

L'actine cytosquelettique et ses protéines associées

I. Analyse fondamentale

Abdellatif Fattoum

Chez les eucaryotes, le développement de la plupart des processus biologiques nécessite des remaniements substantiels du cytosquelette d'actine. Le cycle de polymérisation/dépolymérisation des filaments d'actine est contrôlé *in vivo* par des protéines associées à l'actine, en réponse à divers signaux intra- et extra-cellulaires. Ces mécanismes sont au cœur de plusieurs événements fonctionnels de la vie d'une cellule, tels que la locomotion, la cytokinèse et l'apoptose. Des altérations dans l'expression, la localisation, la structure ou la fonction de l'actine elle-même et/ou des protéines qui lui sont associées, peuvent être à l'origine de désordres physiologiques invalidants, parfois fatals.

Le cytosquelette est un réseau cytoplasmique complexe de filaments protéiques doués d'une organisation dynamique, indispensable aux fonctions métaboliques vitales de la cellule. Il est constitué essentiellement de trois types de structures fibrillaires de diamètre et de composition différents: les microfilaments (par exemple l'actine), les microtubules (par exemple la tubuline) et les filaments intermédiaires (par exemple la desmine). Ces polymères sont capables, en dépit de leur localisation dans des secteurs spécifiques, de s'interconnecter pour développer des activités différentes ou complémentaires, de façon coordonnée dans le temps et dans l'espace. La forme et le réarrangement intérieur

de toutes les cellules eucaryotes traduisent l'activité intense qu'effectuent ces structures dans le cadre de leur fonction.

L'actine est le constituant majeur des microfilaments, et fait partie intégrante du cytosquelette sous-membranaire. Elle joue un rôle prépondérant dans la vie de la cellule, et représente un carrefour incontournable, par son abondance (jusqu'à 20 % des protéines myofibrillaires totales et 10 % dans les cellules non musculaires), son ubiquité (elle est présente dans toutes les cellules eucaryotes appartenant au phylum animal et végétal, et dans certaines cellules procaryotes), sa remarquable conservation au cours de l'évolution (plus de 90 % d'homologie entre la levure et l'homme), sa capacité de se poly-

ADRESSE

A. Fattoum : Centre de recherches de biochimie macromoléculaire, CNRS-UPR 1086, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier Cedex 5, France.

mériser et de se dépolymériser, et surtout par les liens spéciaux qu'elle tisse avec une large collection de protéines de liaison dites « associées à l'actine ». Celles-ci sont à leur tour contrôlées par des protéines de phosphorylation, des petites GTPases de la superfamille Ras, des polyphosphoinositides, des ions calcium et d'autres signaux provenant de l'environnement intra- ou extra-cellulaires. Toutes ces propriétés permettent à l'actine d'assumer un rôle fondamental dans la coordination d'un grand nombre de fonctions biologiques aussi diverses que la locomotion et la contractilité, le contrôle de la morphologie cellulaire, l'adhérence au substrat, l'établissement et le maintien de la polarité, l'expansion des pseudopodes, le guidage axonal, l'endocytose, les invasions bactériennes entérocytaires, l'agrégation plaquettaire, le rassemblement des récepteurs membranaires, la cytokinèse, la fécondation et le développement embryonnaire (gastrulation, neurulation) (figure 1).

Ce chapitre sera consacré aux propriétés intrinsèques de l'actine et au rôle que jouent des groupes de protéines et de ligands spécifiques dans la dynamique de l'assemblage du système microfilamentaire. Dans l'article suivant (p. 198), nous décrirons l'implication directe ou indirecte de cette molécule dans une myriade d'aspects pathobiochimiques et pathogéniques de maladies infectieuses, tumorales, endocriniennes, sensorielles, neuro-dégénératives et vasculaires.

Le monomère d'actine

Structure primaire

Découverte au début des années 40 [1], l'actine est plus que jamais d'actualité, et les travaux la concernant produisent aujourd'hui 2000 à 3000 nouvelles références par an, comme l'indique la consultation de la base de données Medline. Il s'agit d'une protéine globulaire, appelée « actine G », constituée d'une chaîne polypeptidique unique de 375 acides aminés et dont la séquence a été déterminée il y a une trentaine d'années (figure 2). Elle apparaît comme l'une des protéines les mieux conservées au cours de la phylogé-

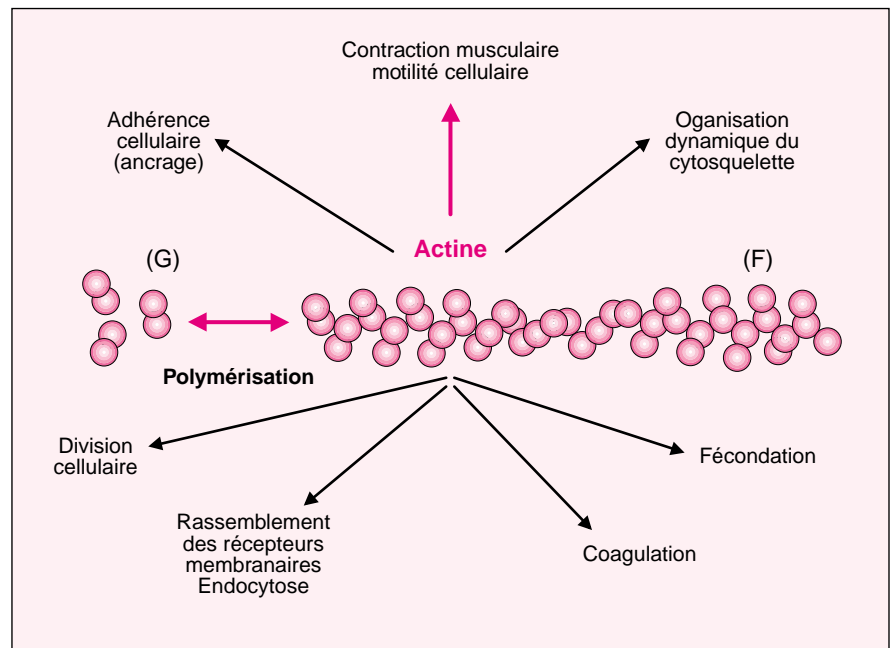


Figure 1. *L'actine est un carrefour cellulaire incontournable. Ubiquitaire et très conservé, le monomère de la protéine (G bilobée) se polymérise en produisant des filaments d'actine (F). Ceux-ci participent à de nombreux processus biologiques vitaux tels que la motilité cellulaire, la contraction musculaire et la mise en place du cytosquelette.*

nèse. Des protéines homologues à l'actine ont été récemment identifiées dans des systèmes procaryotes comme les cyanobactéries, dont l'origine remonte à 3,5 milliards d'années environ.

Il existe différentes isoformes d'actines codées par des gènes structurellement très proches qui auraient évolué à partir d'un gène ancestral commun. Leurs séquences primaires sont similaires à plus de 90 %. La plupart des mutations observées touchent presque exclusivement un nombre restreint d'acides aminés situés du côté NH₂-terminal, très anionique, de la chaîne polypeptidique. Chez les vertébrés supérieurs, on distingue six isoformes qui ne diffèrent que par quelques acides aminés et s'expriment d'une façon indépendante de l'espèce, mais spécifique du tissu cellulaire et du stade de développement. Il s'agit des quatre isoformes musculaires (α squelettique et α cardiaque pour le muscle strié, α vasculaire et α viscérale pour le muscle lisse) et des deux isoformes cytoplasmiques non musculaires (actines β et γ) [2].

Structure atomique

La forte tendance de l'actine-G à polymériser à haute force ionique a longtemps freiné les approches cristallographiques du monomère seul. C'est en 1990 [3] que les premiers cristaux satisfaisant les critères de résolution optimale ont pu être obtenus (2.5 Å à 3 Å) par diffraction aux rayons X d'un complexe dans lequel la polymérisation de l'actine est bloquée par addition de DNase I, de profiline ou du segment 1 de la gelsoline. L'actine peut être inscrite dans un parallélepède rectangle de dimensions 35 Å x 55 Å x 55 Å. Elle est composée d'un petit et d'un grand domaine, le premier renfermant le sous-domaine 1 (résidus 1-32, 70-144 et 338-375) et le sous-domaine 2 (résidus 33-69), tandis que le second est constitué du sous-domaine 3 (résidus 145-180 et 270-337) et du sous-domaine 4 (résidus 181-269). Le petit domaine contient les deux extrémités amino- et carboxy-terminales, et les principaux sites d'interaction avec les protéines de liaison. La crevasse située entre les deux domaines est le lieu de fixation du



Figure 2. Séquence primaire de l'actine du muscle squelettique. Les sous-domaines de la molécule sont représentés sur des fonds colorés : rouge pour le sous-domaine 1, bleu pour le sous-domaine 2, vert pour le sous-domaine 3 et violet pour le sous-domaine 4. Les astérisques indiquent les résidus non conservés dans les différentes isoformes présentes chez les mammifères.

nucléotide et du cation divalent, indispensables à la stabilité de la molécule (figure 3A, B).

Le polymère d'actine

La polymérisation est une propriété intrinsèque de l'actine qui, dans la même cellule et au même moment, peut exister sous deux formes interconvertibles, en équilibre dynamique : une forme monomérique globulaire ou actine-G, et une forme polymérique filamenteuse ou actine-F. Ce sont des forces électrostatiques et hydrophobes qui contribuent à la formation de ces polymères homogènes, non covalents, de structure hélicoïdale, d'environ 10 nm de diamètre et de plusieurs microns de longueur. Le filament d'actine est doué d'une grande flexibilité (300 fois plus flexible qu'un microtubule) et d'une capacité de torsion qui lui est nécessaire pour former des structures ordonnées. Sa décoration en têtes de flèche symétriques par le sous-fragment S-1 de la myosine révèle la polarisation d'un polymère ayant deux extrémités, l'une à croissance rapide, appelée (+) ou barbue, l'autre à croissance lente, appelée (-) ou pointue. L'assemblage de l'actine purifiée en filaments est une succession de trois

à quatre étapes fondamentales plus ou moins lentes, sensibles à la force ionique (K^+ , $Na^+ = 10$ à 100 mM), au sel divalent (Mg^{2+} , $Ca^{2+} = 1$ à 2 mM), à la nature du ligand nucléotidique (ATP ou ADP) et à la concentration ($0,1$ à $1 \mu M$) dite critique et notée Cc de l'actine-G. Au-dessous de cette valeur, la protéine est incapable de polymériser, même dans le cas où toutes les autres conditions physiologiques sont optimales. *In vivo*, ces différents paramètres varient peu, et la localisation, l'initiation et la vitesse de polymérisation sont contrôlées principalement par de nombreuses protéines liant l'actine, elles-mêmes sous le contrôle de multiples stimulus enclenchés à la surface de la cellule [4]. L'association-dissociation des monomères d'actine contrôlée par des protéines et ligands spécifiques est au cœur de la plasticité du cytosquelette microfilamenteux et de la motilité cellulaire.

Activation du monomère

La présence de sel, d'ATP et d'une concentration protéique minimale (Cc), entraîne des changements locaux dans la conformation du monomère d'actine, qui entre très rapidement dans un état activé et

acquiert des propriétés structurales différentes, lui conférant notamment une plus grande résistance à la protéolyse. Cette nouvelle entité protéique possède désormais les compétences nécessaires pour le déclenchement du processus de polymérisation.

Nucléation du monomère

Relativement lente, la phase de nucléation est essentielle et dépend beaucoup de la concentration en actine. Elle représente l'étape limitante d'initiation avec association des monomères d'actine activés et formation de noyaux constitués de 2, 3 ou 4 monomères en équilibre rapide. La vitesse de nucléation est beaucoup plus élevée en présence d'ATP et de Mg^{2+} qu'en présence d'ADP et de Ca^{2+} .

Allongement du filament et équilibre

C'est l'étape la plus rapide avec association des monomères d'actine aux deux extrémités du centre de nucléation ou du filament en cours de formation. La vitesse de croissance du polymère d'actine obéit à des constantes cinétiques différentes selon que l'on considère un côté ou l'autre du filament. Elle est 5 à 10 fois plus rapide à l'extrémité barbue qu'à l'extrémité pointue, quel que soit le nucléotide lié à l'actine. *In vivo*, l'actine est sous la forme G-ATP et sa polymérisation s'accompagne de l'hydrolyse différée de l'ATP (lié à chaque sous-unité monomérique) en ADP et Pi. La libération du γ -phosphate déstabilise les interactions actine-actine, entraînant une dissociation plus rapide à l'extrémité pointue du filament (riche en ADP) qu'à son extrémité barbue (riche en ATP). Le filament mûr ou actine-F est constitué essentiellement d'actine-F-ADP à l'exception de la partie barbue qui arbore des sous-unités F-ADP.Pi [5] (figure 4). La force thermodynamique de l'hydrolyse de l'ATP engendre une sorte de manège moléculaire continu ou « tapis roulant » (*treadmilling*). Ce phénomène a lieu *in vitro* et *in vivo* et assure la stabilité et la relative constance des longueurs des filaments d'actine à l'état d'équilibre. Il est à la base de la motilité cellulaire. Les filaments s'allongent à l'une des deux extrémités et raccourcissent

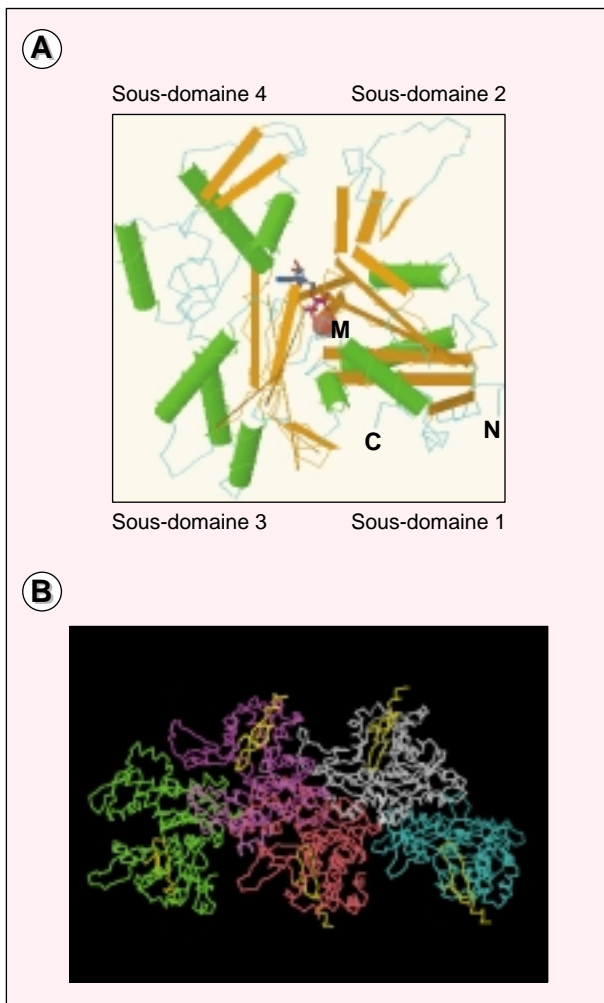


Figure 3. **A. Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de l'actine squelettique.** Au centre, à la jonction des 4 sous-domaines, M indique le cation métallique non loin du nucléotide coloré en rouge et en bleu. Les structures en hélice α ou en feuillet β sont colorées respectivement en vert et en marron. N et C représentent les extrémités terminales de la molécule. **B. Modèle atomique montrant l'organisation des monomères d'actine dans le filament.** Chaque monomère établit avec les quatre sous-unités voisines des interactions longitudinales et transversales. Le sous-domaine 1 est le plus exposé à l'extérieur. La séquence amino-terminale (1-28) de chacune de ses sous-unités est colorée en jaune.

Le processus de polymérisation de l'actine peut aussi être influencé par des substances naturelles comme les cytochalasines qui bloquent l'extrémité à croissance rapide du filament et inhibent la migration cellulaire, ou, au contraire, la phalloïdine qui renforce les contacts inter-monomères et stabilise le filament. De plus, des composants marins (latrunculine, jasplakinolide) ayant pour cible privilégiée la molécule d'actine, se sont avérés être des agents chimiothérapeutiques potentiellement actifs dans le traitement des cancers [7]. La polymérisation peut aussi être fortement perturbée ou inhibée par des facteurs tels que l'ADP-ribosylation, un processus physiopathologique qui résulte de l'action de la toxine C2 de *Clostridium botulinum* sur le monomère d'actine [8]. D'autres facteurs comme l'exoenzyme C3 ADP-ribosyltransférase, ou encore les toxines A et B de *Clostridium difficile*, catalysent, lors d'une étape post-traductionnelle, la glycosylation des petites protéines G à des sites spécifiques. L'inactivation de ces protéines désorganise le remodelage supposé être extensif et permanent du cytosquelette d'actine au cours de la morphogenèse et perturbe profondément la motilité cellulaire. Les petites GTPases et plus particulièrement les prototypes Cdc42, Rac, Rho sont des triphosphatases reliées à la superfamille Ras qui fixent et hydrolysent les nucléotides guanyliques et qui sont l'objet d'un intérêt croissant, depuis une dizaine d'années, en raison des effets remarquables qu'elles exercent sur diverses fonctions biologiques dont celle du cytosquelette microfilamenteux. En réponse à des stimulus [différents agonistes interagissant avec les récepteurs membranaires: facteurs de croissance comme l'EGF (*epidermal growth factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*), ou encore la bradykinine, l'acide lysophosphatidique ou l'insuline...], ces acteurs de la signalisation cellulaire se sont révélés être des régulateurs primordiaux dans la réorganisation rapide de l'actine en contribuant à la formation, à l'assemblage et au maintien des filopodes, des lamellipodes, des plaques d'adhérence focales et des fibres de tension, un ensemble de structures indispensables aux mouvements unidirectionnels et synchronisés des cellules vivantes [9, 10]. La cellule peut à tout moment

simultanément à l'autre. Le niveau d'équilibre est atteint lorsque la vitesse de croissance du polymère devient nulle. Au terme de leur formation, les filaments continuent à échanger lentement les sous-unités de leurs extrémités avec les monomères libres dont la concentration doit être égale à la Cc. De plus, selon un mécanisme de remodelage ou *annealing* fondé sur la diffusion et la collision aléatoire, les filaments les plus longs peuvent se briser et s'associer entre eux bout à bout, sans changement apparent de volume.

Protéines et ligands affectant les propriétés de l'actine

Dans les cellules non musculaires, la polymérisation de l'actine est un phénomène physiologique réversible qui se situe au centre de tous les changements et réarrangements observés au

sein du cytosquelette dont les réseaux fibrillaires peuvent, selon les besoins immédiats de la cellule, se désagréger ou se développer en quelques secondes. La formidable capacité de reconnaissance que possède l'actine, qu'elle soit sous sa forme G ou F, vis-à-vis d'une soixantaine de protéines différentes, constitue un moyen biologique unique dans sa diversité pour contrôler, en réponse à des signaux externes, l'association/dissociation du filament d'actine, sa localisation cellulaire, son renouvellement, son organisation en faisceaux ou en réseaux tridimensionnels, et son ancrage à des structures membranaires. Ces protéines sont généralement répertoriées en 4 à 6 grands groupes selon leur mode de liaison *in vitro* à l'actine. On distingue des protéines de séquestration, de coiffe et/ou de fragmentation, de pontage et d'ancrage [6] (voir *Tableau 1* de l'article suivant, p. 200).

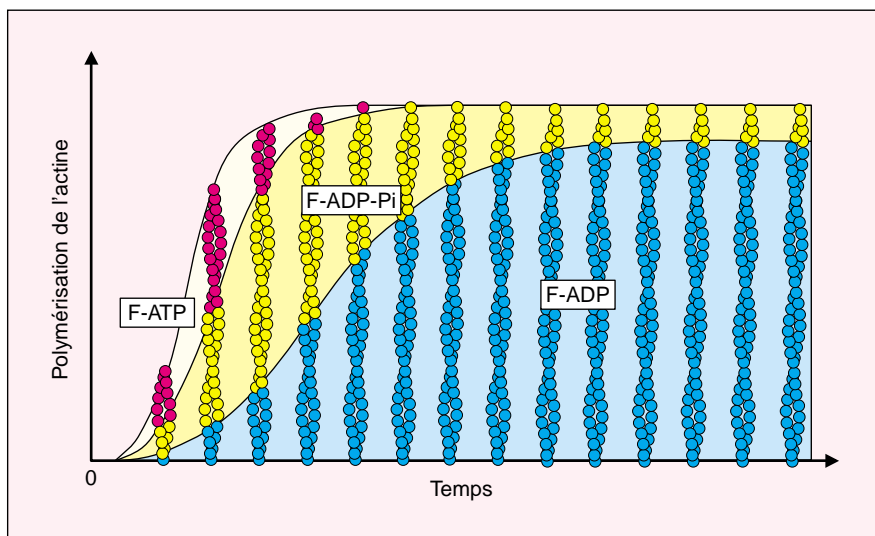


Figure 4. *Évolution du nucléotide lié aux sous-unités d'actine d'un filament au cours de sa polymérisation.* La vitesse d'ajout de sous-unités à un filament augmente en fonction de la concentration d'actine G libre. Initialement, lorsque la concentration d'actine G est élevée, les filaments croissent rapidement avec des sous-unités terminales F-ATP (en rouge); durant la polymérisation, l'actine G diminue, la vitesse d'allongement devient inférieure à la vitesse d'hydrolyse du nucléotide lié et des sous-unités F-ADP.Pi s'accumulent (en jaune); à l'état stationnaire, le filament est composé de sous-unités F-ADP (en bleu) à l'exception de l'extrémité barbue arborant une petite coiffe transitoire de F-ADP.Pi (d'après Carlier 1991).

recevoir de nouveaux signaux qui, une fois intégrés, sont responsables du changement de la direction prise par celle-ci. La signalisation cellulaire et la polymérisation localisée des filaments d'actine sont donc intimement liées, la première contrôlant l'activité de la deuxième. L'inactivation de ces protéines de la famille Rho, testée dans des systèmes cellulaires expérimentaux, bloque la réponse aux différents stimulus extracellulaires, désorganise le cytosquelette en dépolymérisant les filaments d'actine, et induit la perte de la polarité de la cellule, confirmant la position critique qu'occupent ces intermédiaires au sein des différentes voies de transmission du signal qui contrôlent la transcription du gène, la régulation des activités corticales au cours de la division cellulaire, l'évolution des tumeurs cancéreuses et l'apoptose ■

RÉFÉRENCES

1. Straub FB. Actin. Studies from the Institute of Medical Chemistry, University of Szeged 1942; 2: 3-15.
2. Shterline P, Clayton J, Sparrow J. Actin. In protein profile. *Academic Press* 1995; 3: 1-116.

m/s n°2, vol. 17, février 2001

3. Kabsch W, Mannherz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC. Atomic structure of the actin-Dnase I complex. *Nature* 1990; 347: 37-44.

4. Chen H, Berstein BW, Bamberg JR. Regulating actin-filament dynamics *in vivo*. *TIBS* 2000; 25: 19-23.

5. Carlier MF. Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* 1991; 266: 1-14.

Remerciements

Je tiens à remercier tous mes étudiants, collègues et amis avec lesquels j'ai partagé des moments mémorables au cours de nos travaux sur les interactions des protéines et leurs régulations dans le système contractile. D'abord au collège de France à Paris (Annie, Claude, Elizabeth, Françoise, Louise Anne, Malou, Ridha), puis à la Faculté de Médecine de Harvard à Boston, USA (John, Helen, Tom), enfin au CRBM du CNRS à Montpellier (Aghleb, Caroline, Catherine, Grégory, Jean-François, Mohammed). Mes remerciements vont également aux Professeurs J. Demaille et M. Dorée pour l'intérêt constant qu'ils portent à notre travail, au Docteur C. Roustan pour ses commentaires sur le manuscrit et son aide à la réalisation de l'iconographie, à l'INSERM, au CNRS et à l'AFM pour leur soutien financier.

6. Maciver SK. Microfilament organisation and actin-binding proteins. The cytoskeleton, Volume 1. Structure and assembly. *JAI Press Inc* 1995; 1-45.

7. Jordan MA, Wilson L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Curr Op Cell Biology* 1998; 10: 123-30.

8. Aktories K. ADP-ribozylation of actin. *J Muscle Res Cell Motil* 1990; 11: 95-7.

9. Aspenström P. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1999; 246: 20-5.

10. Stossel TP. On the crawling of animal cells. *Science* 1993; 260: 1086-94.

Summary

Actin and actin-binding proteins I. The fundamental analysis

Actin is one of the most abundant and highly conserved proteins on earth. Its transient polymerization and depolymerization are essential during changes in cell shape and locomotion. In most eucaryotic cell types, actin is represented either in a monomeric (G actin) or in a polymeric form (F-actin). The filament turnover cycle occurs *in vitro* (with pure actin) and *in vivo*. Subsequently, it is thought to proceed through the addition of an ATP-monomer to the barbed end of the filament, the hydrolysis of ATP, the release of Pi, and the dissociation of the ADP-monomer from the pointed end. The rate-limiting step in actin polymerization is nucleation, which is the assembly of the first subunit to generate a new filament. The plus (barbed) end grows five to ten times faster than the minus (pointed) end. Actin has an active role in many cellular functions and is thought to be involved as both a target and mediator of signal transduction through the Rho family of small GTPases. It is also dynamically regulated by a complex army of proteins called Actin-binding proteins.

TIRÉS À PART

A. Fattoum.