

FAITS MARQUANTS 2022



INSTITUT
FRESNEL

*Institut Fresnel – UMR 7249 – Faculté des Sciences St-Jérôme
Avenue Escadrille Normandie-Niemen - 13013 Marseille - FRANCE*

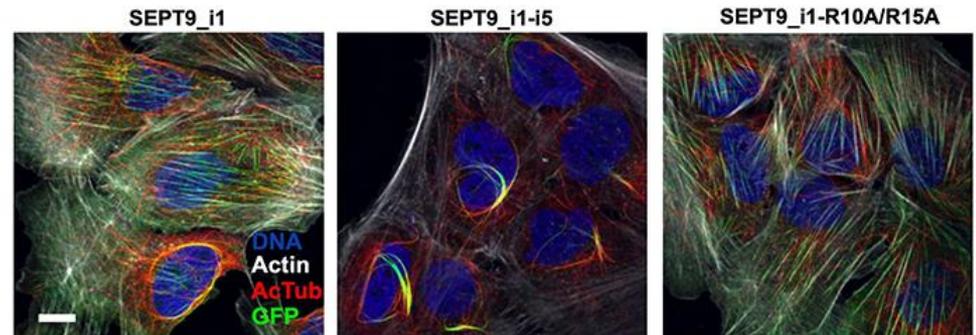
www.fresnel.fr

Un motif nouvellement identifié explique l'association préférentielle septine-microtubules

L'identification d'un nouveau motif permet d'élucider les interactions entre les septines et les microtubules, 2 éléments essentiels du cytosquelette animal

Les septines sont une famille de petites protéines de liaison au GTP hautement conservées qui s'associent aux membranes cellulaires, aux filaments d'actine et aux microtubules, et sont de plus en plus reconnues comme des régulateurs centraux de l'architecture cellulaire. Parmi les treize septines présentes dans les cellules de mammifères, la septine 9 (SEPT9) permet uniquement des interactions avec les microtubules, mais il a été difficile de définir la base moléculaire qui conduit à cette liaison préférentielle. Un travail de collaboration entre des biologistes du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille et de l'Institut Fresnel et des biophysiciens de la TU Delft (Kuzmić et al. 2022) abordent ce problème en combinant des études fonctionnelles intracellulaires avec des essais de reconstitution in vitro. Les auteurs montrent que la liaison des septines aux microtubules nécessite un motif de type MAP (microtubule-associated protein) spécifique à l'isoforme SEPT9_i1, et que seuls les octamères de septines hébergeant cette isoforme se lient spécifiquement aux microtubules dynamiques et ralentissent leur vitesse de dépolymérisation. Les auteurs désignent également un certain nombre de variantes génétiques spécifiques qui modulent l'interaction entre les microtubules et SEPT9_i1, y compris des mutations similaires à celles que l'on trouve fréquemment chez les patients atteints de l'amyotrophie névralgique héréditaire. Il est intéressant de noter que la relocalisation des octamères de septine des fibres de stress aux microtubules entraîne la perte d'une partie de ces fibres dans les cellules adhérentes et modifie leur tension interne. Ces résultats apportent un nouvel éclairage sur les déterminants moléculaires de l'association des septines avec l'actine et les microtubules et sur leurs conséquences sur l'organisation du cytosquelette.

Figures : Imagerie par fluorescence de la distribution des septines dans les cellules animales. Gauche, la septine SEPT9_i1 s'associe à la fois à l'actine et aux microtubules. Milieu, Une septine hybride portant le motif nouvellement identifié s'associe exclusivement aux microtubules. Droit, deux mutations ponctuelles dans le motif nouvellement identifié entraîne la perte de l'association de la septine SEPT9_i1 avec les microtubules.



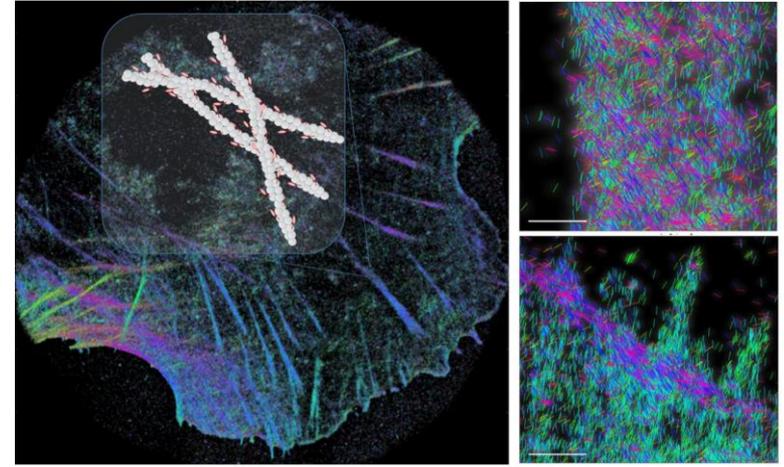
Références : Kuzmić, M., Castro-Linares, G., Fialová, J., Iv, F., Salaün, D., Llewellyn, A., Gomes, A., Belhabib, M., Liu, Y., Asano, K., Rodrigues, M., Isnardon, D., Tachibana, T., Koenderink, G., Badache, A., Mavrakakis, M. et Pascal Verdier-Pinard ; *"Septin-microtubule association via a motif unique to the isoform 1 of septin 9 tunes stress fibers"*

Révéler l'organisation de l'actine dans les Cellules par l'orientation de molécules isolées

Une nouvelle approche d'imagerie polarisée à base de localisation de molécules isolées fluorescente permet de révéler l'organisation de l'actine dans les cellules aux échelles nanométriques.

Imager la manière dont sont orientées les protéines en 3D dans une cellule, tout en les positionnant à des dizaines de nanomètre de précision, est un défi pour l'imagerie optique. C'est pourtant ce qui permettrait de comprendre les processus qui relient les conformations et organisation des protéines, aux fonctions qu'elles exercent dans les cellules. Alors que quelques méthodes émergent aujourd'hui pour mesurer à la fois la position et l'orientation de molécules uniques fluorescentes dans des échantillons *in vitro*, ces approches sont encore limitées pour l'utilisation dans des environnements complexes comme les cellules, où les conditions de signal à bruit et de fond de fluorescence sont délicates. Une des raisons principales est que ces approches se basent sur un codage de l'information de l'orientation moléculaire dans la forme de l'image de chaque molécule, forme qui peut dépendre fortement des aberrations optiques produites dans le microscope et par l'échantillon.

Les chercheurs de l'équipe MOSAIC de l'Institut Fresnel sont parvenus à mettre en place une stratégie basée uniquement sur une mesure de rapports d'intensités d'une même molécule, projetée sur quatre directions de polarisation. En concevant un système de détection optique de telle manière que ces signaux sont peu dépendants des paramètres qui pourraient biaiser les données, les chercheurs ont montré la possibilité de remonter à l'information de l'orientation de molécules marquant l'actine, un filament du cytosquelette des cellules. Ces filaments, par leur densité, sont parfois impossible à isoler sur une image, même super-résolue. Grâce à cette détection polarisée, il a été possible de mettre en évidence la manière dont les filaments s'organisent avec des orientations soit fortement parallèles, comme dans les fibres de stress, soit dans des distributions beaucoup plus complexes mais spécifiques comme dans le front de migration des cellules où l'actine est agencée de manière singulière. Ces images, bien qu'étant mesurées dans des conditions optiques donc compatible avec le vivant, se rapprochent d'une imagerie structurale, révélant la manière dont les protéines s'organisent à des échelles nanométriques.



Références : V C. Rimoli, C. Valades Cruz, V. Curcio, M. Mavrakis, S. Brasselet ; *"4polar-STORM polarized super-resolution imaging of actin filament organization in cells"*

Nature Communications 13, 301 (2022)

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-27966-w>

Contacts chercheurs :

Sophie Brasselet et Manos Mavrakis, équipe MOSAIC

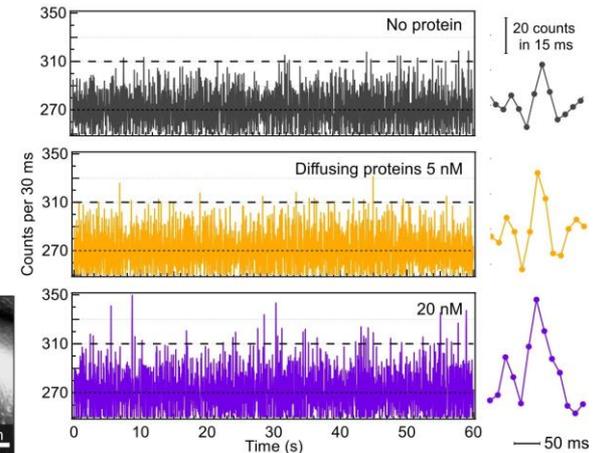
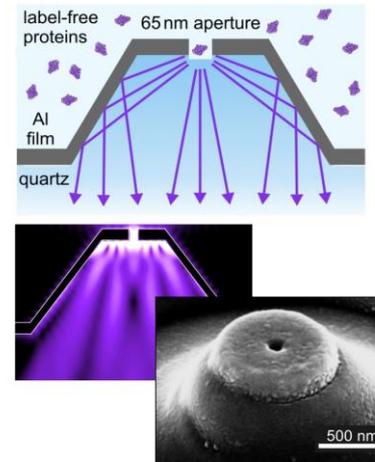
Voir l'émission intrinsèque d'une seule protéine avec des antennes optiques ultraviolettes

Une nouvelle plate-forme d'antenne optique pour la détection sans marquage de protéines uniques dans l'UV avec des résolutions et une sensibilité sans précédent

Les L'un des objectifs ultimes de la biologie moléculaire est d'observer le fonctionnement des protéines individuelles dans leur état natif. Cependant, l'approche courante actuelle de la fluorescence à molécule unique repose sur l'introduction de marqueurs fluorescents externes qui peuvent entraîner des problèmes affectant les résultats expérimentaux. Comme alternative au marquage par fluorescence, travailler dans l'ultraviolet est séduisant pour profiter de l'autofluorescence naturellement présente dans la grande majorité des protéines. Cependant, les protéines émettent des ordres de grandeur moins que les colorants fluorescents conventionnels, de sorte que la détection UV d'une seule protéine est restée un défi jusqu'à présent.

Dans une publication récente dans Nature Communications, des chercheurs de l'Institut Fresnel présentent une nouvelle plate-forme d'antenne optique pour la détection sans marquage de protéines uniques dans l'UV avec des résolutions et une sensibilité sans précédent. L'approche combine (i) un réflecteur conique pour la collecte de fluorescence à des angles ultra-élevés avec (ii) une nano-ouverture métallique pour l'amélioration de la fluorescence et la réduction du bruit de fond. Pour démontrer expérimentalement l'utilité de notre approche et son application directe aux défis biochimiques, la détection en temps réel de l'autofluorescence UV à partir de protéines uniques immobilisées et diffusantes est démontrée, ainsi que des expériences surveillant la dénaturation d'une protéine. Fait important pour les applications biochimiques, toutes les expériences sur une seule molécule sont réalisées sur des protéines sans marquage et dans des conditions physiologiques, ce qui est unique dans ce domaine scientifique.

Les antennes optiques UV ouvrent une nouvelle forme de spectroscopie permettant l'étude de protéines individuelles dans leur état natif et en temps réel. Ce travail fournit un saut vers la conception d'essais biochimiques avec une résolution de protéine unique sans marquage ainsi que des nanosources optiques brillantes.



Figures : Antenne optique pour voir des protéines individuelles sans marquage dans l'ultraviolet.

Références : A. Barulin, P. Roy, J.-B. Claude, J. Wenger ; "Ultraviolet optical horn antennas for label-free detection of single proteins"

Nature Communications, 5 avril 2022

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-29546-4>

Contact chercheur :

Jérôme Wenger, équipe MOSAÏC

La vie à haute température observée sous chauffage laser

Au fond des océans ou près des sources volcaniques, des micro-organismes ont su évoluer pour apprendre à vivre jusqu'à des températures extrêmes, même au-delà de 100°C. Observer ces organismes hyperthermophiles à de si hautes températures sous un microscope optique est une gageure. C'est pourtant la seule façon d'étudier leur métabolisme et leurs interactions.

Des chercheurs de l'Institut Fresnel (CNRS, Marseille) et de l'Institut de Biologie Intégrative de la Cellule (I2CB, université Paris-Saclay, Gif-sur-Yvette) ont mis au point une technique simple qui permet d'observer des hyperthermophiles vivre par microscopie optique haute résolution. La technique consiste à cultiver ces micro-organismes sur une lamelle de verre couvertes de nanoparticules d'or, et chauffer ces nanoparticules par une illumination laser. L'absorption intense des nanoparticules permet d'atteindre des températures arbitrairement élevées avec de faibles puissances laser. Cette technique est applicable sur n'importe quel microscope optique utilisé en biologie, et ne requiert pas l'implémentation d'un caisson chauffant. Elle nécessite juste l'utilisation d'une technique de microscopie de phase quantitative, pour cartographier la température aux petites échelles.

Dans un article publié dans Nature Communications, les chercheurs de l'institut Fresnel et de l'I2BC expliquent comment ils ont pu observer pour la première fois la bactérie *Geobacillus stearothermophilus* se diviser, nager, germiner, et étudier précisément sa vitesse de croissance en fonction de la température.

Ces travaux ouvrent la voie à l'étude de micro-organismes hyperthermophiles par une plus large communauté de biologistes, notamment celle de la bio-imagerie optique, en plein essor aujourd'hui, animée par le développement constant de nouvelles techniques de microscopies optiques permettant d'étudier le vivant à des échelles qui avoisinent le nanomètre, et en 3 dimensions.

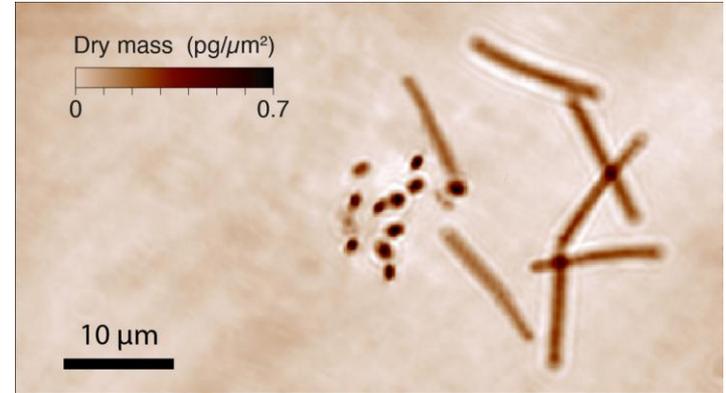


Figure : Germination de bactéries thermophiles (*Geobacillus stearothermophilus*) à partir de spores micrométriques observée par microscopie de front d'onde, et activée par chauffage laser de nanoparticules d'or à 58°C

Références : Céline Molinaro, Maëlle Bénéfice, Aurore Gorlas, Violette Da Cunha, Hadrien M. L. Robert, Ryan Catchpole, Laurent Gallais, Patrick Forterre et Guillaume Baffou ; *"Life at high temperature observed in vitro upon laser heating of gold nanoparticles"*

Nature Communications 13, 5342 (2022)
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33074-6>

Contact chercheur :

Guillaume Baffou, équipe MOSAÏC

Une combinaison d'essais acellulaires et d'études en cellules permet de mieux comprendre l'organisation et la fonction des septines humaines

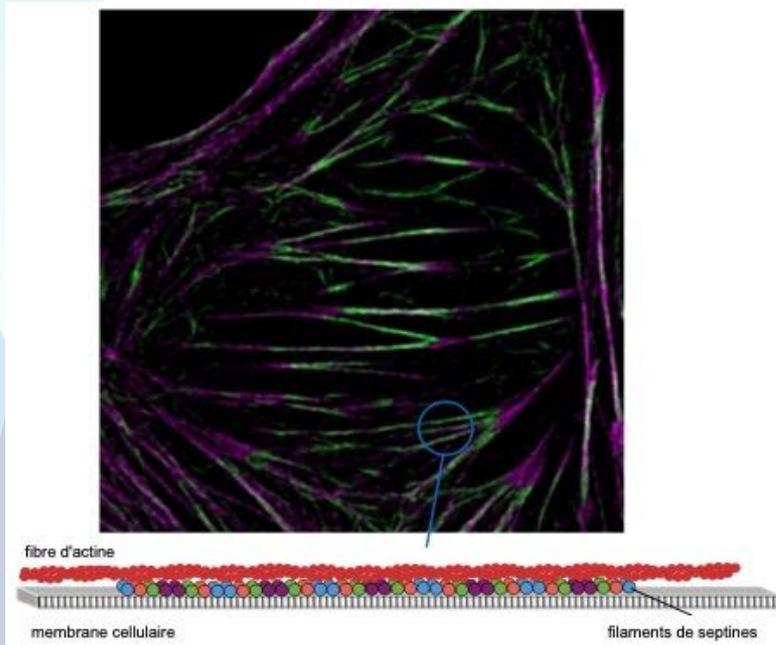


Figure : Image de fluorescence de septines (vert) décorant des fibres d'actine (magenta) dans des cellules adhérentes humaines. Le schéma en bas montre le modèle de travail basé sur les résultats de cette étude. Les septines s'organisent en filaments qui ancrent les fibres d'actine à la membrane cellulaire.

Contact chercheur :

Manos Mavrakis, équipe MOSAÏC

Les septines constituent une famille de protéines impliquées dans un large spectre de processus biologiques, de la division cellulaire à la motilité cellulaire et à la morphogenèse des tissus animaux. En physiopathologie humaine, un rôle des septines a été établi dans les neuropathies, l'infertilité et la tumorigenèse. Malgré leurs rôles essentiels, la façon dont les septines humaines s'organisent et fonctionnent dans les cellules reste mal comprise. Un travail collaboratif entre des biologistes de l'Institut Fresnel et du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT) et des physiciens de l'Institut Fresnel et de TU Delft (Martins et al. 2022) aborde cette question en combinant des études cellulaires avec des essais de reconstitution in vitro. En développant un système rapporteur basé sur la fluorescence comme signature moléculaire des interactions spécifiques septine-septine, les auteurs montrent que toutes les septines décorant les fibres d'actine dans les cellules s'organisent en filaments. Empêcher la polymérisation des septines compromet l'intégrité des fibres d'actine et réduit la rigidité des cellules. Des mesures de distance à résolution nanométrique ont également montré que les filaments de septine sont liés à la membrane. Enfin, des essais de reconstitution ont montré que les filaments de septine ancrent l'actine à la membrane. Cette étude montre que l'organisation des septines en filaments est essentielle à leur fonction d'ancrage et de stabilisation des filaments d'actine à la membrane plasmique..

Références : Carla Silva Martins, Cyntia Taveneau, Gerard Castro-Linares, Mikhail Baibakov, Nicolas Buzhinsky, Mar Eroles, Violeta Milanović, Shizue Omi, Jean-Denis Pedelacq, François Iv, Léa Bouillard, Alex Llewellyn, Maxime Gomes, Mayssa Belhabib, Mira Kuzmić, Pascal Verdier-Pinard, Stacey Lee, Ali Badache, Sanjay Kumar, Cristel Chandre, Sophie Brasselet, Felix Rico, Olivier Rossier, Gijsje H. Koenderink, Jerome Wenger, Stéphanie Cabantous, Manos Mavrakis ; *"Human septins organize as octamer-based filaments and mediate actin-membrane anchoring in cells"*

Journal of Cell Biology, 2022

<https://doi.org/10.1083/jcb.202203016>