe Arp2/3. **E.** Micrographie réalisée à partir de 1 μM de tropomoduline (Tampon-F, pH7.8 | 80 kV | **A-G.** x16 000 ; **B,C,D,E,F,H** : x42 000).

Enfin, une densité raisonnable d'extrémités d'actine a pu être obtenue en s'affranchissant de l'utilisation de protéines de coiffe des extrémités pointues, en ajustant la concentration d'actine initiale à 1 μM , en conservant l'utilisation de 300 nM de Gc-globuline durant la sonication et en introduisant rapidement après sonication 100 nM de formine (**Fig. 48**).



Des acquisitions automatisées à l'aide du microscope électronique en transmission conventionnelle Tecnai G2 (**Fig. 48.C**) ainsi que des acquisitions manuelles à l'aide du microscope électronique en transmission à balayage SU9000 (**Fig. 48.D**) ont pu être réalisées sur ces grilles de microscopie électronique. On remarque ici la différence de contraste existant entre une image brute acquise par **MET** standard (-1.35 μm de défocalisation) et une image brute acquise par **METB**.

Afin d'améliorer les conditions de préparation des échantillons actine-formine, un sonicateur à sonde Vibracell 75041 équipé d'une pointe de 3 mm de diamètre a pu être testée. Après optimisation des paramètres de sonication, des résultats satisfaisants concernant la densité d'extrémités observées par microcroscope ont pu être obtenus en s'affranchissant de l'utilisation de

toute protéine tierce de régulation de l'actine afin de préserver l'interaction du binôme actine-formine. Une telle condition simplifiée permet de faciliter l'interprétation des analyses réalisées ultérieurement.

Dans ce contexte, plusieurs ajustements ont été explorés pour moduler le ratio de liaison observé des formines aux extrémités barbées des filaments d'actine.

La concentration d'actine-F sonicuée ici est de 1 μM en présence de 100 nM de formines introduites 20 secondes (**Fig. 49.A**) ou 1 minute (**Fig. 49.C**) avant le dépôt des échantillons sur grille de microscopie électronique. Une concentration de 200 nM de formine a également pu être utilisée avec un temps d'attente de 20 secondes entre l'introduction des formines et le dépôt des échantillons sur grille de microscopie électronique (**Fig. 49.B**).

On constate sur les images brutes que pour une concentration de formine plus élevée (200 nM), le tapis de protéine observé est plus dense (**Fig. 49.B**) tandis que pour une durée plus longue entre sonication des filaments d'actine et dépôt des échantillons sur grille, les filaments d'actine observés sont qualitativement plus long.

Des acquisitions d'image automatisées ont pu être réalisées sur ces différentes conditions avec le microscope Tecnai G2.

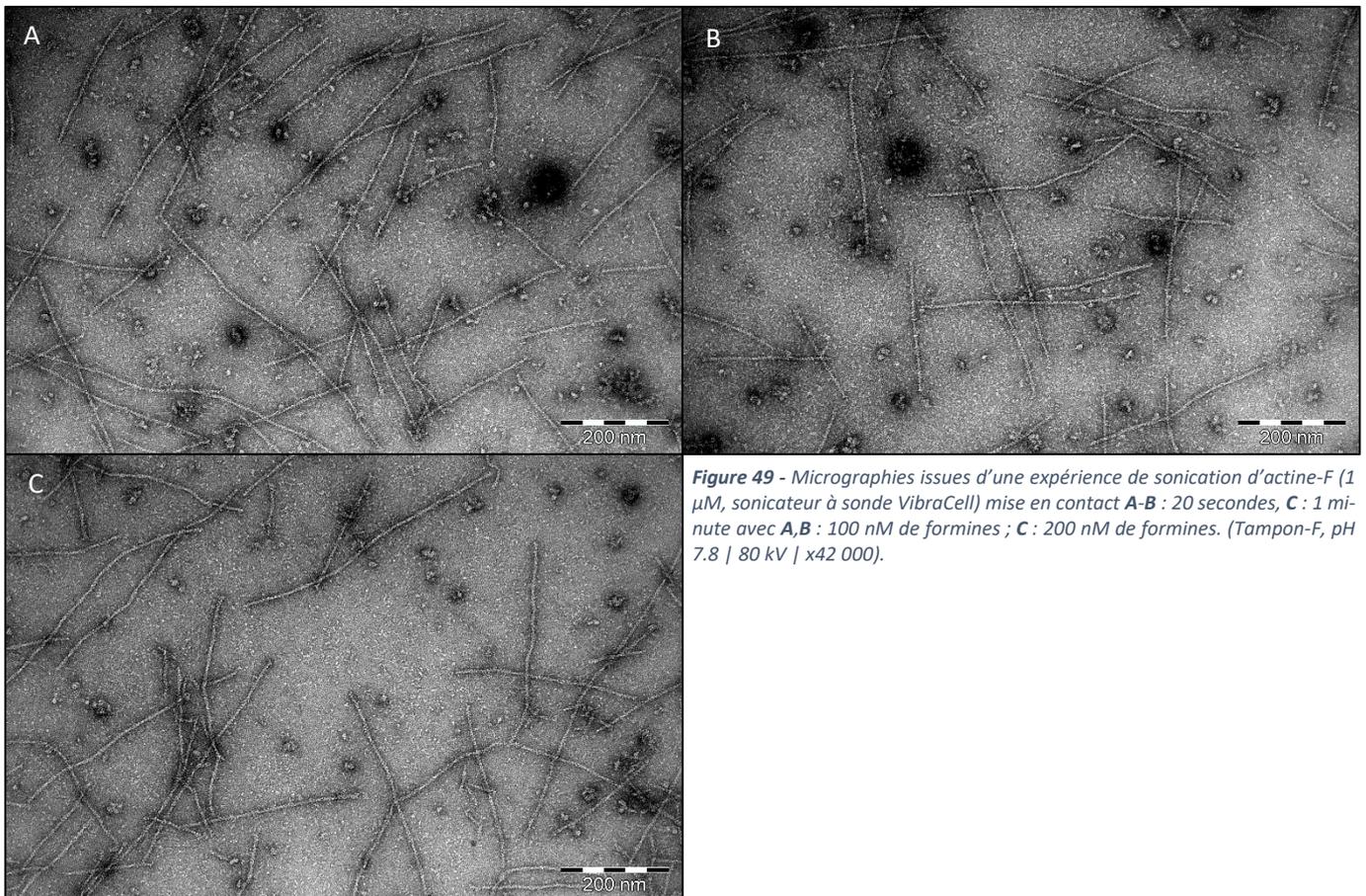


Figure 49 - Micrographies issues d'une expérience de sonication d'actine-F (1 μM , sonicateur à sonde VibraCell) mise en contact **A-B** : 20 secondes, **C** : 1 minute avec **A,B** : 100 nM de formines ; **C** : 200 nM de formines. (Tampon-F, pH 7.8 | 80 kV | x42 000).

Finalement, un nombre conséquent d’approches pour la préparation des échantillons actine-formine a été évalué. Cette phase de fenêtrage stratégique et de mise au point des procédés a constitué une part importante du projet de thèse et a permis de rendre atteignable l’objectif initialement fixé consistant à déterminer les conformations structurales adoptées par des formines au cours même de la polymérisation des filaments d’actine.

3. Analyses en Particule unique adaptées pour des extrémités de filament d’actine.

3.1. Analyse en Particule Isolée : Nucléation, Spectrine • Actine • Formine.

Le premier jeu de données ayant pu être traité par une Analyse en Particule Isolée correspond aux extrémités de filaments d’actine issus d’une expérience de polymérisation d’actine à temps courts en présence de formine et dont la nucléation est assurée par des complexes spectrine-actine.

A. Alignement et classification 2D.

Un alignement 2D suivi d’une classification 2D classiques ont été utilisés pour traiter ces données (**Fig. 50**).

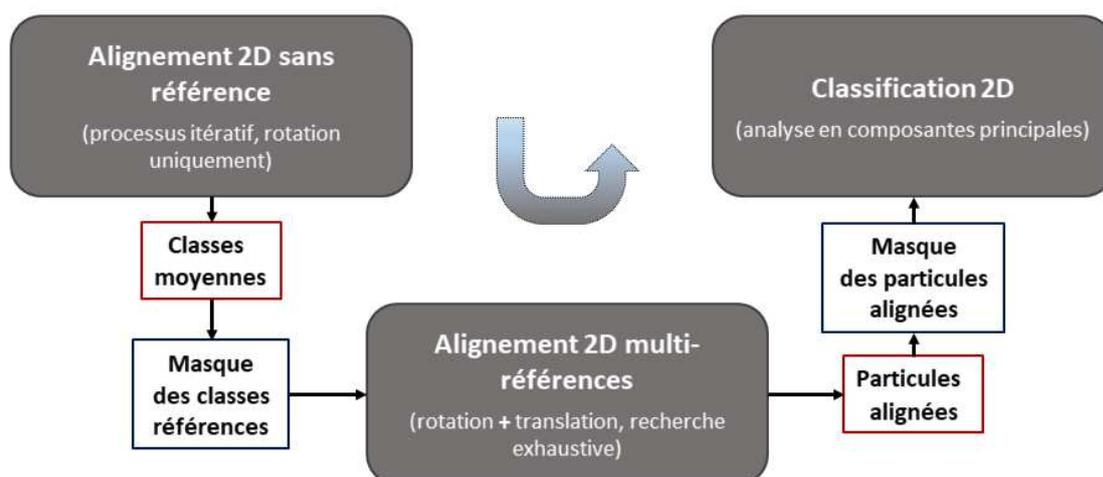


Figure 50 – Schéma de principe d’une analyse 2D classique.

On constate dans l'ensemble des classes obtenues un signal fort des sous-unités d'actine constituant les filaments (**Fig. 51**). Quelques classes présentent des densités électroniques exotiques mais le rapport signal sur bruit affiché reste faible laissant ces moyennes difficilement interprétables dans le contexte d'une coiffe par un dimère de formine (**Fig. 51**, seconde ligne). En outre, la contribution de potentiels signaux associés à des complexes spectrine-actine dans ces données n'est pas clairement définie au sein des classes observées.

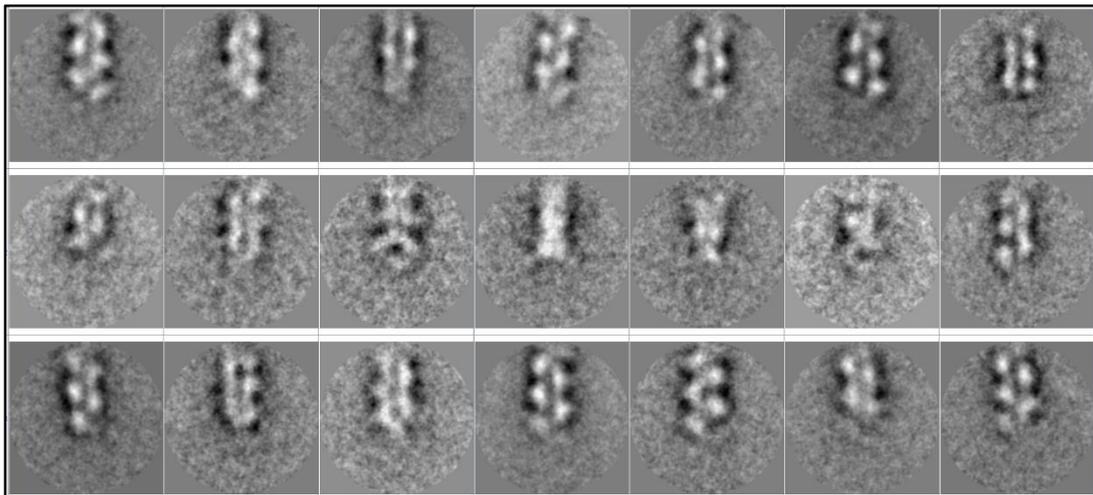


Figure 51 - Résultat d'une classification 2D SPIDER de particules issues d'une expérience de polymérisation d'actine ($1 \mu\text{M}$) à temps court (~ 10 secondes) nucléée par 150 pM de complexes spectrine-actine en présence de 135 nM de formine et traitées en coloration négative (Dimensions des boîtes : 29 nm^2).

En conclusion, la densité d'extrémités de filaments d'actine (~ 5 extrémités de filament d'actine par image) obtenue à travers une approche de nucléation de filaments par des complexes spectrine-actine ne permet pas d'acquérir une quantité de particules suffisante pour réaliser une Analyse en Particule Isolée aboutie. Cette approche n'a donc pas été poursuivie.

3.2. Analyse en Particule Isolée : Sonication, Gc-globuline – Actine • Formine.

Le second jeu de données ayant pu être traité par une Analyse en Particule Isolée correspond aux extrémités de filaments d'actine issus d'une expérience de sonication d'actine-F en présence de Gc-globuline mis en contact succinctement avec de la formine avant dépôt sur grille de microscopie électronique. La densité d'extrémité de filaments d'actine obtenue avec une telle approche est de 15 extrémités par image.

A. Alignement et classification 2D : MET.

De même que pour l'approche par nucléation stimulée en présence de complexes spectrine-actine, le jeu de données présenté ici a été traité dans un premier temps par un alignement 2D suivi d'une classification 2D classiques (**Fig. 50**). Le résultat d'une classification 2D réalisée sous SPIDER à partir de particules de dimensions 110x110 pixel² est représenté en **Figure 52**.

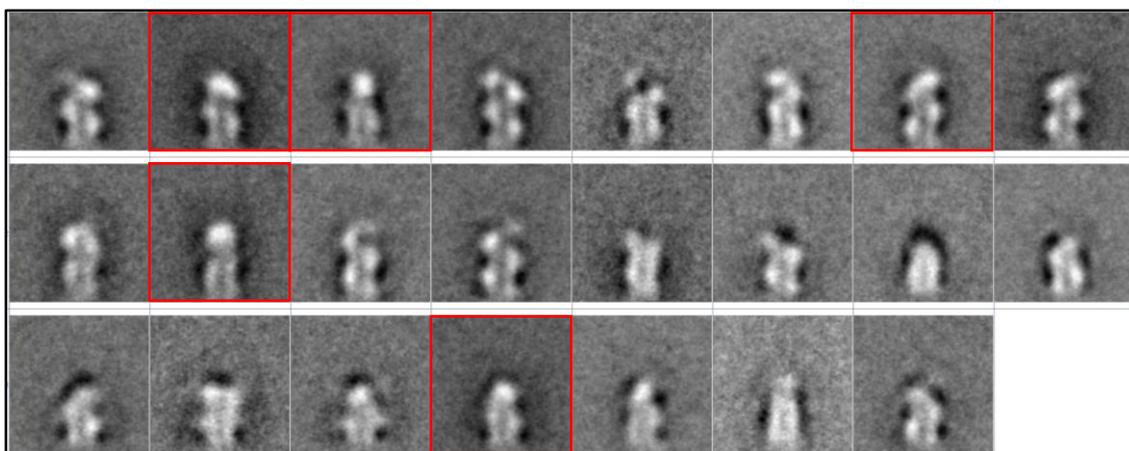


Figure 52 - Résultat d'une classification 2D SPIDER de particules issues d'une expérience de sonication d'actine-F en (1 μ M) présence de Gc-globuline (300 nM) mis en contact succinctement avec de la formine (100 nM) et traitée en coloration négative. Encadrés rouges : classes moyennes présentant une densité globulaire à l'extrémité. (Dimensions des boîtes : 23 nm²).

On constate parmi les classes obtenues des classes moyennes présentant, en plus des sous-unités d'actine constituant le filament, une densité globulaire située à l'extrémité du filament d'actine (**Fig. 52**, encadrés rouges). Les particules associées à ces classes représentent 22% des particules extraites (1698 particules).

B. Alignement et classification 2D : METB.

Des résultats analogues ont pu être obtenus à partir de la même grille de microscopie électronique observée par METB au *Structural Biology Research Center* de Nagoya. Les particules ont été analysées via RELION après une détermination sous EOS de la nature pointue ou barbée des extrémités considérées (**Cf II.7.2**).

On retrouve parmi les classes associées aux bouts barbés une classe qui présente une densité globulaire à son extrémité (**Fig. 53.B**, encadré rouge). La présence exclusive de ces densités globulaires aux extrémités barbées est en accord avec ce qui est attendu pour des formines interagissant avec des filaments d'actine. Les particules associées à cette classe représentent environ 40 % des extrémités barbées identifiées. Ce pourcentage est en adéquation avec la valeur obtenue dans l'analyse précédente (22 %) dans laquelle les extrémités barbées et les extrémités pointues sont confondues.

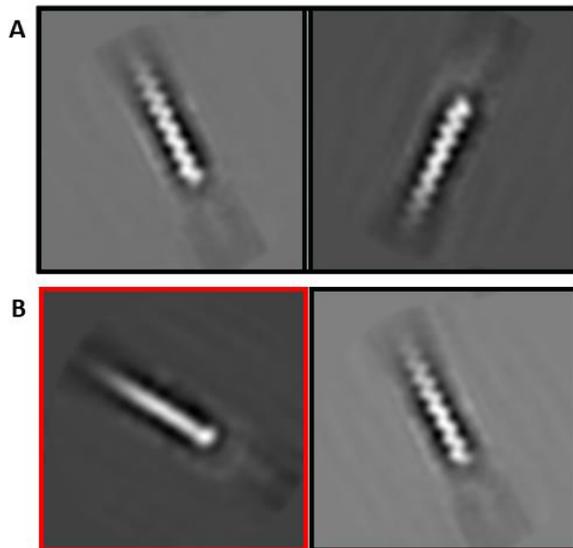


Figure 53 – Classes moyennes représentatives des classifications réalisées via RELION une fois avoir déterminé la nature pointue (A) ou barbée (B) des extrémités considérées. Encadré rouge : classe moyenne de bouts barbés présentant une densité globulaire à l'extrémité.

On remarque que pour cette classe, contrairement aux autres, le motif ondulé associé à l'hélicité du corps du filament d'actine n'est pas mis en évidence (**Fig. 53.B**). Cette observation peut être interprétée comme une différence du signal prépondérant dans l'alignement des filaments de ces deux cas. Dans le cas des filaments où une densité globulaire est présente à l'extrémité, on peut supposer que les extrémités contrastées guident l'alignement des particules au détriment de l'alignement du corps des filaments d'actine qui ne sont pas nécessairement orientés dans la même direction. Le motif ondulé caractéristique d'une orientation est donc perdu.

En l'absence de densité contrastée à l'extrémité des filaments, on peut supposer que les corps des filaments sont alignés de sorte à faire correspondre « crêtes » et « creux » de ce motif ondulé associé à l'hélicité du filament d'actine, cela au détriment de l'alignement des extrémités.

Le nombre d'images acquises pour cette analyse par **METB** a été limité par l'impossibilité de réaliser des acquisitions automatisées. En effet, le système alors utilisé nécessitait un réglage manuel du focus avant la réalisation de chaque image. Un total de 218 images a pu être obtenu. À partir de ces images environ 1600 extrémités ont pu être extraites après identification de la polarité des filaments leurs étant associés. Ainsi une densité d'environ 7.5 extrémités par image a pu être obtenue à travers cette analyse. La densité d'extrémité affichée ici, inférieure par rapport à celle obtenue dans l'analyse précédente, est une conséquence de l'étape supplémentaire visant à déterminer au préalable la polarité des filaments extraits. En effet, dans cette étape, les filaments trop petits, trop courbés ou dont le signal n'est pas suffisamment résolu pour en déterminer efficacement la polarité se retrouvent écartés de l'analyse, diminuant de ce fait le nombre d'extrémités considérées.

Au final, 280 bouts barbés présentant une densité globulaire à leur extrémité ont pu être identifiés. Ce nombre de particules reste insuffisant pour pouvoir réaliser une Analyse en Particule Isolée.

Ainsi, bien qu'une étude par **METB** présente un avantage concernant le contraste observé des images obtenues vis-à-vis d'une étude par **MET**, le nombre de données générées reste insuffisant pour tirer profit de cet avantage dans une Analyse en Particule Isolée.

C. Optimisation 1D de l'alignement des extrémités.

Malgré le nombre de particules obtenues par une approche en **MET** (7551 particules), l'ensemble des reconstructions 3D réalisées à partir de ce jeu de données reste très bruité, laissant les sous-unités d'actine de l'extrémité difficilement identifiables au sein des reconstructions 3D obtenues. Cette observation reste vraie que ce soit en générant un modèle 3D à partir de particules associées à des classes avec ou sans densité globulaire à l'extrémité du filament d'actine. Cette observation pourrait être la conséquence d'un alignement imprécis des extrémités de filament d'actine. En effet, des classifications 2D réalisées avec RELION sur ce jeu de données semblent mettre en évidence un alignement imparfait de certaines extrémités (**Fig. 54**). On observe ici des tailles d'extrémités extraites différentes.

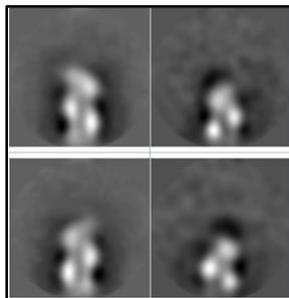


Figure 54 – Groupe de classes moyennes issues d'une unique classification 2D RELION et présentant des extrémités alignées selon deux hauteurs différentes (gauche/droite).

Pour remédier à cette observation, une étape supplémentaire d'ajustement de la position des extrémités sur l'axe du filament a été entreprise (**Fig. 55**). Pour ce faire une classification 2D des particules pré-alignées sous SPIDER a été réalisée en générant un nombre de classes conséquent, cela dans le but d'échantillonner au mieux les données tout en conservant un rapport signal sur bruit suffisant à travers le moyennage de quelques particules par classe (**Fig. 55**, gauche). Chaque classe moyenne est ensuite masquée pour ne conserver que le signal associé à la bande de l'image contenant le filament d'actine (**Fig. 55, a.**). Une projection en 1D des images 2D est réalisée selon un axe perpendiculaire à celui des filaments d'actine (**Fig. 55, b.**). Dans cette étape, les images de filaments d'actine sont préalablement débruitées à travers un filtre *Mean-Shift* opéré sous ImageJ. Ce filtre permet de lisser les fluctuations d'intensité soit le

long du filament, soit en aval du filament, tout en préservant le saut d'intensité associé à l'extrémité du filament (**Fig. 55, c.**).

En outre, les pixels de l'image dont l'intensité est négative sont systématiquement rehaussés à zéro. Cette précaution permet de limiter l'effet de l'enveloppe de colorant accumulé autour du filament d'actine. En effet, cette accumulation de colorant a pour conséquence de déplacer les valeurs d'intensité associées vers des valeurs négatives marquées. De telles valeurs d'intensité auraient pour effet lors de la projection 1D d'atténuer la contribution du signal des protéines associées quant à elles à des valeurs d'intensité positives.

Suite à ces opérations, la projection 1D est seuillée (**Fig. 55, d.**) et le bord délimitant l'extrémité du filament est déterminé à travers un calcul de dérivée (**Fig. 55, e.**). La position du maximum associé à ce gradient d'intensité est alors déterminée (**Fig. 55, f.**).

Une telle approche de détermination de la position de l'extrémité des filaments d'actine est réalisée pour chacune des classes moyennes précédemment générées. Les positions de chaque ensemble de particules associées à chacune de ces classes moyennes sont alors réajustées pour faire correspondre l'ensemble des positions d'extrémité déterminées.

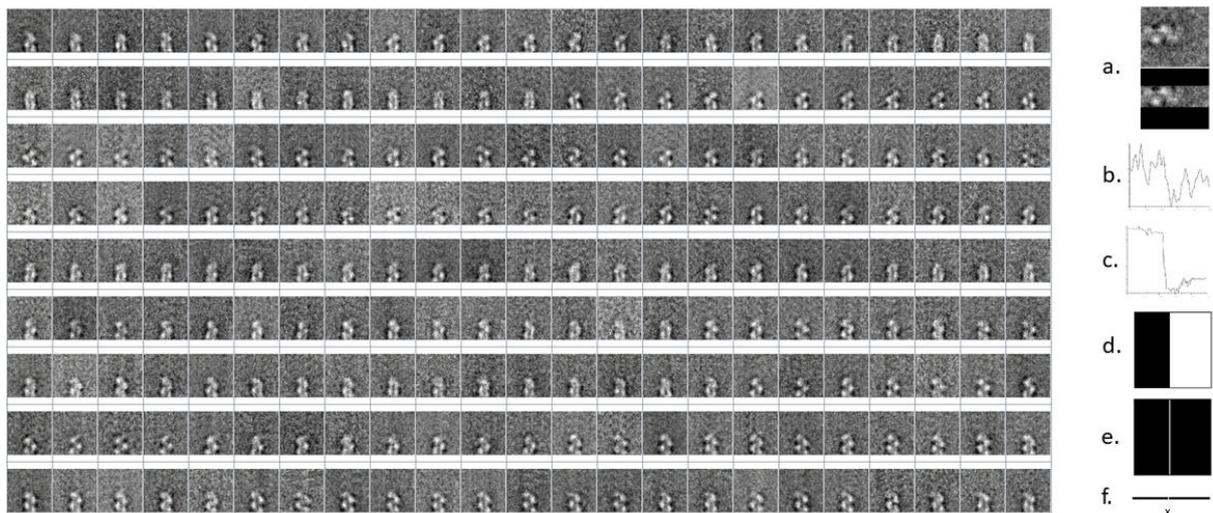


Figure 55 – Gauche : Exemple de classes visant à échantillonner les différentes positions des extrémités de filament d'actine existantes dans le jeu de donnée. **Droite** : Principe de détermination 1D de la position de l'extrémité du filament d'une classe moyenne. **a.** Masque du filament. **b.** Graphe de l'intensité le long de l'axe du filament après projection 1D. **c.** Graphe de l'intensité le long de l'axe du filament après projection 1D et débruitage par un filtre Mean-Shift. **d.** Image 2D représentative du seuillage de la projection 1D. **e.** Image du gradient d'intensité après seuillage. **f.** Détermination de la position du maximum associé au gradient de l'image seuillée.

Après cette étape supplémentaire d'alignement des extrémités extraites on retrouve par classification 2D sous RELION des classes plus justement alignées selon l'axe du filament (**Fig. 56**).

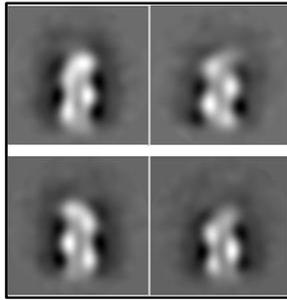


Figure 56 – Groupe de classes issues d’une unique classification 2D RELION de particules dont la position de l’extrémité a été ajustée selon une approche 1D.

Néanmoins, malgré cette étape d’alignement supplémentaire, l’aspect des reconstructions 3D réalisées à partir de particules ré-alignées selon une approche 1D restent bruitées.

Afin d’harmoniser la taille des extrémités de filaments observés dans le jeu de données, un recadrage de la bordure des boîtes utilisées a été réalisé selon le schéma présenté en **Figure 57**.

L’aspect bruité des reconstructions 3D réalisées à partir de telles particules recadrées avec une boîte de dimension finale 86x86 pixel² se retrouve largement amplifié. Cette observation suggère un effet drastique des dimensions de boîte utilisées sur les opérations de reconstruction 3D.

Un nouveau jeu de données (6653 particules) a été ré-extrait des micrographies avec une taille de boîte de 180x180 pixel². Un traitement similaire a été réalisé sur ces particules nouvellement extraites (alignement 2D SPIDER, alignement 1D, recadrage) pour arriver à une dimension finale de boîte de 160x160 pixel².

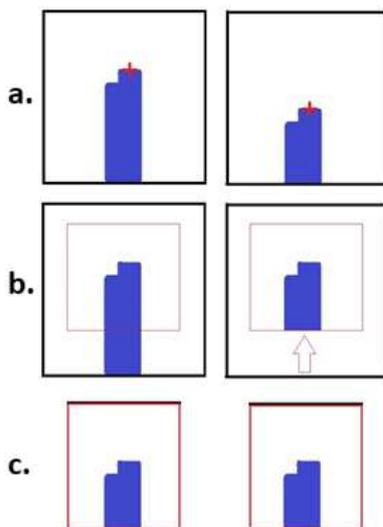


Figure 57 - Schéma de principe du recadrage des particules extraites. a. Détermination 1D de la position de l’extrémité. b. Alignement des extrémités. c. Nouvelle délimitation de la boîte utilisée.

Des reconstructions 3D réalisées à partir de ce nouveau jeu de données ont permis d'obtenir une reconstruction fidèle d'une extrémité de filament d'actine nu à 28 Å de résolution. La structure obtenue permet d'ajuster fidèlement le modèle atomique d'une extrémité d'actine avec un meilleur ajustement pour une extrémité barbée.

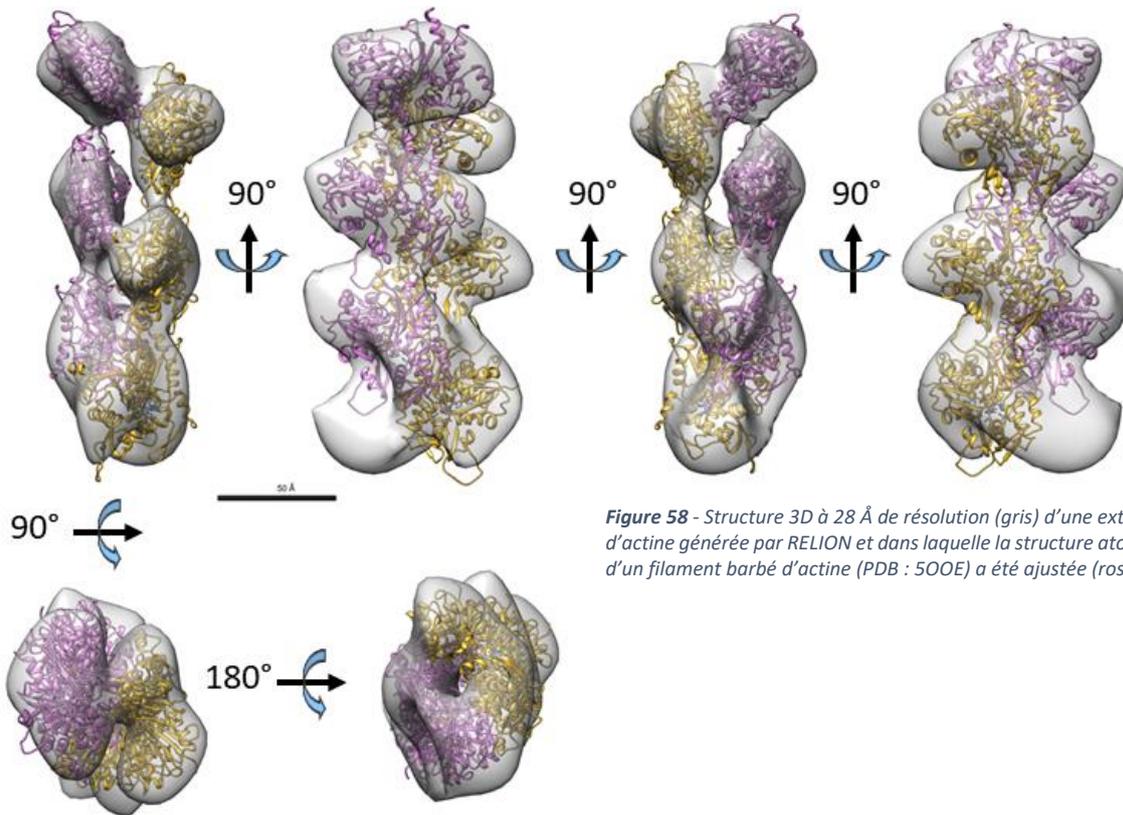


Figure 58 - Structure 3D à 28 Å de résolution (gris) d'une extrémité d'actine générée par RELION et dans laquelle la structure atomique d'un filament barbé d'actine (PDB : 5OOE) a été ajustée (rose, or).

Bien que l'on puisse générer à partir de ce nouveau jeu de données la structure d'une extrémité d'actine nue, aucune structure cohérente avec une extrémité d'actine coiffée d'une formine n'a pu être générée en considérant les classes moyennes associées à une densité globulaire marquée. En outre, les classes moyennes 2D associées à cette densité globulaire sont difficilement interprétables en tant que projections d'une extrémité barbée coiffée d'un dimère de FH2.

Une hypothèse a alors été soulevée : la Gc-globuline utilisée dans ces expériences pourrait perturber l'interaction des extrémités barbées avec les formines qui ne sont introduites dans le mélange actine - Gc-globuline, que dans un second temps et pendant une durée limitée.

Une telle perturbation de l'interaction bout barbé – formine pourrait être la conséquence d'une interaction des Gc-globulines soit avec les formines, soit avec les bouts barbés. Dans le premier cas, aucune étude n'a été menée sur le sujet. Dans le second cas, il est mentionné dans la littérature que la Gc-globuline interagit exclusivement avec l'actine-G en solution¹¹³. Néanmoins, le mode d'interaction des Gc-globulines avec les monomères d'actine sur le sillon 1/3 de ces

derniers (**Fig. 8.C**) laisse, a priori, envisageable une interaction de la Gc-globuline avec la première sous-unité d'actine d'un modèle d'extrémité barbée, sans contrainte stérique apparente exercée par le reste des sous-unités d'actine du filament (**Fig. 59**). Des expériences visant à étudier cette interaction avaient pu être réalisées en 2002¹¹³. Ces expériences reposent sur la séparation en solution de l'actine-G et de l'actine-F par une ultra-centrifugation opérée à 10 000 g. On peut alors se demander si les filaments de plus petites tailles sont efficacement culottés dans ces expériences, en effet, une accélération d'un ordre de grandeur supérieur est généralement préconisée.

En outre, les classes moyennes présentant une densité globulaire marquée observées ici (**Fig. 52**, encadrés rouges) peuvent être mises en correspondance avec des projections d'un modèle structurale d'extrémité barbée coiffée d'une Gc-globuline (**Fig. 59.B**). Cependant, l'existence de ce complexe Gc-globuline – bout barbé n'a pas pu être confirmé par la génération d'une structure 3D correspondante.

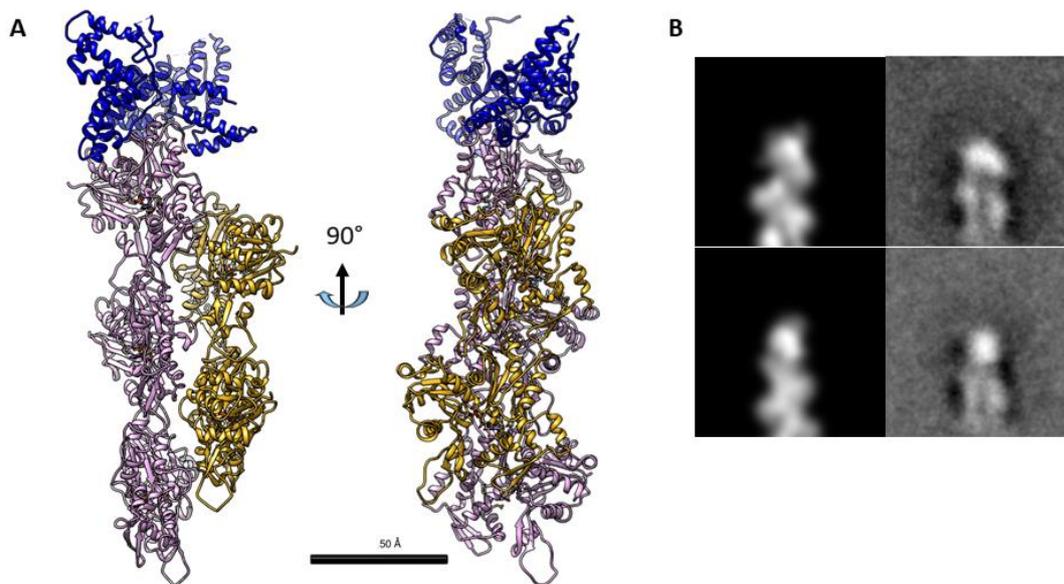


Figure 59 – A. Modèle atomique d'une extrémité barbée (PDB : 500E, rose/or) coiffée d'une Gc-globuline (PDB : 1MA9, bleu). B. Comparaison entre deux projections du modèle atomique bout barbé – Gc-globuline préalablement traité à l'aide d'un filtre Gaussien (Gauche) et deux classes moyennes obtenues à partir du mélange actine – Gc-globuline – formine (droite).

Au regard de ces résultats, des expériences de sonication de filaments d'actine, en s'affranchissant de toute protéine de liaison avec l'actine, exceptée la formine, ont été réalisées. Une telle configuration permet de lever toute ambiguïté sur la nature des potentiels complexes observés aux extrémités des filaments d'actine.

3.3. Analyse en Particule Isolée : Sonication, Actine • Formine.

Finalement, les derniers jeux de données obtenus par une approche en coloration négative et ayant pu être traités par une Analyse en Particule Isolée correspondent aux extrémités de filaments d'actine issus d'expériences de sonication de 1 μM d'actine-F seule avec un sonicateur Vibracell, mise en contact succinctement avec de la formine avant dépôt sur grille de microscopie électronique. Ces conditions ont permis d'obtenir les résultats les plus concluants concernant l'étude de l'association des formines aux extrémités barbées des filaments d'actine.

Pour l'ensemble des concentrations de formine utilisées (100/200 nM) ou des temps de contact entre actine-F soniquée et formine avant dépôt sur grille de microscopie électronique (20/60 secondes), une densité d'environ 12 extrémités de filament d'actine par image est observée.

Pour chacune de ces conditions, des structures particulières à l'extrémité de certains filaments d'actine sont observables dès l'acquisition des images brutes de microscopie électronique (**Fig. 60**).

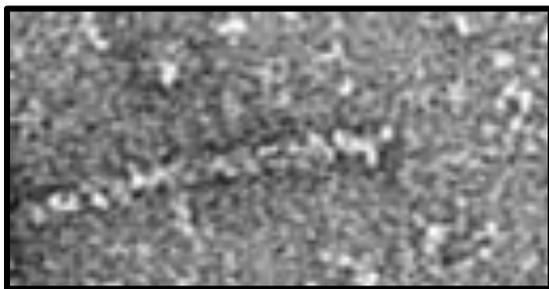


Figure 60 – Image d'un filament d'actine présentant à son extrémité une structure asymétrique caractéristique de l'échantillon actine-formine observé (MET | 80 kV).

Lors de l'alignement des extrémités de filament extraites, une attention particulière a été portée sur ces structures.

A. Optimisation 2D de l'alignement des extrémités.

La première étape de l'analyse de ces jeux de données a été d'améliorer le protocole d'alignement et de classification 2D utilisé avec SPIDER pour l'analyse des extrémités de filament d'actine. En effet, SPIDER offre une très grande flexibilité quant aux diverses fonctions paramétriques utilisées pour réaliser une analyse 2D. Cette flexibilité rend l'analyse 2D sous SPIDER plus délicate mais en contrepartie permet d'adapter l'approche choisie, au jeu de données traité.

Les différentes étapes utilisées dans ce protocole d'analyse 2D sous SPIDER sont résumés dans le schéma **Figure 61** et détaillées ci-dessous.

Dans la première étape, les filaments sont normalisés à travers un masque circulaire classique. Cette étape consiste à ajuster pour chaque particule la distribution des intensités de tous les pixels situés en dehors d'un disque centré (**Fig. 61.1**), avec la distribution des intensités d'une image référence ne représentant que du bruit (sans aucune protéine). Cette étape permet d'harmoniser l'intensité de toutes les particules du jeu de données.

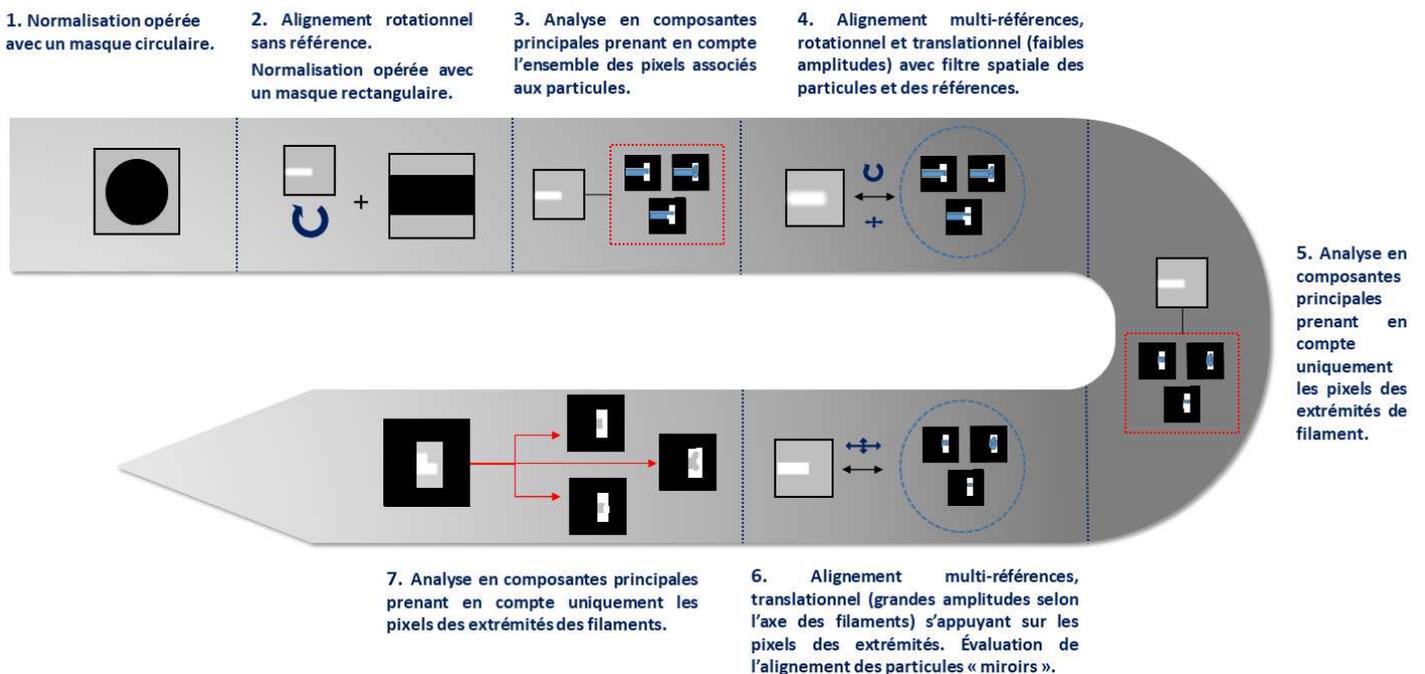


Figure 61 – Schéma représentant les étapes de l'analyse 2D adaptée à des extrémités de filament (analyse réalisée sous SPIDER).

Cependant, un tel traitement est correctement réalisé lorsque seul du bruit est présent en dehors du disque centré, comme c'est le cas pour des particules globulaires. Ici, les extrémités extraites interceptent le bord de la boîte ce qui implique que les pixels constituant l'extérieur du disque centré contiennent également du signal associé aux protéines. Une nouvelle étape de normalisation est donc réalisée après avoir aligné rotationnellement l'ensemble des extrémités selon un axe donné, et en utilisant cette fois-ci un masque rectangulaire qui éclipse totalement le signal du filament (**Fig. 61.2**).

Dans un troisième temps, une analyse en composantes principales est réalisée sur les extrémités alignées rotationnellement (**Fig. 61.3**). Cette étape a pour but de générer des moyennes références représentatives de l'allure globale des extrémités extraites. Les moyennes références générées sont alignées entre elles et utilisées pour un alignement multiréférences (**Fig. 61.4**).

L'objectif principal de cet alignement est d'ajuster au mieux l'orientation de chacune des particules. Dans cette opération, un filtre passe-bas est appliqué sur les particules et les moyennes références afin de faire ressortir l'orientation globale de chaque particule.

Une nouvelle analyse en composantes principales est alors réalisée à travers un masque focalisé sur le bout des filaments extraits (**Fig. 61.5**). Cette étape a pour but de générer des moyennes références représentatives de la variabilité structurale ainsi que des diverses positions de ces bouts. À nouveau, les moyennes références générées sont alignées entre elles et utilisées pour un alignement multiréférences (**Fig. 61.6**). L'objectif de cet alignement est d'ajuster avec précision la position des extrémités.

En outre, les particules « miroirs » du jeu de données sont également considérées. Ces particules « miroirs » correspondent aux particules générées après l'application d'une symétrie 2 selon l'axe des filaments. Étant donné que l'image d'un objet 3D en microscopie électronique correspond à la projection de ses densités en 2D, l'information structurale contenue dans l'image d'un objet ou dans son image « miroir » est identique. En effet, cela revient à observer l'objet adsorbé par une face ou par sa face opposée. Pour chaque particule alignée, le score d'alignement obtenu est comparé au score d'alignement obtenu en considérant sa particule « miroir ». La particule présentant le score le plus élevé est conservée pour le reste de l'analyse. Cette étape permet dans le cas de particules asymétriques comme observées en **Figure 60**, d'aligner l'ensemble des motifs asymétriques dans un sens donné pour augmenter le rapport signal sur bruit obtenu après moyennage et permettre également l'utilisation d'un masque asymétrique plus adapté (**Fig. 62**).

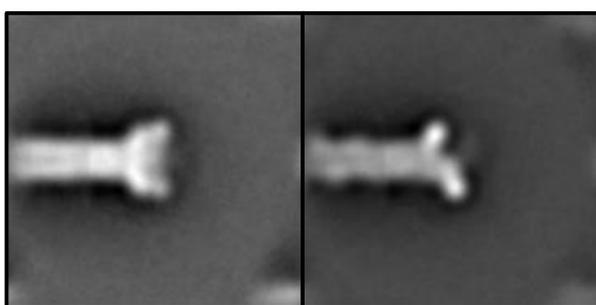


Figure 62 – Moyennage de particules asymétriques sans considérer l'alignement des particules « miroirs » (gauche) ou en considérant l'alignement des particules « miroirs » (droite).

B. Affinement itératif de l'analyse 2D.

Les premiers résultats des analyses 2D obtenus à partir de la sonication (sonicateur Vi-bracell) d'actine-F mise en contact avec de la formine sont présentés en **Figure 63.A-C**.

Dans l'ensemble de ces classifications 2D on retrouve des classes moyennes représentatives d'extrémités de filaments d'actine nues (**Fig. 63.A-C**, classes moyennes non encadrées) au côté

de classes moyennes atypiques, analogues à la densité caractéristique observée en **Figure 60** (**Fig. 63.A-C**, encadrés rouges) ainsi que des classes moyennes moins contrastées, génériques de ces premières classes moyennes atypiques (**Fig. 63.A-C**, encadrés bleus). Ces classes moyennes atypiques ne sont pas observables à l'issue d'une sonication d'actine-F réalisée sans ajout de formine (**Fig. 60.D**, 1033 particules) et semblent ainsi caractéristiques des formines. Les particules associées aux premières classes moyennes atypiques (**Fig. 63**, encadrés rouges) représentent environ 20 % de la totalité des extrémités considérées dans les expériences réalisées après sonication d'actine-F mise en contact 20 secondes avec 100 nM (**Fig. 63.A**, 2249 particules) ou 200 nM de formine (**Fig. 63.B**, 1327 particules). Ce pourcentage descend à 11 % dans le cas d'une expérience de sonication d'actine-F mise en contact 1 minute avec 100 nM de formine (**Fig. 63.C**, 1329 particules). Néanmoins, l'interprétation de cette baisse de ratio reste délicate étant donné que l'aliquote de formine utilisée ici provient du même lot d'aliquotes utilisé pour les deux autres conditions mais a enduré une nuit d'attente sur glace après sa décongélation. On ne peut donc pas exclure ici une dégradation partielle des formines utilisées pour cette expérience.

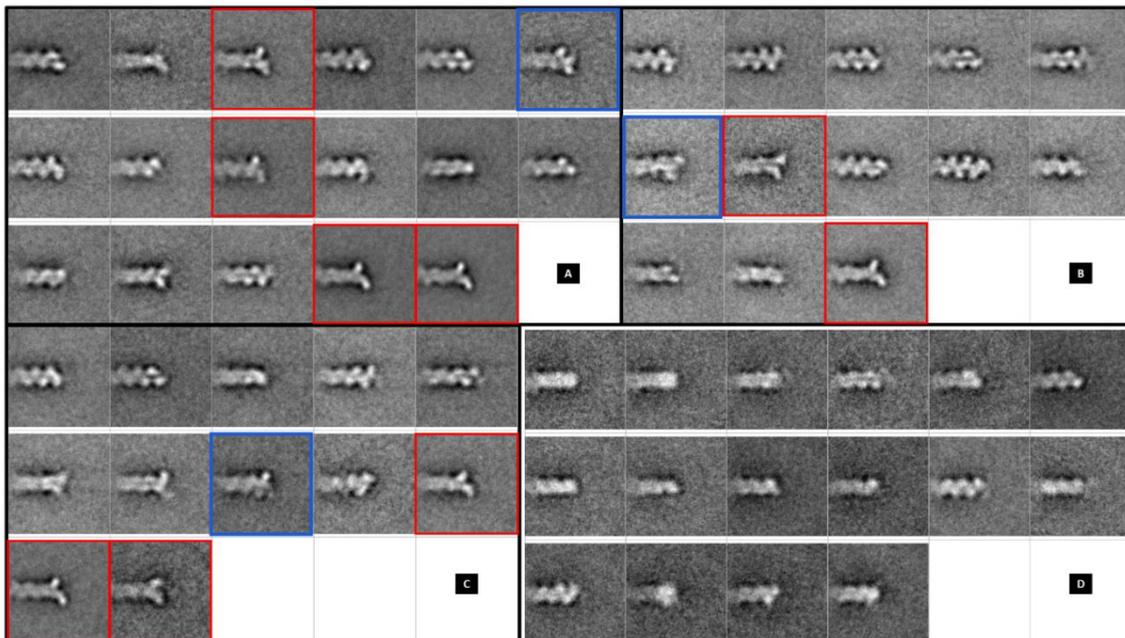


Figure 63 – Résultat d'une classification 2D SPIDER de particules issues d'expériences de sonication d'actine-F (1 μ M) mis en contact 20 s (**A,B**) ou 60 s (**C**) avec 100 nM (**A,C**), 200 nM (**B**) ou 0 nM (**D**) de formine avant d'être traitées en coloration négative. Encadrés rouges : première série de classes moyennes présentant une densité atypique. Encadrés bleus : seconde série de classes moyennes présentant une densité atypique générique de la première. (Dimensions des boîtes : 38 nm²).

En ce qui concerne les secondes classes moyennes atypiques (**Fig. 63**, encadrés bleus), elles représentent 3 à 7 % de la totalité des particules observées.

Suite à ces observations et afin de travailler à partir d'un jeu de données plus conséquent pour maximiser le rapport signal sur bruit à l'issue des moyennages, l'ensemble des données issues des expériences de sonication d'actine-F mise en contact 20/60 secondes avec 100/200 nM de formine a été regroupé.

En outre, de nouvelles images ont été acquises sur une grille de microscopie électronique issue d'une expérience de sonication (Vibracell) d'actine-F mise en contact 20 secondes avec 100 nM. Cette condition a été choisie pour l'acquisition de nouvelles images étant donné qu'aucune amélioration du ratio des particules attribuables à des complexes bout barbé – formine n'a pu être observée avec les autres conditions.

La classification 2D SPIDER résultante de ce jeu de données agrandi (20 922 particules) est présentée en **Figure 64**. Les particules associées à des classes moyennes d'extrémités de filament d'actine atypiques (**Fig. 64**, encadrés vert) ont été sélectionnées pour réaliser une nouvelle série d'alignement et de classification 2D sous SPIDER à partir d'un jeu de donnée plus homogène.

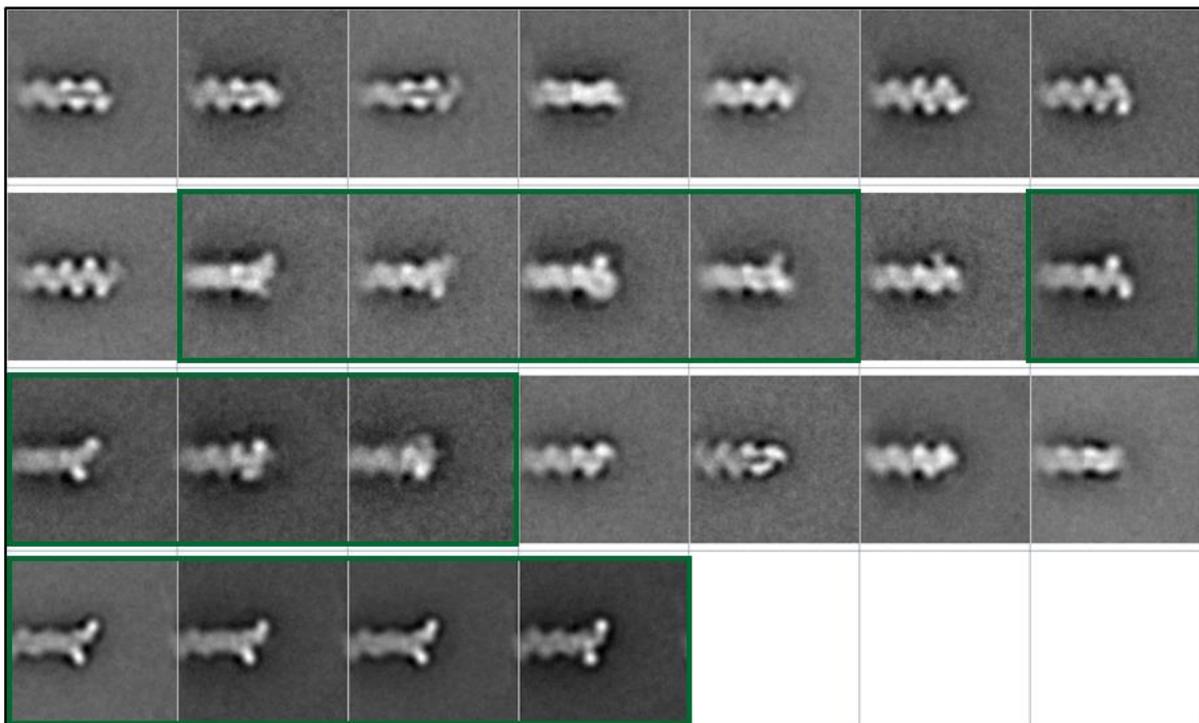


Figure 64 - Résultat d'une classification 2D SPIDER de particules issue d'un mélange d'expériences de sonication d'actine-F (1 μ M) mis en contact 20/60 s avec 100/200 nM de formine avant d'être traitées en coloration négative. Encadrés verts : série de classes moyennes présentant une densité atypique caractéristique des formines. (Dimensions des boîtes : 38 nm²).

À cette occasion, un *script* a pu être généré dans le but de ré-extraire les particules alignées en transposant aux coordonnées de chacune des boîtes d'extraction initiales, les paramètres de

translation déterminés lors de l’alignement (**Fig. 65**). Cette opération permet d’harmoniser la taille des extrémités utilisées lors de reconstructions 3D réalisées ultérieurement.

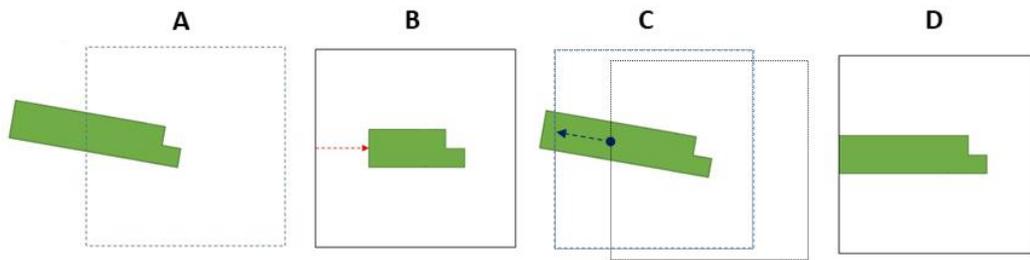


Figure 65 – Schéma de principe de la ré-extraction d’une extrémité d’actine après alignement. **A.** Position initiale de la boîte d’extraction. **B.** Extrémité extraite et alignée. **C.** Ajustement de la position de la boîte d’extraction en prenant en compte les paramètres d’alignement déterminés précédemment. **D.** Extrémité ré-extraite et ré-alignée.

4. Structures 3D du complexe formine – bout barbé obtenues en coloration négative : modèle de « la marche enjambée ».

Les expériences de sonication d’actine-F mise en contact avec de la formine ont finalement permis, après analyse 2D (**III.3.4.B**), de constituer deux jeux de particules distincts, avec une configuration majoritaire regroupant 3804 particules (**Fig. 66.A**) et une configuration minoritaire regroupant 800 particules (**Fig. 66.C**).

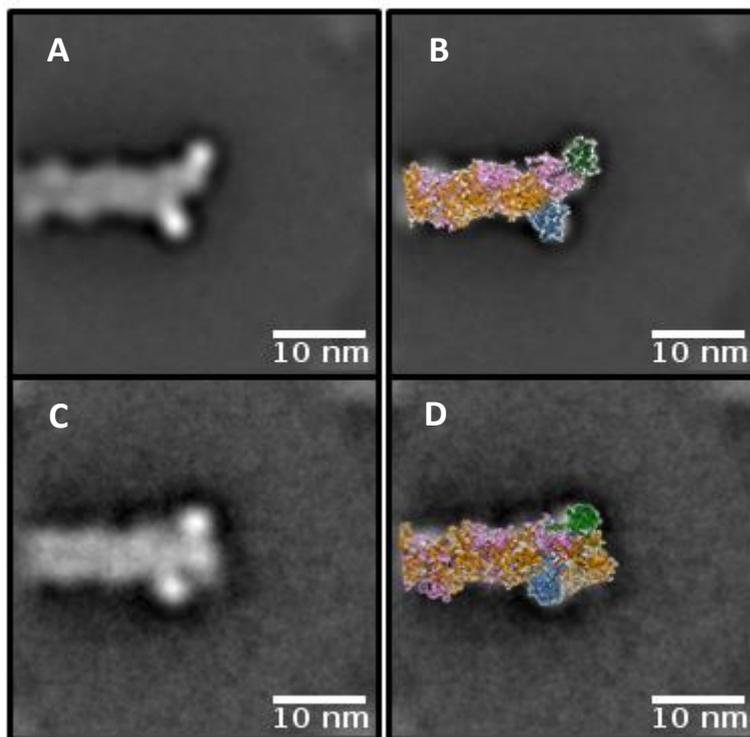


Figure 66 – **A.** Moyenne totale des particules (3804) associées à la configuration majoritaire des extrémités barbées coiffées de formine. **B.** Correspondance 2D de la configuration majoritaire avec un modèle atomique de l’état « ouvert » décrit par le modèle de la « marche enjambée ». **C.** Moyenne totale des particules (800) associées à la configuration minoritaire des extrémités barbées coiffées de formine. **D.** Correspondance 2D de la configuration minoritaire avec un modèle atomique de l’état « fermé » décrit par le modèle de la « marche enjambée ».

La classe moyenne majoritaire (**Fig. 66.A**) peut être mise en correspondance avec une projection d'un modèle atomique d'une extrémité barbée coiffée d'une formine dans l'état « ouvert » décrit par le modèle de la « marche enjambée » (**Fig. 66.B**). La classe moyenne minoritaire (**Fig. 66.C**) peut, quant à elle, être mise en correspondance avec une projection du modèle atomique d'une extrémité barbée coiffée d'une formine dans l'état « fermé » décrit par le modèle de la « marche enjambée » (**Fig. 66.D**).

Cette correspondance entre les données expérimentales et les deux états du modèle de la « marche enjambée » est plus largement validée par la reconstruction de deux structures 3D. Ces structures 3D ont été obtenues en partant des deux jeux de données évoqués ci-dessus et affinés après une série de classification 3D/sélection de particules sous RELION.

D'une part, un modèle atomique de l'état « ouvert » décrit par le modèle de la « marche enjambée » a pu être ajusté dans la structure 3D regroupant le plus grand nombre de particules sélectionnées (**Fig. 67**, 2048 particules, 24 Å de résolution). D'autre part, un modèle atomique de l'état « fermé » décrit par le modèle de la « marche enjambée » a pu être ajusté dans la structure 3D regroupant un nombre restreint de particules sélectionnées (**Fig. 68**, 402 particules, 35 Å de résolution).

Les ajustements des modèles atomiques effectués ici ont été réalisés en deux temps à l'aide de la fonction « Fit in Map » de Chimera. Dans un premier temps, des modèles atomiques rigides d'une extrémité barbée coiffée d'une formine dans son état « ouvert » ou « fermé » (modèle de la « marche enjambée ») ont été ajustés dans les deux structures de microscopie électronique présentées ici. Ces deux modèles atomiques ont été obtenus à partir d'un dimère de formine lié à deux monomères d'actine (état « ouvert ») ou trois monomères d'actine (état « fermé ») selon l'agencement observé dans la structure 1Y64. Dans ce modèle atomique, le pseudo-filament d'actine présentant un pas angulaire de 180° est étendu du côté pointu par l'addition de deux sous-unités d'actine orientées selon la symétrie classique du filament d'actine observée dans la structure 5OOE. Une fois ce premier ajustement global réalisé, un ajustement local est effectué en permettant l'ajustement indépendant des deux domaines FH2 ainsi que des sous-unités d'actine. Les sous-domaines « linker » reliant les deux domaines FH2 ont été supprimés dans cette opération afin de permettre leur ajustement indépendamment l'un de l'autre. D'autre part les contacts « actine – FH2_{knob} » initiaux, de même que l'orientation relative des deux sous-unités d'actine ajoutées à l'extrémité pointue sont maintenus au cours de cet ajustement.

Les deux reconstructions 3D ainsi obtenues (**Fig. 67-68**) valident largement la description structurale des états « ouvert » et « fermé » proposée dans le modèle de la « marche enjambée » et

écartent le modèle du « saut enclenché » avec une structure 3D principale (**Fig. 67**) qui n'est pas décrite dans le cadre de ce dernier modèle.

En outre, les proportions de complexes formine - bout barbé identifiés dans l'état « ouvert » ou dans l'état « fermé » (modèle de la « marche enjambée »), après sélection 2D (respectivement 83% et 17%) ou sélection 3D (respectivement 84% et 16%) sont cohérents avec le facteur d'ouverture d'environ 0.9^{199} proposé initialement pour la formine mDia1.

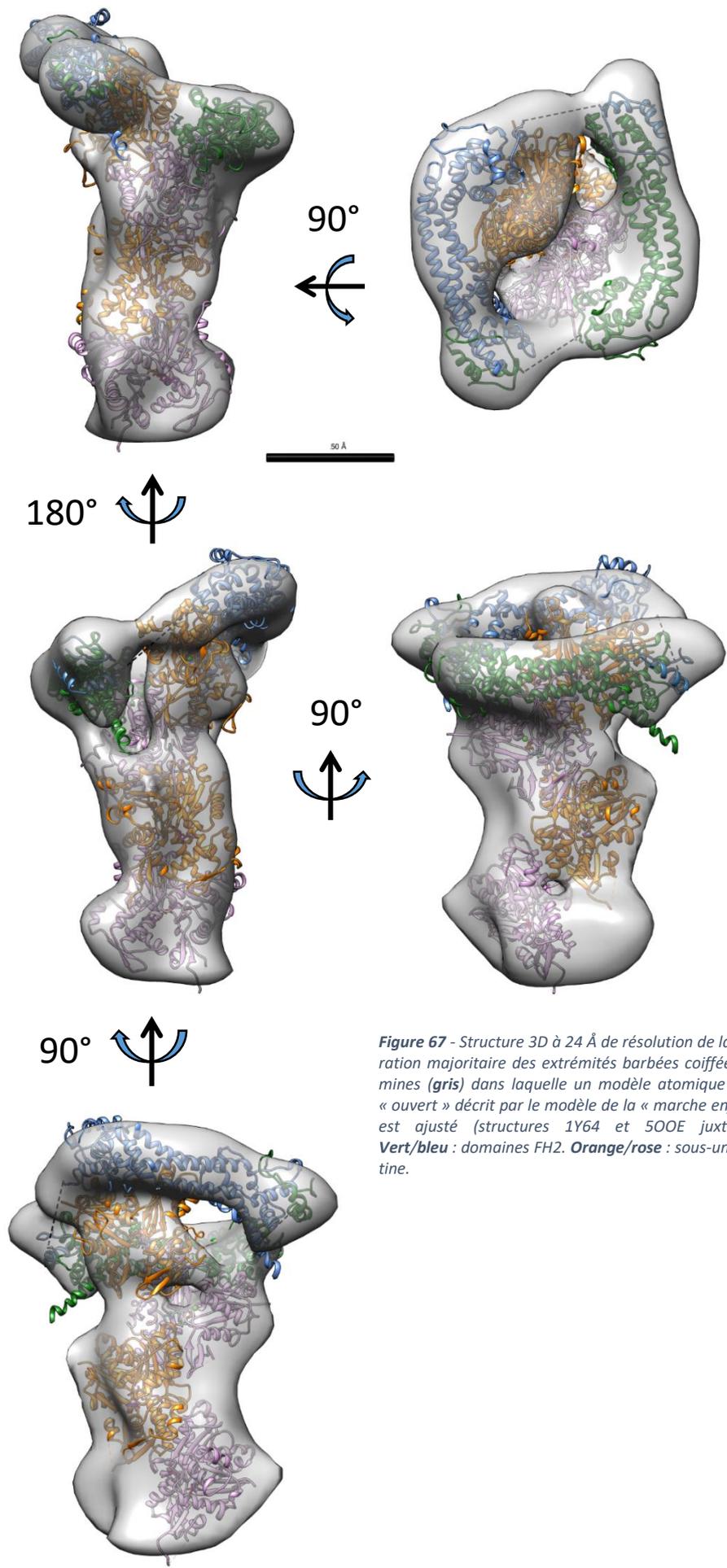


Figure 67 - Structure 3D à 24 Å de résolution de la configuration majoritaire des extrémités barbées coiffées de formines (gris) dans laquelle un modèle atomique de l'état « ouvert » décrit par le modèle de la « marche enjambée » est ajusté (structures 1Y64 et 500E juxtaposées). Vert/bleu : domaines FH2. Orange/rose : sous-unités d'actine.

Bien que les structures 3D obtenues ici confortent le modèle de la « marche enjambée », il est à noter que les basses résolutions qui leurs sont associées laissent une ambiguïté quant à l'hélicité adoptée par les filaments d'actine coiffés de formines et ne permettent donc pas d'exclure une variation du pas angulaire entre 167° et 180° comme proposé dans le modèle du « saut enclenché ».

Les résolutions limitées observées dans ces deux structures générées s'expliquent par le nombre restreint de particules utilisées dans les reconstructions 3D ainsi que par une distribution angulaire inhomogène des particules identifiées (**Fig. 69.A-B**). L'occurrence d'orientations privilégiées est cohérente avec les analyses 2D réalisées précédemment (**Fig. 66**) qui mettent en avant des projections particulières.

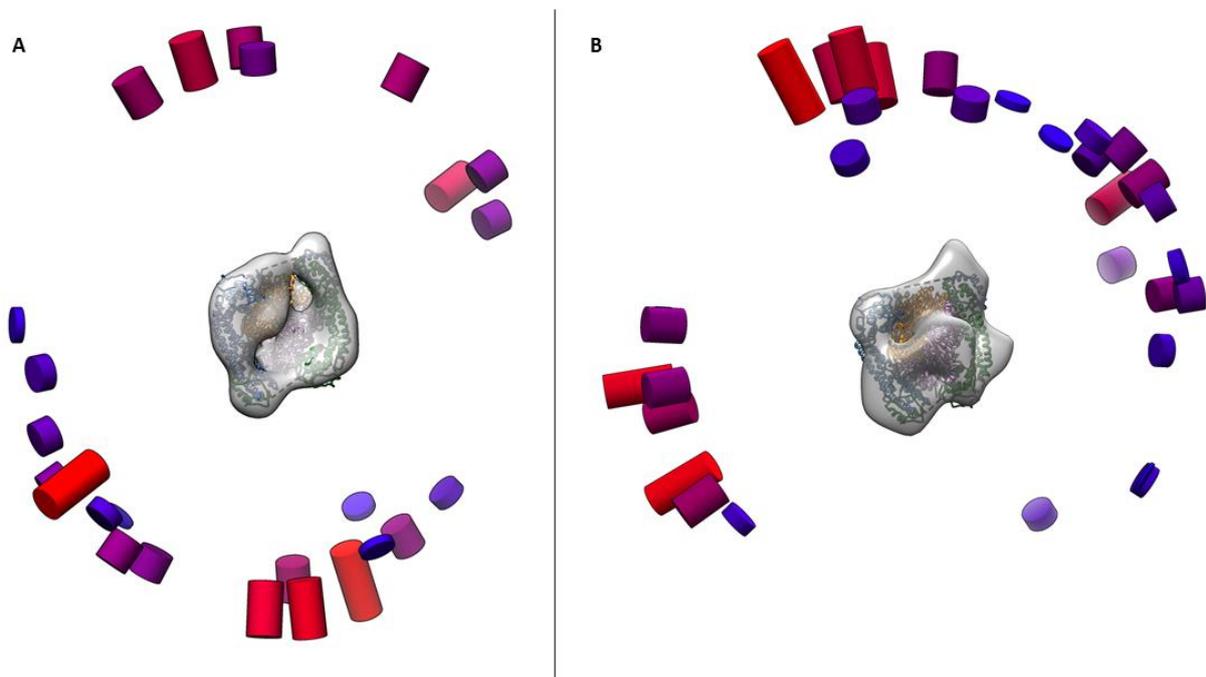


Figure 69 – Représentation 3D RELION de la distribution des angles de projections assignés aux particules lors de la reconstruction 3D de la configuration majoritaire (A) ou minoritaire (B) des extrémités barbées coiffées de formines. Les structures 3D sont observées selon l'axe du filament d'actine. La position de chaque cylindre correspond à un axe de projection ayant été associé à des particules. Les hauteurs des cylindres sont proportionnelles aux nombres de particules assignées. De même, des cylindres associés à des couleurs chaudes indiquent un plus grand nombre de particules assignées.

Il est peu probable que l'extrémité coiffée des filaments d'actine adsorbés sur grille influe significativement sur l'orientation de l'ensemble du filament. Ainsi, il est plus vraisemblable ici que l'observation d'orientations privilégiées soit une conséquence de l'analyse computationnelle. En effet, la forme allongée des domaines FH2 structurés ainsi que leur poids moléculaire (40 - 45 kDa) proche de celui de l'actine (42 kDa) rendent l'identification des complexes actine-formine plus ou moins favorable selon leur orientation. Une telle explication permet de réinterpréter le faible taux de particules associées à des extrémités barbées coiffées de formines

(III.3.4.B, ~20%) parmi l'ensemble des extrémités considérées. Ce faible taux ne représenterait qu'une partie des complexes formines – bout barbés existants.

Pour aller plus loin, une analyse 2D focalisée sur les complexes formine - actine identifiés dans leur état « ouvert » a été réalisée afin d'en évaluer l'hétérogénéité structurale.

5. Variation conformationnelle de l'état « ouvert ».

5.1. « Battement » 2D du premier domaine FH2.

Dès la première classification 2D réalisée à partir de 20 922 extrémités, on observe au sein des classes moyennes associées à l'état « ouvert » d'un complexe actine – formine une certaine variation de l'orientation du premier domaine FH2 relativement à l'axe du filament d'actine (**Fig. 64**, dernière ligne).

Un masque focalisé sur ce domaine FH2 (**Fig. 70.A**, bas), indépendant du masque utilisé lors de l'alignement (**Fig. 70.A**, milieu), a alors été employé pour réaliser une classification 2D des particules associées aux complexes actine – formine dans l'état « ouvert » (**Fig. 70.A**, haut, 3804 particules). Quatre classes moyennes ont pu être générées à partir de cette classification 2D SPIDER (**Fig. 70.B**).

Les trois premières classes moyennes présentent des orientations différentes de leur premier domaine FH2 qui, mis bout à bout, dessinent un « battement » à deux dimensions (**Fig. 70.B**, colonne de gauche). Ces trois premières classes moyennes constituent respectivement 25% (956 particules), 29% (1092 particules) et 17% (651 particules) des particules observées. La quatrième classe moyenne (29% des particules observées, 1104 particules) présente une configuration similaire à la classe moyenne n°2 mais avec un premier domaine FH2 moins bien délimité par l'enveloppe noire de colorant (**Fig. 70.B**, dernière ligne). Cette observation peut suggérer une plus grande disparité conformationnelle et/ou d'orientation parmi les particules associées à cette dernière classe moyenne. Cette classe moyenne a donc été écartée du reste de l'analyse afin de conserver un rapport signal sur bruit suffisant.

Bien que les domaines FH2 présentent des orientations manifestement différentes parmi les trois premières classes moyennes observées, les corps des filaments d'actine correspondant res-

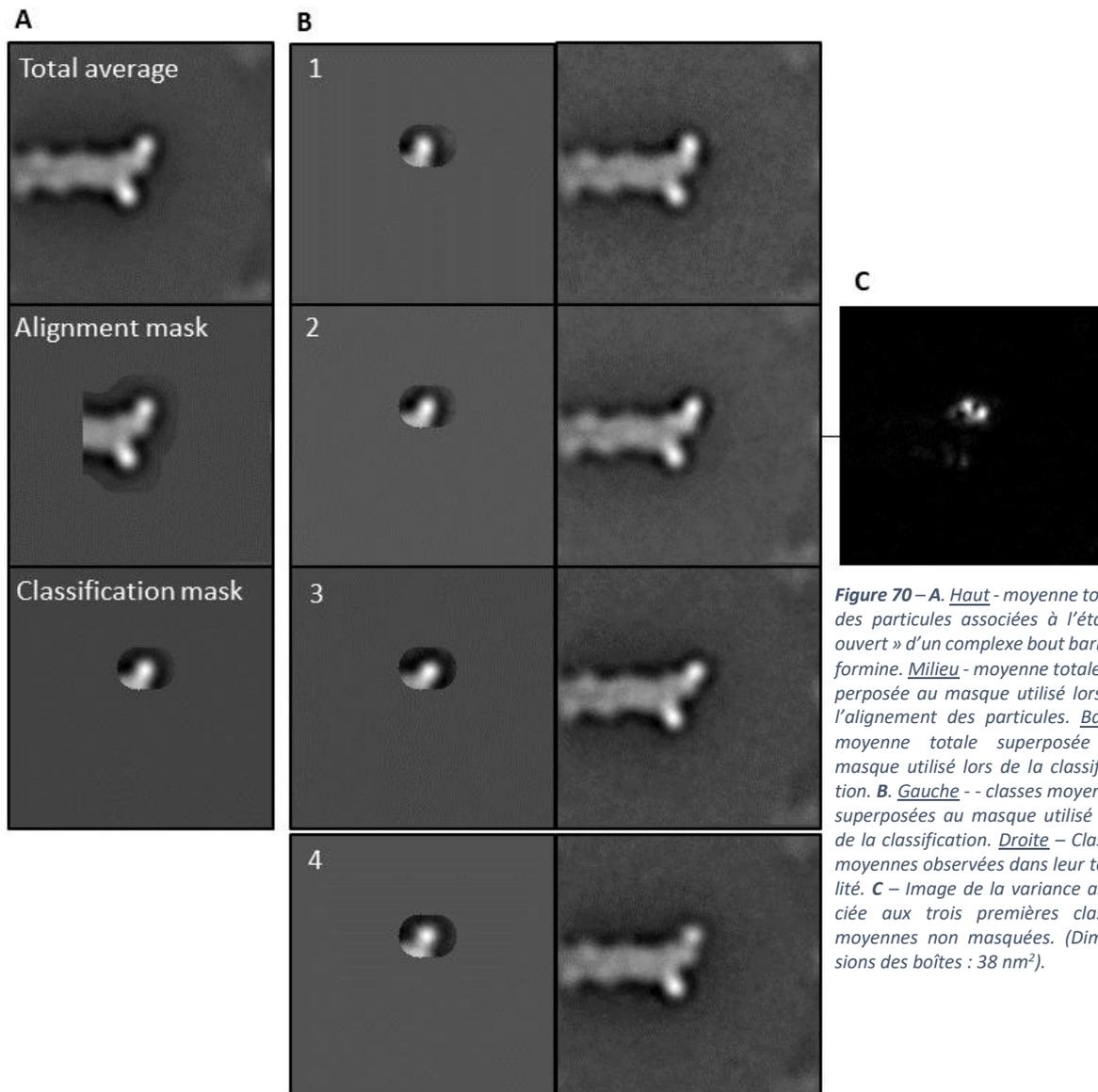


Figure 70 – A. Haut - moyenne totale des particules associées à l'état « ouvert » d'un complexe bout barbé-formine. *Milieu* - moyenne totale superposée au masque utilisé lors de l'alignement des particules. *Bas* - moyenne totale superposée au masque utilisé lors de la classification. *B. Gauche* - classes moyennes superposées au masque utilisé lors de la classification. *Droite* - Classes moyennes observées dans leur totalité. *C* - Image de la variance associée aux trois premières classes moyennes non masquées. (Dimensions des boîtes : 38 nm²).

tent quant à eux globalement alignés (**Fig. 70.B**, colonne de droite). La variance associée à ces trois classes moyennes pointe en effet une variation d'intensité concentrée au niveau du premier domaine FH2 (**Fig. 70.C**).

Cette dernière observation suggère que la variation de l'orientation en deux dimensions des premiers domaines FH2 observée parmi les trois premières classes moyennes repose principalement sur une variation conformationnelle limitée strictement au complexe formine - actine (deux premières sous-unités d'actine) et non pas à une variation de l'orientation globale des filaments extraits.

Pour appuyer cette observation, aucune corrélation évidente n'a pu être observée entre l'appartenance d'une particule à l'une de ces classes (**Fig. 70.B**) et une gamme spécifique des angles de projections qui lui sont assignés au cours de la reconstruction 3D présentée en **Figure 67**.

La structure à basse résolution obtenue à partir de cette reconstruction 3D (**Fig. 67**) ne permet apparemment pas de révéler la légère variation d'orientation du premier domaine FH2 observée à deux dimensions.

En outre, des reconstructions 3D réalisées à partir de sous-groupes de particules, chacun associé aux différentes classes moyennes observées (**Fig. 70.B**) n'ont pas permis d'obtenir des structures 3D cohérentes de complexe formine – actine présentant chacune des orientations différentes de leur premier domaine FH2. Les sous-groupes de particules obtenus en divisant le jeu de données initial selon les classes moyennes observées ne sont vraisemblablement pas suffisamment grands pour générer des structures cohérentes (rapport signal sur bruit trop faible).

Afin d'estimer l'amplitude de la variation de l'orientation du premier domaine FH2, des mesures d'angle à deux dimensions ont été réalisées sous ImageJ à partir des trois premières classes moyennes. Pour ce faire, les images des complexes FH2 – actine masqués (**Fig. 71.A**, première ligne) ont été binarisées (**Fig. 71.A**, deuxième ligne). Des délimitations 1D de ces complexes ont ensuite été générées à partir des images binaires (**Fig. 71.A**, troisième et quatrième lignes).

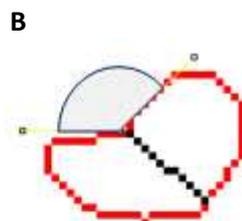
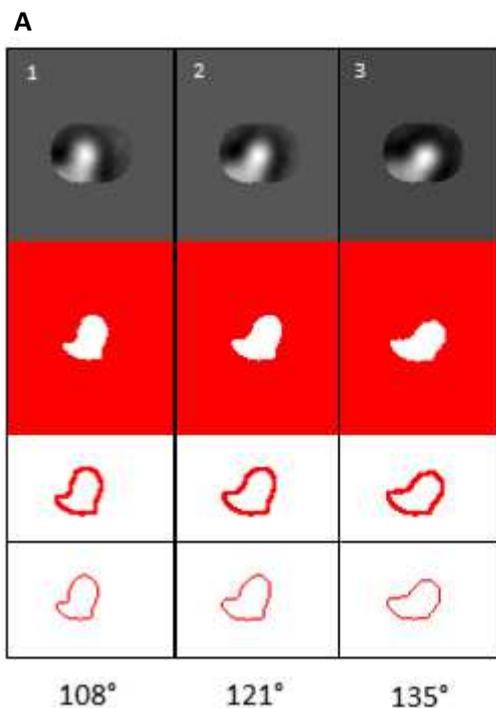


Figure 71 – A. Différentes étapes réalisées lors de la mesure de l'angle formé par l'axe du filament d'actine et le premier domaine FH2 pour les trois configurations observées. Ligne 1 – classes moyennes masquées. Ligne 2 – images binarisées. Ligne 3 – Délimitation de la bordure. Ligne 4 – Réduction 1D des bordures. Ligne 5 – Valeurs d'angle obtenues. **B.** Principe de la mesure d'un angle à partir de la bordure 1D générée.

Pour finir, des mesures d'angle ont été réalisées selon le schéma présenté **Figure 71.B**. On trouve ainsi un angle entre l'axe du filament d'actine (horizontal) et l'orientation du domaine FH2 associé à la classe moyenne n°1 d'environ 108°, d'environ 121° pour la classe moyenne n°2 et d'environ 135° pour la classe moyenne n°3.

Ces mesures ne sont pas absolues dans le sens où elles dépendent fortement du contraste des images, de la finesse du contour des protéines après moyennage et de la forme du domaine FH2 sur laquelle repose l'attribution de son orientation. De telles mesures permettent néanmoins d'obtenir un ordre de grandeur associé à l'amplitude de la variation des orientations observée en deux dimensions. Ces mesures ont ainsi pu être utilisées afin de concevoir un modèle structural 3D.

5.2. « Battement » du domaine FH2 : élaboration d'un modèle structural 3D.

A. Modèles structuraux envisageables.

Deux modèles structuraux ont pu être proposés pour expliquer ces variations d'orientation observées en deux dimensions.

Dans un premier temps, on peut supposer que le premier domaine FH2 oscille autour de son axe principal indépendamment du reste de la structure (**Fig. 72.A**). Lorsque l'on associe l'amplitude des variations d'orientation mesurées en section **III.5.1** à un tel mouvement, aucune contrainte stérique n'apparaît dans le modèle atomique correspondant (**Fig. 72.A**). En outre, la flexibilité de la région « linker » autorise un tel mouvement au sein du dimère de formine. Néanmoins, ce mouvement suppose que l'interaction existante entre la région « knob » du domaine FH2 mobile et la sous-unité d'actine à laquelle ce dernier est rattaché soit suffisamment préservée lors de la rotation du domaine FH2 de sorte à le maintenir lié à l'extrémité barbée, et cela malgré un alignement des acides aminés en interaction qui varie. Cette dernière supposition reste incertaine.

Dans un second temps, il a pu être proposé que la variation des orientations observée en deux dimensions soit associée à un réarrangement dynamique de l'orientation de la première sous-unité du filament d'actine vis-à-vis de la sous-unité d'actine suivante. Cette première sous-unité d'actine emporterait dans son mouvement le domaine FH2 qui lui est rattaché par sa région « knob » de sorte à laisser intacte cette liaison. Ce réarrangement pourrait impliquer le passage

d'une orientation assimilable à celle observée dans la structure cristalline de Takanori Otomo (PDB : 1Y64) à une orientation assimilable à celle observée dans un filament d'actine classique (PDB : 5OOE). En effet, la transition entre ces deux arrangements implique non seulement une diminution du pas angulaire qui passe de 180° à 167° , mais également un pivotement de la sous-unité d'actine par rapport à l'axe principal du filament d'actine, cette dernière exposant ainsi plus largement son sous-domaine 2 au solvant (**Fig. 19.B**). Un tel réarrangement suffirait donc à expliquer la variation de l'orientation du premier domaine FH2 observée en deux dimensions (**Fig. 72.B-C**). Ce second modèle structural apparaît plus robuste que le premier dans le sens où il s'appuie sur des modes de liaison (FH2_{« knob »}/actine ou actine/actine) déjà mis en évidence par le passé au sein de structures atomiques (1Y64, 5OOE).

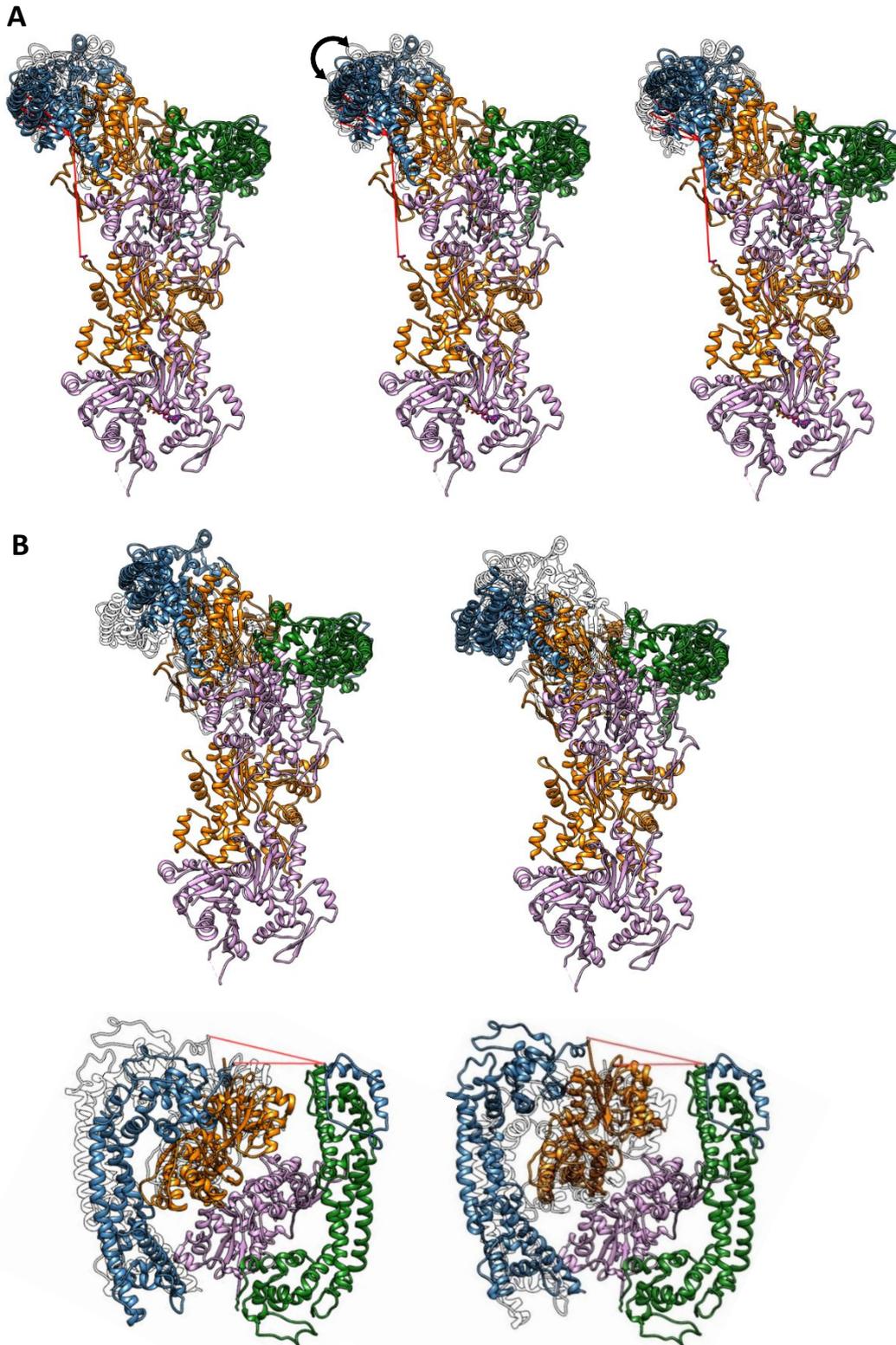


Figure 72 – A. Modèle atomique d'une extrémité barbée coiffée d'une formine dans son état « ouvert » et présentée selon l'agencement déterminé précédemment (milieu, Fig. 67) ou après rotation indépendante du domaine FH2 dans le sens trigonométrique (gauche) ou anti-trigonométrique (droite). B. Modèle atomique d'une extrémité barbée coiffée d'une formine dans son état « ouvert » et présentée selon l'agencement déterminé précédemment (gauche, Fig. 67) ou après réorientation de la première sous-unité d'actine (droite). Haut – vue latérale. Bas – vue du dessus. Vert/bleu : domaines FH2. Orange/rose : sous-unités d'actine.

B. Modèle structural du « battement » et au-delà.

La configuration structurale de l'état « ouvert » évoquée précédemment, impliquant la ré-orientation de la première sous-unité d'actine vers un arrangement proche de celui classiquement observé dans un filament d'actine (**Fig. 72.B**, droite) autorise l'incorporation, sans aucune contrainte stérique apparente, d'un monomère d'actine supplémentaire, toujours orienté selon l'arrangement classique du filament d'actine. La nouvelle configuration ainsi obtenue correspond exactement à l'état « ouvert » décrit par le modèle du « saut enclenché » (**Fig. 21.B**). Si l'on considère l'ajout d'un second monomère d'actine à cette nouvelle configuration, on retrouve cette fois l'état transitoire décrit par le modèle du « saut enclenché » (**Fig. 21.A**). Alors que dans le modèle du « saut enclenché », la nature hautement transitoire de cette configuration est indispensable pour pouvoir expliquer le maintien efficace des formines aux extrémités barbées, cette caractéristique n'est pas nécessaire dans le cadre du modèle de la « marche enjambee » qui s'appuie sur un mécanisme autre (« cliquet Brownien ») pour décrire la processivité des formines à l'extrémité barbée des filaments d'actine. On peut ainsi envisager que si une extrémité barbée coiffée d'une formine atteint cette configuration particulière (**Fig. 73**) l'élongation du filament à l'extrémité barbée pourrait se poursuivre en laissant le dimère de formine encercler non plus l'extrémité barbée du filament d'actine mais le corps de ce filament. La recherche d'une telle configuration a pu être réalisée et est décrite dans la section suivante.

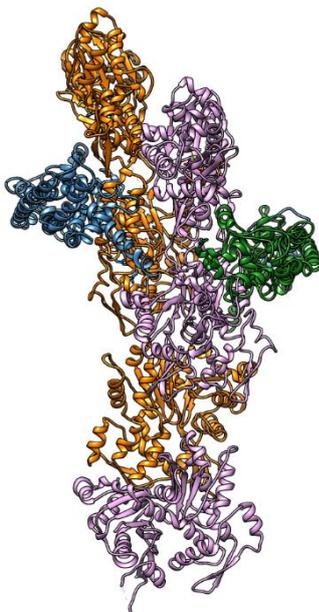


Figure 73 – Modèle atomique d'une extrémité barbée coiffée d'une formine et correspondant à l'état « transitoire » décrit dans le modèle du « saut enclenché ».

6. Dimère de formine encerclant le corps d'un filament d'actine.

Le motif caractéristique d'une projection 2D d'un dimère de formine encerclant le corps d'un filament d'actine (**Fig. 73**) a été recherché à l'œil le long de filaments d'actine issus d'expériences de sonication d'actine-F et mise en contact 20 secondes avec 100 nM de formine. Un total de 2013 particules a pu être extrait à l'issue de cette recherche et soumis à une analyse 2D telle que présentée en section III.3.4.A, **Figure 61**. Les résultats de l'analyse 2D sont présentés dans la **Figure 74** ci-dessous.

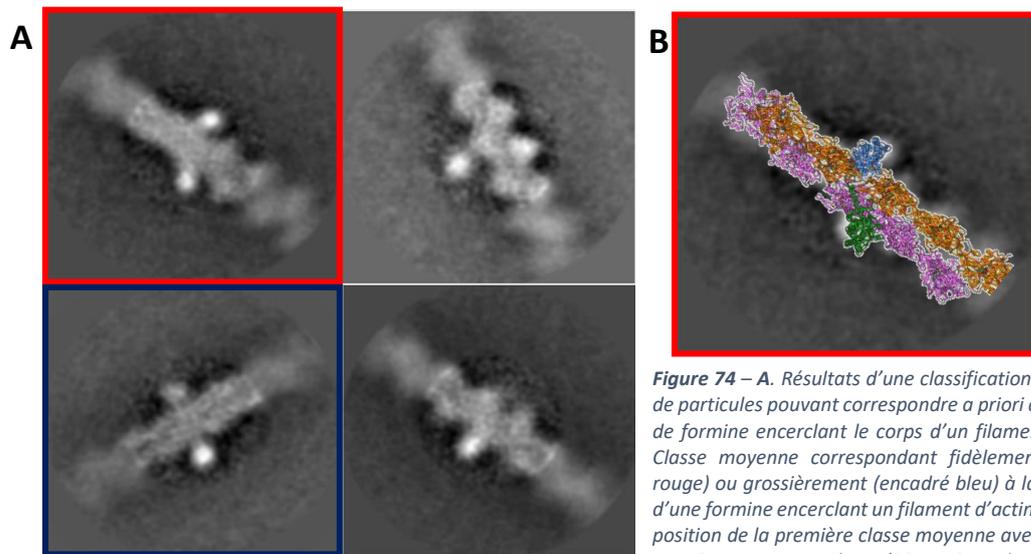


Figure 74 – A. Résultats d'une classification 2D RELION de particules pouvant correspondre a priori à un dimère de formine encerclant le corps d'un filament d'actine. Classe moyenne correspondant fidèlement (encadré rouge) ou grossièrement (encadré bleu) à la projection d'une formine encerclant un filament d'actine. B. Superposition de la première classe moyenne avec le modèle atomique correspondant. (Dimensions des boîtes : 36 nm²).

On retrouve une classe moyenne correspondant parfaitement à la projection d'un dimère de formine encerclant le corps d'un filament d'actine (**Fig. 74.A-B**, encadrés rouges). Une seconde classe moyenne (**Fig. 74.A**, encadré bleu) présente également un couple d'intensités globulaires pouvant correspondre à des domaines FH2 observés par leur tranche. Cependant, dans cette seconde classe moyenne, le filament d'actine observé apparaît moins bien défini. L'utilisation des particules associées à cette seconde classe moyenne n'a pas permis d'obtenir des résultats convaincants lors d'analyses 3D. Les autres classes moyennes (**Fig. 74.A**, classes moyennes non encadrées) semblent pointer des interactions artéfactuelles de protéines avec le filament d'actine. Finalement, l'ensemble des particules associées à la première classe moyenne (717 particules) a été utilisé lors d'une reconstruction 3D RELION dont le résultat final est présenté en **Figure 75**.

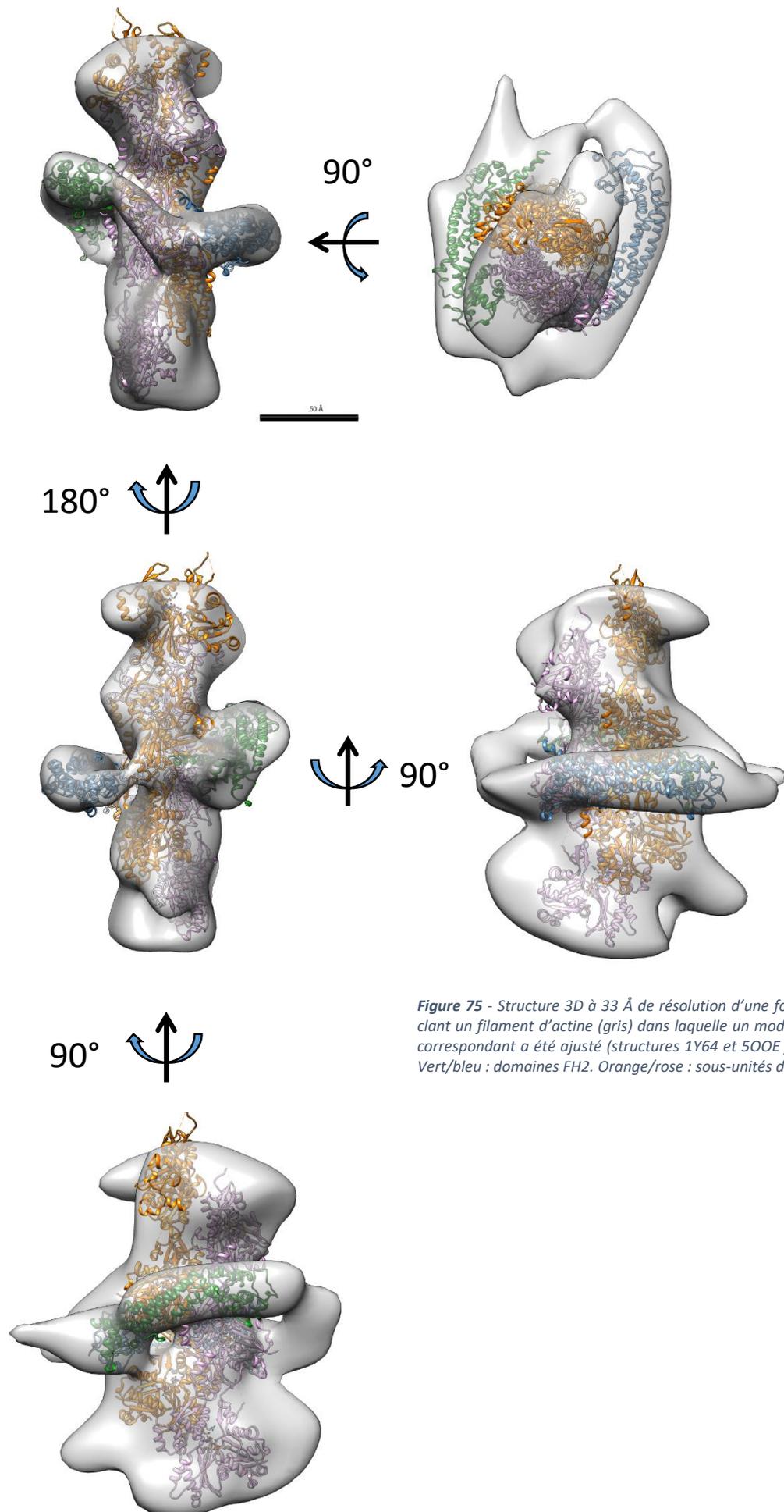


Figure 75 - Structure 3D à 33 Å de résolution d'une formine encerclant un filament d'actine (gris) dans laquelle un modèle atomique correspondant a été ajusté (structures 1Y64 et 500E juxtaposées). Vert/bleu : domaines FH2. Orange/rose : sous-unités d'actine.

Une structure 3D à 33 Å de résolution a pu être obtenue. La structure obtenue ici souffre d'une distorsion suivant les axes principaux des domaines FH2 (**Fig. 75**). Cette distorsion est la conséquence d'un sous-échantillonnage des angles de projection correspondant à des points de vue orthogonaux aux axes principaux des deux domaines FH2 (**Fig.76**). La sur-représentation des images présentant les domaines FH2 selon leur axe principal s'explique par le fait que c'est à travers ce point de vue que le motif formé par un dimère de formine encerclant un filament d'actine est le plus facilement identifiable. Ainsi, lors de la sélection des particules à l'œil le long des filaments d'actine, seules des projections proches de ce point de vue ont pu être identifiées. Par la suite, des sélections automatisées réalisées sous RELION via une approche par comparaison de modèle 2D ont pu être testées sans succès.

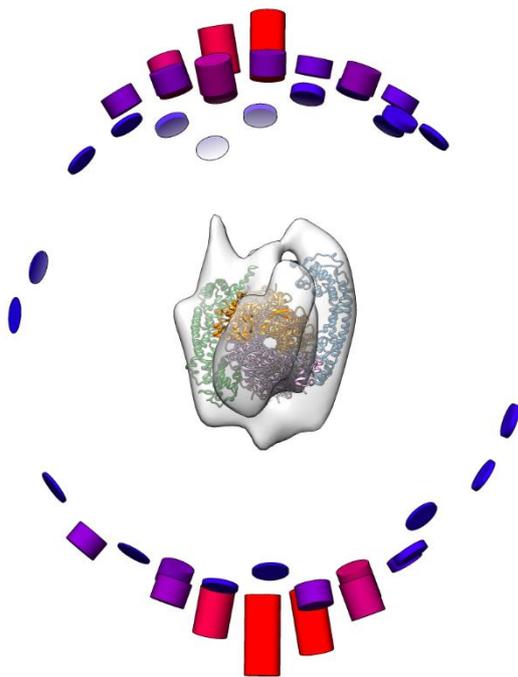


Figure 76 - Représentation 3D RELION de la distribution des angles de projections assignés aux particules lors de la reconstruction 3D d'une formine encerclant un filament d'actine.

Malgré tout, la structure 3D obtenue ici permet d'ajuster fidèlement le modèle atomique d'un dimère de formine encerclant le corps d'un filament d'actine (**Fig.74**) et valide de ce fait ce mode d'interaction inattendu de la formine mDia1.

Le déroulé mécanique par lequel un dimère de formine se retrouve en position d'encercler le corps d'un filament d'actine reste cependant à déterminer. Un premier scénario a pu être évoqué en section **III.5.2.B**. Dans ce scénario un dimère de formine initialement lié à une extrémité barbée se retrouve à encercler un filament d'actine suite à l'élongation de ce filament indépendamment de la procession des domaines FH2. On peut également imaginer ici que la dissociation partielle des dimères de FH2 pourrait permettre l'encerclage direct du corps des filaments d'actine sans passer par leur extrémité barbée.

L'ensemble des résultats obtenus ici l'ont été via une approche par coloration négative. Afin de confirmer ces observations et d'obtenir de meilleures résolutions, une étude par cryo-microscopie électronique a été entreprise en se focalisant sur la coiffe des extrémités barbées par des formines.

7. Étude par cryo-microscopie électronique de la coiffe des formines.

Comme évoqué dans les sections **II.6.1-3**, les deux grandes difficultés accompagnant le passage d'une approche par coloration négative à une approche par cryo-microscopie électronique sont la baisse du contraste des images de par l'absence d'agent contrastant ainsi que la diminution de la densité des protéines observées de par la nature différente de l'interaction des protéines avec les grilles utilisées. Pour ce dernier aspect, différentes grilles de cryo-microscopie électronique ont été testées afin de conserver une densité d'extrémités de filaments d'actine convenable pour une Analyse en Particule Isolée.

7.1. Mise au point des conditions de réalisation des grilles de cryo-microscopie électronique.

Les premières observations réalisées à l'aide de grilles Quantifoil classiquement utilisées en cryo-microscopie électronique montrent une très faible densité de filaments d'actine retenus sur grille. Les filaments d'actine observables sont localisés en périphérie des trous de la grille de microscopie (**Fig. 77**). Le reste des filaments d'actine est réparti sur la membrane amorphe de carbone.

Une telle répartition des filaments d'actine est courante en cryo-microscopie électronique. Dans ce contexte, il est en général d'usage de concentrer la quantité d'actine polymérisée à déposer sur grille afin de maximiser le nombre de filaments d'actine retenus dans les trous des grilles de cryo-microscopie électronique. Pour exemple, Steven Z. Chou et Thomas D. Pollard ont dû

déposer une solution de 9 μM d'actine polymérisée sur des grilles Quantifoil pour en étudier le corps des filaments d'actine²²⁹.

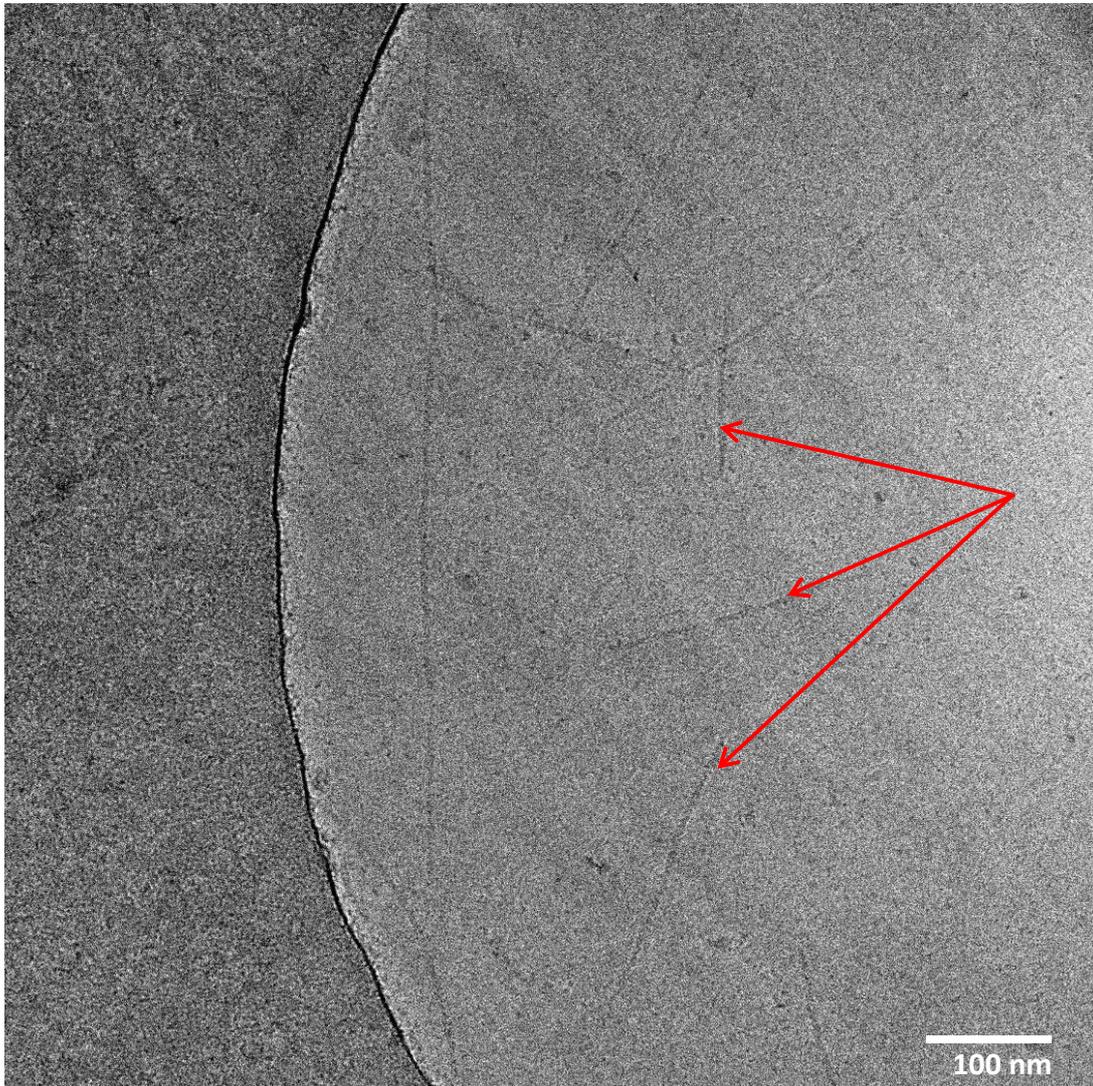


Figure 77 - Cryo-micrographie issue d'une expérience de sonication d'actine mise en contact avec de la formine. Flèches rouges : filaments d'actine incorporés dans un trou de la grille. (Grille Quantifoil R2/1 | TEM 200 kV – LaB₆ | x50 000).

Avec l'approche utilisée ici pour étudier l'extrémité des filaments d'actine et qui s'appuie sur la sonication de longs filaments d'actine en état stationnaire, une telle concentration d'actine n'est pas envisageable. En effet, une concentration d'actine trop élevée entrainerait dans ce cas, au-delà d'une repolymérisation rapide des filaments après sonication, l'agrégation de ces filaments au cours de leur sonication.

L'utilisation de grilles Lacey à la place des grilles Quantifoil avait alors pu être testée. Les grilles Lacey ont l'avantage de présenter des trous de tailles variables avec un ratio membrane/trou faible ce qui facilite généralement l'incorporation, dans ces trous, des protéines déposées sur grille.

Des densités locales plus importantes de filaments d'actine avaient pu être observées avec l'utilisation de grilles Lacey (**Fig. 78.A**). Cependant, ces zones peuplées de filaments d'actine sont peu représentatives de l'ensemble de la grille utilisée et la majorité des trous restent vides (**Fig. 78.B**). Une telle observation n'est pas compatible avec la nécessité d'acquérir un nombre conséquent d'images pour une Analyse en Particule Isolée.

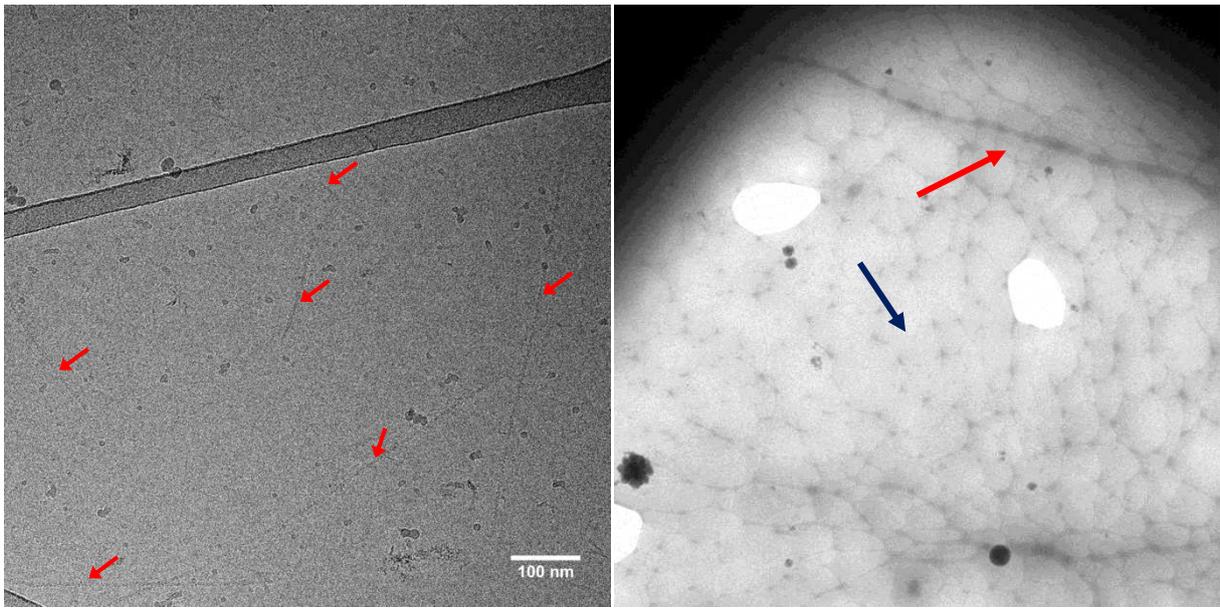


Figure 78 - Cryo-micrographies réalisées à deux grossissements différents (**A** : x50 000, **B** : x3500) et obtenue à partir d'expériences de sonication d'actine mise en contact avec de la formine le tout déposé sur une grille Lacey. **A**. Flèches rouges : filaments d'actine observables. **B**. Flèches rouge : zone contenant des filaments d'actine. Flèche bleue : zone vide de protéine.

Rapidement, l'utilisation de grilles recouvertes de feuilles d'oxide de graphène a été envisagée. Les premières observations ont mis en évidence l'intérêt de l'utilisation des feuilles d'oxide de graphène qui participent à maintenir une densité importante de filaments d'actine sur grille (**Fig. 79**).

On peut ainsi observer, à l'extrémité de certains filaments d'actine, des motifs caractéristiques d'extrémité barbées coiffées de formines (**Fig. 79**, encadrés et cercles rouges). La présence de feuilles d'oxide de graphène est confirmée par la densité plus importante de protéines observées ainsi que par la présence de lignes droites sans motif associé à l'hélice d'un filament d'actine (**Fig. 79**, flèches bleues) interprétées comme des plis ou des bordures de ces feuilles.

Aucune influence notable n'a pu être mise en évidence entre les deux variantes du protocole de préparation des grilles couvertes de feuilles d'oxide de graphène (Cf section **II.6.3**). Le contrôle de la concentration effective d'oxide de graphène en solution apparait cependant utile avec des variations significatives ayant pu être mesurées après prélèvement du surnageant issu d'une centrifugation de la solution stock diluée. Ces variations de la concentration mesurées traduisent

vraisemblablement un état d'agrégation évolutif de la solution stock d'oxide de graphène utilisée.

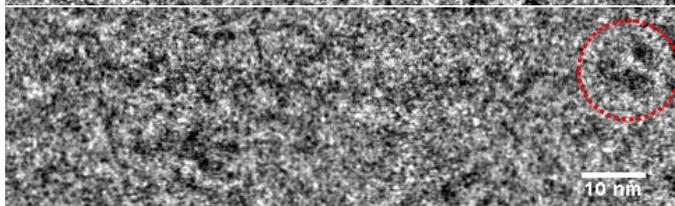
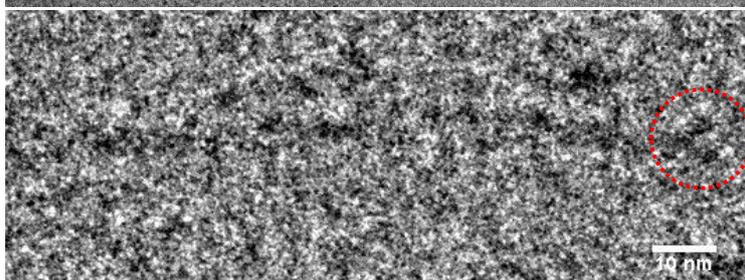
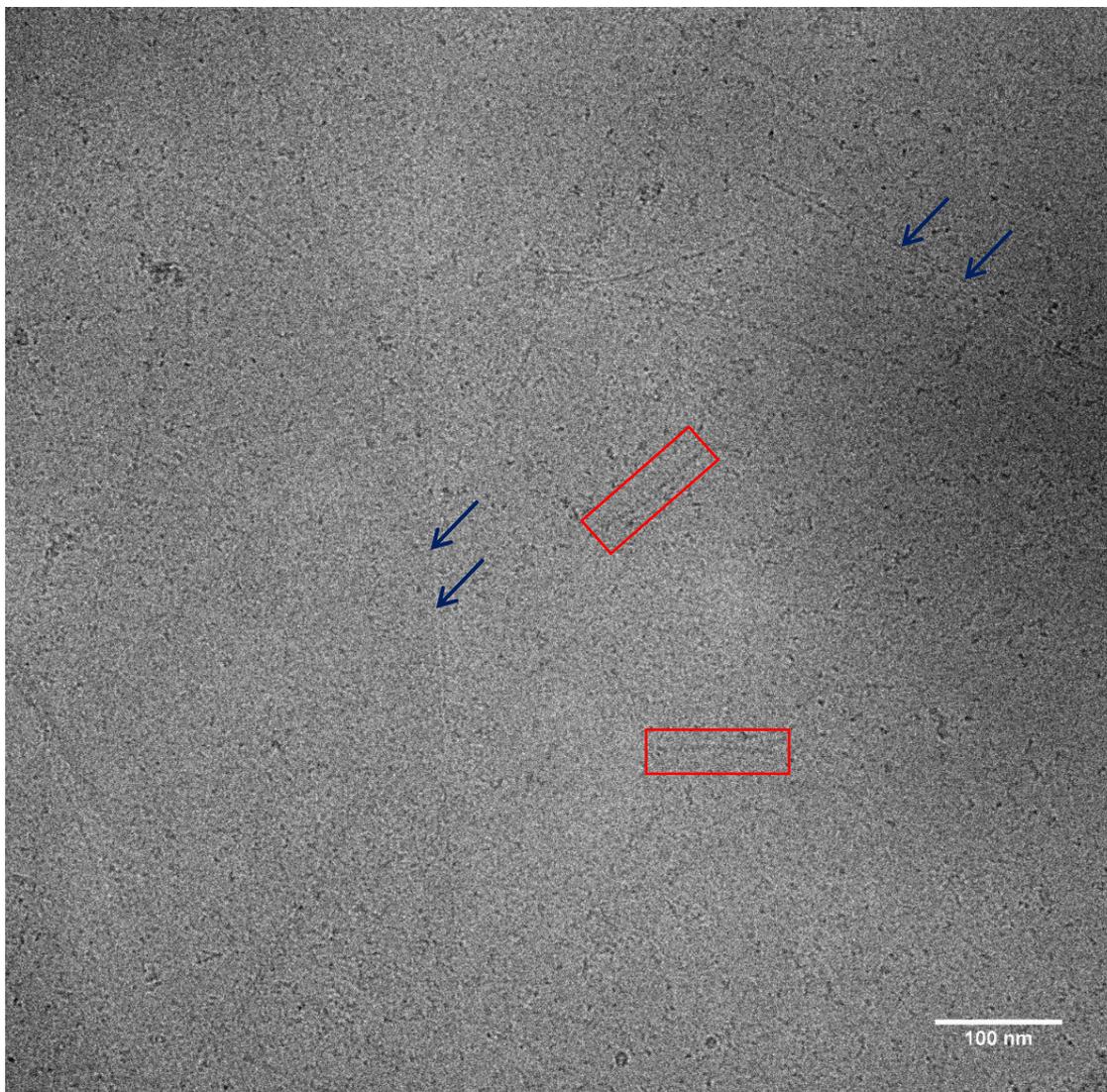


Figure 79 – Haut : Cryo-micrographie issue d'une expérience de sonication d'actine mise en contact avec de la formine le tout déposé sur une grille Quantifoil R2/1 préalablement tapissée de feuilles d'oxide de graphène. Flèches bleues : bordures ou plis de feuilles d'oxide de graphène. Encadrés rouges : filaments d'actine présentant des structures caractéristiques des formines à leurs extrémités. Bas : Images agrandies des deux filaments encadrés. Cercles rouges : structures caractéristiques de formines coiffant les extrémités de filaments d'actine. (TEM 200 kV – LaB₆ | x50 000).

Malgré ces premières observations encourageantes concernant l'utilisation de feuilles d'oxyde de graphène, les grilles réalisées dans un premier temps apparaissaient globalement très hétérogènes (**Fig. 80.A**) avec des trous aléatoirement fournis en filaments d'actine. Les paramètres de réalisation des grilles ont pu être ajustés afin d'obtenir des grilles plus homogènes, condition nécessaire pour la réalisation d'acquisitions automatisées d'images. Dans ce but les paramètres associés à la décharge ionisante appliquée sur les grilles avant dépôt des échantillons ont été révisés passant d'une intensité de 1 mA à 2.5 mA pour retenir au mieux les échantillons déposés sur grille. De même, le temps de dépôt des échantillons sur grille a été modifié passant de quelques secondes à 30 secondes afin de laisser le temps nécessaire à l'échantillon de se répartir de manière homogène à la surface de la grille. Enfin le temps du contact entre le papier filtre et la grille juste avant de plonger l'échantillon dans l'éthane a été rallongé de 1 seconde à 3 secondes afin d'obtenir une répartition de la glace plus reproductible. Finalement, des grilles C-Flat R2/2 ont été utilisées. L'ensemble de ces modifications ont permis d'obtenir des grilles plus homogènes avec néanmoins une perte sur l'épaisseur de la glace dans les zones exploitables (**Fig. 80.B-C**).

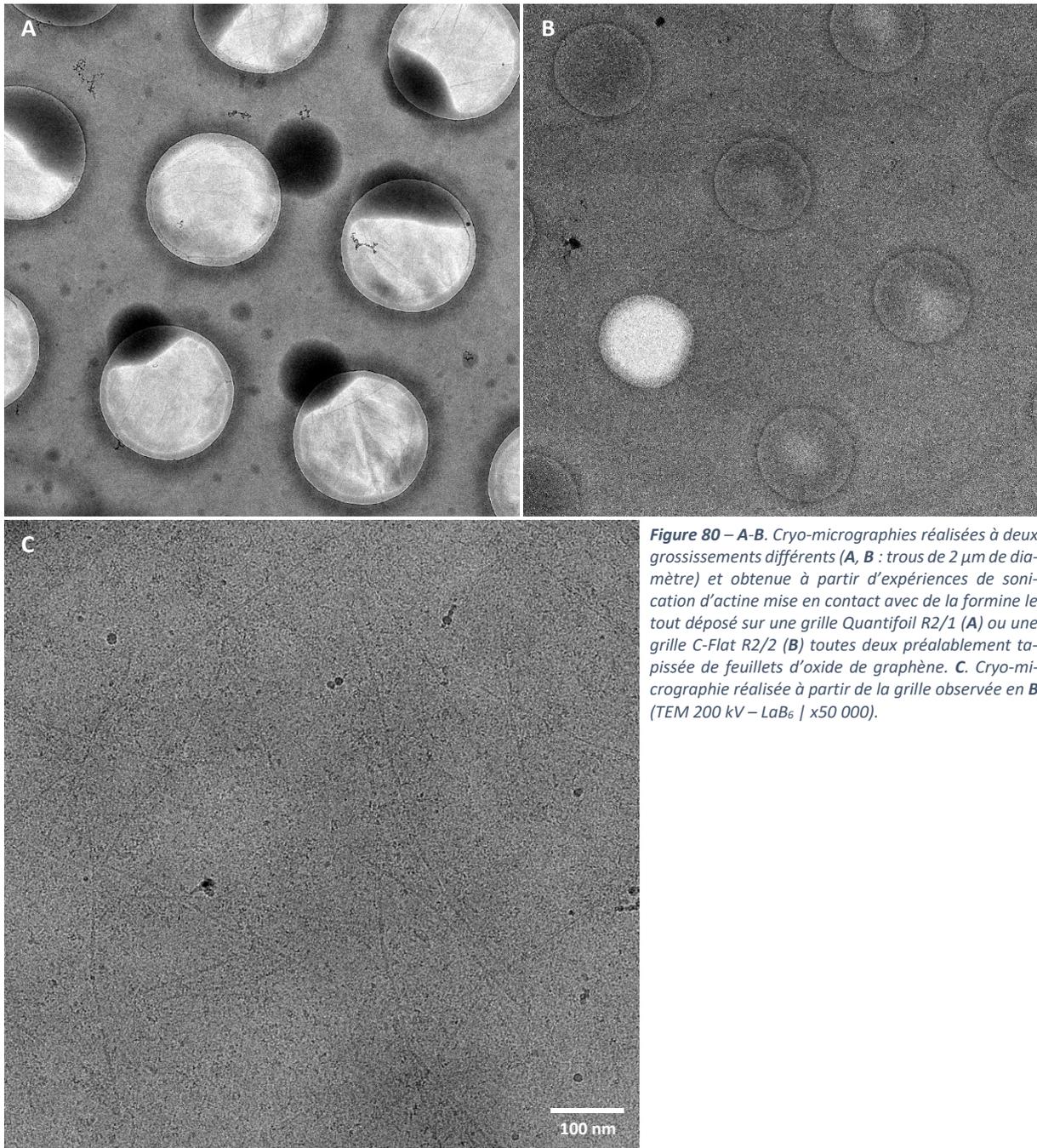


Figure 80 – A-B. Cryo-micrographies réalisées à deux grossissements différents (**A, B** : trous de 2 μm de diamètre) et obtenue à partir d'expériences de sonication d'actine mise en contact avec de la formine le tout déposé sur une grille Quantifoil R2/1 (**A**) ou une grille C-Flat R2/2 (**B**) toutes deux préalablement tapissée de feuillets d'oxide de graphène. **C.** Cryo-micrographie réalisée à partir de la grille observée en **B** (TEM 200 kV – LaB₆ | x50 000).

Des acquisitions automatisées d'images ont pu être réalisées à partir d'une grille réalisée selon les dernières conditions évoquées ci-dessus, sur un microscope Glacios 200 kV de FEI équipé d'une caméra à détection directe et situé à la plateforme de microscopie électronique de l'Institut Pasteur.

7.2. Analyse en Particule Isolée de données de cryo-microscopie électronique.

Un total de 4233 images a été collecté sur une grille de cryo-microscopie obtenue à partir d'une expérience de sonication d'actine mise en contact avec de la formine. Un sous-total de 3405 images a pu être conservé après avoir écarté les micrographes présentant une membrane partiellement cassée associée à une dérive importante de l'échantillon ou bien des zones présentant exclusivement des agrégats de feuillets d'oxide de graphène et/ou de protéines.

De ces images, une quantité limitée d'extrémités de filaments d'actine ont pu être identifiées distinctement et extraites manuellement (12 112 particules). Le faible nombre d'extrémités de filaments d'actine extraits s'explique par une densité variable des filaments observés sur grille (**Fig. 81.A-B**) et par des extrémités pas toujours exploitables à causes notamment de la présence

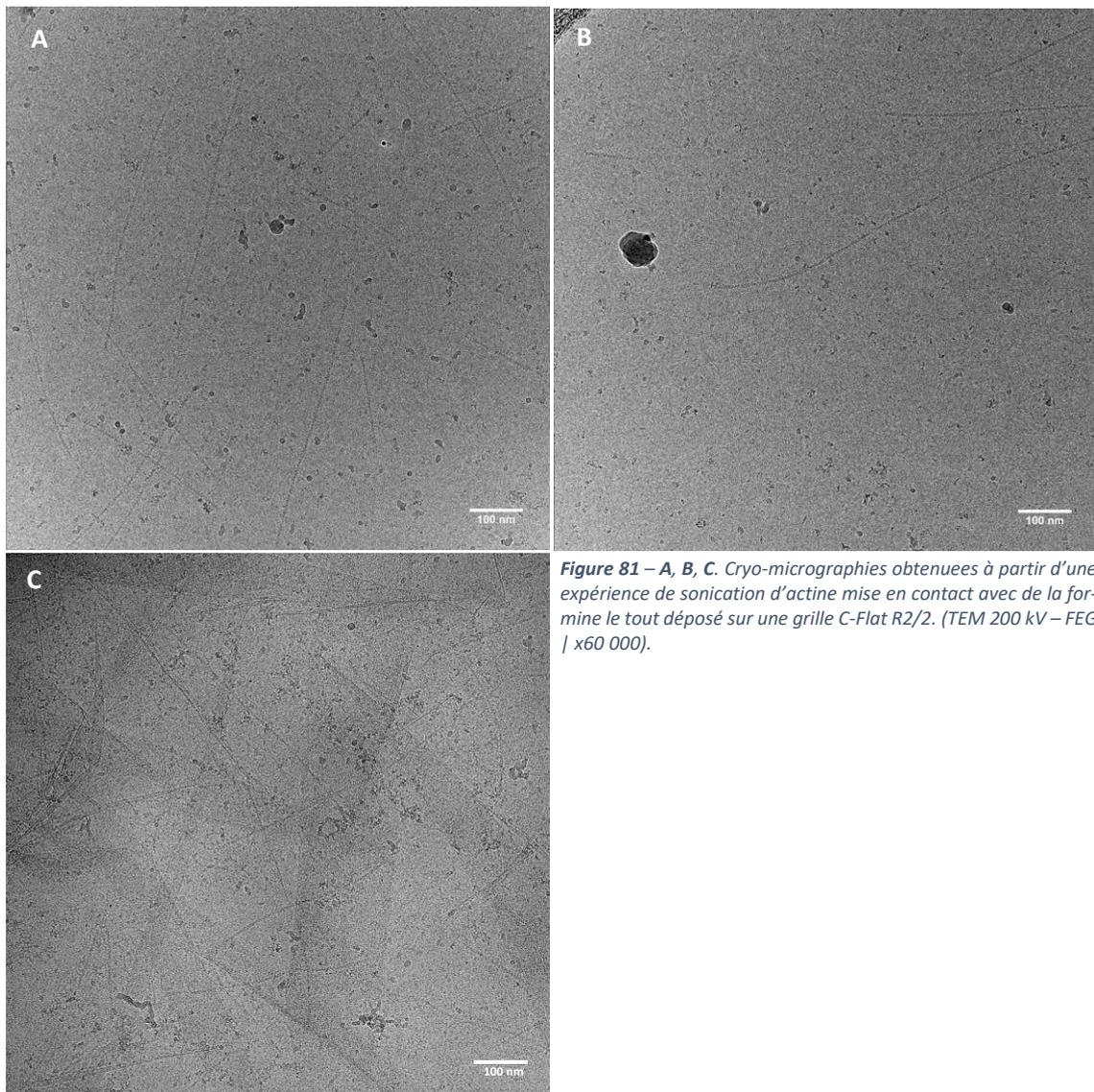


Figure 81 – A, B, C. Cryo-micrographies obtenues à partir d'une expérience de sonication d'actine mise en contact avec de la formine le tout déposé sur une grille C-Flat R2/2. (TEM 200 kV – FEG | x60 000).

d'agrégats de protéines, de contaminations ou de feuillets de graphène mal dissociés (**Fig. 81.C**).

Un tel jeu de données reste très limité dans le cadre d'une analyse en cryo-microscopie ou le ratio signal sur bruit initialement faible nécessite le moyennage d'un nombre important de particules. Néanmoins, des classifications 2D ont tout de même pu être réalisées et ont mis en évidence des classes moyennes caractéristiques d'un dimère de formine coiffant l'extrémité d'un filament d'actine (**Fig. 82**, encadrés rouges).

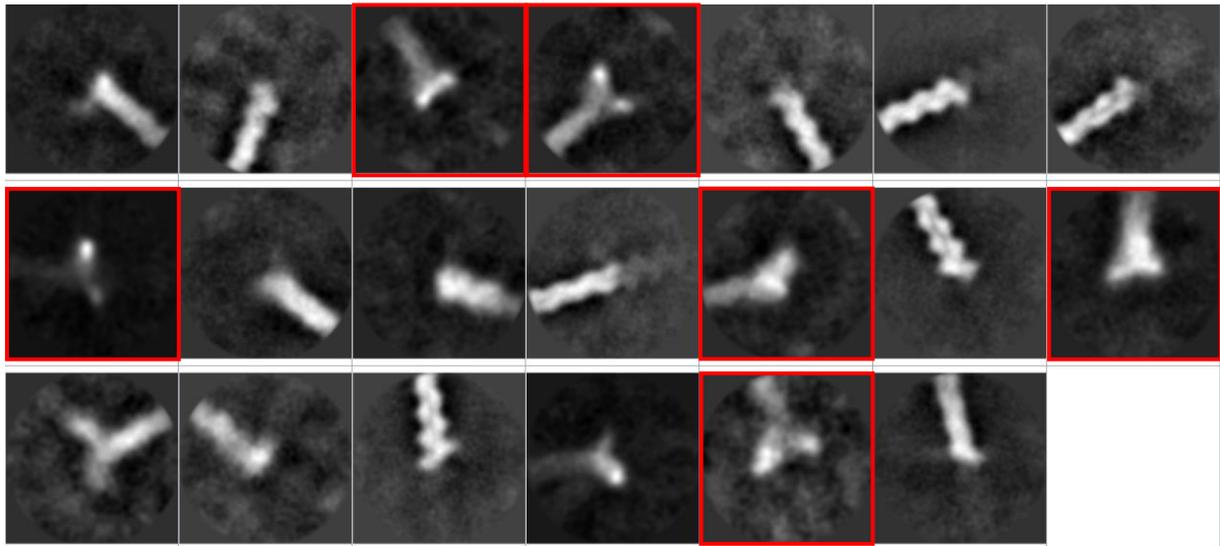


Figure 82 – Résultat d'une classification 2D RELION obtenue à partir d'une expérience de sonication d'actine mise en contact avec de la formine et observée par cryo-microscopie électronique. (Dimensions des boîtes : 38,5 nm²).

Ces classes moyennes représentent 13 % du jeu de données (1548 particules). Une structure 3D à basse résolution (30 Å) a alors pu être générée (**Fig. 83**) à travers une classification 3D intégrant l'ensemble des extrémités et utilisant deux modèles références initiaux : l'extrémité d'un filament d'actine nu ou bien coiffé d'une formine (état « ouvert ») tous deux filtrés à 40 Å de résolution.

Bien que cette structure 3D obtenue par cryo-microscopie électronique reste peu résolue et ainsi n'apporte pas plus d'informations structurales que celles déjà obtenues par une approche en coloration négative, cette structure confirme tout au moins l'origine non artéfactuelle des structures identifiées précédemment.

Afin d'obtenir une meilleure résolution, la collecte de données supplémentaire serait nécessaire. Néanmoins, les contraintes liées au système étudié limitent fortement la quantité de particules facilement atteignable et compromettent ainsi l'obtention d'une structure à haute résolution.

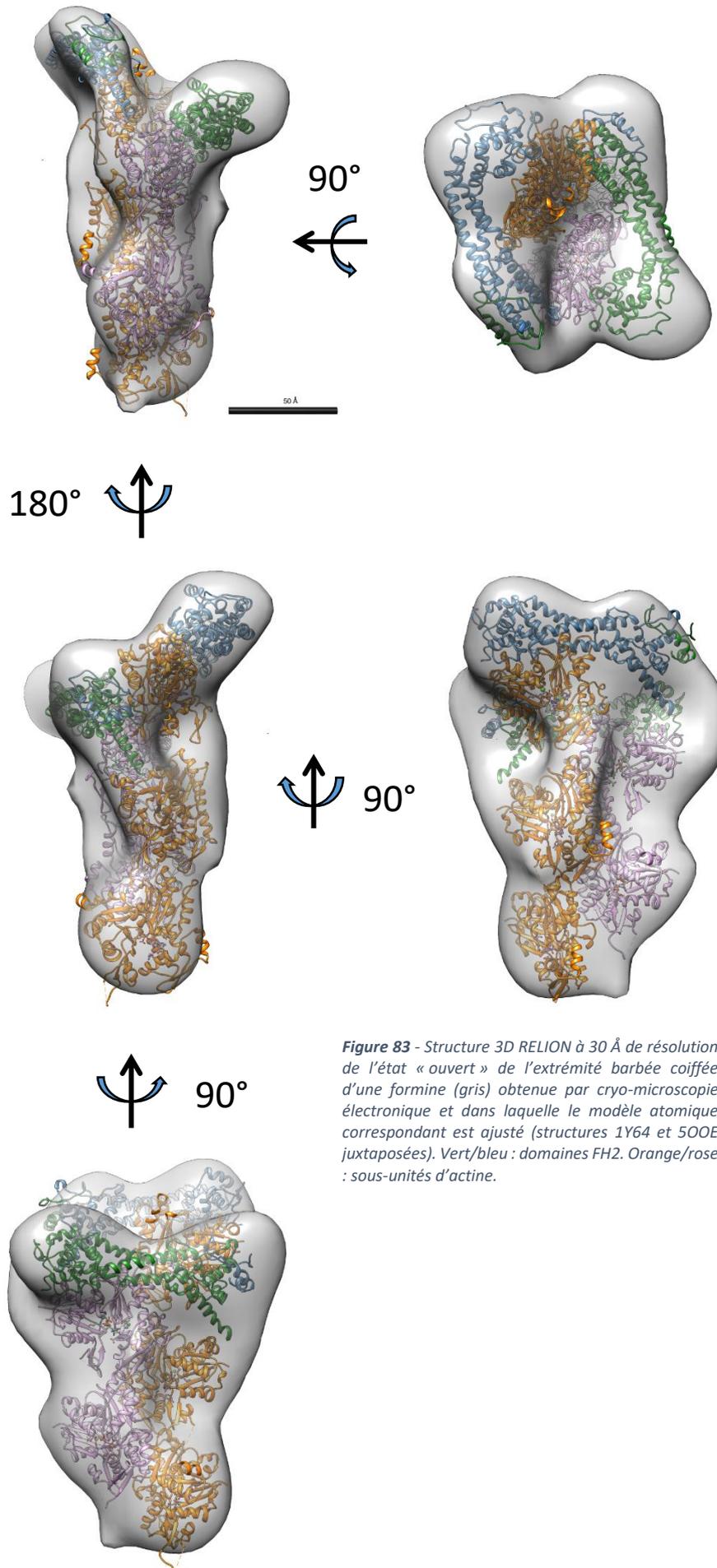


Figure 83 - Structure 3D RELION à 30 Å de résolution de l'état « ouvert » de l'extrémité barbée coiffée d'une formine (gris) obtenue par cryo-microscopie électronique et dans laquelle le modèle atomique correspondant est ajusté (structures 1Y64 et 5OOE juxtaposées). Vert/bleu : domaines FH2. Orange/rose : sous-unités d'actine.

En parallèle de cette étude structurale visant à élucider les modalités de l'association pérenne des formines aux extrémités barbées des filaments d'actine en élongation, une étude structurale de l'activité nucléatrice des formines exercée en synergie avec Arp2/3 et SPIN90 a également pu être réalisée et est présentée dans la section suivante.

8. Formation d'un complexe nucléateur Formine-Arp2/3-SPIN90.

En parallèle de mon projet de thèse, nos collaborateurs de l'équipe « Régulation de la dynamique d'assemblage de l'actine » à l'Institut Jacques Monod ont pu étudier la polymérisation formine-dépendante de filaments d'actine nucléés par des complexes Arp2/3 préalablement activés par SPIN90.

Au cours de ces expériences réalisées par microfluidique, ils ont pu observer que lorsque des protéines SPIN90 sont ancrées à la surface d'une chambre de microfluidique et que l'on expose cette chambre séquentiellement et de manière transitoire à une solution de Arp2/3 puis de formine mDia1 et enfin d'actine, une fraction non négligeable des filaments polymérisés à partir des complexes de la chambre de microfluidique polymérise à une vitesse accélérée caractéristique de l'activité des formines. Lorsque les formines sont introduites avant Arp2/3, la fraction caractéristique d'une élongation formine-dépendante n'est plus observée.

Ces observations suggèrent qu'un complexe a pu se former entre SPIN90-Arp2/3 d'une part et la formine mDia1 d'autre part lors de l'ajout séquentiel des protéines, retenant cette dernière au sein de la chambre de microfluidique.

Afin de mettre en évidence l'existence d'un tel complexe ternaire, j'ai réalisé une étude par microscopie électronique en coloration négative à l'Institut Curie. Cette étude a été intégrée dans un article collaboratif publié en 2020 dans *Nature Cell Biology*²⁴⁵.

8.1. Analyse en Particule Isolée : alignements et classifications 2D.

Les micrographies réalisées à partir de Arp2/3 ou SPIN90 montrent des protéines globalement homogènes sur grille de microscopie électronique (**Fig. 84.A-B**). Les micrographies issues d'un mélange de ces deux protéines sans ou avec la formine mDia1 sont présentées en **Figure 84.C** et **Figure 84.D** respectivement. On observe une plus grande hétérogénéité dans le mélange avec l'introduction de la formine mDia1 (**Fig. 84.D**).

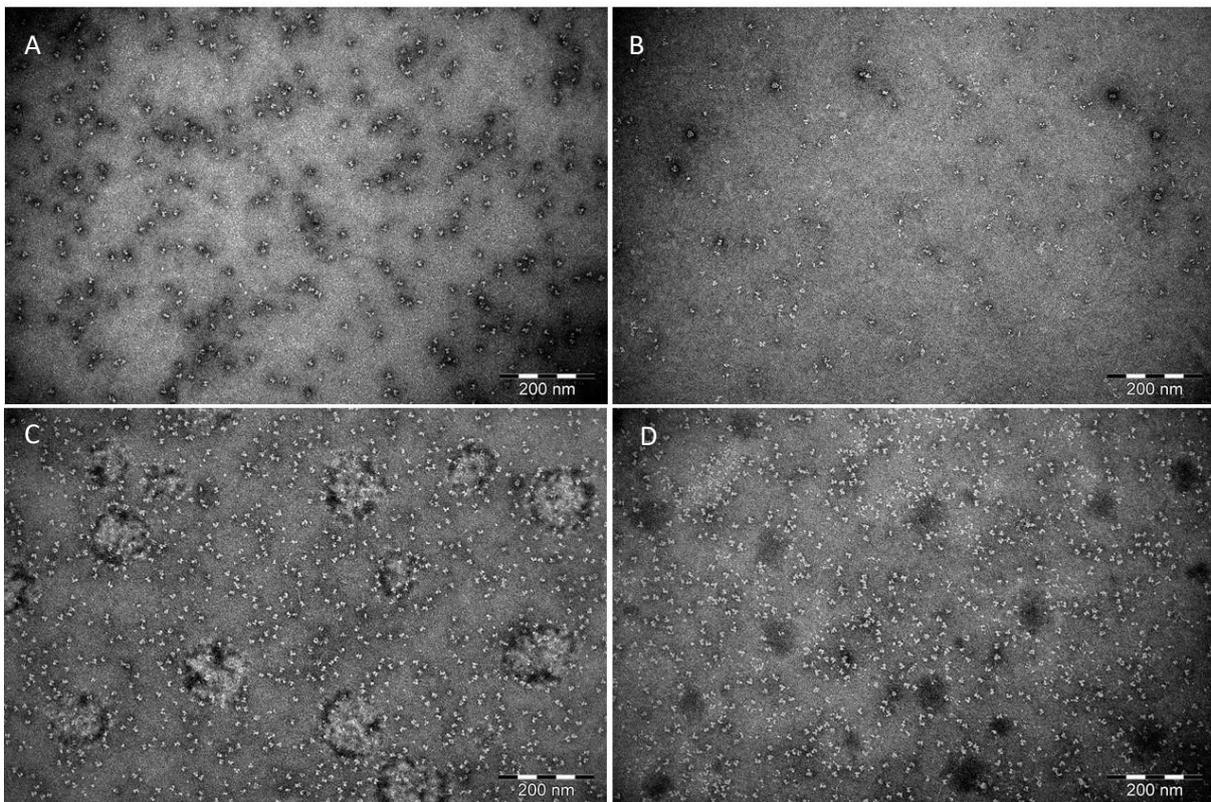
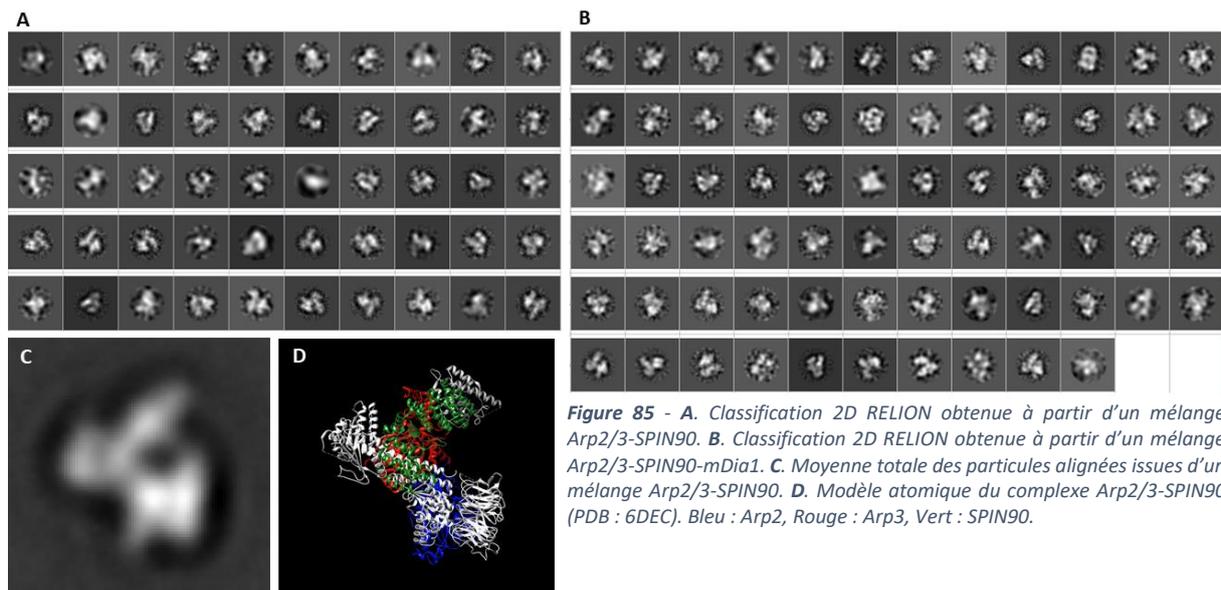


Figure 84 - **A.** Micrographie de complexes Arp2/3 observés en coloration négative. **B.** Micrographie de SPIN90 observé en coloration négative. **C.** Micrographie issue d'un mélange de Arp2/3 et SPIN90 observé en coloration négative. **D.** Micrographie issue d'un mélange de Arp2/3, SPIN90 et mDia1 observé en coloration négative. (Tampon-F, pH7.8 | 80 kV LaB6, x42 000).

Pour chacune de ces expériences, les particules observées dont la taille correspondrait à celle d'un complexe potentiel, incluant Arp2/3, ont été sélectionnées. Arp2/3 présente la masse moléculaire la plus élevée parmi les protéines introduites sur grille et de ce fait les particules dont la taille est inférieure à celle de Arp2/3 ne peuvent correspondre à un complexe et sont pour cette raison directement écartées de l'analyse.

Les classifications 2D réalisées pour chacun de ces jeux de données (6 568 particules dans le cas de Arp2/3-SPIN90 et 9970 dans le cas de Arp2/3-SPIN90-mDia1) montrent des résultats à première vue très similaires et dominés par le signal du complexe Arp2/3 (**Fig. 85**).



Un moyennage globale des particules associées au mélange Arp2/3 et SPIN90 montre une correspondance avec une orientation particulière de la structure atomique du complexe Arp2/3-SPIN90 (**Fig. 85.C-D**). Cette orientation qui apparaît ainsi majoritaire ne permet pas de distinguer aisément la densité associée à SPIN90 (**Fig. 85.C**, sous-unité verte), celle-ci se retrouvant projetée sur le reste du complexe.

La distinction des différents complexes potentiels (Arp2/3, Arp2/3-SPIN90, Arp2/3-SPIN90-mDia1) apparaît avec ces premiers résultats difficilement réalisable à travers une simple observation des classes moyennes 2D générées.

De ce fait, un tri des particules à travers une classification 3D a été envisagé.

8.2. Analyse en Particule Isolée : classifications et reconstructions 3D.

Pour chacun des jeux de données obtenus à partir des différents mélanges sus-cités, une première classification 3D RELION a été réalisée en permettant la génération de trois classes distinctes, cela afin de trier les particules. Dans chaque cas, une structure atomique filtrée spatialement à 40 Å de résolution a été utilisée comme modèle de référence. Seules les particules ayant permis la génération d'une structure cohérente avec le modèle de référence initial sont alors conservées.

La structure atomique du complexe Arp2/3-SPIN90 (PDB : 6DEC) a été utilisée pour l'analyse des données Arp2/3-SPIN90. Différents modèles générés à partir du complexe Arp2/3-SPIN90

(PDB : 6DEC) et des domaines FH2 provenant du complexe FH2-actine (PDB : 1Y64) ont été utilisés pour l'analyse des données Arp2/3-SPIN90-mDia1. Dans ces modèles, une interaction des domaines FH2 avec les sous-unités Arp2 et/ou Arp3 (structures homologues à l'actine) est imposée en prenant pour référence l'interaction existant dans la structure 1Y64 entre ces mêmes domaines FH2 et les sous-unités d'actine.

En outre, une analyse similaire a été réalisée à partir d'un jeu de données issu d'un mélange entre Arp2/3 et mDia1 uniquement (7 572 particules). À cette occasion un modèle généré à partir de la structure atomique de Arp2/3 (PDB : 4XF2) avec ou sans domaines FH2 ajoutés (PDB : 1Y64) a été utilisé.

À travers ces tris par classification 3D, un total de 4 690 particules a pu être sélectionné dans le cadre du mélange Arp2/3-SPIN90 (70% des particules). Un total de 2006 particules a pu être sélectionné dans le cadre du mélange Arp2/3-SPIN90-FH2 (20% des particules). En revanche, dans le cadre du mélange Arp2/3-mDia1 aucune structure cohérente avec le modèle initial de référence incluant des domaines FH2 n'a pu être obtenue. Cette observation suggère qu'aucun complexe stable impliquant Arp2/3 et mDia1 n'a été généré. Lorsqu'un modèle atomique de Arp2/3 sans domaine FH2 additionnel est utilisé comme référence pour ce dernier jeu de données, 5456 particules peuvent être sélectionnées (72 % des particules).

À la suite de ces sélections, les sous-jeux de particules obtenus sont soumis à des reconstructions 3D en utilisant des modèles de référence initiaux plus fortement filtrés (50 – 60 Å) afin de limiter les biais introduits par ces derniers.

Des structures 3D à 27 Å de résolution ont pu être obtenues pour ces différents jeux de données et sont présentées en **Figures 86, 87**.

Un modèle atomique du complexe Arp2/3-SPIN90 (PDB : 6DEC) peut être ajusté sans ambiguïté dans la structure issue du mélange Arp2/3-SPIN90 (**Fig. 86.B**) de même qu'un modèle atomique de Arp2/3 (PDB : 4XF2) peut être ajusté dans la structure issue du mélange Arp2/3-mDia1 (**Fig. 86.A**).

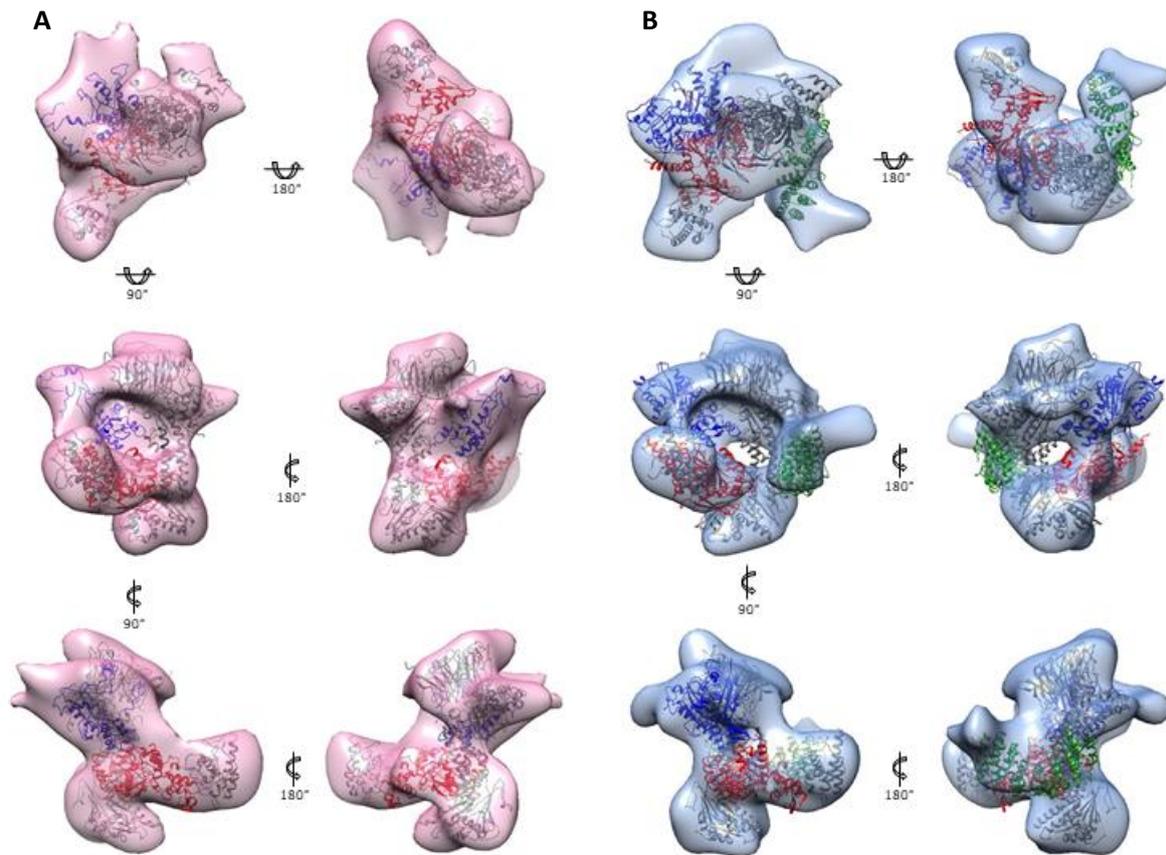


Figure 86 - A. Structures 3D RELION à 27 Å de résolution obtenues à partir des mélanges Arp2/3-mDia1 (A, rose) ou Arp2/3-SPIN90 (B, bleu) et dans lesquelles les modèles atomiques correspondant ont été ajustés (A : Arp2/3, PDB :4XF2 | B : Arp2/3-SPIN90 , PDB : 6DEC). Bleu : Arp2, Rouge : Arp3, Vert : SPIN90.

En ce qui concerne la structure issue du mélange Arp2/3-SPIN90-mDia1, lorsque le complexe atomique de Arp2/3-SPIN90 est ajusté dans la structure, une densité supplémentaire est observée à proximité des sous-unités Arp2 et Arp3 (**Fig. 87**). Cette densité n'étant pas observée dans les autres structures, elle est identifiée ici comme la contribution des domaines FH2 de mDia1. Dans la **Figure 87**, l'enveloppe électronique accueille un modèle généré à partir de la structure atomique du complexe Arp2/3-SPIN90 activée (PDB : 6W17) et dont les sous-unités Arp2 et Arp3 sont mises en contact avec les domaines FH2 selon la configuration observée dans la structure 1Y64 (contact actine-FH2). Des incompatibilités stériques locales sont observées dans ce modèle entre les domaines FH2 et le restant du complexe Arp2/3, cependant, une légère ré-orientation de ces domaines FH2 permettrait d'éviter ces incompatibilités stériques localisées sans modifier l'allure globale du modèle.

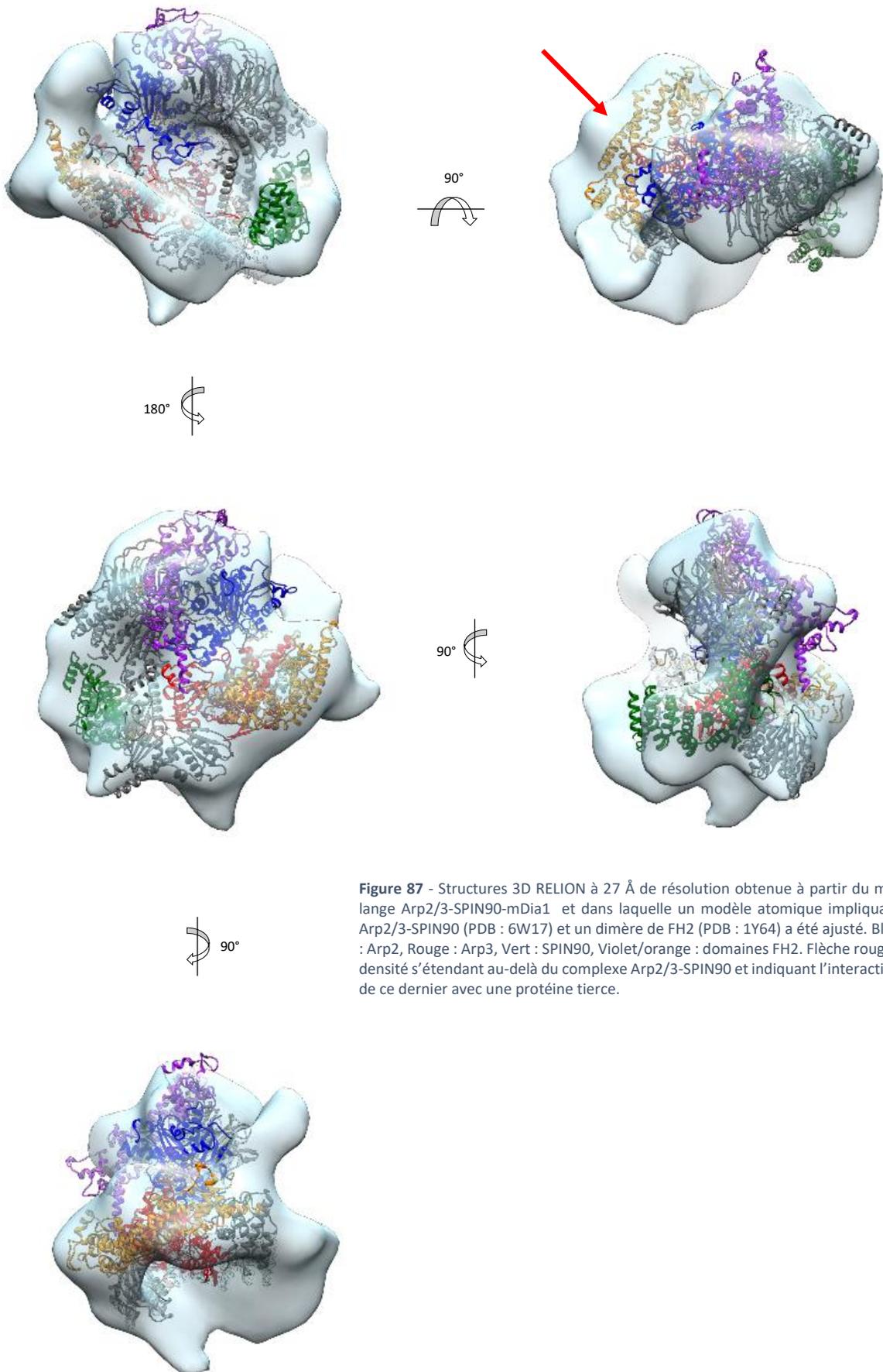


Figure 87 - Structures 3D RELION à 27 Å de résolution obtenue à partir du mélange Arp2/3-SPIN90-mDia1 et dans laquelle un modèle atomique impliquant Arp2/3-SPIN90 (PDB : 6W17) et un dimère de FH2 (PDB : 1Y64) a été ajusté. Bleu : Arp2, Rouge : Arp3, Vert : SPIN90, Violet/orange : domaines FH2. Flèche rouge : densité s'étendant au-delà du complexe Arp2/3-SPIN90 et indiquant l'interaction de ce dernier avec une protéine tierce.

Cette dernière structure soutient directement l'hypothèse de la formation d'un complexe ternaire impliquant Arp2/3-SPIN90-mDia1 avec une interaction identifiée du côté Arp2/Arp3. Néanmoins, une ambiguïté persiste sur le positionnement des domaines FH2 dans ce complexe avec différentes orientations ajustables au sein de la structure obtenue, ne permettant pas d'avoir une définition claire du complexe formé. Il serait alors nécessaire d'inclure un plus grand nombre de particules en coloration négative avant de passer ensuite à une approche par cryo-microscopie électronique pour mieux caractériser le complexe ternaire formé.

Ces résultats ont pu être intégrés au sein d'un article publié en 2020 dans le journal *Nature Cell Biology* : « *SPIN90 associates with mDia1 and the Arp2/3 complex to regulate cortical actin organization* »²⁴⁵.

9. Conclusions et Perspectives.

9.1. Modalités de génération d'une densité élevée de courts filaments d'actine adaptée à une Analyse en Particule Isolée.

L'étude structurale des extrémités d'actine hautement dynamiques et notamment de leur extrémité barbée reste un enjeu majeur pour la compréhension fine d'un ensemble de procédés biologiques impliquant la polymérisation de ces filaments d'actine. En effet, une part importante de la régulation dynamique et/ou fonctionnelle des filaments d'actine s'opère à travers ces extrémités. On peut ainsi penser à l'activité des protéines de coiffe CapZ ou des formines dans le fonctionnement des lamellipodes ou des filopodes.

Malgré cet intérêt notoire, les études en microscopie électronique portant sur les extrémités de ces filaments d'actine restent peu nombreuses. On peut néanmoins noter l'occurrence de deux travaux de recherche récents, paru en 2020 pour le premier et à paraître pour le second (disponible sur BioRxiv), et élucidant, dans l'ordre, la structure à haute résolution de l'extrémité pointue coiffée d'un complexe Arp2/3-Dip1²³² (3,9 angström) et la structure de l'extrémité barbée en complexe avec la protéine de coiffe CapZ (3,8 angström). Ces deux résultats marquent une avancée remarquable dans l'étude des extrémités de filaments d'actine par microscopie électronique. Dans ces deux cas les auteurs ont utilisé avec succès la capacité neutralisante de la dynamique des extrémités barbées qu'offre la protéine de coiffe CapZ. Ils ont ainsi pu adsorber sur grille de microscopie électronique une densité importante de courts filaments d'actine nécessaire pour une Analyse en Particule Isolée.

Malheureusement une telle approche n'est plus envisageable lorsque l'on s'intéresse à la structure libre de l'extrémité barbée ou bien à son interaction intacte avec une autre protéine de coiffe telles que les formines étudiées au cours de ma thèse.

De ce fait, plusieurs stratégies alternatives ont dû être envisagées pour mener à bien mon projet de thèse qui visait principalement à élucider les modalités de l'association pérenne des formines aux extrémités barbées des filaments d'actine en élongation. Ces stratégies ayant pour but de générer une densité importante de courts filaments d'actine ont été évaluées dans un premier temps à travers une approche par coloration négative.

A. Approche infructueuse du rééquilibrage nucléation/élongation des filaments d'actine.

La première approche ayant été testée a consisté à stimuler la nucléation des filaments d'actine par le biais de complexes spectrine-actine pour rendre le mécanisme de nucléation de nouveaux filaments d'actine prépondérant vis-à-vis de leur élongation. Cette approche n'a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants concernant la densité d'extrémités de filaments d'actine observées sur grille de microscopie électronique. Il n'est cependant pas exclu ici que d'autres noyaux de nucléation puissent donner de meilleurs résultats.

Toujours dans l'idée de favoriser la nucléation des filaments d'actine par rapport à leur élongation, une approche par modulation des interactions électrostatiques en solution à travers la modulation de la force ionique ou du pH a été envisagée. De nouveau, cette approche n'a pas permis d'obtenir les résultats escomptés. Dans le cas de la force ionique aucun effet majeur n'a pu être mis en évidence alors que ce paramètre pourrait altérer l'association pérenne des formines aux extrémités barbées (défavorable dans le contexte de l'étude).

En outre, l'utilisation de pH extrêmes (6.5 – 8.5) a mis en évidence une neutralisation du potentiel nucléateur des complexes spectrine-actine à bas pH et une altération de l'intégrité structurale des filaments d'actine observés à haut pH. Dans le cas des bas pH, l'effet inhibiteur sur l'activité des complexes spectrine-actine empêche la génération d'une densité importante de filaments d'actine. Dans le cas des pH élevés, la perturbation de la structure des filaments d'actine n'apparaît pas compatible avec une étude structurale de ces derniers avec les formines.

B. Approche fructueuse du contrôle de la taille des filaments d'actine par sonication.

Une tout autre approche a alors été envisagée. Dans cette approche, des filaments d'actine amenés à leur état stationnaire ont été segmentés par sonication avant d'être mis succinctement en contact avec de la formine. Cette approche a permis d'obtenir des résultats satisfaisants concernant la densité des extrémités de filaments d'actine observées sur grille de microscopie électronique.

Dans cette approche, l'utilisation de sonicateurs à sonde est apparue primordiale avec un ajustement crucial des paramètres de sonication (pulsations, diamètre de la pointe). Si la sonication des filaments d'actine pouvait, a priori, laisser envisager une potentielle altération structurale des filaments d'actine générés (ce qui aurait été néfaste pour l'interaction des formines), la

capacité observée des filaments à repolymériser après sonication a pu montrer que l'intégrité structurale de ces derniers reste largement préservée.

Dans le cadre de cette approche par sonication, des protéines régulatrices de la polymérisation des filaments d'actine ont également pu être testées (complexes spectrine-actine, Arp2/3, tromoduline, Gc-globuline) afin de limiter la repolymérisation des filaments d'actine pendant ou après la sonication. À cette occasion, seule la Gc-globuline avait été retenue afin de neutraliser la réserve d'actine-G non polymérisée en solution. Une Analyse en Particule Isolée réalisée à partir d'une expérience de sonication d'actine-F en présence de Gc-globuline et mise en contact succinctement avec des formines avant dépôt sur grille n'avait cependant pas permis d'identifier la coiffe d'extrémités barbées par des formines. Des densités électroniques supplémentaires avaient cependant pu être identifiées aux extrémités barbées. Les classes moyennes 2D correspondantes avaient alors pu être associées à des projections 2D d'un hypothétique complexe formé à partir d'une Gc-globuline coiffant une extrémité barbée. Néanmoins, aucune reconstruction 3D n'a permis de confirmer la formation d'un tel complexe.

Des conditions simplifiées avaient finalement été retenues en s'affranchissant, tout au long de la préparation des échantillons, de l'utilisation de protéines régulatrices autres que celle des formines. Une densité d'environ 12 extrémités de filament d'actine par image avait alors pu être observée en coloration négative. Cette densité d'extrémité reste relativement faible mais a néanmoins permis de réaliser une Analyse en Particule Isolée fructueuse en coloration négative. Une Analyse en Particule Isolée a également pu être envisagée en cryo-microscopie électronique grâce à une acquisition massive d'images permise par les nouveaux systèmes d'acquisitions des microscopes électroniques.

9.2. Détermination structurale en coloration négative de complexes de formine aux extrémités barbées de filaments d'actine en élongation.

A. Validation du modèle de la « marche enjambée ».

Les analyses 2D réalisées en coloration négative à partir d'expériences de sonication d'actine-F mise en contact succinctement avec de la formine ont permis de mettre en évidence des classes moyennes caractéristiques de la coiffe des extrémités barbées par des formines. Un protocole d'analyse 2D dédié a été mis en place à cette occasion afin d'aligner et de classifier au mieux les extrémités de filaments d'actine dont la forme est atypique dans le cadre d'une

Analyse en Particule Isolée. Ce protocole a permis de mettre en évidence, en plus de la conformation structurale majoritaire associée à une formine coiffant l'extrémité d'un filament d'actine (environ 20% des extrémités), une seconde conformation structurale minoritaire (environ 2% des extrémités). Ces deux conformations structurales identifiées lors d'analyses 2D ont alors permis de générer des structures 3D à respectivement 24 angström et 35 angström de résolution, directement interprétables comme l'état « ouvert » (majoritaire) et l'état « fermé » (minoritaire), décrits par le modèle de la « marche enjambée ». Ces résultats permettent ainsi de soutenir largement le modèle de la « marche enjambée » initialement proposé par Takanori Otomo et ses collègues.

B. Distribution angulaire inhomogène des complexes bout barbé -formine.

Lors des reconstructions 3D de complexes bout barbé – formine on observe une distribution des angles de projection associés aux particules durant la reconstruction qui surreprésente certaines orientations du modèle atomique. Cette observation est en accord avec les classes moyennes 2D identifiées, dominées par des angles de projections particuliers. Une telle configuration est néanmoins difficilement imputable à l'adsorption selon une orientation particulière des extrémités coiffées de formine sur grille de microscopie électronique. En effet, cela impliquerait que l'orientation des filaments d'actine adsorbés sur grille soit dominée par l'interaction d'une de leur extrémité ce qui semble peu probable. Il a alors été proposé ici que cette distribution inhomogène des orientations identifiées lors des analyses est le fruit d'un biais computationnel avec des orientations données moins facilement identifiables que les autres parmi l'ensemble des extrémités de filaments d'actine extraites, mais pas moins présentes dans le jeu de données. Des reconstructions 3D réalisées avec l'ensemble des particules extraites (sans tri préalable des particules après analyses 2D) pour tenter d'assigner des orientations difficilement identifiables en 2D dans le cadre d'un complexe bout barbé - formine n'avaient néanmoins pas permis ici d'améliorer les résultats. Une solution envisageable dans ce contexte pour remédier à ce potentiel effet d'orientations sous-identifiées serait d'introduire lors des acquisitions d'images, une seconde image réalisée avec un angle non orthogonal entre le faisceau d'électron incident et le plan de la grille de microscopie électronique. Un tel mode d'acquisition permettrait de générer des paires d'images à deux angles de vue différents pour chaque extrémité extraite. Ces deux angles de vue pourraient ainsi favoriser la probabilité d'identifier un complexe bout barbé – formine en favorisant l'observation de chaque extrémité selon une orientation favorable à une telle identification.

C. Facteur d'ouverture.

Les proportions de complexes formine - bout barbé identifiés d'un point de vue structurale ici dans l'état « ouvert » ou dans l'état « fermé » (modèle de la « marche enjambée »), après des analyses 2D (83% et 17%) ou 3D (84% et 16%) sont cohérentes avec le facteur d'ouverture de la formine mDia1 proposé en 2006 dans l'article « Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. » et estimé à 0.9¹⁹⁹. Dans cet article, l'estimation du facteur d'ouverture s'appuie sur la différence des vitesses d'élongation des filaments d'actine mesurées soit en présence soit en absence d'une coiffe de formine. La réduction de la vitesse d'élongation mesurée en présence de formines (sans profiline) est attribuée ici à une occupation de l'état « fermé ». Cette interprétation suppose que la coiffe des extrémités barbées par des formines n'altère pas significativement les taux d'additions ou de soustraction des sous-unités d'actine à l'extrémité barbée dans son état ouvert. Une telle hypothèse reste largement discutable.

Concernant les structures déterminées ici, les natures « ouverte » (élongation autorisée des filaments d'actine) ou « fermée » (élongation impossible du filament d'actine) sont attribuées essentiellement à travers une analogie avec la description structurale initialement proposée par le modèle de la « marche enjambée ». En effet, les faibles résolutions obtenues ici ne permettent pas de certifier la possibilité ou l'impossibilité stérique de l'ajout d'un nouveau monomère d'actine dans une configuration donnée. En particulier, dans le cas de l'état dit « fermé » un changement conformationnel du complexe bout barbée – formine, analogue à celui proposé dans le modèle du « saut enclenché » et qui expliquerait « l'ouverture » de l'extrémité n'est pas excluable.

Il serait intéressant ici d'obtenir des données supplémentaires pour caractériser plus finement cet état minoritaire dit « fermé » du complexe bout barbée - formine. Dans le même article cité ci-dessus, il avait été proposé que l'hydrolyse des nucléotides fixés aux sous-unités d'actine des extrémités barbées pouvait influencer le rapport entre état « ouvert » et état « fermé » en faveur de ce dernier. Pour la formine mDia1, le passage d'un facteur d'ouverture de 0.9 en présence d'ATP-actine à 0.5 en présence d'ADP-actine avait pu être estimé. Un tel phénomène, s'il est vérifié, pourrait être utile dans le but de caractériser l'état « fermé » initialement minoritaire. Toujours à travers cet article, des facteurs d'ouverture variés avaient pu être estimés pour d'autres isoformes de formine. Des facteurs d'ouvertures de 0.75 – 0.5 pour Bni1p, 0.25 pour mDia2 et 0 pour Cdc12 ont ainsi pu être estimés¹⁹⁹. Il serait profitable ici de réaliser avec ces différents isoformes la même expérience que celle effectuée avec la formine mDia1, cela afin

de comparer les rapports observés entre état « ouvert » et état « fermé » avec les facteurs d'ouverture initialement estimés.

Étant donné que l'approche par microscopie électronique proposée ici s'appuie sur une observation directe des états structuraux adoptés par les formines aux extrémités barbées, l'estimation du facteur d'ouverture qui en résulte est décorrélée de potentielles variations des taux d'échanges des monomères d'actine dans l'état « ouvert ». Une telle approche pourrait ainsi valider ou invalider l'effet de l'hydrolyse de l'ATP sur la proportion de ces deux états par une comparaison de résultats issus d'expériences réalisées en présence d'ATP-actine ou en présence d'ADP-actine.

9.3. Modèle du battement de FH2 dans l'état « ouvert » et dimères de formine encerclant le corps des filaments d'actine.

Des analyses 2D focalisées sur l'état « ouvert » des complexes bout barbé - formine ont pu mettre en évidence une variation conformationnelle localisée au niveau du premier domaine FH2 qui semble réaliser un battement à deux dimensions.

Une telle observation avait permis de proposer un modèle 3D reliant notamment cette variation conformationnelle observée en 2D avec une réorientation de la première sous-unité d'actine vis-à-vis du reste du filament, passant d'une configuration proche de celle observée dans le cristal de Takanori Otomo à une configuration proche de celle observée dans un filament d'actine classique. Cette reconfiguration est analogue à la variation structurale proposée dans le modèle du « saut enclenché ». Cette variation conformationnelle observée dans l'état « ouvert » pourrait enrichir le modèle à deux états proposé (ouvert/fermé) en introduisant l'occurrence de sous-états conformationnels qui pourraient eux-mêmes moduler l'échange des monomères d'actine aux extrémités barbées.

Partant de ce modèle du battement de l'état « ouvert », une configuration plus avancée de l'état d'élongation du filament a pu être envisagée avec pour conséquence l'encerclement du corps du filament d'actine par le dimère FH2, à distance de l'extrémité barbée.

Une telle configuration a pu être confirmée via des analyses 2D réalisées à partir des images de microscopie électronique précédemment obtenues en coloration négative par sonication d'actine-F mise en contact avec de la formine. Le scénario proposé ici pour atteindre cette configuration reste néanmoins à prouver avec une potentielle dissociation partielle des dimères de formine pouvant permettre l'encerclement du corps des filaments d'actine sans passer par leurs extrémités barbées. Des mutants de formine non-dissociables pourraient être envisagés pour vérifier ce dernier scénario.

La structure 3D de cette configuration obtenue à 33 angström de résolution indique sans surprise une surreprésentation de l'orientation présentant les domaines FH2 du dimère de formine selon leurs deux axes principaux. En effet, seule cette orientation avait pu être reconnue lors de l'extraction des particules. Comme proposé dans le cadre de la coiffe des extrémités barbées, il serait bénéfique ici de réaliser des acquisitions d'images couplées en introduisant un angle dans l'orientation de la grille de microscopie électronique. Cette approche pourrait être d'autant plus bénéfique si les axes des filaments d'actine observés étaient orientés selon l'axe de rotation de la grille. Dans ce contexte, l'alignement des filaments d'actine lors de leur dépôt sur grille de microscopie électronique pourrait être envisagé en s'appuyant sur l'utilisation d'un champ magnétique faible comme décrit dans l'article « Low-intensity magnetic fields assisted alignment of actin filaments »²⁴⁶.

9.4. Étude du complexe extrémité barbée – formine par une approche en cryo-microscopie électronique.

Les résultats encourageants concernant l'étude de la coiffe des extrémités barbées par des formines obtenus par une approche en coloration négative ont permis d'envisager une approche par cryo-microscopie électronique afin de confirmer ces résultats dans un premier temps mais également d'améliorer la résolution des structures générées. La difficulté de ce transfert des résultats d'une approche par coloration négative à la cryo-microscopie électronique réside dans la baisse de densité en protéine généralement observée avec les grilles classiquement utilisées dans cette seconde approche. Ce point est critique dans le cadre de l'étude des formines aux extrémités barbées étant donné que c'est le facteur limitant majeur de l'étude d'un tel complexe par une Analyse en Particule Isolée.

Les travaux ayant visé à maintenir la densité des extrémités de filaments d'actine sur grille de cryo-microscopie électronique ont rapidement convergés vers l'utilisation de grilles C-Flat recouvertes de feuilles d'oxide de graphène. Il est intéressant de voir que l'équipe de Stefan Raunser a également convergé vers l'utilisation de feuilles d'oxide de graphène pour maintenir une densité importante de courts filaments d'actine dans le cadre de leur étude à paraître de la coiffe des extrémités barbées par les protéines CapZ.

Dans le cas de l'étude des complexes bout barbé – formine une densité moyenne très limitée avait finalement pu être obtenue : de l'ordre de 4 - 5 extrémités par image ce qui équivaut à une densité divisée par trois par rapport à ce qui avait pu être observé en coloration négative (12 - 15).

Malgré tout, des classes moyennes 2D similaires à celles observées en coloration négative pour l'état « ouvert » ont pu être mises en évidence par cette approche en cryo-microscopie électronique, confirmant ainsi le caractère non artéfactuel de ces premières observations.

Le peu de particules alors identifiées (1548) n'a pas permis de générer une structure 3D à une résolution plus importante que celle déjà obtenue en coloration négative (30 angström de résolution contre 24 angström de résolution).

Une amélioration pourrait être obtenue à travers l'optimisation du tapissage des grilles de cryo-microscopie par des feuilles d'oxide de graphène. En effet, une tendance non négligeable à l'agrégation de ces feuilles ou l'occurrence de trous dépourvus de feuille indique une marge d'amélioration.

Néanmoins, les résultats obtenus restent très éloignés des dizaines de milliers de bouts barbés coiffés de formine nécessaires pour générer une structure à haute résolution. Le travail d'optimisation reste donc encore très important.

9.5. Formation d'un complexe ternaire Arp2/3-SPIN90-mDia1.

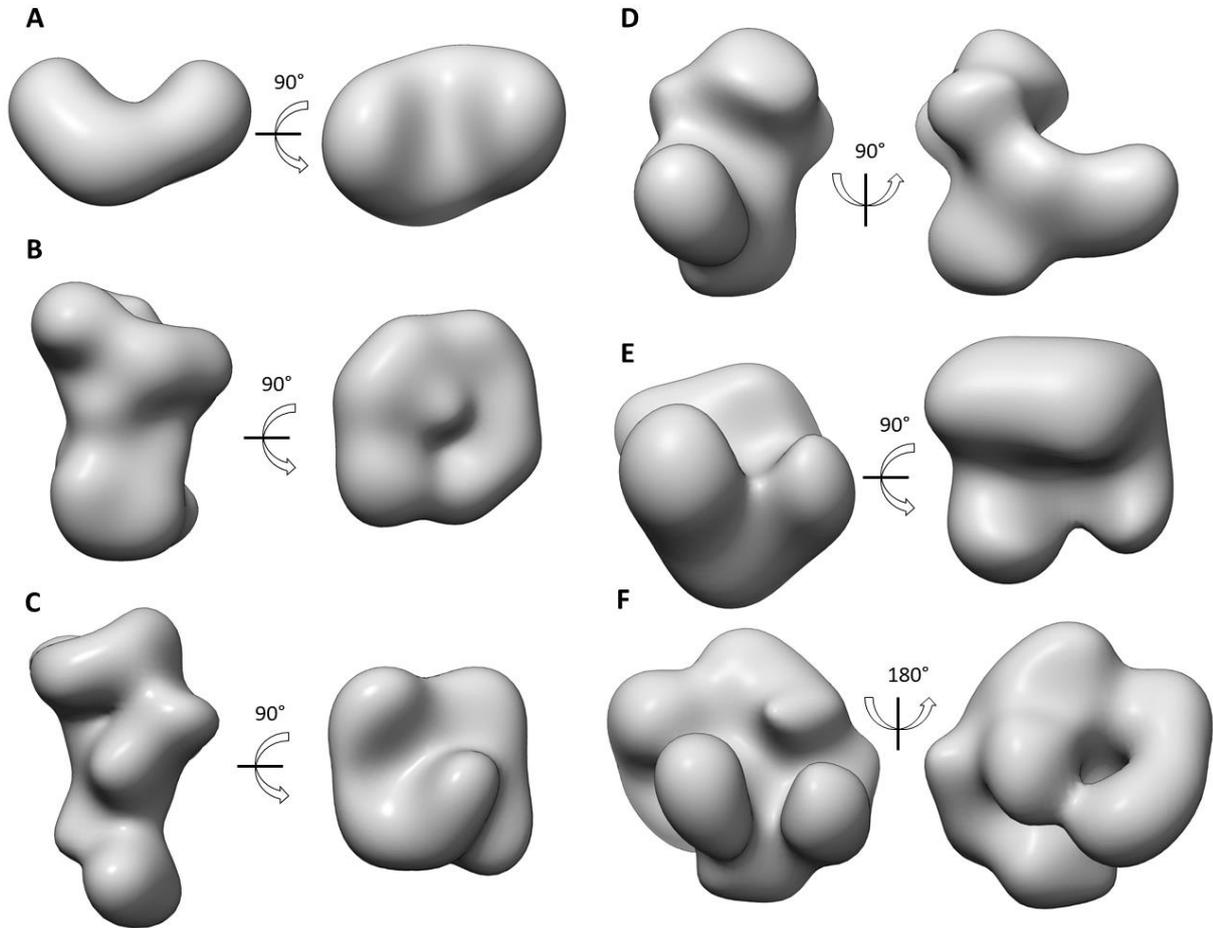
Des Analyses en Particule Unique réalisées parallèlement avec des mélanges de Arp2/3-SPIN90 ou Arp2/3-SPIN90-mDia1 ont permis de mettre en évidence la génération d'un complexe ternaire Arp2/3-SPIN90-mDia. En effet, l'occurrence d'une densité supplémentaire avait pu être observée au niveau de Arp2/Arp3 dans la structure 3D générée par un mélange Arp2/3-

SPIN90-mDia1 en comparaison avec celle obtenue à partir du mélange Arp2/3-SPIN90. Le nombre de particules correspondant au complexe Arp2/3-SPIN90-mDia1 reste cependant limité avec 2006 particules identifiées (20% des particules) ce qui n'a pas permis de générer une structure suffisamment résolue (27 angström) pour décrire sans ambiguïté les modalités d'interactions des domaines FH2 dans ce complexe. Plus de données pourraient être obtenues pour améliorer ces résultats. Néanmoins, il se peut que la résolution atteignable soit également limitée par une variabilité conformationnelle du complexe formé entre mDia1 et Arp2/3-SPIN90.

9.6. Conclusion générale.

L'un des résultats majeurs de ma thèse a été la caractérisation structurale des conformations adoptées par les formines au cours même de la coiffe dynamique des extrémités barbées de filaments d'actine en élongation. Cette caractérisation structurale obtenue par une approche en microscopie électronique a été permise suite à la résolution de verrous techniques empêchant initialement toute réalisation d'une Analyse en Particule Isolée à partir de ce système hautement dynamique et hétérogène. Les informations structurales qui ont été obtenues ici ont permis de valider dans un premier temps des hypothèses relatives au mode de fonctionnement des formines liées aux extrémités barbées des filaments d'actine, puis dans un second temps, d'enrichir le modèle à deux états initialement proposé pour décrire la procession des formines aux extrémités barbées. À la lumière de ce modèle affiné, un second mode d'interaction de la formine mDia1 avec le corps des filaments d'actine a pu être envisagé, puis déterminé en microscopie électronique. L'ensemble de ces résultats inédits apportant une contribution substantielle au domaine d'étude fait actuellement l'objet de la préparation d'un article scientifique.

IV. Annexes.



Annexe 1 – Modèles filtrés spatialement utilisées comme références pour la reconstruction de structures 3D sous RELION. **A.** Dimère de FH2. **B.** Extrémité barbée coiffée d'une formine dans l'état « ouvert ». **C.** Extrémité barbée coiffée d'une formine dans l'état « fermé ». **D.** Arp2/3 **E.** Arp2/3-SPIN90. **F.** Arp2/3-SPIN90-mDia1.

V. Bibliographie

1. Tominaga, T. *et al.* Diaphanous-Related Formins Bridge Rho GTPase and Src Tyrosine Kinase Signaling. *Molecular Cell* **5**, 13–25 (2000).
2. Kato, T. mDia1 localization to mitotic spindle. 10.
3. Tolliday, N., VerPlank, L. & Li, R. Rho1 Directs Formin-Mediated Actin Ring Assembly during Budding Yeast Cytokinesis. *Current Biology* **12**, 1864–1870 (2002).
4. Yamana, N. *et al.* The Rho-mDia1 Pathway Regulates Cell Polarity and Focal Adhesion Turnover in Migrating Cells through Mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol* **26**, 6844–6858 (2006).
5. Hotulainen, P. & Lappalainen, P. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *Journal of Cell Biology* **173**, 383–394 (2006).
6. Carramusa, L., Ballestrem, C., Zilberman, Y. & Bershadsky, A. D. Mammalian diaphanous-related formin Dia1 controls the organization of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. *Journal of Cell Science* **120**, 3870–3882 (2007).
7. Mellor, H. The role of formins in filopodia formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1803**, 191–200 (2010).
8. DeWard, A. D., Eisenmann, K. M., Matheson, S. F. & Alberts, A. S. The role of formins in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1803**, 226–233 (2010).
9. Lin, Y.-N. *et al.* Expression of DIAPH1 is up-regulated in colorectal cancer and its down-regulation strongly reduces the metastatic capacity of colon carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **134**, 1571–1582 (2014).
10. Kim, D. *et al.* mDia1 regulates breast cancer invasion by controlling membrane type 1-matrix metalloproteinase localization. *Oncotarget* **7**, (2016).
11. Thompson, S. B. *et al.* The Formin mDia1 Regulates Acute Lymphoblastic Leukemia Engraftment, Migration, and Progression in vivo. *Front Oncol* **8**, 389 (2018).

12. Yang, J. *et al.* DIAPH1 Is Upregulated and Inhibits Cell Apoptosis through ATR/p53/Caspase-3 Signaling Pathway in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Dis. Markers* **2019**, 6716472 (2019).
13. Pruyne, D. *et al.* Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association. *Science* **297**, 612–615 (2002).
14. Romero, S. *et al.* Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* **119**, 419–429 (2004).
15. Otomo, T. *et al.* Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* **433**, 488–494 (2005).
16. Jégou, A., Carlier, M.-F. & Romet-Lemonne, G. Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments. *Nature Communications* **4**, 1–7 (2013).
17. Kubota, H. *et al.* Biphasic Effect of Profilin Impacts the Formin mDia1 Force-Sensing Mechanism in Actin Polymerization. *Biophys. J.* **113**, 461–471 (2017).
18. Paul, A. & Pollard, T. The Role of the FH1 Domain and Profilin in Formin-Mediated Actin-Filament Elongation and Nucleation. *Curr Biol* **18**, 9–19 (2008).
19. Paul, A. S. & Pollard, T. D. Energetic Requirements for Processive Elongation of Actin Filaments by FH1FH2-formins. *J Biol Chem* **284**, 12533–12540 (2009).
20. Pollard, T. D. & Goldman, R. D. Overview of the Cytoskeleton from an Evolutionary Perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
21. Ali, M. Y., Vilfan, A., Trybus, K. M. & Warshaw, D. M. Cargo Transport by Two Coupled Myosin Va Motors on Actin Filaments and Bundles. *Biophys. J.* **111**, 2228–2240 (2016).
22. Pilling, A. D., Horiuchi, D., Lively, C. M. & Saxton, W. M. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2057–2068 (2006).
23. Liu, Z., Persson, S. & Zhang, Y. The connection of cytoskeletal network with plasma membrane and the cell wall. *J Integr Plant Biol* **57**, 330–340 (2015).

24. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* **463**, 485–492 (2010).
25. Pegoraro, A. F., Janmey, P. & Weitz, D. A. Mechanical Properties of the Cytoskeleton and Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, (2017).
26. Le Clainche, C. & Carlier, M.-F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* **88**, 489–513 (2008).
27. Bugyi, B., Didry, D. & Carlier, M.-F. How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach. *EMBO J.* **29**, 14–26 (2010).
28. Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C. & Plastino, J. Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* **94**, 235–263 (2014).
29. Short, B. Formin' the cytokinetic ring. *J Cell Biol* **203**, 3 (2013).
30. Chugh, P. & Paluch, E. K. The actin cortex at a glance. *J Cell Sci* **131**, (2018).
31. Wang, S. & O'Shaughnessy, B. Anchoring of actin to the plasma membrane enables tension production in the fission yeast cytokinetic ring. *Mol Biol Cell* **30**, 2053–2064 (2019).
32. Goode, B. L., Eskin, J. A. & Wendland, B. Actin and Endocytosis in Budding Yeast. *Genetics* **199**, 315–358 (2015).
33. Pedersen, R. T. A. & Drubin, D. G. Type I myosins anchor actin assembly to the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis. *J. Cell Biol.* **218**, 1138–1147 (2019).
34. Huber, F. *et al.* Emergent complexity of the cytoskeleton: from single filaments to tissue. *Adv Phys* **62**, 1–112 (2013).
35. dos Remedios, C. G. *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* **83**, 433–473 (2003).
36. Paavilainen, V. O., Bertling, E., Falck, S. & Lappalainen, P. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **14**, 386–394 (2004).
37. Pollard, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).

38. Mayne, R., Adamatzky, A. & Jones, J. On the role of the plasmodial cytoskeleton in facilitating intelligent behavior in slime mold *Physarum polycephalum*. *Communicative & Integrative Biology* **8**, (2015).
39. Ramaekers, F. C. & Bosman, F. T. The cytoskeleton and disease. *The Journal of Pathology* **204**, 351–354 (2004).
40. Bugyi, B. & Kellermayer, M. The discovery of actin: “to see what everyone else has seen, and to think what nobody has thought”*. *J Muscle Res Cell Motil* **41**, 3–9 (2020).
41. Cooper, G. M. Structure and Organization of Actin Filaments. *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition (2000).
42. Pantaloni, D., Le Clainche, C. & Carlier, M. F. Mechanism of actin-based motility. *Science* **292**, 1502–1506 (2001).
43. Carlier, M.-F. & Shekhar, S. Global treadmilling coordinates actin turnover and controls the size of actin networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 389–401 (2017).
44. Mattila, P. K. & Lappalainen, P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 446–454 (2008).
45. Schwayer, C., Sikora, M., Slováková, J., Kardos, R. & Heisenberg, C.-P. Actin Rings of Power. *Dev. Cell* **37**, 493–506 (2016).
46. Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F. & Holmes, K. C. Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* **347**, 37–44 (1990).
47. Dominguez, R. *A Common Binding Site for Actin-Binding Proteins on the Actin Surface*. (Landes Bioscience, 2013).
48. Dominguez, R. & Holmes, K. C. Actin Structure and Function. *Annual Review of Biophysics* **40**, 169–186 (2011).
49. Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W. & Kabsch, W. Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44–49 (1990).

50. Egelman, E. H., Francis, N. & DeRosier, D. J. F-actin is a helix with a random variable twist. *Nature* **298**, 131–135 (1982).
51. Galkin, V. E., Orlova, A., Solodukhin, A., Schröder, G. F. & Egelman, E. H. Structural Polymorphism of F-Actin is Coupled with its Mechanical Properties. *Biophysical Journal* **104**, 644a–645a (2013).
52. Fujii, T., Iwane, A. H., Yanagida, T. & Namba, K. Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* **467**, 724–728 (2010).
53. Flexural rigidity of microtubules and actin filaments measured from thermal fluctuations in shape. *J Cell Biol* **120**, 923–934 (1993).
54. Wisanpitayakorn, P., Mickolajczyk, K. J., Hancock, W. O. & Tuzel, E. Measurement of the Persistence Length of Cytoskeletal Filaments using Curvature Distributions. 16.
55. Murakami, K. *et al.* Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell* **143**, 275–287 (2010).
56. Wegner, A. Head to tail polymerization of actin. *Journal of Molecular Biology* **108**, 139–150 (1976).
57. Wells, W. A. Microtubules get a name. *J Cell Biol* **168**, 852–853 (2005).
58. Muroyama, A. & Lechler, T. Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells. *Development* **144**, 3012–3021 (2017).
59. Brouhard, G. J. & Rice, L. M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 451–463 (2018).
60. Wells, W. A. The discovery of tubulin. *J Cell Biol* **169**, 552 (2005).
61. Nogales, E., Wolf, S. G. & Downing, K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature* **391**, 199–203 (1998).
62. Bodakuntla, S., Jijumon, A. S., Villablanca, C., Gonzalez-Billault, C. & Janke, C. Microtubule-Associated Proteins: Structuring the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **29**, 804–819 (2019).

63. Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V. & Aebi, U. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 562–573 (2007).
64. Oshima, R. G. Intermediate filaments: a historical perspective. *Exp. Cell Res.* **313**, 1981–1994 (2007).
65. Herrmann, H. & Aebi, U. Intermediate Filaments: Structure and Assembly. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **8**, (2016).
66. Sanghvi-Shah, R. & Weber, G. F. Intermediate Filaments at the Junction of Mechanotransduction, Migration, and Development. *Front Cell Dev Biol* **5**, 81 (2017).
67. Wen, Q. & Janmey, P. A. Polymer physics of the cytoskeleton. *Curr Opin Solid State Mater Sci* **15**, 177–182 (2011).
68. Mostowy, S. & Cossart, P. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **13**, 183–194 (2012).
69. Bridges, A. A. & Gladfelter, A. S. Septin Form and Function at the Cell Cortex. *J. Biol. Chem.* **290**, 17173–17180 (2015).
70. Beber, A. *et al.* Membrane reshaping by micrometric curvature sensitive septin filaments. *Nature Communications* **10**, 1–12 (2019).
71. Gönczi, M. *et al.* Septins, a cytoskeletal protein family, with emerging role in striated muscle. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* (2020) doi:10.1007/s10974-020-09573-8.
72. Spiliotis, E. T. Spatial effects - site-specific regulation of actin and microtubule organization by septin GTPases. *J. Cell. Sci.* **131**, (2018).
73. Valadares, N. F., d' Muniz Pereira, H., Ulian Araujo, A. P. & Garratt, R. C. Septin structure and filament assembly. *Biophys Rev* **9**, 481–500 (2017).
74. Bertin, A. *et al.* *Saccharomyces cerevisiae* septins: Supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *PNAS* **105**, 8274–8279 (2008).
75. Mavrikis, M. *et al.* Septins promote F-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nature Cell Biology* **16**, 322–334 (2014).

76. Dogterom, M. & Koenderink, G. H. Actin–microtubule crosstalk in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 38–54 (2019).
77. Pfisterer, K., Jayo, A. & Parsons, M. Control of nuclear organization by F-actin binding proteins. *Nucleus* **8**, 126–133 (2017).
78. Crevenna, A. H. *et al.* Electrostatics Control Actin Filament Nucleation and Elongation Kinetics. *J Biol Chem* **288**, 12102–12113 (2013).
79. Grazi, E., Ferri, A. & Cino, S. The polymerization of actin. A study of the nucleation reaction. *Biochem. J.* **213**, 727–732 (1983).
80. Cooper, J. A., Walker, S. B. & Pollard, T. D. Pyrene actin: documentation of the validity of a sensitive assay for actin polymerization. *J Muscle Res Cell Motil* **4**, 253–262 (1983).
81. Pollard, T. D. & Mooseker, M. S. Direct measurement of actin polymerization rate constants by electron microscopy of actin filaments nucleated by isolated microvillus cores. *J. Cell Biol.* **88**, 654–659 (1981).
82. Oda, T., Aihara, T. & Wakabayashi, K. Early nucleation events in the polymerization of actin, probed by time-resolved small-angle x-ray scattering. *Scientific Reports* **6**, 1–13 (2016).
83. Narita, A., Oda, T. & Maéda, Y. Structural basis for the slow dynamics of the actin filament pointed end. *EMBO J* **30**, 1230–1237 (2011).
84. Fujiwara, I., Vavylonis, D. & Pollard, T. D. Polymerization kinetics of ADP- and ADP-Pi-actin determined by fluorescence microscopy. *PNAS* **104**, 8827–8832 (2007).
85. Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y. & Narita, A. The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441–445 (2009).
86. von der Ecken, J. *et al.* Structure of the F–actin–tropomyosin complex. *Nature* **519**, 114–117 (2015).
87. Merino, F. *et al.* Structural transitions of F-actin upon ATP hydrolysis at near-atomic resolution revealed by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 528–537 (2018).

88. Merino, F., Pospich, S. & Raunser, S. Towards a structural understanding of the remodeling of the actin cytoskeleton. *Seminars in Cell & Developmental Biology* (2019)
doi:10.1016/j.semcdb.2019.11.018.
89. Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T. & Ishiwata, S. Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature Cell Biology* **4**, 666–673 (2002).
90. Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M. F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* **401**, 613–616 (1999).
91. Pospich, S. *et al.* Near-atomic structure of jasplakinolide-stabilized malaria parasite F-actin reveals the structural basis of filament instability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 10636–10641 (2017).
92. Kumpula, E.-P., Lopez, A. J., Tajedin, L., Han, H. & Kursula, I. Atomic view into Plasmodium actin polymerization, ATP hydrolysis, and fragmentation. *PLOS Biology* **17**, e3000315 (2019).
93. Wetzel, D. M., Håkansson, S., Hu, K., Roos, D. & Sibley, L. D. Actin Filament Polymerization Regulates Gliding Motility by Apicomplexan Parasites. *Mol Biol Cell* **14**, 396–406 (2003).
94. Perrin, B. J. & Ervasti, J. M. The Actin Gene Family: Function Follows Isoform. *Cytoskeleton (Hoboken)* **67**, 630–634 (2010).
95. Belyantseva, I. A. *et al.* Gamma-actin is required for cytoskeletal maintenance but not development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9703–9708 (2009).
96. Bunnell, T. M., Burbach, B. J., Shimizu, Y. & Ervasti, J. M. β -Actin specifically controls cell growth, migration, and the G-actin pool. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4047–4058 (2011).
97. Gimona, M. *et al.* β -actin specific monoclonal antibody. *Cell Motility* **27**, 108–116 (1994).
98. Hill, M. A. & Gunning, P. Beta and gamma actin mRNAs are differentially located within myoblasts. *J. Cell Biol.* **122**, 825–832 (1993).
99. Kang, H. *et al.* Identification of cation-binding sites on actin that drive polymerization and modulate bending stiffness. *PNAS* **109**, 16923–16927 (2012).

100. Karakozova, M. *et al.* Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science* **313**, 192–196 (2006).
101. Zhang, F., Saha, S., Shabalina, S. A. & Kashina, A. Differential arginylation of actin isoforms is regulated by coding sequence-dependent degradation. *Science* **329**, 1534–1537 (2010).
102. Skruber, K., Read, T.-A. & Vitriol, E. A. Reconsidering an active role for G-actin in cytoskeletal regulation. *J. Cell. Sci.* **131**, (2018).
103. Carlier, M. F. Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.* **266**, 1–4 (1991).
104. Weber, A., Herz, R. & Reiss, I. Role of magnesium in the relaxation of myofibrils. *Biochemistry* **8**, 2266–2271 (1969).
105. Pantaloni, D. & Carlier, M. F. How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* **75**, 1007–1014 (1993).
106. Hertzog, M. *et al.* The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell* **117**, 611–623 (2004).
107. Porta, J. C. & Borgstahl, G. E. O. Structural basis for profilin-mediated actin nucleotide exchange. *J Mol Biol* **418**, 103–116 (2012).
108. Courtemanche, N. & Pollard, T. D. Interaction of profilin with the barbed end of actin filaments. *Biochemistry* **52**, (2013).
109. Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S. H. & Dominguez, R. Structural basis for the recruitment of profilin–actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* **26**, 4597–4606 (2007).
110. Xue, B., Leyrat, C., Grimes, J. M. & Robinson, R. C. Structural basis of thymosin- β 4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4596–E4605 (2014).
111. Otterbein, L. R., Cosio, C., Graceffa, P. & Dominguez, R. Crystal structures of the vitamin D-binding protein and its complex with actin: structural basis of the actin-scavenger system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 8003–8008 (2002).

112. Chun, R. F. New perspectives on the vitamin D binding protein. *Cell Biochemistry and Function* **30**, 445–456 (2012).
113. Verboven, C. *et al.* Actin-DBP: the perfect structural fit? *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **59**, 263–273 (2003).
114. Van Baelen, H., Bouillon, R. & De Moor, P. Vitamin D-binding protein (Gc-globulin) binds actin. *J. Biol. Chem.* **255**, 2270–2272 (1980).
115. Mohapatra, L., Lagny, T. J., Harbage, D., Jelenkovic, P. R. & Kondev, J. The Limiting-Pool Mechanism Fails to Control the Size of Multiple Organelles. *Cell Systems* **4**, 559-567.e14 (2017).
116. Suarez, C. & Kovar, D. R. Internetwork competition for monomers governs actin cytoskeleton organization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**, 799–810 (2016).
117. Rotty, J. D. *et al.* Profilin-1 serves as a gatekeeper for actin assembly by Arp2/3-dependent and –independent pathways. *Dev Cell* **32**, 54–67 (2015).
118. Suarez, C. *et al.* Profilin regulates F-actin network homeostasis by favoring formin over Arp2/3 complex. *Dev. Cell* **32**, 43–53 (2015).
119. Wioland, H. *et al.* ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends. *Curr. Biol.* **27**, 1956-1967.e7 (2017).
120. Tanaka, K. *et al.* Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly. *Nat Commun* **9**, 1860 (2018).
121. Fan, J. *et al.* Structural Basis for pH-mediated Regulation of F-actin Severing by Gelsolin Domain 1. *Scientific Reports* **7**, 1–10 (2017).
122. Huehn, A. *et al.* The actin filament twist changes abruptly at boundaries between bare and cofilin-decorated segments. *J. Biol. Chem.* **293**, 5377–5383 (2018).
123. Gurel, P. S. *et al.* INF2-mediated severing through actin filament encirclement and disruption. *Curr Biol* **24**, 156–164 (2014).

124. Harris, E. S., Li, F. & Higgs, H. N. The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* **279**, 20076–20087 (2004).
125. Pospich, S., Merino, F. & Raunser, S. Structural Effects and Functional Implications of Phalloidin and Jasplakinolide Binding to Actin Filaments. *Structure* **28**, 437-449.e5 (2020).
126. Melak, M., Plessner, M. & Grosse, R. Actin visualization at a glance. *J Cell Sci* **130**, 525–530 (2017).
127. Gunning, P. W., Hardeman, E. C., Lappalainen, P. & Mulvihill, D. P. Tropomyosin – master regulator of actin filament function in the cytoskeleton. *J Cell Sci* **128**, 2965–2974 (2015).
128. Ostrowska-Podhorodecka, Z., Śliwinska, M., Reisler, E. & Moraczewska, J. Tropomyosin isoforms regulate cofilin 1 activity by modulating actin filament conformation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **682**, 108280 (2020).
129. Behrmann, E. *et al.* Structure of the Rigor Actin-Tropomyosin-Myosin Complex. *Cell* **150**, 327–338 (2012).
130. Svitkina, T. The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **10**, (2018).
131. Bryan, J., Edwards, R., Matsudaira, P., Otto, J. & Wulfskuhle, J. Fascin, an echinoid actin-bundling protein, is a homolog of the Drosophila singed gene product. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 9115–9 (1993).
132. Jansen, S. *et al.* Mechanism of Actin Filament Bundling by Fascin. *J Biol Chem* **286**, 30087–30096 (2011).
133. Yang, S. *et al.* Molecular Mechanism of Fascin Function in Filopodial Formation. *J Biol Chem* **288**, 274–284 (2013).
134. Louvet-Vallée, S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling. *Biol. Cell* **92**, 305–316 (2000).

135. Ribeiro, E. de A. *et al.* The Structure and Regulation of Human Muscle α -Actinin. *Cell* **159**, 1447–1460 (2014).
136. Hosseini, K., Sbosny, L., Poser, I. & Fischer-Friedrich, E. Binding dynamics of alpha-actinin-4 in dependence of actin cortex tension. *bioRxiv* 2020.03.11.986935 (2020)
doi:10.1101/2020.03.11.986935.
137. Jin, Y. *et al.* Complete Characterization of Cardiac Myosin Heavy Chain (223 kDa) Enabled by Size-Exclusion Chromatography and Middle-down Mass Spectrometry. *Anal Chem* **89**, 4922–4930 (2017).
138. Wear, M. A., Yamashita, A., Kim, K., Maéda, Y. & Cooper, J. A. How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr. Biol.* **13**, 1531–1537 (2003).
139. Narita, A., Takeda, S., Yamashita, A. & Maéda, Y. Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *EMBO J* **25**, 5626–5633 (2006).
140. Pappas, C. T., Bhattacharya, N., Cooper, J. A. & Gregorio, C. C. Nebulin Interacts with CapZ and Regulates Thin Filament Architecture within the Z-Disc. *Mol Biol Cell* **19**, 1837–1847 (2008).
141. Fowler, V. M., Greenfield, N. J. & Moyer, J. Tropomodulin contains two actin filament pointed end-capping domains. *J. Biol. Chem.* **278**, 40000–40009 (2003).
142. Yamashiro, S., Gokhin, D. S., Kimura, S., Nowak, R. B. & Fowler, V. M. Tropomodulins: pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 337–370 (2012).
143. Dmitrieff, S. & Nédélec, F. Amplification of actin polymerization forces. *J. Cell Biol.* **212**, 763–766 (2016).
144. Harker, A. J. *et al.* Ena/VASP processive elongation is modulated by avidity on actin filaments bundled by the filopodia cross-linker fascin. *Mol Biol Cell* **30**, 851–862 (2019).
145. Higgs, H. N. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 342–353 (2005).

146. Bear, J. E. *et al.* Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* **109**, 509–521 (2002).
147. Shekhar, S., Pernier, J. & Carlier, M.-F. Regulators of actin filament barbed ends at a glance. *J Cell Sci* **129**, 1085–1091 (2016).
148. Shekhar, S. *et al.* Formin and capping protein together embrace the actin filament in a ménage à trois. *Nature Communications* **6**, 8730 (2015).
149. Umeki, N., Hirose, K. & Uyeda, T. Q. P. Cofilin-induced cooperative conformational changes of actin subunits revealed using cofilin-actin fusion protein. *Scientific Reports* **6**, 1–13 (2016).
150. Ngo, K. X., Kodera, N., Katayama, E., Ando, T. & Uyeda, T. Q. Cofilin-induced unidirectional cooperative conformational changes in actin filaments revealed by high-speed atomic force microscopy. *eLife* **4**,.
151. Sharma, S., Grintsevich, E. E., Hsueh, C., Reisler, E. & Gimzewski, J. K. Molecular Cooperativity of Drebrin1-300 Binding and Structural Remodeling of F-Actin. *Biophysical Journal* **103**, 275–283 (2012).
152. Ngo, K. X. *et al.* Allosteric regulation by cooperative conformational changes of actin filaments drives mutually exclusive binding with cofilin and myosin. *Sci Rep* **6**, 35449 (2016).
153. Galkin, V. E., Orlova, A. & Egelman, E. H. Actin filaments as tension sensors. *Curr. Biol.* **22**, R96-101 (2012).
154. Uyeda, T. Q. P., Iwadate, Y., Umeki, N., Nagasaki, A. & Yumura, S. Stretching Actin Filaments within Cells Enhances their Affinity for the Myosin II Motor Domain. *PLOS ONE* **6**, e26200 (2011).
155. Harris, A. R., Jreij, P., Belardi, B., Bausch, A. & Fletcher, D. A. Biased localization of actin binding proteins by actin filament conformation. *bioRxiv* 2020.02.21.959791 (2020)
doi:10.1101/2020.02.21.959791.
156. Kim, D. J. *et al.* Interaction of SPIN90 with the Arp2/3 complex mediates lamellipodia and actin comet tail formation. *J. Biol. Chem.* **281**, 617–625 (2006).

157. Luan, Q., Liu, S.-L., Helgeson, L. A. & Nolen, B. J. Structure of the nucleation-promoting factor SPIN90 bound to the actin filament nucleator Arp2/3 complex. *EMBO J.* **37**, (2018).
158. Jégou, A. *et al.* Individual Actin Filaments in a Microfluidic Flow Reveal the Mechanism of ATP Hydrolysis and Give Insight Into the Properties of Profilin. *PLOS Biology* **9**, e1001161 (2011).
159. Pernier, J., Shekhar, S., Jegou, A., Guichard, B. & Carrier, M.-F. Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility. *Dev. Cell* **36**, 201–214 (2016).
160. McLeod, J. F., Kowalski, M. A. & Haddad, J. G. Interactions among serum vitamin D binding protein, monomeric actin, profilin, and profilactin. *J. Biol. Chem.* **264**, 1260–1267 (1989).
161. Andrianantoandro, E. & Pollard, T. D. Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Molecular Cell* **24**, 13–23 (2006).
162. Cruz, E. M. D. L. & Pollard, T. D. Kinetics and thermodynamics of phalloidin binding to actin filaments from three divergent species. *Biochemistry* (1996) doi:10.1021/bi961047t.
163. De La Cruz, E. M. & Pollard, T. D. Transient kinetic analysis of rhodamine phalloidin binding to actin filaments. *Biochemistry* **33**, 14387–14392 (1994).
164. Winkelman, J. D. *et al.* Fascin- and α -Actinin-Bundled Networks Contain Intrinsic Structural Features that Drive Protein Sorting. *Current Biology* **26**, 2697–2706 (2016).
165. Blanchoin, L., Pollard, T. D. & Mullins, R. D. Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* **10**, 1273–1282 (2000).
166. Zwolak, A., Fujiwara, I., Hammer, J. A. & Tjandra, N. Structural Basis for Capping Protein Sequestration by Myotrophin (V-1). *J Biol Chem* **285**, 25767–25781 (2010).
167. Hansen, S. D. & Mullins, R. D. VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol* **191**, 571–584 (2010).
168. Maiti, S. *et al.* Structure and activity of full-length formin mDia1. *Cytoskeleton (Hoboken)* **69**, 393–405 (2012).

169. Goode, B. & Eck, M. Mechanism and Function of Formins in Control of Actin Assembly. *Annual review of biochemistry* **76**, 593–627 (2007).
170. Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C. & Zigmond, S. H. Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments. *Biochemistry* **42**, 486–496 (2003).
171. Castrillon, D. H. & Wasserman, S. A. diaphanous is required for cytokinesis in Drosophila and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. **11**.
172. Chalkia, D., Nikolaidis, N., Makalowski, W., Klein, J. & Nei, M. Origins and Evolution of the Formin Multigene Family That Is Involved in the Formation of Actin Filaments. *Mol Biol Evol* **25**, 2717–2733 (2008).
173. Goh, W. I. & Ahmed, S. mDia1-3 in mammalian filopodia. *Commun Integr Biol* **5**, 340–344 (2012).
174. Block, J. *et al.* Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *Journal of Microscopy* **231**, 506–517 (2008).
175. Matusek, T. *et al.* Formin Proteins of the DAAM Subfamily Play a Role during Axon Growth. *J. Neurosci.* **28**, 13310–13319 (2008).
176. Jaiswal, R. *et al.* The Formin Daam1 and Fascin Directly Collaborate to Promote Filopodia Formation. *Current Biology* **23**, 1373–1379 (2013).
177. Pfisterer, K. *et al.* FMNL2 regulates dynamics of fascin in filopodia. *Journal of Cell Biology* **219**, (2020).
178. Harris, E. S., Gauvin, T. J., Heimsath, E. G. & Higgs, H. N. Assembly of filopodia by the formin FRL2 (FMNL3). *Cytoskeleton* **67**, 755–772 (2010).
179. Tojkander, S., Gateva, G. & Lappalainen, P. Actin stress fibers – assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* **125**, 1855–1864 (2012).
180. Lammel, U. *et al.* The Drosophila FHOD1-like formin Knittrig acts through Rok to promote stress fiber formation and directed macrophage migration during the cellular immune response. *Development* **141**, 1366–1380 (2014).

181. Innocenti, M. New insights into the formation and the function of lamellipodia and ruffles in mesenchymal cell migration. *Cell Adhesion & Migration* **12**, 401–416 (2018).
182. Kage, F. *et al.* FMNL formins boost lamellipodial force generation. *Nature Communications* **8**, 14832 (2017).
183. Breitsprecher, D. & Goode, B. L. Formins at a glance. *J Cell Sci* **126**, 1–7 (2013).
184. Thompson, S. B. *et al.* Formin-like 1 mediates effector T cell trafficking to inflammatory sites to enable T cell-mediated autoimmunity. *eLife* **9**, e58046 (2020).
185. Lai, S.-L. *et al.* Diaphanous-Related Formin 2 and Profilin I Are Required for Gastrulation Cell Movements. *PLOS ONE* **3**, e3439 (2008).
186. Li, D. *et al.* Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1 (Daam1) is required for heart morphogenesis. *Development* **138**, 303–315 (2011).
187. Zigmond, S. H. *et al.* Formin leaky cap allows elongation in the presence of tight capping proteins. *Curr Biol* **13**, 1820–1823 (2003).
188. Sharma, S. *et al.* Nanostructured self-assembly of inverted formin 2 (INF2) and F-actin-INF2 complexes revealed by atomic force microscopy. *Langmuir* **30**, 7533–7539 (2014).
189. Rivero, F. *et al.* A comparative sequence analysis reveals a common GBD/FH3-FH1-FH2-DAD architecture in formins from Dictyostelium, fungi and metazoa. *BMC Genomics* **6**, 28 (2005).
190. Shimada, A. *et al.* The Core FH2 Domain of Diaphanous-Related Formins Is an Elongated Actin Binding Protein that Inhibits Polymerization. *Molecular Cell* **13**, 511–522 (2004).
191. Xu, Y. *et al.* Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* **116**, 711–723 (2004).
192. Thompson, M. E., Heimsath, E. G., Gauvin, T. J., Higgs, H. N. & Kull, F. J. FMNL3 FH2-actin structure gives insight into formin-mediated actin nucleation and elongation. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 111–118 (2013).
193. Lu, J. *et al.* Structure of the FH2 domain of Daam1: implications for formin regulation of actin assembly. *J Mol Biol* **369**, 1258–1269 (2007).

194. Yamashita, M. *et al.* Crystal structure of human DAAM1 formin homology 2 domain. *Genes to Cells* **12**, 1255–1265 (2007).
195. Cintio, O., Adami, R., Choquet, D. & Grazi, E. On the elastic properties of tetramethylrhodamine F-actin. *Biophys Chem* **92**, 201–207 (2001).
196. Kudryashov, D. S., Phillips, M. & Reisler, E. Formation and Destabilization of Actin Filaments with Tetramethylrhodamine-Modified Actin. *Biophysical Journal* **87**, 1136–1145 (2004).
197. Paul, A. S. & Pollard, T. D. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 606–617 (2009).
198. Cao, L. *et al.* Modulation of formin processivity by profilin and mechanical tension. *eLife* **7**,.
199. Kovar, D. R., Harris, E. S., Mahaffy, R., Higgs, H. N. & Pollard, T. D. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* **124**, 423–435 (2006).
200. Courtemanche, N. & Pollard, T. D. Determinants of Formin Homology 1 (FH1) Domain Function in Actin Filament Elongation by Formins *. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 7812–7820 (2012).
201. Courtemanche, N., Lee, J. Y., Pollard, T. D. & Greene, E. C. Tension modulates actin filament polymerization mediated by formin and profilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 9752–9757 (2013).
202. Vavylonis, D., Kovar, D. R., O’Shaughnessy, B. & Pollard, T. D. Model of Formin-Associated Actin Filament Elongation. *Mol Cell* **21**, 455–466 (2006).
203. Courtemanche, N. Mechanisms of formin-mediated actin assembly and dynamics. *Biophys Rev* **10**, 1553–1569 (2018).
204. Horan, B. G., Zerze, G. H., Kim, Y. C., Vavylonis, D. & Mittal, J. Computational modeling highlights the role of the disordered Formin Homology 1 domain in profilin-actin transfer. *FEBS Lett* **592**, 1804–1816 (2018).

205. Nezami, A., Poy, F., Toms, A., Zheng, W. & Eck, M. J. Crystal structure of a complex between amino and carboxy terminal fragments of mDia1: insights into autoinhibition of diaphanous-related formins. *PLoS One* **5**, (2010).
206. Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Machius, M. & Rosen, M. K. Crystal Structure of the Formin mDia1 in Autoinhibited Conformation. *PLOS ONE* **5**, e12896 (2010).
207. Ramalingam, N. *et al.* Phospholipids regulate localization and activity of mDia1 formin. *Eur J Cell Biol* **89**, 723–732 (2010).
208. Gorelik, R., Yang, C., Kameswaran, V., Dominguez, R. & Svitkina, T. Mechanisms of plasma membrane targeting of formin mDia2 through its amino terminal domains. *Mol Biol Cell* **22**, 189–201 (2011).
209. Gould, C. J. *et al.* The Formin DAD Domain Plays Dual Roles in Autoinhibition and Actin Nucleation. *Current Biology* **21**, 384–390 (2011).
210. Vizcarra, C. L., Bor, B. & Quinlan, M. E. The Role of Formin Tails in Actin Nucleation, Processive Elongation, and Filament Bundling. *J Biol Chem* **289**, 30602–30613 (2014).
211. Harris, E. S., Rouiller, I., Hanein, D. & Higgs, H. N. Mechanistic Differences in Actin Bundling Activity of Two Mammalian Formins, FRL1 and mDia2 *. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 14383–14392 (2006).
212. Michelot, A. *et al.* A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr Biol* **16**, 1924–1930 (2006).
213. Mizuno, H. *et al.* Rotational movement of the formin mDia1 along the double helical strand of an actin filament. *Science* **331**, 80–83 (2011).
214. Shemesh, T., Otomo, T., Rosen, M. K., Bershadsky, A. D. & Kozlov, M. M. A novel mechanism of actin filament processive capping by formin : solution of the rotation paradox. *Journal of Cell Biology* **170**, 889–893 (2005).
215. Aydin, F., Courtemanche, N., Pollard, T. D. & Voth, G. A. Gating mechanisms during actin filament elongation by formins. *eLife* **7**, e37342 (2018).

216. Kovar, D. R. & Pollard, T. D. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *PNAS* **101**, 14725–14730 (2004).
217. Yu, M. *et al.* mDia1 senses both force and torque during F-actin filament polymerization. *Nature Communications* **8**, 1650 (2017).
218. Popp, D. *et al.* Advances in Structural Biology and the Application to Biological Filament Systems. *Bioessays* **40**, e1700213 (2018).
219. Effantin, G. Etudes par cryo-microscopie électronique de la structure de virus: application aux bactériophages Gifsy-2 de Salmonella Typhimurium et T5 d'Escherichia Coli. 191 (2005).
220. Ruska, E. The early development of electron lenses and electron microscopy. *Microsc Acta Suppl* 1–140 (1980).
221. Boekema, E. J., Folea, M. & Kouřil, R. Single particle electron microscopy. *Photosynth Res* **102**, 189–196 (2009).
222. Scarff, C. A., Fuller, M. J. G., Thompson, R. F. & Iadanza, M. G. Variations on Negative Stain Electron Microscopy Methods: Tools for Tackling Challenging Systems. *Journal of Visualized Experiments : JoVE* (2018) doi:10.3791/57199.
223. Adrian, M., Dubochet, J., Lepault, J. & McDowell, A. W. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**, 32–36 (1984).
224. Crewe, A. V., Eggenberger, D. N., Wall, J. & Welter, L. M. Electron Gun Using a Field Emission Source. *Review of Scientific Instruments* **39**, 576–583 (1968).
225. Grigorieff, N. Direct detection pays off for electron cryo-microscopy. *eLife* **2**, e00573 (2013).
226. Scheres, S. H. W. A Bayesian View on Cryo-EM Structure Determination. *J Mol Biol* **415**, 406–418 (2012).
227. Milligan, R. A., Whittaker, M. & Safer, D. Molecular structure of F-actin and location of surface binding sites. *Nature* **348**, 217–221 (1990).
228. Holmes, K. C., Angert, I., Jon Kull, F., Jahn, W. & Schröder, R. R. Electron cryo-microscopy shows how strong binding of myosin to actin releases nucleotide. *Nature* **425**, 423–427 (2003).

229. Chou, S. Z. & Pollard, T. D. *Mechanism of actin polymerization revealed by cryo-EM structures of actin filaments with three different bound nucleotides*. <http://bio-rxiv.org/lookup/doi/10.1101/309534> (2018) doi:10.1101/309534.
230. Chou, S. Z. & Pollard, T. D. Cryo-electron microscopy structures of pyrene-labeled ADP-Pi- and ADP-actin filaments. *Nature Communications* **11**, 5897 (2020).
231. Narita, A. & Maéda, Y. Molecular Determination by Electron Microscopy of the Actin Filament End Structure. *Journal of Molecular Biology* **365**, 480–501 (2007).
232. Shaaban, M., Chowdhury, S. & Nolen, B. J. Cryo-EM reveals the transition of Arp2/3 complex from inactive to nucleation-competent state. *Nature Structural & Molecular Biology* **27**, 1009–1016 (2020).
233. Volkman, N., Page, C., Li, R. & Hanein, D. Three-dimensional reconstructions of actin filaments capped by Arp2/3 complex. *Eur J Cell Biol* **93**, 179–183 (2014).
234. Pinder, J. C., Bray, D. & Gratzler, W. B. Actin polymerisation induced by spectrin. *Nature* **258**, 765–766 (1975).
235. Sept, D., Xu, J., Pollard, T. D. & Andrew McCammon, J. Annealing Accounts for the Length of Actin Filaments Formed by Spontaneous Polymerization. *Biophysical Journal* **77**, 2911–2919 (1999).
236. Carlier, M. F., Pantaloni, D. & Korn, E. D. Steady state length distribution of F-actin under controlled fragmentation and mechanism of length redistribution following fragmentation. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 9987–9991 (1984).
237. Preparation of Uranyl Formate Stain | The Grigorieff Lab. https://grigoriefflab.umass-med.edu/preparation_uranyl_formate_stain.
238. Cryo-electron Microscope Developed for Simultaneous STEM, SEM Imaging and Its Application to Biological Samples | SI NEWS : Hitachi High-Tech GLOBAL. https://www.hitachi-hightech.com/global/sinews/si_report/100201/.

239. Graphene Oxide Grid Preparation. *figshare* /articles/media/Graphene_Oxide_Grid_Preparation/3178669/1 (2016) doi:10.6084/m9.figshare.3178669.v1.
240. Palovcak, E. *et al.* A simple and robust procedure for preparing graphene-oxide cryo-EM grids. *J Struct Biol* **204**, 80–84 (2018).
241. Penczek, P. A. Image Restoration in Cryo-electron Microscopy. *Methods Enzymol* **482**, 35–72 (2010).
242. Yasunaga, T. & Wakabayashi, T. Extensible and object-oriented system Eos supplies a new environment for image analysis of electron micrographs of macromolecules. *J Struct Biol* **116**, 155–160 (1996).
243. Frank, J. *et al.* SPIDER and WEB: Processing and Visualization of Images in 3D Electron Microscopy and Related Fields. *Journal of Structural Biology* **116**, 190–199 (1996).
244. Pettersen, E. F. *et al.* UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605–1612 (2004).
245. Cao, L., Yonis, A., Vaghela, M. *et al.* SPIN90 associates with mDia1 and the Arp2/3 complex to regulate cortical actin organization. *Nat Cell Biol* **22**, 803–814 (2020).
246. Harsimran, K. *et al.* Low-intensity magnetic fields assisted alignment of actin filaments. *Int. J. Biol. Macromol.* **47**, 371-374, (2010).
247. Nans, A. *et al.* Native Ultrastructure of the Red Cell Cytoskeleton by Cryo-Electron Tomography. *Biophys J.* **101** (10), 2341–2350 (2011).
248. Rouiller, I. *et al.* The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* **180** (5), 887–895 (2008).
249. Mizuno, H. *et al.* Helical rotation of the diaphanous-related formin mDia1 generates actin filaments resistant to cofilin. *PNAS* **115** (22), 5000-5007 (2018).

RÉSUMÉ

Les Formines sont des protéines régulatrices clés pour l'assemblage des filaments d'actine dans les cellules. Les formines y stimulent la nucléation et l'élongation rapide de filaments d'actine. L'activité des formines participe ainsi à la génération de structures fonctionnelles et se retrouvent impliquées dans des processus cellulaires fondamentaux comme la migration ou la division cellulaire. À l'échelle moléculaire, les formines constituent des homodimères capables d'interagir avec les extrémités barbées des filaments d'actine en élongation via leurs domaines FH2. Bien que les changements conformationnels impliqués dans cette traque des bouts barbés n'aient jamais été observés directement, des études de biochimie, biophysique et biologie structurale suggèrent que le dimère de FH2 se déplace pas à pas à l'extrémité barbée polymérisante, à travers un équilibre entre deux états dits « fermé » et « ouvert ». Dans l'état « fermé », aucune nouvelle sous-unité d'actine ne peut être ajoutée à l'extrémité barbée tandis que cet événement est permis dans l'état « ouvert ». Plusieurs modèles coexistent et sont en discussion pour décrire la conformation structurale de ces deux états ainsi que la transition de l'un vers l'autre. On peut alors évoquer le modèle de la « marche enjambée » et le modèle du « saut enclenché ».

Mon projet de recherche a eu pour objet de lever les interrogations qui persistent quant à la nature des états conformationnels adoptés par la formine au bout barbé, plus particulièrement pour la formine de mammifère mDia1. Pour cela j'ai utilisé essentiellement des méthodes de biologie structurale par microscopie électronique. Aucune structure en microscopie électronique n'avait été obtenue jusqu'à présent. En effet, rapidement, en présence de formines, de longs filaments d'actine sont générés et ne permettent pas l'obtention d'une densité élevée de courts filaments coiffés de formines, nécessaire à une analyse en particules isolées. Un goulot d'étranglement a donc dû être surmonté afin d'optimiser les échantillons pour une telle analyse. Une approche par sonication a ainsi été choisie. Une première enveloppe 3D du complexe formé par l'extrémité barbée et le dimère de FH2 a pu être déterminée en coloration négative. Cette enveloppe correspond à l'état « ouvert » du modèle de la « marche enjambée ». Après une optimisation du protocole de traitement d'images, une seconde conformation 3D du complexe a pu être déterminée correspondant cette fois à l'état « fermé » du modèle de la « marche enjambée » minoritaire. Une étude à deux dimensions plus poussée a également permis de mettre en évidence des variations conformationnelles au sein même de l'état « ouvert ». Ces observations ont permis de proposer l'hypothèse que, pour des conformations extrêmes, le dimère de FH2 peut se retrouver non plus à encercler l'extrémité barbée mais le corps même des filaments d'actine. La recherche d'une telle configuration a pu être validée par des analyses 2D ainsi qu'une densité 3D préliminaire d'un complexe d'un dimère de FH2 encerclant le corps d'un filament. L'adaptation de mes échantillons vers la cryo-microscopie a été débutée. En particulier, des feuilles d'oxide de graphène ont été déposés sur les grilles de microscopie pour conserver une densité d'extrémités de filaments d'actine suffisante. Une quantité limitée d'extrémités a pu être analysée par classification 2D et 3D confirmant tout au moins la nature non artéfactuelle de l'état ouvert précédemment observé.

Enfin, j'ai également pu contribuer à travers cette thèse à l'étude de l'action synergique de la Formine avec Arp2/3 en présence de Spin90 via la mise en évidence d'un complexe tétramérique.

MOTS CLÉS

Biologie Structurale – Microscopie électronique - Cytosquelette - Formine – Actine

ABSTRACT

Formins are key regulators of the assembly of actin filaments in cells. Formins induce the nucleation and rapid elongation of actin filaments. The activity of formins thus participates in the generation of functional structures such as filopodia, stress fibers or the cytokinetic ring. Hence, formins are involved in fundamental cellular processes such as migration or cell division. At the molecular level, formins are homodimers capable of interacting with the barbed ends of elongating actin filaments via their FH2 domains. The conformational changes involved in tracking the barbed ends have never been directly observed. However, a set of biochemical, biophysical and structural biology studies evidence that the FH2 dimer moves stepwise at the barbed end, following an equilibrium between two states : "closed" and "opened". In the closed state, no new actin subunit can be added to the barbed end, while it is allowed in the opened state. Several models, under discussion, describe the structural nature of these two states and how they alternate. One can then evoke the « stair-stepping » model and the « stepping second » model.

My thesis aims at elucidating the debate about the conformational states adopted by formin at the barbed end, focusing on the mammalian formin mDia1. Our goal was undertaken using electron microscopy. So far, formins bound to the barbed ends of actin has not been described using electron microscopy. Indeed, to pursue single particle analysis by EM, a sufficient density of objects of interest randomly oriented have to be displayed within an image. Formins bound to actin rapidly generate long filaments, preventing the obtention of enough short filaments exhibiting formins at their barbed ends. Thus, a bottleneck had to be overcome to make the samples suitable for single particle structural analysis. A sonication approach was chosen to produce short actin filaments. A first 3D reconstruction of the FH2 dimer-actin complex was obtained from negative stain electron microscopy samples. This envelope corresponds to the open state of the « stair stepping » model. After optimizing the image analysis protocol, a second 3D conformation of the complex could be determined, corresponding to the closed state of the so-called « stair stepping » model, which was minority. A further 2D study also revealed conformational variations within the open state. These observations led to the hypothesis that, for extreme conformations, the FH2 dimer can be found not only at the barbed end but also on the body of the actin filaments. The search for such a configuration could be validated by 2D analyses and a preliminary 3D density of an FH2 dimer complex encircling the body of an actin filament. We have adapted our samples to cryo-electron microscopy. Graphene-Oxide was added to the surface of the EM grids to preserve a sufficient actin filament ends density. A limited quantity of filament ends could be analyzed through 2D and 3D classifications. It thus confirms the non-artefactual nature of the previously observed open state.

In addition, through a collaborative project, I also showed the synergistic action of Formin with Arp2/3 in the presence of Spin90 by highlighting the formation of a tetramer.

KEYWORDS

Structural Biology – Electron Microscopy - Cytoskeleton - Formin – Actin