



**HAL**  
open science

## Dynamique des réseaux d'actine d'architecture contrôlée.

Anne-Cécile Reymann

► **To cite this version:**

Anne-Cécile Reymann. Dynamique des réseaux d'actine d'architecture contrôlée.. Biophysique [physics.bio-ph]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: . tel-00686015

**HAL Id: tel-00686015**

**<https://theses.hal.science/tel-00686015>**

Submitted on 6 Apr 2012

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

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

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

## DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

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

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Anne-Cécile REYMANN** »

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

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

# Dynamique des réseaux d'actine d'architecture contrôlée.

Thèse soutenue publiquement le « **11 Juillet 2011** »,  
devant le jury composé de :

**M Bertrand FOURCADE**

Université Joseph Fourier Grenoble (Président)

**M Pascal MARTIN**

CNRS, Institut Curie Paris (Rapporteur)

**M Pierre-François LENNE**

CNRS, IBDML Marseille (Rapporteur)

**M Grégory GIANNONE**

CNRS, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences Bordeaux (Membre)

**Mme Rajaa BOUJEMAA-PATERSKI**

Université Joseph Fourier, CEA Grenoble (Membre)

**M Laurent BLANCHOIN**

CNRS, CEA Grenoble (Membre)





# Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	<b>1</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>5</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Avant Propos sur la compréhension d'un système cellulaire complexe</b> .....	<b>8</b>
<b>2. Assemblage de l'actine</b> .....	<b>10</b>
2.1. Des monomères au filament .....	10
2.2. Facteurs inhibiteurs de la dynamique .....	12
2.3. Facteurs de nucléation indispensables .....	14
2.4. Une véritable boîte à outils permettant la création de différentes architectures cellulaires .....	17
<b>3. Survie ou désassemblage</b> .....	<b>21</b>
3.1. A l'échelle de la cellule, turnover sans ABP ("Actin-Binding-Proteins") ? .....	21
3.2. ADF/cofiline et la mécanique du filament .....	22
3.3. Régulation et protection contre le désassemblage .....	24
3.4. Bilan sur le lamellipode et apport des modèles reconstitués bio-mimétiques .....	25
<b>4. Contraction induite par myosines</b> .....	<b>29</b>
4.1. Principe et mécanique du moteur moléculaire .....	29
4.2. La myosine VI : double tête processive .....	34
4.3. Exemple d'une structure contractile, les fibres de stress .....	37
<b>5. Complexité du contrôle de la morphogenèse cellulaire</b> .....	<b>41</b>
5.1 La géométrie d'adhésion contrôle l'architecture cellulaire .....	41
5.2. Une synergie biochimique contrôle la motilité cellulaire .....	45
5.3. Dynamique rétroactive entre contrôle biochimique et géométrique d'une structure contractile .....	50
<b>Résultats</b> .....	<b>57</b>
<b>Introduction de mon travail de thèse</b> .....	<b>58</b>
Article 1. Achard, Current Biology, 2010 .....	62
Article 2. Reymann, Molecular Biology of the Cell, 2011 .....	82
Article 3. Suarez, Current Biology, 2011 .....	112
Article 4. Reymann, Nature Materials, 2010 .....	130
Article 5. Reymann, en cours de rédaction .....	164
<b>Discussion et Perspectives</b> .....	<b>185</b>
<b>1. Une organisation spontanée</b> .....	<b>186</b>
1.1. Contexte biochimique .....	186
1.2. Contexte physique .....	187
<b>2. Effet dynamique et mécanique de protéines associées à l'actine</b> .....	<b>189</b>
2.1 ADF/cofiline .....	189
2.2. Myosine .....	189
<b>3. Conclusion</b> .....	<b>192</b>

<b>Annexe.....</b>	<b>193</b>
<b>Références .....</b>	<b>199</b>
<b>Résumé en Anglais .....</b>	<b>210</b>
<b>Résumé.....</b>	<b>211</b>

# Remerciements

Je remercie Laurent Blanchoin pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, physique du cytosquelette et de la morphogénèse, du Laboratoire de physiologie cellulaire et végétale. Ma reconnaissance va également à Rajaa Boujemaa-Paterski et Manuel Thery. Durant ma thèse j'ai pu apprécier leur pédagogie, leur créativité et toutes les autres qualités de leur travail. A trois, ils ont su me guider et me faire découvrir de nombreuses facettes de la recherche. Un aspect qui restera gravé en moi est cette dynamique perpétuelle et la profusion d'idées qui furent des plus passionnantes. Merci également à Jean-Louis Martiel pour sa patience et tout l'intérêt qu'il a porté à mon travail malgré un emploi du temps des plus chargés. Je remercie aussi particulièrement Cristian Suarez pour son écoute attentive, son aide et ses conseils tout au long de mes travaux, ainsi que pour l'énergie qu'il a su dépenser afin de mettre l'ambiance et la cohésion parmi les "jeunes" du laboratoire. Je n'oublierai pas non plus les deux piliers du fonctionnement de notre équipe de recherche: Christophe Guérin et Jérémie Gaillard, sans qui très peu serait possible !

Mes remerciements vont également à l'ensemble des membres du laboratoire, notamment à Marilyn Vantard, pour l'ambiance chaleureuse et propice au travail qu'ils savent développer, ainsi que pour leur ouverture et leur attention vis-à-vis de mes questions. Un dernier merci à Théo pour cette découverte collective fort sympathique d'un vol en parapente.



# Liste des abréviations

ABP: "Actin Binding Protein", protéine se liant à l'actine

ADF: "Actin Depolymerizing Factor", protéine de la famille des cofilines dont le rôle effectif est de fragmenter le filament d'actine.

AFM: "Atomic Force Microscope", microscopie à force atomique

ATP/ADP: Adénosine triphosphate / adénosine diphosphate

Arp2/3: "Actin Related Proteins 2/3", complexe de sept polypeptides dont Arp2 et Arp3, nucléateur de branches sur filament d'actine

CP: Capping Protein ou protéine de coiffe

EM: "Electron microscope", microscopie électronique

ECM: "ExtraCellular Matrix", matrice extracellulaire

FRAP: "Fluorescence Recovery After Photobleaching" ou recouvrement de la fluorescence après photoblanchiment

FRET: "Fluorescence Resonance Energy Transfer", transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

FSM: "fluorescent speckle microscopy", microscopie de fluorescence en faible concentration de marqueurs fluorescents

HMM: "Heavy MeroMyosin", terminologie employée en cas de myosine à deux têtes processive

Microscopie TIRF: "Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy", TIRFM ou microscopie à onde évanescente.

NPF: "Nucleation Promoting Factor", facteurs promoteurs de nucléation d'actine

NWASP: "Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein", protéine contenant le domaine VCA, capable d'activer le complexe Arp2/3 et d'initier la nucléation branches, notamment au niveau du lamellipode des cellules motiles

PDMS: Polydimethylsiloxane, polymère de la famille des siloxanes utilisé pour faire des gels de rigidité contrôlée

pWA: domaine VCA additionné d'une région polyproline, utilisée *in vitro* afin d'activer le complexe Arp2/3 et d'initier la nucléation de branches en présence de profiline – actine.

siRNA: "Small interfering RNA", petits RNA interférents utilisés pour empêcher l'expression de gènes ("gene silencing")

VCA, WA: domaine C-terminal des protéines de la famille WASP/scar. La région "verproline homology", dite V ou W, recrute deux monomères d'actine ; la région "cofilin homology", dite C, et la séquence acide, dite A, respectivement, recrute et active le complexe Arp2/3.





# **Introduction**

## 1. Avant Propos sur la compréhension d'un système cellulaire complexe

Malgré une recherche exceptionnellement riche dans le domaine, il existe encore des lacunes fondamentales entre notre compréhension des mécanismes à l'échelle moléculaire et notre compréhension de la synchronisation de l'action de ces molécules afin d'aboutir à une cellule fonctionnelle vivante. Afin de pallier à cela, deux types d'approches sont possibles. Une approche "top-down" qui consiste à modifier le système cellulaire afin de pouvoir s'affranchir de certains aspects (par exemple de la complexité de la géométrie usuelle et non reproductible en utilisant des micropatterns (Thery et al., 2007) ou d'en étudier d'autres bien particuliers (étude de mutants, surexpression ou répression de l'expression des protéines...). Une approche de type "bottom-up" qui consiste à partir de protéines purifiées et au fur et à mesure de l'avancée de la compréhension à complexifier le système reconstitué en vue de se rapprocher du système cellulaire. Cela comprend le fait d'aboutir à ce que l'on appelle des systèmes reconstitués biomimétiques. Systèmes où l'on associe un jeu de protéines essentielles en vue de reproduire une seule fonction ou architecture cellulaire, afin de mieux comprendre son mécanisme de formation ainsi que sa mécanique. Il en existe de nombreux comme la reproduction du mode de transport de particules ou "cargo" sur microtubule (Hancock and Howard, 1998; Howard et al., 1989), la propulsion induite par polymérisation d'actine de pathogènes ou de billes mimant le mode de production de force présent dans le lamellipode (Loisel et al., 1999), l'endocytose avec l'étude d'invagination clathrine dépendante sur vésicules lipidiques (Kaksonen et al., 2005)... L'idéal étant d'avancer suivant ces deux types d'approches ("top-down" et "bottom-up") afin un jour de pouvoir les voir se rejoindre !

Une des notions qui semble de plus en plus incontournable dans l'ensemble des thématiques biologiques, et qui l'est d'autant plus dans le contexte cellulaire, est la notion de mécanique. Mécanique cellulaire, mécanique du cytosquelette, couplage structure-biochimie-mécanique... sont autant d'expressions de plus en plus présentes, désormais capables de concurrencer les notions de facteur génétique et de cascades de signalisation cellulaire. D'où la logique de faire interagir de manière forte biologie, physique et mathématique. Qui plus est, physique et mathématique ne se contentent plus (et ne doivent pas se contenter) d'agir en tant que soutien de demandes biologiques. Désormais, elles constituent à part entière des modes de raisonnements aussi bien dans la compréhension théorique, la génération de modèles complexes, la confrontation d'hypothèses et la suggestion de nouvelles pistes expérimentales. Ce qui me fascine le plus personnellement est le fait que le modèle mathématique nous permet d'entrer dans une profondeur et une précision, qui ne pourraient être atteintes d'un strict point de vue expérimental. Un piège à éviter toutefois: "rester les pieds sur terre" en partant d'hypothèses biologiquement valides et répondre à des questions précises, pertinentes *in vivo* (Fletcher and Mullins, 2010).

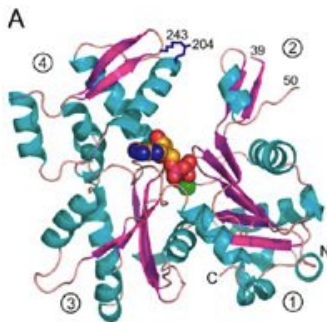
Au cours de ma thèse, je me suis positionnée à l'intersection de trois points de vue bien distincts, présents au sein de mon équipe d'accueil: l'étude approfondie des propriétés biochimiques de protéines individuelles, l'étude de la synergie entre ces protéines à l'aide de systèmes reconstitués biomimétiques et l'étude cellulaire basée sur les interactions entre géométrie d'adhésion et équilibre des forces. Si la diversité de ces influences fut pour moi des plus stimulantes, aujourd'hui avec l'écriture de ce manuscrit et tout comme ce fut le cas lors de mes expériences, je ne peux en approfondir l'ensemble des thématiques ni tester l'ensemble des pistes qui ont été ouvertes. Je ne cherche donc pas ici à faire une description détaillée et complète, ni une liste exhaustive de tout ce qui a été fait dans le domaine. Je souhaite par contre introduire le concept de contrôle par la biochimie et par la géométrie, de systèmes liés

au cytosquelette d'actine. C'est pourquoi ce manuscrit s'articule en deux parties. La première partie vise à introduire le cytosquelette d'actine et notamment sa dynamique à l'échelle cellulaire. Je m'attacherai à discuter les paramètres essentiels à la compréhension de mon travail ainsi qu'à faire sans cesse le lien entre les propriétés biochimiques des protéines étudiées *in vitro* avec le système cellulaire dans son ensemble. J'ai également choisi d'approfondir certaines études *in vivo* qui me semblent particulièrement pertinentes pour la problématique de mon sujet. La seconde partie présente, sous forme d'articles publiés ou en cours de publication, la majorité des résultats que j'ai obtenus au cours de mes trois années de recherche en thèse, ainsi qu'une discussion générale de ces résultats et les perspectives engendrées.

## 2. Assemblage de l'actine

### 2.1. Des monomères au filament

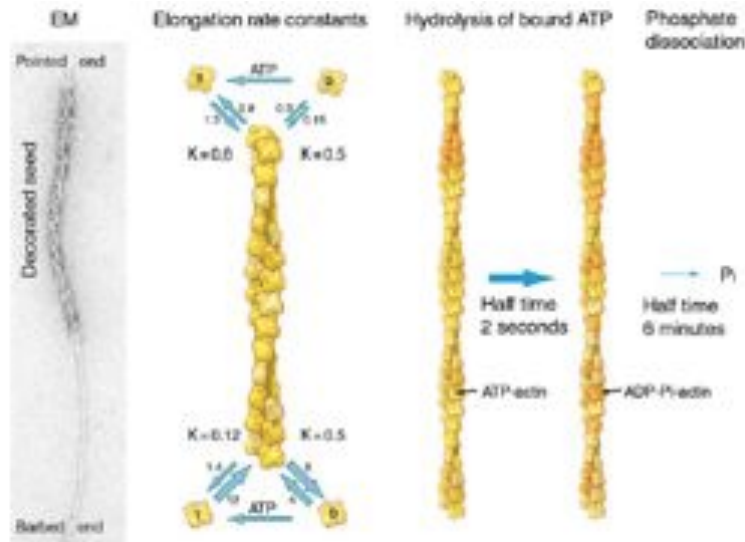
L'actine, découverte par Straub en 1942, est l'une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes. Il s'agit d'une protéine de 43 kDa polymérisant spontanément et de manière réversible en filaments hélicoïdaux polaires double-brins en présence de sels neutres à concentration physiologique (KCl 0.1 mol/l). La forme monomérique globulaire est nommée G-actine, sa forme filamenteuse est nommée F-actine. D'un point de vue physique, il s'agit d'un polymère semi-flexible de longueur de persistance égale à 10  $\mu\text{m}$  pour un diamètre de 7 nm (Isambert et al., 1995).



**Figure 1: Structure du monomère d'actine**

Le monomère d'actine est constitué de 4 sous-domaines. Les sous-domaines 1 et 3 constituent son extrémité dite barbée, les sous-domaines 2 et 4 son extrémité dite pointue. Au centre se trouve la cavité contenant le nucléotide (ATP dans cette structure) et le cation divalent ( $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Ca}^{2+}$ ) (Rould et al., 2006).

Dans les cellules vivantes, l'actine monomérique est associée à l'Adénosine TriPhosphate, l'ATP, et à un cation divalent  $\text{Mg}^{2+}$ . Les travaux d'Oosawa et ses collaborateurs ont montré que les filaments d'actine ne s'assemblent qu'au-delà d'une concentration définie de monomères d'actine, appelée concentration critique (Kasai et al., 1962; Yanagida and Oosawa, 1975) qui est déterminée par les conditions expérimentales telles que la concentration en sels, le pH et la température. Les monomères s'assemblent spontanément en oligomères selon une étape thermodynamiquement défavorable donc limitante appelée nucléation. Dès lors que ces oligomères (trimères) ont adopté une conformation hélicoïdale la stabilité du filament est assurée et l'on parlera d'élongation du filament. Au sein du filament les sous-unités ont toutes la même orientation ce qui confère la propriété essentielle de polarité structurale au filament d'actine, responsable de la polarité thermodynamique des deux extrémités. Le bout barbée, ou extrémité dynamique, a une constante de vitesse d'association ( $k_+$ ) des monomères-ATP 10 fois supérieure à celle du bout pointu (Figure 2, (Pollard, 1986). Aussi, étant donné leurs constantes de vitesses d'association et de dissociation, les extrémités barbée et pointue se distinguent par deux concentrations critiques distinctes ( $C_c = k_-/k_+$ ). Rapidement après leur incorporation dans le filament au cours de l'élongation, une variation structurale au sein de la sous-unité d'actine induit un processus d'hydrolyse irréversible de l'ATP en ADP+Pi (Murakami et al., 2010). Il faut environ 2 à 3 secondes pour hydrolyser l'ATP en ADP+Pi (pour l'actine -  $\text{Mg}^{2+}$ ) puis 6 à 9 minutes pour que le phosphate inorganique se dissocie de la sous-unité d'actine (Blanchoin and Pollard, 1999; Blanchoin and Pollard, 2002).



**Figure 2: Cinétique du filament d'actine**

Sur la gauche, cliché de microscopie électronique (EM) montrant un filament d'actine décoré de têtes de myosines ce qui rend compte de sa polarité. A droite, les constantes de vitesse d'association sont données en  $\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$  et les constantes de vitesse de dissociation en  $\text{s}^{-1}$ . Le ratio entre constante de dissociation et association est  $K$ , représentant la concentration critique à chaque extrémité en fonction de l'état du nucléotide associé, exprimé en  $\mu\text{M}$ . Le monomère-T représente l'actine-ATP, le monomère-D représente l'actine-ADP (Pollard, 1986; Pollard and Borisy, 2003).

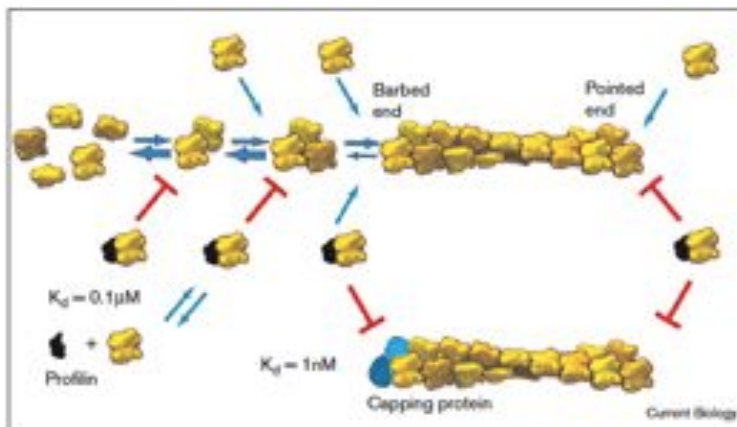
Ce mécanisme joue le rôle de véritable horloge interne donnant le vieillissement des sous-unités d'actine au sein du filament et contrôle l'affinité de certaines protéines interagissant avec l'actine comme l'ADF/cofilin (Blanchoin and Pollard, 1999).

Une des difficultés majeures rencontrées par les cellules pour assembler un cytosquelette d'actine est de maintenir une large concentration d'actine monomérique disponible dans le cytoplasme pour la polymérisation rapide, massive et localisée de structures adéquates composées de filaments d'actine, tout en contrôlant spatiotemporellement la dépolymérisation rapide des zones "âgées" de ces structures.

Quels sont donc les facteurs cellulaires impliqués dans le contrôle biochimique du large réservoir cytoplasmique de monomères d'actine, de la nucléation de filaments pour la formation de réseaux organisés, et du recyclage des monomères d'actine par dépolymérisation des portions âgées des structures néoformées ?

## 2.2. Facteurs inhibiteurs de la dynamique

La présence d'une forte concentration d'actine monomérique dans la cellule, jusqu'à 50% de la masse totale d'actine, peu sembler fort utile afin de disposer d'un réservoir de monomères rapidement disponibles pour l'assemblage d'actine *de novo*. Cependant, à l'échelle de la cellule, maintenir une concentration en monomères si élevée au-delà de la concentration critique (150  $\mu\text{M}$  dans le lamellipode, (Koestler et al., 2009)) est également défavorable d'un point de vue énergétique. En effet, cela signifierait que ce large réservoir de monomères polymériserait spontanément et donc de manière non contrôlée à l'échelle spatiotemporelle. Une protéine essentielle qui contrôle et maintient le large réservoir cellulaire d'actine à l'état monomérique est la profiline (Goldschmidt-Clermont et al., 1991; Perelroizen et al., 1995). La profiline recrute le monomère d'actine pour former le complexe profiline - actine qui est incapable de nucléer spontanément des filaments d'actine et qui ne participe pas non plus à l'élongation de l'extrémité pointue du filament. Par ailleurs, le complexe profiline-actine a la capacité de s'associer à l'extrémité barbée sans en perturber la cinétique de polymérisation et peut être pris en charge par les facteurs cellulaires de nucléation des filaments d'actine (cf §2.3 et figure 3). Aussi, la présence de la profiline permet d'une part de limiter l'utilisation du large réservoir cellulaire de monomères d'actine pour l'élongation des extrémités barbées dynamiques des filaments, et d'autre part elle inhibe la polymérisation à l'extrémité pointue des filaments en permettant indirectement sa dépolymérisation spontanée (dans un contexte cellulaire où le réservoir d'actine monomérique est bien au-delà de la concentration critique de l'extrémité pointue, mais complexé à la profiline).

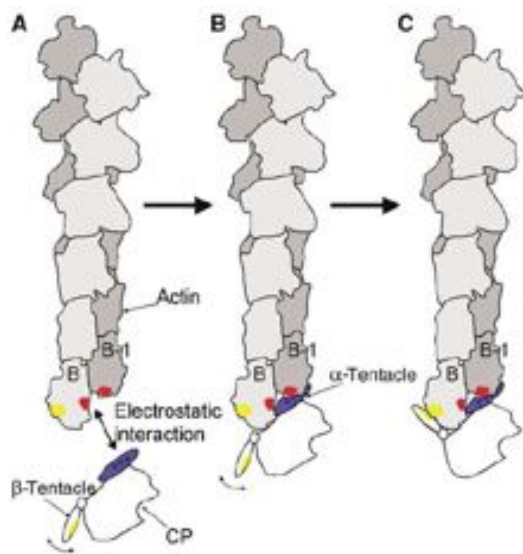


**Figure 3: Action de la profiline et de la protéine de coiffe, Capping Protein ou CP**

Ce schéma montre l'effet de la profiline et de CP sur la cinétique de nucléation et d'élongation d'un filament d'actine. La première inhibe la nucléation spontanée et l'élongation du filament par l'extrémité pointue alors que la seconde bloque toute association à l'extrémité barbée (Amman Pollard 2000 Cur Bio).

Par ailleurs, il existe *in vivo* des facteurs cellulaires tels que la protéine de coiffe de la famille des gelsolines ou de la "Capping Protein", qui inhibent l'élongation des filaments d'actine, en interagissant et bloquant leurs bouts barbés. La "Capping Protein" (CP) est une protéine hétérodimérique se fixant aux extrémités barbées (dynamiques) des filaments de telle sorte à bloquer toute addition (ou perte) de monomères (figure 4). Son interaction avec les filaments d'actine a été largement étudiée (Cooper and Sept, 2008) deux paramètres importants sont à retenir pour la suite la constante de vitesse d'association,  $k_+ = 2.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et la constante de vitesse de dissociation,  $k_- = 0.0003 \text{ s}^{-1}$  (Kuhn and Pollard, 2007; Schafer et

al., 1996). CP est essentielle à de nombreuses fonctions *in vivo*. Nous verrons que celle-ci est essentielle au sein du bord avant des cellules motiles, appelé lamellipode (Eddy et al., 1997; Iwasa and Mullins, 2007; Waddle et al., 1993) ou en tant que régulateur indirect puisque contrôlant la quantité d'extrémité dynamique et la concentration en monomères libres (par exemple un knockdown de CP induit *in vivo* une augmentation de la quantité de filopodes §2.4, (Mejillano et al., 2004)). Toute la complexité de ces interactions ainsi que son contrôle et sa régulation spatiotemporelle ne sont pas aujourd'hui entièrement connus. Une chose est néanmoins certaine son rôle majeur dans tout mécanisme d'assemblage et de désassemblage d'actine aussi bien dans les cellules que dans les systèmes reconstitués (Iwasa and Mullins, 2007; Loisel et al., 1999).



**Figure 4: Modèle de l'association de CP à l'extrémité barbée du filament d'actine**

Ce schéma montre l'association entre CP (hétérodimère  $\alpha\beta$ ) et le bout barbé d'un filament d'actine. Selon ce modèle celle-ci s'effectue en deux temps: attraction électrostatique de la sous-unité terminale du filament grâce à la sous-unité  $\alpha$  de la CP et stabilisation par la liaison de la sous-unité  $\beta$  de la CP (Narita et al., 2006).

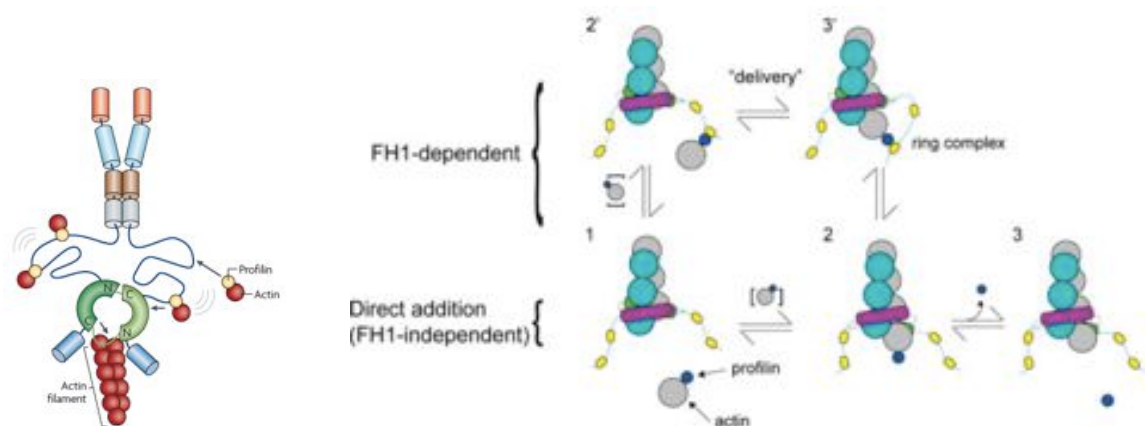
A travers l'exemple de la profiline et de la CP, nous venons de voir comment deux protéines peuvent agir de façon synergistique, pour inhiber la polymérisation spontanée de filaments d'actine, limiter la polymérisation à l'extrémité barbée, stopper l'élongation afin de contrôler la longueur des structures d'actine et également maintenir un réservoir élevé de monomères d'actine. Je viens de mentionner le fait que la profiline inhibe la polymérisation spontanée de l'actine pourtant la présence de nombreux filaments *in vivo* témoigne de mécanismes supplémentaires. Voyons donc maintenant comment les filaments d'actine peuvent être initiés en présence de profiline.



### 2.3. Facteurs de nucléation indispensables

En réponse à la signalisation, la cellule polymérise des réseaux d'actine de structures variées mais adaptées à la réponse cellulaire requise (Pollard and Cooper, 2009). Le mécanisme identifié pour la génération de nouvelles extrémités barbées libres *in vivo* est la nucléation *de novo* (Pollard et al., 2000). Ce processus est catalysé par des facteurs cellulaires qui utilisent le large réservoir d'actine monomérique complexé à la profiline. Parmi les facteurs de nucléation identifiés, le complexe Arp2/3 et les protéines de la famille des formines sont les mieux caractérisés (Pollard and Borisov, 2003).

Les formines nucléent les filaments d'actine à partir de monomères puis en favorisent l'élongation, tout en restant attachée de manière processive à leur extrémité barbée (Mizuno et al., 2011; Romero et al., 2004; Sagot et al., 2002). Ce sont des polypeptides dimériques caractérisés par des domaines régulateurs variables et une région constante active divisée en deux domaines. Le domaine Formin Homology 1 (FH1) contenant le site de liaison au complexe profiline - actine, et le domaine Formin Homology 2 (FH2) en forme de "doughnut" et permettant la fixation à l'extrémité barbée du filament d'actine (Schéma figure 5 ci-dessous) (Kovar et al., 2003; Moseley et al., 2004; Otomo et al., 2005; Xu et al., 2004).



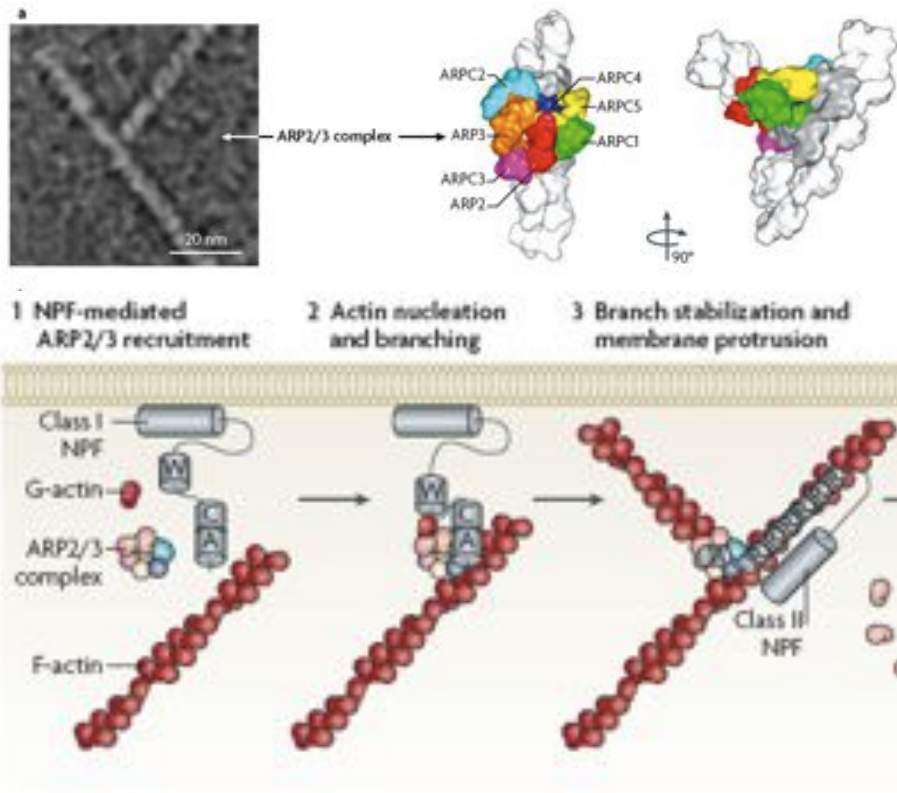
**Figure 5: La formine catalyse une élongation processive du filament d'actine**

Schémas de formine (mDia1) en action sur un filament d'actine. Le domaine FH2 (à gauche en vert, à droite en violet) reste au contact de l'extrémité barbée pendant que les bras FH1 recrutent et délivrent les complexes profiline-actine à l'extrémité barbée (Chesarone et al., 2009; Paul and Pollard, 2009).

Pour la plupart des formines, le domaine FH2 est suffisant pour catalyser la nucléation de nouveaux filaments à partir d'actine monomérique purifiée (Kovar et al., 2006). Lors de la phase d'élongation du filament, le domaine FH2 se déplace de manière processive en suivant l'extrémité barbée, la protégeant ainsi des protéines de coiffe. Le domaine FH1 possède de multiples domaines d'interaction avec la profiline. En recrutant les complexes profiline - actine, la formine augmente localement la concentration de monomères à proximité de l'extrémité barbée ce qui a pour effet d'accélérer l'élongation de cette extrémité des filaments en multipliant par 19 sa constante de vitesse d'association,  $k_+$  (Kovar and Pollard, 2004a; Michelot et al., 2007; Paul and Pollard, 2009). Ces vitesses d'élongation en présence des formines varient beaucoup d'une formine à l'autre selon des critères de spécificité des différents domaines (Gould et al., 2011; Kovar and Pollard, 2004b). *In vivo*, les formines sont supposées agir comme de véritables polymérases qui catalysent l'élongation des extrémités

barbées des filaments qu'elles protègent de l'action des protéines de coiffe. Elles sont essentiellement localisées au sommet de filopodes où elles sont indispensables pour la formation des faisceaux parallèles de filaments d'actine (Chhabra and Higgs, 2007; Yang et al., 2007).

Le complexe Arp2/3 a d'abord été identifié comme ligand de la profiline (Machesky et al., 1994). L'analyse en microscopie électronique de filaments d'actine incubés avec le complexe Arp2/3 purifié montre que celui-ci décore latéralement le filament, se fixe à l'extrémité pointue et conduit à une organisation branchée (en Y, avec un angle de 70°) des filaments d'actine (Mullins et al., 1998). Les résultats de la modélisation moléculaire, ultérieurement confirmés par des études cristallographiques ou tomographiques, ont montré que le complexe Arp2/3 est stable et stoechiométriquement constitué de sept sous-unités dont deux polypeptides apparentés à l'actine Arp2 et Arp3. Ces deux sous-unités sont adjacentes dans le complexe, et l'hétérodimère qu'elles forment sert d'amorce pour la polymérisation de l'actine par l'extrémité barbée qu'elles miment (figure 6, (Kelleher et al., 1995; Robinson et al., 2001; Rouiller et al., 2008). Les travaux de Mullins et collaborateurs avaient initialement démontré que le complexe Arp2/3 active la polymérisation de l'actine selon un modèle dendritique où il bloque l'extrémité pointue des filaments (Mullins et al., 1998). Néanmoins, le complexe Arp2/3 est constitutivement inactif et possède intrinsèquement une très faible activité nucléatrice. Son activation par les protéines de la famille WASP/scar (Wiscott-Aldrich syndrom protein.) couplée à l'interaction avec le côté d'un filament préexistant, induit une variation conformationnelle du complexe qui repositionne notamment les sous-unités Arp2 et Arp3 dans la configuration native de l'extrémité barbée d'un filament d'actine. Dans cet état activé, le complexe Arp2/3 initie un filament d'actine (branche fille) sur le côté d'un autre filament préexistant (filament mère) sur plusieurs générations de filaments (figure 6, (Machesky et al., 1999)). L'activité nucléatrice, dite autocatalytique, du complexe Arp2/3 génère alors un réseau arborescent, dit dendritique, d'architecture contrôlée (Blanchoin 2000). Les protéines de la famille WASP/scar sont des facteurs multimodulaires régulés. Elles possèdent en position N-terminale une région d'interaction avec le filament d'actine, une large région régulatrice, suivie du domaine effecteur en position C-terminale. Il se compose de deux régions "verprolin homology", WH2 liant le monomère d'actine, d'une région "cofilin homology", et d'une région acide qui recrute transitoirement (Martin et al., 2006) et active de complexe Arp2/3 (Machesky et al., 1999). Ainsi la partie C-terminale des protéines WASP/Scar se nomme "WA" ou "VCA" (schéma figure 6). Ces protéines sont activées par des protéines transductrices du signal, que sont les petites protéines G de la famille Rho, Rac et CDC42 (Rohatgi et al., 1999). Aussi, lors de la signalisation, la cascade d'activation "petites protéines G / protéine WASP/Scar / complexe Arp 2/3" permet de contrôler dans l'espace et dans le temps, la formation de réseau branché d'actine localisée exclusivement à la membrane, siège requis de la production de force propulsive lors des phénomènes morphogénétiques et de motilité cellulaire (Co et al., 2007; Rohatgi et al., 1999; Svitkina and Borisy, 1999).



**Figure 6: Structure et fonctionnement du complexe Arp2/3**

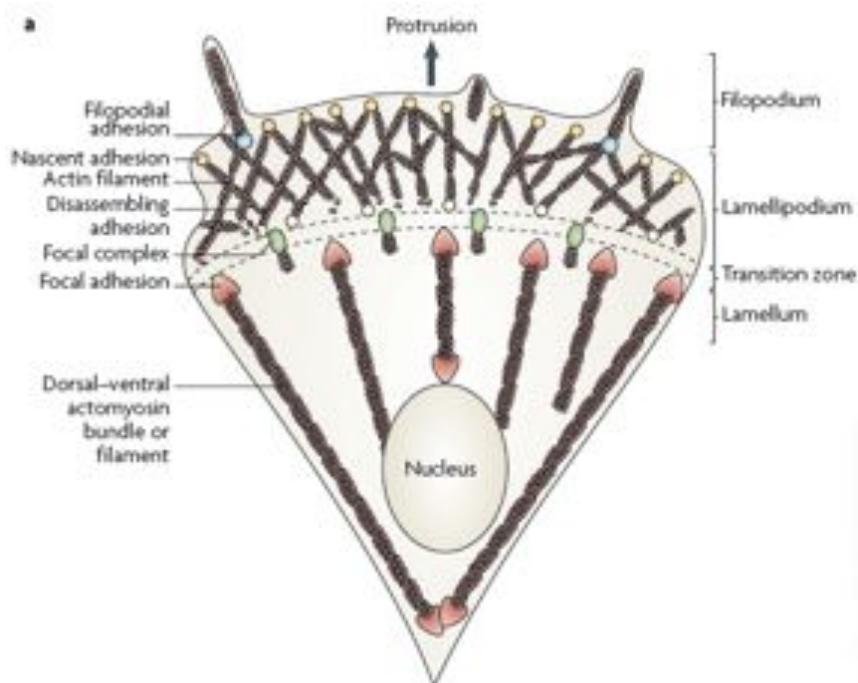
A gauche, un cliché EM montre la morphologie d'une branche formée par Arp2/3, à droite schéma structurel obtenu par tomographie électronique. En-dessous modèle de nucléation par le complexe Arp2/3 localisée à la membrane cellulaire en trois étapes. Recrutement et activation de manière régiosélective des NPFs à la membrane, recrutement et activation par les NPFs du complexe Arp2/3, nucléation de branche sur le côté d'un filament d'actine préexistant par le complexe Arp2/3 et stabilisation de la structure (Campellone and Welch, 2008).

Certaines protéines, telle la coronine (Cai et al., 2008) ou l'ADF/cofiline (Blanchoin et al., 2001), ont été montrées comme capables de dissocier le complexe Arp2/3 des branches selon un phénomène appelé "debranching", accélérant ainsi sans doute le phénomène de dissociation du complexe Arp2/3 lié à une interaction moins forte avec les filaments après dissociation du phosphate (Chan et al., 2009) et une destruction de la structure générée.

Les observations en microscopie électronique des réseaux branchés générés par le complexe Arp2/3 au bord avant des cellules révèlent des structures denses et composées de filaments relativement courts, comparés aux faisceaux de filaments parallèles présents au sein des filopodes (Svitkina and Borisy, 1999). Par ailleurs, l'analyse biochimique de ces réseaux confirme la présence de la protéine de coiffe, CP (Iwasa and Mullins, 2007). Aussi, le rôle majeur de cette protéine de coiffe, bloquant les extrémités barbées libres des filaments d'actine, est-il de restreindre certes la longueur de ces polymères semi-flexibles, mais surtout de conférer au réseau dendritique la densité et la rigidité nécessaires et suffisantes pour la production de force propulsive. En conclusion, la génération de force motrice basée sur la polymérisation de l'actine résulterait d'un équilibre finement régulé entre nucléation et élongation des filaments (Pantaloni et al., 2000).

## 2.4. Une véritable boîte à outils permettant la création de différentes architectures cellulaires

L'architecture des cellules est formidablement construite, en perpétuel renouvellement et cependant avec une organisation précise dédiée à chaque fonction. Sa complexité est son fort puisque tout comme un jeu de construction, la multiplicité des outils/pièces du cytosquelette cellulaire permet de maximiser les assemblages. Actine, microtubules et filaments intermédiaires n'en sont que les briques ("building blocks") fondamentales. Les cellules sont donc capables de créer différents réseaux d'actine aux caractéristiques bien spécifiques: localisation, composition, architecture (linéaire avec des extrémités barbées protégées des protéines de coiffe versus branchée avec des extrémités barbées libres), "timing", fonction, mécanique... Pour ce faire, elles utilisent et combinent au besoin la palette de nucléateurs ainsi que l'ensemble des protéines associées à l'actine. C'est ainsi que la distribution notamment des formines et du complexe Arp2/3 est en général bien distincte dans les cellules (Chhabra and Higgs, 2007).



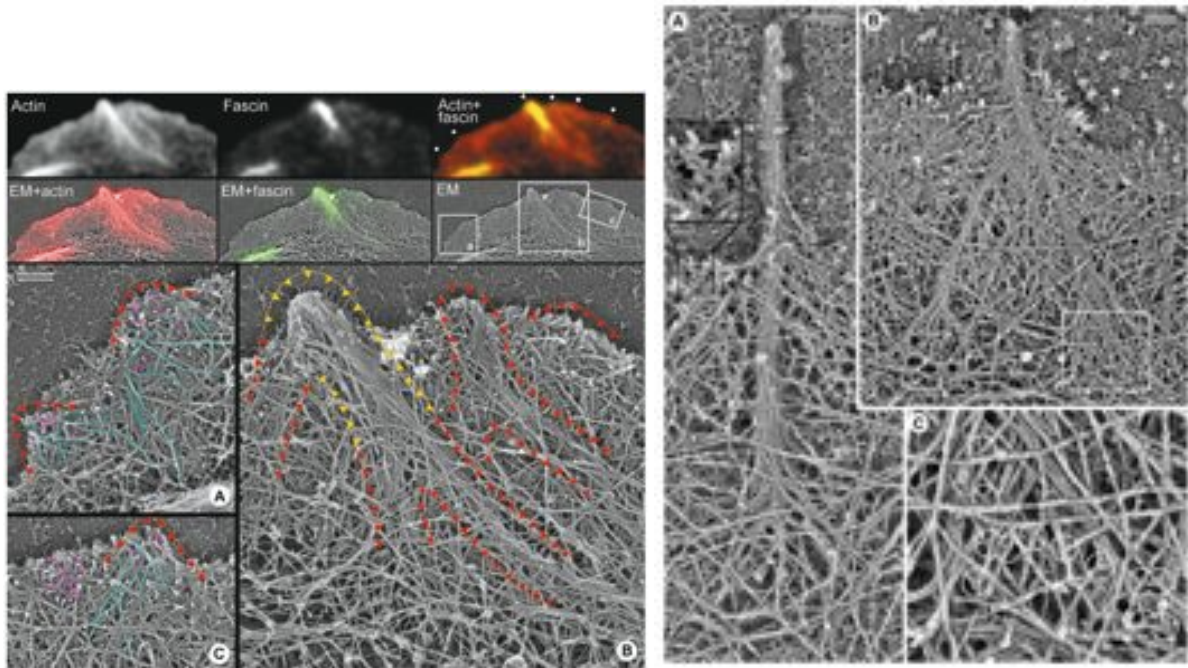
**Figure 7: Le cytosquelette d'actine, une architecture fonctionnalisée**

Schéma montrant l'organisation du cytosquelette d'actine présent dans une cellule motile (Parsons et al., 2010).

Une des structures dynamiques construites transitoirement par le cytosquelette d'actine est le lamellipode. Il s'agit d'une large protrusion cellulaire étalée ( $\approx 100$  nm d'épaisseur sur 3 à 5  $\mu\text{m}$  de long et une dizaine de microns de large) présente au bord avant des cellules motiles. Celle-ci contient un réseau dense d'actine généré selon un processus communément appelé processus de nucléation dendritique (schéma figure 7). Des études *in vivo* ont montré l'importance des diverses protéines impliquées (notamment un lien fort entre activité du complexe Arp2/3 et assemblage du lamellipode) et l'importance de leur régulation spatiale et temporelle ce qui a permis l'élaboration d'un tel mécanisme (Iwasa and Mullins, 2007; Koestler et al., 2008; Pollard and Borisy, 2003). Ce processus repose sur une activation du complexe Arp2/3 localisée à la membrane par des protéines de la famille WASP/Scar qui y

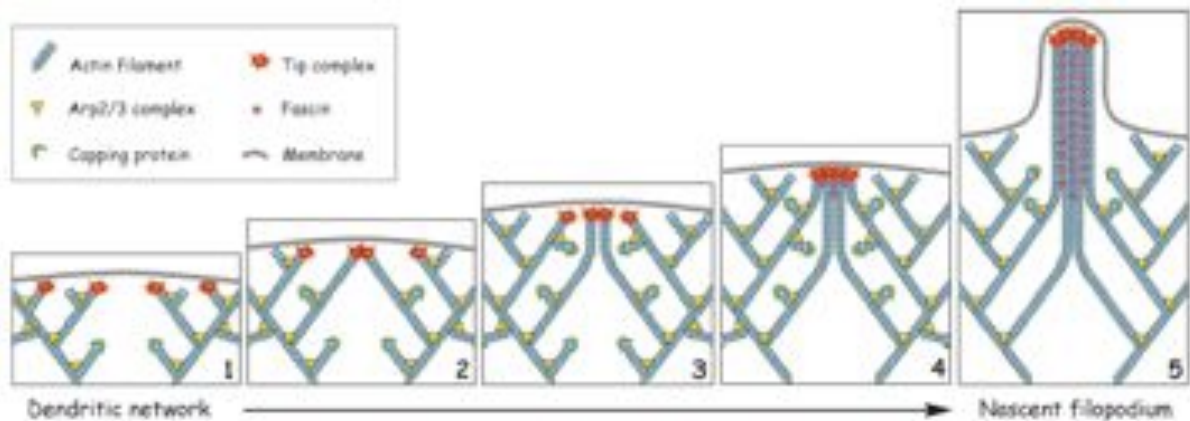
sont recrutées. Cette nucléation importante doit être couplée à l'action de protéines de coiffe (CP) qui stoppent rapidement la croissance des nouveaux filaments, contrôlant ainsi l'équilibre entre nucléation et élongation et de ce fait la rigidité de ce réseau réticulé formé de courts filaments d'actine. L'action des CP rend alors possible la génération de force de propulsion (point discuté en de plus amples détails en § 3.4, (Iwasa and Mullins, 2007)). La nucléation par Arp2/3 est particulièrement adapté au besoin de la cellule dans cette zone active puisqu'elle permet une rapide recrudescence de la polymérisation (ou "burst") de manière localisée dès lors que la cascade de signalisation est activée, ainsi que la formation d'un réseau très dense et cohésif. Bien évidemment, cela suppose en aval, des mécanismes de remodelage et de recyclage des monomères, mécanismes décrits dans le chapitre 3 (Pollard and Borisy, 2003).

*In vivo* les formines, de part leur mode de fonctionnement processif, induisent l'assemblage de diverses structures cellulaires composées de filaments parallèles non branchés comme les câbles d'actine présents dans les filopodes ou microvilli, au sein des anneaux contractiles ou éventuellement dans certaines fibres de stress. Les filopodes sont des protrusions longilignes s'étendant le plus souvent en amont du lamellipode ou des cônes neuronaux et dont le rôle est d'agir comme senseur de l'environnement de la cellule. Ils contiennent un réseau de longs filaments (actine et microtubules) parallèles qui s'évase à son pied étant intriqué dans le réseau dense du lamellipode (voir figure 8). Leur mécanisme de formation n'est pas encore entièrement résolu et il semblerait que plusieurs mécanismes pourraient coexister. Trois aspects semblent pourtant cruciaux: une étape de nucléation de filaments, l'élongation soutenue de ces extrémités barbées dynamiques et l'action de protéines de pontage ("bundling proteins", protéines s'associant à la fois à deux filaments adjacents et créant une jonction physique entre les deux, modifiant des propriétés comme la longueur de persistance). Une hypothèse me semblant particulièrement intéressante est la suivante. La première étape de génération de filaments se fait au niveau du lamellipode. Du réseau dense et branché pourraient ressortir des précurseurs (filaments courts et parallèles) (Svitkina et al., 2003). Leur cohésion sans doute accentuée par des protéines de pontage de type fascine permettrait une première déformation de la membrane (voir schéma figure 9). La formation de ces précurseurs serait suivie d'un recrutement des extrémités barbées dynamiques par des formines processives et localisées à la membrane plasmique, contenues dans le "Tip complexe", rendant possible une élongation continue et linéaire de l'ensemble de la structure (les formines entrent en compétition avec CP, et protègent l'extrémité barbée du blocage). En conclusion, s'il y a bien spécificité de fonction découlant de la forme de réseau engendré par les différents nucléateurs, cela n'exclue pas pour autant des dépendances fortes et une coordination entre les différentes structures formées. Par exemple un "knockdown" de CP, laissant les extrémités barbées libres émanant du réseau dendritique, induit *in vivo* une augmentation de la quantité de filopodes et un amoindrissement du lamellipode (voir figure 10, (Mejillano et al., 2004)). Tout est dans l'art de l'équilibre, de la réorganisation et de la cohésion (cf § 4.3)...



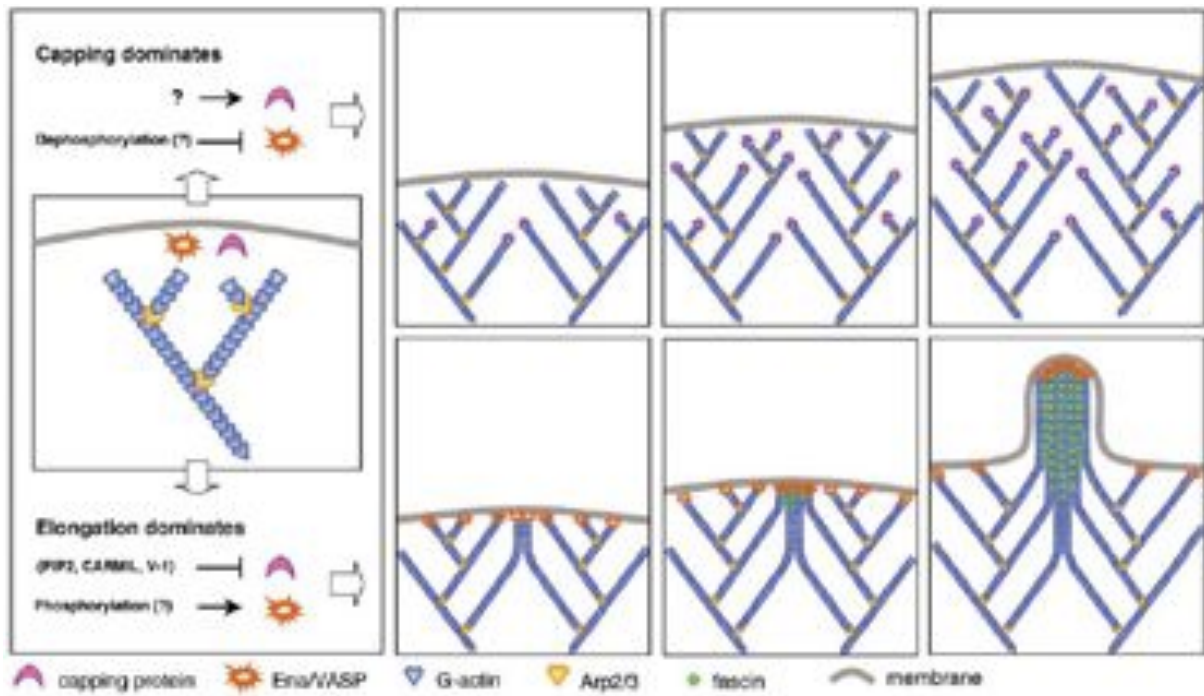
**Figure 8: Filopode de cellule mélanomiale émergeant du réseau dendritique**

Clichés EM et zoom montrant l'organisation des filaments d'actine au niveau d'un précurseur de filopode (cadre de gauche) et de filopodes formés (à droite). L'on remarque que ceux-ci résultent de la fusion de filaments parallèles émergeant du réseau dendritique enchevêtré du lamellipode. Deux clichés de microscopie à fluorescence (en haut à droite) témoignent de la présence localisée de fascine sur les filaments d'actine présents dans un précurseur de filopode. Barres, 0,2  $\mu\text{m}$ . (Svitkina et al., 2003)



**Figure 9: Schéma du mécanisme de formation de filopode**

Modèle expliquant la formation de filopodes au niveau d'une membrane cellulaire au contact d'un réseau dendritique de filaments d'actine. Des filaments sont recrutés par des protéines présentes dans un complexe protéique "tip complex" (dont les formines) après co-alignement et pontage grâce à l'association (Svitkina et al., 2003).



**Figure 10: Mécanisme d'équilibre entre réseau dendritique et filopodes sous l'action de CP**

La présence de CP (en haut) bloque les extrémités barbées libres du réseau dendritique favorisant la nucléation. Au contraire en absence de CP, l'élongation (en bas) est favorisée et permet la génération de nombreux filopodes (Mejillano et al., 2004).

### 3. Survie ou désassemblage

#### 3.1. A l'échelle de la cellule, turnover sans ABP ("Actin-Binding-Proteins") ?

D'un point de vue général, la cellule contient environ autant d'actine sous forme filamenteuse que sous forme monomérique. Les estimations varient selon le mode et la zone de mesure. Si l'on prend, par exemple, les données d'une étude récente, (Koestler et al., 2009), il y aurait environ au sein du lamellipode trois fois plus d'actine F (500  $\mu\text{M}$ ) que de G actine (150  $\mu\text{M}$ ). Si l'on en croit cette étude, cela signifie donc qu'il a 1500 fois plus de monomères que la concentration critique nécessaire à l'élongation du bout barbé d'où une vitesse de polymérisation de 260  $\mu\text{m}/\text{min}$  (soit plus de 85 000 sous-unités par min)! Nous avons déjà vu qu'un des outils essentiels de la cellule pour ralentir cette consommation effrénée de monomères est la CP, qui *in vivo* est présente à des concentrations de l'ordre du micromolaire, de manière comparable à la quantité d'extrémités dynamiques d'actine. Afin de promouvoir un "turnover" rapide, il est également indispensable que la cellule dispose d'un mécanisme de désassemblage, nécessaire par exemple au maintien de la largeur du réseau lamellipodial en contrant ainsi la pression de polymérisation au bord avant de la cellule. L'hypothèse simple d'un "treadmilling" ou "tapis roulant" à l'échelle des filaments uniques d'actine (état d'équilibre du filament durant lequel au bout barbé s'associent des monomères - ATP alors que le bout pointu relâche des sous-unités - ADP, voir figure 2) ne semble pas rendre compte du turnover du réseau d'actine au sein du lamellipode sans l'aide de facteurs extérieurs (Wang, 1985). En effet, en l'absence de facteurs de régulation, en une minute seulement 16 à 48 sous-unités se dissocieraient des extrémités pointues (la constante de vitesse de dissociation,  $k_{\text{pointu}} - \text{ADP} = 0.27 \text{ sec}$ ,  $k_{\text{pointu}} - \text{ATP} = 0.8 \text{ sec}$  (Pollard, 1986). De plus, il faut attendre 6 à 8 minutes après l'association d'un monomère à l'extrémité barbée pour que la dissociation du phosphate et donc le désassemblage de la sous-unité ait lieu... Ce processus semble donc peu probable pour compenser les milliers de sous-unités ajoutées par minute, dans la plupart des structures d'actine *in vivo*.

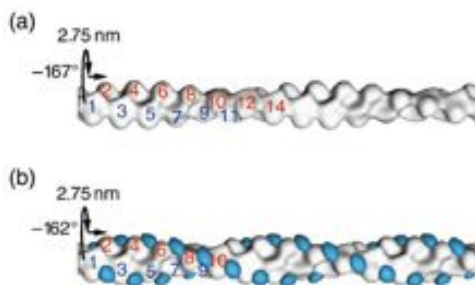
*In vivo*, le facteur additionnel essentiel au renouvellement ("turnover") de l'actine est l'ADF/cofiline. De nombreuses études ont montré son mode d'action et sa localisation dans diverses structures (Iwasa and Mullins, 2007; Okreglak and Drubin, 2007). Par son action combinée de fragmentation des filaments et son effet d'accélération de la dissociation du phosphate il semble être le facteur majeur du désassemblage et de la réorganisation des réseaux d'actine dans la cellule (Lappalainen and Drubin, 1997; Miyoshi et al., 2006). Par génération importante d'extrémités pointues suite à l'activité de fragmentation, l'ADF/cofilin rend possible un désassemblage rapide sous forme de "burst" par perte de morceaux entiers de filaments ( $\tau = 100 \text{ s}$ ) et insensible à la forte concentration de monomères (Kueh et al., 2008; Okreglak and Drubin, 2010).

En conclusion, le défi majeur pour la cellule est de réaliser un assemblage rapide, massif et localisé à la membrane du réseau d'actine tout en conservant un réservoir suffisant afin de compléter le système en monomères d'actine. Cela nécessite un processus de recyclage efficace par ADF/cofiline. Hors étant donné la concentration cellulaire en complexe profilin - actine, cela devrait engendrer une polymérisation rapide des extrémités barbées libres des filaments, donnant naissance à un réseau dont l'essentiel serait sous forme ATP/ADP-Pi. Les zones ADP des filaments recrutant l'ADF/cofiline devraient être quasi inexistantes dans la cellule. Pourtant l'ADF/cofiline est présente *in vivo* dans différentes structures dont le lamellipode (§3.4, Borisy Svitkina JCB 1999). Quelle solution la cellule a-t-elle donc à sa disposition afin de résoudre ce paradoxe ?



### 3.2. ADF/cofiline et la mécanique du filament

Un aspect très intéressant du mode d'action de l'ADF/cofiline est son lien étroit entre mécanique et cinétique. A tort, le premier mécanisme proposé fut que ces protéines accélèrent la vitesse de dissociation des sous-unités à l'extrémité pointue des filaments d'actine (Carlier et al., 1997), d'où le nom ADF pour "Actin Depolymerization/Dynamizing Factor". Depuis diverses études, notamment des observations en TIRF à l'échelle du filament unique au sein de notre équipe et d'autres laboratoires, contredisent cette hypothèse et rendent compte du mécanisme de fragmentation par ADF/cofiline et non d'une perte progressive de sous-unités d'actine (Michelot et al., 2007).



**Figure 11: Décoration d'un filament d'actine par ADF/cofiline**

Structure EM, changement du twist entre les sous-unités d'actine (Bamburg et al., 1999).

L'association de l'ADF/cofiline sur les sous-unités d'un filament est une réaction bimoléculaire dont l'affinité varie selon la nature du nucléotide associé à ces sous-unités. D'une affinité de l'ordre de  $10 \mu\text{M}$  pour les sous-unités ATP et ADP-Pi, elle atteint  $0.3$  ou  $0.05 \mu\text{M}$  pour les zones ADP (Blanchoin and Pollard, 1999; Nishida, 1985). Sa liaison au filament est ainsi régulée par l'horloge interne liée à l'état du nucléotide. *In vivo*, cette propriété se révèle être un moyen de régulation supplémentaire afin de réguler finement la localisation spatiale et temporelle du désassemblage induit par ADF/cofiline, en l'excluant notamment des zones de polymérisation active (Iwasa and Mullins, 2007; Okreglak and Drubin, 2007).



**Figure 12: Schéma représentant la fragmentation par ADF/cofiline et le recyclage des monomères d'actine**

L'incorporation d'ADF/cofiline sur un filament d'actine induit sa fragmentation. La présence de CP permet d'arrêter l'élongation des filaments d'actine par leur extrémité barbée; les filaments ne peuvent alors que se dépolymériser via l'extrémité pointue (Andrianantoandro and Pollard, 2006).

Une fois insérée dans le filament d'actine, l'ADF/cofiline induit une torsion ou "twist" au sein de cette structure qui déstabilise les contacts normaux entre les sous-unités, un phénomène qui se propage sur plusieurs centaines de sous-unités (figure 11, (Galkin et al., 2003; McGough et al., 1997; Prochniewicz et al., 2005). Cette modification de structure à l'échelle du filament engendre des zones de fragilité qui aboutissent à des événements de fragmentation par accumulation de stress mécanique (Roland et al., 2008). De plus, son association au sein d'un filament est coopérative (pour certaines cofilines) et une fois liée, l'ADF/cofiline accélère de manière allostérique la dissociation du phosphate des sous-unités non décorées adjacentes (Blanchoin and Pollard, 1999; De La Cruz and Sept, 2010). Ceci a pour effet d'augmenter rapidement la taille des zones de fixation (sous forme de bandes, "stretch") et de créer de nombreuses zones de transition entre les parties décorées par ADF/cofiline ou non. D'où une recrudescence des sites potentiels de fragmentation (Andrianantoandro and Pollard, 2006; McCullough et al., 2008). Le mode de fonctionnement de l'ADF/cofiline sera discuté en plus amples détails dans l'article 3 présenté dans la partie résultats.

### 3.3. Régulation et protection contre le désassemblage

Un premier mode de régulation de l'ADF/cofiline se fait par phosphorylation/déphosphorylation de la protéine. Selon une modification post traductionnelle, l'ADF/cofiline ne lie plus le filament d'actine si phosphorylée sur Ser3 (Moriyama et al., 1990). Une phosphorylation qui est régulée *in vivo* par de très nombreux signaux cellulaires (concentration d'ions, voies de signalisation, interaction avec membrane polyphosphoinositides, PIP2 et PIP3...) sans doute avec des rétrocontrôles de la cofiline au travers des changements dans les structures d'actine (Yonezawa et al., 1991a; Yonezawa et al., 1991b; Yonezawa et al., 1989). Une variation du pH intracellulaire pourrait être un autre mécanisme de régulation de l'activité de l'ADF/cofiline. En effet, *in vitro* il a été montré que des changements de pH d'ordre physiologique (6.8 à 7.4) influencent en effet son activité (Hawkins et al., 1993).

Un second mode de régulation du désassemblage se fait dans la cellule grâce à l'action d'autres protéines interagissant avec l'actine. Ces mécanismes ne sont pas encore totalement compris puisque fort complexes et potentiellement différents d'un système à l'autre. Je n'en cite ici que quelques exemples. Ensemble, coronine et actin-interacting protein 1 (Aip1), ont été définies comme catalyseurs de la fragmentation par "burst" induit par la cofiline sans doute par une action déstabilisante des intermédiaires réactionnels créés qui faciliterait la séparation des deux brins d'actine (étude *in vitro* (Kueh et al., 2008)). La combinaison de ces trois protéines est par exemple présente durant la fin de vie des patchs d'actine de levure ("buding yeast") et concorde avec la perte de matériel (actine et autres protéines associées) (Lin et al., 2010). La coronine seule a également un effet de remodelage au sein des structures branchées d'actine. Par une action de dissociation/remplacement du complexe Arp2/3 et donc débranchement, elle favoriserait le "turnover" des réseaux comme le lamellipode (Cai et al., 2008). Une action antagoniste de celle de la cortactine qui tend à la stabilisation de ces points de branchements. La fixation de l'ADF/cofiline est également mutuellement exclusive de celle de la tropomyosine sur les filaments d'actine (Bernstein and Bamburg, 1982). La tropomyosine est une protéine allongée se fixant sur plusieurs sous-unités le long d'un filament d'actine et ayant un fort effet de stabilisation. Lorsque celle-ci décore fortement un filament d'actine sa présence empêche la fixation d'ADF/cofiline et ainsi la fragmentation induite par celle-ci.

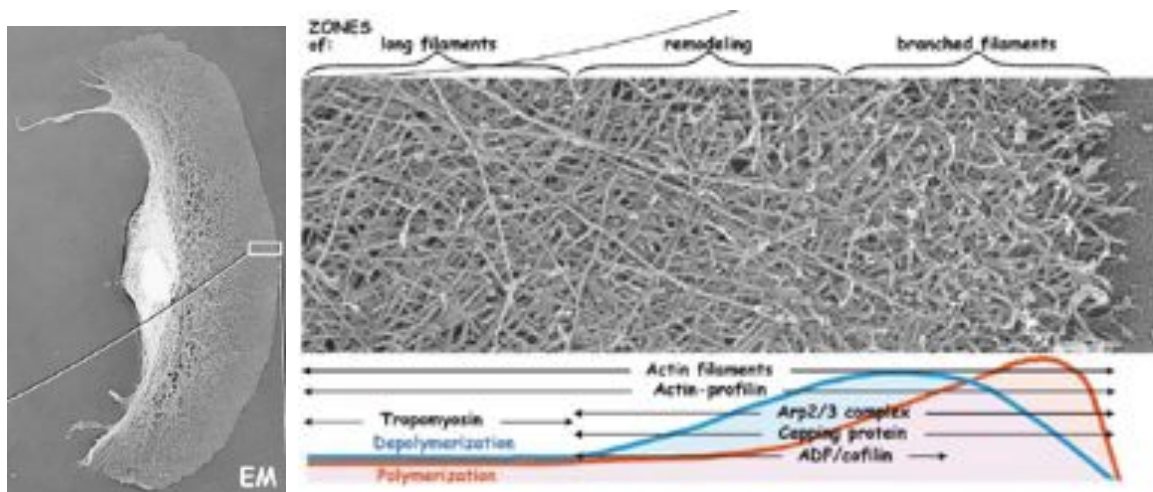
Un autre mode de régulation du désassemblage par la cofiline découle de l'exclusion cinétique (faible affinité) de celle-ci sur toute structure d'actine - ATP. Créant ainsi une protection naturelle des zones nouvellement polymérisées. Ceci semble également être le cas pour la coronine, dont le rôle est bimodal. Elle inhibe la fragmentation par la cofiline sur filament - ATP, et agit de manière synergique sur filament - ADP avec la cofiline stimulant la fragmentation (Gandhi et al., 2009). Enfin un autre mode de régulation pourrait être aussi simplement induit par variation de la concentration d'ADF/cofiline. Plusieurs études *in vitro* ont montré qu'à faible concentration, la décoration du filament d'actine par l'ADF/cofiline est discontinue conduisant à sa fragmentation. A l'opposé, à forte concentration, le filament d'actine est alors saturé d'ADF/cofiline, cela change sa mécanique certes en le rendant plus flexible mais n'induit pas de fragmentation (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Chan et al., 2009; McCullough et al., 2008).

### 3.4. Bilan sur le lamellipode et apport des modèles reconstitués bio-mimétiques

Nous venons d'aborder quelques détails de la complexité et de la diversité de l'assemblage et du désassemblage des réseaux d'actine dans ces magnifiques machines biomécaniques que sont les cellules. Arrêtons nous un moment pour faire le point sur une architecture cellulaire sur laquelle je suis revenue à plusieurs reprises dans les chapitres précédents: le lamellipode.

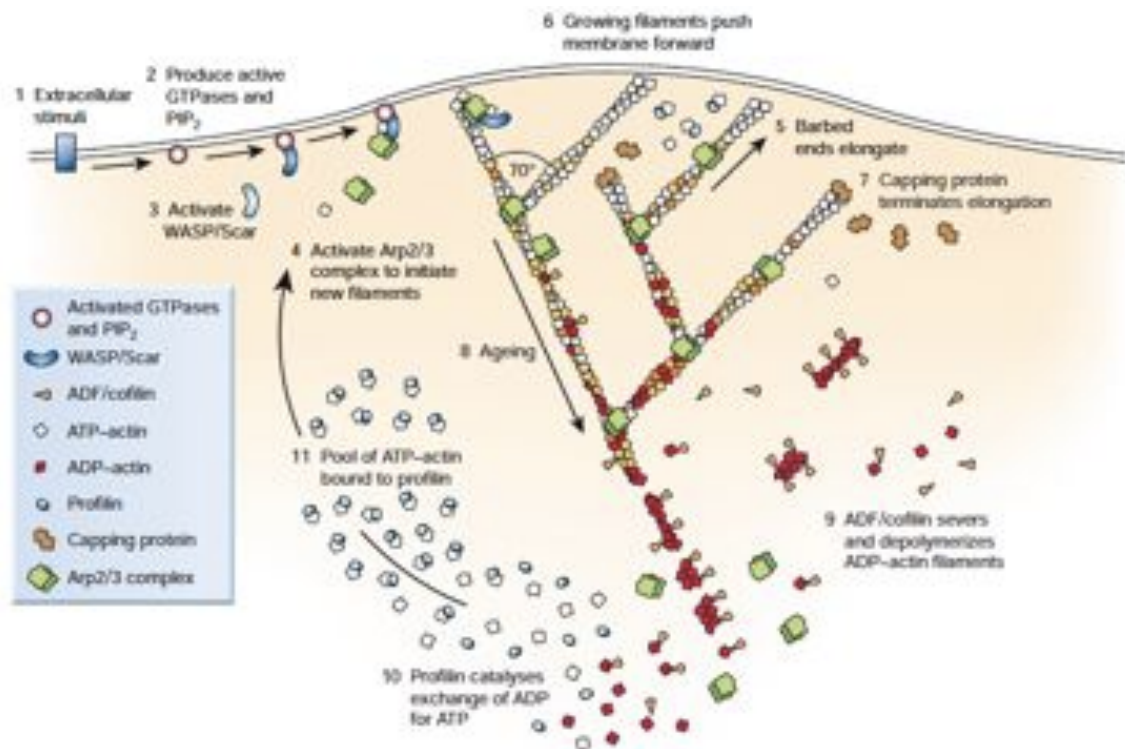
Le lamellipode se différencie clairement du reste du cytosquelette cellulaire par sa combinaison d'une architecture bien spécifique (large bande presque en 2D de filaments branchés) et un remodelage de l'ensemble de sa structure ("turnover") extrêmement rapide. Deux paramètres qui lui confèrent sans doute son rôle de production de force essentiel à la motilité cellulaire (mesure de force *in vivo*, (Prass et al., 2006)).

Situé juste en dessous de la membrane plasmique, le lamellipode est une structure à l'architecture finement régulée par une action coordonnée de diverses protéines régulatrices de la dynamique de l'actine. La machinerie du processus de nucléation dendritique peut-être séparée en deux catégories, spatialement et temporellement distinctes. Une zone de filaments extrêmement courts et branchés avec localisation abondante du complexe Arp2/3 et de CP, ainsi qu'une zone plus clairsemée (1.8 fois plus faible) où les filaments semblent plus longs et dans laquelle on retrouve la cofiline ainsi qu'une perte de CP puis du complexe Arp2/3 (Iwasa and Mullins, 2007; Svitkina and Borisy, 1999).



**Figure 13: Lamellipode de kératocyte motile**

Cliché EM montrant l'organisation du cytosquelette d'un kératocyte. A droite, zoom correspondant à la zone encadrée de l'image de droite. Un profil de concentration des protéines clés est présenté. La courbe rouge correspond à une mesure expérimentale de l'intensité d'actine marquée avec une GFP (Watanabe and Mitchison, 2002), la courbe bleue correspond à une prédiction suivant une analyse quantitative (Mogilner and Edelstein-Keshet, 2002), (Pollard and Borisy, 2003).



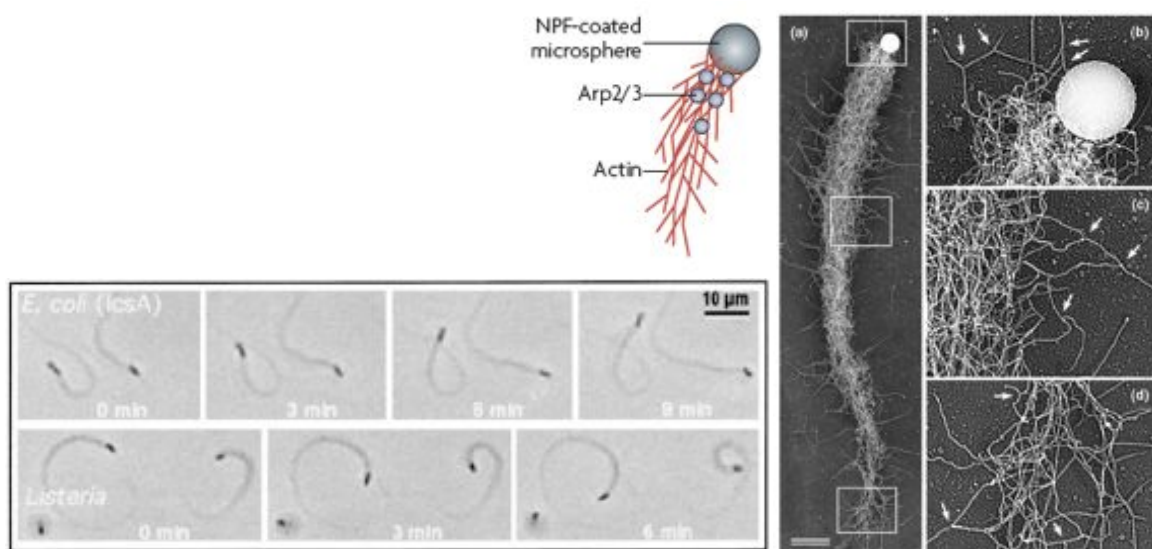
**Figure 14: Modèle de nucléation dendritique**

Ce schéma montre l'assemblage contrôlé au niveau de la membrane cellulaire du réseau d'actine constituant le lamellipode. Description dans le corps du texte ci-dessous (Pollard, 2003; Pollard and Cooper, 2009).

Suite à la signalisation et au recrutement et activation de complexes protéiques à la membrane, les zones de nucléation se forment. Dans un premier temps l'activation des récepteurs membranaires et des facteurs transmembranaires telles que les protéines GTPasiques de la famille Rho, recrutent à la membrane des protéines telles que celles de la famille WASP/Scar, qui à leur tour recrutent et activent le complexe Arp2/3. Vient ensuite la formation abondante de branches sur le réseau de filaments préexistants (Rohatgi et al., 1999). En s'allongeant les filaments produisent une énergie libre transformée en travail qui déforme la membrane lipidique et propulse la cellule. L'élongation de ces filaments est stoppée par l'action de coiffe de CP. Vient ensuite la phase de désassemblage. Alors que les filaments vieillissent (transition ATP→ADP des nucléotides associés aux sous-unités), on observe la décoration progressive de la structure par la cofiline notamment au niveau des régions ADP. Celle-ci induit des fragmentations successives, des pertes de branches et accélération du "turnover" des protéines, ce qui, sans doute aidé par ses protéines régulatrices, initie le recyclage des monomères d'actine. La profiline parachève la boucle par remplacement des nucléotides liés aux monomères libérés (ADP versus ATP). Tout cela en moins d'un micromètre, soit un temps de vie des filaments d'une trentaine de secondes. Si l'on a vu que l'on ne peut pas parler de "treadmilling" à l'échelle du filament, certains caractérisent cet état global quasi-stationnaire où polymérisation et désassemblage sont également balancés de chaque côté, d' "array treadmilling" (Mullins et al., 1998; Svitkina and Borisy, 1999; Watanabe and Mitchison, 2002).

Dans l'histoire de la recherche visant à la compréhension de ce système complexe de la motilité cellulaire, la reconstitution *in vitro* de la motilité à partir d'un jeu minimal de protéines purifiées (Loisel et al., 1999) fut un tournant majeur. Cela fut rendu possible grâce à

l'étude d'une bactérie pathogène, *Listeria monocytogenes*. Cette bactérie est internalisée dans une cellule eucaryote, puis détourne la machinerie cellulaire cytoplasmique afin de générer une comète d'actine capable de la propulser dans le cytoplasme de la cellule hôte (Theriot et al., 1992). En ouvrant la porte aux systèmes reconstitués, dits bio-mimétiques (car mimant le phénomène biologique étudié), cette étude a permis une compréhension accrue des paramètres importants pour la motilité par polymérisation de l'actine, aussi bien d'un point de vue biochimique (localisation, importance et interactions des protéines associées) que d'un point de vue physique (mesure de forces, réflexion sur les paramètres physiques mis en jeu, principe de la brisure de symétrie) (Akin and Mullins, 2008; Bernheim-Groswasser et al., 2002; Delatour et al., 2008; Parekh et al., 2005). Beaucoup de ces systèmes biomimétiques reproduisent la motilité induite par polymérisation d'actine (gel) sur de petits objets greffés de NPF en utilisant Arp2/3 comme nucléateur de la polymérisation (figure 15).



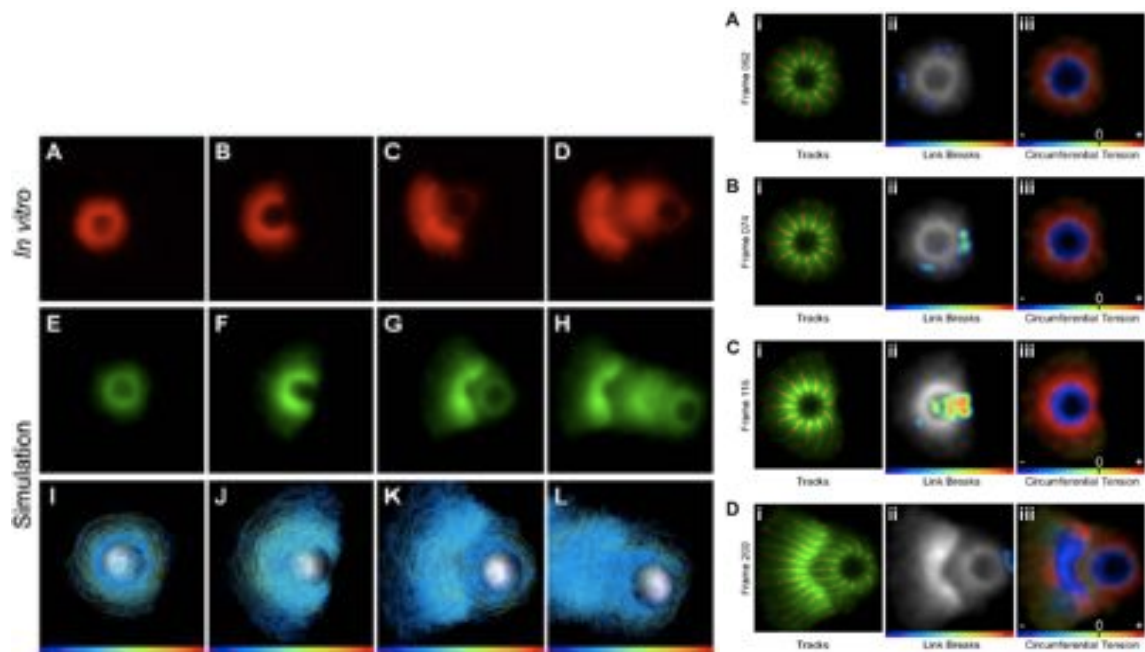
**Figure 15: Système biomimétique de particules propulsées par la polymérisation d'actine**

Sur la gauche, clichés de microscopie en contraste de phase montrant la motilité de pathogènes induite par polymérisation d'actine dans un milieu reconstitué composé de protéines purifiées (Loisel et al., 1999). Sur la droite, cliché EM d'une bille de polystyrène attachée à sa comète d'actine nucléé par le complexe Arp2/3 en extrait acellulaire (Cameron et al., 2001).

La meilleure connaissance des contraintes physiques et de la balance des forces (force élastique et force de friction) ont permis par exemple l'élaboration d'un modèle de propulsion élastique et l'explication du phénomène de brisure de symétrie rendant possible la transition entre une croissance isotrope d'actine et un mouvement dirigé et constant (Noireaux et al., 2000; van Oudenaarden and Theriot, 1999).

Plus récemment l'importance de la modélisation ou modèle mathématique (Mogilner and Edelstein-Keshet, 2002; Mogilner and Rubinstein, 2005) a permis d'étudier en détails et notamment d'un point de vue quantitatif, la pertinence des mécanismes suggérés dans lesquels une régulation et un contrôle spatial de la nucléation, de la polymérisation et du désassemblage d'un réseau d'actine aboutit à la production de force (protrusion membranaire) dans les cellules. Un des résultats majeurs de ces études est la nécessité d'une densité optimale d'extrémités barbées dynamiques de filaments pour une protrusion maximale. Un moyen

simple et rapide pour la cellule de réguler la transition vers un état motile ou de modifier la direction du mouvement serait donc possible grâce à une régulation fine de la densité en extrémités barbées non coiffées. Le terrain des systèmes reconstitués fut également propice à de nombreuses simulations (Dayel et al., 2009).



**Figure 16: Simulation numérique du processus de brisure de symétrie suivie de la propulsion de microsphère par polymérisation d'actine**

A gauche, comparaison d'une expérience de propulsion de microsphère par polymérisation d'actine faite *in vitro* (rouge, fluorescence de l'actine) et du résultat d'une simulation numérique (verte). A droite, détails du processus de brisure de symétrie *in silico*: représentation du gel d'actine (i), avec quantification de la tension accumulée (iii) et de la quantité de liens brisés au sein de cette structure (ii), maximale lors de la brisure globale du gel isotrope assemblé autour de la particule (en Cii) (Dayel et al., 2009).

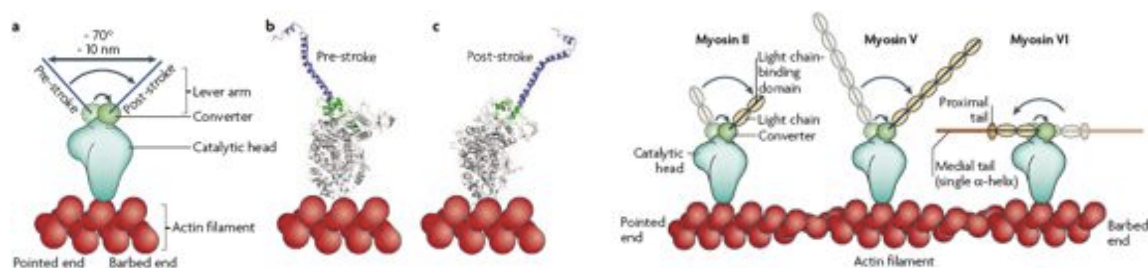
Je me suis intéressée dans les chapitres précédents à vous montrer comment la polymérisation de l'actine peut être un élément moteur capable de générer des forces notamment au cours de la motilité cellulaire. Mais ce n'est évidemment pas le seul mécanisme capable de produire des forces dans la cellule. En effet, la cellule possède des protéines que l'on appelle des moteurs moléculaires qui, dans le contexte de l'actine, appartiennent à la famille des myosines.

## 4. Contraction induite par myosines

### 4.1. Principe et mécanique du moteur moléculaire

Les moteurs moléculaires sont des machines biologiques remarquables qui en se fixant sur un filament du cytosquelette utilisent l'énergie dérivée de cycles répétés d'hydrolyse d'ATP pour produire une énergie mécanique suffisante à leur déplacement le long de ce rail moléculaire. Il en existe de nombreuses qui interagissent avec l'actine, les myosines, avec toutes différentes propriétés biochimiques, structurales et fonctionnelles. Au sein d'une cellule trois fonctions principales reposent essentiellement sur l'action des myosines: (i) en tant que moteur de la contraction (ii) en tant que transporteur de particule ou "cargos" moléculaire (iii) en tant qu'attache mécanosensible entre le cytosquelette et une autre structure (membrane, points focaux d'adhésion).

La partie motrice de la myosine est présente dans la partie N-terminale, ou tête de la chaîne lourde, qui contient également le site de liaison au nucléotide. Alors que la partie C-terminale, ou queue, contient le site de liaison aux différents partenaires, notamment avec les cargos. Entre les deux se trouve une ou plusieurs chaînes légères, ou cou, qui confère au moteur moléculaire sa flexibilité. Des études cristallographiques ont montré que ce domaine subit un mouvement de rotation durant la transition faible à forte liaison au filament, jouant ainsi le rôle de bras de levier exerçant la force motrice ("power stroke") par amplification des changements conformationnels du cycle catalytique induits par la liaison à l'ATP, l'hydrolyse et la dissociation des produits, schéma ci dessous figure 17, (Dominguez et al., 1998; Geeves and Holmes, 1999; Rayment et al., 1993a).



**Figure 17: Principe du bras de levier**

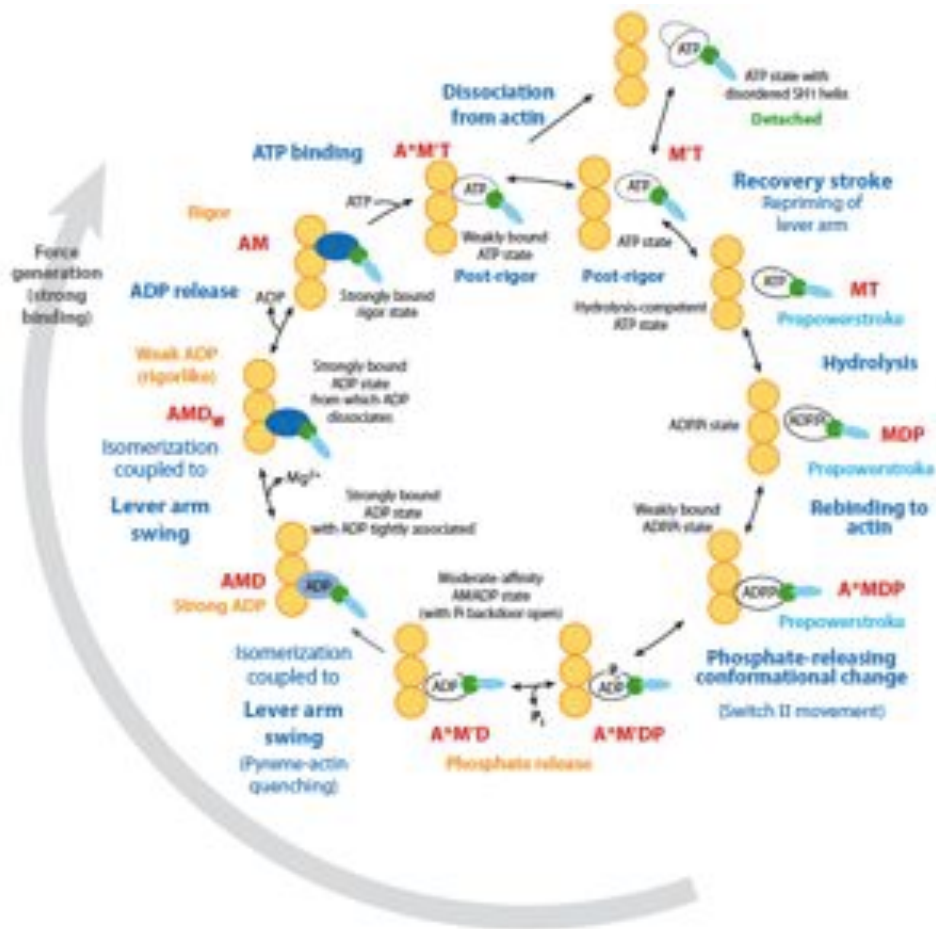
Schéma fonctionnel du principe de bras de levier pour la myosine II (a) et comparaison avec les myosines V et VI (d). Description dans le corps du texte ci-dessus. (b et c) montrent la structure de la myosine II dans ses deux conformations (basé sur les travaux de (Dominguez et al., 1998; Rayment et al., 1993a; Rayment et al., 1993b; Spudich and Sivaramakrishnan, 2010)

Il existe deux types de myosines, les conventionnelles qui forment de manière spontanée de larges assemblages bipolaires via une homo-oligomérisation des queues (comme les myosines II) et les non conventionnelles qui n'en sont pas capables mais dont certaines peuvent se dimériser (myosines à deux têtes comme la myosine V et VI).

Liée à l'ATP la myosine reste détachée du filament d'actine et l'interaction entre les deux induit la dissociation du phosphate et le début d'un cycle cinétique, voir figure 18. Au sein de ce cycle, l'affinité des états intermédiaires réactionnels de la myosine pour le filament



d'actine dépend de son état nucléotidique (d'une manière simplifiée, ATP = faible liaison et ADP = forte liaison). La génération de force (mouvement du bras de levier ou "Lever arm swing") coïncide avec la dissociation du phosphate durant la transition faible à forte liaison.



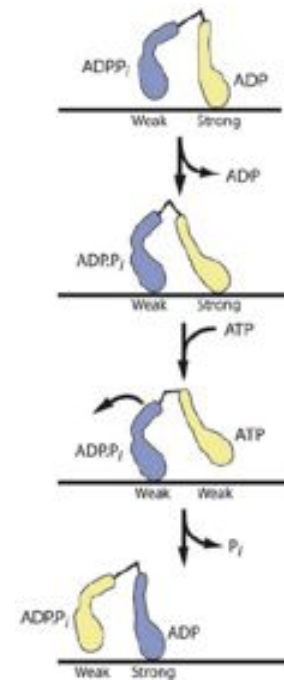
**Figure 18: Schéma réactionnel du fonctionnement de la myosine**

La génération de force par la myosine se fait de manière cyclique grâce à un couplage entre l'état du nucléotide auquel elle est associée, entraînant des changements conformationnels de la myosine, et la force de liaison au filament d'actine. Les états pour lesquels la myosine est liée à l'actine et à l'ATP (A.M.T) ou après hydrolyse (MDP) sont des états intermédiaires "pré-force" de faible liaison, qui se détachent et s'attachent sur le filament à une échelle sous la microseconde. Les états actine – myosine sans nucléotide (AM) ou lié à l'ADP (AMD) sont des intermédiaires s'attachant fortement au filament de manière stéréospécifique avec une affinité sous le micromolaire (Sweeney and Houdusse, 2010b).

Si toutes les myosines suivent globalement le même cycle cinétique, les vitesses de transition entre les différents états sont fortement variables. Ceci permet une adaptation cinétique des myosines à de nombreuses fonctions cellulaires, en effet, en plus de modifier la vitesse à laquelle se fait le cycle ATPasique cela permet de faire varier le temps durant lequel la myosine reste dans un état fortement lié au filament, état de rigidité, qui génère la production de force (Huxley, 1969). Le temps relatif d'occupation entre l'état de rigidité et la dissociation du filament est appelé "duty ratio". Un "duty ratio" élevé rend compte d'un temps de résidence important sur le filament ce qui confère aux myosines la propriété d'être processive. C'est à dire ayant la capacité de réaliser une succession de cycles en avançant un pas devant l'autre sur le même filament ("in a hand over fashion"), puisqu'à duty ratio élevé

lorsqu'une tête se détache lors de la fixation de l'ATP et avant que celle-ci ne se rattache sur une sous-unité en aval, la probabilité que la deuxième tête se détache également est très faible (figure 19). En coordination avec le cycle d'hydrolyse du nucléotide, une variation de conformation s'opère au sein de la myosine entre des états où elle est solidement fixée sur le filament et des états où elle n'est pas liée. Si de tout temps, l'on a cru que la relation entre structure et nucléotide associé au moteur moléculaire était simple, de récentes études tendent à montrer que tout n'est pas aussi clair (Nesmelov et al., 2011).

**Figure 19: Processivité de la myosine sur un filament d'actine**  
 Marche un pas devant l'autre. (De La Cruz Sweeney 2001)

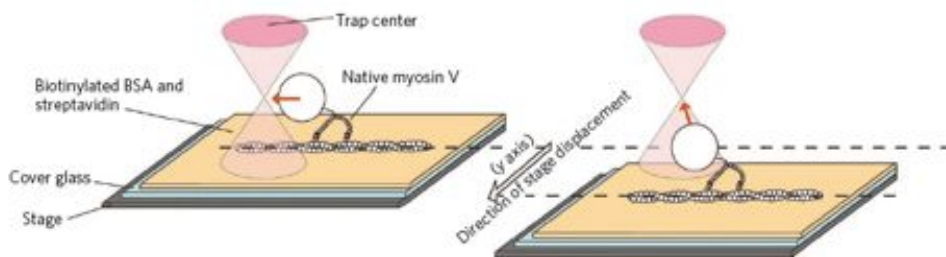


D'une manière générale, la vitesse à laquelle une myosine se déplace le long d'un filament d'actine dépend de trois paramètres: le déplacement par cycle d'ATP (pas de la myosine,  $d$ ), du "duty ratio" ( $f$ ) et du temps global du cycle ATPasique (activé par sa liaison avec l'actine).  $V = \frac{d \cdot k_{ATPase}}{f}$ . Une mesure

indépendante de ces trois paramètres aboutit la plupart du temps à une bonne estimation de cette vitesse de déplacement (en accord avec les données expérimentales). Cependant les mesures effectuées témoignent de larges gammes de vitesses pour l'ensemble des myosines et des conditions expérimentales (concentrations en ATP et ADP, concentration en calcium, charge appliquée sur la myosine...). Il se pourrait que certaines myosines adaptent leur vitesse de déplacement afin de pouvoir effectuer diverses fonctions cellulaires, ce qui expliquerait qu'une même myosine est capable d'accomplir par exemple à la fois la fonction de transporteur et d'ancrage selon l'environnement dans laquelle elle se trouve. En supplément d'un contrôle biochimique, l'idée que le processus de régulation et de tri de l'activité des diverses myosines *in vivo* est également régulé par l'architecture du réseau d'actine sur lequel elles interagissent, fait aussi peu à peu son apparition (Brawley and Rock, 2009; Nagy et al., 2008). Voici comment des paramètres biomécaniques (telles géométrie, densité, polarité, présence de protéines de pontage) au sein d'une cellule serviraient de régulateur de l'activité des moteurs moléculaires.

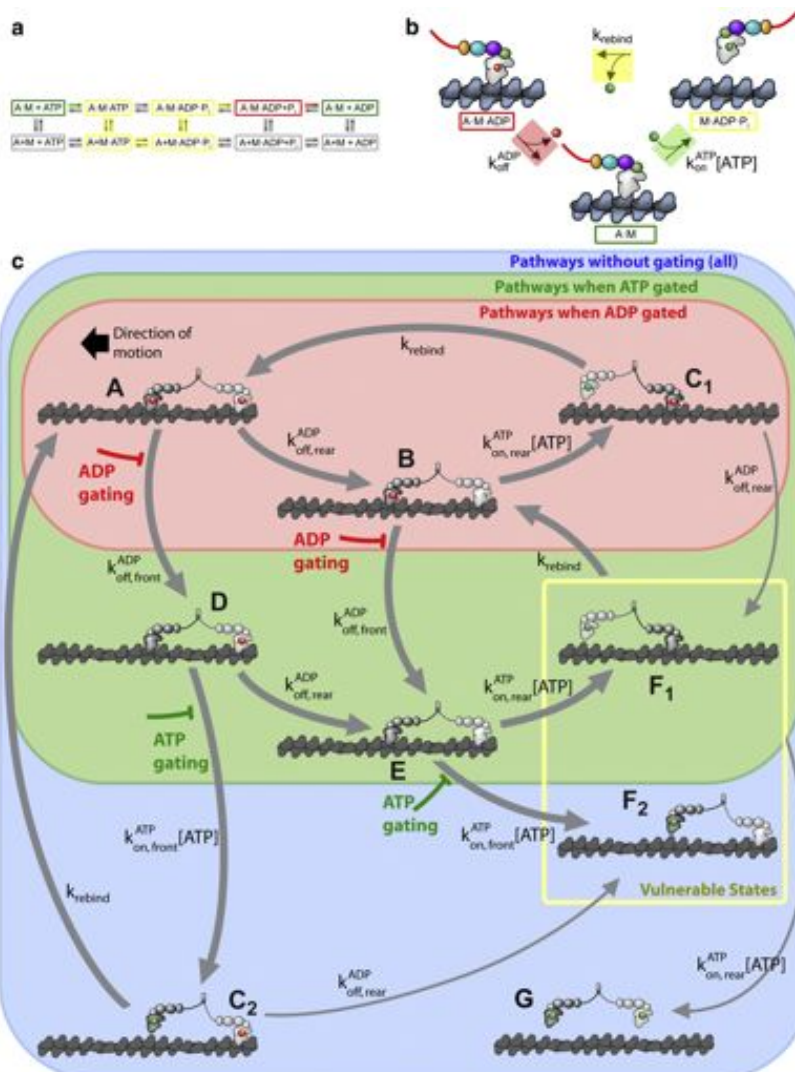
Le degré de processivité d'une myosine peut également être augmenté par une communication efficace entre les deux têtes d'une même myosine, selon un processus appelé "gating" (De La Cruz et al., 2001; Elting et al., 2011; Robblee et al., 2004; Veigel et al., 2002). Le moyen de communication pour ce faire, repose sur un stress intramoléculaire estimé à 2 pN qui se développe grâce à la connexion physique entre les deux têtes et qui bloque la première tête de myosine dans un état lié au filament (soit dans son état de liaison avec MgADP avec inhibition de la dissociation de cet ADP soit par inhibition de la liaison avec l'ATP) jusqu'à ce que la tête suivante se détache de celui-ci (figure 21). Les étapes faisant intervenir un mouvement du bras de levier de la myosine sont également sensibles à la charge portée par la myosine ce qui confère à ces moteurs moléculaires la propriété d'être mécano-sensible (Dunn et al., 2010; Oguchi et al., 2010; Purcell et al., 2005; Watanabe et al., 2010). En effet, la présence d'un poids accru défavorise la dissociation de l'ADP puisque celle-ci est couplée au mouvement du bras de levier, augmentant ainsi le "duty ratio" de la myosine. Les expériences de pinces optiques sur moteur moléculaire unique sont un outil particulièrement adapté à l'étude des mécanismes de processivité, de transition biochimique et

de couplage force-vitesse (figure 20 et (Dunn et al., 2010; Oguchi et al., 2010; Purcell et al., 2005; Watanabe et al., 2010)).



**Figure 20: Senseur des interactions moléculaires entre une myosine processive et un filament d'actine à l'aide de pinces optiques**

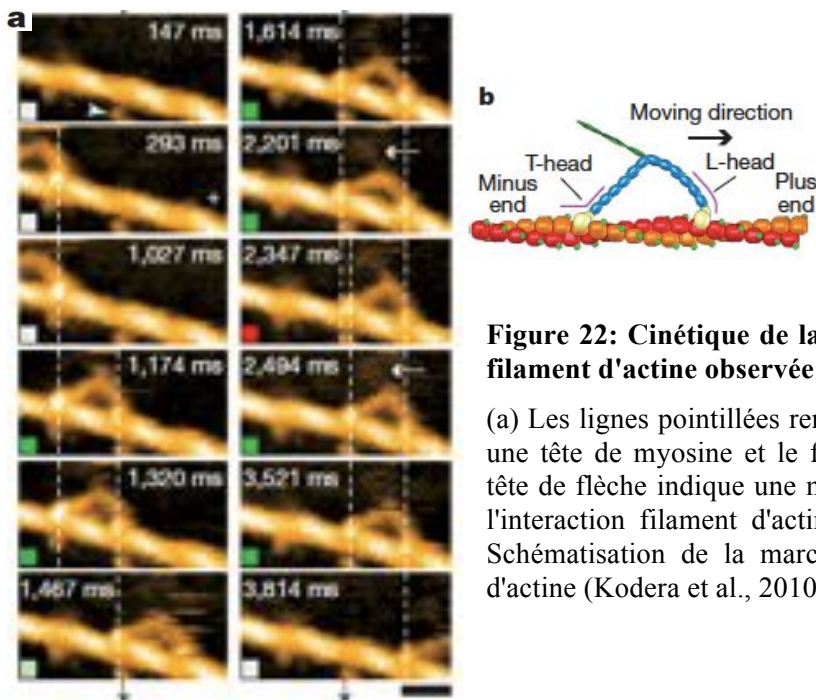
Des filaments d'actine sont fixés à l'aide de liens streptavidine biotine à la surface de la lamelle de verre. La bille greffée du moteur moléculaire (myosine V) est piégée dans une pince optique. Il est alors possible soit de suivre précisément le mouvement de la myosine soit de lui appliquer une résistance connue et visualiser son impact sur la processivité du moteur moléculaire (Oguchi et al., 2010).



**Figure 21: Principe du mécanisme cinétique de "gating" lors de la processivité de la myosine VI**

Deux mécanismes sont possibles, un "gating" par inhibition du détachement dans un état ATP ou ADP. Un code couleur distingue les trois états de la myosine vis à vis du filament d'actine en a, b et c. Cas vert: la myosine est attachée au filament en absence de nucléotide. Cas jaune: la myosine est détachée ou interagissant faiblement avec le filament. Cas rouge: la myosine est attachée au filament d'actine en présence d'ADP (Elting et al., 2011).

Une magnifique étude récente a permis la visualisation en temps réel de la course d'une myosine sur un filament d'actine grâce à une technique d'AFM rapide (microscopie à force atomique). Ceci a permis de confirmer diverses propriétés du mouvement de la myosine V, notamment un pas de 36 nm, une marche processive un pas devant l'autre ainsi qu'une meilleure connaissance des détails structuraux de la cinétique du fonctionnement d'un moteur moléculaire ("foot stomp") (Kodera et al., 2010).



**Figure 22: Cinétique de la marche d'une myosine V sur un filament d'actine observée en AFM rapide.**

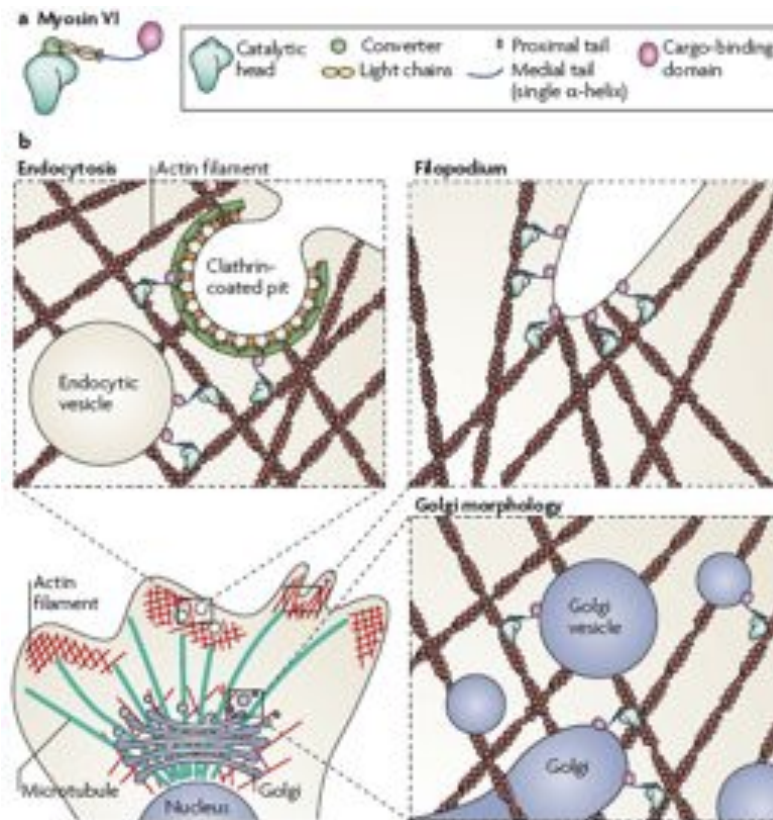
(a) Les lignes pointillées rendent compte de l'attachement entre une tête de myosine et le filament d'actine. Barre, 30 nm. La tête de flèche indique une molécule de streptavidine stabilisant l'interaction filament d'actine – lamelle (image "147 ms). (b) Schématisation de la marche de la myosine sur le filament d'actine (Kodera et al., 2010).

D'autres techniques d'imagerie ont également récemment permis une amélioration des observations, par exemple grâce au (TR)<sup>2</sup>FRET ("transient time-resolved FRET") une meilleure résolution en espace et en temps a permis la visualisation directe entre structure des états transitionnels de la myosine II et cinétique des transitions biochimiques (réaction ATPasique) (Nesmelov et al., 2011). Cette technique repose sur un marquage de la myosine à l'aide de deux sondes couplées énergétiquement. Une fois en présence d'ATP, la distance intersondes est rapidement mesurée à l'aide du FRET lors des changements conformationnels du bras de levier ("recovery stroke") avec une résolution importante d'un point de vue temporel et spatial. Cette étude a notamment remis en question le couplage fort entre les états structuraux et biochimiques de la myosine, par la découverte d'une coexistence de deux états structuraux intermédiaires pour un seul état biochimique (M-ATP). L'avancée énorme des technologies d'observation de ces dernières années change peu à peu l'échelle de la recherche en biologie; le domaine très vaste des moteurs moléculaires semble désormais aussi avoir directement accès à une observation de protéine unique à l'échelle moléculaire lors de son fonctionnement (O'Connell et al., 2007; Sweeney and Houdusse, 2010b).

## 4.2. La myosine VI : double tête processive

La capacité de processivité de certaines myosines est essentielle à de nombreuses fonctions cellulaires. Permettant une interaction de longue durée avec un même filament d'actine, elle accroît l'efficacité de la production de forces. Par exemple: allonger la durée de transport d'un cargo sur un même filament accroît la directionnalité de ce transport, ou augmenter le nombre de cycles sans dissociation du filament accroît l'efficacité de l'ancrage ou du phénomène de contraction avec un nombre minime de myosines. Deux modèles de myosines processives ont été largement étudiées, la myosine V et la myosine VI. Leur mode de fonctionnement étant similaire, à la directionnalité près, j'ai choisi ici de présenter la myosine VI puisqu'il s'agit de la myosine que j'ai principalement utilisée au cours de ma thèse.

La myosine VI est impliquée dans une large variété de processus cellulaires, incluant la migration cellulaire (notamment de certaines lignées cancéreuses), la maintenance des contacts cellule - cellule contenant la cadherine (Maddugoda et al., 2007), l'endocytose clathrine dépendante (Buss and Kendrick-Jones, 2008; Buss et al., 2001), la maintenance du Golgi ou du stereocilia de l'oreille interne (Sahlender et al., 2005; Warner et al., 2003). De plus, il a été montré que deux pathologies, la surdité et la cardiomyopathie, sont liées à des mutations de la myosine VI (Avraham et al., 1995; Hertzano et al., 2008; Mohiddin et al., 2004). La myosine VI est une myosine proche de la myosine V, sans doute la myosine non conventionnelle très processive la mieux caractérisée, à un détail près: sa directionnalité en sens opposé, ce qui fait d'elle la seule myosine à marcher vers l'extrémité pointue des filaments d'actine.



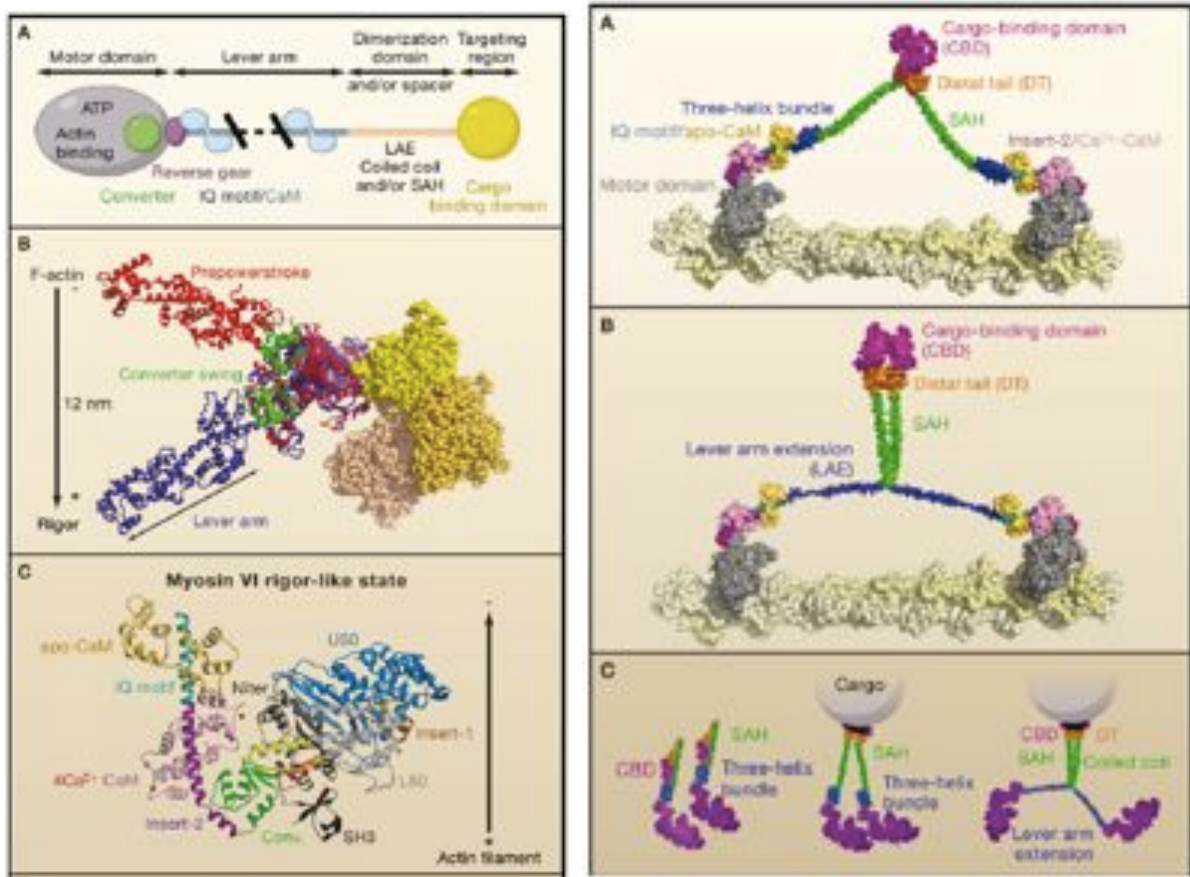
**Figure 23: La myosine VI, un moteur moléculaire multi-fonctionnel**

(a) Schéma de la structure de la myosine VI. (b) Schéma de différentes fonctions de la myosine VI dans la cellule (transport de vésicules endocytiques ou du Golgi, ancrage et stabilité de filopodes) (Spudich and Sivaramakrishnan, 2010).

Comparons le fonctionnement de la myosine VI avec la myosine II conventionnelle, "skeletal and smooth muscle myosin". La myosine II a un duty ratio d'environ 0.05 selon les isoformes, et ne reste donc que 10 à 20 % de son cycle attachée au filament d'actine. Clairement cela est optimum pour le fonctionnement du tissu musculaire au sein duquel les myosines sont organisées en myofilaments et où de nombreuses têtes sont engagées simultanément avec le même filament d'actine afin de produire une contraction rapide. Les têtes doivent interagir rapidement avec lui et se détacher de manière à ne pas freiner le déplacement induit par les autres têtes de myosines. Alors qu'au contraire la myosine VI utilise son "duty ratio" élevé 0.8, résultant d'une dissociation de l'ADP lente et limitante, et d'une liaison à l'ATP faible et lente, afin de maintenir une interaction continue avec le même filament d'actine (attachement au filament durant 90 % de son cycle). L'ensemble des paramètres cinétiques de la myosine VI a été décrit en détails par une étude complète d'Enrique De la Cruz (De La Cruz et al., 2001). De plus, grâce à une région "coiled-coiled" de sa queue qui pourrait permettre la dimérisation de deux têtes à "duty ratio" important ou tout simplement grâce à la liaison de deux moteurs ou plus sur un même cargo, cela produit une unité fonctionnelle hautement adaptée ("duty ratio" quasiment égale à l'unité) en vue d'un déplacement processif efficace (figure 24). C'est pourquoi il s'agit d'une myosine particulièrement adaptée au transport longue distance. Par exemple, un dimère de myosine VI peut se déplacer sur des distances de plus de 200 nm sans se détacher, et une myosine V peut parcourir un filament sur plusieurs micromètres, alors qu'une tête de myosine II se détache à chaque cycle ATPasique. Du fait de son sens de déplacement à l'opposé des autres myosines, la myosine VI permettrait à la cellule d'avoir un moyen de transport efficace à deux sens. De plus, il a été émis que la myosine VI dimérique pourrait posséder la capacité de maintenir les cycles catalytiques de ses deux têtes alternativement dans des phases opposées, selon le processus décrit plus haut comme "gating" qui accentue encore la processivité du moteur moléculaire, processus complexe non complètement connu aujourd'hui (Dunn et al., 2010; Elting et al., 2011). Selon plusieurs études, la processivité de la myosine VI pourrait être finement régulée par la charge qui s'exerce sur elle, faisant d'elle un moteur mécano-sensible robuste (Altman et al., 2004; Chuan et al., 2010; Iwaki et al., 2009). Selon cette étude, elle serait un transporteur efficace pour des charges de 2 pN maximum, mais agirait en tant qu'ancrage du cytosquelette pour des charges supérieures, faisant quelques pas en arrière avant de se détacher du filament d'actine. De cette manière, la myosine VI serait capable de maintenir des tensions de 2 pN et de réduire des forces plus importantes que 2.5 pN.

Cependant, il existe un débat sur la qualification ou non de la myosine VI comme processive (Sweeney and Houdusse, 2010a). L'analyse de la séquence primaire de celle-ci a révélé la présence d'une large région "coiled-coil" de sa queue similaire à celle de la myosine V et II. Ce motif est censé assurer la dimérisation des protéines *in vivo*. C'est pourquoi une grande proportion des études de caractérisation a été faite en utilisant une construction artificielle forçant la dimérisation de deux têtes. Cette construction utilise une myosine VI tronquée au niveau de la queue (juste avant le domaine prédit comme "coiled-coil") suivie d'une région "leucine zipper" assurant une dimérisation forte même à faible concentration (De La Cruz et al., 2001). Il apparaît que suivant les conditions, la myosine VI sauvage entière serait capable ou non de garder un mouvement processif et serait capable ou non de se dimériser (Spudich and Sivaramakrishnan, 2010). Notamment en enlevant la partie de liaison au cargo (C-terminale) on pourrait accroître la probabilité de dimérisation jusqu'à 90 %: ce qui suggère que cette région puisse fonctionner comme un moyen de régulation de l'oligomérisation. La myosine VI n'a pas encore révélé tous ses secrets non plus en ce qui concerne son incroyable flexibilité qui lui permet de faire des pas bien plus grands (dans sa forme dimérique 30 à 36 nm et 12 à 18 nm pour une seule tête, soit un swing de son bras de levier de 180° et non 70° comme la myosine II et V) que l'on aurait prédit en se basant sur ses

proportions, c'est à dire la longueur de son bras de levier, qui ne contient qu'une répétition de chaîne légère Calmoduline (10 nm), et la distance entre ses deux têtes dans son état de rigidité (30 nm)(Sivaramakrishnan and Spudich, 2009; Spudich and Sivaramakrishnan, 2010; Sweeney and Houdusse, 2010a).



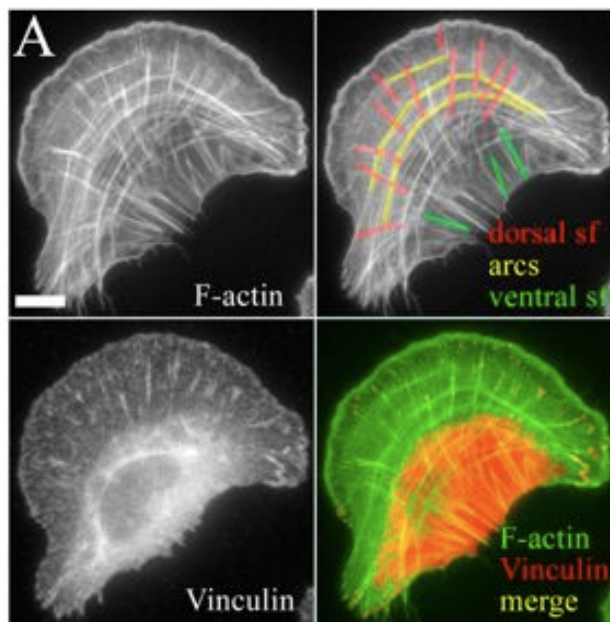
**Figure 24: description de la myosine VI**

Colonne de gauche, schéma des différents domaines fonctionnels (A, moteur et interaction avec l'actine, région de dimérisation et de liaison au cargo moléculaire) et structure de la myosine VI dans les différentes configurations qu'elle peut adopter vis à vis du filament d'actine (B, principe du bras de levier). Colonne de droite, différents modèles de dimérisation de la myosine VI (à l'aide de la région coiled-coil ou d'une particule) (Sweeney and Houdusse, 2010a).

Pour illustrer le lien entre le chapitre précédent traitant de l'organisation de l'actine et ce chapitre sur les moteurs moléculaires, intéressons-nous d'abord à une structure d'actine complexe mise sous tension par des moteurs moléculaires et qui contrôle la réponse mécanique de la cellule: les fibres de stress.

### 4.3. Exemple d'une structure contractile, les fibres de stress

Les fibres de stress me semblent être un exemple très complet, montrant comment l'organisation d'un réseau d'actine en interaction forte avec des moteurs moléculaires aboutit à la génération de forces au sein de structures contractiles, impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires (adhésion, motilité ou morphogénèse). Originellement décrites comme de larges fibres pontées de filaments d'actine, l'on sait aujourd'hui qu'elles sont composées d'un assemblage de courts filaments bipolaires sur lesquels myosine II et  $\alpha$ -actinine forment des patterns alternés (Langanger et al., 1986). Contrairement aux cycles répétés de contraction-relaxation des fibres musculaires, les fibres de stress sont en constante contraction, entrecoupée uniquement d'occasionnelles phases de relaxation et d'allongement. Les cellules de mammifère disposent de trois catégories de fibres de stress: les fibres de stress ventrales attachées aux deux extrémités à des points focaux d'adhésion, les fibres de stress dorsales attachées d'un seul côté à un point focal, et les fibres transverses incurvées, sans lien direct avec les zones d'adhésion cellulaire et subissant un flux rétrograde vers le centre de la cellule (figure 25, (Hotulainen and Lappalainen, 2006)). Au sein d'une cellule, ces trois types de fibres ont une organisation spatiale bien définie. Les fibres ventrales sont à l'arrière dans l'axe de la cellule, responsable de la rétraction de la cellule dans cette zone et associées aux variations de formes de la cellule lors de la motilité. Les fibres dorsales quant à elles sont situées proche et perpendiculairement au bord avant de la cellule. Des études ont montré que ce ne sont pas à strictement parler de réelles fibres de stress puisque aucune contraction n'y a été décelée et qu'elles n'ont pas de patterns typiques  $\alpha$ -actinine-myosine II. Pourtant il pourrait s'agir des fibres précurseurs des fibres ventrales. De plus il semblerait qu'elles servent de lien physique entre le substrat et les arcs transverses qui sont quant à eux parallèles à la membrane cellulaire (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Naumanen et al., 2008).



**Figure 25: L'organisation des fibres de stress au sein d'une cellule ostéosarcoma humaine (U2OS)**

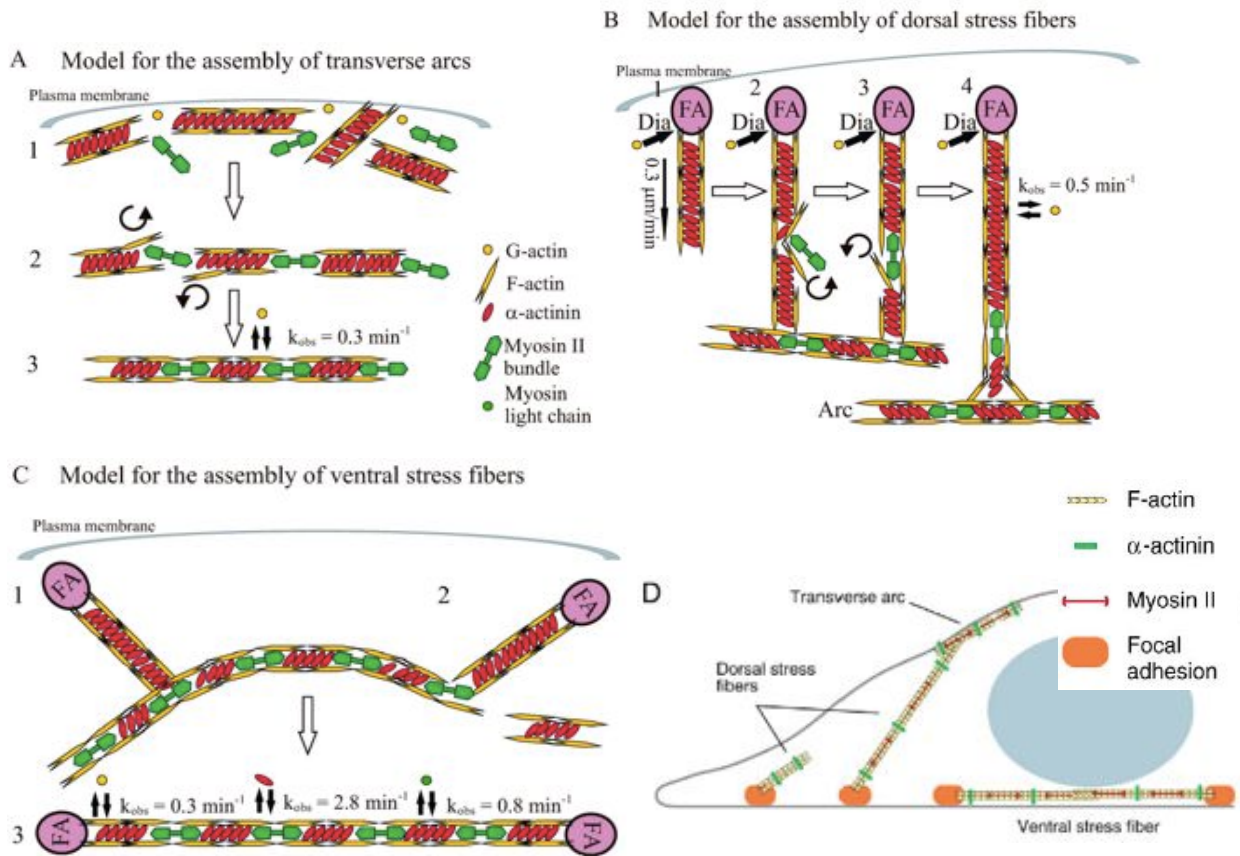
Les filaments d'actine et les points focaux d'adhésion, grâce au marquage de la vinculine, sont visualisés par immunomarquage. Les trois types de fibres de stress dorsales, ventrales et transverses (arcs), sont soulignés par un marquage de couleur dans l'image en haut à gauche. Barre 10  $\mu$ m. (Hotulainen and Lappalainen, 2006)

Les principaux composants des fibres de stress sont l'actine et la myosine II sous forme de myofilaments bipolaires. L'inhibition de la contractilité des myosines résulte en la perte des fibres de stress, ce qui fait de la contractilité un élément indispensable à l'intégrité de ces



structures. D'autres protéines sont également présentes et assurent la maintenance de cette architecture comme l' $\alpha$ -actinine, mutuellement exclusif de la myosine, qui en plus de sa fonction de pontage entre les filaments assurerait le recrutement d'autres protéines comme palladine, ALP ou CLP-36. Diverses tropomyosines sont également présentes et participent à la stabilité des fibres, sans doute par exclusion de l'action de fragmentation de l'ADF/cofiline.

Mais quel est le mécanisme de formation des fibres de stress ? Diverses études ont tenté de répondre à cette question avec des hypothèses plus ou moins proches (Burnette et al., 2011; Hotulainen and Lappalainen, 2006; Small et al., 1998; Svitkina et al., 1997; Verkhovsky et al., 1995). Je serais tentée de dire qu'avec les progrès des techniques d'observation et l'augmentation des connaissances d'un point de vue général, les études les plus récentes ont permis une observation hautement résolutive et une description directe de ces structures. C'est pourquoi je me base ici principalement sur les travaux de Hotulainen & Lappalainen qui, grâce à une étude multi-couleurs de fluorescence sur cellules vivantes et à la technique de FRAP (recouvrement de fluorescence après photoblanchiment), explorent les mécanismes d'assemblage des fibres de stress. Les fibres de stress ventrales s'allongent depuis (ou proche) des points focaux d'adhésion grâce à la présence d'une formine, mDia1/DRF1. A contrario, pour les fibres transverses qui ne sont pas ancrés au substrat, c'est la présence du complexe Arp2/3 qui semble impliquée pour leur formation, révélant ainsi que ces arcs proviendraient d'une réorganisation du réseau d'actine du lamellipode grâce à un processus de raboutage des fibres acto-myosines, l' "annealing". La myosine II étant elle, directement nécessaire à la création de leur flux rétrograde. Pour ce qui est des fibres ventrales, elles dériveraient d'une reconversion des fibres dorsales et des arcs transverses. L'analyse en temps réel montre que les fibres dorsales et les arcs transverses sont en constante formation et désassemblage mais avec des mécanismes complètement différents. Les fibres dorsales s'allongeant de plusieurs microns vers le centre de la cellule à partir d'actine présente au niveau des points focaux d'adhésion. Les vitesses de polymérisation et le flux de matériel au sein de ces fibres, mesurés par FRAP, rendent compte d'une même vitesse issue d'une polymérisation localisée de 0.25  $\mu\text{m}/\text{min}$ , proche de la vitesse de polymérisation *in vitro* en présence de mDia1, 0.4  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Elles recrutent sous forme de "stretch" au court du temps les protéines de pontage puis la myosine II après connexion avec les arcs transverses. Les arcs transverses s'assemblent à partir de courts "bundles" d'actine et myosines ou d' $\alpha$ -actinine provenant du lamellipode et se condensant puis se contractant au fur et à mesure qu'ils suivent le flux centripète. Grâce aux expériences de siRNA, les auteurs ont démontré l'implication de mDia1 et du complexe Arp2/3 dans la formation de ces deux types de fibre de stress. Un traitement à la blebistatine, drogue inhibant l'activité de la myosine, a révélé l'importance de l'activité des myosines pour la maintenance des arcs transverses (et à moindre impact sur les fibres dorsales). Des expériences de FRAP ont montré une dynamique rapide d'association et dissociation des protéines de pontage au sein de ces structures, ce qui permettrait une association progressive de la myosine ainsi que la génération de fibres d'actine bipolaires donc contractiles par glissement ("sliding") des filaments les uns par rapport aux autres. Les fibres ventrales ne semblent pas issues d'une polymérisation *de novo* mais plutôt du remodelage des fibres de stress préexistantes.



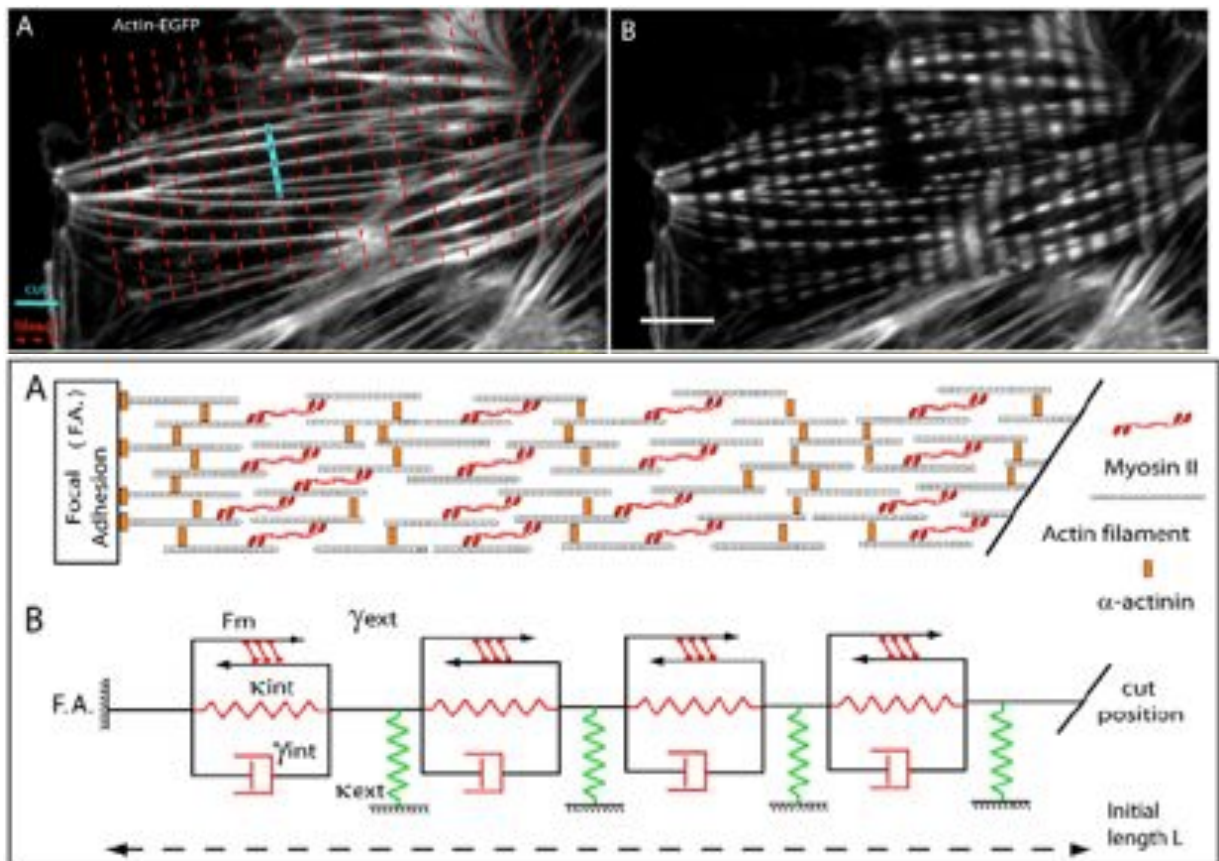
**Figure 26: Modèle d'assemblage des fibres de stress**

(A, B et C) représentent respectivement les mécanismes d'assemblage de fibres de stress transverses, dorsales et ventrales (Hotulainen and Lappalainen, 2006). (D) schématise leur positionnement au sein de la cellule, vue en coupe. Explication dans le corps du texte. Ces processus reposent sur le rôle majeur de la myosine dans l'assemblage de ces structures (Pellegrin and Mellor, 2007).

Une étude plus récente utilisant une technologie innovante (photo-conversion d'actine modifiée par le fluorophore tdEos) (Burnette et al., 2011) a confirmé le mécanisme de formation des arcs transverses, dans des cellules motiles, en mettant en évidence une zone de transition d'un réseau déstructuré mais polarisé en une organisation alignée sans orientation préférentielle des filaments. Ce mécanisme illustre la transformation graduelle du réseau branché du lamellipode en des arcs orientés parallèlement à la membrane cellulaire. Un remodelage spatio-temporel effectivement induit par l'action des myosines II mais également lié aux brefs mouvements de rétraction de la membrane cellulaire, les arcs étant initiés par vagues successives après chaque rétraction. La nouveauté de cette étude tient également du fait de l'implication des points focaux d'adhésion d'une part pour la génération de forces (comme points d'ancrage pour la propulsion) et également en tant que frein mécano-sensitif puisque ceux-ci glissent progressivement, emportés par les arcs, de manière proportionnelle à la force de l'adhésion avec le substrat extracellulaire.

Diverses études ont également décrit les propriétés physiques des fibres de stress, notamment à l'aide d'une technique communément appelée nano-chirurgie, consistant à sectionner grâce à un faisceau laser une seule fibre de stress, dans une cellule vivante, afin de visualiser sa rétraction, qui témoigne de la tension engagée au sein de ces structures contractiles et de leurs propriétés viscoélastiques (voir figure 27) (Colombelli et al., 2009; Tanner et al., 2010). Colombelli et ses collaborateurs ont par exemple prouvé l'existence d'un

couplage fort entre recrutement de protéines (comme la zyxin qui interagit avec l' $\alpha$ -actinine) et la charge mécanique ou tension d'une fibre de stress. L'équipe décrit donc celles-ci comme de véritables plates formes mécano-sensibles capables de répondre aux forces intracellulaires. Par leur contraction non uniforme et un couplage fort et rétroactif avec leur environnement (via les points focaux d'adhésion dont la formation peut, par exemple, être générée ou désassemblée par une rétraction de fibre), les fibres de stress ne peuvent pas être vues comme de simples ressorts connectant divers points d'adhésions cellulaires. Elles forment un véritable réseau mécaniquement interdépendant et connecté à l'ensemble du cytosquelette d'actine et à la matrice extracellulaire, permettant de communiquer (transmission de forces) rapidement sur des échelles de plusieurs micromètres.



**Figure 27: Rétraction d'une fibre de stress de cellule épithéliale exprimant de l'actine-GFP après photoblanchiment et nanoablation laser**

En haut: (A) Cliché avant dissection (B) Cliché 120 secondes après la coupe et le début de la rétraction. En bas: Modèle viscoélastique basé sur une succession en série d'unités contractiles, permettant d'interpréter les données de rétraction des fibres de stress: modélisées par un ressort, une résistance mécanique, des forces contractiles induites par la myosine ( $F_m$ ) et des liens élastiques avec le substrat (modélisés par des ressorts verts) (Colombelli et al., 2009).

Dernier point à propos des fibres de stress, s'il s'agit bien de fibres contractiles nécessaires à la maintenance d'une architecture cellulaire, il faut préciser que celles-ci ne sont pas visibles dans toutes les conditions, ni ne sont véritablement à l'identique dans tous les types cellulaires. Les cellules doivent être suffisamment étalées pour qu'apparaissent des fibres de stress reliant différents points focaux d'adhésion (§5.1, (They et al., 2006)).

## **5. Complexité du contrôle de la morphogénèse cellulaire**

Au cours des chapitres précédents, nous nous sommes intéressés à la diversité des acteurs impliqués dans l'assemblage, le recyclage et la contraction du cytosquelette d'actine, ainsi que les différents types d'organisation de ces réseaux au sein d'une cellule et quels en sont les différents mécanismes de formation. Voyons désormais dans ce dernier chapitre introductif, comment de telles architectures sont construites au cours de trois événements de la morphogénèse cellulaire. Plus précisément comment l'équilibre entre les deux paramètres que sont la géométrie et la biochimie contrôle l'organisation dynamique et donc le devenir d'architectures cellulaires spécifiques. Dans un premier temps, nous verrons comment la géométrie et l'intensité des forces d'adhésion au substrat contrôlent à elles seules l'organisation du cytosquelette de cellules étalées. Dans un second temps, nous verrons comment la biochimie, par une synergie spatio-temporelle de l'action de nombreuses protéines, induit la géométrie fonctionnelle propre à la motilité d'une cellule. Finalement, l'exemple de la dynamique de l'anneau contractile illustre un processus où la biochimie engendre une architecture contractile dont elle contrôle la géométrie, et où réciproquement la géométrie contrôle la composition des protéines au cours du temps.

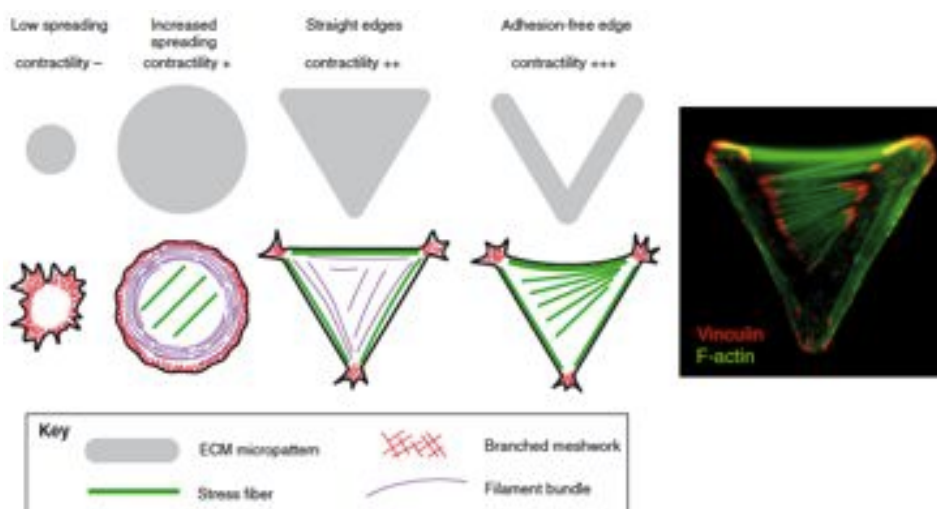
### **5.1 La géométrie d'adhésion contrôle l'architecture cellulaire**

La géométrie cellulaire est un paramètre complexe, extrêmement variable et pourtant des plus important aussi bien lors de la morphogénèse que dans toutes les étapes du développement. L'expression fonctionnelle de mécanismes individuels est sans doute finement régulée par le contexte cellulaire: au travers du cytosquelette acto - myosine, de la membrane cellulaire et des adhésions avec la matrice extracellulaire. Les signaux mécaniques semblent être idéaux pour une coordination des attitudes cellulaires selon une échelle spatiale et temporelle en accord avec la morphogénèse.

En effet, il semble que l'information spatiale et l'environnement des cellules semblent être l'élément déclencheur qui guide en permanence les processus de forme cellulaire et de polarité, notamment durant le processus de division cellulaire au travers de la distribution des éléments de signalisation en lien avec l'adhésion cellulaire (Thery et al., 2007). Les points focaux d'adhésion sont de véritables senseurs mécaniques de la cellule, s'assemblant et se réorganisant de manière directionnelle en réponse à des forces extérieures comme le montre de nombreuses études de micromanipulation cellulaire (micropipettes, substrats étirés, AFM...) et cela suivant une boucle positive de rétroaction. Ces points focaux d'adhésion sont des sites où se concentrent abondamment des récepteurs transmembranaires de la famille des intégrines, qui lient la matrice extracellulaire au cytosquelette. Cette interaction est rendue possible grâce à de nombreuses autres protéines adaptatrices ou d'ancrage (plus d'une cinquantaine connues aujourd'hui) formant une véritable plate forme fonctionnelle dynamique. L'organisation spatiale et temporelle des sites d'adhésions au bord avant de la cellule est de plus finement régulée par des cycles d'endocytose des récepteurs et de recyclage faisant intervenir la myosine VI; l'inhibition du trafic endosomal ou du recyclage des points focaux d'adhésion perturbent la polarité cellulaire et la migration. L'adhésion cellulaire dicte à la cellule les zones d'assemblage des réseaux d'actine et de microtubules, construisant ainsi l'architecture cellulaire adaptée à son environnement (mécanique et géométrique).

Si la cohésion d'une cellule, voir d'un tissu, repose sur un équilibre de forces en lien avec son environnement, que se passe-t-il donc si l'on contrôle et modifie cet environnement ? Une technique ayant apporté des réponses significatives dans ce domaine d'étude est la technique du "micropatterning" (utilisation de micro-patrons) qui grâce à l'utilisation de la micro-ingénierie permet de modifier chimiquement les surfaces, généralement non-adhésives, les rendant adhésives suivant des géométries contrôlées de l'ordre du micromètre, en 2D ou 3D, sur support rigide ou mou... L'ensemble des paramètres cruciaux pour une cellule peut être modulé à souhait. En imposant aux cellules des conditions de bords spécifiques, l'on module alors leur volume, leur étalement, leur force d'adhésion avec la matrice extracellulaire. Cela impose des contraintes au cytosquelette cellulaire et influence, via le dédale des voies de signalisation, l'expression de certains gènes et la différenciation cellulaire. Finalement, cette approche permet de reproduire des contraintes de confinement similaires à celles rencontrées dans les conditions *in situ*, puisque les cellules intégrées dans un organisme sont pour la plupart piégées dans un micro environnement structuré.

Si l'on prend l'exemple de Thery et collaborateurs, les auteurs ont étudié l'impact d'une modification de la géométrie des zones d'adhésion (au travers de la forme du micro-patron: C V  $\Delta$  T Y, figure 29) sur le réseau d'actine, via fibres de stress et points focaux d'adhésion. Ils ont notamment utilisé des formes combinant des zones adhésives et non adhésives afin de pouvoir différencier la forme d'une cellule et son adhésion avec la matrice extracellulaire (Thery et al., 2006). Sur toutes ces formes géométriques, les cellules adoptent une forme triangulaire aux contours convexes, mais en y regardant de plus près de nombreuses différences sont présentes.



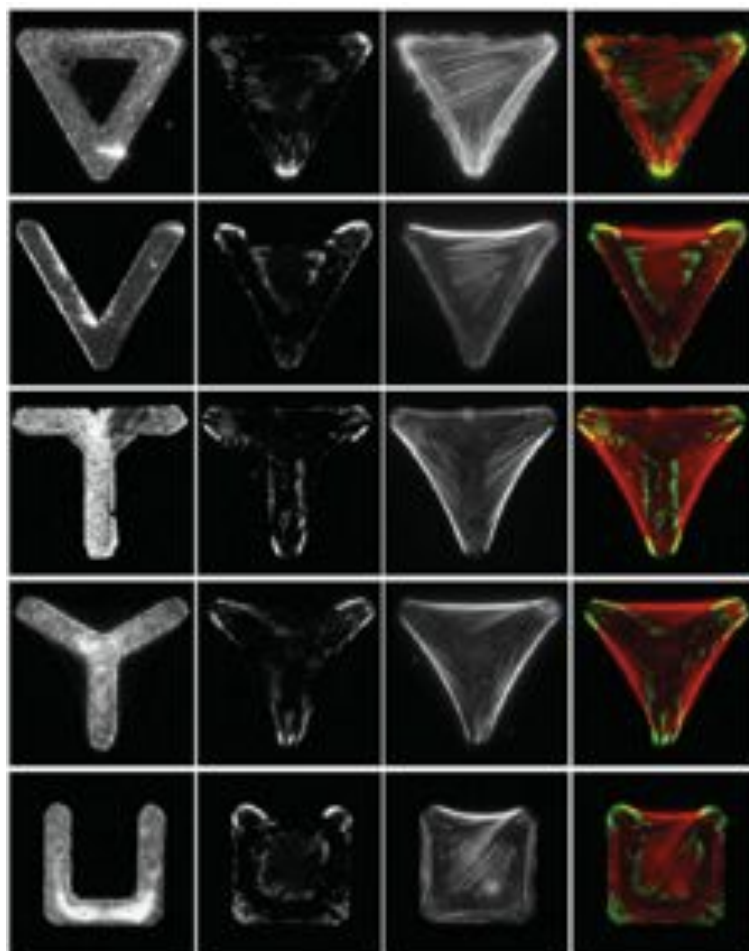
**Figure 28: Effet de la forme de la surface d'adhésion sur l'architecture cellulaire et sa contractilité**

En confinement, la cellule construit principalement un réseau branché. Etalée, la cellule devient contractile et construit de larges fibres de stress dont la localisation dépend de la forme (ronde ou aux bords droits) et de la surface d'adhésion. L'immunomarquage présenté à droite rend compte de la localisation des points focaux d'adhésion (Vinculine) en tant que points d'ancrage aux fibres de stress reliant les différentes zones adhésives. ECM, matrice extracellulaire (Thery, 2010).

La première évidence réside en la manière dont l'adhésion coordonne la distribution de la tension. En effet, les bords adhésifs d'une cellule sont globalement stables, peu tendus et peu sensibles à des modifications de l'activité contractile de la myosine. On y observe une

activité importante d'ondulations membranaires ou "ruffling". A l'opposé, les bords d'une cellule surplombant une zone non adhésive disposent de larges câbles d'actine, dont la courbure est fortement liée à l'activité de la myosine. Les câbles apparaissent comme fortement tendus et permettent de contrer la contrainte des tensions de surface liée à la membrane cellulaire. Donc même si la forme globale de la cellule est la même sur les différentes géométries étudiées (figure 29:  $\Delta, V, T, Y, U$ ), il existe des disparités de tension des fibres inhérentes à un équilibre entre la tension membranaire et la tension interne. Si la tension et la disposition des fibres de stress au sein d'une cellule sont corrélées à des paramètres géométriques liés aux conditions de bords de celle-ci, la distribution des points focaux d'adhésion suit la même influence. Il semble y avoir deux zones de développement important de points focaux d'adhésion dans toutes ces cellules: premièrement au niveau de la périphérie des extrémités de la géométrie cellulaire et deuxièmement, en vis à vis de deux bordures adhésives se faisant face et sous les extrémités des fibres de stress tendus au-dessus d'une zone non adhésive (voir figure 28). Cette corrélation semble témoigner d'un coassemblage progressif des points focaux d'adhésion et des fibres de stress durant l'étalement cellulaire. La méthodologie des "micropatterns" montre que ces comportements sont reproductibles sur un nombre significatif de motifs testés. Pour résumer, la machinerie intracellulaire de traction contrebalance la distribution spatiale extérieure des bords adhésifs jusqu'à un équilibre contractile. Un dernier point qui me semble particulièrement intéressant de noter: toutes les cellules disposent d'une même quantité de filaments d'actine impliqués dans les structures contractiles mais ceux-ci se réarrangent différemment selon une organisation spatiale liée à la géométrie des zones d'adhésion (quantification comparative de la fluorescence de l'actine intégrée dans une cellule).

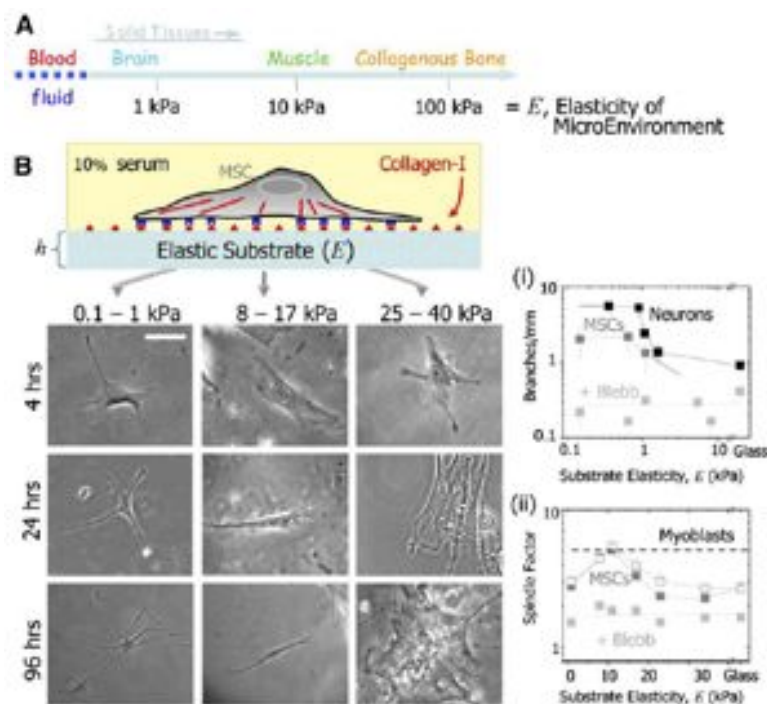
FIBRONECTINE    VINCULINE    ACTINE    MERGE



**Figure 29: Réponse aux asymétries de la forme des zones adhésives sur la localisation des fibres de stress**

Remarquons que les fibres de stress sont en général plus importantes et concaves au-dessus des zones non adhésives. Leur disposition, stabilisée par les points focaux d'adhésion, rend compte fidèlement des conditions de bords des zones adhésives. Le marquage fluorescent de la fibronectine (protéine de matrice extracellulaire) révèle la géométrie du pattern adhésif; le marquage fluorescent de la vinculine révèle la position des points focaux d'adhésion; la dernière colonne est la superposition du signal de la vinculine en vert et de l'actine en rouge (Theyry et al., 2006).

L'étude de Engler et collaborateurs a également permis une avancée significative de la compréhension de l'impact de l'environnement physique de cellules tout en donnant des pistes thérapeutiques potentielles (Engler et al., 2006). Les auteurs ont étudié comment la rigidité du micro-environnement cellulaire, à elle seule, suffit à diriger la différenciation de cellules souches mésenchymateuses en ostéoblastes, en myoblastes ou en neurones (figure 30). Cette induction a lieu grâce au processus de mécanotransduction cellulaire via l'adhésion cellulaire et de manière myosine II - dépendante. Cette différenciation, qui s'opère après une semaine de traitement, a été confirmée par divers marqueurs transcriptionnels spécifiques des différents types cellulaires. Elle témoigne ainsi d'une expression protéique véritablement induite par l'élasticité du substrat de culture. Pour aller encore un peu plus loin vers un aboutissement thérapeutique, d'autres équipes de recherche tentent de reconstituer, grâce à ces techniques, la formation de véritables tissus fonctionnels *in vitro* (Raghavan et al.).



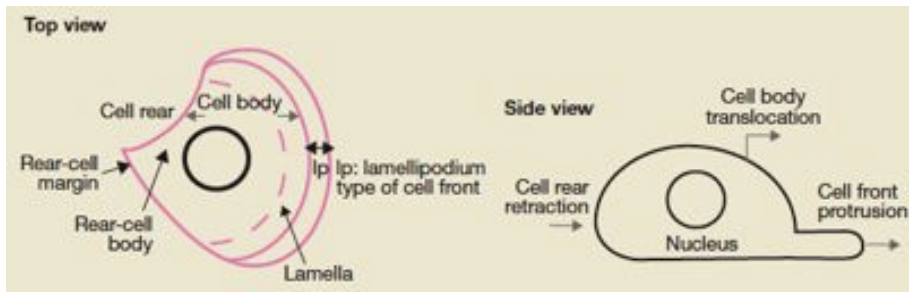
**Figure 30: Différenciation de cellules répondant à l'élasticité du microenvironnement *in vitro***

(A) Élasticité des tissus. (B) Réponse morphologique de cellules souches mésenchymateuses (MCS) à une variabilité de l'élasticité du micro-environnement cellulaire (gel d'acrylamide), comparée (i) à celle de neurones sur support mou et (ii) à celle de myoblastes sur support dur. Cette réponse cellulaire est dans les deux cas liée à l'activité contractile des myosines (inhibition par ajout de blebisatine). Barre 20  $\mu$ m. (Engler et al., 2006)

Selon le type cellulaire, l'élongation de la cellule tout comme la rigidité du substrat sur lequel elle adhère, a un impact différent sur la régulation de sa croissance et de son cycle de division. En effet, They et collaborateurs ont montré que, via une géométrie d'adhésion contrôlée, l'asymétrie des forces corticales (liant les microtubules du fuseau mitotique et les fibres de rétractations connectées aux zones adhésives) permettrait l'orientation du fuseau mitotique selon des lois purement physiques d'équilibrage de forces (They et al., 2007). Se pourrait-il donc que de légères perturbations du micro-environnement cellulaire soient suffisantes pour induire différents signaux capables de faire basculer une cellule d'une transition symétrique à une transition asymétrique ? Ou bien peut-on réellement penser que cette transition serait uniquement régulée par des facteurs intracellulaires ?

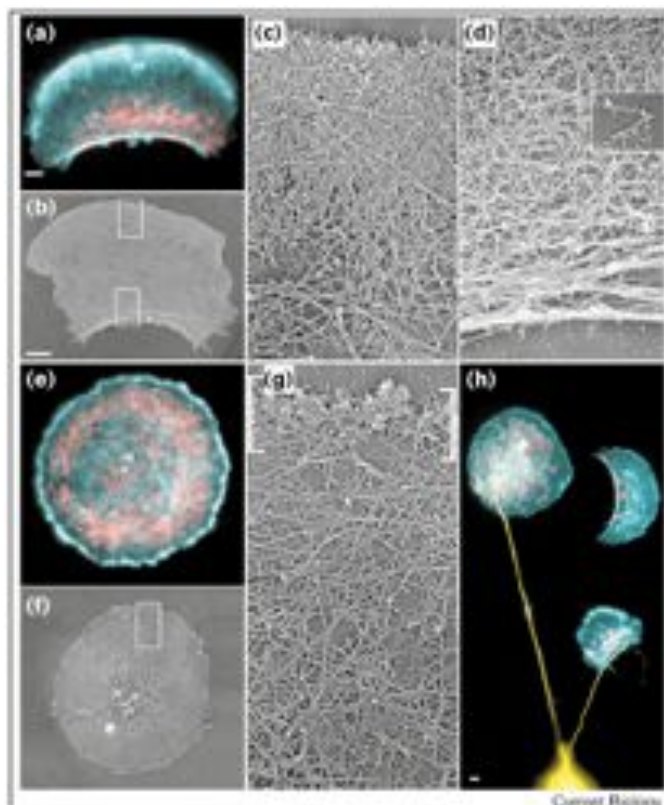
## 5.2. Une synergie biochimique contrôle la motilité cellulaire

Nous venons de voir qu'en réponse aux paramètres géométriques environnementaux, l'organisation spatiale du cytosquelette d'actine en zones contractiles en opposition à des zones de polymérisation actives est un élément essentiel à la mise en place de la polarité cellulaire. Une polarité qui gouverne par la suite la migration (Jiang et al., 2005; Saez et al., 2007). Cependant des questions restent encore en suspens: Quels sont les éléments biochimiques responsables de la motilité de la cellule dans son ensemble ? Quels sont les mécanismes précis de mise en place de la polarité nécessaire avant tout mouvement cellulaire ? Le système modèle largement utilisé dans ce domaine est la motilité du kératocyte, cellule épithéliale de poisson, qui se polarise spontanément et migre de manière persistante et rapide en l'absence de stimuli externe. Pour ce faire, les cellules disposent d'un bord avant (lamellipode) en protrusion mais sans contraction et d'un bord arrière agissant de manière étonnamment coordonnée et opposée (Svitkina et al., 1997). Dans cette configuration, la cellule est douée de motilité et maintient son cytosquelette stationnaire par rapport au substrat (figure 31 ci-dessous).



**Figure 31: Organisation de la cellule motile**

La migration se fait sans translocation du cytosquelette cellulaire par rapport à l'environnement extérieur, mais par protrusion du bord cellulaire avant due à une polymérisation au sein du lamellipode et rétraction de sa zone arrière (Cramer, 2010).



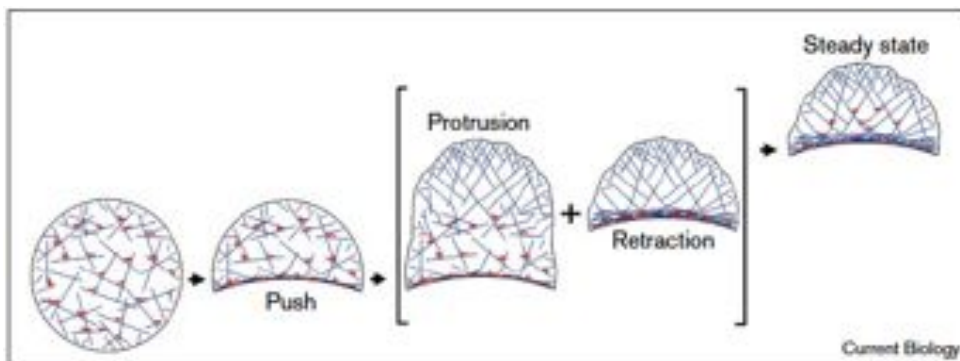
**Figure 32: Organisation du cytosquelette d'actine de fragments de kératocytes**

Cliché EM ou de microscopie à fluorescence de (a-d) fragments motiles (e-g) fragments immobiles, obtenus par bourgeonnement induit d'une cellule normale traitée par la staurosporine. La principale différence étant l'absence de bord contractile contenant des faisceaux acto-myosines alignés (tel qu'en d) dans la seconde condition. (a, e, h) Immunomarquage de la distribution de la myosine en rouge et cyan pour l'actine; en h la tubuline est représentée en jaune et est quasiment absente de ces fragments cellulaires. Barre 2 μm en (a, b, h) et 200 nm en (c) (Verkhovsky et al., 1999).



Verkhovsky et collaborateurs montrent que des fragments de kératocytes ne contenant ni noyau, ni microtubules et manquant de nombreux organelles, conservent à la fois une capacité de motilité semblable à celles des cellules entières, ainsi que la morphologie asymétrique du réseau d'actine: (i) un réseau branché et dense en forme de croissant au niveau du bord avant et, (ii) présence d'amas de filaments bipolaires de myosine II et désassemblage du réseau acto-myosine dans la zone arrière. Les fragments non motiles sont quant à eux en forme de disque et possèdent une isotropie de réseau d'actine (figure 32, (Verkhovsky et al., 1999)). Aussi les mécanismes de polarité induite par la myosine et de motilité, semblent être autopiloté par les macromolécules du lamellipode.

Ce qui est d'autant plus surprenant est le fait que ces fragments cellulaires deviennent spontanément motiles à la suite de collisions fortuites avec d'autres fragments ou au contact d'une micropipette. Ainsi, les auteurs proposent l'existence d'un état dynamique bistable au sein duquel les transitions résultent de fluctuations de la balance mécanique (voir figure 33). Une asymétrie est générée par l'impact mécanique: dans cette zone il y aurait détachement entre le réseau d'actine et la membrane plasmique avec réaligement des filaments dans un bundle parallèle au bord rétracté, puis contraction de celui-ci. Une fois la symétrie brisée, le mouvement se poursuit dans cet état quasi stationnaire de protrusion - rétraction grâce à une boucle de rétroaction mécanique positive puisque la contraction arrière diminue la tension membranaire et favorise la protrusion du bord opposé aboutissant ainsi en une translocation persistante. De plus l'accumulation de myosine II dans la zone arrière, due à la fuite en avant de ce bord protrusif, accroîtrait encore localement la contraction et le désassemblage de la zone arrière. Ainsi l'élément essentiel de la motilité de cette machine biologique réside en une forme asymétrique fonctionnelle contenant un réseau auto-organisé et dynamique, dont les deux activités sont intimement couplées par la membrane cellulaire, le tout dirigé par des critères simples biochimiques et biophysiques (Keren et al., 2008; Mogilner and Keren, 2009).



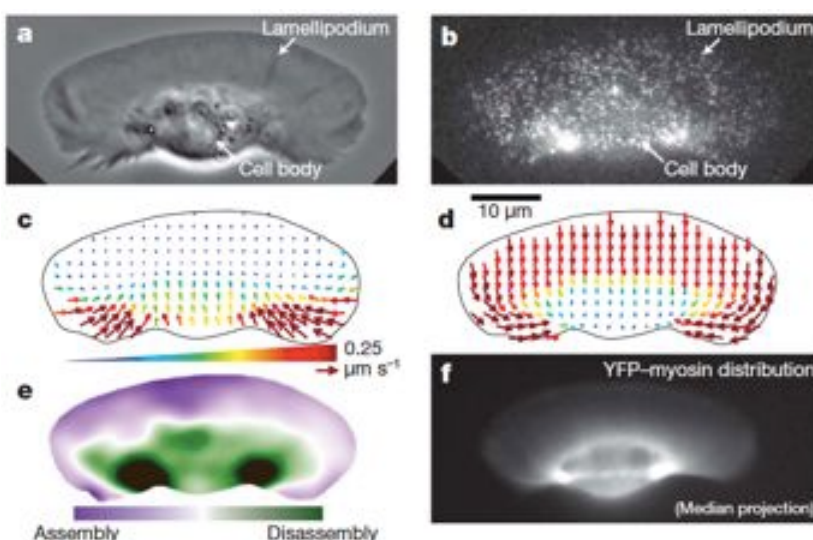
**Figure 33: Modèle de polarisation et locomotion d'un kératocyte**

Sont représentés en bleu les filaments d'actine et en rouge les minifilaments de myosines. La capacité de motilité repose sur l'acquisition par le fragment de cellule d'une organisation / forme asymétrique (Verkhovsky et al., 1999).

Penchons nous plus en détails sur les contributions de la myosine II. Vis à vis de la contraction, si leur présence nécessaire et leur impact sur l'organisation du cytosquelette ont été largement étudiés et corroborent les prédictions de 1998 faites par Verkhovsky et collaborateurs (Verkhovsky et al., 1999), il semble que l'élément déclencheur de leur localisation asymétrique, c'est à dire le processus exact de brisure de symétrie, ne soit toujours pas clairement élucidé (Cai et al., 2010; Vicente-Manzanares et al., 2008). Ce qui est admis est que la myosine IIA, de part son activité contractile, est nécessaire à la mise en place de la

polarité de la cellule et la myosine IIB assure sa persistance. Présente de manière plus abondante dans la zone arrière, elles forment des faisceaux d'acto - myosine contractiles qui activent l'adhésion cellulaire. En retour, les points focaux d'adhésion matures ainsi formés inhiberaient grâce à la présence de la myosine II, la voie de signalisation de Rac (dont le rôle est d'activer la polymérisation d'actine au niveau des protrusions) via un faible recrutement localisé de ses activateurs GEF (guanine nucléotide exchange factor).

Ce n'est que récemment que Vallotton et collaborateurs (Vallotton et al., 2004) ainsi que Wilson et collaborateurs (Wilson et al., 2010) ont introduit l'idée que la myosine pouvait également induire un désassemblage du réseau d'actine. La mise en parallèle d'images de FSM ("Fluorescence Speckle Microscopy" qui consiste à n'avoir qu'une faible proportion de protéines marquées afin de suivre individuellement la dynamique de points individuels) pour le suivi de la population d'actine, et de microscopie à épifluorescence pour la myosine II est on ne peut plus claire: les deux zones de désassemblage massif de l'actine de chaque côté du corps cellulaire colocalisent parfaitement avec une abondance de myosine II (voir figure 34). De plus, par combinaison à la fois de drogues inhibitrices de l'activité de la myosine (blebistatine) et de l'activité de polymérisation d'actine (jaspakinolide, stabilisatrice des filaments d'actine et latrunculine, ayant un effet de séquestration des monomères), les auteurs démontrent qu'il existe deux voies distinctes de désassemblage de la masse d'actine au sein du kératocyte, toutes deux favorisant sa motilité. Plus précisément, des études ont été menées sur le cytosquelette de ces cellules extrait à l'aide de Triton (en excluant ainsi tout facteur cytosolique). L'ajout d'ATP à ce système induit une forte contraction de la zone arrière du cytosquelette concomitante d'un désassemblage d'actine dans cette région uniquement. Un effet totalement perdu en cas de traitement à la blebistatine. Ces dépendances (ATP, blebistatine) et cette concordance spatio-temporelle témoignent indéniablement d'un désassemblage des réseaux d'actine induit par la myosine II, en absence de tout facteur extérieur donc probablement des suites de brisures mécaniques des filaments. Par ailleurs le désassemblage résiduel en présence de blebistatine qui est présent de manière plus dispersée au sein du lamellipode de ces cellules et qui est inhibé par une stabilisation des filaments serait, quant à lui, le résultat de l'action de fragmentation des filaments d'actine par des protéines comme ADF/cofiline ou gelsoline.

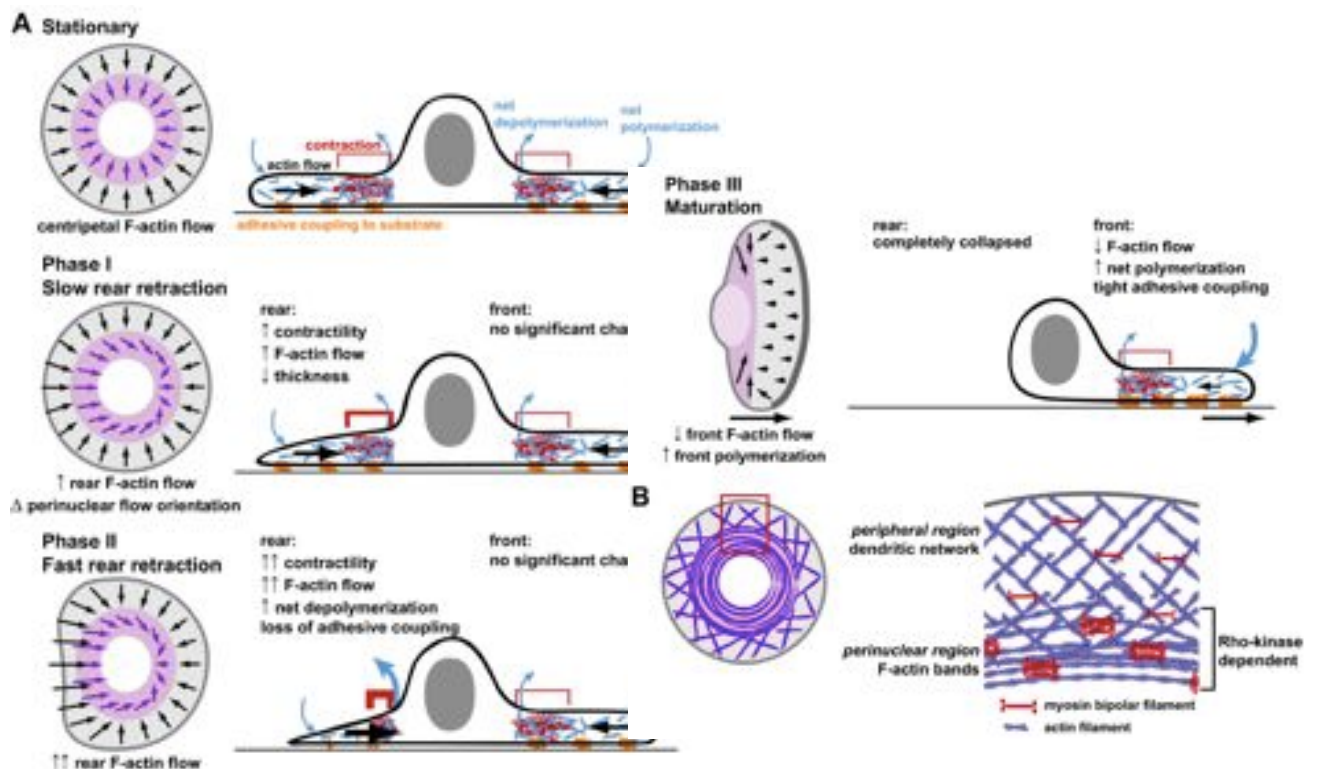


**Figure 34: Localisation de la myosine au sein du kératocyte sur les sites de désassemblage**

(a) Cliché de contraste de phase d'un kératocyte motile, (b) fluorescence de l'actine (FSM, "fluorescent speckle microscopy") et (f) fluorescence de la myosine II. (c et d) représentent les flux du cytosquelette d'actine respectivement dans le référentiel du laboratoire et de la cellule. (e) schématise les zones d'assemblage et de désassemblage de l'actine (Wilson et al., 2010).

Finalement l'implication de la myosine dans le "turnover" du cytosquelette de cellules motiles permettrait la mise en place d'une coordination temporelle et à longue distance du désassemblage essentiel au "turnover" à l'échelle de la cellule. L'incorporation progressive de myosine II au sein du réseau d'actine induirait progressivement un réarrangement de ce réseau par alignement des filaments d'actine. Cette coalescence vers un système aligné servirait de chronomètre, jusqu'à une organisation en myofilaments bipolaires efficaces pour la génération de contraction puis de désassemblage.

Un dernier élément semble être important pour la mise en place de la polarité et la migration du kératocyte: le concept de flux rétrograde des filaments d'actine. Dans une cellule non polarisée, celui-ci est dirigé vers le centre de la cellule de manière anisotrope. Lors de la mise en place de la polarité, et à la suite d'une contractilité accrue du réseau d'actine, ce flux s'intensifie dans la zone arrière. Cela aboutit à une rétraction de la membrane dont l'effet accroît le flux rétrograde d'actine tout en augmentant l'adhésion cellulaire dans cette zone. Le corps cellulaire est alors propulsé vers l'avant, la migration démarre et se poursuit par un effondrement total du cytosquelette d'actine dans la zone arrière (Schéma bilan figure 35).



**Figure 35: Schémas récapitulatifs de l'organisation cellulaire et des événements aboutissant à la brisure de symétrie.**

La brisure de symétrie est initiée au niveau de l'arrière de la cellule par une recrudescence de la contractilité et du flux d'actine. Ceci a pour effet d'accroître la dépolymérisation dans cette zone et d'y diminuer l'adhésion cellulaire. La morphologie de la cellule change des suites du collapse total de la zone arrière mais sans modification au niveau de son bord avant toujours proéminent, aboutissant à la polarité finale d'une cellule motile (Yam et al., 2007).

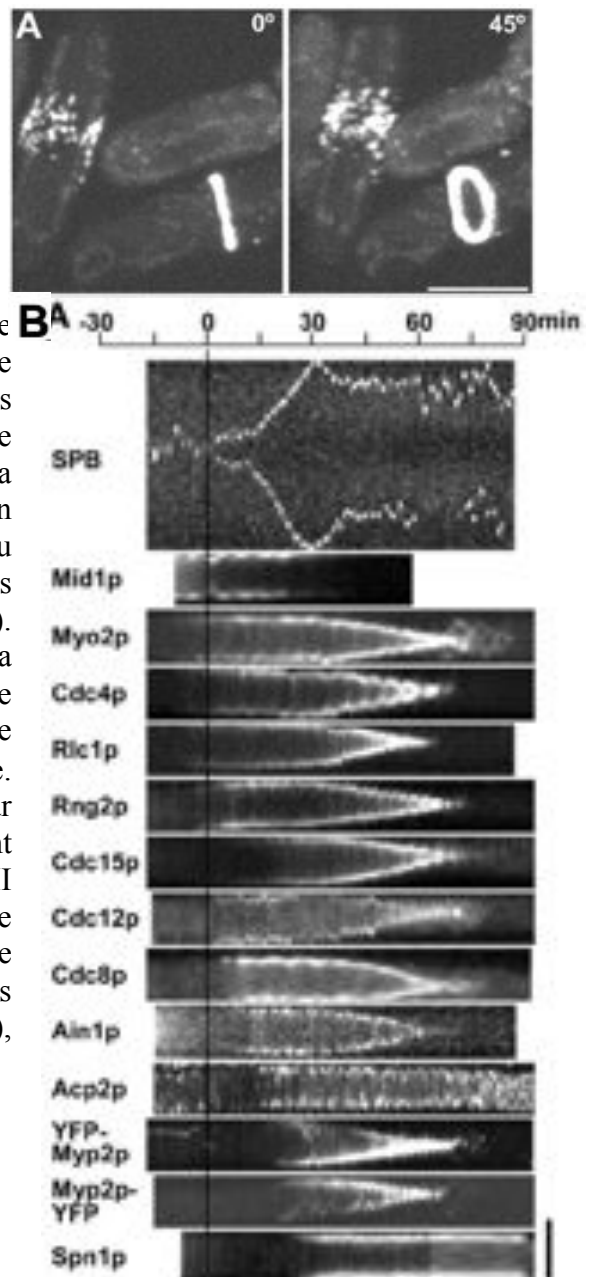
Pour résumer, si bien souvent l'idée première est que le mécanisme de migration cellulaire provient d'une brisure de symétrie au niveau du bord avant de la cellule et est donc protrusion dépendante, il semblerait que dans de nombreuses cellules (comme kératocytes et fibroblastes) ce soit la rétraction du bord arrière qui initie la brisure de symétrie (donc la géométrie) permettant la migration de la cellule. Un processus donc intimement myosine II dépendant (Cramer, 2010). La myosine, une fois cette mission de contraction accomplie, aurait alors deux rôles secondaires: induire le désassemblage des structures d'actine de manière localisée dans la zone arrière de la cellule et engendrer un flux de matériel plus important vers la zone avant en permanente construction (lamellipode protrusif). Zone avant au sein de laquelle il existe une véritable synergie entre les nombreuses protéines impliquées dans la nucléation dendritique, et qui est couplée à plus grande échelle à l'action opposée des myosines dans la zone arrière.

Malgré de nombreuses recherches dans le domaine, il semble que toutes les réponses ne soient pourtant pas encore trouvées: est-ce directement les forces contractiles des structures acto-myosines qui induisent la rétraction initiale de la cellule ? Ou bien ces forces induisent-elles la détermination de ce bord contractile par un moyen indirect (par exemple via des moyens de signalisation) ? Ou une combinaison des deux ? Comment se crée l'asymétrie de ces forces pour aboutir à une cellule polarisée en l'absence de facteurs extérieurs anisotropes ?

### 5.3. Dynamique rétroactive entre contrôle biochimique et géométrique d'une structure contractile

La séparation physique des deux cellules filles est la dernière étape du cycle cellulaire. De nombreux types cellulaires (Ameobas, fungi, cellules animales) utilisent pour ce faire un anneau contractile composé essentiellement d'actine et de moteurs moléculaires afin d'engendrer le pincement qui tend à séparer le matériel biologique en deux. Le moteur de ce mouvement est produit essentiellement par l'action de myosines II mais nécessite par exemple pour les levures à fission pas moins d'une trentaine de protéines, ce qui fait intervenir le produit de plus de 50 gènes. Trois éléments sont indispensables à la réussite de la cytokinèse: (i) le bon positionnement de fuseau mitotique entre les chromosomes, (ii) un assemblage, une contraction et un désassemblage réussis de l'anneau contractile, (iii) la fusion de la membrane cellulaire entre les deux cellules filles. Un véritable défi à chaque cycle et pourtant son succès quasi perpétuel tant à montrer qu'il s'agit pour les cellules d'un mécanisme bien rodé. La question clé vis à vis de la structure de l'actine est de comprendre comment la biochimie de ces dizaines de protéines engendre une structure dont l'organisation géométrique est fonctionnelle en induisant elle-même son propre remodelage lors de sa constriction.

La formation de l'anneau contractile a été particulièrement bien étudiée chez les levures à fission (Wu et al., 2003). L'observation spatio-temporelle d'une douzaine de protéines impliquée a révélé un "timing" et une organisation fine particulièrement régulée (figure 36). Un véritable travail d'orfèvre qui débute par la séparation des pôles fusoriaux, "spindle pole bodies". L'anneau contractile se forme suivant un processus en trois étapes. Durant la première, une large bande équatoriale regroupant de nombreuses protéines se forme, et Mid1p, une protéine de la famille des anillines, sort du noyau et se concentre dans le cortex adjacent. Durant la transition G2/M, la myosine II conventionnelle (myo2p) s'organise en de nombreux points discrets (ou nodules) au niveau de cette même bande puis est rejointe par les protéines PCH (Cdc15p) et les formines (Cdc12p). La deuxième étape est marquée par la polymérisation d'actine dans cette zone qui induit le recrutement de tropomyosine (Cdc8p) et l' $\alpha$ -actinine (Ain1p) formant ainsi sans doute un réseau de base. L'ensemble de ces protéines se regroupe alors par compaction en un véritable anneau continu ayant pour moteur des forces induites par les myosines II présentes. La troisième étape consiste en une longue phase de maturation de cet anneau durant laquelle de nombreuses autres protéines sont recrutées comme la myosine II non conventionnelle (Myp2p), des septines ainsi qu'une faible quantité de CP.

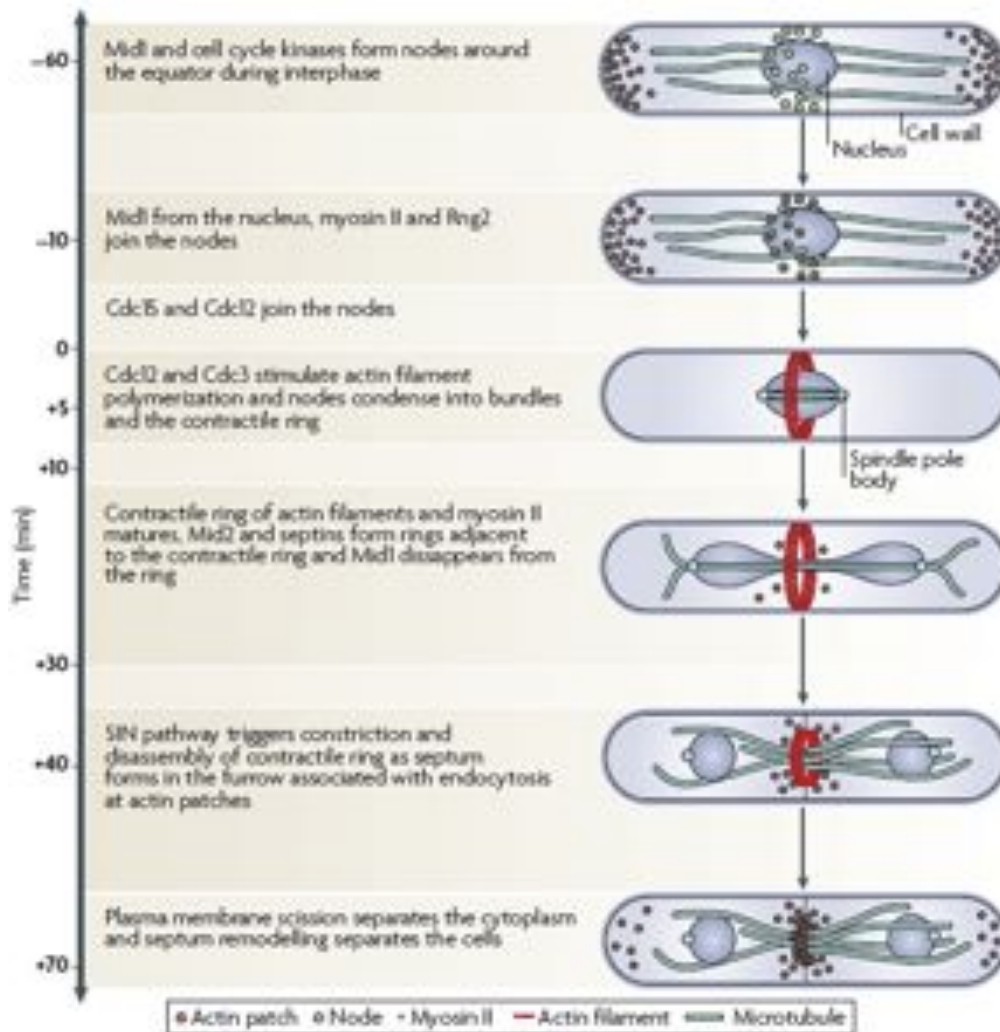


**Figure 36: Anneau contractile et cinétique des protéines associées**

(A) Cliché de microscopie confocale permettant une visualisation pour  $y = 0$  et  $45^\circ$ . (B) Kymographes de la fluorescence des différentes protéines localisées dans l'anneau contractile au cours de sa formation, sa contraction et de son désassemblage. Le temps zéro correspond à la séparation des pôles du fuseau. L'axe des x est le temps, en y est la section observée (Wu et al., 2003).

Après 25 minutes sans contraction (selon un timing non résolu) s'opère finalement ladite contraction de l'anneau contractile pour atteindre la taille d'un point unique, à une vitesse de 5 nm/s. Cette phase induit l'augmentation de la concentration locale des diverses protéines présentes de manière sélective, ce qui implique des mécanismes de dissociation sélective de celles-ci. Par exemple, l'actine et la formine décroissent en proportion alors même que la myosine II se concentre. Soudainement l'anneau disparaît et la plupart des protéines (par exemple Myo2p) retrouvent immédiatement l'intensité du signal initial.

En résumé, la formation de l'anneau contractile illustre bien un mécanisme moléculaire de formation de structure d'actine contrôlée par un jeu de protéines spécifiques (contrôle biochimique). La dynamique de cet assemblage étant autorégulée par sa propre architecture (contrôle biochimique).

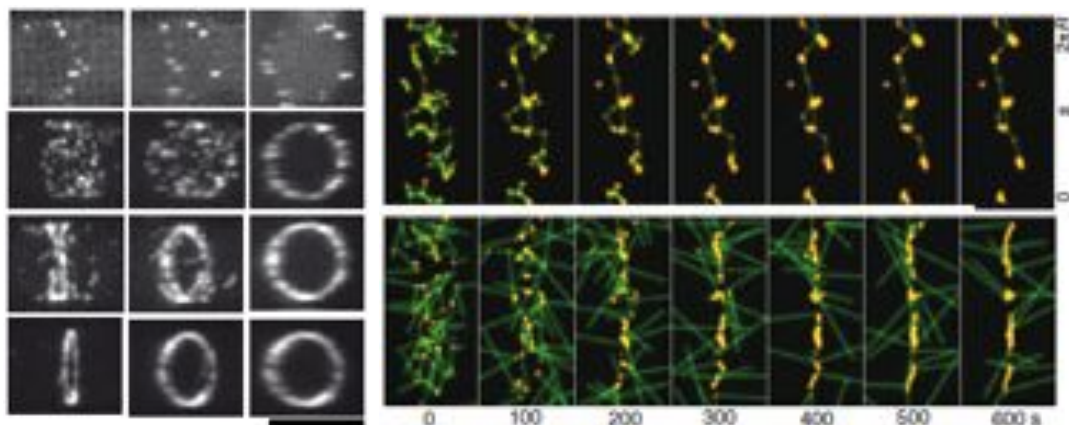


**Figure 37: Schéma explicatif du processus de cytokinèse des levures à fission**

Le temps zéro correspond à la séparation des pôles du fuseau (Pollard and Wu, 2010).

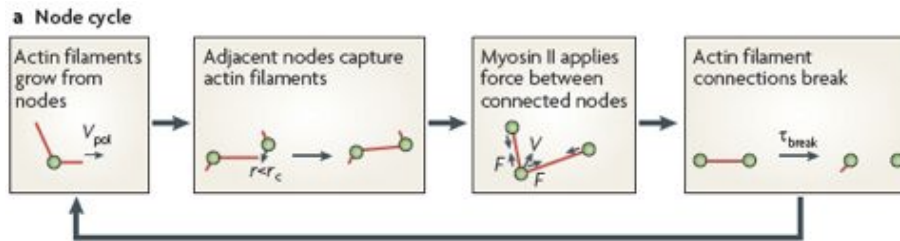
Les deux étapes les plus intéressantes vis à vis de mon sujet sont l'étape de transition entre des nodules discrets et un anneau continu et homogène, ainsi que l'étape couplée de contraction et désassemblage de cet anneau. Deux études me semblent particulièrement intéressantes à ce propos; respectivement (Vavylonis et al., 2008) et (Carvalho et al., 2009).

Vavylonis et collaborateurs proposent, à l'aide d'observations de fluorescence appuyées par des simulations mathématiques, un mécanisme simple de compaction acto - myosine dépendante de type "recherche, capture, traction et relaxation" ("search, capture, pull and release"). Avant polymérisation de l'actine, les nodules contenant la myosine II conventionnelle se déplacent peu et sans corrélation, selon une dynamique propre à une diffusion en deux dimensions. Puis dès l'apparition des filaments d'actine, ceux-ci se déplacent de manière plus persistante, par à-coups de 20 secondes à des vitesses de l'ordre de 30 nm/s entrecoupés de pauses ou de coalescence avec un nodule proche (figure 38). Le réseau d'actine croît de manière isotrope de chaque nodule et parallèlement à la membrane à des vitesses de l'ordre de 0.2  $\mu\text{m/s}$ , en générant des connections entre ceux-ci sans doute sous forme de petits faisceaux. Les filaments subissent un renouvellement rapide (inférieur à 20 secondes) sans doute par fragmentation du type ADF/cofiline ou simplement par brisure mécanique sous tension. Les auteurs estiment qu'à partir de 100 nm ces filaments sont capturés par les myosines d'un nodule adjacent qui exercent alors une force constante de traction aboutissant au rapprochement de cette paire de nodules. Ce processus est nommé "recherche et capture" puisque chaque entité attractive trouve plus facilement une voisine proche avec qui elle pourra coalescer (voir figure 39). L'apport du modèle mathématique dans ce cas précis permet d'une part de vérifier si un tel mécanisme aboutit bien, dans le temps imparti, à la formation d'un anneau continu mais surtout avec quel jeu de paramètres cela est possible. Ce qui permet d'estimer la quantité de chaque élément présent dans ce système: quantité de myosine par nodule, nombre de filaments, activité des formines, fréquence de fragmentation des liens, force de répulsion et d'attraction...Un joli mécanisme simple mais robuste même en l'absence de mécanisme régulateur extérieur de type rétroaction positive, et qui pourrait s'appliquer à toutes les cellules animales à quelques variations près.



**Figure 38: Organisation dynamique des nodules en un anneau continu**

Sur la gauche, reconstitution 3D à partir d'images confocales de levure exprimant Rlc1p-3GFP. Chaque colonne correspond à des rotations successives de 45°. A droite, résultat d'une simulation numérique basée sur le modèle "recherche, capture, traction et relaxation", reproduisant à l'identique le phénomène d'organisation dynamique des nodules en un anneau continu. En vert sont représentés les filaments d'actine. Barre 5  $\mu\text{m}$ . (Vavylonis et al., 2008)



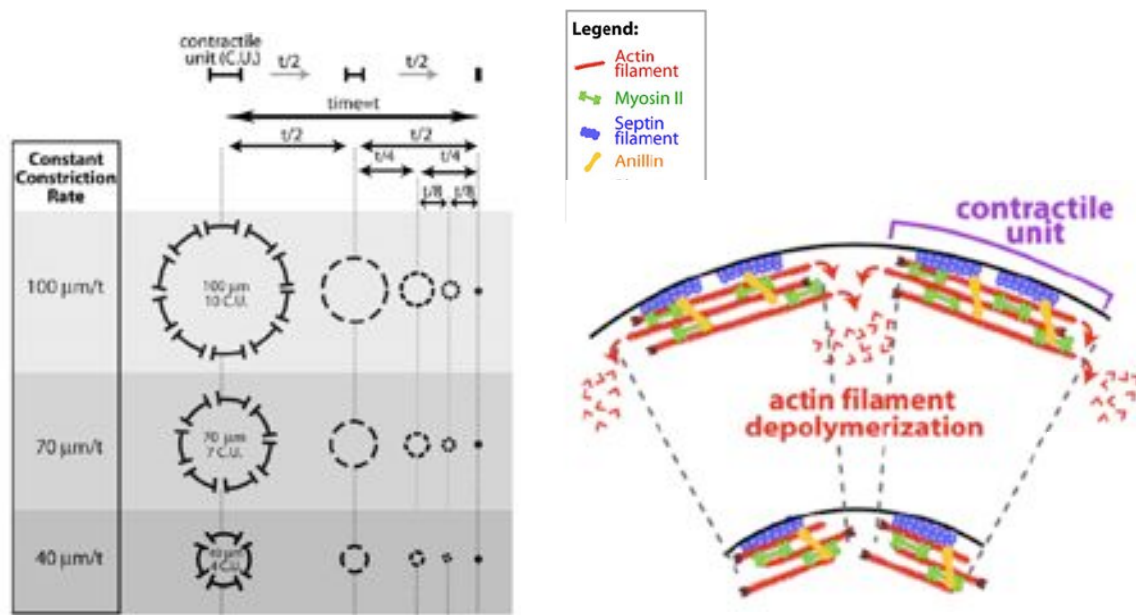
**Figure 39: Schéma du mécanisme de "recherche, capture, tire et relâche"**

Les différentes étapes de ce mécanisme sont les suivantes. Une croissance isotrope des filaments d'actine à partir de chaque nodule. La capture de certains filaments par les myosines contenues dans un nodule adjacent, celles-ci exerçant alors des forces attractives entre les nodules connectés. Brisure de ces liens actine-nodule et fin de cycle (Pollard and Wu, 2010).

Avant de passer à l'étape de constriction, revenons brièvement à l'organisation des filaments au sein de la structure qu'est l'anneau contractile. Il s'agit d'une fine couche de 0.1 à 0.2  $\mu\text{m}$  (pour la levure à fission et pouvant aller jusqu'à 20  $\mu\text{m}$  dans d'autres organismes) située en dessous de la membrane cellulaire et constituée de 1000 à 2000 filaments d'actine de petite taille (0.6  $\mu\text{m}$  en moyenne) de polarité mixte et de nombreuses myosines (Kamasaki et al., 2007). Cette polarité opposée et la présence de myosine II semblent indiquer que le principal moteur de la constriction se ferait par glissement relatif ("sliding") des filaments les uns par rapports aux autres sous l'action de ces moteurs moléculaires. Les composants moléculaires de cette structure ont un renouvellement rapide (par exemple  $t_{1/2} = 30$  s pour la myosine) à une échelle bien plus rapide que la vitesse de constriction et la durée de vie de l'anneau contractile. A première vue, il semblerait que les proportions physiques aient toute leur importance pour un tel système mécanique. Carvalho et collaborateurs se sont penchés sur les premières divisions d'embryons du nématode *Caenorhabditis elegans* afin d'étudier l'impact de la taille des anneaux sur leur vitesse de constriction (Carvalho et al., 2009). Dans ce système, les auteurs montrent que toutes les cellules des cinq premières divisions se contractent suivant un même laps de temps (en un peu plus de 250 secondes). Les vitesses de contractions ont un profil biphasique avec dans un premier temps une vitesse constante proportionnelle à la taille initiale de la cellule suivie d'une phase de diminution linéaire de la vitesse lorsque le périmètre instantané atteint la valeur critique de 19  $\mu\text{m}$ . Ce profil biphasique est perdu en absence de SPD-1, protéine nécessaire à la formation de faisceaux de microtubules pour la construction du "midzone spindle", qui se positionne au centre de l'anneau de constriction. Une interaction physique entre anneau et le "midzone spindle" agirait donc comme frein en fin de constriction. Le fait que la vitesse initiale s'accroisse de manière linéaire avec la taille du périmètre initial est interprété par les auteurs comme une mémoire structurelle au cours de la contraction. Une analyse de la quantité de protéines (mutants exprimant myosine, septine et annilline liés à un fluorophore) montre que l'intensité par unité de longueur de ces trois protéines est relativement constante au cours de la troisième division. Cette stabilité de la quantité des protéines durant la constriction témoigne d'une perte progressive de matériel, c'est à dire d'un désassemblage de l'anneau contractile chez *C. elegans*. Des expériences de FRAP et un traitement à la latrunculine A montrent que le réseau d'actine de l'anneau est dans un premier temps polymérisé, puis progressivement désassemblé lors de sa contraction sans qu'il n'y ait de renouvellement des protéines impliquées (aussi bien myosine que actine). Contrairement aux levures à fission, selon cette étude, chez *C. elegans* les composants de l'anneau contractile n'ont pas de renouvellement rapide au sein de la structure mais resteraient relativement stables. Les auteurs concluent qu'un modèle de constriction à l'aide d'unités contractiles rendrait compte de telles propriétés, notamment de la "mémoire structurelle" de ces structures, c'est à dire le maintien de l'information concernant



la taille initiale de la structure au cours de sa déformation (schéma figure 40). Ce modèle est basé sur trois assomptions: (i) lors de son assemblage l'anneau est construit en unités fonctionnelles acto - myosine (ii) ces unités sont de longueur similaire quel que soit le périmètre initial, donc un plus grand anneau contiendra plus de ces unités contractiles (iii) chacune de ces unités se contracte à une vitesse constante et donc perdra autant de matériel durant un même laps de temps. Ainsi, la constriction ne se fait pas globalement par perte d'unité mais plutôt par diminution de la taille de ces unités. Deux questions essentielles restent pourtant en suspens: quelle serait la nature biochimique de ces unités et quel serait le mécanisme de désassemblage de leurs extrémités?



**Figure 40: Modèle de constriction basé sur la contraction constante d'unités contractiles indépendantes**

Ce modèle rend compte de la proportionnalité entre les vitesses de constriction et le diamètre initial des anneaux cellulaires. Ces unités étant toutes de même longueur et subissant une contraction constante, un cercle plus large qui en contient donc un plus grand nombre auront tendance à perdre plus de matériel par unité de temps qu'un plus petit cercle. La contraction des unités fonctionnelles étant obtenue par dépolymérisation de filaments d'actine au niveau de ces bords comme montré dans le schéma de droite (Carvalho et al., 2009).

À cette seconde question les auteurs proposent une dépolymérisation localisée de filaments d'actine. De mon point de vue, l'aspect discontinu en unité contractile ne me semble pas apporter entière satisfaction. En effet, une vision continue de l'anneau, avec contraction et perte de matériel constantes par unité de longueur sur l'ensemble de la structure, pourrait tout aussi bien rendre compte d'une vitesse en lien avec la taille initiale. L'idée d'une dépolymérisation localisée ne me semble pas plus convaincante puisque aucune observation ne semble en témoigner, de plus aucun mécanisme biochimique ne saurait expliquer cette localisation précise et la rapidité du phénomène proposé de dépolymérisation. Par contre, je serais tentée de dire qu'il y a bien perte de matériel mais sans doute selon un processus de fragmentation des filaments d'actine des suites de stress mécaniques induits par l'action des myosines de manière uniforme lors de la constriction. Comme le démontre Guha et collaborateurs (Guha et al., 2005) qui parle très joliment d'un couplage contraction et

désintégration structurelle, un rôle double joué par la myosine II, dans lequel la génération de forces facilite également l'ingression par désassemblage du cortex. Cette étude nous rappelle également que si la cytokinèse implique des événements locaux au niveau de l'équateur, elle est également indissociable d'un équilibre global des forces contractiles, de la rigidité corticale et de l'intégrité structurelle de la cellule dans son ensemble.

Nous venons de voir comment la biochimie engendre une architecture contractile dont la géométrie est intrinsèquement contrôlée de manière extrêmement dynamique et qui aboutit à la formation d'un véritable anneau fonctionnel. Rétrospectivement, la constriction de celui-ci impose d'importantes modifications de la composition de sa structure suivant un désassemblage sans doute mécaniquement contrôlé.



# Résultats

## Introduction de mon travail de thèse

Nous venons de voir que l'architecture cellulaire est en constante évolution afin de réaliser les nombreuses et complexes transformations mécaniques requises au cours de la morphogénèse cellulaire (forme et motilité). Une dynamique perpétuelle, une organisation, régulation ou rapide reconstruction ne sont que quelques-unes des propriétés essentielles assurées par le cytosquelette d'actine. Nous avons également vu que pour ce faire, les filaments d'actine s'assemblent en un large panel de structures (fibres de stress, lamellipode, anneau contractile...), le tout finement régulé par l'ensemble des protéines interagissant avec l'actine en réponse à des stimuli externes ou une signalisation en interne. En intégrant l'équipe de Laurent Blanchoin, mon travail fut de développer différents projets en vue d'aborder les mécanismes d'assemblage et la dynamique de réseaux d'actine *in vitro*, ainsi que de me pencher sur le mécanisme moléculaire de production de force en système biomimétique reconstitué. L'idée générale étant de mettre en évidence des lois simples physiques et biochimiques s'appliquant à des systèmes simplifiés afin d'accroître notre compréhension de l'organisation et du fonctionnement de la cellule. Par exemple comment des propriétés biochimiques, résultant de la combinaison d'un jeu de protéines, peuvent-elles aboutir à des lois physiques gouvernant la structure des réseaux assemblés ?

La caractérisation de la dynamique sur l'actine *in vitro*, s'est essentiellement basée sur deux catégories d'expériences, celles permettant de comprendre les mécanismes biochimiques à l'échelle de la protéine et celles s'intéressant à la mécanique macroscopique des gels d'actine. Pour ces dernières, l'interprétation des résultats est souvent liée à des connaissances provenant des études biochimiques des protéines individuelles. Cependant, dans un tel contexte, il manque un certain nombre d'expériences intermédiaires prenant en compte les propriétés biochimiques de protéines, et permettant de visualiser précisément leur localisation spatiale et temporelle, dans un système de taille macroscopique similaire à ceux présents à l'échelle du vivant. Les deux premières publications présentées dans ce manuscrit de thèse ont pour but de pallier en partie à ce manque. Pour la première, il s'agit de visualiser à l'échelle du filament individuel l'organisation des réseaux d'actine au sein d'une structure dense et propulsive. Nous avons alors caractérisé le rôle de la CP dans le processus de brisure de symétrie d'un gel continu d'actine. Cette étude nous a également permis de visualiser et mettre en évidence la nécessité d'un filament préexistant et précurseur du processus de nucléation dendritique. La seconde étude constitue une analyse de la localisation des différentes protéines impliquées dans la mise en place et le maintien de la motilité de particules, ainsi que dans le turnover des réseaux propulsifs impliqués dans ce processus. Grâce à cette étude nous avons pu préciser la rétroaction de l'effet de ces protéines sur la structure, et donc la mécanique, des gels formés. Le troisième article présenté ici rend compte d'une analyse moléculaire de l'activité de fragmentation et du mécanisme de vieillissement induit par l'ADF/cofiline à l'échelle du filament unique.

Avec l'article 4 nous avons abordé différemment la question de la régulation de la dynamique de l'actine. Précédemment, nous nous intéressions surtout à modifier le système biochimique et à conclure quant à l'impact de divers jeux de protéines sur l'organisation spatiale et les propriétés physiques des réseaux d'actine. Avec cette étude, nous avons au contraire répondu à la question suivante: se peut-il que la géométrie, c'est à dire la disposition spatiale des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine et notamment des facteurs nucléateurs, influence l'organisation de la structure formée et ses propriétés physiques, cela tout en maintenant constantes les caractéristiques biochimiques du milieu ? La méthodologie innovante de "micropatterning" a été un outil déterminant pour cette étude quantitative qui nous a permis de reconstituer le contrôle par la géométrie des structures d'actine. Ma dernière

étude, en cours de rédaction, utilise cette même technique mais en vue d'aborder les mécanismes de contraction et de désassemblage myosine dépendant. Grâce à l'utilisation de réseaux d'actine d'architecture contrôlée nous avons découplé dans l'espace, ainsi que temporiser, les différentes actions de remodelage induites par moteur moléculaire.

L'ensemble de mon travail de thèse peut être également séparé en deux axes principaux de réflexion. Comment s'organise spontanément un réseau d'actine suivant le contexte biochimique mais également suivant l'environnement physique de ce jeu de protéines ? Comment la présence de certaines protéines (ADF/cofiline ou myosine) régule les paramètres dynamiques de formation et de recyclage de tels réseaux d'actine ainsi que leurs propriétés physiques ? Pour répondre à de telles questions ouvertes, dans un premier temps, j'ai utilisé des techniques et des systèmes bien rodés dans le laboratoire, du type observation à l'échelle du filament unique grâce au TIRF, à l'échelle de la molécule par du FRAP, ou motilité de particules recouvertes de promoteurs de nucléation. Dans un second temps, je me suis pleinement investie au développement d'un système biomimétique novateur utilisant le système de "micropatterning" permettant un contrôle spatial reproductible et précis des sites de nucléation d'actine. Ce système versatile a fait l'objet du dépôt d'un brevet par mes encadrants, autant pour son intérêt vis à vis de la recherche fondamentale que pour sa potentielle application pour la formation de réseaux complexes et contrôlés de biopolymères potentiellement conducteurs. Il fut également progressivement intégré aux divers projets développés au sein de l'équipe et nous amène aujourd'hui une profusion d'idées à exploiter! Les cinq publications auxquelles j'ai participé durant mon travail de thèse reflètent bien cette évolution des techniques. C'est pourquoi je vous les présente ci-après dans un ordre chronologique avant d'en discuter plus en détails les conclusions et perspectives suivant les deux thématiques abordées.



# **Article 1**



## Article 1. Achard, Current Biology, 2010

Dans un premier temps je me suis intéressée à l'étude de l'organisation spatio-temporelle des réseaux d'actine et de ses protéines associées durant la propulsion de particules recouvertes de facteurs promoteurs de nucléation d'actine. Ces systèmes reconstitués, comme nous l'avons vu, constituent une approche particulièrement intéressante et de qualité en vue de mieux comprendre les mécanismes de production de force actine - dépendant. Grâce à eux, le jeu de protéines nécessaires et suffisantes à la mise en place et au maintien de la propulsion en milieu reconstitué fut déterminé (Cameron et al., 2001; Loisel et al., 1999; van der Gucht et al., 2005). Si une analyse de l'impact de nombreux paramètres globaux (comme la concentration des protéines, la taille des objets, la viscosité du milieu) avait déjà été largement effectuée, le rôle précis de chacune des protéines, leur coordination spatiale et temporelle durant la motilité demeure une question ouverte. C'est pourquoi l'étude à laquelle j'ai participé en début de thèse, correspondant à l'article 1 (Achard et al., 2010), vise à montrer **l'importance mécanique de l'action de la CP en vue d'établir un gel d'actine cohésif capable de générer une poussée suffisante à la propulsion de petits objets, tels que des billes en polystyrène ou des fibres de verre fonctionnalisées**. Cette étude nous a également permis de rendre toute son importance à un petit détail pourtant essentiel du processus: **quel est l'élément déclencheur du processus de nucléation autocatalytique ?** En fait, il s'agit d'un premier contact avec un ou plusieurs petits filaments d'actine appelé "primer".

Pour cette étude, trois éléments se sont révélés essentiels en vue d'obtenir une résolution spatiale et temporelle qui n'avait pas été obtenue jusqu'à présent. Premièrement l'utilisation de la microscopie à onde évanescente, (TIRF) qui permet de passer d'une échelle d'observation macroscopique à une échelle microscopique compatible à l'observation de filaments uniques. Par ailleurs, nous avons visualisé la polarité des filaments en combinant TIRF et un marquage de l'actine à l'aide d'une fluorophore à photoblanchiment rapide (Alexa-532) (figure 1 E-G). Cette diminution progressive de fluorescence au sein d'un filament dans les zones âgées (longtemps exposées) finit par ne laisser paraître que les extrémités barbées dynamiques. Le deuxième élément essentiel à cette étude est l'utilisation de fibres de verre de faible largeur mais forte longueur ( $1 \mu\text{m} * 10\text{-}40 \mu\text{m}$ ) recouverts d'un peptide activateur de la nucléation par Arp2/3 (pWA), ce qui nous a permis une meilleure résolution spatiale de notre observation. Et finalement, le troisième élément essentiel à cette étude a été la reconstitution de la motilité au sein d'un milieu composé d'actine monomérique complexée à la profiline. Ce contexte à l'avantage d'être relevant *in vivo*, contrairement aux études antérieures qui utilisaient un réservoir d'actine filamenteuse pour promouvoir la motilité, qui entre en compétition avec le réseau polymérisé autour des particules pour le recrutement des protéines régulatrices de l'assemblage d'actine.

L'un des apports majeurs de cette étude fut la compréhension des mécanismes déclencheurs de la polymérisation d'actine sous forme de gel, capable d'aboutir à la propulsion d'objets recouverts fonctionnalisés. En effet, par un contrôle précis de la quantité de filaments nucléés spontanément dans le milieu, l'on a pu temporiser et visualiser l'élément déclencheur du processus de nucléation (NPF) autocatalytique par le complexe Arp2/3 à la surface d'objets recouverts d'activateur de ce complexe, c'est à dire le contact entre un filament "primer" du milieu et la source locale de NPF (figure 1D, figure 3, et S1A). De plus, grâce à l'utilisation du TIRF et d'objets longilignes, j'ai également visualisé le processus de branchement par interaction transitoire entre un filament mère s'allongeant au contact de l'objet et l'activateur localisé sur la particule fonctionnalisée (figure 1E). Nous avons

également observé que l'élongation des filaments filles (ou branches) se fait de manière radiale à celui-ci (1FG). Aussi, les filaments d'actine du réseau branché initié par le complexe Arp2/3 à la surface des particules s'allongent avec leurs extrémités barbées dynamiques orientées vers le milieu et non pas contre l'obstacle à propulser, comme cela est proposé dans le schéma de la nucléation dendritique (Mullins, 2000). L'apport de ces nouvelles méthodologies nous a donc permis de confirmer les hypothèses mécanistiques (importance du "primer", processus autocatalytique) élaborées précédemment (Machesky et al., 1999; Mullins, 2000) à l'aide d'analyses biochimiques conventionnelles (en solution complexe).

Le second apport de cette étude est sa précision vis à vis du rôle de la Capping Protein, CP, dans le processus de brisure de symétrie du gel d'actine polymérisé autour de la particule qui précède obligatoirement la propulsion dirigée de ces objets biomimétiques. Grâce à des observations à des échelles spatiales différentes (filaments en solutions, nucléés sur fibre et sur bille, figure 2), l'on a pu montrer que CP ne perturbe pas le processus de nucléation autocatalytique par Arp2/3. CP diminue la distance entre les branches des réseaux formés, réduit la longueur des filaments, et rend donc le réseau d'actine plus compact et plus rigide (d'où l'analogie fréquente avec les gels). Ainsi, la présence de la CP contraint spatialement l'élongation des extrémités dynamiques, dont l'orientation demeure libre, au voisinage proche de l'objet nucléateur. L'extérieur de ce gel, qui est alors constitué d'extrémités barbées de filaments toutes bloquées par CP, est nommé zone morte de part son absence de polymérisation. Aussi, le rôle de la CP n'est pas d'inverser la polarité des filaments, contrairement à ce qui a été précédemment proposé (Akin and Mullins, 2008), mais de contraindre les zones de polymérisation au voisinage proche de l'objet (figure 4A). D'où la notion de contrainte stérique responsable de l'accumulation de stress mécanique due à l'incorporation continue de matériel (monomères) au sein d'un volume fini (car contraint par la CP), et responsable de la production de force propulsive des particules fonctionnalisées, et par extension la membrane plasmique au niveau du lamellipode *in cellula*.

La présence de CP qui stoppe la croissance de ce gel en expansion tend également à rendre celui-ci sensible vis à vis de la quantité de "primer" qui l'initie. Cet aspect s'en est en effet révélé essentiel à la production de forces nécessaires au processus de brisure de symétrie. Cela a pu être confirmé grâce à un modèle mathématique de simulation de croissance de réseau d'actine au contact d'une bille recouverte d'activateur d'Arp2/3, (figure 4B). Le contact de chaque "primer" initie un gel d'actine cohésif en expansion. L'enchevêtrement de ces réseaux voisins induit des forces de résistance s'opposant à leur croissance tout en permettant la cohésion du gel d'actine dans son ensemble. Lorsque les résistances sont trop importantes (un stress interne trop important) et que la polymérisation est presque totalement inhibée, la zone morte externe du gel d'actine se brise brutalement selon une fracture nette qui permet l'expulsion de la bille. Le processus repart alors presque à zéro dans une phase d'expansion. Ruptures et expansions se répétant alors de manière cyclique rapide, à un détail près, la mémoire de la zone de fracture est maintenue de part sa fragilité accrue (zone moins dense en filaments donc de moindre résistance) ce qui permet une propulsion de l'objet de manière unidirectionnelle.

En document annexe se trouve également la "News and Views" écrite à propos de notre propre article par Cecile Sykes et Julie Plastino et qui fut publiée dans la revue Nature.

# A “Primer”-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility

Vérane Achard,<sup>1,3</sup> Jean-Louis Martiel,<sup>2,3</sup> Alphée Michelot,<sup>1,4</sup> Christophe Guérin,<sup>1</sup> Anne-Cécile Reymann,<sup>1</sup> Laurent Blanchoin,<sup>1,\*</sup> and Rajaa Boujemaa-Paterski<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, CNRS/CEA/INRA/UJF, 38054 Grenoble, France

<sup>2</sup>Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, CNRS/UJF, Pavillon Taillefer, Faculté de Médecine, 38706 La Tronche, France

## Summary

Cells use actin assembly to generate forces for membrane protrusions during movement [1] or, in the case of pathogens, to propel themselves in the host cells, in crude extracts [2], or in mixtures of actin and other purified proteins [3]. Significant progress has been made in understanding the mechanism of actin-based motility at a macroscopic level by using biomimetic systems in vitro [4–6]. Here, we combined such a system with evanescent wave microscopy to visualize Arp2/3-mediated actin network formation at single-actin-filament resolution. We found that actin filaments that we call “primers” determine the origin of the autocatalytic and propagative formation of the actin network. In the presence of capping protein, multiple “primers” generate independent networks that merge around the object to form an outer “shell” made of entangled and capped filaments. Simultaneously, newly created filaments on the surface of the particle initiate mechanical stress, which develops until symmetry breaking. Our results and extensive modeling support that the stress, which releases into propulsive forces [7], is controlled not by any specific orientation of actin filaments toward the nucleation sites but only by new monomers added near the load surface.

## Results and Discussion

### Experimental Design

We used total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) to study the dynamic formation of Arp2/3 complex branched actin networks in real time at single-actin-filament resolution. We followed actin assembly around 10–40  $\mu\text{m}$  glass rods coated with pWA, the C-terminal region of WASP/Scar protein [8] that initiates actin polymerization in the presence of Arp2/3 complex and G-actin. The initial steps of actin assembly and the network extension around the particles were characterized with Alexa 488-labeled G-actin [9]. Additionally, the use of photosensitive Alexa 532-labeled actin allowed us to track individual actin filaments during the polymerization within such a dense and branched actin network.

Therefore, we were able to monitor in real time the sustained and autocatalytic branch formation, which continuously propagates along the particle surface.

### Actin Filament “Primers” Are Necessary to Initiate Arp2/3 Complex-Mediated Actin Polymerization around the NPF-Coated Particle

As a first step, and because nonmuscle cells maintain unpolymerized actin at concentrations as high as 100–300  $\mu\text{M}$ , we used a profilin-G-actin buffered medium containing a minimal set of purified actin-binding proteins to reconstitute sustained actin-based motility of nucleation-promoting factor (NPF)-coated beads and glass rods. The recorded velocities were 8–33 nm/s (Figures 1A and 1B; see also Movies S1A and S1B available online). In these conditions where the actin monomer pool is bound to profilin, actin filaments nucleated by Arp2/3 complex elongate strictly at free barbed ends. Although this macroscopic reconstitution under physiological conditions was an important step toward identifying the nature of the minimal set of purified proteins essential to generate actin-based motility, most of the molecular mechanisms involved in building the actin filament meshwork remain to be established.

Using evanescent wave microscopy, we observed specifically the elementary molecular reactions that control actin dynamics leading to symmetry breaking and motility at a microscopic level and addressed the central role of heterodimeric capping protein (CP; the muscle isoform is also called CapZ) in these processes. We first investigated how assembly of actin filaments at the surface of NPF-coated particles is initiated. We discovered that NPF-coated particles only induced autocatalytic actin assembly after an initial contact with a drifting actin filament in the medium (Figure 1C, red and green arrowheads; Movie S1C) or with an actin filament emanating from an adjacent branched network (Figure S1A; Movie S1D), which is consistent with biochemical measurements [8]. Accordingly, the time to first contact between the NPF-coated particles and a drifting actin filament decreases as a function of the density of “primers” in solution (Figure 1D). The observation of this activation by a drifting “primer” responsible for the initiation of protruding actin networks was buried because of the high concentration of actin filaments present in the media of reconstituted systems used previously [2–5]. Moreover, the long functionalized rods allowed us to observe that several actin filament “primers” were required to achieve the rapid and overall spread of an actin-branched network around the particle (Figure 1C). We found that the actin-branched network often drifted around the NPF-coated glass fiber, contacted the rod, initiated branches, and finally detached, so the interactions of filaments with the nucleation sites on the fiber were transient (Figure 1E; Movie S2A); this was consistent with biochemical measurements of rapid dissociation of VCA from Arp2/3 complex [10].

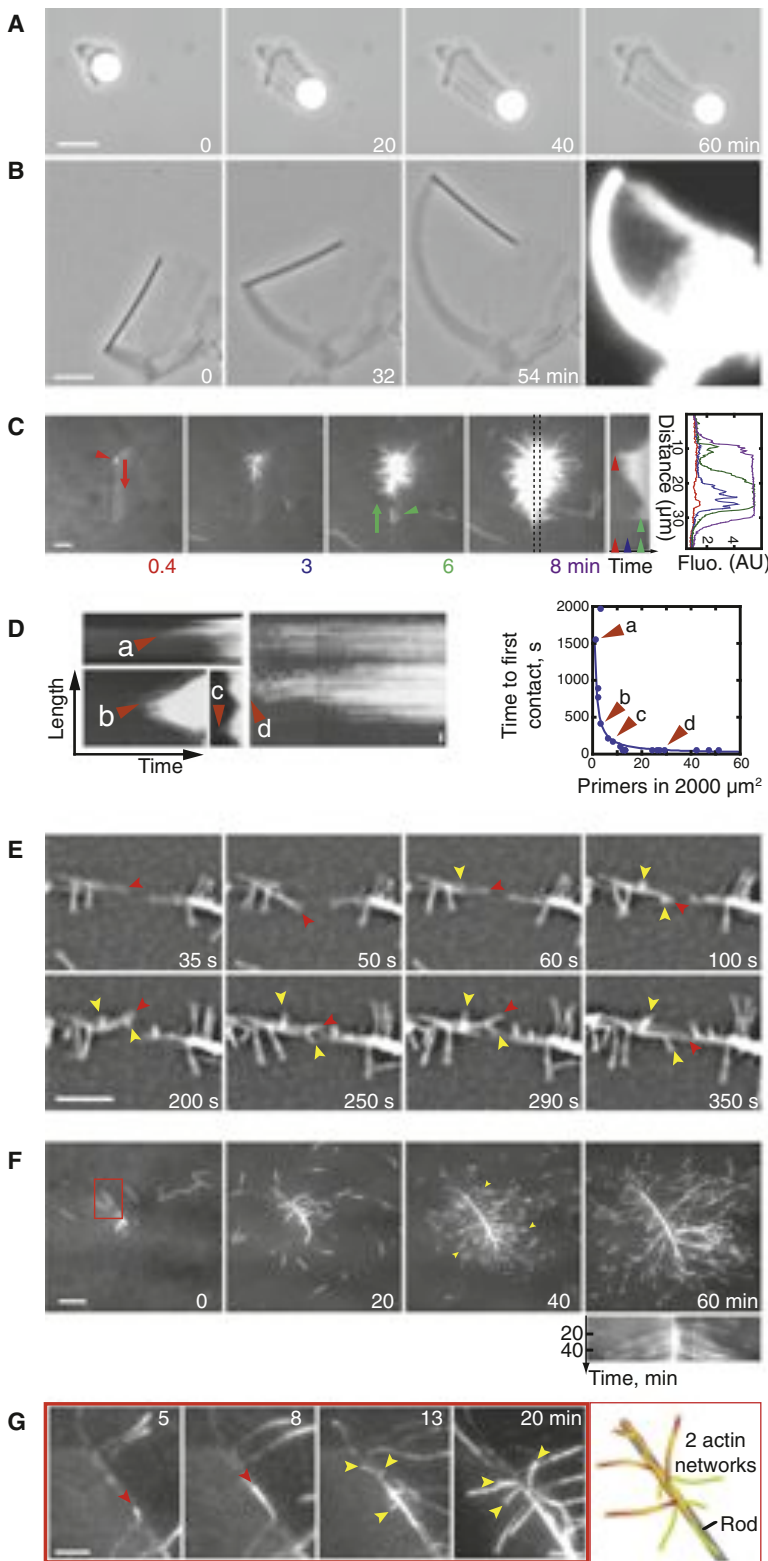
### Barbed Ends of Branched Actin Filaments Initiated at the Nucleation Sites Grow away from the NPF-Coated Particle

To further characterize the geometry of the branched network of actin filaments assembled at the surface of

\*Correspondence: laurent.blanchoin@cea.fr (L.B.), rajaa.paterski@cea.fr (R.B.-P.)

<sup>3</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>4</sup>Present address: Department of Molecular & Cell Biology, University of California, Berkeley, Berkeley, CA 94720-3202, USA



**Figure 1. Dynamic Architecture of an Arp2/3 Complex-Generated Actin Filament Network**

(A and B) Reconstituted motility of 2  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated beads or 9  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated rods, imaged by phase-contrast microscopy, with 4  $\mu\text{M}$  G-actin, 12  $\mu\text{M}$  profilin, 75 nM Arp2/3 complex, 25 nM capping protein (CP), and 1  $\mu\text{M}$  ADF/cofilin. G-actin was 7% Alexa 488 labeled. Epifluorescence image highlights the actin network density.

(C–F) Actin assembly around nucleation-promoting factor (NPF)-coated particles followed by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM).

(C) Actin filament triggers polymerization around 1  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated rods with 50 nM Arp2/3 complex and 1.2  $\mu\text{M}$  Alexa 488-G-actin. Red and green arrowheads indicate initial contact of an actin filament “primer” with the particle, and arrows show the direction of actin filament elongation. Kymographs, measured between the dotted lines, illustrate the fluorescence increase due to polymerization; corresponding fluorescence intensity distribution was calculated at different times. Color coding in graph at right is associated with times indicated by colored numbers under panels to the left.

(D) Actin polymerization around NPF-coated rods was analyzed (in conditions similar to C), and the time to first contact by a “primer” was determined for different densities of filaments measured in the evanescent wave field ( $2000 \mu\text{m}^2$ ). The spontaneous nucleation process of monomeric actin in the reconstituted medium was tuned with increasing amount of profilin. The actin filament “primers” that initiate actin assembly along the glass rod range between 1 and 2  $\mu\text{m}$  in length. Kymographs illustrate the fluorescence increase due to polymerization. (a)–(d) represent activation events. The graph at right represents the comparison between experimental results (blue dots) and the theoretical prediction (solid line) based on a diffusion-controlled capture of “primers” by rods [16].

(E) 0.5  $\mu\text{M}$  Alexa 532-G-actin polymerized in the presence of 1.5  $\mu\text{M}$  profilin, 0.5  $\mu\text{M}$  ADF/cofilin, and 33 nM Arp2/3 complex into actin filaments (red arrowheads) that initiate branches (yellow arrowheads) on 0.5  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated rods.

(F) Actin network assembly on 5  $\mu\text{M}$  GST-WA-coated rods mixed with 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa 532-G-actin and 40 nM Arp2/3 complex; kymograph highlights branching activity emerging from the rod.

(G) Zoomed region of actin network indicated by red box in (F) (color code as in E). The cartoon at right represents the two actin networks generated on the rod.

Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ . (See also Figure S1 and Movies S1 and S2.)

functionalized glass rods by Arp2/3 complex, we followed the growth of the network by using G-actin covalently labeled with Alexa 532. Rapid photobleaching of polymerized Alexa 532-actin allows one to follow barbed ends elongating either outwards or, interestingly, within the branched network, because they are much brighter than older regions

of the filaments [11]. Whereas previous studies described actin incorporation sites around motile particles by static labeling of the branched actin network or by speckle microscopy [12, 13], here we monitored actin filament network formation in real time at single-actin-filament resolution and obtained a chronological description of the elementary events that lead to actin-based motility. We found that the actin-branched network elongated with all barbed ends growing away from the NPF-coated glass rod (Figure 1F; Movie S2B; see also Figure S1B for modeling), subsequent to the stimulation of Arp2/3 complex branching activity on actin filaments growing along the NPF-coated rod (Figure 1G; Movie S2C).

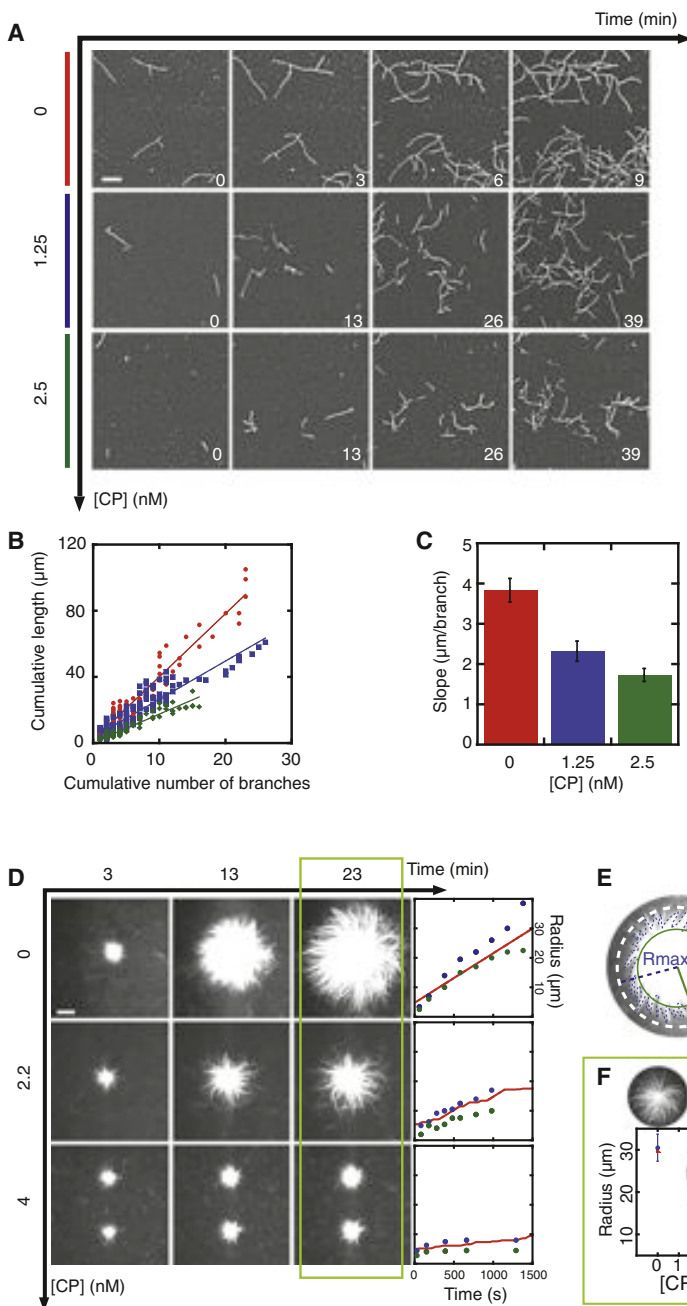


Figure 2. Capping Protein Limits the Average Network Extension Radius around Particles by Reducing the Average Branch Length

(A) Dynamic assembly of actin-branched structures in solution observed by TIRFM with 1  $\mu\text{M}$  Alexa 568-G-actin, 10 nM Arp2/3 complex, 113 nM GST-WA, and CP at the indicated concentrations.

(B) The total number of branches counted correlates linearly with the cumulative length (dots) as predicted by simulation (lines).

(C) The average filament length is reduced with increasing CP concentration. Error bars are the error of each slope calculated from the linear regressions in (B).

(D) Decrease of the radius of actin networks around 4  $\mu\text{M}$  GST-WA-coated beads with 1.5  $\mu\text{M}$  Alexa 532-G-actin, 30 nM Arp2/3 complex, and CP at the indicated concentrations; each reaction was followed by TIRFM. Rightmost column: comparison between the experimental actin network radius around beads versus time (blue dots =  $R_{\text{max}}$ , green dots =  $R_{\text{min}}$ ) and in silico simulation (solid line) (see Figure S1C and Supplemental Experimental Procedures).

(E) Cartoon illustrating the  $R_{\text{max}}$  and  $R_{\text{min}}$  determination.

(F) Experimental (blue dots) and simulated (red triangles) mean actin network radius decreases with CP concentration ( $n = 20$  for each condition). Error bars represent the standard deviation of the radii measured for each CP concentration.

Scale bars in (A) and (D) represent 5  $\mu\text{m}$ . (See also Figure S1.)

average filament length (Figure S1C). As a consequence, the average distance between two branching points on a mother branch was negatively correlated with increasing CP concentration as a result of less available actin filament length to host the nucleation of new branches (Figure 2C). Second, when NPFs were located on beads or glass rods, increasing the concentration of CP reduced the radius of the actin network assembled around the particle (Figures 2D and 2E), in agreement with our kinetic model implemented with the capping activity (Figure 2F; Supplemental Experimental Procedures).

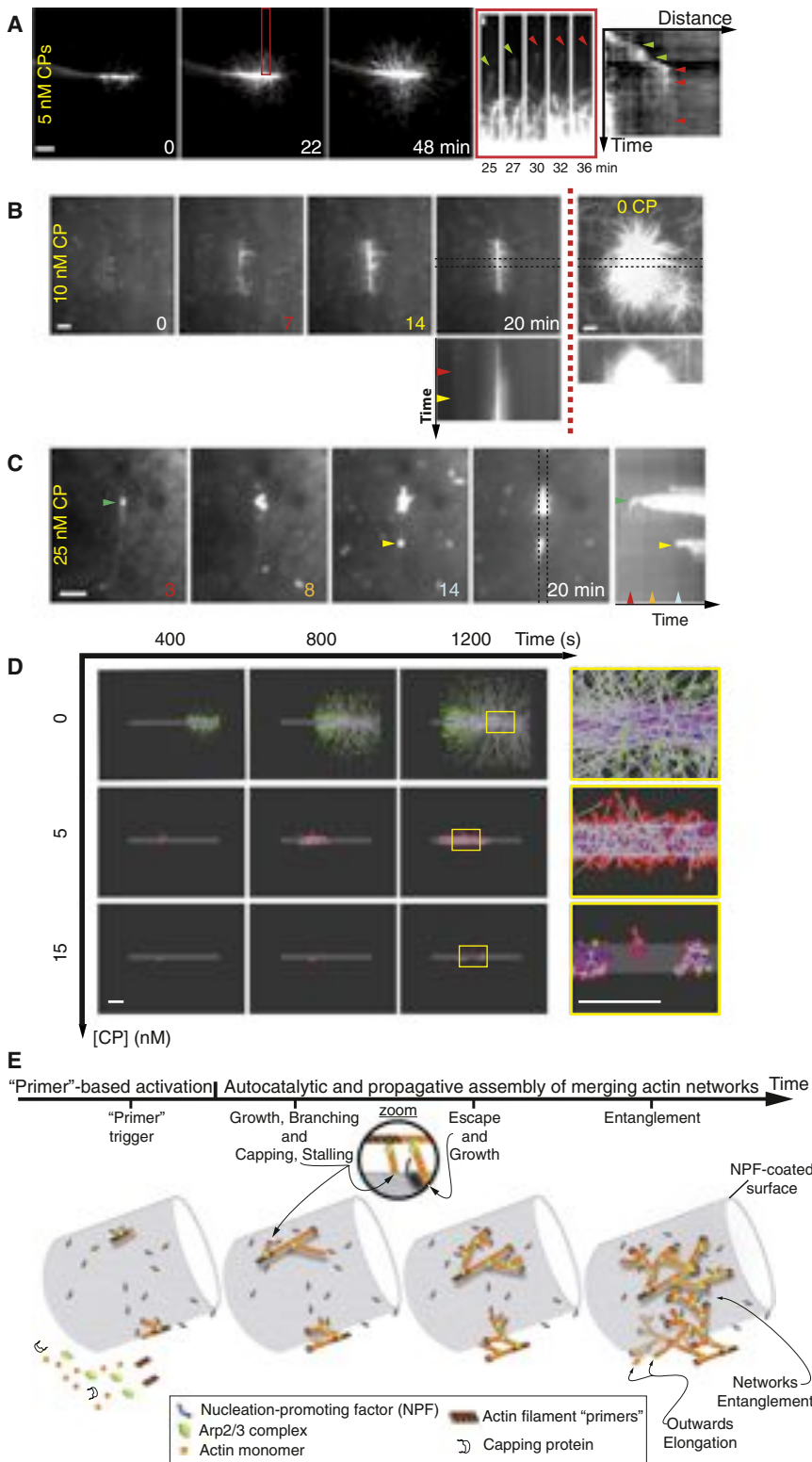
Capping actin filament barbed ends constrained actin filament elongation near the NPF nucleating sites (Figure 2D; Figure 3B; Figure S2C), in agreement with previous studies [6, 12], but without necessarily affecting the orientation of branches in the network assembled around

### Capping Protein Shortens the Growth of Actin Filament “Primers” and Creates Independent Networks around the NPF-Coated Particle

We investigated the role of CP in the architecture of a growing Arp2/3 complex-mediated actin network prior to symmetry breaking. CP was identified as one of three actin-binding proteins (ABPs) that precisely choreograph actin polymerization and organization to generate “comet tail” motility in vitro [3]. Heterodimeric CP binds with high affinity (0.1 nM) to filament barbed ends and prevents subunit loss or addition. First, we followed Arp2/3 complex-mediated branch formation in solution (Figure 2A) to quantify the kinetic formation of a dendritic filament network (Figure 2B; Figure S1C). Both the total number of branches and their cumulative length increased exponentially over time. Increasing CP concentration did not affect this autocatalytic behavior but reduced the

particles. To increase the spatial resolution, we followed Arp2/3 complex-mediated actin-branched network assembly around glass rods, instead of around beads, with Alexa 532-actin monomers. The branched actin filaments grew away from the rod until being capped at their barbed end (Figure 3A). Using photobleaching of Alexa 532-actin, we followed the elongation of new fluorescent actin branches until they disappeared after a capping event (Figure 3A; Movie S3A). When the CP concentration was increased, the actin-branched network did not propagate efficiently along the rod (Figure 3C). In order to obtain a homogenous spread of branched filament network along the functionalized rod, actin assembly must be initiated by multiple actin filament “primers” at several NPF coating sites (Figure 3C).

We simulated the kinetics of nucleation, branching, and capping of new filaments on glass rods (Figure 3D; Movie



**Figure 3. Spreading of Actin-Branched Network along Glass Rods Emanates from Actin Filament “Primers” and Is Limited by Capping Protein**

(A–C) Actin assembly is followed by TIRFM. Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

(A) 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa 532-G-actin polymerizes around 5  $\mu\text{M}$  GST-WA-coated glass rods with 80 nM Arp2/3 complex and 5 nM CP. Barbed ends grew away from the rod (green arrowheads) before been capped (red arrowheads). The fluorescence of the Alexa 532 then disappears as a result of photobleaching, as shown in the zoom of the red boxed area and in its associated kymograph.

(B and C) 2  $\mu\text{M}$  Alexa 488-G-actin polymerizes around 1  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated glass rods with 25 nM Arp2/3 complex and CP as indicated. Arrowheads indicate the contact of the initial actin filament “primer” with the NPF-coated particle. The color code used in the kymographs in (B) and (C) is associated with the indicated times.

(D) Simulated network growth. Activated Arp2/3 complex (magenta dots) initiates branches (gray lines) on the actin filament “primers.” Free barbed ends (green dots) escape the rod surface or are stalled against it (blue dots). However, because of thermal fluctuations, stalled barbed ends are oriented tangentially to the particle surface. Thereby, actin filament barbed ends resume their growth (yellow dots). In the presence of CP, the spatial actin network extension is reduced (capped barbed ends; red dots). The rightmost column magnifies the yellow boxed regions of each row. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

(E) Model of branched network formation around the motile particle. The molecular mechanism of Arp2/3 complex-mediated network formation consists of an initial “primer”-based activation (“primer” trigger step) followed by the autocatalytic and propagative spread of the network. Each “primer” creates an independent network. These networks merge to cover the particle. Each new branch can transiently be stalled against the load (see Figure S2Ab and [17]) or elongate away from it before being capped. Networks are viewed from the top. The encircled area at top is a zoomed side view of some branching points. (See also Figure S2 and Movie S3.)

of new filament branches was a self-sustained process that depended on CP concentration (Figure 3D; Movie S3B). Barbed-end capping restricted the maximal growth of the network, whereas it had little or no effect on the self-sustained nucleation process at low CP concentration (Figure 3D; Movie S3B). Additionally, capping modified the distribution of filament branch lengths, but barbed-end orientation remained isotropic. Because CP reduced the average

S3B) or beads (Figures 2D–2F) by using the different kinetic steps illustrated in Figure 3E (see also the detailed description of the model in Supplemental Experimental Procedures and Figures S2A and S2B). Based on the experimental settings in which neither the density of NPFs nor the concentrations of Arp2/3 complex or actin monomers were limiting, nucleation

filament length, both the network radius and the rate of network extension were smaller with than without CP. Moreover, CP increased the density of actin filaments inside the network. The model shows that a single actin filament “primer” was sufficient at low CP concentration to trigger an explosive generation of branches (Figure 3D, top and middle panels;

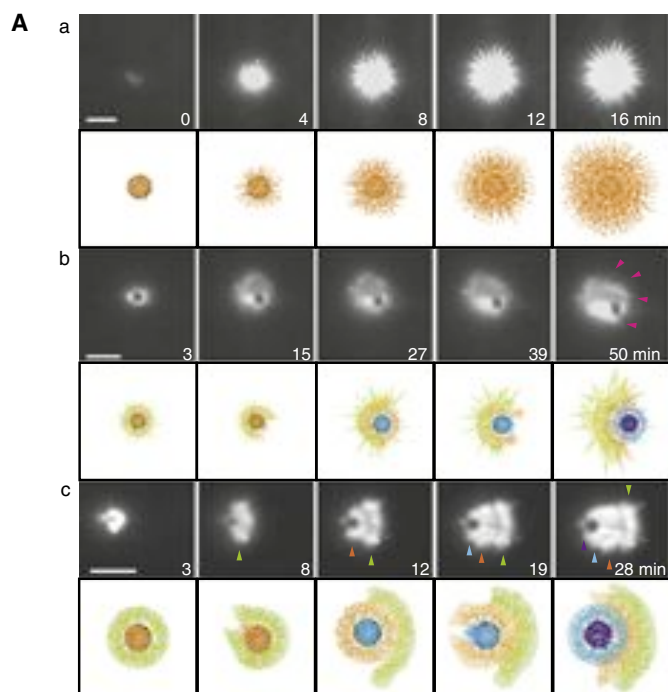


Figure 4. Network Rupture Occurs through a “Multiple Shell-Breaking” Process of Randomly Oriented Actin Filaments

(Aa–Ac) An isotropic actin network assembles around 2  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated beads mixed with 2  $\mu\text{M}$  Alexa 488-G-actin and 50 nM Arp2/3 complex (Aa). Addition of 25 nM CP triggers a “multiple shell-breaking” process (Ac); arrowheads indicate the successive shells. We changed the ratio of Arp2/3 complex to CP and still observed the multiple shell-breaking process for 4  $\mu\text{M}$  GST-pWA-coated beads mixed with 4  $\mu\text{M}$  Alexa 488-G-actin, 12  $\mu\text{M}$  profilin, 100 nM Arp2/3 complex, and 25 nM CP. However, insufficient capping leads to a “fishbone” pattern in the actin “comet” (Ab). Arrowheads highlight elongating filaments or bundles growing away from the bead. Scale bars represent 10  $\mu\text{m}$ .

(B) Under the experimental conditions in (Ac), the model (see [Supplemental Experimental Procedures](#)) shows that after an isotropic and homogeneous growth of filaments nucleated on the bead (10–170 s), the internal stress fractures the network (170 s) before the filaments are displaced (between 170 s and 230 s). Newly nucleated actin filaments spread over the bead “empty zone” (after 230 s), leading to the reconstruction of a fully developed network. The free barbed ends in the network that move away from the bead (170–230 s) are rapidly capped and form the “comet tail.” Scale bar represents 5  $\mu\text{m}$ . (See also [Figures S2 and S3](#) and [Movies S4 and S5](#).)

#### Evidence for a “Multiple Shell-Breaking” Process during Actin-Based Motility

To bridge the molecular events of actin filament meshwork formation and actin-based motility of NPF-coated beads, we used evanescent wave microscopy to follow actin assembly around particles until symmetry breaking. In the absence of CP, functionalized beads assembled an actin network with a star-like pattern, as Arp2/3 complex-nucleated branches at the bead surface with their barbed ends growing away from the bead ([Figure 4Aa](#)). Surprisingly, in the presence of sufficient CP, we found that sustained motility results from a “multiple shell-breaking” process ([Figure 4Ac](#); [Movie S4B](#)) during “continuous movement” observed by phase contrast or epifluorescence microscopy ([Figures 1A and 1B](#)).

Based on this observation, we propose the following model centered on the control of actin filament length by CP ([Figure S2C](#)): (1) CP creates a “dead zone” at the outer actin “shell” by inhibiting all actin filament elongation beyond the shell radius; (2) Arp2/3 nucleation occurs strictly at the bead surface because NPF is immobilized on the particle; this will create an active polymerization zone embedded within the constrained dead zone; (3) continuous actin nucleation in the vicinity of the bead will generate an internal stress that breaks the former dead zone; and (4) CP will block elongation of actin filaments in the “active zone,” creating a new dead zone, while Arp2/3 complex nucleates new actin filaments at the surface of the bead, building a new active zone. The dead zone breaking repeats, leading to the multiple shell-breaking process. The existence

of cyclic versus continuous network breakage was assigned to different mechanisms controlled by either particle size [5] or the role of fluctuations behind symmetry breaking [6, 14]. Based on our observations, we propose that the actin network oscillates between expansion and rupture phases, but depending on the network thickness at rupture, this process may or may not be observable via conventional microscopy methods but is always observable via TIRFM.

Moreover, when the ratio between Arp2/3 complex and CP is low, multiple shell breaking still occurs, but some actin

[Movie S3B](#)). Conversely, experimental data and numerical simulations showed that above a CP concentration of  $\sim 10$  nM (in our experimental setup), the shortened actin filament “primers” and reduced duration of branch elongation were unable to sustain autocatalytic branching ([Figures 3C and 3D](#), bottom panel; [Movie S3B](#)). For CP concentrations above 10 nM, the model predicts that up to 20 independent actin filament “primers” were necessary to generate a fully developed filament meshwork comparable to experimental data ([Figure 1](#); [Figure 4](#)).

filaments elongate beyond the dead shell radius (Figure 4Ab; Figure S2C; Movie S4A), giving rise to the “fishbone” pattern observed previously [15].

### Symmetry Breaking: The Elastic Continuum Made of Elementary Merging Actin Meshworks Breaks upon Mechanical and Spatial Constraints

We modeled dynamic organization of actin filaments during network formation and shell breakage (Supplemental Experimental Procedures). Simulations presented in Figure 3 show that when the CP concentration is high (~25 nM; see Figure 4A), about 30 independent “primers” are required to generate full coverage of the bead by growing actin filaments. Extension and merging of these elementary networks (Figure 3E; Figure S2E), each generated by a single “primer” filament, provides a continuous tiling of the bead within ~30 min (Figure 4B; Movie S5). Extension of this network is accompanied by a slow but constant displacement of the actin filaments away from the bead (Figure 3E; Figure 4B; Movie S5). However, because entanglements between networks tend to oppose the forces generated at the bead surface, the progression of the network slows down and it reaches equilibrium. At 170 s, thermal fluctuations lead to the uniform tiling rupture by moving the filaments away from the bead and leaving an empty space (Figure S2E). This rapid movement (between 180 s and 230 s) relieves the stress applied to the actin filaments, which in turn results in a marked increase in the generation of new filaments (Figure S2Fa). However, the orientation of actin filaments remains isotropic (Figure S2Fc). The occurrence of symmetry breaking of the actin filament network around a NPF-coated bead in the presence of a high concentration of Arp2/3 complex and in the absence of CP (Figure S3) confirms our model’s fundamental hypothesis of barbed-end steric constraint.

### Concluding Remarks

We propose that Arp2/3 complex-mediated force generation is based on a simple but fundamental steric constraint wherein elongating barbed ends tend to escape when they are aimed directly at the load and simultaneously entangled into a broad actin meshwork. Thus, filaments either growing along the load or growing outwards create a steric hindrance and a stress, which releases into propulsive forces, consistent with the mechanics of symmetry breaking of actin gel [6, 7]. Therefore, a challenge for future investigations will be to constrain our molecular model with previous observations on the symmetry breaking time [7] to predict at the molecular level the mechanical properties of the active gel around the motile particle.

We have demonstrated that actin filaments that we call “primers” initiate the formation of the actin network. Physiological concentration of capping proteins shortens the growth of these “primers” and creates independent networks made of isotropically oriented actin filaments that merge around the motile particle. Moreover, the movement of NPF-coated particles then results from a multiple shell-breaking process controlled by the tight tiling of these independent networks, each grown from a single actin filament “primer.” Our observations suggest that force production necessary to propel cytoplasmic particles or to protrude the plasma membrane relies not necessarily on any preferential orientation of actin filaments inside the network, but on simple and universal physics laws. The “primer”-based mechanism likely emerges as a general feature of branched network assembly involved in “comet tail” or lamellipodium formation during pathogen or cell motility. Based on this mechanism, actin filaments parallel

to the nucleating surface constitute an efficient and optimal way to initiate branched network formation upon signaling.

### Supplemental Information

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, three figures, and five movies and can be found with this article online at doi:10.1016/j.cub.2009.12.056.

### Acknowledgments

We are grateful to T.D. Pollard, J. Van der Gucht, J.-F. Joanny, C.J. Staiger, and D. Vignjevic for helpful discussions and insightful suggestions. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche grant ANR-06-PCV1-0022 to L.B. and J.-L.M.

Received: October 1, 2009

Revised: December 22, 2009

Accepted: December 23, 2009

Published online: February 25, 2010

### References

1. Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
2. Cameron, L.A., Giardini, P.A., Soo, F.S., and Theriot, J.A. (2000). Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 110–119.
3. Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613–616.
4. Akin, O., and Mullins, R.D. (2008). Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell* 133, 841–851.
5. Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R.M., Carlier, M.F., and Sykes, C. (2002). The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* 417, 308–311.
6. Dayel, M.J., Akin, O., Landeryou, M., Risca, V., Mogilner, A., and Mullins, R.D. (2009). In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility. *PLoS Biol.* 7, e1000201.
7. van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 7847–7852.
8. Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3739–3744.
9. Michelot, A., Berro, J., Guérin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., and Blanchoin, L. (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17, 825–833.
10. Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D., and Higgs, H.N. (2001). Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* 3, 76–82.
11. Michelot, A., Derivery, E., Paterski-Boujemaa, R., Guérin, C., Huang, S., Parcy, F., Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2006). A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr. Biol.* 16, 1924–1930.
12. Cameron, L.A., Svitkina, T.M., Vignjevic, D., Theriot, J.A., and Borisy, G.G. (2001). Dendritic organization of actin comet tails. *Curr. Biol.* 11, 130–135.
13. Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2003). Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell Biol.* 160, 951–962.
14. Cameron, L.A., Robbins, J.R., Footer, M.J., and Theriot, J.A. (2004). Biophysical parameters influence actin-based movement, trajectory, and initiation in a cell-free system. *Mol. Biol. Cell* 15, 2312–2323.
15. Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M.F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* 2, 385–391.
16. Berg, O.G., and von Hippel, P.H. (1985). Diffusion-controlled macromolecular interactions. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 14, 131–160.
17. Mogilner, A., and Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71, 3030–3045.



**Current Biology, Volume 20**

**Supplemental Information**

**A “Primer”-Based Mechanism Underlies**

**Branched Actin Filament Network**

**Formation and Motility**

**Vérane Achard, Jean-Louis Martiel, Alphée Michelot, Christophe Guérin,  
Anne-Cécile Reymann, Laurent Blanchoin, and Rajaa Boujemaa-Paterski**

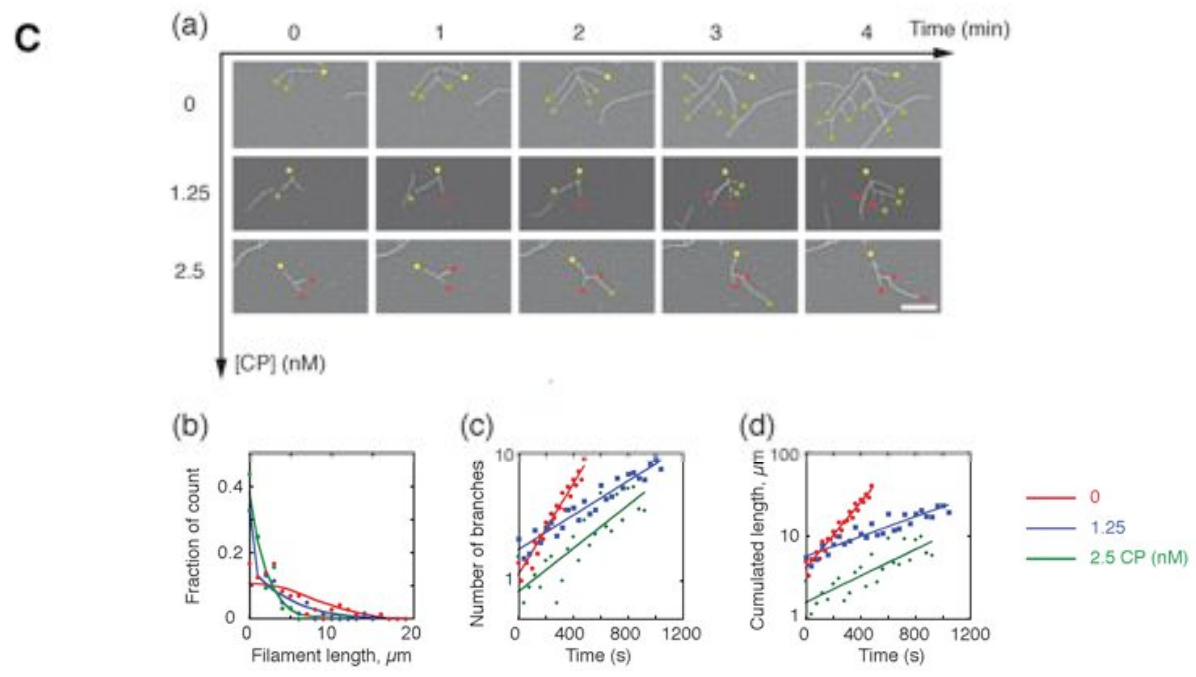
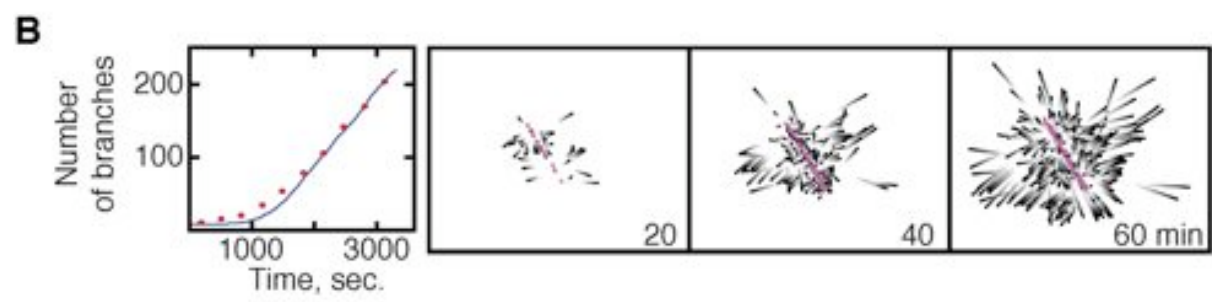
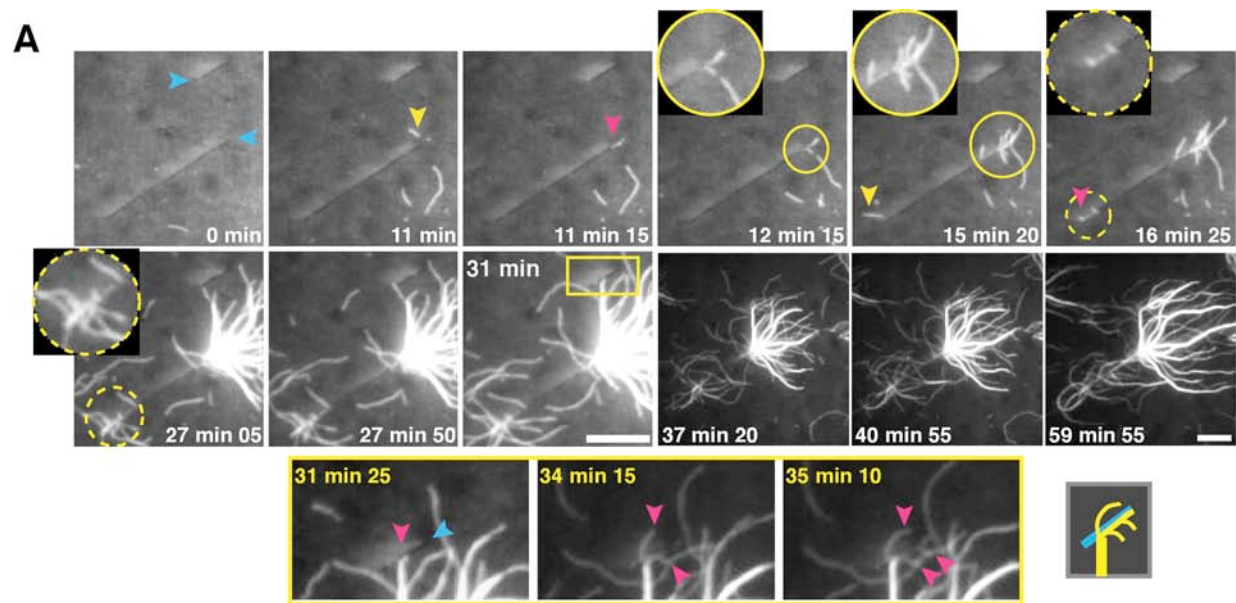


Figure S1.

## Figure S1. Related to Figures 1 and 2

(A) Actin filament “primers” are required to achieve the overall spread of actin-branched network around the NPF-coated glass rods. Actin assembly occurred around 1  $\mu\text{M}$  GST-WA-coated rods with 25 nM Arp2/3 complex, 2  $\mu\text{M}$  Alexa488-G-actin, 6  $\mu\text{M}$  profilin. Two rods were monitored (blue arrowheads) by TIRFm. Two distinct actin filament “primers” (yellow arrowheads) activated the Arp2/3 complex branching activity along the lower rod. The encircled zoomed areas (solid and dotted circles) highlight the stable interaction between the “primer” and the particle (pink arrowheads), the elongation of each actin filament “primer” along the functionalized rod and its subsequent branching by Arp2/3 complex. The elongation of actin filament branches emanating from the lower rod triggers Arp2/3 complex-mediated actin network assembly on the functionalized upper rod. However, it is of interest to emphasize that this second rod recruits only well positioned filaments (parallel and not crossing the rod), as shown in the zoomed rectangle area (pink arrowheads indicate the contact, the filament elongation and branching) and in its associated cartoon (actin filaments were drawn in yellow and the rod in blue). Bars are 10  $\mu\text{m}$ .

(B) Actin filaments generated at the particle surface are all elongating outwards. Numerical simulations of our experiments (see Supplemental Data), using kinetic constants for each elementary reaction, reproduced qualitatively and quantitatively networks of actin filaments with all barbed ends growing away from NPF-coated rods. Moreover, we found that the number of branches emanating from the glass rod increased exponentially over time, as expected from the autocatalytic production mechanism.

(C) CP reduces the total number of branches and their cumulated length.

(Ca) The number and the length of each branches in growing tree-like structures observed by TIRFm are determined as indicated in the Experimental Procedure section. Yellow, green and red dots indicate, respectively, the pointed end, free barbed ends and capped barbed ends. Bar is 5  $\mu\text{m}$ .

(Cb-Cd) Distribution of actin filament length in the absence of CP (red dots), 1.25 nM of CP (blue dots) and 2.5 nM of CP (green dots). As expected, increasing concentrations of capping favor short filaments. The solid curves are given by polynomial fitting of experimental histograms (dots).

(Cc and Cd) The number of branches (Cc) and the cumulated length (Cd) for one branched structure are well approximated by exponential functions of time (solid lines, log scale). The exponential growth of the structure size (both in the number of branches and the cumulated length) clearly shows the autocatalytic nature of branching: as actin filaments elongate, they offer more surface to nucleate new branches. Note that increasing concentration of capping only decrease the rate of the exponential growth but does not change the exponential nature of branching.

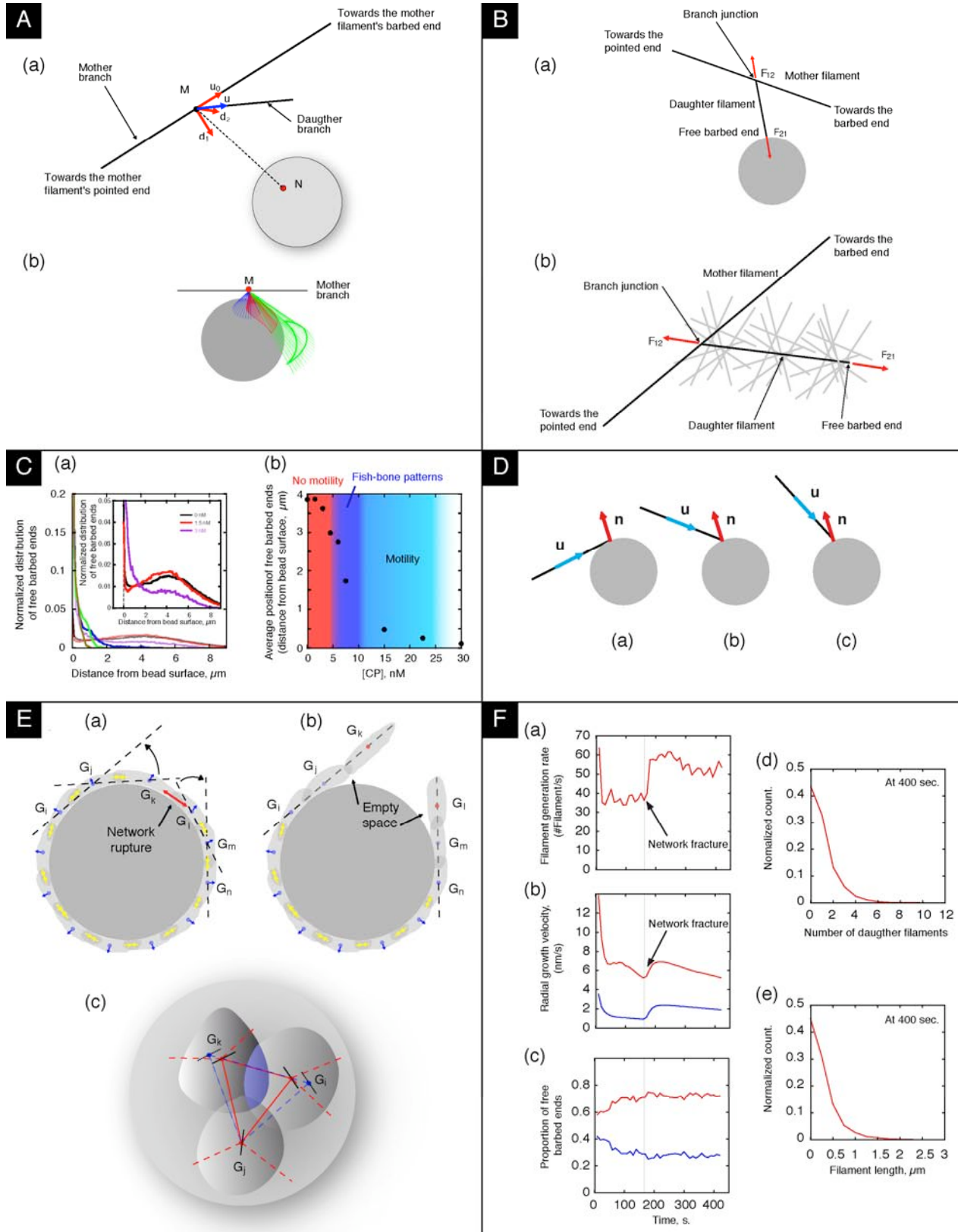


Figure S2.

## Figure S2. Modeling (Related to Figures 3 and 4)

(A) Geometrical aspects of actin filaments branching.

(Aa)  $u_0$  (resp.  $u$ ) is the unit vector along the parent branch (resp. the daughter branch).  $(M, u_0, d_1, u_2)$  form an orthonormal system of reference with vector  $d_1$  orthogonal to  $u_0$  and in the plane containing the parent branch and the point N (position of the active NPFs-Arp2/3 complex on the bead.) The angle  $\alpha$  between  $u$  and  $u_0$  on one hand and the angle  $\phi$  between the projection of  $u$  orthogonal to  $u_0$  on  $d_1$  on the other hand are normally distributed random variables with average and standard deviation respectively  $(70^\circ, 7^\circ)$  for  $\alpha$  and  $(0, 7^\circ)$  for  $\phi$ . Cartoon not drawn to scale.

(Ab) The probability of activation of a new branch at position M on the mother filament (large red dot) is proportional to the bead area enclosed in the blue cone. This cone includes all the bead area that is at a distance ( $d$ ) from M, smaller than a critical value ( $d \sim 10$  nm). Additionally, the new branch is included in a tilted cone whose main axis makes an angle of about  $70^\circ$  with the mother filament. Depending on the relative position of M and the bead, the new branch is arrested by the surface (red cone) or can elongate away from the load (green cone).

(B) Force generation by growing actin filament. We take into account forces that are produced by actin filaments growing against the bead (Ba) or entangled in the meshwork made of other filaments (Bb). The two forces  $F_{12}$  and  $F_{21}$  (red arrows), applied respectively on the daughter-mother branching point and the bead (Ba) or on other filaments entangled in the meshwork (Bb), have the same magnitude but opposite directions (i.e.  $F_{12} + F_{21} = 0$ ). Note that the barbed end of the daughter branch is free to elongate. Cartoon not drawn to scale.

(C) Distribution of free, non-stalled, barbed ends around the bead determined from model simulations.

(Ca) The distribution of free barbed ends that are aimed at the bead surface display a complex pattern as the concentration of CP is increased. Curves represent the average distribution of free barbed ends for 20 simulations run over 150 s for increasing CP: 0 nM (black), 3 nM (red), 5 nM (magenta), 15 nM (blue), 22.5 nM (green) and 30 nM (brown). To allow direct comparison between all simulations conditions, curves corresponding to 0, 3 and 5 nM are plotted in the main figure (attenuated colors) and enlarged in the inset.

(Cb) The average position of free, non-stalled barbed ends, determined from the distribution curves in (Ca), gets closer to the bead surface as the CP concentration increases (black dots). The red and blue domains correspond, respectively, to non-motile (red) or motile beads (blue) in our experiments. The bead motion for CP concentration  $> 30$  nM is inhibited, as indicated by the colorless part of the graph. The dark blue domain corresponds to the existence of experimentally observed fish-bone patterns (see Figure 4).

(D) Model for actin filament-bead interactions. We distinguish three situations where the actin filament direction  $u$  (blue arrow) has different positions with respect to  $n$ , the unit vector normal to the bead (red arrow). The actin filament (black line) is free to polymerize ( $u \cdot n > 0$ ) (Da); the angle between  $n$  and  $u$  is sufficient to partially block the actin filament ( $\theta < u \cdot n < 0$ ) (Db); stalling is complete ( $u \cdot n < \theta$ ) (Dc). The threshold  $\theta$ , which distinguishes situations in panels b and c, is given by the condition

$$\mathbf{u} \cdot \mathbf{n} = -\frac{|\mathbf{F}_{Stall}|}{|\mathbf{F}|} < 0,$$

where  $|\mathbf{F}_{Stall}|$  and  $|\mathbf{F}|$  are, respectively, the magnitude of the stall force and the magnitude of the buckling force exerted by the filament. Cartoon not drawn to scale.

(E) Rupture of the meshwork.

(Ea and Eb) We assume that the development of entanglement between networks forms a whole elastic continuum medium subjected to two kind of antagonistic constraints (Ea). First, the forces exerted by filaments against the bead (blue arrows) push the continuum medium outwards; second, entanglement between networks (yellow arrows) tends to limit the medium movement outwards [1]. Once a large fluctuation in the internal stress develops (red double arrow, Ea), it balances the entanglement between networks out by creating a rupture (black arrows, Ea). Since attached networks are equivalent to an

elastic medium, breaking the bonds between networks (Eb) results into the formation of a planar structure, which corresponds to a minimum for the elastic energy.

(Ec) Network dynamics. We model each network generated by a single actin filament "primer", represented as a continuous black line segment, as a rigid body with a barycenter, denoted  $G$ , and an orientation, given by the orientation of the initial filament (black segment). Adjacent networks are connected by filaments in their overlapping domain (blue region). In addition, some of these filaments in the entanglement are uncapped and may participate to stress generation that will separate the two networks (dashed blue line between barycenters  $G_i$  and  $G_k$ ). During movement, each network behaves as a rigid body and is displaced during the movement (as shown by the black solid and dashed line segments). The solid red (resp. dashed blue) lines materialize the relative position of the networks before (resp. after) displacement. Cartoon not drawn to scale.

(F) Statistic compartment of actin filaments in the meshwork during symmetry breaking process.

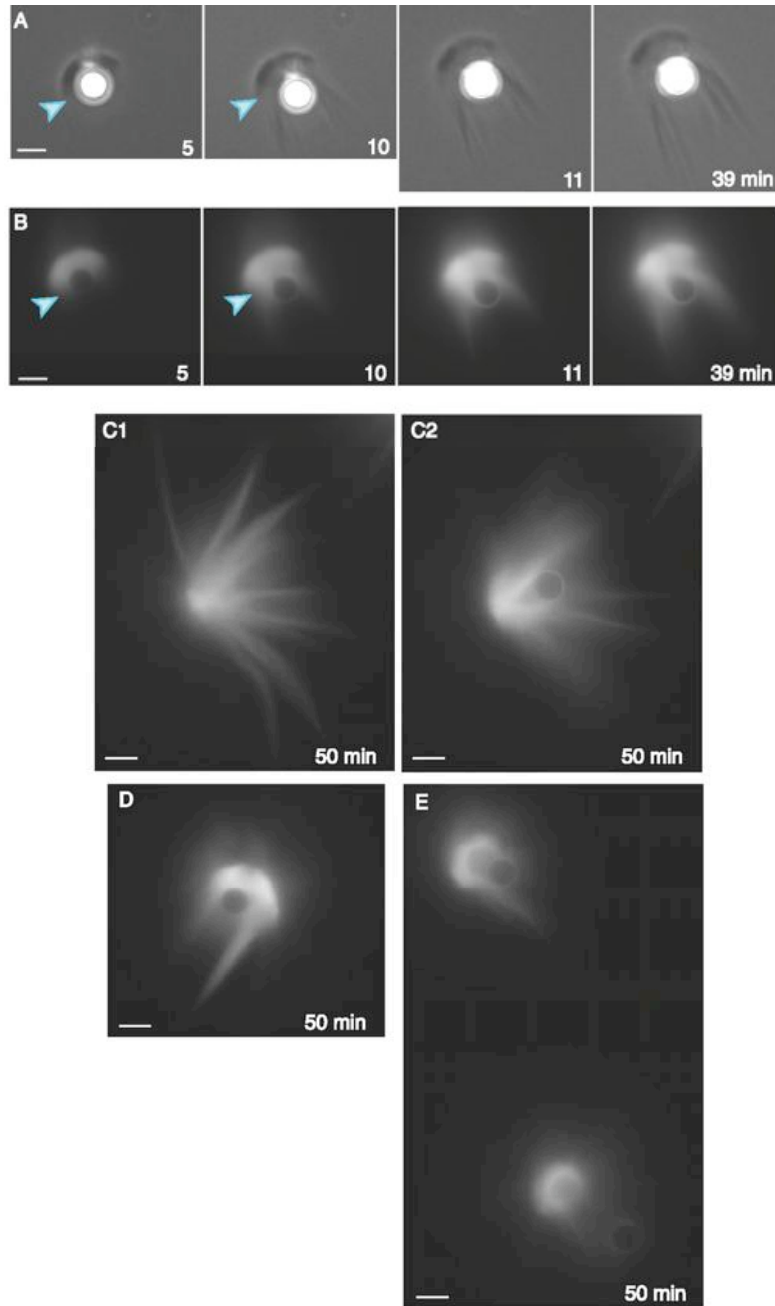
(Fa) Rate of new filament generation during simulations. The rupture of the network (at  $t \sim 180$  s), which offers more space for further branching, results into a sharp increase of the branch generation rate.

(Fb) Average (blue curve) and maximal (red curve) radial velocities of the filament movement. The initial drop (between 0 and 170 s) corresponds to generation of an internal stress that reduces actin polymerization; hence, both the maximal and average network extensions are reduced. The stress relief resulting from network rupture ( $\sim 180$  s) is responsible for a net acceleration of the movement.

(Fc) The proportion of free barbed ends hitting the bead (blue curve) or entangled in the network (red curve) remains practically constant over time. As the active barbed ends within the network have no preferential orientation, the rupture of the network at  $t \sim 180$  s does not induce any network re-orientation of these ends.

(Fd) Number of offspring per filament at  $t = 400$  s (final simulation time).

(Fe) Filament length distribution at  $t = 400$  s. Most of the filaments are short, which is consistent with the model assumption that filaments are rigid rods.



**Figure S3. Symmetry Breaking of Actin Network Polymerized around GST-pWA-Coated Beads without CPs (Related to Figure 4)**

2 μM GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4 μM actin monomers (1/4 of which were Alexa568 labeled), 12 μM profilin, 300 nM Arp2/3 complex. Images were taken at the indicated times during polymerization.

(A and B) Time-lapse images of beads acquired quasi simultaneously by phase contrast and fluorescence microscopy. Arrows indicate the position of the dense initial actin shell which after symmetry breaking lead to the bead's expulsion and the formation of a small comet tail. Bundles of actin filaments escaping from the bead are also present.

(C-E) Three different images of beads are presented. C1 and C2 are different focus planes of the same bead. Bar represents 5 μm.

## Supplemental Experimental Procedures

### Protein Expression and Purification

Actin was purified from rabbit skeletal-muscle acetone powder [2, 3]. Actin was labeled on lysines with Alexa-532 or Alexa-488 according to Isambert et al [4]. Arp2/3 complex was purified from bovine brain extracts as according to Egile et al. [5]. GST-WA, GST-pWA, Human profilin, Mouse capping protein and ADF/cofilin were expressed and purified as described previously [6-9].

### Motility Assay in G-Actin Conditions

Glass rods were extracted from Glass microfiber filters (Whatman, Schleicher et Schuell, Germany). Carboxylated polystyrene microspheres (4  $\mu\text{m}$  in diameter, Polyscience, Eppelheim, Germany) or glass rods were coated with the indicated concentration of GST-Scar WA or GST-human WASP pWA according to Loisel et al. [10]. The coated particles were introduced in the motility assay containing 10 mM HEPES [pH 7.5], 1.5 mM Mg-ATP, 0.1 M KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 3 mM DTT, 0.1 mM DABCO, 0.2% methylcellulose, 1% BSA and proteins as indicated in the figure legends. Samples were observed in phase contrast microscopy or epifluorescence microscopy as in [11].

### Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy

Protein mixtures were diluted in freshly prepared fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl [pH 7.8], 50 mM KCl, 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 100 mM DTT, 3 mg/ml glucose, 20 mg/ml catalase, 100 mg/ml glucose oxidase and 0.5% methylcellulose to induce actin polymerization and were followed by TIRF microscopy. Alexa-532-actin polymerization was observed and acquired with a homemade TIRF microscope [12]. Time course of Alexa-488-actin polymerization was observed on a Nikon TE2000E inverted microscope equipped to receive TIRF illumination. The time course of actin polymerization was acquired from 10 seconds up to 20 seconds time intervals with a QuantEM 512SC – Quantitative EMCCD camera (Roper Scientific GmbH, Germany) with MetaMorph version 7.5.

### Image Analysis

The analysis of images of the actin-branched network dynamics in solution was carried out using NeuronJ, plugging of the free software ImageJ [13]. We developed a Matlab (R2008a) code to implement simulations of the kinetics of network formation and force production (see section below). The code was run on a Dell Xeon (3GHz) computer.

### Description of Model and Numerical Simulation Methods

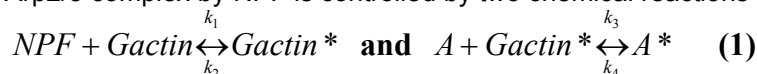
#### Model layout

Mathematical modeling is based on the kinetics of nucleation, elongation and branching of actin filament network at the surface of NPF-coated particles and the subsequent mechanical stress that builds up within this elastic growing network. Here, we document the three major components of the model for (i) kinetics of the network growth, (ii) the generation of forces by actin polymerization and (iii) the subsequent displacement of actin filaments induced by the stress release.

#### Kinetics of filament nucleation, elongation, branching and capping

We limited the set of chemical reactions to (i) activation of the Arp2/3 complex by NPF at the bead surface or glass rod, (ii) branching of new filaments on pre-existing filaments, (iii) elongation and capping of the barbed ends of actin filaments.

**Step 1.** Activation of Arp2/3 complex by NPF is controlled by two chemical reactions



where A is the Arp2/3 complex and Gactin is the actin monomer;  $Gactin^*$  and  $A^*$  are, respectively, the complex between NPF and actin monomer and the ternary complex NPF-Arp2/3-Gactin. We adapt the Gillespie algorithm to simulate the formation of the active ternary  $A^*$  and its dissociation. We assumed that the average time for the  $A^*$  formation from isolated proteins is:



$$\tau_1 = \frac{1}{k_3[A]} \left( 1 + \frac{k_2}{k_1[Gactin]} \right) + \frac{1}{(k_1[Gactin] + k_2)} \left( \frac{k_2}{k_1[Gactin]} \right),$$

and the average time for its dissociation into its elementary compound is:

$$\tau_2 = \frac{1}{k_4} + \frac{1}{k_3[A]} \left( 1 + \frac{k_2}{k_1[Gactin]} \right).$$

$k_{1-4}$  are rates constant of chemical reactions (1). In the derivation of  $\tau_1$ , we assume that the first reaction is at equilibrium. We used for the association rate constant between the NPF and one actin monomer to form the complex,  $k_1$  ( $43 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , [14]), the dissociation rate constant of the complex Gactin\*,  $k_2$  ( $30 \text{ s}^{-1}$ , [14]), the association rate constant between Gactin\* and Arp2/3 to form the active complex A\*,  $k_3$  ( $0.8 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , [14]), and the dissociation rate constant of the complex A\*,  $k_4$  ( $0.6 \text{ s}^{-1}$ , [14]).

**Step 2.** An actin filament **Fi** contacts the activated complex A\*, formed at position **N** on the bead (Figure S2Aa), with the probability  $p_i = L(F_i) \left( \sum_{j=1}^n L(F_j) \right)^{-1}$ ;  $\sum_{i=1}^n p_i = 1$

where **Fi** is the i-th filament partially (or totally) included in a sphere  $S(\mathbf{N}, \mathbf{d})$ , of radius  $\mathbf{d}$ , centred at **N** ( $\mathbf{d}$  is the range of the interactions between A\* and a filament, as indicated by the blue cone, Figure S2Ab), and  $L(F_i)$  is the length of **Fi** included in  $S(\mathbf{N}, \mathbf{d})$ . The direction  $\mathbf{u}$ , of the new branch pointing out from the point **M** depends on the relative positions of points **M** and **N** and on the direction of the mother filament (Figure S2A). The new branch direction  $\mathbf{u}$ , is then given by

$$\mathbf{u} = \cos \alpha \mathbf{u}_0 + \sin \alpha (\cos \phi \mathbf{d}_1 + \sin \phi \mathbf{d}_2) \quad (2)$$

The angle  $\alpha$  (resp.  $\phi$ ), is drawn from normal distribution of average  $70^\circ$  (resp.  $0$ ) and variance  $\sigma^2$  [15]. To simplify further the kinetics of branching and the mechanics of filaments, we assume a rapid dissociation of the NPF molecule from the branching point after nucleation. Hence, there is no spatial constraint exerted on the point **M** and the distance between points **M** and **N** can change after branching; also, NPF molecules resume the activation cycle and give rise to new actin filaments.

**Step 3.** Assuming that actin monomers concentration is constant during the time of the experiment, the length of each uncapped filament is incremented by  $\Delta s = k_{on}[Gactin]\delta\Delta t$ , where  $\delta$  is the radius of one actin subunit;  $\Delta t$  is the unit time step in simulations. Because  $[Gactin]$  is well above the critical concentration for the free barbed end, we neglect any depolymerization or fluctuation in the elongation rate. In addition, their growth is directed along the line through the barbed and pointed ends (Figure S2Aa). This hypothesis is not a serious drawback in our modeling as long as the length of a particular branch remains smaller than the persistence length of actin filaments ( $L_p \sim 10 \mu\text{m}$ ). For capping protein concentration above 3 nM, the maximal filament length in the networks is seldom greater than  $L_p$  and our assumption is valid. The capping of free barbed ends occurs randomly; the time to capping is

exponentially distributed, with parameter  $\tau_{Cap} = \frac{1}{k_{Cap}[CP]}$ , where  $k_{Cap}$  is the rate constant of the

association of the capping protein with the barbed end; we assume that uncapping does not occur ( $k_{off} \sim 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  and  $k_{Cap} = 6.3 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) [16].

## Mechanics and Production of Forces in the Network

### Force generation by actin filament with free barbed end

When an active filament is stalled on the particle or entangled in a dense network, it buckles, exerting a force on its pointed and barbed ends (Figure S2B, a and b). We assume that both situations produce a force

$$\mathbf{F} = \gamma \left( \kappa \frac{\pi^2}{L^2} \right) \mathbf{u}, \quad (3)$$

which is given by the Euler buckling condition;  $\kappa$  is the bending modulus of the filament;  $L$  is the filament length;  $\mathbf{u}$  is the unit vector along the filament oriented from the pointed to the barbed end;  $\gamma$  is a numerical factor depending on the boundary conditions prevailing at both ends of the filament; here, we choose  $\gamma=1$  [17]. Therefore, the force exerted on the parent filament through the branching point is  $-\mathbf{F}$  whereas the barbed end senses a force  $\mathbf{F}$  (Figure S2Ba).

### **Reservoir of active barbed ends close to the bead**

Depending on the angle between an actin filament (given by the unit vector  $\mathbf{u}$  in relation 2) and the normal to the bead (denoted  $\mathbf{n}$ ), a filament can grow freely (Figure S2Da) or is partially or totally blocked against the bead (Figure S2A and S2D, b and c). In the intermediate regime (Figure S2Db), the effective force (ie the projection of  $\mathbf{F}$  on vector  $\mathbf{n}$ ) is less than the stalling force to which corresponds a length increase of:

$$\Delta s = k_{on}[Gactin] \delta \exp\left(-\frac{W}{k_B T}\right) \Delta t,$$

where ( $k_B T$ ) is the thermal energy;  $W$  is the energy cost due to the insertion of one monomer (relation 3). In situation C (Figure 2D), the filament is totally blocked by the bead and cannot elongate. Additionally, we assume that these active barbed ends, partially or totally in contact with the particle (Figure 2D, b and c), are protected against capping.

Therefore, the dynamics of actin filament barbed ends, which are stalled against the load, is controlled by random displacements that change filament orientation with respect to the bead. Because all filaments in contact with the particle have their pointed ends branched on a mother filament through the Arp2/3 complex, we use the cantilever beam to model the amplitude of their fluctuations (normal distribution with variance  $L^3(3L_p)^{-1}$ , for a filament of length  $L$  and of persistence length  $L_p$ ). The change of the barbed end position allows filaments to escape the load (Figure S2D, transition from c to b or to a) or become locked against the particle (Figure S2D, transition from a or b to c). In consequence, the active mechanical stress depends on these transitions that feeds continuously the population of growing actin filaments from the reservoir of filaments stalled against the bead. We used a thermal energy,  $k_B T$  of  $4.1 \cdot 10^{-21}$  J, and a critical distance between the NPF position and a point on a filament,  $d$  of 10 nm.

### **Global network rupture**

In absence of network remodeling factors, we assume that the elastic behavior is predominant in the global movement of actin filaments networks, particularly on a scale of one second to few minutes [18]. Therefore, we suppose here that the nucleation and branching of new filaments contacting the load and the entanglement between actin filaments is sufficient to account for the initial isotropic growth of the network and its rupture.

We have shown that capping proteins limit the spatial extension of actin filament network at the surface of beads (Figure 2) or glass rods (Figure 3 and Movie S3B). However, we also have shown that in the presence of high capping protein concentration (above 15 nM), a continuous network of actin filaments can develop before the symmetry of this initial isotropic growth is broken due to large amplitude fluctuations in the mechanical stress (Figure 4A). To reconcile these data, we assume that the mesoscopic continuous mesh of actin filaments, observed at the scale of the micrometer (Figure 4A), results from the tight tiling of independent networks, each of them grown from an actin filament "primer". These elementary networks join and merge to form an elastic continuum medium subjected to mechanical and spatial constraints (Figure S2E, a and b) [1].

Elementary networks are subjected to two kinds of antagonistic constraints (Figure S2Ea). First, the forces exerted by actin filaments against the bead push the network outwards (Figure S2E, a and b, blue arrows). Second, entanglement between elementary networks tends to limit the network movement outwards (Figure S2E, a and b, yellow arrows). Once a large fluctuation in the internal stress develops (Figure S2E, a and b, red arrow), it overcomes the entanglement between networks by creating a rupture (Figure S2E, a and b, black arrows). Since we assumed that these elementary networks are equivalent to an elastic medium, breaking the bonds between networks forms a planar structure of minimum elastic energy (Figure S2Eb).

We included these assumptions in a very simple model to account for (i) the rupture of the network at the surface of the bead, (ii) the large-amplitude displacement of the network and (iii) the slow development of the network at the bead surface (Figure S2E).

## Supplemental References

1. Noireaux, V., Golsteyn, R.M., Friederich, E., Prost, J., Antony, C., Louvard, D., and Sykes, C. (2000). Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys. J.* **78**, 1643-1654.
2. MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* **20**, 329-341.
3. Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871.
4. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* **270**, 11437-11444.
5. Egile, C., Loisel, T.P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P.J., and Carlier, M.F. (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J. Cell Biol.* **146**, 1319-1332.
6. Almo, S.C., Pollard, T.D., Way, M., and Lattman, E.E. (1994). Purification, characterization and crystallization of Acanthamoeba profilin expressed in Escherichia-Coli. *J. Mol. Biol.* **236**, 950-952.
7. Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Mullins, R.D. (2000). Interaction of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr. Biol.* **10**, 1273-1282.
8. Falck, S., Paavilainen, V.O., Wear, M.A., Grossmann, J.G., Cooper, J.A., and Lappalainen, P. (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *Embo J.* **23**, 3010-3019.
9. Machesky, L.M., Mullins, D.M., Higgs, H.N., Kaiser, D.A., Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 3739-3744.
10. Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of Listeria and Shigella using pure proteins. *Nature* **401**, 613-616.
11. Michelot, A., Berro, J., Guerin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., and Blanchoin, L. (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* **17**, 825-833.
12. Michelot, A., Derivery, E., Paterski-Boujemaa, R., Guerin, C., Huang, S., Parcy, F., Staiger, C.J., and Blanchoin, L. (2006). A novel mechanism for the formation of actin-filament bundles by a nonprocessive formin. *Curr. Biol.* **16**, 1924-1930.
13. Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.C., Steiner, P., Hirling, H., and Unser, M. (2004). Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* **58**, 167-176.
14. Marchand, J.B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D., and Higgs, H.N. (2001). Interaction of WASp/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* **3**, 76-82.
15. Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 6181-6186.
16. Wear, M.A., Yamashita, A., Kim, K., Maeda, Y., and Cooper, J.A. (2003). How capping protein binds the barbed end of the actin filament. *Curr. Biol.* **13**, 1531-1537.
17. Howard, J. (2001). *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer Associate, Inc.
18. van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 7847-7852.

## **Article 2**

## Article 2. Reymann, *Molecular Biology of the Cell*, 2011

Après une prise en main des systèmes biomimétiques reconstitués au cours de mon apport dans le projet précédent, cette étude constitue ma première histoire personnelle à proprement parler. Pour ce faire, je disposais d'un jeu complet de protéines purifiées et marquées de manière fluorescente dans le laboratoire par Christophe Guérin. A moi donc de les associer à la motilité de bille induite par polymérisation d'actine (totalement similaire à celle de l'étude précédente). La question étant: **quelle est la localisation spatiale et temporelle des différentes protéines impliquées au cours du processus de motilité actine - dépendant et quel est leur impact sur la mécanique de ce système ?** Cette étude correspond à l'article 2 accepté dans *Molecular Biology of Cell*. Elle montre comment l'incorporation des deux protéines régulatrices que sont la CP et l'ADF/cofiline, de part leurs propriétés biochimiques régulent à la fois la dynamique de l'actine (polymérisation et recyclage) mais également les propriétés mécaniques de ce réseau. Propriétés sans doutes transposables dans la cellule, au niveau du réseau dendritique similaire au sein du lamellipode.

Le complexe Arp2/3, initiateur de branches, et CP, dont le rôle est d'arrêter rapidement l'élongation de ces filaments (comme nous l'avons vu dans l'article 1), sont présents de manière uniforme au sein de la comète propulsive, colocalisant avec l'actine sur l'ensemble de sa structure (figure 1). Cela nous permet une fois de plus de confirmer qu'Arp2/3 n'interagit que de manière transitoire avec son activateur localisé à la surface de l'objet et reste ensuite attaché à la base du filament initié, entre filament mère et fille, au cours du processus de brisure de symétrie mais aussi durant la motilité. La première coque d'actine qui brise sa symétrie, est plus dense que le reste du réseau. Cela est en accord avec un mécanisme d'accumulation de stress en interne (de manière anisotrope autour de l'objet) avant la brisure mécanique. Par la suite, les processus de brisure de symétrie sont facilités puisque le gel d'actine dans la zone de la fracture précédente a une moindre résistance, ce qui tend à rendre le mouvement unidirectionnel.

Au contraire de CP, l'ADF/cofiline est associée de manière graduelle au sein de la comète d'actine (figure 2). ADF/cofiline est présente de manière abondante en s'éloignant de la bille et de manière concomitante avec l'état du nucléotide des sous-unités d'actine au sein du réseau. En effet les filaments fraîchement nucléés au contact de la bille sont constitués de sous-unités ATP uniquement donc sur lesquels l'ADF/cofiline ne s'associe pas (la constante de dissociation,  $K_d$ , de l'ADF/cofiline les sous-unités – ATP est de l'ordre de 10  $\mu\text{M}$ , alors qu'il est de 0.3  $\mu\text{M}$  pour les sous-unités – ADP). Cela explique la présence d'une zone d'exclusion au voisinage immédiat de la bille appelée coiffe ATP/ADP-Pi, ou "ATP/ADP-Pi cap". Lors du mouvement de la bille, celle-ci laisse derrière elle ces filaments qui, coiffés par CP, ne s'allongent plus mais qui au cours du temps subissent le vieillissement naturel des filaments d'actine: hydrolyse puis dissociation du phosphate en gamma de l'ATP. Ce vieillissement de la structure d'actine dans son ensemble, lorsque l'on s'éloigne de sa zone initiatrice (la bille), donne donc le tempo qui régule les délais et l'association progressive de l'ADF/cofiline.

Ce principe biochimique aboutissant à un gradient de protéines au sein d'une structure d'actine générée au contact d'une bille recouverte d'activateur de polymérisation par le complexe Arp2/3, a été validé par un modèle mathématique essentiellement basé sur les cinétiques de vieillissement de filaments d'actine et d'association de l'ADF/cofiline (figure 3). Au sein de ce modèle, les informations biochimiques découlent en partie d'une étude faite en

parallèle dans l'équipe par Cristian Suarez mais à l'échelle du filament unique (correspondant à l'article 3 présenté dans cette thèse).

Après avoir remarqué qu'en présence d'une concentration importante d'ADF/cofiline, la zone la plus âgée de la comète, qui est de plus fortement décorée par ADF/cofiline, avait tendance à disparaître par dissociation de fragments macroscopiques de gel d'actine (figure 5), l'on a voulu quantifier plus précisément l'impact que pouvait avoir les événements de fragmentation microscopique par ADF/cofiline. Grâce à des expériences de FRAP sur la comète d'actine, nous avons utilisé la CP comme marqueur de la quantité d'extrémités libres nouvellement créées dans le système. Ainsi la vitesse de recouvrement de fluorescence de CP est intimement liée à la proportion de CP libre dans le système donc à la quantité d'extrémités déjà présentes et coiffées au sein du réseau d'actine. Nous avons ainsi mis en évidence la présence de fragmentations à l'échelle microscopique (à l'échelle du filament) au sein de la comète d'actine due à l'activité d'ADF/cofiline avec une efficacité d'au moins un événement de fragmentation pour cent molécules d'ADF/cofiline présentes durant l'échelle de temps propre à l'expérience (figure 4). Nous pensons que ces fragmentations d'ordre microscopiques aboutissent à l'échelle macroscopique à une déstabilisation progressive de la cohésion du gel d'actine. Une action déstabilisante donc d'autant plus importante que le réseau est âgé, d'où la perte progressive de matériel à l'arrière de la comète par dissociation de fragments de matériel (qui par fragmentations successives désassemble l'ensemble de ces bouts de réseau d'actine sans doute jusqu'au recyclage des monomères d'actine *in vivo*). Ce mécanisme peut être apparenté au mécanisme de dynamique stochastique décrit dans (Michelot et al., 2007) à l'échelle de filaments individuels, et est sans doute important au sein du lamellipode pour le recyclage rapide et important de cette structure d'actine.

Pour résumer, nos résultats montrent que l'organisation spatiale de la nucléation, l'élongation et la localisation des zones âgées dépendent de la balance entre une nucléation soutenue et localisée de filaments d'actine par le complexe Arp2/3 et l'activité de coiffe de CP, l'ADF/cofiline agissant comme chronomètre et acteur du recyclage de cette structure. D'une fragmentation à l'échelle microscopique, on aboutit à une dynamique stochastique macroscopique pouvant expliquer le maintien dynamique et le recyclage extrêmement rapide du réseau d'actine présent dans le lamellipode des cellules motiles.

# Turnover of branched actin filament networks by stochastic fragmentation with ADF/cofilin

Anne-Cécile Reymann<sup>a,\*</sup>, Cristian Suarez<sup>a,\*</sup>, Christophe Guérin<sup>a</sup>, Jean-Louis Martiel<sup>a</sup>, Christopher J. Staiger<sup>b,c</sup>, Laurent Blanchoin<sup>a</sup>, and Rajaa Boujemaa-Paterski<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire & Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (IRTSV), Centre National de la Recherche Scientifique/Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives/Institut National de la Recherche Agronomique/Université Joseph Fourier (CNRS/CEA/INRA/UJF), Grenoble 38054, France; <sup>b</sup>Department of Biological Sciences and <sup>c</sup>The Bindley Bioscience Center, Purdue University, West Lafayette, IN 47907-2064

**ABSTRACT** Cell motility depends on the rapid assembly, aging, severing, and disassembly of actin filaments in spatially distinct zones. How a set of actin regulatory proteins that sustains actin-based force generation during motility work together in space and time remains poorly understood. We present our study of the distribution and dynamics of Arp2/3 complex, capping protein (CP), and actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin in actin “comet tails,” using a minimal reconstituted system with nucleation-promoting factor (NPF)-coated beads. The Arp2/3 complex concentrates at nucleation sites near the beads as well as in the first actin shell. CP colocalizes with actin and is homogeneously distributed throughout the comet tail; it serves to constrain the spatial distribution of ATP/ADP-P<sub>i</sub> filament zones to areas near the bead. The association of ADF/cofilin with the actin network is therefore governed by kinetics of actin assembly, actin nucleotide state, and CP binding. A kinetic simulation accurately validates these observations. Following its binding to the actin networks, ADF/cofilin is able to break up the dense actin filament array of a comet tail. Stochastic severing by ADF/cofilin loosens the tight entanglement of actin filaments inside the comet tail and facilitates turnover through the macroscopic release of large portions of the aged actin network.

## Monitoring Editor

Fred Chang  
Columbia University

Received: Jan 20, 2011

Revised: May 12, 2011

Accepted: May 17, 2011

## INTRODUCTION

Cellular motility is a fundamental process essential for embryonic development, immune responses, wound healing, and neuronal growth cone migration (Pollard *et al.*, 2000). During motility, the rapid assembly and disassembly of actin networks provide the driving

force that deforms the plasma membrane (Pollard and Cooper, 2009). Upon signaling, site-directed actin assembly at the leading edge of migrating cells depends primarily on the activation of the Arp2/3 complex, one of the three known actin nucleators in eukaryotes (Welch *et al.*, 1998; Machesky *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999; Svitkina and Borisy, 1999; Pollard and Borisy, 2003; Goley and Welch, 2006; Rouiller *et al.*, 2008). The activated complex triggers the rapid de novo assembly of a rigid and highly cross-linked actin filament array called the “dendritic network” (Mullins *et al.*, 1998; Machesky *et al.*, 1999; Blanchoin *et al.*, 2000a; Achard *et al.*, 2010). To efficiently convert the chemical energy provided by ATP hydrolysis within an actin filament into mechanical forces, rapid assembly of the actin network must be 1) localized underneath the plasma membrane (Rohatgi *et al.*, 1999) and 2) supplied with a large reservoir of actin monomers (Pantaloni *et al.*, 2000; Pollard *et al.*, 2000). Selective recruitment of nucleation-promoting factors (NPFs) to the sites of signaling (Chhabra and Higgs, 2007; Pollard and Cooper, 2009), followed by the rapid arrest of fast-growing barbed ends of actin filaments by capping protein (CP; Schafer *et al.*, 1996; Yamashita *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2004), prevents the expansion of Arp2/3-branched

This article was published online ahead of print in MBoc in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E11-01-0052>) on May 25, 2011.

\*These authors contributed equally to this work.

Address correspondence to: Laurent Blanchoin ([laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr)) or Rajaa Boujemaa-Paterski ([rajaa.paterski@cea.fr](mailto:rajaa.paterski@cea.fr)).

Abbreviations used: ABP, actin-binding protein; ADF, actin-depolymerizing factor; BSA, bovine serum albumin; CP, capping protein; DTT, dithiothreitol; Ena/VASP, Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; GST-pWA, glutathione-S-transferase–polyproline verproline homology acidic C-terminus regions of human Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASp); NPF, nucleation-promoting factor; TCEP, Tris(2-carboxyethyl)phosphine.

© 2011 Reymann *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

“ASCB®,” “The American Society for Cell Biology®,” and “Molecular Biology of the Cell®” are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

actin meshwork away from the load (membrane). This ensures the formation of a sufficiently rigid and branched meshwork that pushes the plasma membrane forward (Iwasa and Mullins, 2007; Achard et al., 2010). Disassembly of the aged actin network is then required to maintain the large cellular reservoir of polymerizable actin monomers, and is achieved through fragmentation by actin-binding proteins (ABPs), the most important of which is actin-depolymerizing factor (ADF/cofilin (Pollard et al., 2000; Chan et al., 2009; Bernstein and Bamberg, 2010). ADF/cofilin is known to bind preferentially to the aged, thus ADP-loaded, part of the actin filament (Blanchoin and Pollard, 1999). This changes the structure and mechanical properties of ADP-loaded actin filaments (McGough et al., 1997; McCullough et al., 2008) and promotes fragmentation (Maciver et al., 1991; Blanchoin and Pollard, 1999; Michelot et al., 2007; De La Cruz, 2009) into small and depolymerizing pieces by a mechanism called “stochastic dynamics” (Michelot et al., 2007; Chan et al., 2009). The general features of this process were recently observed in vivo (Staiger et al., 2009). Alternatively, rather than depolymerizing, short cofilin-generated fragments or oligomers can contribute to actin filament elongation in vivo (Okreglak and Drubin, 2010). Finally, ADF/cofilin binding and severing activities are regulated by molecular partners, including Aip1 and/or coronin that promote efficient actin monomer recycling (Okada et al., 2006; Kueh et al., 2008; Gandhi et al., 2009; Bernstein and Bamberg, 2010). The biochemical properties of most ABPs are individually well characterized in bulk solution or in reconstituted minimal systems (Loisel et al., 1999; Pollard and Borisy, 2003). However, the coordination of their actions in space and time, necessary to precisely choreograph actin turnover and organization and to generate proper network dynamics and mechanics, remains poorly documented (Brieher et al., 2006; Reymann et al., 2010).

To answer the question of how a minimal set of purified ABPs coordinate their functions to promote force production and actin-based motility, we examined the spatiotemporal distribution of the Arp2/3 complex, CP, and ADF/cofilin along the actin “comet tail” of motile particles in vitro. We found that the Arp2/3 complex is concentrated near the nucleation sites to initiate branched actin networks, and remains attached to the actin tail after it detaches from the nucleation sites. CP distributes homogeneously throughout the actin network of the comet tail. Conversely, ADF/cofilin binds preferentially at the rear of the comet tail, with a spatial distribution consistent with the state of the nucleotide in these aged parts of the actin tail, and induces massive breakage of the network into small and drifting pieces. Thus the macroscopic stochastic dynamics modulated by ADF/cofilin fragmentation of the aged part of the actin filament network arises as a major event during the fast actin disassembly necessary to maintain a steady dynamical regime during force production.

## RESULTS

### Arp2/3 complex and CP are continuously incorporated in elongating actin filament networks during actin-based motility

To image the spatiotemporal distribution of the Arp2/3 complex and CP within propulsive actin networks, we reconstituted motility of functionalized polystyrene beads in a physiologically relevant system prepared from profilin–G-actin-buffered medium containing the Arp2/3 complex and CP, in the absence of ADF/cofilin. Alternatively, we used a fluorescently labeled version of these proteins without detecting any changes in the rate of bead motility, indicating that the fluorescent proteins behave similarly to the unlabeled proteins (Figures 1 and 2). The velocity of bead propulsion recorded was  $-0.4$ – $0.6$   $\mu\text{m}/\text{min}$ . After 4–5 min of polymerization, an actin gel nucleated on the surface of beads coated with GST-pWA, which is a

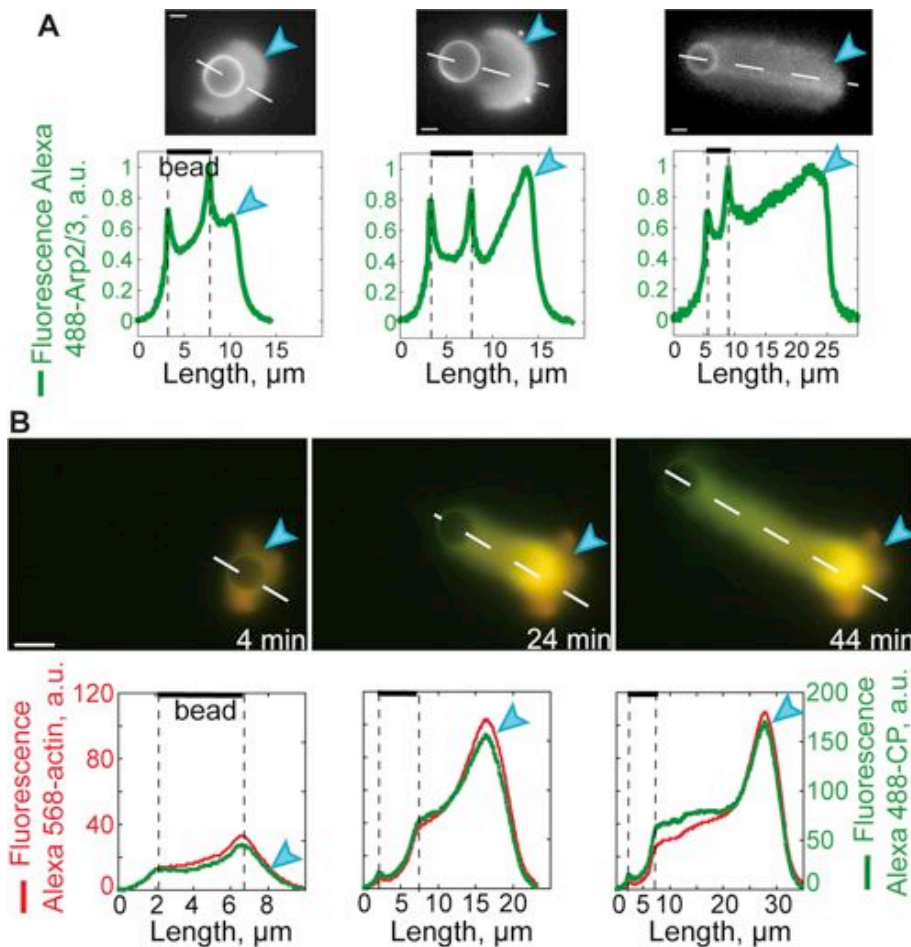
nucleation-promoting factor, broke symmetry, propelled the bead forward, and initiated a propulsive actin comet tail (van der Gucht et al., 2005). As a first step, we followed the real-time incorporation of fluorescently labeled Arp2/3 complex into these actin networks (Figure 1A). A line scan of fluorescence intensity along the diameter of the beads toward the center of the comet tail (Figure 1A, dashed line) allowed us to visualize the relative amounts of Arp2/3 complex incorporated over time during the establishment of the motility (Figure 1A). We found that the Arp2/3 complex was concentrated at the surface of beads, where it is recruited by GST-pWA and activated to initiate new-branched actin filaments before being released (Figure 1A). This is consistent with its transient activation through the formation of a ternary complex, NPF–Arp2/3 complex–actin filament (Martin et al., 2006; Achard et al., 2010). After release, the Arp2/3 complex was sparsely present throughout the whole actin array, but was markedly more abundant in the first actin shell (Figure 1A, middle). This is in agreement with our recent findings on the assembly of a dense actin shell prior to symmetry breaking and motility (Achard et al., 2010).

We investigated next, the spatiotemporal incorporation of actin and CP within the actin-branched network by following simultaneously their localization with Alexa Fluor 488-CP and Alexa Fluor 568-actin (Figure 1B and Movie S1). We found that CP was homogeneously distributed along the comet tail and colocalizes with actin (Figure 1B), and is in agreement with previous reports of its biochemical properties and its association with elongating branched filaments in vitro (Achard et al., 2010). Biochemical characterization in vitro has established that CP binds the fast-growing barbed-end of actin filaments with high-affinity (Schafer et al., 1996; Yamashita et al., 2003; Kim et al., 2004) and blocks dynamics (Cooper and Schafer, 2000). This distribution of CP is also consistent with the autocatalytic nucleation process of actin networks mediated by the Arp2/3 complex. Continuous generation of free barbed ends and their rapid capping by CP leads to the formation of a rigid and highly cross-linked actin filament array responsible for production of propulsive forces. Concomitant with the dense localization of Arp2/3 complex in the actin shell formed prior to symmetry breaking, we also found a higher fluorescence of CP and actin in this region (Figure 1B). This demonstrates that the formation of the first actin shell requires a highly dense network of actin, Arp2/3 complex and CP (van der Gucht et al., 2005). During the ensuing actin-based motility, the network was not as dense and these three proteins were less abundant (Figure 1). Following this initial investigation on the localization of proteins involved in building the protrusive actin network, we focused our attention on the spatiotemporal localization of ADF/cofilin, a protein necessary for network disassembly.

### ADF/cofilin associates preferentially with the aged part of the comet tail and accumulates over time

ADF/cofilin is a key factor involved in the recycling of actin monomers from polymerized networks and therefore renders them available for actin assembly and force production (Pollard et al., 2000). To characterize the macroscopic distribution of ADF/cofilin within the dynamic branched actin network, we followed the spatial and temporal distribution of ADF/cofilin in the actin comet tail by simultaneously tracking the fluorescence associated with Alexa Fluor 488-ADF/cofilin and Alexa Fluor 568-monomeric actin. We found that the recruitment of ADF/cofilin was delayed compared with the polymerization of actin networks around motile beads (Figure 2, A and D, and Supplemental Movie S2). Importantly, we showed that ADF/cofilin was excluded from the actin network during the early stage of actin assembly following symmetry-breaking





**FIGURE 1:** Arp2/3 complex and CP distribute homogeneously within the actin network during actin assembly. GST-pWA-coated beads were added to a motility medium containing 4  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor 568-actin monomers, 12  $\mu\text{M}$  profilin, and (A) 210 nM Alexa Fluor 488-Arp2/3 complex, 25 nM CP, or (B) 150 nM Arp2/3 complex, 45 nM Alexa Fluor 488-CP. Images were taken at the indicated times during polymerization. Alexa Fluor 488 is colored in green and Alexa Fluor 568 in red. In (A) different motile beads were imaged after 30 min of actin assembly, and in (B) a montage of time-lapse images of a motile bead taken at 20-min intervals shows the comet tail formation. Line scans of the fluorescence intensities taken along the actin gel, as indicated by the dashed curves, are displayed under each corresponding image. For easier comparison in (A), we normalized the fluorescence by the integrated fluorescence of each image. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (See also Movie S1.)

events (for at least 4 min; Figure 2, A and D). After 26 min of actin polymerization, ADF/cofilin was incorporated at the distal or aged part of the comet tail but remained excluded from the proximal or young part (Figure 2A). Quantification of the fluorescence ratio of ADF/cofilin to actin filaments in the comet tail demonstrates a dual process for ADF/cofilin incorporation within the actin network (Figure 2C). First, at a given time the concentration of ADF/cofilin increased gradually in space, from the proximal or young to the rear or aged part of the tail. Second, the concentration of ADF/cofilin increased gradually over time along the comet tail by enhancing the gradient already established along the actin network (Figure 2C). Because we confined the activation of Arp2/3 complex to the surface of NPF-coated beads, the newly polymerized zone is located near the bead. We propose that the spatiotemporal distribution of ADF/cofilin in the comet tail is modulated by the nucleotide state of the actin networks. Moreover, we followed the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin throughout dynamic actin networks in the absence of CP, and found that ADF/cofilin binding is

similarly governed by the biochemical state of actin-bound nucleotides of reconstituted parallel networks (Supplemental Figure S1 and Movie S3).

Biochemical studies have previously reported that kinetics of ATP hydrolysis along an actin filament occurs on a timescale of seconds, whereas that of the phosphate release happens on a timescale of minutes (Pollard *et al.*, 2000). Moreover, ADF/cofilin exhibits differential binding along the actin filament, with strong binding to ADP-loaded zones ( $K_d$  of 0.3  $\mu\text{M}$ ) and weak binding to ATP- or ADP- $\text{P}_i$ -loaded zones ( $K_d \approx 20 \mu\text{M}$ ; Carlier *et al.*, 1997; Blanchoin and Pollard, 1999).

We therefore measured the evolution over time of the ADF/cofilin exclusion zone in our system. We defined the exclusion zone as the area where ADF/cofilin is excluded from the actin tail, which is the region enriched in ATP- or ADP- $\text{P}_i$ -loaded actin subunits. Remarkably, we found that ADF/cofilin exclusion zone length is nearly constant during propulsion. The length of the ADF/cofilin-free portion was  $3.8 \pm 0.7 \mu\text{m}$  during 50 min (Figures 2A and 3C). Moreover, the exclusion zone length dropped rapidly and was abolished as soon as bead motility ceased (Figures 2B and 3C). Furthermore, exclusion zone length was sensitive to ADF/cofilin concentration (Figures 2, D and E, and 3D). Indeed, increasing the concentration of ADF/cofilin twofold resulted in an increase of the ratio of ADF/cofilin to actin along the comet tail over time (Figure 2, D and F). Consequently, the length of the exclusion zone of ADF/cofilin decreased by a factor of two, and was  $2.2 \pm 0.6 \mu\text{m}$  during 30 min (Figures 2D and 3D). Interestingly, we noted that increasing the ADF/cofilin concentration enhanced bead motility; we recorded mean velocities of 0.3 or

0.5  $\mu\text{m}/\text{min}$  for ADF/cofilin concentrations of 0.3 and 0.6  $\mu\text{M}$ , respectively (Figure 2, B and E).

### Kinetic modeling accounts for the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin throughout expanding branched networks

The above results supported ADF/cofilin binding either to branched or to parallel actin networks concomitant with the chemical state of actin-bound nucleotide. Therefore, to understand mechanistically the distribution of ADF/cofilin along the growing actin comet tails, we developed a mathematical model that includes all the chemical reactions controlling the interaction of ADF/cofilin with actin filaments (Figure 3 and Supplemental Data). This model is based on the kinetics of actin assembly in the presence of profilin, the kinetics of ATP hydrolysis and phosphate release from actin filaments, and the kinetics of CP incorporation controlling actin filament length within branched actin networks. Moreover, we took into account the kinetics of interaction of ADF/cofilin with actin filaments, as well

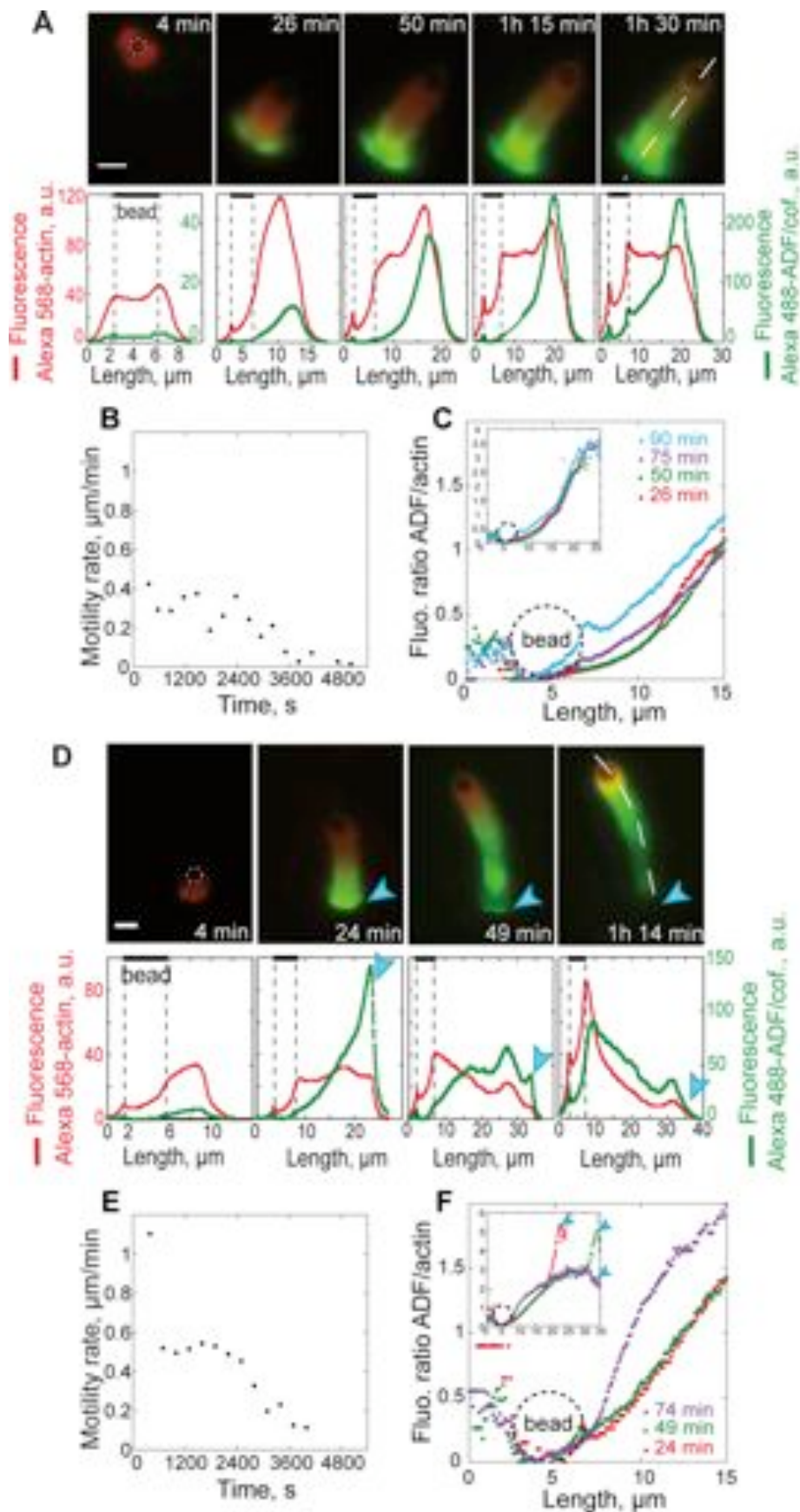


FIGURE 2: ADF/cofilin is progressively recruited to the actin comet tail during reconstituted bead motility. GST-pWA-coated beads were added to a motility medium containing 12  $\mu\text{M}$  profilin, 4  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor 568-actin monomers, 150 nM Arp2/3 complex, 25 nM CP, and

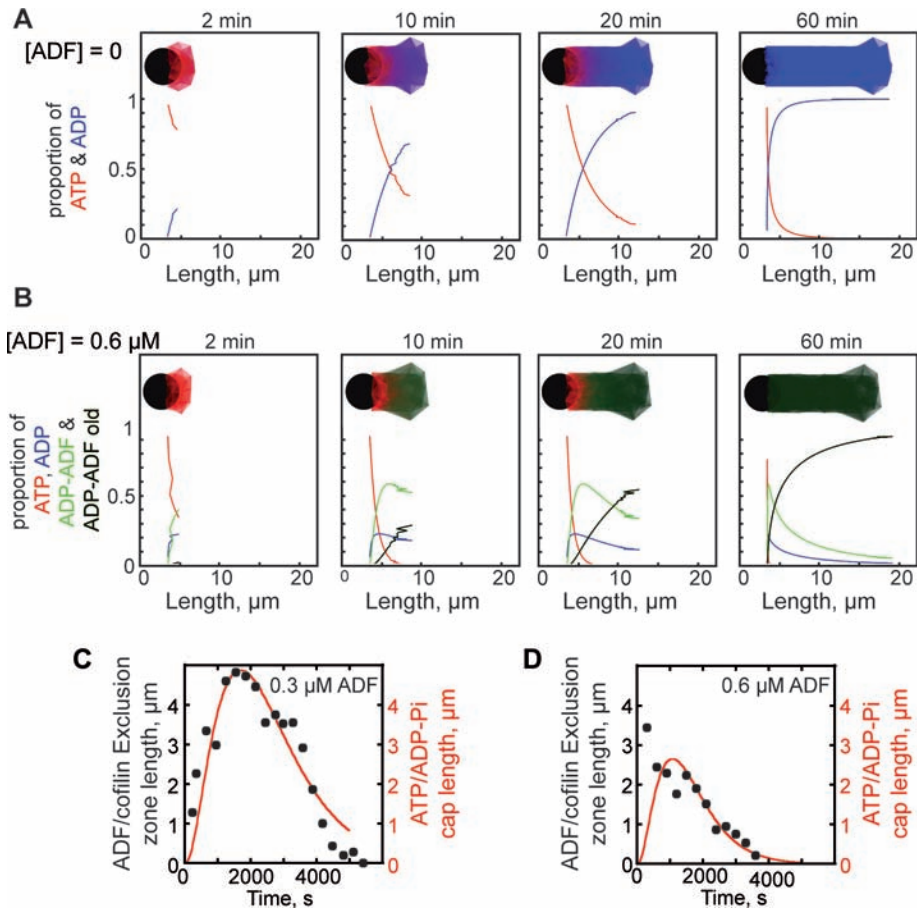
as the subsequent acceleration (19-fold greater) of the phosphate release from neighboring subunits induced after ADF/cofilin binding (Figure 3 and Supplemental text; Blanchoin and Pollard, 1999).

In agreement with the experimental results, the kinetic reactions incorporated into the mathematical model could account for the aging of the actin network assembled in the absence or presence of ADF/cofilin (Figure 3 and Movie S4). In the absence of ADF/cofilin, and in the presence of actin and CP, the elongation zone of actin filaments was restricted to the bead vicinity. Additionally, the actin network underwent aging and the ADP-loaded region spread along the assembled network (Figure 3A). When ADF/cofilin was introduced, the kinetic model demonstrated that ADF/cofilin is gradually incorporated and enriched in the aged part of the actin tail, where it is presumed to induce severing of actin filament networks (Figure 3B; Blanchoin and Pollard, 1999). Remarkably, the simulated and experimental ADF/cofilin exclusion zone evolved similarly throughout actin network polymerization and bead motility (Figure 3, C and D). These results demonstrated that in our reconstituted system the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin within a polymerizing actin network is governed by kinetics.

#### ADF/cofilin fragments short actin filaments in the Arp2/3-mediated networks of propulsive comet tails

ADF/cofilin induces structural remodeling of branched networks in vitro by reducing the affinity of actin filaments for Arp2/3 complex and by destabilizing branches (Blanchoin

(A) 0.3  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor 488-ADF/cofilin or (D) 0.6  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor 568-ADF/cofilin. Images were taken at the indicated times during polymerization and analyzed as in Figure 1. Blue arrowheads indicate the site of abundant binding of ADF/cofilin and its abrupt dissociation due to the subsequent actin network fragmentation. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (B and E) A time course of motility rates during actin comet tail formation was measured. (C and F) Line scans of the fluorescence intensities taken along the actin network, as indicated by the dashed lines in D, were analyzed for the different times of acquisition (as in Figure 1). Graphs represent the ratio of the fluorescence intensity for ADF/cofilin to that of actin at different times. A zoom of the vicinity around the bead is presented, whereas the inset shows the entire ratio of the full actin network. (See also Movies S2 and S3.)



**FIGURE 3:** Kinetic modeling of ADF/cofilin recruitment within the comet tail. *In silico* reconstitution of the elongation of the Arp2/3-mediated actin branched network according to the kinetic model (Supplemental Data). (A and B) The graphs represent a montage of the evolution over time of the ratio of ATP- and ADP-loaded actin subunits within the simulated network assembled in the presence of  $4 \mu\text{M}$  of profilin-actin complex,  $25 \text{ nM}$  CP, and ADF/cofilin as indicated. The ATP and ADP-P<sub>i</sub> states of the nucleotide were incorporated into one, and named ATP. Simulations of the elongating comet tail were drawn and positioned with the front bead edge aligned with the origin of x-axis and the rear one with the interface bead/actin network. The color-coding of the comet tail corresponds to that of the curves. (B) Given the acceleration of P<sub>i</sub> release on actin subunits by ADF/cofilin and the higher affinity for ADP-loaded subunits, the proportion of the ADP-loaded subunits diminished in favor of both ADP-ADF-loaded subunits and old ADP-ADF-loaded ones. The latter population accounted for severing by ADF/cofilin. (C) Superimposition of predicted ATP/ADP-P<sub>i</sub> cap lengths (line) and experimental ADF/cofilin exclusion zones measured in Figure 2, A and D, respectively (dots); experimentally, the cap length, i.e., the zone of exclusion of ADF/cofilin, was represented by the red zone in the comet tail (Figure 2, A and D). (See also Movie S4.)

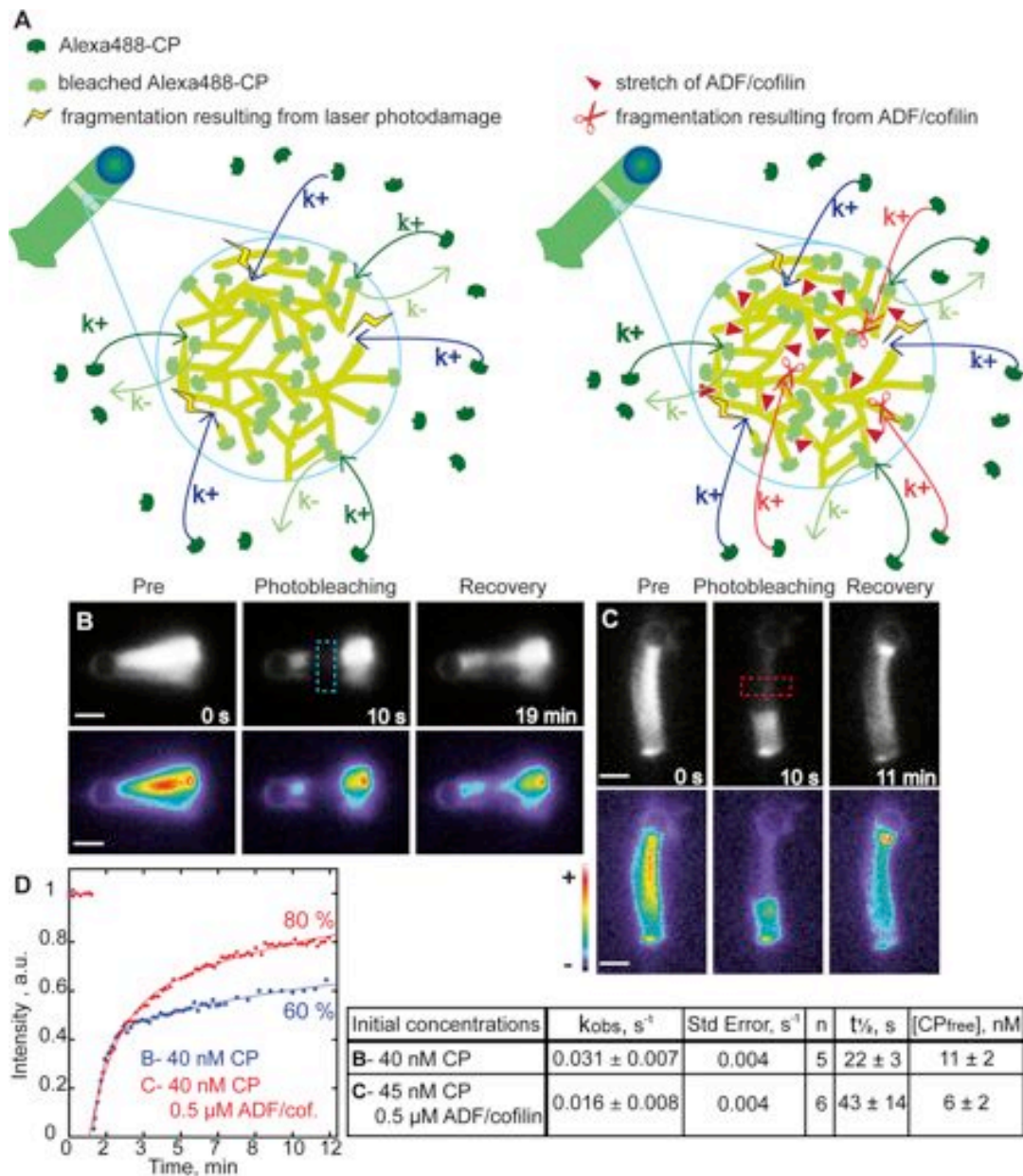
*et al.*, 2000a; Chan *et al.*, 2009). At a low occupancy of filaments, it severs actin polymers, presumably because of torsion stress that accumulates at the interface between bare and ADF/cofilin-decorated regions of short actin filaments (De La Cruz, 2005; Andrianantoandro and Pollard, 2006; Suarez *et al.*, 2011). We therefore asked whether ADF/cofilin severing activity still occurs within actin networks rendered rigid and highly branched by the presence of CP, which significantly shortens the length of filament branches and increases the branch density (Blanchain *et al.*, 2000a; Achard *et al.*, 2010).

Line scans of fluorescence intensity for both labeled actin (red) and ADF/cofilin (green) taken along the comet tail at different times of actin polymerization revealed a shoulder in the actin curves (Figure 2, A and D). This heterogeneity in the actin concentration along the comet tail is consistent with the initial construction of a dense actin shell prior to symmetry breaking (Achard *et al.*, 2010). This

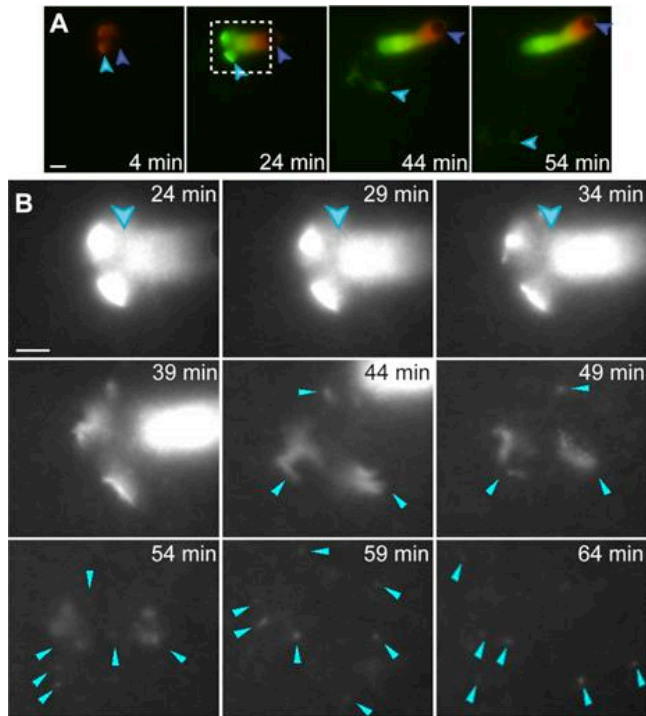
shoulder was observable during the early time course of bead motion (before 50 min) in the presence of a low concentration of ADF/cofilin but became progressively reduced thereafter, and disappeared after 1 h 30 min (Figure 2A), in agreement with the CP mean fluorescence along the tail (Figure S2). In the presence of a twofold increase in the concentration of ADF/cofilin, the amount of actin filaments was drastically reduced within the last 10  $\mu\text{m}$  of the comet tail (Figure 2D, red curve: decreased regime) concurrent with the drop of ADF/cofilin amount in the same region of the comet (Figure 2D, green curve: decreased regime). One explanation for this reduction is that actin filaments in the comet tail are being disassembled due to the fragmentation activity of ADF/cofilin, similar to that observed *in vitro* for single growing actin filaments (Michelot *et al.*, 2007) or for branched actin networks (Blanchain *et al.*, 2000a; Chan *et al.*, 2009).

To address this question, we quantified the ADF/cofilin-mediated severing of actin filament branched arrays during motility. Based on the high affinity of CP for free barbed ends of actin filaments ( $K_d$  of  $0.1 \text{ nM}$ ; Schafer *et al.*, 1996), and assuming that CP binds to ADF/cofilin-severed ends with the same affinity, we used CP as a marker to estimate the amount of barbed ends present within an actin network. Thus, by comparing the amount of CP in propulsive comet tails, in the presence and absence of ADF/cofilin, we could estimate the extent of filament fragmentation in the dense networks. We used fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments on Alexa Fluor 488-CP incorporated in the comet tail during bead motility, with or without ADF/cofilin, to quantify the dynamics of CP within the propulsive actin network. A well-defined zone of the actin comet tail away from the bead center was bleached using a local intense laser illumination (Figure 4, B and C, and Movie S5).

Taking into account the photodamage due to the laser illumination (Figures 4A and S3 and Supplemental Data), we quantified the severing activity of ADF/cofilin in branched actin networks responsible for bead propulsion. During experiments conducted in the absence of ADF/cofilin, we determined the rate constant for slow fluorescence recovery corresponding to the dissociation rate constant of CP from the barbed ends of actin filaments to be  $0.0015 \pm 0.0002 \text{ s}^{-1}$ . This value is comparable to published values for CP  $k_{\text{off}}$  determined by other methods (Schafer *et al.*, 1996; Kuhn and Pollard, 2007). Interestingly, the presence of ADF/cofilin induced an increase in the amplitude of the rapid fluorescence recovery after photobleaching (Figure 4D). This demonstrated that ADF/cofilin fragments the actin networks, leading to the creation of free barbed ends that are rapidly capped by free CP present in the medium. Using the association rate constant reported previously



**FIGURE 4:** ADF/cofilin severs short actin filaments and creates new filament barbed ends during reconstituted bead motility. (A) Schematic representation of the photobleaching experiments of Alexa Fluor 488–labeled CP in a dense actin network nucleated from the pWA-coated beads in the absence of ADF/cofilin (left) and in the presence of ADF/cofilin (right). Once dissociated from the end of filaments according to its kinetic dissociation constant  $k_-$  (limiting step), bleached CP is rapidly replaced by unbleached Alexa Fluor 488-CP diffusing from the surrounding medium (following a kinetic constant equal to its association constant rate  $k_+$  multiplied by the protein concentration in the medium). Filaments are also damaged and fragmented by the laser light during the photobleaching process. These new artificial barbed ends are rapidly capped. In the presence of ADF/cofilin, filaments are further fragmented, leading to the rapid recruitment of CP. (B and C) Time-lapse images of FRAP experiments of Alexa Fluor 488-CP on the propulsive actin network nucleated from GST-pWA-coated beads in the absence (A) or presence (B) of 0.3 μM Alexa Fluor 568-ADF/cofilin under conditions similar to Figure 2A. Images were taken at the indicated times during polymerization. Time-lapse images were acquired by fluorescence microscopy. The photobleached zones, indicated by a dashed rectangle on the images, were obtained by a local intense laser illumination. For a better visualization of CP fluorescence intensity, images are also shown in pseudocolor. Scale bar: 5 μm. (D) Graph representing the time course of fluorescence intensity changes for Alexa Fluor 488-labeled CP within the bleached zones. For an easier comparison, data were normalized by fluorescence intensity prior to bleaching. Blue, data corresponding to the experiment shown in (B) in the absence of ADF/cofilin; red, those corresponding to experiment (C) in the presence of ADF/cofilin. Means and statistics obtained for the kinetics of the fluorescence recovery after photobleaching of Alexa Fluor 488-CP in different experiments are presented. Curve fits were obtained using a double exponential function in KaleidaGraph. The dissociation constant was fixed to the mean experimental value found ( $k_- = 0.00155 s^{-1}$ ) in order to solve the other kinetic constant  $k_{obs}$ , therefore permitting the calculation of the half-time  $t_{1/2}$  and the free concentration of CP in the medium (using  $k_{+th} = 3 \mu M^{-1} \cdot s^{-1}$ ). Data are represented as mean  $\pm$  SE. (See also Movie S5.)



**FIGURE 5:** Evidence for the macroscopic stochastic dynamics of ADF/cofilin severing activity. (A) GST-pWA-coated beads were added to a motility medium containing 4  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor 568-actin monomers, 150 nM Arp2/3 complex, 25 nM CP, and 0.6  $\mu\text{M}$  Alexa Fluor 488-ADF/cofilin under the same conditions as in Figure 2A. The dark blue arrowhead points to the motile bead and the light blue arrowhead follows the thick actin shell assembled prior to symmetry breaking and its fragmentation into small meshwork pieces. Alexa Fluor 568-actin is colored in red, and Alexa Fluor 488-ADF/cofilin in green. (B) is a magnification of the area outlined by a dashed box in (A). The signal in (B) corresponds to fluorescence of Alexa Fluor 568-actin only. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ . (See also Movie S6.)

(Schafer *et al.*, 1996), the double exponential fits of the fluorescence recovery curves revealed 29 nM of CP was bound to actin comet tail in the absence of ADF/cofilin, corresponding to 73% of the initial concentration of CP, whereas 39 nM CP was bound in the presence of ADF/cofilin, corresponding to 87% of the initial concentration of CP (Figure 4). This difference of 10 nM  $\text{CP}_{\text{bound}}$  represents the concentration of free barbed ends created by ADF/cofilin-severing activity within the actin network.

Since we knew the concentration of ADF/cofilin present in the medium and the increased number of barbed ends resulting from fragmentation by ADF/cofilin, we estimated the efficiency of severing by ADF/cofilin as at least one severing event per 100 molecules of ADF/cofilin present.

#### ADF/cofilin is required for the macroscopic release of the aged end of the comet tail

To investigate whether severing of individual actin filaments by ADF/cofilin leads to a macroscopic dissociation and disassembly of the Arp2/3 complex-mediated network, we reconstituted motility of functionalized beads with a high concentration of ADF/cofilin (0.6  $\mu\text{M}$ ), and tracked the distribution of fluorescently labeled actin and ADF/cofilin (Figure 5A and Movie S6). The spatial and temporal incorporation of both proteins was in agreement with those presented in Figure 2. Remarkably, under these experimental conditions, we observed that the oldest actin region, which consists of the

dense actin shell assembled prior to symmetry breaking, broke into small pieces of meshwork that drifted away and disappeared in the medium (Figure 5B). Paradoxically, in the absence of ADF/cofilin in the motility medium, the oldest actin region remained intact throughout the duration of the experiments (Figure 1). Given both the microscopic severing activity of ADF/cofilin highlighted by the FRAP experiments (Figure 4) and its spatiotemporal localization, we propose, in the minimal experimental context of our study involving Arp2/3 complex, CP, and ADF/cofilin, that the release of portions of the actin-branched network is due to a macroscopic destabilization modulated by actin filament severing by ADF/cofilin. Consequently, the disassembly of the actin comet tails appears inconsistent with a treadmilling mechanism wherein the actin network turnover results only from the depolymerization of actin filaments from their pointed ends. Instead, the rapid and macroscopic release of the aged actin network seems likely related to the process of stochastic fragmentation mediated by ADF/cofilin recently described at the single-filament level (Michelot *et al.*, 2007; Roland *et al.*, 2008; Staiger *et al.*, 2009).

## DISCUSSION

The actin cytoskeleton is a highly dynamic array and its mechanical properties are involved in many essential cellular functions like cell division, polarity, morphogenesis, and motility (Pollard and Cooper, 2009). To engage in such complex behaviors, cells maintain precise control over the spatial and temporal localization of actin polymerization (Rohatgi *et al.*, 1999), and finely modulate the actin filament networks' mechanical properties in response to extracellular stimuli. In this study, we used a reconstituted motility system and followed in space and time the incorporation of three key actin-binding proteins (Arp2/3 complex, CP, and ADF/cofilin) within a dynamic actin network to provide insights into the establishment of a mechanochemical gradient along this actin network during particle propulsion. Our findings reveal that ADF/cofilin orchestrates the mechanical destabilization of actin networks during motility, leading to the macroscopic loss of portions of the network to the medium, whereas CP coordinates the spatiotemporal localization of ADF/cofilin. Thus these two proteins act in concert to modulate the biomechanical properties and the turnover of actin filament arrays during actin-based motility by branched networks.

#### CP orchestrates the spatiotemporal localization of ADF/cofilin within propulsive networks

Heterodimeric capping protein has a high association rate constant and can rapidly block the fast-growing barbed ends of actin filaments (Schafer *et al.*, 1996). Thus CP efficiently prevents filament elongation at locations distal to nucleation sites, which are thought to exist near propulsion sites (Rohatgi *et al.*, 1999; Pantaloni *et al.*, 2000; Iwasa and Mullins, 2007). Accordingly, our results revealed that the spatiotemporal incorporation of CP was superimposed on that of actin. This suggests that actin filament branches initiated by the Arp2/3 complex at the nucleation sites (i.e., the bead surface) elongate soon after nucleation for a only brief period before being capped (Figures 1 and 4; Achard *et al.*, 2010). Therefore CP restricts the "active" zone (where new actin monomers are inserted; Akin and Mullins, 2008; Achard *et al.*, 2010; Reymann *et al.*, 2010) to the vicinity of nucleation sites and controls the chronological and spatial progression of the "dead" zone (where actin filament elongation has ceased) along the propulsive actin meshwork. This mechanism yields a macroscopic gradient of nucleotide-loaded states along the actin filament network. Indeed, since actin monomers are added only near the

bead surface, ATP-loaded subunits are temporarily constrained to this region of the comet tail before ATP hydrolysis and phosphate dissociation occur in the whole network. Because ADF/cofilin has a marked preference for ADP-loaded actin (Blanchoin and Pollard, 1999), the establishment of this gradient controls the gradual incorporation of ADF/cofilin along the actin network (Figures 2A and 3). In addition, by increasing the rate of phosphate release, ADF/cofilin limits the size of the actin filament network resistant to its interaction (Blanchoin and Pollard, 1999; Suarez *et al.*, 2011). Consistent with this scheme, as soon as bead motility stops (Figure 2B), due to a lack of actin monomers in solution, the size of the ADF/cofilin exclusion zone around the bead rapidly decreases, and ultimately disappears after 1 h. The spatiotemporal localization of CP and ADF/cofilin described here is fully consistent with their mutual distribution in vivo (Svitkina and Borisy, 1999; Okreglak and Drubin, 2007). Indeed, CP localizes to the lamellipodium in the 1  $\mu\text{m}$  immediately adjacent to the plasma membrane (Iwasa and Mullins, 2007), whereas ADF/cofilin is excluded from 0.2–0.7  $\mu\text{m}$  of the lamellipodial network (Svitkina and Borisy, 1999). Our present results demonstrate that the gradient of ADF/cofilin along the actin network is controlled by kinetics, that is, by its higher affinity for ADP-loaded subunits and its ability to accelerate  $\text{P}_i$  release (Figures 2 and 3).

### ADF/cofilin catalyzes the microscopic severing and macroscopic destabilization of dense and rigid actin networks

In terms of its mechanical properties, the propulsive actin filament network is made of a dense and rigid actin filament array with an elongation zone restricted spatially and temporally to the vicinity of the nucleation particle. The FRAP experiments provide evidence that ADF/cofilin was able to sever actin filaments within this stiff and highly cross-linked actin network, as the actin-based propulsion of particles was achieved in the presence of a critical amount of CP. This also emphasized that actin filament severing by ADF/cofilin, followed by the rapid recruitment of CP to newly created barbed ends, introduces a mechanical heterogeneity throughout branched networks. The microscopic fragmentation of actin filaments by ADF/cofilin within the comet tail is consistent with the fact that its spatial and temporal incorporation correlated with the decrease of actin filament density along the aging regions of the tail (Figure 2, A and D, line scans). In addition, studies have established that ADF/cofilin also dissociates Arp2/3-generated actin filament branches (Blanchoin *et al.*, 2000a; Chan *et al.*, 2009) and only slightly affects the rate of depolymerization of actin filaments (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Suarez *et al.*, 2011). Thus a global process that relies on filament debranching and severing by ADF/cofilin, rather than enhanced pointed-end depolymerization, is an attractive explanation for the loss of actin mass from older regions of an actin array that is dense and rigid (Figures 2A, line scans, and 3C). We propose that loss of actin filaments in the comet tail due to fragmentation by ADF/cofilin occurs in two steps: 1) it happens microscopically at the single actin filament level, and 2) it propagates macroscopically to release stochastically not single filaments but large portions of the aged actin network. This model is in agreement with the fast disassembly of actin filaments within dense branched networks in endocytic patches (Berro *et al.*, 2010). Furthermore, it reconciles the paradox for the apparent dissociation rate of CP being three orders of magnitude faster in vivo compared with in vitro in the absence of any severing protein (Miyoshi *et al.*, 2006).

### Concluding remarks

The rapid and continuous recruitment of CP throughout the Arp2/3-mediated actin assembly imposes mechanical properties on the actin network conformation, which is a rigid array necessary for the production of protrusive force. CP also directly controls the spatiotemporal recruitment of ADF/cofilin, which in turn affects the actin network mechanics and CP turnover. Consequently, we propose that the synergy between CP and ADF/cofilin leads to a tight coupling between both the biochemical and mechanical properties of the actin networks, which explains the turnover of actin filaments at the leading edge of motile cells (Svitkina and Borisy, 1999).

It must be kept in mind that cells display an infinite complexity and the spatiotemporal distribution of actin networks' aging zones imposed by CP, together with the subsequent actin monomer recycling by ADF/cofilin severing activity, are modulated by a diverse battery of regulating proteins, including Aip1 (Kueh *et al.*, 2008; Okreglak and Drubin, 2010), coronin (Gandhi *et al.*, 2009), tropomyosin (Blanchoin *et al.*, 2001; Bugyi *et al.*, 2010), and myosin II (Hotulainen and Lappalainen, 2006). In addition, processive actin polymerases such as formin (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Lee *et al.*, 2010) or Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) family of proteins (Bear, 2002; Trichet *et al.*, 2007; Hansen and Mullins, 2010) protect actin filament barbed ends against CP and generate parallel actin networks with specific mechanical properties. Further understanding of the interplay between the control of actin dynamics and the actin network's mechanical properties should come from studies where the minimal reconstituted motility system is expanded to include the presence of additional actin-regulating factors.

### MATERIALS AND METHODS

#### Protein production and labeling

Actin was purified from rabbit skeletal muscle acetone powder (Spudich and Watt, 1971). Monomeric Ca-ATP-actin was purified by gel-filtration chromatography on Sephacryl S-300 (McLean-Fletcher and Pollard, 1980) at 4°C in G buffer (5 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.2 mM ATP, 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ , and 0.5 mM dithiothreitol [DTT]). Actin was labeled on lysines with Alexa Fluor 568 or Alexa Fluor 488 as described previously (Isambert *et al.*, 1995; Egile *et al.*, 1999). The Arp2/3 complex was purified from bovine brain extracts according to Egile *et al.* (1999). GST-WA, GST-pWA, human profilin, mouse CP, and ADF/cofilin were expressed and purified as described previously (Almo *et al.*, 1994; Machesky *et al.*, 1999; Blanchoin *et al.*, 2000b; Falck *et al.*, 2004). The Arp2/3 complex, CP, and ADF/cofilin were labeled on cysteines with Alexa Fluor 568 or Alexa Fluor 488. D34C, C62A mutations were introduced on *COF1 Saccharomyces cerevisiae* cofilin gene, as previously described (Lappalainen *et al.*, 1997). We referred to this double mutant protein as "D34C-ADF/cofilin" and labeled it on C34 (Suarez *et al.*, 2011). The purified protein solution was dialyzed overnight against two changes of dialysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride [TCEP]). The protein concentration was then adjusted to 100  $\mu\text{M}$  for a total volume of 1 ml and labeled overnight with sixfold excess of Alexa 488 or Alexa 568 C5-maleimide (Invitrogen, Carlsbad, CA). Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 568-protein was purified by gel-filtration chromatography on G25 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) in elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT) and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

#### Coating of beads

Carboxylate polystyrene microspheres (4.5  $\mu\text{m}$  diameter, 2.6% solids-latex suspension; Polysciences, Eppelheim, Germany) were

mixed with 2  $\mu\text{M}$  GST-pWA in X buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 0.1 M KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, and 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) for 15 min at 20°C on a thermoshaker. The beads coated with pWA were then washed in X buffer containing 1% bovine serum albumin (BSA) and stored on ice for 48 h in X buffer-0.1% BSA. GST-pWA surface density on the beads was quantified on SDS-PAGE gel:  $2.4 \times 10^4$  pWA/ $\mu\text{m}^2$ .

### Motility assay

GST-pWA-coated beads were mixed with a motility medium containing 4  $\mu\text{M}$  actin monomers, 12  $\mu\text{M}$  profilin, and the indicated concentration of Arp2/3, CP, and ADF/cofilin, labeled or not, in X buffer (10 mM HEPES, pH 7.0, 0.1 M KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, and 0.1 mM  $\text{CaCl}_2$ ) supplemented with 1% BSA, 0.2% methylcellulose, 3 mM DTT, 0.13 mM DABCO, 1.8 mM ATP. Image acquisition was performed on a Zeiss axioplan microscope (Jena, Germany) equipped with a 63 $\times$ , 1.5 numerical aperture Plan-APOCHROMAT objective lens, and images were collected with a Hamamatsu ORCA CCD camera (Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, Germany) with Metavue version 6.2r6 (Universal Imaging, Media, PA). Two sets of filters were used: FITC filter (BP 450–490, FT 510, BP 515–568, Zeiss) adapted to the Alexa Fluor 488 and rhodamine filter (BP 546/12, FT580, LP 590, Zeiss) adapted to the Alexa Fluor 568. A journal was created in Metavue in order to acquire three images quasi-simultaneously (phase contrast, Alexa Fluor 568 acquisition, Alexa Fluor 488 acquisition).

For bead motility, time-lapse images of motile beads were acquired quasi-simultaneously by fluorescence microscopy with two sets of filters adapted to Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 568, permitting the tracking of two proteins.

### Data analysis of FRAP experiments

Images were then combined using Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Images corresponding to the different fluorophores were color combined and analyzed (line scan, threshold area) using Metamorph version 7.5. Data were then analyzed (normalization, curve fits) and plotted with KaleidaGraph version 4.01 (Synergy Software, Reading, PA). For the fluorescence recoveries after bleaching, double exponential curve fits were first achieved on experiments in the absence of ADF/cofilin in order to obtain a mean value of the  $k_-$  ( $0.00155 \text{ s}^{-1} \pm 0.00016$ ;  $n = 5$ ). This value was then fixed in all double exponential fits possible to obtain the other kinetic constant ( $k_{\text{obs}} = k_+ * [\text{CP}_{\text{free}}]$ ). Using the theoretical  $k_+$  ( $3 \mu\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) published by Schafer *et al.* (1996), we obtained an estimation of the concentration of free CP in the medium.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to L.B. from Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0012 and ANR-08-SYSC-013) and a fellowship to A.C.R. from CEA. C.J.S. was supported by the Physical Biosciences Program of the Office of Basic Energy Sciences, U. S. Department of Energy, under contract number DE-FG02-04ER15526.

### REFERENCES

- Achard V, Martiel JL, Michelot A, Guerin C, Reymann AC, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R (2010). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol* 20, 423–428.
- Akin O, Mullins RD (2008). Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell* 133, 841–851.
- Almo SC, Pollard TD, Way M, Lattman EE (1994). Purification, characterization and crystallization of *Acanthamoeba* profilin expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 236, 950–952.
- Andrianantoandro E, Pollard TD (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell* 24, 13–23.
- Bear JE (2002). Formins: taking a ride on the barbed end. *Dev Cell* 3, 149–150.
- Bernstein BW, Bamberg JR (2010). ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* 20, 187–195.
- Berro J, Sirotkin V, Pollard TD (2010). Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol Biol Cell* 21, 2905–2915.
- Blanchoin L, Pollard TD (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem* 274, 15538–15546.
- Blanchoin L, Pollard TD, Hitchcock-DeGregori SE (2001). Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol* 11, 1300–1304.
- Blanchoin L, Pollard TD, Mullins RD (2000a). Interaction of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol* 10, 1273–1282.
- Blanchoin L, Robinson RC, Choe S, Pollard TD (2000b). Phosphorylation of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure. *J Mol Biol* 295, 203–211.
- Brieher WM, Kueh HY, Ballif BA, Mitchison TJ (2006). Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of *Listeria* actin comet tails by cofilin, coronin, and Aip1. *J Cell Biol* 175, 315–324.
- Bugyi B, Didry D, Carlier MF (2010). How tropomyosin regulates lamellipodial actin-based motility: a combined biochemical and reconstituted motility approach. *EMBO J* 29, 14–26.
- Carlier MF, Laurent V, Santolini J, Melki R, Didry D, Xia GX, Hong Y, Chua NH, Pantaloni D (1997). Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* 136, 1307–1322.
- Chan C, Beltzner CC, Pollard TD (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol* 19, 537–545.
- Chhabra ES, Higgs HN (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* 9, 1110–1121.
- Cooper JA, Schafer DA (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr Opin Cell Biol* 12, 97–103.
- De La Cruz EM (2005). Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J Mol Biol* 346, 557–564.
- De La Cruz EM (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys Rev* 1, 51–59.
- Egile C, Loisel TP, Laurent V, Li R, Pantaloni D, Sansonetti PJ, Carlier MF (1999). Activation of the CDC42 effector N-WASP by the *Shigella flexneri* IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* 146, 1319–1332.
- Falck S, Paavilainen VO, Wear MA, Grossmann JG, Cooper JA, Lappalainen P (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *EMBO J* 23, 3010–3019.
- Gandhi M, Achard V, Blanchoin L, Goode BL (2009). Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol Cell* 34, 364–374.
- Goley ED, Welch MD (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 713–726.
- Hansen SD, Mullins RD (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol* 191, 571–584.
- Hotulainen P, Lappalainen P (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* 173, 383–394.
- Isambert H, Venier P, Maggs AC, Fattoum A, Kassab R, Pantaloni D, Carlier MF (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem* 270, 11437–11444.
- Iwasa JH, Mullins RD (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol* 17, 395–406.
- Kim K, Yamashita A, Wear MA, Maeda Y, Cooper JA (2004). Capping protein binding to actin in yeast: biochemical mechanism and physiological relevance. *J Cell Biol* 164, 567–580.
- Kueh HY, Charras GT, Mitchison TJ, Brieher WM (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J Cell Biol* 182, 341–353.
- Kuhn JR, Pollard TD (2007). Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins. *J Biol Chem* 282, 28014–28024.

- Lappalainen P, Fedorov EV, Fedorov AA, Almo SC, Drubin DG (1997). Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *EMBO J* 16, 5520–5530.
- Lee K, Gallop JL, Rambani K, Kirschner MW (2010). Self-assembly of filopodia-like structures on supported lipid bilayers. *Science* 329, 1341–1345.
- Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier MF (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613–616.
- Machesky LM, Mullins DM, Higgs HN, Kaiser DA, Blanchoin L, May RC, Hall ME, Pollard TD (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 3739–3744.
- Maciver SK, Zot HG, Pollard TD (1991). Characterization of actin filament severing by actophorin from *Acanthamoeba castellanii*. *J Cell Biol* 115, 1611–1620.
- Martin AC, Welch MD, Drubin DG (2006). Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat Cell Biol* 8, 826–833.
- McCullough BR, Blanchoin L, Martiel JL, De la Cruz EM (2008). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol* 381, 550–558.
- McGough A, Pope B, Chiu W, Weeds A (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol* 138, 771–781.
- McLean-Fletcher S, Pollard TD (1980). Identification of a factor in conventional muscle actin preparations which inhibits actin filament self-association. *Biochem Biophys Res Commun* 96, 18–27.
- Michelot A, Berro J, Guerin C, Boujemaa-Paterski R, Staiger CJ, Martiel JL, Blanchoin L (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr Biol* 17, 825–833.
- Miyoshi T, Tsuji T, Higashida C, Hertzog M, Fujita A, Narumiya S, Scita G, Watanabe N (2006). Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J Cell Biol* 175, 947–955.
- Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high-affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 6181–6186.
- Okada K, Ravi H, Smith EM, Goode BL (2006). Aip1 and cofilin promote rapid turnover of yeast actin patches and cables: a coordinated mechanism for severing and capping filaments. *Mol Biol Cell* 17, 2855–2868.
- Okreglak V, Drubin DG (2007). Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J Cell Biol* 178, 1251–1264.
- Okreglak V, Drubin DG (2010). Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J Cell Biol* 188, 769–777.
- Pantaloni D, Boujemaa R, Didry D, Gounon P, Carlier M-F (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol* 2, 385–391.
- Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys* 29, 545–576.
- Pollard TD, Borisy GG (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Pollard TD, Cooper JA (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208–1212.
- Reymann A-C, Martiel J-L, Cambier T, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Théry M (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat Mat* 9, 827–832.
- Rohatgi R, Ma L, Miki H, Lopez M, Kirchhausen T, Takenawa T, Kirschner MW (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221–231.
- Roland J, Berro J, Michelot A, Blanchoin L, Martiel JL (2008). Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys J* 94, 2082–2094.
- Rouiller I, Xu XP, Amann KJ, Egile C, Nickell S, Nicastro D, Li R, Pollard TD, Volkman N, Hanein D (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol* 180, 887–895.
- Schafer DA, Jennings PB, Cooper JA (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol* 135, 169–179.
- Spudich JA, Watt S (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* 246, 4866–4871.
- Staiger CJ, Sheahan MB, Khurana P, Wang X, McCurdy DW, Blanchoin L (2009). Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *J Cell Biol* 184, 269–280.
- Suarez C, Roland J, Boujemaa-Paterski R, Kang H, McCullough BR, Reymann AC, Guérin C, Martiel JL, De La Cruz E, Blanchoin L (2011). Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr Biol* 21, 862–868.
- Svitkina TM, Borisy GG (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* 145, 1009–1026.
- Trichet L, Campas O, Sykes C, Plastino J (2007). VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys J* 92, 1081–1089.
- van der Gucht J, Paluch E, Plastino J, Sykes C (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 7847–7852.
- Welch MD, Rosenblatt J, Skoble J, Portnoy DA, Mitchison TJ (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105–108.
- Yamashita A, Maeda K, Maeda Y (2003). Crystal structure of CapZ: structural basis for actin filament barbed end capping. *EMBO J* 22, 1529–1538.



## **Supplemental Information**

### **Inventory of Supplemental Information:**

#### **Supplemental data:**

- Supplemental Figures: S1 and S2 related to Figure 2; S3 related to Figure 5.
- Supplemental Movies: S1 related to Figure 1; S2 and S3 related to Figure 2; S4 related to Figure 3; S5 related to Figure 4; S6 related to Figure 5.

#### **Supplemental Experimental Procedures:**

- Experimental methods required to perform the experiments described in this study.

#### **Supplemental Text**

- ADF/cofilin binding is controlled by the chemical state of actin-bound nucleotide throughout elongating networks
- Description of the mathematical model and the numerical simulation methods used to account for the spatiotemporal distribution of ADF/cofilin throughout actin filament networks.

#### **Supporting References**

**Figure S1. ADF/cofilin binding is controlled by the chemical state of actin-bound nucleotide throughout elongating networks**

GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4  $\mu\text{M}$  Alexa568-actin monomers, 12  $\mu\text{M}$  profilin, 150 nM Arp2/3 complex, and 0.3  $\mu\text{M}$  Alexa488-ADF/cofilin. **(A)** is a montage of time-lapse images showing the formation of a star-shaped actin network elongating from the nucleating beads; the corresponding graphs represent the evolution of fluorescence intensities (taken along the dashed line) for actin and ADF/cofilin within the actin tail at different times during polymerization. **(B)** is a representative image taken after one hour of actin assembly of star-like network and the cartoon in the rightmost part of the image highlights the positioning of the different zones of ADF/cofilin recruitment. Blue chevrons indicate the localization of the polymerizing zone close to nucleating beads, whereas blue arrowheads point to the filament elongation sites at bundles tips. **(C)** and **(D)** are zooms of bead surroundings in **(A)** and **(B)** respectively. The scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ . (See also Movie S3).

**Figure S2. Distinct modes of spatiotemporal incorporation for CP and ADF/cofilin during actin based motility.**

GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4  $\mu\text{M}$  actin monomers, 12  $\mu\text{M}$  profilin, 150 nM Arp2/3 complex, 0.3  $\mu\text{M}$  Alexa568-ADF/cofilin, 45 nM Alexa488-CP. Images were taken at the indicated times during polymerization. Alexa488 is colorized in green and Alexa568 in red. Linescans of the fluorescence intensities taken along the actin gel (using Metamorph), as represented by the dashed curves, are associated under each image of the time-lapse it is linked to. The scale bar represents 5  $\mu\text{m}$ .

**Figure S3. Effect of the Intensity and duration of laser photobleaching during FRAP experiences with CP.**

(A-D) Time-lapse images of photobleaching experiments of Alexa488-CP on the propulsive actin network nucleated from GST-pWA coated beads in the absence of ADF/cofilin. In these examples, the intensity of the laser and the duration of the illumination were modified for each experiment and the values for CP fluorescence intensity in the bleached zone are indicated in (E). GST-pWA coated beads were added to a motility medium containing 4  $\mu$ M actin monomers, 12  $\mu$ M profilin, 150 nM Arp2/3 complex, 45 nM Alexa488-CP. Images were taken at the indicated times during polymerization.

Time-lapsed images were acquired by fluorescent microscopy. The photobleached zone, surrounded by a dashed rectangle on the images, was obtained by a local intense laser illumination. For a better visualization images are also shown in pseudocolor. The scale bar represents 5  $\mu$ m. (E) Graph representing the recovery over time of the fluorescence intensity within the bleached zones of the different experiments presented in this figure. Analysis was achieved using the threshold function of Metamorph. For an easier comparison data were normalized by the fluorescence intensity pre-bleaching. The different curves are superimposed on the right, showing that the photobleaching intensity has an effect on the depth of the first rapid phase of recovery (linked to the capping of ends resulting from fragmentation subsequent to laser photodamage) but not on the slopes neither on the second slower phase of recovery (linked to the replacement of bleached proteins).

## Supporting Movies

### **Movie S1: Spatiotemporal incorporation of CP (green) throughout elongating actin networks (red) during reconstituted bead motility.**

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 1B. Total elapsed time is 43 min 58 s and compressed to a 1-second AVI movie.

### **Movie S2: Spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin (green) throughout elongating actin networks (red) during reconstituted bead motility.**

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 2. Total elapsed time is (left) 1 hour 30 min, or (right) 1 hour 14 min, and is compressed to a 4-second AVI movie.

### **Movie S3: Spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin (green) throughout reconstituted star-shaped actin networks (red), in the absence of CP.**

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure S1. Total elapsed time is 58 min 56 s and compressed to a 2-second AVI movie.

### **Movie S4: *In silico* reconstitution of the chemical state of actin-bound nucleotide of elongating comet tails controlling ADF/cofilin incorporation.**

Left, in the absence of ADF/cofilin; right, in the presence of 1  $\mu$ M of ADF/cofilin. The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 3.

### **Movie S5: Evidence for ADF/cofilin fragmentation activity within dense actin networks.**

Fluorescence recovery after photobleaching experiments on Alexa-Capping protein incorporated in the comet tail during bead motility, in conditions similar to that used in Figure 4. Three zones are successively bleached using local intense laser illumination. Total elapsed time is 49 min and compressed to a 7-second AVI movie.

### **Movie S6: Actin networks turnover through the macroscopic release of their aged portions due to ADF/cofilin stochastic severing activity.**

The movie corresponds to the time-lapse series in Figure 5. In the first movie Alexa568-actin is colorized in red, and Alexa488-ADF/cofilin in green. Total elapsed

time is 1 hour 14 min and compressed to a 3-second AVI movie. In the second movie, representing a zoom of the fragmenting rear of the comet tail, only actin-fluorescence is showed. The dark blue arrowhead points to the motile bead, the light blue arrowhead follows the thick actin shell assembled prior to symmetry breaking and its macroscopic release (red arrowhead) into small meshwork portions (blue arrowheads).

## Supplemental Experimental Procedures:

### Quantification of the laser photodamage during FRAP experiments

A well-defined zone of the actin comet tail away from the bead center was bleached using a local intense laser illumination (Figures 4 and S3). The variation of the fluorescence recovery over time of these zones followed a double exponential (Figure 4D) that reads:

$$y = m_1 + m_2 \cdot \exp(-k_{\text{obs1}} \cdot x) + m_4 \cdot \exp(-k_{\text{obs2}} \cdot x)$$

with

$$k_{\text{obs1}} = k_{+\text{th, CP}} \cdot (\text{CP}) - k_{-, \text{CP}}$$

$$k_{\text{obs2}} = k_{-, \text{CP}}$$

and where  $m_1$  corresponds to the intercept,  $m_2$  and  $m_4$  to the amplitudes of the fluorescence recovery,  $k_{\text{obs1}}$  to the fast rate of recovery, and  $k_{\text{obs2}}$  to the slow rate of recovery. To determine the reactions that contributed to the kinetics of the fluorescence recovery after photobleaching, we first tested the effect of a variation of the intensity of the laser illumination during the FRAP on the fluorescence recovery (Figures 4A and S3). We found that the intensity of illumination had an impact only on the amplitude of the rapid phase of the fluorescence recovery signal (Figure S3). Indeed, the amplitude of the rapid phase of recovery increased with the laser intensity (Figure S3). We conclude that the FRAP illumination fragments the actin filaments; thereby creating free barbed ends available for the rapid recruitment of unbleached CP (Figure 4A and S3). However, as the amplitude of the photodamage of actin networks was related to the laser intensity, it was comparable between different sets of FRAP experiments performed at equal laser intensity. This effect was quantified in the absence of fragmentation by ADF/cofilin and factored into the

equation of double exponential curve fits used to analyze the FRAP experiments in the presence of ADF/cofilin. As a consequence,  $k_{obs1}$  accounted for the rapid incorporation of unbleached CP, which is limited by both the concentration of free CP present in the motility medium and the on-rate constant ( $3 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ , (Schafer *et al.*, 1996)), and corresponds to the phase of the rapid fluorescence recovery. The  $k_{obs2}$  corresponds then to the slow replacement of bleached CPs, which is limited by their slow off-rate constant from actin filaments barbed ends ( $4 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$  in (Schafer *et al.*, 1996)) and is related to the phase of slow fluorescence recovery. Importantly, the rapid phase of recovery involves the generation of free barbed ends within the defined area of photobleaching assay. For experiments achieved in the absence of ADF/cofilin, we determined the rate constant for slow fluorescence recovery corresponding to the dissociation rate constant of CP from the barbed ends of actin filaments,  $0.0015 \pm 0.0002 \text{ sec}^{-1}$ , a value 3 to 5 times faster than that already published data (Schafer *et al.*, 1996; Kuhn and Pollard, 2007). Moreover, the occurrence of laser photodamage would probably induce loss of actin filaments that drift away, which may explain that lack of recovery of the initial signal of photobleached fluorescent CP (Figures 4D and S3).

## Supplemental Text

### **ADF/cofilin binding is controlled by the chemical state of actin-bound nucleotide throughout elongating networks**

Based on its ability to bind the aged part of actin filament networks with a 40-fold higher affinity than to the newly-polymerized zone, at low concentration (0.3  $\mu\text{M}$ ) ADF/cofilin may serve as a “late” marker of actin networks; We investigated the macroscopic organization of dynamic actin networks in the absence of CP. We initiated the assembly of Arp2/3 complex branched-actin networks on the surface of NPF-coated beads in the absence of CP and in presence of 0.3  $\mu\text{M}$  of ADF/cofilin. As predicted, removing CP from the motility medium led to the formation of a star-like actin structure and a spherical scattered actin gel initiated around the bead (Vignjevic *et al.*, 2003; Achard *et al.*, 2010) (Figure S1). Moreover, in agreement with previously published results (Loisel *et al.*, 1999; Achard *et al.*, 2010), no symmetry breaking of the actin network was observed in absence of CP (Figure S1). To further describe the dynamic organization of this actin network, we quantified the spatial and temporal incorporation of fluorescently-labeled ADF/cofilin with linescans of fluorescence intensity taken along both the diameter of the nucleating bead and the center of an actin bundle from the star-shaped network (Figure S1). We found that at the initial times of actin polymerization, up to 4 minutes, ADF/cofilin localized around nucleating beads and thereafter at the distal part of the actin bundles assembled around the particle. During actin polymerization, ADF/cofilin accumulated along the bundles of the star-shaped actin network (up to 38 minutes); it was enriched in the central part of the bundles, but less abundant in the vicinity of the bead and excluded from the distal tips of bundles (Figure S1, linescans, arrowheads and chevrons for



exclusion). In addition, although the spatio-temporal enrichment of ADF/cofilin in the central part of the bundles was associated with a stable amount of actin along the dashed lines (Figure S1A, linescans), its was closely related to the increase in bundle thickness over time (Figure S1A, timelapse images). The spatial and temporal incorporation of ADF/cofilin is in agreement with the orientation of actin filaments with their barbed ends growing away from the nucleating particle as recently observed at single filament resolution (Achard *et al.*, 2010; Reymann *et al.*, 2010), and consistent with the progressive gathering of actin filaments into large bundles to form the star-like structure (Achard *et al.*, 2010).

Furthermore, in the absence of CP, we observed that ADF/cofilin accumulated in a thin layer of actin network immediately surrounding the bead (Figure S1, B green rings, C and D), whereas it was simultaneously excluded from the distal actin network (Figure S1A, red shell). This ADF/cofilin distribution highlighted that the preexisting actin filaments that host the autocatalytic formation of the Arp2/3-branched actin networks were ADP-loaded (Achard *et al.*, 2010).

## **Kinetic model for the spatiotemporal incorporation of ADF/cofilin within growing actin filament networks**

### **A. Dynamics of actin network growth from nucleating beads.**

We modelled the growth of actin network after the breaking of the initial shell and the establishment of the polar expansion of the actin comet tail. The velocity of actin gel growth is then controlled by the elongation or nucleation of new actin filaments at the bead surface only. Therefore, we considered the actin comet tail as a continuum

medium generated on the bead surface (half a bead) and growing at a constant velocity,  $V$ . Furthermore, the newly created actin filaments were transported with the same velocity  $V$  to form a comet tail with a constant section and a length proportional to the polymerization duration. The definition and value of  $V$  is given in the table S1.

### B. Kinetics of actin modification in the comet.

The hydrolysis of the bound nucleotide and the phosphate release are important processes that control ADF/cofilin binding to ADP-actin filaments (or F-ADP) before filament severing and network fragmentation. Since the state of the nucleotide bound to actin subunits depends only on the age of the subunit in the actin network, we subdivided the comet into slices of constant thickness. We assumed that the nucleotide state was identical for all subunits in a given slice and depended only on the age at which the slice was generated at the bead surface. More specifically, we assume that each slice can be in one of the following states

$$\{F - ATP, F - ADP - P_i, F - ADP, F - ADP - ADF, F - ADP - (ADF)_2\},$$

with the probability

$$\{S_1(t), S_2(t), S_3(t), S_4(t), S_5(t)\}.$$

The changes of nucleotide state or ADF/cofilin binding is governed by a simple set of linear differential equations

$$\begin{aligned} \frac{dS_2}{dt} &= r_1 - (r_1 + r_2)S_2 - r_1S_3 - r_1S_4 - r_1S_5 \\ \frac{dS_3}{dt} &= r_2S_2 - r_3S_3 \\ \frac{dS_4}{dt} &= r_3S_3 - r_4S_4 \\ \frac{dS_5}{dt} &= r_4S_4 - r_5S_5, \end{aligned} \tag{1}$$

Where we used the fact that

$$S_1(t) + S_2(t) + S_3(t) + S_4(t) + S_5(t) = 1. \quad (2)$$

The reaction rates in eq. (1) represent ATP hydrolysis ( $r_1$ ), phosphate release ( $r_2$ ), the binding of ADF/cofilin to ADP-actin subunits ( $r_3$ ), and the cooperative binding of a second ADF/cofilin molecule with the rate  $r_4$ . All rates definition and numerical values are listed in the table S1. Finally, severing of filaments and comet tail fragmentation occurs for slices in the final state  $S_5$  at rate  $r_5$  (Blanchoin and Pollard, 1999). When constraining the  $r_5$  constant to the value measured previously by Blanchoin et al (Blanchoin and Pollard, 1999), the model accounted for a comet tail length obtained experimentally.

### C. Fitting the ATP/ADP-Pi cap length.

The ATP/ADP-Pi cap length is controlled by (i) the overall growth of the actin comet, (ii) the release of Pi following ATP hydrolysis and (iii) the depletion of actin monomers in the course of time. We adopted a very simple model, assuming that the concentration of monomeric actin is governed by

$$\frac{d[G]}{dt} = k_{on} [B] \times ([G]_c - [G])$$

where  $[B]$  is the concentration of barbed ends (assumed constant),  $k_{on}$  is the rate of binding of actin monomers at the barbed end of actin filaments,  $[G]_c$  is the critical concentration of actin monomers. The corresponding velocity for barbed ends is classically given by

$$Vel = \delta k_{on} [B] ([G] - [G]_c)$$

where  $\delta$  is the length increase of an actin filament upon polymerization of a single actin monomer. The total filament length at time  $t$  is now:

$$L(t) = \delta k_{on} [B] \int_0^t ([G](s) - [G]_c) ds$$

The proportion of monomers bound to ATP or ADP-Pi is then given by

$$L_{cap}(t) = \int_0^t L(t-s) \exp(-k_p s) ds \quad (3)$$

where  $k_p$  is the rate constant of Pi release (here, we neglected the ATP hydrolysis since this process is extremely fast compared to Pi release). This last equation expresses that the fraction of F-actin filament created at time  $(t-s)$ , with a length  $L(t-s)$  has a proportion of  $\exp(-k_p s)$  to be in the ATP/ADP-Pi state. The ATP/ADP-Pi cap length is the integral of this last quantity.

During the fitting of figure 3, C and D, we adjusted the parameter  $k_p$  to  $0.0012 \text{ s}^{-1}$  (compared to  $0.0019 \text{ s}^{-1}$  measured in bulk solution (Blanchoin and Pollard, 1999)) to ensure matching between experimentally measured ADF/cofilin exclusion zone length and the ATP/ADP-Pi cap length predicted by equation (3).

Parameter	Definition	Numerical value or Expression
$k_{\text{on, Barbed end}}$	Association rate constant at the barbed end (Pollard, 1986)	$11.6 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{\text{Pi-release}}$	Rate constant of the release of the inorganic phosphate without ADF/cofilin (Melki <i>et al.</i> , 1996)	$0.0012 \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{Pi-release-ADF}}$	Rate constant of the release of the inorganic phosphate in the presence of ADF/cofilin (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.035 \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{ATP-hydrolysis}}$	Hydrolysis rate constant of ATP-nucleotide bound to subunits (Pollard and Borisy, 2003)	$0.35 \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{on, ADF}}$	Binding rate constant of ADF/cofilin on ADP-actin subunits (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.0085 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{\text{off, ADF}}$	Dissociation rate constant of ADF/cofilin (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.005 \text{ s}^{-1}$
$k_{\text{coop, ADF}}$	Rate constant of cooperative binding/unbinding of ADF/cofilin to FADP subunits (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.075 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
$k_{\text{severing}}$	Severing rate constant (Blanchoin and Pollard, 1999)	$0.012 \text{ s}^{-1}$
$V$	Elongation rate	$k_{\text{on, Barbed end}} \cdot [\text{Actin}] - k_{\text{off, Barbed end}}$
$r_1$	ATP hydrolysis rate	$k_{\text{ATP-hydrolysis}}$
$r_2$	Phosphate release rate	$k_{\text{Pi-release}}$
$r_3$	Rate of binding/unbinding of ADF/cofilin to F-ADP subunits	$k_{\text{on, ADF}} \cdot [\text{ADF/cofilin}] - k_{\text{off, ADF}}$
$r_4$	Rate of cooperative binding/unbinding of ADF/cofilin to FADP subunits	$k_{\text{coop, ADF}} \cdot [\text{ADF/cofilin}] - k_{\text{off, ADF}}$
$r_5$	Rate of severing	$k_{\text{severing}}$

Table S1: Kinetic rate constants and reaction rates.

## Supplemental References

- Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guerin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* *20*, 423-428.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* *274*, 15538-15546.
- Kuhn, J.R., and Pollard, T.D. (2007). Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins. *J. Biol. Chem.* *282*, 28014-28024.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* *401*, 613-616.
- Melki, R., Fievez, S., and Carlier, M.-F. (1996). Continuous Monitoring of Pi release Following Nucleotide Hydrolysis in Actin or Tubulin Assembly Using 2-Amino-6-mercapto-7-methylpurine Ribonucleoside and Purine-Nucleoside Phosphorylase as an Enzyme-linked Assay. *Biochemistry* *35*, 12038-12045.
- Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* *103*, 2747-2754.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.
- Reymann, A.-C., Martiel, J.-L., Cambier, T., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., and Théry, M. (2010). Nucleation geometry governs ordered actin networks structures. *Nat. Mat.* *9*, 827-832.
- Schafer, D.A., Jennings, P.B., and Cooper, J.A. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* *135*, 169-179.
- Vignjevic, D., Yarar, D., Welch, M.D., Peloquin, J., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2003). Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J. Cell Biol.* *160*, 951-962.

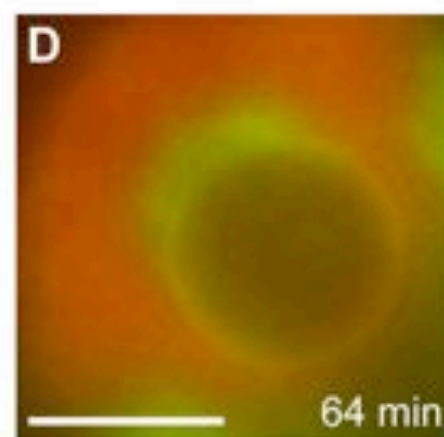
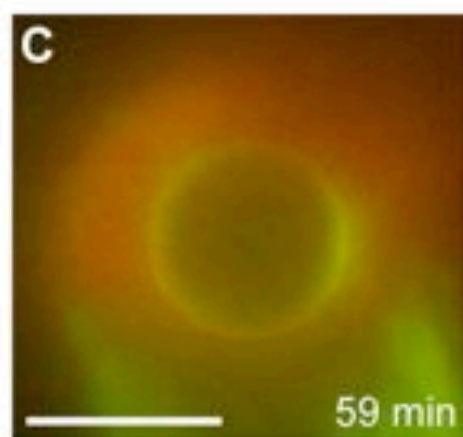
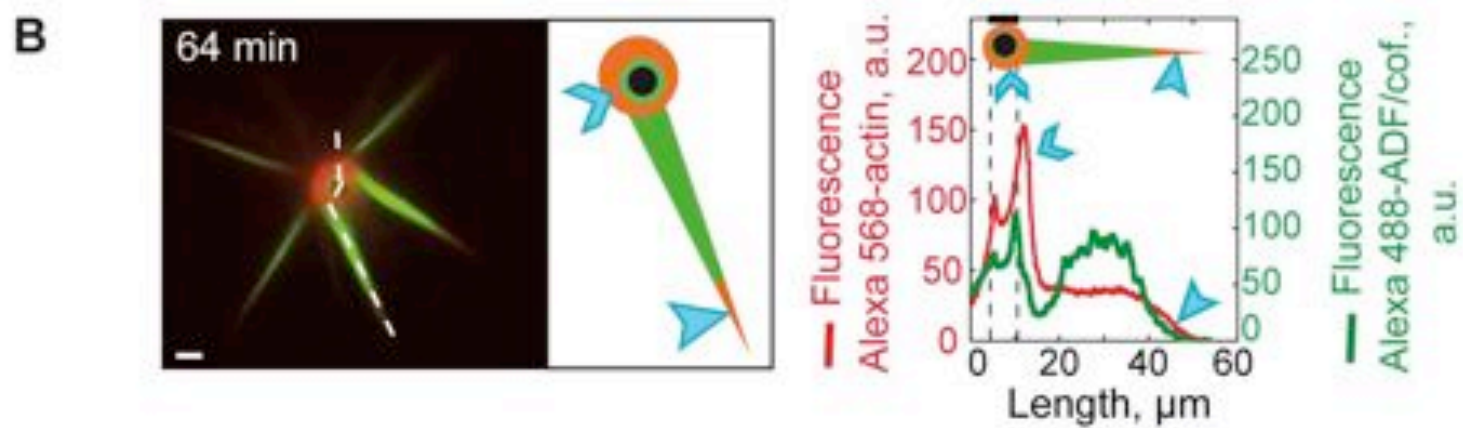
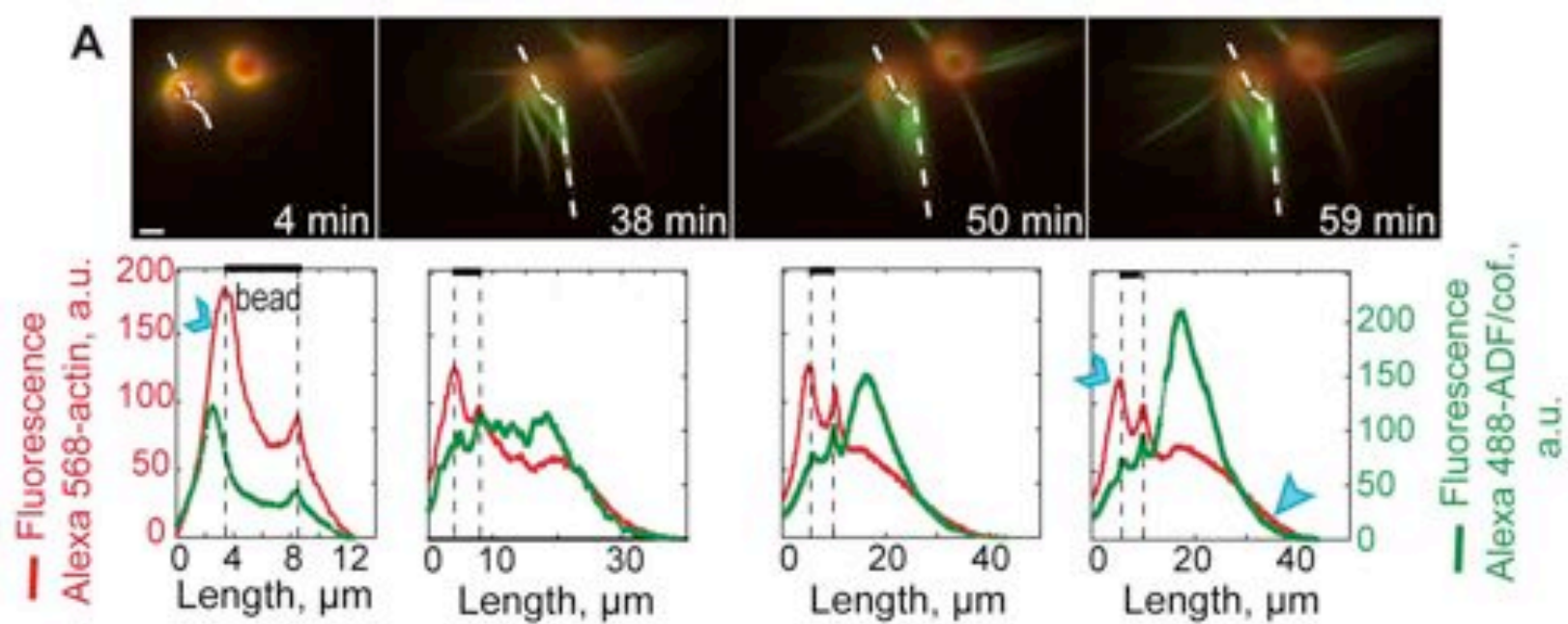


Figure S1

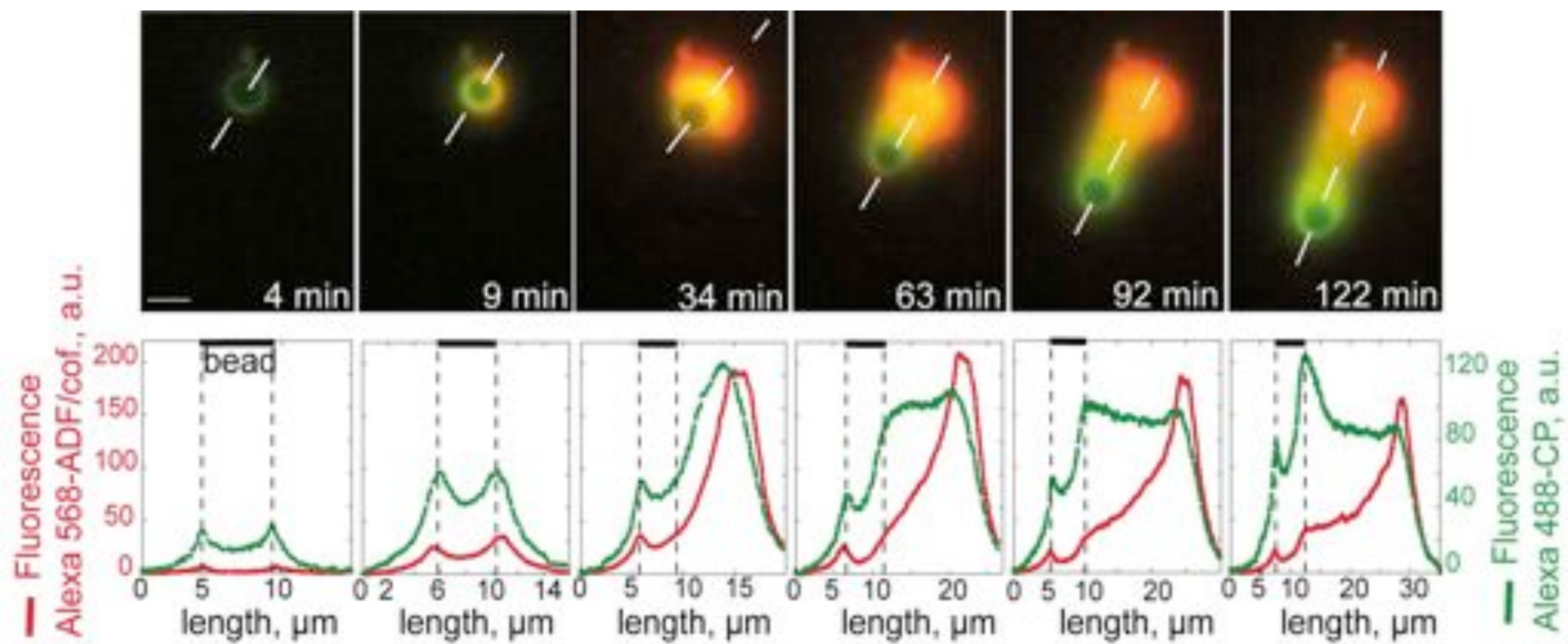


Figure S2



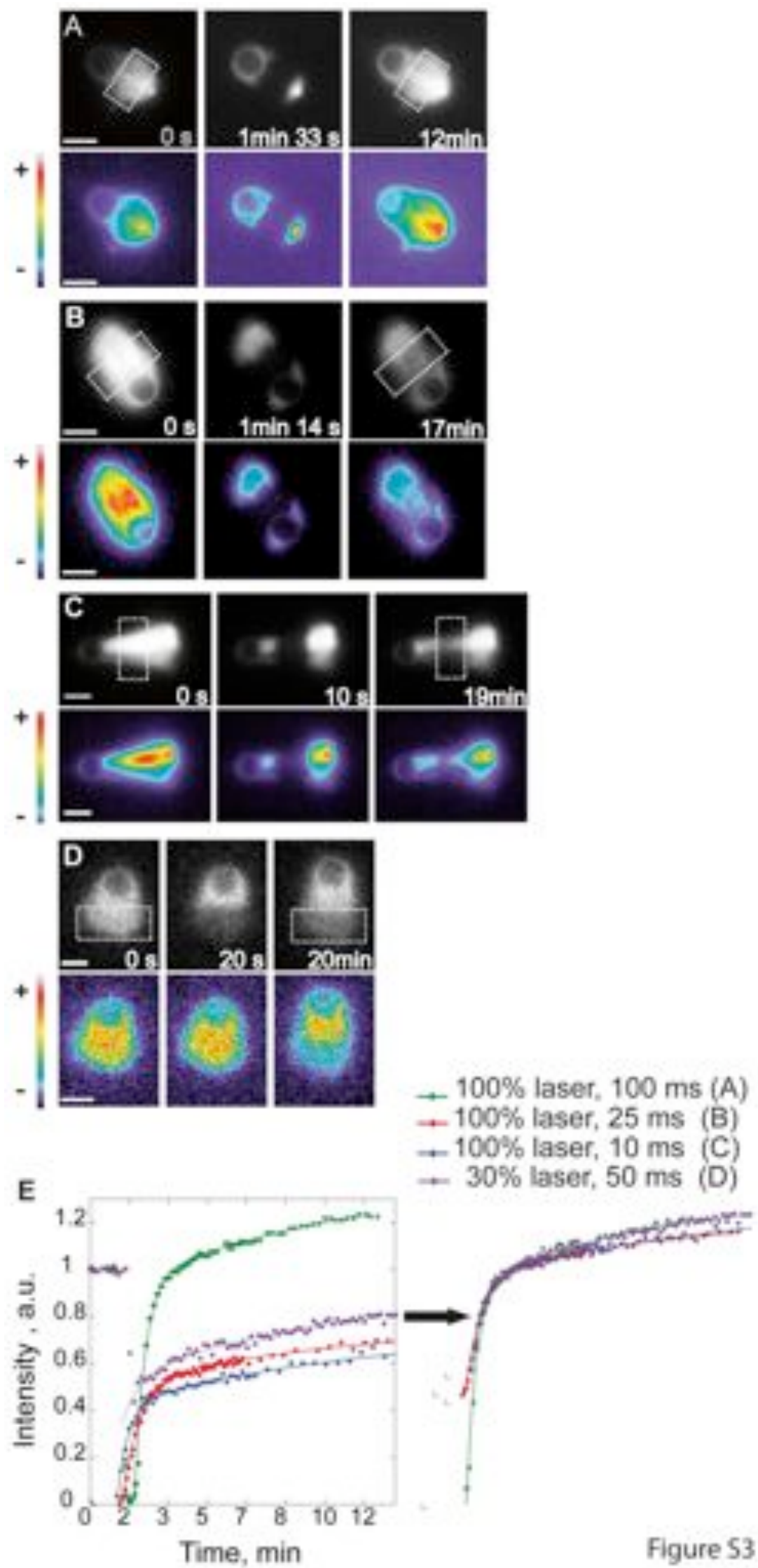


Figure S3

## **Article 3**

### Article 3. Suarez, Current Biology, 2011

L'article 3 correspond à une étude détaillée de l'interaction entre ADF/cofiline et actine à l'échelle du filament individuel. Cette étude a permis la caractérisation de cette protéine nécessaire à l'aboutissement de mon projet, à l'échelle macroscopique, correspondant à l'article 2. Si j'ai fait partie de la réflexion concernant ce projet, je n'y ai pas participé d'un point de vue expérimental. Dans cette étude nous expliquons **à la fois la localisation spatio-temporelle de l'ADF/cofiline, de part sa dépendance vis à vis de l'état des sous-unités, donc de l'âge du filament, mais aussi vis à vis des principes biochimiques agissant en rétroaction sur le filament (accélération de la dissociation du phosphate, association coopérative)**. L'ADF/cofiline décore le filament d'actine en s'insérant entre les sous-unités, perturbe leurs contacts latéraux et conduit à la modification de ses propriétés physiques de la région décorée dans son ensemble, et notamment augmente sa flexibilité (McCullough et al., 2008; McGough et al., 1997). Grâce à la visualisation d'un grand nombre d'évènements de fragmentation et avec l'aide d'un modèle mathématique biomécanique, nous avons montré que la fragmentation du filament d'actine se faisait à l'interface entre portion non décorée et portion décorée par l'ADF/cofiline. Cette fragmentation purement mécanique résulte des comportements mécaniques distincts des portions non décorées et décorées.

Cette étude repose essentiellement sur l'obtention d'une ADF/cofiline modifiée ponctuellement, covalamment liée à un fluorophore et qui conserve sa fonction de liaison et de fragmentation du filament d'actine (figure 1AB). Ainsi grâce à une visualisation simultanée en TIRF avec deux lasers d'excitation, nous avons pu suivre la cinétique d'association de l'ADF/cofiline sur un filament d'actine en élongation et observer avec précision le phénomène de fragmentation (figure 1). Ces expériences ont également été réalisées en présence de profiline afin de maintenir un pool de monomères liés à l'ATP et ainsi recycler l'ADF/cofiline du complexe ADF/cofiline – monomère non polymérisable.

L'ADF/cofiline se lie au filament d'actine selon une cinétique d'association intimement liée à l'état du nucléotide des sous-unités qui composent ce filament. Nous avons montré tout d'abord que la dissociation de l'ADF/cofiline d'un filament d'actine n'aurait pas de relevance *in vivo*, puisque celle-ci s'est révélée des plus lentes et quasi inexistante sur les échelles de temps observées de l'ordre de 800 secondes (expérience de FRAP ou de chasse, c'est à dire de remplacement entre protéine marquée et non marquée, figure 2). Un délai avant toute fixation d'ADF/cofiline est observé lors de la polymérisation d'actine. De plus au sein d'un filament en élongation, son association est exclue d'une zone située à l'extrémité barbée appelée "ATP/ADP-Pi cap" du filament, (figure 3). Ceci s'explique par son association 40 fois plus faible sur des sous-unités - ATP ou - ADP-Pi que sur des sous-unités - ADP du filament. La présence de décoration discontinue sur de nombreux filaments tend à montrer que l'hydrolyse de l'ATP se fait bien selon un mécanisme de stochastique aléatoire. Ajouter à cela, le fait que la longueur de la zone dépourvue de fixation d'ADF/cofiline décroisse avec la concentration de celle-ci et l'on peut confirmer que l'association d'ADF/cofiline sur un filament a tendance à accélérer la dissociation du phosphate des sous-unités qui lui sont adjacentes. Cet élément a été confirmé par un modèle mathématique basé sur les cinétiques de polymérisation et de vieillissement d'un filament d'actine ainsi que sur la cinétique et le mécanisme de fixation d'ADF/cofiline (figure 3B, table S1). Plus précisément, le modèle précise que la fixation d'une ADF/cofiline à une sous-unité induit une accélération allostérique de la dissociation du phosphate jusqu'à la 10ème sous-unités éloignée et non décorées sur le filament.

Il existe donc un couplage fort entre l'élongation du filament, sa composition nucléotidique et la fixation d'ADF/cofiline. L'ADF/cofiline modifie ainsi la dynamique du

filament d'actine mais aussi sa structure, rendant celui-ci plus flexible que d'ordinaire (McCullough2008). Cette propriété semble être l'origine mécanique de la fragmentation induite par ADF/cofiline. Par une étude fine des sites de fragmentation de filaments d'actine décorés par l'ADF/cofiline, et cela de manière corrélée à une analyse des densités de présence (liée à l'intensité de fluorescence observée), nous avons démontré que les événements de fragmentation se produisent exclusivement au niveau des zones de transition entre segment décoré et non décoré par ADF/cofiline, (figure 4). Qui plus est la fréquence de fragmentation est positivement corrélée à la densité de protéine présente au niveau de cette interface et à la quantité de zones de transition. C'est pourquoi un filament semble stabilisé à forte (totalement décoré) comme à faible (peu de zones de transitions) concentration d'ADF/cofiline. Une fois de plus, un modèle de simulation mathématique du phénomène nous apporte l'explication de ce mécanisme de fragmentation (Roland et al., 2008): le stress de cisaillement associé aux fluctuations thermiques s'accumule localement au niveau des interfaces des zones décorées par ADF/cofiline c'est à dire là où il y a discontinuité dans les propriétés mécaniques internes du filament d'actine. Passé un certain seuil celui-ci cède pour donner deux filaments d'actine parfaitement fonctionnels (tous deux capables de s'allonger ou de se fragmenter à nouveau).

# Cofilin Tunes the Nucleotide State of Actin Filaments and Severs at Bare and Decorated Segment Boundaries

Cristian Suarez,<sup>1</sup> Jérémy Roland,<sup>1</sup>  
 Rajaa Boujemaa-Paterski,<sup>1</sup> Hyeran Kang,<sup>2</sup>  
 Brannon R. McCullough,<sup>2</sup> Anne-Cécile Reymann,<sup>1</sup>  
 Christophe Guérin,<sup>1</sup> Jean-Louis Martiel,<sup>1</sup>  
 Enrique M. De La Cruz,<sup>2,\*</sup> and Laurent Blanchoin<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Sciences et Technologies pour le Vivant, CEA/CNRS/INRA/UJF, F-38054 Grenoble, France

<sup>2</sup>Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, CT 06520, USA

## Summary

Actin-based motility demands the spatial and temporal coordination of numerous regulatory actin-binding proteins (ABPs) [1], many of which bind with affinities that depend on the nucleotide state of actin filament. Cofilin, one of three ABPs that precisely choreograph actin assembly and organization into comet tails that drive motility *in vitro* [2], binds and stochastically severs aged ADP actin filament segments of *de novo* growing actin filaments [3]. Deficiencies in methodologies to track in real time the nucleotide state of actin filaments, as well as cofilin severing, limit the molecular understanding of coupling between actin filament chemical and mechanical states and severing. We engineered a fluorescently labeled cofilin that retains actin filament binding and severing activities. Because cofilin binding depends strongly on the actin-bound nucleotide, direct visualization of fluorescent cofilin binding serves as a marker of the actin filament nucleotide state during assembly. Bound cofilin allosterically accelerates  $P_i$  release from unoccupied filament subunits, which shortens the filament ATP/ADP- $P_i$  cap length by nearly an order of magnitude. Real-time visualization of filament severing indicates that fragmentation scales with and occurs preferentially at boundaries between bare and cofilin-decorated filament segments, thereby controlling the overall filament length, depending on cofilin binding density.

## Results and Discussion

### Direct Visualization of ADF/Cofilin Binding to Growing Actin Filaments

To follow in real time ADF/cofilin binding to actin filaments, we engineered a yeast ADF/cofilin mutant that could be specifically labeled with a fluorescent probe. Yeast ADF/cofilin contains a single cysteine residue that is buried in the protein structure, so we substituted D34, a solvent-exposed amino acid residue positioned outside of the actin-binding site [4], to cysteine (Figure 1A) and labeled with Alexa-488 maleimide (Figure 1B). Labeled D34C ADF/cofilin retains strong actin filament binding (see Figure S1A available online), severing (discussed forthcoming), and acceleration of spontaneous actin

assembly activities (Figure S1B). Given the minimal perturbations of substitution and labeling, Alexa-488-labeled ADF/cofilin is a reliable tool to investigate the dynamic interaction with elongating actin filaments.

We followed in real time using total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFm) the interaction of ADF/cofilin with actin filaments as they spontaneously assembled from Alexa 568-labeled ATP-actin monomers (Figures 1C and 1E). Measurements were done in the presence of profilin to foster nucleotide exchange from actin monomers, thereby maintaining an ATP-actin monomer pool [5] and limiting ADF/cofilin binding to monomers in solution. The cumulative fluorescence of labeled actin in the evanescent field (proportional to polymer mass) increases linearly over time (Figure 1E), yielding a filament elongation rate of  $\approx 5$  subunits  $s^{-1}$  (Figure 1E) in the absence of ADF/cofilin, consistent with previous determinations [6].

Using two-color TIRFm, we simultaneously monitored in real time actin filament assembly and ADF/cofilin binding (Figures 1D and 1F and Movie S1). The density of bound ADF/cofilin scales with the increase in total polymer (Figure 1F). Remarkably, we detect only minor ADF/cofilin fluorescence before 170 s of actin assembly at the TIRFm resolution scale (Figure 1D), demonstrating that ADF/cofilin binding is delayed relative to actin polymerization, presumably because of the nucleotide state of filament subunits [5].

### Bound ADF/Cofilin Dissociates Slowly from Actin Filaments

The lifetime and dissociation kinetics of bound ADF/cofilin were evaluated by fluorescence recovery after photobleaching (FRAP). A defined segment of an Alexa-488-ADF/cofilin-decorated filament was photobleached with an intense laser beam (Figure 2A, white box). Surprisingly, minimal fluorescence recovery associated with alexa-488-ADF/cofilin occurs within 500 s, indicating that the rate constant for yeast ADF/cofilin dissociation from filaments is very slow and negligible over the time courses of experimental visualization (Figure 2B and Movie S2). Locally bleached actin filaments elongate and bind Alexa-488-ADF/cofilin, thereby confirming that neither actin nor ADF/cofilin are limiting (Figure 2A, green box, and Figure 2C) and that the lack of ADF/cofilin recovery after photobleaching (Figures 2A and 2B) reflects slow ADF/cofilin dissociation.

To ensure that slow yeast ADF/cofilin dissociation is not a consequence of labeling or photobleaching procedures, we competed bound unlabeled ADF/cofilin with Alexa-labeled ADF/cofilin (Figure 2E and Movie S2). Undetectable levels of Alexa-ADF/cofilin incorporate into actin filaments decorated with unlabeled ADF/cofilin filaments within 800 s (Figure 2E), thereby confirming that slow ADF/cofilin dissociation is an intrinsic biochemical property of yeast ADF/cofilin that contributes to a high overall binding affinity [7]. Note that Alexa-488-ADF/cofilin binds rapidly to bare actin filaments (Figure 2D and Movie S2).

### ADF/Cofilin Shortens the ATP/ADP- $P_i$ Cap Length of Actin Filaments by Allosterically Accelerating $P_i$ Release

ADF/cofilin binds 40-fold more strongly to ADP-actin filament subunits than to ATP or ADP- $P_i$  subunits and weakens

\*Correspondence: [enrique.delacruz@yale.edu](mailto:enrique.delacruz@yale.edu) (E.M.D.L.C.), [laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr) (L.B.)

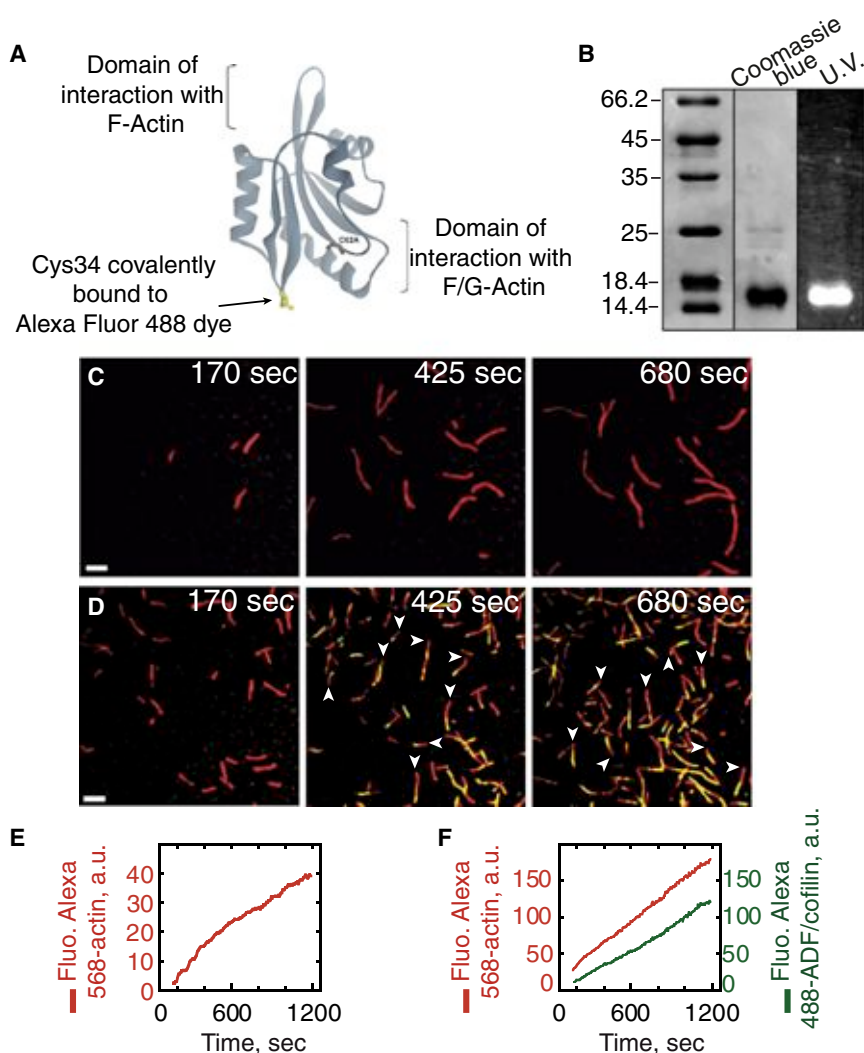


Figure 1. Direct Visualization of ADF/Cofilin Binding on Elongating Actin Filaments by Evanescent Wave Microscopy

(A) Structure of *S. cerevisiae* cofilin (Protein Data Bank ID code COF1); its only cysteine (C62) radical is buried in the wild-type protein structure. We designed a mutant D34C-cofilin with a solvent-exposed cysteine that is available for labeling by Alexa dyes.

(B) A 15% SDS-PAGE gel of purified Alexa-488-labeled D34C-cofilin revealed both by Coomassie blue staining and ultraviolet illumination.

(C–F) Montage of time-lapse total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) images showing the polymerization of 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa-568-labeled actin with 2.4  $\mu\text{M}$  profilin in the absence (C, E) or presence (D, F) of 0.92  $\mu\text{M}$  Alexa-488-cofilin. Alexa-568-actin filaments were colored in red, Alexa-488-ADF/cofilin in green, and the decorated portions of filaments in yellow in the merged images (D). White arrowheads indicate the fast-growing barbed ends of filaments. (E) shows the increase of the integrated intensity fluorescence over time along actin filaments (red curve) in (C), whereas (F) shows that of actin filaments (red curve) and bound Alexa-488-cofilin (green curve) in (D). Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$ .

saturation concentration of ADF/cofilin and in the presence of 0.8  $\mu\text{M}$  actin (Figure 3B). Higher ADF/cofilin concentrations do not shorten the cap length (Figure 3B), which remains stationary over time, whereas the aged zone of the filament is decorated with ADF/cofilin (Figure S1C).

A kinetic model in which the nucleotide-linked equations of actin filament nucleation, elongation, random ATP hydrolysis,  $P_i$  release, and ADF/cofilin binding are explicitly accounted for

$P_i$  binding by accelerating release from ADP- $P_i$  subunits through thermodynamic and kinetic linkage [5]. Labeled ADF/cofilin therefore serves as an effective marker to directly probe the nucleotide composition of individual actin filaments. TIRFM reveals that ADF/cofilin does not decorate filament barbed end segments, even at high ADF/cofilin concentration (Figure 3A, middle and bottom, and Movie S3), which we interpret as weak binding to ATP/ADP- $P_i$  cap at filament barbed ends (Figure 3A). We note that the filament is comprised predominantly of ADP- $P_i$  subunits at these actin concentrations and in the absence of ADF/cofilin (Figure 3A, top; [8, 9]), to which ADF/cofilin binds very weakly [5, 10]. ADF/cofilin must therefore accelerate  $P_i$  release from filaments, as reported for assays done with bulk filament populations [5], to decorate with such high efficiency (Figure 3A, middle and bottom). In addition, observation of multiple ADF/cofilin clusters along individual actin filaments favors a random ATP hydrolysis mechanism for filament subunits over a vectorial mechanism (Movie S1 and Movie S3).

Because the ATP/ADP- $P_i$  cap size can be limited both by slow ADF/cofilin binding [11, 12] and/or by the rate of  $P_i$  release, we investigated the variation in cap length as a function of ADF/cofilin and actin monomer concentrations. Statistical analysis reveals that the mean cap length depends on the ADF/cofilin concentration, reaching a minimum of 1.6  $\mu\text{m}$  at

was used to fit the experimental cap length data (Figures 3B and 3C and Supplemental Experimental Procedures). The ADF/cofilin concentration dependence of the cap length is well described by a model in which bound ADF/cofilin increases  $P_i$  release from ADP- $P_i$  subunits by an order of magnitude from 0.0019  $\text{s}^{-1}$  to 0.013  $\text{s}^{-1}$  (Figure 3B; [5]). The fit to the data, however, is significantly improved if acceleration of  $P_i$  release is propagated allosterically from ADF/cofilin-occupied sites to  $\geq 10$  vacant subunits along the filament (i.e., nonnearest neighbor effects), as predicted from long-range effects on filament subunit torsional dynamics [13].

The actin filament ATP/ADP- $P_i$  cap size (at a given actin concentration) is determined by the maximum  $P_i$  release rate constant, even though it is accelerated allosterically by ADF/cofilin binding. This behavior predicts that the cap length increases linearly with actin concentration and also with inclusion of  $P_i$  in the medium, as is observed (Figures 3C and 3D). Similarly, if filament barbed end elongation is stopped with capping protein, the ATP/ADP- $P_i$  cap disappears and ADF/cofilin decorates the entire filament (Figure S1D). Taken together, these results demonstrate that the ATP/ADP- $P_i$  cap length reflects a tight balance between filament elongation, random ATP hydrolysis, ADF/cofilin binding, and allosteric acceleration of  $P_i$  release from vacant filament subunits.

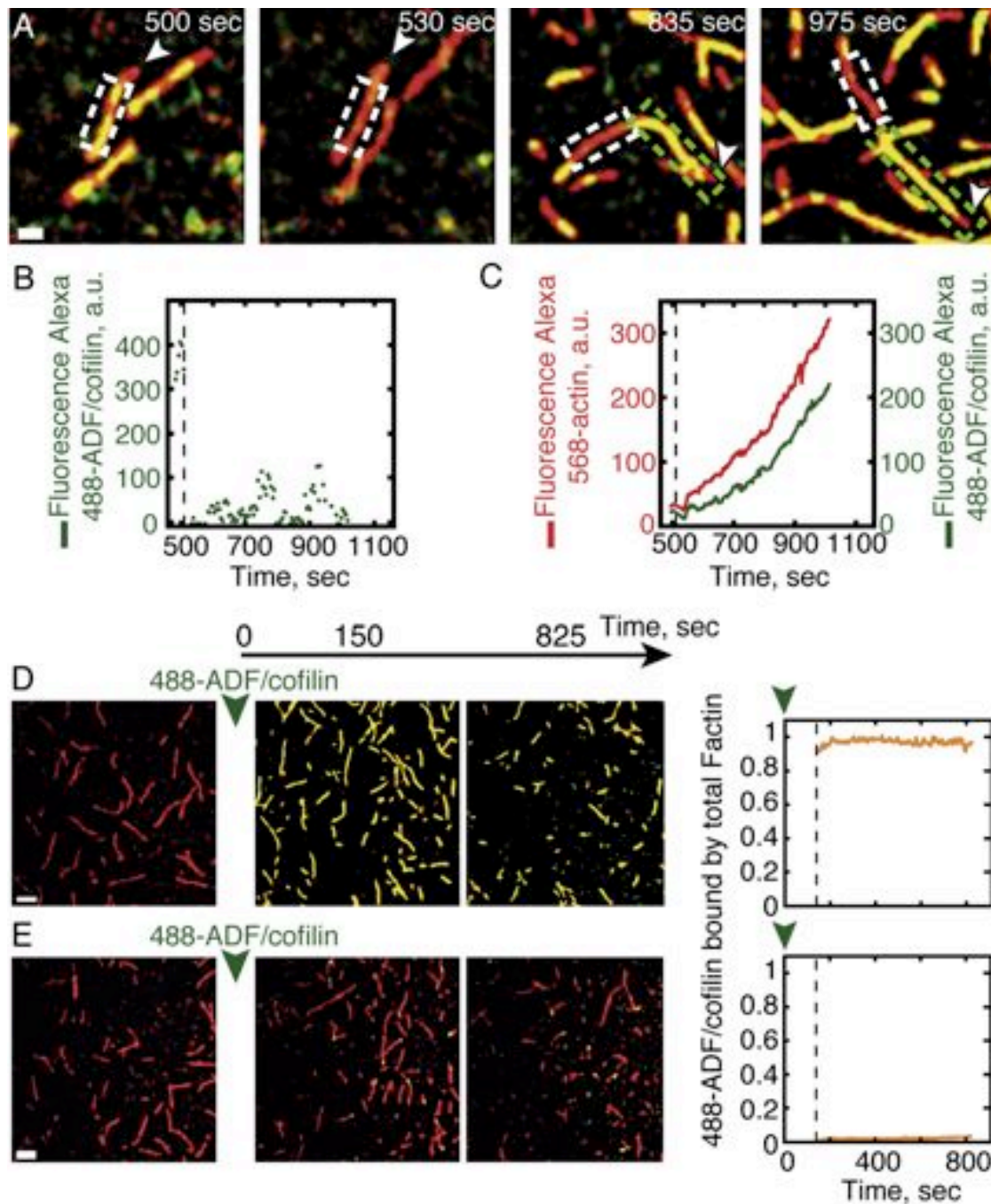


Figure 2. The ADF/Cofilin Turnover on Actin Filaments Is Limited by Its Slow Off-Rate Constant

The polymerization of 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa-568-actin monomers in the presence of 2.4  $\mu\text{M}$  profilin and 1.8  $\mu\text{M}$  Alexa-488-ADF/cofilin (A) or 2  $\mu\text{M}$  Alexa-488-ADF/cofilin (D) was followed by TIRFm. Fluorescence signals were colored as in Figure 1.

(A–C) FRAP assays were performed on Alexa-488-ADF/cofilin in interaction with growing actin filaments. After 500 s of actin polymerization, Alexa-488-ADF/cofilin fluorescence was bleached (dashed white box) and the fluorescence recovery was followed over a period of an additional 500 s of actin assembly (A). The actin filament was still elongating outside of the bleached box by its fast-growing barbed end (white arrowhead) and was decorated by Alexa-488-ADF/cofilin (green box, A). After photobleaching, the integrated Alexa-488-ADF/cofilin fluorescence over time in the bleached area (dashed white box) remained negligible compared to its initial value (B); however, in (C), the integrated fluorescence intensities of both Alexa-568-actin filaments and Alexa-488-ADF/cofilin outside the bleached area still increase over time (green box).

(D) Pulse-chase experiments. We added 2  $\mu\text{M}$  Alexa-488-ADF/cofilin to 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa-568-actin saturated with 2.4  $\mu\text{M}$  profilin after 3 min of polymerization. (E) Same as in (D), but actin polymerization occurred in the presence of 2  $\mu\text{M}$  unlabeled ADF/cofilin before addition of Alexa-488-ADF/cofilin. Time zero corresponds to the addition of 2  $\mu\text{M}$  Alexa-488-ADF/cofilin. The rightmost graphs show that the integrated fluorescence intensity of Alexa-488-ADF/cofilin bound along the bare actin filament (D) and along the actin filament preincubated with unlabeled-ADF/cofilin (E). Scale bars represent 2  $\mu\text{m}$  in (A) and 5  $\mu\text{m}$  in (D).

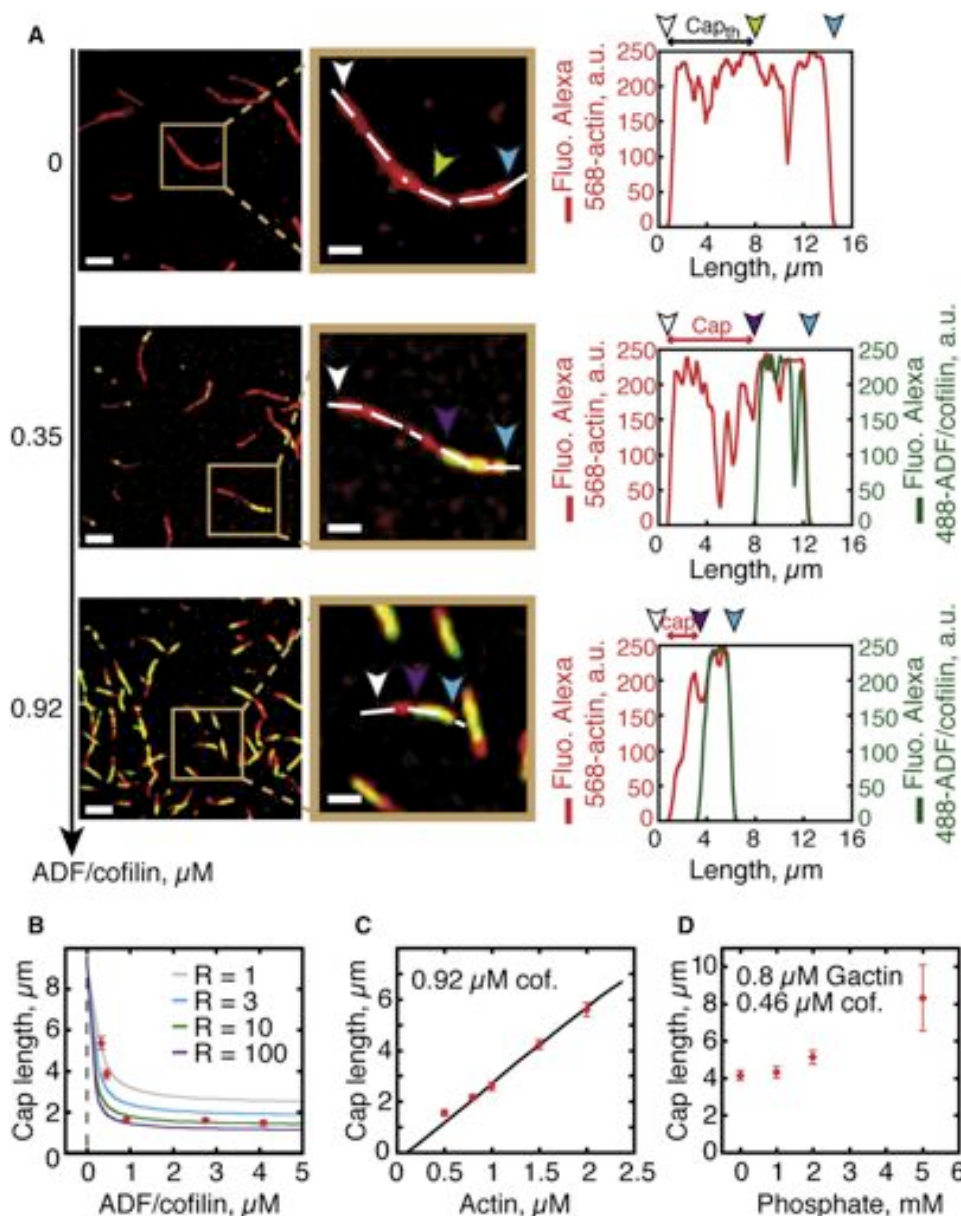


Figure 3. Tight Coupling between Binding and Effect on Nucleotide State of Actin Filaments Modulates ADF/Cofilin-Actin Interaction

(A) 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa-568-actin monomers were polymerized in the presence of 2.4  $\mu\text{M}$  profilin and ADF/cofilin, as indicated. TIRFM images were taken at 800 s. Fluorescence signals were colored as in Figure 1. The images in the middle column are zooms of the boxed areas in the left column. Arrowheads indicate pointed ends (blue), barbed ends (white), and the ATP/ADP- $P_i$  cap length (white to purple). In the absence of ADF/cofilin, the theoretical position of the interface between ADP- $P_i$  and ADP zones (green) was determined according to the slow phosphate release, whose half-life time is  $\sim 6$  min [5]. In the presence of ADF/cofilin, the cap length is determined by the absence of fluorescence in the green channel (middle and bottom). Graphs in the rightmost column quantified the fluorescence intensity of Alexa-568-actin and Alexa-488-ADF/cofilin along actin filament length, marked by a dashed line. Scale bars represent 5  $\mu\text{m}$  and 2  $\mu\text{m}$ , respectively, for the left and middle columns.

(B) Allosteric effect of ADF/cofilin on ATP/ADP- $P_i$  cap length. Experimental data (dots) were fitted by a kinetic model (lines, see Supplemental Experimental Procedures) as a function of Alexa-488-ADF/cofilin concentrations. We varied in the model the R value, which represents how  $P_i$  release is propagated allosterically from ADF/cofilin-occupied sites to 1 (gray), 3 (blue), 10 (green), or 100 (purple) vacant subunits along the filament.

(C) The experimental ATP/ADP- $P_i$  cap (dots) increases linearly with the concentration of actin monomers in solution, as predicted by the model (line).

(D) Variation of the ATP/ADP- $P_i$  cap length in the presence of an increasing concentration of inorganic phosphate in the medium.

Error bars in (B)–(D) represent the standard deviation of the cap length measured for each condition.

### Actin Filament Severing Occurs at Low ADF/Cofilin Binding Densities and Preferentially at Boundaries of Bare and ADF/Cofilin-Decorated Segments

Direct, real-time visualization of ADF/cofilin binding to actin filaments also permits evaluation of the sites of severing and identification of how they correlate with filament occupancy. Of

particular importance is identifying the site or sites of preferential filament fragmentation. That is, whether it occurs preferentially at junctions of bare and decorated regions [14] or internally within homogenous (bare or ADF/cofilin-decorated) segments.

ADF/cofilin binding alters the average structure [15, 16] and dynamics [7, 13, 17, 18] of actin filaments such that they are



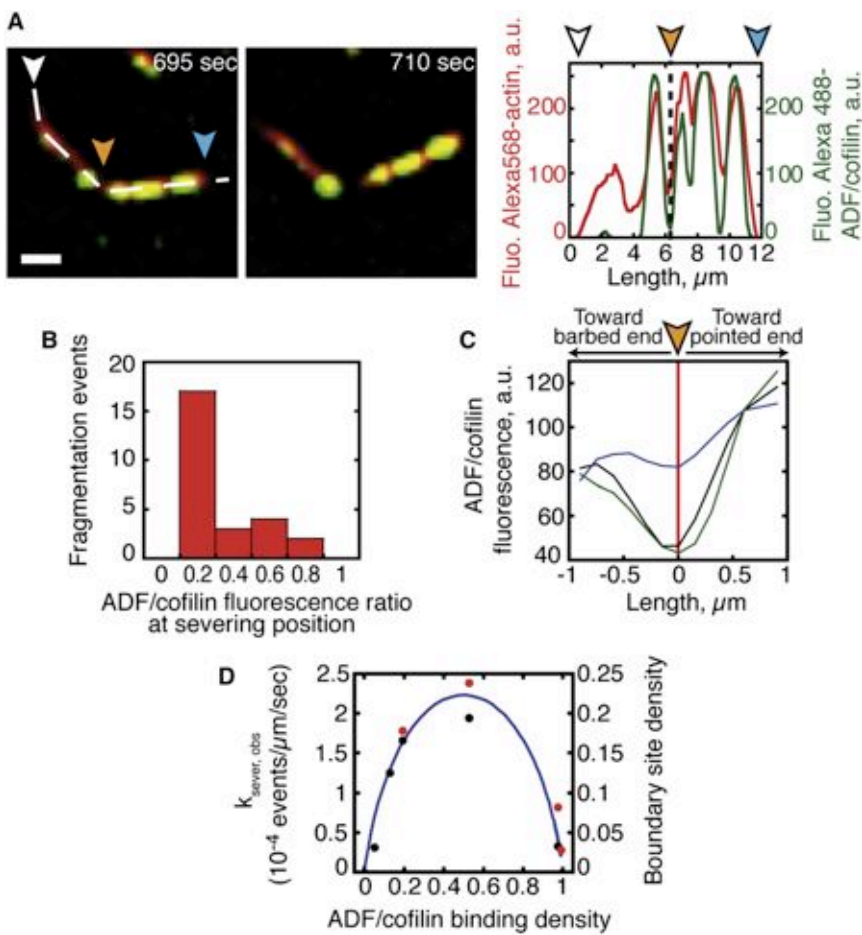


Figure 4. ADF/Cofilin Severing Occurs between Regions of Bare and ADF/Cofilin-Decorated Actin Filaments

(A) The polymerization of 0.5  $\mu\text{M}$  Alexa-568-actin monomers in the presence of 1.5  $\mu\text{M}$  profilin and 0.3  $\mu\text{M}$  Alexa-488-cofilin was followed by TIRFM. The distribution of Alexa-568-actin and Alexa-488-cofilin along the filament was quantified using line scans of their respective fluorescence (dashed line). Fluorescence signals were colored as in Figure 1. The arrowheads (orange) indicate the position of the actin filament's severing site, barbed end (white), and pointed end (blue). Scale bars represent 2  $\mu\text{m}$ .

(B) The histogram quantified the frequency of fragmentation events as a function of the ratio of Alexa-488-ADF/cofilin over actin filament.

(C) Statistics of the Alexa-488-ADF/cofilin fluorescence ratio, calculated as in (B), along fragmented filaments, which were centered on their fragmentation site (red line). The curves give the average of the fluorescence ratio ( $n = 28$ ) for 0.5  $\mu\text{M}$  (black), 0.9  $\mu\text{M}$  (blue), and 2.8  $\mu\text{M}$  Alexa-488-ADF/cofilin (green curve).

(D) ADF/cofilin severing activity (red dots for labeled ADF/cofilin and black dots for unlabeled ADF/cofilin) scales with the density of boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filament segments (solid line). The ADF/cofilin binding density (cofilins bound per actin subunit) and the fractional site density of boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated segments (solid line) were calculated from the Alexa-488-labeled ADF/cofilin or unlabeled ADF/cofilin binding parameters, determined in equilibrium binding measurements (Figure S1A; [20]). The boundary density reaches a maximum of  $\sim 22\%$  total sites at  $\sim 50\%$  filament occupancy.

more flexible than native filaments (Figure S2A and [18, 19]). It is hypothesized that shear stress associated with thermal-induced fluctuations accumulates locally at boundaries of mechanical asymmetry, thereby leading to preferential severing at junctions of bare and decorated filament segments [3, 12, 14, 19, 20].

To test the prediction of preferential severing at boundaries of bare and decorated segments, we quantified the severing events occurring during spontaneous assembly of ATP-actin filaments. Line scans of fluorescence intensity along actin filaments reveal that fragmentation is statistically favored at sites of low ADF/cofilin binding density and occurs exclusively outside the ATP/ADP- $P_i$  cap (Figures 4A–4C). Note that severing is not obligatory with ADF/cofilin binding, but the frequency of severing events correlates with the position (Figures 4A and 4B) and density (Figure 4D) of bare and ADF/cofilin-decorated boundaries, consistent with preferential severing at or near these boundaries on filaments (Movie S4).

### Concluding Remarks

#### ADF/Cofilin Modulates the Nucleotide Composition of Growing Actin Filaments

The age and stability of actin filaments is linked to the chemical state of the bound adenine nucleotide. ATP bound to monomers is rapidly hydrolyzed after incorporation into filaments such that freshly polymerized filaments are comprised of

subunits with bound ATP or ADP- $P_i$ , whereas older filament subunits release  $P_i$  slowly and have bound ADP. The actin-binding activities of many actin-binding proteins (ABPs) including ADF/cofilin are sensitive to the chemical state of the actin-bound nucleotide, so the filament nucleotide composition dramatically influences the organization, stability, and dynamics of cellular actin-based structures.

ADF/cofilin ages filaments by accelerating  $P_i$  release over an order of magnitude. This effect is allosteric and propagates to distal sites unoccupied by ADF/cofilin, presumably through allosteric modulation of filament twist and dynamics [13, 21, 22]. Therefore, a kinetic competition between monomer addition, intrinsic random ATP hydrolysis [23] and  $P_i$  release [5], ADF/cofilin binding [5, 11, 12], and allosteric ADF/cofilin-mediated acceleration of  $P_i$  release (Figure 3B) exists during assembly and network growth.

$P_i$  release, though accelerated allosterically by ADF/cofilin, remains considerably slower than filament elongation (up to 500 subunits  $\text{s}^{-1}$ ) at high in vivo actin concentrations, which yields a large filament ATP/ADP- $P_i$  cap ( $\sim 100 \mu\text{m}$  in length) that precludes ADF/cofilin binding and severing. Even if the  $P_i$  release is faster for yeast actin [24], this behavior is difficult to reconcile with the observation that ADF/cofilin binds growing cellular filaments only 0.2–1  $\mu\text{m}$  away from their nucleation sites [25–27]. We favor a mechanism in which filament barbed ends must be rapidly capped (to stop rapid elongation) for significant ADF/cofilin binding to occur. Such a mechanism

would account for colocalization of ADF/cofilin and capping protein in actin networks [26] and modulation of ADF/cofilin severing efficiency by capping protein. Subsequent ADF/cofilin binding to stochastically emerging ADP subunits of capped filaments allosterically accelerates  $P_i$  release, thereby promoting Arp2/3 complex dissociation [10] and network remodeling. Therefore, although ADF/cofilin-mediated acceleration of  $P_i$  release minimally affects the ATP/ADP- $P_i$  cap length of rapidly elongating filaments in vivo, it rapidly ages filaments and networks by allosterically accelerating  $P_i$  release once they are capped and stop elongating.

#### **ADF/Cofilin Preferentially Severs ADP-Actin Filaments at Boundaries of Bare and Cofilin-Decorated Segments**

Quantitative analysis of filament binding [5, 9, 11, 12, 20, 28] and severing [3, 29, 30] indicates that ADF/cofilin severing activity scales with the density of boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filament segments [14]. It has been hypothesized that asymmetry originating from discontinuities in filament topology and mechanics (i.e., bending and twisting elasticity) generates a local accumulation of shear stress [19], thereby leading to preferential fragmentation at or near these boundaries [14]. This hypothesis relies on three important observations: (1) severing occurs at low ADF/cofilin binding densities and small cluster sizes [20, 29, 30]; (2) cofilin-decorated filaments display significantly different mechanical properties from bare filaments [13, 18, 19]; (3) partially ADF/cofilin-decorated filaments are considerably less stable than bare or ADF/cofilin-saturated filaments [21, 22].

The prediction that ADF/cofilin-mediated severing occurs at bare and decorated boundaries lacks direct proof and is best evaluated by direct, real-time visualization of ADF/cofilin binding and filament severing, as performed in this study. Severing is not obligatory with ADF/cofilin binding, but the frequency of severing events scales with the boundary density and also occurs at or near these boundaries. These observations lend credence to the hypothesis that shear stress accumulates at a mechanical asymmetry presented at boundaries of bare and ADF/cofilin-decorated filament segments, thereby promoting severing. A challenge for future investigations will be to determine how other actin-binding proteins, including coronin and AiP1 [31], modulate this mechanism to promote actin disassembly.

#### **Supplemental Information**

Supplemental Information includes two figures, Supplemental Experimental Procedures, one table, and four movies and can be found with this article online at [doi:10.1016/j.cub.2011.03.064](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.064).

#### **Acknowledgments**

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche to J.-L.M. and L.B. (ANR-08-BLANC-0022 and ANR-08-SYSC-013), the American Heart Association (0940075N awarded to E.M.D.L.C.), the National Institutes of Health (GM071688 and GM071688-03S1 awarded to E.M.D.L.C.), and the Institute of Complex Systems XXI, Rhône-Alpes (awarded to J.-L.M.). E.M.D.L.C. is an American Heart Association Established Investigator, an NSF-CAREER Award recipient (MCB-0546353), and a Hellman Family Fellow. We thank Pekka Lappalainen and Bruce Goode for the ADF/cofilin D34C, C62A construct.

Received: January 28, 2011  
Revised: March 9, 2011  
Accepted: March 24, 2011  
Published online: April 28, 2011

#### **References**

- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 545–576.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401, 613–616.
- Michelot, A., Berro, J., Guérin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., and Blanchoin, L. (2007). Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr. Biol.* 17, 825–833.
- Lappalainen, P., Fedorov, E.V., Fedorov, A.A., Almo, S.C., and Drubin, D.G. (1997). Essential functions and actin-binding surfaces of yeast cofilin revealed by systematic mutagenesis. *EMBO J.* 16, 5520–5530.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 274, 15538–15546.
- Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R.A. (2010). A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* 20, 423–428.
- Bobkov, A.A., Muhrad, A., Kokabi, K., Vorobiev, S., Almo, S.C., and Reisler, E. (2002). Structural effects of cofilin on longitudinal contacts in F-actin. *J. Mol. Biol.* 323, 739–750.
- Vavylonis, D., Yang, Q., and O’Shaughnessy, B. (2005). Actin polymerization kinetics, cap structure, and fluctuations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8543–8548.
- Roland, J., Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., and Martiel, J.L. (2008). Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.* 94, 2082–2094.
- Chan, C., Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2009). Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr. Biol.* 19, 537–545.
- Cao, W., Goodarzi, J.P., and De La Cruz, E.M. (2006). Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* 361, 257–267.
- De La Cruz, E.M., and Sept, D. (2010). The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament. *Biophys. J.* 98, 1893–1901.
- Prochniewicz, E., Janson, N., Thomas, D.D., and De la Cruz, E.M. (2005). Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J. Mol. Biol.* 353, 990–1000.
- De La Cruz, E.M. (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* 1, 51–59.
- McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138, 771–781.
- Galkin, V.E., Orlova, A., Lukyanova, N., Wriggers, W., and Egelman, E.H. (2001). Actin depolymerizing factor stabilizes an existing state of F-actin and can change the tilt of F-actin subunits. *J. Cell Biol.* 153, 75–86.
- Muhrad, A., Kudryashov, D., Michael Peyser, Y., Bobkov, A.A., Almo, S.C., and Reisler, E. (2004). Cofilin induced conformational changes in F-actin expose subdomain 2 to proteolysis. *J. Mol. Biol.* 342, 1559–1567.
- Pfaendtner, J., De La Cruz, E.M., and Voth, G.A. (2010). Actin filament remodeling by actin depolymerization factor/cofilin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 7299–7304.
- McCullough, B.R., Blanchoin, L., Martiel, J.L., and De la Cruz, E.M. (2008). Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: Implications for severing and cell mechanics. *J. Mol. Biol.* 381, 550–558.
- De La Cruz, E.M. (2005). Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: Isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* 346, 557–564.
- Bobkov, A.A., Muhrad, A., Pavlov, D.A., Kokabi, K., Yilmaz, A., and Reisler, E. (2006). Cooperative effects of cofilin (ADF) on actin structure suggest allosteric mechanism of cofilin function. *J. Mol. Biol.* 356, 325–334.
- Dedova, I.V., Nikolaeva, O.P., Safer, D., De La Cruz, E.M., and dos Remedios, C.G. (2006). Thymosin beta4 induces a conformational change in actin monomers. *Biophys. J.* 90, 985–992.

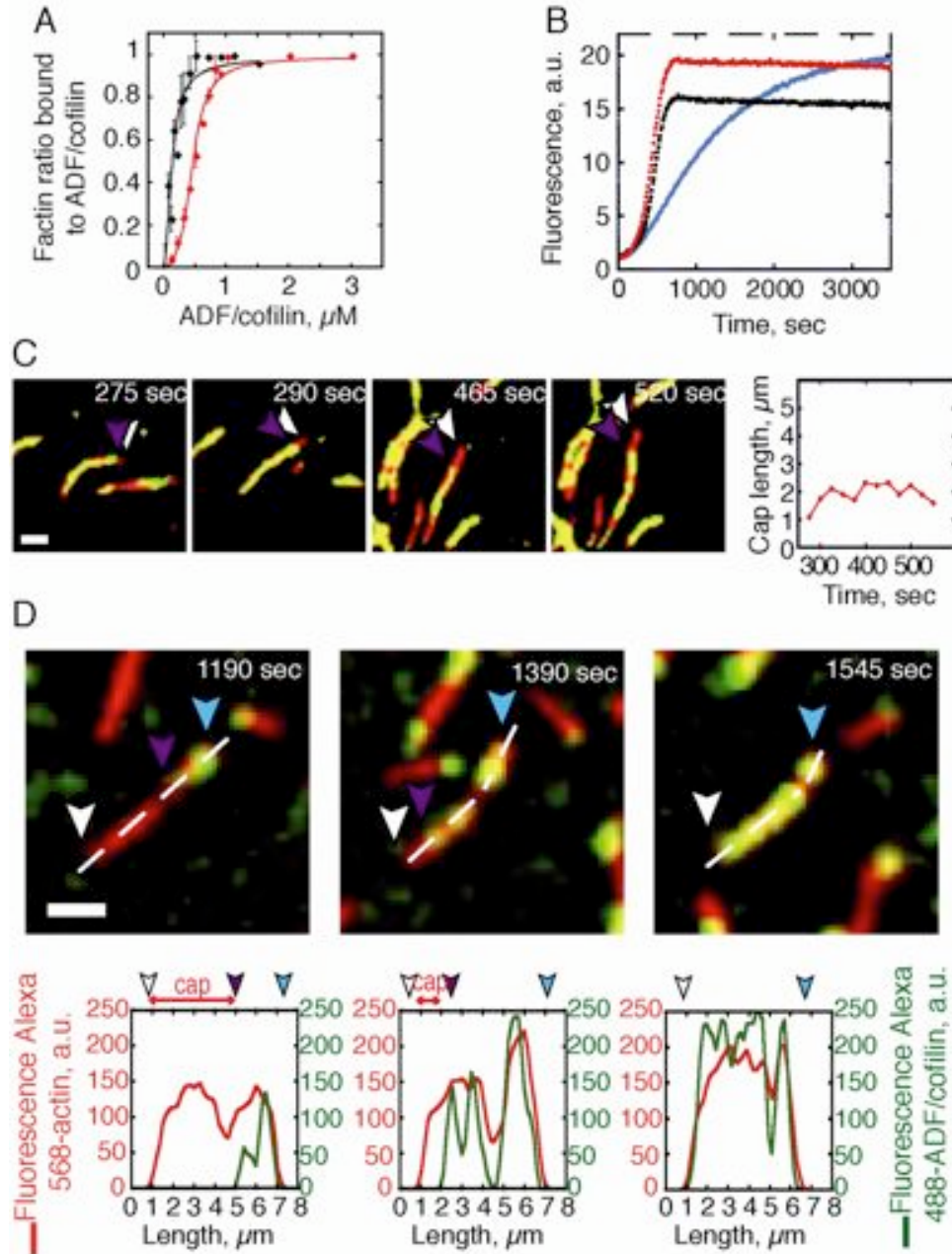
23. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* *41*, 597–602.
24. Ti, S.C., and Pollard, T.D. (2011). Purification of actin from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of functional differences from muscle actin. *J. Biol. Chem.* *286*, 5784–5792.
25. Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* *145*, 1009–1026.
26. Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* *17*, 395–406.
27. Okreglak, V., and Drubin, D.G. (2007). Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J. Cell Biol.* *178*, 1251–1264.
28. Ressad, F., Didry, D., Xia, G.X., Hong, Y., Chua, N.H., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1998). Kinetic analysis of the interaction of actin-depolymerizing factor (ADF)/cofilin with G- and F-actins. Comparison of plant and human ADFs and effect of phosphorylation. *J. Biol. Chem.* *273*, 20894–20902.
29. Andrianantoandro, E., and Pollard, T.D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol. Cell* *24*, 13–23.
30. Pavlov, D., Muhlrad, A., Cooper, J., Wear, M., and Reisler, E. (2007). Actin filament severing by cofilin. *J. Mol. Biol.* *365*, 1350–1358.
31. Kueh, H.Y., Charas, G.T., Mitchison, T.J., and Brieher, W.M. (2008). Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J. Cell Biol.* *182*, 341–353.

**Current Biology, Volume 21**

**Supplemental Information**

**Cofilin Tunes the Nucleotide State  
of Actin Filaments and Severs at Bare  
and Decorated Segment Boundaries**

Cristian Suarez, Jérémy Roland, Rajaa Boujemaa-Paterski, Hyeran Kang,  
Brannon R. McCullough, Anne-Cécile Reymann, Christophe Guérin, Jean-Louis Martiel,  
Enrique M. De La Cruz, and Laurent Blanchoin



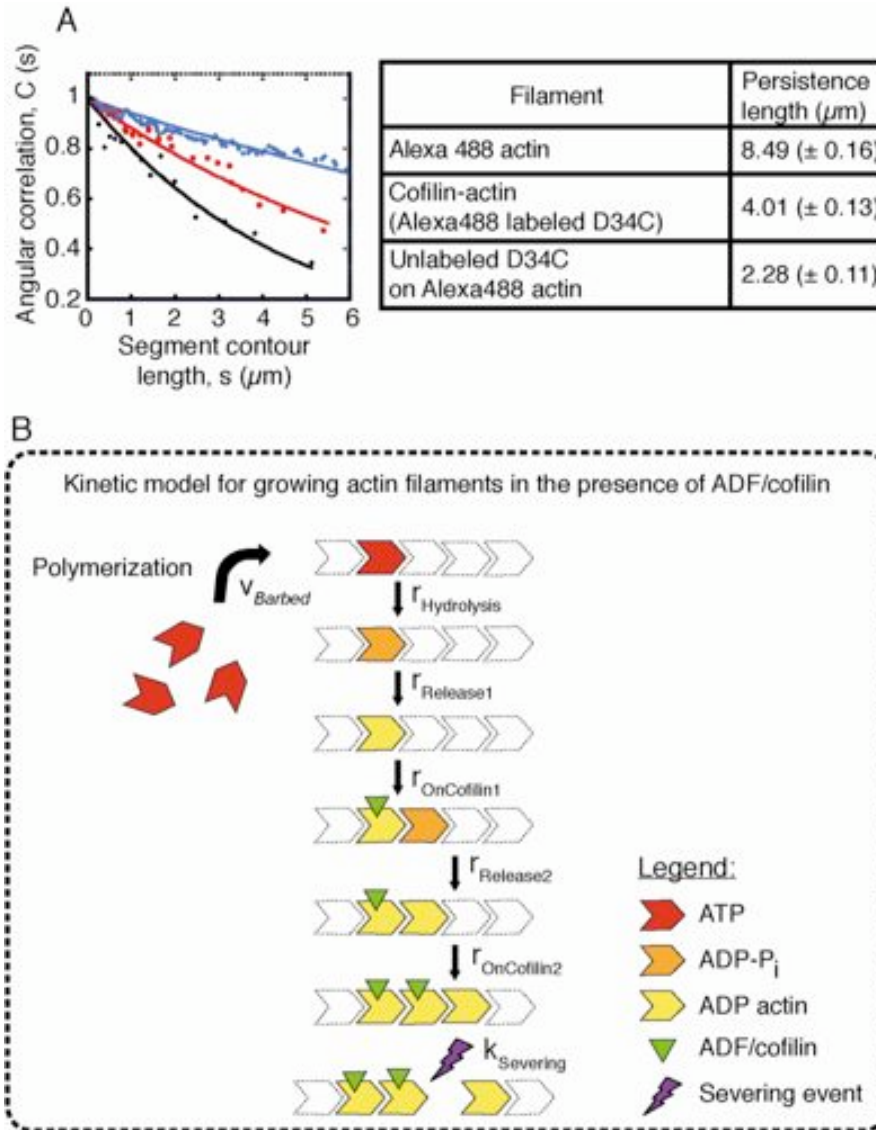
**Figure S1. (Related to Figures 1 and 3)**

(A) Labeled D34C ADF/cofilin retains strong actin filament binding. Fluorescence quenching of 300 nM pyrenyl-labeled-actin filaments by unlabeled (black dots) or Alexa488-labeled (red dots) D34C-ADF/cofilin. The solid lines through the data represent the best fits to cooperative (red) and non cooperative (black) binding models (see Methods). The apparent affinity of unlabeled D34C is  $\leq 300$  nM. The isolated sites binding constant and cooperativity parameter ( $\omega$ ) of fluorescent D34C ADF/cofilin binding is  $6.0 \pm 1.4$   $\mu\text{M}$  and  $12.1 \pm 2.8$   $\mu\text{M}$ , respectively. Error bars represent the standard deviation of the F-actin ratios bound to ADF/cofilin measured for each ADF/cofilin concentration.

(B) Labeled D34C ADF/cofilin retains strong acceleration of spontaneous actin assembly activities. Fluorescence assay of the time course of 3  $\mu\text{M}$  pyrenyl-labeled actin polymerization in absence (blue curve), and in presence of 1  $\mu\text{M}$  unlabeled D34C-cofilin (black curve) or 1  $\mu\text{M}$  Alexa-488-D34C-ADF/cofilin (red curve).

(C) Distribution of ATP/ADP-P<sub>i</sub> cap length at high ADF/cofilin concentration on growing actin filaments. In a polymerizing solution containing 0.8  $\mu\text{M}$  Alexa-568-actin monomers and 2.4  $\mu\text{M}$  profilin, ATP/ADP-P<sub>i</sub> cap lengths were measured for individual growing actin filament in presence of 2.8  $\mu\text{M}$  Alexa-488-ADF/cofilin over time (right panel). Polymerization was followed by TIRFM. Alexa-568-actin filaments were colorized in red, Alexa-488-ADF/cofilin in green, and the decorated portions of filaments were yellow in the merged images. Arrowheads indicate pointed ends (blue), barbed ends (white), and the ATP/ADP-P<sub>i</sub> "cap" length (white to purple).. Scale bars represented 2  $\mu\text{m}$ .

(D) In the presence of ADF/cofilin, capping protein blocks the elongation of barbed end resulting in the decrease of the ATP/ADP-P<sub>i</sub> cap length to zero. Actin filament polymerizing was followed by TIRFM in a solution containing 0.5  $\mu\text{M}$  Alexa-568-actin monomers, 1.5  $\mu\text{M}$  profilin, 0.45  $\mu\text{M}$  Alexa-488-cofilin, and 5 nM capping protein. Alexa-568-actin filaments were colorized in red, Alexa-488-ADF/cofilin in green, and the decorated portions of filaments were yellow in the merged images. White arrowheads indicate the fast growing barbed ends of filaments, blue ones the pointed end. The ATP/ADP-P<sub>i</sub> cap length was measured between the white and purple arrowhead, which indicated the boundary at the interface of bare and ADF/cofilin-decorated filament. Graphs in the bottom panels quantified the fluorescence intensity of Alexa-568-actin and Alexa-488-ADF/cofilin along actin filament length marked by a dashed line. The scale bar represents 2  $\mu\text{m}$ .



**Figure S2. (Related to Figure 4)**

(A) Bending stiffness of D34C-decorated actin filaments. Bending flexibility of actin filaments and D34C yeast ADF/cofilin-decorated actin filaments is determined by measuring the average angular cosine correlation in two dimensions (2D). Filament average angular cosine correlation data ( $n > 200$  filaments) are represented as data points. Lines represent the best fit to the 2D cosine correlation function yielding the persistence lengths for each filament (see right panel).

(B) Schematic of the molecule-based stochastic model for severing of growing filaments. The stochastic model incorporates polymerization (rate  $v_{\text{Barbed}}$ ) of actin monomers at barbed end. We assume ATP hydrolysis is random (rate  $r_{\text{Hydrolysis}}$ ). It is followed by random phosphate release at either a classical rate ( $r_{\text{Release1}}$ ) or an accelerated one ( $r_{\text{Release2}}$ ), due to the presence of an ADF/cofilin molecule nearby on the filament. ADF/cofilin preferentially binds to ADP-actin subunits (rate  $r_{\text{OnCofilin1}}$ ). The ADF/cofilin binding increases if the association occurs on an actin subunit adjacent to one with bound ADF/cofilin ( $r_{\text{OnCofilin2}}$ ). The filament is ultimately severed at boundaries between bare and ADF/cofilin-decorated filaments (rate  $k_{\text{Severing}}$ ) and the fragment discarded.

## Supplemental Experimental Procedures

### Plasmid Construction

D34C, C62A mutations were introduced on COF1 *S. cerevisiae* cofilin gene by oligonucleotide-based mutagenesis as previously described [1].

### Protein Purification and Labeling

*S. cerevisiae* profilin was overexpressed and purified from *Escherichia coli* [2]. Actin was purified from rabbit skeletal muscle [3] and gel filtered [4]. Actin was labeled on Cys374 with pyrenylodoacetamide [5] or on lysines with Alexa-568 fluorophore [6]. D34C mutant *S. cerevisiae* ADF/cofilin was expressed in *Escherichia coli* strain Rosetta2(DE3)pLysS and purified [1]. The D34C mutant ADF/cofilin was then labeled on Cys34 with Alexa-488 C5 Maleimide as follow: ADF/cofilin was dialysed in 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM TCEP, incubated with 8 excess of Alexa-488 C5 Maleimide for two hours at 4°C, and separated on a Sephadex G-25 gel filtration column. Labeled ADF/cofilin was flash frozen in liquid nitrogen and stored in buffer 10 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM DTT at -80°C. Mouse capping protein,  $\alpha\beta$  CP, was purified according to Falk et al. [7].

### Fluorescence Assays

G-actin (10% pyrene labeled) was polymerized at room temperature in the presence or absence of ADF/cofilin D34C, in a buffer containing 2 mM Tris pH 8, 50 mM KCl, 10 mM imidazole, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 0.2 mM ATP, 0.5mM DTT, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub> and 0.1 mM NaAzide. The polymerization was followed by changes in pyrene fluorescence using a Xenius SAFAS (Safas, Monaco).

### ADF/Cofilin Binding Density Measurement

It was calculated from quenching of pyrene actin fluorescence [8]. The isolated site binding affinity and cooperativity parameter ( $\omega$ ) for fluorescent D34C ADF/cofilin were determined by non-linear least square fitting to the one dimensional lattice binding with cooperative nearest neighbor interactions [8]. The apparent binding constant of unlabeled D34C ADF/cofilin was too tight to evaluate cooperativity, so the data was fitted to the quadratic expression for stoichiometric and non cooperative binding

### TIRF Microscopy Assays

Proteins blend were diluted in fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl (pH 7.8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM DTT, 3 mg/ml glucose, 20  $\mu$ g/ml catalase, 100  $\mu$ g/ml glucose oxidase, and 0.5% methylcellulose to induce polymerization and were imaged at 5 seconds intervals on an objective-based TIRF microscope (Nikon TE2000E). Metamorph software (version.6.3r7; Universal Imaging, Media, PA) was used for image acquisition and analysis.

### Data Analysis

Images were treated using Metamorph software V6.3r7, with a basic filter, a flatten background and an equalize light. Matlab software was used to decrease the Alexa 488-ADF/cofilin fluorescence background in Figure S1C. Plots and fits were realized with Kaleidagraph V4.01 software (Synergy Software, Reading, PA).



## Sample Preparation for Actin Filament Bending Rigidity Measurements

Ca-ATP actin monomers were exchanged into Mg-ATP actin monomers by simultaneously adding 0.2 mM EGTA and an amount of MgCl<sub>2</sub> equal to 1 molar of G-actin plus 10 μM excess, then polymerized with 10 X KMEI<sub>6.6</sub> buffer (50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM K<sup>+</sup>-EGTA, 2 mM DTT, 0.2 mM ATP, 10 mM imidazole, pH 6.6). Cofilactin filaments were formed by adding 1-2 μM of unlabeled or Alexa-488 or 568 labeled D34C cofilin to 1 μM of polymerized actin (either Alexa-488 labeled or unlabeled) and equilibrated for 1 min in KMEI<sub>6.6</sub> buffer at room temperature. Equilibrated cofilactin filaments were rapidly diluted by 5 folds in 1X KMEI<sub>6.6</sub> buffer supplemented with 20 μg/ mL catalase, 100 μg/ mL glucose oxidase and 10 mM glucose, and applied onto poly-L-lysine slides. The dilution buffer also contained free unlabeled cofilin at a concentration to ensure fully decorated cofilactin filaments, i.e., the cofilin binding density kept near unity.

## Image Analysis and Bending Rigidity Measurement

Fluorescent images of actin and cofilactin filaments adsorbed to poly-L-lysine slides were acquired for 100 ms using a Nikon Eclipse TE300 microscope equipped with a Coolsnap HQ cooled CCD camera (Roper Scientific, Tucson, AZ) and Metamorph image acquisition software (Molecular Devices, Downingtown, PA). This method yields essentially identical actin persistence lengths as those obtained from images of thermally fluctuating filaments. Digital images were processed and skeletonized using ImageJ software. Filaments longer than 10 pixels (1 pixel = 0.18 μm) were automatically detected and reconstructed with an average third-order Bezier spline to increase resolution of filament curvature using Matlab software (The Mathworks Inc., Natick, MA).

The persistence lengths ( $L_p$ ) of actin and cofilactin filaments were calculated from digitized filament images (20 images,  $n \geq 200$  filaments for each data set), by fitting the 2D average cosine correlation function  $\langle C(s) \rangle$  to the average cosine of correlated tangential angles ( $\theta$ ) along filament segment lengths ( $s$ ) [6]:

$$\langle C(s) \rangle = \langle \cos \theta(s) \rangle = \langle \cos \theta(0) \rangle \exp \left( -\frac{s}{2L_p} \right) \quad (1)$$

## Kinetic Model for Filament Elongation, ADF/Cofilin Association and Severing

We used an exact, one-dimensional, representation of an actin filament (Figure S2B) to predict (i) the filament size, (ii) the nucleotide state and (iii) the distribution of bound ADF/cofilin molecules (see [9] for a discussion of the model assumptions and its physical properties).

The presence of profilin in the bulk limits spontaneous filament nucleation and prevents elongation at the filament's pointed end. Therefore, polymerization occurs at the filament's barbed end only with a constant velocity  $v_{Barbed}$  (Figure S2B and Table S1). The hydrolysis of ATP (rate:  $r_{Hydrolysis}$ ) and the release of inorganic phosphate (rate:  $r_{Release}$ ) are supposed random and independent of the subunit position in the filament [10, 11]. The binding of ADF/cofilin accelerates the phosphate release of the  $R$  ( $R$  is an integer) nearest subunits flanking an ADF/cofilin bound to a particular subunit [12]. To accurately fit our experimental data with our kinetic model the two only adjustable parameters used are  $R$  and the rate of phosphate release in presence of ADF/cofilin (see Table S1). To account for the cooperativity of ADF/cofilin binding to ADP-actin subunits ([13] and Figure S1A and Figure 4D), we consider that:

- ADF/cofilin can bind directly to a vacant, isolated filament subunit (i.e. no bound nearest neighbors) with a rate equal to  $r_{OnCofilin1}$  [14-16];
- the association of a ADF/cofilin facilitates the binding of a second ADF/cofilin molecule on the nearest subunit on the same or the opposite strands in the actin filament (rate:  $r_{OnCofilin2}$ );
- the dissociation rate constant of one ADF/cofilin molecule from a particular actin subunit is independent of the state of the next subunits (rate:  $k_{OffCofilin}$ ).

Finally, actin filament severing occurs preferentially (i.e. with higher frequency) at the interface between bare and ADF/cofilin decorated actin filament segments (rate:  $k_{Severing}$ ), thereby generating two filaments free barbed and pointed ends (Figure S2B).

We use the Gillespie algorithm to simulate the set of coupled reactions and the subunit state as illustrated in Figure S2B [17, 18]. Filament structure (size, nucleotide state and density of bound ADF/cofilin molecules) is determined by averaging a large number of independent runs (corresponding to 1,000 filaments) over a long period of time (2,000 s.). The *ATP-ADP-P<sub>i</sub>* cap is defined as the filament region where the averaged probability to find an *ATP-ADP-P<sub>i</sub>* subunit is greater than 50% (Figures 3C and 3D). Similarly, the averaged distribution of ADF/cofilin bound actin subunits is used to determine the density of boundaries between decorated and non-decorated regions of the actin filament (Figure 4D).

**Table S1. Parameters Used in the Kinetic Model**

Parameter	Symbol	Expression	Numerical value	Reference
Barbed end elongation rate	$k_{OnB}$		$11.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	[10]
ATP hydrolysis	$r_{Hydrolysis}$		$0.35 \text{ s}^{-1}$	[19]
P <sub>i</sub> release	$r_{Release1}$		$1.9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	[20]
P <sub>i</sub> release	$r_{Release2}$		$1.3 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$	This study
Range of Pi release acceleration	R		1 to 100	This study
ADF/cofilin association rate	$k_{OnCofilin1}$		$3 \times 10^{-2} \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	This study
ADF/cofilin association rate	$k_{OnCofilin2}$		$0.24 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	This study
ADF/cofilin dissociation rate	$k_{OffCofilin}$		$10^{-2} \text{ s}^{-1}$	This study
Actin monomer concentration	[Actin]		0 to 2.5 $\mu\text{M}$	This study
ADF/cofilin concentration	[Cofilin]		0 to 4 $\mu\text{M}$	This study
Polymerization velocity	$v_{Barbed}$	$k_{OnB}[\text{Actin}]$		
ADF/cofilin association	$r_{OnCofilin1}$	$k_{OnCofilin1}[\text{Cof.}]$		
ADF/cofilin association	$r_{OnCofilin2}$	$k_{OnCofilin2}[\text{Cof.}]$		
Severing rate	$k_{Severing}$		$10^{-5} \text{ s}^{-1}\text{Subunit}^{-1}$	This study

## Supplemental References

- S1. Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* **388**, 78-82.
- S2. Eads, J.C., Mahoney, N.M., Vorobiev, S., Bresnick, A.R., Wen, K.K., Rubenstein, P.A., Haarer, B.K., and Almo, S.C. (1998). Structure determination and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* profilin. *Biochemistry* **37**, 11171-11181.
- S3. Spudich, J.A., and Watt, S. (1971). The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J. Biol. Chem.* **246**, 4866-4871.
- S4. MacLean-Fletcher, S., and Pollard, T.D. (1980). Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* **20**, 329-341.
- S5. Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (1984). Quantitative analysis of the effect of *Acanthamoeba* profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry* **23**, 6631-6641.
- S6. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem* **270**, 11437-11444.
- S7. Falck, S., Paavilainen, V.O., Wear, M.A., Grossmann, J.G., Cooper, J.A., and Lappalainen, P. (2004). Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *Embo J.* **23**, 3010-3019.
- S8. De La Cruz, E.M. (2005). Cofilin binding to muscle and non-muscle actin filaments: isoform-dependent cooperative interactions. *J. Mol. Biol.* **346**, 557-564.
- S9. Roland, J., Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., and Martiel, J.L. (2008). Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys. J.* **94**, 2082-2094.
- S10. Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* **103**, 2747-2754.
- S11. Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465.
- S12. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* **274**, 15538-15546.
- S13. De La Cruz, E.M. (2009). How cofilin severs an actin filament. *Biophys. Rev.* **1**, 51-59.
- S14. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of *Acanthamoeba* actophorin (ADF/cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* **274**, 15538-15546.
- S15. Cao, W., Goodarzi, J.P., and De La Cruz, E.M. (2006). Energetics and kinetics of cooperative cofilin-actin filament interactions. *J. Mol. Biol.* **361**, 257-267.
- S16. Ressad, F., Didry, D., Xia, G.-X., Hong, Y., Chua, N.-H., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (1998). Kinetics Analysis of the Interaction of Actin-depolymerizing Factor ADF/Cofilin with G- and F-actins. *J. Biol. Chem.* **273**, 20894-20902.
- S17. Gillespie, D.T. (1997). Exact Stochastic Simulation of Coupled Reactions. *J. Phys. Chem.* **81**, 2340-2361.
- S18. Gillespie, D.T. (2007). Stochastic simulation of chemical kinetics. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 35-55.
- S19. Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (2002). Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry* **41**, 597-602.
- S20. Melki, R., Fievez, S., and Carlier, M.F. (1996). Continuous monitoring of Pi release following nucleotide hydrolysis in actin or tubulin assembly using 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside and purine-nucleoside phosphorylase as an enzyme-linked assay. *Biochemistry* **35**, 12038-12045.

## **Article 4**

#### Article 4. Reymann, Nature Materials, 2010

Avec l'article 4 (ma seconde étude véritablement personnelle), nous publions le premier article combinant la technique innovatrice de "micropatterning" de surface à l'aide de lumière UV et une polymérisation d'actine *in vitro* ainsi spatialement contrôlée. Précédemment, en système biomimétique lié à l'actine, le paramètre géométrique était difficilement modulable. Les expériences se faisaient principalement à l'aide d'objets nucléateurs de géométrie simple et pour la plupart sphériques (bille ou goutte, baguette) ou simplement en solution. C'est pourquoi répondre à la question, d'un éventuel contrôle de l'architecture et des propriétés d'un réseau d'actine, via la géométrie de nucléation, n'était pas expérimentalement possible. De manière significative, nous montrons ici que les filaments d'actine assemblés sur ces zones nucléatrices adoptent une organisation collective reproductible. Cela nous a permis de montrer que **des barrières géométriques, semblables à celles rencontrées dans les cellules, peuvent influencer la formation dynamique de réseaux d'ordre important et ainsi contrôler la localisation de production de force.**

Le procédé de fabrication de micro patrons à l'aide de lumière UV repose sur une fonctionnalisation de surface qui est localement soit hydrophobe soit hydrophile. Pour ce faire une lamelle de verre est dans un premier temps entièrement recouverte de polylysine-L-g-polyéthylèneglycol (PLL-PEG) créant ainsi une surface hydrophobe donc non adhésive pour la majorité des protéines. Ces lamelles sont ensuite insolées localement aux UV profonds (200 nm de longueur d'onde) à travers un masque de chrome. La présence de lumière UV au niveau des zones géométriques transparentes du masque induit une destruction de la couche de PLL-PEG, permettant l'absorption des protéines sur ce que l'on appelle usuellement des "micropatterns" (figure 1a). Ainsi la disposition et la géométrie des zones de présence de diverses protéines peuvent être contrôlées de manière reproductible et fiable sur une échelle de l'ordre du micromètre. Afin d'engendrer localement la nucléation de filaments d'actine, un peptide activateur du complexe Arp2/3, pWA est adsorbé sur ces "micropatterns". L'ajout d'une solution protéique composée essentiellement d'actine monomérique, de profiline et du complexe Arp2/3, permet alors une polymérisation rapide et importante au niveau des zones pWA y générant un réseau dense et enchevêtré de filaments branchés (figure 1b). De manière collective les filaments s'échappant de cette zone nucléatrice s'organisent spontanément perpendiculairement au bord du pattern avec une orientation bien définie (figure 1c et d). En effet, diverses expériences (FRAP ou double couleur, c'est à dire un ajout séquentiel d'actine marquée à l'aide de deux fluorophores différents) démontrent que l'ensemble des filaments qui s'échappent des zones nucléatrices sont orientés extrémité barbée vers l'extérieur, s'allongeant donc en dehors du "micropattern" au sein duquel reste intriquée leur extrémité pointue (figure S2). Divers contrôles ont montré que la nature des interactions de surface sur ce nouveau support ne modifiait en rien les propriétés biochimiques des filaments d'actine ainsi assemblés (figure S1). Par cette méthode, nous disposons donc d'un répertoire de géométries de nucléation d'actine spatialement contrôlée sur des échelles micrométriques semblables à celles présentes au sein de certaines cellules; constituant sans doute un système biomimétique des plus performant pour divers projets.

Dans cette première étude, en utilisant ce contrôle géométrique de la croissance de réseaux d'actine, nous avons étudié les interactions entre deux groupes de filaments en croissance se faisant face (par exemple sur des patterns en forme d'angle). Nous avons montré qu'un réseau de filaments parallèles se rassemble spontanément en un faisceau dense qui se déforme sous l'action de pression d'un même ensemble de filaments lui faisant face (figures 3 et 4). De tels faisceaux pourraient s'apparenter aux précurseurs de filopodes ou à ceux présents au niveau des invadopodia dans un contexte cellulaire. La formation d'une telle

structure dépend notamment de l'angle entre les zones de nucléation de telle sorte qu'il existe un angle optimal afin de rassembler le maximum de filaments au sein de ce faisceau. L'ajout de protéines de pontage du type  $\alpha$ -actinine, ne modifie pas une telle organisation semblant tout juste la stabiliser (figure S6 et observation de fluctuations thermiques de moindre amplitude, film joint). Au contraire lorsque les filaments issus de deux zones de nucléation distinctes possèdent une orientation antiparallèle entre eux (exemple des ronds concentriques, figure 2) et suivant la distance entre ces zones nucléatrices, les deux réseaux de filaments s'interpénètrent sans encombre ou bien semblent bloqués de manière stérique par la rencontre avec un obstacle important. Un tel frein à l'élongation n'opère que lorsque les filaments sont longs donc plus flexibles. Les filaments plus courts, et par définition plus rigides, sont par contre capables de traverser un réseau dense et branché de filaments d'actine. Ainsi en analysant la capacité d'un réseau auto-organisé de filaments d'actine à se déformer et se rassembler en faisceaux parallèles similaires aux précurseurs de filopodes *in vivo* (Svitkina et al., 2003) ou au contraire les facteurs biochimiques ou géométriques pouvant bloquer ou non leur élongation, nous pouvons tirer des conclusions quant à l'importance des paramètres physiques mis en jeu dans des organisations architecturales complexes semblables à celles du cytosquelette d'actine cellulaire.

Enfin, à l'aide d'une analyse statistique et d'un modèle de simulation numérique, nous montrons que les propriétés mécaniques des filaments ainsi que des lois de probabilité suffisent pour gouverner l'arrangement spatial d'un réseau dense et complexe d'actine. Par exemple la transition entre une organisation antiparallèle de filaments interdigités (présente à la base d'un secteur angulaire) et une déformation de filaments parallèles en un faisceau peut s'expliquer simplement à l'aide des propriétés mécaniques des filaments d'actine et une loi probabiliste régulant la cinétique d'un tel assemblage collectif, (figure 4). Tout cela en réponse uniquement à des conditions géométriques de nucléation et de manière indépendante de protéines régulatrices de type protéines de pontage, sans doute un paramètre de plus qu'il nous faudra à l'avenir particulièrement observer *in vivo*.

En document annexe se trouve également la "News and Views" écrite à propos de notre propre article par Denis Wirtz et Shyam Khatau, qui fut publiée dans la même issue de Nature Materials.

# Nucleation geometry governs ordered actin networks structures

Anne-Cécile Reymann<sup>1</sup>, Jean-Louis Martiel<sup>1,2</sup>, Théo Cambier<sup>1</sup>, Laurent Blanchoin<sup>1</sup>,  
Rajaa Boujemaa-Paterski<sup>1\*</sup> and Manuel Théry<sup>1\*</sup>

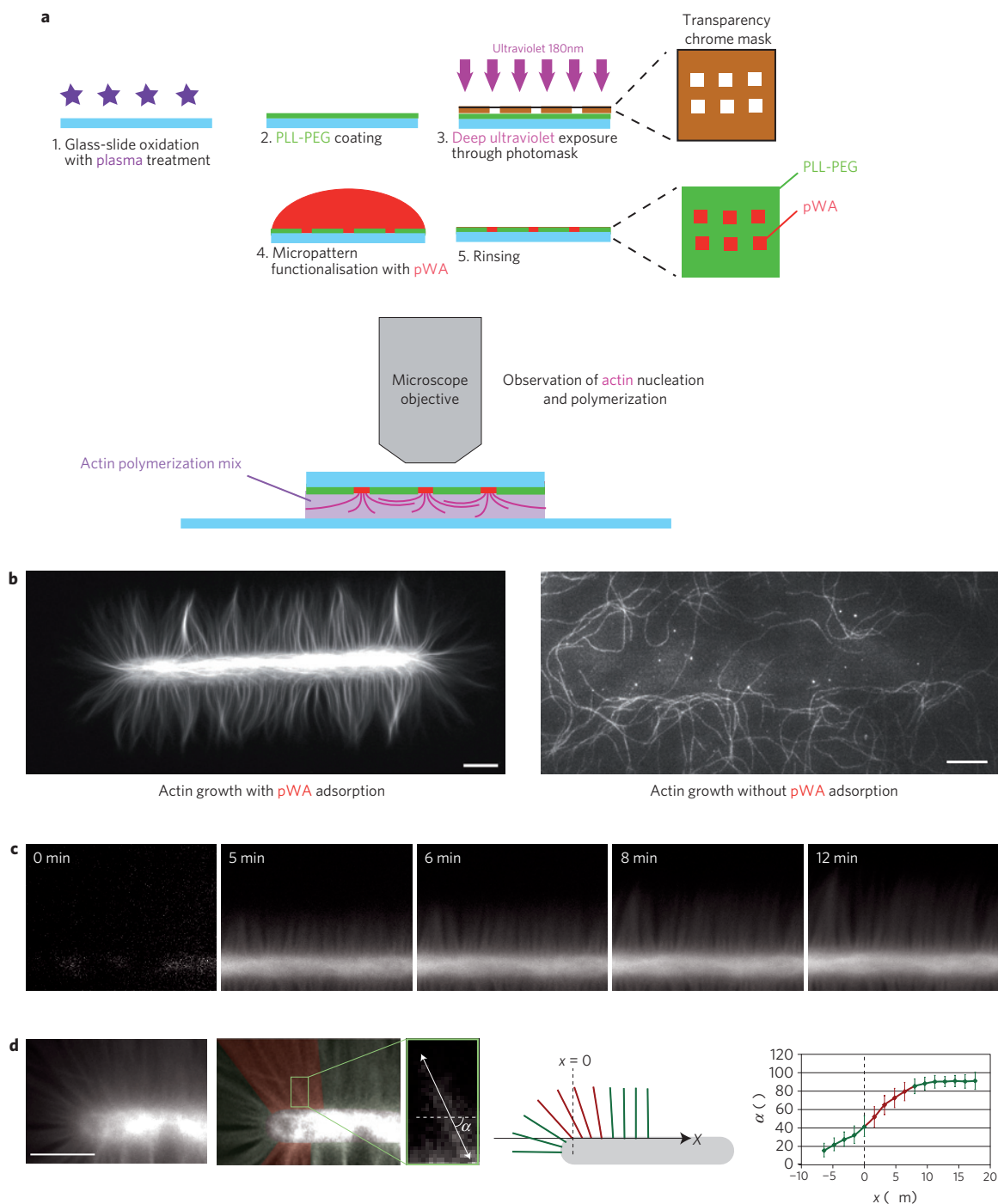
**Actin filaments constitute one of the main components of cell cytoskeleton. Assembled into bundles in filopodia or in stress fibres, they play a pivotal role in eukaryotes during cell morphogenesis, adhesion and motility. The bundle emergence has been extensively related to specific actin regulators<sup>1-3</sup> *in vivo*<sup>4-7</sup>. Such dynamic modulation was also highlighted by biochemical reconstitution of the actin-network assembly, in bulk solution or with biomimetic devices<sup>8-18</sup>. However, the question of how geometrical boundaries, such as those encountered in cells, affect the dynamic formation of highly ordered actin structures remains poorly studied<sup>14,19</sup>. Here we demonstrate that the nucleation geometry in itself can be the principal determinant of actin-network architecture. We developed a micropatterning method that enables the spatial control of actin nucleation sites for *in vitro* assays. Shape, orientation and distance between nucleation regions control filament orientation and length, filament-filament interactions and filopodium-like bundle formation. Modelling of filament growth and interactions demonstrates that basic mechanical and probabilistic laws govern actin assembly in higher-order structures.**

In cells, actin nucleation occurs at various locations at the plasma membrane, and bundles of parallel actin filaments are initiated at focal adhesion sites<sup>1</sup> or result from the rearrangement of the dynamic branched actin network of the lamellipodium<sup>6</sup>. Here, we modulate the positioning of nucleation sites at scales corresponding to cellular dimensions. As a first step and to precisely regulate the position of actin nucleation sites *in vitro*, we used a recently developed ultraviolet-based micropatterning approach<sup>20</sup> to create a template for the localization of the nucleation promoting factor pWA (Fig. 1a). pWA comprises the C-terminal domains from the WASP/Scar proteins, a ubiquitous family of proteins that initiate actin polymerization on a pre-existing actin filament in the presence of the Arp2/3 complex and an actin monomer<sup>21-23</sup>. A small volume of solution made of a minimal set of purified proteins ensuring actin polymerization<sup>8,10</sup> was placed between the pWA-coated micropatterned slide and a glass support. Functionalized micropatterns specifically initiate actin filament nucleation on their surface and promote two-dimensional growth of actin filaments (Fig. 1b). Real-time visualization of actin-filament nucleation and growth highlighted the autocatalytic process of network formation (see Supplementary Fig. S1). These networks consist of filaments growing from the pWA-coated regions, with their fast-growing, barbed end oriented outwards (Fig. 1c and Supplementary Fig. S2 and Videos S1-S3). In agreement with actin-filament growth on glass rods<sup>15</sup>, as the nucleation waves propagate, dense and interconnected

networks are formed on the micropattern (Supplementary Fig. S1). Collectively, actin filaments emanating from this dense meshwork self-organize normally to the micropattern edge, except within the narrow region close to the bar end (Fig. 1c,d). Although densely organized into a parallel network, these filaments can be further gathered into larger bundles by the addition of cross-linking factors; we therefore refer to them as filaments rather than bundles. We term as bundles the structures unaffected by the subsequent addition of cross-linkers (see Supplementary Fig. S6a and Video S5). We validated that filament growth on the micropattern was sensitive to known biochemical parameters: filament length increased with the concentration of G-actin, and reduced with increasing concentrations of Arp2/3 or capping protein. In addition, these filaments are bundled by  $\alpha$ -actinin or fascin (see Supplementary Figs S1 and S6).

We took advantage of the geometrical control of actin growth to investigate the interaction between two sets of actin filaments growing toward each other. We therefore analysed actin growth from individual, concentric or eccentric circles. Twenty- to thirty-micrometre-long actin filaments grew radially inwards and outwards (Fig. 2a). Surprisingly, the networks generated by three concentric circles spaced 15  $\mu\text{m}$  apart did not simply superimpose and the centripetal arrangement of parallel bundles disappeared. Instead, the interactions between inward- and outward-growing filaments formed short and thin antiparallel bundles between adjacent circles. Interestingly, actin-filament elongation seemed to be blocked by the presence of the dense actin network formed on the adjacent circles. To verify this, we quantified the local actin-network density by averaging several images taken separately on identical micropatterns (Fig. 2b). In addition, to understand how actin-filament growth could lead to these actin density profiles, we carried out numerical simulations, where actin filaments were nucleated with a constant linear density along the circle (see Supplementary Fig. S3 and Equations). Filaments grew normally out of the circle and their length was determined by the biochemical conditions. Actin filaments were then allowed or not to cross adjacent nucleation regions (see Supplementary Fig. S3), and theoretical density maps were derived from the local density of simulated actin filaments (Fig. 2b). Numerical simulations showed that, on concentric circles, filaments did not cross the dense network region lying on their path. Conversely, when the distance between separate nucleation regions was reduced, as in the case of eccentric circles, the density within the inner circle was no longer isotropic. Numerical simulations confirmed that extra filaments enter this innermost region to locally increase fluorescence intensity (Fig. 2b). This demonstrates that short, and thus stiff, filaments can grow through the dense network whereas longer and more

<sup>1</sup>Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, France, <sup>2</sup>Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, CNRS/UJF, Pavillon Taillefer Faculté de Médecine, La Tronche, 38706, France. \*e-mail: rajaa.paterski@cea.fr; manuel.thery@cea.fr.



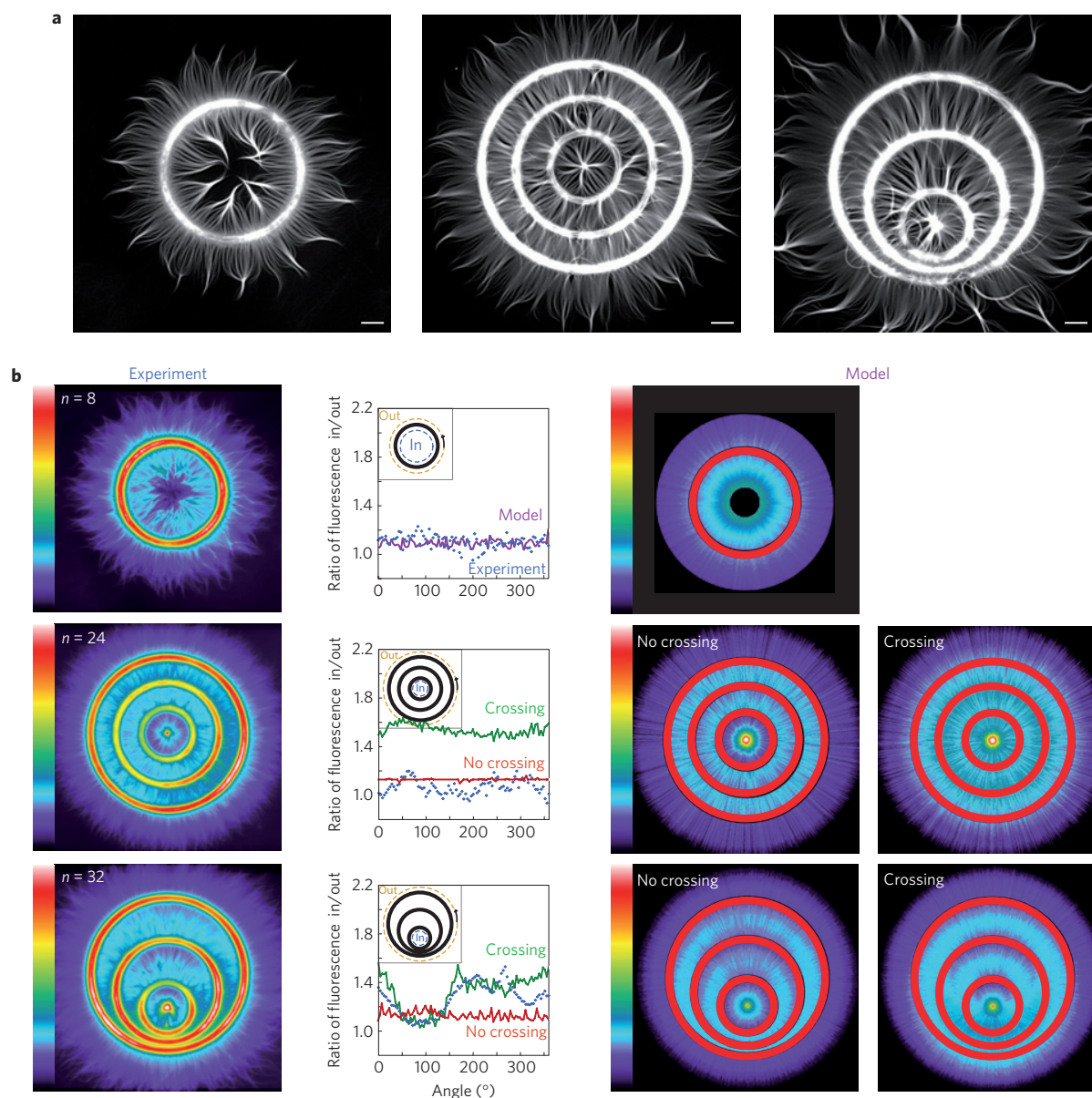
**Figure 1 | Geometrical control of actin nucleation and growth.** **a**, Surface-micropatterning method. **b**, Epifluorescence-microscopy images of actin filaments specifically nucleated on the pWA-coated micropattern, and of spontaneous filament polymerization in the solution in the absence of pWA-coating—no actin filament is recruited to the uncoated micropattern. **c**, Actin-filament nucleation and growth on a pWA-coated micropattern. **d**, The fluorescence image is filtered and the angle between the actin filament and the bar micropattern major axis manually measured with respect to their position ( $x$ ) along the bar. The error bars (rightmost panel) represent the standard deviation calculated for 65 angles measured at each position ( $x$ ). Filaments normal to the pattern edges are coloured green, and filaments of the transition region red. Scale bars indicate  $10\ \mu\text{m}$ . See also Supplementary Videos S1–S3.

flexible filaments become entangled and blocked by an adjacent actin network. Consequently, physical constraints in addition to biochemical cues regulate actin-filament length.

To further explore the role of geometrical parameters on actin-filament interactions and their resulting network structure, we forced contacts between filaments at various angles. When nucleated from two short bars, filaments first grew perpendicularly

to the bars, then interacted and zipped to form a filopodium-like parallel bundle (Fig. 3a, see Supplementary Fig. S4 and Video S4), reminiscent of that present *in vivo*<sup>6</sup>. This interaction forced the filaments to bend, so bundle formation depended on filaments' ability to change their growing direction. We tested this parameter by varying the angle between the two short bars (Fig. 3b) and quantified the formation of parallel bundles (Fig. 3c). For



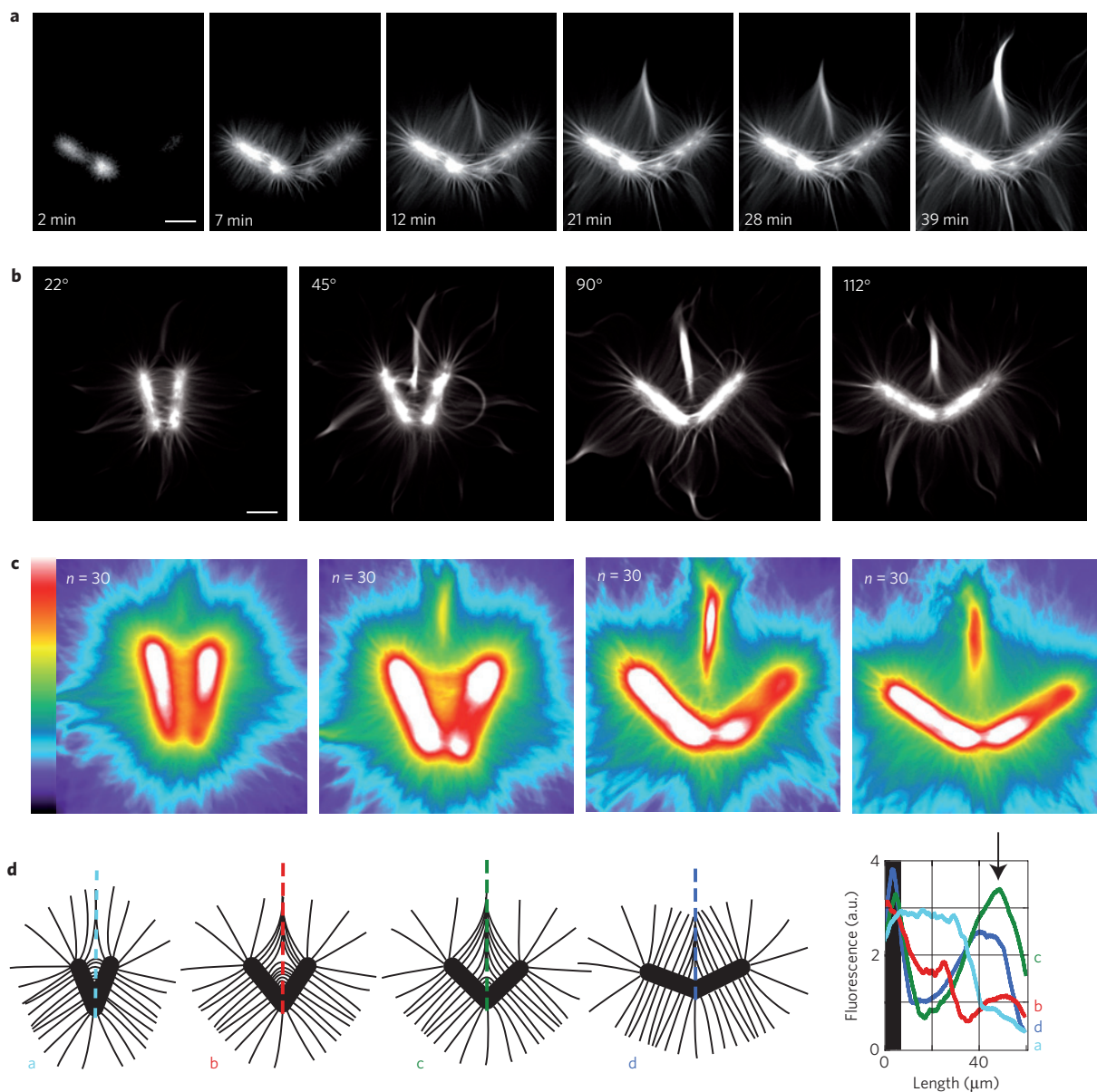


**Figure 2 | Filament length controls their ability to cross dense actin networks.** **a**, Fluorescent-microscopy images of actin structures formed on nucleation circles. Inward-growing filaments were brought together by the circle curvature and generated parallel bundles. **b**, Actin-network density maps calculated by overlaying and averaging several images (first column) and from numerical simulations of actin-filament growth (third and fourth columns). The averaged structure was colour-coded (see also Supplementary Fig. S3) and nucleation regions are represented in red. We measured the fluorescence ratio of line scans along the innermost circle and the external side of the outermost circle (as a reference) as in the inset image (second column, coloured dashed circles). The second column shows the comparison between the ratios of the experimental density maps (dots) and the ratios of the numerical simulations (lines) where actin filaments can or cannot cross the dense actin network. Scale bars indicate 10  $\mu\text{m}$ .

nucleation bar angles close to  $22^\circ$ , filaments are associated into short and thin antiparallel bundles. Parallel bundles only started to form above a critical angle between  $22^\circ$  and  $45^\circ$ , and averaged image analysis confirmed the existence of an optimal angle to promote the coalescence of numerous filaments into a parallel bundle (Fig. 3d).

As we had demonstrated that the length and rigidity of filaments modulate their interaction with actin-filament networks, we investigated whether or not a variation in the distance at a given angle between two nucleation regions would affect bundle formation. For this purpose we designed eight-branched radial arrays where the rays were moved in and out from the origin. As expected, filaments grew outward from each ray and formed parallel bundles on the bisecting line between adjacent rays (Fig. 4a,b, and see Supplementary Fig. S4). When rays were sufficiently distant,

short parallel bundles formed precisely along the bisecting line and maintained this orientation. As the distance between rays decreased, bundles were longer, mis-positioned and curved (Fig. 4b,c). In all cases, the transition between the assembly of antiparallel bundles in the proximal part of the rays and the assembly of parallel bundles in their distal part occurred at a fairly variable position (Fig. 4d,e). Consequently, the distance between nucleation sites, in the range tested, was not critical to the generation of the final structure. The position of the transition from antiparallel to parallel bundles could be modelled as the result of intrinsic filament properties and collective assembly (Fig. 4f). If filaments assembled exclusively into antiparallel bundles in the proximal part of the network, filaments that contact one another would have a probability  $p$  to assemble into parallel bundles. This intrinsic probability  $p$  depends only on



**Figure 3 | Orientation of nucleation regions controls bundle formation.** **a**, Nucleation, elongation and deformation of actin filaments nucleated on a 120° V-shaped nucleation zone. **b**, Fluorescence-microscopy images of actin structures formed on V-shaped zones with four different angles. **c**, Average fluorescent projection of 30 images for each angle. **d**, Schematic representation of bundle formation resulting from the interaction of actin filaments nucleated on the micropattern. The fluorescent-intensity distribution along the line scans (dotted lines) carried out on the averaged images relates the actin filament number involved in the bundle; the arrow, against curve c, indicates the maximum fluorescence corresponding to the bundle thickening at 45°. Scale bars indicate 10  $\mu\text{m}$ . See also Supplementary Video S4.

filament orientation and therefore on their position along the ray (Fig. 1d and see Supplementary Fig. S5). If filaments formed a parallel bundle in the proximal network, the encountering filaments are forced to bend and contribute to this parallel bundle. Therefore the probability  $Q$  to form a parallel bundle is given by

$$Q(y+1) = p(y)(1 - Q(y)) + Q(y)$$

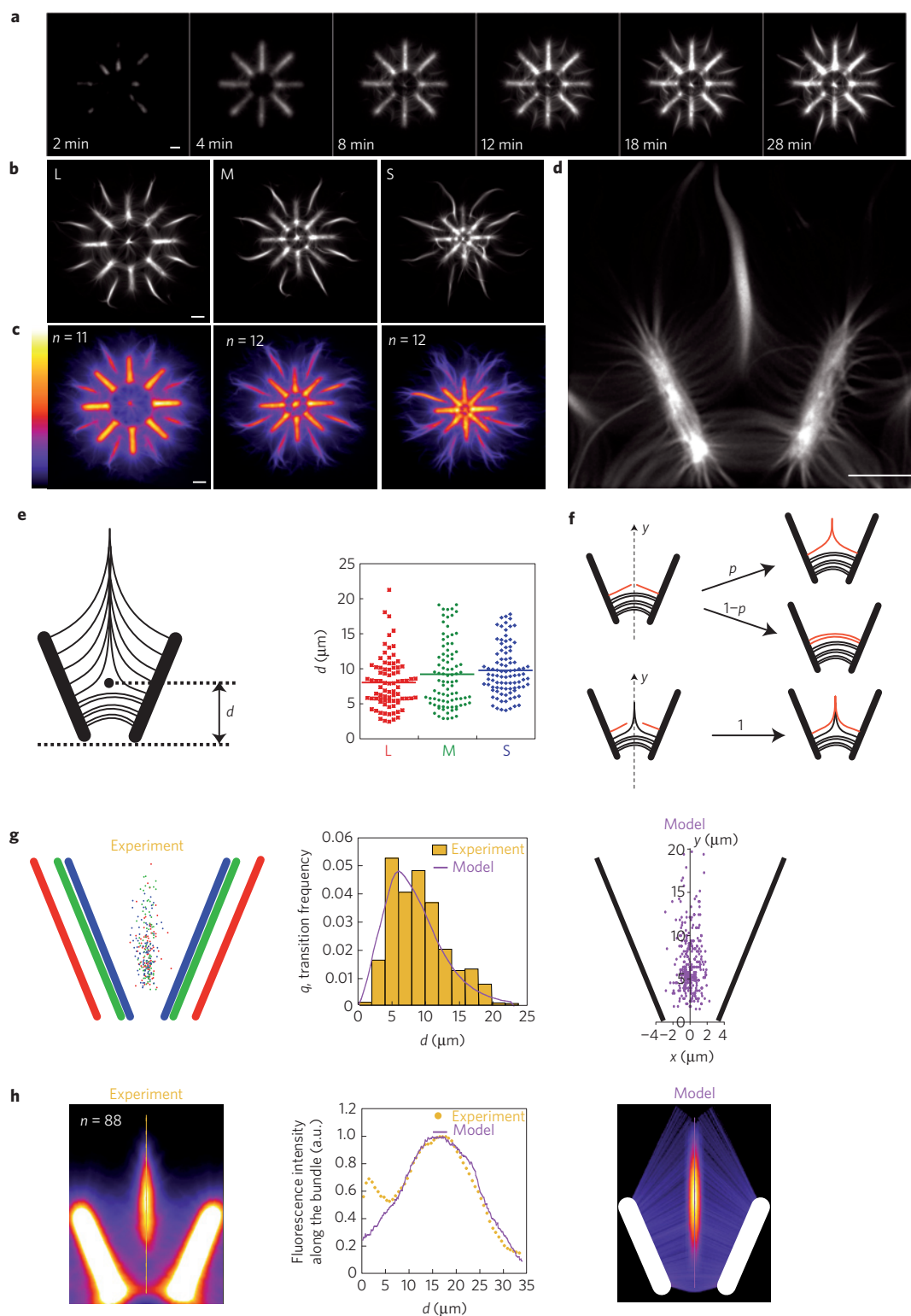
which gives

$$Q(y) = 1 - \prod_{k=0}^{y-1} (1 - p(k)) \quad (1)$$

where  $y$  is a discrete variable characterizing the position along the bisecting axis (see Supplementary Equations). The transition positions obtained from the probability function  $Q$  precisely

matched experimental data (Fig. 4g). As a transition point generates a parallel bundle made of all distal filaments, we calculated the bundle size and fluorescent intensity associated with each transition point (see Supplementary Equations). Our model accurately accounted for both the increase of fluorescence due to filament assembly into the bundle and the reduction of fluorescence due to various filament lengths within the bundle (Fig. 4h). These geometrically mediated bundles still occur in presence of two distinct actin cross-linkers in a concentration-dependent manner (see Supplementary Fig. S6 and Video S5). This confirms that bundle emergence is tightly controlled by mechanical properties of the actin filament<sup>24</sup>.

Our reconstitution of the filopodium-like bundles relies on the spontaneous formation of a precursor structure formed by the collapse and the further coalescence of actin filaments emanating from



**Figure 4 | Intrinsic properties and collective assembly of actin filaments regulate parallel-bundle formation.** **a**, Time-lapse acquisition of the nucleation and elongation of actin filaments on an eight-branched radial array. **b**, Fluorescence images of three sizes of the radial array at steady state of actin assembly. **c**, Average fluorescent projections. **d** A zoom of the L-sized radial array of **b**. **e**, The distance  $d$  between the bottom of the bar and the position of the transition point did not vary between the three radial array sizes. **f**, Model assumptions: actin filaments' probabilistic compartment depends on their local environment. **g**, Left: combined experimental measures from **e** for the three different radial array sizes. Right: 200 transition-point positions calculated from the probability  $Q(y)$  (equation (1)) and a normal variability along the  $x$  axis. Middle: comparison of experimental measures of the transition-point position and the model function  $Q(y)$  (equation (1)). **h**, Left: average fluorescent projection of each sector of the large radial array. Right: the calculated fluorescent intensity of 10,000 parallel filaments constituting the bundle generated according to the function  $Q(y)$ . Middle: comparison of fluorescence intensity along the bisecting line on the experimental averaged image (dots) and on the analytical formulation obtained from the model. Scale bars indicate 10  $\mu\text{m}$ .

the dense actin network, to which adjacent elongating filaments will systematically converge (see Supplementary Video S4). Interestingly, this propagative coalescence of actin filaments initiated by a precursor, such as the  $\Lambda$ -precursors corresponding to the splayed filopodial roots observed *in vivo*<sup>6</sup>, accounts for the emergence of the parallel bundles from the dense surrounding network in cells. Moreover, this propagative process explains the presence of short actin filaments within bundles<sup>25</sup>, consistent with the high barbed-end capping activity present at the leading edge of lamellipodia<sup>26</sup>.

Our innovative methodology has demonstrated that, independently of the mixture of actin-binding proteins, nucleation geometry plays a key role in the determination of the actin-filament network architecture. Respective positioning of adjacent nucleation zones results in the entanglement of actin filaments into networks and the control of their length. Actin-filament orientation determines their ability to interact with neighbours and to form bundles. Fundamentally, basic mechanical and probabilistic laws govern the spatial arrangements of antiparallel and filopodium-like parallel filaments in response to defined geometrical boundary conditions. By extension to living cells, this work emphasizes the importance of the spatial and temporal organization of the nucleation areas, giving rise to specific actin-network architectures and hence controlling the location of force production. Although the spatio-temporal regulation of actin growth is known to influence cell shape<sup>27,28</sup>, our work has revealed, in quantitative terms, that reciprocally physical boundaries, within or around the cell, control actin cytoskeleton architectures.

## Methods

**Micropatterning.** Glass coverslips were oxidized with oxygen plasma (10 s, 30 W, Harrick Plasma, Ithaca, NY) and incubated with 0.1 mg ml<sup>-1</sup> of polylysine-L-g-polyethyleneglycol (JenKem Technology, TX) in HEPES 10 mM at pH 7.4 for 1 h. Pegylated coverslips were placed on a chromium synthetic-quartz photomask (Toppan Photomasks, Corbeil, France) using a home-made vacuum holder. The chromium layer of the photomask contained 3- $\mu$ m-wide transparent micropatterns. The mask-covered coverslips were then exposed to deep ultraviolet light ( $\lambda < 200$  nm, UVO Cleaner, Jelight Company, Irvine, CA) for 5 min and coated with a solution of the nucleation promoting factor pWA at 0.5  $\mu$ M for 15 min.

**Actin polymerization.** Protein mixtures were diluted in freshly prepared fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl (pH 7.8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM dithiothreitol, 3 mg ml<sup>-1</sup> glucose, 20  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> catalase, 100 mg ml<sup>-1</sup> glucose oxidase and 0.5% methylcellulose to induce actin polymerization. Actin polymerization was induced in a solution containing 2  $\mu$ M actin monomers (7% labelled with Alexa568) and 6  $\mu$ M profilin, and 30 nM Arp2/3 complex.

**Image acquisition.** Images were taken using an upright BX61 Olympus microscope equipped with a  $\times 40$  dry objective (UPLFLN, NA = 0.75), an XY motorized stage (Marzhauser, Germany) and a CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Germany). The microscope and devices were driven by MetaMorph (Molecular Devices, Downingtown, PA).

**Image treatment.** All images were taken using the same light intensity and exposure time. However, before being overlaid and averaged, image grey scales were adjusted to have the same minimum and maximum grey values. The images shown were filtered using the 'unsharp mask' and the 'Gaussian blur' filters from Image J software to highlight filaments from the background.

Received 18 March 2010; accepted 11 August 2010;  
published online 19 September 2010

## References

- Naumanen, P., Lappalainen, P. & Hotulainen, P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J. Microsc.* **231**, 446–454 (2008).
- Welch, M. D. & Mullins, R. D. Cellular control of actin nucleation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **18**, 247–288 (2002).
- Chesarone, M. A., DuPage, A. G. & Goode, B. L. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **11**, 62–74 (2010).
- Hotulainen, P. *et al.* Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J. Cell. Biol.* **185**, 323–339 (2009).
- Korobova, F. & Svitkina, T. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol. Biol. Cell.* **21**, 165–176.
- Svitkina, T. M. *et al.* Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell. Biol.* **160**, 409–421 (2003).
- Vignjevic, D. *et al.* Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell. Biol.* **174**, 863–875 (2006).
- 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).
- Theriot, J. A., Mitchison, T. J., Tilney, L. G. & Portnoy, D. A. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature* **357**, 257–260 (1992).
- Welch, M. D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A. & Mitchison, T. J. Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* **281**, 105–108 (1998).
- Bernheim-Groswasser, A., Wiesner, S., Golsteyn, R. M., Carlier, M. F. & Sykes, C. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature* **417**, 308–311 (2002).
- Cameron, L. A., Footer, M. J., van Oudenaarden, A. & Theriot, J. A. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 4908–4913 (1999).
- 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).
- Liu, A. P. *et al.* Membrane-induced bundling of actin filaments. *Nature Phys.* **4**, 789–793 (2008).
- Achard, V. *et al.* A primer-based mechanism underlies branched actin filament networks formation and motility. *Curr. Biol.* **20**, 423–428 (2010).
- Briehier, W. M., Coughlin, M. & Mitchison, T. J. Fascin-mediated propulsion of *Listeria monocytogenes* independent of frequent nucleation by the Arp2/3 complex. *J. Cell. Biol.* **165**, 233–242 (2004).
- Haviv, L. *et al.* Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 4906–4911 (2006).
- Vignjevic, D. *et al.* Formation of filopodia-like bundles *in vitro* from a dendritic network. *J. Cell. Biol.* **160**, 951–962 (2003).
- Mogilner, A. & Rubinstein, B. The physics of filopodial protrusion. *Biophys. J.* **89**, 782–795 (2005).
- Azioune, A., Storch, M., Bornens, M., Thery, M. & Piel, M. Simple and rapid process for single cell micro-patterning. *Lab Chip* **9**, 1640–1642 (2009).
- Blanchoin, L. *et al.* Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* **404**, 1007–1011 (2000).
- Machesky, L. M. *et al.* Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3739–3744 (1999).
- Mullins, R. D., Heuser, J. A. & Pollard, T. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **95**, 6181–6186 (1998).
- Courson, D. S. & Rock, R. S. Actin crosslink assembly and disassembly mechanics for alpha-actinin and fascin. *J. Biol. Chem.* **285**, 26350–26357 (2010).
- Medalia, O. *et al.* Organization of actin networks in intact filopodia. *Curr. Biol.* **17**, 79–84 (2007).
- Iwasa, J. H. & Mullins, R. D. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* **17**, 395–406 (2007).
- Parker, K. K. *et al.* Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *Faseb. J.* **16**, 1195–1204 (2002).
- Thery, M., Pepin, A., Dressaire, E., Chen, Y. & Bornens, M. Cell distribution of stress fibres in response to adhesive environment geometry. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **63**, 341–355 (2006).

## Acknowledgements

We are grateful to C. J. Staiger, J. Plastino and D. Pellman for critical reading of the manuscript and suggestions. This work was supported by grants from Agence National pour la Recherche to L.B. (ANR-06-PCV1-0022 and ANR-08-BLAN-0012) and M.T. (ANR-08-JC-0103 and ANR-PCV08-322457); A.-C.R. is supported by an IRTELIS fellowship from CEA.

## Author contributions

A.-C.R. and T.C. carried out the experiments. J.-L.M. carried out the physical modelling. L.B., R.B.-P. and M.T. directed the project and wrote the manuscript.

## Additional information

The authors declare no competing financial interests. Supplementary information accompanies this paper on [www.nature.com/naturematerials](http://www.nature.com/naturematerials). Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions>. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.B.-P. or M.T.

# Nucleation Geometry Governs Ordered Actin Networks Structure

Anne-Cécile Reymann<sup>1</sup>, Jean-Louis Martiel<sup>1,2</sup>, Théo Cambier<sup>1</sup>, Laurent Blanchoin<sup>1</sup>, Rajaa Boujemaa-Paterski<sup>1</sup> & Manuel Théry<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, FRANCE*

<sup>2</sup>*Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité, CNRS/UJF, Pavillon Taillefer Faculté de Médecine, La Tronche, 38706, FRANCE*

## Supplementary Information

### 1. Supplementary Figures S1 to S6

### 2. Supplementary Videos S1 to S4

### 3. Supplementary Methods

Protein expression and purification  
Total Internal Reflection Fluorescence  
Photobleaching

### 4. Supplementary Equations

Modeling actin network density on circular micropatterns

*Algorithm for the fluorescence distribution in model images.  
Matlab implementation.  
Artificial images*

Modeling actin filament growth out of radial arrays

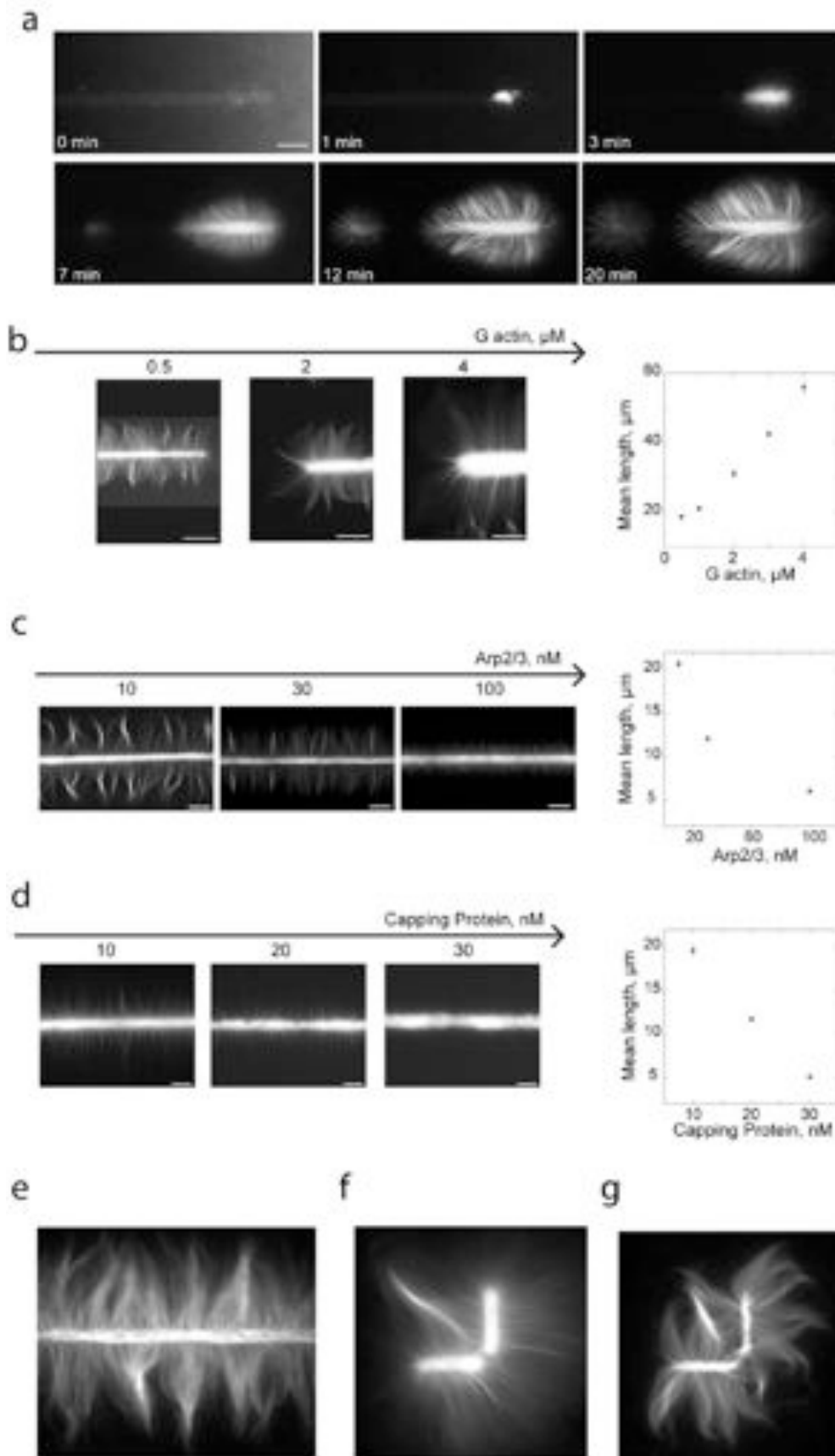
*Geometry of the pattern and parameterization of the filament position  
Distribution of the transition between anti-parallel and parallel bundles*

Modeling actin filament density within parallel bundle

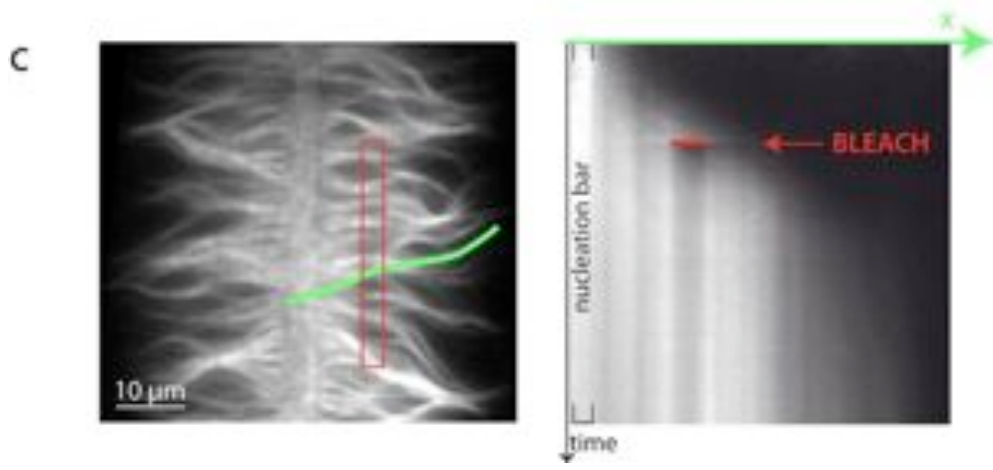
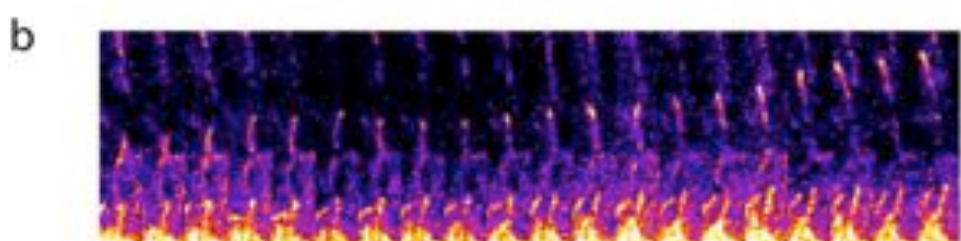
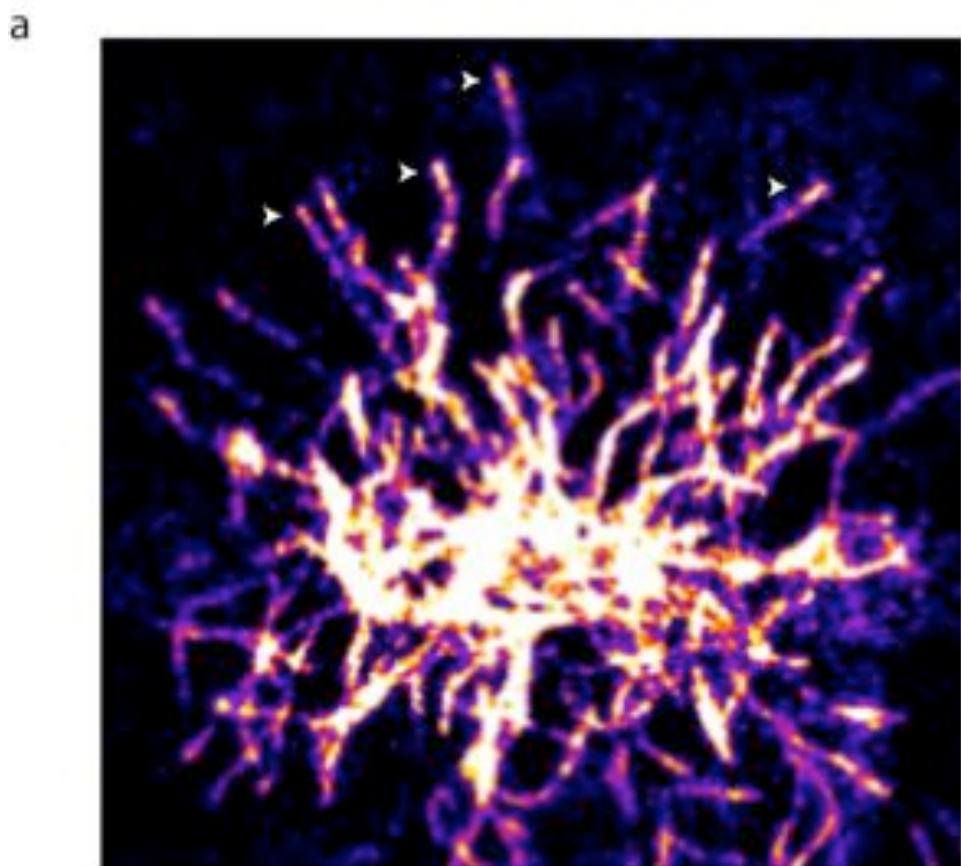
*Matlab implementation.  
Analytical expression of the fluorescence along the bisecting line*

### 5. Supplementary References

1. Supplementary Figures

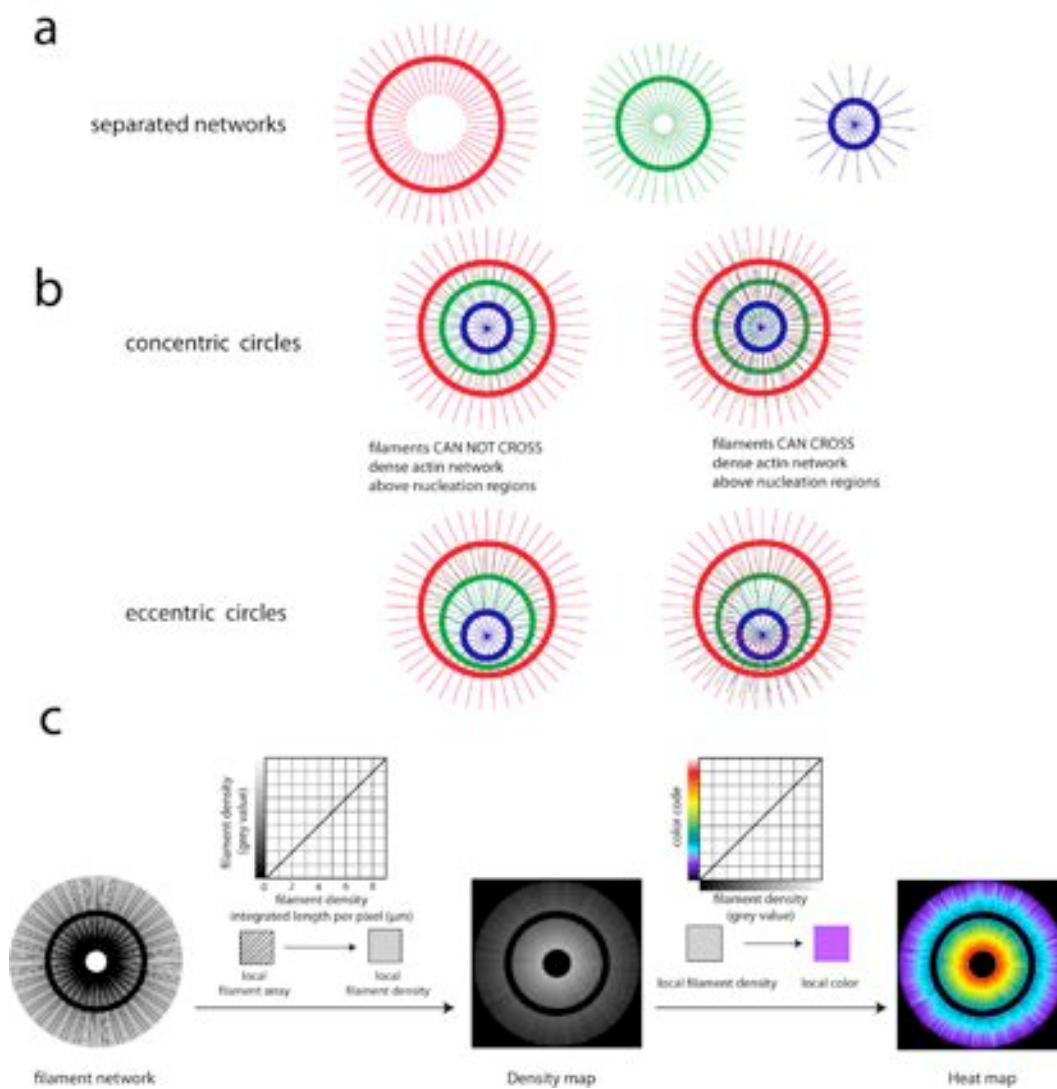


**Supplementary Figure S1**, Biochemical control of filament number and length. **a**, Initiation and propagation of actin-alexa488 assembly along a pWA-coated micropattern followed by evanescent wave microscopy. **b**, Variation of the monomeric actin concentration present in the medium. Actin filaments elongating out of the nucleation area were longer with an increasing actin concentration. **c**, Variation of the nucleation factor, the Arp2/3 complex concentration. Actin filaments escaping the nucleation area became shorter with an increasing concentration of the Arp2/3 complex. **d**, Response to the barbed end capper, the heterodimeric capping protein. Actin filaments escaping the nucleation area shortened with an increasing concentration of capping protein. **e**, Polymerization of the actin monomers-Ca-ATP rather than the physiologically relevant form, actin monomers-Mg-ATP. In the standard conditions of actin assembly, calcium actin filaments grew unperturbed from the nucleation micro-patterned surfaces. **f**, Actin polymerization in the presence of 0,25% methylcellulose. **g**, Actin polymerization in the presence of 1% methylcellulose. In both cases filaments kept their assembling properties into bundles. Scale bars are 20  $\mu\text{m}$ .



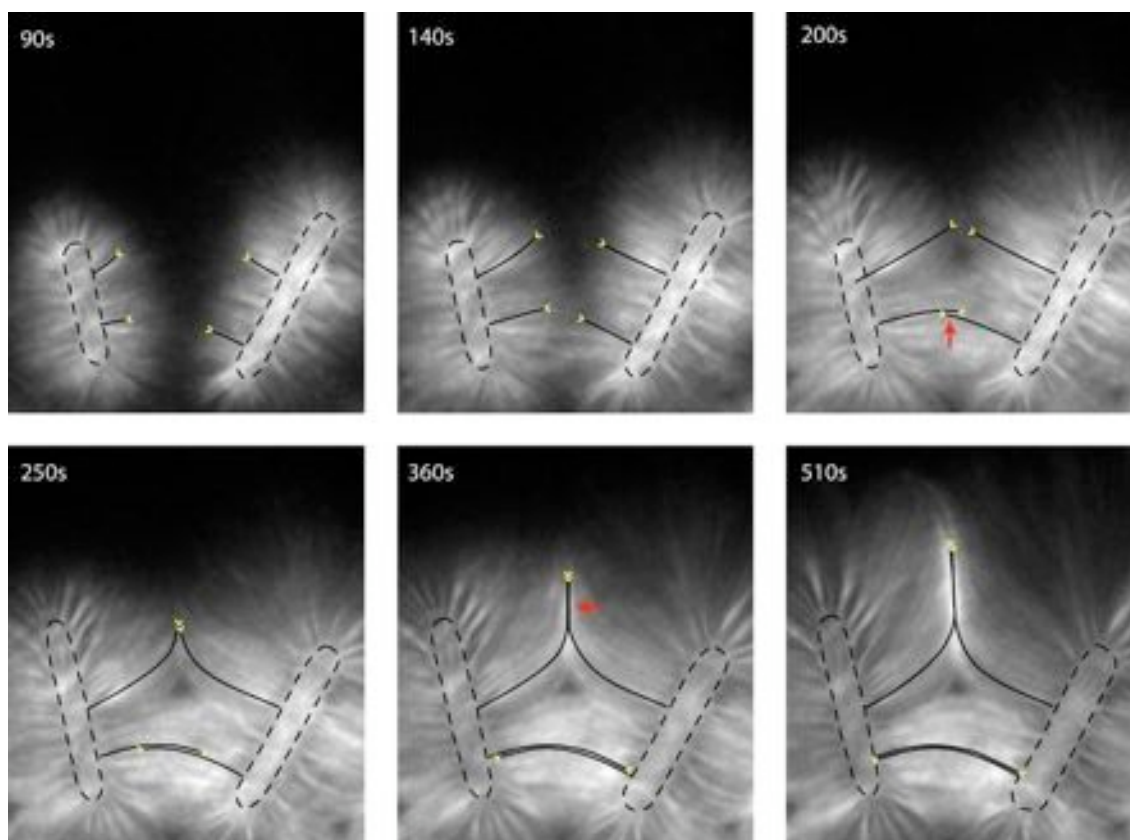


**Supplementary Figure S2**, Polarized growth of actin filaments out of nucleation regions. **a.** FIRE Look Up Table was applied to the acquired picture to highlight in yellow/orange the brighter signal corresponding to the filament growing barbed ends (See Supplementary methods). Growing barbed ends were systematically located at the distal part of the filament (arrow heads) (See Video S1). **b.** Time-lapse acquisition of a growing filament showing actin polymerization (bright signal) at the distal part of the filament. Images were taken every 10 s. **c.** Filament growth was followed in TIRF microscopy. A visual mark was applied on some filaments by photo-bleaching their distal extremity (See Video S3). Fluorescence analysis along growing filaments (green) is shown in a kymograph (right). It showed that the bleach region did not move. This demonstrated that the filament barbed end incorporate new fluorescent monomers and elongate outward the nucleation area (the filament pointed end being engaged in the dense network within this nucleation area, as in Video S2). If the actin monomers were incorporated at the proximal end, at the nucleation site, the bleached region should have been displaced away from the nucleation bar during filament elongation.

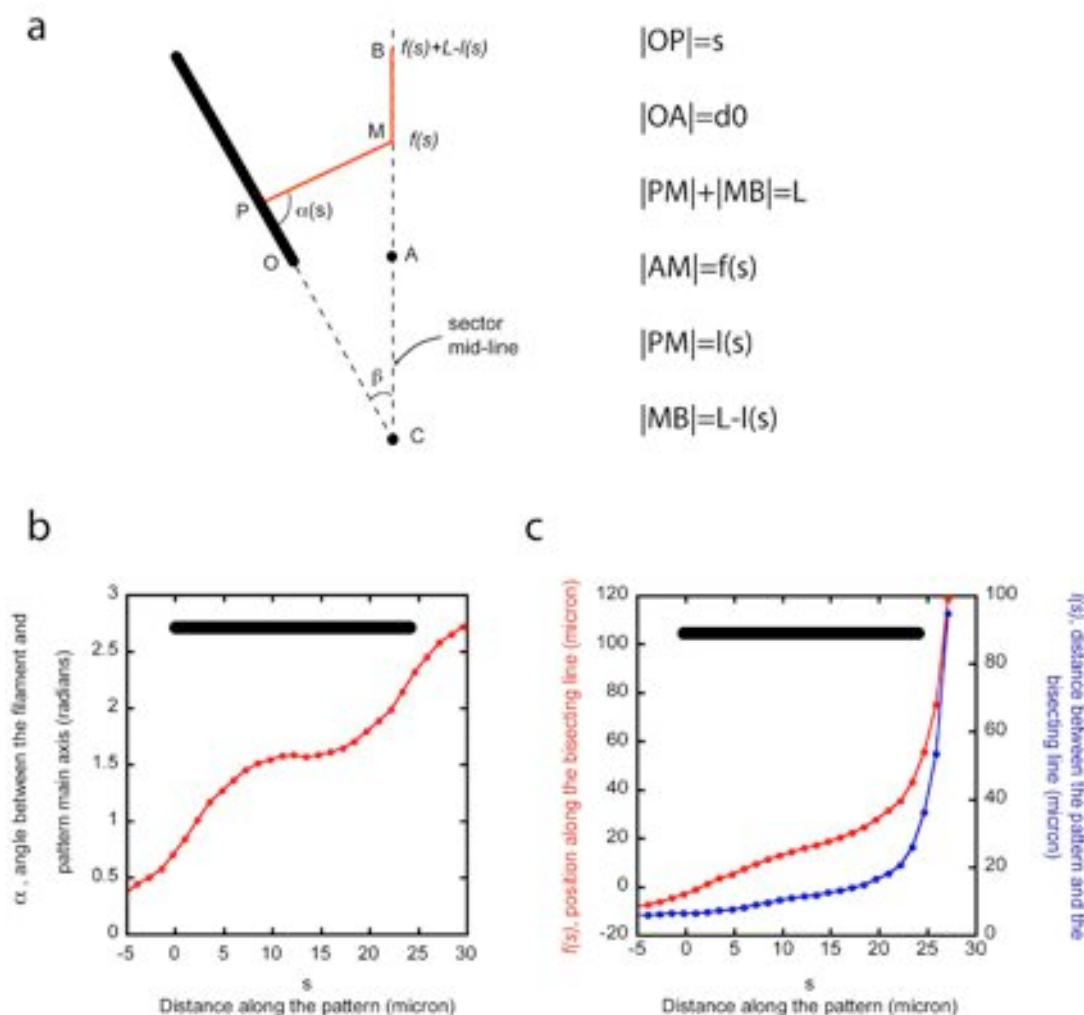


**Supplementary Figure S3:** Numerical simulations of actin growth out of circles.

**a,** Each circle nucleates the same linear density of filaments for both inwards and outwards growth. Different colors are used for each circle in order to later distinguish filament origin. Only a subset of filaments is represented for clarity, although actual numerical simulations are based on several thousands of filaments. **b,** Two different conditions are illustrated on concentric or eccentric circles. On the left, filament can not cross a nucleation region and stop growing. Therefore, network density in the central circle is isotropic and independent on the central or deported position of the circle. On the right, filament can cross the nucleation regions they encounter. Therefore, network density in the central circle is higher in the angular sector close to adjacent nucleation circles. **c,** Color coding of filament density map. A grey value and then a specific color is attributed to each image pixel according to the local filament density. A color heat map is generated to highlight the various actin filament density regions in the network.



**Supplementary Figure S4:** Real time acquisition of parallel and anti-parallel filament networks formation observed by TIRF microscopy. Actin filament assembly was initiated from two nucleation bars (dotted ovoid areas). Lines highlight the orientation of actin filaments emanating from the branched actin network initiated on the nucleation area. Yellow inverted arrowhead indicates the elongating barbed end position. Red arrows point out the anti-parallel (at 200 s) or the parallel (at 360 s) actin filaments network formation. See Video S4.



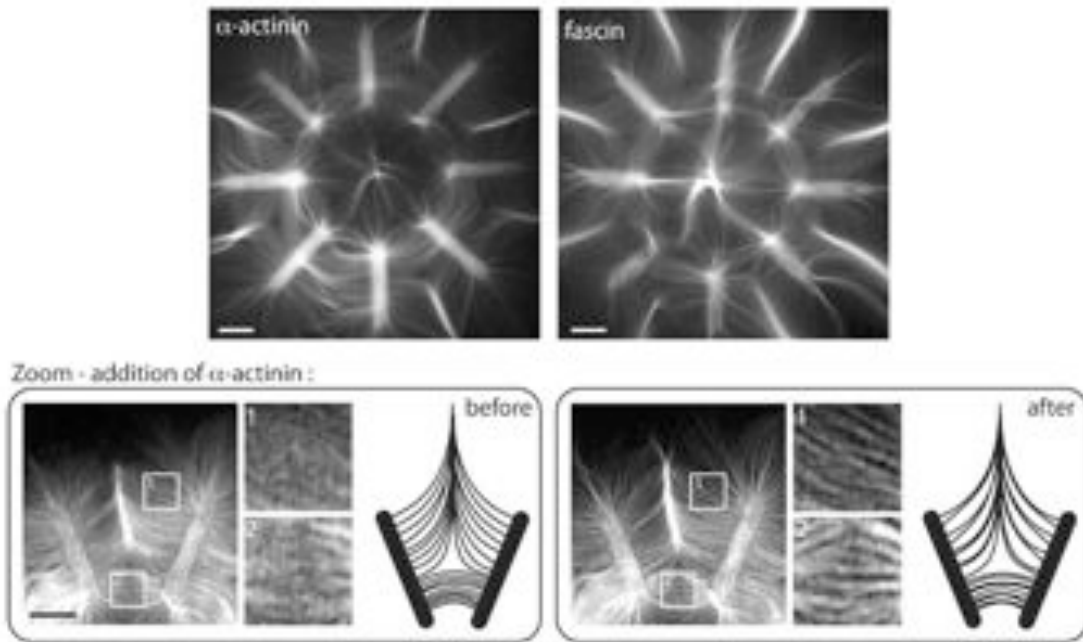
### Supplementary Figure S5: Numerical simulations of actin growth within angular sectors

**a**, Schematic representation of a sector of the radial array pattern. The large black line represents the left ray of the pattern (we assume a mirror symmetry about the vertical axis to reconstitute the entire sector). C: center of the radial array; O: origin of measurements (bottom point of the pattern); The broken PMB line (red line) represents an actin filament of length  $L$  originating at P on the pattern, merging into the central bundle at M and ending at B along the bisecting line. The position of P from O is coded by a simple parameter  $s$ , which controls  $\alpha(s)$ , the angle between the pattern main axis and the filament (see Figure 1d). The positions of the other points (M and B) are given by equations (2) and (3) of the Supplementary Equations. Other parameters,  $\beta$  and  $d_0$  are constants only depending on the pattern shape.

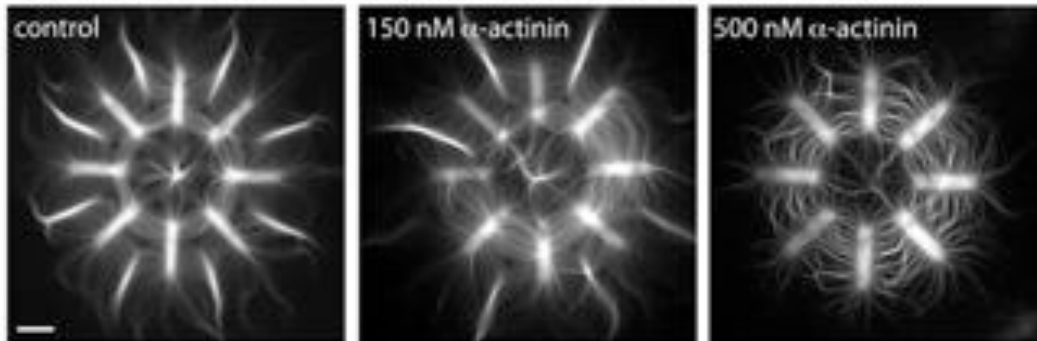
**b**, Experimental determination of the angle between filaments and pattern main axis as a function of the position on the pattern (see Figure 1d). The large black line indicates the pattern extension (between 0 and 24.5  $\mu\text{m}$ ). Positions outside the pattern ( $s < 0$  or  $s > 24.5$ ) are taken along the pattern main axis either towards the radial array center ( $s < 0$ ) or in the opposite direction ( $s > 24.5$ ).

**c**, Using the distribution  $\alpha(s)$  in **b**, we compute the position of the intersecting point M on the bisecting line given by the function  $f$  (red curve) and the distance  $l$  between points P and M (blue curve).

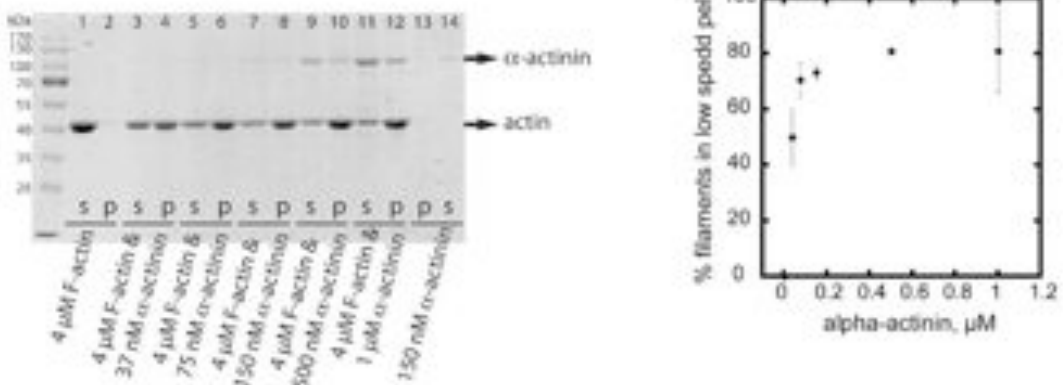
**a** Addition over performed structure : bundling of adjacent filaments within ordered architecture



**b** Addition from the start : dose dependant response with loss of standard organization



**c**  $\alpha$ -actinin bundling activity



**Supplementary Figure S6:** Differential effect of bundling proteins on geometrically induced actin networks.

**a.** Effect of the addition of  $\alpha$ -actinin or fascin over performed filamentous structures on patterned surface. In order to introduce the protein without perturbing the organization of actin filaments, a special set up was used. Instead of creating a flow cell, actin polymerization mix was dropped directly on the micropatterned coverslip and kept in a humid chamber. Droplets of bundling proteins could then gently be added on top of it. This addition of 1  $\mu$ M  $\alpha$ -actinin leads to the bundling of adjacent filaments within the ordered architecture (zoomed images, see also Video S5) whereas 1  $\mu$ M fascin induces no change. **b.** Images showing the effect of an addition of bundling proteins from the start. Standard organization of filaments is lost at high concentrations. **c.**  $\alpha$ -actinin bundles actin filaments. Low speed pelleting assay was performed at 13 krpm at 4°C of 4  $\mu$ M actin assembled to steady state for 1 hour at 20 °C in presence or not of  $\alpha$ -actinin as indicated. Unbundled actin filaments remained in the supernatant (lanes 1 and 2) whereas  $\alpha$ -actinin-bundled filaments were transferred to the pellet (lanes 3 to 12). The percentage of actin filament recovered in the low-speed pellet as a function of the concentration of  $\alpha$ -actinin shows that the  $\alpha$ -actinin binds to actin filaments with an apparent  $K_d$  of 20 nM.

## 2. Supplementary Videos

### Video S1

Growth of individual filaments out of the pWA-coated bar is observed by reducing the concentration of Arp2/3 complexes. Filaments are constantly photo-bleached to highlight the incorporation of new monomers at the filament barbed-ends, which therefore appear brighter. Fluorescence intensity is color coded with the FIRE look-up table. Intense signal appears in white-yellow. This shows that actin filaments emanate from the branched actin network nucleated on the pWA coated-region, and are all oriented with their barbed end growing outwards.

### Video S2

Growth of individual filaments out of the pWA-coated bar is observed by reducing the concentration of Arp2/3 complexes. Filaments are constantly photo-bleached to highlight the incorporation of new monomers at the filament barbed-ends, which therefore appear brighter (yellow arrows). This demonstrates that actin filament barbed ends grow outward the nucleation area. The zoom region highlights a growing filament that initiates newly branched filaments on the pWA-coated bars. This confirms the autocatalytic process of filament network growth from pWA coated-bar.

### Video S3

Growth of individual filaments out of the pWA-coated bar is observed by TIRF microscopy. During filament growth, a rectangular region is punctually photobleached. This region did not move during subsequent filament elongation, demonstrating that filament elongation occurred at away from the pWA-coated bar.



#### Video S4

Growth of individual filaments out of two pWA-coated bars forming a 45° angle is observed by TIRF microscopy. Two minutes after the beginning of the video, one can clearly see on the zoom region the interactions of facing actin filaments that bent and induced the anti-parallel to parallel transition. The subsequent propagative coalescence of filaments induced the formation of the large central parallel bundle.

#### Video S5

Growth of individual filaments out of two pWA-coated bars forming a 45° angle is observed by TIRF microscopy. The 10 s time frame allows the observation of filament thermal fluctuations (in the first part of the movie colored in blue). These fluctuations were abrogated when the actin filaments associated into the central bundle. Six minutes after the video has started, 1 μM of α-actinin is added (the following part of the movie is colored in green). α-actinin did not affect the overall ordered structure growth. However, it induced the coalescence into thin bundles of all adjacent filaments that were not previously incorporated into the main central bundle.

### 3. Supplementary Methods

#### Protein expression and purification

Actin was purified from rabbit skeletal-muscle acetone powder<sup>1,2</sup>. Actin was labeled on lysines with Alexa-488 according to Isambert and colleagues<sup>3</sup>. Arp2/3 complex was purified from bovine brain extracts as according to Egile and colleagues<sup>4</sup>. GST-pWA, Human profilin, and Mouse capping protein were expressed and purified as described previously<sup>5-7</sup>.

#### Total Internal Reflection Fluorescence microscopy

Total-internal-reflection-fluorescence acquisitions were performed on a Nikon TE2000E inverted microscope equipped with a 50mW 488nm laser and a QuantEM 512SC – Quantitative EMCCD camera (Roper Scientific).

#### Photobleaching

Permanent photo-bleaching, shown in Supplementary Figure S2a,b and S4, was obtained by a constant illumination of the sample with TIRF microscopy laser with 25 mW, allowing Alexa488-actin filaments to bleach quickly during time-lapse acquisition in TIRF microscopy. Polymerizing actin filament tips appear brighter due to the addition of unbleached fast diffusing monomers, thus revealing the localization of filament growing ends. In Supplementary Figure S2 and videos S1 and S2, nucleation frequencies were diminished (by decreasing Arp2/3 and actin primers concentrations as performed by Achard and colleagues<sup>8</sup>) allowing an individual observation of filaments and an efficient bleaching of performed filaments.

Punctual photo-bleaching marks were obtained by a short intense laser illumination with 25 mW in normal excitation localized in the region of interest using Metamorph software.

#### 4. Supplementary Equations

##### **Modeling actin network density on circular patterns.**

We assumed that filaments are continuously generated on the pattern at a constant rate and with a constant density. For the ‘crossing case’, we considered that actin filaments can go through the pattern (left panels, Supplementary Figure 3b). Conversely, for the ‘non-crossing case’, we hypothesized that the high density of actin filaments on the adjacent patterns prevents any crossing. The actin filament barbed ends are stalled and their growth is stopped (right panels, Supplementary Figure 3b). Therefore, in our simulations, ‘crossing’ vs. ‘non-crossing’ is only determined by the geometry of the pattern and the filament length in the course of time.

##### *Algorithm for the fluorescence distribution in model images.*

Step 1.

Definition of the geometrical characteristics of circular patterns (radii  $r_i$  and centers  $C_i$ ,  $i=1,2,3$  ; position of nucleation inner/outer boundaries for each circle). Note that filament’s growth direction is determined by their position : filaments on inner (resp. outer) nucleation boundaries grow inwards (resp. outwards). For each time interval  $[t, t+\tau]$ , repeat steps 2-5 until the final simulation time is reached.

Step 2. Nucleation.

The number,  $N_c$ , of newly nucleated filaments on a boundary is

$$N_c = \tau R_N \lambda_B L_B \quad (1)$$

where  $\tau$  is the time step;  $R_N$  the nucleation rate,  $L_B$  the nucleation boundary length and  $\lambda_B$  the linear density of filaments.  $R_N$  depends on the actin monomer concentration and other chemical factors such as the Arp2/3 complex or its activator;  $\lambda_B$  controls the space available to host new filaments on the pattern boundary. Therefore, each new filament is characterized by a triplet of numbers, (1) the nucleation boundary (and its growth direction), (2) its position on the boundary and (3) its time of birth. Due to the Arp2/3 complex nucleation activity, the branched filament pointed end is located on the nucleation boundary itself whereas the barbed end is always elongating outward the nucleation boundary.

### Step 3. Elongation.

For each filament, predict the next position of the barbed end at  $t+\tau$  step along the filament direction. If pattern crossing is prohibited, then go to step 4; otherwise go to step 5.

### Step 4. No crossing case.

All newly predicted barbed end positions inside a pattern domain must be removed: if so barbed end position is frozen to the preceding predicted position, otherwise its position is updated as such.

### Step 5. Crossing case.

Update the filament barbed end position and proceed to step 2 after time incrementation.

***Matlab implementation.***

We use the commercial package Matlab to simulate the algorithm and generate a population of growing filaments. In particular, we need to record/update the following data for each filament

- date of birth;
- $(X_P, Y_P)$ : the position of the pointed end;
- $(X_B, Y_B)$ : the position of the barbed end.
- Stalling/No-stalling state.

These pieces of information are stored in a Matlab array updated during simulations of  $N(t)$  rows and 6 columns,  $N(t)$  being the number of filaments in the population. Note that the last variable is set to 0, if the barbed end is outside any pattern domain, and to 1, if the barbed end is stalled against a pattern. Hence, in the case of no-crossing dynamics, this variable helps to save time by applying step 4 to relevant filaments only. In addition, the position of the pointed and barbed ends is sufficient to extract parameters of interest like the filament length or the position of any point along the filament.

***Artificial images.***

We generate model images by assuming that the pixel fluorescence is proportional to the density of filaments over the pixel. These images are calculated with an algorithm that deals with a grid (using the typical pixel size of an experimental image  $0.16 \times 0.16 \mu\text{m}$ ) in which each element is associated to the cumulated lengths of all actin filament pieces that are just above that element. This numerical array is therefore a representation of the pixel intensity of the model image.

## Modeling actin filament growth out of radial arrays

### *Geometry of the pattern and parameterization of the filament position*

The angle between actin filaments and the pattern bar main axis controls the transition between anti-parallel and parallel bundles and, by consequence, the spatial distribution of fluorescence along the bisecting line. From images (Figure 1d), we measured the angle  $\alpha(s)$  formed by the pattern main axis and the filament as a function of  $s$ , the position of the filament origin on the pattern (Supplementary figure 5a). The geometry of the pattern and the position of the filament origin on the pattern determine uniquely the intersection between the filament and the bisecting line (point M, Supplementary figure 5a). Therefore, we can express the vertical position of M, denoted  $f(s)$ , and the distance between points P and M, denoted  $l(s)$ , as function of the filament position,  $s$ , the angle  $\alpha(s)$  and the geometrical characteristics of the pattern (parameters  $d_0$  and  $\beta$ , Supplementary figure 5a):

$$f(s) = \frac{1}{2} \frac{d_0 (\sin \alpha(s) - \sin(2\beta + \alpha(s))) + s (\cos(\alpha(s) - \beta) - \cos(\alpha(s) + \beta))}{\sin \beta \sin(\beta + \alpha(s))} \quad (2)$$

$$l(s) = \frac{s(1 - \cos 2\beta) + 2d_0 \sin \beta}{\cos \alpha(s) - \cos(2\beta + \alpha(s))} \quad (3).$$

### *Distribution of the transition between anti-parallel and parallel bundles*

The existence and the spatial distribution of anti-parallel to parallel bundle transitions (Figure 4e) results from two independent causes: (1) anti-parallel bundles are favored if the angle between two filaments on the bisecting line is almost straight; (2) the presence of a bundle of parallel filaments prevents the formation of anti-parallel bundles further away from the radial array. We summarized these facts in the following set of hypothesis:

1. No bundle exists at the base of the pattern (ie at position A, Supplementary Figure 3);

2. The probability that a bundle of parallel filaments exists in the interval  $[y, y+h]$  is the sum of two mutually exclusive outcomes: either a bundle of parallel filaments exists in the domain  $[0, y]$ , with probability  $Q(y)$ , or there is no bundle of parallel filaments in  $[0, y]$ , with probability  $1-Q(y)$ , and one is created in the interval  $[y, y+h]$ , with probability  $p(y)$ .

3. The probability that a bundle of parallel filaments is created in the interval  $[y, y+h]$  is favored if the corresponding angle  $\alpha(s)$  (with  $y$  being given by equation 2) is close to  $\pi/2$ . For simplicity, we take

$$p(y) = \max(0, p_0(\alpha(s) - p_l)) \tag{4}$$

so only two parameters  $p_0$  and  $p_l$  have to be determined.

From assumptions 1 and 2, we know that the probability that at least one bundle exists in the domain  $[0, y+h]$  is the solution of the recurrence equation

$$\begin{aligned} Q(y + h) &= p(y)(1 - Q(y)) + Q(y), \\ Q(0) &= 0. \end{aligned} \tag{5}$$

The solution of equation (5) reads:

$$Q(y) = 1 - \prod_{k=0}^{y-1} (1 - p(k)). \tag{6}$$

The best fit for the experimental distribution is obtained for  $p_0=0.26$  and  $p_l=0.5$ , as shown in Figure 4G for the density  $q(y)$ .



## Modeling actin filament density within parallel bundle

We use the data and models presented in Figure 4e and 4g to generate the corresponding fluorescence distribution between two bars of the radial array. The horizontal and vertical positions of the transition between anti-parallel to parallel bundles are independent variables (chi-square test), with very simple distributions. The horizontal component is well approximated by a zero-average Gaussian distribution (standard deviation of  $0.9\ \mu\text{m}$ ) whereas the vertical component is given by the function  $Q$  (see previous section). Therefore, we use the following algorithm to determine the spatial distribution of fluorescence between the two rays of a radial array sector.

Step 1. Pick a point P on the pattern assuming a uniform distribution along the pattern. Let  $s$  be the distance of that point from the innermost point of the pattern.

Step 2. From  $s$ , get  $y_M=f(s)$ , the vertical position of M, with  $f(s)$  given by equation 2. The horizontal component of M, denoted  $x_M$ , is drawn from a Gaussian distribution (average zero and standard deviation of  $0.9\ \mu\text{m}$ ).

Step 3. Compare  $Q(y_M)$  and  $r$ , a random number given by the uniform distribution over  $[0,1]$ . If  $Q(y_M)<r$ , then go to Step 4; otherwise, go to Step 5.

Step 4. The filament belongs to a parallel bundle. Therefore, given the filament length  $L$  and  $l(s)$ , the distance between P and M, we obtain the vertical position of the barbed end position as:  $y_B=y_M+\max(0,L-l(s))$ . The horizontal position of B is already fixed at  $x_B=x_M$ . Note that the sign of  $x_M$  determines on which (left or right) ray of the pattern the point P lays. Note also that if  $L-l(s)<0$ , as it is the case close to the outermost point of the pattern, points B and M are identical.

Step 5. The filament is part of an anti-parallel array of filaments. We assume that point B is symmetrical to point P (vertical symmetry about the bisecting line) but on the opposite ray. Note that the length of filament is given by the distance of the segment line PMB.

***Matlab implementation.***

We use the Matlab package to simulate filament dynamics. In particular, the information associated with one filament

- date of birth,
- position of the pointed end ( $X_P, Y_P$ ),
- position of the middle point ( $X_M, Y_M$ ),
- position of the barbed end ( $X_B, Y_B$ ),

is stored as a row in a Matlab array. Using this information, we generate fluorescence images, as shown in Figure 4h, using the same algorithm presented in the previous section.

***Analytical expression of the fluorescence along the bisecting line***

The fluorescence along the middle line is the sum of all contributions from filaments that are nucleated on the two rays of the pattern (position of their pointed end) and ending in a bundle of parallel filaments on the bisecting line. Therefore, the contribution of such a filament to mid-line fluorescence at position  $\xi$  is proportional to  $U(\xi, y_M, y_B)$

$$U(\xi, y_M, y_B) = H(\xi - y_M)(1 - H(\xi - y_B))$$

$$H(x) = \begin{cases} 1, & x \geq 0 \\ 0, & x < 0 \end{cases} \quad (7)$$

where  $y_M$  and  $y_B$  are, respectively the position of the merging point and the filament barbed end on the bisecting line. Note that these two parameters,  $y_M$  and  $y_B$ , are

determined by the position on the pointed end on the pattern (see Supplementary Figure 5a).

For an arbitrary position  $s$  on the pattern, the probability that a bundle of parallel filament is formed is  $Q(f(s))$ . Hence, the contribution of one of these filaments to mid-line fluorescence at  $\xi$  is proportional to  $U(\xi, f(y), f(y) + \max(0, L - l(y)))$ , with  $l$  given by equation (2). Therefore, the total fluorescence associated to filaments starting in the interval  $[s, s+h]$  on the pattern is:

$$\Phi(\xi, s) = hQ(f(s))U(\xi, f(s), f(s) + \max(0, L - l(s))) \quad (8)$$

Finally, we obtain the total fluorescence at  $\xi$  by summing all contributions from the pattern

$$\begin{aligned} F(\xi) &= \int_0^{L_P} \Phi(\xi, s) ds \\ &= \int_0^{L_P} Q(f(s))U(\xi, f(s), f(s) + \max(0, L - l(s))) ds \end{aligned} \quad (9)$$

where  $L_P$  is the pattern length.

## 5. Supplementary References

- 1 MacLean-Fletcher, S. & Pollard, T.D., Mechanism of action of cytochalasin B on actin. *Cell* **20** (2), 329-341 (1980).
- 2 Spudich, J.A. & Watt, S., The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. *J Biol Chem* **246** (15), 4866-4871 (1971).
- 3 Isambert, H. *et al.*, Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem* **270** (19), 11437-11444 (1995).
- 4 Egile, C. *et al.*, Activation of the CDC42 effector N-WASP by the Shigella flexneri IcsA protein promotes actin nucleation by Arp2/3 complex and bacterial actin-based motility. *J Cell Biol* **146** (6), 1319-1332 (1999).
- 5 Almo, S.C., Pollard, T.D., Way, M., & Lattman, E.E., Purification, characterization and crystallization of Acanthamoeba profilin expressed in Escherichia coli. *J Mol Biol* **236** (3), 950-952 (1994).
- 6 Falck, S. *et al.*, Biological role and structural mechanism of twinfilin-capping protein interaction. *EMBO J* **23** (15), 3010-3019 (2004).
- 7 Machesky, L.M. *et al.*, Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (7), 3739-3744 (1999).
- 8 Achard, V. *et al.*, A Primer-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Networks Formation and Motility. *Current Biology* **in press** (2010).



## **Article 5**

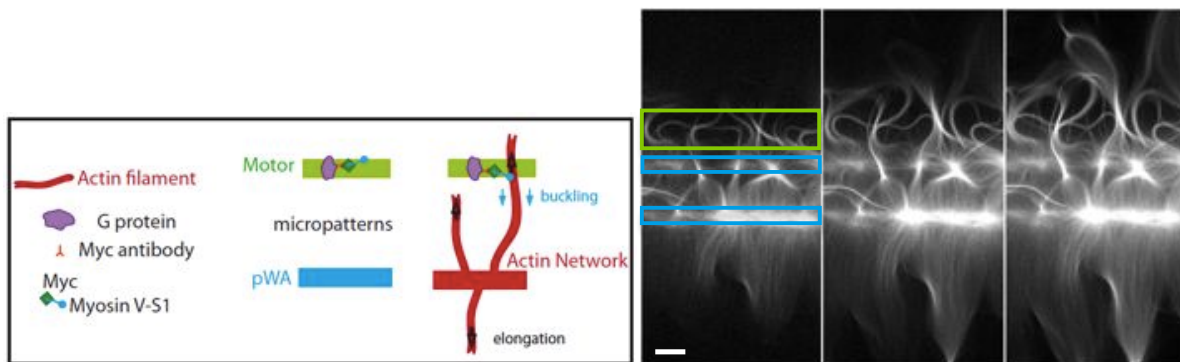
## Article 5. Reymann, en cours de rédaction

Finally, my last study (in progress) takes account of the use of this "micropatterning" technique in order to improve the understanding of the contraction mechanism induced by molecular motors which are myosins. The general question to which we are trying to answer is: **What are the properties of the mechanism of deformation, contraction and remodeling of an actin network of controlled architecture under the action of molecular motors?** On the one hand, a surface functionalization, on "micropattern", of the myosin processive VI HMM has allowed us to verify its directionality and to observe the deformation of an actin network under the action of localized traction forces (figure 1). On the other hand, the addition in solution of myosin, has allowed us to characterize certain simple principles of its functioning such as for example a selective interaction according to the architecture of the actin network (interdigitated and dense, antiparallel or parallel). In addition we have clearly studied the tension mechanism followed by deformation of the actin network only under the action of myosins where contraction is intimately coupled to a massive disassembly of actin filaments. This phenomenon has been suggested *in vivo* but remains relatively poorly characterized *in cellula* (Vallotton et al., 2004; Wilson et al., 2010). In addition, we show that this process depends strongly on the structure of the network (with protected zones or on the contrary completely destroyed), which could play an essential role in the spatial organization of zones of expansion and contraction within a cell.

This project began with a memorable collaboration with Enrique De La Cruz who spent a few months in sabbatical leave in our team during my first year of thesis. The excitation of the first "micropatterns" capable of correctly nucleating actin filaments (previous study) pushed us to test these in the presence of myosins (Enrique De La Cruz being a specialist in the field). A few weeks after his arrival, we received different types of purified myosins in his laboratory (myosin VI, construction with two heads, and myosin V, single-headed). It was thus that Enrique and I put our competences in common on this project which appeared to us at the time as utopian! Our first success was to specifically and simultaneously graft on micropatterns the pWA peptide, activator of the Arp2/3 complex, and active myosin VI. Two elements were essential for this success: on the one hand the use of a robust functionalization method with the help of antibodies, on the other hand the addition of a regenerative ATP system. It was not then our surprise to observe the capture, the tensioning and then the displacement of an entire network of actin filaments nucleated on an H surface under the action of molecular motors (The film is present in the CD joint: supplementary films / myosin VI).

Technically here is how we proceed for the grafting of molecular motors on the surface of micropatterns. In a first step it is necessary to create functionalized patterns with pWA according to the technique described in the article in Nature Materials. The lamellae are then dried gently (which does not lead to a large loss of activity) and then irradiated with UV a second time in order to generate a second set of "micropatterns". It then follows long steps of functionalization in cell culture for the grafting of myosin. The idea is to graft in a first step the protein G (support protein for antibodies), then to incubate the micropattern successively with anti-GFP antibodies (of type IgG2A and thus specifically recognized by protein G), with BSA (as a passivating agent for the still adhesive surfaces) and finally to introduce myosin-GFP properly. The whole is done on ice and followed by numerous washing steps. This technique, which involves the use of linker intermediaries on the surface, allows for a better

conserver l'activité des myosines une fois greffées. Finalement l'introduction d'un mélange réactionnel similaire à ceux utilisés en absence de myosine (avec ajout de MgATP et d'un système régénérateur d'ATP) déclenche alors la polymérisation d'actine sur les patterns pWA. Lorsque des filaments qui s'en échappent atteignent un "micropattern" avoisinant greffé de myosines VI, ceux-ci sont alors capturés puis mis sous tension avant d'être complètement tirés par les myosines processives remontant vers les extrémités pointues localisées au niveau de la zone nucléatrice. Ce qui a pour effet de décrocher la structure d'actine dense de sa surface nucléatrice (sans doute par détachement du pWA) et d'induire son déplacement en direction du pôle attracteur de myosine VI (figure 1). Puisque nous connaissions précisément l'orientation des filaments sur pattern nous avons donc confirmé la directionnalité des myosines VI. Cela nous a également permis de remarquer que sous l'action de forces de traction, un réseau d'actine généré par polymérisation sur "micropattern" possède une certaine cohésion lui permettant de se déplacer tout en gardant son architecture globale. En ce qui concerne la myosine V, un greffage identique (à cela près que l'on utilise la zone MYC présente sur cette construction et non la GFP comme cible d'anticorps) semble un peu plus délicat. Des essais similaires à ceux réalisés avec la myosine VI ont toutefois confirmé le sens de marche opposé de ces myosines V (voir figure ci-dessous 41). Dans ce cas-ci les myosines n'exercent pas de force attractive vis à vis de la structure d'actine mais au contraire induisent la formation de boucles dues à une marche vers l'extrémité barbée en croissance du filament (l'extrémité pointue étant bloquée au niveau de la zone nucléatrice).



**Figure 41: Formation de boucles de filaments d'actine induit par un tapis de myosine V fonctionnalisées**

A gauche, schéma du montage expérimental de fonctionnalisation double: pattern nucléateur d'actine (pWA, en bleu) et pattern de moteurs moléculaires (en vert) obtenu suivant le protocole de greffage de myosine sur un micropattern à l'aide d'anticorps décrit en détail dans le corps du texte ci-dessus. A droite, clichés de la croissance de filaments d'actine, avec formation de boucles au-dessus de la surface fonctionnalisée de moteurs moléculaires. Le même code couleur est utilisé pour représenter la localisation des différents patterns. Barre 5  $\mu\text{m}$ . Le film est présent dans le CD joint (films supplémentaires / myosineV-figure41).

Fort de ce succès et en vue de se rapprocher du système cellulaire, pour lesquels les myosines sont souvent libres d'interagir avec l'ensemble des réseaux d'actine et non pas solidement attachées en une localisation précise (comme la membrane cellulaire), nous avons ajouté ces mêmes myosines processives VI directement en solution. En solution les myosines sont libres de se déplacer le long de tous les filaments d'actine et s'accumulent au niveau des réseaux denses et enchevêtrés correspondant à ceux présents dans les limites des zones nucléatrices. L'abondance de filaments aux orientations isotropes (ou la multitude des sites d'interaction) agirait comme piège de ces moteurs moléculaires. Suite à leur accumulation



dans ces structures, l'on observe progressivement une déformation macroscopique des réseaux denses d'actine, qui finissent par se contracter complètement sur eux-mêmes concentrant ainsi myosine et actine dans un espace de plus en plus réduit (figure 2). Durant cette phase de collapse, les filaments doivent résister à d'importants stress mécaniques jusqu'à un point de rupture, prenant la forme d'une vague macroscopique de désassemblage massif de la structure d'actine décrite en figure 2. Si dans différentes études cellulaires (cf §5.2 chapitre motilité), un mécanisme de désassemblage du réseau d'actine induit par des myosines avait été suggéré, jusqu'à présent, aucune expérience *in vitro* ne pouvait le confirmer avec une telle clarté.

Ce qui semble particulièrement intéressant est que ce processus en trois étapes - tension, déformation puis désassemblage subit par les filaments d'actine sous l'action de myosines - soit dépendant de l'architecture du réseau d'actine. Cela en l'absence de tout système de régulation ou de signalisation extérieures. En effet, si une organisation de filaments en un réseau dense, généré par une nucléation locale par Arp2/3, est rapidement soumise à ce processus de déstructuration, au contraire une organisation en faisceau de filaments parallèles y est insensible poursuivant imperturbablement leur élongation progressive. Cela est particulièrement visible sur la géométrie en étoile dont les branches sont rapidement contractées les unes sur les autres puis progressivement engouffrées par un trou noir central de désassemblage alors que les faisceaux parallèles de type filopode, situé entre les branches, poursuivent leur élongation (figure 3). Cette différence pourrait découler du mode d'action de la contraction induite par des myosines. D'un point de vue moléculaire nous pensons qu'un moteur moléculaire processif tel la myosine VI a suffisamment de flexibilité interne pour que chacune de ses deux têtes marche sur un filament d'actine différent (schéma figure 2A). Selon cette hypothèse la polarité des deux filaments a donc toute son importance: la myosine faisant glisser deux filaments antiparallèles l'un contre l'autre ("sliding motion") et se déplaçant simplement le long de filaments parallèles ou agissant alors comme protéine de pontage. Ainsi une organisation auto-assemblée de filaments sur micropatterns contient en elle-même un moyen de contrôler la localisation et l'intensité des réorganisations induites par des moteurs moléculaires que sont les myosines VI.

Pour aller encore plus loin, nous nous sommes dit que la proportion de filaments de polarité mixte et antiparallèles présents au sein d'une structure pouvait influencer la vitesse de contraction de cette architecture. Les filaments parallèles agissant comme frein visqueux, les antiparallèles en tant que support à la production de force. Pour tester une telle hypothèse, nous nous sommes intéressés à la constriction de structures en forme d'anneau continu ou d'anneau discontinu formé d'une succession de points de nucléation (figure 4). Cette discontinuité génère des zones de réseau d'actine où les filaments sont organisés uniquement de manière antiparallèle, en augmentant ainsi leur proportion vis à vis des zones nucléatrices où la polarité y est mixte. Une analyse fine semi-automatique sur un grand nombre de structures a révélé un processus en trois phases: une première phase durant laquelle le réseau se densifie et accumule des myosines sans contraction, une seconde phase qui débute par le décrochement de la structure d'actine de sa zone de nucléation initiale et avec une constriction rapide et constante (durant laquelle la vitesse est maximale), et une phase finale de constriction lente. La comparaison des vitesses de constriction correspondant à la deuxième phase et durant laquelle le réseau n'est plus connecté à la surface, montre que cette vitesse est d'autant plus rapide que la proportion en filaments antiparallèles est grande. Cela de manière significative et reproductible.

Nous avons donc montré dans cette étude que la régiosélectivité de l'action des myosines vis à vis de différentes architectures d'actine pouvait avoir une influence importante sur le devenir de ces structures. Les vitesses de constriction sont également intimement liées à

l'organisation interne de ces réseaux. Ces propriétés pourraient expliquer en partie l'énigme cellulaire qui tient au fait que les moteurs moléculaires sont présents uniformément dans la cellule mais agissent spécifiquement de manière spatiotemporellement contrôlée.

# Actin network architecture determines myosin motor activity

Anne-Cécile Reymann<sup>1</sup>, Rajaa Boujemaa-Paterski<sup>1</sup>, Jean-Louis Martiel<sup>1</sup>, Wenxiang Cao<sup>2</sup>, Harvey F. Chin<sup>2</sup>, Enrique M. De La Cruz<sup>2</sup>, Manuel Théry<sup>1\*</sup> & Laurent Blanchoin<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>*institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, iRTSV, Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, FRANCE*

<sup>2</sup>*Department of Molecular Biophysics and Biochemistry, Yale University, New Haven, Connecticut, USA*

**Correspondence:** [manuel.thery@cea.fr](mailto:manuel.thery@cea.fr), [laurent.blanchoin@cea.fr](mailto:laurent.blanchoin@cea.fr)

## ABSTRACT

The organization of actin filaments into higher-ordered structures governs overall eukaryotic cell shape, mechanical integrity and directed movement. Global actin network size and architecture is maintained in a dynamic steady-state through regulated assembly and disassembly. Here, we use geometrically controlled and polarized in vitro actin structures to evaluate how myosin motors, that play a critical role in this process, influences network architecture. Direct visualization of filaments demonstrates the spectacular myosin-induced actin network deformation. We determine that during this reorganization myosins selectively contract and disassemble anti-parallel actin structures while parallel actin bundles remain unaffected. This “orientation selection” reveals how the spatial organization and dynamics of the cellular actin cytoskeleton is locally controlled by actomyosin contractility.

Actin filament networks are composed of a large variety of different structures. Their spatial organization supports complex cell shape regulation. Dynamics and mechanical properties of these structures result from the assembly of polarized actin filaments. Filopodia and retraction fibers are built of parallel filaments (1, 2). Stress fibers and transverse arc have filaments arranged in anti-parallel orientations (1-4). The lamellipodium is a dense array of cross-linked and randomly-oriented filaments (5).

Global actin network size and architecture is maintained in a dynamic steady-state through regulated assembly and disassembly, as well as through contractility and sliding driven by myosin motor proteins (6). Myosin motor proteins can also promote filament disassembly (7, 8), presumably through mechanical fragmentation. Collectively, these observations have supported a mechanism in which the coupling between myosin contractility and filament disassembly ensures a temporal synchrony between actin retrograde flow at the front and filament disassembly at the rear of migrating cells (8).

Central to this coupling mechanism is that filaments are selected for sliding or disassembly, but it is not known what factors determine response to myosin contractile forces (9). Here we use micropatterning methods to assemble geometrically controlled and polarized actin filament networks (10) to evaluate how the overall polarity of actin filament architectures determines their response – reorganization or disassembly – to myosin contractile forces.

Actin filament growth out of dense meshwork on nucleating micropatterned regions leads to the formation of parallel array of filaments with barbed ends oriented away from the micropattern (10). We evaluated the pointed-end directed and processive motor, myosin VI-HMM (11) on these oriented actin filaments (Fig. 1). The precise location of myosin surface-tethering with respect to these oriented filaments is controlled by a second micropatterning zone (Fig. 1A). The controlled actin filament orientation with barbed ends radiating outward predicts that myosin movement toward filament barbed ends would induce filament buckling,

while movement toward filament pointed ends would put filament under tension. We monitored actin filament growth and action of myosins by time-lapse fluorescence microscopy (Fig. 1B). As filaments grow and contact the grafted myosin motors, they attach (Fig. 1B, white arrows) and are pulled (Fig. 1B, blue arrows) by myosin, eventually leading to displacement of the entire network (Figs. 1B, S1).

We then analyzed the response of randomly-oriented filament networks, such as those found in cell lamellipodia. Here, the actin network is confined to grow on a large, 100  $\mu\text{m}$  wide band (coated with actin promoting factors) leading to an entangled actin organization (Fig. 2). Myosin VI is added in solution together with actin polymerization mix including Arp2/3 complex, profilin and actin monomers. GFP-tagged myosins and Alexa-568-labeled actin monomers allow following in real time actin growth and myosin-induced reorganization (Fig. 2A). Myosins interact with the self-organized actin architectures and lead to a clear three-phase process constituted by: the deformation of actin networks (Fig. 2A, distance between the yellow arrow heads), the densification of the actomyosin structure (Figs. 2A, increase in fluorescence red curve and 2D), tightly coupled to a massive filament disassembly (Figs. 2B decrease in fluorescence red curve after 1980 s, see green arrow and 2D). As filaments disassemble, myosins move on adjacent filaments, which leads to the formation and propagation of a spectacular disassembly wave over hundreds of microns (Figs. 2B, 2D). The combination of these processes has been proposed during actin structure remodeling by myosins (8, 12-14), but the observation of both actin filament and myosin in a purified system and in real time provides the first visual and unambiguous evidence of myosin's ability to disassemble actin network. In addition, myosin induced reorientation of crossed actin filaments leading to a progressive coalignment of filaments and further contraction (15, 16) (Fig. 2C).

The polarity of the filaments interacting with the myosins is critical and determines the response to myosin contractile forces. Anti-parallel filaments slide against each other leading to global contraction. As a result condensed actin filaments must resist increasing

mechanical constraints to a point of breakage, leading to a massive disassembly (Figs. 2B, 2D). Whereas parallel filaments guide myosins until they interact with a filament of different orientation propagating then the tensile forces without disassembling (Fig. 2B, blue arrows). This polarity determinant for selective contraction and disassembly of anti-parallel filaments by myosin was further tested on networks of controlled polarity.

We previously showed that filaments nucleated on eight branch radial array leads to the formation of bundles of anti-parallel in the most central part of the array and the formation of bundles of parallel filaments in the outer part of the array (10) (Fig. 3A). This defined distinction between zones containing parallel, anti-parallel or randomly-oriented network organization (Fig. 3E) enables characterization of the region-selectivity of myosin-induced reorganization (Fig. 3). The addition of myosin in solution on these controlled actin architectures lead to the rapid contraction of the anti-parallel and randomly-oriented zones (Fig. S2, arrows), followed by their massive disassembly (Fig. 3A, central black hole after 1640 s and Figs. 3B, C). The parallel networks remain unperturbed and continue to elongate until the monomers freshly released by central disassembly are consumed (Figs. 3B-D). These results demonstrate that myosin-induced contraction is specific to anti-parallel filaments and that myosin-induced disassembly of these structures further supplies actin monomers for the growth of parallel filament bundles.

These observations also suggest that in cells the local proportions of parallel versus anti-parallel bundles of filaments in actin networks could affect the local myosin-contraction rate. Parallel filaments would act as a viscous drag while anti-parallel ones would respond to the active motor contraction. We tested this hypothesis by comparing the effect of myosins on structures whose proportions of mixed polarity zones versus anti-parallel filaments zones were finely controlled (Fig. 4). On a full circle, filaments adopt random orientations (Fig. 4A). On dotted circles, filaments adopt random orientations on the dots but form specifically anti-parallel interactions in between the dots (Fig. 4A). The proportion of anti-parallel filaments is therefore inversely correlated to the number of dots. We monitored actin network contraction

and deformation upon the addition of myosin (Figs. 4B, C). Each sector of the circles (Fig. 4A) follows three distinct phases during remodeling (Fig. 4D). First, a delay phase during which filaments are aligned, resulting in network densification without producing net deformation. Second, a fast contraction phase with a constant rate, after network detachment from the nucleating region. Finally, a third phase during which the network is highly compacted at the circle center and the contraction slows down. We measured the rate of the fast contraction phase, as it reflects the main amplitude of change in sector size (Fig. 4D). The contraction rate increases as the proportion of anti-parallel filaments in the circles increases (Fig. 4E). Indeed, the rate of contraction is 2 times faster for high density dotted versus regular circles and more than 3.5 times for low density dotted versus regular circles (Fig. 4E).

Our results demonstrate that myosins contract and disassemble actin networks in a manner that depends on the actin filament orientations. Parallel filaments elongate and align whereas anti-parallel filaments disassemble. Such rules in myosins selectivity explain how their presence in the entire cellular space does not induce a global cell collapse but instead supports the overall spatial coordination of the different actin structures by regulating their reorganization.

## Methods Summary

### *Micropatterning*

Micropatterning of Nucleating Promoting Factor pWA was performed as previously described<sup>10</sup>. Micropatterns for myosin grafting (Fig. 1) were made following the same protocol of surface modification, after the grafting of pWA on a first set of micropatterns. Coverslides were then mounted in flow cells with adhesive double tape and coated successively with G protein (0.5 mg/ml), GFP-antibodies (160 µg/ml), BSA (5%) and GFP-HMM-myosin VI (80 nM).

### *Actin polymerization*

Protein mixtures were diluted in freshly prepared fluorescence buffer containing 10 mM imidazole-HCl (pH 7.8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM dithiothreitol, 3 mg/ml glucose, 20 µg/ml catalase, 100 mg/ml glucose oxidase, 0.6 mM ATP and 0.5 % methyl-cellulose to induce actin polymerization. An ATP regenerator system was also added to this mixture (2 mM MgATP, 2 mM Phosphoenolpyruvate (PEP), 100 U/mL Pyruvate kinase). Actin polymerization was induced in a solution containing 2 µM actin monomers (7 % labelled with Alexa-568), 6 µM profilin, 30 nM Arp2/3 complex and when so 8 nM of HMM-myosin VI (GFP labelled).

### *Image acquisition*

Images were taken using a straight BX61 Olympus microscope equipped with a 40x dry objective (UPLFLN, NA=0,75), a XY motorized stage (Marzhauser, Germany) and a CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, GmbH, Germany). Microscope and devices were driven by MetaMorph (Molecular Devices, downington, PA).

### *Image treatment and analysis*

All set of images were taken using the same light intensity and exposure time. However, before being overlaid, images grey scales were adjusted to have the same minimum and maximum grey values.

Fluorescence analysis (linescans of fluorescent intensities and kymographs, Figs. 2, 3 and S2) and the velocity of displacement (Fig. S1) were performed using Metamorph toolboxes. A specific semi-automated analysis of data was developed using ImageJ (J-Filament plugins (17)) and Matlab for the analysis of myosin induced-constriction of actin networks on patterned circles (Fig. 4), see Supplemental Methods.



## Figure Legends:

### **Fig. 1: Surface-tethered Myosin VI pulls on actin filaments and displaces actin networks**

(A) Schematic representation of the protocol of micro-patterned surface grafting dedicated to the study of fixed myosin-induced deformation of a simple patterned actin structure. (B) Time-lapse fluorescence microscopy of the elongation, tension and deformation of actin filaments nucleated on a micropatterned bar (actin monomers are labeled with Alexa-568) interacting with a patterned bar of grafted HMM-myosin VI (GFP labeled). The colored image is a combination of the acquisition of the myosin signal (green), as well as the first and last images of the actin fluorescence (respectively blue and red). The film is presented in supplementary data. Scale bar is 10  $\mu\text{m}$ .

### **Fig. 2: Myosin VI-induced actin meshwork contraction and disassembly**

(A, B) Time-series of the deformation of a large (100  $\mu\text{m}$ ) actin architecture induced by HMM-myosin VI in solution. Actin is represented in red, myosin in green. Graphs represent linescans of fluorescence intensity along a vertical line (A) or a horizontal line (B). In A, yellow arrows indicate the actin network contraction; in B, the green arrow underlies the direction of the disassembly wave and blue arrows point out resisting parallel bundles. (C) Schematic representation of a processive double-headed myosin interaction with actin filament networks or how processive double-headed myosins could induce macroscopic contraction of densely branched and randomly oriented actin networks. (D) Schematic representation: the network contraction induces actin densification and myosin accumulation followed by a wave of mechanical disassembly of the denser actin border. Scale bar is 20  $\mu\text{m}$ .

### **Fig. 3: Regioselective action of myosin contractility**

(A) Time-series of myosin-induced architecture selective contraction and disassembly, on an eight-branch actin nucleating radial array (actin, myosin and a color combine of both fluorescence are shown). The first line shows the control experiment in absence of myosin. (B) Kymograph of actin fluorescence along a parallel bundle (blue dashed line) and central region of actin filaments, showing the different localization of contraction, disassembly and elongation. (C) Graph of the integrated fluorescence intensity of a central zone (dashed green circle in A) and a parallel bundle (blue dashed line). (D) Graph of the variation of the length of parallel bundles overtime in absence or presence of myosins. (E) Schematic representation of the final architecture on an eight-branch actin nucleating radial array in absence and in presence of processive double-headed myosins in solution. Scale bar is 20  $\mu\text{m}$ .

### **Fig. 4: Proportions of anti-parallel versus parallel filaments regulate network contraction rates**

(A) Schematic representation of two actin networks nucleated on a full circle (random orientation of filaments) and a dotted circle (anti-parallel associations of filaments between adjacent dots, random orientation on dots). Green angular sectors represent the geometric divisions used during the analysis (according to the instantaneous barycenter). (B) Time-

series of myosin-induced contraction of actin networks nucleated from full (left) and dotted (right) circles. (C) Illustration of automated network contraction analysis. Each circle represents a time point. Length measurements were shifted in order to numerically synchronize the beginning of sector contraction. (D) Each contraction curve then adopted the same profile. Time series of length values (red dots) could be fitted by a lag phase, and two successive linear regressions (black line), first a fast contraction phase and second a slow contraction phase. (E) Values for the fast contraction phases were compared between full (red, n=527) and dotted circles with two width of separation: high density (green, n=72) and low density (blue, n=141). Low density dotted circles contracted more than three times faster as full circles and high density ones almost twice as fast. Mean  $\pm$  standard error as well as Gaussian fits are shown. Diameter of circles is 75  $\mu\text{m}$ .

## Acknowledgments

This work was supported by grants from Agence Nationale de la Recherche to L.B. (ANR-08-BLANC-0012), the American Heart Association (0940075N awarded to E.M.D.L.C.), the National Institutes of Health (GM071688 and GM071688-03S1 awarded to E.M.D.L.C.). E.M.D.L.C. is an American Heart Association Established Investigator, an NSF-CAREER Award recipient (MCB-0546353), and a Hellman Family Fellow.

## References

1. L. P. Cramer, M. Siebert, T. J. Mitchison, *J. Cell Biol.* **136**, 1287 (1997).
2. D. Vignjevic *et al.*, *J. Cell Biol.* **160**, 951 (2003).
3. P. Hotulainen, P. Lappalainen, *J. Cell Biol.* **173**, 383 (2006).
4. A. B. Verkhovskiy, T. M. Svitkina, G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* **131**, 989 (1995).
5. T. M. Svitkina, A. B. Verkhovskiy, K. M. McQuade, G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* **139**, 397 (1997).
6. C. Veigel, C. F. Schmidt, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 163 (2011).
7. L. Haviv, D. Gillo, F. Backouche, A. Bernheim-Groswasser, *J. Mol. Biol.* **375**, 325 (2008).
8. C. A. Wilson *et al.*, *Nature* **465**, 373 (2010).
9. C. M. Brawley, R. S. Rock, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 9685 (2009).
10. A. C. Reymann *et al.*, *Nat. Mater.* **9**, 827 (2010).
11. E. M. De La Cruz, E. M. Ostap, H. L. Sweeney, *J. Biol. Chem.* **276**, 32373 (2001).
12. S. Kohler, V. Schaller, A. R. Bausch, *Nat. Mater.* **10**, 462 (2011).
13. M. S. Silva *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 9408 (2011).
14. T. Thoresen, M. Lenz, M. L. Gardel, *Biophys. J.* **100**, 2698 (2011).
15. Y. Inoue, S. Tsuda, K. Nakagawa, M. Hojo, T. Adachi, *J. Theor. Biol.* **281**, 65 (2011).
16. Y. Tanaka-Takiguchi *et al.*, *J. Mol. Biol.* **341**, 467 (2004).
17. M. B. Smith *et al.*, *Cytoskeleton* **67**, 693 (2010).

## Supplemental Methods

### *Protein expression and purification*

Actin was purified from rabbit skeletal-muscle acetone powder. Actin was labeled on lysines with Alexa-568 according to Isambert and colleagues (S1). Arp2/3 complex was purified from bovine brain extracts as according to Egile and colleagues (S2). GST-pWA and human profilin were expressed and purified as described previously. Double-headed (referred to as HMM) myosin VI with bound calmodulin was purified from Sf9 cells by FLAG affinity chromatography (S3).

### *Semi-automated analysis of data*

Myosin induced constricting circles were first analyzed with ImageJ either manually (for dotted circles) or using the 2D JFilament plugins (for regular circles) to obtain the precise position of the denser actin gel as it constricts. These continuous contours obtained for regular circles were divided in small angular sectors using the instantaneous center of the actin structure. Data were analyzed using a Matlab program enabling the automated measuring of network deformation by the analysis of the constriction rate of all sectors of circles. Linear approximations were made to distinguish the different phases of movement (lag, rapid decrease and slow decrease) and determine the precise time point,  $t_0$ , corresponding to the beginning of the fast phase (linear phase with the maximum constriction velocity). For comparisons between different patterns and evaluation of proportions or means all curves were time shifted to zero at  $t_0$ . P values were obtained using Student tests.

## Supplemental Figures

### **Fig. S1: Velocity of actin network deformation by fixed myosins.**

(Left) Plot of the velocity (vertical displacement presented in Fig. 1) of the dense actin network along with time. (Right) Plot of the velocity of individual motor moving along parallel filaments. Mean was calculated from 4 different motors and 54 time points.

### **Fig. S2: Details of myosin-induced contraction on a complex architecture**

(A) Time-series of myosin-induced architecture selective contraction and disassembly, on an eight-branch actin nucleating radial array (actin, myosin and a color combine of both fluorescence are shown). (B) Schematic representation of the selective steps occurring during the contraction of this structure. (C) Double color kymograph along one branch of the array shown as the dotted line K1 in A.

## Supplemental Movies

**Movie 1: Tension and deformation of cohesive actin network by HMM-myosin VI.** Actin filaments nucleated from a micropatterned bar (4  $\mu\text{m}$  width) coated with pWA, elongate and undergo tension and deformation as they interact with HMM-myosinVI spotted on an adjacent micropattern. Total elapsed time is 33 min and compressed to a 4-second QuickTime movie, that corresponds to the time-lapse series in Figure 1.

**Movie 2: Myosin-induced mechanical disassembly of actin meshwork.** Deformation of a large actin entangled network (100  $\mu\text{m}$  width) induced by HMM-myosinVI present in solution. Actin is represented in red, myosin in green. A mechanical disassembly wave of actin propagates from a denser actin spot present on the bottom border. Actin is represented in red, myosin in green. Total elapsed time is 69 min and compressed to a 10-second QuickTime movie, that corresponds to the time-lapse series in Figure 2.

**Movie 3: Dynamic organization of actin architectures assembled on an eight-branch nucleating radial array in absence of myosin.** Width of the bars is 4  $\mu\text{m}$ . Total elapsed time is 79 min and compressed to a 10-second QuickTime movie, that corresponds to the time-lapse series in Figure 3A.

**Movie 4: Regioselective myosin-induced contraction and disassembly of complex actin architecture.** Kinetic of myosin-induced architecture selective contraction and disassembly, on an eight-branch actin nucleating radial array. As the denser entangled nucleating zones and the anti-parallel links between them rapidly contract and disassemble, the parallel bundles keep on elongating without perturbation. Width of the bars is 4  $\mu\text{m}$ . Total elapsed time is 90 min and compressed to a 10-second QuickTime movie, that corresponds to the time-lapse series in Figure 3A.

**Movie 5: Myosin-induced contraction of actin network nucleated on a full circle.** The circle is 75  $\mu\text{m}$  in diameter. Total elapsed time is 38 min and compressed to a 7-second QuickTime movie, that corresponds to the time-lapse series in Figure 4.

**Movie 6: Myosin-induced contraction of actin network nucleated on a dotted circle.** Actin filaments are nucleated and orient randomly on each dot, while they elongate radially and form specifically anti-parallel associations with those emanating from adjacent dots. The circle is 75  $\mu\text{m}$  in diameter. Total elapsed time is 17 min and compressed to a 3-second QuickTime movie, that corresponds to the time-lapse series in Figure 4.

### Supplemental References

- S1. H. Isambert *et al.*, *J. Biol. Chem.* **270**, 11437 (1995).
- S2. C. Egile *et al.*, *J. Cell Biol.* **146**, 1319 (1999).
- S3. J. P. Robblee, A. O. Olivares, E. M. de la Cruz, *J. Biol. Chem.* **279**, 38608 (2004).

Fig. 1 : Surface-tethered Myosin VI pulls on actin filaments and displaces actin networks.

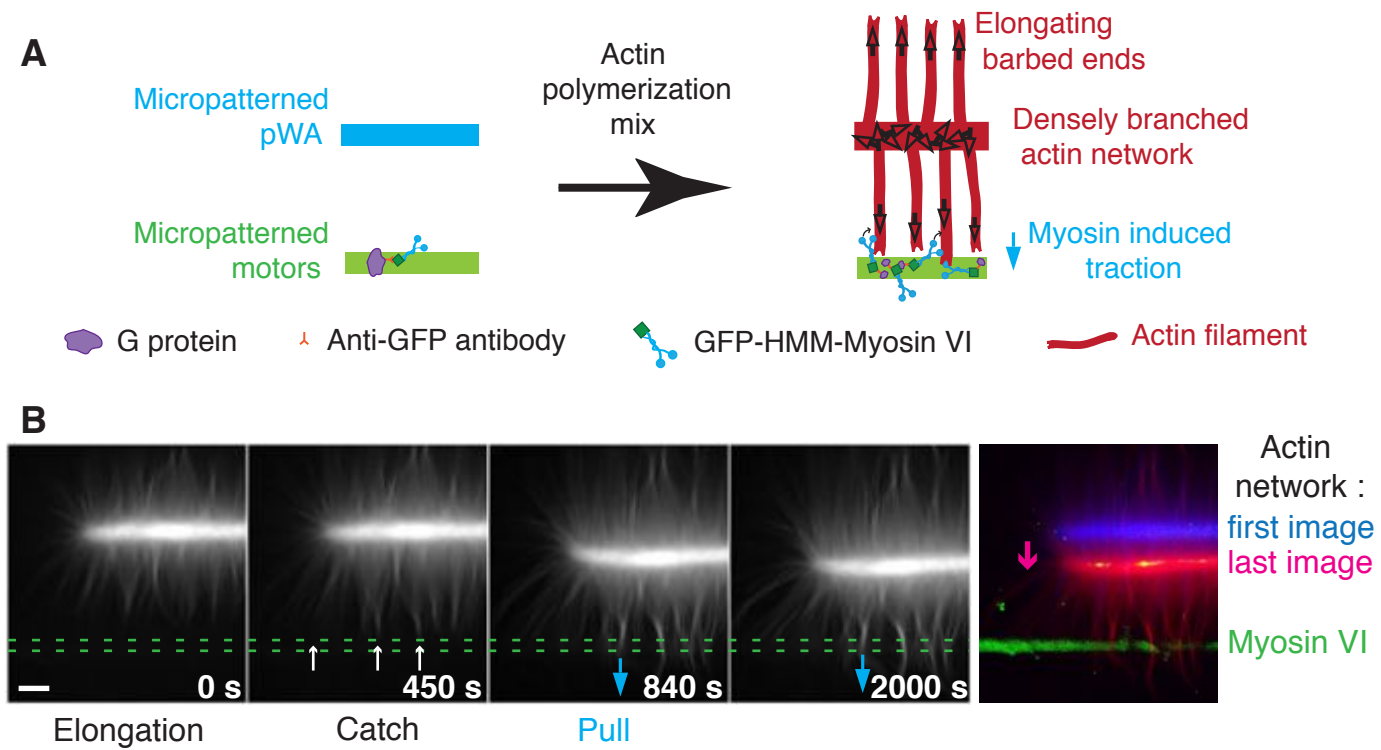
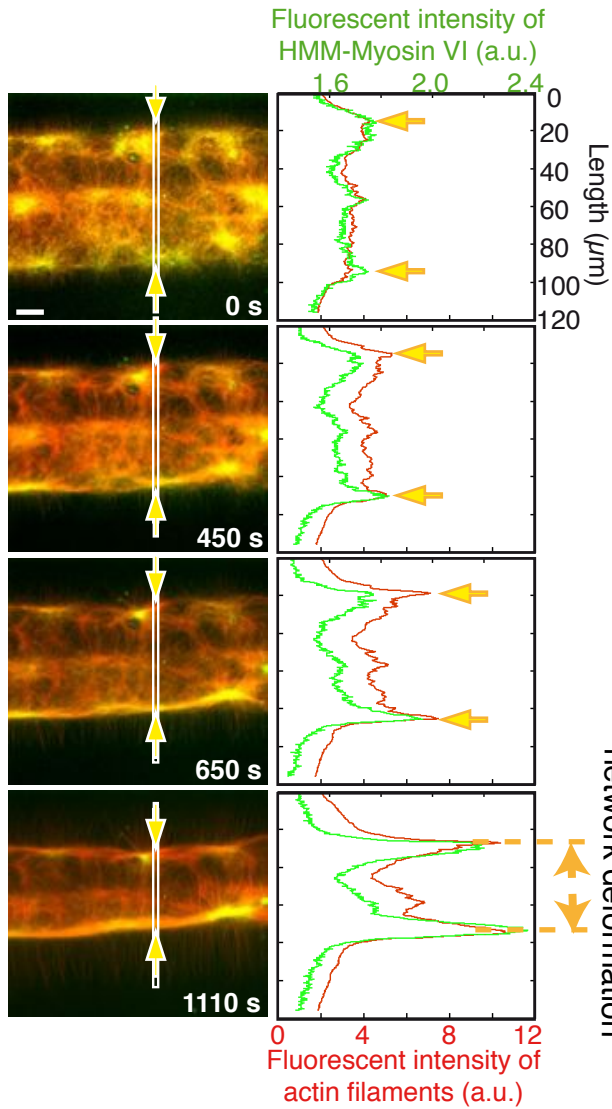


Fig. 2 : MyosinVI-induced actin meshwork contraction and disassembly.

**A** Actin meshwork contraction



**B** Disassembly wave

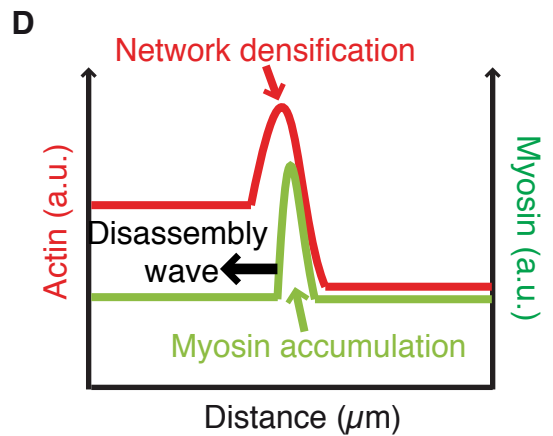
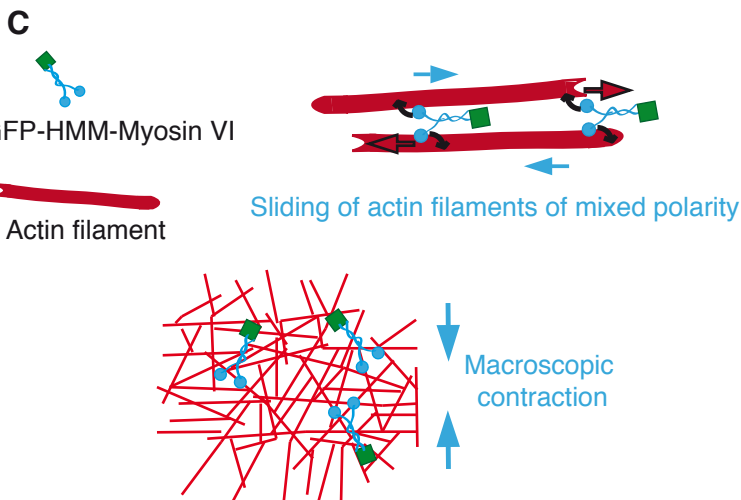
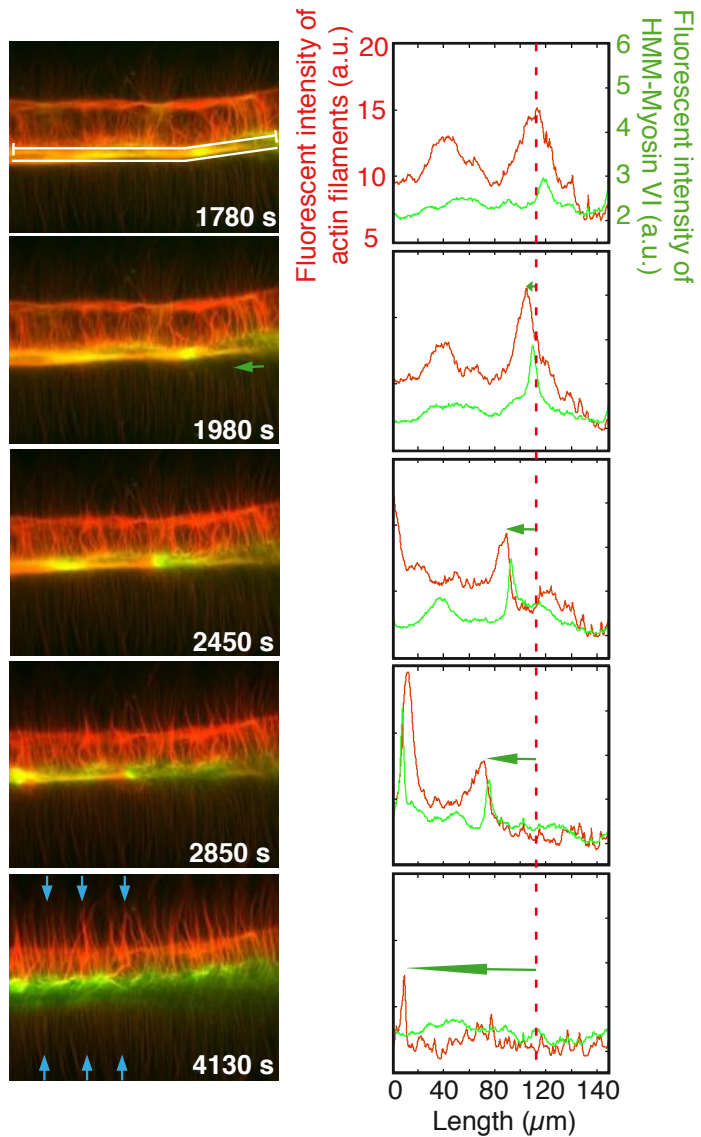


Fig. 3 : Regioselective action of myosin contractility.

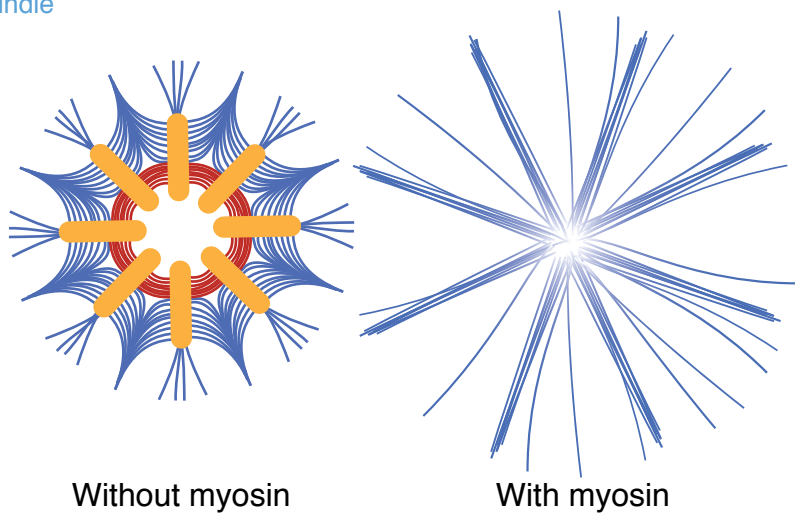
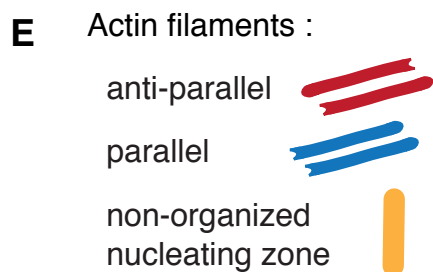
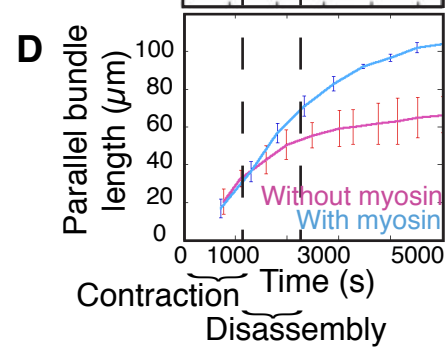
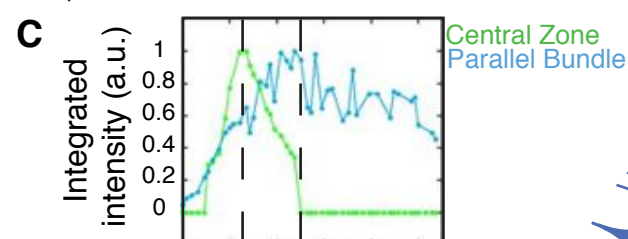
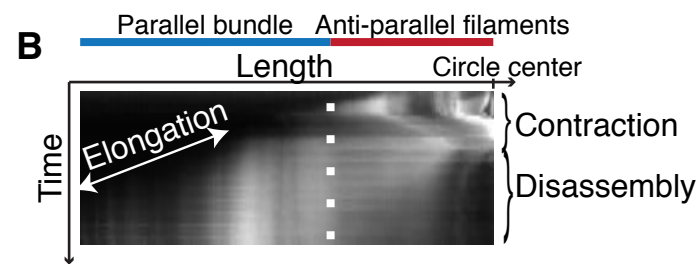
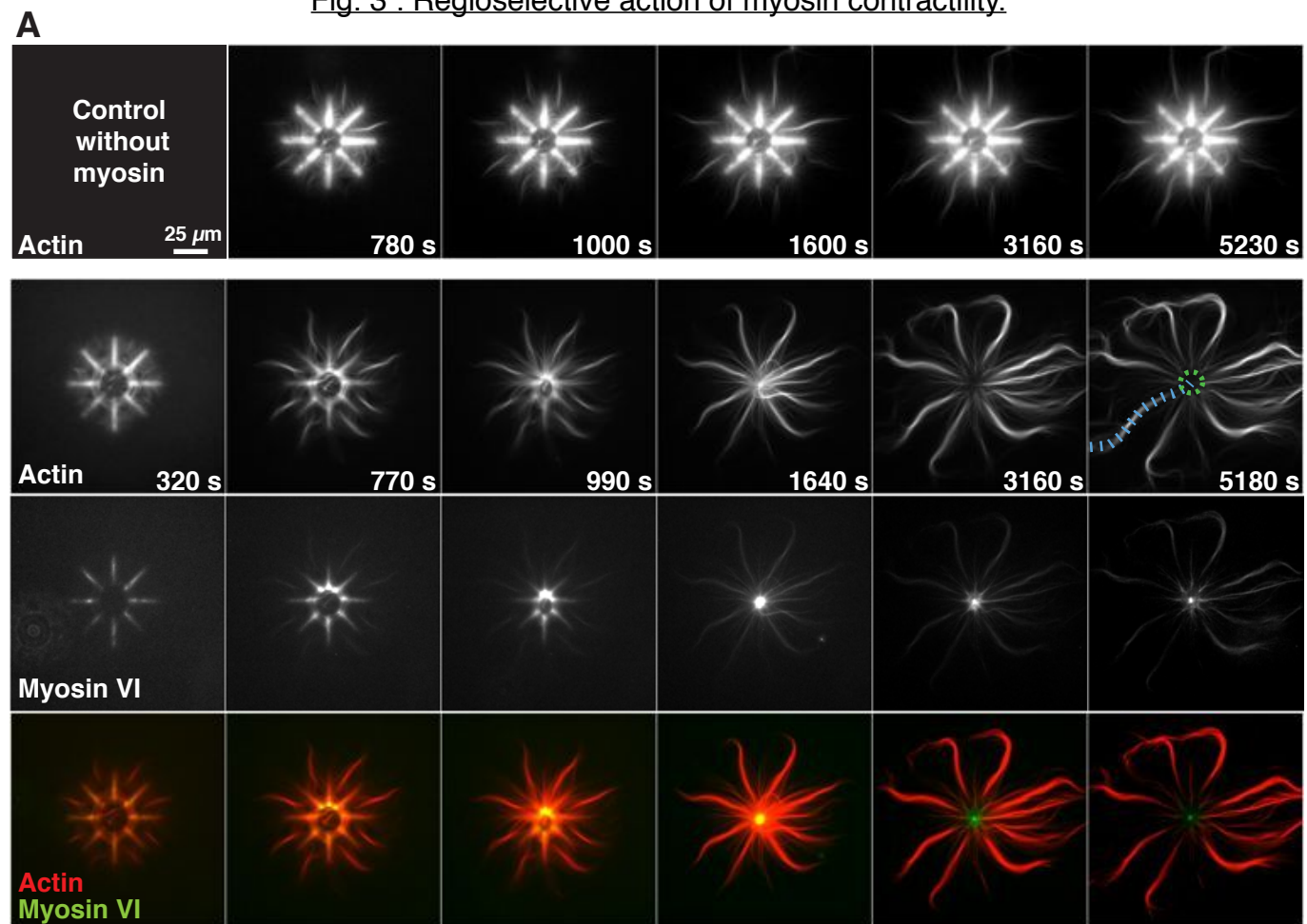




Fig. 4: Proportions of anti-parallel versus parallel filaments regulate network contraction rates.

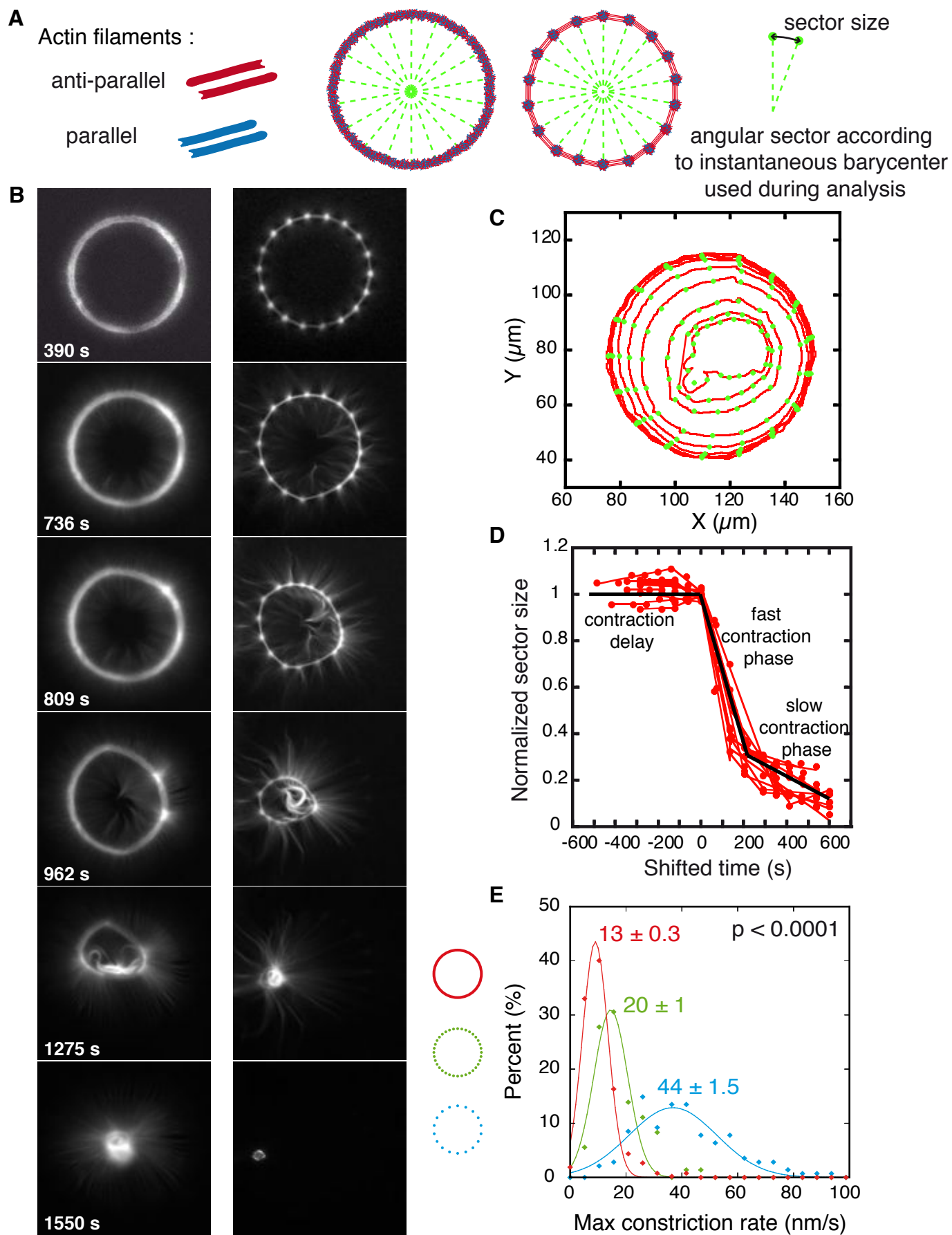


Fig. S1 : Velocity of actin network deformation by fixed myosins.

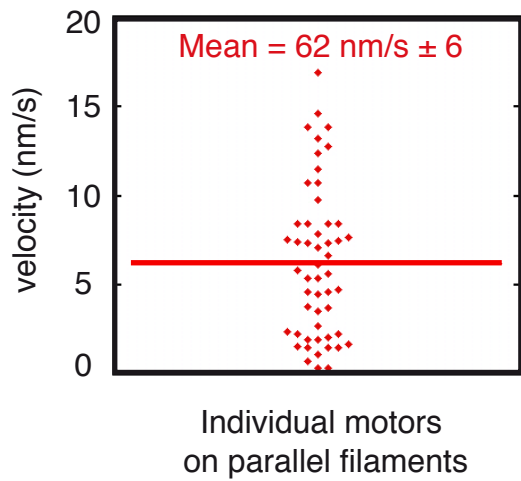
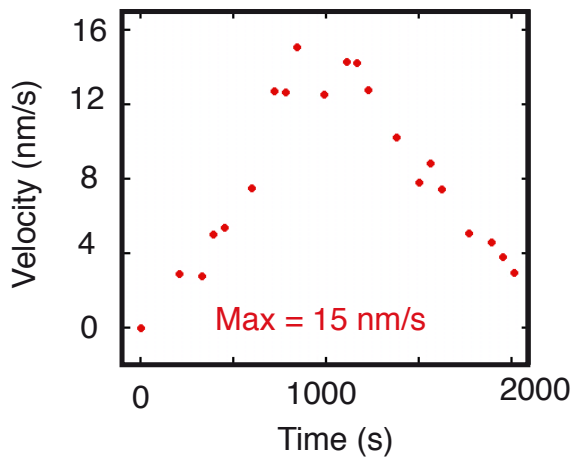
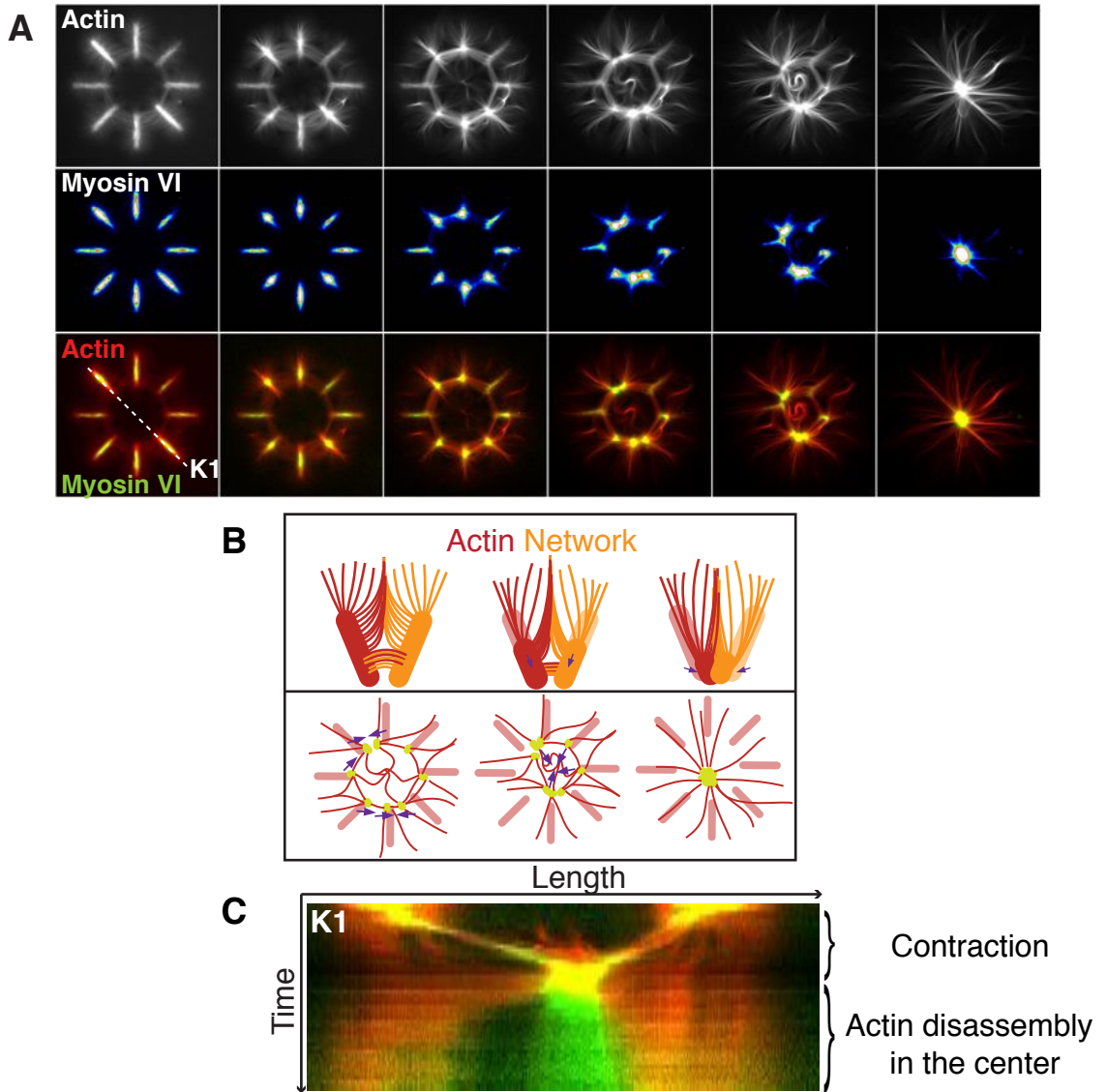


Fig. S2 : Details of myosin-induced contraction on a complex architecture.



## **Discussion et Perspectives**

Cette partie discussion et perspectives de l'ensemble de mon travail de thèse s'articule selon les deux axes principaux de mon projet : Comment s'organise spontanément un réseau d'actine suivant le contexte biochimique mais également physique ? Quel est l'effet dynamique et mécanique de certaines protéines interagissant sur de tels réseaux ?

## 1. Une organisation spontanée

Ce point fut pour moi l'élément déclencheur de ma curiosité lors de ma première rencontre avec ce polymère biologique qu'est l'actine. Le fait que celui-ci s'assemble spontanément (et véritablement sous nos yeux dans un contexte *in vitro*) d'une manière auto-organisée qui s'adapte au contexte biochimique et géométrique de son environnement reste pour moi fascinant...

### 1.1. Contexte biochimique

En toute logique, le contexte biochimique a une importance majeure dans la mise en place d'un réseau d'actine aussi bien *in vitro* que dans l'environnement clos d'une cellule. La palette des protéines présentes, leurs concentrations respectives et comparatives, la concentration en sel ou en ATP, la viscosité du milieu sont autant d'éléments pouvant faire basculer la balance d'un côté comme de l'autre.

Au cours de ma thèse, je me suis essentiellement intéressée à des réseaux d'actine initiés par nucléation, par le complexe Arp2/3, localisée à la surface d'un objet (bille, baguette ou "micropattern"). Nous avons déjà vu que de part la nature de ce nucléateur d'actine, dépend la géométrie de la structure formée: dense et branchée. Sans ingrédient supplémentaire, la concentration en complexe Arp2/3 (ou en activateur de ce complexe, ce qui revient exactement à la même chose) et la quantité de filaments "primer" contrôlent déjà aussi bien le degré de réticulation que la distance interbranche, la cinétique et la multiplicité des zones en expansion... Des aspects qui modulent déjà les propriétés mécaniques du réseau d'actine formé.

Si l'on ajoute à cela la présence de protéines de coiffe (par exemple CP) tout change. A forte concentration le système reste complètement bloqué sans possibilité de croissance. A faible concentration la géométrie de la structure n'est pas perturbée mais les filaments sont plus courts, favorisant déjà la nucléation au dépend de l'élongation. A une concentration optimale, c'est toute l'organisation du réseau qui semble comme inversée. Par exemple une bille recouverte de NPF en absence de CP formera une structure en forme d'étoile où les zones de polymérisation active sont très vite éloignées de l'objet central (extrémités barbées s'allongeant à l'extérieur de ce pôle de nucléation, (Achard et al., 2010; Vignjevic et al., 2003). Ajouter à cela CP en concentration optimum et vous obtiendrez dans un premier temps une structure anisotrope en forme de coque, zone "morte" à l'extérieur et zone de polymérisation active maintenue et favorisée au contact immédiat de l'objet uniquement. Des suites d'une brisure de symétrie ce réseau aboutit à la formation d'une comète propulsive d'actine. La présence de cette seule protéine supplémentaire conduit donc à la transition d'un système ordonné de filaments parallèles centripètes et flexibles, en un gel cohésif, capable de soutenir la propulsion d'objets de taille micrométrique. Une véritable révolution mécanique pour un réseau d'actine!

La perspective la plus novatrice vis à vis du contexte biochimique *in vitro*, telle que je l'ai étudiée, serait la combinaison avec un système microfluidique performant. Jusqu'à présent, la seule solution dont je disposais pour modifier en cours de cinétique la composition biochimique de mes systèmes était d'effectuer des expériences dites en goutte, système ouvert sur lamelle de verre à observer sur un microscope inversé. Goutte dans laquelle l'on ne peut qu'espérer ajouter un constituant et non modifier véritablement le mélange réactionnel. Les inconvénients de cette technique sont nombreux. Premièrement, l'on ne contrôle pas réellement la concentration des protéines que l'on ajoute (l'effet est localement important sans possibilité d'homogénéisation), et lors de cet ajout la génération de flux pouvant perturber l'organisation de notre système est fort probable. Finalement, puisque ce système est ouvert dans une atmosphère non contrôlée, l'évaporation de cette goutte est importante ce qui réduit d'autant les temps d'observation. L'ensemble de ces problèmes pourrait être résolu si l'on disposait d'un système micro fluidique de qualité répondant aux critères suivants: un contrôle des flux propres au niveau des structures observées, une possibilité d'entrée séquentielle de différentes solutions sans flux ni bulles, des volumes morts réduits, un système compatible avec une observation de qualité sous microscope.

## 1.2. Contexte physique

Le contexte physique, et par-là j'entends de manière générale l'environnement physique du système étudié, est à la fois influencé par et influence lui-même l'architecture d'un réseau d'actine. Bien évidemment, les paramètres géométriques concernant la localisation des zones de nucléation sont de grande importance. Dans les systèmes biomimétiques usuellement associés à l'étude du cytosquelette d'actine (bille, vésicule lipidique), la marge de manœuvre est très faible, principalement associée à des changements de taille et de nature (solide ou fluide) des objets. C'est pourquoi l'apport versatile de la technique de micropatterning a considérablement modifié notre approche vis à vis du contexte géométrique. Et si en absence de protéines régulatrices de l'actine, dans un contexte biochimiquement connu et contrôlé, la géométrie des zones de nucléation pouvait à elle seule dicter des propriétés d'organisation du réseau d'actine ainsi créé ?

En effet, nous avons montré dans l'article 2 que des propriétés biochimiques intrinsèques aux filaments d'actine induisent des lois physiques dans la nature des réseaux formés. Deux barres nucléatrices se faisant face avec un angle donné construisent une architecture d'actine à trois éléments: des zones extrêmement denses où les filaments sont courts, branchés et intriqués, une zone ordonnée de filaments antiparallèles et interdigités, véritable pont entre les zones précédentes, et une dernière zone pour laquelle les filaments se sont déformés et déviés de leur trajectoire originelle pour se rassembler en un faisceau de filaments tous parallèles. Nous avons également montré qu'au contact d'un obstacle, suivant la rigidité des filaments d'actine (longs ou courts), ceux-ci cessent, ou non leur élongation. Un aspect que l'on retrouve aussi dans le contexte des billes pour lesquelles on parle de pression stérique due à cette coque morte figée par la présence de CP et bloquant la nucléation de nouveaux filaments au voisinage de l'objet. Ainsi la pression stérique interne à l'organisation du réseau d'actine (induite par une densité forte en filaments), tout comme son environnement physique extérieur (barrière souple ou rigide formée par un objet extérieur), sont des acteurs essentiels dans la construction d'une architecture d'actine. Cet aspect est à mon avis tout aussi important dans une cellule où, géométrie de l'organisation du cytosquelette, géométrie des zones de nucléation, et densité en organelles ou autres structures doivent rétroactivement

physiquement jouer un rôle des plus importants dans la réorganisation perpétuelle du cytosquelette d'actine.

Une variation de nombreux autres paramètres du contexte physique est également envisageable. Grâce à une utilisation d'un support mou comme du PDMS, l'on peut par exemple moduler la rigidité de surface, modifiant ainsi les interactions entre le réseau d'actine et son environnement. Cette technique apporterait également un avantage indéniable de quantification des forces induites par la polymérisation d'actine. Ce qui est fait couramment dans de nombreuses études cellulaires. L'on pourrait aussi imaginer modifier les zones de nucléation en cours de cinétique de formation d'un réseau d'actine: les augmenter ou les réduire à l'aide par exemple de la technique de patterning en directe à l'aide d'un laser UV. Ou combiner des zones nucléatrices de nature différente (complexe Arp2/3 et formine) et ainsi explorer les interactions mécaniques entre deux types de réseaux biochimiquement différents. Et pourquoi pas non plus passer de la 2D à la 3D...

## 2. Effet dynamique et mécanique de protéines associées à l'actine

Certaines protéines interagissant avec l'actine, ont l'étonnante capacité de modifier à la fois le contexte biochimique et physique du réseau avec lequel elles interagissent. Au cours de ma thèse, j'ai intimement côtoyé deux d'entre-elles: ADF/cofiline et myosine.

### 2.1 ADF/cofiline

Comme nous l'avons vu, l'ADF/cofiline introduit une hétérogénéité mécanique à l'échelle du filament grâce à une cinétique d'association biochimiquement contrôlée (liée à l'état nucléotidique du filament d'actine) et à une rétroaction positive (accélération de la dissociation du phosphate des sous-unités adjacentes). Ceci a un impact fort sur la cohésion mécanique de la structure du filament d'actine partiellement décoré puisque aboutissant finalement à la fragmentation de celui-ci dans une zone de transition de ses propriétés mécaniques (article 3).

A l'échelle d'une structure macroscopique que sont les comètes d'actine, nous avons vu que l'ADF/cofiline s'associe au sein de ce gel dense suivant les mêmes mécanismes de régulation spatiotemporellement contrôlés liée au vieillissement de la structure d'actine (article 2). De plus, par son action de fragmentation à l'échelle microscopique, la présence importante d'ADF/cofiline introduit des fragilités mécaniques au sein d'un réseau préalablement cohésif. Cela aboutit à des pertes de matériel d'ordre macroscopique, contrôlant ainsi la longueur de la comète propulsive et permettant sans doute également *in vivo* le recyclage des structures d'actine. En effet, le système étudié ici est l'analogie biomimétique des structures présentes au sein du lamellipode qui sont capables de propulser la membrane plasmique pour induire la motilité cellulaire. Mieux comprendre son fonctionnement permet d'aboutir à une meilleure compréhension de la biomécanique cellulaire, en s'affranchissant de tout système de régulation (signalisation ou génétique), hormis celles intrinsèques aux propriétés biochimiques et mécaniques de telles structures.

Dans une cellule, nous avons vu que la question de la vitesse de recyclage des structures d'actine est essentielle afin de contrer une polymérisation abondante. Ce recyclage ne peut pas reposer uniquement sur les propriétés intrinsèques des filaments d'actine, ni attendre simplement un vieillissement de filaments en élongation rapide permettant l'action déstabilisatrice de l'ADF/cofiline. *In vivo*, cela est sans doute le résultat d'un nombre impressionnant de protéines interagissant avec l'actine, participant toutes à des degrés divers. Par exemple, de part son effet de coiffe contrôlant la longueur des filaments, CP module l'efficacité de fragmentation par ADF/cofiline. C'est ainsi que des filaments courts mais vieillissant pourront tout de même subir des fragmentations successives aboutissant au recyclage des monomères d'actine (article 2). De plus, comme nous l'avons vu la présence de CP module la localisation des zones globalement en expansion et par-là même la localisation des zones non actives les plus sujettes à l'action d'ADF/cofiline. C'est pourquoi l'on peut dire qu'il existe une synergie entre CP et ADF/cofiline aboutissant à un couplage fort entre biochimie et mécanique.

### 2.2. Myosine

La combinaison entre microfabrication et moteurs moléculaires se révèle être riche en informations. Les études *in vitro* réalisées précédemment en vue de mieux comprendre les



phénomènes de motilité et contraction liée à l'action de myosines sur filaments d'actine se faisaient aux deux extrémités de l'échelle micrométrique. A l'échelle du filament individuel, l'on discerne principalement deux types d'expériences. Des expériences faites à l'aide de pinces optiques idéales pour une meilleure connaissance des interactions moléculaires entre filament et moteur moléculaire et pour une quantification des forces développées par les différentes myosines.

Des expériences du type "gliding assay", où des filaments d'actine individuels ou en faisceaux sont déplacés sous l'action de myosines greffées sur une surface, et principalement utilisée pour décrire le principe de motilité induite par moteur moléculaire (Beausang et al., 2008) ou la génération d'ordre ("polar pattern formation") dans un contexte dense (Schaller et al., 2010). Des expériences de ce dernier type semblent être faibles en information vis à vis des processus présents au sein d'une cellule mais se révèlent être un outil potentiellement fort intéressant en vue d'utiliser des moteurs moléculaires pour diriger et délivrer des cargos au sein de microfabrications (Korten et al., 2010; Sundberg et al., 2006a; Sundberg et al., 2006b; Takatsuki et al., 2011). A l'autre bout de l'échelle, on retrouve des analyses de l'ordre d'une centaine de micromètres décrivant en "bulk" la contraction de réseaux d'actine sans structure particulière sous l'action de myofilaments de myosine II et en nécessitant la présence de protéines de pontage. L'intérêt est là mais les faibles possibilités de visualisation du phénomène rendent l'analyse de telles études difficiles (Bendix et al., 2008; Inoue et al., 2011; Koenderink et al., 2009; Kohler et al., 2011; Tanaka-Takiguchi et al., 2004).

Grâce à l'utilisation de "micropatterns", le potentiel de telles expériences peut être considérablement accru puisqu'ils permettent un contrôle précis de la polymérisation d'actine induisant des architectures reproductibles et versatiles. L'on peut imaginer d'une part organiser à volonté la polarité et la géométrie des filaments d'actine, ou au contraire la localisation précise des moteurs moléculaires greffés, afin d'étudier les propriétés motrices des myosines ou diriger le transport de cargos moléculaires. D'autre part, comme montré dans l'article 5, de tels systèmes permettent une meilleure visualisation mais surtout un contrôle bien plus important des structures d'actine, supports de la contraction induite par des moteurs moléculaires en solution.

Deux propriétés essentielles de la contraction induite par myosine ont pu être formalisées par cette étude. Premièrement, le couplage entre contraction et désassemblage, précédemment invoqué dans la cellule au cours de la motilité ou de la cytokinèse comme nous l'avons vu en chapitre 5. Cet aspect, décrit comme une accélération du recyclage ("turnover") de l'actine induite par les myosines, a également été invoqué dans quelques études *in vitro* (Haviv et al., 2008) sans qu'une visualisation dynamique ne soit possible ni que les mécanismes n'en soient véritablement expliqués. Dans notre cas, nous observons clairement ce couplage spatiotemporel entre contraction et désassemblage d'un réseau dense d'actine sous l'action de myosines processives. Contrairement à Haviv et collaborateurs, nous pensons que la myosine n'accélère pas la dépolymérisation d'actine (c'est à dire la perte de sous-unités d'actine au niveau de ces extrémités) mais induirait plutôt des fragmentations successives de filaments des suites d'une accumulation de stress mécanique. Tout comme pour l'ADF/cofiline, ces mini fragments d'actine sont libres de diffuser et sans doute de dépolymériser pour participer au recyclage de la masse d'actine filamentueuse.

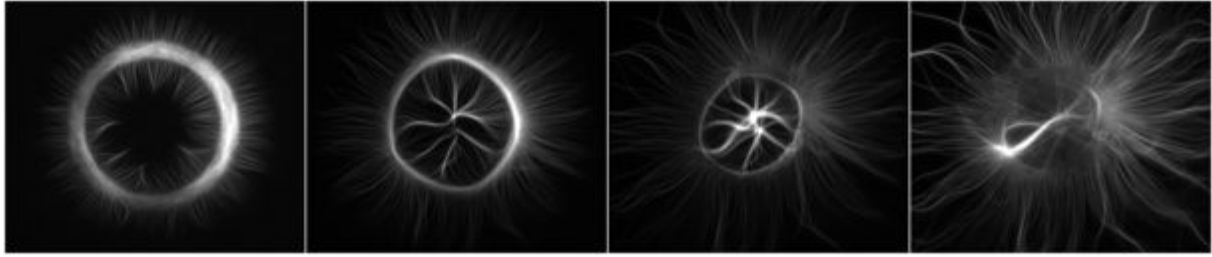
Deuxièmement, nous avons montré que cette contraction couplée à un désassemblage a la particularité d'être régiosélective. C'est à dire que l'architecture du réseau d'actine va diriger l'impact de la réorganisation dynamique induite par des myosines. Les structures parallèles formées par des filaments de même polarité de types filopodes ne seront pas

affectées et continuent leur croissance alors qu'au contraire les zones denses de polarité mixte ainsi que les régions où les filaments sont antiparallèles seront rapidement soumises à de fortes contractions puis seront progressivement désassemblées pour finalement disparaître complètement (article 5).

Bien évidemment, dans la continuité de cette étude, il nous reste à préciser la dépendance de ces propriétés vis à vis du type de moteur moléculaire utilisé. Des éléments comme la directionnalité de la marche de la myosine, son degré de processivité, sa structure (monomère, dimère, myofilament), pourraient avoir une influence sur les mécanismes de contraction et de désassemblage que nous avons observés.

La localisation cellulaire de la machinerie contractile dépendant de l'actine et de myosines est sans doute un élément essentiel afin de déterminer le destin d'une cellule ou de la structure d'un tissu. En connaître les paramètres importants pourrait se révéler des plus instructifs pour notre compréhension de la division cellulaire et de la morphogénèse. Si l'on a montré *in vitro* que l'activité (contraction et désassemblage) de la myosine est architecture d'actine - dépendante, il a également été publié qu'une régulation du recrutement de la myosine par la tension est effective *in vivo* (Fernandez-Gonzalez et al., 2009; Pouille et al., 2009; Ren et al., 2009). Une suite de l'étude présentée ici concernant la dynamique d'actomyosine sur réseaux d'architecture contrôlée à l'aide de micropatrons, pourrait être de tester cet aspect mécanosensible. Cela nécessite sans doute au préalable une caractérisation de la réponse mécanique de réseaux d'actine en présence de moteurs moléculaires. Pour ce faire une mesure physique des propriétés mécaniques de tels systèmes devra être effectuée, en utilisant par exemple le technique d'AFM ("Atomic force microscopy", microscope à force atomique).

La cellule est un intermédiaire entre un état stationnaire et un état contractile aussi bien d'un point de vue géographique (avec des zones d'assemblage dirigé ou de destruction plus ou moins importante) que d'un point de vue chronologique (avec une alternance des phases de croissance, de contraction et de désassemblage). Une limitation du système biomimétique exposé dans l'article 5 est que nous ne maîtrisons pas réellement cet état intermédiaire. En effet dans notre système, une fois la croissance du réseau d'actine et sa destruction complète sous l'action des myosines, nous ne pouvons repartir à zéro ni aboutir à un système oscillatoire, similaires à ceux décrits *in vivo* (He et al., 2010; Martin, 2010; Martin et al., 2009). Il est également difficile d'arrêter le processus de destruction totale pour, par exemple, se maintenir dans un état d'équilibre quasi stationnaire, comme l'est une cellule motile. Deux pistes sont peut être à exploiter afin de moduler les aspects figés de l'évolution de nos structures *in vitro*, d'une part par ajout de régulateurs protéiques interagissant avec l'actine ou la myosine, d'autre part à l'aide d'une évolution contrôlée des concentrations en protéines ou en ATP à l'aide d'un système microfluidique performant. Au cours de ma thèse, j'ai commencé à tester ce premier point en ajoutant à ce système des protéines de pontage, comme l' $\alpha$ -actinine (figure 42). L'analyse et la quantification de ces données préliminaires indiquent que ces protéines de pontage entraînent une modification de la mécanique du réseau d'actine, et ont tendance à modifier la dynamique de la contraction ainsi que à augmenter le poids du désassemblage dans le couple contraction - désassemblage.



**Figure 42: Cinétique de constriction d'un cercle d'actine en présence de protéine de pontage**

Constriction d'un cercle nucléateur d'actine en présence de 2.5  $\mu\text{M}$  de myosine HMM VI et de 100 nM d' $\alpha$ -actinine. On observe rapidement le désassemblage massif du réseau dense d'actine (affinement et disparition du cercle d'actine) avant l'aboutissement d'une complète constriction. Le film est présent dans le CD joint (films supplémentaires / solution myosineVI-actinine-figure42).

### 3. Conclusion

Les résultats accumulés pendant mon parcours montrent que l'organisation du cytosquelette et sa dynamique peuvent être contrôlées intrinsèquement par sa composition moléculaire mais également suivant des critères physiques, notamment au sein de son réseau contractile. Un nombre impressionnant de protéines agissent au sein d'une cellule en synergie afin de contrôler aussi bien la dynamique de formation et la géométrie des réseaux que de moduler la mécanique et le devenir de ces architectures de manière régiosélective. La combinaison d'expériences en systèmes biomimétiques, notamment à l'aide du "micropatterning", et de simulations numériques ou modèles mathématiques, nous permet d'exploiter et d'étudier les détails découplés et simplifiés de ces phénomènes afin d'en définir certaines propriétés et mieux comprendre le fonctionnement des cellules.

# **Annexe**

A. BERGLUND



**Figure 1 | Courting couple.** A male (front) and female of the species *Syngnathus typhle* engage in a nuptial dance. Like other pipefish, including the species (*S. scovelli*) studied by Paczolt and Jones<sup>6</sup>, it is the father that broods the resulting eggs.

can save resources for future broods.

It could be that larger females are better at manipulating males to invest more in their eggs, but this explanation seems less likely than one invoking male control. The eggs of small females never did very well, not even when those females were preceded in mating by another small female, which suggests that the pattern of brood survival is due to a male adaptive strategy of cryptic choice (choice after mating). So pipefish fathers invest more in offspring from preferred mates. Can they also exploit non-preferred females by using their eggs as a source of nutrition? Possibly they can: in related *Syngnathus* species, nutrients move not only from father to offspring<sup>1</sup> but also from offspring to father<sup>9</sup>.

Evidently, cryptic male support for eggs from preferred females for mating would benefit these females' offspring; that is, one might expect post-copulatory sexual selection to reinforce pre-copulatory selection. A different possibility is that fathers might compensate for the shortcomings of low-quality mothers by investing more in their eggs. Something similar has, for instance, been shown in the broad-nosed pipefish, where mothers made up for the shortcomings of low-quality fathers by providing them with eggs with extra protein<sup>10</sup>. Perhaps the sex that makes the choice of partner is more likely to invest differentially in the offspring of high-quality partners, whereas the chosen sex is more likely to adopt the compensatory strategy of providing extra support for those of low-quality partners.

From Paczolt and Jones's observations<sup>6</sup> it seems that male gulf pipefish opt for differential allocation of support, and a simulation model using realistic reproductive parameters

confirmed that this strategy can be adaptive. Males that were reluctant to mate with small females and exhibited cryptic (post-copulatory) choice in favour of large females had a higher fitness than males not adopting cryptic choice — the higher fitness taking the form of more offspring being produced.

The pipefish brood pouch may serve several functions. It provides safety and nutrition for offspring, and it may serve as an attractant signal for females. But also, as is evident from Paczolt and Jones's study, it grants fathers better control over reproduction — males may use their role as carers not only to nurture the eggs but also to favour those from high-quality females and disfavour and/or exploit those of low-quality females. What at first sight seems an egalitarian partnership between males and females, both investing heavily in their young, looks more like brooding sexual conflict. ■

Anders Berglund is in the Department of Ecology and Evolution, Uppsala University, Norbyvägen 18 D, SE-752 36 Uppsala, Sweden. e-mail: anders.berglund@ebc.uu.se

1. Ripley, J. L. & Foran, C. M. *J. Comp. Phys. B* **179**, 325–333 (2009).
2. Ripley, J. L. *Comp. Biochem. Phys. A* **154**, 98–104 (2009).
3. Berglund, A. & Rosenqvist, G. *Adv. Study Behav.* **32**, 131–167 (2003).
4. Scobell, S. K., Fudickar, A. M. & Knapp, R. *Anim. Behav.* **78**, 747–753 (2009).
5. Jones, A. G., Walker, D. & Avise, J. C. *Proc. R. Soc. Lond. B* **268**, 2531–2535 (2001).
6. Paczolt, K. A. & Jones, A. G. *Nature* **464**, 401–404 (2010). A video presentation based on this paper can be viewed at [www.youtube.com/NatureVideoChannel](http://www.youtube.com/NatureVideoChannel)
7. Ahnesjö, I. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **38**, 167–172 (1996).
8. Partridge, C. *et al. Behav. Ecol. Sociobiol.* **63**, 345–354 (2009).
9. Sagebakken, G., Ahnesjö, I., Mobley, K. B., Braga Gonçalves, I. & Kvarnemo, C. *Proc. R. Soc. Lond. B* **277**, 971–977 (2010).
10. Braga Gonçalves, I. *et al. Proc. R. Soc. Lond. B* (in the press).

## CELL BIOLOGY

# Actin filaments up against a wall

Cécile Sykes and Julie Plastino

**The front of motile cells is thought to be pushed out by branched filaments of actin protein abutting the cell membrane. New work challenges this textbook view, showing that actin branches grow away from, or obliquely to, a surface.**

Monomers of the protein actin assemble into a filamentous scaffold that propels the cell forward, and that can also power the movement of intracellular pathogens and transport vesicles, as well as biomimetic objects such as beads and liposomes<sup>1,2</sup>. The complex formed by actin-related proteins 2 and 3 (the Arp2/3 complex) is a 'nucleator' of actin polymerization, which causes branching in this scaffold. The existing model for actin-mediated movement proposes that the fast-growing (barbed) ends of actin filaments are directed towards a surface, such as the cell membrane, where polymerization is catalysed. Writing in *Current Biology*, Achard *et al.*<sup>3</sup> turn this model on its head by providing a real-time readout of single-filament dynamics in a network growing on a surface. They show that when the growing filament-ends encounter a wall (in this case, a rod or a bead, but by analogy a cell membrane), they orient away from it.

The previous view of actin-based motility came from three main observations. First, in solution, the Arp2/3 complex is activated by nucleation-promoting factors (NPFs) of the WASp/Scar family; consequently, it nucleates new actin filaments as branches at a 70° angle on the sides of the 'mother' filaments, and near the growing barbed end<sup>4,5</sup>. Second, live imaging shows that new actin material is incorporated near the leading-edge membrane of motile cells and near the surface of moving biomimetic objects<sup>6–8</sup>. Third, electron microscopy of

fixed cells suggests that branches are oriented towards the cell membrane<sup>9</sup>. Together, these observations led to the interpretation that, at an NPF-coated surface, forward-facing branches form, elongating by actin-monomer addition to the barbed ends abutting the surface and so pushing the surface forward.

Achard *et al.*<sup>3</sup> call this view into question. The authors coated glass rods with an NPF, and incubated them with the ingredients for actin-filament formation: the Arp2/3 complex and a mixture of actin and profilin (a protein that binds to actin monomers), to ensure that filament elongation occurred only at barbed ends. Their trick was to use a fluorescently labelled form of actin that bleaches quickly; the newly polymerized filament-ends fluoresce, whereas older parts of the network are less visible. The authors then observed this biomimetic system using TIRF (total internal reflection fluorescence) microscopy, which limits background fluorescence.

Surprisingly, they saw that all of the filaments' barbed ends were directed away from the rod surface. On adding a capping protein, which stops filament elongation, barbed ends were still oriented away from the surface, although the region containing the growing filaments was closer to the surface. The authors also found that explosive Arp2/3-dependent actin polymerization was initiated by actin-filament seeds, or 'primers'. This is consistent with the results of experiments performed in

## INORGANIC CHEMISTRY

## Pores off the peg

Porous materials provide a nanometre-scale playground for chemists to investigate unusual reactions that occur in confined spaces. But in the most widely used of these materials — zeolites and metal-organic frameworks — it is difficult to control the size and geometry both of pore openings and of the pores themselves. Writing in *Nature Chemistry*, Scott Mitchell and his colleagues report a solution to this problem in which the molecular building blocks used to create a porous framework are themselves ready-made pore openings (S. G. Mitchell *et al.* *Nature Chem.* doi:10.1038/nchem.581; 2010).

The authors' building block is a polyoxometalate — a 'wheel' of metal, oxygen and phosphorus atoms that has an opening of about 1 nanometre in diameter. Six of these wheels (three of which are

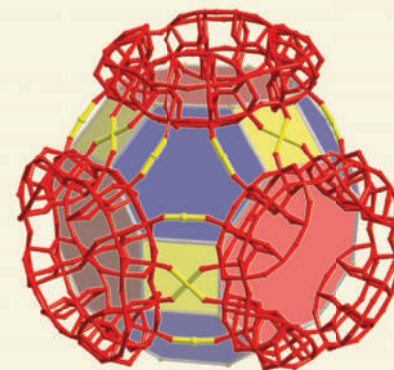
pictured here as red structures) self-assemble in the presence of manganese ions (small yellow spheres) to form a regularly shaped pore (multicoloured faceted structure) of about 7 nm<sup>3</sup> in volume. These roughly cubic units extend in three dimensions throughout the material to make a remarkably open framework.

The material also incorporates potassium and lithium ions (not shown) to balance the negative charge carried by the oxide ions in the wheel. These metal ions fit into the channels and cavities of the material loosely enough that they can be replaced with other positive ions if the compound is soaked in a suitable solution. For example, Mitchell *et al.* found that 35 copper(II) ions (Cu<sup>2+</sup>) could be incorporated into each pore by soaking the material in a solution of

copper(II) nitrate. None of the manganese ions in the porous material was displaced by Cu<sup>2+</sup> — even though both types of ion bear the same charge — leaving the framework architecture intact.

The authors could easily alter the oxidation state of the linking manganese ions while they were in the framework. When they increased the oxidation state from +2 to +3, they observed a reduction in the number of charge-balancing lithium and potassium ions. These charge-balancing ions could still be replaced with Cu<sup>2+</sup> ions, but only by about half as many as before.

The system's ion-exchange properties could be further tuned by blocking the pore openings with organic molecules. The team found that small organic molecules introduced into the material's pores can subsequently be displaced



by Cu<sup>2+</sup> ions. But larger organic molecules that are too large to fit inside the pore framework instead interact with pore entrances, blocking the entry of Cu<sup>2+</sup> ions.

Because a wide range of polyoxometalate wheels are available, Mitchell and colleagues' work opens the door to a variety of porous materials that have tunable properties. The authors are currently investigating the material's catalytic and ion-sensing capabilities.

Neil Withers

solution<sup>4</sup>, but that had never been incorporated into biomimetic or cell-motility models.

Achard *et al.* combine these observations to propose the following model (Fig. 1). On activation by an NPF on the polymerizing surface, the Arp2/3 complex captures a floating primer, becoming attached to its side to generate a branch point that nucleates a daughter filament; the new filament can grow away from, tangential to or towards the surface. Filaments oriented away from or tangential to the surface will elongate until stopped by the capping protein. Those growing towards the surface, however, will be stalled by the surface until they escape and restart growth tangentially to it. All tangentially oriented filaments act as primers for further branching events at the surface.

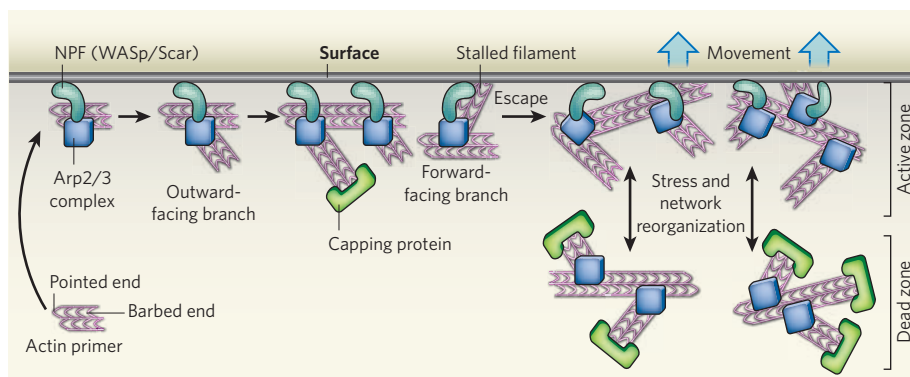
In such a scenario, a propulsive force is

produced on a surface by an actively polymerizing zone that is constrained to grow between the surface and a 'dead zone' of capped filaments (Fig. 1). In the case of spherical beads, stress builds up on the surface because actin filaments are organized in a connected network, covering the entire bead surface. Rupture of the dead zone relaxes stress, giving space for the formation of a freshly polymerizing zone that propels the object forward. This zone, in turn, becomes capped, leading to a new cycle of stress-and-rupture.

In the context of the cell membrane, one can imagine that the newly polymerizing zone at the surface braces against the dead zone to push out the membrane. The wide distribution of filament orientations previously observed by electron microscopy<sup>9,10</sup> fits with this model.

What remains unclear is why most filaments in motile cells are oriented with their barbed ends towards the membrane. Achard and colleagues' data suggest that this orientation cannot be explained solely by the molecular mechanism of the Arp2/3-complex, which would give rise to actin-filament barbed ends oriented predominantly away from the membrane. General reorganization due to stresses in the actin network may cause filament reorientation. Moreover, proteins that bind to actin barbed ends at or near the leading edge — for example, formins<sup>11</sup> — may contribute to the forward orientation of the barbed ends. Nonetheless, one point is certain: Achard and colleagues' results<sup>3</sup> fundamentally change our view of how, at the molecular level, actin polymerization catalysed by the Arp2/3 complex powers movement. ■

Cécile Sykes and Julie Plastino are in the Laboratoire Physico-chimie, Institut Curie, Centre de Recherche, CNRS UMR 168, Université Paris VI, Paris F-75248, France.  
e-mails: julie.plastino@curie.fr;  
cecile.sykes@curie.fr



**Figure 1 | Actin-network assembly gets a fresh look.** Achard *et al.*<sup>3</sup> propose that, after a primer has been captured at a surface, branches form in all directions. Outward-facing branches grow until capped. Forward-facing branches stall, escape and eventually grow tangentially. Tangential filaments act as primers for explosive actin-network growth. Capped parts of the network constitute the dead zone, whereas the active polymerizing zone is constrained to the surface.

- Pollard, T. D. & Borisy, G. G. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
- Plastino, J. & Sykes, C. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 62–66 (2005).
- Achard, V. *et al.* *Curr. Biol.* **20**, 423–428 (2010).
- Machesky, L. M. *et al.* *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 3739–3744 (1999).
- Amann, K. J. & Pollard, T. D. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **98**, 15009–15013 (2001).
- Wang, Y. L. *J. Cell Biol.* **101**, 597–602 (1985).
- Cameron, L. A. *et al.* *Curr. Biol.* **11**, 130–135 (2001).
- Paluch, E., van der Gucht, J., Joanny, J.-F. & Sykes, C. *Biophys. J.* **91**, 3113–3122 (2006).
- Svitkina, T. M., Verkhovskiy, A. B., McQuade, K. M. & Borisy, G. G. *J. Cell Biol.* **139**, 397–415 (1997).
- Koestler, S. A. *et al.* *Nature Cell Biol.* **10**, 306–313 (2008).
- Gupton, S. L., Eisenmann, K., Alberts, A. S. & Waterman-Storer, C. M. *J. Cell Sci.* **120**, 3475–3487 (2007).

a low-field ( $\sim 10$  mT) magnetoelectric effect at room temperature. Specifically, they demonstrate that in this compound a magnetic field induces an electrical polarization. Furthermore, the direction of the induced polarization can be switched through a magnetoelectric annealing procedure, an effect suggesting an unusual non-volatile, low-power memory device.

Note that these materials are not ferroelectric and therefore are not multiferroic. Nor do they display a magnetoelectric effect in the usual sense. A multiferroic phase, however, does play a key role in the observed magnetic-field-induced polarization. The authors suspect that the paraelectric-magnetic room temperature phase is close in energy to a state in which ferroelectricity is induced by a magnetic spin spiral structure, which is common in multiferroic hexaferrites. In the present case, a small magnetic field could drive the system into this multiferroic state, producing a magnetoelectric response. This large magnetoelectric response is therefore better thought of from the perspective of phase competition.

This material is not the first hexaferrite to display such an effect. For example, in 2005 one of the authors was able to apply a large magnetic field ( $\sim 1$  T) to the Y hexaferrite  $\text{Ba}_{0.5}\text{Sr}_{1.5}\text{Zn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$  (ref. 7). Unfortunately, owing to electrical leakage a magnetoelectric effect could only be measured below 130 K in  $\text{Ba}_{0.5}\text{Sr}_{1.5}\text{Zn}_2\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$  — it was

not sufficiently insulating. Next, Ishiwata and co-workers<sup>8</sup> chemically tuned the magnetic structure of this Y hexaferrite and discovered that the strength of the magnetic field required to drive the system into the multiferroic phase was two orders of magnitude less in  $\text{Ba}_2\text{Mg}_3\text{Fe}_{12}\text{O}_{22}$ , for which beautiful neutron studies confirmed the phase competition scenario suggested to explain the magnetoelectric response of these Y and Z hexaferrites<sup>9</sup>. By further exploring the rich structural chemical space of the hexaferrites, the present work has discovered an outstanding material with the desirable combination of small magnetic field and high-temperature operation.

Still, several fundamental and technological challenges exist in the field of magnetoelectrics and multiferroics. One potential drawback of the present work is that the value of the induced polarization may be several orders of magnitude smaller than that required for applications. Furthermore, when it comes to technological applications, electric fields are far easier to route in devices than magnetic fields, and being able to use a voltage, rather than a current, to locally control magnetism will revolutionize the field of low-power magneto-electronic devices. One promising route has been the use of multiferroics in an exchange-bias device<sup>10,11</sup>. Single-phase multiferroics, in which an electric field can deterministically switch the magnetization by  $180^\circ$ , have

yet to be experimentally demonstrated. That this still holds true after an intense search within the last decade is a statement about the fundamental issues that still confront us.

A dozen years after the resurgence of interest and fervent international activity in multiferroics, key challenges remain: to create a multiferroic with a strong coupling and with sizable moments regardless of temperature, and strategies to realize these effects at room temperature. Kitagawa and colleagues have shown that persistence is not futile.  $\square$

Craig J. Fennie is in the School of Applied & Engineering Physics, Cornell University, Ithaca, New York 14853-3501, USA; Darrell G. Schlom is in the Department of Materials Science and Engineering, Cornell University, Ithaca, New York 14853-1501, USA.  
e-mail: fennie@cornell.edu

#### References

1. Kitagawa, Y. *et al. Nature Mater.* **9**, 797–802 (2010).
2. Standley, K. J. *Nature* **178**, 1371–1373 (1956).
3. Wijn, H. P. J. *Nature* **170**, 707–708 (1952).
4. Jonker, G. H., Wijn, H. P. J. & Braun, P. B. *Philips Tech. Rev.* **18**, 145–154 (1956).
5. Braun, P. B. *Philips Res. Rep.* **12**, 491–548 (1957).
6. Kohn, J. A., Eckart, D. W. & Cook, C. F. Jr *Science* **172**, 519–525 (1971).
7. Kimura, T., Lawes, G. & Ramirez, A. P. *Phys. Rev. Lett.* **94**, 137201 (2005).
8. Ishiwata, S., Taguchi, Y., Murakawa, H., Onose, Y. & Tokura, Y. *Science* **319**, 1643–1646 (2008).
9. Ishiwata, S. *et al. Phys. Rev. B* **81**, 174418 (2010).
10. Chu, Y.-H. *et al. Nature Mater.* **7**, 478–482 (2008).
11. He, X. *et al. Nature Mater.* **9**, 579–585 (2010).

## PROTEIN FILAMENTS

# Bundles from boundaries

Using a micropatterning technique, the architecture of actin networks is revealed to be influenced by the spatial organization of actin filament nucleation. Considering the geometric boundaries within live cells, implications in the realm of actin-induced cell functions are vast.

Denis Wirtz and Shyam B. Khatau

**A**ctin is a highly abundant, globular protein which assembles into dynamic, 8-nm diameter filaments (F-actin) that are nucleated and organized into distinct structures in different parts of the cell (Fig. 1). These different F-actin structures orchestrate a vast range of cellular functions, including cell shape determination, cell motility, cell adhesion and cell differentiation<sup>1</sup>. It has long been assumed that to organize actin filaments into these cytoskeletal architectures, the cell requires specific auxiliary proteins,

in particular crosslinking and bundling proteins. In support of this, it is observed that crosslinking and bundling proteins *in vitro* readily organize actin filaments into elastic orthogonal networks and parallel bundles depending on the local concentration of the proteins and their intrinsic molecular architecture. Moreover, the depletion of such proteins induces considerable disorganization of the actin cytoskeleton and cell shape changes.

Using a micropatterning method, Reymann *et al.*<sup>2</sup> report in *Nature Materials*

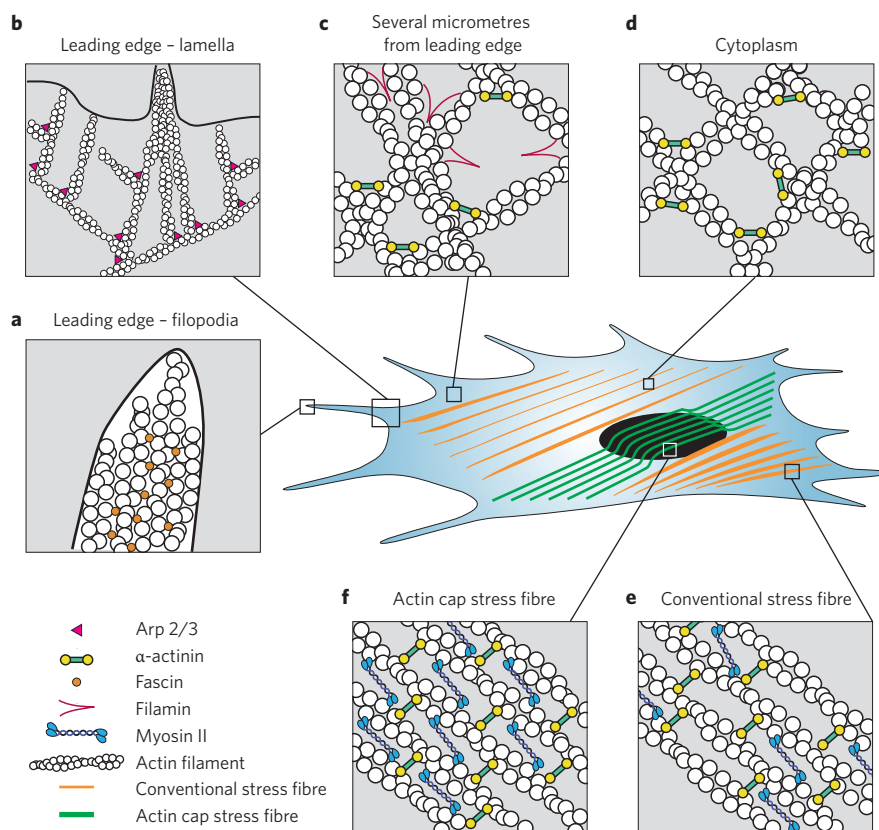
that the spatial organization of F-actin nucleating factors can organize actin filaments into arrays very similar to those observed in live cells and reconstituted biomimetic systems<sup>3</sup>. Importantly, they show that the presence of high concentrations of crosslinking and bundling proteins does not overwhelm this F-actin ordering, suggesting that this process is a dominant regulator of F-actin organization and function in cells.

These exciting results add to a rapidly lengthening list of cellular phenomena

where physics complements chemistry for efficient biological function<sup>4</sup>. The study by Reymann *et al.* suggests that cell shape may spatially organize actin filaments and therefore regulate actin's ubiquitous involvement in cellular functions (Fig. 2). Moreover, because it is well established that actin organization regulates cell shape, these findings imply a bidirectional regulatory loop between cell shape and actin functions.

Central to F-actin's ability to self-organize into arrays is that it is a semi-flexible polymer — its intrinsic bending rigidity is such that its persistence length (17  $\mu\text{m}$ ) is similar to its total contour length (5–15  $\mu\text{m}$ )<sup>5</sup>. If actin filaments were highly flexible, they would simply form amorphous disorganized polymer networks<sup>6</sup>. Reymann *et al.* show that changes in the length of actin filaments — and hence, the ratio between contour and persistence length — have marked effects on the spatial organization of actin filaments.

In live cells, actin structures are in close contact with cell membranes and organelles that may spatially organize the nucleation of F-actin (Fig. 1). At the curved cell's leading edge, actin polymerizes into growing dendritic networks that generate large forces that push the plasma membrane and, in turn, mediate cell motility<sup>7</sup>. In the confining space a few micrometres away from the leading edge, actin filaments form orthogonal networks of overlapping filaments intertwined with contractile bundles that are loosely compact. At the dorsal surface of the cell, in close contact with the interphase nucleus, actin filaments organize into highly compact, contractile, parallel bundles that form the perinuclear actin cap. The actin cap is tightly connected to the nuclear lamina, which regulates the shape of the nucleus in healthy cells and is missing in some human diseased cells<sup>8</sup>. In the expanded cytoplasmic region, actin filaments are crosslinked into approximately orthogonal networks that are highly elastic, but not contractile. At the relatively flat basal surface of the cell, actin filaments form discrete, contractile stress fibres containing the motor protein myosin II. One of the possible consequences of Reymann and co-workers' results is that the local shape of cell membranes could affect F-actin organization. Indeed, the disassembly of any of these structures has a significant effect on cellular and nuclear shape. Moreover, because nucleating factors are localized at the cell leading edge and at focal adhesions that terminate stress



**Figure 1** | Actin filaments are organized into highly diverse complex assemblies in different regions of the cell. These different structures are conventionally believed to be induced by specific F-actin crosslinking and bundling proteins. At the leading edge (**a**) filopodial protrusions are supported by parallel actin bundles containing the F-actin bundling protein fascin, whereas in the lamella (**b**) F-actin forms dendritic filament networks containing the F-actin nucleating factor Arp2/3. **c**, A few micrometres from the leading edge, actin forms orthogonal networks of overlapping filaments intertwined with contractile bundles containing crosslinking proteins  $\alpha$ -actinin and filamin, and motor protein/bundling protein myosin II. **d**, In the cytoplasm, actin filaments are crosslinked into roughly orthogonal networks that are elastic, but not contractile because they are devoid of myosin II. **e**, At the basal surface of the cell, actin filaments form discrete, contractile stress fibres containing the motor protein myosin II. **f**, At the apical surface of the cell on top of the nucleus, actin filaments organize into highly compact, contractile, parallel bundles that form the perinuclear actin cap.

fibres, these new findings suggest that the diversity of actin structures found in cells could be induced by differences in local spatial organizations of nucleating factors and types of confinement by the cell membrane and the nucleus.

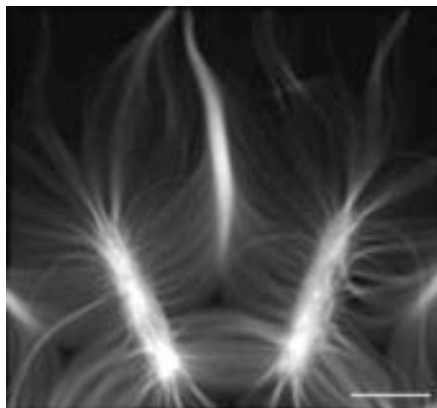
The interplay between conventional biochemical filament crosslinking by proteins and physical bundling by spatial organization of nucleating factors deserves further investigation<sup>9</sup>. Conventional filament crosslinking can largely be explained by the submolecular architecture of the crosslinking proteins and their overall concentration. For example, the F-actin crosslinking proteins filamin and  $\alpha$ -actinin, which are enriched in the cytoplasm and near the leading edge, contain two actin-binding sites of low

F-actin affinity and long molecular arms that organize F-actin into orthogonal networks and loose bundles, at low and high concentrations, respectively. The generation of a wide range of actin networks by spatial organization of nucleation suggests that actin filaments can readily organize into a vast menagerie of complex architectures that resemble structures observed *in vivo* through edge and confinement effects alone.

A critical role of F-actin and crosslinking and bundling proteins is to provide mechanical strength to the cell. Different actin structures *in vitro* and *in vivo* containing different proteins display different microrheological properties. For example, computational modelling and reconstituted actin networks



indicate that the combination of compact bundles embedded into crosslinked orthogonal networks forms significantly stiffer structures than structures (with the same number of filaments) containing only bundles or only orthogonally crosslinked filaments. Even actin filament structures that have identical organizations may still react differently under mechanical stress or strain. Without the stabilizing effect of specific bundling proteins, actin bundles formed by the spatial organization of nucleating factors may allow for interfilament sliding within the bundle and, therefore, may display little resistance to shear forces. In contrast, fascin-containing F-actin structures in filopodial bundles bend little under force by preventing interfilament sliding<sup>10</sup>. Similarly, low concentrations of crosslinking proteins do not affect actin filament network organization, but by preventing filament sliding, crosslinking can greatly enhance network stiffness at low levels of shear, whereas past a threshold sliding stress, will mediate rapid decrease of network elasticity<sup>11</sup>. It will be



**Figure 2** | A fluorescence image showing that actin filaments can organize into a filopodial-like compact bundle by the spatial organization of nucleating factors<sup>2</sup>. Scale bar, 10  $\mu\text{m}$ .

important to establish the relationship between structure and function in the various micropattern-induced actin structures reported by Reymann *et al.*, using microrheology techniques, and

to test whether they display different micromechanical properties in the absence and presence of crosslinking and bundling proteins. □

Denis Wirtz and Shyam B. Khatau are in the Department of Chemical and Biomolecular Engineering and the Johns Hopkins Physical Sciences in Oncology Center, Johns Hopkins University, 3400 North Charles Street, Baltimore, Maryland 21218, USA.  
e-mail: wirtz@jhu.edu and shyam@jhu.edu

#### References

1. Pollard, T. D. & Borisy, G. G. *Cell* **112**, 453–465 (2003).
2. Reymann, A.-C. *et al. Nature Mater.* **9**, 827–832 (2010).
3. Liu, A. P. & Fletcher, D. A. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **10**, 644–650 (2009).
4. Sun, S. X., Walcott, S. & Wolgemuth, C. W. *Curr. Biol.* **20**, R649–R654 (2010).
5. Kas, J. *et al. Biophys. J.* **70**, 609–625 (1996).
6. de Gennes, P.-G. *Scaling Concepts in Polymer Physics* (Cornell Univ. Press, 1991).
7. Blanchoin, L. *et al. Nature* **404**, 1007–1011 (2000).
8. Khatau, S. B. *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 19017–19022 (2009).
9. Liu, A. P. *et al. Nature Phys.* **4**, 789–793 (2008).
10. Vignjevic, D. *et al. J. Cell Biol.* **160**, 951–962 (2003).
11. Xu, J., Tseng, Y. & Wirtz, D. *J. Biol. Chem.* **275**, 35886–35892 (2000).

## FLEXIBLE ELECTRONICS

# Within touch of artificial skin

Flexible arrays of transducers can now be fabricated with pressure sensitivity and response times approaching those of natural human skin.

John J. Boland

As humans, we interact with our immediate environment through our senses — sight, sound, smell, taste and touch. Emulation of the senses by electronic means has long been a grand challenge of artificial intelligence and is pivotal in the development of accessible and natural interfaces between man and machine. Sight and sound are the simplest technologically, and the past decades have seen significant developments in image acquisition and processing technologies, in addition to voice synthesis and recognition. From an electronic standpoint, smell and taste are one and the same, but despite significant advances in electronic nose<sup>1</sup> and chemical sensor<sup>2</sup> technologies, the sensitivity and discrimination levels of these engineered systems fall short of the performance of their human counterparts.

Touch also remains stubbornly difficult to mimic. The difficulty is not simply to

identify transduction mechanisms that can detect mechanical resistance or static mass loads; touch emulation necessitates the development of high spatial-resolution, pressure-sensitive artificial skins capable of discriminating between local stimuli on a textured surface. For example, by applying a pressure of 10 kPa over a 1 cm<sup>2</sup> contact area, the human touch can typically detect local roughness variations with a spatial resolution of 50  $\mu\text{m}$ . Coupled with the fact that the softest touch corresponds to a mass-loading sensitivity of better than 0.1 g per mm<sup>2</sup> (or about 1 kPa), this highlights the very real challenge of developing touch technology that can compete with the performance in humans.

As now reported in *Nature Materials*, separate research groups have addressed this problem in two distinct ways<sup>3,4</sup>. Both employ an active matrix array of transducers using flexible materials. Flexibility is desirable because it enables

the fabrication of transducer arrays that can conform to curved surfaces, which is essential if these engineered materials are to serve as artificial skins for prosthetic devices or in applications where a high degree of spatial resolution is required. Where the groups differ is in their approach to the transduction mechanism and the types of substrate used. Ali Javey and co-workers<sup>3</sup> used Ge/Si-nanowire-array field-effect transistors (FETs) laminated on a flexible polyimide substrate with a pressure-sensitive rubber layer that acts as a tunable resistor in series with the nanowire FET (Fig. 1). On the other hand, Zhenan Bao and collaborators<sup>4</sup> microstructured polydimethylsiloxane (PDMS) films to produce pressure-sensitive capacitor arrays that are integrated into the gate dielectrics of an organic FET array (Fig. 2). Both report pressure sensors with response times of less than 100 ms and a dynamic range of 0.5–20 kPa or

# Références

- Achard, V., J.L. Martiel, A. Michelot, C. Guerin, A.C. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2010. A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol.* 20:423-8.
- Akin, O., and R.D. Mullins. 2008. Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell.* 133:841-51.
- Altman, D., H.L. Sweeney, and J.A. Spudich. 2004. The mechanism of myosin VI translocation and its load-induced anchoring. *Cell.* 116:737-49.
- Andrianantoandro, E., and T.D. Pollard. 2006. Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/cofilin. *Mol Cell.* 24:13-23.
- Avraham, K.B., T. Hasson, K.P. Steel, D.M. Kingsley, L.B. Russell, M.S. Mooseker, N.G. Copeland, and N.A. Jenkins. 1995. The mouse Snell's waltzer deafness gene encodes an unconventional myosin required for structural integrity of inner ear hair cells. *Nat Genet.* 11:369-75.
- Bamburg, J.R., A. McGough, and S. Ono. 1999. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol.* 9:364-70.
- Beausang, J.F., H.W. Schroeder, 3rd, P.C. Nelson, and Y.E. Goldman. 2008. Twirling of actin by myosins II and V observed via polarized TIRF in a modified gliding assay. *Biophys J.* 95:5820-31.
- Bendix, P.M., G.H. Koenderink, D. Cuvelier, Z. Dogic, B.N. Koeleman, W.M. Briehner, C.M. Field, L. Mahadevan, and D.A. Weitz. 2008. A quantitative analysis of contractility in active cytoskeletal protein networks. *Biophys J.* 94:3126-36.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature.* 417:308-11.
- Bernstein, B.W., and J.R. Bamburg. 1982. Tropomyosin binding to F-actin protects the F-actin from disassembly by brain actin-depolymerizing factor (ADF). *Cell Motil.* 2:1-8.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 1999. Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J Biol Chem.* 274:15538-46.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 2002. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry.* 41:597-602.
- Blanchoin, L., T.D. Pollard, and S.E. Hitchcock-DeGregori. 2001. Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr Biol.* 11:1300-4.
- Brawley, C.M., and R.S. Rock. 2009. Unconventional myosin traffic in cells reveals a selective actin cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:9685-90.
- Burnette, D.T., S. Manley, P. Sengupta, R. Sougrat, M.W. Davidson, B. Kachar, and J. Lippincott-Schwartz. 2011. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nat Cell Biol.* 13:371-82.
- Buss, F., and J. Kendrick-Jones. 2008. How are the cellular functions of myosin VI regulated within the cell? *Biochem Biophys Res Commun.* 369:165-75.
- Buss, F., J.P. Luzio, and J. Kendrick-Jones. 2001. Myosin VI, a new force in clathrin mediated endocytosis. *FEBS Lett.* 508:295-9.
- Cai, L., A.M. Makhov, D.A. Schafer, and J.E. Bear. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell.* 134:828-42.

- Cai, Y., O. Rossier, N.C. Gauthier, N. Biais, M.A. Fardin, X. Zhang, L.W. Miller, B. Ladoux, V.W. Cornish, and M.P. Sheetz. 2010. Cytoskeletal coherence requires myosin-IIA contractility. *J Cell Sci.* 123:413-23.
- Cameron, L.A., T.M. Svitkina, D. Vignjevic, J.A. Theriot, and G.G. Borisy. 2001. Dendritic organization of actin comet tails. *Curr Biol.* 11:130-5.
- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2008. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:237-51.
- Carlier, M.F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307-22.
- Carvalho, A., A. Desai, and K. Oegema. 2009. Structural memory in the contractile ring makes the duration of cytokinesis independent of cell size. *Cell.* 137:926-37.
- Chan, C., C.C. Beltzner, and T.D. Pollard. 2009. Cofilin dissociates Arp2/3 complex and branches from actin filaments. *Curr Biol.* 19:537-45.
- Chesarone, M.A., A.G. DuPage, and B.L. Goode. 2009. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:62-74.
- Chhabra, E.S., and H.N. Higgs. 2007. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol.* 9:1110-21.
- Chuan, P., J.A. Spudich, and A.R. Dunn. 2010. Robust mechanosensing and tension generation by myosin VI. *J Mol Biol.* 405:105-12.
- Co, C., D.T. Wong, S. Gierke, V. Chang, and J. Taunton. 2007. Mechanism of actin network attachment to moving membranes: barbed end capture by N-WASP WH2 domains. *Cell.* 128:901-13.
- Colombelli, J., A. Besser, H. Kress, E.G. Reynaud, P. Girard, E. Caussinus, U. Haselmann, J.V. Small, U.S. Schwarz, and E.H. Stelzer. 2009. Mechanosensing in actin stress fibers revealed by a close correlation between force and protein localization. *J Cell Sci.* 122:1665-79.
- Cooper, J.A., and D. Sept. 2008. New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int Rev Cell Mol Biol.* 267:183-206.
- Cramer, L.P. 2010. Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. *Nat Cell Biol.* 12:628-32.
- Dayel, M.J., O. Akin, M. Landeryou, V. Risca, A. Mogilner, and R.D. Mullins. 2009. In silico reconstitution of actin-based symmetry breaking and motility. *PLoS Biol.* 7:e1000201.
- De La Cruz, E.M., E.M. Ostap, and H.L. Sweeney. 2001. Kinetic mechanism and regulation of myosin VI. *J Biol Chem.* 276:32373-81.
- De La Cruz, E.M., and D. Sept. 2010. The kinetics of cooperative cofilin binding reveals two states of the cofilin-actin filament. *Biophys J.* 98:1893-901.
- Delatour, V., S. Shekhar, A.C. Reymann, D. Didry, K.H. Le, G. Romet-Lemonne, E. Helfer, and M.F. Carlier. 2008. Actin-based propulsion of functionalized hard versus fluid spherical objects. *New Journal of Physics.* 10.
- Dominguez, R., Y. Freyzon, K.M. Trybus, and C. Cohen. 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell.* 94:559-71.
- Dunn, A.R., P. Chuan, Z. Bryant, and J.A. Spudich. 2010. Contribution of the myosin VI tail domain to processive stepping and intramolecular tension sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:7746-50.

- Eddy, R.J., J. Han, and J.S. Condeelis. 1997. Capping protein terminates but does not initiate chemoattractant-induced actin assembly in *Dictyostelium*. *J Cell Biol.* 139:1243-53.
- Elting, M.W., Z. Bryant, J.C. Liao, and J.A. Spudich. 2011. Detailed tuning of structure and intramolecular communication are dispensable for processive motion of myosin VI. *Biophys J.* 100:430-9.
- Engler, A.J., S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher. 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126:677-89.
- Fernandez-Gonzalez, R., M. Simoes Sde, J.C. Roper, S. Eaton, and J.A. Zallen. 2009. Myosin II dynamics are regulated by tension in intercalating cells. *Dev Cell.* 17:736-43.
- Fletcher, D.A., and R.D. Mullins. 2010. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature.* 463:485-92.
- Galkin, V.E., A. Orlova, M.S. VanLoock, A. Shvetsov, E. Reisler, and E.H. Egelman. 2003. ADF/cofilin use an intrinsic mode of F-actin instability to disrupt actin filaments. *J Cell Biol.* 163:1057-66.
- Gandhi, M., V. Achard, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2009. Coronin switches roles in actin disassembly depending on the nucleotide state of actin. *Mol Cell.* 34:364-74.
- Geeves, M.A., and K.C. Holmes. 1999. Structural mechanism of muscle contraction. *Annu Rev Biochem.* 68:687-728.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., L.M. Machesky, S.K. Doberstein, and T.D. Pollard. 1991. Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J Cell Biol.* 113:1081-9.
- Gould, C.J., S. Maiti, A. Michelot, B.R. Graziano, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2011. The formin DAD domain plays dual roles in autoinhibition and actin nucleation. *Curr Biol.* 21:384-90.
- Guha, M., M. Zhou, and Y.L. Wang. 2005. Cortical actin turnover during cytokinesis requires myosin II. *Curr Biol.* 15:732-6.
- Hancock, W.O., and J. Howard. 1998. Processivity of the motor protein kinesin requires two heads. *J Cell Biol.* 140:1395-405.
- Haviv, L., D. Gillo, F. Backouche, and A. Bernheim-Groswasser. 2008. A cytoskeletal demolition worker: myosin II acts as an actin depolymerization agent. *J Mol Biol.* 375:325-30.
- Hawkins, M., B. Pope, S.K. Maciver, and A.G. Weeds. 1993. Human actin depolymerizing factor mediates a pH-sensitive destruction of actin filaments. *Biochemistry.* 32:9985-93.
- He, L., X. Wang, H.L. Tang, and D.J. Montell. 2010. Tissue elongation requires oscillating contractions of a basal actomyosin network. *Nat Cell Biol.* 12:1133-42.
- Hertzano, R., E. Shalit, A.K. Rzadzinska, A.A. Dror, L. Song, U. Ron, J.T. Tan, A.S. Shitrit, H. Fuchs, T. Hasson, N. Ben-Tal, H.L. Sweeney, M.H. de Angelis, K.P. Steel, and K.B. Avraham. 2008. A Myo6 mutation destroys coordination between the myosin heads, revealing new functions of myosin VI in the stereocilia of mammalian inner ear hair cells. *PLoS Genet.* 4:e1000207.
- Hotulainen, P., and P. Lappalainen. 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol.* 173:383-94.
- Howard, J., A.J. Hudspeth, and R.D. Vale. 1989. Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature.* 342:154-8.
- Huxley, H.E. 1969. The mechanism of muscular contraction. *Science.* 164:1356-65.

- Inoue, Y., S. Tsuda, K. Nakagawa, M. Hojo, and T. Adachi. 2011. Modeling myosin-dependent rearrangement and force generation in an actomyosin network. *J Theor Biol.*
- Isambert, H., P. Venier, A.C. Maggs, A. Fattoum, R. Kassab, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 1995. Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J Biol Chem.* 270:11437-44.
- Iwaki, M., A.H. Iwane, T. Shimokawa, R. Cooke, and T. Yanagida. 2009. Brownian search-and-catch mechanism for myosin-VI steps. *Nat Chem Biol.* 5:403-5.
- Iwasa, J.H., and R.D. Mullins. 2007. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol.* 17:395-406.
- Jiang, X., D.A. Bruzewicz, A.P. Wong, M. Piel, and G.M. Whitesides. 2005. Directing cell migration with asymmetric micropatterns. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:975-8.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2005. A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell.* 123:305-20.
- Kamasaki, T., M. Osumi, and I. Mabuchi. 2007. Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol.* 178:765-71.
- Kasai, M., S. Asakura, and F. Oosawa. 1962. The G-F equilibrium in actin solutions under various conditions. *Biochim Biophys Acta.* 57:13-21.
- Kelleher, J.F., S.J. Atkinson, and T.D. Pollard. 1995. Sequences, structural models, and cellular localization of the actin-related proteins Arp2 and Arp3 from *Acanthamoeba*. *J Cell Biol.* 131:385-97.
- Keren, K., Z. Pincus, G.M. Allen, E.L. Barnhart, G. Marriott, A. Mogilner, and J.A. Theriot. 2008. Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature.* 453:475-80.
- Kodera, N., D. Yamamoto, R. Ishikawa, and T. Ando. 2010. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature.* 468:72-6.
- Koenderink, G.H., Z. Dogic, F. Nakamura, P.M. Bendix, F.C. MacKintosh, J.H. Hartwig, T.P. Stossel, and D.A. Weitz. 2009. An active biopolymer network controlled by molecular motors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:15192-7.
- Koestler, S.A., S. Auinger, M. Vinzenz, K. Rottner, and J.V. Small. 2008. Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat Cell Biol.* 10:306-13.
- Koestler, S.A., K. Rottner, F. Lai, J. Block, M. Vinzenz, and J.V. Small. 2009. F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *PLoS One.* 4:e4810.
- Kohler, S., V. Schaller, and A.R. Bausch. 2011. Structure formation in active networks. *Nat Mater.*
- Korten, T., A. Mansson, and S. Diez. 2010. Towards the application of cytoskeletal motor proteins in molecular detection and diagnostic devices. *Curr Opin Biotechnol.* 21:477-88.
- Kovar, D.R., E.S. Harris, R. Mahaffy, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell.* 124:423-35.
- Kovar, D.R., J.R. Kuhn, A.L. Tichy, and T.D. Pollard. 2003. The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin. *J Cell Biol.* 161:875-87.
- Kovar, D.R., and T.D. Pollard. 2004a. Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:14725-30.
- Kovar, D.R., and T.D. Pollard. 2004b. Progressing actin: Formin as a processive elongation machine. *Nat Cell Biol.* 6:1158-9.

- Kueh, H.Y., G.T. Charras, T.J. Mitchison, and W.M. Brieher. 2008. Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *J Cell Biol.* 182:341-53.
- Kuhn, J.R., and T.D. Pollard. 2007. Single molecule kinetic analysis of actin filament capping. Polyphosphoinositides do not dissociate capping proteins. *J Biol Chem.* 282:28014-24.
- Langanger, G., M. Moeremans, G. Daneels, A. Sobieszek, M. De Brabander, and J. De Mey. 1986. The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. *J Cell Biol.* 102:200-9.
- Lappalainen, P., and D.G. Drubin. 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature.* 388:78-82.
- Lin, M.C., B.J. Galletta, D. Sept, and J.A. Cooper. 2010. Overlapping and distinct functions for cofilin, coronin and Aip1 in actin dynamics in vivo. *J Cell Sci.* 123:1329-42.
- Loisel, T.P., R. Boujemaa, D. Pantaloni, and M.F. Carlier. 1999. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature.* 401:613-6.
- Machesky, L.M., S.J. Atkinson, C. Ampe, J. Vandekerckhove, and T.D. Pollard. 1994. Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol.* 127:107-15.
- Machesky, L.M., R.D. Mullins, H.N. Higgs, D.A. Kaiser, L. Blanchoin, R.C. May, M.E. Hall, and T.D. Pollard. 1999. Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3739-44.
- Maddugoda, M.P., M.S. Crampton, A.M. Shewan, and A.S. Yap. 2007. Myosin VI and vinculin cooperate during the morphogenesis of cadherin cell cell contacts in mammalian epithelial cells. *J Cell Biol.* 178:529-40.
- Martin, A.C. 2010. Pulsation and stabilization: contractile forces that underlie morphogenesis. *Dev Biol.* 341:114-25.
- Martin, A.C., M. Kaschube, and E.F. Wieschaus. 2009. Pulsed contractions of an actin-myosin network drive apical constriction. *Nature.* 457:495-9.
- Martin, A.C., M.D. Welch, and D.G. Drubin. 2006. Arp2/3 ATP hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat Cell Biol.* 8:826-33.
- McCullough, B.R., L. Blanchoin, J.L. Martiel, and E.M. De la Cruz. 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *J Mol Biol.* 381:550-8.
- McGough, A., B. Pope, W. Chiu, and A. Weeds. 1997. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol.* 138:771-81.
- Mejillano, M.R., S. Kojima, D.A. Applewhite, F.B. Gertler, T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 2004. Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell.* 118:363-73.
- Michelot, A., J. Berro, C. Guerin, R. Boujemaa-Paterski, C.J. Staiger, J.L. Martiel, and L. Blanchoin. 2007. Actin-filament stochastic dynamics mediated by ADF/cofilin. *Curr Biol.* 17:825-33.
- Miyoshi, T., T. Tsuji, C. Higashida, M. Hertzog, A. Fujita, S. Narumiya, G. Scita, and N. Watanabe. 2006. Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *J Cell Biol.* 175:947-55.

- Mizuno, H., C. Higashida, Y. Yuan, T. Ishizaki, S. Narumiya, and N. Watanabe. 2011. Rotational movement of the formin mDia1 along the double helical strand of an actin filament. *Science*. 331:80-3.
- Mogilner, A., and L. Edelstein-Keshet. 2002. Regulation of actin dynamics in rapidly moving cells: a quantitative analysis. *Biophys J*. 83:1237-58.
- Mogilner, A., and K. Keren. 2009. The shape of motile cells. *Curr Biol*. 19:R762-71.
- Mogilner, A., and B. Rubinstein. 2005. The physics of filopodial protrusion. *Biophys J*. 89:782-95.
- Mohiddin, S.A., Z.M. Ahmed, A.J. Griffith, D. Tripodi, T.B. Friedman, L. Fananapazir, and R.J. Morell. 2004. Novel association of hypertrophic cardiomyopathy, sensorineural deafness, and a mutation in unconventional myosin VI (MYO6). *J Med Genet*. 41:309-14.
- Moriyama, K., S. Matsumoto, E. Nishida, H. Sakai, and I. Yahara. 1990. Nucleotide sequence of mouse cofilin cDNA. *Nucleic Acids Res*. 18:3053.
- Moseley, J.B., I. Sagot, A.L. Manning, Y. Xu, M.J. Eck, D. Pellman, and B.L. Goode. 2004. A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol Biol Cell*. 15:896-907.
- Mullins, R.D. 2000. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. *Curr Opin Cell Biol*. 12:91-6.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6181-6.
- Murakami, K., T. Yasunaga, T.Q. Noguchi, Y. Gomibuchi, K.X. Ngo, T.Q. Uyeda, and T. Wakabayashi. 2010. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell*. 143:275-87.
- Nagy, S., B.L. Ricca, M.F. Norstrom, D.S. Courson, C.M. Brawley, P.A. Smithback, and R.S. Rock. 2008. A myosin motor that selects bundled actin for motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:9616-20.
- Narita, A., S. Takeda, A. Yamashita, and Y. Maeda. 2006. Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *EMBO J*. 25:5626-33.
- Naumanen, P., P. Lappalainen, and P. Hotulainen. 2008. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc*. 231:446-54.
- Nesmelov, Y.E., R.V. Agafonov, I.V. Negrashov, S.E. Blakely, M.A. Titus, and D.D. Thomas. 2011. Structural kinetics of myosin by transient time-resolved FRET. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:1891-6.
- Nishida, E. 1985. Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*. 24:1160-4.
- Noireaux, V., R.M. Golsteyn, E. Friederich, J. Prost, C. Antony, D. Louvard, and C. Sykes. 2000. Growing an actin gel on spherical surfaces. *Biophys J*. 78:1643-54.
- O'Connell, C.B., M.J. Tyska, and M.S. Mooseker. 2007. Myosin at work: motor adaptations for a variety of cellular functions. *Biochim Biophys Acta*. 1773:615-30.
- Oguchi, Y., S.V. Mikhailenko, T. Ohki, A.O. Olivares, E.M. De La Cruz, and S. Ishiwata. 2010. Robust processivity of myosin V under off-axis loads. *Nat Chem Biol*. 6:300-5.
- Okreglak, V., and D.G. Drubin. 2007. Cofilin recruitment and function during actin-mediated endocytosis dictated by actin nucleotide state. *J Cell Biol*. 178:1251-64.
- Okreglak, V., and D.G. Drubin. 2010. Loss of Aip1 reveals a role in maintaining the actin monomer pool and an in vivo oligomer assembly pathway. *J Cell Biol*. 188:769-77.



- Otomo, T., D.R. Tomchick, C. Otomo, S.C. Panchal, M. Machius, and M.K. Rosen. 2005. Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*. 433:488-94.
- Pantaloni, D., R. Boujemaa, D. Didry, P. Gounon, and M.F. Carlier. 2000. The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat Cell Biol*. 2:385-91.
- Parekh, S.H., O. Chaudhuri, J.A. Theriot, and D.A. Fletcher. 2005. Loading history determines the velocity of actin-network growth. *Nat Cell Biol*. 7:1219-23.
- Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:633-43.
- Paul, A.S., and T.D. Pollard. 2009. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton*. 66:606-17.
- Pellegrin, S., and H. Mellor. 2007. Actin stress fibres. *J Cell Sci*. 120:3491-9.
- Perelroizen, I., M.F. Carlier, and D. Pantaloni. 1995. Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J Biol Chem*. 270:1501-8.
- Pollard, T.D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*. 103:2747-54.
- Pollard, T.D. 2003. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature*. 422:741-5.
- Pollard, T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 29:545-76.
- Pollard, T.D., and G.G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 112:453-65.
- Pollard, T.D., and J.A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*. 326:1208-12.
- Pollard, T.D., and J.Q. Wu. 2010. Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:149-55.
- Pouille, P.A., P. Ahmadi, A.C. Brunet, and E. Farge. 2009. Mechanical signals trigger Myosin II redistribution and mesoderm invagination in *Drosophila* embryos. *Sci Signal*. 2:ra16.
- Prass, M., K. Jacobson, A. Mogilner, and M. Radmacher. 2006. Direct measurement of the lamellipodial protrusive force in a migrating cell. *J Cell Biol*. 174:767-72.
- Prochniewicz, E., N. Janson, D.D. Thomas, and E.M. De la Cruz. 2005. Cofilin increases the torsional flexibility and dynamics of actin filaments. *J Mol Biol*. 353:990-1000.
- Purcell, T.J., H.L. Sweeney, and J.A. Spudich. 2005. A force-dependent state controls the coordination of processive myosin V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:13873-8.
- Raghavan, S., R.A. Desai, Y. Kwon, M. Mrksich, and C.S. Chen. Micropatterned dynamically adhesive substrates for cell migration. *Langmuir*. 26:17733-8.
- Rayment, I., H.M. Holden, M. Whittaker, C.B. Yohn, M. Lorenz, K.C. Holmes, and R.A. Milligan. 1993a. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261:58-65.
- Rayment, I., W.R. Rypniewski, K. Schmidt-Base, R. Smith, D.R. Tomchick, M.M. Benning, D.A. Winkelmann, G. Wesenberg, and H.M. Holden. 1993b. Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science*. 261:50-8.
- Ren, Y., J.C. Effer, M. Norstrom, T. Luo, R.A. Firtel, P.A. Iglesias, R.S. Rock, and D.N. Robinson. 2009. Mechanosensing through cooperative interactions between myosin II and the actin crosslinker cortexillin I. *Curr Biol*. 19:1421-8.

- Robblee, J.P., A.O. Olivares, and E.M. de la Cruz. 2004. Mechanism of nucleotide binding to actomyosin VI: evidence for allosteric head-head communication. *J Biol Chem.* 279:38608-17.
- Robinson, R.C., K. Turbedsky, D.A. Kaiser, J.B. Marchand, H.N. Higgs, S. Choe, and T.D. Pollard. 2001. Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science.* 294:1679-84.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M.W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell.* 97:221-31.
- Roland, J., J. Berro, A. Michelot, L. Blanchoin, and J.L. Martiel. 2008. Stochastic severing of actin filaments by actin depolymerizing factor/cofilin controls the emergence of a steady dynamical regime. *Biophys J.* 94:2082-94.
- Romero, S., C. Le Clainche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni, and M.F. Carrier. 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell.* 119:419-29.
- Rouiller, I., X.P. Xu, K.J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T.D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J Cell Biol.* 180:887-95.
- Rould, M.A., Q. Wan, P.B. Joel, S. Lowey, and K.M. Trybus. 2006. Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J Biol Chem.* 281:31909-19.
- Saez, A., M. Ghibaudo, A. Buguin, P. Silberzan, and B. Ladoux. 2007. Rigidity-driven growth and migration of epithelial cells on microstructured anisotropic substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:8281-6.
- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol.* 4:626-31.
- Sahlender, D.A., R.C. Roberts, S.D. Arden, G. Spudich, M.J. Taylor, J.P. Luzio, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2005. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol.* 169:285-95.
- Schafer, D.A., P.B. Jennings, and J.A. Cooper. 1996. Dynamics of capping protein and actin assembly in vitro: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J Cell Biol.* 135:169-79.
- Schaller, V., C. Weber, C. Semmrich, E. Frey, and A.R. Bausch. 2010. Polar patterns of driven filaments. *Nature.* 467:73-7.
- Sivaramakrishnan, S., and J.A. Spudich. 2009. Coupled myosin VI motors facilitate unidirectional movement on an F-actin network. *J Cell Biol.* 187:53-60.
- Small, J.V., K. Rottner, I. Kaverina, and K.I. Anderson. 1998. Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim Biophys Acta.* 1404:271-81.
- Spudich, J.A., and S. Sivaramakrishnan. 2010. Myosin VI: an innovative motor that challenged the swinging lever arm hypothesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:128-37.
- Sundberg, M., M. Balaz, R. Bunk, J.P. Rosengren-Holmberg, L. Montelius, I.A. Nicholls, P. Omling, S. Tagerud, and A. Mansson. 2006a. Selective spatial localization of actomyosin motor function by chemical surface patterning. *Langmuir.* 22:7302-12.
- Sundberg, M., R. Bunk, N. Albet-Torres, A. Kvennefors, F. Persson, L. Montelius, I.A. Nicholls, S. Ghatnekar-Nilsson, P. Omling, S. Tagerud, and A. Mansson. 2006b. Actin filament guidance on a chip: toward high-throughput assays and lab-on-a-chip applications. *Langmuir.* 22:7286-95.

- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy. 1999. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol.* 145:1009-26.
- Svitkina, T.M., E.A. Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol.* 160:409-21.
- Svitkina, T.M., A.B. Verkhovsky, K.M. McQuade, and G.G. Borisy. 1997. Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J Cell Biol.* 139:397-415.
- Sweeney, H.L., and A. Houdusse. 2010a. Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell.* 141:573-82.
- Sweeney, H.L., and A. Houdusse. 2010b. Structural and functional insights into the Myosin motor mechanism. *Annu Rev Biophys.* 39:539-57.
- Takatsuki, H., H. Tanaka, K.M. Rice, M.B. Kolli, S.K. Nalabotu, K. Kohama, P. Famouri, and E.R. Blough. 2011. Transport of single cells using an actin bundle-myosin bionanomotor transport system. *Nanotechnology.* 22:245101.
- Tanaka-Takiguchi, Y., T. Kakei, A. Tanimura, A. Takagi, M. Honda, H. Hotani, and K. Takiguchi. 2004. The elongation and contraction of actin bundles are induced by double-headed myosins in a motor concentration-dependent manner. *J Mol Biol.* 341:467-76.
- Tanner, K., A. Boudreau, M.J. Bissell, and S. Kumar. 2010. Dissecting regional variations in stress fiber mechanics in living cells with laser nanosurgery. *Biophys J.* 99:2775-83.
- Theriot, J.A., T.J. Mitchison, L.G. Tilney, and D.A. Portnoy. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature.* 357:257-60.
- Thery, M. 2010. Micropatterning as a tool to decipher cell morphogenesis and functions. *J Cell Sci.* 123:4201-13.
- Thery, M., A. Jimenez-Dalmaroni, V. Racine, M. Bornens, and F. Julicher. 2007. Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature.* 447:493-6.
- Thery, M., A. Pepin, E. Dressaire, Y. Chen, and M. Bornens. 2006. Cell distribution of stress fibres in response to the geometry of the adhesive environment. *Cell Motil Cytoskeleton.* 63:341-55.
- Vallotton, P., S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9660-5.
- van der Gucht, J., E. Paluch, J. Plastino, and C. Sykes. 2005. Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:7847-52.
- van Oudenaarden, A., and J.A. Theriot. 1999. Cooperative symmetry-breaking by actin polymerization in a model for cell motility. *Nat Cell Biol.* 1:493-9.
- Vavylonis, D., J.Q. Wu, S. Hao, B. O'Shaughnessy, and T.D. Pollard. 2008. Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science.* 319:97-100.
- Veigel, C., F. Wang, M.L. Bartoo, J.R. Sellers, and J.E. Molloy. 2002. The gated gait of the processive molecular motor, myosin V. *Nat Cell Biol.* 4:59-65.

- Verkhovskiy, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 1995. Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles. *J Cell Biol.* 131:989-1002.
- Verkhovskiy, A.B., T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 1999. Self-polarization and directional motility of cytoplasm. *Curr Biol.* 9:11-20.
- Vicente-Manzanares, M., M.A. Koach, L. Whitmore, M.L. Lamers, and A.F. Horwitz. 2008. Segregation and activation of myosin IIB creates a rear in migrating cells. *J Cell Biol.* 183:543-54.
- Vignjevic, D., D. Yazar, M.D. Welch, J. Peloquin, T. Svitkina, and G.G. Borisy. 2003. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol.* 160:951-62.
- Waddle, J.A., J.A. Cooper, and R.H. Waterston. 1993. The alpha and beta subunits of nematode actin capping protein function in yeast. *Mol Biol Cell.* 4:907-17.
- Wang, Y.L. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *J Cell Biol.* 101:597-602.
- Warner, C.L., A. Stewart, J.P. Luzio, K.P. Steel, R.T. Libby, J. Kendrick-Jones, and F. Buss. 2003. Loss of myosin VI reduces secretion and the size of the Golgi in fibroblasts from Snell's waltzer mice. *EMBO J.* 22:569-79.
- Watanabe, N., and T.J. Mitchison. 2002. Single-molecule speckle analysis of actin filament turnover in lamellipodia. *Science.* 295:1083-6.
- Watanabe, T.M., A.H. Iwane, H. Tanaka, M. Ikebe, and T. Yanagida. 2010. Mechanical characterization of one-headed myosin-V using optical tweezers. *PLoS One.* 5:e12224.
- Wilson, C.A., M.A. Tsuchida, G.M. Allen, E.L. Barnhart, K.T. Applegate, P.T. Yam, L. Ji, K. Keren, G. Danuser, and J.A. Theriot. 2010. Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature.* 465:373-7.
- Wu, J.Q., J.R. Kuhn, D.R. Kovar, and T.D. Pollard. 2003. Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell.* 5:723-34.
- Xu, Y., J.B. Moseley, I. Sagot, F. Poy, D. Pellman, B.L. Goode, and M.J. Eck. 2004. Crystal structures of a Formin Homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell.* 116:711-23.
- Yam, P.T., C.A. Wilson, L. Ji, B. Hebert, E.L. Barnhart, N.A. Dye, P.W. Wiseman, G. Danuser, and J.A. Theriot. 2007. Actin-myosin network reorganization breaks symmetry at the cell rear to spontaneously initiate polarized cell motility. *J Cell Biol.* 178:1207-21.
- Yanagida, T., and F. Oosawa. 1975. Effect of myosin on conformational changes of F-actin in thin filament in vivo induced by calcium ions. *Eur J Biochem.* 56:547-56.
- Yang, C., L. Czech, S. Gerboth, S. Kojima, G. Scita, and T. Svitkina. 2007. Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol.* 5:e317.
- Yonezawa, N., Y. Homma, I. Yahara, H. Sakai, and E. Nishida. 1991a. A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J Biol Chem.* 266:17218-21.
- Yonezawa, N., E. Nishida, K. Iida, H. Kumagai, I. Yahara, and H. Sakai. 1991b. Inhibition of actin polymerization by a synthetic dodecapeptide patterned on the sequence around the actin-binding site of cofilin. *J Biol Chem.* 266:10485-9.
- Yonezawa, N., E. Nishida, M. Ohba, M. Seki, H. Kumagai, and H. Sakai. 1989. An actin-interacting heptapeptide in the cofilin sequence. *Eur J Biochem.* 183:235-8.

## Résumé en Anglais

During my thesis I have developed different projects in order to tackle the problem of actin network dynamics and organization as well as the molecular mechanism at the origin of force production in biomimetic reconstituted systems. My first interest concerned the spatiotemporal organization of actin networks and actin-binding proteins during actin based motility of nucleation promoting factor-coated particles (Achard et al, *Current Biology*, 2010 and Reymann et al, accepted at MBOC). I observed in real time the incorporation of two actin regulators (Capping protein et ADF/cofilin) and showed that their biochemical control of actin dynamics also governs its mechanical properties. To further characterize the mechanical properties of expanding actin networks, I used an innovative micropatterning set-up allowing a reproducible spatial control of actin nucleation sites. It allowed me to show that geometrical boundaries, such as those encountered in cells, affect the dynamic formation of highly ordered actin structures and hence control the location of force production (Reymann et al, *Nature Materials*, 2010). Finally the addition of molecular motors on this tunable system allowed me to study implications for myosin-induced contractility. In particular, HMM-MyosinVI selectively interact with the different actin network architectures (parallel, anti-parallel organization or entangled networks) and leads to a selective three-phase process of tension, deformation of actin networks tightly coupled to massive filament disassembly. This phenomenon being highly dependent on actin network architecture could therefore play an essential role in the spatial regulation of expanding and contracting regions of actin cytoskeleton in cells.

# Résumé

Mon travail de thèse fut de développer différents projets en vue de mieux comprendre la dynamique et l'organisation des réseaux d'actine, ainsi que les mécanismes moléculaires à l'origine de la production de force grâce à différents systèmes reconstitués biomimétiques. Dans un premier temps, je me suis intéressée à l'étude de l'organisation spatiotemporelle des réseaux dynamiques d'actine et de ses protéines associées durant la propulsion de particules recouvertes de promoteurs de nucléation des filaments d'actine (Achard et al, Current Biology, 2010 et Reymann et al, accepté à MBoC). J'ai notamment suivi en temps réel l'incorporation de deux régulateurs de l'actine (Capping protein, protéine de coiffe et ADF/cofilin, protéine de fragmentation) et montré que leurs actions conjuguées assurent un contrôle biochimique de l'assemblage d'un réseau complexe d'actine, mais gouvernent également les propriétés mécaniques de ce réseau. Par ailleurs, afin de mieux caractériser les propriétés mécaniques de ces réseaux d'actine en expansion, j'ai développé un système biomimétique novateur utilisant la procédure de micropatrons ou "micropatterning" qui permet un contrôle spatial reproductible des sites de nucléation d'actine. Cela m'a permis de montrer comment des barrières géométriques, semblables à celles trouvées dans les cellules, peuvent influencer la formation dynamique de réseaux organisés d'actine et ainsi contrôler la localisation de la production de forces. (Reymann et al, Nature Materials, 2010). De plus, l'incorporation de moteurs moléculaires dans ce système versatile, nous a permis d'étudier la contraction induite par des myosines. En particulier, j'ai pu montrer que les myosines VI HMM interagissent de manière sélective avec différentes architectures d'actine (organisation parallèle ou antiparallèle, réseau enchevêtré), aboutissant à un processus en trois phases: tension, puis déformation des réseaux d'actine fortement couplée à un désassemblage massif des filaments. Aussi, ce phénomène de désassemblage massif induit par la myosine est intimement dépendant de l'architecture du réseau d'actine et pourrait, de ce fait, jouer un rôle essentiel dans la régulation spatiale des zones d'expansion et de contraction du cytosquelette *in vivo*.