



HAL
open science

Etude du rôle de la protéine VASP dans la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine avec un système biomimétique de la motilité cellulaire

Philippe Noguera

► **To cite this version:**

Philippe Noguera. Etude du rôle de la protéine VASP dans la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine avec un système biomimétique de la motilité cellulaire. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. NNT : 2012PAO66438 . tel-00834288

HAL Id: tel-00834288

<https://theses.hal.science/tel-00834288v1>

Submitted on 14 Jun 2013

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.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Biologie Moléculaire et Cellulaire
ED 515

Présentée par

M. Philippe Noguera

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Étude du rôle de la protéine VASP dans la dynamique et la
mécanique des réseaux d'actine avec un système biomimétique de
la motilité cellulaire.**

Soutenue le 26 septembre 2012

devant le jury composé de :

Mme. Julie Plastino.	Directeur de thèse.
M. Alexis Gautreau.	Rapporteurs.
M. Henry Higgs.	Rapporteurs.
M. Laurent Blanchoin	Examineur.
M. Axel Buguin	Président de jury.

Table des matières.

Avant-propos	p. 7
Chapitre 1 : Introduction générale à la motilité cellulaire et à l'actine.	p. 9
1.1 L'actine.	p. 11
1.1.1 Généralités sur l'actine.	p. 11
1.1.2 L'actine Monomérique (actine-G).	p. 11
1.1.3 Le filament d'actine (actine-F).	p. 12
1.1.4 Les dynamiques de polymérisation de l'actine.	p. 13
1.1.5 Rôle du nucléotide dans la dynamique du filament.	p. 15
1.2 Les protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine.	p. 17
1.2.1 Les ligands de l'actine-G.	p. 17
1.2.2 Les protéines régulatrices de l'actine-F.	p. 18
1.2.3 Les protéines de réticulation (les cross-linkers).	p. 19
1.2.4 Les moteurs moléculaires.	p. 19
1.2.5 Les protéines nucléatrices de l'actine.	p. 20
1.3 Les activateurs de la polymérisation de l'actine.	p. 21
1.3.1 La famille WASP et N-WASP.	p. 22
1.3.1.1 Activation des WASPs.	p. 23
1.3.1.2 Recrutement des WASPs.	p. 24
1.3.2 La famille Scar/WAVES.	p. 24
1.3.2.1 Différences avec les protéines WASPs.	p. 25
1.3.2.2 Régulation des protéines WAVES par le complexe WAVE.	p. 25
1.3.2.3 Activation du complexe WAVE.	p. 26
1.4 Les structures de la motilité cellulaire.	p. 27
1.4.1 Le lamellipode.	p. 27
1.4.2 Les filopodes.	p. 30
1.4.3 Les adhésions focales.	p. 32
1.4.4 Les fibres de stress.	P. 33
1.5 Ena/VASP.	p. 34
1.5.1 Généralités sur VASP.	p. 34
1.5.2 Effets des protéines Ena/VASP sur la motilité.	p. 36
	p. 36

1.5.3	Influence de VASP sur la formation des filopodes.	
1.5.4	Influence de VASP sur le déplacement de <i>Listeria monocytogenes</i>	p. 37
1.5.5	Des arguments en faveur d'une activité « anti protéine de coiffe » de VASP.	p. 37
1.5.6	Des arguments à l'encontre d'une activité « anti protéine de coiffe » de VASP.	p. 38
1.5.7	VASP réduit le nombre de branches formées par le complexe Arp2/3.	p. 39
1.5.8	Contribution des différents domaines de VASP à sa fonction	p. 39
1.5.8.1	Le domaine EVH1.	p. 39
1.5.8.2	Le domaine Polyproline.	p. 40
1.5.8.3	Le domaine EVH2.	p. 40
1.5.8.4	Le site de liaison à l'actine-G.	p. 41
1.5.8.5	Le site de liaison à l'actine-F.	p. 41
1.5.8.6	Le domaine Coiled-coil ou TET.	p. 41
1.5.8.7	Les protéines Ena/VASP et le cancer.	p. 42
1.6	Systèmes biomimétiques.	p. 43
1.6.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	p. 43
1.6.2	Mécanisme de polymérisation de l'actine à la surface de la <i>Listeria</i>	p. 44
1.6.3	Des extraits cellulaires aux extraits reconstitués.	p. 46
1.6.4	De la <i>Listeria</i> à la bille.	p. 46
1.6.5	Diversité des systèmes biomimétiques.	p. 47
1.6.6	Modèle élastique de la génération du mouvement.	p. 47
1.6.7	La brisure de symétrie.	p. 48
1.8	Sujet de la thèse.	p. 49
	Résultats	p. 50
	Chapitre 2 : Ena/VASP agit en synergie avec le complexe Arp2/3 lors de la motilité actine dépendante.	p. 51
2.1	Ena/VASP affecte la croissance du gel d'actine sans augmenter la motilité.	p. 51
2.2	Ena/VASP augmente la motilité uniquement lorsqu'il est lié à	

l'activateur du complexe Arp2/3.	
2.3 L'activité de la famille des activateurs WASP mais pas WAVE est potentialisée par VASP.	p. 55
2.4 La forme tétramérique de VASP a besoin de ses sites de liaison à l'actine-F et à la profiline, mais pas de son site de liaison à l'actine-G pour potentialiser la motilité Arp2/3 dépendante.	p. 57
2.5 L'effet de VASP ne passe pas uniquement par son activité anti protéine de coiffe.	p. 59
2.6 Modèle de transfert moléculaire de VASP.	p. 61
2.7 Bilan.....	p. 62
2.8 Conclusions et perspectives.....	p. 63
Article : Ena/VASP synergizes with the Arp2/3 complex via a molecular hand-off mechanism during actin-based motility.....	p. 65
Chapitre 3 : Etude rhéologique du rôle de VASP dans la mécanique des réseaux d'actine.	p. 97
3.1 Brève introduction à la rhéologie.	p. 97
3.2 Effet de VASP sur le module élastique des réseaux d'actine.....	p. 99
3.3 Contribution des domaines de VASP à l'augmentation de l'élasticité des réseaux d'actine.	p. 102
3.4 Bilan.....	p. 107
3.5 Conclusions et perspectives.....	p. 107
Article : Multiple Actin Binding Domains of Ena/VASP Proteins Determine Actin Network Stiffening.....	p. 109
Chapitre 4 : Rôle de VASP dans la mécanique des comètes d'actine Arp2/3dépendantes étudié par AFM.	p. 143
4.1 Brève introduction sur L'AFM.	p. 143
4.2 Observation des comètes par AFM.	p. 145
4.3 Effet du recrutement de VASP sur le module élastique des comètes.	p. 149
4.4 Effet de la concentration en VASP sur le module élastique.	p. 151
4.5 Effet de la force ionique du mix de motilité sur le module élastique.	p. 152
4.6 Bilan.....	p. 155
4.7 Conclusions et perspectives.....	p. 155
Article : The role of VASP in an Arp3/3-complex-based motility assay..	p. 157
	p. 169

Conclusion générale.....

Avant-propos.

Chez les métazoaires, la migration cellulaire par reptation sur substrat intervient dans des processus physiologiques fondamentaux. Ainsi, lors de l'étape clé de l'embryogenèse qu'est la gastrulation, les cellules migrent et se rassemblent en une suite de mouvements morphogénétiques pour la mise en place des tissus et des organes. Lors de la cicatrisation, les fibroblastes migrent pour coloniser et réparer la plaie. Dans le cadre de la réponse immunitaire, les neutrophiles passent la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins et rechercher activement la présence de pathogènes dans les tissus environnants pour les détruire.

Ces déplacements cellulaires à grande échelle sont conduits par le cytosquelette (ou squelette de la cellule). Le cytosquelette est constitué d'un réseau cohésif de filaments protéiques qui s'étend dans le cytoplasme des cellules et dont la dynamique est régulée par des protéines qui lui sont associées. Il joue un rôle mécanique majeur puisqu'il détermine et contraint la forme ainsi que le déplacement des cellules.

Mon travail de thèse porte sur le cytosquelette d'actine et plus particulièrement sur le rôle de la protéine VASP (Ena/Vasodilator-stimulated phosphoprotein), dans la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine. Si VASP semble intervenir dans la formation de structures indispensables à la motilité cellulaire, ses modes d'actions restent à ce jour mal compris, sujets à de nombreuses controverses. De plus, VASP est anormalement exprimée dans plusieurs types de cancers et est souvent la marque d'un pronostic défavorable. Il apparaît alors important de comprendre comment VASP participe à la motilité cellulaire. Pour mener à bien cette étude, nous avons testé l'activité de VASP à l'aide d'un système biomimétique composé de billes recouvertes par des activateurs de la polymérisation de l'actine. Dans un mélange de protéines purifiées soutenant la polymérisation de l'actine, des comètes d'actine se forment à la surface des billes, mimant le cytosquelette d'actine qui sous-tend la membrane du front de migration des cellules en mouvement.

Le chapitre 1 de ma thèse présente une introduction générale sur les différents aspects de la motilité cellulaire impliquant l'actine et les protéines partenaires comme VASP. Les chapitres 2, 3 et 4 résument nos travaux sur l'activité de VASP.

En premier lieu, nous avons décortiqué le mode de fonctionnement de VASP à l'aide du système de billes. Ces travaux sont présentés dans le chapitre 2. La mécanique des réseaux d'actine jouant un rôle prépondérant dans la formation des structures de la motilité cellulaire, nous avons d'une

part mesuré l'activité de réticulation de VASP sur des réseaux d'actine en solution à l'aide de mesures en rhéologie couplées à des observations en microscopie confocale (travaux en collaboration avec le laboratoire de Gijsje Koenderink, AMOLF, Pays-Bas), et d'autre part, les effets de VASP sur l'élasticité des comètes d'actine à l'aide de mesures en microscopie à force atomique (AFM) (travaux en collaboration avec le laboratoire de Laurent Kreplak, Delhousie University, Canada). Ces travaux sont respectivement présentés dans les chapitres 3 et 4.

Chapitre 1.

Introduction générale à la Motilité Cellulaire et à l'actine.

La migration cellulaire est essentielle à divers processus biologiques comme l'embryogenèse, la réponse du système immunitaire ou encore la réparation des tissus. La dérégulation de cette motilité cellulaire est associée à de nombreuses maladies comme des syndromes auto-immuns ou encore la formation de métastases (Lambrechts et al., 2004; Wickramarachchi et al., 2010). C'est pourquoi il est important d'en comprendre les différents aspects. En outre, la migration cellulaire est un processus qui engage diverses structures et protrusions riches en actine.

En polymérisant, l'actine permet l'extension de protrusions membranaires : une extension large et plate appelée **lamellipode** et des extensions quasi unidimensionnelles, sortes de « doigts » qui s'étendent depuis le lamellipode et qui jouent un rôle dans l'exploration de l'environnement de la cellule : **les filopodes**. Pour ancrer ses protrusions, le front de migration de la cellule interagit avec la MEC : **matrice extracellulaire**. La matrice extracellulaire désigne l'ensemble de macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif et des autres tissus. Elle est constituée en grande partie de glycoprotéines et de protéines pures, ainsi que de glycosaminoglycanes. Les cellules forment avec la MEC des adhésions naissantes ou complexes focaux connectés au réseau d'actine intracellulaire du lamellipode. Ces points d'adhésion sont dynamiques et peuvent se désassembler ou mûrir en réponse aux forces du complexe actomyosine en de larges structures appelées **adhésions focales**. Ces adhésions focales assurent la formation de longs câbles contractiles constitués par le complexe actomyosine : **les fibres de stress**. En se contractant sous l'effet de moteurs moléculaires : les myosines II, les fibres de stress détachent l'arrière de la cellule de son substrat rétractant vers l'avant le corps cellulaire. Cette contraction produit également un flux cytoplasmique vers l'avant de la cellule, nécessaire à la protrusion du lamellipode (Figure 1.1a-b).

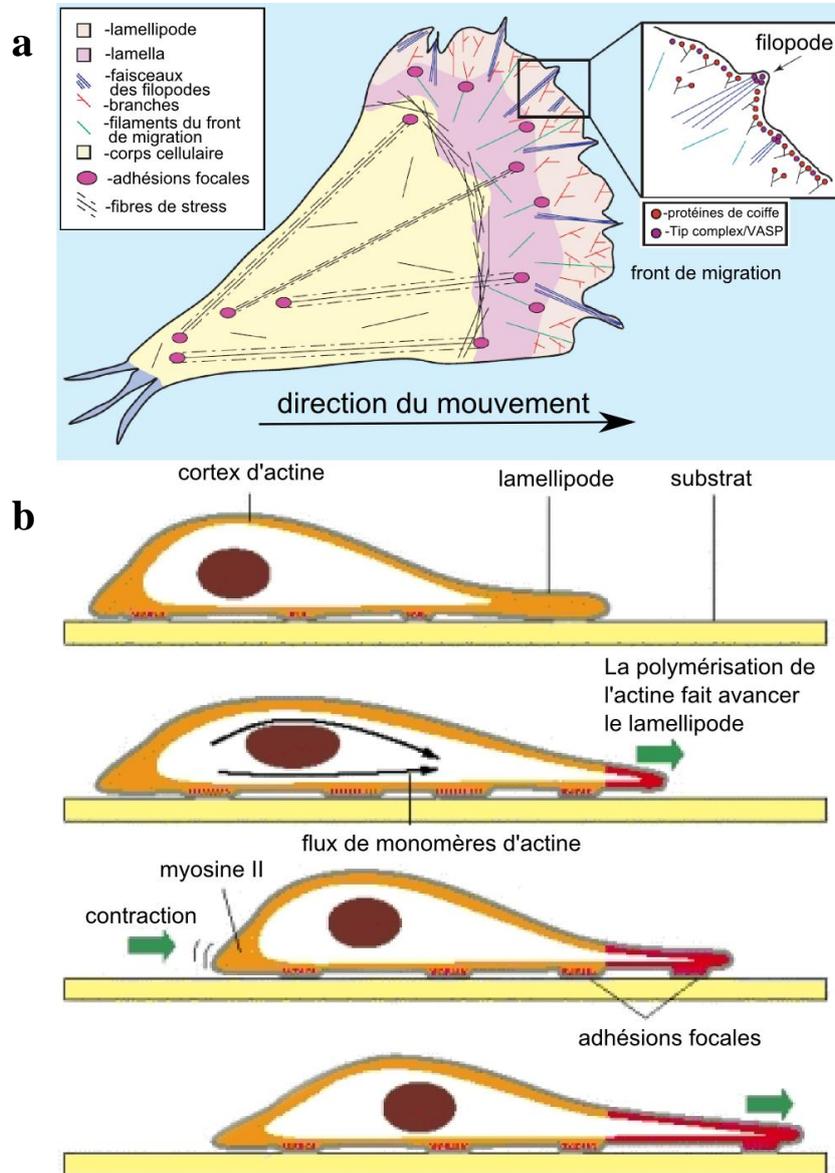


Figure 1.1 : (a) Modèle d'une cellule migrante et de ses principales structures d'actine impliquées dans la motilité. Adapté de Nicholson-Dykstra., 2005. (b) Modèle du mouvement cellulaire. (1) La cellule étend son lamellipode vers l'avant. (2) Elle forme avec son substrat des adhésions appelées adhésions focales dont elle se sert pour prendre appui et avancer. (3) Le cortex d'actomyosine à l'arrière de la cellule se contracte. Cela a pour effet de créer un flux cytoplasmique d'actine vers l'avant, de tirer le corps cellulaire dans le sens du mouvement et de détacher à l'arrière la cellule de son substrat. Adapté de Alberts et al., 2002.

1.1 L'actine.

1.1.1 Généralités sur l'actine.

Présente sous forme monomérique (actine-G) et capables de polymériser pour former des filaments (actine-F), l'actine est l'un des composés majeurs du cytosquelette des cellules eucaryotes et constitue 5 à 10% des protéines totales (jusqu'à 60% dans les cellules musculaires). Abondante et versatile, elle est indispensable à la motilité, et intervient dans des fonctions variées telles que la phagocytose, la division cellulaire et même la transcription. Dans les cellules eucaryotes, l'actine forme des structures variées comme des faisceaux statiques, des faisceaux contractiles, des réseaux bidimensionnels ou encore des gels tridimensionnels. La localisation, les structures et fonctions de ces assemblages dépendent de toute une ménagerie de protéines partenaires de l'actine qui lui sont associées. L'actine est une des protéines les plus conservées au cours de l'évolution. Ainsi, on ne compte que 15 acides aminés différents sur 375 entre l'actine- γ cytoplasmiques des mammifères et l'actine d'*Acanthamoeba* ou de *Dictyostelium* (des amibes), et la comparaison de l'actine du muscle squelettique de nombreux vertébrés ne révèle aucune différence. Cette forte conservation évolutive peut s'expliquer par le nombre élevé d'interactions de l'actine avec des protéines partenaires. En effet, il apparaît difficile de modifier sa séquence sans affecter une ou plusieurs de ces interactions protéine/protéine et leurs fonctions associées dans la cellule.

Chez les mammifères, on dénombre six isoformes majeures d'actines (cytosquelettiques et musculaires) réparties en 3 familles qui diffèrent selon leur point isoélectrique : α (la plus acide) β et γ (Vandekerckhove and Weber, 1978). Toutes sont codées par une famille de gènes issue de la duplication d'un gène ancestral avant l'apparition des chordés. Leurs différences sont faibles et sont pratiquement indiscernables dans leur capacité à polymériser et à interagir avec d'autres protéines. Ainsi les actines cytoplasmiques et musculaires ne diffèrent que d'environ 23 acides aminés sur 375.

1.1.2 L'actine monomérique (actine-G).

L'actine monomérique ou actine-G est une protéine globulaire ubiquitaire composée d'une seule chaîne polypeptidique de 375 acides aminés pour une masse moléculaire d'environ 42kDa et un diamètre de 5,5nm. Plutôt acide, son point isoélectrique se situe aux environs de pH 5,5. Le monomère d'actine est constitué par deux sous-domaines globulaires articulés entre eux et séparés par une fente. Cette fente est le site de liaisons de deux cofacteurs: un nucléotide : l'adénosine triphosphate (ATP) ou

bien l'Adénosine Diphosphate (ADP), ainsi qu'un cation divalent : le Calcium (Ca^{++}) ou le Magnésium (Mg^{++}) (Figure 1.2). Ces cofacteurs participent aux dynamiques et à la stabilité de l'actine (De La Cruz et al., 2000). In vivo, la majorité des monomères d'actine sont complexés au magnésium et à l'ATP. De plus, dans la plupart des cellules examinées, l'actine porte deux modifications post traductionnelles : l'acétylation de ses résidus en N-terminal ainsi que la méthylation d'une de ses histidines. Le monomère d'actine présente quatre sites de liaison pour d'autres monomères d'actine. Mis en conditions favorables (présence d'ions divalents, d'ATP, concentration au-dessus du point critique de polymérisation) ces monomères s'assemblent de manière stéréospécifique, spontanément et de manière réversible en filaments de plusieurs micromètres de longueur.

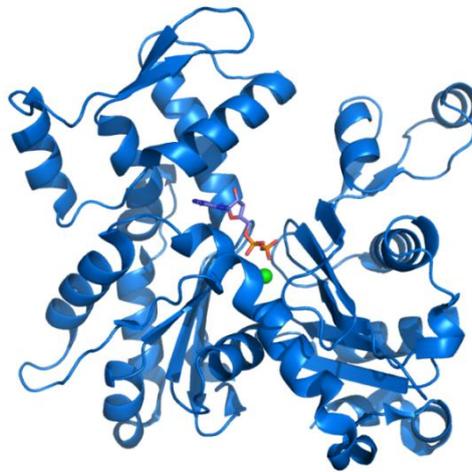


Figure 1.2 : Représentation d'un monomère d'actine en feuillet bêta et hélice alpha complexé avec une molécule d'ATP et son cation divalent (boule verte). Cette structure est générée à l'aide du logiciel PyMOL d'après la structure de Kabsch et., 1990.

1.1.3 Le filament d'actine (actine-F).

Le filament d'actine est une double hélice droite flexible composée de deux brins parallèles et qui tourne sur elle-même avec un pas de 37 nanomètres (Figure 1.3a et b). En polymérisant, les monomères s'assemblent avec la même orientation. Leur incorporation dans le filament s'accompagne de leur aplatissement par rotation relative des deux domaines globulaires de 20 degrés (Oda et al., 2009). Les deux extrémités du filament exposent alors des portions de monomère différentes, donc, des structures différentes, conférant ainsi sa polarité au filament. Cette polarité peut être mise en évidence grâce à des filaments d'actine décorés par des têtes S1 de myosine II et observés en microscopie électronique (Figure 1.3c) (Craig et al., 1985). En se fixant au filament d'actine, les têtes de myosine forment une série de projections latérales inclinées de 45° toutes dans la même direction, dessinant des « pointes de flèche ». L'extrémité vers laquelle pointent ces motifs est appelée bout pointu par opposition à l'autre extrémité appelée bout barbé. Le bout barbé, plus dynamique, est également appelé le bout plus. Le bout pointu est appelé le bout moins. Les deux sillons du filament

d'actine formés par l'enlacement de ses deux brins sont stériquement identiques. Cela a pour conséquence la fixation latérale de partenaires comme la tropomyosine de manière indifférente sur les deux côtés du filament.

La force de liaison entre monomères dépend de facteurs externes comme la force ionique du tampon. Cette propriété peut être avantageusement utilisée pour amener une préparation d'actine vers un état de polymérisation ou de dépolymérisation et ainsi étudier ses cinétiques par divers moyens physiques (suivi de la viscosité, utilisation de marqueurs fluorescents, etc...).

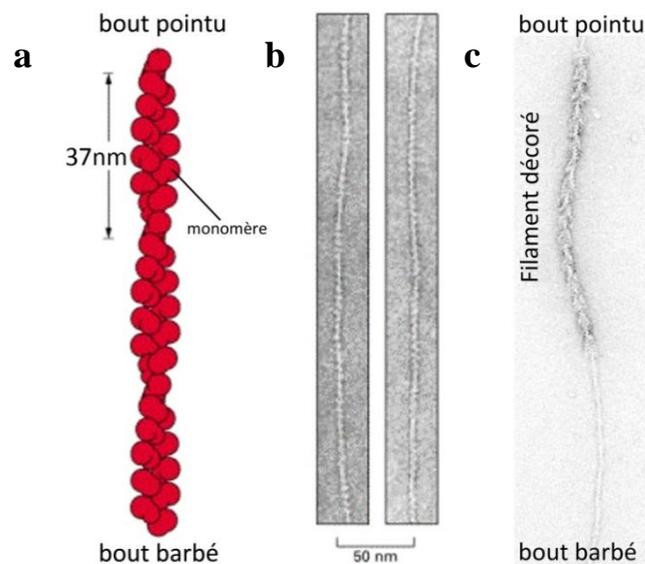


Figure 1.3 : (a) représentation schématique de la double hélice d'un filament d'actine. (b) Filaments d'actine en microscopie électronique. (c) filament d'actine décoré par des têtes de myosine II observé en microscopie électronique. (a) et (b) d'après Alberts et al., 2002 et (c) d'après Pollard et Borisy., 2003.

1.1.4 Les dynamiques de polymérisation de l'actine.

La polymérisation de l'actine *in vitro* présente trois phases (Figure 1.4).

La phase de nucléation.

Une augmentation de la force ionique (ajout de KCl, MgCl₂ ou CaCl₂) d'une solution d'actine-G pure additionnée d'ATP déclenche la polymérisation. Celle-ci commence par une phase dite de nucléation et se traduit par un retard dont la durée (de plusieurs secondes à quelques minutes) dépend de la concentration en actine-G. Elle s'explique par le fait que les monomères doivent s'assembler en de courts oligomères d'actine instables composés de trois monomères : les noyaux de nucléation (Sept and McCammon, 2001). Ces noyaux, dont la formation constitue l'étape cinétiquement limitante car défavorable, sont nécessaires à

l'initiation de la croissance des filaments d'actine. La phase de nucléation peut être supprimée en ajoutant à la solution d'actine-G des oligomères préformés.

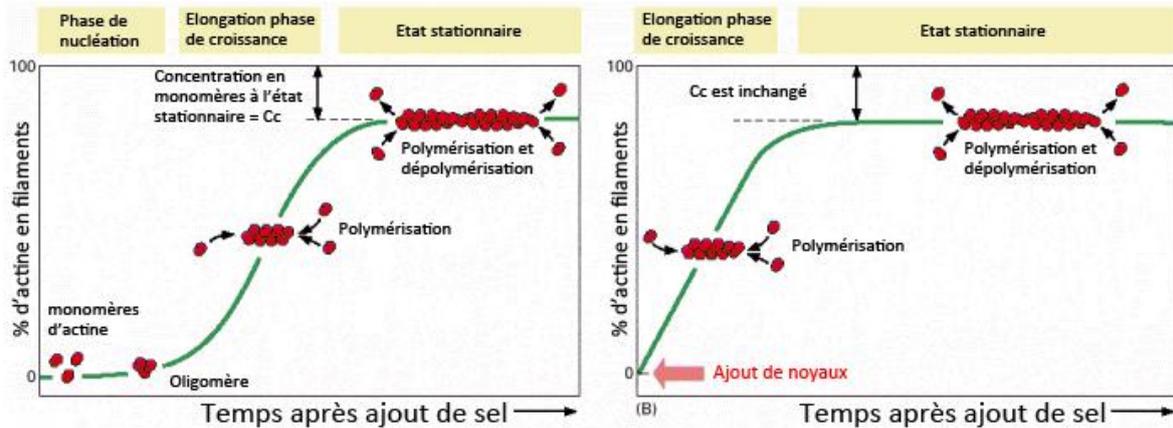


Figure 1.4 : (a) l'augmentation de la concentration en sel initie la polymérisation d'une solution d'actine monomérique. (b) l'étape limitante de la nucléation peut être contournée par l'ajout dans la solution de fragments de filaments préformés:

Phase d'élongation.

Des expériences démontrent que les taux d'élongation des deux extrémités du filament d'actine ne sont pas égaux. Cela s'explique par la polarité du filament : les structures exposées aux deux bouts sont différentes. Ainsi, des fragments d'actine-F décorés par des têtes S1 de myosine II et mélangés à une solution d'actine-G initient l'élongation de filaments. Les filaments polymérisés sont récupérés et observés en microscopie électronique. Il apparaît que ceux-ci grandissent de façon asymétrique de part et d'autre de la portion décorée. La région du côté barbé grandit environ dix fois plus rapidement que la région du côté pointu (Kondo and Ishiwata, 1976).

La phase d'élongation correspond à la somme des réactions d'association (k_{on} , $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et de dissociation (k_{off} , s^{-1}) des monomères d'actine aux deux extrémités du polymère. Du fait de la différence structurale des deux extrémités du filament, les constantes d'association k_{on} et de dissociation k_{off} sont différentes pour les deux bouts.

- $k_{on} \times C$ représente le taux de polymérisation proportionnel à la concentration C en monomères.
- k_{off} représente le taux de dépolymérisation qui est indépendant de la concentration en monomères.

Au cours de la phase d'élongation, les taux de croissance nets au bout barbé (dn_b/dt) et au bout pointu (dn_p/dt) sont donnés par la différence entre le taux de polymérisation et la dépolymérisation de chaque extrémité.

$$dn_b/dt = k_{on,b} \times C - k_{off,b}$$

$$dn_p/dt = k_{on,p} \times C - k_{off,p}$$

Chaque extrémité possède sa propre concentration critique C_c qui est c'est la valeur seuil en dessous de laquelle les monomères d'actine ne sont plus capables de s'assemblent spontanément en filaments. Elle est donnée par le ratio k_{off}/k_{on} . En conditions physiologiques, la concentration critique en actine-G pour le bout barbé est plus faible ($0,12\mu M$) que pour le bout pointu ($0,62\mu M$). Ces constantes ont pu être mesurées grâce à l'étude cinétique de la longueur des filaments en microscopie électronique (Pollard, 1986). Au cours des dernières années, la microscopie en TIRF a rendu possible l'observation de filaments uniques d'actine en dynamique (Fujiwara et al., 2002; Kuhn and Pollard, 2005). L'observation d'importantes fluctuations dans la longueur des filaments laisse suggérer qu'association et dissociation de l'actine pourraient également se faire par oligomères.

L'état stationnaire.

La concentration en actine-F croît, jusqu'à atteindre une valeur plateau : c'est l'état stationnaire. L'actine-G (à sa concentration critique C_c) est en équilibre dynamique avec l'actine-F et leur concentration ne varie plus. La concentration en actine-G est supérieure à la concentration critique au bout barbé (le filament polymérise au bout plus), mais inférieure à la concentration critique au bout pointu (le filament dépolymérise au bout moins). Le taux de polymérisation au bout plus compense exactement le taux de dépolymérisation au bout moins et le filament est dans un état stationnaire où il garde une longueur constante. Il n'y a plus de croissance nette des filaments.

$$k_{on} \times C - k_{off} = 0$$

$$C = k_{off}/k_{on}$$

On parle alors de phénomène dit de « tapis roulant », mis en évidence par des expériences de polymérisation en présence de monomères radiomarqués (Wegner, 1976). L'observation de ce phénomène en dynamique par microscopie TIRF ne remonte qu'à une dizaine d'années seulement (Fujiwara et al., 2002). A l'inverse, si on part d'une solution d'actine-F pure, les filaments commencent par dépolymériser. Au fur et à mesure que les monomères quittent les filaments, la

concentration en actine-G augmente progressivement jusqu'à atteindre la concentration critique. Le taux initial de polymérisation est alors négatif.

1.1.5 Rôle du nucléotide dans la dynamique du filament.

Pendant longtemps, le rôle de l'ATP dans la polymérisation de l'actine n'était pas bien compris puisque l'actine-ADP et même l'actine sans nucléotide peuvent s'assembler en filaments (De La Cruz et al., 2000). Mais le taux d'élongation de l'actine-ADP est plus lent que celui de l'actine-ATP. Aussi, les bouts + et - des filaments d'actine-ADP ont la même concentration critique ($C_c=2\mu\text{M}$) (Figure 1.5). Dans ces conditions, elles polymérisent (au-dessus de la C_c) ou dépolymérisent (en dessous de la C_c) en même temps et ne sont pas sujettes au phénomène de tapis roulant. En absence de nucléotide, l'actine est instable et les deux extrémités ont la même concentration critique (proche de $0\mu\text{M}$ (De La Cruz et al., 2000)). L'actine-F se comporte alors comme un polymère à l'équilibre.

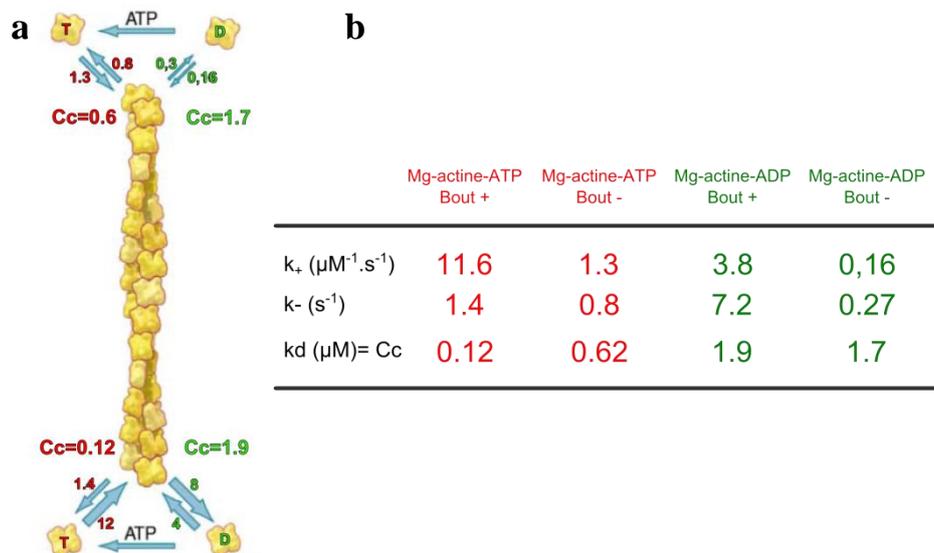


Figure 1.5 : Taux d'association ($\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), taux de dissociation (s^{-1}) et concentration critique (μM) de l'actine-ATP (en rouge) et de l'actine-ADP (en vert). (a) adapté de Pollard et Borisy., 2003. (b) adapté de Pollard., 1986.

En fait, l'hydrolyse de l'ATP par l'actine polymérisée suivie par la dissociation du phosphate γ joue le rôle d'horloge interne du filament d'actine, module ses propriétés mécaniques et cinétiques et déclenche les processus de son renouvellement par des protéines régulatrices. L'actine est d'abord incorporée au bout plus sous forme actine-ATP, puis elle hydrolyse son ATP en ATP-Pi. Deux visions s'opposent : un modèle préconise l'hydrolyse de l'ATP de façon stochastique dans le filament, indépendamment de l'état des nucléotides liés aux monomères voisins (Pollard, 1986), et un deuxième modèle met en avant un mécanisme vectoriel de l'hydrolyse dans lequel les monomères coopèrent avec la nécessité d'avoir un voisin lié à l'ADP pour être hydrolysé (Pantaloni et al., 1985). Il s'en suit le relargage lent et aléatoire du phosphate qui entraîne un changement de conformation et

une diminution de la rigidité du filament, le déstabilise et conduisant à sa dépolymérisation (Isambert et al., 1995; Jégou et al., 2011).

L'hydrolyse de l'ATP par l'actine polymérisée est un processus irréversible (Carlier et al., 1988). Son taux est dépendant du cation (Mg^{2+} ou Ca^{2+}) divalent lié. Ainsi, en conditions physiologiques, l'espèce Mg-ATP-actine hydrolyse l'ATP six fois plus rapidement que l'espèce Ca-ATP-actine avec une demi-vie de deux secondes (Blanchoin and Pollard, 2002). La dissociation du phosphate est bien plus lente avec une demi-vie de 6 minutes faisant de l'actine-ADP-Pi un intermédiaire à la durée de vie élevée au sein du filament (Carlier and Pantaloni, 1986). Les monomères actine-ADP se dissocient plus rapidement du bout barbé que les monomères actine-ATP mais les deux se dissocient lentement du bout pointu (Pollard, 1986).

En l'absence de protéines régulatrices, les filaments d'actine seuls se renouvèlent très lentement alors que les cellules peuvent avancer rapidement. A l'équilibre, la croissance au bout barbé est limitée *in vitro* par la dépolymérisation au bout pointu qui progresse à $0,04\mu m/min$ comparé aux hépatocytes ou aux pathogènes comme la *Listeria* qui peuvent se déplacer jusqu'à $10\mu m/min$. Seule la présence de protéines régulatrices qui influent les dynamiques de polymérisation de l'actine peuvent expliquer ces différences observées.

1.2 Les protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine.

La concentration en actine monomérique dans les cellules va de 50 à $200\mu M$ soit environ 100 fois plus élevé que la concentration critique mesurée en tube à essai sur des solutions d'actine pure. Aussi, la croissance de filaments d'actine *in vivo* peut être jusqu'à 200 fois supérieure à celle observée *in vitro* (Pollard and Borisy, 2003). Ces différences s'expliquent par la présence de protéines partenaires de l'actine ou ABP (actin-binding proteins). À ce jour, plusieurs centaines d'ABP appartenant à une soixantaine de classes ont été découvertes et leur nombre ne cesse de croître (Pollard and Borisy, 2003). Ces ABP regroupent des protéines aux fonctions très variées comme la nucléation, le coiffage des filaments, la stabilisation, le coupage, la dépolymérisation, la réticulation, la formation de faisceaux, la séquestration ou la livraison des monomères aux bouts barbés (Goley and Welch, 2006). Nous ne détaillerons ici que quelques ABP parmi les plus connues. Ces protéines génèrent une grande diversité de structures d'actine critiques pour assurer les fonctions et la viabilité cellulaire.

1.2.1 Les ligands de l'actine-G.

Dans la cellule, la majorité des monomères d'actine sont sous forme séquestrée pour maintenir un pool d'actine-G mobilisable en cas de nécessité à former des protrusions.

La profiline est une petite protéine qui lie le bout barbé des monomères d'actine. Elle lie préférentiellement les monomères actine-ADP et catalyse l'échange du nucléotide (Theriot et al., 1994). Elle n'entraîne pas une augmentation du taux de polymérisation des filaments d'actine. En revanche, elle empêche leur incorporation au bout pointu. La profiline inhibe également la nucléation spontanée des filaments d'actine en solution. Dans certaines cellules, sa concentration et son affinité pour l'actine-G suffisent à séquestrer la totalité des monomères libres (Kaiser et al., 1999). La profiline peut aussi lier les domaines riches en prolines de certaines protéines partenaires comme VASP, les formines ou encore N-WASP, augmentant la dynamique de polymérisation de l'actine. Cette double interaction se révèle essentielle à la migration des cellules vasculaires endothéliales formant les capillaires sanguins (Ding et al., 2009).

La thymosine-β4 forme un complexe de stœchiométrie 1 :1 avec l'actine monomérique. Elle empêche la nucléation, la polymérisation ainsi que l'échange du nucléotide. Son affinité pour l'actine-ATP est 50 fois plus importante que pour l'actine-ADP (Carlier et al., 1993). Bien que la thymosine-β4 empêche toute réaction de polymérisation, la cellule arrive à maintenir une réserve d'actine-profiline. En effet, les deux protéines présentent des temps d'association aux monomères d'actines inférieurs à la seconde et s'échangent par conséquent de l'actine-G. Cela permet à la profiline de maintenir une réserve d'actine-G mobilisable pendant que la thymosine-β4 maintient le reste des monomères en réserve.

1.2.2 Les protéines régulatrices de l'actine-F.

Une croissance rapide et non contrôlée des filaments d'actine épuiserait le stock d'actine-G mobilisable dans la cellule, rendant la cellule incapable de changer de forme et de se déplacer. Des mécanismes existent pour compenser cette déplétion en monomères d'actine.

L'ADF/Cofiline (Actin Depolymerizing Factor) est une protéine qui coupe les filaments d'actine. Elle se lie préférentiellement aux filaments d'actine-ADP favorise le relargage du Pi, modifie leurs propriétés structurelles et mécaniques favorisant leur fragmentation (McGough et al., 1997; Blanchoin and Pollard, 1999; McCullough et al., 2011). De récents travaux montrent que la fragmentation a lieu préférentiellement à la frontière entre la partie décorée par la cofiline et la partie « nue » du filament, et dépend de la densité de cofiline liée au filament (Suarez et al., 2011). Le fractionnement par la cofiline multiplie le nombre d'extrémités barbées, ce qui active la polymérisation globale, et pointues, ce qui amplifie la dépolymérisation (Pollard and Borisy, 2003).

La gelsoline présente une activité potentielle de fragmentation. Activée par le calcium elle se fixe au filament d'actine, le coupe, mais reste en place à l'endroit de la coupure et coiffe le nouveau bout barbé formé (Janmey et al., 1985; Bearer, 1991). Ainsi, elle ne produit pas de nouveaux bouts barbés libres et n'active pas la polymérisation globale.

Les protéines de coiffe ou **Capping Proteins** stoppent la polymérisation des filaments d'actine en se fixant sur leur bout barbé avec une très grande affinité ($K_d \sim 0,1 - 1nM$) (Schafer et al., 1996). Les filaments coiffés n'ont d'autres possibilités que de dépolymériser par leur bout pointu. Les protéines de coiffe sont indispensables à la motilité cellulaire, car, en générant des filaments courts, elles permettent la formation d'un réseau d'actine densément branché capable de générer la force nécessaire à la protrusion de la membrane (Iwasa and Mullins, 2007). **La gélsoline** présente des propriétés de protéine coiffante comme nous l'avons vu précédemment .

1.2.3 Les protéines de réticulation (les cross-linkers).

Les protéines réticulantes organisent les filaments d'actine en des structures dynamiques et complexes qui orchestrent de nombreuses fonctions mécaniques dont la motilité cellulaire est un exemple.

La fascine est une petite protéine globulaire conservée au cours de l'évolution qui présente deux sites de liaison à l'actine et qui lui permettent de lier étroitement les filaments d'actine parallèles pour former des faisceaux polaires. La fascine est le composant majeur et essentiel des filopodes (Svitkina et al., 2003; Vignjevic et al., 2006). De manière moins prononcée, elle intervient également dans la formation des faisceaux d'actine cytoplasmiques qui participent à la maintenance de l'architecture interne des cellules. Enfin, la fascine joue un rôle majeur dans la propagation des métastases puisqu'elle stabilise les faisceaux d'actine dans les invadopodes (Li et al., 2010; Machesky and Li, 2010).

Il existe d'autres protéines réticulantes comme **la villine**. Associée au faisceaux d'actine qui supportent la formation des microvilli, la villine a également la particularité de coiffer, de nucléer et de couper les filaments de manière calcium dépendant (Revenu et al., 2007).

1.2.4 Les moteurs moléculaires.

La super famille des myosines compte au moins 25 différentes classes. La sous-famille des myosines II inclut des myosines de muscles squelettiques, cardiaques et lisses, mais également des myosines II non musculaires. Les myosines utilisent l'énergie libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP pour générer des forces. Chaque cycle de liaison/hydrolyse de l'ATP est associé à un changement conformationnel de la tête de myosine qui génère du mouvement. La capacité de la myosine à marcher le long du filament vient d'une coordination étroite du cycle catalytique des deux têtes qui la composent. Or, la myosine II n'est pas processive : les deux têtes ne sont pas coordonnées et le dimère se détache entre chaque cycle. Pour générer des forces, la myosine II s'assemble en de courts filaments bipolaires antiparallèles comprenant 10 à 30 myosines. Les têtes aux deux extrémités des filaments de myosines s'associent avec des filaments d'actine orientés de manière opposée. En tirant ensemble sur

les filaments d'actine, les myosines II génèrent des tensions qui produisent des contractions des faisceaux d'actine auxquels elles sont associées (Vicente-Manzanares et al., 2009).

1.2.5 Les protéines nucléatrices de l'actine.

Le complexe ARP2/3 (actin related protein) très conservé au cours de l'évolution, se compose de sept sous-unités dont deux (ARP2 et ARP3 qui ont donné leur nom au complexe) présentent environ 45% d'identité avec l'actine (Machesky et al., 1994). Seul, le complexe ARP2/3 nucléée très peu de filaments d'actine et requière la présence à la membrane d'activateurs comme les protéines de la famille WASP décrite dans le sous-chapitre suivant (Rohatgi et al., 1999). Le complexe ARP2/3 est lié latéralement à un premier filament d'actine, ainsi qu'au bout pointu d'un second filament qu'il a nucléé, formant une branche à 70° (Mullins et al., 1998) (Figure 1.6). Deux modèles s'opposent quant à l'apparition de ces branches. Un modèle préconise que le branchement se produise uniquement aux bouts barbés conduisant à une croissance fractale des filaments d'actine (Pantaloni et al., 2000). Un second modèle plus communément admis et dit de « nucléation dendritique » propose que ARP2/3 se lie latéralement à un filament préexistant pour en nucléer un nouveau (Machesky et al., 1999; Blanchoin et al., 2000; Amann and Pollard, 2001; Rouiller et al., 2008). Il en résulte la formation depuis la membrane de structures dendritiques capables de générer la force de protrusion nécessaire à l'extension du lamellipode (Pollard and Borisy, 2003; Svitkina et al., 2003). De récents travaux montrent que des lignées de cellules fibroblastiques murines n'exprimant plus le complexe ARP2/3 fonctionnel perdent leur capacité à former un lamellipode (Suraneni et al., 2012; Wu et al., 2012).

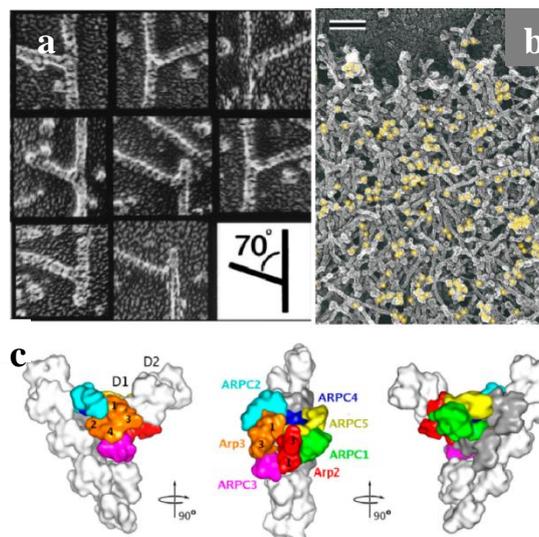


Figure 1.6 : (a) image en microscopie électronique de branches formées à 70° par le complexe Arp2/3. D'après Mullins et al., 1998. (b) image de microscopie électronique du lamellipode. Des anticorps anti-p21 couplés à des billes d'or décorent les complexes Arp2/3 enrichis au front de migration. Bar d'échelle 10µm. D'après Svitkina et Borisy 1999. (c) modèle de la structure de la branche formée par le complexe Arp2/3. Chaque vue est le résultat d'une rotation à 90° de la structure. D'après Rouiller et al., 2008.

Les formines qui représentent une autre classe de protéines nucléatrices assurent de manière processive l'élongation de filaments d'actine non branchés. Elles sont caractérisées par la présence de deux domaines conservés : formin homology 1 et 2 (FH1 et FH2). Les domaines FH1 interagissent avec la profiline pendant que les domaines FH2 nucléent des filaments d'actine en stabilisant des dimères (Watanabe et al., 1997; Pruyne et al., 2002; Pring et al., 2003). FH2 sous forme homodimérique active est suffisant pour nucléer l'actine et former des faisceaux (Harris et al., 2004, 2006). Contrairement au complexe ARP2/3 qui coiffe le bout pointu des filaments, FH2 lie le bout barbé et allonge le filament d'actine de manière processive en les protégeant des protéines de coiffe (Harris et al., 2004). De nombreuses expériences montrent leur implication dans la formation et le maintien des filopodes (Pellegrin and Mellor, 2005; Schirenbeck et al., 2005a; Block et al., 2008). Récemment, il a été montré que certaines formines joueraient également un rôle dans la protrusion du lamellipode (Block et al., 2012).

1.3 Les activateurs de la polymérisation de l'actine.

Le complexe ARP2/3 est depuis une quinzaine d'années le nucléateur de l'actine le plus étudié *in vivo* et *in vitro*. Il est important pour toute une variété de fonctions cellulaires impliquant le cytosquelette d'actine, comme l'endocytose, le trafic vésiculaire, la division cellulaire ou encore la formation des filopodes et lamellipodes pour la motilité cellulaire. Il apparaît alors essentiel que son activité soit finement régulée dans l'espace et dans le temps. Les activateurs de la nucléation par le complexe Arp2/3, « Nucleation Promoting Factors » (NPF), servent de relais dans différentes voies de transduction communément gouvernées par des protéines de la famille Rho GTPases (RhoA, Cdc42 et Rac). En réponse à des signaux extra ou intracellulaires, les NPF activent de manière rapide, coordonnée et localisée le complexe ARP2/3 qui déclenche l'assemblage de nouveaux réseaux d'actine.

Les NPF se répartissent en deux types : les NPF de type I qui seront l'objet principal de cette partie, et les NPF de type II (comme la cortactine ou la coronine). Les NPF de type I ont en commun un domaine Carboxy-terminal WA ou VCA (WASp homology 2 domain : WH2 ou V, Cofilin homology region ou Central region, Acidic region) conservé qui forme une hélice amphipathique (Panchal et al., 2003). Il se compose d'un domaine WH2 qui lie l'actine monomérique et les extrémités des bouts barbés en cours d'élongation, suivi d'un connecteur basique (C) et d'une portion acide (A) qui interagit avec le complexe ARP2/3 et stimule son activité (Symons et al., 1996; Machesky and Insall, 1998; Miki and Takenawa, 1998; Higgs et al., 1999; Machesky et al., 1999;

Rohatgi et al., 1999; Marchand et al., 2001). Le domaine VCA active la nucléation ainsi que le branchement de filaments nouvellement formés pour former des réseaux branchés (Blanchoin et al., 2000). Les NPF de type I sont également caractérisés par la présence en amont du site VCA de domaines riches en proline (PRD) ou de domaines polyproline (P). En revanche, leur séquence N-terminales diverge fortement. Elle intervient dans l'interaction avec les GTPases de la famille Rho, avec des protéines régulatrices et participe à la formation de complexes protéiques. On pense qu'elles joueraient également un rôle dans leur adressage subcellulaire.

Les NPF de type II ont une structure très différente des NPF de type I. Ils ne portent pas de domaine WH2 mais une répétition de séquence (R) qui lie l'actine-F. Ils interagissent avec le complexe ARP2/3 via un domaine acide (A) situé en N-terminale. Ils contiennent également un domaine poly-proline (PRD) et un domaine SH3 en C-terminal qui interagit avec d'autres protéines partenaires.

À ce jour, les NPF de type I sont classés en sept groupes (Kollmar et al., 2012):

- WASP (Wiskott-Aldrich Syndrome protein) et N-WASP (neural-Wiskott-Aldrich Syndrome protein).
- WAVE (WASP-family-verprolin homolog), également connus sous le nom de Scar pour suppressor of cAR qui compte trois isoformes.
- WASH (WASP/Scar homolog).
- WHAMM (WASP homolog associated with actin, membrane and microtubule).
- JMY (junction-mediated regulatory protein).
- WAWH (WASP without WH1 domain).
- WAML (WASP and MIM like).

Nous ne présenterons que les activateurs WASP et WAVE.

1.3.1 La famille WASP et N-WASP.

La découverte du gène impliqué dans le syndrome de Wiskott-Aldrich qui associe immunodéficience, thrombocytopénie (une faible numération plaquettaire), eczéma et accentue le risque de développer lymphomes et de leucémies sera à l'origine de la découverte des protéines de la famille WASP (Derry et al., 1994). WASP est uniquement exprimée dans les cellules hématopoïétiques contrairement à son homologue ubiquitaire découvert peu après : N-WASP (Neural-WASP) (Miki et al., 1996). Bien qu'abondamment exprimé dans les cellules du système nerveux, N-WASP, plus ubiquitaire que WASP, est présent dans un plus grand nombre de tissus. En réponse à divers signaux extérieurs, N-WASP active le complexe ARP2/3 dans une multitude de fonctions cellulaires nécessitant la polymérisation d'actine comme la formation de structures endocytaires, de filopodes, de neurites ou encore le « ruffling » de la membrane (Suetsugu et al., 2002; Tsujita et al.,

2006; Legg et al., 2007; Bu et al., 2009). Sa structure diffère légèrement de WASP par la présence en tandem d'un motif WH2 supplémentaire ainsi que par une région A plus acide qui a pour effet de renforcer sa capacité nucléatrice (Symons et al., 1996; Zalevsky et al., 2001).

La partie N-terminal des protéines WASPs se compose d'un domaine WH1 également connu sous le nom de Ena/VASP homology 1 (EVH1). Cette région est suivie d'une région basique riche en lysines et arginine qui forme un domaine Pleckstrin homology (PH). Suivent un domaine de liaison aux GTPases (GTPase binding domain (GBD)/ Cdc42/Rac interactive binding (CRIB)) ainsi qu'un domaine riche en proline (Poly-proline rich domain (PRD)). WH1 est spécifique des protéines de la famille WASP et lie les séquences polyproline des protéines WIP (WASP interacting protein). Les protéines WIP stabilisent les WASPs, forment des hétérocomplexes qui les inhibent ou les activent et sont également capables de recruter des activateurs de la polymérisation de l'actine comme la profiline (Symons et al., 1996; Martinez-Quiles et al., 2001; Sasahara et al., 2002; Schulte and Sefton, 2003; Hertzog et al., 2004; de la Fuente et al., 2007). Les interactions WIPs/WASPs sont cruciales dans l'activité des cellules immunitaires, mais l'étendue de leurs fonctions reste à préciser (Ramesh and Geha, 2009).

1.3.1.1 Activation des WASPs.

A l'état inactif, WASP et N-WASP sont repliées sur elles-mêmes par une interaction intramoléculaire entre le domaine VCA et la région GBD/CRIB (Symons et al., 1996) (Figure 1.7). Le domaine VCA est donc rendu inaccessible au complexe ARP2/3. Cette auto inhibition est levée synergiquement par les interactions compétitrices du Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate ($PI_{4,5}P_2$) avec la région basique/PH domain (Miki et al., 1996), et de la forme active de Cdc42 liée au GTP avec le GBD/CRIB (Symons et al., 1996). La molécule WASP se déplie et rend accessible son domaine VCA au complexe ARP2/3. Cette activation est donc tributaire du recrutement des WASPs à la membrane où abonde le $PI_{4,5}P_2$ et est présent Cdc42-GTP.

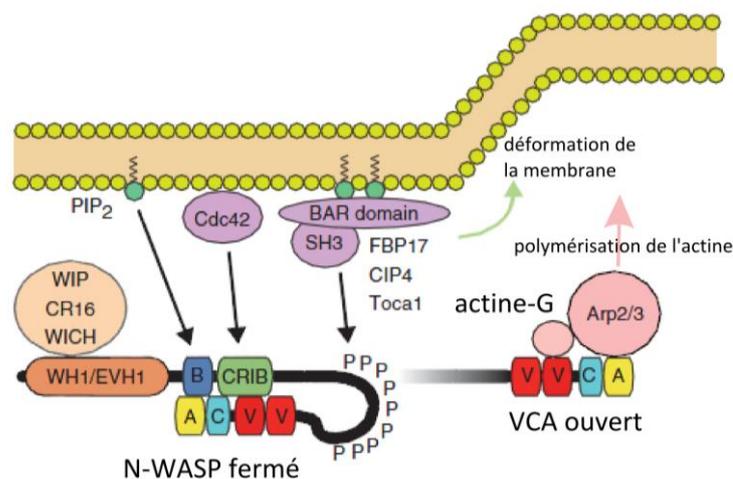


Figure 1.7 : Les voies d'activation de N-WASP. N-WASP est auto inhibée à l'état basal par l'interaction de son domaine GBD/CRIB avec la région VCA. Le $PI_{4,5}P_2$ et Cdc42 lient respectivement la région B et le GBD/CRIB activant N-WASP en synergie. La liaison de protéines à domaine SH3 (WIP, Nck, Grb2, CIP4, Toca1 etc.) à N-WASP peut rentrer en compétition avec les interactions d'auto inhibition de N-WASP est l'activer. D'après Kurisu et Takenawa 2009

1.3.1.2 Recrutement des WASPs.

En plus de la voie de recrutement via PIP et Cdc42, les WASPs sont recrutés à la membrane, via leur domaine PRD par des protéines associées à la membrane portant un domaine SH3: les protéines de la super famille Bin-Amphiphysin-Rvs161/167 (BAR). Ces protéines sont elles-mêmes ancrées à la membrane par des phosphoinositides tels que $PI_{4,5}P_2$ et $PI_{3,4,5}P_3$. Elles ont la propriété de courber la membrane et ainsi de faciliter les déformations de celle-ci par le réseau d'actine ARP2/3 dépendant initié par WASP, pour former des protrusions (Tsujita et al., 2006; Shimada et al., 2007). On pense qu'elles participent également à l'activation des WASPs (Yarar et al., 2007; Takano et al., 2008; Yamada et al., 2009; Suetsugu and Gautreau, 2012).

Les protéines de la famille Scar/WAVE constituent la deuxième grande famille des activateurs du complexe Arp2/3.

1.3.2 La famille Scar/WAVEs.

WAVE1, principalement exprimé dans le cerveau, est le premier représentant de la famille WAVE à avoir été découvert lors d'un screen génétique visant à identifier des protéines porteuses de séquences homologues au domaine VCA des WASPs (Nagase et al., 1996; Miki et al., 1998). Au même moment était découvert chez *Dictyostelium* un gène suppresseur de la mutation du gène codant pour un récepteur à l'AMP cyclique : cyclic AMP receptor (cAR), le gène codant pour la protéine SCAR (Suppressor of cyclic AMP receptor) homologue de WAVE1. Enfin, WAVE2 et WAVE3 ont été découverts en recherchant dans une librairie de marqueurs de séquences exprimées (EST) des homologues de WAVE1, (Suetsugu et al., 1999). Comme WAVE1, WAVE3 est abondant dans le cerveau alors que WAVE2 présente une expression plus ubiquitaire.

Il semblerait que les protéines WAVEs jouent un rôle prépondérant dans la réalisation des mouvements morphogénétiques des cellules lors du développement embryonnaire (KO WAVE2 non viables : (Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003; Patel et al., 2008)) et dans le développement du système nerveux (Dahl et al., 2003; Kim et al., 2006). A l'échelle cellulaire, WAVE s'accumule à l'extrémité du lamellipode des cellules et se retrouve au bout des filopodes en croissance des cellules nerveuses (Hahne et al., 2001; Nozumi et al., 2003). les protéines WAVEs sont impliquées dans la régulation du cycle de la motilité cellulaire en jouant notamment sur l'adhésion des cellules au substrat (Bastounis et al., 2011). WAVE1 régule le phénomène de ruffling de la membrane et stabilise le

lamellipode, quant à WAVE2, il est nécessaire à la formation du lamellipode (Suetsugu et al., 2003; Yamazaki et al., 2005).

1.3.2.1 Différences avec les protéines WASPs.

Contrairement aux protéines WASP, les protéines WAVEs ne portent pas en N-terminal de domaine WH1, mais un WAVE homology domain (WHD), appelé aussi SCAR homology domain (Bear et al., 1998)(Suetsugu et al., 1999) (Figure 1.8). Ce domaine N-terminal est suivi d'une région basique qui interagit avec du $PI_{3,4,5}P_3$. Cette interaction est nécessaire pour le recrutement de WAVE2 au front de migration du lamellipode (Oikawa et al., 2004). Les protéines WAVEs ne possèdent pas de domaine de liaison aux GTPases. Ainsi, elles sont constitutivement actives, non-auto inhibées par repliement intramoléculaire.

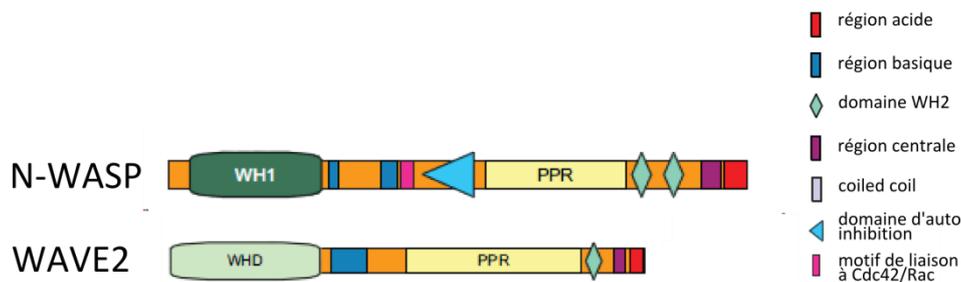


Figure 1.8 : Comparaison de la structure de N-WASP et de WAVE2. D'après Kollmar et al., 2012

1.3.2.2 Régulation des protéines WAVEs par le complexe WAVE.

L'activité des protéines WAVE est régulée par un complexe protéique : le **complexe WAVE** sensible à l'activité de la GTPase Rac (Miki et al., 1998) (Figure 1.9). Le domaine WHD contribue à la formation d'un hétéro complexe pentamérique d'environ 400kDa qui participe à la régulation des protéines WAVEs (Eden et al., 2002; Innocenti et al., 2004; Stovold et al., 2005). Ce complexe se compose de WAVE, d'ABI1 (Abelson-interacting protein), NAP1 (Nck associated protein 1, également appelé p125NAP1), SRA1 (Specifically Rac associated 1, également appelé CYFIP1, ou la protéine très proche PIR121) et de HSPC300 (également connue sous le nom de BRICK). La purification du complexe WAVE a permis une meilleure compréhension de son architecture: Hspc et ABI1 lient WAVE et NAP1 interagit avec ABI1 et SRA1 (Gautreau et al., 2004). Des expériences de polymérisation d'actine in vitro montrent que le complexe WAVE purifié inhibe l'activité des WAVEs en masquant son site de liaison au complexe ARP2/3 (Derivery et al., 2009; Ismail et al., 2009). De plus, SRA1 séquestre la partie V et C du domaine VCA de WAVE, empêchant le

recrutement de l'actine monomérique et affectant l'activation d'ARP2/3 (Chen et al., 2010). Chaque sous-unité qui compose le complexe WAVE est essentielle à sa localisation, à stabilité et à sa fonction (Rogers et al., 2003; Innocenti et al., 2004; Steffen et al., 2004).

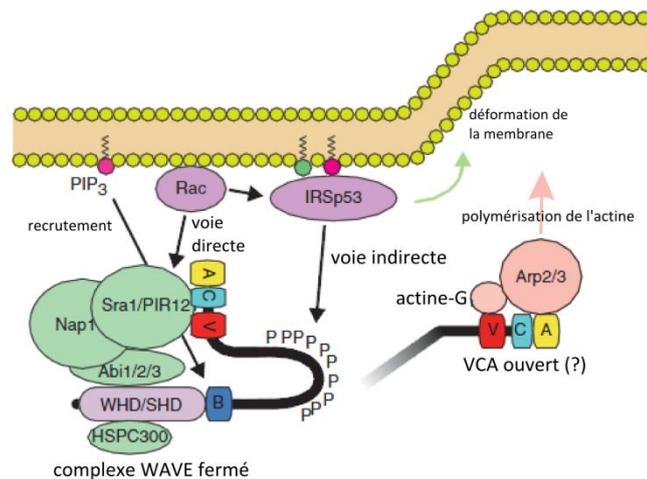


Figure 1.9 : Les voies d'activation de WAVE2. Les protéines WAVE existent dans la cellule sous forme de complexes hétéropentamérique. WAVE2 est recruté à la membrane par PIP3 et IRSp53. L'affinité de WAVE2 pour IRSp53 est augmentée quand Rac lie le domaine RCB/MIM de IRSp53. IRSp53 peut stimuler l'activation de Arp2/3 par WAVE2. Cette voie via IRSp53 est une activation indirecte par Rac. Rac peut également activer directement WAVE en liant Sra1. D'après Kurisu et Takenawa 2009.

1.3.2.3 Activation du complexe WAVE.

La GTPase Rac joue un rôle majeur dans le contrôle de la polymérisation pour former le lamellipode. A l'état inactif, la sous-unité Sra1 du complexe WASP lie le domaine V et C de WAVE, inhibant son activité. Chen et al., 2010 propose que sous l'influence d'un signal extérieur, Rac1 vienne se lier à la sous-unité Sra1 et peut être à WAVE sur une séquence proche de son VCA. Cette interaction induirait un changement de conformation de cette région de WAVE et/ou de son site d'interaction avec Sra1 entraînant la libération du domaine VCA alors capable de recruter l'actine monomérique et le complexe Arp2/3 pour initier la polymérisation d'un réseau d'actine.

L'état de phosphorylation de WAVE joue également un rôle prépondérant puisque la phosphorylation de WAVE3 et 2 par la non-receptor tyrosine kinase (Abl) est nécessaire à la formation du lamellipode et à la motilité des cellules (Leng et al., 2005; Sossey-Alaoui et al., 2007). Les protéines WAVE sont également les cibles de cyclin-dependent kinase 5 (Cdc5) lors de la myélinisation des axones, ou

encore de Src tyrosine kinase qui augmente l'affinité de Scar1 pour le complexe Arp2/3 (Arden et al., 2006; Miyamoto et al., 2008).

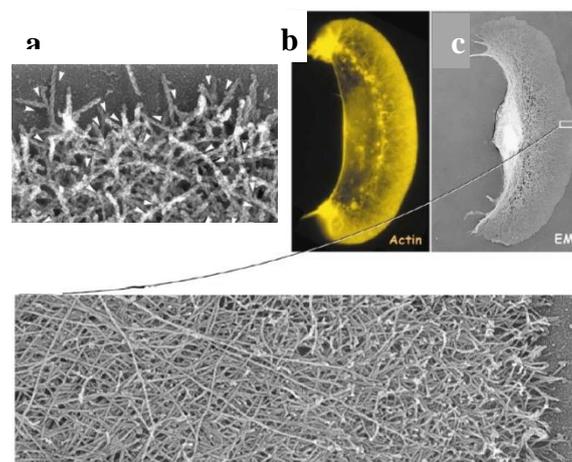
Comme les protéines WASPs, les WAVEs ont un domaine PRD leur permettant de recruter la profiline ainsi que des protéines à domaine SH3 telles que la protéine substrat de l'insuline : Insulin-receptor substrate IRSp53 (Miki et al., 1998, 2000). IRSp53 augmente l'activité de WAVE2 en recrutant Rac lors de la formation du lamellipode, mais n'affecte pas la formation des filopodes (Suetsugu et al., 2006; Roy et al., 2009). Enfin, IRSp53 pourrait constituer un lien entre WAVE2 à la membrane et les microtubules lors de l'invasion des cellules cancéreuses (Kikuchi and Takahashi, 2008).

1.4 Les structures de la motilité cellulaire.

Les diverses protéines mentionnées précédemment régulent la formation de structures d'actine qui permettent à la cellule de changer de forme. Les protrusions qui résultent de ces changements de forme sont primordiales pour la motilité cellulaire.

1.4.1 Le lamellipode.

Le lamellipode est une fine protrusion membranaire en deux dimensions de 200nm d'épaisseur et de plusieurs microns de large qui se forme à l'avant des cellules en reptation (Small and Resch, 2005). Elle est remplie d'un réseau dendritique dense et polarisé d'actine généré principalement par le complexe Arp2/3 et dirigé vers la membrane (Svitkina et al., 1997; Svitkina and Borisy, 1999) (Figure 1.10). Des expériences de FRAP suivies par un recouvrement de fluorescence menées sur des cellules injectées avec de l'actine fluorescente ont démontré que le réseau d'actine polymérise au front de migration à la membrane et se désassemble à l'arrière du lamellipode donnant le nom de treadmilling (tapis roulant) au phénomène (Wang, 1985). Les filaments individuels *in vivo* ne sont pas soumis à ce phénomène. En effet, un filament donné n'est jamais à la fois en train de polymériser au bout + et de dépolymériser au bout -. Les filaments sont toujours coiffés à l'une de leurs extrémités rendant leur croissance transitoire. Des expériences de photoactivation d'actine fluorescente dans le lamellipode de kératocytes montrent que les filaments d'actine restent à peu près stationnaires par rapport au substrat alors que la cellule avance, démontrant que celle-ci progresse au rythme de la polymérisation de l'actine (Theriot and Mitchison, 1991).



En 2010, Urban et al., 2010 observent les lamellipodes de différents types de cellules motiles en cryotomographie électronique et concluent à l'inverse de tous les travaux précédents que les filaments d'actine n'y sont pas branchés. En 2011, Yang and Svitkina analysent les données supplémentaires publiées dans l'étude d'Urban et al et démontrent la présence de branches. Des études récentes menées à l'aide de fibroblaste n'exprimant pas de complexe Arp2/3 fonctionnel démontrent directement que le complexe Arp2/3 est essentiel à la formation du lamellipode (Suraneni et al., 2012; Wu et al., 2012). Si l'absence de lamellipode n'abolit pas la motilité cellulaire, les auteurs montrent qu'elle profite à la formation des filopodes et réduit drastiquement la vitesse et l'efficacité de la migration cellulaire dirigée. Ainsi, Wu et al., 2012 observent que l'absence de lamellipode conduit à un désalignement global des points focaux d'adhésion et à une incapacité de la cellule à réguler sa vitesse de migration sur différentes concentrations en MEC (haptotaxie). Ils concluent en revanche que la chimiotaxie (la capacité de la cellule à s'orienter dans un gradient chimique) n'est pas affectée, s'opposant ainsi aux conclusions de Suraneni et al., 2012.

Les processus biochimiques à l'œuvre dans la croissance du lamellipode sont résumés par Pollard and Borisy, 2003 qui proposent le modèle de nucléation dendritique (Figure 1.11). Des stimuli extérieurs activent des récepteurs. Les voies des signaux de transduction associées activent des GTPases de la famille Rho et la production de PIP_2 nécessaires à l'activation des protéines WASp/Scar. Ces dernières recrutent et activent le complexe Arp2/3 qui nucléée de nouveaux filaments à partir du réservoir de monomères d'actine complexés à la profiline. Ces filaments croissent sur le côté de filaments préexistants avec un angle de 70° . Cette croissance est transitoire : rapidement le filament est coiffé au bout barbé par les protéines coiffantes (gélsoline, protéine de coiffe) et ne peut plus grandir. Les monomères qui le forment hydrolysent leur ATP, déstabilisant les branches ce qui favorise la dépolymérisation des filaments (Blanchoin et al., 2000). Ce phénomène est accentué par l'ADF cofiline qui augmente d'un facteur 10 le relargage du Pi par l'actine-ADP-Pi (Blanchoin and Pollard, 1999).

Figure 1.10 : (a) image en microscopie électronique du front de migration d'un kératinocyte fixé. Les bouts barbés sont dirigés vers la membrane. D'après Svitkina et al., 1997. (b) kératinocytes en migration. Image en fluorescence. L'actine est marquée avec de la phalloïdine rhodamine. (c) image en microscopie électronique d'un kératinocyte en migration et zoom sur son front de migration. D'après Pollard et Borisy., 2003.

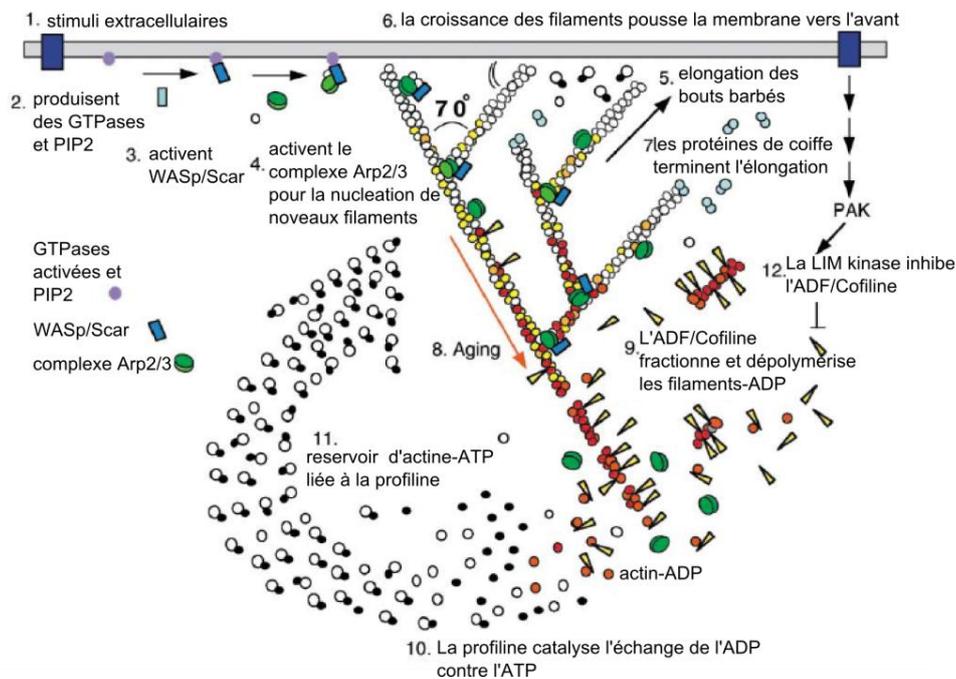


Figure 1.11 : Modèle de nucléation dendritique au front de migration du lamellipode. Adapté de Pollard et Borisy., 2003.

Toutefois, de récents travaux viennent raffiner ce modèle. Achard et al., 2010 montrent que le complexe Arp2/3 activé par un facteur de nucléation capture le côté de noyaux de nucléation ou primers, c'est-à-dire de filaments d'actine composés d'un très faible nombre de monomères. Des branches sont générées et de nouveaux filaments sont nucléés. Ces filaments peuvent alors pousser tangentiellement, vers, ou à l'opposé de la surface. Les filaments poussant tangentiellement ou à l'opposé de la surface sont rapidement coiffés créant une « zone morte » (Figure 1.12). Ceux poussant vers la surface butent contre celle-ci avant de s'échapper et de reprendre une croissance tangentielle. Ils peuvent alors servir de « primers » pour d'autres événements de branchement et de nucléation de filaments définissant une zone active de polymérisation qui repousse vers l'arrière du lamellipode la zone morte. Ce modèle propose qu'une force de propulsion soit exercée à la surface par la zone active de polymérisation contrainte de croître entre la zone morte et la surface. Extrapolée au front de migration des cellules, la zone de polymérisation active à la membrane viendrait s'appuyer contre la zone morte, poussant la membrane vers l'avant et entraînant la protrusion du lamellipode.

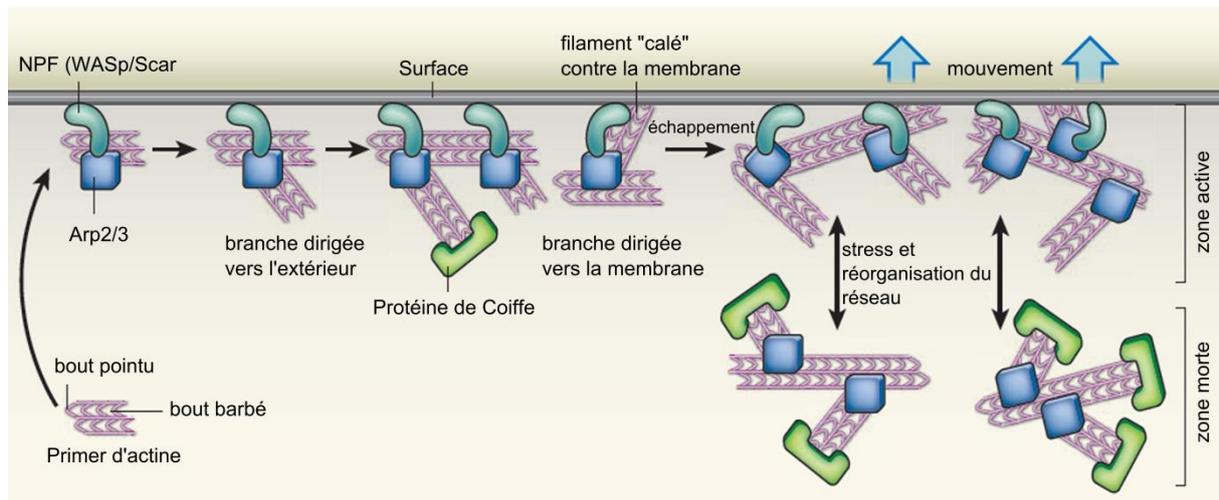


Figure 1.12 : Modèle de nucléation par primer. D'après Achard et al.,2010. Adapté de Sykes et Plastino., 2010

Ce modèle n'explique pourtant pas pourquoi dans le lamellipode, la grande majorité des filaments d'actine ont leur bout barbé orienté vers la membrane. Les auteurs suggèrent que le stress généré dans le réseau d'actine pourrait expliquer la réorientation globale des filaments. Enfin, des protéines comme les formines qui lient les bouts barbés au front de migration pourraient également contribuer à cette réorientation.

1.4.2 Les filopodes.

Les filopodes sont de fines projections cellulaires très dynamiques qui explorent l'environnement local et forment des interactions avec le substrat pour former des adhésions focales ou des contacts cellule/cellule (Vasioukhin et al., 2000; Partridge and Marcantonio, 2006). Ils renferment des filaments d'actine longs et non branchés parallèles formant un faisceau serré avec leur bout barbé dirigé vers la membrane (Svitkina and Borisy, 1999). L'extension et la rétraction des filopodes sont assurées par l'assemblage de monomères aux bouts barbés et le flux rétrograde d'actine (Mallavarapu and Mitchison, 1999). L'initiation des filopodes reste sujet à controverse et deux modèles sont proposés (Yang and Svitkina, 2011).

Un modèle appelé **le modèle d'élongation convergente** propose que dans réseau dendritique du lamellipode formé par le complexe Arp2/3, certains bouts barbés échappent aux protéines de coiffe et se retrouvent complexés au tip complex ou « complexe d'extrémité » (Svitkina et al., 2003) (Figure 1.13a). Ce complexe d'extrémité comprend notamment les protéines anti-coiffe Ena/VASP et les formines qui autorisent l'élongation continue des filaments. Distribuées de manière homogène à la membrane, les Ena/VASP et les formines se regroupent progressivement à l'extrémité des niveaux filopodes formés (Svitkina et al., 2003; Yang et al., 2007). Ces bouts barbés ainsi protégés convergent les uns vers les autres jusqu'à rentrer en collision. Les tip complexes de chaque filament, en s'oligomérisant, favorisent le regroupement des filaments en faisceaux stabilisés par la fascine ce qui permet de pousser la membrane efficacement pour former les filopodes. Des travaux ont cependant montré que le complexe Arp2/3 n'est pas nécessaire à la formation des filopodes (Steffen et al., 2006; Suraneni et al., 2012; Wu et al., 2012). La capacité des formines à nucléer, allonger et protéger les filaments des protéines de coiffe ainsi que leur localisation à l'extrémité des filopodes en font un candidat idéal à leur initiation et maintenance (Svitkina et al., 2003).

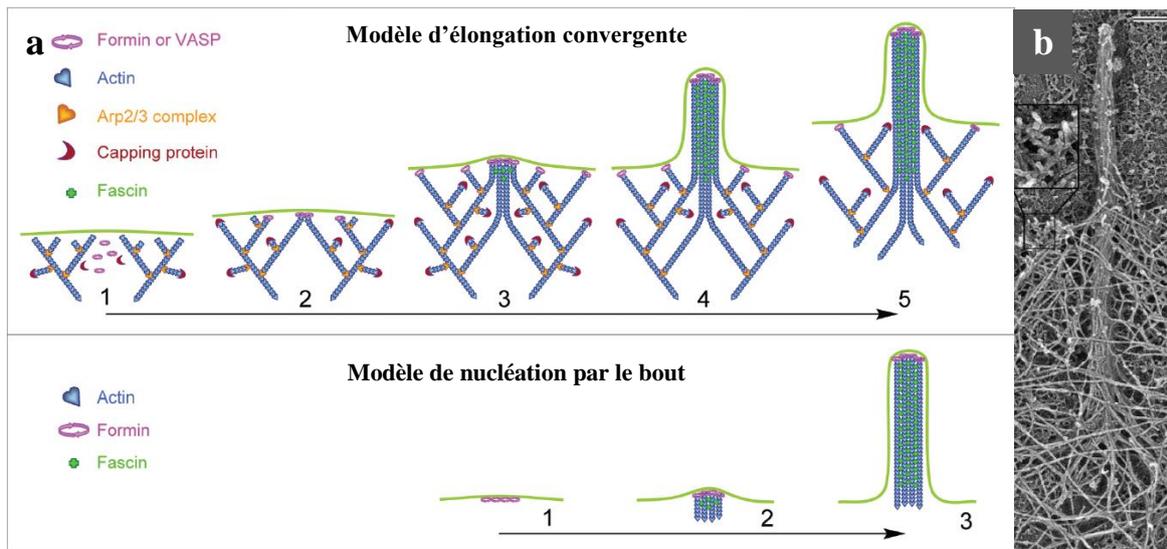


Figure 1.13 : (a) modèles mécanistiques de l'initiation des filopodes. **Modèle d'élongation convergente** (haut) : (1) un réseau branché est formé par Arp2/3. (2) des facteurs d'élongation maintiennent une élongation continue de certains bouts +. (3) interaction entre bouts +, probablement aidée par les formines ou Ena/VASP qui assurent une élongation parallèle synchronisée des filaments convergents. (4) Les filaments parallèles sont cross-linkés par la fascine formant un bundle d'actine. (5) au cours du temps, les complexes Arp2/3 qui ont nucléé les filaments du filopode se dissocient des bouts -. **Modèle de « tip nucleation »** (bas) : (1) les formines actives sont regroupées à la membrane plasmique. (2) ces groupes de formines nucléent des filaments d'actine et maintiennent leur élongation. (3) les filaments en cours d'élongation sont cross-linkés par la fascine et forment un bundle. Adapté de Yang et Svitkina 2011. (b) : Observation en microscopie électronique d'un bundle d'actine composant un filopode. Le bundle semble s'étaler et se fondre dans le réseau du lamellipode en accord avec le modèle d'élongation convergente.

Un deuxième modèle émerge alors : **le modèle de nucléation par le bout** ou « tip nucleation » dans lequel les filaments d'actine du filopode sont directement nucléés à la membrane (Figure 1.13a). Avant l'initiation du filopode, des formines regroupées en clusters à la membrane nucléent plusieurs filaments. Ceux-ci restent regroupés et s'allongent protégées des protéines de coiffe. De tels filaments n'émergent donc pas du réseau dendritique sous-jacent. Ces filaments en croissance sont réticulés par la fascine pour former le faisceau principal du filopode. Ce modèle s'appuie principalement sur des expériences de sur expression ou d'inhibition des formines corrélées directement avec le degré de protrusion des filopodes (Schirenbeck et al., 2005b; Block et al., 2008). Toutefois, les observations en microscopie électronique semblent privilégier le modèle d'élongation convergente (Yang et al., 2007) (Figure 1.13b). De plus, des expériences menées *in vitro* à l'aide de micro patterns viennent appuyer le modèle d'élongation convergente (Reymann et al., 2010). Elles démontrent que la forme, la distance ainsi que l'orientation de sites de nucléation influent sur l'orientation des filaments, sur leur interaction et la formation de structures ressemblant aux faisceaux des filopodes. Enfin, la naissance d'un filopode en un point focal à la membrane comme prédit par le modèle de tip nucléation n'a jamais été observée, contrairement à la convergence de filaments issus du lamellipode pour former un faisceau à la base du filopode.

Ces modèles sont deux possibilités théoriques qui compte tenu de la diversité des protrusions appelées filopodes pourraient coexister même si les preuves expérimentales directes semblent pencher en faveur du modèle d'élongation convergente.

1.4.3 Les adhésions focales.

Lors du cycle migratoire, le lamellipode mais également les filopodes interagissent avec la matrice extracellulaire en formant de petits complexes très dynamiques: les adhésions naissantes (Nemethova et al., 2008; Ciobanasu et al., 2012). Elles se composent principalement d'intégrines (qui interagissent avec le substrat) et de taline chargée de faire le lien avec le cytosquelette d'actine et le substrat. Ces adhésions naissantes peuvent se désassembler ou mûrir en complexes d'adhésions focales en recrutant d'autres protéines (Figure 1.14). Cette maturation est mécano sensible et repose sur les forces générées par le complexe acto-myosine dans la lamella en réponse à la voie de signalisation RhoA (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). La lamella se trouve derrière le lamellipode. Elle présente un réseau de filaments d'actine lâches et non branchés enrichis en tropomyosine et myosine II (Svitkina et al., 1997; Svitkina and Borisy, 1999; DesMarais et al., 2002). Cependant, les mécanismes mécano sensibles impliqués dans la maturation des adhésions focales restent mal compris (Geiger et al., 2009). Cette maturation s'accompagne d'un enrichissement en vinculin, VASP, zyxin et alpha-actinine (Zaidel-Bar et al., 2003). Des expériences montrent qu'une forte tension mécanique appliquée à la vinculine est associée à la maturation des adhésions focales

alors qu'une faible tension, à leur désassemblage (Johnson et al., 2007). Ces tensions peuvent être générées au sein même du complexe par des protéines comme la myosine II et moduler son accrochement au cytosquelette d'actine (Vicente-Manzanares et al., 2009).

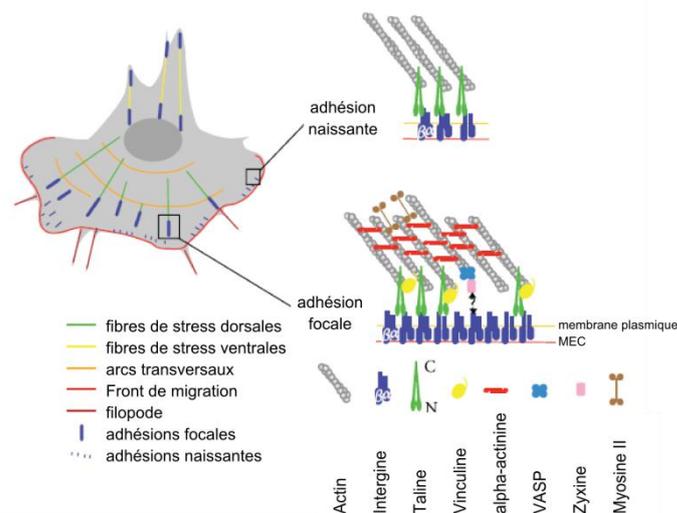


Figure 1.14 : Schéma du réseau d'actine d'une cellule en migration et organisation des adhésions naissantes et des adhésions focales.

La régulation de l'incorporation d'actine au niveau des adhésions focales est essentielle, car elle régule directement la formation des fibres de stress.

1.4.4 Les fibres de stress.

Les fibres de stress sont constituées de filaments d'actine réticulés de manière parallèle ou antiparallèle par l' α -actinine et séparés par 15-40nm, autorisant l'insertion de filaments de myosines II qui assure à l'ensemble sa contractilité (Langanger et al., 1986) (Figure 1.15). La tropomyosine joue également un rôle important dans la formation des fibres de stress (Gupton et al., 2005). En liant les filaments d'actine, la tropomyosine empêche leur branchement par Arp2/3, leur dépolymérisation par l'ADF et assure leur stabilité (Blanchoin et al., 2001; Ono and Ono, 2002). La dynamique de polymérisation des fibres de stress n'est pas complètement comprise. Cependant, il semble que les formines et Arp2/3 soient impliqués (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Les fibres de stress ont la capacité de s'auto-réparer lorsqu'elles subissent des forces trop importantes. Ainsi, soumise à un stress mécanique, la zyxine est capable de se relocaliser depuis les adhésions focales à la fibre de stress et

s'accompagne de la relocalisation de VASP ainsi que de l' α -actinine (Yoshigi et al., 2005). Ces trois partenaires contribuent à restaurer l'intégrité structurelle et la contractilité de la fibre de stress endommagée par des mécanismes encore inconnus (Smith et al., 2010). Bien qu'elles localisent au niveau des adhésions focales, les protéines Ena/VASP ne semblent pas jouer un rôle majeur dans la formation des fibres de stress, des cellules KO Ena/VASP formant des fibres de stress normales.

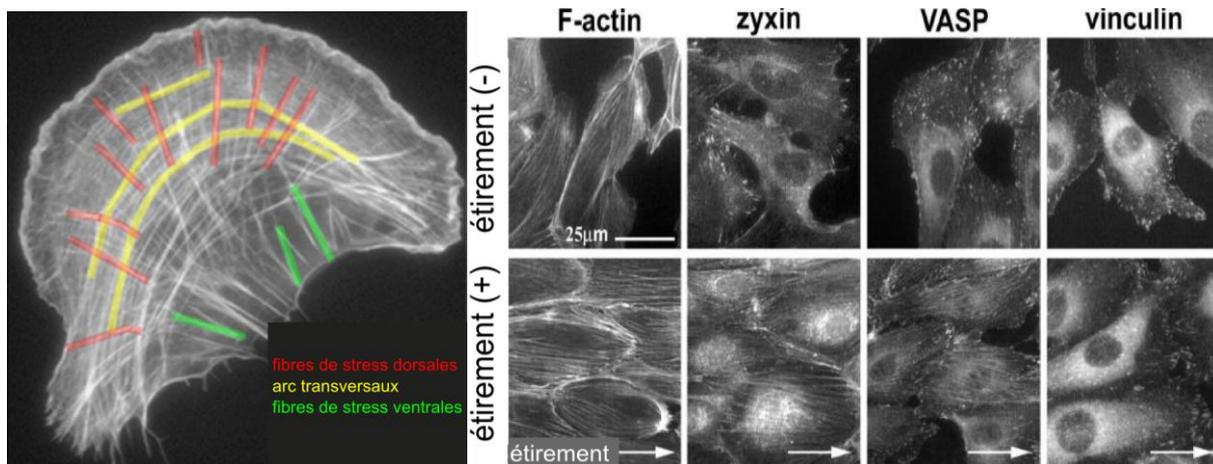


Figure 1.15 : (a) cellule d'ostéosarcome en microscopie à fluorescence. L'actine est taggée GFP. Les trois types de fibres de stress apparaissent : les fibres de stress dorsales, ventrales et les arc transversaux (b) observation de cellules endothéliales en microscopie à fluorescence. D'après [Hotulainen](#) et Lappalainen 2006. (b) un stress d'étirement appliqué pendant 2 heures augmente le recrutement de la zyxine et le recrutement de VASP depuis les points focaux aux fibres de stress. La vinculine ne quitte pas les points focaux. D'après Yoshigi et al., 2005

1.5 Ena/VASP.

VASP étant le sujet d'étude de cette thèse, nous proposons de lui consacrons un sous-chapitre entier regroupant les connaissances actuelles sur le rôle de VASP dans l'établissement des structures précédemment décrites.

1.5.1 Généralités sur VASP.

VASP appartient à la famille des protéines Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP). Ces protéines ont la capacité de lier directement l'actine-F, l'actine-G et la profiline (Ahern-Djamali et al., 1999; Bachmann et al., 1999; Hüttelmaier et al., 1999; Lambrechts et al., 2000; Walders-Harbeck et al., 2002). Les protéines Ena/VASP ont en commun une structure modulaire présentant des domaines fonctionnels séparés par des régions non structurées et très flexibles rendant à ce jour la cristallisation de la protéine impossible (Breitsprecher et al., 2008) (Figure 1.16).

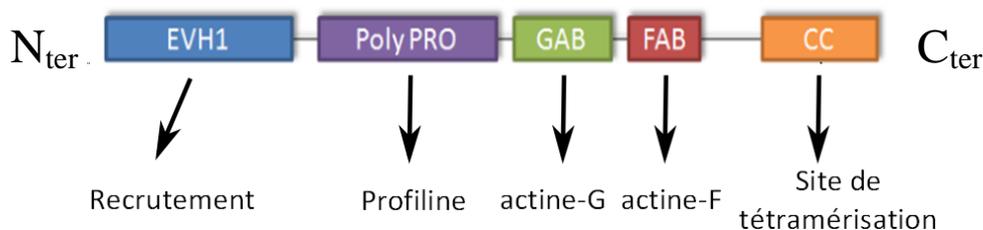
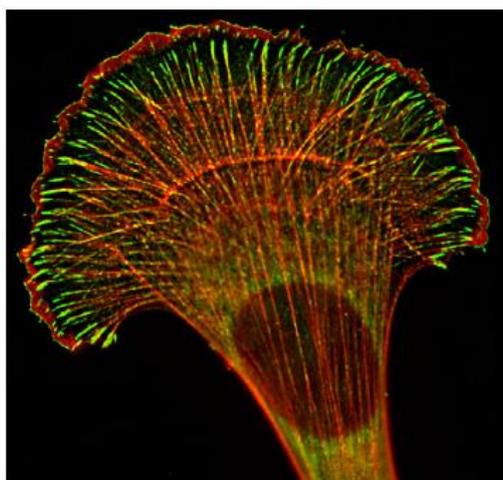


Figure 1.16 : Représentation schématique d'un monomère de VASP avec ses domaines et leur fonction.

Originellement décrit comme cible des kinases dépendantes de l'AMPc et du GMPc lors de l'activation des plaquettes (Aszódi et al., 1999; Hauser et al., 1999), VASP est le premier membre de la famille Ena/VASP à avoir été identifié (Waldmann et al., 1987; Halbrügge and Walter, 1989; Halbrügge et al., 1990). D'autres membres ont par la suite été découverts comme mammalian Ena (Mena) et Ena/VASP-like protein (EVL) respectivement enrichis dans les neurones et la rate/le thymus (Gertler et al., 1996; Lanier et al., 1999). Des protéines de la famille Ena/VASP ont également été trouvées chez d'autres organismes : Enabled (Ena) chez la drosophile (Gertler et al., 1990), UNC-34 chez *C. elegans* ou encore DdVASP chez *Dictyostelium*.

Bien que leur rôle soit encore marqué par une certaine controverse, il est clair que cette famille de protéines participe à la régulation de nombreux processus actine dépendants. Les protéines Ena/VASP localisent dans la cellule là où l'actine se réorganise de manière dynamique comme dans le front de migration du lamellipode et à l'extrémité des filopodes, au niveau des contacts cellule/cellule, des adhésions focales ainsi que de manière ponctuelle le long des fibres de stress (Reinhard et al., 1992; Lanier et al., 1999; Liu et al., 1999; Rottner et al., 1999) (Figure 1.17). Le degré de protrusion du lamellipode semble directement corrélé avec la quantité de VASP présente au front de migration qui ne présente plus de VASP lors de sa rétraction (Rottner et al., 1999). Les protéines Ena/VASP sont essentielles à l'établissement des systèmes nerveux central et périphérique. Elles interviennent dans différentes voies de signalisations importantes pour le guidage des axones chez *C. elegans*, la Drosophile ainsi que chez la souris (Gertler et al., 1995; Lanier et al., 1999; Bashaw et al., 2000). Ainsi, VASP est indispensable à la formation des filopodes et des cônes de croissances qui permettent aux neurones d'établir des connexions avec d'autres neurones cibles pour créer un réseau neuronal. (Goh et al., 2002; Lebrand et al., 2004; Kwiatkowski et al., 2007).



1.5.2 Effets des protéines Ena/VASP sur la motilité.

De manière générale, quand les protéines Ena/VASP sont surexprimées ou artificiellement adressées au front de migration des cellules, il y a formation d'un long réseau de filaments d'actine peu branchés par rapport aux cellules sauvages (Figure 1.18b-c). Il en résulte une protrusion rapide mais instable du lamellipode des fibroblastes (Bear et al., 2002; Loureiro et al., 2002). A l'inverse, lorsque l'adressage des Ena/VASP au front de migration du lamellipode de fibroblastes est empêché, il y a formation d'un réseau de filaments d'actine plus courts et plus branchés par rapport aux cellules sauvages (Figure 1.18a-b). Le lamellipode qui en résulte protreude plus lentement mais adhère au substrat de manière plus efficace rendant le déplacement dirigé de la cellule plus rapide *in vitro* (Bear et al., 2002; Loureiro et al., 2002).

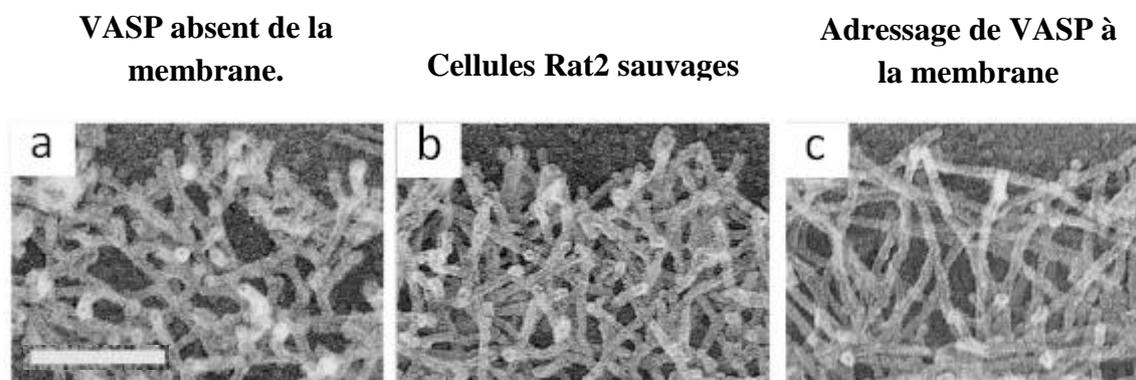


Figure 1.18 : Images en microscopie électronique du réseau d'actine au front de migration de cellules fibroblastiques rat2. L'accumulation de VASP au front de migration des cellules par adressage artificiel (c) produit un réseau d'actine moins branché par rapport aux cellules sauvages contrôles (a). À l'inverse, l'absence de VASP à la membrane produit des réseaux d'actine plus branchés par rapport aux cellules contrôles. barre d'échelle 100nm. Adapté de Bear et al., 2002.

1.5.3 Influence de VASP sur la formation des filopodes.

VASP semble également jouer un rôle dans la dynamique des filopodes. Ainsi, la formation des filopodes est fortement réduite au niveau des cônes de croissance des neurones KO pour VASP

(Bear et al., 2002; Lebrand et al., 2004) et complètement annulée chez *Dictyostelium* KO DdVASP (Han et al., 2002; Schirenbeck et al., 2006) (Figure 1.19) et les cellules de mélanome murin B16F1 KO VASP (Mejillano et al., 2004). Chez *Dictyostelium*, la formine mDia2 insuffisante aurait besoin d'interagir avec VASP, pour former les filopodes (Schirenbeck et al., 2005a). De manière intéressante, VASP ne semble pas essentielle à ce processus pour tous les types cellulaires étudiés. En effet, les cellules MV^{D7} présentent quand même des structures fibroblastiques caractéristiques telles que des filopodes et des points focaux d'adhésion (Bear et al., 2000; Loureiro et al., 2002).

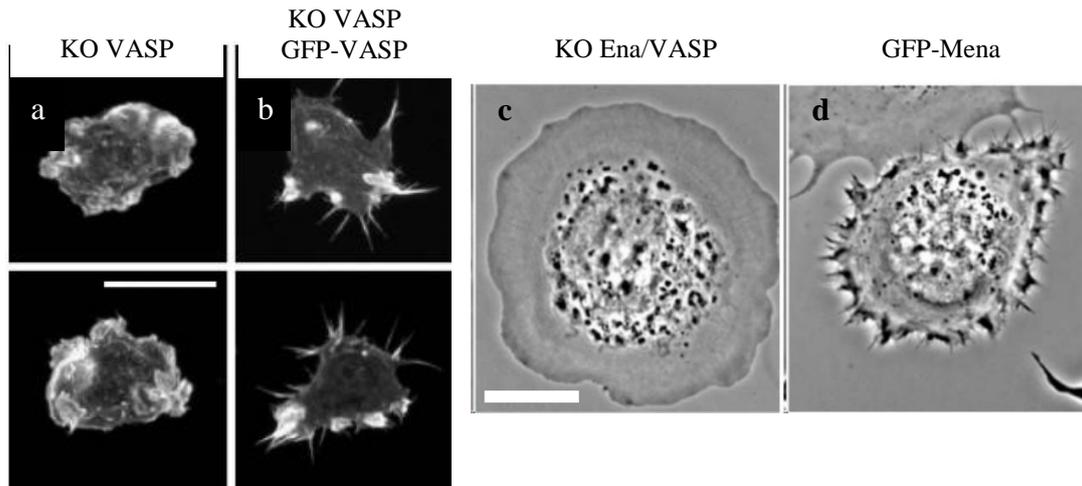


Figure 1.19 : La réintroduction des protéines Ena/VASP dans des cellules KO Ena/VASP restaure la formation des filopodes. (a et b) images en microscopie confocale. (a) *Dictyostelium* KO VASP ne forme pas de filopode contrairement (phalloïdine marquée TRITC). La réintroduction de GFP-VASP sur ce fond génétique entraîne la formation de filopodes (b). (c et d) image en contraste de phase de cellules MV^{D7}. Les cellules MV^{D7} dépourvues des protéines Ena/VASP ne forment pas de filopode en absence de protéines de coiffe (c). La réintroduction de Mena sur ce fond génétique restaure la formation des filopodes. A et b d'après Schirenbeck., 2006. Barre d'échelle 5µm. c et d d'après Mejillano et al., 2006. Barre d'échelle 10µm.

1.5.4 Influence de VASP sur le déplacement de *La Listeria monocytogenes*.

VASP participe à la protrusion des cellules mais nous verrons plus en détail que la bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* est capable de détourner VASP pour augmenter sa vitesse de déplacement dans les cellules infectées et en extrait cellulaire. (Chakraborty et al., 1995; Smith et al., 1996; Niebuhr et al., 1997; Laurent et al., 1999; Loisel et al., 1999; Skoble et al., 2001; Geese et al., 2002)

1.5.5 Des arguments en faveur d'une activité « anti protéine de coiffe » de VASP.

Au cours des dernières années, de nombreuses preuves apportées par des expériences *in vitro* avec des protéines purifiées et des expériences de biologie cellulaire étayent l'hypothèse d'une activité anti protéine de coiffe portée par VASP. Ainsi, cette activité anti protéine de coiffe a été observée indirectement via des expériences de polymérisation d'actine pyrène, et directement par des

expériences en microscopie TIRF (Geese et al., 2002; Barzik et al., 2005; Pasic et al., 2008). VASP purifié permet de retarder le coiffage de l'extrémité barbée des filaments par les protéines de coiffe. De plus, le taux d'élongation des filaments semble augmenté par l'ajout de profiline. VASP semble augmenter le taux de polymérisation des filaments d'actine uniquement en présence de protéine de coiffe en protégeant les extrémités barbées de celles-ci. La protéine VASP elle-même ne semble pas capable d'augmenter le taux d'élongation de filaments d'actine. Les expériences de cinétiques montrent que l'effet stimulateur de la profiline sur l'activité anti protéine de coiffe de VASP requière les interactions directes profiline/VASP mais aussi Profiline/actine-G (Bear et al., 2002; Barzik et al., 2005; Hansen and Mullins, 2010). Il fait noter que ces expériences ont été effectuées dans des conditions en sels physiologiques pour lesquelles l'activité de nucléation de VASP est négligeable.

La capacité de VASP à lier directement les bouts barbés a été démontrée directement en microscopie TIRF. Dans l'étude de Pasic et al., 2008, des filaments d'actine préformés sont injectés entre lame et lamelle sur laquelle sont immobilisées des protéines VASP. Les conditions employées permettent la croissance au bout plus, pas au bout moins. VASP immobilisé sur la surface se montre capable d'attraper les filaments par leur bout barbé. Cependant, les filaments déjà coiffés par des protéines de coiffe ne sont pas capturés, excluant l'hypothèse d'une activité « décoiffante » de VASP. Plus récemment encore, Hansen and Mullins, 2010 confirment l'interaction de VASP avec les bouts. Ces résultats sont en accord avec de précédentes expériences où VASP immobilisé à la surface de billes est capable de capturer les bouts barbés libres des filaments d'actine (Bear et al., 2002). L'activité anti protéine de coiffe a été confirmée par (Breitsprecher et al., 2008). Dans cette étude, VASP de *Dictyostelium* immobilisé sur des billes est capable de supporter l'élongation de filaments d'actine même en présence de fortes concentrations en protéine de coiffe.

Des observations sur cellules semblent confirmer l'interaction de Ena/VASP avec les bouts barbés des filaments d'actine. Ainsi, dans des cellules traitées à la cytochalasine D (une drogue qui bloque les bouts barbés) Ena/VASP est déplacé de l'extrémité des lamellipodes en cours de protrusion dans différents types cellulaires (Bear et al., 2002; Krause et al., 2004; Lacayo et al., 2007). Ces expériences indiquent la nécessité de bouts barbés en croissance pour la localisation d'Ena/VASP dans le lamellipode. Les changements de morphologies du lamellipode observé en modifiant le taux d'Ena/VASP dans le lamellipode sont en accord avec des modèles mathématiques dans lesquels Ena/VASP présente une activité anti protéine de coiffe (Lacayo et al., 2007). Des expériences de recouvrement de fluorescence après photo blanchiment (FRAP) révèlent que VASP est associé de manière stable aux bouts barbés des filaments en croissance des filopodes (Applewhite et al., 2007). Le photoblanchiment de VASP et de l'actine montre un recouvrement rapide du signal fluorescent de l'actine, mais pas du signal fluorescent de VASP, indiquant que le renouvellement de VASP à l'extrémité des filopode est faible voir nul alors que de nouveaux monomères sont constamment incorporés à l'extrémité du filopode.

1.5.6 Des arguments à l'encontre d'une activité « anti protéine de coiffe » de VASP.

Bien que la plupart des études récentes supportent l'hypothèse d'une activité anti protéine de coiffe de la part de VASP, certaines études n'ont pas abondé dans ce sens. Ainsi, Boujemaa-Paterski et al., 2001 montrent que VASP n'a pas d'effet sur la polymérisation de l'actine en présence de la protéine de coiffe gélsoline. Les auteurs concluent alors que VASP ne peut empêcher la protéine de coiffe de lier les bouts barbés. Ces expériences mériteraient d'être revisitées à l'aide de technique comme la microscopie TIRF.

L'effet de VASP sur la vitesse d'élongation des filaments d'actine reste lui aussi controversé. Certaines études ne rapportent aucun effet de VASP seul sur la vitesse d'élongation des filaments d'actine (Bear et al., 2002; Barzik et al., 2005) alors que d'autres montrent une augmentation significative ou bien très modérée de VASP sur la vitesse d'élongation (Breitsprecher et al., 2008; Hansen and Mullins, 2010). Même le rôle de la profiline reste controversé. Dans certaines études, la profiline augmente l'élongation des bouts barbés des filaments d'actine en présence de VASP (Barzik et al., 2005; Hansen and Mullins, 2010) alors qu'elle ne présente aucun effet pour d'autre (Breitsprecher et al., 2008). Les différences observées ne sont pas toujours expliquées mais il semblerait que les concentrations en sels utilisées jouent un rôle majeur. En effet, nous savons que l'activité anti protéine de coiffe de VASP et d'élongation sont très sensibles à la concentration en sel (Hansen and Mullins, 2010). Aussi, les expériences TIRF sont souvent menées à des concentrations en sels faibles, favorisant la nucléation non physiologique par VASP et l'augmentation de la vitesse d'élongation des filaments.

1.5.7 VASP réduit le nombre de branches formées par le complexe Arp2/3.

Les protéines Ena/VASP pourraient avoir d'autres activités biochimiques qui agiraient en parallèle ou en synergie avec l'activité anti protéine de coiffe. Ainsi, plusieurs études pointent le fait que les protéines Ena/VASP diminueraient la fréquence de branchement des filaments d'actine par le complexe Arp2/3 (Skoble et al., 2001; Bear et al., 2002; Samarin et al., 2003; Plastino et al., 2004). Ainsi, Skoble et al., 2001 observent en fluorescence que VASP réduit le branchement induit par le complexe Arp2/3 activé par ActA. Ces expériences ne contiennent pas de protéine de coiffe, indiquant que cette activité anti branchement serait indépendante de l'activité anti protéine de coiffe. Le mécanisme anti branchement reste à ce jour incompris. Samarin et al., 2003 ont proposé que VASP possède une activité de détachement des branches de ActA mais aucune observation directe n'a pu confirmer cette hypothèse.

1.5.8 Contribution des différents domaines de VASP à sa fonction.

1.5.8.1 Le domaine EVH1.

VASP présente un domaine aminoterminal EVH1 (Ena/VASP homology1) qui peut lier les séquences polyproline FPPPP de protéines partenaires (Niebuhr et al., 1997; Prehoda et al., 1999; Castellano et al., 2001). Cette liaison est suffisante pour le recrutement de VASP aux adhésions focales, au front de migration du lamellipode ainsi qu'à l'extrémité des filopodes (Bear et al., 2001). Ainsi, VASP est recruté par la zyxine au niveau des adhésions focales via EVH1 et contrôle la dynamique des adhésions cellulaires et le remodelage des fibres de stress (Ahern-Djamali et al., 1998; Hoffman et al., 2006) en participant notamment à l'homéostasie mécanique des cellules, réparant et renforçant les fibres de stress endommagées par une tension trop importante (Smith et al., 2010). Lorsque la zyxine est supprimée des cellules, VASP ne peut plus être recruté au niveau des adhésions focales, ce qui entraîne une adhésion des cellules plus forte et une vitesse de migration plus élevée (Hoffman et al., 2006). De même, une mauvaise localisation de VASP dans le kératinocyte de poisson (VASP réparti dans l'ensemble de la cellule et non pas concentré au front de migration du lamellipode) entraîne une altération de la forme des cellules et une migration moins efficace (Lacayo et al., 2007).

Au front de migration du lamellipode, VASP est recruté à la membrane entre autres par la lamellipodine : une protéine ancrée à la membrane via son domaine Pleckstrin homology qui lie le $PI_{(3,4)}P_2$ présent dans la membrane. Des cellules KO pour la lamellipodine ne parviennent plus à former de lamellipode. A l'inverse, une augmentation de l'expression de la lamellipodine dans les neurones entraîne une augmentation de la vitesse de protrusion du lamellipode ainsi que de la formation des ruffles, un phénotype caractéristique d'une augmentation d'expression de VASP. Ce phénotype résultant d'une sur expression de la lamellipodine est dépendant de la présence de VASP (Lebrand et al., 2004). C'est la protéine kinase c-Abl qui, en phosphorylant la lamellipodine autorise le recrutement de VASP (Michael et al., 2010).

1.5.8.2 Le domaine Polyproline.

La région polyproline centrale de VASP permet le recrutement de protéines à domaine SH3 et WW qui diffèrent pour chaque protéine Ena/VASP, leur permettant d'avoir différents partenaires et mécanismes de régulations (Gertler et al., 1995; Ahern-Djamali et al., 1999; Lambrechts et al., 2000). Parmi ces partenaires, on trouve Abl, Src, Drk ou encore IRSp53 (Krause et al., 2003). C'est la région de la protéine la plus divergente au sein de la famille Ena/VASP. En revanche, tous les Ena/VASP ont la capacité de recruter la profiline via leur domaine polyproline. (Reinhard et al., 1995; Ahern-Djamali et al., 1999). De manière surprenante, cette région s'avère inutile à la bonne localisation de la protéine qui colocalise parfaitement avec la vinculine et N-WASP au front de migration et aux adhésions focales (Loureiro et al., 2002). C'est via la liaison de ce domaine que la profiline améliore l'activité anti protéines de coiffe de VASP (Barzik et al., 2005). Breitsprecher et al., 2008 n'observent pas

d'effet de la profiline sur la polymérisation de l'actine par VASP. Hansen and Mullins, 2010 constatent une contribution de la profiline sur la vitesse d'élongation des filaments par VASP.

1.5.8.3 Le domaine EVH2.

En C-terminal, Ena/VASP présente un domaine EVH2 (Ena/VASP homology2) qui se compose dans cet ordre de trois domaines distincts : un **site de liaison à l'actine-G**, un **site de liaison à l'actine-F** et un **domaine coiled coil** nécessaire à la tetramerisation de la protéine (Gertler et al., 1996; Ahern-Djamali et al., 1998; Bachmann et al., 1999).

1.5.8.4 Le site de liaison à l'actine-G.

Le site de liaison à l'actine-G : GAB (Globular Actin Binding) porte un motif KLRK similaire à celui porté par la thymosine $\beta 4$: KLKK (Gertler et al., 1996) et possède des propriétés de nucléation de l'actine à des concentrations en sels basses non physiologiques (Walders-Harbeck et al., 2002). *In vivo*, le site de liaison à l'actine-G est essentiel à la localisation de la protéine dans les fibroblastes MV^{D7} et le mutant GAB localise à l'extrémité de leur filopodes de manière moins marquée (Loureiro et al., 2002; Applewhite et al., 2007). Or, Schirenbeck et al., 2006 rapporte que le GAB n'est pas essentiel à la formation des filopodes chez *Dictyostelium*. En revanche, le site de liaison à l'actine semble essentiel au déplacement de la Lisetria *in vivo* (Geese et al., 2002). *In vitro*, GAB semble essentiel à l'activité anti protéines de coiffe de VASP (Barzik et al., 2005), mais pas pour la capture des bouts barbés (Pasic et al., 2008). Pourtant GAB est essentiel au ciblage de VASP au bout barbé comme le montrent les expériences à l'échelle de la molécule unique (Hansen and Mullins, 2010).

1.5.8.5 Le site de liaison à l'actine-F.

La capacité de VASP à lier l'actine-F via son domaine FAB (filamentous actin binding) a pu être mise en évidence en co précipitant VASP avec des filaments d'actine (Bachmann et al., 1999; Hüttelmaier et al., 1999; Laurent et al., 1999). *In vivo*, ce domaine est important pour la localisation de la protéine au front de migration de la cellule (la présence du mutant FAB y est fortement réduite mais une faible fraction reste détectable) et au filopode, mais pas pour sa localisation aux adhésions focales (Bear et al., 2002; Loureiro et al., 2002; Applewhite et al., 2007). Chez *Dictyostelium*, Schirenbeck et al., 2006 montre que l'activité de bundling du domaine FAB est nécessaire à la formation des filopodes, à localisation de VASP au front de migration et à sa motilité. *In vitro*, FAB semble essentiel à l'activité anti protéines de coiffe de VASP (Barzik et al., 2005). (Pasic et al., 2008) observent pourtant que le mutant FAB peut toujours attraper le bout barbé tout comme le double mutant FAB-GAB. Pour Hansen and Mullins, 2010, FAB est essentiel à l'interaction de VASP avec le côté du filament et au ciblage de VASP au bout barbé. C'est ce qui lui permet par diffusion latérale sur le filament d'actine de trouver le bout barbé. Breitsprecher et al., 2008 décrit une chute brutale du taux de polymérisation avec le mutant FAB qui s'accompagne d'une perte de la formation de faisceau tout

comme pour le double mutant FAB-GAB. En revanche, adsorbé à la surface de billes, le mutant FAB semble toujours être capable d'élongation processive même si il perd l'activité anti protéine de coiffe. In vivo, l'expression du mutant FAB augmente de manière surprenante la vitesse de déplacement des *Listeria* (Geese et al., 2002).

1.5.8.6 Le domaine Coiled-coil ou TET.

Enfin la partie la plus C-terminale consiste en un domaine coiled-coil nécessaire à l'oligomérisation de la protéine en tétramère (Bachmann et al., 1999; Hüttelmaier et al., 1999; Zimmermann et al., 2002). Les cellules exprimant la forme tronquée pour son domaine coiled-coil de VASP ne sont plus capables de former des filopodes (Applewhite et al., 2007). Aussi, le domaine de tétramérisation participe à la localisation de la protéine au front de migration des fibroblastes MV^{D7}, mais pas à leur localisation aux points focaux d'adhésion. *In vitro*, la tétramérisation apparaît importante pour la fonction anti protéine de coiffe de VASP (Barzik et al., 2005). Hansen and Mullins, 2010 montrent que VASP doit être tétramérisé pour interagir avec le filament d'actine. Breitsprecher et al., 2008 concluent à l'importance de la tétramérisation pour former des faisceaux d'actine ainsi que pour la processivité de l'élongation des filaments par VASP. Cette processivité peut être restaurée lorsque le mutant TET est immobilisé, regroupé à la surface de billes, la densité compensant la perte de tétramérisation. Cette observation est également faite avec les *Listeria* dont la vitesse de déplacement en présence du mutant de tétramérisation n'est pas affectée comparée à VASP sauvage (Geese et al., 2002).

1.5.8.7 Les protéines Ena/VASP et le cancer.

Depuis quelques années, des études relient les protéines Ena/VASP à la transformation cancéreuse des cellules ainsi qu'à leur caractère métastatique. Ainsi, il a été montré que des fibroblastes qui sur ou sous expriment VASP perdent l'inhibition de contact et présentent un potentiel tumorigénique suggérant qu'une cellule normale restreint l'expression de VASP dans une fenêtre de concentration étroite (Liu et al., 1999). VASP est significativement sur exprimé dans les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires et ce niveau d'expression est corrélé avec l'état d'avancement de la tumeur (Dertsiz et al., 2005). Une autre membre de la famille Ena/VASP, Mena, est sur exprimé dans la majorité des lignées de cellules cancéreuses du sein, et est déjà exprimé dans les lésions bénignes du sein à potentiel tumorigénique, potentialisant leur caractère métastatique (Di Modugno et al., 2004, 2006; Philippar et al., 2008; Bae et al., 2009; Roussos et al., 2010; Toyoda et al., 2011).

VASP semble jouer un rôle dans la formation des invadopodes : structures primordiales pour la dissémination des cellules cancéreuses, puisque la formation de ces structures est inhibée par la phosphorylation de VASP (ce qui inhibe son interaction avec l'actine), empêchant la dissémination des tumeurs du côlon (Zuzga et al., 2011).

Tout comme la formation des invadopodes, l'angiogenèse a également un rôle déterminant dans la croissance et la propagation des tumeurs puisqu'elle favorise la formation des nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à leur développement. En dessous de 1 à 2 millimètres, des tumeurs insuffisamment vascularisées nécrosent ou rentrent en apoptose. D'ailleurs, l'inhibition de l'angiogenèse permet de réduire significativement la progression tumorale (Parangi et al., 1996). Au niveau du placenta, l'expression de VASP augmente, participant à l'angiogenèse de ce tissu en régulant la migration des cellules endothéliales des veines ombilicales qui formeront les capillaires (Salazar et al., 1999; Kayisli et al., 2002). Des tumeurs de mélanomes greffées chez des souris KO VASP se développent moins bien : les tumeurs sont plus petites et moins vascularisées (Kim et al., 2011). Dans ce contexte, il apparaît que VASP joue un rôle majeur dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, donc, dans la vascularisation des tumeurs solides. Dans l'ensemble, les protéines de la famille Ena/VASP exerceraient un rôle à plusieurs niveaux et conduiraient au développement des métastases via leur interaction avec l'actine.

Pour étudier les interactions de VASP avec l'actine, l'apport des systèmes biomimétiques se révèle être un atout majeur comme nous allons le voir dans la partie suivante ainsi que dans le chapitre 2 de cette thèse.

1.6 Systèmes biomimétiques.

La complexité biochimique et physique du mouvement cellulaire rend la réalisation de mesures quantitatives et d'expériences contrôlées difficile à mettre en œuvre, comme le montrent les résultats parfois contradictoires des études sur VASP. Pour contourner ces obstacles, les chercheurs ont développé des systèmes simplifiés *in vitro* dits biomimétiques ayant pour but de reproduire en partie le front de migration des cellules en mouvement. Ces systèmes se composent d'un substrat qui joue le rôle de la membrane plasmique du front de migration et d'un mélange de protéines purifiées ou d'un extrait cellulaire mimant le cytosol. Au cours des dernières années, ces systèmes ont contribué à la compréhension des dynamiques de polymérisation de l'actine.

1.6.1 *Listeria monocytogenes*.

A l'origine, les systèmes biomimétiques puisent leur inspiration de la bactérie *Listeria*. Ainsi, de nombreux progrès dans la compréhension des dynamiques de l'actine sont imputables à l'étude de son déplacement dans les cellules. La *Listeria* est une bactérie cylindrique de 1,5 à 2 µm de long sur 0,6 µm de large. (1) Elle infecte les cellules par un processus d'internalisation, et (2) détourne à son profit la machinerie de polymérisation de l'actine de la cellule hôte grâce à la protéine ActA, pour former une comète d'actine grâce à laquelle elle se propulse (Tilney et al., 1990, 1992; Welch et al.,

1997). Cette comète d'actine génère suffisamment de force pour permettre à la *Listeria* de déformer la membrane plasmique et former un pseudopode se prolongeant dans la cellule voisine (3). Cette dernière peut alors phagocytter la protrusion avec la bactérie qu'elle contient, se retrouvant infectée à son tour (4). (Figure 1.20)

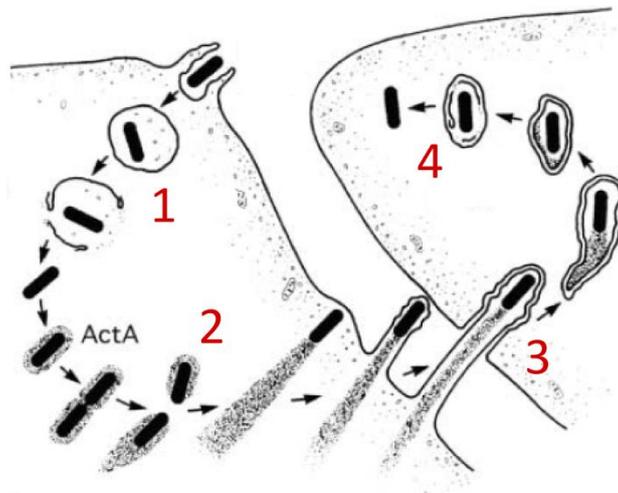


Figure 1.20 : Cycle d'infection de la *Listeria*. D'après Portnoy et al., 2002

D'autres pathogènes intracellulaires comme le virus de la vaccine ou encore les bactéries *Shigella* et *Rickettsiae* détournent de manière similaire la machinerie d'assemblage de l'actine des cellules hôte pour former une comète d'actine et se déplacer (Gouin et al., 2005). (Figure 1.21)

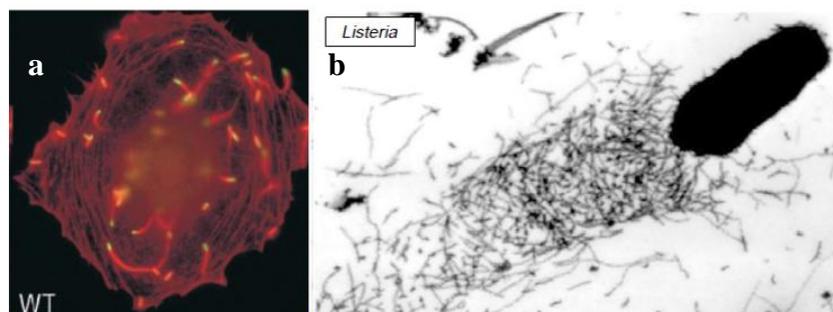


Figure 1.21 : (a) observation de *Listeria* se propulsant grâce à une comète d'actine, dans le cytoplasme d'une cellule infectée. L'actine est marquée en rouge et la bactérie en vert. D'après Skoble et al., 2001. (b) observation en microscopie électronique d'une comète de *Listeria*. D'après Gouin et al., 1999.

1.6.2 Mécanisme de polymérisation de l'actine à la surface de la *Listeria*.

La *Listeria* exprime à sa surface et de manière polarisée des facteurs de virulence parmi lesquels la protéine « Actin assembly-inducing protein » (ActA) qui recrute et active le complexe Arp2/3 (Kocks et al., 1993; Welch et al., 1997, 1998; Boujemaa-Paterski et al., 2001). Il est intéressant de noter qu'ActA fut un temps le seul activateur du complexe Arp2/3 connu avant même les activateurs de la famille N-WASP (Welch et al., 1998). Une fois activé, Arp2/3 forme à la surface de la bactérie un nuage d'actine qui donne naissance à une queue en forme de comète mimant le réseau d'actine qui sous-tend la membrane plasmique des cellules en mouvement. En effet, les filaments de la comète ont leurs bouts barbés orientés vers la surface de la bactérie, donc, dans le sens du mouvement (Tilney et al., 1992). De plus, des expériences de photoactivation d'actine dans la comète ont démontré que le mouvement de la *Listeria* résulte de la polymérisation continue de filaments d'actine à la surface de la bactérie (Tilney et al., 1992). Dès que la comète est plus longue que la bactérie, la force de frottement du cytoplasme est plus forte sur la comète que sur la bactérie. La comète reste alors immobile par rapport au cytoplasme alors que la bactérie se déplace.

ActA.

La protéine ActA est nécessaire et suffisante au mouvement de *Listeria*. Elle contient tous les éléments pour déclencher la formation de comètes. Elle se compose de trois domaines (Skoble et al., 2000) (Figure 1.22).

- Un domaine N-terminal essentiel à la polymérisation de l'actine contenant des éléments fonctionnels analogues à ceux présents chez les activateurs eucaryotes WASPs. Ce domaine comprend : (1) une région acide qui stimule le complexe Arp2/3 mais n'est pas essentielle à son activité. (2) un site de liaison à l'actine-G essentiel à la nucléation *in vitro*, mais pas *in vivo* (cette activité pouvant être compensé par VASP *in vivo*). (3) une séquence « cofilin homology » critique pour l'activation du complexe Arp2/3.
- Une région centrale favorisant le mouvement de la *Listeria* qui contient quatre répétitions polyprolines capables de recruter la protéine VASP via son domaine EVH1 (Niebuhr et al., 1997)
- Un domaine C-terminal nécessaire à l'encrage de la protéine à la surface de la bactérie.

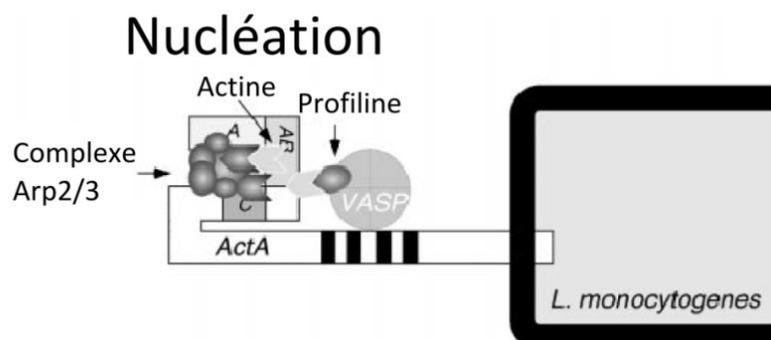


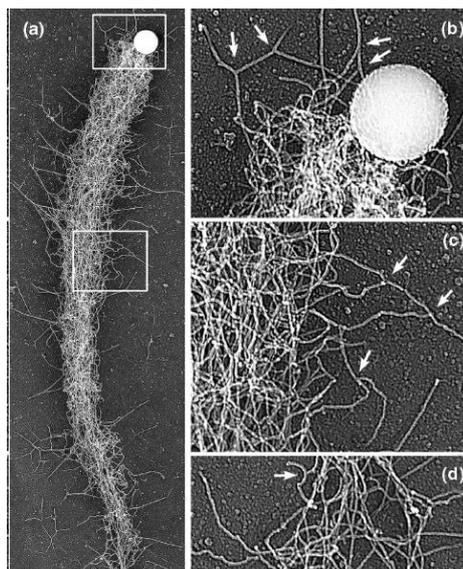
Figure 1.22 : modèle de nucléation par ActA et le complexe Arp2/3 à la surface de la *Listeria*. La région acide (A) et la séquence « cofilin homology » (C) d'ActA contribuent toutes les deux à activer Arp2/3. Le domaine de liaison à l'actine-G (AB) recrute et présente les monomères d'actine à Arp2/3 pour faciliter la formation d'un noyau. VASP pourrait lier les nouveaux filaments formés pour aider à les maintenir à la surface de la bactérie. D'après Skoble et al., 2000

1.6.3 Des extraits cellulaires aux extraits reconstitués.

Un pas a été franchi avec la mise au point d'un mélange de protéines purifiées et d'actine-F capable de soutenir le mouvement de la *Listeria* (Loisel et al., 1999). La possibilité de faire varier la composition de ce mélange de manière contrôlée a permis de définir les ingrédients nécessaires au mouvement. Seules trois protéines se révèlent essentielles en plus de l'actine : le complexe Arp2/3, l'ADF/cofiline (nécessaire pour produire des monomères à partir des filaments d'actine) et une protéine coiffant le bout plus pour former le réseau réticulé de la comète. Ces expériences démontrent que les moteurs moléculaires de type myosine n'interviennent pas dans le processus. D'autres protéines ne sont pas essentielles mais améliorent l'efficacité du déplacement. Ainsi VASP peut augmenter la vitesse de *Listeria* par un facteur cinq (Loisel et al., 1999)

1.6.4 De la *Listeria* à la bille.

Le système peut encore être simplifié en substituant une bille de polystyrène recouverte de ActA à la *Listeria* (Cameron et al., 1999) (Figure 1.23). Des observations en microscopie électronique montrent que les comètes poussées sur billes et le réseau d'actine dans le lamellipode partagent la même organisation dendritique responsable de leur mouvement protrusif (Cameron et al., 2001). A ce stade, la composition du mix de motilité, la géométrie du support de polymérisation ainsi que la concentration en activateur à la surface de l'objet sont contrôlables et en font un système puissant pour la compréhension du mouvement cellulaire.



Le remplacement d'ActA par les activateurs WASPs (ou leur domaine VCA) à la surface des billes démontre qu'ils sont suffisants pour la formation des réseaux dendritiques Arp2/3 dépendants à l'origine du mouvement des cellules eucaryotes (Yarar et al., 1999).

1.6.5 Diversité des systèmes biomimétiques.

Au cours des dernières années, ces systèmes biomimétiques se sont diversifiés et de nombreuses approches expérimentales ont vu le jour (Figure 1.24). Des bâtonnets de verres habillés avec les activateurs de la polymérisation de l'actine permettent de recréer en 2D un réseau ressemblant à celui du lamellipode (Carlier et al., 2003). Le remplacement des billes par des gouttelettes lipidiques déformables permet l'étude des contraintes de l'actine sur leur support (Boukellal et al., 2004). Enfin, l'utilisation de patterns comme source de nucléation permet d'étudier l'influence de la géométrie sur l'organisation des réseaux d'actine (Reymann et al., 2010).

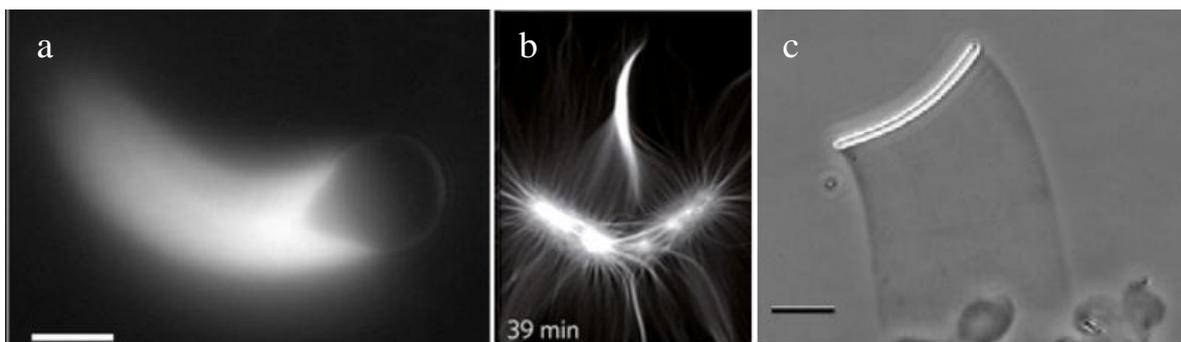


Figure 1.24 : Divers systèmes biomimétiques. (a) image en fluorescence d'une goutte d'huile recouverte d'activateur de la polymérisation propulsée dans un extrait de cellules Hela. Sous la contrainte exercée par la comète, la goutte se déforme. D'après Boukellal et al., 2004. (b) image en fluorescence de la formation d'un bundle à partir de filaments nucléés sur des pattern. Ici, la géométrie induit la formation du bundle. D'après Reymann et al., 2010. (c) observation en microscopie à contraste de phase d'un bâtonnet de verre recouvert de nucléateurs de l'actine et propulsé par un réseau d'actine mimant l'extension du lamellipode.

1.6.6 Modèle élastique de la génération du mouvement.

Les réseaux d'actine sont assimilables à des gels puisqu'ils répondent à la définition de réseaux tridimensionnels enchevêtrés ayant le comportement d'un solide. Le modèle de croissance d'un gel d'actine symétrique autour d'une bille en extraits cellulaires proposé par Noireaux et al., 2000 et raffiné quelques années plus tard par Achard et al., 2010 résume les paramètres physiques mis en jeu (Figure 1.25). Les bouts barbés sont préférentiellement confinés à proximité de la surface de la bille. C'est là que sont incorporés les monomères d'actine du gel en croissance. Ce gel dépolymérise préférentiellement au niveau de sa couche extérieure qui ne polymérise plus et constitue une « zone morte ». Du fait de la géométrie sphérique, le gel pour pouvoir croître, doit insérer à la surface de la bille une nouvelle couche d'actine, repoussant ainsi l'ancienne vers l'extérieur. Le gel se déforme en accumulant de la contrainte élastique. Cette contrainte est d'autant plus importante que le gel est épais et finit par freiner la polymérisation. On atteint alors une épaisseur ou le taux de polymérisation limité par la contrainte compense juste la dépolymérisation à l'extérieur.

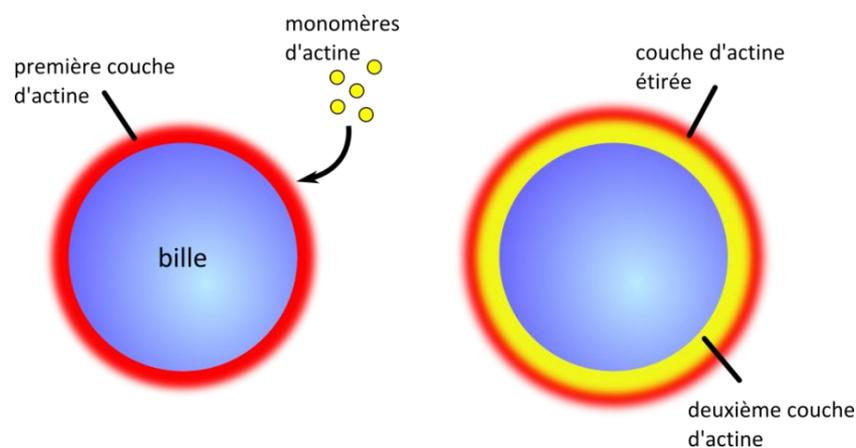


Figure 1.25 : Schéma de la croissance d'un gel d'actine autour d'une bille. L'ajout d'une deuxième couche étire la première couche de gel.

1.6.7 La brisure de symétrie.

La contrainte accumulée par le gel d'actine au cours de sa croissance freine sa polymérisation, mais sa relaxation peut induire sa rupture : c'est la brisure de symétrie (van der Gucht et al., 2005) (Figure 1.26). Après brisure (spontanée ou déclenchée), le gel, soumis à la contrainte tangentielle, semble « s'éplucher » de la surface de la bille et l'expulse. Tant que l'épaisseur du gel est homogène, la distribution de la contrainte est uniforme le long de la surface de la bille. Une inhomogénéité locale peut provoquer une variation d'épaisseur qui se traduit par une contrainte plus forte là où le gel est le plus fin (Sekimoto et al., 2004). Le gel se rompt à ce niveau et une comète se forme du côté opposé, propulsant la bille vers l'avant. Ce mécanisme de brisure de symétrie résultant de tension dans le gel autour des billes est analogue à l'acquisition d'une polarité par les cellules. Dans ce dernier cas, ce

n'est pas la géométrie qui est responsable de l'acquisition de la polarité, mais la contraction du cortex d'actine sous l'action contractile des myosines (Paluch et al., 2006).

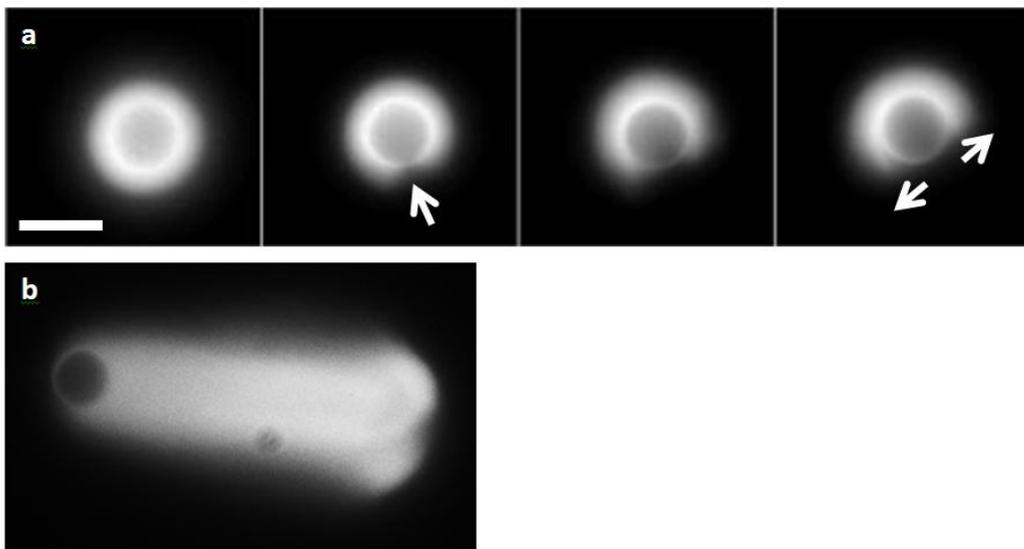


Figure 1.26 : (a) images en fluorescence d'un gel en train de briser la symétrie. Une bille de $4,5\mu\text{m}$ de diamètre et recouverte d'un activateur de la polymérisation de l'actine est incubée en extrait reconstitué. Un gel d'actine se forme. En grossissant, le gel accumule du stress élastique qu'il finit par libérer en se brisant : c'est la brisure de symétrie. Barre = $5\mu\text{m}$. Les images sont prises à intervalle de 5 minutes. La première flèche indique l'apparition d'une encoche dans le gel. Les deux dernières flèches montrent le gel s'étirer de part et d'autre du trou. (b) image en fluorescence d'une bille de $4,5\mu\text{m}$ de diamètre propulsée par une comète d'actine en extrait reconstitué.

1.8 Sujet de la thèse.

Au regard des études parfois contradictoires traitant des mécanismes de VASP, et compte tenu de son importance dans le développement de certains cancers et la formation des métastases, il apparaît indispensable de continuer les recherches sur la protéine VASP. Cette thèse s'intéresse donc aux effets de VASP sur la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine, notamment grâce à l'apport du système biomimétique de billes. Contrôlé, il se révèle précieux pour s'affranchir des effets

inhérents à la physiologie complexe des cellules. Une meilleure compréhension du rôle de VASP dans la motilité cellulaire pourrait, *in fine*, avoir des répercussions sur la lutte contre le cancer.

Résultats.

Les chapitres suivants exposent les résultats de mon travail de thèse. Le chapitre 2 présente les travaux menés sous la direction de Julie Plastino à l'Institut Curie au sein de l'UMR 168. Les chapitres 3 et 4 constituent les volets plus physiques de l'étude des effets de VASP sur les réseaux d'actine et présentent respectivement les travaux menés en collaboration avec l'équipe de Gijssje Koenderink (AMOLF, Pays-Bas) et les travaux menés en collaboration avec l'équipe de Laurent Kreplak (Delhousie University, Canada). Chacun de ces trois chapitres donne lieu à un article en cours de publication ou déjà publié.

- Le chapitre 2 porte sur l'étude des effets de VASP ainsi que des formes mutantes de VASP sur la motilité, à l'aide d'un système biomimétique constitué de billes recouvertes d'activateurs de la polymérisation de l'actine, mais également à l'aide de la bactérie *Listeria monocytogenes*. Cette étude nous permet de mieux comprendre les mécanismes moléculaires que VASP déploie pour augmenter les vitesses de propulsion, met en évidence l'importance du mécanisme du recrutement de VASP et met à jour un nouvel effet de VASP sur la formation des réseaux d'actine.
- Le chapitre 3 porte sur les effets réticulant de la protéine VASP sur des réseaux d'actine en solution. Grâce à des mesures en rhéologie couplées à des observations en microscopie confocale, les effets de différentes concentrations en VASP et en mutants VASP sur la formation de faisceaux et d'amas d'actine en solution sont

mesurés et observés pour comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels VASP peut modifier la structure des réseaux d'actine.

- Le chapitre 4 vise l'étude des effets de VASP sur la mécanique des réseaux d'actine à l'aide du système biomimétique de billes. Grâce à la microscopie à force atomique (AFM), nous voulons sonder les propriétés élastiques des comètes poussées à la surface des billes en présence de VASP.

Chaque chapitre s'ouvre par une brève introduction suivie des principaux résultats qui sont le fruit de mon travail ou de la collaboration avec nos partenaires, et se conclue par un bilan suivi d'une conclusion. L'article reprenant la plupart des résultats exposés vient clore le chapitre.

Chapitre 2

Ena/VASP agit en synergie avec le complexe Arp2/3 lors de la motilité actine dépendante.

La famille de protéines Ena/VASP (Ena, Mena et VASP) compte parmi les marqueurs de cancers particulièrement invasifs du sein, du poumon ou encore du colon et est également impliquée dans d'autres pathologies (Philippart et al., 2008; Pula and Krause, 2008; Zuzga et al., 2011). Si les mécanismes moléculaires de VASP à l'échelle du filament d'actine commencent tout juste à être compris, leur rôle dans l'organisation des réseaux d'actine Arp2/3 dépendant générateurs de mouvement reste très controversé (Barzik et al., 2005; Hansen and Mullins, 2010). Ainsi, les principales études adressant cette question ont pour modèles la propulsion des *Listeria* et le mouvement cellulaire (Bear et al., 2000, 2002; Geese et al., 2002; Loureiro et al., 2002). L'organisation multi domaine de VASP rend la compréhension de ses mécanismes complexe. Les auteurs des études citées ont alors généré une série de mutants VASP, chacun délété d'une fonction, et les ont réintroduits dans des cellules MV^{D7} n'exprimant pas de protéines Ena/VASP. Ils ont alors observé l'impact de ces mutants sur le mouvement des cellules et sur le déplacement des *Listeria*, faisant apparaître des résultats contradictoires. Les cellules MV^{D7} présentent de manière surprenante un phénotype d'hyper motilité alors que les *Listeria* se propulsent moins efficacement dans le cytosol

de ces cellules. La réintroduction des forment sauvages des protéines Ena/VASP dans les cellules MV^{D7} suffit à compenser leur phénotype d'hyper motilité en ralentissant le déplacement des cellules, mais les auteurs ont observé que les protrusions se faisaient plus rapidement et de manière moins persistante. De même, la réintroduction des protéines Ena/VASP augmente la vitesse de propulsion des *Listeria*. Les mutants Ena/VASP délétés de leur site de tétramérisation et de leur site de liaison à l'actine-F conservent des effets similaires voir supérieurs à VASP sauvage sur la propulsion des *Listeria* alors que seul le mutant délété du site de liaison à la profiline présente des effets similaires à VASP sauvage sur la motilité cellulaire (protrusions rapides). Comme résumé dans le tableau 2.1, le seul point d'accord entre ces études est la nécessité d'avoir un site de liaison à l'actine-G fonctionnel pour restaurer des effets comparables à VASP sauvage sur *Listeria* et sur cellules (Bear et al., 2000; Geese et al., 2002; Loureiro et al., 2002). La contradiction de ces résultats pourrait s'expliquer par un adressage subcellulaire aberrant des mutants Ena/VASP et par le fait d'étudier les mouvements cellulaires/*Listeria* dans des cellules en culture (Bear et al., 2002; Loureiro et al., 2002).

Formes d'Ena/VASP	Protrusion cellulaire	Mouvement de la <i>Listeria</i> dans les cellules
Pas d'Ena/VASP	-	-
VASP sauvage	+	+
ΔPP	+	-
ΔGAB	-	-
ΔFAB	-	++
ΔTET	-	++

Tableau 2.1 : récapitulatif des effets des protéines Ena/VASP sur les protrusions cellulaires et le mouvement de la *Listeria* dans les cellules. *N.B. La protrusion est inversement proportionnelle au mouvement global des cellules.

Nous proposons donc d'étudier les mécanismes moléculaires de VASP sur les réseaux protrusifs d'actine Arp2/3 dépendants avec un test de motilité sur billes. Incubée dans un mélange minimal de protéines purifiées soutenant la polymérisation de comètes d'actine, la surface des billes résume ce qui se passe au front de migration du lamellipode des cellules ainsi qu'à la surface des *Listeria*. Les différentes formes de VASP mutant sont testées pour leurs effets sur la croissance des comètes d'actine. Les résultats que nous avons obtenus sont majoritairement en désaccord avec les précédentes études conduites in vivo et sont pour la plupart cohérents avec les observations in vitro faites à l'échelle du filament unique.

2.1 Ena/VASP affecte la croissance du gel d'actine sans augmenter la motilité.

In vivo, le complexe Arp2/3 est recruté et activé à la membrane par les protéines WASP/WAVE tandis que VASP est ciblé à la membrane grâce à des protéines telles que la lamellipodine (Krause et al., 2004). Pour recréer les conditions de ce recrutement, nous habillons des billes de polystyrène avec un mélange contenant les deux peptides VCA et PRO. VCA est la portion de N-WASP humain qui recrute et active le complexe Arp2/3 pour nucléer et brancher des filaments d'actine. PRO est la portion de la protéine de *Listeria* ActA riche en domaines polyprolines FPPPP qui recrutent VASP. Les billes sont incubées dans un mélange de motilité contenant le complexe Arp2/3, la protéine de coiffe et un excès de profiline par rapport à l'actine-G (Achard et al., 2010). Ce mélange mime la forte concentration en actine monomérique présente dans le cytosol des cellules et minimise la formation spontanée de filaments d'en le milieu, ciblant l'assemblage de l'actine à la surface de la bille.

Nous observons que les comètes sont en moyenne plus longues en présence de VASP, mais la quantification des vitesses de déplacement des billes ne montre aucune différence (Figure 2.1).

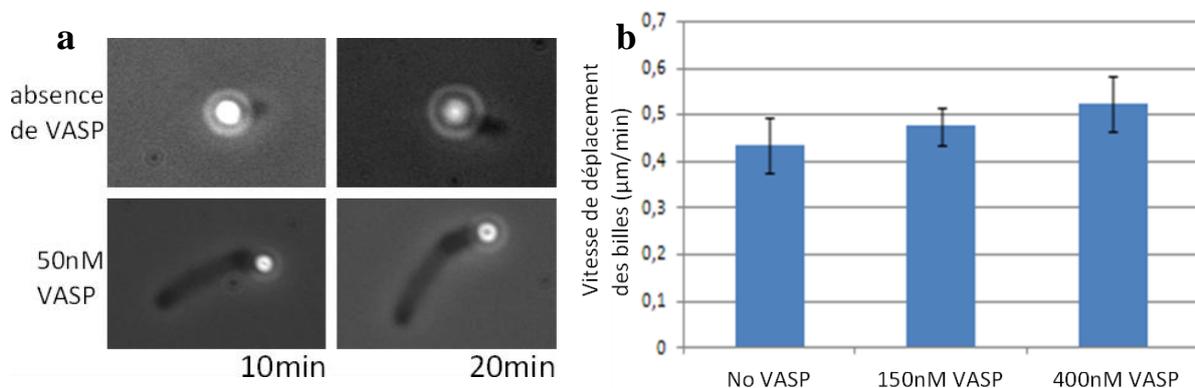
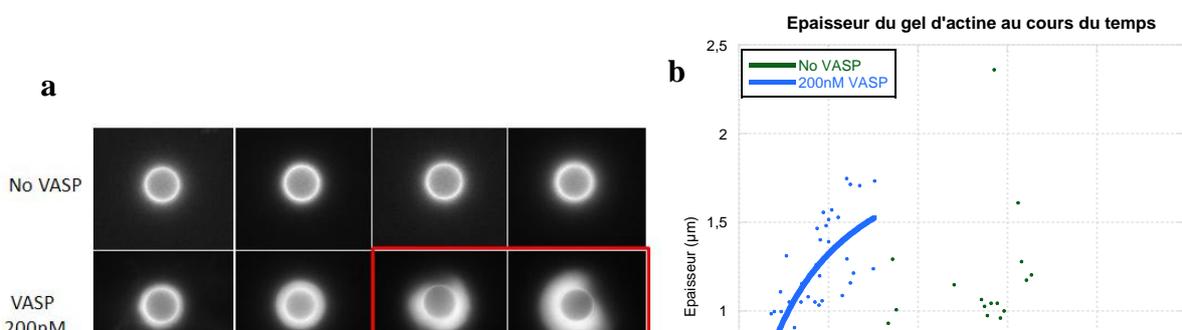


Figure 2.1 : (a) image en Contraste de phase de comètes d'actine en présence ou en absence de VASP à 10minutes puis à 20 minutes après le début de l'incubation des billes. (b) vitesse de déplacement des billes en présence de différentes concentrations en VASP.

Pourtant, en observant la surface des billes aux temps précoces d'incubation, nous constatons que l'actine s'accumule plus vite en présence de VASP avant la brisure de symétrie. Nous quantifions alors ce phénomène en mesurant l'épaisseur des gels d'actine au cours du temps jusqu'à ce que le nuage commence à se polariser (Figure 2.2a et b).



En présence de VASP, les gels d'actine croissaient plus vite et se polarisent plus rapidement sans pour autant augmenter les vitesses de déplacement des billes.

2.2 Ena/VASP augmente la motilité uniquement lorsqu'il est lié à l'activateur du complexe Arp2/3.

L'ajout de VASP murin au mix de motilité n'affecte pas la vitesse des billes VCA/PRO alors qu'il augmente la vitesse de déplacement des *Listeria* (ici notre contrôle positif) d'un facteur sept (Figure 2.3) prouvant que nos VASPs sont actifs et que notre mélange de motilité est adapté.

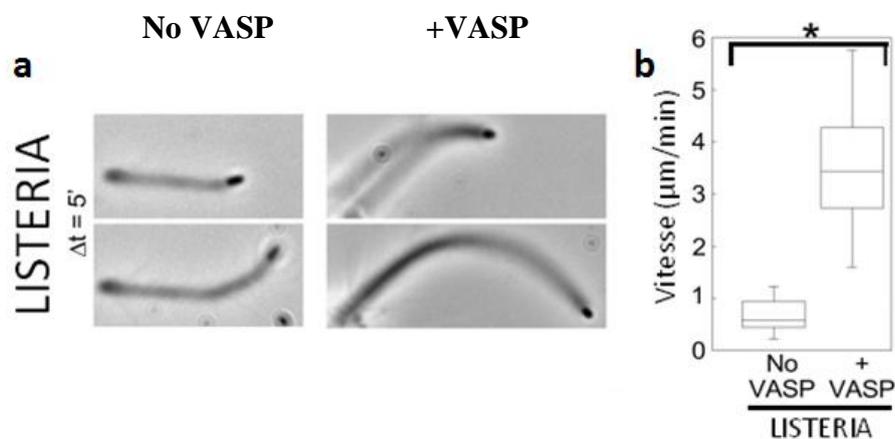
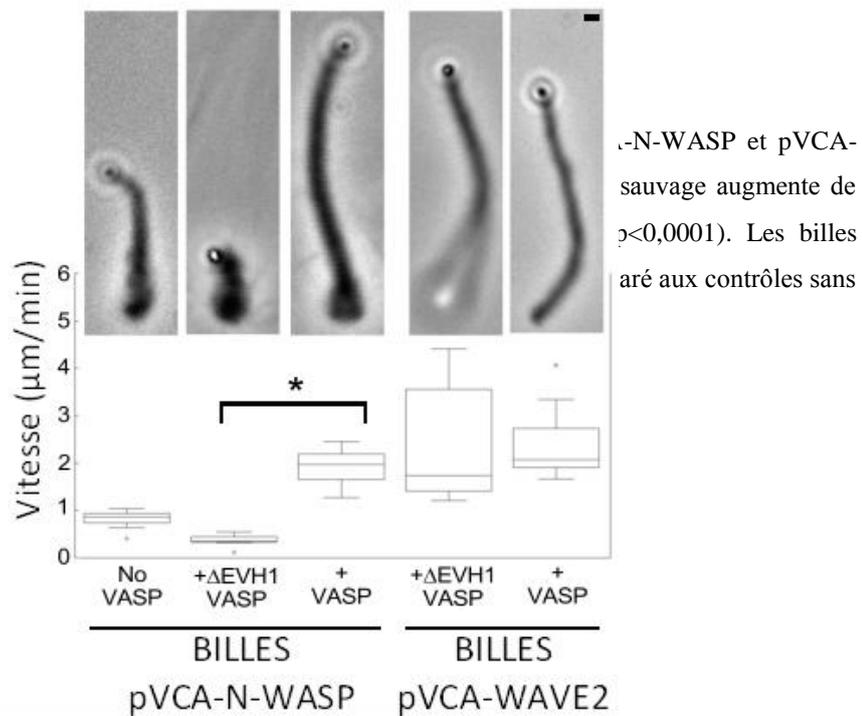


Figure 2.3 : VASP augmente la vitesse des *Listeria*. (a) image en contraste de phase de *Listeria* incubées dans le mix de motilité en présence ou non de VASP. Les images montrent des comètes représentatives à 5 minutes d'intervalle pour chaque condition (panneau gauche). (b) diagramme en boîte des vitesses de déplacement des *Listeria*. VASP augmente de manière significative ($p < 0,0001$) la vitesse de la *Listeria*. Barre d'échelle 1 μm .

2.3 L'activité de la famille des activateurs WASP mais pas WAVE est potentialisée par VASP.

La protrusion du lamellipode étant principalement dépendante de l'activité de WAVE, nous voulons vérifier si VASP potentialise l'activité de l'ensemble de la superfamille WASP/WAVE. Pour cela, nous réalisons des expériences avec le domaine pVCA de WAVE2 et le domaine pVCA de N-WASP de rat (Figure 2.5). Contrairement au fragment VCA utilisé pour habiller les billes VCA/PRO, ces fragments contiennent respectivement des séquences LPPPP et YPPPP. Cette dernière se montre également permissive pour la liaison à VASP (Niebuhr et al., 1997).

Figure 2.5 : Diagramme de vitesse de déplacement des billes pVCA-WAVE2 et images en microscopie à contraste de phase de billes pVCA-WAVE2 et pVCA-N-WASP en présence ou en absence de VASP.



En présence de VASP sauvage, les billes pVCA-N-WASP présentent comme les billes pVCA-WASP une augmentation de leur vitesse de déplacement par un facteur 2 comparé aux contrôles en absence de VASP ou en présence de Δ EVH1-VASP. Par contre, la vitesse des billes pVCA-WAVE2 reste inchangée. Il semble alors que seule la sous-famille N-WASP/WASP est sensible à VASP, pas la famille WAVE.

pVCA-WASP contient trois répétitions LPPPP : une en N-terminal L159, et deux dans le domaine riche en prolines : L313 et L381 (Figure 2.6a). Pour étudier le recrutement de VASP par WASP, nous mutons chaque répétition LPPPP en substituant les résidus leucine en alanine. Les séquences polyprolines ainsi mutées ne sont plus capables de recruter VASP (Niebuhr et al., 1997). Les billes de polystyrène habillées avec ces mutants ont été incubées dans le mélange de motilité et la croissance des comètes mesurée après 5 minutes (Figures 2.6b et c).

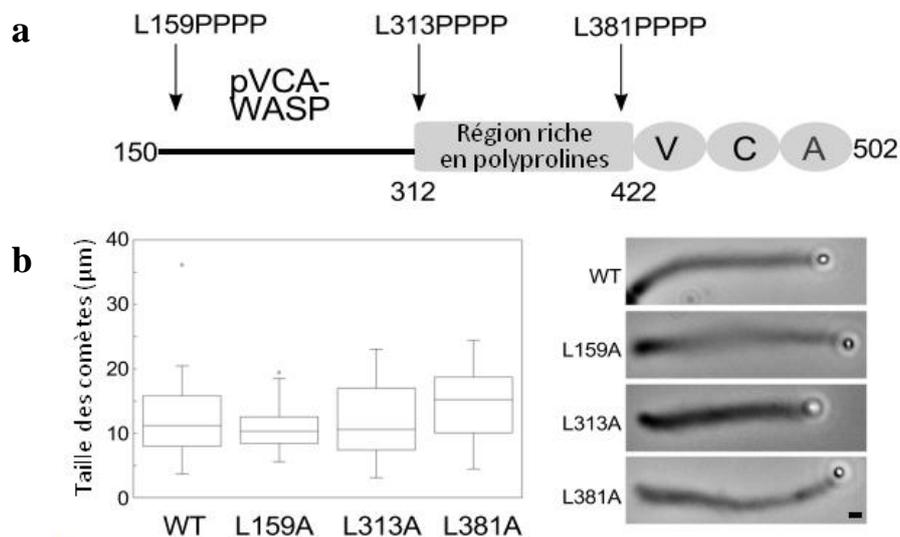


Figure 2.6 : (a) représentation schématique de la structure de pVCA-WASP. Les flèches indiquent l'emplacement des trois sites de liaison possibles de VASP (LPPPP). (b) diagramme en boîte représentant la taille des comètes après 5 minutes en présence de VASP. (c) images en contraste de phase représentatives des comètes pour chaque mutant pVCA. Les mutants présentent des tailles de comètes semblables à pVCA sauvage (WT). Barre d'échelle 1µm.

En présence de VASP, les comètes d'actine des mutants pVCA ne présentent pas une taille significativement différente par rapport au pVCA sauvage. Aucune des trois séquences LPPPP mutées n'est capable d'abolir le recrutement de VASP à la surface de la bille. Ces résultats semblent indiquer que toutes les répétitions LPPPP sont redondantes pour assurer le recrutement de VASP. Néanmoins, ils n'excluent pas l'hypothèse qu'un site de recrutement de VASP non classique (qui n'implique pas d'interaction FPPPP/EVH1) intervienne comme dans le cas du recrutement de Mena par le récepteur Tes (Boëda et al., 2007).

2.4 La forme tétramérique de VASP a besoin de ses sites de liaison à l'actine-F et à la profiline, mais pas de son site de liaison à l'actine-G pour potentialiser la motilité Arp2/3 dépendante.

Pour comprendre quels domaines de VASP sont nécessaires à la potentialisation de la motilité Arp2/3 dépendante, nous testons différentes formes mutantes de VASP murin sur billes pVCA-WASP et *Listeria* (Figure 2.7). Ces mutants VASP sont obtenus en modifiant ou en supprimant chacun des sites et sont désignés par la fonction qu'ils ont perdue (voir tableau 2.2).

Mutants VASP.	Fonction perdue.
Δ GAB	Liaison à l'actine-G.
Δ PP	Liaison à la Profiline.
Δ FAB	Liaison à l'actine-F.
Δ FAB/GAB	Liaison à l'actine-G et F.
Δ TET	Tétramérisation.

Tableau 2.2 : Liste des différents mutants VASP.

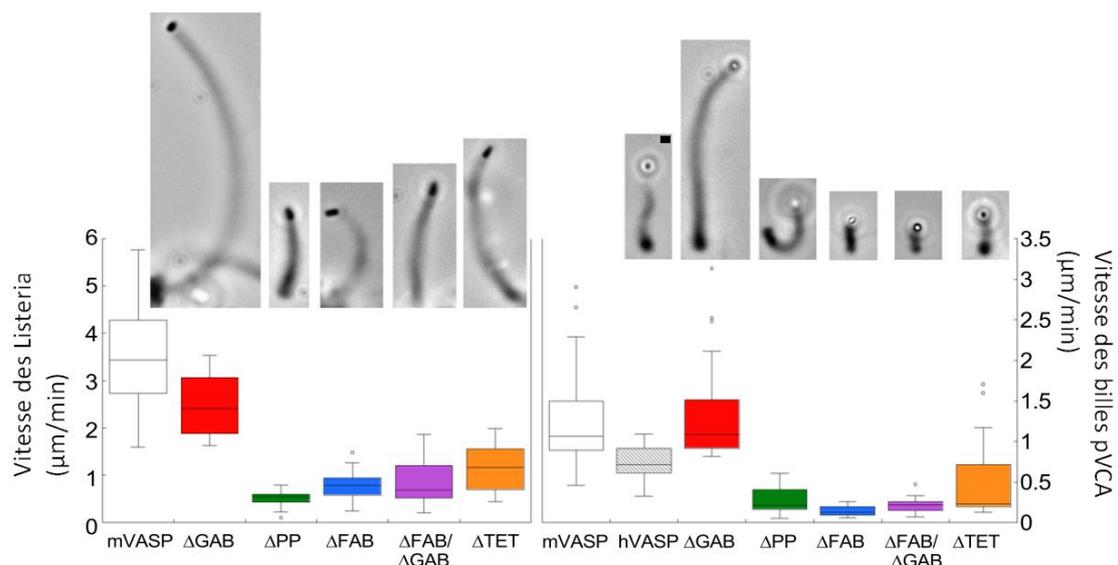


Figure 2.7 : Diagramme en boîte des vitesses de déplacement des *Listeria* (gauche) et des billes pVCA (droite) en présence des différents mutants VASP. Les images en contraste de phase de comètes représentatives sont associées. Pour les *Listeria* et les billes, Δ GAB produit une augmentation de vitesse comparable à VASP sauvage alors que les mutants produisent des vitesses significativement plus basses ($p < 0,0003$). Barre d'échelle 1 μ m.

Les billes ainsi que les *Listeria* présentent les mêmes tendances. Seuls le mutant Δ GAB et la forme humaine de VASP (hVASP) sont capables d'augmenter la vitesse de manière similaire à VASP sauvage. VASP délété des sites de liaison à l'actine-F, à la profiline ainsi que de son site de tetramérisation perd la capacité d'augmenter les vitesses de déplacement des billes pVCA-WASP et des *Listeria*, donnant des vitesses comparables à celles obtenues en absence de VASP ou en présence du mutant Δ EVH1.

Nous avons ensuite voulu ensuite vérifier en microscopie TIRF si une éventuelle augmentation du taux d'élongation des bouts barbés par VASP pourrait être à l'origine de l'augmentation de la vitesse de déplacement des billes et *Listeria*. De précédentes études ont montré que VASP augmente la vitesse d'élongation des filaments d'actine par un mécanisme d'élongation processive (Breitsprecher et al., 2008; Hansen and Mullins, 2010). Dans nos conditions expérimentales, pour des concentrations en sels plus élevées (et plus physiologiques) que celles communément utilisées en TIRF, nous ne constatons pas d'effet de VASP murin sur la vitesse d'élongation des filaments individuels (Tableau 2.3), pas plus que la formation de boucles qui témoigneraient d'une élongation processive des filaments par VASP. Cette processivité pourrait ici être inhibée par la présence à proximité de VASP du complexe Arp2/3.

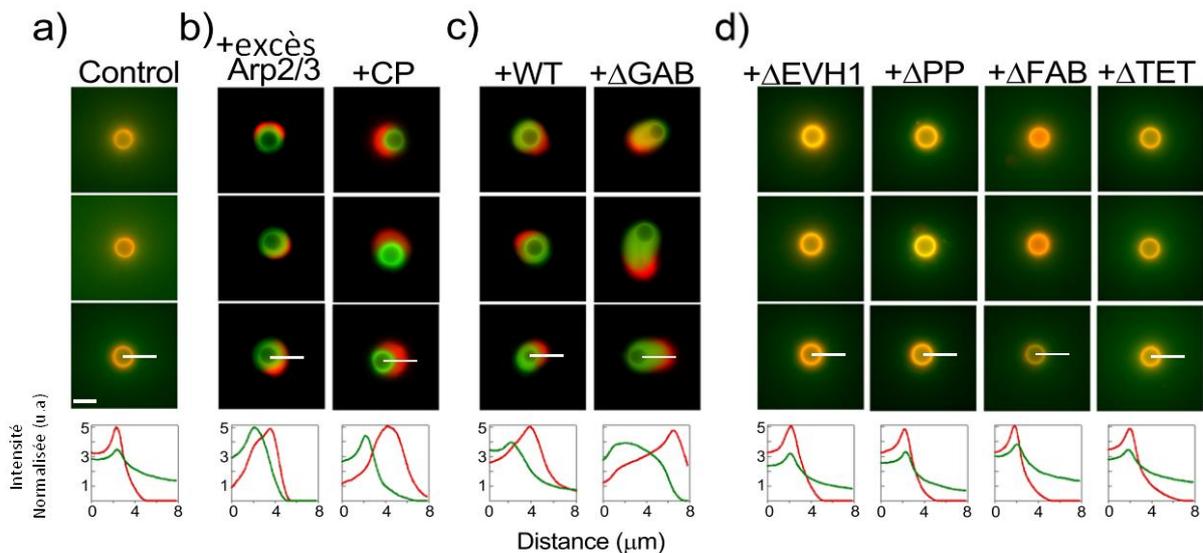
Conditions	Taux d'élongation du bout barbé (sous-unités/sec)
Sans VASP	12,5+/- 3,2
+50nM VASP	12,2+/-2,5 ^c
+50nM Δ FAB	13,9+/-1,6 ^c

Tableau 2.3 : Taux d'élongation des bouts barbés des filaments. Conditions : 30 to 40 nM Arp2/3 ; 1.5 μ M actine-G ; 4,5 μ M profiline ; 1,5 Mg-actine, 50 nM WT-VASP ou Δ FAB ; 0,2 mM DABCO ; 0,2% methylcellulose 1500cPs ; 0,5% BSA ; 2 mM ATP 20 - 50 filaments ont été mesurés pour chaque condition sur 2 à 5 préparations différentes.

2.5 L'effet de VASP ne passe pas uniquement par son activité anti protéine de coiffe.

VASP n'entraînant pas d'augmentation de la vitesse de polymérisation des filaments, nous nous intéressons à son activité anti protéine de coiffe. Nous cherchons à savoir si VASP présente des

effets, indépendamment de la présence des protéines de coiffe, sur les réseaux d'actine poussés à la surface des billes pVCA-WASP. En absence de protéine de coiffe, les réseaux d'actine ne sont pas suffisamment réticulés et denses pour former des gels d'actine qui donneraient naissance à des comètes. Pour visualiser le lieu d'incorporation de l'actine dans les réseaux dynamiques, nous réalisons des expériences de « double couleur » (van der Gucht et al., 2005). Des billes pVCA-WASP mesurant 4,5 μ m de diamètre sont d'abord incubées dans un mix semblable au mix de motilité dépourvu de protéine de coiffe et complété en actine rouge. Après quelques minutes, un excès de ce même mix complété en actine verte est ajouté à la réaction. En absence de protéine de coiffe, la surface des billes est entourée d'actine rouge et des filaments verts s'étendant dans le milieu, indiquant que l'actine s'est incorporée aux bouts barbés qui se sont échappés de la surface (Figure 2.8a). L'addition soit de protéine de coiffe, soit d'un excès de complexe Arp2/3 augmente la polymérisation à la surface des billes, comme l'indique l'insertion d'une couche d'actine verte à la surface des billes, repoussant la couche d'actine rouge vers l'extérieur du (Figure 2.8b). Quand VASP sauvage ou Δ GAB sont ajoutés à la place de la protéine de coiffe ou du complexe Arp2/3, le même phénomène de polymérisation concentrée à la surface est observé (Figure 2.8c), suivi de la formation de comètes d'actine générant du mouvement. L'addition des autres mutants à la réaction, y compris Δ EVH1, ne permet pas de restaurer la polymérisation à la surface des billes (Figure 2.8d).



sauvage, le mutant Δ EVH1 est capable de concentrer la polymérisation de l'actine à la surface de la bille, mimant la présence de protéine de coiffe ou un excès de complexe Arp2/3. En partant de la surface de la bille, les profils de fluorescence montrent que la couleur rouge succède au vert.

Il semble que les formes de VASP capables d'augmenter la vitesse de déplacement des billes et des *Listeria* soient celles capables de favoriser la polymérisation d'actine dirigée vers la surface en absence de protéine de coiffe.

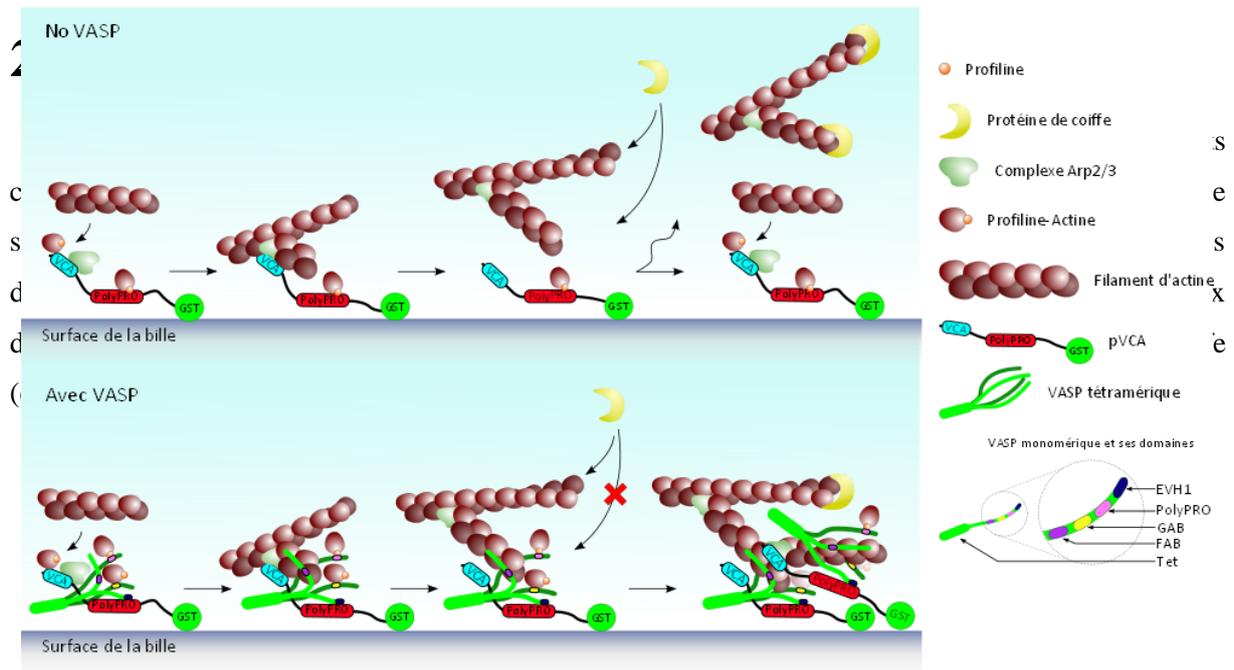


Figure 2.9 : Schéma du modèle de transfert moléculaire de VASP à la surface des billes, en absence (haut) et en présence de VASP (bas). Lorsque le tétramère de VASP est correctement positionné par rapport au complexe Arp2/3, le filament naissant est transféré directement à VASP. Ceci a pour effets de protéger le filament des protéines de coiffe, mais également de le maintenir à la surface de la bille ce qui favoriserait les évènements de branchements. Nous proposons que ce mécanisme s'applique également *in vivo* à la membrane plasmique où WASP et N-WASP recruterait directement VASP pour une protrusion du front de migration maximale. La proximité des VASPs ainsi recrutés par WASP lèverait la nécessité que VASP soit sous forme tétramérique.

Le complexe Arp2/3 est recruté et activé par les activateurs WASPs. Il crée une nouvelle branche sur le côté d'un filament préexistant. Le bout barbé généré est directement transféré à la molécule de VASP qui se tient prête à proximité, mise en place dans la bonne conformation géométrique via son association au domaine polyproline des WASPs. L'association de VASP au filament naissant via ses multiples domaines l'autorise à rester lié aux protéines WASPs, aux côtés des filaments grâce à son domaine FAB et à délivrer des complexes de profiline-actine au bout barbé en croissance. Le site de liaison à l'actine-G apparaît superflu dans nos expériences de motilité. Dans le scénario proposé, en plus d'interférer avec la protéine de coiffe, VASP pourrait maintenir le filament en croissance à la surface de la bille. Ce filament servirait à son tour de noyau de nucléation au complexe Arp2/3 pour générer de nouvelles branches. Ces deux effets augmenteraient la polymérisation dirigée à la surface (comme le montrent les expériences double couleur) ainsi qu'un mouvement plus efficace.

Le fait que VASP potentialise la polymérisation des réseaux d'actine à la surface de bille pourrait expliquer que l'expression des protéines Ena/VASP soit associée à un pronostic défavorable des cancers métastatiques. En effet, Il a été montré que N-WASP est le nucléateur majeur de la polymérisation de l'actine dans les invadopodes : des structures protrusives remplies d'actine qui permettent aux cellules cancéreuses de dégrader la matrice extracellulaire pour rejoindre le système circulatoire et créer des métastases dans d'autres organes (Gligorijevic et al., 2012). Ainsi, le recrutement de VASP par N-WASP pourrait potentialiser la polymérisation de l'actine et favoriser l'invasion.

2.7 Bilan.

A l'origine du projet, nous voulions étudier le rôle du recrutement de VASP sur la vitesse de propulsion des billes recouvertes de VCA et de PRO. L'idée était de découpler le recrutement de VASP de celui du complexe Arp2/3 pour pouvoir modifier ces deux paramètres indépendamment l'un de l'autre. Malgré des temps de brisure raccourcis, VASP n'est jamais parvenu à augmenter la vitesse de propulsion des billes VCA/PRO en extraits reconstitués. Pourtant, l'observation des premiers événements avant brisure de symétrie nous indique clairement que VASP augmente la vitesse de croissance de gels d'actine homogènes autour des billes VCA/PRO. De manière analogue à la *Listeria*, nous montrons pour les activateurs de la famille WASP que VASP doit être recruté conjointement au complexe Arp2/3 par la même molécule (pVCA-N-WASP ou pVCA-WASP) pour augmenter la motilité des billes, indiquant que VASP doit se trouver dans une certaine conformation par rapport à

Arp2/3 pour être efficace sur la propulsion. L'apport des mutants VASP nous montre que le site de liaison à l'actine-G (GAB) n'est pas nécessaire à l'augmentation de la vitesse des billes. En revanche, le domaine EVH1 de VASP responsable de son recrutement par les activateurs WASPs, le site de liaison à l'actine-F (FAB), à la profiline (PP) ainsi que le site de tetramérisation (TET) de VASP sont indispensables à l'activité de la protéine sur le déplacement des billes. Malheureusement, nous ne sommes pas parvenus à reproduire cet effet avec pVCA-WAVE2. Les observations en TIRF montrent que VASP n'augmente pas la vitesse d'élongation des filaments d'actine et excluent par la même occasion l'hypothèse que ce mécanisme soit responsable de l'augmentation de la vitesse des billes. Nous soupçonnons les motifs polyprolines portés par les activateurs WASP/WAVE d'être responsables du recrutement de VASP, mais les expériences de mutation de chacun de ces sites chez pVCA-WASP n'ont pas permis d'en faire ressortir un comme essentiel à l'activité de VASP. Enfin, nous montrons que VASP, en absence de protéine de coiffe, parvient à restaurer la formation d'un gel d'actine et à diriger la polymérisation de l'actine vers la surface, mimant la présence de protéine de coiffe ou un excès de complexe Arp2/3. Comme observé avec les expériences de motilité, Le site de liaison à l'actine-G ne semble pas indispensable à cette activité. Pour tenter de réconcilier ces données, nous proposons un modèle sur le fonctionnement de VASP.

2.8 Conclusions et perspectives.

Les résultats obtenus sur billes semblent indiquer que les mécanismes à l'origine de la pousse des gels d'actine avant brisure de symétrie diffèrent des mécanismes à l'origine de la propulsion des billes par les comètes. En effet, en présence de VASP, vitesse de croissance du gel et vitesse de propulsion des billes sont découplées pour les billes VCA/PRO, pas pour les billes pVCA-WASP ou pVCA-N-WASP. Pour tenter de percer à jour les mécanismes à l'œuvre, il pourrait être envisagé d'étudier et de comparer la structure des filaments d'actine dans le gel et dans la comète en microscopie électronique. Cette question est pertinente puisqu'il est largement admis dans la littérature que VASP favorise la formation de longs filaments non branchés, même dans les comètes. Or, nos expériences dites « double couleurs » semblent montrer un effet inverse, au moins dans le gel d'actine avant brisure de symétrie. Enfin, l'augmentation de la vitesse de propulsion des billes ne semble pas être due à une augmentation de la vitesse d'élongation des filaments d'actine par VASP, mais plutôt à une coopération entre VASP et le complexe Arp2/3 qui favoriserait la nucléation de nouveaux filaments à la surface et entraînerait potentiellement un changement de structure des filaments d'actine dans la comète.

Dans cette étude, nous posons également la question du recrutement de VASP via l'interaction EVH1/LPPPP. Nous avons muté chacune des répétitions polyproline présente en amont de la région VCA de WASP et avons recouvert des billes avec ces mutants. En présence de VASP, nous n'avons

pas constaté de différence significative dans les vitesses de propulsion des billes recouvertes de ces mutants, par rapport aux billes recouvertes par pVCA-WASP sauvage. Nous formulons donc l'hypothèse qu'il n'y a pas une répétition polyproline essentielle au recrutement de VASP mais que les trois répétitions polyprolines portées par pVCA-WASP sont redondantes dans le recrutement de VASP, l'une pouvant compenser la perte de l'autre. Il pourrait également être envisagé que les domaines EVH1 de VASP interagissent avec d'autres motifs que les répétitions polyprolines. Ils seraient alors intéressants de produire des formes double mutantes de pVCA-WASP pour ne laisser intact qu'une répétition polyproline à la fois et étudier ces mutants à l'aide du test de motilité sur bille

Enfin, nous avons voulu tester les effets de VASP sur la famille d'activateurs WAVE. Contrairement aux activateurs de la famille WASP, VASP n'a pas permis d'augmenter la vitesse de propulsion des billes recouvertes par WAVE2. Comme nous l'avons vu dans le chapitre d'introduction de cette thèse, la régulation des protéines WAVEs diffère de la régulation des WASPs et passe par le complexe WAVE. Il n'est donc pas exclue que VASP puisse coopérer avec les protéines WAVEs en via une interaction avec les protéines constitutives du complexe WAVE. Il serait alors intéressant de refaire les expériences de motilité avec les billes pVCA-WAVE2 en présence de complexe WAVE purifié, et de tester l'activité de VASP sur la propulsion de ces billes.

Cette étude éclaircit un peu plus les mécanismes mis en jeu par VASP mais apporte également d'autres questions dont les réponses permettront peut être de mieux comprendre la migration cellulaire.

Article en revue à *Developmental Cell*.

Ena/VASP synergizes with the Arp2/3 complex via a molecular hand-off mechanism during actin-based motility.

Philippe Noguera^{a,b,c}, Svitlana Havrylenko^{a,b,c}, Sandy Swei^d, John Manzi^{a,b,c}, Fahima Faqir^{a,b,c}, Audrey Lamora^{a,b,c}, Christophe Guérin^e, Laurent Kreplak^d, Laurent Blanchoin^e, Julie Plastino^{*a,b,c}

^a Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75248 France

^b Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 168, Paris, F-75248 France

^c Université Pierre et Marie Curie, Paris F-75248, France

^d Department of Physics and Atmospheric Science, Dalhousie University, Halifax, B3H 4R2, Canada

^e Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, France.

Ena/VASP synergizes with the Arp2/3 complex via a molecular hand-off mechanism during actin-based motility.

Philippe Noguera^{a,b,c}, Svitlana Havrylenko^{a,b,c}, Sandy Sueid, John Manzia^{b,c}, Fahima Faqira^{b,c}, Audrey Lamora^{a,b,c}, Christophe Guérine, Laurent Kreplak^d, Laurent Blanchoine, Julie Plastino^{*a,b,c}

a Institut Curie, Centre de Recherche, Paris, F-75248 France

b Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 168, Paris, F-75248 France

c Université Pierre et Marie Curie, Paris F-75248, France

d Department of Physics and Atmospheric Science, Dalhousie University, Halifax, B3H 4R2, Canada

e Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant (iRTSV), CNRS/CEA/INRA/UJF, Grenoble, 38054, France.

corresponding author julie.plastino@curie.fr **ABSTRACT:*

To investigate how actin is assembled for cell migration, we study an *in vivo* model for a lamellipodial type of cell motility: migration of the epidermal cells on the surface of the embryo during the ventral enclosure event of *Caenorhabditis elegans* embryogenesis. Enclosure is governed by the Arp2/3 complex and its activator, WAVE, a related protein, WASP, and Ena/VASP protein. Here we show that VASP's capacity to bind F-actin and profilin is key for its function in ventral enclosure. We use an *in vitro* motility assay to dissect the mechanism of action of VASP, and discover that VASP is recruited directly by Arp2/3 complex activators to potentiate actin assembly. Our data is consistent with a molecular "hand-off" mechanism whereby the Arp2/3 complex activator positions Ena/VASP so that the nascent barbed end issuing from the Arp2/3 complex branch is passed directly to Ena/VASP for protection against capping protein and retention at the surface, thus increasing the growth of the actin network and enhancing cell motility.

INTRODUCTION:

Ventral enclosure during *Caenorhabditis elegans* morphogenesis involves the formation of actin-filled protrusions by the ventral epidermal cells and their migration to the ventral midline of the embryo to seal the epithelial monolayer (Williams-Masson et al., 1997). Enclosure is a genetically and visually accessible model of 2D cell motility in completely native conditions. It is also an ideal system for studying actin assembly since the Arp2/3 complex activators WAVE and WASP as well as VASP (WVE-1, WSP-1 and UNC-34, respectively, in *C. elegans* notation) have been shown to have interdependent roles in this process. Ventral enclosure absolutely requires WAVE; upon its removal, enclosure fails due to the lack of migration of the epidermal cells, giving a lethal Gex (gut on the exterior) phenotype (Patel et al., 2008). On the other hand, enclosure proceeds almost normally in the absence of either WASP or VASP, but when both are removed, enclosure fails giving the same phenotype as when WAVE is absent (Withee et al., 2004). A possible interpretation of these results is that WAVE and WASP play overlapping roles for actin polymerization nucleation during ventral enclosure, with WAVE being the principal actor, but not sufficient without enhancement by VASP. Indeed *in vitro* WAVE is known to be less effective than WASP at activating the Arp2/3 complex (Zalevsky et al., 2001).

Going beyond ventral enclosure, Ena/VASP proteins are important players in actin dynamics and cell motility in many different motile cell types, and the various members of the family (Ena, VASP and EVL) are part of the invasive signature of human cancers, including breast and lung, as well as being associated with other pathologies (Dertsiz et al., 2005; Hu et al., 2008; Philippar et al., 2008; Pula and Krause, 2008; Trichet et al., 2008). In cells in culture, VASP proteins increase leading edge protrusion (Bear et al., 2002; Lacayo et al., 2007; Rottner et al., 1999). However unlike other major players in motility, Ena/VASP proteins are not actin polymerization nucleators at physiological salt concentrations, but instead have been reported to have anti-capping and/or barbed end elongation enhancement activity (Barzik et al., 2005; Breitsprecher et al., 2008; Breitsprecher et al., 2011; Hansen and Mullins, 2010). It is important to understand how these activities complement the activity of *bona fide* actin polymerization nucleators found at the leading edge of moving cells, such as the Arp2/3 complex, however few studies have addressed this question. In this context it is interesting to note that two Arp2/3 complex activators are known to bind VASP for motility enhancement: the ActA protein from the *Listeria* bacteria via its FPPPP-type repeats, and

human WASP via its proline-rich central domain, which includes three LPPPP sequences (Castellano et al., 2001; Lin et al., 2010; Niebuhr et al., 1997).

Here the different functional parts of VASP, including the N-terminal EVH1 domain that binds the FPPPP-type repeats, the central proline-rich domain that binds profilin, and the C-terminal EVH2 domain that harbors G and F-actin binding sites and a tetramerization domain (Krause et al., 2003) (Figure 1a), are removed one by one to observe the effect on the motility of epidermal cells during ventral enclosure. An *in vitro* motility system is then used to dissect the molecular mechanism behind these results: VASP is recruited to the surface of beads that simultaneously activate the Arp2/3 complex and reproduce actin-based motility in an appropriate protein mixture. By measuring bead speeds, we evaluate which VASP mutants enhance motility and how VASP enhancement depends on the nature of the Arp2/3 complex activator. To test the hypothesis that motility efficiency could be determined by the stiffness of the actin network, we probe its mechanical properties via an atomic force microscopy (AFM) nano-indentation technique in the presence of different forms of VASP.

RESULTS:

The effect of VASP on cell motility in vivo

In order to visualize actin assembly during ventral enclosure in the living *C. elegans* embryo, we produced transgenic worms expressing Lifeact-GFP under an epidermal specific promoter. We observed the presence of fan-shaped, dynamic F-actin structures at the leading edge of the moving sheet of epidermal cells, highly reminiscent of lamellipodia observed in migrating cells in culture (Figure 1b and Supplementary Video S1). We then set out to test VASP's role in forming these cellular protrusions. Into a VASP null background, we introduced extrachromosomal arrays containing GFP-tagged *C. elegans* VASP constructs schematized in Figure 1a with mouse VASP shown for comparison. EVH1-VASP served as a negative control, lacking all VASP functional domains for interaction with actin while Δ PP-VASP, Δ FAB-VASP and Δ TET-VASP lacked individual functional domains. Spinning disc fluorescent microscopy showed that all constructs were correctly expressed and localized at cell-cell borders and cell leading edges during enclosure (Figure 1c). The constructs Δ TET-VASP and EVH1-VASP displayed additional cytoplasmic staining and EVH1 also was present in the nucleus as previously observed in fibroblasts for EVH1-EGFP of Mena (Bear et al., 2000; Sheffield et al., 2007). Each transgenic line was then subjected to RNAi against VASP, conditions where embryos die if they don't have active VASP. Embryonic lethality of 50-70% was observed in the worms carrying Δ PP-VASP and Δ FAB-VASP. This level was comparable to what was observed for worms carrying the negative control construct EVH1-VASP (Figure 1d). Lethality was associated with a Gex (gut on the exterior) phenotype, and although the embryo was disorganized due to enclosure failure, Δ FAB-VASP protein was still correctly localized to the cell-cell junctions of epidermal cells at the sides of the embryo (Figure 1e). On the other hand, worms carrying Δ TET-VASP showed a level of mortality (20%) comparable to that observed for the positive control (WT-VASP). We concluded that the necessary domains for VASP function *in vivo* were the F-actin and profilin-binding domains, while the tetramerization domain appeared to be dispensable.

Ena/VASP increases motility, but only when bound directly to the Arp2/3 complex activator

In order to understand more about VASP domain requirements in Arp2/3 complex-powered lamellipodia formation, we turned to an *in vitro* bead system. To mimic the

lamellipodia leading edge on a bead surface, activated Arp2/3 complex and VASP were recruited to the bead surface separately as is believed to occur *in vivo*, where the Arp2/3 complex is recruited and activated at the plasma membrane by WASP/WAVE proteins, while VASP is targeted via proteins such as lamellipodin. We therefore coated beads with a mixture of the VCA portion of human N-WASP, which recruits and activates the Arp2/3 complex for actin filament nucleation and branching, and the FPPPP repeat domain (called “PRO”) of the ActA protein from *Listeria* to recruit VASP. See Supplementary Table S1 for amino acid sequences of these and subsequent constructs. We incubated the beads in a reconstituted motility mix containing the Arp2/3 complex, capping protein and an excess of profilin over G-actin (Achard et al., 2010). This mix mimics the high concentration of monomeric actin in cellular cytosol and also minimizes F-actin formation in the bulk solution, targeting actin assembly to the bead surface. Adding mouse VASP to the motility mix did not affect the speed of VCA/PRO-coated beads, whereas it drastically increased the motility of the bacteria *Listeria* as a positive control (Figure 2a).

We sought an explanation as to why VASP was functional on *Listeria* but not on VCA/PRO beads, and reasoned that VASP needed to be recruited by the Arp2/3 complex activator in order to affect motility. To test this possibility, we coated beads with pVCA from WASP, comprising the proline-rich, LPPPP repeat region, reported to bind VASP, in addition to the VCA domain. These beads showed a significant increase in speed when VASP was added to the motility mix (Figure 2b). Addition of Δ EVH1-VASP, a mutant VASP unable to bind WASP, but retaining all other domains associated with actin binding, had no effect on speed. All together these results indicated that VASP was efficient to increase speed only when it was targeted to the bead surface and only when it was recruited by the same molecule that activated the Arp2/3 complex.

The activity of WASP family but not WAVE family proteins is potentiated by VASP

Since lamellipodia formation and ventral enclosure are principally dependent on WAVE activity, we wanted to see if the potentiation observed with pVCA-WASP was generalizable to the WASP/WAVE superfamily of Arp2/3 activators. We performed tests with the pVCA domain of human WAVE-2 and pVCA of rat N-WASP, a longer fragment than that used above in the VCA/PRO experiments (Supplementary Table S1). These constructs contain an LPPPP motif and a YPPPP sequence, respectively, also shown to be permissive for VASP binding (Niebuhr et al., 1997). As for WASP, pVCA-N-WASP coated beads displayed a speed increase in the presence of VASP compared to Δ EVH1-VASP or no

addition, whereas pVCA-WAVE-2 coated beads were insensitive to VASP addition (Figure 2c).

C. elegans WAVE contains one putative VASP-binding LPPPP motif, so we mutated the leucine to alanine, since APPPP motifs do not recruit Ena/VASP proteins (Niebuhr et al., 1997), and reintroduced this WAVE mutant into the WAVE-null background in *C. elegans* worms. This mutant was completely competent for restoring correct ventral enclosure. The *in vivo* and *in vitro* studies together suggest that VASP does not interact directly with WAVE's LPPPP motif for enhanced motility. WASP family and WAVE/Scar family proteins must therefore recruit VASP differently for motility optimization.

pVCA-WASP contains three LPPPP repeats in its proline-rich domain: L159, L313 and L381. To understand more about how VASP is recruited by WASP, we performed point mutations of each of the leucine residues into alanine. The pVCA-WASP mutants were absorbed onto bead surfaces and comet tail growth was observed in the presence of VASP protein. Comet tail lengths observed for the mutants after 5 minutes of growth showed no significant differences with respect to WT, indicating that, for all three mutants, VASP was correctly targeted to the bead surface and enhancing speed (Figure 2d). This indicated that either the LPPPP sites were redundant for VASP recruitment or that the VASP binding site was a non-classical one that did not involve FPPPP-type repeats.

Potentiation of Arp2/3 complex-based motility is dependent on tetrameric VASP's binding to F-actin and profilin but not to G-actin

Returning to our original question concerning which domains of VASP were necessary for enhancing motility, we applied different forms of mouse VASP to pVCA-WASP coated beads. Mouse VASP has a similar domain structure as *C. elegans* VASP with the addition of a G-actin binding site, GAB (Figure 1a). We removed or mutated each of these domains and observed the effect of the mutant VASPs on both *Listeria* and pVCA-WASP bead motility. *Listeria* and beads showed the same trend, with only Δ GAB-VASP giving speeds comparable to the addition of WT-VASP (Figure 3a). Human VASP was also competent for increasing the speed of pVCA-WASP coated beads. With abrogation of either profilin or F-actin binding, or deletion of the tetramerization domain, mouse VASP lost the ability to enhance motility, giving speeds that were similar to those for no addition or for addition of Δ EVH1-VASP (Figure 2b). As for ventral enclosure, the necessary domains for VASP function *in vitro* appear to be the F-actin and profilin-binding domains. Unlike for enclosure, the tetramerization domain appears to be indispensable.

In order to test whether barbed end elongation enhancement was the origin of enhanced motility *in vivo* and *in vitro* with VASP, we measured filament elongation under the same conditions as for bead motility using a TIRF assay. We found that mouse VASP had no effect on barbed end elongation of individual filaments so barbed end elongation enhancement could not explain increased bead motility (Table 1).

Increased bead speed is not due to comet stiffening

Another possible explanation for speed enhancement via VASP could be increased rigidity of the actin network, making the comets more efficient at bead propulsion and the veil of actin at the leading edge of epidermal cells more robust. In order to test this hypothesis, we measured the elastic moduli of actin comets via AFM nano-indentation experiments in the presence of WT-VASP, Δ EVH1-VASP and Δ FAB-VASP. Comets grown in the presence of WT-VASP and Δ EVH1-VASP had a comparable elasticity of 1.5 – 2 kPa in contrast with the different speeds observed with these two forms of VASP, suggesting that increased comet elasticity was not the origin of increased motility (Figure 3b). The similarity of WT-VASP and Δ EVH1-VASP further indicated that VASP was decorating the comet independently of surface recruitment. On the other hand, comets formed in the presence of VASP lacking the F-actin binding domain were significantly softer than those formed in the presence of WT-VASP and Δ EVH1-VASP, as expected if increased stiffness was due to comet crosslinking principally via the F-actin binding domain of VASP.

VASP effect is not only via anti-capping activity

Since we had eliminated barbed end elongation enhancement and comet elasticity as mechanisms behind VASP's ability to increase bead speed, the remaining explanation was that VASP increased motility solely via its anti-capping activity. To investigate this possibility, we first wanted to see if VASP had any effects that were independent of capping protein. In the absence of capping protein, comets did not form, so we performed 2-color assays on 4.5 μ m diameter beads, where polymerization was started in red actin and then green actin was flushed in. These kinds of experiments allowed us to pin-point where actin polymerization was occurring in a growing network (van der Gucht et al., 2005). Without capping protein, pVCA-WASP coated beads displayed red actin at the bead surface and green filaments extending into the solution indicating that new actin was polymerizing on barbed ends that had escaped from the surface (Figure 4a). Addition of either capping protein or an

excess of the Arp2/3 complex enhanced polymerization near the surface, as evidenced by the insertion of a green layer of actin at the surface of the bead, displacing the red actin layer toward the exterior of the network, (Figure 4b). When WT-VASP or Δ GAB-VASP were added instead of capping protein or excess Arp2/3 complex, the same phenomenon of polymerization at the surface was observed (Figure 4c), and sometimes even comet formation and movement (Supplementary Video S2). Addition of the other mutants to the reaction, including Δ EVH1-VASP, did not restore polymerization at the surface (Figure 4d). Overall it appeared that the VASP forms that increased bead, *Listeria* and ventral cell migration were those that were capable of favoring surface-directed polymerization in the absence of capping protein.

DISCUSSION:

VASP's ability to bind F-actin and profilin is necessary for both enhanced bead motility and for correct lamellipodial-type motility of epidermal cells during the ventral enclosure event of *C. elegans* embryogenesis. *In vivo* VASP is functional in its monomeric form as evidenced by the fact that Δ TET-VASP transgene restores correct enclosure to the level of reintroduced wild-type protein, while on beads, Δ TET-VASP does not promote efficient motility. A possibility *in vivo* is that VASP is more clustered at the cell membrane as compared to the bead surface, putting VASP monomers in close proximity and allowing them to work together as if they were tetramers.

Furthermore, our results with VCA/PRO-coated beads versus pVCA-WASP-coated beads show that VASP may be enriched at a surface, but will not be functional for actin polymerization enhancement until correctly bound by an Arp2/3 complex activator. Lamellipodial actin structures depend principally on the presence of WAVE-2 for Arp2/3 complex activation (Sarmiento et al., 2008), but our *in vitro* results and our *in vivo* experiments with *C. elegans* WAVE show that VASP does not interact directly with the polyproline part of WAVE, despite the presence of an FPPPP-type repeat such as those of ActA that recruit VASP (Niebuhr et al., 1997). A possibility is that, since WAVE protein exists in a complex with several other proteins (Stradal and Scita, 2006)), one of the components of the complex recruits VASP in the correct geometry for enhanced actin polymerization. On the other hand, ActA (*Listeria*), WASP and N-WASP all show speed enhancement with VASP. For WASP, mutation of each of the three LPPPP motifs separately did not diminish the effect of VASP on bead velocity. It could be that the sites are redundant or that the VASP binding site is a non-classical one that does not involve FPPPP-type repeats, such as the Mena-binding site of the tumor suppressor Tes protein (Boëda et al., 2007).

Previous studies found that VASP enhances barbed end polymerization via a processive elongation mechanism, which is why it was expected that simple surface recruitment of VASP would enhance Arp2/3 complex-based motility (Breitsprecher et al., 2008; Hansen and Mullins, 2010). Under our conditions, with a higher salt concentration than is normally used for TIRF assays, VASP shows no detectable barbed end elongation enhancement, nor do we observe by TIRF microscopy the buckling filaments that would indicate processive filament elongation. This may be because the presence of the Arp2/3 complex next to the VASP molecule somehow inhibits VASP processivity. Therefore although VASP processive elongation may be important for the formation of structures such

as filopodia that are devoid of the Arp2/3 complex, for lamellipodia dynamics, it is important to consider the role of VASP in the context of the Arp2/3 complex-formed actin network.

We propose a mechanism to bring our results together, the key features being 1) the necessity of having VASP recruited next to the Arp2/3 complex in a precise geometry 2) the dependence on the FAB, PP, and TET domain for VASP enhancement of motility and 3) the fact that VASP exercises an activity that goes beyond anti-capping activity as shown in the two-color experiments. We suggest a molecular hand-off mechanism, like racers passing a baton in a relay race (Figure 5): the Arp2/3 complex creates a new branch on the side of an existing filament and this barbed end is “handed off” directly to a molecule of VASP, poised by its association with the FPPPP-type repeats of WASP or N-WASP or with one of the WAVE complex subunits to be in the correct position. VASP’s association with the nascent filament via its multiple domains allows it to remain bound to the WASP/N-WASP molecule or to the WAVE complex at the same time that it binds the side of the filament and perhaps delivers profilin-actin to the growing barbed end. The G-actin binding site of VASP is superfluous in our bead motility assay and is not present in *C. elegans* VASP. In the scenario shown in Figure 5, VASP may not only interfere with capping protein but also hold growing filaments at the bead surface where they can act as primers for further Arp2/3 branching events. Both effects will give enhanced surface-directed polymerization (as seen in the two-color experiments) and more efficient movement.

Assembly dynamics are indeed the determinant in this system and not mechanical effects: our AFM measurements are consistent with an effect of cross-linking the comet via VASP’s F-actin binding capacity, without a correlation to speed of movement. Mechanics and function of the actin cytoskeleton are undoubtedly linked in certain cellular contexts and the link has been shown on actin comets (Lecuit et al., 2011; Paluch et al., 2006), however in the case of VASP, bead speed and presumably epidermal cell migration, are controlled by assembly dynamics and not by mechanical properties of the actin network.

The fact that VASP can increase the polymerization capacity of N-WASP coated beads may explain the association of Ena/VASP expression with a bad prognostic in metastatic cancers. N-WASP has been shown to be the major actin polymerization nucleator for the formation of invadopodia, protrusive actin structures that allow cancer cells to breach extracellular matrix barriers, invade the circulatory system and create metastases (Gligorijevic et al., 2012). VASP recruitment by N-WASP may potentiate actin polymerization for more effective invasion.

EXPERIMENTAL PROCEDURES:

Worm strains and handling

Worms were maintained and handled using standard techniques. The VASP-null strain *unc-34(gm104)* was isolated from PE159 strain [*unc-34(gm104) hmp-1(fe4)/mIs10 V*] (a gift of Jonathon Pettitt, University of Aberdeen, UK). OX308 strain carrying *wve-1(ne350)* I/hT2[bli-4(e937) let-?(q782) qIs48](I;III) was a gift of Martha Soto (Rutgers University, USA).

Constructions

The pAW5 plasmid, carrying nucleotide sequences for *C. elegans lin-26* promoter, *unc-34* cDNA (VASP) and *unc-54* 3'UTR, was a gift of Jonathon Pettitt (University of Aberdeen, UK) (Sheffield et al., 2007). Domain boundaries for *C. elegans* VASP (UNC-34) were predicted by alignment with human and mouse VASP. Constructs coding for Δ PP-VASP (lacking residues from 196 to 256), Δ FAB-VASP (lacking residues from 302 to 319), Δ TET-VASP (lacking residues from 415 to 467) mutants of VASP or its EVH1 domain (first 195 residues only) were prepared by Splicing by Overlapping Extension PCR followed by digestion/ligation into KasI-BstZ17I fragment of pAW5. A list of the primer sequences used to generate the SOEed amplicons is available on request. The *wve-1* rescuing fragment was prepared as described previously (Patel et al., 2008). Briefly, the *wve-1* gene was amplified from genomic DNA using attB-tailed oligonucleotides

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGAAAAGTGTGAGAAAGT
and

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGAAAATTGAAGTTTTTCCTACA,

and recombined with pDONR201 via Gateway BP reaction (Invitrogen). The leucin 319 to alanine mutant was prepared by SOEing mutagenesis using

5'-TCGATTGATGATGATGATGATGATGCTCCACCACCACCACCACC and

5'-GGTGGTGGTGGTGGTGGAGCATCATCATCATCATCAATCGA primers
(flanking oligonucleotide sequences available upon request) and religation after XbaI/PstI double digestion into pDONR201.

The sequence for Lifeact and linker was taken as in (Riedl et al., 2008), but with *C. elegans* codon usage, and was used to amplify GFP from the vector pID3.01B (gift of Geraldine Seydoux, Johns Hopkins University, USA) with attB-tailed oligonucleotides

(sequences available upon request). The product was recombined into pDONR221 and then fused with *lin-26* promoter sequence (from pAW5) and the *unc-54* 3'UTR (gift of Geraldine Seydoux, Addgene plasmid #17253: pCM5.37) in the destination vector pCFJ210 (gift of Erik Jorgensen Addgene plasmid #30538) using the Multisite Gateway System (Invitrogen).

pVCA of human WASP (AA 150-502) was equipped with an N-terminal GST tag by inserting it between the BamHI and NotI sites of pGEX-4T1 (GE Healthcare). A C-terminal 8xHIS tag was added before the stop codon. Site-directed mutagenesis was done to replace leucine 159, 313 and 381 with alanine (numbering according to full-length human WASP), using 10 ng of double-stranded template and the following oligonucleotide pairs:

L159A 5'-GGAGACAGACGCCAGGCACCCCCACCACCAACA/

5'-TGTTGGTGGTGGGGGTGCCTGGCGTCTGTCTCC;

L313A 5'-GAGGCGCCAGGAGCCAGCACCGCCGCCCCACCGC/

5'-GCGGTGGGGGCGGCGGTGCTGGCTCCTGGCGCCTC;

L381A 5'-GACGTTCTGGACCAGCGCCCCCTCCACCCCC/

5'-GGGGGTGGAGGGGGCGCTGGTCCAGAACGTC. DMSO was added at 1% to the PCR reactions, annealing was performed at 55°C and extension was performed using PfuTurbo DNA polymerase (Agilent). The product was treated with DpnI (New England Biolabs) for 3 hours at 37°C to digest the parental DNA template.

The pVCA construct of rat N-WASP (a.k.a. Δ EVH1-N-WASP, AA 151-501) was equipped with an N-terminal 6xHIS tag-TEV cleavage site-HA tag and was provided by Jack Taunton (University of California at San Francisco, USA). Human WAVE-2 cDNA was a gift of Alexis Gautreau (LEBS, France). The pVCA domain of WAVE-2 (AA 195-498) was equipped with an N-terminal GST tag by cloning it into the pGEX6P vector (Invitrogen) between the BamHI and NotI sites. The human VASP gene was purchased from ImaGenes/Source BioScience, I.M.A.G.E. clone 824217 (Berlin, Germany), and was inserted into the pFastBac HTB vector (Invitrogen) between the BamHI and NotI sites thus equipping the protein with an N-terminal HIS tag and a TEV cleavage site. All mouse VASP constructs were from Dorothy Schafer (University of Virginia, USA) and carried an N-terminal 6xHIS tag (Barzik et al., 2005).

Protein purification

VCA of human N-WASP, Arp2/3 complex and rabbit muscle actin were purchased from Cytoskeleton. Mouse α 1 β 2 capping protein was a gift of Dorothy Schafer and was purified as in (Palmgren et al., 2001). The PRO domain of ActA was purified as previously

described (Golsteyn et al., 1997). Profilin and labeled actin for TIRF microscopy were prepared as in (Achard et al., 2010).

The pVCA-WASP protein and leucine to alanine mutants were expressed in Rosetta 2(DE3) pLysS (Novagen) overnight at 20°C with 1 mM IPTG. Cells were lysed in 20mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 1mM DTT supplemented with complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche) then purified using Glutathione sepharose (GE Healthcare). Proteins were eluted with 20mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 25mM reduced glutathione and then supplemented to 40 mM imidazole. Proteins were then bound to Ni sepharose High performance column (GE Healthcare) and eluted in 20mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 300 mM Imidazole. Proteins were further purified over the Superdex 200 10/300GL column (GE Healthcare) in 20mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT. Pure protein was dialyzed into 20mM Tris pH 8.0, 200 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 1mM DTT, 5% Glycerol and stored at -80°C.

The pVCA-N-WASP construct was transformed into Rosetta 2(DE3) pLysS (Novagen) and expressed overnight at 30°C with 1 mM IPTG. Cells were lysed in 20 mM Hepes-KOH pH 7.4, 200 mM NaCl, 20 mM Imidazole supplemented with complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), centrifuged at 20,000xg and supernatants bound to Ni²⁺ column. Protein was eluted in TEV Cleavage buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM Imidazole) and 6xHis tag cleaved with 300U TEV (Invitrogen) overnight at 4°C. Protein was then loaded onto the MonoQ 5/50 GL Column (GE Healthcare) equilibrated in 20 mM Hepes-KOH, pH 7.4 and eluted over a 10mL Gradient from 0 to 1 M NaCl. dEVH1-N-WASP was further purified using the Superdex 200 10/300GL Column (GE Healthcare) in 20 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 100 mM NaCl, and stored at -80°C in the same buffer.

Human VASP was expressed in SF9 cells using Bac-to-Bac Baculovirus Expression System (Invitrogen, Life Technologies), and purified as previously described (Laurent et al., 1999). After the TALON metal affinity chromatography, hVASP was further purified on the Superdex 200 10/300GL column (GE Healthcare) in 20 mM Hepes-NaOH pH 7.4, 30 mM NaCl, 1 mM DTT. Mouse VASP protein and mutants were expressed in E.Coli strain Rosetta™ 2(DE3) pLysS (Novagen) and purified as previously described (Barzik et al., 2005). Proteins were further purified on the FPLC using the Superdex 200 10/300GL column (GE Healthcare).

C. elegans transgenesis and imaging

To create *wve-1* transgenics, *wve-1(ne350) I/hT2[bli-4(e937) let-?(q782) qIs48](I;III)* heterozygous animals were injected with DNA coding for either wild-type or the mutant Leu319 to Ala versions of *wve-1* and the injection marker pRF4 (Mello et al., 1991). Non-injected homozygous *wve-1* animals show Egl (egg-laying defective) and Mel (maternal embryonic lethal) phenotypes. Homozygous *wve-1* animals from established transgenic lines, identified as GFP(-) rollers, were assayed for rescue of these phenotypes. Both wild-type and L->A mutant of *wve-1* effectively restored laying of eggs (brood size 278±19 for WT vs. 278±53 for mutant WAVE transgenic animals) and reverted embryonic lethality of their progeny (65.4% vs. 75.6% eggs hatched for WT and mutant respectively). Assay was done in triplicate, and a total of 12 animals per strain were assayed.

To create VASP transgenic animals, *unc-34(gm104)* hermaphrodites were injected with pAW5 (coding for WT-VASP) or derived plasmids (coding for ΔPP-VASP, ΔFAB-VASP, ΔTET-VASP or EVH1 domain) along with pCFJ90 (Pmyo-2::mCherry) and pRF4 injection markers. For imaging VASP mutant localization during ventral enclosure, embryos were extruded from transgenic adults by cutting them in a drop of M9 solution, and mounted on a 2% agarose pad. Image acquisition was performed at 22°C. Spinning disk confocal fluorescent images were acquired at a Nikon Eclipse TE2000-E microscope equipped with an oil immersion objective 100x 1.40A, a piezo stage (Nanoscan Prior), a Yokogawa CSU22 confocal head, a HQ2 CCD camera (Roper Scientific), and a 491-nm diode laser controlled by MetaMorph software 7.5 (Molecular Devices). Z stacks were acquired with 0.5 μm distance between planes (40 planes per stack). Paired DIC/fluorescence images were taken on an IX70 Olympus 100x 1.35NA objective (Olympus) equipped with a Mercury Arc lamp and recorded with a charge-coupled device camera (Roper Scientific) driven by MetaMorph software.

Lifeact-GFP animals were generated by microparticle bombardment (BioRad) as described previously (Praitis et al., 2001), giving strain JUP30 (*unc-119(ed3); lin-26::lifeact::gfp::unc54 3'UTR*). For time-lapse imaging of Lifeact-GFP during ventral enclosure, z stacks were acquired at 1 min interval on the spinning disc described above.

C. elegans RNAi and analysis

Standard RNAi feeding techniques were used (Kamath and Ahringer, 2003). To create *wsp-1* RNAi feeding vector, a full-length *wsp-1a* cDNA was PCR amplified from yk184g1 cDNA clone (gift of Yuji Kohara) using 5'-GGGCCATGGATGTCGGTATATCCTCCCACGCCGAC and

5'-GGGCTCGAGCTAATCTGACCATTCATTTTTGTCA oligonucleotides and cloned into XhoI-NcoI sites of L4440 plasmid. The resulting plasmid was transformed into HT115 cells. *C. elegans* animals were synchronized by hypochlorite treatment. Feeding was carried out at 20°C. A triplicate of Pmyo-2::mCherry(+) embryos issued from of 10 to 20 Pmyo-2::mCherry(+) adult hermaphrodites per condition were assayed for ability to complete embryonic development. Embryos unable to hatch 36h post-laying were scored as dead. In case of transgenic lines, only mCherry(+) progeny was taken into account.

Bead and Listeria preparation

Carboxylated polystyrene beads of both 0.5 and 4.5 µm diameter (Polysciences) were coated in Xb [10 mM Hepes (pH 7.5), 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, and 0.1 mM CaCl₂] with mixtures of VCA (4.5 µM) and PRO (0.36 µM) or pVCA (4.5 µM) for 20 minutes in a thermomixer (Eppendorf) at 18°C, 900rpm. The amount of beads in 40 µl of protein solution was adjusted to a total surface area of 1.5-3 cm². After coating, the bead surface was blocked by adding Bovin Serum Albumin (BSA) at a final concentration 1% for 5 minutes. The beads were centrifuged, resuspended and stored on ice for a day in 40 µl Xb/1%BSA.

Listeria monocytogenes strain L028actA::Tn917 (pactA3) (collection name BUG666) overexpressing ActA (Kocks et al., 1992) was a gift of Edith Gouin and Pascale Cossart (Pasteur Institute, France). Before each experiment, frozen bacteria were streaked on a Luria Broth/Chloramphenicol (10 µg/ml) agar plate and incubated overnight at 37°C. One colony was resuspended in 40µl of Xb and kept at room temperature for use during one day.

Motility assay

The motility medium contained 115 nM Arp2/3 complex, 250 nM VASP or mutant VASP, 50 nM capping protein, 12 µM profilin, 1.8 mM ATP, 0.5% BSA. Proteins were diluted in Xb and KCl concentration adjusted to 75mM. 0.2µl of coated beads or *Listeria* were added to the mix prior to the addition of 4-6 µM G-actin (final concentration) in a total volume of 4.2 µL. The sample was mixed gently with a pipette and placed between a glass slide and coverslip (18 × 18 mm) sealed with Vaseline/lanolin/paraffin (1:1:1). All statistical tests for significance were performed with a Students t-test.

Two-color assay

The inversion medium contained 20 nM Arp2/3 complex, 50 nM VASP or mutant VASP, 12 µM profilin, 1.8 mM ATP, 0.5% BSA. Proteins were diluted in Xb and KCl

concentration was adjusted to 75 mM. Beads were added prior to the addition of 5 μ M G-actin (final concentration), 10% labeled with Alexa fluor 594 (red) (Invitrogen). The sample was incubated for 5 minutes at room temperature before adding three times the volume of the same motility medium complemented with 5 μ M G-actin, 10% labeled with Alexa fluor 488 (green) (Invitrogen). The sample was mounted as described above.

TIRF assay

The TIRF medium contained 30 to 40 nM Arp2/3 complex, 1.5 μ M G-actin, 4.5 μ M profilin, 1.5 μ M Mg-actin, 50 nM WT-VASP or Δ FAB, 0.2 mM DABCO, 0.2% methylcellulose 1500cPs, 0.5% BSA, 2 mM ATP, sometimes with a glucose oxidase/catalase oxygen scrubbing mixture as described in (Achard et al., 2010). (No difference was observed.) Proteins were diluted in Xb and KCl concentration adjusted between to 75mM. The sample was injected in between glass slide and coverslip separated by 2 double-sided tape spacers to be observed right away at room temperature.

Observation and data processing

Phase contrast (for motility assay) and epifluorescence (for inversion assay) microscopy was performed on an Olympus BX51 upright microscope with a \times 100 oil-immersion objective and CoolSnap fx CCD camera (Photometrics). Imaging was done using MetaMorph software (Universal Imaging). Bead and *Listeria* velocities were calculated by measuring the incremental length difference over 5 minute intervals or by calculating the difference between the actin comet mean length of two bead populations imaged 5 minutes apart. The length measurements were performed using ImageJ software. Fluorescence images acquired in red and green were combined using MetaMorph (Universal Imaging). TIRF microscopy was performed on an Eclipse Ti Inverted Microscope (NIKON) with a \times 100 oil-immersion objective and a Quantum 512SC camera (Photometrics). Actin filament lengths were measured over time with Metamorph software.

AFM nano-indentation

AFM nano-indentation was carried out using a BioScope Catalyst (Bruker) mounted on an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX71). Comets were prepared as described above, then supplemented with 10 μ M phalloidin for stabilization and left to settle onto the surface of a glass bottom petri-dish (Electron Microscopy Services) prior to force measurement. Nano-indentation and imaging was carried out in liquid using MSNL

cantilevers (Bruker) with a spring constant between 0.02 and 0.03 N/m. Each cantilever was first calibrated in air to obtain the spring constant and immersed into fresh XB to obtain the sensitivity on a clean glass. Comets immersed in XB-phalloidin were located with the tip by epifluorescence imaging with a 10X objective using a Leica camera (DFC310FX) and Leica application suite v3. The identified comets were indented with a maximum load of 0.3 to 0.6nN using the force-volume mode as described previously (Suei et al., 2012; Suei et al., 2011). 30 indentation points (on average) were collected on each individual comet.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank Jean-Louis Bessereau for use of the worm injection set-up. We thank Dorothy Schafer and Kevin Carvalho for discussions and Cécile Sykes for discussions and reading of the manuscript. This work was funded by a Human Frontiers Science Program Organization grant to J.P. and L.K.

FIGURE LEGENDS:

Figure 1 Noguera et al.

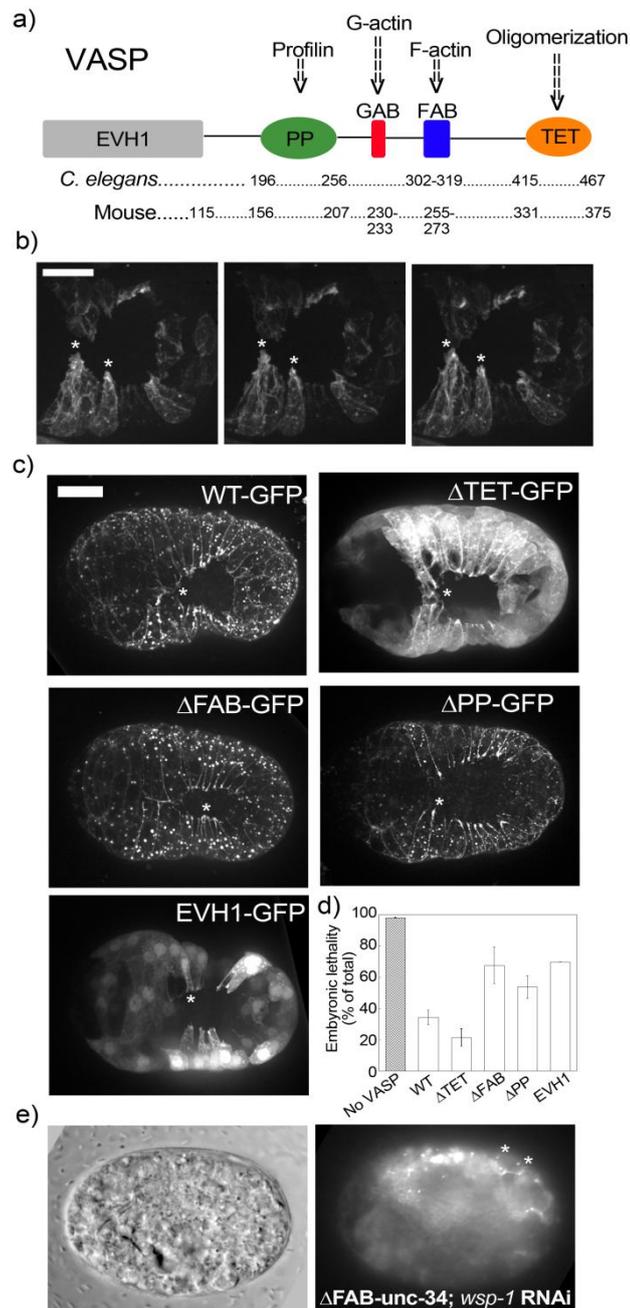


Figure 1: VASP's F-actin and profilin binding activities are important for ventral enclosure during *C. elegans* development. a) Scheme of general VASP domain organization and binding sites and amino acid numbering for *C. elegans* VASP (UNC-34) and mouse VASP. *C. elegans* VASP has no G-actin binding site. b) Lifeact-GFP expressed in epidermal cells labels protrusive lamellipodia-like structures (marked with asterix) at the cell leading edges in successive frames (1 minute intervals). The embryo is tilted and starting to

involute so some of the cells are slightly out of plane and appear less bright. See also Supp. Video S1. Z stack projection over several microns. Spinning disc fluorescent microscopy. c) Against a VASP null mutant background, different forms of *C. elegans* VASP-GFP were introduced as extrachromosomal arrays with expression driven by the epidermal *lin-26* promoter. All mutants and re-introduced wild type protein were correctly localized at cell-cell borders and towards the leading edge of moving cells during ventral enclosure (marked by *). Some mosaicism is evident for EVH1-GFP as black gaps in the epidermal cells. Z stack projection over several microns. Spinning disc fluorescent microscopy. d) Embryonic lethality count (% of total embryos) upon RNAi against WASP in the transgenic worms shown in c). The “no VASP” control is the non-transformed VASP-null animal and almost 100% of the embryos die upon RNAi knockdown of WASP. Re-introduction of WT-VASP or Δ TET-VASP saves the lethal phenotype, giving about 20-30% mortality. For Δ FAB-VASP and Δ PP-VASP, mortality is over 50% and comparable to the introduction of just the EVH1 domain of VASP. Average of two experiments. Error bars are standard deviation. e) Mortality in the presence of Δ FAB-VASP, Δ PP-VASP and EVH1-VASP is due to a ventral enclosure failure, giving an extruded gut phenotype, as evident by DIC microscopy, left, and epifluorescence microscopy, right, for a Δ FAB-VASP embryo. Some cell-cell borders labeled with Δ FAB-VASP are still evident in the Gex embryo (marked with *). Bars 10 μ m.

Figure 2 Noguera et al.

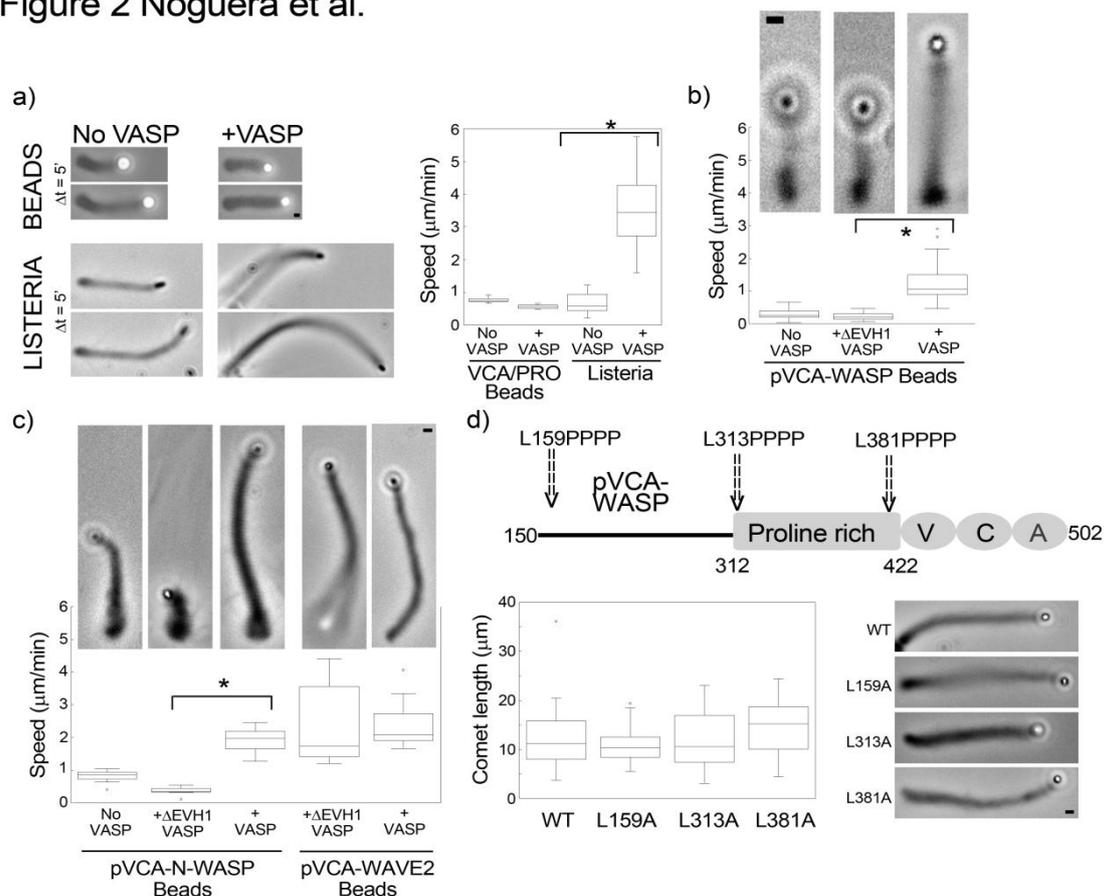


Figure 2: VASP enhances motility when recruited by the same molecule as the Arp2/3 complex. a) Beads coated with a mix of VCA and PRO (recruiting VASP and the Arp2/3 complex separately) and *Listeria* bacteria (recruiting VASP and Arp2/3 complex together via the ActA molecule) with and without VASP added in the motility mix. Left: pictures of representative comets taken at 5 minute intervals. Comets appear as a darker streak behind the beads, which appear white, or the bacteria, which are black oblongs. Right: box plots of speeds of bead and *Listeria* displacement. VASP significantly enhances ($p < 0.0001$) *Listeria* movement. b) Box-plots of displacement speeds and images for beads coated with pVCA-WASP. Adding Δ EVH1-VASP (not targeted to the bead surface) has no effect on bead displacement. In comparison, WT-VASP significantly increases speed ($p < 0.0001$). (Beads that are slightly out of the plane of the comet appear black.) c) Box-plots of displacement speeds and images for beads coated with pVCA-N-WASP and pVCA-WAVE-2. WT-VASP significantly increases speed for pVCA-N-WASP-coated beads ($p < 0.0001$), whereas for pVCA-WAVE-2-coated beads, there is no difference between VASP and Δ EVH1-VASP addition. d) Cartoon of pVCA-WASP with the three possible VASP binding sites (LPPPP),

and below, beads coated with the different mutants and compared to WT-pVCA-WASP: box-plots of comet lengths measured after 5 minutes. Representative comets for each condition are shown on the right. All mutants resemble WT in length and appearance. Phase contrast microscopy. Bars 1 μm .

Figure 3 Noguera et al.

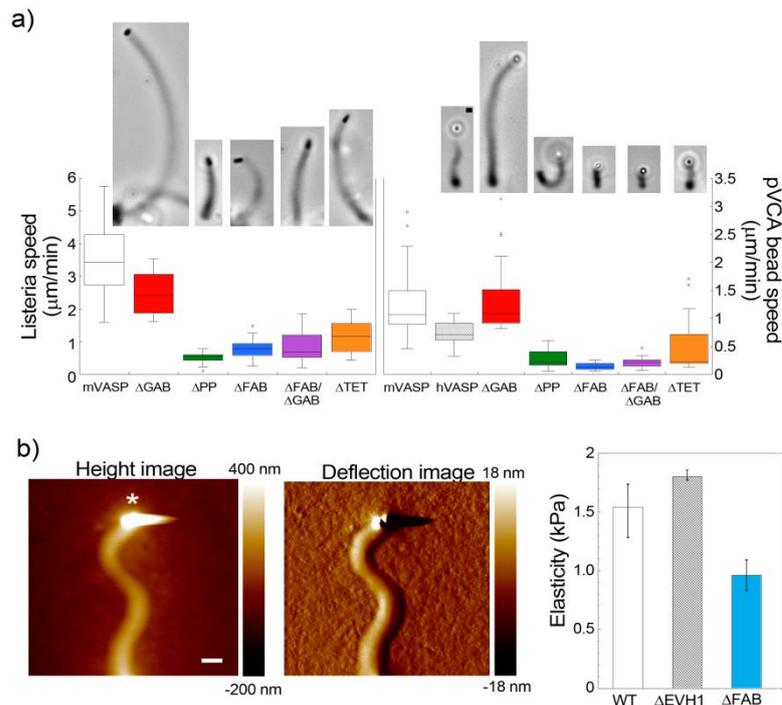


Figure 3: VASP tetramer increases bead and *Listeria* speed, dependent on F-actin and profilin binding capacity, but speed is not correlated with comet rigidity. a) *Listeria* (left) and bead (right) displacement speeds are shown with mouse WT-VASP for comparison (unfilled box-plot, same data as in Figure 2a and b). The box-plots are color-coded to match the domains represented in the cartoon of Figure 1a. Images of representative comets for each condition are shown above the corresponding speed measurement. For both beads and *Listeria*, ΔGAB -VASP gave speeds comparable to the addition of WT-VASP, whereas all the other mutants gave speeds significantly lower ($p < 0.0003$). Phase contrast microscopy. Bar 1 μm . b) AFM nano-indentation measurement of comet elasticity. Left: the height map and the deflection error image of a comet growing on a pVCA-WASP-coated bead (marked with *) in the presence of ΔEVH1 -VASP, scanned at a force of 0.9 nN. Right: Summary plot of average comet elasticities (2-3 comets per condition). Error bars represent the range. By a one-way

ANOVA with Tukey HSD for comparison of multiple samples, WT and Δ EVH1 are not significantly different, while both are significantly different from Δ FAB ($p < 0.03$). Bar 3 μ m.

Figure 4 Noguera et al.

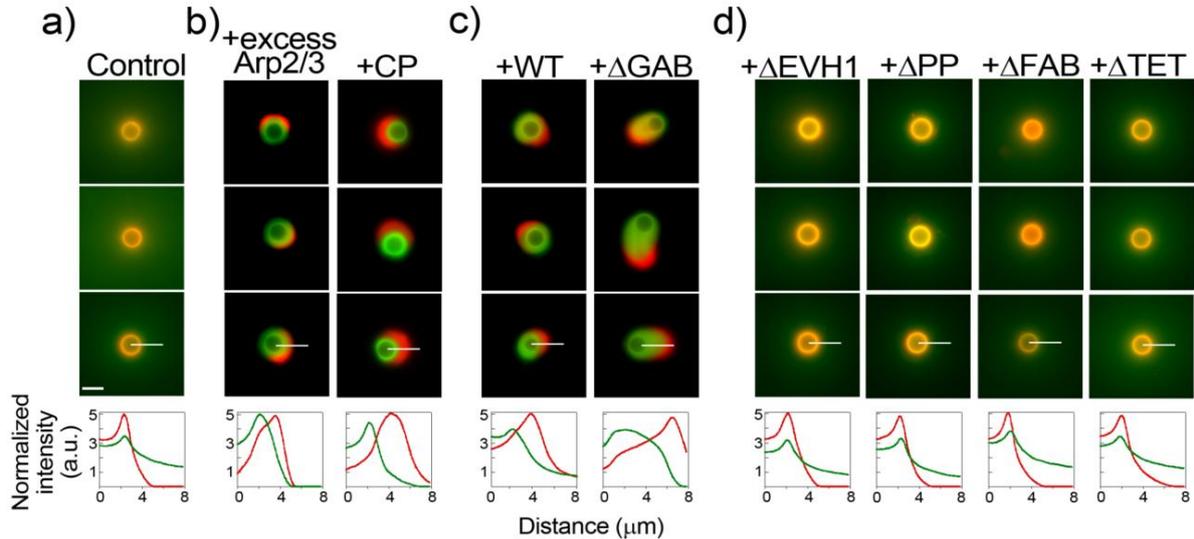


Figure 4: VASP exercises an effect on network growth via the Arp2/3 complex independent of capping protein. 4.5 μ m beads were coated with pVCA-WASP and incubated in the motility mix without capping protein (except when indicated otherwise), first in a mix containing red fluorescent actin, then in a mix containing green fluorescent actin. Representative beads are shown for each condition with a linescan underneath the bottom image. The line on the image indicates where the 8 μ m linescan was taken. a) Control conditions without addition of VASP. A diffuse green network surrounds the red bead surface, as also indicated by the tailing green curve in the linescan. b) Positive control: addition of an excess of the Arp2/3 complex (1.2 μ M) or capping protein (20 nM) redirects assembly towards the surface, as illustrated by the linescan that shows the green fluorescence at the surface and the red curve shifted toward the exterior. c) The same result is achieved by the addition of WT-VASP or Δ GAB-VASP. d) The other VASP mutants look like the control, and the linescans are almost superimposable. Epifluorescence microscopy. Bar 5 μ m.

Figure 5 Noguera et al.

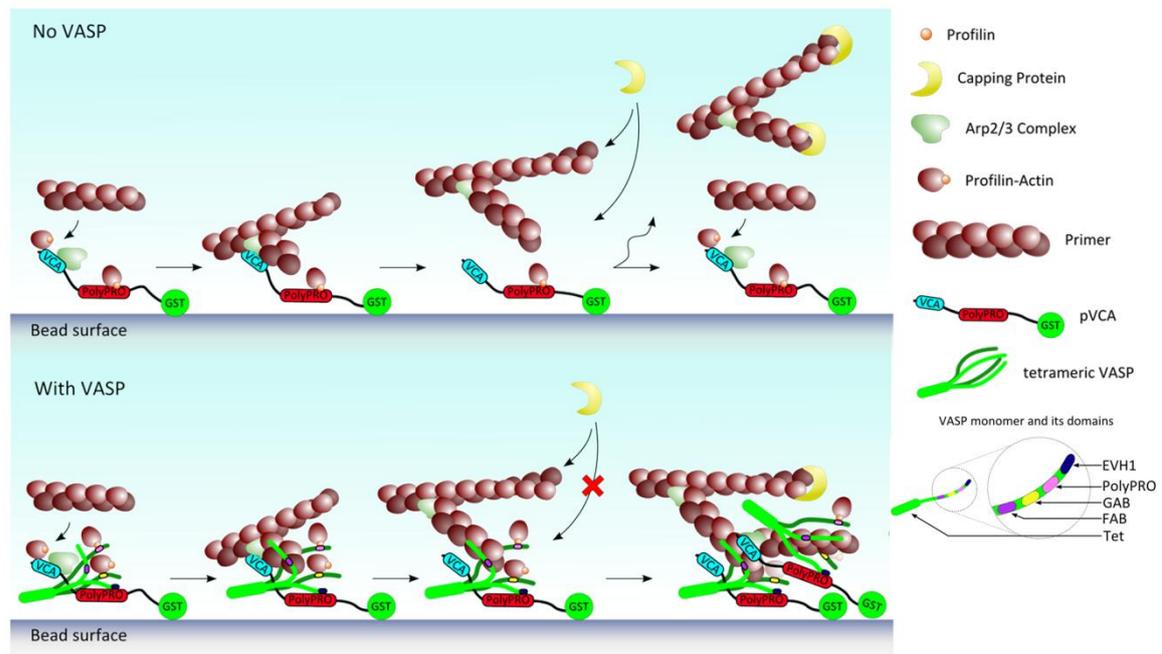


Figure 5: Molecular hand-off mechanism of VASP action. When the VASP tetramer is correctly positioned in relation to the Arp2/3 complex, the nascent filament is handed off directly to VASP, which not only protects the filament from capping, but also keeps the filament at the bead surface for subsequent branching events. For simplicity, only the case for pVCA-WASP on bead surfaces is represented, but we suggest that this mechanism also applies *in vivo* at the plasma membrane where WASP and N-WASP would recruit VASP directly and WAVE indirectly for maximal leading edge protrusion. Close proximity of VASP molecules recruited to WASP or to the WAVE complex could remove the need for tetrameric VASP protein.

TABLES:

Table 1. Barbed end elongation speeds.

	Barbed end elongation (subunits/sec)^{a,b}
No addition	12.5 +/- 3.2
+ 50 nM VASP	12.2 +/- 2.5^c
+ 50 nM ΔFAB	13.9 +/- 1.6^c

^a 1.5 μ M actin, 4.5 μ M profilin, 75 mM KCl, 50 nM VASP or Δ FAB

^b Values are +/- S.D., 20-50 filaments measured for each condition, 2-5 different preparations.

One μ m was taken to be equal to 370 subunits of actin.

^c Not significantly different from the no addition control ($p > 0.01$)

VCA of human N-WASP	MSSVQQQPPP PRRVTNVGSL LLTPQENESL FTFLGKKCVT MSSAVVQLYA ADRNCMWSKK CSGVACLVKD NPQRSHFLRI FDIKDGKLLW EQELYNNFVY NSPRGYFHTF AGDTCQVALN FANEEEAKKF RKAVTDLGR RQRKSEKRRD PPNGNLPMMA TVDIKNPEIT TNRFYGPQVN NISHTKEKKK GKAKKRLTK GDIGTPSNFQ HIGHVGDWPN TGSDLNNDLP ELKNLDFMCG ILEAQLKERE TLKVIYDFIE KTGGEAVKVN ELRRQAPPPP PPSRGGPPPP PPPPHSSGPP PPPARGGAP PPPPSRAPTA APPPPPSRP SVEVPPPPPN RMYPPPPAL PSSAPSGPPP PPPSVLGVGP VAPPPPPPPP PPGPPPPPG LPSDGDHQVP TTAGNKAALL DQIREGAQLK KVEQNSRPVS CSGRDALLDQ IRQGIQLKSV ADGQESTPPT PAPTSGIVGA LMEVMQKRKSK AIHSSDEDED EDDEEDPEDD DEWED
pVCA of rat N-WASP	MSSGQQPPRR VTNVGSLLLT PQENESLFSF LGKKCVTMSS AVVQLYAADR NCMWSKKCSG VACLVKDNPQ RSYFLRIFDI KDGKLLWEQE LYNNFVYNSP RGYFHTFAGD TCQVALNFAN EEEAKKFRKA VTDLLGRRQR KSEKRRDAPN GPNLPMATVD IKNPEITTR FYSSQVNNIS HTKEKKKGA KKKRLTKADI GTPSNFQHIG HVGWDPTGF DLNNDLPELK NLFDMCGISE AQLKDRETSK VIYDFIEKTG GVEAVKNELR RQAPPPPPPS RGGPPPPPPP PHSSGPPPPP ARGRGAPPPP PSRAPTAAPP PPPPSRPGVV VPPPPNRMYP PPPPALPSS APSGPPPPPP LSMAGSTAPP PPPPPPPPG PPPPPGLPSD GDHQVPASSG NKAALLDQIR EGAQLKKEVQ NSRPVCSGR DALLDQIRQG IQLKSVSDGQ ESTPPTPAPT SGIVGALMEV MQKRKSAIHS SDEDEDDDE EDQDDDEWE D
PRO of ActA from Listeria	MGLNRFMRAM MVVFITANCI TINPDIIFAA TSEDSSLNT DEWEEKTEE QPSEVNTGPR YETAREVSSR DIKELEKSNK VRNTNKADLI AMLKEKAEKG PNINNNNSEQ TENAAINEEA SGADRPAIQV ERRHGPLPSD SAAEIKRRK AIASSDSELE SLTYPDKPTK VNKKKVAKES VADASEDDL SSMQSADESS PQPLKANQQP FFPKVFKKIK DAGKWVRDKI DENPEVKKAI VDKSAGLIDQ LLTKKKSEEV NASPPPPPT DEELRLALPE TPMLLGFNAP ATSEPPSPFF PPPTDEELR LALPETPMLL GFNAPATSEP SSFFPPPPPT EDELEI IRET ASSLDSSTPR GDLASLRNAI NRHSQNSDF PPIPTHEELN GRGGRPTSEE PSSLNSGDPT DDENSETTEE EIDRLADLRD RGTGKHSRNA GFLPLNPFAS SPVPSLSPKV SKISAPALIS DITKTPFKN PSQPLNVFNK KTTTKTVTK PTPVKTAPKL AELPATKPQE TVLRENKTPF IEKQAE TNKQ SINMPSLPVI QKEATESDKE EMKPQTEEM VEESESANNA NGKNRSAGIE EGKLIKASAE DEKAKEEPPGN HTLILAMLA IGVPFSLGAFI KIIQLRKNN
PRO of ActA from Listeria	MGLNRFMRAM MVVFITANCI TINPDIIFAA TSEDSSLNT DEWEEKTEE QPSEVNTGPR YETAREVSSR DIKELEKSNK VRNTNKADLI AMLKEKAEKG PNINNNNSEQ TENAAINEEA SGADRPAIQV ERRHGPLPSD SAAEIKRRK AIASSDSELE SLTYPDKPTK VNKKKVAKES VADASEDDL SSMQSADESS PQPLKANQQP FFPKVFKKIK DAGKWVRDKI DENPEVKKAI VDKSAGLIDQ LLTKKKSEEV NASPPPPPT DEELRLALPE TPMLLGFNAP ATSEPPSPFF PPPTDEELR LALPETPMLL GFNAPATSEP SSFFPPPPPT EDELEI IRET ASSLDSSTPR GDLASLRNAI NRHSQNSDF PPIPTHEELN GRGGRPTSEE PSSLNSGDPT DDENSETTEE EIDRLADLRD RGTGKHSRNA GFLPLNPFAS SPVPSLSPKV SKISAPALIS DITKTPFKN PSQPLNVFNK KTTTKTVTK PTPVKTAPKL AELPATKPQE TVLRENKTPF IEKQAE TNKQ SINMPSLPVI QKEATESDKE EMKPQTEEM VEESESANNA NGKNRSAGIE EGKLIKASAE DEKAKEEPPGN HTLILAMLA IGVPFSLGAFI KIIQLRKNN
pVCA of human WASP	MSSGGPMGGRP GGRGAPAVQQ NIPSTLLQDH ENQRLFEMLG RKCLTLATAV VQYLALPPG AEHWTKHECG AVCFVKDNPQ KSYFIRLYGL QAGRLLEWEQE LYSQLVYSTP TPFHTFAGD DCQAGLNFAD EDEAQAQFRAL VQEKIQKRNQ RQSGDRRQLP PPPTPANEER RGGPLPLPLH PGGDQGGPPV GPLSLGLATV DIQNPDITSS RYRGLPAPGP SPADKRRSGK KIKSKADIGA PSGFKHVSHV GWDPQNGFDV NNLDLDRSL FSRAGISEAQ LTDAETSKLI YDFIEDQGG EAVRQEMRRQ EPLPPPPPPP RGGNQLPRPP IVGNGKGRSG PLPPVPLGIA PPPPTPRGPP PPGRGGPPPP PPPATGRSGP LPPPPPGAGG PMPPPPPPP PPPSSGNGP APPPLPALV PAGGLAPGGG RGALLDQIRQ GIQLNKTPGA PESSALQPPP QSSEGLV GAL MHVMQKRSRA IHSSDEGEDQ AGDEDEDEW DD
pVCA human WAVE-2	MPLVTRNIEP RHLCRQTLPS VRSELECVTN ITLANVIRQL GSLSKYAEDI FGELFTQANT FASRVSSLAE RVDRLQVKVT QLDPKKEEVS LQGINTRKAF RSSTIQDQKL FDRNSLPVPV LETYNTCDTP PPLNNTLYR DDGKEALKFY TDPSYFFDLW KEKMLQDTKD IMKEKRKHK EKKDNPNRGN VNPRKIKTRK EEWEKMKMGQ EFVESKEKLG TSGYPPTLVY QNGSIGCVEN VDASSYPPPP QSDSASSPSP SFSEDLNLP PP AEFSYVDN QRSGLAGPK RSVVSPSH PPAPPLGSP GPKPGFAPP APPPPPPPMI GIPPPPPVVG FGSPTGTPPP SPPSFPHPD FAAPPPPPP PAADYPTLPP PPLSQPTGGA PPPPPPPPP GPPPPPTGA DGQPAIDPPL SDTTKPKSSL PAVSDARS DL LS AIRQGFQL RRVEEQREQE KRDVVGNDVA TILSRRIAVE YSDEDDSS FEDEDDSD
<i>C. elegans</i> WAVE	MPLTKRAVSP VNLSRGTIPS TIHRDELQCT ANGTIANLVR QLSSLSKHAE NIFGEIYHDA MIINHNSNTL QQRIDRLHKK VEDLDSNSDQ ATLNEANMRK AFKSSMLVDQ HILDRSTLPT ALTEIYAKCD PPPDLALNP YRDSEIPALS LYTNPSFFFD LWKKTLEKVE AERPRRVKSP NDGSKSPKKR RKQPQGQPLG TTAYNDMQHR NRQISGRIN QQNEVFSFPE EYQAPQALGL QLNFKNQHPN NMVAPIGMTM HHHPPQNVHP SQQRGGAPAA ARGSPNVKRP TEAPPVNL HLPPPDMSIL SIDDDDDLP PPPPPLMNT SIHQPLPAEA PSTIQFVEPS AAPPTNIPP PPPPPPMVIS SAAASFAAPA PKPSADGEAA GTNSPVAPKQ PDARSDDLAA IQSGIKLKKV QRAEAEAAEN AALEANNVAA ILKRRMDQVM GNDDSSSEEG ADDDEWDD

Supplementary Table S1: Amino acid sequences of all Arp2/3 activators mentioned in the article. The full sequence is shown with the domain of interest highlighted in green. Potential VASP-binding FPPPP-like repeats are highlighted in yellow.

SUPPLEMENTARY VIDEO LEGENDS

Supplementary Video S1: Spinning disc confocal microscopy of epidermal cells expressing Lifeact-GFP during ventral enclosure filmed over about 20 minutes. Movie accelerated 160x. Still images are shown in Figure 1.

Supplementary Video S2: 4.5 μm diameter bead coated with pVCA-WASP incubated in a motility mix without capping protein but supplemented with 50 nM VASP, filmed over 30 minutes. Movie accelerated 300x.

REFERENCES:

- Achard, V., Martiel, J.-L., Michelot, A., Guérin, 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.
- Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP Proteins Enhance Actin Polymerization in the Presence of Barbed End Capping Proteins. *J Biol Chem* 280, 28653-28662.
- Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fässler, R., Wehland, J., and Gertler, F.B. (2000). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101, 717-728.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521.
- Boëda, B., Briggs, D.C., Higgins, T., Garvalov, B.K., Fadden, A.J., McDonald, N.Q., and Way, M. (2007). Tes, a specific Mena interacting partner, breaks the rules for EVH1 binding. *Mol Cell* 28, 1071-1082.
- Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., Linkner, J., Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J* 27, 2943-2954.
- Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., Linkner, J., Vinzenz, M., Stradal, T., Small, J.V., Curth, U., Dickinson, R.B., and Faix, J. (2011). Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J* 30, 456-467.
- Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M.-F., and Chavrier, P. (2001). A WASP-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J* 20, 5603-5614.
- Dertsiz, L., Ozbilim, G., Kayisli, Y., Gokhan, G.A., Demircan, A., and Kayisli, U.A. (2005). Differential expression of VASP in normal lung tissue and lung adenocarcinomas. *Thorax* 60, 576-581.
- Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Yamaguchi, H., Wang, Y., Roussos, E.T., and Condeelis, J.S. (2012). N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci* 125, 724-734.
- Golsteyn, R.M., Beckerle, M.C., Koay, T., and Friederich, E. (1997). Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Sci* 110, 1893-1906.

- Hansen, S.D., and Mullins, R.D. (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J Cell Biol* 191, 571-584.
- Hu, L.-D., Zou, H.-F., Zhan, S.-X., and Cao, K.-M. (2008). EVL (Ena/VASP-like) expression is up-regulated in human breast cancer and its relative expression level is correlated with clinical stages. *Oncol Rep* 19, 1015-1020.
- Kamath, R.S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30, 313-321.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 541-564.
- Lacayo, C.I., Pincus, Z., VanDuijn, M.M., Wilson, C.A., Fletcher, D.A., Gertler, F.B., Mogilner, A., and Theriot, J.A. (2007). Emergence of large-scale cell morphology and movement from local actin filament growth dynamics. *PLOS Biol* 5, 2035-2052.
- Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., Gröbe, L., Jockusch, B.M., Wehland, J., Gertler, F.B., and Carlier, M.-F. (1999). Role of proteins of the Ena-VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144, 1245-1258.
- Lecuit, T., Lenne, P.-F., and Munro, E. (2011). Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27, 157-184.
- Lin, W.-H., Nelson, S.E., Hollingsworth, R.J., and Chung, C.Y. (2010). Functional roles of VASP phosphorylation in the regulation of chemotaxis and osmotic stress response. *Cytoskeleton* 67, 259-271.
- Mello, C.C., Kramer, J.M., Stinchcomb, D., and Ambros, V. (1991). Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J* 10, 3959-3970.
- Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J* 16, 5433-5444.
- Palmgren, S., Ojala, P.J., Wear, M.A., Cooper, J.A., and Lappalainen, P. (2001). Interactions with PIP₂, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin. *J Cell Biol* 155, 251-260.
- Paluch, E., van der Gucht, J., Joanny, J.-F., and Sykes, C. (2006). Deformations in actin comets from rocketing beads. *Biophys J* 91, 3113-3122.
- Patel, F.B., Bernadskaya, Y.Y., Chen, E., Jobanputra, A., Pooladi, Z., Freeman, K.L., Gally, C., Mohler, W.A., and Soto, M.C. (2008). The WAVE/SCAR complex promotes polarized

cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis. *Developmental Biology* 324, 297-309.

Philippar, U., Roussos, E.T., Oser, M., Yamaguchi, H., Kim, H.-D., Giampieri, S., Wang, Y., Goswami, S., Wyckoff, J.B., Lauffenburger, D.A., et al. (2008). A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. *Dev Cell* 15, 813-828.

Praitis, V., Casey, E., Collar, D., and Austin, J. (2001). Creation of low-copy integrated transgenic lines in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 157, 1217-1226.

Pula, G., and Krause, M. (2008). Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease. *Handb Exp Pharmacol* 186, 39-65.

Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., et al. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5, 605.

Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1, 321-322.

Sarmiento, C., Wang, W., Dovas, A., Yamaguchi, H., Sidani, M., El-Sibai, M., DesMarais, V., Holman, H.A., Kitchen, S., Backer, J.M., et al. (2008). WASP family members and formin proteins coordinate regulation of cell protrusions in carcinoma cells. *J Cell Biol* 180, 1245-1260.

Sheffield, M., Loveless, T., Hardin, J., and Pettitt, J. (2007). *C. elegans* enabled exhibits novel interactions with N-WASP, Abl and cell-cell junctions. *Curr Biol* 17, 1791-1796.

Stradal, T.E., and Scita, G. (2006). Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18, 4-10.

Trichet, L., Sykes, C., and Plastino, J. (2008). Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J Cell Biol* 181, 19-25.

van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., and Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102, 7847-7852.

Williams-Masson, E.M., Malik, A.N., and Hardin, J. (1997). An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development* 124, 2889-2901.

Withee, J., Galligan, B., Hawkins, N., and Garriga, G. (2004). *Caenorhabditis elegans* WASP and Ena/VASP proteins play compensatory roles in morphogenesis and neuronal cell migration. *Genetics* 167, 1165-1176.

Zalevsky, J., Lempert, L., Kranitz, H., and Mullins, R.D. (2001). Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr Biol* 11, 1903-1913.

Chapitre 3

Etude rhéologique du rôle de VASP dans la mécanique des réseaux d'actine.

En réponse à des contraintes imposées par son environnement, la cellule est capable de modifier les propriétés mécaniques de son cytosquelette d'actine, adaptant ainsi sa morphologie et son comportement migratoire (Stricker et al., 2010; Lecuit et al., 2011). Dans le chapitre précédent, nous avons montré que VASP joue un rôle dans la dynamique de polymérisation de l'actine. Dans ce chapitre de thèse, nous voulons étudier si VASP affecte également les propriétés mécaniques des réseaux d'actine. Dans la cellule, VASP est en effet enrichi au niveau de structures connues pour répondre à des contraintes mécaniques comme le lamellipode, les filopodes les points focaux d'adhésion ou encore les fibres de stress (Rottner et al., 1999; Yoshigi et al., 2005; Chan and Odde, 2008; Smith et al., 2010). De plus, VASP s'organise en un long tétramère flexible ou chaque sous-unité à la capacité de lier l'actine F (Bachmann et al., 1999; Hüttelmaier et al., 1999; Schirenbeck et al., 2006; Breitsprecher et al., 2008), faisant de cette protéine un potentiel réticulant des réseaux d'actine. Pour savoir si VASP affecte les propriétés mécaniques des réseaux d'actine par son activité de réticulation, nous avons fait des mesures de rhéologie en cisaillement des réseaux d'actine en présence de différentes concentrations en VASP.

3.1 Brève introduction à la rhéologie.

La rhéologie constitue une branche de la physique qui étudie la déformation et l'écoulement de la matière molle comme les polymères et des liquides sous l'effet d'une contrainte appliquée. Elle permet de caractériser le comportement élastique, visqueux (et parfois plastique) par une combinaison des lois de l'élasticité et de la mécanique des fluides newtoniens. L'élasticité traduit la capacité du matériau à conserver et restituer l'énergie en retrouvant sa forme après application d'une contrainte et renseigne sur sa rigidité. La viscosité traduit la capacité du matériau à dissiper l'énergie, par exemple par écoulement et frottement entre les polymères du réseau enchevêtré qui le composent. Un matériau viscoélastique se comporte en combinant ces deux propriétés. C'est le cas des polymères et des

réseaux d'actine. La rhéologie permet ainsi d'établir des prévisions sur le comportement d'un matériau en relation avec sa microstructure définie par la taille et l'architecture des polymères ou particules qui le composent.

Dans cette étude, l'application des contraintes au matériau (exemple : le réseau d'actine réticulé en solution) se fait à l'aide d'un rhéomètre (Figure 3.1a). Le rhéomètre est un appareil qui applique un mouvement de cisaillement à l'échantillon par rotation. Le plateau **inférieur** thermo régulé est fixé au stator, et le plateau supérieur fixé au rotor tourne ou oscille à faible distance. L'échantillon remplit le volume de mesure (figure 3.1b).

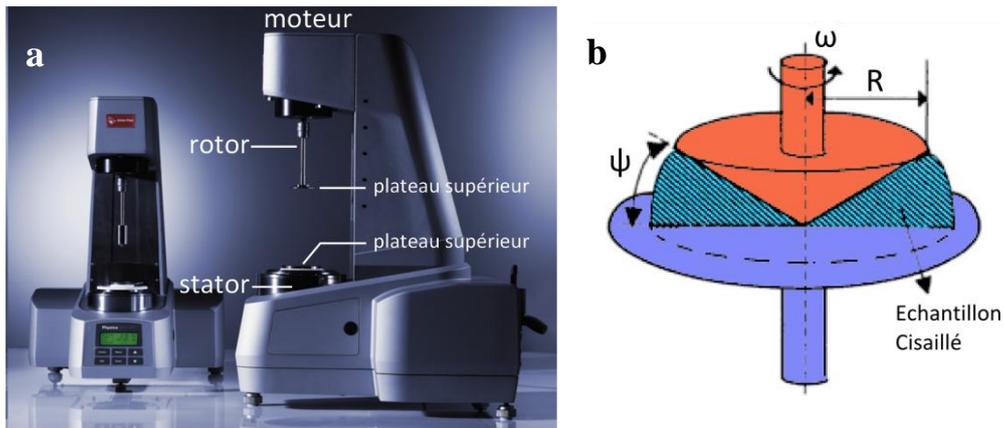


Figure 3.1 : (a) Photo de face et de profil d'un rhéomètre. Source : <http://www.anton-paar.com/>. (b) schéma représentant l'échantillon (bleu) entre le plateau supérieur rotatif (rouge) et le plateau inférieur statique (violet). ψ désigne l'angle de cône maintenu le plus petit possible pour que la viscosité dynamique soit quasi constant dans le volume mesuré. ω désigne la vitesse angulaire du rotor, et R le rayon du plateau supérieur. D'après Jean-Louis Grossiord and Philippe Coussot, 2002.

En appliquant une contrainte sinusoïdale au cours du temps (mode oscillant), il est possible de déterminer les grandeurs viscoélastiques intrinsèques de l'échantillon, qui dépendent notamment du temps (ou de la vitesse angulaire de rotation ω) et de la température. Parmi ces grandeurs, on trouve le module de cisaillement complexe $G^*(\omega)$ qui donne accès aux modules élastiques dits de conservation $G'(\omega)$ et au module visqueux dit de perte $G''(\omega)$ par l'équation :

$$G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega).$$

$G'(\omega)$ caractérise la rigidité du matériau viscoélastique en indiquant la quantité d'énergie conservée (en Pa) et restituée après application d'une contrainte.

$G''(\omega)$ caractérise l'énergie dissipée (en Pa.s) par frottement visqueux lors de l'écoulement du matériau soumis à une contrainte.

Il est alors possible de déterminer le facteur (ou tangente) de perte $\tan \delta$ donné par l'équation $\tan \delta = G''/G'$, qui mesure la capacité d'une matière viscoélastique à dissiper l'énergie mécanique sous forme de chaleur. Ainsi, $\tan \delta$ varie entre 0° (pour un solide élastique parfait, donc pour $G'' = 0$) et 90° (pour un liquide visqueux entièrement dépourvu d'élasticité, donc pour $G' = 0$). Cette grandeur joue un rôle précieux d'indicateur du partage entre les propriétés élastiques et visqueuses.

Toutes ces grandeurs rhéologiques dynamiques qui viennent d'être définies dépendent, pour un matériau donné, de la fréquence ω de cisaillement si bien que celui-ci peut avoir un comportement visqueux à une certaine fréquence, et très élastique à une autre. Typiquement pour des faibles fréquences de cisaillement, les boucles d'enchevêtrement topologique formées par les chaînes macromoléculaires adjacentes (les filaments d'actine dans notre cas) ont le temps de se dénouer si bien que le réseau présente des propriétés liquides. A l'inverse, pour les hautes fréquences, la période est trop courte pour que les enchevêtrements se défassent, si bien que le polymère a tendance à se comporter comme un réseau réticulé, les boucles d'enchevêtrement jouant le rôle de ressorts. Il convient alors de déterminer la réponse dynamique d'un matériau donné sur une gamme de fréquences étendues pour exciter l'ensemble des temps propres de sa structure.

3.2 Effet de VASP sur le module élastique des réseaux d'actine.

Dans un premier temps, nous faisons des mesures sur des réseaux d'actine-F préformés à $35,7\mu\text{M}$ auxquels nous avons rajouté différentes concentrations en VASP. Les premières observations rendent compte que tous les échantillons mesurés se comportent comme des solides faiblement viscoélastiques. Indépendamment de la concentration en VASP, le module élastique des réseaux d'actine ne présente qu'une faible dépendance vis-à-vis de la fréquence avec laquelle la contrainte est appliquée (figure 3.2a) et la tangente de perte $\tan \delta = G''/G'$ indique que le module élastique G' du réseau est toujours légèrement supérieur au module visqueux (Figure 3.2b).

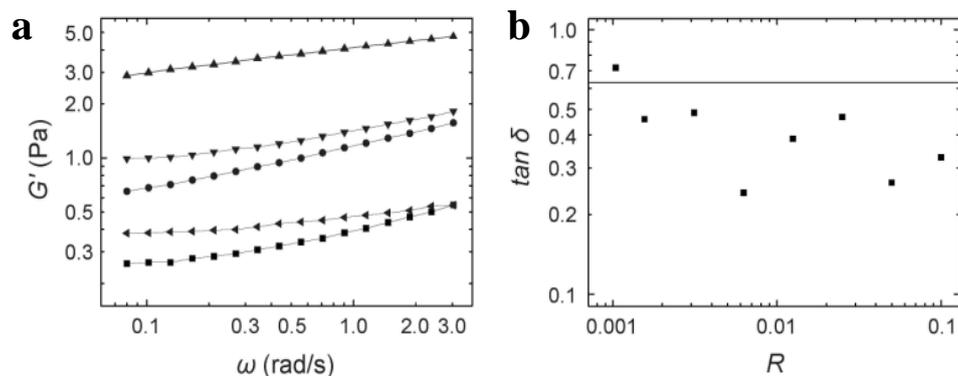


Figure 3.2 : Effet de VASP sur l'élasticité du réseau d'actine. La concentration d'actine est fixée à $35,7\mu\text{M}$ et différents ratios molaires VASP : actine sont testés. (a) module élastique en fonction de la fréquence de la contrainte. (\blacksquare : actine seule, \bullet : $R=0,003$, \blacktriangle : $R=0,006$, \blacktriangledown : $R=0,025$, \blacktriangleleft : $R=0,1$). La faible dépendance du module élastique vis-à-vis de la fréquence rend compte de propriétés faiblement viscoélastiques. (b) tangente de perte $\tan \delta = G''/G'$ en fonction du ratio actine : VASP. Une faible diminution de la tangente de perte accompagne une augmentation de la concentration en VASP en accord avec une activité réticulante du réseau faible. La ligne indique la valeur référence d'un réseau d'actine sans VASP.

Le module de plateau G_0 qui rend compte de l'enchevêtrement du réseau à l'équilibre, donc de ses propriétés viscoélastiques dans le régime linéaire, est mesuré pour différents ratios VASP/actine à concentration en actine fixée à $1,5\text{mg/ml}$ ($35,7\mu\text{M}$). $G_0 = 0,40$ Pa pour des réseaux d'actine polymérisés en absence de VASP (Figure 3.3a). A un ratio VASP/actine bas ($R=0,001$) la constante de plateau augmente très faiblement. Cela suggère encore une fois un faible effet réticulant de VASP dans ce régime. Cette constante de plateau augmente jusqu'au ratio $R=0,006$, pour décroître au-delà de $R=0,0125$ et finalement retourner à des valeurs proches de celles obtenues à bas ratio. A forte concentration en VASP, le réseau d'actine se comporte alors comme si VASP n'était pas présent.

Le profil rhéologique des réseaux d'actine en présence de VASP diffère fortement de ceux obtenus à partir de réseaux d'actine mis en présence d'autres protéines connues pour réticuler et former des faisceaux d'actine. L'augmentation maximum de rigidité des réseaux (G') en présence de VASP est comparable à l'augmentation de rigidité en présence de filamine (Schmoller et al., 2009) mais est un ordre de magnitude inférieur à celle obtenue en présence d' α -actinine, de scruine et de fascine (Tempel et al., 1996; Gardel et al., 2004; Tseng and Wirtz, 2004; Lieleg et al., 2007). De plus, pour ces dernières, le module élastique croit de manière constante avec la concentration en réticulant et ne diminue pas à forte concentration.

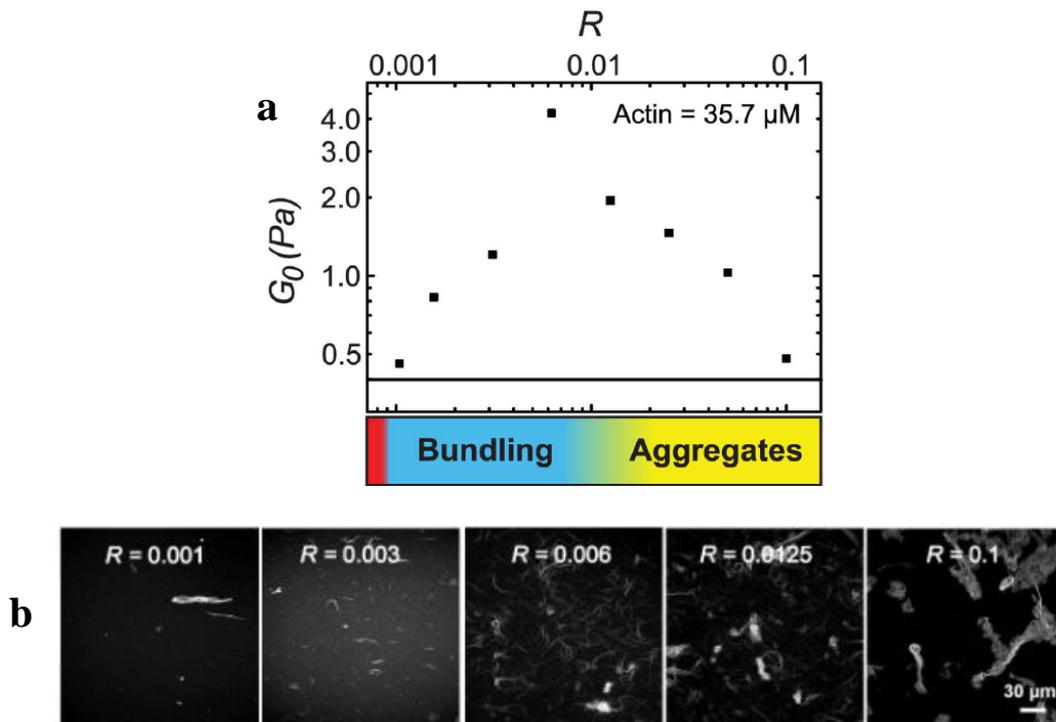


Figure 3.3 : (a) Module de plateau élastique G_0 (Pa) à 35,7 mM actine en fonction du ratio VASP/actine évalué à une vitesse d'oscillation de 1,15rad/s. La valeur G_0 de l'actine seule est représentée par la ligne continue. A $R=0,001$ et $R=0,003$, VASP entraîne une faible augmentation du module de plateau G_0 . A $R=0,006$, G_0 atteint une valeur maximale avant de diminuer pour des valeurs de R plus élevées. (b) La diminution de G_0 à partir de $R=0,006$ est expliquée par les changements de morphologie des réseaux observés en fonction du ratio VASP/actine. Images en microscopie confocales des microstructures formées par les réseaux d'actine en présence de différentes concentrations en VASP montrent à faible R un réseau plutôt homogène de faisceaux d'actine. A R plus élevé, de larges agrégats apparaissent, coïncidant avec la décroissance de G_0 .

Pour comprendre l'origine de la diminution de rigidité des réseaux d'actine mesurée à des ratios molaires VASP/actine élevés (Figure 3.3a), la microstructure de ces réseaux est observée en microscopie confocale (Figure 3.3b). En absence de VASP, les réseaux d'actine sont homogènes et isotropiques, c'est-à-dire que leurs propriétés mécaniques sont identiques dans toutes les directions. En présence de VASP, des faisceaux d'actine se forment dès le ratio molaire VASP/actine $R=0,001$ atteint. Dès lors qu'on augmente VASP de $R=0,001$ à $R=0,006$, l'organisation des réseaux d'actine change et passe d'une structure composite faite de faisceaux courts et droits ou courbés, espacés dans un réseau filamentaire dense, à des faisceaux beaucoup plus longs, épais, et fortement incurvés (Figure 3.3b). De larges agrégats de faisceaux d'actine entremêlés et latéralement associés commencent à se former au sein de ces réseaux composites.

L'évolution du comportement élastique macroscopique des réseaux d'actine en fonction du ratio VASP/actine est directement reflétée par les changements de morphologie observés de ces réseaux: l'augmentation de la formation des faisceaux d'actine accompagne une augmentation de l'élasticité des réseaux pour atteindre un maximum à $R=0,006$. A ce ratio se forment des faisceaux plus épais, plus longs plus courbés et plus enchevêtrés qu'aux ratios molaires VASP/actine faibles. La diminution d'élasticité observée en augmentant au-delà du ratio 0,006 la concentration en VASP correspond à un régime où les réseaux se fragmentent en agrégats. Cette valeur diminue encore au fur et à mesure que les faisceaux sont incorporés dans ces agrégats. Au ratio molaire le plus élevé testé ($R=0,1$), ne subsistent que de larges agrégats séparés les uns des autres. Ces observations sont en accord avec des simulations qui prédisent que la rigidité des réseaux diminue drastiquement au fur et à mesure que plus de matériel est agrégé en structures localisées et hétérogènes comme les faisceaux et agrégats (Lieleg et al., 2009).

Malgré une activité de formation de faisceaux d'actine significative, VASP ne produit que des gels faiblement viscoélastiques, car les réseaux composites filaments/faisceaux ne sont pas interconnectés en structures cohésives étendues qui confèreraient une augmentation de rigidité à l'échelle macroscopique. Si la formation de faisceaux et leur regroupement en agrégats a déjà été observée pour des protéines réticulantes comme l' α -actinine et la filamine (Tempel et al., 1996; Lieleg et al., 2009), la drastique diminution de la réponse élastique passé un certain seuil reste la spécificité de VASP. Jamais leur module de plateau décroît ni ne revient à des valeurs comparables à celles obtenues en absence de réticulant. Ainsi, l' α -actinine et la filamine sont des réticulants bien plus efficaces que VASP.

3.3 Contribution des domaines de VASP à l'augmentation de l'élasticité des réseaux d'actine.

Nous explorons ensuite le rôle des différents domaines de VASP dans l'augmentation de l'élasticité des réseaux d'actine. Pour cela, nous disposons des formes mutantes de VASP décrites précédemment : le mutant mGAB qui porte une mutation inactivant son site de liaison à l'actine monomérique, le mutant Δ FAB dont le domaine de liaison à l'actine-F est tronqué, le mutant Δ FABGAB qui est délété de ses deux domaines de liaison à l'actine G et F et le mutant monomérique Δ TET auquel il manque le site d'oligomérisation. Des mesures de rhéologie sont effectuées en présence des mutants au ratio $R=0,025$; 1,5mg/ml actine, conditions pour lesquelles VASP sauvage est proche de son optimum en terme d'augmentation d'élasticité (Figure 3.3a et Figure 3.4a). Ces

mesures sont couplées avec des observations des réseaux d'actine en microscopie confocales pour voir l'effet des différents mutants sur la morphologie des réseaux.

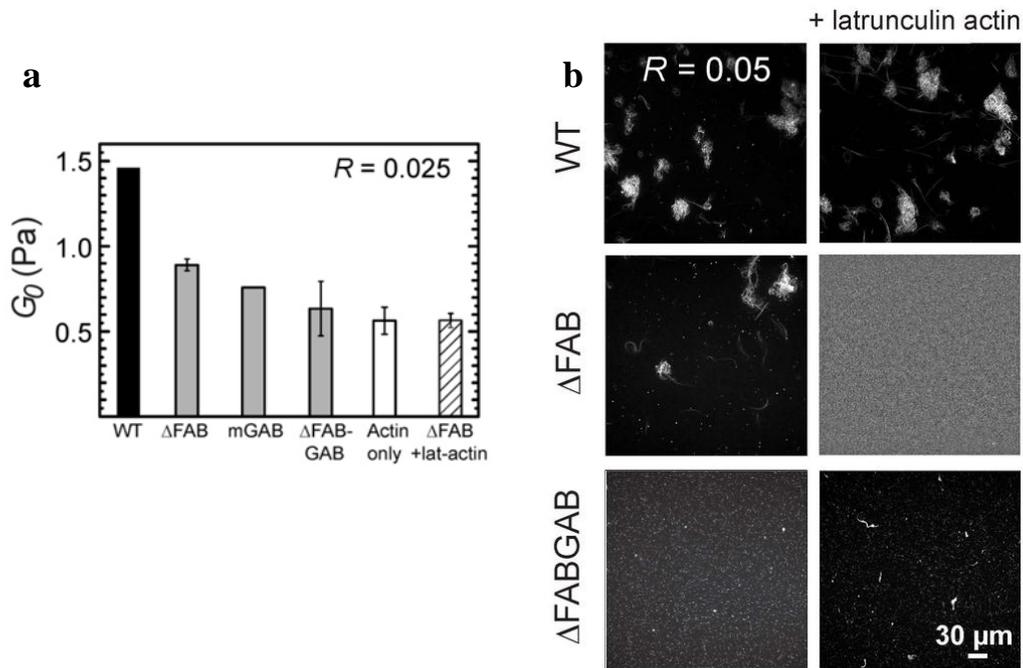


Figure 3.4 : (a) les modules de plateau élastique G_0 mesurés à une fréquence d'oscillation de 1,15 rad/s pour des réseaux d'actine-F 1,5mg/ml (37,5 μ M) polymérisés en présence de différents mutants VASP à un ratio VASP/actine de $R=0,025$. Tous les mutants testés entraînent une augmentation de G_0 en participant à la réticulation des filaments en comparaison avec l'actine-F seule. Cependant, VASP sauvage produit une augmentation d'élasticité plus élevée que les mutants Δ FAB, mGAB et Δ FABGAB. L'augmentation d'élasticité en présence du double mutant Δ FABGAB n'est pas statistiquement différente comparée à l'actine-F seule. Complexer le domaine GAB du mutant Δ FAB avec des monomères latrunculine B-actine abolie tout effet de réticulation.

(b) image en microscopie confocale de réseaux d'actine-F 0,5mg/ml actine (11,9 μ M) incubés en présence de VASP sauvage, de Δ FAB ou de Δ FABGAB à un ratio $R=0,05$. Δ FAB présente une quantité significative de faisceaux d'actine, mais moins que VASP sauvage alors que Δ FABGAB ne présente que des faisceaux épars (colonne de droite). L'ajout de 4 μ M latrunculine-actine élimine les faisceaux formés en présence de Δ FAB mais n'a pas d'effet sur VASP sauvage ni Δ FABGAB.

En présence de Δ FAB, les réseaux d'actine sont moins rigides qu'en présence de VASP sauvage (figure 3.4a). Néanmoins, Δ FAB garde la capacité à augmenter l'élasticité des réseaux comparés au contrôle sans VASP et à former des faisceaux (figure 3.4b colonne gauche), indiquant qu'un autre domaine peut lier les filaments d'actine. La mutation du site de liaison à l'actine monomérique GAB diminue également la capacité de VASP à augmenter l'élasticité des réseaux d'actine comparée à VASP sauvage. Enfin, le mutant VASP dépourvu de ses deux sites GAB et FAB n'entraîne pas d'augmentation d'élasticité significative comparée au réseau d'actine seul (Figure 3.4a) et n'est plus capable de former des faisceaux (figure 3.4b colonne gauche). Ces mesures semblent

indiquer que le domaine GAB, à l'instar de FAB, participe à la liaison aux filaments d'actine et forme des faisceaux.

Pour tester cette hypothèse, le site de liaison à l'actine-G est saturé avec de l'actine monomérique en ajoutant 4 μ M de latrunculine B-actine : une forme d'actine qui ne peut pas polymériser, selon un protocole établi par Hansen and Mullins, 2010. Ce traitement abaisse le module de plateau élastique des réseaux d'actine en présence de FAB à une valeur comparable au contrôle sans VASP (Figure 3.4a) en annihilant complètement la formation des faisceaux d'actine par FAB (Figure 3.4b colonne droite). En accord avec les mesures de rhéologie, cette expérience indique que le domaine GAB participe à la liaison aux filaments d'actine en absence de monomère. Dans ce contexte, GAB ou FAB seraient suffisants pour former des faisceaux. En présence d'actine-G, la liaison de GAB serait déplacée des filaments vers les monomères. Ainsi complexé, GAB ne pourrait plus lier l'actine-F et réticuler les réseaux.

Ces résultats sont en accord avec les expériences de sédimentation à basse vitesse (Figure 3.5). Les différents mutants VASP sont incubés en présence d'actine à 0,5mg/ml (12 μ M) et 75nM, 500nM et 600nM VASP soit des ratios $R=0,006$, $R=0,05$ et $R=0,05$. S'en suit une étape de centrifugation lente. Seuls les filaments d'actine incorporés dans les faisceaux ou agrégats par l'activité de réticulation de VASP tombent dans le culot tandis que les filaments libres restent en suspension dans le surnageant. Après centrifugation, les surnageants et culots sont analysés sur gel de polyacrylamide pour comparer la quantité d'actine relative tombée dans le culot par rapport à celle restée dans le surnageant.

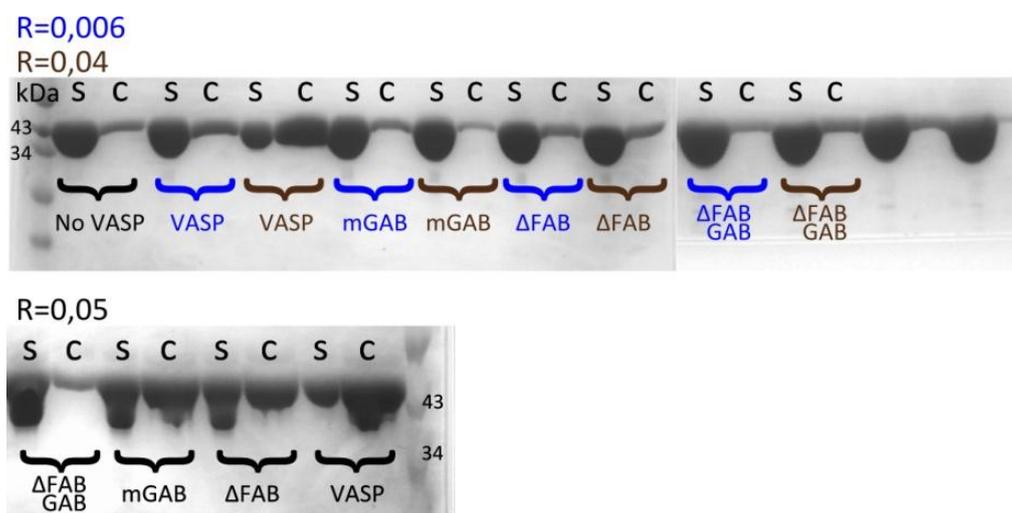


Figure 3.5 : Expériences de sédimentation à basse vitesse dans le but de détecter la formation ou non de faisceaux d'actine. Différentes concentrations en VASP: 75, 500 et 600nM sont incubés avec 12 μ M d'actine (donnant respectivement les ratios $R=0,006$, $R=0,04$ et $R=0,05$). Seuls les filaments incorporés dans les faisceaux et agrégats tombent dans les culots après centrifugation. À $R=0,006$, aucun des VASP ne présente de culots significativement enrichis en actine comparé à contrôle sans VASP. À $R=0,04$, seul VASP sauvage présente un culot enrichi en actine comparé au contrôle. Au ratio seuil $R=0,05$, mGAB et Δ FAB présentent des culots enrichis en actine, mais moins que VASP sauvage qui semble plus efficace pour former des faisceaux d'actine. (S) désigne le surnageant, (c) désigne le culot.

Au ratio $R=0,006$ (75nM VASPs), les formes sauvages et mutantes de VASP ne présentent pas de culot significativement plus enrichi en actine comparé au contrôle sans VASP. A cette concentration, VASP ne parvient pas à réticuler efficacement les filaments d'actine pour former des faisceaux. Au ratio $R=0,04$ (500nM VASPs), seul le culot de VASP sauvage est enrichi significativement en actine comparé au contrôle. On estime que plus de la moitié de l'actine a été incorporé aux faisceaux et agrégats d'actine. Au ratio $R=0,05$ (600nM VASPs), les mutants mGAB et Δ FAB présentent à leur tour des culots enrichis en actine, mais moins que VASP sauvage. À cette concentration, mGAB et Δ FAB sont capables de réticuler les réseaux d'actine, mais de manière moins efficace que VASP. En accord avec les mesures de rhéologie, ces expériences de sédimentation à faible vitesse confirment qu'en actine-F, la protéine VASP est un faible réticulant et que le domaine FAB coopère avec le domaine GAB pour une liaison optimale de VASP au filament. Il est à noter que le mutant Δ FABGAB est également capable de former des réseaux lâches de faisceaux d'actine, mais uniquement à partir de 1,5mg/ml d'actine, pour des ratios molaires VASP/actine élevés $R=0,50 - 0,10$ (Figure 3.6).

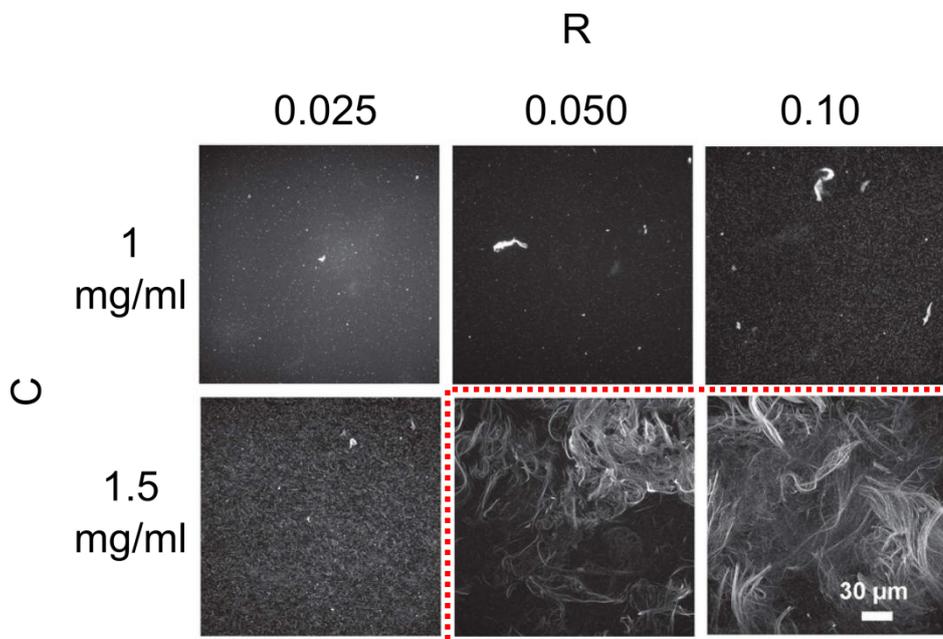


Figure 3.6 : Images en microscopie confocale de réseaux d'actine F incubés avec le mutant Δ FABGAB aux concentrations en actine C : 1 et 1,5 mg/ml pour des ratios molaires $R=0,025$; 0,050 et 0,10. Un réseau lâche de faisceaux d'actine se forme à 1,5mg/ml (35,7 μ M) actine en présence de 1,60 μ M ($R=0,050$) et 3,60 μ M ($R=0,10$) (encadré en pointillés rouges)

Ce résultat indique la possibilité que VASP possède un autre site de liaison à l'actine-F moins performant, en accord avec des observations de travaux précédents dans lesquels les mutants Δ FABGAB Dictyostelium et murin adsorbés sur des surfaces gardent la capacité à

capturer les filaments d'actine, suggérant l'existence en C-terminal d'un site additionnel de liaison à l'actine-F (Breitsprecher et al., 2008; Pasic et al., 2008).

L'ensemble de cette étude fait en partie écho aux travaux récents menés à l'échelle de la molécule unique par Hansen and Mullins, 2010 dans lesquels ils décrivent une association statique de VASP au filament. En revanche, la mutation du site GAB ou sa saturation par des monomères d'actine affaiblit l'interaction de VASP avec le filament, lui faisant adopter un comportement diffusif. VASP « glisse » alors le long du filament jusqu'à se fixer au bout barbé. La mutation du site FAB abroge totalement la liaison de VASP au filament. L'activité de réticulation de VASP apparaît alors sensible à la concentration en actine-G.

Pour finir, nous avons étudié l'importance de la structure tétramérique de VASP dans la formation des faisceaux. Des réseaux d'actine incubés avec un mutant VASP incapable de s'assembler en complexe (Δ TET) sont observés en microscopie confocale (Figure 3.7).

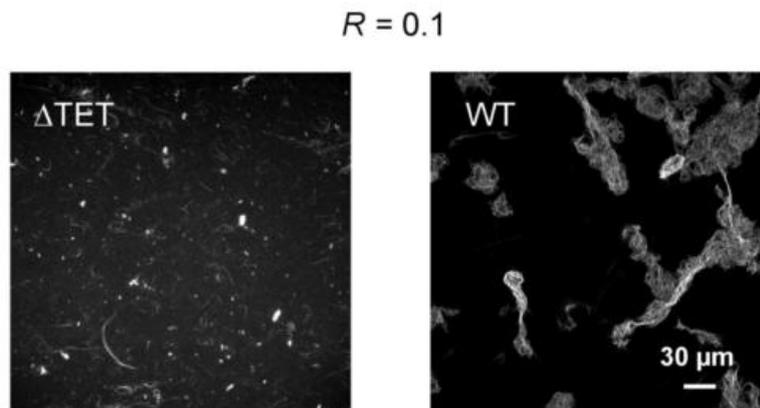


Figure 3.7 : Image en microscopie confocale de réseaux d'actine-F, 1,5mg/ml actine ($35,7\mu\text{M}$) incubés (a) en présence de Δ TET ou (b) en présence de VASP sauvage, tous les deux à un ratio VASP/actine $R=0,1$, soit $3,57\mu\text{M}$ VASPs. Même à forte concentration, Δ TET se révèle incapable à former des faisceaux et agrégats comparé à VASP sauvage.

Il apparaît que le pouvoir réticulant de ce mutant est très diminué, même à forte concentration, comme en témoigne la quasi-absence de macrostructure d'actine-F. Bien que les sites de liaison à l'actine GAB et FAB soient présents, la structure tétramérique de VASP est indispensable pour produire de manière significative des faisceaux et des agrégats.

En conclusion, le comportement réticulant de VASP résulterait de l'arrangement de plusieurs domaines de liaison à l'actine sur un tétramère flexible. Cette structure pourrait expliquer la dépendance de morphologie des faisceaux formés vis-à-vis de la concentration en actine et du ratio VASP/actine. Plus de VASP ou plus de filaments d'actine disponibles augmenteraient la formation de points de réticulation multiples entre filaments et faisceaux dans divers alignements et configurations jusqu'à former des agrégats. Cette dépendance vis-à-vis de la concentration en actine et VASP serait

particulièrement pertinente dans le lamellipode des cellules en migration et dans les comètes d'actine où la concentration en actine-F peut atteindre respectivement 500 μ M (Koestler et al., 2009), et environ 1mM (Wiesner et al., 2003). De plus, la concentration en profiline-actine qui peut être assez élevée (5 – 40 μ M) pourrait fournir un moyen de finement réguler l'activité de VASP (Ferron et al., 2007). VASP ne fonctionnerait donc pas comme une véritable protéine réticulante conférant une augmentation globale de la rigidité des réseaux d'actine, mais plutôt comme un réticulant près de la membrane au front de migration où les concentrations en actine-F et VASP sont élevés, aidant ainsi à la protrusion du lamellipode et formation des filopodes.

3.4 Bilan.

Avec cette étude, nous avons voulu savoir à l'aide de mesures rhéologiques couplées à des observations en microscopie confocale si VASP pouvait être un bon réticulant des réseaux d'actine. En effet, bien que VASP soit surtout associée à la dynamique des bouts barbés, elle possède un site de liaison à l'actine-F et une structure tétramérique qui lui permettraient de remplir cette fonction. Nous montrons que VASP possède en fait un faible pouvoir de réticulation des filaments d'actine sensible au ratio VASP/actine : l'élasticité des réseaux augmente en fonction du ratio VASP/actine pour finalement chuter. Ce comportement mécanique s'explique par l'incapacité de VASP à former des réseaux interconnectés en structures cohésives, mais plutôt des agrégats d'actine localisés et hétérogènes. En actine-F, nous montrons que les sites FAB et GAB collaborent au sein du tétramère VASP pour lier les filaments d'actine et augmenter l'élasticité des réseaux formés. En revanche, en présence d'actine-G, le site GAB saturé par des monomères ne peut plus participer à la liaison aux filaments d'actine. La concordance de ces résultats avec des travaux précédents valide leur pertinence. Enfin, des résultats obtenus avec le mutants Δ FABGAB pour des hauts ratios VASP/actine suggère que VASP posséderait un autre site de liaison à l'actine peu efficace et encore inconnu à ce jour.

3.5 Conclusions et perspectives.

VASP à elle seule n'augmente pas de manière significative la rigidité des réseaux d'actine qui permettrait la formation de protrusions associées au mouvement cellulaire. En revanche, près de la membrane où les concentrations en VASP et en actine sont les plus élevées, VASP en association avec d'autres protéines partenaires de l'actine pourrait

contribuer à remodeler les réseaux et aider à la protrusion membranaire. Une des limitations de cette étude est qu'elle se limite à l'emploi de filaments d'actine mis en présence de VASP. Aussi, il serait intéressant de poursuivre ce travail avec d'autres protéines partenaires de l'actine présents à la membrane, comme le complexe Arp2/3, pour voir si l'augmentation d'élasticité des réseaux d'actine médiée par VASP ne peut pas être potentialisée.

L'ensemble de ces résultats contribue à la compréhension des mécanismes que VASP met en œuvre sur les réseaux d'actine à la membrane des cellules en mouvement, et devrait aider à préciser sa contribution mécanique aux phénomènes de protrusion membranaire.

Article en revue après révision à *European Biophysical Journal*.

Multiple Actin Binding Domains of Ena/VASP Proteins Determine Actin Network Stiffening.

→ Collaboration dans le cadre d'un financement HFSP avec Brian Gentry et Gijsje Koenderink, FOM Institute AMOLF, Pays-Bas.

Brian S. Gentry¹, Stef van der Meulen¹, Philippe Noguera², Julie Plastino² and Gijsje H. Koenderink^{1*}

¹Biological Soft Matter Group, FOM Institute AMOLF, Science Park 104, 1098 XG
Amsterdam, The Netherlands

²Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, Paris F-75248, France

Multiple Actin Binding Domains of Ena/VASP Proteins Determine Actin Network Stiffening

Brian S. Gentry¹, Stef van der Meulen¹, Philippe Noguera², Julie Plastino² and Gijsje H. Koenderink^{1*}

¹*Biological Soft Matter Group, FOM Institute AMOLF, Science Park 104, 1098 XG Amsterdam, The Netherlands*

²*Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Pierre et Marie Curie, Paris F-75248, France*

**Corresponding author.* Tel.: +31(20) 754-7100; Fax: +31(20)-754-7290; E-mail: g.koenderink@amolf.nl

Abstract

Vasodilator-stimulated phosphoprotein (Ena/VASP) is an actin binding protein, important for actin dynamics in motile cells and developing organisms. Though VASP's main activity is the promotion of barbed end growth, it has an F-actin binding site and can form tetramers, and so could additionally play a role in actin crosslinking and bundling in the cell. To test this activity, we perform rheology of reconstituted actin networks in the presence of wild type VASP or mutants lacking the ability to tetramerize or to bind G-actin and/or F-actin. We show that increasing amounts of wild type VASP increase network stiffness up to a certain point, beyond which stiffness actually decreases with increasing VASP concentration. The maximum stiffness is 10-fold higher than for pure actin networks. Confocal microscopy shows that VASP forms clustered actin filament bundles, explaining the reduction in network elasticity at high VASP concentration. Removal of the tetramerization site results in significantly reduced bundling and bundle clustering, indicating that VASP's flexible

tetrameric structure causes clustering. Removing either the F-actin or the G-actin binding site diminishes VASP's effect on elasticity, but does not eliminate it. Mutating the F-actin and G-actin binding site together, or mutating the F-actin binding site and saturating the G-actin binding site with monomeric actin, eliminates VASP's ability to increase network stiffness. We propose that, in the cell, VASP crosslinking confers only moderate increases in linear network elasticity, and unlike other crosslinkers, VASP's network stiffening activity may be tuned by the local concentration of monomeric actin.

Keywords

cell mechanics; rheology; cytoskeleton; viscoelasticity; crosslinking

Introduction

Ena/VASP is a family of proteins found in vertebrates, invertebrates and *Dictyostelium* whose members play important roles in many actin remodelling processes in cells and developing organisms (Reinhard et al. 2001; Krause et al. 2002). Examples include fibroblast rigidity, adhesion and migration (Bear et al. 2000; Galler et al. 2006) formation of endothelial junctions in mice (Furman et al. 2007); development of the human cerebral cortex (Yaba et al. 2011); formation of filopodia in fibroblasts, *Dictyostelium* and neuronal growth cones; neurite growth and neuronal guidance (Applewhite et al. 2007; Schirenbeck et al. 2006; Lebrand et al. 2004; Kwiatkowski et al. 2007); and movement of *Listeria monocytogenes* (Laurent et al. 1999). *In vitro*, VASP influences actin assembly through binding of actin monomers, filaments and profilin-actin (Walders-Harbeck et al. 2002; Chereau and Dominguez 2006; Hansen et al. 2010); promotes filament elongation (Hansen et al. 2010; Plastino et al. 2004; Breitsprecher et al. 2008); interferes with barbed end capping (Bear et al. 2002; Barzik et al. 2005); bundles filaments (Schirenbeck et al. 2006; Bachmann et al. 1999; Hüttelmaier et al.

1999); and influences bead motility in reconstituted systems (Plastino et al. 2004; Samarin et al. 2003; Trichet et al. 2007). Moreover, a recent AFM nanoindentation study of actin comet tails grown from VASP-coated beads showed increases in tail stiffness (Suei et al. 2011).

All Ena/VASP proteins share a highly conserved domain structure, with an N-terminal Ena/VASP homology 1 (EVH1) region and a C-terminal Ena/VASP homology 2 (EVH2) region separated by a proline-rich core (Reinhard et al. 2001; Kwiatkowski et al. 2003), as illustrated in Fig. 1a. The EVH1 domain binds to numerous ligands important for cytoskeletal regulation, including the actin binding proteins zyxin, vinculin, and ActA (Reinhard et al. 2001). The EVH2 domain is responsible for interaction with actin and contains a globular G-actin binding site (GAB) and a filamentous F-actin binding site (FAB), both of which can bind F-actin (Hansen et al. 2010). EVH2 also contains a tetramerization motif (TET). Between the EVH1 and EVH2 domains lies a proline-rich region (Poly Pro) adjacent to the GAB site that promotes addition of profilin-actin complexes at filament barbed ends (Ferron et al. 2007). The VASP molecule is long and flexible. While its real dimensions are not known, since a crystal structure of the full-length molecule is lacking, the EVH1 domain alone already has an average end-to-end length of 40 nm (Breitsprecher et al. 2008).

Based on VASP's multiple domain structure, it has been proposed that it can have a complex range of possible interactions with actin monomers, actin filaments and actin binding proteins (Bear and Gertler 2009), as sketched in Fig. 1b. Experiments have indeed demonstrated a number of VASP-actin interactions, including both actin filament end-binding and side-binding modes. It was shown that VASP may regulate the cytoskeleton via actin assembly at filament barbed ends, where it stably binds and promotes elongation through monomer addition. In this capacity it can bind both monomeric actin and profilin-actin complexes through its GAB site, while the FAB site transiently binds to the filament side (Hansen et al. 2010; Breitsprecher et al. 2011; Pasic et al. 2008). The side-binding capacity

may be particularly important to insure actin filament stabilization and tethering during elongation when VASP is confined to a substrate (Schirenbeck et al. 2006; Laurent et al. 1999; Hansen et al. 2010), but it may also help bundle actin filament tips in filopodia (Schirenbeck et al. 2006; Lebrand et al. 2004; Hansen et al. 2010). A more stable side-binding mode in which both GAB and FAB domains bind actin filaments is presumably responsible for the formation of composite filament/bundle networks *in vitro* (Laurent et al. 1999; Breitsprecher et al. 2008; Barzik et al. 2005; Bachmann et al. 1999; Skoble et al. 2001), though there is also evidence that this bundling initiates from interactions at the barbed end (Pasic et al. 2008). It is not known if VASP also crosslinks actin filaments and stiffens *in vitro* networks through side-binding, nor is it clear to what extent these effects are important under cellular conditions.

VASP's different actin binding modes can be modified by free actin monomers which antagonize side binding and promote end binding by occupation of the GAB domain (Hansen et al. 2010). Thus, VASP-actin interactions may be tuned by the participation of different domains in actin binding. Interactions may also be significantly modified by numerous physiologically relevant factors such as buffer ionic strength, VASP and actin concentration, substrate confinement or molecular crowding (Breitsprecher et al. 2008). Because nucleation, tetramerization, and bundling are all interrelated and accounted for by the EVH2 domain found in each of VASP's four flexible arms, VASP-actin interactions may be strongly influenced by the local cytoskeletal environment (Chereau and Dominguez 2006).

Because VASP-actin interactions are complex, it is important to study them in simplified and controlled systems. Elucidating the structural and mechanical properties of filament networks bundled by VASP provides a straightforward way to gain a better understanding of actin-VASP interactions. We examine the microstructure and viscoelastic properties of networks reconstituted from purified actin and VASP in a range of

physiologically relevant concentrations. Use of VASP mutants and free actin monomers to study the effects of distinct VASP domains on network mechanics and structure sheds new light on the complexity of VASP-actin interactions.

Materials and methods

Materials

Recombinant murine His-tagged wild type VASP and VASP mutant proteins were prepared as described elsewhere (Barzik et al. 2005; Pasic et al. 2008). Concentrations of all VASP mutants were determined by a Bradford assay and reported values represent the tetramer. Actin was purified according to the method of Pardee and Spudich (Pardee and Spudich 1982), including a gel filtration step on a HiPrep Sephacryl 26/60 column (Åkta), or purchased from Cytoskeleton (sedimentation assays). The actin concentration was quantified by measuring light absorbance at 290 nm using an extinction coefficient of 0.62 ml/mg (Loisel et al. 1999). Alexa 594-labelled G-actin was prepared following the manufacturer's instructions using Alexa Fluor 594 carboxylic acid succinimidyl ester (Invitrogen) at pH 8, followed by dialysis against G Buffer (Tris HCl 2 mM, CaCl₂ 0.2 mM, dithiothreitol (DTT) 0.2 mM, pH 8.0) to remove excess dye. Proper function of fluorescently labelled actin at a ratio of 1 labelled to 10 unlabelled monomers was verified by the formation of comet tails in a bead motility assay (Plastino et al. 2004). The average length of fluorescently labelled filaments was 8 µm. For all protein concentration measurements a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) was used. Latrunculin-actin was prepared using a 5-fold molar excess of latrunculin B (Santa Cruz Biotechnology) and was incubated in G-buffer for 30 min on ice prior to experiments.

Confocal microscopy

Sample chambers were prepared by cleaning glass coverslips and microscope slides by sonication in 50% ethanol, followed by sonication and rinsing with Milli-Q water. Slivers of coverslips were used as spacers to create chambers with a nominal volume of 22 μ l. Slides, spacers and coverslips were bonded using optical adhesive (Norland). Chambers were passivated with 0.1 mg/ml kappa-casein for 5 min and then washed with X-buffer (10 mM Hepes, 0.1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 0.1 mM CaCl₂). For VASP-actin samples, first Mg-G-actin (10% fluorescently labelled and 90% unlabelled) was prepared by incubation in a 1 molar equivalent plus 10 μ M MgCl₂ and 0.2 mM EGTA in G-buffer (2 mM Tris 0.2 mM CaCl₂, 0.2 mM DTT pH 8) and incubating on ice for 5 min. VASP proteins were added to Mg-G-actin before polymerization. The final samples contained 10 mM Hepes, pH 7.5, 115 mM KCl, 2.1 mM Mg-ATP, 7 mM DTT, and 150 μ M DABCO. These buffer conditions are similar to those used in typical actin comet tail assays (Plastino et al. 2004; Loisel et al. 1999; Wiesner et al. 2003). We verified by confocal microscopy that the Mg²⁺ ions at the concentration used in these studies did not cause bundling in the presence of VASP (Online Resource 1) nor with actin alone (Online Resource 2c). For latrunculin-actin samples, actin was allowed to polymerize for 5 min at room temperature in the presence of VASP before addition of latrunculin-actin. Samples were polymerized at room temperature for 45 min. Fluorescent actin was illuminated with a Melles Griot 543 nm laser and observed using a Nikon Eclipse C1Si confocal head fitted to a Nikon Eclipse Ti inverted microscope using a 40x apochromatic oil objective (1.0 NA). Image stacks in the z-direction were automatically obtained using Nikon EZC1 software with 35 images taken at 1.5 μ m intervals. Maximum intensity projections were created using ImageJ and the contrast of each projection was identically enhanced (normalized with 0.4% saturated pixels). For homogeneous filament networks, single plane images were recorded. These images were bandpass filtered between 1 and 40 pixels to remove large wavelength variations in light intensity.

Macroscopic shear rheology and LAOS analysis

Samples were prepared at 35.7 μM actin with a 125 μl sample volume in the same manner as for confocal microscopy. Immediately after mixing, samples were pipetted onto the steel bottom plate of a stress-controlled rheometer (Anton Paar Physica MCR 501, Graz, Austria) set at 20°C. Actin was polymerized between the bottom plate and a 30 mm diameter steel cone (0.988° angle, 58 μm truncation). Polymerization was monitored by measuring the increase in the elastic and viscous shear modulus with an oscillating shear at a frequency, ω , of 3.1 rad/s and small strain amplitude, γ , of 0.5%. In the linear regime, the ratio of the stress response, $\sigma(\omega)$, to the applied strain equals the complex shear modulus, $G^*(\omega) = G'(\omega) + iG''(\omega)$. The elastic modulus, $G'(\omega)$, represents the in-phase (storage) response, while the viscous modulus, $G''(\omega)$, represents the out-of-phase (loss) response. The frequency dependent moduli of actin-VASP networks were measured by oscillatory tests using $\gamma = 2.0\%$ and $\omega = 3.1\text{-}0.031$ rad/s.

Nonlinear shear rheology was performed with the same rheometer and cone-plate geometry using the large amplitude oscillatory shear (LAOS) method. We used this method instead of commonly used prestress and step-stress protocols (Gardel et al. 2006, Broedersz et al. 2008, Semmrich et al. 2008), because we observed substantial creep of actin-VASP networks when a steady shear (even within the linear regime) was applied. The rheometer provides stress and strain data averaged over 3 cycles. Since the raw LAOS data at large strain showed clear deviations from a sinusoidal (linear) stress response, we analyzed nonlinearities in the elastic response using a previously described method (Ewoldt et al. 2008). Nonlinearities in the elasticity are well described by the ratio of the first and third coefficients of Chebychev polynomials of the first kind, which are related to the Fourier transform of the stress signal. A coefficient ratio of e_3/e_1 is zero in the linear regime, while $e_3/e_1 > 0$ indicates intra-cycle strain-stiffening, i.e. strain-stiffening within an oscillation cycle. This parameter

suffers less from noise than other elasticity parameters, and provides a sensitive measure of deviations from linear elasticity (Ewoldt et al. 2008).

Co-sedimentation assays

G-actin (purchased from Cytoskeleton) was charged with Mg^{2+} by incubation in a 1 molar equivalent plus 10 μM $MgCl_2$ and 0.2 mM EGTA in G-buffer (2 mM Tris 0.2 mM $CaCl_2$, 0.2 mM DTT pH 8) on ice for 5 min. Actin was then diluted to 12 μM in X-buffer (10 mM HEPES pH 7.5, 0.1 M KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.1 mM $CaCl_2$), supplemented with 1.8 mM ATP, 3.6 mM $MgCl_2$, 130 μM DABCO, 6 mM DTT and the appropriate amount of VASP or VASP mutants in VASP buffer (20mM imidazole, pH 7.0, 200mM KCl, 1mM EGTA, 2mM $MgCl_2$ and 1mM DTT). The final pH was 7.5 and the salt concentration was 110 mM KCl. The reactions were incubated at room temperature for 1 hour and then centrifuged at 12,000 x g for one hour at 4°C to pellet bundles. Supernatants and pellets were separated, denatured in tris-glycine sample buffer, and loaded on 10% polyacrylamide SDS-page gels.

Results

VASP increases the elastic modulus of F-actin networks

We determined whether VASP affects the elastic modulus of actin networks since VASP is rich in specific structures in the cell that are known to sense mechanical cues, such as lamellipodia and filopodia. To this end, rheological measurements were performed on samples with a constant actin concentration (35.7 μM) and crosslink density (VASP:actin ratio) varying from $R = 0.001$ to 0.1. All samples behave as weak viscoelastic solids regardless of VASP concentration, with the elastic modulus G' displaying only a weak frequency

dependence (Fig. 2a, left). The loss tangent, $\tan \delta = G''/G'$, calculated at each value of R , shows an elastic modulus only slightly larger than the viscous modulus (Fig. 2a, right), also consistent with weak solid-like behaviour. Figure 2b shows the plateau modulus G_0 (determined at $\omega = 1.15$ rad/s) for increasing VASP:actin molar ratios R . G_0 was 0.40 Pa for actin networks polymerized in the absence of VASP (solid line in Fig. 2b). At low VASP:actin molar ratios ($R = 0.001$), G_0 was only slightly higher than F-actin alone (black squares in Fig. 2b). This suggests that there is little crosslinking effect due to VASP in this regime. As R increases, the plateau modulus also increases, but only for values up to $R = 0.006$. Beginning at $R = 0.0125$, G_0 decreases with increasing VASP concentration, finally returning to values close to those at low R . This rheological profile differs significantly from that of networks crosslinked by certain other actin binding proteins that are known to crosslink and bundle F-actin, where the elastic modulus steadily increases with increasing crosslinker concentration. The maximum increase in network stiffness observed with VASP is comparable to stiffness increases seen with filamin (Schmoller et al. 2009; Kasza et al. 2009), but an order of magnitude less than that seen for α -actinin, scruin and fascin (Tseng and Wirtz 2001, Tempel et al. 1996; Gardel et al. 2004; Lieleg et al. 2007).

To test the origin of the decrease in linear network elasticity at high VASP to actin molar ratios, we observed the microstructure of VASP-actin networks via confocal imaging. In the absence of VASP, actin networks polymerized at 35.7 μM (1.5 mg/ml) are homogeneous and isotropic (Online Resource 2). When VASP is added, bundles start to appear at a very low threshold of the VASP:actin molar ratio, $R = 0.001$. As VASP is increased from $R = 0.001$ to $R = 0.006$, the network organization changes from composite structures of short straight or curved bundles interspersed in dense filamentous networks to longer, thicker, and more strongly curved fibers (Fig. 2b, top). In addition, large aggregates of intertwined, laterally associated bundles begin to form within these composite bundle/filament

networks. This increase in the extent of VASP-mediated bundling as seen by confocal microscopy correlates well with the increase in G_0 measured with rheology (see Fig. 2b, lower). The largest value of G_0 occurs at $R = 0.006$. At this R value, confocal images show longer, thicker and more strongly curved bundles as compared to lower VASP:actin molar ratios (Fig. 2b, top). The decrease in G_0 observed when the VASP concentration is raised further corresponds to the regime where large bundle aggregates become predominant in the sample. The plateau modulus decreases still further as more bundles become incorporated into the aggregates at higher R values. At the highest molar ratios, the actin filaments are in very large aggregates of tangled bundles that appear separate (Fig. 2b, top $R = 0.1$). Overall this profile indicates that despite significant bundling, VASP produces only weakly viscoelastic gels because the composite filament/bundle networks are not interconnected in cohesive, spanning structures that confer a macroscopic stiffness increase. This interpretation is supported by the weak viscoelastic behaviour shown by all samples (Fig. 2b).

In order to further compare VASP's effect on the elastic behaviour of F-actin networks to that of other crosslinkers, nonlinear rheology was performed at $R = 0.006$ corresponding to the maximum increase in the linear elastic modulus. We used the large amplitude oscillatory shear (LAOS) method, in which filament networks are subjected to strain oscillations at a constant frequency (here 0.1 Hz) with increasing strain amplitude γ_0 . Figure 3 (inset) shows Lissajous figures generated by plotting the stress $\sigma(t)$ as a function of the applied strain $\gamma(t)$ for three strains – 2.0% (innermost curve), 22.2% (middle curve), and 73.9% (outermost curve). The shape of these curves provides a signature of nonlinear response. At small strains the response is linear (inner curve), as evident from the elliptical shape of the Lissajous curve. At higher strains the curve deviates from an ellipse with a small upturn at maximum strain (middle curve) indicating moderate intra-cycle stiffening. Finally, the trajectory becomes distorted as the network approaches mechanical failure and rupture (outer curve). The ratio of

the first and third Chebychev coefficients plotted against γ_0 (Fig. 3, squares) confirms that F-actin networks containing VASP produced only moderate strain stiffening at high strains. Furthermore, the strain-stiffening behaviour of VASP-mediated actin networks was not significantly different from that of F-actin alone (Fig. 3, circles). This supports evidence from linear rheology that VASP does not strongly crosslink F-actin networks.

The effect of VASP on linear network elasticity is due to a combination of VASP's actin binding domains and tetrameric structure

To elucidate the role of VASP's multiple actin binding domains in increasing network stiffness via F-actin crosslinking/bundling, we generated VASP mutants in which the GAB and FAB sites were separately rendered non-functional, either by mutation (mGAB) or deletion (Δ FAB), as well as a mutant lacking both sites (Δ FABGAB). Rheological measurements were performed on VASP wild type and mutants at $R = 0.025$ and $c = 35.7 \mu\text{M}$, conditions where wild type VASP is close to its optimum in terms of stiffness increase. As expected, Δ FAB produces a smaller increase in network stiffness than wild type VASP. Surprisingly, however, Δ FAB is still able to increase stiffness over the background level of pure F-actin, indicating that there must be other sites on the VASP molecule capable of binding F-actin (Fig. 4b). The G-actin binding (GAB) site seems to be a likely candidate, since the mGAB mutation greatly reduces VASP's ability to increase network stiffness compared to wild type VASP. Removal of both actin-binding sites (Δ FABGAB) indeed reduces the plateau modulus to that of F-actin only. As an alternative test of F-actin binding by the GAB site, we treated the Δ FAB mutant with $4 \mu\text{M}$ of latrunculin-actin, which provides a pool of unpolymerizable actin monomers. This treatment reduced the plateau modulus to that of F-actin only (Fig. 4a), confirming that the GAB site contributes to the F-actin

crosslinking/bundling activity of VASP and can maintain a certain level of crosslinking in the absence of the F-actin binding site. However, this crosslinking activity occurs only when the GAB domain is not complexed with monomeric actin.

We can also observe this effect by confocal fluorescence microscopy and sedimentation assays. The Δ FAB mutant displays bundling activity, presumably via the GAB site (Online Resource 3), since when both sites are removed (Δ FABGAB) only small actin punctae are observed within the actin network (Online Resource 4). Additionally, when the Δ FAB mutant is treated with 4 μ M of latrunculin-actin, bundles are no longer formed (Fig. 4b). Consistent with the rheology measurements, these results indicate that the GAB site causes bundling even in the absence of the F-actin binding domain, but only when it is not bound with monomeric actin. These results were further confirmed by a low-speed sedimentation assay at 11.9 μ M actin (Fig. 4c). In this assay, only filamentous actin that is incorporated into bundles or aggregates will be pelleted, while free filaments will remain in the supernatant. At $R = 0.05$, (Fig. 4c), only the Δ FABGAB mutant displays almost no pelleted actin, while mGAB and Δ FAB show a considerable amount, although less than wild type. This confirms the observation made by confocal microscopy that the GAB and FAB sites both appear to participate in F-actin bundling.

To determine the contribution of VASP's tetrameric structure to F-actin bundling, networks containing a VASP mutant lacking the tetramerization (Δ TET) site were observed using confocal microscopy. Bundling was dramatically reduced in all samples, and very few aggregates were observed, even at high R values. Figure 4d illustrates the contrast in bundling between VASP wild type and the Δ TET mutant at $c = 35.7 \mu$ M and $R = 0.1$. Thus, the tetrameric structure of VASP plays a crucial role in producing large bundles and aggregates thereof.

VASP-mediated bundling and aggregate formation also depend upon actin concentration

Confocal images of VASP-mediated F-actin bundling also show that the onset actin:VASP molar ratio R for bundling depends on F-actin concentration. In the absence of VASP, networks are homogeneous and isotropic for all concentrations tested (Online Resource 2). Figure 5 shows the transition from homogeneous filament networks to networks containing bundles for samples with VASP at three different actin concentrations. As the actin concentration is lowered, the actin:VASP molar ratio where bundles first appear goes up, from 0.001 at 35.7 μM (1.5 mg/ml) actin to 0.003 at 11.9 μM (0.5 mg/ml) (Fig. 5, compare left-hand and middle columns). At an R value of 0.05, all actin concentrations tested showed primarily large aggregated bundle structures, but these aggregates were largest at the highest actin concentration (Fig. 5, right-hand column).

Discussion

Our rheological measurements of VASP-mediated F-actin bundling in solution show that, unlike crosslinking/bundling proteins such as fascin, VASP confers only modest increases in linear network elastic modulus and does not substantially modify the nonlinear response even at high VASP concentrations. This is consistent with a recent study using atomic force microscopy to probe the elasticity of actin comet tails grown from microspheres. The presence of low concentrations of VASP in the solution had no detectable effect upon the elastic modulus of the comets (Suei et al. 2011).

The stiffness dependence on VASP:actin molar ratio is directly reflected by changes observed in bundle network morphology. Confocal images allow observation of the overall appearance of large sample areas and help to explain the macroscopic elastic behaviour of the networks. The maximum increase in stiffness occurs in networks of long entangled bundles at

intermediate molar ratios, whereas the drop in the plateau modulus with decreasing R corresponds with the formation of large aggregates (Fig. 5). These observations are consistent with finite element simulations, which predict that clustering in composite bundle/filament networks drastically reduces stiffness as more material becomes incorporated in localized, heterogeneous structures (Lieleg et al. 2009).

Bundle cluster networks have also been observed with α -actinin and filamin at actin concentrations of 24 μM . These actin-binding proteins, like VASP, are long and flexible, whereas shorter and stiffer molecules such as fascin and scruin produce composite filament/bundle networks or even pure bundled phases without clusters (Schmoller et al. 2009; Lieleg et al. 2007; Lieleg et al. 2009; Shin et al. 2004; Lieleg et al. 2010). Previous work already showed that bundle cluster networks are associated with a weaker mechanical response as compared to the large increases in G_0 observed with fascin and scruin (Lieleg et al. 2010). However, drastic decreases in elastic response due to clustering have not been previously observed. Filamin, like VASP, produces very large clusters at higher crosslink concentrations, but shows a modest overall *increase* in linear elasticity (Schmoller et al. 2009; Kasza et al. 2009); α -actinin shows a weaker plateau modulus increase in the bundle cluster regime compared to the mixed bundle phase (Lieleg et al. 2009). Neither α -actinin nor filamin, however, show an actual decrease in elasticity due to clustering. VASP-mediated networks display a marked decrease in the elastic modulus at the onset of bundle clustering, and the modulus continues to decrease with increasing VASP concentration. The elastic response eventually returns to a value similar to that induced by low VASP concentrations. Overall, this suggests that, despite bundle cluster formation, α -actinin and filamin play a stronger crosslinking role in F-actin networks than does VASP. This conclusion is supported by the moderate strain-stiffening behaviour of VASP-actin networks at high strains, which is indistinguishable from that of pure F-actin solutions. This behaviour is in contrast to the

marked strain-stiffening observed with other crosslinking and bundling proteins such as α -actinin, filamin, heavy meromyosin and fascin (Xu et al. 2000, Gardel et al. 2006, Kasza et al. 2006, Schmoller et al. 2009, Tharmann et al. 2007, Lieleg et al. 2006).

In the absence of free actin monomers, we show that both the FAB and GAB domains of VASP individually increase network stiffness above that of pure F-actin, though both produce a smaller effect than the wild type. This result is confirmed by confocal microscopy and sedimentation assays that show that either domain is sufficient for some bundle formation, but only at high VASP:actin molar ratios (Fig. 4). While it has previously been shown that the FAB domain is sufficient to produce filament bundling, we also observed bundling in the mutant lacking the FAB site (Online Resource 3). We even observed loose bundling by the mutant lacking both FAB and GAB sites, though only at the highest actin concentrations and highest VASP:actin molar ratios (Online Resource 4). This surprising finding is actually consistent with prior observations that both *Dictyostelium* and murine VASP mutants lacking the GAB and FAB domains were able to capture filaments on surfaces, suggesting an additional F-actin binding site on VASP's C-terminal region (Breitsprecher et al. 2008; Pasic et al. 2008). Finally, we show by confocal microscopy that the tetrameric structure of VASP is necessary to produce a significant degree of bundling and aggregation, even when both G- and F-actin binding domains are present (Fig. 4d).

Although the GAB domain participates in F-actin bundling in our assay, it may not when it is in contact with the high concentrations of G-actin that are present in the cell, which we mimicked in this study with sequestered latrunculin-actin. Indeed, free actin monomers reduce or eliminate bundling with VASP \square FAB at low actin concentrations. Presumably, this mutant binds actin filaments via its GAB domain, which is competitively displaced from F-actin in the presence of monomeric actin. These results echo, in part, recent findings using single molecule detection of VASP on actin filaments by total internal reflection fluorescence

(TIRF) microscopy, where it was observed that mutating the GAB domain or saturating this site with monomeric actin compromises filament binding by VASP, although deletion of the FAB domain in this same study completely abrogated VASP's ability to interact with F-actin (Hansen et al. 2010). Filament bundling by VASP thus appears very sensitive to the free actin monomer concentration, the ratio between the amount of F-actin and VASP, and also to the F-actin concentration, which changes the thresholds for the onset of bundling and the predominance of aggregates within the networks.

We propose that the observed F-actin bundling behaviour of wild type and mutant VASP results from the structural arrangement of multiple actin binding sites on flexible VASP tetramers. This proposal is in line with prior models based on observations of VASP interaction with actin monomers and filaments (Bear and Gertler 2009) (Fig. 1b). VASP's flexible tetrameric structure can explain the dependence of bundle morphology on both c and R , as more VASP or more actin filaments allow connections between multiple filaments and bundles in various alignments and configurations. The flexible tetrameric structure also explains VASP's ability to bundle at very low VASP:actin molar ratios and to form aggregates at high molar ratios, because each VASP can bind up to four actin filaments. In order to more thoroughly understand the formation of aggregates at higher R values, details of individual bundle morphology at high magnification must be considered. Previous electron microscopy observations of VASP-mediated F-actin bundles in buffers of similar ionic strength show loosely packed bundles with many single filaments emanating at multiple angles, and displaying no long range internal order (Laurent et al. 1999; Barzik et al. 2005). This suggests that as the VASP:actin molar ratio is increased, the number of VASP-mediated interactions between filaments emanating from different bundles will also increase. Transmission electron microscopy and analytical centrifugation have shown that the VASP molecule is very flexible (Breitsprecher et al. 2008), so connections between bundles will have little bending energy

cost, resulting in numerous lateral associations between bundles that are often strongly curved (Fig. 5) Because bundles tend to be quite long at the highest R values (30 μm or more), more bundle-bundle interactions will occur along the long axis of the fibers, producing large aggregates within the composite networks.

The sensitive dependence of VASP-mediated bundling in solution on actin and VASP concentrations that we demonstrate here may be particularly relevant to cells, where F-actin concentrations have been estimated to be in the range of 12-300 μM (Pollard et al. 2000). In some localized regions, such as the lamellipodia of migrating cells, F-actin levels can reach values as high as 500 μM (Koestler et al. 2009), and actin comet tails have been estimated to be in the millimolar range in F-actin (Wiesner et al. 2003). In addition, intracellular profilin-actin concentrations can also be quite high (5-40 μM), possibly providing a means by which bundling interactions can be tuned (Ferron et al. 2007). We propose that VASP does not function as a bona fide crosslinking protein conferring global increases in network stiffness, but rather bundles near the leading edge or in filopodia where local F-actin and VASP concentrations are high. Monomer depletion in rapidly expanding zones may equally allow for transient increases in VASP bundling activity.

Acknowledgements

This work was funded by a Human Frontier Science Program Young Investigator Grant No. RGY0085/2009-C (to J.P. and G.H.K.) and is part of the research program of the 'Stichting voor Fundamenteel Onderzoek der Materie (FOM)', which is financially supported by the 'Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO)'. We are grateful to Marjolein Kuit-Vinkenoog (AMOLF) and John Manzi (Institut Curie) for invaluable help with VASP purifications. We thank Dorothy Schafer for the VASP constructs and useful discussions, and Roberto Dominguez, Marjolein Kuit-Vinkenoog, Sandy Swei, Laurent Kreplak, José Alvarado, and Björn Stuhmann for useful discussion. We thank Baldomero Alonso Latorre for help with LAOS analysis.

References

- Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, Svitkina TM, Gertler FB, Borisy GG (2007) Ena/VASP Proteins Have an Anti-Capping Independent Function in Filopodia Formation. *Mol Biol Cell* 18:2579–2591
- Bachmann C, Fischer L, Walter U, Reinhard M (1999) The EVH2 Domain of the Vasodilator-stimulated Phosphoprotein Mediates Tetramerization, F-actin Binding, and Actin Bundle Formation. *J Biol Chem* 274:23549–23557
- Barzik M, Kotova TI, Higgs HN, Hazelwood L, Hanein D, Gertler FB, and Schafer DA (2005) Ena/VASP Proteins Enhance Actin Polymerization in the Presence of Barbed End Capping Proteins. *J Biol Chem* 280:28653–28662
- Bear JE, Loureiro JJ, Libova I, Fässler R, Wehland J, Gertler FB (2000) Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101:717–28
- Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, Gertler FB (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109:509–21
- Bear JE, Gertler FB (2009) Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J Cell Sci* 122:1947–1953
- Breitsprecher D, Kieseewetter AK, Linkner J, Urbanke C, Resch GP, Small JV, Faix J (2008) Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J* 27:2943–2954
- Breitsprecher D, Kieseewetter AK, Linkner J, Vinzenz M, Stradal TEB, Small JV, Curth U, Dickinson RB, Faix J (2011) Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J* 30:456–467

Broedersz CP, Storm C, MacKintosh FC (2008) Nonlinear Elasticity of Composite Networks of Stiff Biopolymers with Flexible Linkers. *Phys Rev Lett* 101:118103

Chereau D, Dominguez R (2006) Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *J Struct Biol* 155:195–201

Ewoldt R H, Hosoi AE, McKinley GH (2008) New Measures for Characterizing Nonlinear Viscoelasticity in Large Amplitude Oscillatory Shear. *J Rheo* 52:1427-1458

Ferron F, Rebowski G, Lee SH, Dominguez R (2007) Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* 26:4597–4606

Furman C, Sieminski AL, Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Vasile E, Bronson RT, Fässler R, Gertler FB (2007) Ena/VASP is required for endothelial barrier function *in vivo*. *J Cell Biol* 179:761–775

Galler AB, Garcia Arguinzonis MI, Baumgartner W, Smolenski A, Simm A, Reinhard M (2006) VASP-dependent regulation of actin cytoskeleton rigidity, cell adhesion, and detachment. *Histochem Cell Biol* 125:457–474

Gardel ML, Shin JH, MacKintosh FC, Mahadevan L, Matsudaira P, Weitz DA (2004) Elastic Behavior of Cross-Linked and Bundled Actin Networks. *Science* 304:1301–1305

Gardel ML, Nakamura F, Hartwig JH, Crocker JC, Stossel TP, Weitz DA (2006) Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:1762-1767

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

Hüttelmaier S, Harbeck B, Steffens NO, Meßerschmidt SI, Illenberger S, Jockusch BM (1999) Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Letters* 451:68–74

Kasza KE, Koenderink GH, Lin YC, Broedersz CP, Messner W, Nakamura F, Stossel TP, MacKintosh FC Weitz DA (2009) Nonlinear elasticity of stiff biopolymers connected by flexible linkers. *Phys Rev E* 79:041928

Koestler SA, Rottner K, Lai F, Block J, Vincenz M, Small JV (2009) F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *PLoS ONE* 4:e4810

Krause M, Bear JE, Loureiro J, Gertler F B (2002) The Ena/VASP enigma. *J Cell Sci* 115:4721–4726

Kwiatkowski AV, Gertler FB, Loureiro JJ (2003) Function and regulation of Ena/VASP proteins. *Trends Cell Biol* 13:386–392

Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, van Ween EJ, Leslie JD, Zhang J, Mebane LM, Philippar U, Pinheiro EM, Burds AA, Bronson RT, Mori S, Fässler R, Gertler FB (2007) Ena/VASP Is Required for Neuritegenesis in the Developing Cortex. *Neuron* 56:441–455

Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Groebe L, Jockusch BM, Wehland J, Gertler FB, Carlier M-F (1999) Role of Proteins of the Ena/VASP Family in Actin-based Motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144:1245–1258

Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, Lanier LM, Krause M, Svitkina TM, Borisy GG, Gertler FB (2004) Critical Role of Ena/VASP Proteins for Filopodia Formation in Neurons and in Function Downstream of Netrin-1. *Neuron* 42:37–49

Lieleg O, Claessens MMAE, Heussinger C, Frey E, Bausch AR (2007) Mechanics of Bundled Semiflexible Polymer Networks. *Phys Rev Lett* 99:088102–4

Lieleg O, Cyron CJ, Schmoller KM, Luan Y, Wall WA, Bausch AR (2009) Structural polymorphism in heterogeneous cytoskeletal networks. *Soft Matter* 5:1796–1803

Lieleg O, Claessens MMAE, Bausch AR (2010) Structure and dynamics of cross-linked actin networks. *Soft Matter* 6:218–225

Loisel TP, Boujemaa R, Pantaloni D, Carlier M-F (1999) Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* 401:613–616

Paluch E, van der Gucht J, Joanny J-F, Sykes C (2006) Deformations in Actin Comets from Rocketing Beads. *Biophys J* 91:3113–3122

Pardee JD, Spudich JA (1982) Mechanism of K⁺-induced actin assembly. *J Cell Biol* 93:648–654

Pasic L, Kotova TI, Schafer DA (2008) Ena/VASP Proteins Capture Actin Filament Barbed Ends. *J Biol Chem* 283:9814–9819

Plastino J, Olivier S, Sykes C (2004) Actin Filaments Align into Hollow Comets for Rapid VASP-Mediated Propulsion. *Curr Biol* 14:1766–1771

Pollard TD, Blanchoin L, Mullins RD (2000) Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:545–576

Reinhard M, Jarchau, T, Walter, U (2001) Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins. *Trends Biochem Sci* 26:243–249

Samarin S, Romero S, Kocks C, Didry D, Pantaloni, D, Carlier M-F (2003) How VASP enhances actin-based motility. *J Cell Biol* 163:131–142

Semrich C, Larsen RJ, Bausch AR (2008) Nonlinear mechanics of entangled F-actin solutions. *Soft Matter* 4:1675–1680

Schirenbeck A, Arasada R, Bretschneider T, Stradal TEB, Schleicher, M, Faix J (2006) The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7694–7699

Schmoller KM, Lieleg O, Bausch, A. (2009) Structural and Viscoelastic Properties of Actin/Filamin Networks: Cross-Linked versus Bundled Networks. *Biophys J* 97:83–89

Shin JH, Gardel ML, Mahadevan L, Matsudaira P, Weitz DA (2004) Relating microstructure to rheology of a bundled and cross-linked F-actin network in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:9636–9641

Skoble J, Auerbuch V, Goley ED, Welch MD, and Portnoy DA (2001) Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J Cell Biol* 155:89–100

Suei S, Seyan R, Noguera P, Manzi J, Plastino J, Kreplak L (2011) The Mechanical Role of VASP in an Arp2/3-Complex-Based Motility Assay. *J Mol Biol* (in press)

Tempel M, Isenberg G, Sackmann E (1996) Temperature-induced sol-gel- transition and microgel formation in alpha-actinin cross-linked actin networks: A rheological study. *Phys Rev E* 54:1802–1808

Tobacman LS, Korn ED (1983) The kinetics of actin nucleation and polymerization. *J Biol Chem* 258:3207–3214

Trichet L, Campàs O, Sykes C, Plastino J (2007) VASP Governs Actin Dynamics by Modulating Filament Anchoring. *Biophys J* 92:1081–1089

Tseng Y, Wirtz D (2001) Mechanics and Multiple-Particle Tracking Microheterogeneity of α Actinin-Cross-Linked Actin Filament Networks. *Biophys J* 81:1643-1656

Walders-Harbeck B, Khaitlina SY, Hinssen H, Jockusch BM, Illenberger S (2002) The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett* 529:275–280

Wiesner S, Helfer E, Didry D, Ducoiret G, Lafuma F, Carlier M-F, Pantaloni D (2003) A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J Cell Biol* 160:387–398

Xu J, Tseng Y, Wirtz D (2000) Strain Hardening of Actin Filament Networks. *J Biol Chem* 275:35886-35892

Yaba A, Kayisli U, Tanriover G, Demir N (2011) Spatial and temporal expression of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in fetal and adult human cerebral cortex. *Int J Dev Neurosci* 29:131–136

Figure captions

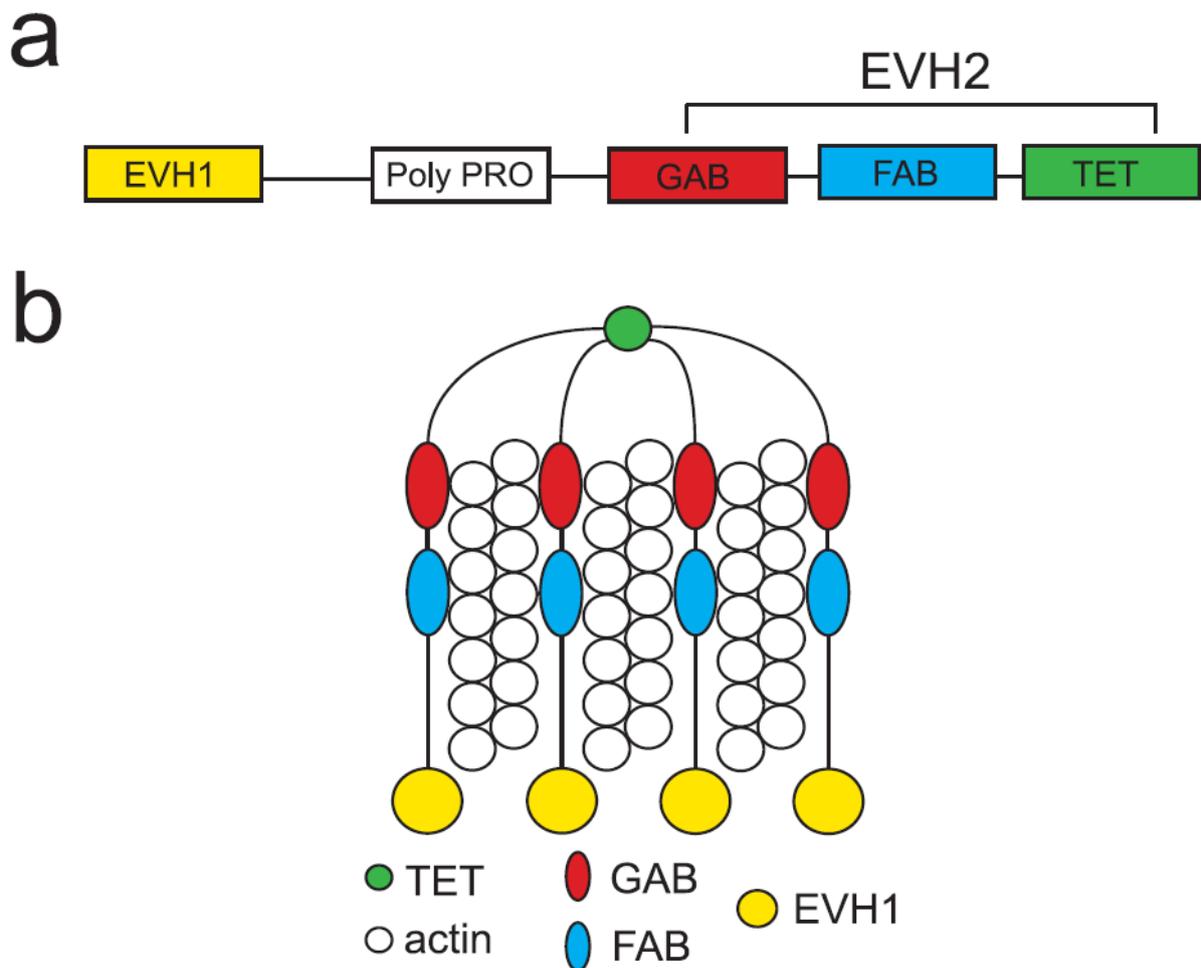


Fig. 1 Schematic of VASP's domain structure and binding partners. **a.** Diagram of VASP's domains including EVH1, proline-rich and EVH2 domains. The EVH1 domain binds actin binding proteins such as zyxin, vinculin, and ActA. The proline-rich domain (Poly Pro) binds profilin, and the GAB and FAB domains bind monomeric and filamentous actin, respectively. TET is responsible for forming VASP tetramers. **b.** Diagram of VASP's tetrameric structure depicting actin filament binding via both GAB and FAB domains in the absence of free actin monomers. The EVH2 domain is known to be highly flexible and allows for multiple F-actin configurations when VASP is not confined to a substrate.

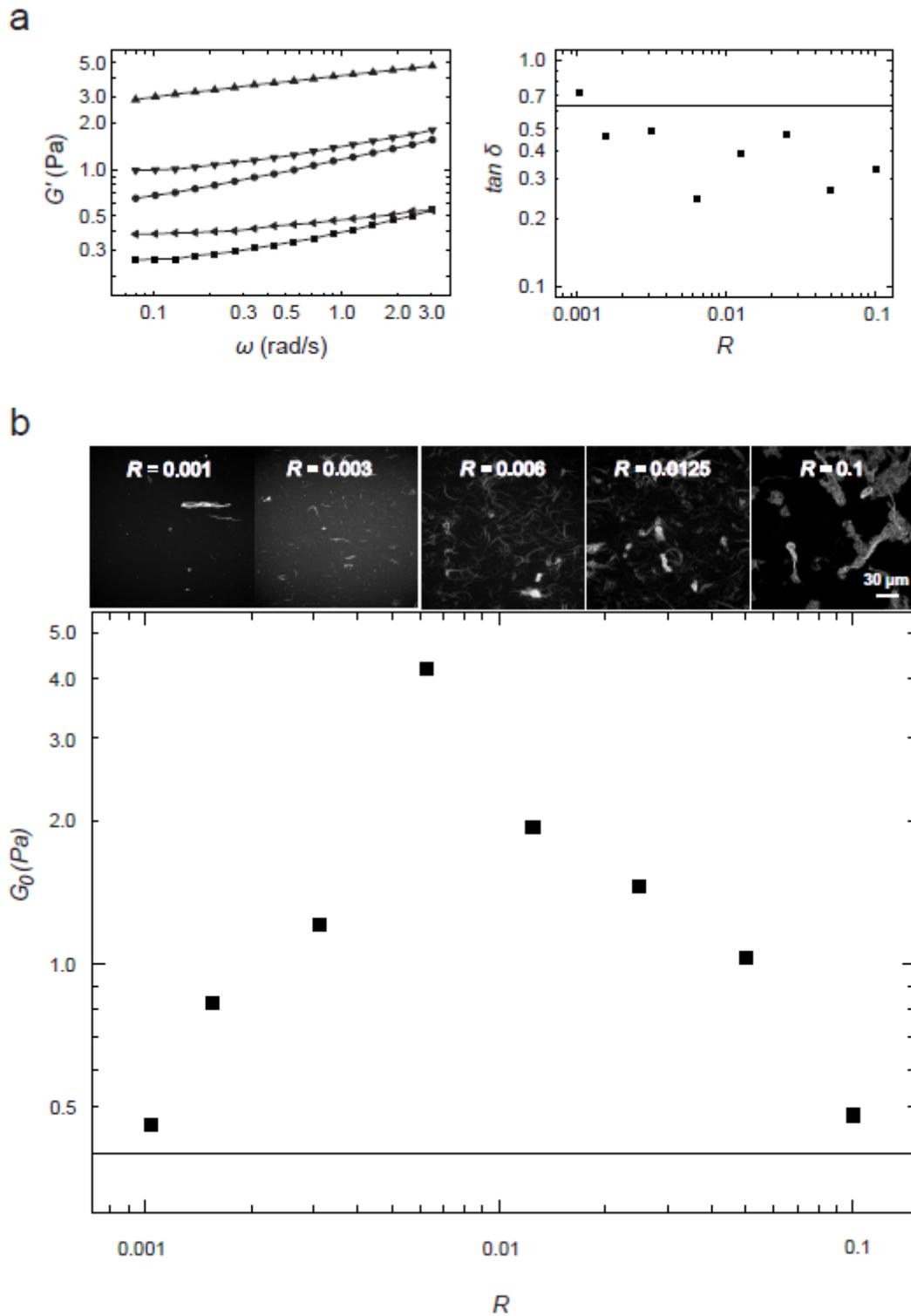


Fig. 2 Effects of wild type VASP on F-actin network elasticity and morphology. The actin concentration is held fixed at $c = 35.7 \mu\text{M}$ and the actin:VASP molar ratio is varied. a (Left). Frequency dependence of the elastic modulus of VASP/actin networks for five VASP:actin molar ratios, R (Squares: actin-only; circles: $R = 0.003$; triangles up: $R = 0.006$); triangles

down: $R = 0.025$; triangles left: $R = 0.1$). The weak dependence on frequency is characteristic of weakly viscoelastic solids. (Right) Dependence of the loss tangent, $\tan \delta = G''/G'$, on R . The solid line indicates the reference value measured for a pure actin network. There is only a small decrease in the loss tangent with increasing VASP concentration, again consistent with weak crosslinking activity. b (Lower). Elastic plateau modulus, G_0 , versus R , evaluated at an oscillation frequency of 1.15 rad/s. The value of G_0 for actin alone is shown as a horizontal line for reference. G_0 shows a maximum at an R -value of 0.006. (Upper) Confocal fluorescence images showing the microstructure of F-actin/VASP networks. Changes in overall network morphology as a function of R are consistent with the rheological behaviour. At $R = 0.001$, bundling is sparse, corresponding to a small increase in plateau modulus G_0 . At $R = 0.003$, more bundles have formed and G_0 is increased. At $R = 0.006$, where G_0 is maximal, bundles are longer, thicker and more strongly curved and some small aggregates appear. At $R = 0.0125$, many bundles become incorporated into tangled aggregates and G_0 decreases. Finally, at $R = 0.1$ aggregates become very large and prominent and G_0 returns to near the value at low R . The scale bar applies to all images.

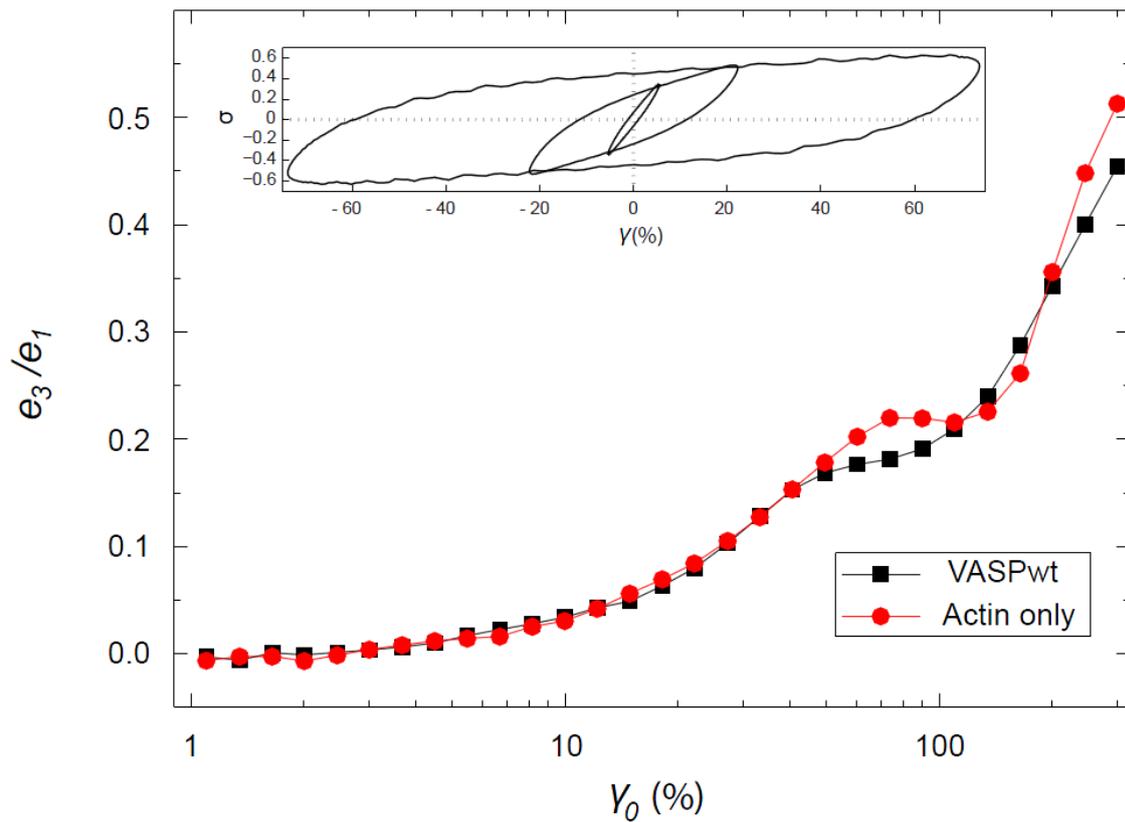


Fig. 3 The nonlinear elastic response of VASP-mediated F-actin networks measured by LAOS. The ratio of the Chebyshev coefficients e_3/e_1 provides a measure of the nonlinear network response. At $c = 35.7 \mu\text{M}$ and $R = 0.006$, corresponding to the maximum increase in the linear elastic modulus, only a small degree of strain-stiffening due to the presence of VASP (squares) is observed. This strain-stiffening is not significantly different from that of F-actin alone (circles). (Inset) Lissajous curves showing stress σ_t as a function of applied strain γ_t for three strain amplitudes – 2.0% (innermost curve), 22.2% (middle curve), and 73.9% (outermost curve). The inner curve is elliptical indicating a linear response. Slight deviations from an ellipse are observed at higher strains (middle curve), indicating intra-cycle stiffening. The outer curve shows significant distortion in the Lissajous curve as the network approaches mechanical failure and rupture.

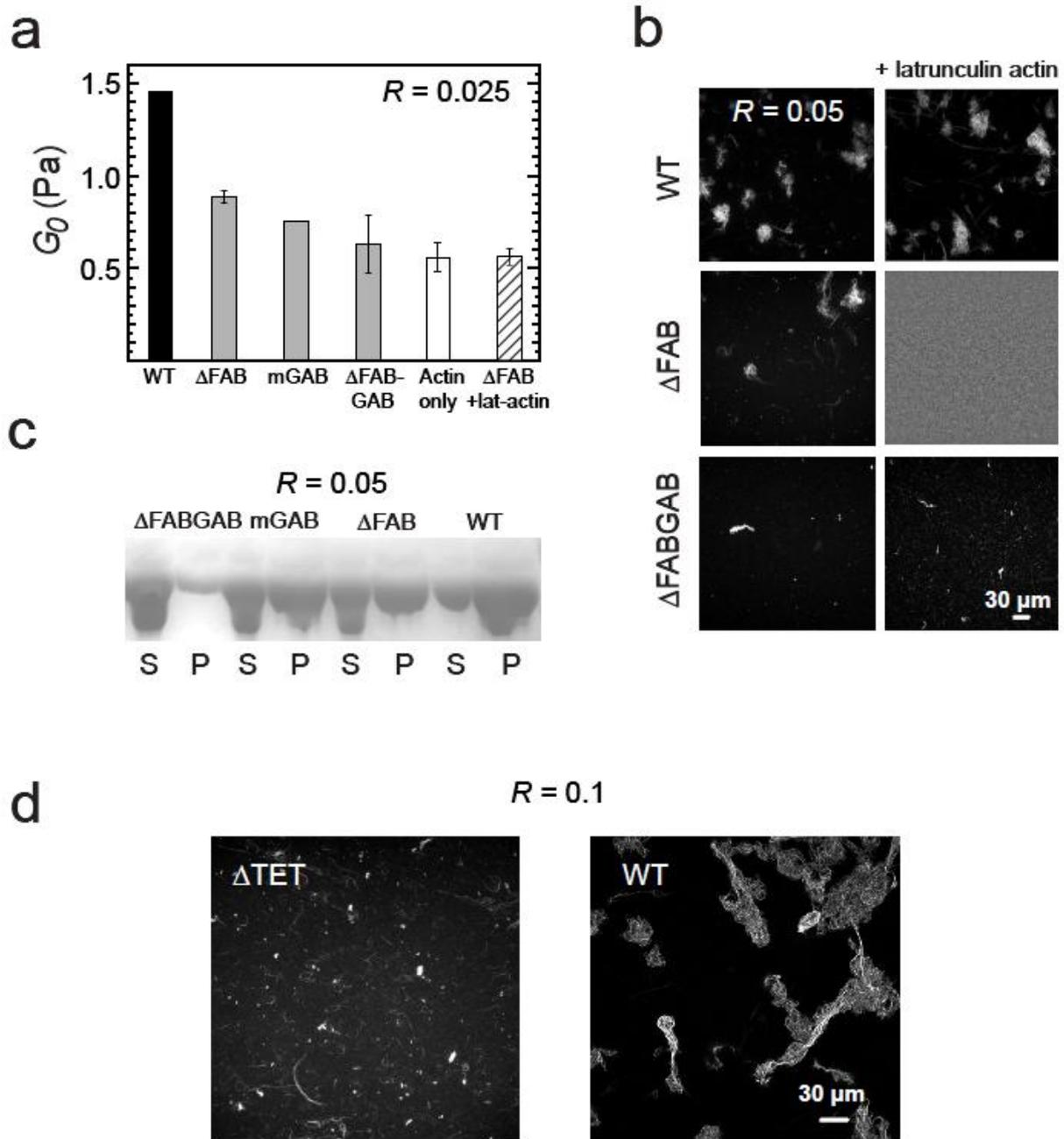


Fig. 4 The effect of VASP's different actin binding domains on F-actin network elasticity and morphology evaluated by comparing wild type VASP (WT) with various mutants. a. Plateau moduli, G_0 , evaluated at an oscillation frequency of 1.15 rad/s for F-actin polymerized in the presence of different VASP mutants at $c = 35.7 \mu\text{M}$ and $R = 0.025$. All mutants cause crosslinking, as evidenced by an increase in network stiffness compared to pure F-actin (white bar). However, wild type VASP (black bar) produces a higher elasticity than any of the

mutants (grey bars). Stiffening by the double mutant Δ FABGAB is not statistically significant compared to actin only. Complexing the GAB site of the FAB mutant with latrunculin B-actin abolished crosslinking (hatched bar). Data with error bars are averages with standard deviations of 3 independent experiments. b. Confocal images of F-actin networks polymerized at $c = 11.9 \mu\text{M}$ with wild type VASP or Δ FAB and Δ FABGAB mutants at $R = 0.050$. Δ FAB shows significant bundling, but less than wild type VASP, while Δ FABGAB shows only sparse bundles. The rightmost column shows the effect of addition of $4 \mu\text{M}$ latrunculin-actin to wild type, Δ FAB and Δ FABGAB samples. Latrunculin-actin eliminates bundling for the Δ FAB mutant, but has no effect for wild type or Δ FABGAB VASP. The scale bar applies to all images. c. Low speed sedimentation assay showing that all mutants bundle at $R = 0.050$ (significant amounts of actin present in the pellet, P), except for Δ FABGAB (nearly all actin present in the supernatant, S). d. Confocal fluorescence images comparing effects on F-actin network morphology between VASP wild type and the mutant VASP Δ TET for $c = 35.7 \mu\text{M}$ and $R = 0.1$. This mutant lacks the tetramerization site and demonstrates that VASP monomers produce significantly less bundling than full tetramers. The scale bar applies to all images.

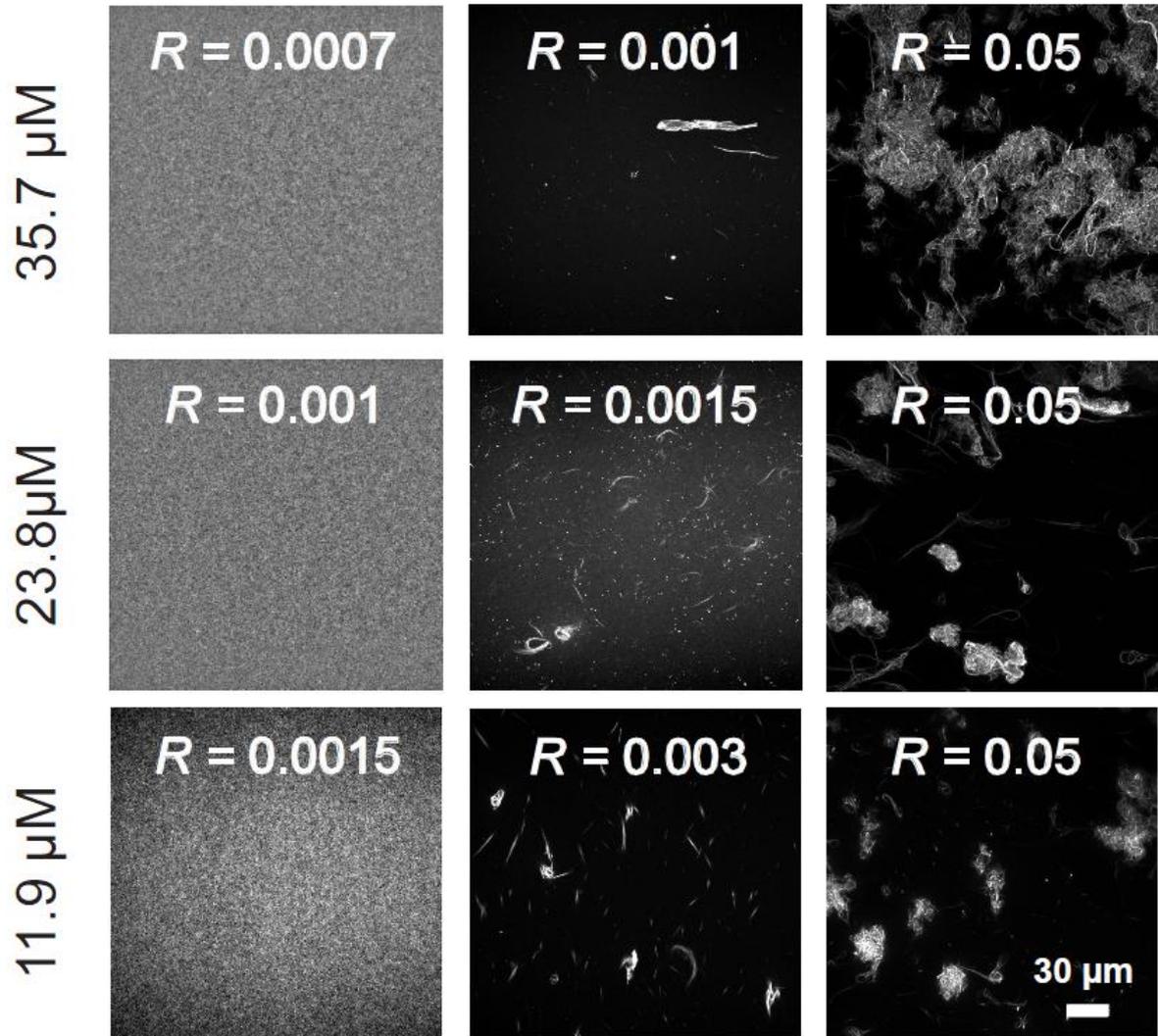
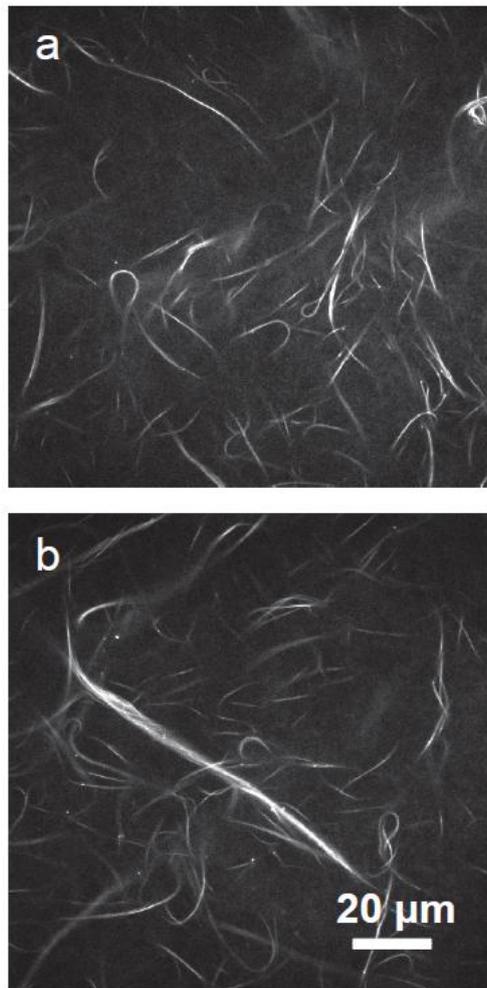
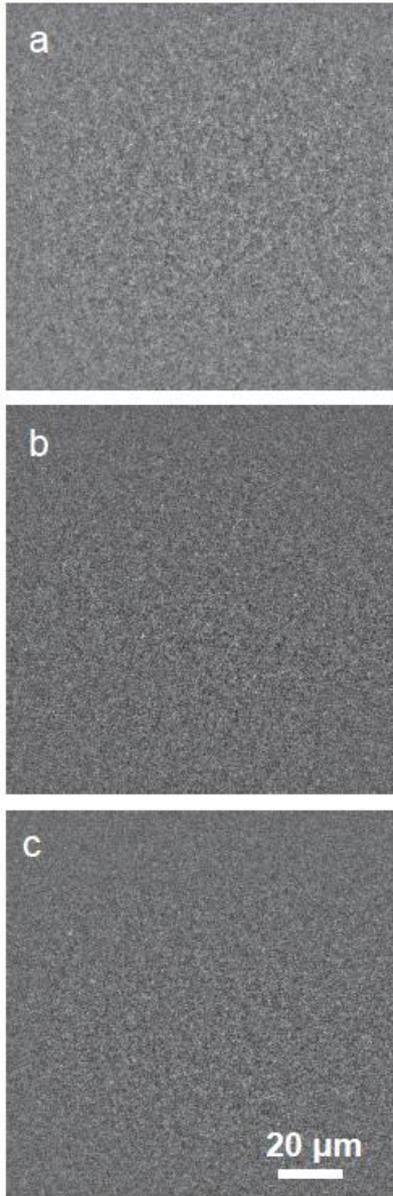


Fig. 5 The onset of VASP-mediated F-actin bundling depends upon actin concentration. The left-hand column shows homogeneous F-actin networks containing wild type VASP at the indicated actin:VASP molar ratio R . The middle column shows the first appearance of actin bundles at higher R . As the actin concentration is decreased, the bundling onset shifts to higher values of R . At all actin concentrations tested, large bundle aggregates were dominant at a molar ratio of $R = 0.05$ (right-hand column). The scale bar applies to all images.

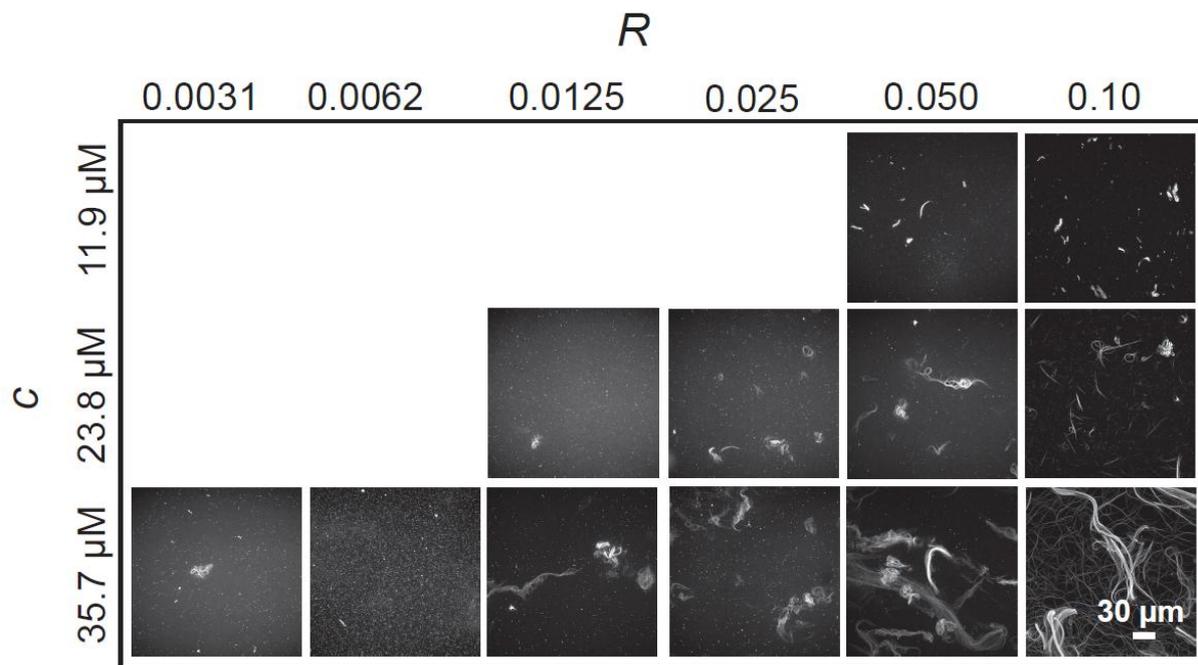
Supplementary Figure captions



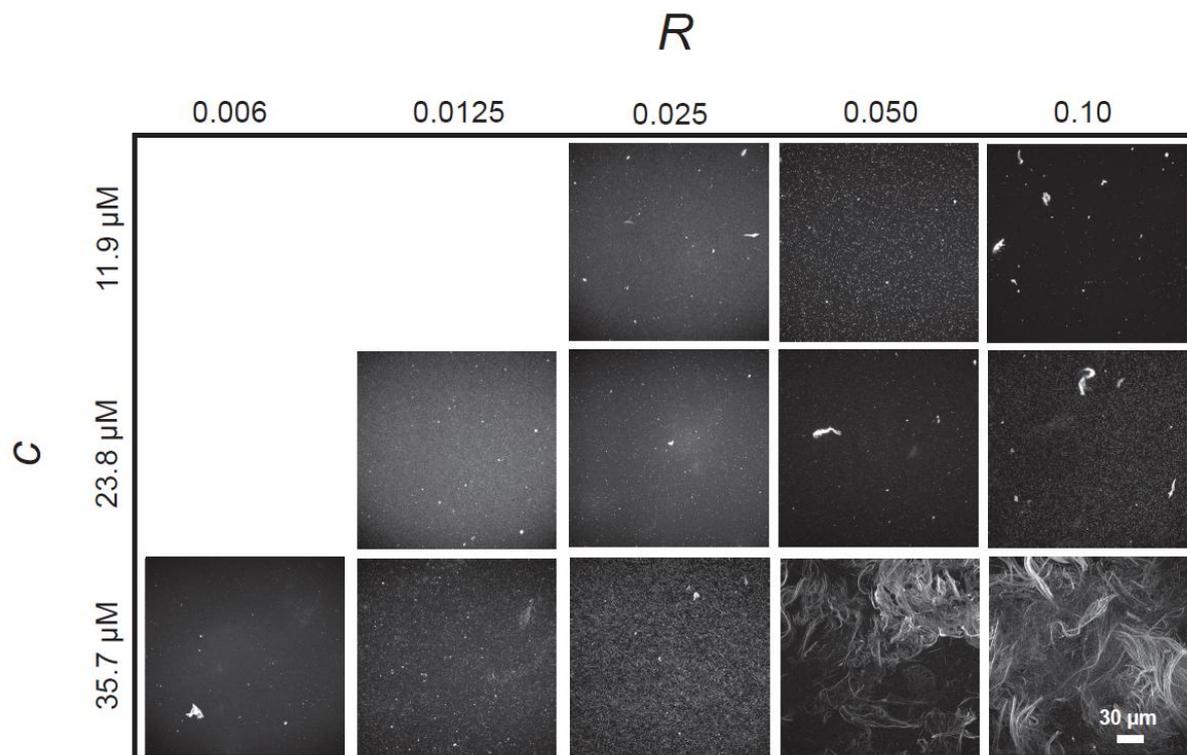
Online Resource 1 Confocal fluorescence images showing F-actin networks in solutions containing Mg^{2+} concentrations of (a) 1.42 mM and (b) 5.18 mM. No significant difference in the degree or extent of bundling is apparent.



Online Resource 2 Homogeneous F-actin networks at three actin concentrations. **A.** 11.9 μM . **B.** 23.8 μM . **C.** 35.7 μM . The scale bar applies to all images.



Online Resource 3 Confocal fluorescence images showing effects on F-actin network morphology by the mutant VASP Δ FAB for $c = 11.9, 23.8$ and $35.7 \mu\text{M}$. This mutant demonstrates that the GAB site alone is sufficient to produce F-actin bundles. The scale bar applies to all images.



Online Resource 4 Confocal fluorescence images showing effects on F-actin network morphology by the double mutant VASP Δ FABGAB for $c = 11.9, 23.8$ and $35.7 \mu\text{M}$. Loose bundles are observed only at $c = 35.7 \mu\text{M}$ and $R > 0.025$. The scale bar applies to all images.

Chapitre 4

Rôle de VASP dans la mécanique des comètes d'actine Arp2/3 dépendantes étudié par AFM.

Bien qu'il existe de nombreuses études sur la mécanique des cellules et des réseaux d'actine, il existe peu de mesures quantitatives effectuées sur les comètes d'actine formées à la surface de billes. À ce jour, seuls deux papiers rapportent la mesure des modules élastiques des comètes par mesures directes, l'un par une technique de micromanipulation (Marcy et al., 2004) et l'autre par piège optique (Gerbal et al., 2000). Il en ressort des estimations assez larges. Les premiers auteurs estiment un module de Young à 3,7kPa (pour des comètes grandies à la surface de billes de 2 μ m de diamètre) et les seconds auteurs établissent une fourchette de 1 à 10kPa (pour des comètes grandies à la surface de *Listeria*). Dans cette étude, nous avons mesuré le module élastique des comètes d'actine Arp2/3 dépendante en présence et en absence de VASP par la microscopie à force atomique (AFM : atomic force microscopy) basée sur la nano indentation.

4.1 Brève introduction sur L'AFM.

L'AFM, mise au point par G. Binnig, F. Quate et C. Gerber en 1985 est un type de microscopie à sonde locale à très haute résolution permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon à l'échelle du nanomètre et de mesurer des forces locales de surface. Ce type de microscopie est basé sur l'analyse de la surface d'un objet point par point par balayage avec une sonde placée à l'extrémité d'un ressort-lame ou « cantilever ». L'échantillon est mobile : il est supporté par des éléments piézoélectriques qui assurent un déplacement fin vers la pointe de la sonde. D'autres grandeurs physiques caractéristiques de l'objet peuvent être mesurées selon la sonde employée (capacité, intensité de rayonnement, courant...). Les mesures peuvent être réalisées dans divers environnements tels que les milieux sous vide, liquides ou ambiants.

Mesure des forces de surface.

La sonde consiste en une pointe très fine (dans notre cas : 2nm) de silicium ou de nitrure de silicium intégrée à l'extrémité d'un cantilever flexible qui balaye la surface de l'échantillon par contact. Un faisceau laser est focalisé sur le cantilever et est réfléchi dans une photodiode à quatre cadrans chargée d'enregistrer les déflexions du laser au fur et à mesure que la sonde rentre en contact, appuie et quitte l'échantillon (Figure 4.1).

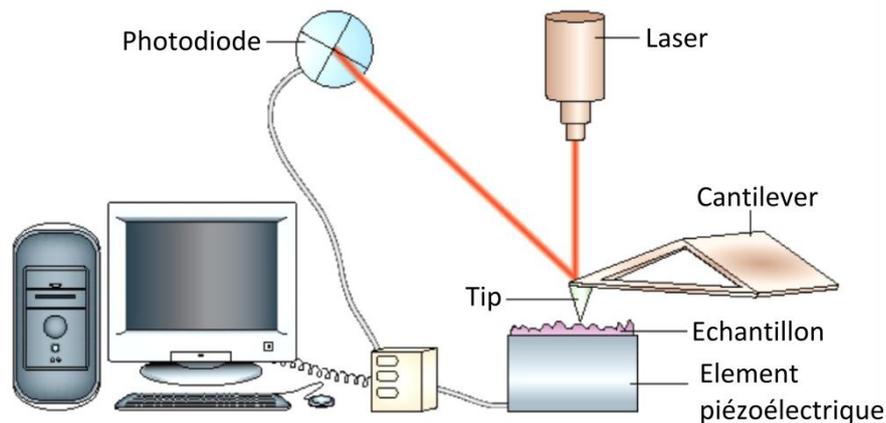


Figure 4.1 : Schéma d'un dispositif AFM. Un laser pointe sur le cantilever dont les déflexions, au contact de l'échantillon, sont enregistrées par une photodiode. Source : <http://www.geobacter.org/Nanowires>

Le cantilever obéit à la loi de Hooke qui dans le domaine élastique linéaire relie la déformation à la contrainte via le module de Young. Il est alors possible d'ajuster la courbe de force-distance pour en extraire le module de Young. Plus la pente de la courbe force-distance est forte et plus le module élastique (donc la rigidité de l'échantillon) est élevé.

La mesure des forces locales de surface par AFM commence par un cycle d'approche (courbe bleue) (Figure 4.2). L'échantillon est approché de la pointe de la sonde. La surface de celui-ci n'exerce encore aucune force sur la sonde et la courbe est plate (1). La pointe est ensuite appuyée contre la surface de l'échantillon. Le cantilever est dévié et l'on rentre dans le « régime de compliance » qui permet de déterminer les propriétés mécaniques de la surface de l'échantillon (2). Une fois le cycle d'approche terminé, le cycle de rétractation peut commencer (en orange sur le schéma). L'échantillon est éloigné de la sonde et le cantilever revient progressivement à sa position d'origine. Cependant, lors du retrait, des forces d'adhésions peuvent maintenir la pointe attachée à la surface de l'échantillon (3) jusqu'à ce que la force élastique du cantilever dépasse l'adhésion (4). La sonde revient alors à sa position d'origine (5).

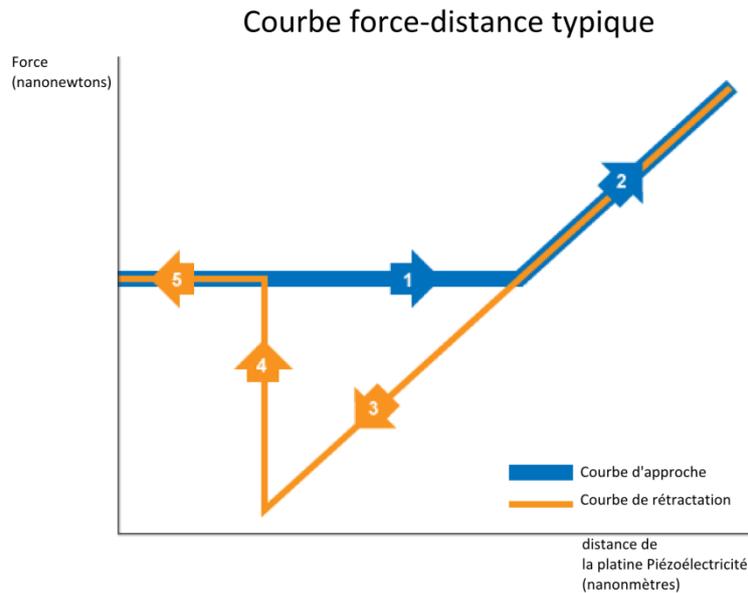


Figure 4.4 : Courbe distance typique. En bleu est représentée la courbe d'approche. En orange est représentée la courbe de rétraction.

D'après : <http://www.ammrf.org.au/myscope/spm/background/measure.php>

4.2 Observation des comètes par AFM.

Dans cette étude, nous utilisons le système de formation de comètes d'actine sur billes. Pour cela, nous adsorbons ensemble le peptide activateur du complexe Arp2/3 : VCA (issu de l'activateur N-WASP) et le peptide chargé de recruter VASP : PRO (issu de ActA : protéine exprimée par la *Listeria*) à la surface de billes de $1\mu\text{m}$ de diamètre.

Comme expliqué dans le chapitre 2, les comètes présentent la même vitesse initiale de croissance en présence ou en absence de VASP, mais des longueurs différentes grâce à l'accélération de la brisure de symétrie induite par VASP (Figure 4.3a). Les images d'épifluorescence et AFM des comètes fixées et séchées montrent la même tendance : une décroissance graduelle du diamètre des comètes en direction de la bille (Figure 4.3b et c). Des coupes transversales extraites des mesures en AFM confirment cet amincissement (Figure 4.4) : A l'arrière, les comètes ont un diamètre deux fois supérieur à celui des billes qui les supportent ($2\mu\text{m}$), et celui-ci diminue progressivement en direction de la surface des billes, jusqu'à équivaloir au diamètre de la bille. La bille finit par s'arrêter et se détache de la comète.

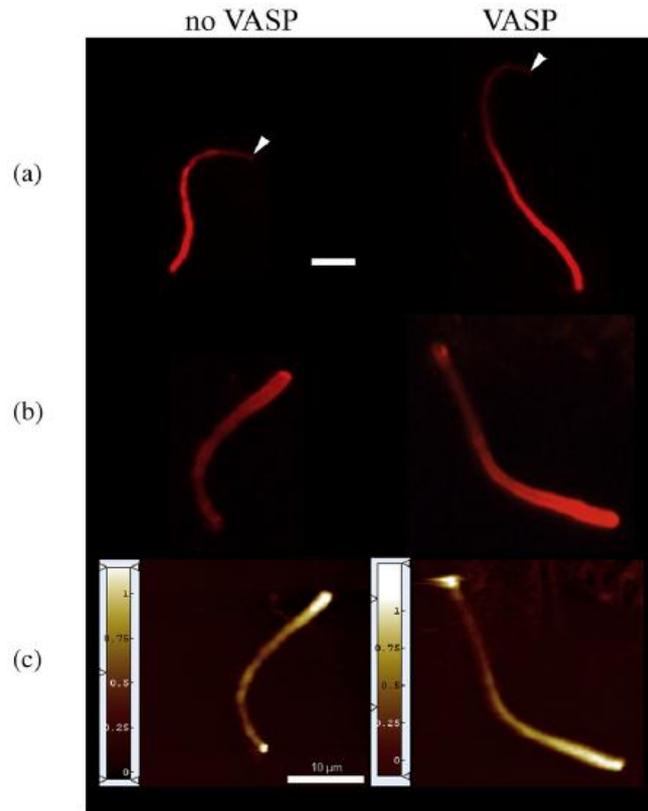


Figure 4.5 : Observation de comètes d'actine en présence (droite) ou en absence de VASP (gauche) en combinant épifluorescence et AFM. (a) les comètes ont été mises à pousser en chambre humide 2 heures. La flèche indique la position de la bille. (b) et (c) images de comètes fixées en 4% glutaraldehyde et séchées respectivement observées en épifluorescence puis en AFM. L'intensité de fluorescence ainsi que la largeur des comètes décroissent depuis l'extrémité de la comète jusqu'à la bille.

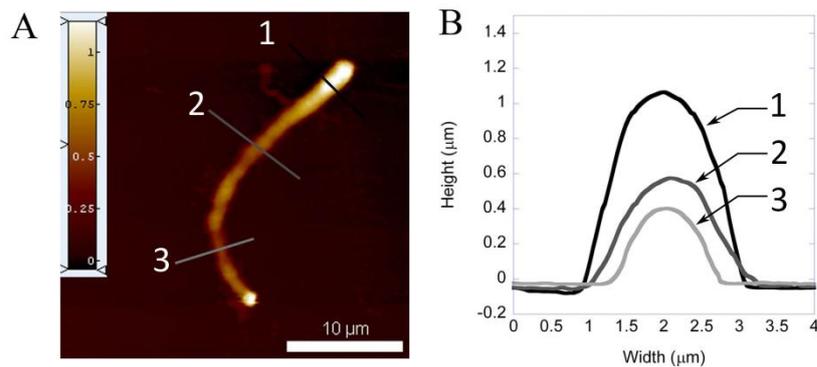


Figure 4.4: Analyse dimensionnelle de la comète sans VASP montré en Figure 3c. Les profils d'épaisseur et de largeur de trois sections (1, 2 et 3) sont représentés en et confirment un amincissement de la comète en direction de la bille.

La réduction de la largeur des comètes est plus graduelle en présence qu'en absence de VASP (Figure 4. 3b et c) et leur détachement intervient significativement plus tardivement, comme en témoigne un meilleur maintien de la vitesse moyenne de croissance (Figure 4.5). Avec VASP la vitesse se maintient à la vitesse initiale de $0,4 \mu\text{m}/\text{min}$ pendant plus d'une heure avant de chuter brusquement à 0. Sans VASP, la vitesse décroît graduellement dès le départ.

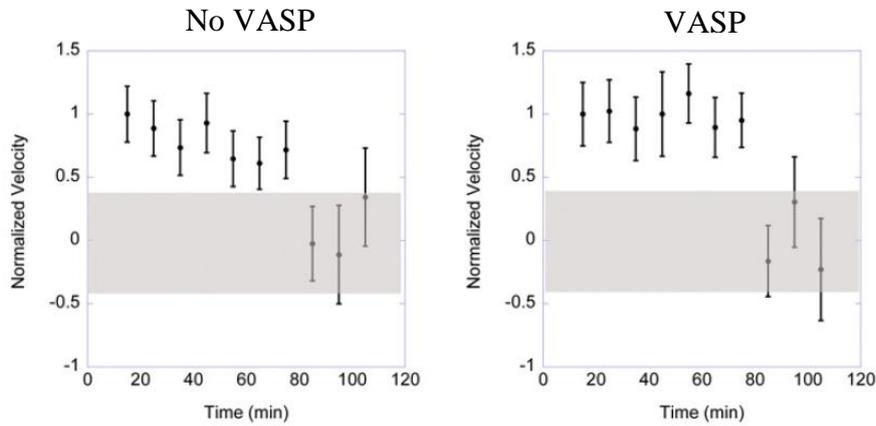


Figure 4.5 : En absence (a) ou en présence (b) de VASP, les comètes présentent une vitesse de croissance initiale équivalente ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$). Celle-ci est maintenue plus longtemps en présence qu'en absence de VASP. Les vitesses dans la zone grise sont considérées comme proche de zéro.

Une autre manifestation de ce phénomène est la distribution des tailles des comètes (Figure 4.6). Elle s'élargit et perd sa forme gaussienne au cours du temps en absence de VASP, vraisemblablement parce que les billes ayant perdu leur comète en reforment une autre, décalant la distribution. Par contre en présence de VASP, la distribution reste gaussienne et présente un élargissement vers les longueurs plus petites (Figure 4.6).

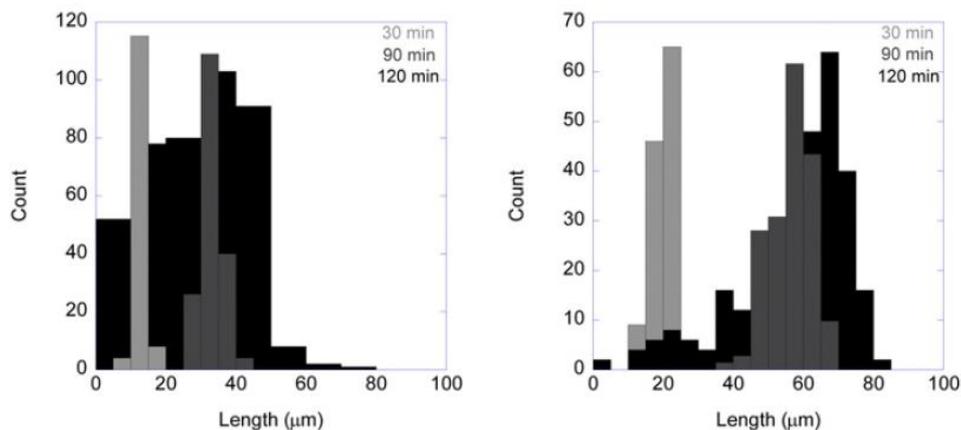


Figure 4.6: histogrammes des longueurs de comètes poussées en présence ou en absence de VASP à trois temps différents (30, 90 et 120min). La distribution s'élargit et perd sa forme gaussienne après 90min. L'élargissement de la distribution vers les petites longueurs en absence de VASP est plus prononcé qu'en sa présence. VASP participe au maintien de la vitesse de croissance de la comète et à son attachement à la surface de la bille.

Nous avons cherché les raisons de l'amincissement des comètes et de la perte de motilité. Quand la concentration en ATP est doublée, les comètes présentent une vitesse initiale ($0,4 \pm 0,1 \mu\text{m}/\text{min}$) et un amincissement similaires aux comètes obtenues en conditions standard. Nous avons aussi testé la possibilité que cet amincissement résulte d'une déplétion du mix en ingrédients essentiels à la motilité par des expériences « deux couleurs ». Dans ces expériences, les comètes sont d'abord mises à pousser dans un mélange de protéines avec de l'actine verte. Après quelques minutes, un mélange frais contenant de l'actine rouge est additionné à la réaction, permettant de visualiser le moment du rajout du nouveau milieu dans l'histoire de la comète (Figure 4.7). Après l'ajout d'un mix de motilité en actine rouge au mix de motilité en actine vert, il y a un élargissement léger de la comète visible en fluorescence (Figure 4.7a) et confirmé en AFM (Figure 4.7b). Toutefois, les comètes ne retrouvent jamais leur largeur d'origine et poursuivent leur amincissement progressif. Le nuage d'actine observé autour des comètes fixées au glutaraldéhyde (Figure 4.7b) provient probablement de l'actine non utilisée dans le milieu et n'est pas observé en conditions standard. L'amincissement ainsi que la diminution d'intensité de fluorescence de la comète ne sont donc pas dus à l'épuisement du milieu en protéines nécessaires à la motilité.

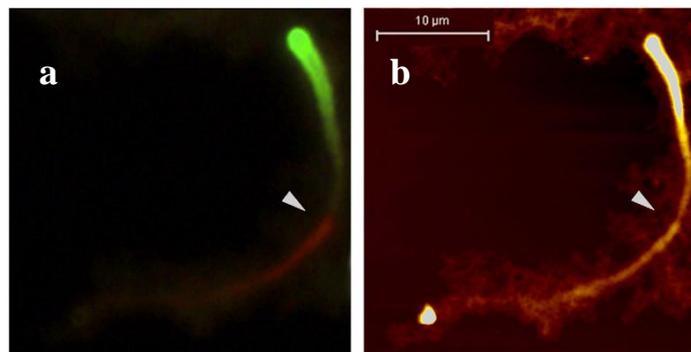


Figure 4.7 : Images d'une comète observée (a) en épifluorescence puis (b) en AFM d'une comète fixée en 4% glutaraldéhyde et séchée. La comète pousse d'abord dans un mix de motilité contenant de l'actine-Alexa488. Au bout de 30 minutes la réaction est complétée en mix de motilité contenant de l'actine-Alexa594 (flèche) et laissée incuber 90 min supplémentaires. Le nuage d'actine visible autour de la comète en AFM est un artefact de fixation au glutaraldéhyde.

Ensemble, ces observations indiquent que VASP participe au maintien de la vitesse de croissance des comètes ainsi qu'à leur attachement à la surface des billes. Un résultat similaire a été trouvé par Samarin et al. VASP porte un site de liaison à l'actine G et actine-F. Le domaine GAB qui est homologue au domaine WH2 de N-WASP. Il a été montré respectivement par Co et al., 2007 et Hansen et al., 2010 que le domaine WH2 de N-WASP est nécessaire au maintien de la comète à la surface de la bille en capturant les bouts barbés des filaments d'actine et que les domaines GAB et FAB de VASP sont indispensables à son association aux bouts barbés. Il est alors envisageable que comme N-WASP, VASP participe à la capture et au maintien des bouts barbés à la surface de la bille

via son GAB et son FAB. Il est également envisageable que l'activité cross-linking de VASP favorise cet attachement. Hu and Kuhn, 2012 ont en effet montré que la formation de bundles d'actine par la fascine favorise l'attachement de la comète à la bille, probablement en augmentant la processive de la capture des bouts + par les domaines WH2 de de WASP.

4.3 Effet du recrutement de VASP sur le module élastique des comètes.

Les effets de VASP sur les propriétés élastiques des comètes d'actine sont sondés par nanoindentation en AFM. Les comètes d'actine sont mises à pousser en absence et en présence de VASP puis fixées à la phalloïdine pour les protéger de la dépolymérisation sans gêner les sites de liaison des protéines partenaires. Comme attendu, les comètes sont plus molles que le substrat en verre et apparaissent en foncées sur la carte du module de Young (Figure 4.8b).

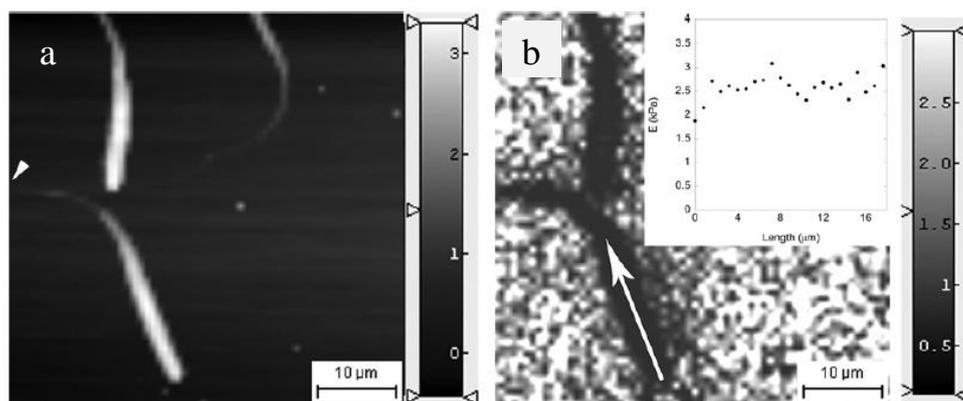


Figure 4.8 : Mesure du module élastique des comètes en présence de 250nM VASP. (a) représente la carte des hauteurs et (b) la carte des forces acquises par nanoindentation par AFM. L'insert en (b) représente le module élastique extrait de la carte des forces le long d'une même comète. La comète apparaît en noir moins rigide que le substrat.

Pour tester les effets du recrutement de VASP sur les propriétés mécaniques des comètes, les expériences suivantes sont effectuées. Dans un cas, les billes habillées avec les peptides VCA et PRO sont incubées en absence ou en présence de 200nM VASP dans le mélange de motilité (Figure 4.9a). Dans un second cas, des billes habillées uniquement avec VCA (Figure 4.9b noir) ou VCA et PRO (Figure 4.9b gris) sont incubées en présence de 200nM VASP dans le mélange de motilité.

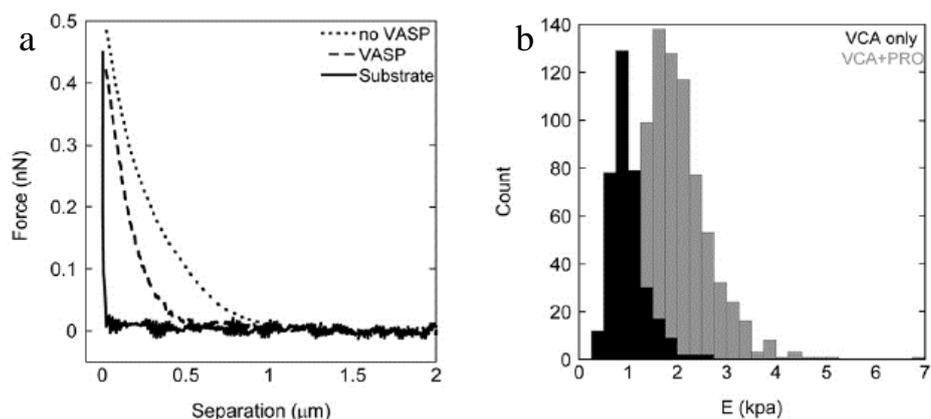


Figure 4.9 : (a) courbes de force obtenues à partir de comètes poussées sur des billes VCA/PRO en absence de VASP, en présence de VASP et à partir du substrat de verre. Les courbes de forces montrent que les comètes poussées en absence de VASP ont un module élastique plus faible que les comètes poussées en présence de VASP. (b) Histogramme représentant l'élasticité des comètes en présence de VASP poussées sur les billes VCA ou VCA/PRO. VASP augmente l'élasticité des comètes, donc leur rigidité, uniquement lorsqu'elle est recrutée à la surface des billes par PRO.

Le module de Young estimé à partir des comètes poussées en absence de VASP ($1,10 \pm 0,14 \text{ kPa}$; $n=144$) est similaire à celui des comètes poussées en présence de VASP mais en sans PRO à la surface des billes ($1,10 \pm 0,25 \text{ kPa}$; $n=354$). En revanche avec PRO à la surface des billes, le module de Young estimé des comètes augmente environ de deux fois en présence de VASP ($2,05 \pm 0,25 \text{ kPa}$, $n=803$). VASP augmente le module de Young, donc l'élasticité des comètes d'actine, uniquement lorsqu'il est recruté à la surface des billes par PRO.

Bien que la phalloïdine altère la longueur de persistance des filaments d'actine (Isambert et al., 1995), la structure des filaments d'actine stabilisés à la phalloïdine serait plus proche de celle des filaments d'actine-ATP que celle des filaments d'actine-ADP (Ichetovkin et al., 2002). Des modèles informatiques suggèrent que l'état de la molécule d'ATP détermine la structure du filament d'actine-F, donc, la longueur de persistance de celui-ci (Pfaendtner et al., 2009). Il semble alors que la phalloïdine, plutôt que d'altérer la mécanique des filaments d'actine-F, la préserve. Aussi, les comètes d'actine Arp2/3 dépendantes stabilisées à la phalloïdine ont un module de Young autour de 1kPa en accord avec des travaux précédents (Gerbai et al., 2000; Marcy et al., 2004). Cette valeur est 1000 fois supérieure au module de Young dynamique mesuré dans des réseaux d'actine-F assemblés à $24 \mu\text{M}$ actine en présence de $0,48 \mu\text{M}$ Arp2/3 (Nakamura et al., 2002). Des expériences de sédimentation (Abraham et al., 1999; Wiesner et al., 2003; Paluch et al., 2006) ont permis d'estimer la concentration locale en actine dans les comètes à environ 1mM, soit une concentration similaire à celle trouvée dans les lamellipodes. Le module élastique est à peu près proportionnel au carré de la concentration en actine. Ce serait donc la concentration accrue en actine dans les comètes comparées au réseaux formés en solution qui expliquerait cette différence d'un facteur 1000 (MacKintosh et al., 1995).

Cette étude nous permet de conclure que VASP augmente la rigidité de la comète uniquement quand elle est recrutée à la surface de la bille. Sa simple présence dans la solution n'affecte pas la rigidité. Pour des raisons encore mal comprises, ce résultat n'est pas complètement en accord avec ce que nous avons observé avec les billes pVCA (Chapitre 2).

4.4 Effet de la concentration en VASP sur le module élastique.

Des comètes sur des billes VCA/PRO sont ensuite mises à pousser en présence de différentes concentrations en VASP (de 0 à 400nM) à force ionique constante. Toutes croissent à des vitesses similaires ($0,4\pm 0,1\mu\text{m}/\text{min}$). De plus, la morphologie de ces comètes après deux heures d'incubation est indiscernable en épifluorescence (Figure 4.10a). Les expériences de nano-indentation révèlent que le module élastique de ces comètes ne change pas pour des concentrations en VASP inférieures à 150nM et augmente linéairement avec la concentration en VASP dans une fourchette comprise entre 150 et 300nM (Figure 4.10b et Tableau 4.1).

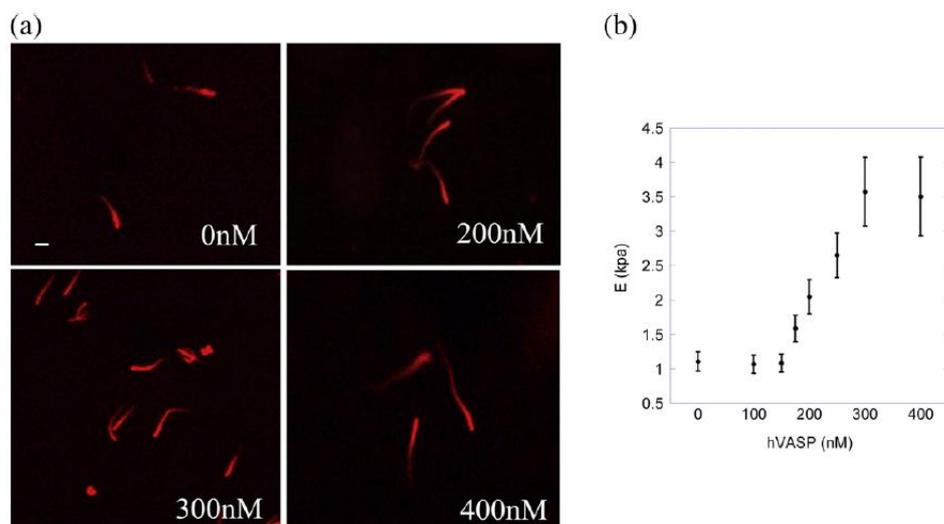


Figure 4.10 : Effets de différentes concentrations en VASP sur le module élastique des comètes à haute concentration en sels ($\approx 130\text{mM}$ KCl). (a) images en épifluorescence de comètes d'actine stabilisées à la phalloïdine et poussées en présence de 0, 200, 300 et 400nM VASP pendant deux heures en milieu liquide. Les comètes présentent la même morphologie ainsi que la même vitesse de croissance initiale ($0,4\pm 0,1\mu\text{m}/\text{min}$) Barre d'échelle = $10\mu\text{m}$. (b) Le module élastique des comètes reste constant à 1kPa en dessous de 150nM VASP. Au-dessus de cette concentration, le module élastique augmente presque linéairement avec la concentration en VASP de manière dose-dépendante avant saturation à 300nM.

Human VASP [nM]	E [kPa] (n)
0	1.10±0.14 (144)
100	1.07±0.13 (118)
150	1.08±0.13 (191)
175	1.59±0.19 (151)
200	2.05±0.25 (803)
250	2.65±0.33 (397)
300	3.57±0.50 (48)
400	3.50±0.57 (33)

Tableau 4.1 : Effet de la gamme de concentrations en VASP et ses effets sur le module élastique des comètes d'actine.

Il ressort une dépendance linéaire avec une pente de 16Pa par nano molaire de VASP. Après 300nM VASP, le module élastique des comètes atteint un plateau, indiquant que tous les sites de réticulation accessibles dans la comète sont probablement saturés.

En présence ou en absence de VASP, les comètes contiennent à peu près la même concentration d'actine. Le triplement observé du module élastique en présence de quantités croissantes de VASP doit être dû à une augmentation du nombre de liens de réticulation entre les filaments d'actine. Or, il a été montré que VASP réduit le nombre de branches formées par le complexe Arp2/3 (Skoble et al., 2001; Bear et al., 2002; Plastino et al., 2004). Samarin et al. Rapportent une diminution du nombre de branches de trois à quatre. Cependant, il existe également une controverse quant aux effets des branches formées par Arp2/3 sur le module élastique des réseaux d'actine. Certains auteurs concluent qu'il n'y a aucun effet quand d'autres concluent à une augmentation du module élastique (Nakamura et al., 2002; Tseng and Wirtz, 2004). Il est de toute façon inattendu d'observer en présence de VASP une augmentation du module élastique des comètes alors que le nombre de branches est censé diminuer. L'augmentation de la rigidité des comètes est alors consécutive à VASP via son activité de réticulation et/ou de formation de faisceaux d'actine. Aussi, au regard des effets de VASP sur le module de Young, il est probable que l'amélioration de l'attachement des comètes à la bille observée en présence de VASP soit le résultat direct de l'activité de réticulation de VASP.

En résumé, en conditions physiologiques en sels, le recrutement de VASP à la surface des billes augmente le module élastique des comètes d'actine ce qui pourrait renforcer l'attachement des comètes à leur bille et autoriser ainsi une meilleure persistance de leur propulsion.

4.5 Effet de la force ionique du mix de motilité sur le module élastique.

Des comètes poussées en absence ou en présence de 200nM VASP montrent différentes réponses à des changements de force ionique du mix de motilité de 50 à 200mM en KCl. En l'absence de VASP, il n'y a pas de différence de morphologie observée en épifluorescence aux différentes

concentrations en sel. En revanche, en présence de VASP, l'augmentation de la force ionique du milieu a pour conséquence l'augmentation de la taille des comètes (Figure 4.11a). Ainsi, en présence de VASP, l'amincissement graduel est moins visible à 200 qu'à 50mM KCl (Figure 4.11b).

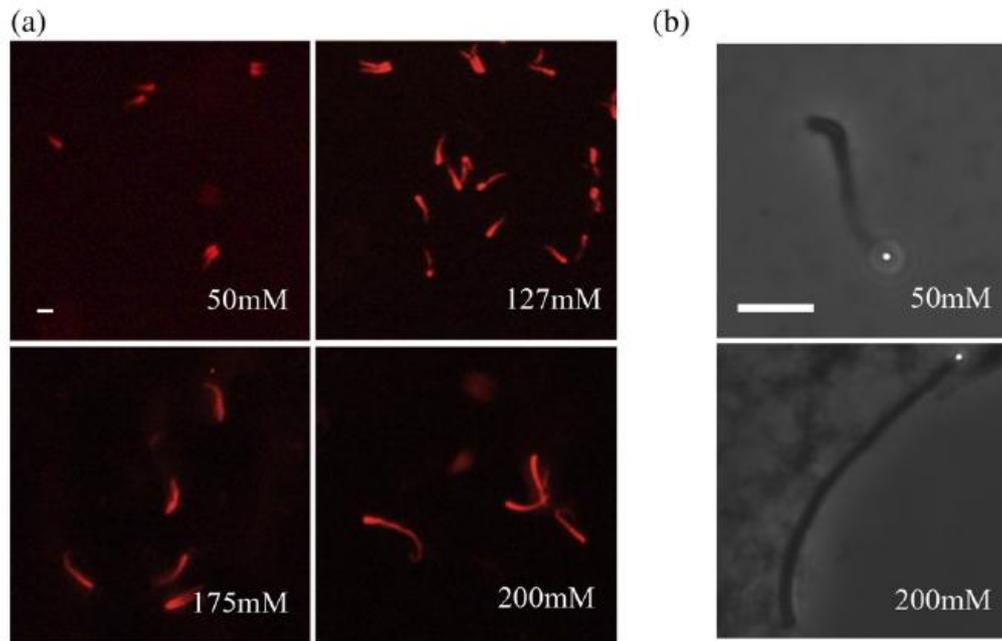


Figure 4.11 : Effet de la concentration en KCl sur la morphologie des comètes poussées en présence de VASP. (a) images en épifluorescence de comètes d'actine poussées en présence de 200nM VASP et 50, 127, 175 ou 200mM KCl pendant deux heures en milieu liquide. La longueur des comètes augmente avec la force ionique. (b) Images en contraste de phase de comètes poussées en présence de 200nM VASP et 50 ou 200mM KCl pendant 30 min. l'amincissement de la comète est moins visible à 200mM qu'à 50mM KCl. Barres d'échelle = 10µm.

Le module élastique (Tableau 2) des comètes poussées en absence de VASP reste constant aux environs de 1kPa sur toute la gamme de concentration en KCl (Figure 12a, ronds) alors qu'il augmente linéairement avec la force ionique en présence de VASP (Figure 12a, carrés), avant de saturer à 175mM KCl. Cette dépendance linéaire avec une pente de 6Pa par millimolaire de KCl montre que la force ionique du mix de motilité a un impact mesurable sur le module élastique des comètes poussées en présence de VASP. L'augmentation du module élastique s'accompagne d'une augmentation de la longueur des comètes (Figure 12b).

Le module élastique des comètes poussées en absence de VASP reste constant aux environs de 1kPa sur toute la gamme de concentration en KCl (Figure 4.12a, ronds pleins) alors qu'il augmente linéairement avec la force ionique en présence de VASP (Figure 4.12a, carrés pleins) avant de saturer à 175mM KCl (Tableau 2). Cette dépendance linéaire avec une pente de 6Pa par millimolaire de KCl montre que la force ionique du mix de motilité a un impact mesurable sur le module élastique des

comètes poussées en présence de VASP. L'augmentation du module élastique s'accompagne d'une augmentation de la longueur des comètes (Figure 4.12b).

KCl [mM]	No VASP	VASP	
	E [kPa] (n)	E [kPa] (n)	Length [μ m]
50	1.1 \pm 0.15 (48)	1.7 \pm 0.24 (52)	12 \pm 2
86	1.2 \pm 0.16 (60)	1.7 \pm 0.25 (177)	14 \pm 2
127	1.2 \pm 0.18 (31)	2.1 \pm 0.30 (37)	20 \pm 2
175	1.2 \pm 0.18 (116)	2.4 \pm 0.34 (204)	35 \pm 4
200	1.0 \pm 0.15 (66)	2.2 \pm 0.30 (105)	44 \pm 6

Tableau 4.2 : Gamme de concentrations en KCl et ses effets sur le module élastique des comètes d'actine en présence (200nM) ou en absence de VASP.

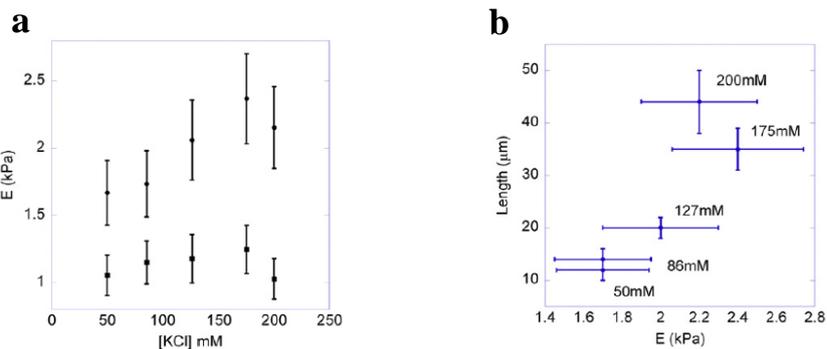


Figure 4.12 : (a) Les comètes poussées en présence de 200nM VASP voient leur module élastique augmenter avec la force ionique avant de saturer à 175mM KCl (ronds pleins, tracé du haut). Les comètes poussées en l'absence de VASP sont insensibles à la variation de concentration en KCl (carrés pleins, tracé du bas). (d) Longueur des comètes d'actine poussées en présence de 200nM VASP et différentes concentrations en KCl, en fonction de leur module élastique. La longueur ainsi que le module élastique augmentent avec la force ionique en présence de VASP.

Ces résultats indiquent que les comètes poussées uniquement de manière Arp2/3 dépendante sont insensibles à la force ionique du mélange de motilité. Les augmentations du module élastique et de longueur observées sont imputables à VASP, et sont potentialisées par l'augmentation de la force ionique.

Le fait que la capacité de VASP à lier l'actine-F soit sensible au sel a soulevé la question de la pertinence physiologique de cette interaction (Schirenbeck et al., 2006; Breitsprecher et al., 2011). Dans un cas, il a été montré que l'affinité de VASP pour les filaments d'actine diminue en augmentant la force ionique (Hüttelmaier et al., 1999). Dans un autre cas, les activités de liaison à actine-F et de formation des faisceaux d'actine de VASP sont maintenues en augmentant la force ionique (Schirenbeck et al., 2006). Cependant, toutes ces études ont été conduites avec des concentrations en actine de l'ordre du micro molaire avec des concentrations en sels (KCl) plus bas que dans notre étude. Nous montrons ici que pour des concentrations d'actine de l'ordre du milli molaire, le module élastique augmente en

augmentant la force ionique du milieu de 50 à 200mM en présence de VASP. Une amélioration de la persistance de croissance des comètes est également observée en présence de VASP en augmentant la force ionique. Cet effet pourrait être le résultat d'une augmentation de l'activité de formation de faisceaux d'actine de VASP ou un résultat indirect d'une augmentation de l'interaction ionique entre les filaments d'actine plus alignés en présence de VASP comme observé par (Plastino et al., 2004).

L'ensemble de ces résultats indique que dans les cellules où la concentration en actine peut être aussi élevée que dans les comètes, VASP pourrait jouer sur les propriétés élastiques des réseaux d'actine formés par le complexe Arp2/3.

4.6 Bilan.

Lorsque que nous avons initiée cette étude, nous voulions vérifier l'existence d'un lien entre vitesse de déplacement des billes et rigidité des comètes d'actine sous l'action de VASP. Or, nous travaillions encore avec le système de billes VCA/PRO dont on sait aujourd'hui qu'il ne permet pas à VASP d'augmenter la vitesse de déplacement des billes. Néanmoins, nous savions que VASP était recrutée à la surface des billes VCA/PRO et présentait un effet sur la pousse des gels dont il accélérât la brisure de symétrie (chapitre 2). Nous avons donc pu réaliser un certain nombre d'observations. Ainsi, nous montrons en microscopie à force atomique que VASP augmente de manière dose dépendante la rigidité des comètes d'actine lorsqu'elle est recrutée à la surface des billes. De plus, nous montrons que VASP permet un meilleur attachement de la comète à la surface de la bille ainsi qu'un meilleur maintien de leur vitesse de polymérisation. Enfin, nous montrons que des concentrations croissantes en KCl potentialisent les effets de VASP sur le module élastique et l'attachement des comètes aux billes.

4.7 Conclusions et perspectives.

Cette étude complète les expériences de rhéologie présentées en chapitre 3. En mesurant les effets de VASP sur la rigidité des comètes, nous utilisons un système dont les concentrations en actine se rapprochent de celles du lamellipode. De plus, contrairement au chapitre 3 où VASP est incubée en présence de filaments d'actine préformés, les effets de VASP sont ici mesurés sur des réseaux dynamiques initiés par le complexe Arp2/3. Cependant, maintenant que l'importance du recrutement conjoint de VASP et du complexe Arp2/3 par la même molécule est comprise, la suite logique de cette étude serait d'effectuer des expériences similaires avec le système de billes pVCA-WASP dont VASP augmente la vitesse de propulsion. Au terme de ces travaux, les effets de VASP sur la structure des comètes d'actine ne sont pas bien compris. Les tentatives de résolution de la structure de la comète par

sondage avec la pointe AFM ne se sont pas révélées satisfaisantes. Aussi, nous ne pouvons émettre que des hypothèses. Nous envisageons par exemple que VASP favorise la formation de faisceaux d'actine, augmentant ainsi la rigidité globale de la comète. Pour trancher cette question, il serait envisageable d'observer en microscopie électronique la structure des comètes poussées en présence de VASP. L'apport des nombreux mutants VASP que nous possédons aujourd'hui permettrait également de mieux décortiquer les modalités d'action de VASP sur la mécanique des comètes d'actine.

En lien avec le chapitre 3, cette étude contribue à comprendre comment VASP agit sur la mécanique des réseaux d'actine grâce à un système se rapprochant plus fidèlement du lamellipode. Là encore, ces résultats devraient aider à comprendre la contribution mécanique de VASP aux phénomènes de protrusion membranaire.

Article publié dans *Journal of Molecular Biology*.

The role of VASP in an Arp3/3-complex-based motility assay.

→ *Collaboration dans le cadre d'un financement HFSP avec Sandy Swei et Laurent Kreplak, Dalhousie University, Canada.*

Sandy Swei¹, Rajveer Seyan¹, Philippe Noguera², John Manzi², Julie Plastino² and Laurent Kreplak¹

¹Department of Physics and Atmospheric Science, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada B3H 3J5

²Laboratoire Physicochimie Curie, Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 6, 75231 Paris Cedex 05, France



The Mechanical Role of VASP in an Arp2/3-Complex-Based Motility Assay

Sandy Sui¹, Rajveer Seyan¹, Philippe Noguera², John Manzi², Julie Plastino² and Laurent Kreplak^{1*}

¹Department of Physics and Atmospheric Science, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada B3H 3J5

²Laboratoire Physicochimie Curie, Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique, Paris 6, 75231 Paris Cedex 05, France

Received 29 April 2011;
received in revised form
11 August 2011;
accepted 30 August 2011
Available online
10 September 2011

Edited by W. Baumeister

Keywords:

atomic force microscopy;
nanoindentation;
mechanical properties;
elastic modulus;
actin comets

The comet motility assay, inspired by *Listeria* locomotion, has been used extensively as an *in vitro* model to study the structural and motile properties of the actin cytoskeleton. However, there are no quantitative measurements of the mechanical properties of these actin comets. In this work, we use nanoindentation based on atomic force microscopy to measure the elastic modulus of actin comets grown on 1- μ m-diameter beads in an Arp2/3 (actin-related proteins 2 and 3)-complex-dependent fashion in the absence and in the presence of VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*). Recruitment of VASP to the bead surface had no effect on the initial velocity or morphology of the comets. Instead, we observed an improved contact of the comets with the beads and an increased elastic modulus of the comets. The VASP-mediated increase in elastic modulus was dependent on both concentration and ionic strength. In conclusion, we propose that VASP plays a mechanical role in Arp2/3-complex-dependent motility by amplifying the elastic modulus of the thus assembled actin network and, consequently, by strengthening its cohesion for persistent protrusion.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The actin cytoskeleton is responsible for locomotion in eukaryotic cells through the assembly of actin filaments at the plasma membrane. One way to investigate the role of individual actin binding proteins *in vitro* is to use a bead motility assay inspired by *Listeria* locomotion in cells.¹ These bacteria were found to hijack the cytoskeleton for its transportation by recruiting actin filaments and actin binding proteins at its surface via ActA. This protein recruits the Arp2/3 (actin-related proteins 2 and 3) complex, an actin filament nucleation and branching molecule,^{2,3} as well as VASP (*vasodilator-stimulated phosphoprotein*) proteins, which are key

regulators of dynamic actin networks. The Ena/VASP protein family has been associated with increased protrusion and reduced branching.⁴ The system was subsequently simplified for easier adjustments *in vitro* by replacing the bacteria with beads functionalized with peptides to initiate actin polymerization and to recruit VASP, and by replacing cell extracts with a minimal mix of purified proteins that reconstituted movement.^{1,5,6} Moreover, it has been demonstrated that VASP alone distributes throughout the comet,⁷ whereas coating the beads with PRO, a VASP-recruiting domain of ActA, results in further recruitment of VASP at the bead surface. Hard beads, such as polystyrene microspheres, are routinely used to examine actin comet growth, velocity, and morphology.⁸ Alternatively, soft supports, such as lipid vesicles, endosomes, and oil droplets, were used to demonstrate that actin polymerization generates stress that can change the shape of the support.^{7,9–12} The terms

*Corresponding author. E-mail address: kreplak@dal.ca.

Abbreviations used: AFM, atomic force microscopy; BSA, bovine serum albumin.

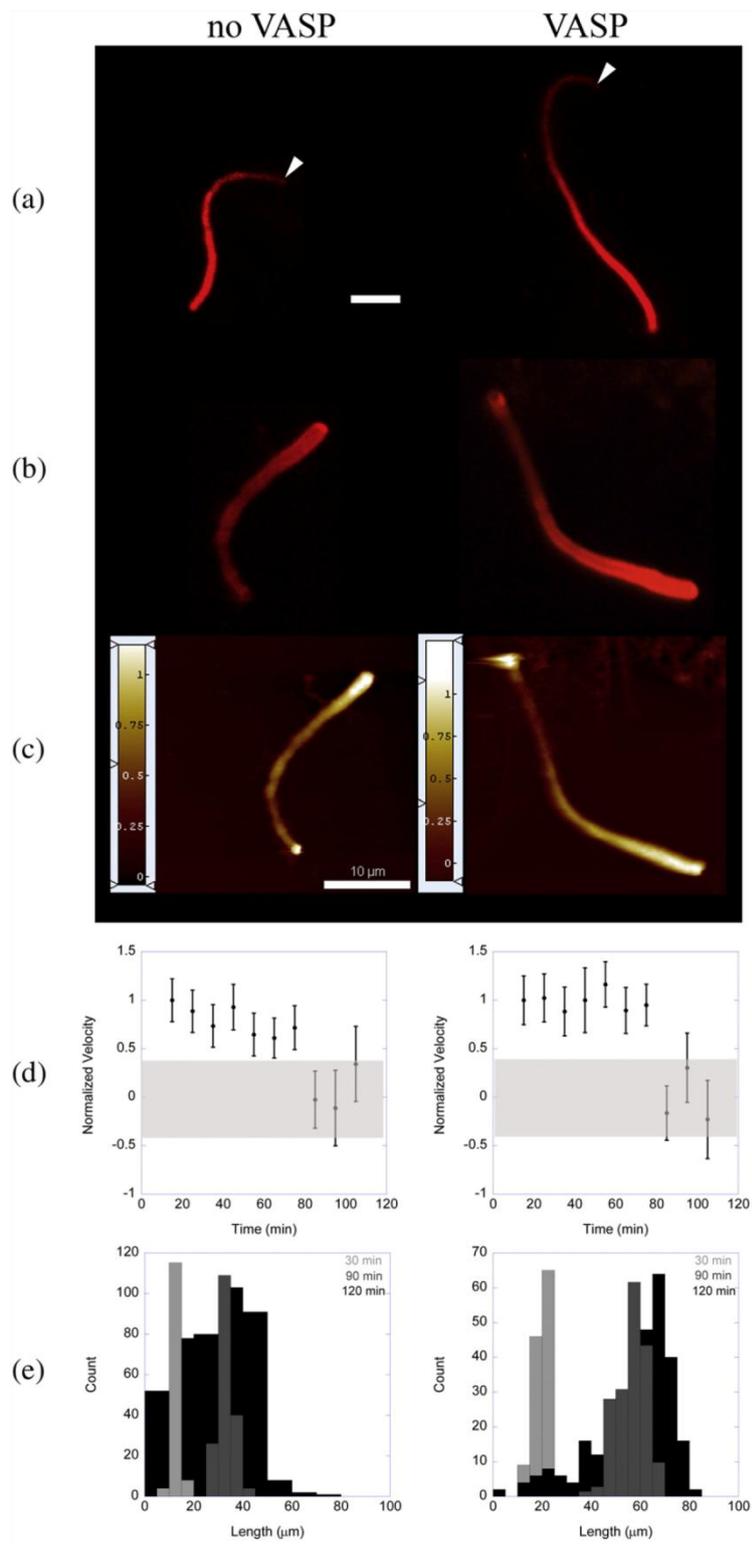


Fig. 1 (legend on next page)

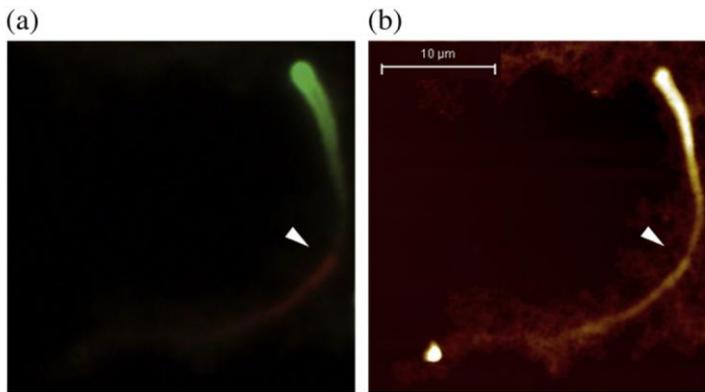


Fig. 2. Representative correlative epifluorescence (a) and AFM images (b) of a comet fixed and dried with 4% glutaraldehyde, first grown in a motility medium containing Alexa-Fluor488 actin for 30 min (arrow-head) then supplemented with a motility medium containing Alexa-Fluor594 actin and further incubated for 90 min. This indicates that the gradual decay was not due to actin depletion in the motility medium. Note that the actin cloud surrounding the comet in the AFM image is an artifact of glutaraldehyde fixation.

'hard' and 'soft' are used in comparison with the elastic modulus of the actin comets, which is still poorly defined. The only two direct measurements of the elastic modulus of actin comets used micromanipulation technique¹³ and optical trap,¹⁴ respectively. The first approach yielded an estimated Young's modulus of 3.7 kPa for a comet grown on a 2- μ m-diameter polystyrene microsphere.¹³ The second one provided a rough estimate of the Young's modulus of a *Listeria* tail of between 1 and 10 kPa.¹⁴

VASP has several putative roles, including salt-sensitive actin filament bundling, anti-capping, and recruitment of actin filaments at focal adhesion sites.^{15–19} Yet, it is unclear how the actin bundling activity of VASP is involved, if at all, in increasing protrusion under physiological salt conditions. Here we combine epifluorescence and atomic force microscopy (AFM)-based nanoindentation to study the mechanical properties of actin comets in the absence and in the presence of VASP.

Results

Comet growth and morphology

Initial velocity was determined by averaging the velocities for the first 40 min of comet growth for

comparison purposes, as described previously.²⁰ However, in order to obtain long comets to facilitate AFM-based nanoindentation, we incubated the assays for 2 h prior to imaging. In the absence and in the presence of VASP, comets had the same initial velocity ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$) and similar morphology, apart from their lengths (Fig. 1a). A gradual decay in width (Fig. 1b and c) towards the bead direction that led to comet detachment was observed in both types of comets (see Movie S1 in Supporting Material), as seen previously.²¹ We showed, using a two-color experiment, that this decay in width was not due to the depletion of ingredient components in the motility medium (Fig. 2). After the addition of red-labeled actin in the motility medium, there was a slight broadening in both epifluorescence (Fig. 2a) and height image (Fig. 2b). Still, the width of the comets never recovered back to its original value, and comets underwent the same gradual decay as if there was no fresh additional actin. Notably, the actin cloud observed in the height image (Fig. 2b) was possibly the unused actin in the motility medium that was simultaneously fixed with the comets by glutaraldehyde, which was not observed under standard conditions (Fig. 1c). Similarly, with double the ATP concentration, comets had the same initial velocity ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$) and decay in width compared to the standard ones. The cross sections of comets (Fig. S1b) extracted from the

Fig. 1. Visualization of actin comets grown in the absence (left) and in the presence (right) of VASP by combining epifluorescence and AFM. Representative epifluorescence images (a)) of comets grown for 2 h in a wet chamber. Arrowheads indicate the position of the beads. Correlative epifluorescence (b) and AFM (c) images of comets fixed and dried in 4% glutaraldehyde. Notice that both the fluorescence intensity and the width decreased from the end of the comet to the bead. (d) Comets grown in the absence and in the presence of VASP had similar initial velocities ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$), which were maintained for a prolonged period of time in comets grown in the presence of VASP but not in its absence. Velocity points lying in the shaded zone were considered close to zero. Length histograms (e) of comets grown in the absence and in the presence of VASP at three different time points (30, 90, and 120 min) indicate that both types of comets showed a broadening of their length distributions over time, and the distributions became non-Gaussian after 90 min. The broadening towards shorter length was more pronounced in the absence of VASP than in its presence. We attribute this behavior to the detachment of comets from the beads and to the growth of new comets on the "naked" beads (see Movie S1). All scale bars represent 10 μm . AFM height scale bar is expressed in micrometers.

AFM image (Fig. S1a) further confirmed the occurrence of this gradual decay in both height and width towards the bead direction. This also demonstrated that the comets were unlikely to be hollow, as observed previously for larger-diameter beads and peptide coating with a higher percentage of PRO compared to this study.⁶

Notably, the reduction in width was more gradual for comets grown in the presence of VASP than for comets grown in its absence (Fig. 1b and c). This effect was accompanied by better maintenance of the average velocity (Fig. 1d). Velocity maintenance was confirmed by following single-comet growth (Fig. S2). Furthermore, in the absence and in the presence of VASP, the length histograms of both comets at early time points revealed narrow Gaussian-like distributions (Fig. 1e). After 2 h, the distribution was broadened and lost its Gaussian shape in the absence of VASP, while the distribution remained Gaussian like, with a tail extending towards shorter lengths in the presence of VASP. Phase-contrast movies of single-comet growth showed that comets became less visible, followed by bead detachment after 90 min (Movie S1). It is possible that free beads were reused to form new comets based on the changes in distributions over time (Fig. 1e). These data indicate that VASP helped velocity maintenance and comet attachment to the beads.

Effect of VASP recruitment on the comets' elastic modulus

The elastic modulus of comets grown for 2 h in the absence and in the presence of VASP was measured by AFM-based nanoindentation in liquid (Fig. 3a). Phalloidin was used to stabilize actin in its filamentous form,²² thus protecting comets from disassembly without disturbing the binding sites of the associated proteins. Note that the AFM height image (Fig. 3a, left) acquired during nanoindentation again demonstrated that the comets were unlikely to be hollow, as mentioned above. Under all the conditions investigated, the comets were softer than the glass substrate, as expected, and appeared as dark regions in the Young's modulus map (Fig. 3a, right). The inset (Fig. 3a, right) demonstrated local changes/fluctuations in the elastic modulus along a single comet in the presence of 250 nM VASP (Fig. 3a, arrow). This is possibly due to local variations in VASP concentration; however, one can also argue that the observed fluctuations come from the strain field induced by one indent. If this field extends for more than 1 pixel and the relaxation time is on the order of several seconds, then the surrounding indents will be affected.

In order to test the effect of VASP recruitment by PRO at the bead surface on the mechanical properties of the comets, we performed the following experiments. In one case, beads coated with VCA (*verprolin*/cofilin/acidic domain) and PRO were incubated in the

absence and in the presence of 200 nM VASP (Fig. 3b). In another case, beads coated with either VCA only (Fig. 3c, black) or both VCA and PRO (Fig. 3c, gray) were added to the motility medium supplemented with VASP. The estimated Young's modulus of comets grown in the absence of VASP (1.10 ± 0.14 kPa; $n = 144$) was similar to that of the comets grown in the presence of VASP in the medium but in the absence of PRO at the bead surface (1.10 ± 0.13 kPa; $n = 354$). Furthermore, when 200 nM VASP was present in the medium with PRO at the bead surface, the estimated Young's modulus of the comets displayed a 2-fold increase (2.05 ± 0.25 kPa; $n = 803$). Experiments were carried out at least in duplicate with different batches of proteins and cantilevers. Error bars were derived by combining standard deviation errors from the distribution and variations between cantilevers ($\pm 12\%$). In summary, we observed an increase in the elastic modulus of the comets when and only when VASP was recruited at the bead surface using PRO.

In the rest of this study, we used beads coated with VCA and PRO in order to measure the effect of VASP concentration and motility medium ionic strength on the mechanical properties of actin comets.

Effect of VASP concentration on the elastic modulus

Varying VASP concentrations from 0 to 400 nM, with constant ionic strength (127 mM KCl), yielded comets that grew with the same initial velocity (0.4 ± 0.1 $\mu\text{m}/\text{min}$). Moreover, the morphology of the comets after 2 h of incubation was indistinguishable by fluorescence microscopy (Fig. 4a). AFM-based nanoindentation (Table 1) revealed that the elastic modulus of these comets was insensitive to VASP concentrations below 150 nM and increased almost linearly with increasing VASP concentrations between 150 and 300 nM (Fig. 4b). The linear dependency with a slope of 16 Pa per nanomolar of VASP indicated that VASP was used to titrate the available cross-linking sites within the comets until saturation above 300 nM.

Effect of motility medium ionic strength on the elastic modulus

Comets grown in the presence or in the absence of 200 nM VASP showed different responses to changes in the ionic strength of the motility medium from 50 to 200 mM KCl. There were no morphological differences in comets grown in the absence of VASP, while an increase in comet lengths was observed in comets grown in the presence of VASP with increasing ionic strength (Fig. 5a). The gradual decay was less visible in comets grown in the presence of VASP in 200 mM KCl medium compared to 50 mM KCl (Fig. 5b). The elastic modulus (Table 2) of comets grown in the absence

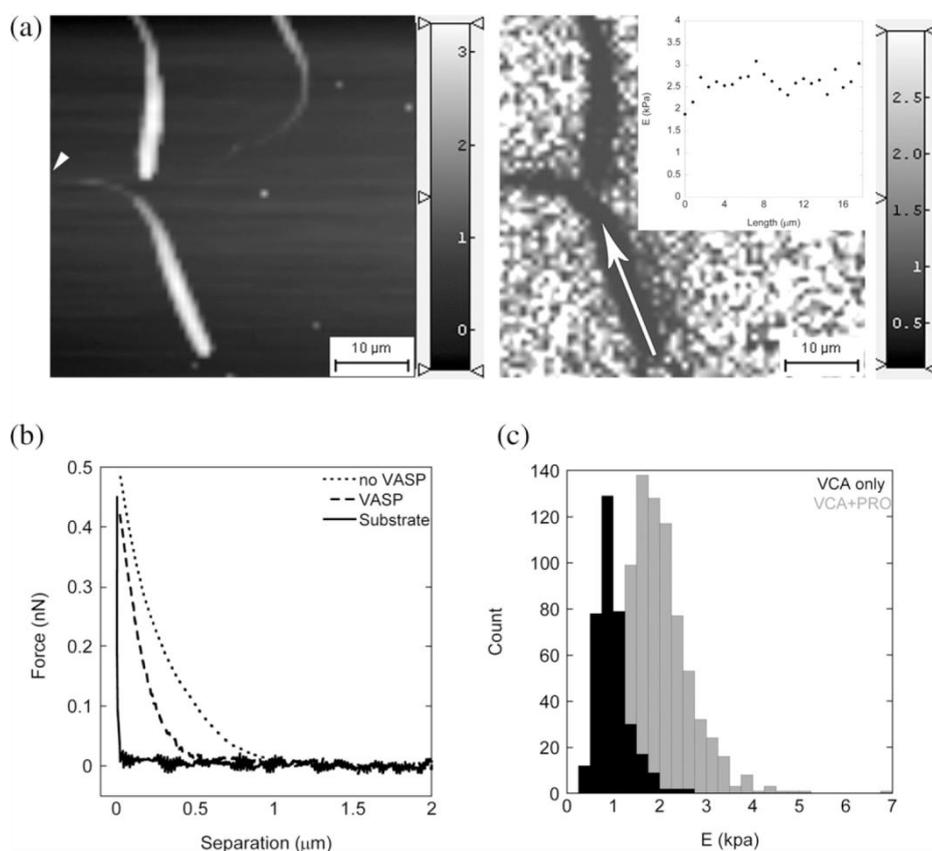


Fig. 3. The elastic modulus of actin comets. (a) Representative height (left) and force map (right) acquired by AFM-based nanoindentation of comets grown in the presence of 250 nM VASP. The inset represents the elastic modulus extracted from the force map (a; arrow) along the back of a single comet. Notice the occurrence of small fluctuations that could be attributed to local variations in VASP concentration. The comets were softer than the glass substrate and appeared as a dark region in the force map (right). This was confirmed by visual inspection of representative force curves (b) obtained on comets grown on beads coated with both VCA and PRO in the absence of VASP (dotted line), in the presence of VASP (broken line), and in the presence of the glass substrate (continuous line). The force curves showed that comets grown in the absence of VASP had a lower elastic modulus than comets grown in the presence of VASP. (c) Histograms of the estimated Young's modulus of the comets grown on beads coated with VCA and PRO in the presence of 200 nM VASP showed a 2-fold increase in the elastic modulus compared to that in its absence. Comets grown on beads coated with VCA and PRO in the absence of VASP showed an elastic modulus similar to that of the comets grown on beads coated with VCA only in the presence of VASP. AFM height scale bar is expressed in micrometers. AFM force map scale bar is expressed in kilopascals.

of VASP remained constant at around 1 kPa over the full range of ionic strengths (Fig. 5c, filled square), whereas the elastic modulus of comets grown in the presence of VASP increased linearly with increasing ionic strength (Fig. 5c, filled circle) before saturation at 175 mM KCl. The linear dependency with a slope of 6 Pa per millimolar of KCl indicated that the ionic strength of the motility medium had a measurable impact on the elastic modulus of comets in the presence of VASP. This increase in the elastic modulus was associated with an increase in comet lengths (Fig 5d). These results indicate that comets grown in an Arp2/3-complex-dependent fashion alone were insensitive

to variations in the ionic strength of the motility medium. However, the increase in the elastic modulus and comet lengths observed can be solely attributed to VASP due to an increase in the ionic strength of the motility medium.

Discussion

The elastic modulus of phalloidin-stabilized actin comets

In this study, we used AFM-based nanoindentation to estimate the elastic modulus of phalloidin-

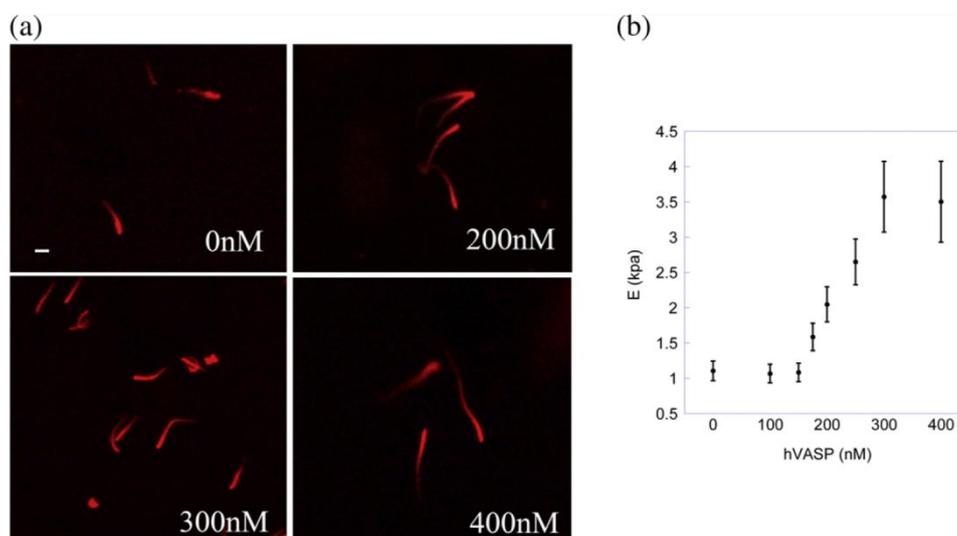


Fig. 4. The effect of VASP concentration on the elastic modulus of actin comets at 127 mM KCl in the motility medium. (a) Fluorescence images of phalloidin-stabilized comets grown in the presence of 0, 200, 300, and 400 nM VASP for 2 h in liquid. There were no obvious differences within this range of VASP concentrations with respect to the morphology and initial velocity ($0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$) of the comets. (b) The elastic modulus of the actin comets remained constant at 1 kPa below 150 nM VASP. Above this threshold, the elastic modulus increased almost linearly with increasing VASP concentration in a dose-dependent manner before saturation at 300 nM. Scale bar represents 10 μm .

stabilized actin comets (Fig. 3). Although phalloidin has been shown to alter the persistence length of F-actin,²³ it has been proposed that the structure of the phalloidin-stabilized F-actin may be closer to ATP F-actin than to ADP F-actin.²⁴ Moreover, based on computational modeling, the status of the ATP molecule in F-actin determines the structure and hence the persistence length of the actin filament.²⁵ Thus, phalloidin, instead of chemically altering the mechanical properties of F-actin, more likely preserves them better. Furthermore, phalloidin-stabilized comets grown in an Arp2/3-complex-dependent fashion showed an estimated Young's modulus of around 1 kPa, in agreement with previously published data.^{13,14} Still, this value is 1000 times higher than the dynamic elastic modulus reported for an F-actin network assembled at 24 μM actin concentration in the presence of 0.48 μM

Arp2/3 complex.²⁶ Within comets, a local concentration of 1 mM F-actin, on average, which is similar to the F-actin concentration in cell lamellipodia, was previously derived from sedimentation measurements.^{20,27,28} Since the elastic modulus scales approximately with the square of the actin concentration, this accounts for the 1000-fold elastic modulus increase observed in actin comet tails.²⁹ A concentration of 1 mM in the comet translates into a filament spacing of about 10 nm, assuming that all the filaments are aligned inside the comet to simplify the calculation. This estimation is in agreement with our measured spacing between VCA molecules coated on the beads (unpublished data) and electron microscopy images of comets grown from VCA-coated and PRO-coated beads.⁶

VASP enhances the elastic modulus of actin comets

When VASP was recruited to the bead surface through its interaction with PRO, we observed a tripling of the estimated Young's modulus from 1 to 3.5 kPa from 0 to 400 nM VASP with the same initial velocity (Fig. 4b). Accordingly, our bead motility system is in a diffusion-limited regime where the velocity of the comets is independent of the velocity.²⁷ Moreover, this increase in the elastic modulus is only measurable beyond a threshold of VASP and up to 300 nM, where the elastic modulus

Table 1. A range of VASP concentrations used to examine the effect on the elastic modulus of actin comets

Human VASP [nM]	E [kPa] (n)
0	1.10 ± 0.14 (144)
100	1.07 ± 0.13 (118)
150	1.08 ± 0.13 (191)
175	1.59 ± 0.19 (151)
200	2.05 ± 0.25 (803)
250	2.65 ± 0.33 (397)
300	3.57 ± 0.50 (48)
400	3.50 ± 0.57 (33)

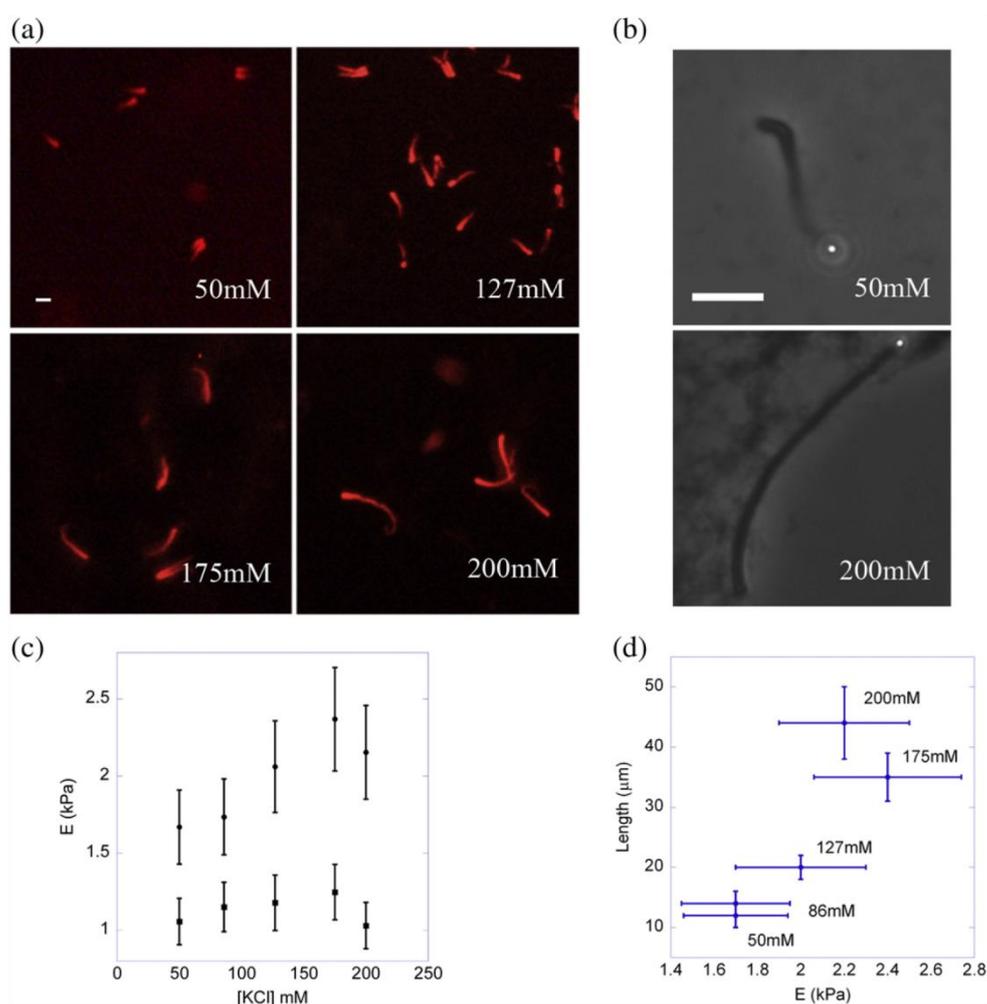


Fig. 5. The effect of motility medium ionic strength on the elastic modulus of comets grown in the absence and in the presence of 200 nM VASP. (a) Fluorescence images of phalloidin-stabilized comets grown in the presence of VASP with 50, 127, 175, and 200 mM KCl for 2 h in liquid. Note that the length of actin comets increases with increasing ionic strength of the medium. (b) Phase images of comets grown in the presence of VASP with 50 mM and 200 mM KCl for 30 min. The gradual decay was less visible at 200 mM KCl than at 50 mM KCl. (c) The elastic modulus of comets grown in the presence of VASP (filled circle) increases with increasing ionic strength before saturation at 175 mM KCl. On the other hand, comets grown in the absence of VASP were insensitive to variations of ionic strength in the same range (filled square). (d) Plot of comet length as a function of the elastic modulus of comets grown in the presence of VASP with varying ionic strengths. Both the length and the elastic modulus of comets grown in the presence of VASP increased with increasing ionic strength. Scale bar represents 10 μm .

Table 2. A range of motility medium ionic strengths used to examine the effect on the elastic modulus of actin comets in the absence and in the presence of 200 nM VASP

KCl [mM]	No VASP		VASP	
	E [kPa] (n)	E [kPa] (n)	E [kPa] (n)	Length [μm]
50	1.1 ± 0.15 (48)	1.7 ± 0.24 (52)		12 ± 2
86	1.2 ± 0.16 (60)	1.7 ± 0.25 (177)		14 ± 2
127	1.2 ± 0.18 (31)	2.1 ± 0.30 (37)		20 ± 2
175	1.2 ± 0.18 (116)	2.4 ± 0.34 (204)		35 ± 4
200	1.0 ± 0.15 (66)	2.2 ± 0.30 (105)		44 ± 6

reached saturation. Comets grown in the presence and in the absence of VASP contain approximately the same concentration of actin, so this tripling must be due to an increase in the number of cross-links. However, VASP has been shown to reduce the number of Arp2/3-mediated branches.^{6,16,30} Samarin *et al.* quantified this decrease to 3-fold to 4-fold.²¹ There is some controversy concerning the effect of Arp2/3-complex-formed branches on the elastic modulus of an actin network, with some authors concluding no effect and with others

concluding an increase in the elastic modulus due to the ability of branches to homogenize the network.^{26,31} In neither case would a decrease in the amount of the Arp2/3 complex in actin comet tails formed in the presence of VASP be expected to increase the Young's modulus of the comet, leading us to the conclusion that VASP itself is responsible for the enhanced elastic modulus probably via filament cross-linking or bundling.

The fact that the F-actin binding capacity of VASP is highly salt sensitive has called into question the physiological relevance of this interaction.^{32–35} In one case, the affinity of VASP for actin filaments has been shown to decrease with increasing ionic strength.³⁴ In another case, the bundling activity of VASP was maintained with increasing ionic strength.³⁵ However, these measurements have been performed at actin concentrations in the micromolar range and at low ionic strength compared to this study. We show that for an actin concentration in the millimolar range, the elastic modulus increased with increasing salt concentration from 50 to 200 mM in the presence of VASP. The effect of VASP on the elastic modulus of comets with respect to the corresponding no-VASP controls doubled in that range of salt concentration from 0.6 to 1.2 kPa. Additionally, we also observed enhanced growth maintenance in comets grown in the presence of VASP with increasing ionic strength (Fig. 5). We hypothesize that this effect was either a direct result from an increase in VASP bundling activity or an indirect result from an increase in ionic interaction between more aligned actin filaments in the presence of VASP, as observed previously.⁶

These results imply that in the cell where local F-actin concentrations can be as high as in actin comet tails, VASP can have a real effect on the elastic properties of the actin networks assembled via Arp2/3-complex-dependent polymerization.

VASP enhances the attachment of comets to the bead

Regardless of the cause of width decay over time, it turned out to be a useful morphological tool. A first observation was that the comet started out with a diameter that was twice that of the bead, and that movement ceased once the comet width fell close to the diameter of the bead (Fig. 1; Fig. S1). This indicated that the actin gel on the sides of the bead was the key to motility, in keeping with the squeezing phenomenon contributing to actin-based propulsion.⁸ In the absence of VASP, the detachment of the comets from the beads occurred significantly sooner compared to that in its presence, meaning that VASP improved the strength of the attachment. Given our Young's modulus data, we propose that this enhanced attachment was directly due to the cross-linking ability of VASP. In summary, we show

that under physiological salt conditions, the recruitment of human VASP at the bead surface increases the elastic modulus of actin comet tails, strengthening the interface between the comet and the bead and thus allowing for more persistent motion.

In conclusion, we demonstrated that, *in vitro*, VASP recruitment at the bead surface increases the elastic modulus of the actin comets. Interestingly, our elasticity maps (Fig. 3a) and previous fluorescence immunostaining⁷ both indicate that VASP is evenly distributed throughout the comets. *In vivo*, the situation is completely different. Immunogold localization of VASP shows that VASP resides within the first 2 μm of the plasma membrane at protrusion sites.³⁶ This is most likely due to the presence of other actin binding proteins that compete with VASP. Based on these considerations and our data, we propose that VASP contributes to actin-based protrusion particularly in enhancing adhesion for growth maintenance by increasing the elastic modulus of the actin network in close proximity to the plasma membrane.

Materials and Methods

Proteins and peptides

Actin extracted from rabbit skeletal muscle, human recombinant cofilin (ADF), bovine brain Arp2/3 protein complex, human recombinant profilin, and glutathione-S-transferase-tagged VCA were purchased from Cytoskeleton. Actin extracted from rabbit muscle and conjugated to AlexaFluor 594 was purchased from Invitrogen. Glutathione-S-transferase-tagged PRO, the VASP-recruiting domain of ActA, was prepared as previously described,³⁷ and His-tagged human VASP was expressed in insect cells and purified as described by Laurent *et al.*¹⁸ Heterodimeric mouse capping protein was a gift from Dorothy Schafer.³⁸

Functionalization of polystyrene beads

Polystyrene beads (Polysciences) of 1 μm diameter were incubated for an hour at 4 °C on a rotating wheel in XB [10 mM HEPES (pH 7.5), 0.1 M KCl, 1 mM MgCl₂, and 0.1 mM CaCl₂] containing VCA (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 4.5 μM) with or without PRO (40.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 0.6 μM). The amount of beads in a 40- μl protein solution was adjusted to a total surface area of 3.5 cm². The bead surface was blocked by addition of 5 μl of bovine serum albumin (BSA) at a concentration of 1 mg/ml for 5 min. The beads were centrifuged, resuspended, and stored in 40 μl of XB containing 1 mg/ml BSA. Functionalized beads were stored at 4 °C and were ready to use for up to 1 week.

Motility medium

Standard motility medium consisted of 8.7 μM F-actin (4% AlexaFluor 594 actin) prepolymerized for 1 h on ice by mixing G-actin in G buffer [2 mM Tris, 0.2 mM CaCl₂, and

0.2 mM DTT (pH 8)] with 1 mM MgCl₂, 0.2 mM ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether) *N,N'*-tetraacetic acid, and 100 mM KCl, supplemented with 0.1 μM Arp2/3 complex, 5 μM ADF, 1 μM profilin, and 50 nM capping protein with 1.8 mM ATP, 3.6 mM MgCl₂, 0.13 mM 1,4-diazabicyclo [2.2.2]octane, 6 mM DTT, and 160 mM CaCl₂ in XB and 1% BSA.

To prepare a single motility assay of 4.2 μl, we diluted functionalized beads 8-fold before adding 0.2 μl into 4 μl of motility medium with or without 200 nM human VASP diluted in VASP buffer [20 mM imidazole (pH 7.0), 200 mM KCl, 1 mM ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether) *N,N'*-tetraacetic acid, 2 mM MgCl₂, and 1 mM DTT], unless otherwise stated. Control experiments were carried out with VASP buffer instead of the VASP protein. The final KCl concentration in the assay was 127 mM, unless otherwise stated. Assays were incubated in Eppendorf tubes (Progene) at room temperature before being fixed with either glutaraldehyde (SPI-CHEM) or phalloidin (Sigma) at each time point.

Epifluorescence imaging

Aliquots of 1 μl from a bulk assay were quenched with 4% glutaraldehyde every 10 min for the first 2 h and every 30 min until 3.5 h of incubation. The aliquots were placed between a cover slide and a coverslip, sealed with nail polish, and observed under an epifluorescence microscope (Olympus IX71) with a 40× objective using a Leica camera (DFC310FX) and Leica application suite v3. Growth profile was determined by measuring the average length of 150–250 comets per time point using ImageJ†. Fluorescence intensity profiles were extracted with ImageJ from comets that were not overlapping with others. The two-color experiment was performed, firstly, by carrying out the standard motility assay prepared with AlexaFluor488 actin. At time points 30, 60, and 90 min after the initial incubation, fresh motility medium prepared with AlexaFluor594 actin was then added and further incubated for another 90, 60, and 30 min, respectively. Samples were then fixed with 4% glutaraldehyde at the end of the total 2-h course of incubation.

Atomic force microscopy

AFM imaging

Comets were grown for 2 h in Eppendorf tubes at room temperature before being fixed with 4% glutaraldehyde overnight in a glass-bottomed Petri dish (Electron Microscopy Sciences). Comets were rinsed with nanopure water and dried for imaging in air. AFM imaging was carried out in contact mode using a Bioscope II (Veeco) mounted on an inverted epifluorescence microscope (Olympus IX71). We used triangular MSNL (Veeco) cantilevers with a nominal spring constant of 0.5 N/m and a nominal tip radius of 2 nm. The width of the comets was extracted from AFM dimension images using SPIP (Nanoscience Instruments).

AFM-based nanoindentation

Phalloidin (10 μM) was suspended in XB before being added to comets grown for 2 h under the conditions described above. Comets were resuspended in a glass-bottomed Petri dish and left to settle overnight in the fridge. Nanoindentation was carried out in liquid (10 μM phalloidin in XB) using the same setup described above and MSNL cantilevers (Veeco) with an average spring constant of 0.018 N/m (range, 0.0176–0.0198 N/m). The cantilever was first calibrated in air to obtain the spring constant and immersed in fresh XB to obtain sensitivity on a clean glass. Comets immersed in XB/phalloidin buffer were located by epifluorescence imaging and scanned in force–volume mode to obtain an estimate of their Young's modulus. Force–volume parameters were set to relative trigger mode with a threshold of 0.5–2 V. The images were 64×64 pixels, and each force curve had 512 samples. Before the start of nanoindentation, tips were always checked for protein attachment with the epifluorescence microscope. Force curves obtained from nanoindentation were then analyzed using SPIP. The force curves were background corrected, and the point of first indentation was identified visually. The first 200 nm of indentation was fitted using the Sneddon model³⁹ with a cone angle of 22.5° to obtain the estimated Young's modulus at each point. According to the Bueckle empirical rule,^{40,41} the depth of indentation should be no more than 10% of the sample thickness in order for the elasticity measurement to be unaffected by the underlying substrate. Therefore, we only analyzed the force curves corresponding to points on the comets that were taller than 1 μm.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jmb.2011.08.054

Acknowledgements

The authors thank Dorothy Schafer for providing capping protein and Gijsje Koenderink and Corinne Gullekson for helpful discussions. S.S. acknowledges support from the Human Frontiers Science Program through a Young investigator grant awarded to J.P., L.K., and Gijsje Koenderink acknowledges support from the Natural Sciences and Engineering Research Council and the Canada Foundation for Innovation.

References

1. Cameron, L., Footer, M., Van Oudenaarden, A. & Theriot, J. (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 4908.
2. Pollard, T. (1995). Actin cytoskeleton: missing link for intracellular bacterial motility? *Curr. Biol.* **5**, 837–840.
3. Theriot, J. (1995). The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **11**, 213–239.

† <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

4. Trichet, L., Sykes, C. & Plastino, J. (2008). Relaxing the actin cytoskeleton for adhesion and movement with Ena/VASP. *J. Cell Biol.* **181**, 19.
5. Loisel, T., Boujemaa, R., Pantaloni, D. & Carlier, M. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature*, **401**, 613–616.
6. Plastino, J., Olivier, S. & Sykes, C. (2004). Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion. *Curr. Biol.* **14**, 1766–1771.
7. Trichet, L., Campàs, O., Sykes, C. & Plastino, J. (2007). VASP governs actin dynamics by modulating filament anchoring. *Biophys. J.* **92**, 1081–1089.
8. Plastino, J. & Sykes, C. (2005). The actin slingshot. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 62–66.
9. Boukellal, H., Campàs, O., Joanny, J., Prost, J. & Sykes, C. (2004). Soft *Listeria*: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys. Rev. E*, **69**, 61906.
10. Giardini, P., Fletcher, D. & Theriot, J. (2003). Compression forces generated by actin comet tails on lipid vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 6493.
11. Taunton, J., Rowning, B., Coughlin, M., Wu, M., Moon, R., Mitchison, T. & Larabell, C. (2000). Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-Wasp. *J. Cell Biol.* **148**, 519.
12. Úpadhyaya, A., Chabot, J., Andreeva, A., Samadani, A. & Van Oudenaarden, A. (2003). Probing polymerization forces by using actin-propelled lipid vesicles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 4521.
13. Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M. & Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc. Natl Acad. Sci.* **101**, 5992.
14. Gerbal, F., Chaikin, P., Rabin, Y. & Prost, J. (2000). An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion. *Biophys. J.* **79**, 2259–2275.
15. Barzik, M., Kotova, T., Higgs, H., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F. & Schafer, D. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J. Biol. Chem.* **280**, 28653.
16. Bear, J., Svitkina, T., Krause, M., Schafer, D., Loureiro, J., Strasser, G. *et al.* (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*, **109**, 509–521.
17. Han, Y., Chung, C., Wessels, D., Stephens, S., Titus, M., Soll, D. & Firtel, R. (2002). Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J. Biol. Chem.* **277**, 49877.
18. Laurent, V., Loisel, T., Harbeck, B., Wehman, A., Gröbe, L., Jockusch, B. *et al.* (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **144**, 1245.
19. Zhang, Y., Tu, Y., Gkretsi, V. & Wu, C. (2006). Migfilin interacts with vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) and regulates VASP localization to cell-matrix adhesions and migration. *J. Biol. Chem.* **281**, 12397.
20. Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M. & Pantaloni, D. (2003). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J. Cell Biol.* **160**, 387.
21. Samarin, S., Romero, S., Kocks, C., Didry, D., Pantaloni, D. & Carlier, M. (2003). How VASP enhances actin-based motility. *J. Cell Biol.* **163**, 131.
22. Sampath, P. & Pollard, T. (1991). Effects of cytochalasin, phalloidin and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry*, **30**, 1973–1980.
23. Isambert, H., Venier, P., Maggs, A. C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D. & 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.
24. Ichetovkin, I., Grant, W. & Condeelis, J. (2002). Cofilin produces newly polymerized actin filaments that are preferred for dendritic nucleation by the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* **12**, 79–84.
25. Pfäendtner, J., Branduardi, D., Parrinello, M., Pollard, T. D. & Voth, G. A. (2009). Nucleotide-dependent conformational states of actin. *Proc. Natl Acad. Sci.* **106**, 12723.
26. Nakamura, F., Osborn, E., Janmey, P. A. & Stossel, T. P. (2002). Comparison of filamin A-induced cross-linking and Arp2/3 complex-mediated branching on the mechanics of actin filaments. *J. Biol. Chem.* **277**, 9148–9154.
27. Paluch, E., van der Gucht, J., Joanny, J. & Sykes, C. (2006). Deformations in actin comets from rocketing beads. *Biophys. J.* **91**, 3113–3122.
28. Abraham, V. C., Krishnamurthi, V., Taylor, D. L. & Lanni, F. (1999). The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys. J.* **77**, 1721–1732.
29. MacKintosh, F. C., Kas, J. & Janmey, P. A. (1995). Elasticity of semiflexible biopolymer networks. *Phys. Rev. Lett.* **75**, 4425–4428.
30. Skoble, J., Auerbuch, V., Goley, E. D., Welch, M. D. & Portnoy, D. A. (2001). Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J. Cell Biol.* **155**, 89–100.
31. Tseng, Y. & Wirtz, D. (2004). Dendritic branching and homogenization of actin networks mediated by Arp2/3 complex. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 258104.
32. Breitsprecher, D., Kiesewetter, A. K., Linkner, J., Vinzenz, M., Stradal, T. E. B., Small, J. V. *et al.* (2011). Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J.* **30**, 456–467.
33. Hansen, S. D. & Mullins, R. D. (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J. Cell Biol.* **191**, 571–584.
34. Huttelmaier, S., Harbeck, B., Steffens, O., Messerschmidt, T., Illenberger, S. & Jockusch, B. M. (1999). Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* **451**, 68–74.
35. Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Stradal, T. E. B., Schleicher, M. & Faix, J. (2006). The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 7694–7699.
36. Rottner, K., Behrendt, B., Small, J. V. & Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.* **1**, 321–322.

37. Golsteyn, R., Beckerle, M., Koay, T. & Friederich, E. (1997). Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Sci.* **110**, 1893.
38. Schafer, D., Jennings, P. & Cooper, J. (1996). Dynamics of capping protein and actin assembly *in vitro*: uncapping barbed ends by polyphosphoinositides. *J. Cell Biol.* **135**, 169.
39. Sneddon, I. (1965). The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.* **3**, 47–57.
40. Bueckle, H. (1973). *The Science of Hardness Testing and Its Research Applications*. American Society for Metals, Materials Park, OH.
41. Persch, G., Born, C. & Utesch, B. (1994). Nano-hardness investigations of thin films by an atomic force microscope. *Microelectron. Eng.* **24**, 113–121.

Conclusion générale.

Avec cette thèse, nous avons abordé la question des effets de VASP sur les réseaux d'actine et la motilité sous deux angles différents.

Dans une première partie axée plus biologique (chapitre 2), nous nous sommes intéressés au recrutement de VASP par les activateurs de la famille WASP/WAVE, et ses effets sur la motilité. Nous avons travaillé avec un système biomimétique en extraits reconstitués composés de protéines purifiées, nous permettant de contrôler précisément leur composition. Grâce à ce système simplifié, nous avons montré que pour augmenter la vitesse de propulsion des billes, VASP et le complexe Arp2/3 doivent être recrutés conjointement par la même molécule, soulignant l'importance probable de la conformation dans l'espace de ces deux partenaires pour une coopération efficace. Nous avons démontré l'importance du recrutement de VASP à la surface de la bille sous sa forme tétramérique, ainsi que la nécessité des domaines de liaison à l'actine-F et à la profiline pour augmenter la vitesse de propulsion des billes. Ces résultats ont été reproduits avec la *Listeria* qui utilise la protéine ActA analogue aux protéines WASP, soulignant ainsi leur pertinence. Nous avons pu proposer un modèle prenant en compte la plupart de ces résultats. Néanmoins, cette étude pose de nouvelles questions. En effet, du travail reste à accomplir pour comprendre précisément les modalités de recrutement de VASP par les activateurs de la polymérisation de l'actine. De même, il serait intéressant de vérifier les effets de VASP sur la motilité de billes recouvertes par pVCA-WAVE2 en présence du complexe WAVE.

Dans une deuxième partie axée plus physique (chapitre 3 et 4), nous avons étudié les effets de VASP sur la mécanique des réseaux d'actine. Nous nous sommes d'abord demandé si VASP pouvait être une protéine réticulante des filaments d'actine (chapitre 3). En effet, bien qu'elle soit plutôt associée à la dynamique des bouts barbés, VASP pourrait remplir une fonction de réticulation entre filaments grâce à son site de liaison à l'actine-F et à sa forme tétramérique. Si les résultats obtenus sont cohérents avec d'autres travaux et confirment une coopération des sites de liaison à l'actine-G et à l'actine-F pour la liaison aux filaments d'actine, nous montrons grâce à des mesures en rhéologie couplées à des observations en microscopie confocale que VASP présente un faible pouvoir réticulant très sensible au ratio VASP/actine ainsi qu'à la présence de monomères d'actine. VASP seule ne permettrait donc

pas d'augmenter globalement la rigidité des réseaux d'actine, mais pourrait jouer un rôle local à la membrane, où les concentrations en VASP et en actine sont les plus élevées, pour aider à la protrusion de la membrane en coopération avec d'autres partenaires. Il serait alors intéressant d'étudier la rhéologie des réseaux d'actine en présence de VASP avec d'autres partenaires réticulant présents à la membrane comme le complexe Arp2/3.

Enfin, nous sommes intéressés aux effets de VASP sur la rigidité des comètes d'actine (chapitre 4). Nous voulions savoir si l'augmentation de vitesse des billes attendue en présence de VASP serait consécutive à une modification des propriétés mécaniques des comètes d'actine. Bien que cette étude ait été menée sur les billes VCA/PRO, avant que nous mettions le doigt sur l'importance du recrutement conjoint de VASP et d'Arp2/3 pour augmenter la vitesse des billes, nous avons montré que lorsqu'elle est recrutée à la surface des billes, VASP augmente la rigidité des comètes d'actine, favorise leur attachement à la bille et augmente la persistance de leur croissance. Enfin, nous avons montré que toutes ces propriétés sont potentialisées par des concentrations croissantes en KCl. Cette étude fait le lien avec l'étude précédente (chapitre 3). En présence de fortes concentrations en actine comme dans le lamellipode des cellules, VASP pourrait modifier la rigidité des réseaux d'actine formés par le complexe Arp2/3 et participer à la protrusion de la membrane. En perspective, l'apport à cette étude des billes pVCA-WASP pourrait rendre ces observations plus physiologiques, donc, plus pertinentes.

L'ensemble de ces résultats permet de mieux cerner les mécanismes que VASP met en œuvre sur les réseaux d'actine. A terme, nous espérons qu'ils contribueront à comprendre le rôle de VASP dans la motilité cellulaire pour un jour en faire une potentielle cible dans la lutte contre le cancer.

Bibliographie.

Abraham, V.C., Krishnamurthi, V., Taylor, D.L., and Lanni, F. (1999). The actin-based nanomachine at the leading edge of migrating cells. *Biophys. J.* 77, 1721–1732.

Achard, V., Martiel, J.-L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.-C., Blanchoin, L., and Boujema-Paterski, R. (2010). A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol* 20, 423–428.

Ahern-Djamali, S.M., Bachmann, C., Hua, P., Reddy, S.K., Kastenmeier, A.S., Walter, U., and Hoffmann, F.M. (1999). Identification of profilin and src homology 3 domains as binding partners for *Drosophila* enabled. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4977–4982.

Ahern-Djamali, S.M., Comer, A.R., Bachmann, C., Kastenmeier, A.S., Reddy, S.K., Beckerle, M.C., Walter, U., and Hoffmann, F.M. (1998). Mutations in *Drosophila* enabled and rescue by human vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) indicate important functional roles for Ena/VASP homology domain 1 (EVH1) and EVH2 domains. *Mol. Biol. Cell* 9, 2157–2171.

Amann, K.J., and Pollard, T.D. (2001). The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments. *Nat. Cell Biol.* 3, 306–310.

Applewhite, D.A., Barzik, M., Kojima, S.-I., Svitkina, T.M., Gertler, F.B., and Borisy, G.G. (2007). Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation. *Mol. Biol. Cell* 18, 2579–2591.

Ardern, H., Sandilands, E., Machesky, L.M., Timpson, P., Frame, M.C., and Brunton, V.G. (2006). Src-dependent phosphorylation of Scar1 promotes its association with the Arp2/3 complex. *Cell Motil. Cytoskeleton* 63, 6–13.

Aszódi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X.H., Ny, L., Andersson, K.E., Kehrel, B., Offermanns, S., and Fässler, R. (1999). The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *EMBO J.* 18, 37–48.

Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U., and Reinhard, M. (1999). The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J. Biol. Chem.* 274, 23549–23557.

Bae, Y.H., Ding, Z., Zou, L., Wells, A., Gertler, F., and Roy, P. (2009). Loss of profilin-1 expression enhances breast cancer cell motility by Ena/VASP proteins. *J. Cell. Physiol* 219, 354–364.

Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J. Biol. Chem* 280, 28653–28662.

Bashaw, G.J., Kidd, T., Murray, D., Pawson, T., and Goodman, C.S. (2000). Repulsive axon guidance: Abelson and Enabled play opposing roles downstream of the roundabout receptor. *Cell* 101, 703–715.

Bastounis, E., Meili, R., Alonso-Latorre, B., del Álamo, J.C., Lasheras, J.C., and Firtel, R.A. (2011). The SCAR/WAVE complex is necessary for proper regulation of traction stresses during amoeboid motility. *Mol. Biol. Cell* 22, 3995–4003.

- Bear, J.E., and Gertler, F.B. (2009). Ena/VASP: towards resolving a pointed controversy at the barbed end. *J. Cell. Sci* *122*, 1947–1953.
- Bear, J.E., Krause, M., and Gertler, F.B. (2001). Regulating cellular actin assembly. *Curr. Opin. Cell Biol* *13*, 158–166.
- Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fässler, R., Wehland, J., and Gertler, F.B. (2000). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* *101*, 717–728.
- Bear, J.E., Rawls, J.F., and Saxe, C.L., 3rd (1998). SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J. Cell Biol.* *142*, 1325–1335.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* *109*, 509–521.
- Bearer, E.L. (1991). Direct observation of actin filament severing by gelsolin and binding by gCap39 and CapZ. *J. Cell Biol.* *115*, 1629–1638.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* *404*, 1007–1011.
- Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *J. Biol. Chem.* *274*, 15538–15546.
- 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.
- Blanchoin, L., Pollard, T.D., and Hitchcock-DeGregori, S.E. (2001). Inhibition of the Arp2/3 complex-nucleated actin polymerization and branch formation by tropomyosin. *Curr. Biol.* *11*, 1300–1304.
- Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., et al. (2012). FMNL2 Drives Actin-Based Protrusion and Migration Downstream of Cdc42. *Current Biology: CB*.
- Block, J., Stradal, T.E.B., Hänisch, J., Geffers, R., Köstler, S.A., Urban, E., Small, J.V., Rottner, K., and Faix, J. (2008). Filopodia formation induced by active mDia2/Drf3. *J Microsc* *231*, 506–517.
- Boëda, B., Briggs, D.C., Higgins, T., Garvalov, B.K., Fadden, A.J., McDonald, N.Q., and Way, M. (2007). Tes, a specific Mena interacting partner, breaks the rules for EVH1 binding. *Mol. Cell* *28*, 1071–1082.
- Boujemaa-Paterski, R., Gouin, E., Hansen, G., Samarin, S., Le Clainche, C., Didry, D., Dehoux, P., Cossart, P., Kocks, C., Carlier, M.F., et al. (2001). Listeria protein ActA mimics WASp family proteins: it activates filament barbed end branching by Arp2/3 complex. *Biochemistry* *40*, 11390–11404.
- Boukellal, H., Campàs, O., Joanny, J.-F., Prost, J., and Sykes, C. (2004). Soft Listeria: actin-based propulsion of liquid drops. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* *69*, 061906.
- Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J* *27*, 2943–2954.

- Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., Vincenz, M., Stradal, T.E.B., Small, J.V., Curth, U., Dickinson, R.B., and Faix, J. (2011). Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J* 30, 456–467.
- Bu, W., Chou, A.M., Lim, K.B., Sudhakaran, T., and Ahmed, S. (2009). The Toca-1-N-WASP complex links filopodial formation to endocytosis. *J. Biol. Chem.* 284, 11622–11636.
- Cameron, L.A., Footer, M.J., van Oudenaarden, A., and Theriot, J.A. (1999). Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 4908–4913.
- 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.
- Carlier, M.F., Jean, C., Rieger, K.J., Lenfant, M., and Pantaloni, D. (1993). Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 5034–5038.
- Carlier, M.F., and Pantaloni, D. (1986). Direct evidence for ADP-Pi-F-actin as the major intermediate in ATP-actin polymerization. Rate of dissociation of Pi from actin filaments. *Biochemistry* 25, 7789–7792.
- Carlier, M.F., Pantaloni, D., Evans, J.A., Lambooy, P.K., Korn, E.D., and Webb, M.R. (1988). The hydrolysis of ATP that accompanies actin polymerization is essentially irreversible. *FEBS Lett.* 235, 211–214.
- Carlier, M.-F., Wiesner, S., Le Clainche, C., and Pantaloni, D. (2003). Actin-based motility as a self-organized system: mechanism and reconstitution in vitro. *C. R. Biol* 326, 161–170.
- Castellano, F., Le Clainche, C., Patin, D., Carlier, M.F., and Chavrier, P. (2001). A WASp-VASP complex regulates actin polymerization at the plasma membrane. *EMBO J* 20, 5603–5614.
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C.J., Jockusch, B.M., Reinhard, M., and Walter, U. (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J.* 14, 1314–1321.
- Chan, C.E., and Odde, D.J. (2008). Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science* 322, 1687–1691.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B., Gomez, T.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M., Umetani, J., Billadeau, D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468, 533–538.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burridge, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403–1415.
- Ciobanasu, C., Faivre, B., and Le Clainche, C. (2012). Actin dynamics associated with focal adhesions. *Int J Cell Biol* 2012, 941292.
- Co, C., Wong, D.T., Gierke, S., Chang, V., and Taunton, J. (2007). Mechanism of actin network attachment to moving membranes: barbed end capture by N-WASP WH2 domains. *Cell* 128, 901–913.
- Craig, R., Greene, L.E., and Eisenberg, E. (1985). Structure of the actin-myosin complex in the presence of ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 3247–3251.

- Dahl, J.P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M.E.P., Mark, R.J., and Kwak, S.P. (2003). Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J. Neurosci.* *23*, 3343–3352.
- Derivery, E., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 777–790.
- Derry, J.M., Ochs, H.D., and Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* *78*, 635–644.
- Dertsiz, L., Ozbilim, G., Kayisli, Y., Gokhan, G.A., Demircan, A., and Kayisli, U.A. (2005). Differential expression of VASP in normal lung tissue and lung adenocarcinomas. *Thorax* *60*, 576–581.
- DesMarais, V., Ichetovkin, I., Condeelis, J., and Hitchcock-DeGregori, S.E. (2002). Spatial regulation of actin dynamics: a tropomyosin-free, actin-rich compartment at the leading edge. *J. Cell. Sci.* *115*, 4649–4660.
- Ding, Z., Gau, D., Deasy, B., Wells, A., and Roy, P. (2009). Both actin and polyproline interactions of profilin-1 are required for migration, invasion and capillary morphogenesis of vascular endothelial cells. *Exp. Cell Res.* *315*, 2963–2973.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790–793.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S.H., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin–actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* *26*, 4597–4606.
- de la Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Antón, I.M., Elkhail, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., et al. (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 926–931.
- Fujiwara, I., Takahashi, S., Tadakuma, H., Funatsu, T., and Ishiwata, S. (2002). Microscopic analysis of polymerization dynamics with individual actin filaments. *Nature Cell Biology* *4*, 666–673.
- Gardel, M.L., Shin, J.H., MacKintosh, F.C., Mahadevan, L., Matsudaira, P., and Weitz, D.A. (2004). Elastic behavior of cross-linked and bundled actin networks. *Science* *304*, 1301–1305.
- Gautreau, A., Ho, H.H., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 4379–4383.
- Geese, M., Loureiro, J.J., Bear, J.E., Wehland, J., Gertler, F.B., and Sechi, A.S. (2002). Contribution of Ena/VASP proteins to intracellular motility of listeria requires phosphorylation and proline-rich core but not F-actin binding or multimerization. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2383–2396.
- Geiger, B., Spatz, J.P., and Bershadsky, A.D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 21–33.
- Gerbal, F., Chaikin, P., Rabin, Y., and Prost, J. (2000). An elastic analysis of *Listeria monocytogenes* propulsion. *Biophys. J.* *79*, 2259–2275.
- Gertler, F.B., Comer, A.R., Juang, J.L., Ahern, S.M., Clark, M.J., Liebl, E.C., and Hoffmann, F.M. (1995). *enabled*, a dosage-sensitive suppressor of mutations in the *Drosophila* Abl tyrosine kinase, encodes an Abl substrate with SH3 domain-binding properties. *Genes Dev.* *9*, 521–533.

- Gertler, F.B., Doctor, J.S., and Hoffmann, F.M. (1990). Genetic Suppression of Mutations in the *Drosophila* Abl Proto-Oncogene Homolog. *Science* 248, 857–860.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and *Drosophila* Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227–239.
- Gligorijevic, B., Wyckoff, J., Yamaguchi, H., Wang, Y., Roussos, E.T., and Condeelis, J. (2012). N-WASP-mediated invadopodium formation is involved in intravasation and lung metastasis of mammary tumors. *J Cell Sci* 125, 724–734.
- Goh, K.L., Cai, L., Cepko, C.L., and Gertler, F.B. (2002). Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning. *Curr. Biol.* 12, 565–569.
- Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713–726.
- Golsteyn, R.M., Beckerle, M.C., Koay, T., and Friederich, E. (1997). Structural and functional similarities between the human cytoskeletal protein zyxin and the ActA protein of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell. Sci.* 110 (Pt 16), 1893–1906.
- Gouin, E., Welch, M.D., and Cossart, P. (2005). Actin-based motility of intracellular pathogens. *Current Opinion in Microbiology* 8, 35–45.
- 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. U.S.A* 102, 7847–7852.
- Gupton, S.L., Anderson, K.L., Kole, T.P., Fischer, R.S., Ponti, A., Hitchcock-DeGregori, S.E., Danuser, G., Fowler, V.M., Wirtz, D., Hanein, D., et al. (2005). Cell migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J. Cell Biol.* 168, 619–631.
- Hahne, P., Sechi, A., Benesch, S., and Small, J.V. (2001). Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* 492, 215–220.
- Halbrügge, M., Friedrich, C., Eigenthaler, M., Schanzenbächer, P., and Walter, U. (1990). Stoichiometric and reversible phosphorylation of a 46-kDa protein in human platelets in response to cGMP- and cAMP-elevating vasodilators. *J. Biol. Chem.* 265, 3088–3093.
- Halbrügge, M., and Walter, U. (1989). Purification of a vasodilator-regulated phosphoprotein from human platelets. *European Journal of Biochemistry* 185, 41–50.
- Han, Y.-H., Chung, C.Y., Wessels, D., Stephens, S., Titus, M.A., Soll, D.R., and Firtel, R.A. (2002). Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in *dictyostelium*. *J. Biol. Chem.* 277, 49877–49887.
- Hansen, S.D., and Mullins, R.D. (2010). VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *J. Cell Biol* 191, 571–584.
- Harris, E.S., Li, F., and Higgs, H.N. (2004). The mouse formin, FRLalpha, slows actin filament barbed end elongation, competes with capping protein, accelerates polymerization from monomers, and severs filaments. *J. Biol. Chem.* 279, 20076–20087.
- Harris, E.S., Rouiller, I., Hanein, D., and Higgs, H.N. (2006). Mechanistic differences in actin bundling activity of two mammalian formins, FRL1 and mDia2. *J. Biol. Chem.* 281, 14383–14392.

- Hauser, W., Knobloch, K.P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U., et al. (1999). Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 8120–8125.
- Hayot, C., Debeir, O., Van Ham, P., Van Damme, M., Kiss, R., and Decaestecker, C. (2006). Characterization of the activities of actin-affecting drugs on tumor cell migration. *Toxicol. Appl. Pharmacol* *211*, 30–40.
- Hertzog, M., van Heijenoort, C., Didry, D., Gaudier, M., Coutant, J., Gigant, B., Didelot, G., Pr  at, T., Knossow, M., Guittet, E., et al. (2004). The β -Thymosin/WH2 Domain: Structural Basis for the Switch from Inhibition to Promotion of Actin Assembly. *Cell* *117*, 611–623.
- Higgs, H.N., Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry* *38*, 15212–15222.
- Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Kloeker, S., Wang, C.-L.A., Yoshigi, M., and Beckerle, M.C. (2006). Genetic ablation of zyxin causes Mena/VASP mislocalization, increased motility, and deficits in actin remodeling. *J. Cell Biol.* *172*, 771–782.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J. Cell Biol.* *173*, 383–394.
- Hu, X., and Kuhn, J.R. (2012). Actin Filament Attachments for Sustained Motility In Vitro Are Maintained by Filament Bundling. *PLoS ONE* *7*, e31385.
- Hüttelmaier, S., Harbeck, B., Steffens, O., Messerschmidt, T., Illenberger, S., and Jockusch, B.M. (1999). Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP. *FEBS Lett.* *451*, 68–74.
- Ichetovkin, I., Grant, W., and Condeelis, J. (2002). Cofilin Produces Newly Polymerized Actin Filaments that Are Preferred for Dendritic Nucleation by the Arp2/3 Complex. *Current Biology* *12*, 79–84.
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E.B., Di Fiore, P.P., Carlier, M.-F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* *6*, 319–327.
- 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.
- Ismail, A.M., Padrick, S.B., Chen, B., Umetani, J., and Rosen, M.K. (2009). The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 561–563.
- Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* *17*, 395–406.
- Janmey, P.A., Chaponnier, C., Lind, S.E., Zaner, K.S., Stossel, T.P., and Yin, H.L. (1985). Interactions of gelsolin and gelsolin-actin complexes with actin. Effects of calcium on actin nucleation, filament severing, and end blocking. *Biochemistry* *24*, 3714–3723.
- Jégou, A., Niedermayer, T., Orb  n, J., Didry, D., Lipowsky, R., Carlier, M.-F., and Romet-Lemonne, G. (2011). Individual Actin Filaments in a Microfluidic Flow Reveal the Mechanism of ATP Hydrolysis and Give Insight Into the Properties of Profilin. *PLoS Biol* *9*,

- Johnson, C.P., Tang, H.-Y., Carag, C., Speicher, D.W., and Discher, D.E. (2007). Forced unfolding of proteins within cells. *Science* 317, 663–666.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37–44.
- Kaiser, D.A., Vinson, V.K., Murphy, D.B., and Pollard, T.D. (1999). Profilin is predominantly associated with monomeric actin in *Acanthamoeba*. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 21), 3779–3790.
- Kayisli, U.A., Demir, R., Erguler, G., and Arici, A. (2002). Vasodilator-stimulated phosphoprotein expression and its cytokine-mediated regulation in vasculogenesis during human placental development. *Mol. Hum. Reprod.* 8, 1023–1030.
- Kikuchi, K., and Takahashi, K. (2008). WAVE2- and microtubule-dependent formation of long protrusions and invasion of cancer cells cultured on three-dimensional extracellular matrices. *Cancer Sci.* 99, 2252–2259.
- Kim, Y., Sung, J.Y., Ceglia, I., Lee, K.-W., Ahn, J.-H., Halford, J.M., Kim, A.M., Kwak, S.P., Park, J.B., Ho Ryu, S., et al. (2006). Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 442, 814–817.
- Kim, Y.-M., Renné, C., Seifert, S., Schuh, K., and Renné, T. (2011). Impaired melanoma growth in VASP deficient mice. *FEBS Lett.*
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell* 68, 521–531.
- Kocks, C., Hellio, R., Gounon, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1993). Polarized distribution of *Listeria monocytogenes* surface protein ActA at the site of directional actin assembly. *J. Cell. Sci.* 105 (Pt 3), 699–710.
- Koestler, S.A., Rottner, K., Lai, F., Block, J., Vinzenz, M., and Small, J.V. (2009). F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *PLoS ONE* 4, e4810.
- Kollmar, M., Lbik, D., and Enge, S. (2012). Evolution of the eukaryotic ARP2/3 activators of the WASP family: WASP, WAVE, WASH, and WHAMM, and the proposed new family members WAWH and WAML. *BMC Research Notes* 5, 88.
- Kondo, H., and Ishiwata, S. (1976). Uni-directional growth of F-actin. *J. Biochem.* 79, 159–171.
- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 541–564.
- Krause, M., Leslie, J.D., Stewart, M., Lafuente, E.M., Valderrama, F., Jagannathan, R., Strasser, G.A., Rubinson, D.A., Liu, H., Way, M., et al. (2004). Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Dev. Cell* 7, 571–583.
- Kuhn, J.R., and Pollard, T.D. (2005). Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 88, 1387–1402.
- Kurusu, S., and Takenawa, T. (2009). The WASP and WAVE family proteins. *Genome Biol.* 10, 226.
- Kwiatkowski, A.V., Rubinson, D.A., Dent, E.W., Edward van Veen, J., Leslie, J.D., Zhang, J., Mebane, L.M., Philippar, U., Pinheiro, E.M., Burds, A.A., et al. (2007). Ena/VASP Is Required for neuritegenesis in the developing cortex. *Neuron* 56, 441–455.

- De La Cruz, E.M., Mandinova, A., Steinmetz, M.O., Stoffler, D., Aebi, U., and Pollard, T.D. (2000). Polymerization and structure of nucleotide-free actin filaments. *J. Mol. Biol.* 295, 517–526.
- Lacayo, C.I., Pincus, Z., VanDuijn, M.M., Wilson, C.A., Fletcher, D.A., Gertler, F.B., Mogilner, A., and Theriot, J.A. (2007). Emergence of large-scale cell morphology and movement from local actin filament growth dynamics. *PLoS Biol* 5, e233.
- Lambrechts, A., Kwiatkowski, A.V., Lanier, L.M., Bear, J.E., Vandekerckhove, J., Ampe, C., and Gertler, F.B. (2000). cAMP-dependent protein kinase phosphorylation of EVL, a Mena/VASP relative, regulates its interaction with actin and SH3 domains. *J. Biol. Chem.* 275, 36143–36151.
- Lambrechts, A., Van Troys, M., and Ampe, C. (2004). The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int. J. Biochem. Cell Biol* 36, 1890–1909.
- Langanger, G., Moeremans, M., Daneels, G., Sobieszek, A., De Brabander, M., and De Mey, J. (1986). The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. *J. Cell Biol.* 102, 200–209.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., and Gertler, F.B. (1999). Mena Is Required for Neurulation and Commissure Formation. *Neuron* 22, 313–325.
- Laurent, V., Loisel, T.P., Harbeck, B., Wehman, A., Gröbe, L., Jockusch, B.M., Wehland, J., Gertler, F.B., and Carlier, M.F. (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 144, 1245–1258.
- Lebrand, C., Dent, E.W., Strasser, G.A., Lanier, L.M., Krause, M., Svitkina, T.M., Borisy, G.G., and Gertler, F.B. (2004). Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron* 42, 37–49.
- Lecuit, T., Lenne, P.-F., and Munro, E. (2011). Force generation, transmission, and integration during cell and tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 157–184.
- Legg, J.A., Bompard, G., Dawson, J., Morris, H.L., Andrew, N., Cooper, L., Johnston, S.A., Tramontanis, G., and Machesky, L.M. (2007). N-WASP involvement in dorsal ruffle formation in mouse embryonic fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 18, 678–687.
- Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M., and Siminovitch, K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 1098–1103.
- Li, A., Dawson, J.C., Forero-Vargas, M., Spence, H.J., Yu, X., König, I., Anderson, K., and Machesky, L.M. (2010). The actin-bundling protein fascin stabilizes actin in invadopodia and potentiates protrusive invasion. *Curr. Biol.* 20, 339–345.
- Lieleg, O., Claessens, M.M.A.E., Heussinger, C., Frey, E., and Bausch, A.R. (2007). Mechanics of bundled semiflexible polymer networks. *Phys. Rev. Lett.* 99, 088102.
- Lieleg, O., Schmoller, K.M., Cyron, C.J., Luan, Y., Wall, W.A., and Bausch, A.R. (2009). Structural polymorphism in heterogeneous cytoskeletal networks. *Soft Matter* 5, 1796.
- Liu, K., Li, L., Nisson, P.E., Gruber, C., Jessee, J., and Cohen, S.N. (1999). Reversible tumorigenesis induced by deficiency of vasodilator-stimulated phosphoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3696–3703.

- 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.
- Loureiro, J.J., Rubinson, D.A., Bear, J.E., Baltus, G.A., Kwiatkowski, A.V., and Gertler, F.B. (2002). Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. *Mol. Biol. Cell* *13*, 2533–2546.
- Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J. Cell Biol.* *127*, 107–115.
- Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* *8*, 1347–1356.
- Machesky, L.M., and Li, A. (2010). Fascin: Invasive filopodia promoting metastasis. *Commun Integr Biol* *3*, 263–270.
- 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. U.S.A.* *96*, 3739–3744.
- MacKintosh, F.C., Käs, J., and Janmey, P.A. (1995). Elasticity of Semiflexible Biopolymer Networks. *Phys. Rev. Lett.* *75*, 4425–4428.
- Mallavarapu, A., and Mitchison, T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J. Cell Biol.* *146*, 1097–1106.
- 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.
- Marcy, Y., Prost, J., Carlier, M.-F., and Sykes, C. (2004). Forces generated during actin-based propulsion: a direct measurement by micromanipulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 5992–5997.
- Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Antón, I.M., Medina, M., Saviile, S.P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J.H., Geha, R.S., et al. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* *3*, 484–491.
- McCullough, B.R., Grintsevich, E.E., Chen, C.K., Kang, H., Hutchison, A.L., Henn, A., Cao, W., Suarez, C., Martiel, J.-L., Blanchoin, L., et al. (2011). Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophys. J.* *101*, 151–159.
- 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.
- Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* *118*, 363–373.
- Michael, M., Vehlow, A., Navarro, C., and Krause, M. (2010). c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP Proteins Cooperate in Dorsal Ruffling of Fibroblasts and Axonal Morphogenesis. *Current Biology* *20*, 783–791.

Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). N-WASP, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a PIP2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J.* *15*, 5326–5335.

Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO Journal* *17*, 6932–6941.

Miki, H., and Takenawa, T. (1998). Direct binding of the verprolin-homology domain in N-WASP to actin is essential for cytoskeletal reorganization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *243*, 73–78.

Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* *408*, 732–735.

Miyamoto, Y., Yamauchi, J., and Tanoue, A. (2008). Cdk5 phosphorylation of WAVE2 regulates oligodendrocyte precursor cell migration through nonreceptor tyrosine kinase Fyn. *J. Neurosci.* *28*, 8326–8337.

Di Modugno, F., Bronzi, G., Scanlan, M.J., Del Bello, D., Cascioli, S., Ventura, I., Botti, C., Nicotra, M.R., Mottolese, M., Natali, P.G., et al. (2004). Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8⁺ T-cell immune response. *Int. J. Cancer* *109*, 909–918.

Di Modugno, F., Mottolese, M., Di Benedetto, A., Conidi, A., Novelli, F., Perracchio, L., Ventura, I., Botti, C., Jager, E., Santoni, A., et al. (2006). The cytoskeleton regulatory protein hMena (ENAH) is overexpressed in human benign breast lesions with high risk of transformation and human epidermal growth factor receptor-2-positive/hormonal receptor-negative tumors. *Clin. Cancer Res* *12*, 1470–1478.

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. U.S.A.* *95*, 6181–6186.

Nagase, T., Seki, N., Ishikawa, K., Ohira, M., Kawarabayasi, Y., Ohara, O., Tanaka, A., Kotani, H., Miyajima, N., and Nomura, N. (1996). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. VI. The coding sequences of 80 new genes (KIAA0201-KIAA0280) deduced by analysis of cDNA clones from cell line KG-1 and brain. *DNA Res.* *3*, 321–329, 341–354.

Nakamura, F., Osborn, E., Janmey, P.A., and Stossel, T.P. (2002). Comparison of filamin A-induced cross-linking and Arp2/3 complex-mediated branching on the mechanics of actin filaments. *J. Biol. Chem.* *277*, 9148–9154.

Nemethova, M., Auinger, S., and Small, J.V. (2008). Building the actin cytoskeleton: filopodia contribute to the construction of contractile bundles in the lamella. *J. Cell Biol.* *180*, 1233–1244.

Niebuhr, K., Ebel, F., Frank, R., Reinhard, M., Domann, E., Carl, U.D., Walter, U., Gertler, F.B., Wehland, J., and Chakraborty, T. (1997). A novel proline-rich motif present in ActA of *Listeria monocytogenes* and cytoskeletal proteins is the ligand for the EVH1 domain, a protein module present in the Ena/VASP family. *EMBO J* *16*, 5433–5444.

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.

Nozumi, M., Nakagawa, H., Miki, H., Takenawa, T., and Miyamoto, S. (2003). Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J. Cell. Sci.* *116*, 239–246.

- Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., and Narita, A. (2009). The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 457, 441–445.
- Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004). PtdIns(3,4,5)P₃ binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* 6, 420–426.
- Ono, S., and Ono, K. (2002). Tropomyosin inhibits ADF/cofilin-dependent actin filament dynamics. *J. Cell Biol.* 156, 1065–1076.
- Palmgren, S., Ojala, P.J., Wear, M.A., Cooper, J.A., and Lappalainen, P. (2001). Interactions with PIP₂, ADP-actin monomers, and capping protein regulate the activity and localization of yeast twinfilin. *J. Cell Biol.* 155, 251–260.
- Paluch, E., van der Gucht, J., Joanny, J.-F., and Sykes, C. (2006a). Deformations in actin comets from rocketing beads. *Biophys. J* 91, 3113–3122.
- Paluch, E., Sykes, C., Prost, J., and Bornens, M. (2006b). Dynamic modes of the cortical actomyosin gel during cell locomotion and division. *Trends Cell Biol* 16, 5–10.
- Panchal, S.C., Kaiser, D.A., Torres, E., Pollard, T.D., and Rosen, M.K. (2003). A conserved amphipathic helix in WASP/Scar proteins is essential for activation of Arp2/3 complex. *Nat. Struct. Biol.* 10, 591–598.
- Pantaloni, D., Boujmaa, 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.
- Pantaloni, D., Hill, T.L., Carlier, M.F., and Korn, E.D. (1985). A model for actin polymerization and the kinetic effects of ATP hydrolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 7207–7211.
- Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., and Hanahan, D. (1996). Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 2002–2007.
- Pardee, J.D., and Spudich, J.A. (1982). Mechanism of K⁺-induced actin assembly. *J. Cell Biol.* 93, 648–654.
- Partridge, M.A., and Marcantonio, E.E. (2006). Initiation of attachment and generation of mature focal adhesions by integrin-containing filopodia in cell spreading. *Mol. Biol. Cell* 17, 4237–4248.
- Pasic, L., Kotova, T., and Schafer, D.A. (2008). Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *J. Biol. Chem* 283, 9814–9819.
- Patel, F.B., Bernadskaya, Y.Y., Chen, E., Jobanputra, A., Pooladi, Z., Freeman, K.L., Gally, C., Mohler, W.A., and Soto, M.C. (2008). The WAVE/SCAR complex promotes polarized cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis. *Dev. Biol.* 324, 297–309.
- Pawlak, G., and Helfman, D.M. (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev* 11, 41–47.
- Pellegrin, S., and Mellor, H. (2005). The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Curr. Biol* 15, 129–133.

- Pfaendtner, J., Branduardi, D., Parrinello, M., Pollard, T.D., and Voth, G.A. (2009). Nucleotide-dependent conformational states of actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 12723–12728.
- Philippar, U., Roussos, E.T., Oser, M., Yamaguchi, H., Kim, H.-D., Giampieri, S., Wang, Y., Goswami, S., Wyckoff, J.B., Lauffenburger, D.A., et al. (2008). A Mena invasion isoform potentiates EGF-induced carcinoma cell invasion and metastasis. *Dev. Cell* *15*, 813–828.
- Plastino, J., Olivier, S., and Sykes, C. (2004). Actin filaments align into hollow comets for rapid VASP-mediated propulsion. *Curr. Biol* *14*, 1766–1771.
- 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.
- Prehoda, K.E., Lee, D.J., and Lim, W.A. (1999). Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. *Cell* *97*, 471–480.
- Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., and Zigmond, S.H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* *42*, 486–496.
- Pruyne, D., Evangelista, M., Yang, C., Bi, E., Zigmond, S., Bretscher, A., and Boone, C. (2002). Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science* *297*, 612–615.
- Pula, G., and Krause, M. (2008). Role of Ena/VASP proteins in homeostasis and disease. *Handb Exp Pharmacol* 39–65.
- Ramesh, N., and Geha, R. (2009). Recent advances in the biology of WASP and WIP. *Immunol. Res.* *44*, 99–111.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1995). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* *14*, 1583–1589.
- Reinhard, M., Halbrügge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J* *11*, 2063–2070.
- Revenu, C., Courtois, M., Michelot, A., Sykes, C., Louvard, D., and Robine, S. (2007). Villin severing activity enhances actin-based motility in vivo. *Mol. Biol. Cell* *18*, 827–838.
- 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 Mater* *9*, 827–832.
- Rogers, S.L., Wiedemann, U., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in *Drosophila* S2 cells. *J. Cell Biol.* *162*, 1079–1088.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* *97*, 221–231.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol* *1*, 321–322.

- Rouiller, I., Xu, X.-P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N., and Hanein, D. (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* *180*, 887–895.
- Roussos, E.T., Wang, Y., Wyckoff, J.B., Sellers, R.S., Wang, W., Li, J., Pollard, J.W., Gertler, F.B., and Condeelis, J.S. (2010). Mena deficiency delays tumor progression and decreases metastasis in polyoma middle-T transgenic mouse mammary tumors. *Breast Cancer Res.* *12*, R101.
- Roy, B.C., Kakinuma, N., and Kiyama, R. (2009). Kank attenuates actin remodeling by preventing interaction between IRSp53 and Rac1. *J. Cell Biol.* *184*, 253–267.
- Salazar, R., Bell, S.E., and Davis, G.E. (1999). Coordinate induction of the actin cytoskeletal regulatory proteins gelsolin, vasodilator-stimulated phosphoprotein, and profilin during capillary morphogenesis in vitro. *Exp. Cell Res* *249*, 22–32.
- Samarin, S., Romero, S., Kocks, C., Didry, D., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (2003). How VASP enhances actin-based motility. *J. Cell Biol* *163*, 131–142.
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M.J., de la Fuente, M.A., Abraham, R.T., Ramesh, N., and Geha, R.S. (2002). Mechanism of Recruitment of WASP to the Immunological Synapse and of Its Activation Following TCR Ligation. *Molecular Cell* *10*, 1269–1281.
- 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.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Schleicher, M., and Faix, J. (2005a). Formins and VASPs may co-operate in the formation of filopodia. *Biochem. Soc. Trans.* *33*, 1256–1259.
- Schirenbeck, A., Arasada, R., Bretschneider, T., Stradal, T.E.B., Schleicher, M., and Faix, J. (2006). The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *103*, 7694–7699.
- Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J. (2005b). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* *7*, 619–625.
- Schmoller, K.M., Lieleg, O., and Bausch, A.R. (2009). Structural and viscoelastic properties of actin/filamin networks: cross-linked versus bundled networks. *Biophys. J.* *97*, 83–89.
- Schulte, R.J., and Sefton, B.M. (2003). Inhibition of the activity of SRC and Abl tyrosine protein kinases by the binding of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry* *42*, 9424–9430.
- Sekimoto, K., Prost, J., Jülicher, F., Boukellal, H., and Bernheim-Grosswasser, A. (2004). Role of tensile stress in actin gels and a symmetry-breaking instability. *Eur Phys J E Soft Matter* *13*, 247–259.
- Sept, D., and McCammon, J.A. (2001). Thermodynamics and kinetics of actin filament nucleation. *Biophys. J.* *81*, 667–674.
- Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., et al. (2007). Curved EFC/F-BAR-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell* *129*, 761–772.
- Skoble, J., Auerbuch, V., Goley, E.D., Welch, M.D., and Portnoy, D.A. (2001). Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *J. Cell Biol.* *155*, 89–100.

- Skoble, J., Portnoy, D.A., and Welch, M.D. (2000). Three Regions within Acta Promote Arp2/3 Complex-Mediated Actin Nucleation and *Listeria monocytogenes* Motility. *The Journal of Cell Biology* *150*, 527.
- Small, J.V., and Resch, G.P. (2005). The comings and goings of actin: coupling protrusion and retraction in cell motility. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 517–523.
- Smith, G.A., Theriot, J.A., and Portnoy, D.A. (1996). The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J. Cell Biol.* *135*, 647–660.
- Smith, M.A., Blankman, E., Gardel, M.L., Luetjohann, L., Waterman, C.M., and Beckerle, M.C. (2010). A zyxin-mediated mechanism for actin stress fiber maintenance and repair. *Dev. Cell* *19*, 365–376.
- Sossey-Alaoui, K., Li, X., and Cowell, J.K. (2007). c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE3 is required for lamellipodia formation and cell migration. *J. Biol. Chem.* *282*, 26257–26265.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E.B. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol. Biol. Cell* *17*, 2581–2591.
- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T.E.B. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* *23*, 749–759.
- Stovold, C.F., Millard, T.H., and Machesky, L.M. (2005). Inclusion of Scar/WAVE3 in a similar complex to Scar/WAVE1 and 2. *BMC Cell Biol.* *6*, 11.
- Stricker, J., Falzone, T., and Gardel, M.L. (2010). Mechanics of the F-actin cytoskeleton. *J Biomech* *43*, 9–14.
- Suarez, C., Roland, J., Boujemaa-Paterski, R., Kang, H., McCullough, B.R., Reymann, A.-C., Guérin, C., Martiel, J.-L., De la Cruz, E.M., and Blanchoin, L. (2011). Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Curr. Biol.* *21*, 862–868.
- Suetsugu, S., and Gautreau, A. (2012). Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends in Cell Biology*.
- Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). Sustained activation of N-WASP through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev. Cell* *3*, 645–658.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J. Cell Biol.* *173*, 571–585.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *260*, 296–302.
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2003). Differential Roles of WAVE1 and WAVE2 in Dorsal and Peripheral Ruffle Formation for Fibroblast Cell Migration. *Developmental Cell* *5*, 595–609.

- Suraneni, P., Rubinstein, B., Unruh, J.R., Durnin, M., Hanein, D., and Li, R. (2012). The Arp2/3 Complex Is Required for Lamellipodia Extension and Directional Fibroblast Cell Migration. *J Cell Biol* 197, 239–251.
- 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.
- Svitkina, T.M., Bulanova, E.A., Chaga, O.Y., Vignjevic, D.M., Kojima, S., Vasiliev, J.M., and Borisy, G.G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J. Cell Biol* 160, 409–421.
- Svitkina, T.M., Verkhovskiy, A.B., McQuade, K.M., and Borisy, G.G. (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: mechanism of cell body translocation. *J. Cell Biol.* 139, 397–415.
- Symons, M., Derry, J.M., Karlak, B., Jiang, S., Lemahieu, V., McCormick, F., Francke, U., and Abo, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723–734.
- Takano, K., Takano, K., Toyooka, K., and Suetsugu, S. (2008). EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* 27, 2817–2828.
- Tempel, Isenberg, and Sackmann (1996). Temperature-induced sol-gel transition and microgel formation in alpha -actinin cross-linked actin networks: A rheological study. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 54, 1802–1810.
- Theriot, J.A., and Mitchison, T.J. (1991). Actin microfilament dynamics in locomoting cells. *Nature* 352, 126–131.
- Theriot, J.A., Rosenblatt, J., Portnoy, D.A., Goldschmidt-Clermont, P.J., and Mitchison, T.J. (1994). Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76, 505–517.
- Tilney, L.G., Connelly, P.S., and Portnoy, D.A. (1990). Actin filament nucleation by the bacterial pathogen, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 111, 2979–2988.
- Tilney, L.G., DeRosier, D.J., and Tilney, M.S. (1992). How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement. *J. Cell Biol.* 118, 71–81.
- Toyoda, A., Yokota, A., Saito, T., Kawana, H., Higashi, M., Suzuki, Y., Tanaka, T., Kitagawa, M., and Harigaya, K. (2011). Overexpression of human ortholog of mammalian enabled (hMena) is associated with the expression of mutant p53 protein in human breast cancers. *Int. J. Oncol* 38, 89–96.
- Tseng, Y., and Wirtz, D. (2004). Dendritic branching and homogenization of actin networks mediated by arp2/3 complex. *Phys. Rev. Lett.* 93, 258104.
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J. Cell Biol.* 172, 269–279.
- Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G.P., and Small, J.V. (2010). Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* 12, 429–435.

- Vandekerckhove, J., and Weber, K. (1978). At least six different actins are expressed in a higher mammal: An analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *Journal of Molecular Biology* *126*, 783–802.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* *100*, 209–219.
- Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S., and Horwitz, A.R. (2009). Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *10*, 778–790.
- Vignjevic, D., Kojima, S., Aratyn, Y., Danciu, O., Svitkina, T., and Borisy, G.G. (2006). Role of fascin in filopodial protrusion. *J. Cell Biol* *174*, 863–875.
- Walders-Harbeck, B., Khaitlina, S.Y., Hinssen, H., Jockusch, B.M., and Illenberger, S. (2002). The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett.* *529*, 275–280.
- Waldmann, R., Nieberding, M., and Walter, U. (1987). Vasodilator-stimulated protein phosphorylation in platelets is mediated by cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Eur. J. Biochem.* *167*, 441–448.
- 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.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B.M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* *16*, 3044–3056.
- Wegner, A. (1976). Head to tail polymerization of actin. *J. Mol. Biol.* *108*, 139–150.
- Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* *385*, 265–269.
- Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* *281*, 105–108.
- Wickramarachchi, D.C., Theofilopoulos, A.N., and Kono, D.H. (2010). Immune pathology associated with altered actin cytoskeleton regulation. *Autoimmunity* *43*, 64–75.
- Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M.-F., and Pantaloni, D. (2003a). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J. Cell Biol.* *160*, 387–398.
- Wiesner, S., Helfer, E., Didry, D., Ducouret, G., Lafuma, F., Carlier, M.-F., and Pantaloni, D. (2003b). A biomimetic motility assay provides insight into the mechanism of actin-based motility. *J. Cell Biol.* *160*, 387–398.
- Wu, C., Asokan, S.B., Berginski, M.E., Haynes, E.M., Sharpless, N.E., Griffith, J.D., Gomez, S.M., and Bear, J.E. (2012). Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* *148*, 973–987.

- Yamada, H., Padilla-Parra, S., Park, S.-J., Itoh, T., Chaineau, M., Monaldi, I., Cremona, O., Benfenati, F., De Camilli, P., Coppey-Moisan, M., et al. (2009). Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly. *J. Biol. Chem.* *284*, 34244–34256.
- Yamazaki, D., Fujiwara, T., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2005). A novel function of WAVE in lamellipodia: WAVE1 is required for stabilization of lamellipodial protrusions during cell spreading. *Genes Cells* *10*, 381–392.
- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S.-I., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* *424*, 452–456.
- Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S.B., Kirschner, M.W., et al. (2003). WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *EMBO J.* *22*, 3602–3612.
- Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007). Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol.* *5*, e317.
- Yang, C., and Svitkina, T. (2011). Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell Adh Migr* *5*, 402–408.
- Yarar, D., D'Alessio, J.A., Jeng, R.L., and Welch, M.D. (2002). Motility determinants in WASP family proteins. *Mol. Biol. Cell* *13*, 4045–4059.
- Yarar, D., To, W., Abo, A., and Welch, M.D. (1999). The Wiskott-Aldrich syndrome protein directs actin-based motility by stimulating actin nucleation with the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* *9*, 555–558.
- Yarar, D., Waterman-Storer, C.M., and Schmid, S.L. (2007). SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis. *Dev. Cell* *13*, 43–56.
- Yoshigi, M., Hoffman, L.M., Jensen, C.C., Yost, H.J., and Beckerle, M.C. (2005). Mechanical force mobilizes zyxin from focal adhesions to actin filaments and regulates cytoskeletal reinforcement. *J. Cell Biol.* *171*, 209–215.
- Zaidel-Bar, R., Ballestrem, C., Kam, Z., and Geiger, B. (2003). Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell. Sci.* *116*, 4605–4613.
- Zalevsky, J., Lempert, L., Kranitz, H., and Mullins, R.D. (2001). Different WASP family proteins stimulate different Arp2/3 complex-dependent actin-nucleating activities. *Curr. Biol.* *11*, 1903–1913.
- Zimmermann, J., Labudde, D., Jarchau, T., Walter, U., Oschkinat, H., and Ball, L.J. (2002). Relaxation, equilibrium oligomerization, and molecular symmetry of the VASP (336-380) EVH2 tetramer. *Biochemistry* *41*, 11143–11151.
- Zuzga, D.S., Pelta-Heller, J., Li, P., Bombonati, A., Waldman, S.A., and Pitari, G.M. (2011). Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein ser239 suppresses filopodia and invadopodia in colon cancer. *Int J Cancer.*

Résumé.

Étude du rôle de la protéine VASP dans la dynamique et la mécanique des réseaux d'actine avec un système biomimétique de la motilité cellulaire.

Nous étudions dans cette thèse l'influence de la protéine VASP sur la dynamique et les propriétés mécaniques des réseaux d'actine à l'origine de la motilité cellulaire. Dans une première partie, nous utilisons un système biomimétique du mouvement constitué de billes. Incubées dans un mélange minimal de protéines soutenant la polymérisation, ces billes forment un réseau d'actine appelé « comète » les propulsant vers l'avant, semblable à celui qui sous-tend la membrane du front de migration des cellules en mouvement. Grâce à des formes mutantes de VASP, nous explorons la contribution à son activité des domaines qui la composent. Dans nos conditions, nous montrons également que VASP agit au travers d'un mécanisme de coopération avec le complexe Arp2/3 qui est à l'origine de la formation des réseaux d'actine. Enfin, nous étudions les modalités de recrutement de VASP par les activateurs de la famille WASP/WAVE en mutant les sites potentiels de recrutement de VASP. Dans une seconde partie, nous nous intéressons, en collaboration avec deux équipes de recherche, au rôle de VASP dans la mécanique des réseaux d'actine. Nous caractérisons en rhéologie couplée à des observations en microscopie confocale les mécanismes moléculaires de VASP dans la réorganisation de l'architecture des réseaux d'actine, en lien avec leurs propriétés mécaniques, puis, nous étudions en AFM par nano indentation l'augmentation de rigidité des réseaux d'actine formés en présence de VASP.

Mots-clés. VASP, actine, cytosquelette, biomimétisme, motilité, élasticité.

The role of the protein VASP in actin network dynamics and mechanics using a biomimetic system of cell motility

We study the influence of the VASP protein on dynamics and mechanics of the actin networks that drive cell motility. Our experimental setup is an *in vitro* bead system that mimics cell movement. The beads are induced to form a network of actin on their surface that resembles a "comet" and propels the bead forward. The actin comet reproduces in many ways the actin network that pushes forward the front of a moving cell. Using mutant forms of VASP, we define which functional domains of VASP are necessary for its function in enhancement of motility. We show that VASP exercises its effect on actin polymerization via synergy with the Arp2/3 complex, an actin polymerization nucleator and an important component of branched actin networks in the cell. We study how this synergy is brought about by co-recruitment of VASP and the Arp2/3 complex by actin polymerization activators of the WASP/WAVE family. In collaboration, we also study how VASP affects the mechanical properties of actin networks. Via AFM nano-indentation of actin comets, we show that VASP increases actin network rigidity, and we corroborate this result by rheological measurements of the elasticity of pure actin networks in the presence of VASP, where we also gain insights into how VASP affects actin network architecture. Our results define the mechanism of action of VASP for enhancement of actin dynamics and cell motility, and shed light on why VASP is implicated in various pathologies, including cancer cell metastasis.