



Régulation de l'assemblage de l'actine dans les jonctions adhérentes : étude du mécanisme d'action du complexe α -caténine-vinculine-VASP

Rayan Said

► To cite this version:

Rayan Said. Régulation de l'assemblage de l'actine dans les jonctions adhérentes : étude du mécanisme d'action du complexe α -caténine-vinculine-VASP. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay, 2023. Français. NNT : 2023UPASL024 . tel-04514080

HAL Id: tel-04514080

<https://theses.hal.science/tel-04514080>

Submitted on 21 Mar 2024

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.

Régulation de l'assemblage de l'actine dans les jonctions adhérentes : étude du mécanisme d'action du complexe α -caténine-vinculine-VASP

*Regulation of actin assembly in adherens junctions: a study of the
mechanism of action of the α -catenin-vinculin-VASP complex*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577, Structure et Dynamique des Systèmes Vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Biochimie et biologie structurale
Graduate School : Life Sciences and Health. Référent : Faculté des Sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **I2BC Institut de biologie intégrative de la
cellule (Université Paris-Saclay, CEA, CNRS)**, sous la direction de
Christophe LE CLAINCHE, directeur de recherche DR2

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 20 Mars 2023, par

Rayan SAID

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Marie-Émilie TERRET

Directrice de Recherche, CIRB (Paris)

Présidente & Rapportrice

Antoine JÉGOU

Directeur de Recherche, Institut Jacques Monod (Paris)

Rapporteur & Examineur

Clément CAMPILLO

Maître de conférences, HDR, LAMBE (Évry)

Examineur

Danijela VIGNJEVIC

Directrice de Recherche, Institut Curie (Paris)

Examinatrice

Titre : Régulation de l'assemblage de l'actine dans les jonctions adhérentes : étude du mécanisme d'action du complexe α -caténine-vinculine-VASP

Mots clés : cytosquelette d'actine, adhérence, force, α -caténine, vinculine, VASP.

Résumé : La formation et la cohésion des tissus au cours du développement des organismes multicellulaires ainsi que leur adaptation aux perturbations mécaniques chez l'adulte nécessitent des structures d'adhérence entre les cellules telles que les jonctions adhérentes (JA). Les JA contiennent des protéines transmembranaires d'adhérence de la famille des cadhérines. La formation des JA nécessite que deux cellules entrent en contact en étendant leur membrane. Ces protrusions membranaires se forment grâce à l'assemblage d'un réseau de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3. Après leur formation, les JA assemblent et organisent un nouveau réseau d'actine grâce à un complexe mécanosensible formé des protéines α -caténine, vinculine et VASP.

Le but de ce projet était de déchiffrer le mécanisme par lequel les protéines constituant ce complexe d'adhérence combinent leurs activités pour réguler la polymérisation et l'organisation du cytosquelette d'actine au cours de la formation et de la maturation des JA. Pour répondre à ces questions, les techniques de spectroscopie de fluorescence ainsi que l'observation des filaments uniques d'actine en microscopie TIRF ont été utilisées. Les résultats montrent que l' α -caténine, la vinculine et VASP coopèrent pour inhiber le branchement des filaments d'actine par le complexe Arp2/3, nucléer des filaments d'actine et accélérer leur élongation en présence de profiline, et rassembler ces filaments en faisceaux.

Title : Regulation of actin assembly in adherens junctions: a study of the mechanism of action of the α -catenin-vinculin-VASP complex

Keywords : actin cytoskeleton, adhesion, force, α -catenin, vinculin, VASP.

Abstract : Tissue formation and cohesion during development of multicellular organisms as well as adaptation to mechanical perturbations in the adult requires cell-cell adhesion structures such as adherens junctions (AJs). AJs contain transmembrane adhesion proteins of the cadherin family. AJ formation requires that two cells come into contact by extending their plasma membranes. These membrane protrusions are formed by the assembly of a network of actin filaments branched by the Arp2/3 complex. After formation, AJs assemble and organize a new actin network through a mechanosensitive complex formed by the proteins α -catenin, vinculin and VASP.

The goal of this project was to decipher the mechanism by which the proteins composing this adhesion complex combine their activities to regulate the polymerization and organization of the actin cytoskeleton during AJ formation and maturation. To address these questions, fluorescence spectroscopy techniques as well as observation of single actin filaments by TIRF microscopy were used. The results show that α -catenin, vinculin, and VASP cooperate to inhibit actin filament branching by the Arp2/3 complex, nucleate actin filaments and accelerate their elongation in the presence of profilin, and organize these filaments into bundles.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je voudrais exprimer ma gratitude à tous les membres de mon jury de thèse, Antoine Jégou, Marie-Émilie Terret, Clément Campillo et Danijela Vignjevic, d'avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse et de m'honorer par leur présence.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Christophe Le Clainche, de m'avoir accueillie dans son équipe, d'avoir cru en moi et de m'avoir confiée ce projet. Merci pour les discussions et les conseils qui m'ont permis d'apprendre beaucoup et qui ont amplement contribué à l'avancement de ce travail. Je suis reconnaissante pour ton aide à trouver une solution afin de prolonger mon contrat. Merci également pour ton optimisme assez impressionnant, ta patience et tes assurances continues pendant ces trois ans de thèse.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, René-Marc Mège et Flora Llense, pour l'évaluation régulière de mon travail et pour leurs conseils et discussions enrichissantes.

Durant ma thèse, j'ai été chanceuse de travailler et d'être entourée par des membres d'équipe très agréables qui ont tous participé d'une manière ou d'une autre à l'achèvement de ce travail. Je remercie tous les membres de l'équipe « Dynamique du cytosquelette et motilité », actuels et anciens : Christophe, Violaine, Marcelina, Hema, Julien, Audrey, Aurélie, Clémence, Hong, Louis et Magda. Avoir une bonne ambiance d'équipe aide énormément pour l'épanouissement personnel et professionnel, et moi j'ai eu la chance d'avoir fait ma thèse avec vous la « Team ACTIN ».

Julien, merci pour ton aide tout au long de ma thèse. Merci de m'avoir formé au début de ma thèse et de m'avoir appris délicatement la plupart des techniques. Je te remercie pour toutes les discussions concernant les expériences et l'avancement du projet, pour les remarques et les conseils pertinents que tu m'as donné durant mes présentations. Merci de m'avoir sauvé quand j'avais des problèmes avec le microscope et l'AKTA. Merci de me faire peur dans les couloirs. Je te souhaite une très bonne continuation dans ta nouvelle équipe.

Violaine, toujours souriante ! Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. J'ai souvent adoré discuter avec toi du travail mais aussi de plein d'autres choses, surtout de la philosophie tout en essayant de me convaincre que « le temps n'existe pas ». Merci pour toutes les astuces que tu m'as transmises pour la préparation des boîtes de culture, et aussi pour ton soutien pendant la rédaction de ma thèse.

Marcelina, merci pour ta spontanéité et ta gentillesse, pour toutes les discussions intéressantes du travail et autres, pour les améliorations du TIRF et aussi tes commentaires utiles pour mes présentations.

Hema, merci pour ta bienveillance, ta bonté et ta gentillesse. Merci pour toutes les pauses déjeuner à la cafétéria et nos discussions interminables. Je savais que je pouvais tout te dire et que tu prenais toujours le temps de m'écouter, de me motiver et de m'encourager. Tu n'as jamais hésité à proposer ton aide pour les expériences, je te remercie pour tes participations (actuelles et prochaines) pour les révisions de l'article. Tu m'as appris une nouvelle culture, les traditions indiennes, et les recettes des gâteaux qu'on a partagées ! Merci pour ton grand cœur !

Audrey et Aurélie, je vous souhaite plein de courage pour la thèse !

Je remercie tous les « voisins » du bâtiment 34 que j'ai pu côtoyer et discuter avec eux au quotidien. Merci également aux thésards du 34 avec qui j'ai pu partager les inquiétudes et le stress des journées de thèse.

Je tiens à remercier la plateforme ImagerieGif surtout les membres de la plateforme de microscopie photonique : Romain LeBars et Sandrine Lécart.

Mes chers amis du Liban, merci de rester mes amis fidèles pendant toutes ces années, pour votre soutien, d'être toujours aussi serviables et aussi adorables, de me faire rire et oublier le stress de travail !

Mes plus profonds remerciements à ma formidable famille et en particulier mon père, ma mère et mes deux frères : Mhamad et Hassan. Un court paragraphe ne suffit pas pour vous exprimer ma gratitude. Mes chers parents, je sais que vous avez sacrifié beaucoup pour que mes frères et moi recevions la meilleure éducation. Je n'aurais rien accompli dans ma vie sans votre amour inconditionnel et votre support incessant. Merci pour vos prières sincères, vos appels et vos messages qui m'ont fait sentir d'être parmi vous malgré la distance. J'espère que vous êtes fiers de moi ! Je remercie également ma belle-famille pour leur soutien et leur encouragement (surtout Amani et Achraf).

Le meilleur pour la fin ! Mes derniers remerciements sont les plus spéciaux et les plus durs à écrire ! Je voudrais remercier la personne la plus précieuse, la plus gentille, mon amour, mon ami et mon partenaire, AHMAD. Cette réussite n'aurait pas été possible sans toi. Merci d'être mon « backbone », mon pilier tout au long de ce voyage. Je te remercie de m'avoir encouragée quand je baisse les bras, de me motiver toujours et de me remonter le moral. Merci d'être toujours à mes côtés dans les bons et mauvais moments. Les mots me manquent pour exprimer ce que je ressens. Je te remercie infiniment pour tout !

الْحَمْدُ لِلَّهِ

SOMMAIRE

RÉSUMÉ	6
SUMMARY	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES	11
I. INTRODUCTION	13
I.1. ADAPTATION DES TISSUS AUX CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES	13
I.2. ORGANISATION ET DYNAMIQUE DES SYSTÈMES ADHÉSIFS CELLULAIRES	15
I.2.1. Les adhésions cellule-cellule	15
I.2.1.1. Variété des structures adhésives intercellulaires	15
I.2.1.2. Organisation et assemblage des jonctions adhérentes (JA)	17
I.2.1.3. Mécanosensibilité des jonctions adhérentes	21
I.2.1.4. Composition moléculaire des jonctions adhérentes	22
I.2.1.4.1. E-cadhérines	22
I.2.1.4.2. p120-caténine	26
I.2.1.4.3. β -caténine	27
I.2.1.4.4. α -caténine	28
I.2.2. Les adhésions cellule-matrice	32
I.2.3. Analogie et interaction entre jonctions adhérentes et adhésions focales	36
I.3. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE : ORGANISATION ET RÉGULATION	38
I.3.1. Structure et assemblage de l'actine	38
I.3.2. Régulation de la polymérisation de l'actine	42
I.3.2.1. Les protéines séquestrantes	43
I.3.2.2. Les nucléateurs	44
I.3.2.3. Les protéines de coiffe	46
I.3.2.4. Les protéines de désassemblage	47
I.3.2.5. Les protéines de réticulation (<i>crosslinking</i>)	49
I.3.3. Le réseau contractile d'actomyosine	49
I.4. RÉGULATION DE LA DYNAMIQUE DE L'ACTINE AU NIVEAU DES JONCTIONS ADHÉRENTES	50
I.4.1. Organisation et régulation de l'actine au niveau des JA	50

I.4.2. La vinculine	53
I.4.2.1. Organisation structurale, interactions et régulation	53
I.4.2.2. Rôle dans la régulation de l'assemblage de l'actine	55
I.4.3. VASP	55
I.4.3.1. Organisation structurale et interactions	56
I.4.3.2. Rôle dans la régulation de l'assemblage de l'actine	57
II. POSITION DU SUJET	59
III. MATÉRIELS ET MÉTHODES	61
III.1. PURIFICATION DES PROTÉINES ÉTUDIÉES	61
III.1.1. Purification et marquage de l'actine	61
III.1.2. α-caténine	62
III.1.3. Vinculine	63
III.1.4. VASP	65
III.2. ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DE L'ASSEMBLAGE ET DE L'ORGANISATION DE L'ACTINE	66
III.2.1. Mesure et analyse <i>in vitro</i> de la cinétique de polymérisation d'actine-pyrène par spectroscopie de fluorescence	67
III.2.1.1. Principe	67
III.2.1.2. Considérations biochimiques et techniques et analyse des données	67
III.2.2. Mesure de la formation de faisceaux d'actine en diffusion de la lumière suivie d'une observation en microscopie à épifluorescence	69
III.2.3 Observation <i>in vitro</i> de filaments d'actine uniques en microscopie de fluorescence TIRF.	70
III.2.3.1. Principe et stratégie expérimentale	70
III.2.3.2. Préparations des chambres et considérations techniques	71
IV. RÉSULTATS	73
ARTICLE 1: LES PROTÉINES DES JONCTIONS ADHÉRENTES α-CATÉNINE, VINCULINE ET VASP COOPÈRENT POUR FAVORISER L'ASSEMBLAGE DE L'ACTINE	73
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	106
BIBLIOGRAPHIE	116
ANNEXE	137
ARTICLE 2: La TALINE ET LA VINCULINE COMBINENT LEURS ACTIVITÉS POUR DÉCLENCHER L'ASSEMBLAGE DE L'ACTINE. (EN RÉVISION)	137

RÉSUMÉ

Au cours de nombreux processus physiologiques, les tissus doivent s'adapter aux variations mécaniques auxquelles ils sont soumis pour maintenir leur intégrité. La mécanotransduction des forces tissulaires en information biochimique intracellulaire interprétable par la cellule fait intervenir les complexes mécanosensibles présents dans les jonctions adhérentes qui assurent l'adhésion entre les cellules. Les jonctions adhérentes contiennent des protéines transmembranaires adhésives de la famille des cadhérines. Le rapprochement des cadhérines de deux cellules requiert l'extension de protrusions membranaires qui se forment grâce à l'assemblage de réseaux de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3. Les domaines extracellulaires des cadhérines assurent alors l'adhésion entre les cellules et les domaines intracellulaires ancrent le cytosquelette d'actine via les caténines et une variété de protéines de liaison à l'actine telles que la vinculine et VASP. Le complexe mécanosensible formé des protéines α -caténine, vinculine et VASP induit alors la polymérisation de l'actine en réponse à la tension générée par l'activité de l'actomyosine pour réorganiser le réseau d'actine branchée par un mécanisme inconnu au début de ce travail de thèse.

Le but de ce projet était donc d'étudier le mécanisme moléculaire par lequel les protéines constituant ce complexe d'adhérence régulent la polymérisation et l'organisation du cytosquelette d'actine au cours de la formation et de la maturation des jonctions adhérentes.

Cette étude a nécessité la production de protéines mutées qui s'associent entre elles constitutivement sans stimulus mécanique. L'étude de la cinétique de polymérisation d'actine en spectroscopie de fluorescence ainsi que l'observation des filaments uniques d'actine en microscopie à onde évanescente (TIRF) montrent que l' α -caténine, la vinculine et VASP coopèrent pour inhiber le branchement des filaments d'actine par le complexe Arp2/3, nucléer des filaments d'actine et accélérer leur élongation en présence de profiline, et rassembler ces filaments en faisceaux. Cette étude révèle les mécanismes moléculaires par lesquels l' α -caténine, la vinculine et VASP coopèrent pour adapter l'architecture et la dynamique des réseaux d'actine lors de la formation et la maturation des jonctions adhérentes.

SUMMARY

During many physiological processes, tissues must adapt to the mechanical variations to which they are subjected in order to maintain their integrity. The mechanotransduction of tissue forces into intracellular biochemical information that can be interpreted by the cell involves the mechanosensitive complexes present in adherens junctions that ensure adhesion between cells. Adherens junctions contain transmembrane adhesive proteins of the cadherin family. Bringing the cadherins of two cells together requires the extension of membrane protrusions that are formed through the assembly of branched actin filament networks by the Arp2/3 complex. The extracellular domains of cadherins then provide adhesion between cells and the intracellular domains anchor the actin cytoskeleton via catenins and a variety of actin-binding proteins such as vinculin and VASP. The mechanosensitive complex of α -catenin, vinculin and VASP proteins then induces actin polymerization in response to tension generated by actomyosin activity to reorganize the branched actin network by a mechanism unknown at the start of this thesis work.

The aim of this project was therefore to study the molecular mechanism by which the proteins constituting this adhesion complex regulate the polymerization and organization of the actin cytoskeleton during adherens junction formation and maturation.

This study required the production of mutated proteins that associate with each other constitutively without mechanical stimulus. The study of actin polymerization kinetics by fluorescence spectroscopy as well as the observation of single actin filaments by evanescent wave microscopy (TIRF) show that α -catenin, vinculin and VASP cooperate to inhibit actin filament branching by the Arp2/3 complex, nucleate actin filaments and accelerate their elongation in the presence of profilin, and bundle these filaments. This study reveals the molecular mechanisms by which α -catenin, vinculin and VASP cooperate to adapt the architecture and dynamics of actin networks during the formation and maturation of adherens junctions.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ABD: actin binding domain

Abl: tyrosine kinase Abelson murine leukemia

ABP: actin-binding protein

ActA: Actin assembly-inducing protein

Actine-F: actine filamenteuse

Actine-G: actine globulaire monomérique

ADF: actin depolymerizing factor

ADN: acide désoxyribonucléique

ADP: adenosine diphosphate

AF: adhésion focale

AN: adhésion naissante

APC: Adenomatous Polyposis Coli

Arm: domaine Armadillo

Arp2/3: Actin-related protein

ATP: adenosine triphosphate

BSA: bovine serum albumin

CBD: Catenin Binding Domain

Cdc42: Cell division control protein 42 homolog (de la famille des RhoGTPases)

CP: capping protein

CRMP-1: collapsin response mediator protein 1

DSC: desmocollines

DSG: desmoglénines

EC: ectodomaine

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

EGTA: acide éthylène glycol tétraacétique

EMT: epithelial-mesenchymal transition

Ena/VASP: Enabled/ Vasodilator-stimulated phosphoprotein
EVH1: Ena/VASP homology 1
EVH2: Ena/VASP homology 2
EVL: Ena/VASP-like
FAB: filamentous actin binding
FERM: Four-point-one/Ezrin/radixin/moesin
FRET: Förster resonance energy transfer
GAB: globular actin binding
GDP: guanosine diphosphate
GST: glutathione-S-transférase
GTP: guanosine triphosphate
GTPases: Hydrolase Enzyme de Guanosine triphosphate
IpaA: invasion plasmid antigen A
iPALM: interferometric PhotoActivated Localization Microscopy
IPTG: isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside
JA: jonction adhérente
JMD: Juxta Membrane Domain
LEF: lymphoid enhancer-binding factor
mDia1: Diaphanous-related formin
MEC: matrice extracellulaire
NMIIA: non-muscle myosin II A
NMIIB: non-muscle myosin II B
NPF: nucleation promoting factor
PA: punctum adherens
PIP2: phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate
PLL-g-PEG: Poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol)
RIAM: Rap1-GTP-interacting adaptor molecule
TCF: T-Cell-specific factor

TIRF: total internal reflection fluorescence

VBS: vinculin binding site

VCA: verprolin, central, acidic

WASP: Wiskott-Aldrich Syndrome protein

WAVE: WASP-family veroprolin-homologous protein

ZA: zonula adherens

ZO-1: Zonula Occludens-1

ZO-2: Zonula Occludens-2

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Modèle de la réparation des plaies chez l'embryon de drosophile.	14
Figure 2. Représentation schématique des différents types des contacts cellule-cellule et leur composition moléculaire.	16
Figure 3. Différents types de jonctions adhérentes observées dans les cellules épithéliales.	18
Figure 4. Mécanisme d'initiation et d'assemblage des jonctions adhérentes.	20
Figure 5. Modèle schématique de l'organisation moléculaire des jonctions adhérentes et de la distribution de leurs composants le long de l'axe vertical en microscopie iPALM.	21
Figure 6. Structure et organisation en domaines de la E-cadhérine.	23
Figure 7. Les molécules de E-cadhérines des JA sont soumises à une tension constitutive dépendante du cytosquelette d'actine.	25
Figure 8. Organisation en domaines de la p120-caténine.	26
Figure 9. Structure et organisation en domaines de la β -caténine.	27
Figure 10. Organisation en domaines de l' α -caténine et interactions.	29
Figure 11. Mécanosensibilité du complexe α -caténine-vinculine.	30
Figure 12. Modèle moléculaire 3D représentant le complexe d'adhésion cellulaire E-cadhérine-caténine associé au filament d'actine (actine-F).	31
Figure 13. Représentation schématique des différentes catégories de complexes d'adhésion cellule-matrice et leur distribution spatiale dans la cellule.	32
Figure 14. Représentation schématique des deux conformations d'intégrines transmembranaires.	34
Figure 15. Structure et organisation en domaine de la taline.	35
Figure 16. Similarités et différences dans l'organisation moléculaire des complexes d'adhésion intégrines et cadhérines.	37
Figure 17. Structure du monomère d'actine.	39
Figure 18. Processus d'assemblage des filaments d'actine.	41
Figure 19. Les différents modes de régulation de l'actine par les ABPs.	43
Figure 20. Schéma représentant le mécanisme d'échange ADP/ATP par la profiline lors de la polymérisation d'actine.	44
Figure 21. Structure du complexe Arp2/3.	46
Figure 22. Modèle représentant la régulation du mécanisme « tapis roulant ».	48
Figure 23. Le cytosquelette d'actomyosine.	50
Figure 24. Schéma représentant la réorganisation de l'actine au cours de la formation des contacts cellule-cellule.	52
Figure 25. Structure et organisation en domaines de la vinculine.	54
Figure 26. Organisation en domaines de VASP et ses partenaires.	56
Figure 27. Mécanisme d'élongation processive des filaments d'actine par VASP.	58
Figure 28. Les constructions d' α -caténine utilisées dans cette étude.	62

Figure 29. La construction de la vinculine utilisée dans cette étude.....	64
Figure 30. La construction de VASP utilisée dans cette étude.....	65
Figure 31. Principe de l'essai pour mesurer des cinétiques de polymérisation d'actine in vitro par spectroscopie de fluorescence.	67
Figure 32. Illustration des étapes de préparation des chambres pour l'observation in vitro des filaments uniques d'actine en microscopie à fluorescence TIRF.	71
Figure 33. La vinculine et les protéines Ena/VASP sont nécessaires à l'assemblage de l'actine jonctionnelle.....	107
Figure 34. Images en microscopie électronique montrant deux types de réseaux d'actine au niveau des JA.....	112
Figure 35. L'isoforme NMIIIB contrôle le dépliement de l'α-caténine au niveau des contacts cellule-cellule.	113
Figure 36. Modèle du mécanisme par lequel l'α-caténine, la vinculine et VASP régulent l'assemblage et l'organisation de l'actine durant la formation des contacts cellule-cellule.	114

I. INTRODUCTION

I.1. ADAPTATION DES TISSUS AUX CONTRAINTES ENVIRONNEMENTALES

L'organisation morphologique et fonctionnelle des cellules en tissus est une spécificité des organismes vivants pluricellulaires. Le développement et l'entretien de ce processus nécessitent un dialogue entre les cellules impliquant des messages qui ne sont pas seulement biochimiques mais aussi mécaniques. Ainsi, la répartition des tensions détermine l'organisation des cellules dans les tissus ([D'Arcy Thompson, 1917](#)). Au sein d'un tissu, les cellules sont capables de s'adapter aux changements mécaniques de leur environnement pour maintenir leur intégrité ([LeGoff et Lecuit, 2016](#)). Cette dynamique tissulaire permet une grande variété des phénomènes morphogénétiques comme la régénération des tissus adultes, la cicatrisation des plaies ou l'invasion des cellules cancéreuses qui migrent de manière collective ([Abreu-Blanco et al., 2012](#)) (Figure 1). Ainsi, en cas de blessure de la peau, les cellules de la couche basale de l'épiderme migrent collectivement et prolifèrent pour recoloniser les zones endommagées acellulaires et cicatriser la plaie. Dans ce processus de migration collective, les cellules exercent des forces de contraction qui sont transmises au substrat et à leurs voisines par les jonctions intercellulaires ([Treat et al., 2009](#); [Treat et Fredberg, 2011](#)). Ces jonctions confèrent aux cellules la propriété de s'adapter au sein du tissu pendant la migration épithéliale collective ([Doxzen et al., 2013](#); [Vedula et al., 2012](#)). Certains processus morphogénétiques illustrent également l'importance de la coordination des cellules pour maintenir l'intégrité tissulaire. On peut citer par exemple la morphogenèse des canaux mammaires dans des modèles humains et animaux (souris) où des groupes de cellules s'adaptent aux contraintes environnementales en migrant et en se réorganisant ([Ewald et al., 2008](#)). Ces réarrangements de cellules interconnectées conduisent à la formation d'un tissu épithélial multicouche bien structuré. En plus de ces processus physiologiques, il existe aussi des phénomènes pathologiques dans lesquels la compression des cellules altère le microenvironnement tissulaire, comme dans le cancer du sein ([Mouw et al., 2014](#)) et le carcinome du côlon ([Nabeshima et al., 1999](#)).

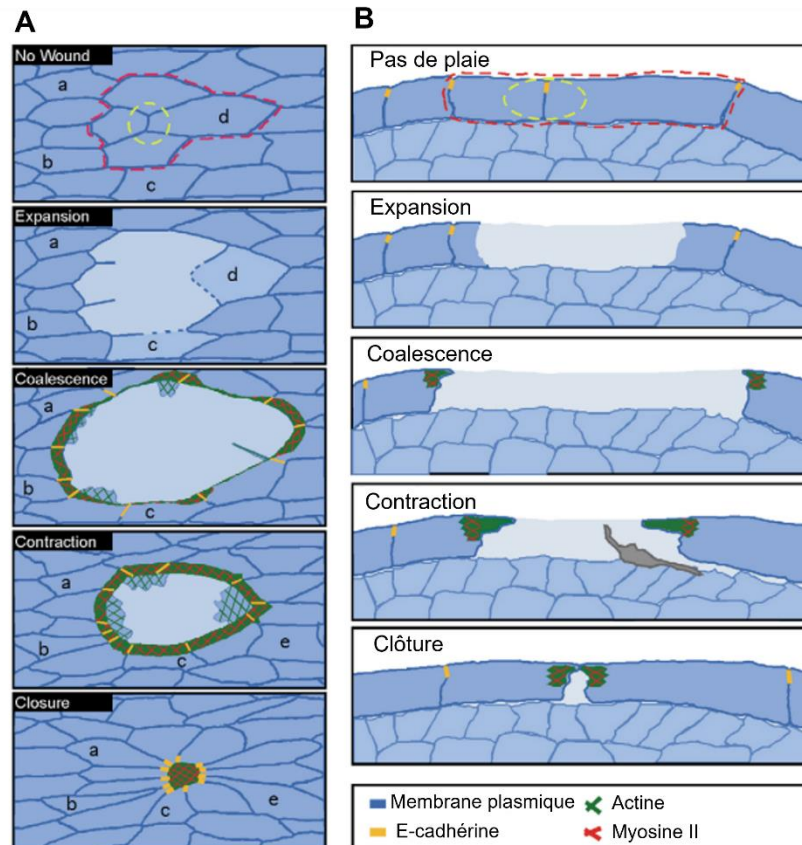


Figure 1. Modèle de la réparation des plaies chez l'embryon de drosophile.

Schémas en vue du dessus **(A)** et en coupes transversales **(B)** de cellules épithéliales de l'embryon de drosophile pendant la réparation d'une blessure. Les protéines impliquées dans ce processus sont indiquées en bas à droite. Les lettres (a-e) représentent les cellules qui ont subi des changements de forme et de comportement au bord de la plaie. (adapté de [Abreu-Blanco et al., 2012](#)).

Les mécanismes par lesquels les cellules d'un tissu détectent les variations de leur environnement et s'y adaptent ont fait l'objet de multiples études depuis quelques années. Le rôle des adhésions intercellulaires dans ces mécanismes a reçu une attention particulière ces dernières années. En effet, les cellules détectent et exercent des forces entre elles au niveau des structures d'adhésion intercellulaires, appelées jonctions adhérentes (JA), contenant les protéines transmembranaires de la famille des cadhérines ([Leckband et de Rooij, 2014; Takeichi, 2014](#)). Les JA n'assurent pas seulement la cohésion des cellules dans un tissu mais confèrent également des propriétés mécaniques à ce tissu ([Guillot et Lecuit, 2013; Collins et Nelson, 2015; Takeichi, 2014](#)). Une caractéristique majeure des JA est la mécanosensibilité qui leur permet d'adapter les propriétés mécaniques des cellules, et donc des tissus, aux variations des forces

intracellulaires et extracellulaires ([Ladoux et Mège, 2017](#); [Lecuit et Yap, 2015](#); [Hoffman et Yap, 2015](#)).

I.2. ORGANISATION ET DYNAMIQUE DES SYSTÈMES ADHÉSIFS CELLULAIRES

I.2.1. Les adhésions cellule-cellule

I.2.1.1. Variété des structures adhésives intercellulaires

Les structures d'adhésion cellule-cellule assurent la polarité cellulaire, la maintenance de la cohésion tissulaire, et les échanges intercellulaires de molécules et de signaux. Les contacts cellule-cellule constituent donc une barrière souple et adaptable aux contraintes environnementales. Les principales jonctions cellule-cellule connues chez les vertébrés sont les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes (Figure 2).

Les jonctions serrées, également appelées « *Zonula occludens* » sont localisées au pôle apical des cellules épithéliales. Elles constituent des barrières imperméables qui empêchent le passage des fluides et des nutriments extracellulaires entre les cellules ([Zihni et al., 2016](#)). Les jonctions serrées sont constituées des protéines transmembranaires appelées claudines et occludines, qui interagissent de manière homotypique avec les claudines et les occludines des cellules voisines. Les domaines cytoplasmiques de ces protéines transmembranaires se lient indirectement au cytosquelette d'actine ([Fanning et al., 1998](#)) et aux microtubules ([Yano et al., 2013](#)) via des protéines adaptatrices telles que ZO-1 (Zonula Occludens -1) et ZO-2 (Zonula Occludens -2). La formation des jonctions serrées confère aux cellules une polarité apico-basal.

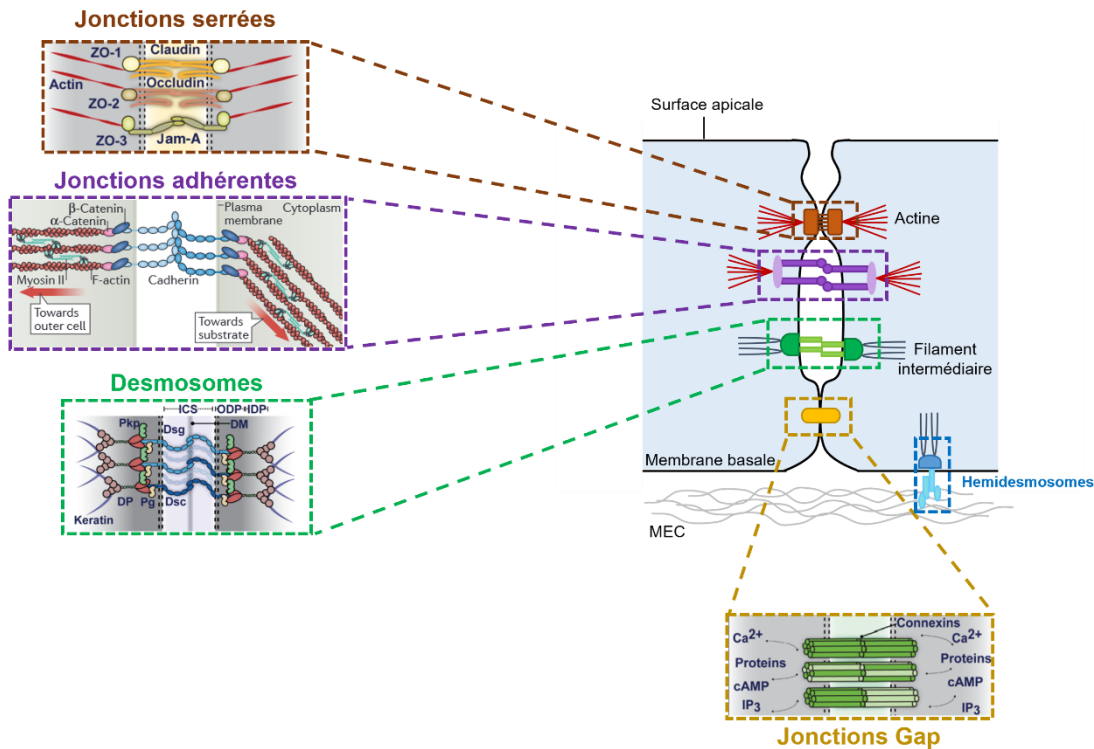


Figure 2. Représentation schématisée des différents types des contacts cellule-cellule et leur composition moléculaire.

(Adapté de [Jefferson et al., 2004](#) ; [Green et al., 2019](#) pour les jonctions serrées, les desmosomes et les jonctions Gap ; et [Ladoux et Mège 2017](#) pour les jonctions adhérentes).

Les *jonctions adhérentes* (JA), localisées en dessous des jonctions serrées, constituent, avec les desmosomes, les jonctions d'ancrage majeures entre les cellules épithéliales, et sont aussi présentes dans les muscles cardiaques, les fibroblastes et les neurones. Les jonctions adhérentes sont hautement dynamiques et relient les membranes plasmiques et plus spécifiquement le cytosquelette d'actine des cellules adjacentes. Ces jonctions sont formées par l'association des domaines extracellulaires des récepteurs transmembranaires cadhérines des cellules juxtaposées ([M Takeichi, 1977](#)) (I.2.1.4.1). Des protéines adaptatrices de la famille des caténines (β -caténine et α -caténine) assurent le lien entre les domaines cytoplasmiques des cadhérines et le cytosquelette d'actine. Les caténines se lient à d'autres protéines de liaison à l'actine pour former un complexe qui régule l'assemblage de l'actine en réponse à la force contractile de l'actomyosine (I.2.1.4.4.) ([Leerberg et al., 2014](#)), ce qui constitue un mécanisme de renforcement mécanosensible des jonctions adhérentes.

Les jonctions communicantes, aussi appelées *les jonctions gap*, sont des canaux transmembranaires qui relient le cytoplasme des cellules adjacentes. Les jonctions communicantes se forment suite à l'association de connexons, qui sont des homohexamères de connexine, de deux cellules adjacentes. Les jonctions communicantes permettent le couplage chimique et électrique entre les cellules grâce aux échanges d'ions et de petits métabolites (<1kD) (Evans et Martin, 2002; Hervé et Derangeon, 2013). Ce couplage entre les cellules synchronise leur activité dans des tissus comme la rétine, les neurones et le cœur (Danik et al., 2004). Ce type de jonctions joue un rôle crucial au cours du développement et de la mort cellulaire (Goodenough et Paul, 2009).

Les desmosomes sont situés le long de la membrane baso-latérale des cellules. Les desmosomes contiennent des cadhérines desmosomales, appelées desmocollines (DSC) et desmoglénines (DSG), différentes de celles présentes dans les jonctions adhérentes (Delva et al., 2009). Les domaines cytoplasmiques des cadhérines desmosomales se lient aux plakoglobines et aux plakophilines, qui elles-mêmes interagissent avec la desmoplakine pour fournir un ancrage direct aux filaments intermédiaires de kératine. Les desmosomes préservent la structure des tissus des contraintes mécaniques en couplant les réseaux de filaments intermédiaires des cellules adjacentes. Il existe un type d'adhésion similaire aux desmosomes, appelé *les hémidesmosomes*, qui relient la membrane basale de la cellule à la lame basale (matrice extracellulaire). Les hémidesmosomes se forment grâce aux protéines transmembranaires d'adhésion intégrines $\alpha_6\beta_4$ (Green et Jones, 1996).

1.2.1.2. Organisation et assemblage des jonctions adhérentes (JA)

Généralement, trois types de JA existent : les « punctums adherens » (PA), les « zonula adherens » (ZA) et les jonctions adhérentes (JA) tricellulaires (Figure 3). Les « punctums adherens » (PA), appelées aussi jonctions adhérentes ponctuelles ou bien jonctions naissantes, sont souvent qualifiées de JA immatures et sont observées dans les étapes précoces de la formation des JA des cellules épithéliales (Yonemura et al., 1995).

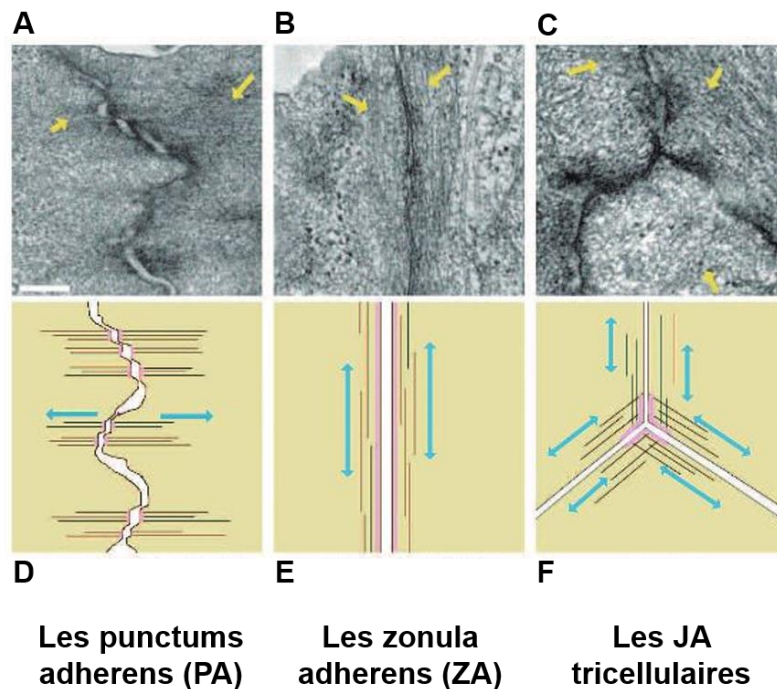


Figure 3. Différents types de jonctions adhérentes observées dans les cellules épithéliales.

Des micrographes électroniques **(A-C)** et des schémas illustratifs **(D-F)** représentent les différents types de jonctions adhérentes (JA) classifiés selon le mode d'association des filaments d'actine. Les faisceaux de filaments d'actine sont orientés perpendiculairement à la membrane cellulaire dans les « punctum adherens » (PA) **(A,D)** alors qu'ils y sont parallèles dans les « zonula adherens » (ZA) **(B,E)**. **(C,F)** Les jonctions adhérentes (JA) tricellulaires correspondent aux angles où trois cellules se rencontrent. Elles sont formées aux deux extrémités de la JA dans un feuillet cellulaire hexagonal. Les régions mises en évidence en rose représentent les JA. Les flèches en jaune et bleu représentent respectivement les filaments d'actine et leur orientation (adapté de [Yonemura, 2017](#)).

Les PA ne sont pas uniquement des jonctions immatures, elles sont également présentes dans certains types cellulaires comme les kératinocytes et les cardiomyocytes. Les faisceaux de filaments d'actine sont associés perpendiculairement à la membrane plasmique au niveau des PA ([Volk et Geiger, 1986](#)). Les « zonula adherens » (ZA) sont les formes matures des JA dans les cellules épithéliales polarisées. Les faisceaux de filaments d'actine à ce niveau sont associés parallèlement à la membrane plasmique ([Hull et Staehelin, 1979](#)). La fusion de deux jonctions PA forme

une jonction adhérente mature ZA accompagnée par des changements d'organisation et de dynamique des filaments d'actine. Finalement, les jonctions adhérentes tricellulaires se forment lorsque trois cellules s'associent.

L'initiation de la formation des adhésions implique des contacts entre les membranes des lamellipodes de deux cellules voisines ([Adams et al., 1998](#); [Harris et Tepass, 2010](#)) (Figure 4). Cela favorise le recrutement et le « clustering » (agrégation) des cadhérines aux bords des zones de contacts entre les cellules voisines. À mesure que les contacts s'élargissent, les cadhérines se réorganisent pour se localiser vers la périphérie ([Yamada et Nelson, 2007](#)). D'autre part, le mécanisme de formation des jonctions cellule-cellule nécessite la polymérisation locale d'actine qui favoriserait le regroupement latéral des cadhérines ([Truong Quang et al., 2013](#)).

L'imagerie par super-résolution a montré que l'initiation des jonctions adhérentes est caractérisée par la formation de « microclusters » de molécules de E-cadhérine dans les cellules épithéliales de mammifères ([Lambert et al., 2007](#); [Cavey et al., 2008](#)). La densité des « clusters » de E-cadhérine recrutés aux jonctions augmente au fur et à mesure de la maturation des adhésions. Du côté intracellulaire, les « clusters » de E-cadhérine initient le recrutement de la β -caténine, suivie de l' α -caténine qui se lie au cytosquelette d'actine et à d'autres protéines de liaison à l'actine ([Gumbiner et McCrear, 1993](#); [Baum et Georgiou, 2011](#)). En réponse à la force mécanique, le recrutement de l' α -caténine aux filaments d'actine se traduit par le renforcement des adhésions ([Buckley et al., 2014](#)), et l'augmentation de la densité des clusters de complexes E-cadhérine-caténine ([Chen et al., 2015](#)).

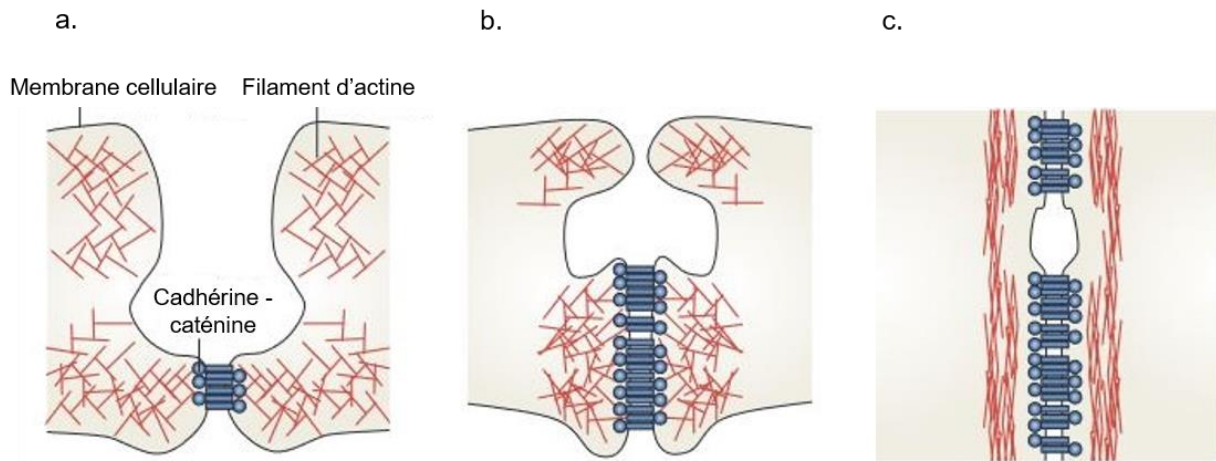


Figure 4. Mécanisme d'initiation et d'assemblage des jonctions adhérentes.

a. Initiation des contacts cellule-cellule par rapprochement des protrusions membranaires et regroupement des « clusters » des complexes cadhérine-caténine. **b.** Les « clusters » cadhérine-caténine activent les protrusions des réseaux branchés d'actine par le complexe Arp2/3 ce qui favorise l'expansion des JA. **c.** La formation des faisceaux d'actine contractiles maintient les jonctions matures. (adapté de [Harris et Tepass, 2010](#)).

Les jonctions adhérentes matures adoptent une architecture bien définie (Figure 5). Des études de microscopie en super-résolution de type iPALM ont réussi à visualiser l'architecture moléculaire des jonctions adhérentes ainsi qu'à classer ses composants moléculaires en fonction de leur distance par rapport à la membrane plasmique en cultivant des cellules sur des surfaces fonctionnalisées par des chimères E-cadhérine-Fc ([Bertocchi et al., 2017](#)). À proximité de la membrane, une couche de complexes cadhérine-caténine a été identifiée, suivie d'une couche intermédiaire où se trouve la vinculine distante de 60 nm environ de la membrane. Enfin, une troisième couche composée de l'actine et de l' α -actinine est observée. Les composants mentionnés dans ce paragraphe sont détaillés dans les sections ultérieures de l'introduction.

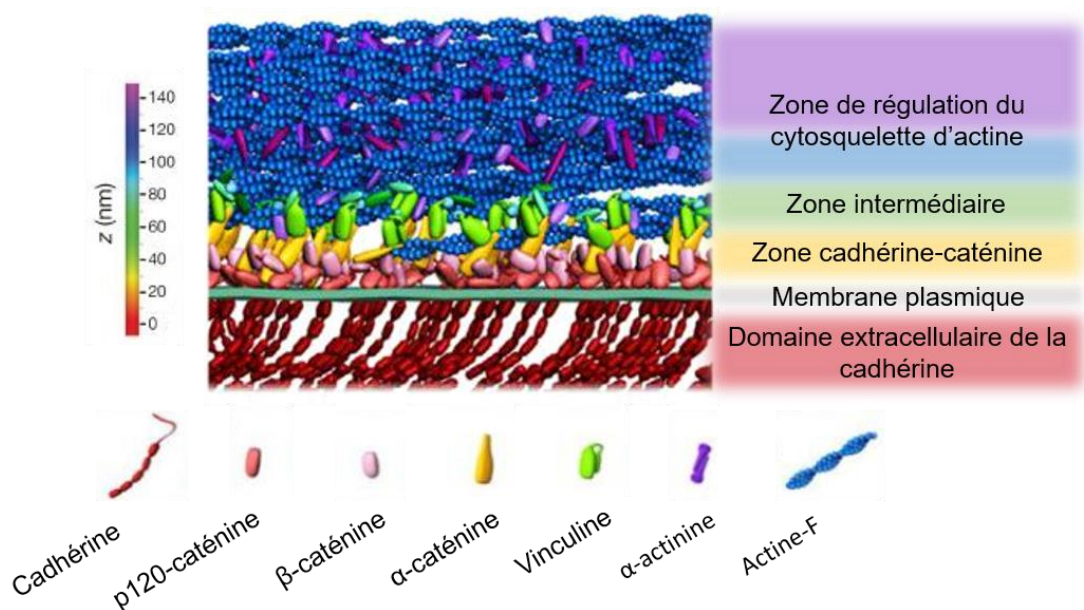


Figure 5. Modèle schématique de l'organisation moléculaire des jonctions adhérentes et de la distribution de leurs composants le long de l'axe vertical en microscopie iPALM (adapté de [Bertocchi et al., 2017](#)).

I.2.1.3. Mécanosensibilité des jonctions adhérentes

Le développement et la maturation des jonctions nécessitent l'activation de la voie RhoA, ce qui stimule la contractilité du cytosquelette d'actomyosine. Les faisceaux contractiles d'actomyosine sont liés aux jonctions intercellulaire matures parallèlement à la membrane ([Choi et al., 2016](#)). Dans les cellules de la peau, en plus des forces de traction, il existe des forces de poussée dirigées vers les complexes cadhérines et générées par la polymérisation de l'actine ([Vasioukhin et al., 2000](#)). Ces forces de poussée impliquent le recrutement du complexe Arp2/3, de Mena/VASP et de la formine, qui dépendent des voies de signalisation Rac1 et Cdc42, pour la polymérisation et le remodelage du cytosquelette d'actine au niveau des contacts en formation ([Kovacs et al., 2002](#); [Grikscheit et al., 2015](#)). Le renforcement et la stabilité des jonctions dépendent grandement de la polymérisation et de la contractilité du cytosquelette d'actine.

Les premiers essais *in vitro* ont mis en évidence la mécanosensibilité des jonctions adhérentes en utilisant des billes fonctionnalisées par des N-cadhérines, pour mimer

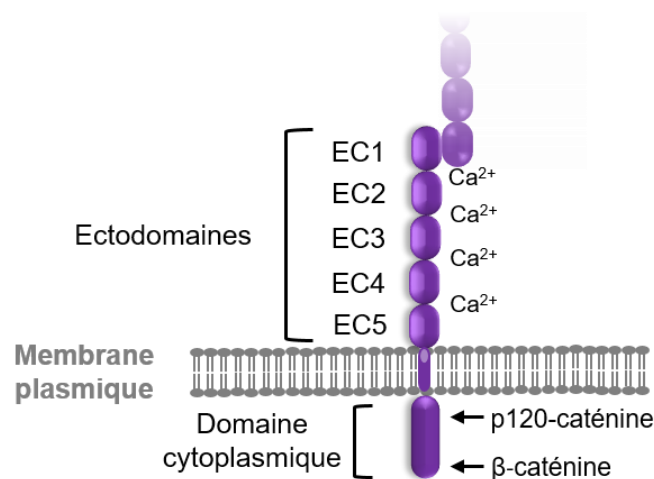
des contacts intercellulaires avec la surface des myocytes, suivie de l'application de forces par un dispositif de pinces optiques ([Lambert et al., 2002](#)). Plus tard, des expériences utilisant des micropipettes ont permis de montrer l'implication du cytosquelette d'actine et des petites Rho GTPases dans le processus de renforcement des jonctions cellule-cellule ([Chu et al., 2004](#)). La mécanosensibilité des jonctions adhérentes est intimement liée au cytosquelette d'actomyosine. Le cytosquelette d'actomyosine maintient une tension constitutive de quelques pN par molécules de cadhérine ([Borghi et al., 2012](#)). L'inhibition de l'activité de la myosine II avec de la blebbistatine conduit à une diminution de la quantité de E-cadhérine au niveau des contacts cellule-cellule ([Shewan et al., 2005](#)). De même, le knockdown des deux isoformes de la myosine II non musculaire (NMIIA et NMIIB) contribue à une diminution de la polymérisation de l'actine au niveau des jonctions ([Leerberg et al., 2014](#)). D'autres expériences, utilisant des billes magnétiques, ont mis en évidence que l'augmentation de la rigidité des E-cadhérines en réponse à l'application d'une force, dépend du cytosquelette d'actomyosine ([le Duc et al., 2010](#)). La transmission de la force générée par le cytosquelette d'actomyosine est assurée par l' α -caténine et renforcée par la vinculine ([Muhammed et al., 2016](#); [Barry et al., 2014](#)). L' α -caténine recrute la vinculine dans les jonctions en réponse à la force générée par l'actomyosine ([Yonemura et al., 2010](#); [le Duc et al., 2010](#)). Des expériences de manipulation de molécules uniques par des pinces magnétiques, décrites plus en détail dans les paragraphes suivants, ont mis en évidence que l'étirement de l' α -caténine, en réponse à une force d'environ de 5pN, expose un site cryptique pour la vinculine ([Yao et al., 2014](#)). D'autres expériences de molécules uniques montrent que l'association du complexe E-cadhérine/ β -caténine/ α -caténine avec les filaments d'actine est renforcée par l'application d'une force d'environ 7pN ([Buckley et al., 2014](#)). Enfin, la formation du complexe α -caténine-vinculine-VASP dans les jonctions adhérentes, décrit plus en détail dans les paragraphes suivants, en réponse à la force actomyosine, induit l'assemblage de l'actine et favorise la formation et le développement des jonctions ([Leerberg et al., 2014](#)).

I.2.1.4. Composition moléculaire des jonctions adhérentes

I.2.1.4.1. E-cadhérines

Découvertes en 1977 par Takeichi, les cadhérines (pour « calcium-dependent adhesion ») constituent les principales glycoprotéines transmembranaires

dépendantes du calcium qui sont à l'origine des jonctions cellule-cellule ([Takeichi, 1977](#)). La superfamille des cadhérines est classée en plusieurs sous-familles qui présentent des variations structurales au niveau du domaine extracellulaire ainsi que dans le domaine cytoplasmique dont les partenaires sont très différents ([Tepass et al., 2000](#)). La sous-famille des cadhérines classiques est répartie en trois types : les types I et II sont les cadhérines de vertébrés et le type III est spécifique des invertébrés. Chez les vertébrés, les cadhérines classiques de type I sont séparées en plusieurs membres en fonction de leur spécificité tissulaire. Les E-cadhérines sont exprimées dans le tissu épithélial, les N-cadhérines sont présentes dans le tissu nerveux mais pas exclusivement, les VE-cadhérines sont exprimées dans l'endothélium vasculaire et les P-cadhérines sont présentes dans le placenta. Dans la suite de ce manuscrit, je me concentrerai sur les cadhérines classiques de type I et plus spécifiquement les E-cadhérines. Structuralement, elles sont composées de trois domaines : le domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire (Figure 6). Le domaine extracellulaire en position N-terminale présente cinq répétitions de domaines EC (extracellulaire) ou domaines cadhérines nommés EC1 à EC5 ([Overduin et al., 1995](#)). Ce domaine extracellulaire est à l'origine des interactions homophiliques entre cadhérines. Plus spécifiquement, le domaine EC1 est le domaine le plus distal par rapport à la membrane plasmique et il est considéré comme le site de liaison *trans* ([Zhang et al., 2009](#)). En plus de l'homodimérisation en *trans*, les cadhérines peuvent



interagir latéralement en *cis* pour former des oligomères ([Brasch et al., 2012](#)).

Figure 6. Structure et organisation en domaines de la E-cadhérine.

La E-cadhérine est constituée de trois domaines : Les ectodomaines (EC1-EC5) constituent le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire où se fixe la p120-caténine et la β-caténine.

Cette adhésion homotypique entre cadhérines est dépendante des ions Ca^{2+} qui se fixent à l'interface entre deux domaines EC. Plus précisément, trois ions Ca^{2+} peuvent se lier entre deux domaines EC d'une même molécule de cadhérine ([Gumbiner, 2005](#)). La présence des ions Ca^{2+} stabilise les interactions homotypiques des cadhérines et protège les domaines EC de la protéolyse. Les domaines EC sont déstructurés suite à l'absence des ions Ca^{2+} et une diminution de l'adhésion est remarquée suite à une mutation dans le domaine de liaison au Ca^{2+} ([Ozawa et al., 1990](#); [Pertz, 1999](#)). Le domaine transmembranaire permet l'insertion des E-cadhérines dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Ce domaine est constitué d'une simple hélice α . Concernant la partie C-terminale intracellulaire, cette partie est bien conservée dans la sous-famille des cadhérines classiques et est constituée de deux sous-domaines. Le premier sous-domaine nommé domaine juxta membranaire (JMD : Juxta Membrane Domain) permet la liaison à des protéines adaptatrices cytoplasmiques de la famille des caténines : les p120 caténines qui sont impliquées dans la stabilisation des E-cadhérines ([Hartsock et Nelson, 2008](#)). Enfin, le second sous-domaine appelé domaine de liaison aux caténines (CBD : Catenin Binding Domain) lie la β -caténine, qui elle-même se lie à plusieurs protéines adaptatrices cytoplasmiques comme l' α -caténine qui est responsable du couplage entre le cytosquelette d'actine et les cadhérines ([Gumbiner, 2005](#)). L' α -caténine relie aussi les caténines et l'actine via une diversité de protéines comme la vinculine, l' α -actinine et la formine ([Baum et Georgio, 2011](#)) (I.4.).

Les cadhérines sont des protéines adhésives transmembranaires mécanosensibles qui ressentent et transmettent les forces du cytosquelette d'actine via les caténines. La mécanosensibilité des E-cadhérines a été mise en évidence en utilisant des détecteurs de forces moléculaires. Ces expériences montrent que les E-cadhérines sont constitutivement sous tension de quelques pN suite à leur liaison avec le cytosquelette d'actomyosine ([Borghi et al., 2012](#)) (Figure 7). Des expériences ultérieures, utilisant des billes magnétiques, ont montré que l'augmentation de la force augmente la rigidité des E-cadhérines ([le Duc et al., 2010](#); [Muhammed et al., 2016](#); [Barry et al., 2014](#)).

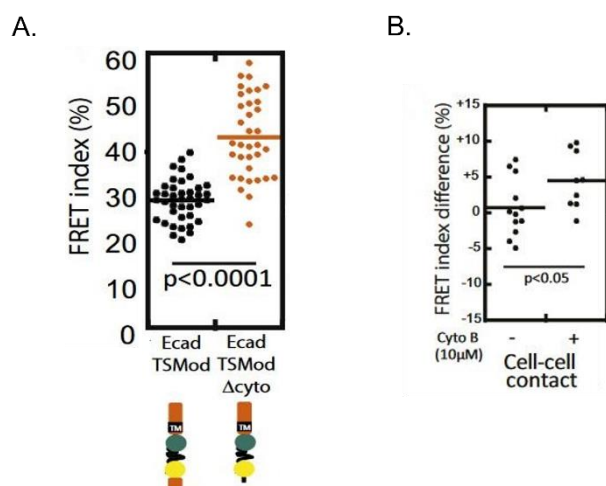


Figure 7. Les molécules de E-cadhérines des JA sont soumises à une tension constitutive dépendante du cytosquelette d'actine.

A. Comparaison des indices de FRET au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales de type MDCK exprimant EcadTSMOD (E-cadhérine entière) et EcadTSMODΔcyto (E-cadhérine avec une délétion du domaine de liaison à la β -caténine). Dans les cellules exprimant EcadTSMOD, l'indice de FRET est le plus bas ce qui montre une tension élevée alors que pour EcadTSMODΔcyto l'indice de FRET est grand indiquant une faible tension en raison de la perte de connexion avec le cytosquelette d'actine. **B.** Une perturbation suite à l'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine B provoque une diminution de la tension soumise aux E-cadhérines par le cytosquelette. (adapté de [Borghi et al., 2012](#)).

Les E-cadhérines sont exprimées dans la plupart des cellules épithéliales des tissus embryonnaires et adultes et assurent de multiples fonctions ([Huang et al., 2011](#)). Dans l'ovocyte, les cadhérines épithéliales sont déjà exprimées mais non activées. Une fois que le zygote est au stade de 8 cellules, les E-cadhérines sont activées et démarrent la compaction de l'embryon. En outre, la E-cadhérine joue un rôle fondamental dans le processus de morphogenèse de l'épithélium. Ceci est montré chez les souris au stade blastocyste, lorsque la formation de l'épithélium trophoctodermale, qui est le premier tissu épithélial formé, échoue dans les embryons sans E-cadhérines ([Larue et al., 1994](#)). D'autres études ont mis en évidence l'importance des cadhérines dans une grande variété de processus biologiques comme la migration cellulaire collective, la transition épithelio-mésenchymateuse (EMT) et la formation des métastases dans le cancer. Au cours de la migration cellulaire collective, une dérégulation d'expression de la E-cadhérine contribue à l'altération de l'orientation et de la persistance collective ([Li et](#)

al., 2012). L'EMT est caractérisée par le changement d'expression de E-cadhérines en N-cadhérines, ce qui diminue l'adhésion entre les cellules et favorise l'invasion et la migration cellulaire. Ce phénomène d'EMT existe au cours de l'embryogenèse et dans l'invasion cancéreuse (*Thiery, 2002*). La diminution d'expression des E-cadhérines est considérée comme un marqueur de diagnostic du cancer et des métastases (*Jeanes et al., 2008*).

I.2.1.4.2. p120-caténine

La p120-caténine appartient à la famille des caténines qui interagissent avec le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine. Elle est constituée de 9 domaines centraux répétés qui se lient spécifiquement au domaine juxta membranaire (JMD) de la E-cadhérine, et qui sont encadrés par une région N-terminale et C-terminale (*Kourtidis et al., 2013*) (Figure 8).

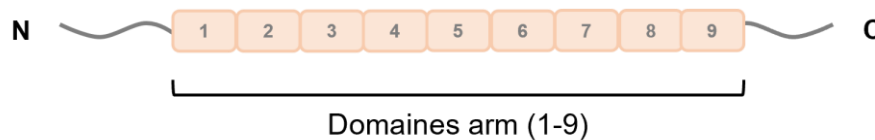


Figure 8. Organisation en domaines de la p120-caténine.

La p120-caténine est importante pour la stabilisation et le renouvellement des E-cadhérines (*Xiao et al., 2007; Davis et al., 2003*). La liaison de la p120-caténine à la E-cadhérine masque un motif impliqué dans l'endocytose des cadhérines (*Nanes et al., 2012*). Le dérèglement de l'activité d'endocytose de la p120-caténine perturbe le recyclage des composants des jonctions, ce qui implique une limitation de la migration collective des monocouches d'astrocytes (*Peglion et al., 2014*). En plus de son rôle dans la stabilité des adhésions, la p120-caténine régule l'activité des Rho GTPases qui contrôlent l'organisation du cytosquelette d'actine. La p120-caténine se lie à RhoA et inhibe par la suite l'échange du GDP/GTP de ce dernier (*Castano et al., 2007*). Par ailleurs, au cours de l'initiation de contacts adhésifs cellule-cellule, la p120-caténine recrute Rac1, ce qui active la voie de signalisation Rac1/WAVE/Arp2/3, qui active la nucléation des filaments branchés. Des études utilisant les cadhérines chimériques ont

révélé une stimulation de la formation de lamellipodes en réponse au recrutement de Rac1 dans les régions adhésives contenant la p120-caténine ([Gavard et al., 2004](#); [Kovacs et al., 2002a](#)).

I.2.1.4.3. β -caténine

Au niveau des jonctions adhérentes, la β -caténine a d'abord été identifiée comme une protéine partenaire des cadhérines qui lie spécifiquement l' α -caténine, elle-même à son tour couple, directement ou indirectement, le cytosquelette d'actine. Chez les mammifères, la structure de la β -caténine des cellules épithéliales est composée de trois domaines : deux extrémités N-terminale et C-terminale relativement flexibles et un domaine central rigide (Figure 9). Le domaine N-terminal non structuré permet la liaison de la β -caténine à l' α -caténine ([Aberle et al., 1996](#)) et contient des sites de phosphorylation responsables de sa dégradation.

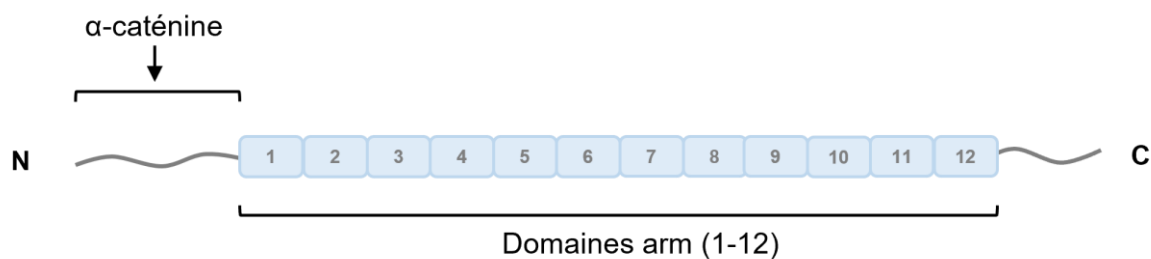


Figure 9. Structure et organisation en domaines de la β -caténine.

La région centrale, très conservée, est composée d'une répétition en tandem de 12 domaines Armadillo. Des études en cristallographie ont montré que cette zone centrale permet l'interaction de la β -caténine avec la queue cytoplasmique des cadhérines ([Huber et Weis, 2001](#)). Cette interaction est contrôlée par des phosphorylations des deux partenaires qui sont fondamentales pour la formation et la stabilité des adhésions cellulaires ([Lilien et Balsamo, 2005](#); [Daugherty et Gottardi, 2007](#)). En effet, la β -caténine est responsable de l'adressage des cadhérines aux membranes ([Chen et al., 1999](#)). D'autre part, cette région centrale peut s'associer également dans le cytosol avec des complexes de dégradation APC (Adenomatous Polyposis Coli) et des facteurs de transcription TCF/LEF (TCF : T-Cell-specific factor/ LEF : lymphoid enhancer-binding factor) dans le noyau qui interviennent en tant que co-facteur de la voie de

signalisation Wnt (*Choi et al., 2006; Moon et al., 2002*). De plus, la β -caténine peut interagir avec les microtubules via la dynéine (*Ligon et al., 2001*). Le troisième domaine est le domaine C-terminal qui assure l'interaction de la β -caténine avec l'ADN et renforce ainsi l'affinité avec les facteurs de transcription.

L'affinité de la liaison de la β -caténine avec les composants du complexe adhésif est régulée par des modifications post-traductionnelles. Une diminution d'affinité de liaison avec la E-cadhérine et l' α -caténine est observée à la suite des phosphorylations des tyrosines 654 et 142 de la β -caténine. La modification de l'activité de la β -caténine peut altérer la stabilité du complexe cadhérine-caténine. Des travaux ont identifié l'implication de la phosphorylation de la β -caténine dans la dissociation du complexe adhésif cadhérine-caténine (*Rhee et al., 2007; Lilien et Balsamo, 2005*). Cependant, le rôle fonctionnel crucial de la β -caténine réside dans la liaison de la cadhérine à l' α -caténine. Ceci a été montré lors de l'ovogenèse chez la drosophile où la perte de l'homologue de la β -caténine a été totalement compensée par une protéine de fusion cadhérine- α -caténine (*Pacquelet et Rørth, 2005*).

I.2.1.4.4. α -caténine

Chez les mammifères, l' α -caténine est une protéine dimérique d'environ 102 KDa qui existe en trois isoformes codés par des gènes différents (*Kobielak et Fuchs, 2004*). Le premier isoforme est l' α -E-caténine (l' α -caténine épithéliale), codée par le gène *CTNNA1*, qui est ubiquitaire et dont l'expression n'est pas limitée aux tissus épithéliaux. Le second est l' α -N-caténine (l' α -caténine neuronale) qui est généralement exprimée dans le cerveau et qui est codée par le gène *CTNNA2*. Le dernier isoforme est l' α -T-caténine qui est codée par le gène *CTNNA3* et qui est trouvée majoritairement dans les testicules mais également dans le cœur et le cerveau. Dans la suite de ce manuscrit, je me concentrerai sur l' α -E-caténine que je nommerai simplement α -caténine. La structure de l' α -caténine est caractérisée par trois domaines successifs : le domaine N-terminal, le domaine modulateur M (divisé en MI, MII et MIII) et le domaine C-terminal (*Ishiyama et al., 2013*) (Figure 10). La région N-terminale (résidues 55-269) correspond au domaine d'homodimérisation de la protéine et est aussi le site de liaison à la β -caténine (*Aberle et al., 1994; Koslov et al., 1997*). Le domaine modulateur M (résidues 377-633) permet le repliement de l' α -caténine sur elle-même à la suite de l'interaction

intramoléculaire du MI avec les domaines adjacents MII et MIII. De même, le domaine M constitue un site de liaison à plusieurs protéines partenaires permettant ainsi la liaison avec le cytosquelette d'actine des jonctions adhérentes, comme la vinculine (*Weiss et al., 1998; Drees et al., 2005*), l'afadine (*Pokutta et al., 2002*), l' α -actinine (*Knudsen et al., 1995*) et VASP. La partie C-terminale (résidues 697-906) contient un site de liaison à l'actine « ABD » (actin binding domain) (*Rimm et al., 1995*).

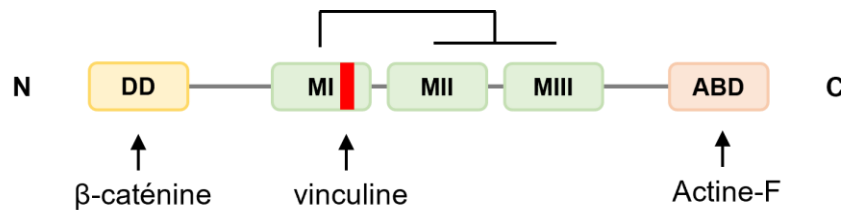


Figure 10. Organisation en domaines de l'α-caténine et interactions.

DD : domaine de dimérisation ; MI, MII et MIII : domaines modulateurs I-III ; ABD (actin binding domain) : domaine de liaison à l'actine. Le domaine de fixation à la vinculine (VBS) est représenté en rouge. Une interaction intramoléculaire est présentée entre le domaine MI et les domaines MII et MIII.

L'autoinhibition qui résulte de l'interaction entre les domaines MI et MII-MIII maintient la protéine dans une conformation fermée. Cependant, l'α-caténine est une protéine mécanosensible qui peut s'ouvrir pour exposer des domaines masqués en réponse à l'application de forces mécaniques entre 5 et 15 pN (*Yao et al., 2014*) (Figure 11). Le site de fixation de la vinculine (VBS) situé dans MI est masqué, ce qui implique que la liaison de l'α-caténine à la vinculine nécessite l'ouverture de la protéine pour exposer le VBS (*Choi et al., 2012*). Des observations dans les cellules ont confirmé que l'α-caténine est sous tension (*Acharya et al., 2017*) et que cette tension induit des changements de conformation (*Kim et al., 2015*) qui sont suffisants pour déplier la protéine et exposer le VBS (*Yonemura et al., 2010; Ishiyama et al., 2018*). En effet, la levée de l'autoinhibition de l'α-caténine en réponse à la force transmise par le cytosquelette d'actomyosine permet le recrutement de la vinculine aux jonctions adhérentes (*le Duc et al., 2010; Thomas et al., 2013; Seddiki et al., 2018; Yonemura et al., 2010*). Ultérieurement, des études en molécules uniques, en utilisant les pinces magnétiques et la microscopie à force atomique (AFM), ont montré que l'étirement du

domaine central de l' α -caténine révèle un site cryptique unique pour la liaison de la vinculine (*Maki et al., 2018; Yao et al., 2014*).

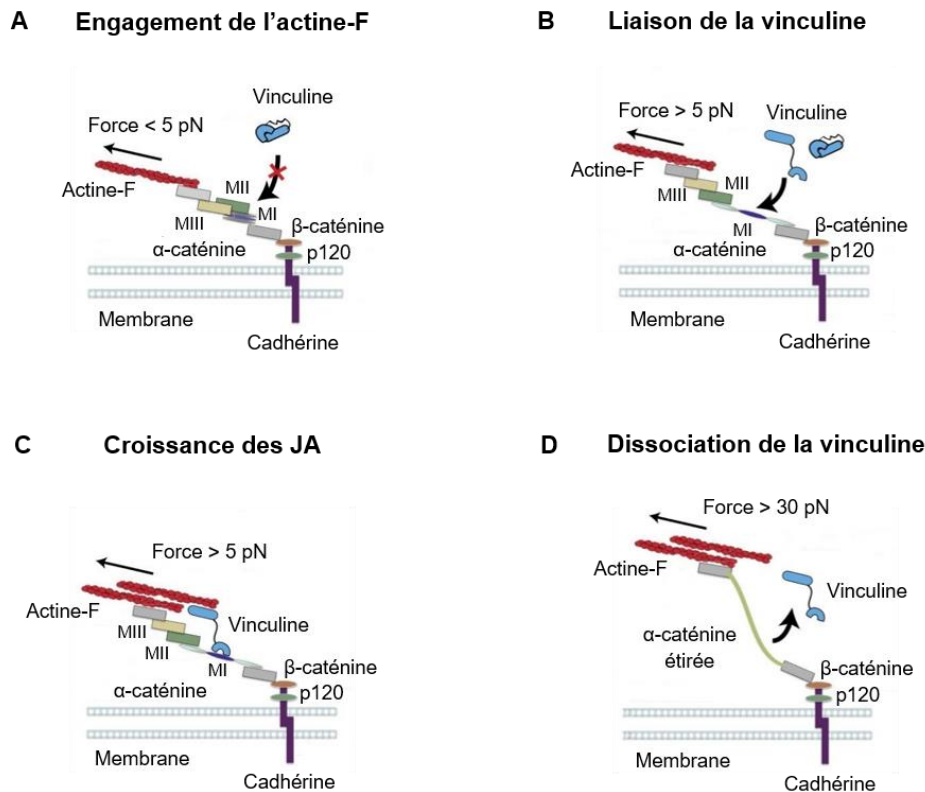


Figure 11. Mécanosensibilité du complexe α -caténine-vinculine.

A. À faible force (< 5 pN), l' α -caténine existe sous forme autoinhibée empêchant la fixation de la vinculine au VBS dans MI. **B.** La génération d'une force intermédiaire supérieure à 5 pN (5 – 30 pN) permet le dépliement de l' α -caténine et l'exposition du domaine cryptique (VBS) nécessaire pour la liaison de la vinculine. **C.** L'exposition du domaine de liaison à l'actine de la vinculine permet le renforcement et la maturation des jonctions. **D.** À forte force (> 30 pN), l' α -caténine subit un changement de conformation ce qui entraîne le relargage de la vinculine. (adapté de *Yao et al., 2014*).

Les premières études ont suggéré que le rôle de l' α -caténine dans le complexe cadhérine-caténine est d'assurer le couplage physique entre les cadhérines et le cytosquelette d'actine car l' α -caténine possède un site ABD de fixation à l'actine et un site de liaison à la β -caténine. Néanmoins, cette hypothèse a été rejetée suite à des recherches ultérieures qui ont constaté une inhibition de la fixation de l' α -caténine à l'actine une fois liée à la β -caténine (*Yamada et al., 2005*). L' α -caténine peut exister sous

forme d'homodimères qui lient l'actine avec une forte affinité. Cependant cette dimerization de l' α -caténine est abolie par la liaison à la β -caténine et le monomère d' α -caténine qui en résulte possède une très faible affinité de liaison aux filaments d'actine, ce qui a affaibli l'hypothèse du couplage mécanique pendant quelques années ([Drees et al., 2005](#)). Plus tard, des études structurales et des expériences en molécules uniques à l'aide des pinces optiques ont démontré que le complexe cadhérine- α -caténine-actine agit comme un catch bond qui se renforce sous l'application d'une force ([Buckley et al., 2014](#); [Xu et al., 2020](#); [Mei et al., 2020](#)). Le complexe adhésif cadhérine- β -caténine- α -caténine-actine (Figure 12) assure aussi bien un lien fonctionnel que mécanique. Ainsi, en plus de son rôle dans la régulation de la polymérisation et l'assemblage du réseau d'actine au niveau des jonctions adhérentes, l' α -caténine permet la transmission ainsi que la transduction des signaux mécaniques entre les cellules voisines.

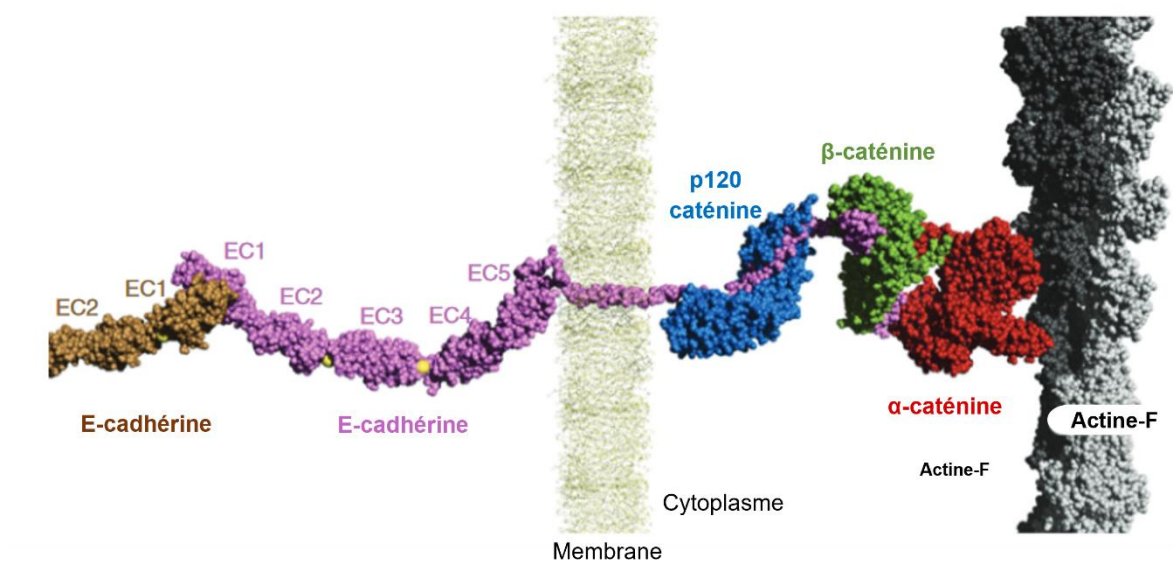


Figure 12. Modèle moléculaire 3D représentant le complexe d'adhésion cellulaire E-cadhérine-caténine associé au filament d'actine (actine-F) (adapté de [Mège et Ishiyama, 2017](#)).

Sa fonction dans les jonctions confère à l' α -caténine un rôle important dans plusieurs fonctions. Ainsi, dans des monocouches confluentes de cellules épithéliales, un « *knockdown* » de l' α -caténine aboutit à une diminution des tensions intercellulaires et

à une accélération de la vitesse de migration (*Bazellères et al., 2015*). Enfin, l' α -caténine participe à la régulation de la prolifération cellulaire. Une suppression de son expression conduit à une hyperprolifération des kératinocytes de souris (*Vasioukhin et al., 2001*).

1.2.2. Les adhésions cellule-matrice

La cohésion ainsi que la stabilité tissulaire nécessitent l'interaction et l'adaptation des cellules à leur environnement immédiat, que ça soit les cellules voisines ou bien leur substrat. En effet, les cellules établissent des contacts entre elles par de multiples structures détaillées ci-dessus ainsi que des interactions avec la matrice extracellulaire (MEC). Les adhésions cellule-matrice permettent aux cellules de sentir et de s'adapter aux variations mécaniques de leur environnement car elles assurent le couplage entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire.

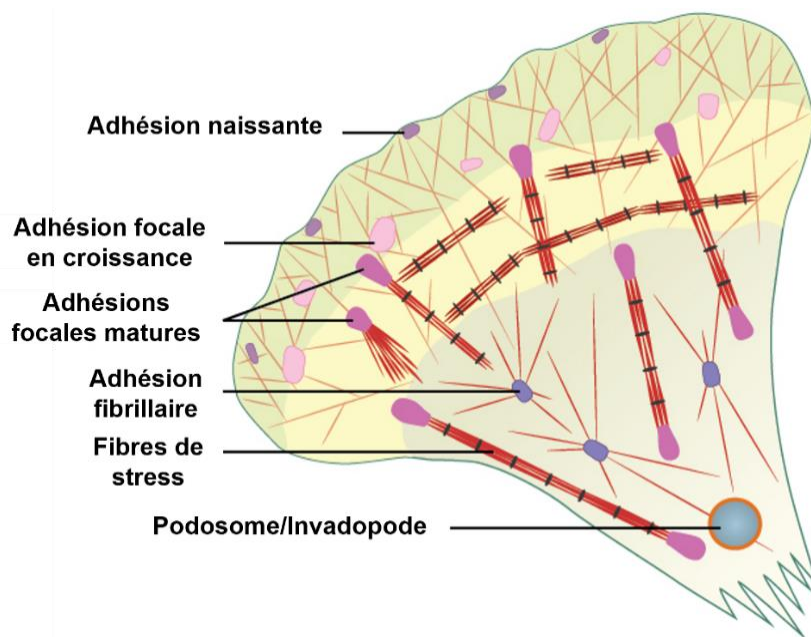


Figure 13. Représentation schématique des différentes catégories de complexes d'adhésion cellule-matrice et leur distribution spatiale dans la cellule.

Source: <https://www.mechanobio.info/what-is-mechanosignaling/what-is-the-extracellular-matrix-and-the-basal-lamina/#what-are-cell-matrix-adhesions-2>

Deux types de jonctions d'ancrage à la MEC sont présentes et sont distinguées selon le type de structures de cytosquelette auxquelles elles sont liées. Les hémidesmosomes ancrent fermement la lame basale au cytosquelette de kératine, qui sont des filaments intermédiaires et sont surtout répandus dans les kératinocytes. Les adhésions focales relient les intégrines avec plusieurs ligands de la matrice extracellulaire, comme les collagènes, les fibronectines et les laminines, au cytosquelette d'actomyosine. Il existe plusieurs catégories d'adhésions focales contenant des intégrines qui sont classées en fonction de leur taille, morphologie et distribution (Figure 13). Les adhésions naissantes (AN) sont présentes à la périphérie des lamellipodes, elles sont de taille réduite et très dynamiques ce qui permet leur désassemblage rapide ou leur maturation en adhésions focales (AF) matures une fois soumises à des forces de tractions élevées. Les adhésions fibrillaires constituent une autre catégorie d'adhésion cellule-matrice caractérisées par une durée de vie plus longue que les adhésions focales. Enfin, les podosomes sont des structures adhésives impliquées dans la migration cellulaire et la remodelage de la matrice extracellulaire.

- Organisation moléculaire :

Les intégrines

Les intégrines sont les glycoprotéines transmembranaires des adhésions focales qui permettent l'ancrage des cellules d'un part au cytosquelette d'actomyosine, par leur domaine cytoplasmique, et d'autre part à des ligands spécifiques de la MEC, par leur domaine extracellulaire. Les molécules adhésives intégrines sont des hétérodimères de sous-unités α et β . Chez les vertébrés, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β qui sont organisées en 24 hétérodimères $\alpha\beta$ (Takada et al., 2007; Kechagia et al., 2019). Les intégrines adoptent une conformation inactive repliée et une conformation active étendue (Figure 14). Le changement de conformation des intégrines est contrôlé par une voie « *inside-out* » et une voie « *outside-in* ». La voie d'activation "*outside-in*" des intégrines implique la liaison de l'intégrine à un ligand extracellulaire, ce qui entraîne une modification conformationnelle de l'intégrine qui active ses fonctions intracellulaires. La voie d'activation « *inside-out* » des intégrines implique une modification de la conformation de l'intégrine en réponse à une activation intracellulaire. Cette activation peut être initiée par des protéines cytoplasmiques, comme la taline et les kindlines, qui stimulent l'activation de l'intégrine en se fixant au

domaine cytoplasmique de la sous-unité β . Cette interaction modifie la conformation de l'intégrine, permettant le déploiement de son domaine extracellulaire qui peut alors s'engager avec les ligands. D'autres protéines de liaison à l'actine servent d'inhibiteurs des intégrines, comme la filamine.

La mécanosensibilité des intégrines a été mise en évidence dans les années 1990 en utilisant les billes magnétiques fonctionnalisées. Ces essais ont montré une augmentation de la rigidité du cytosquelette suite à l'application d'une force aux intégrines ([Wang et al., 1993](#)). À l'échelle cellulaire, il a été montré que les forces de tractions affectent la dynamique des complexes protéiques des adhésions focales ([Stricker et al., 2011](#)). De même, l'utilisation de capteurs moléculaires de force FRET insérés dans l'intégrine, la taline et la vinculine montre que ces trois protéines sont effectivement sous tension dans les adhésions focales ([Nordenfelt et al., 2016](#); [Austen et al., 2015](#); [Grashoff et al., 2010](#)).

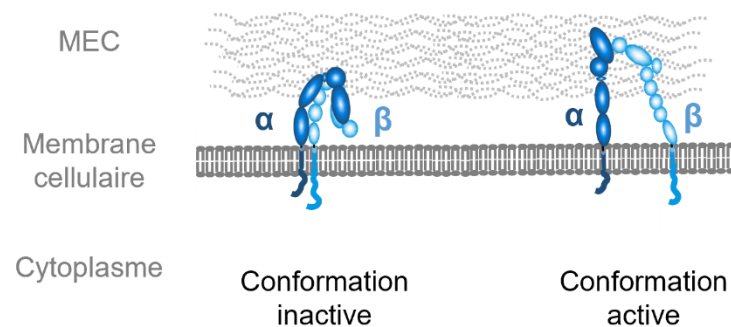


Figure 14. Représentation schématique des deux conformations d'intégrines transmembranaires.

Les intégrines sont des hétérodimères formés de deux sous-unités α et β . Ces protéines transmembranaires peuvent être présentes en conformation fermée inactive (à gauche) ou étendue active (à droite). MEC : matrice extracellulaire.

Taline

La taline est une large protéine adaptatrice de 270 kDa des adhésions focales qui relie les intégrines et le cytosquelette d'actomyosine ([Calderwood et al., 2013](#)). Le domaine N-terminal de la taline, appelé tête, contient un domaine FERM (4.1, ezrin, radixin, moesin) composé de quatre sous-domaines F0, F1, F2, et F3. La tête de la taline est liée à la région en forme de bâton (*rod*) par un linker flexible. Cette région en bâton comprend 13 faisceaux consécutifs de quatre à cinq hélices α ainsi qu'une simple hélice finale en position C-terminale formant le domaine de dimérisation (DD) ([Critchley, 2009](#); [Goult et al., 2018](#)) (Figure 15). La taline est une protéine autoinhibée par deux interactions intramoléculaires l'une entre le sous-domaine F3 du FERM et R9 du domaine rod, et l'autre entre F2 et R12. La structure de la taline contient trois domaines de liaison à l'actine (ABD ou ABS) : F2-F3 en N-terminale, R4 à R8 dans le domaine rod et R13 en C-terminale. En plus de la liaison à l'actine, la région rod de la taline est composée de onze sites de liaison à la vinculine, appelés VBS (vinculin binding site) ([Gingras et al., 2005](#)), un site de fixation à l'intégrine dans F3, et cinq sites de fixation à la protéine adaptatrice RIAM (Rap1-GTP-interacting adapter molecule) (RBS : RIAM binding site). Le mécanisme d'activation de la taline implique son interaction avec les lipides membranaires PIP2 et des protéines régulatrices y compris RIAM, Rap1 et PKC.

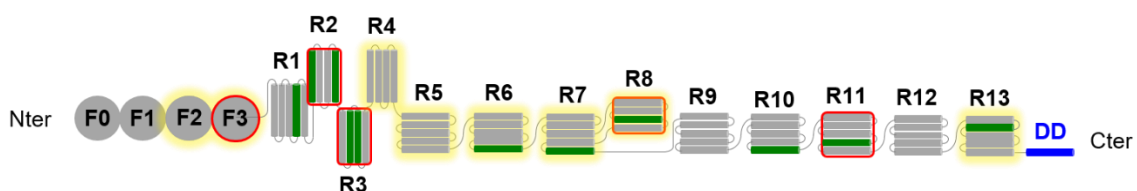


Figure 15. Structure et organisation en domaine de la taline.

F0 à F3 (domaines FERM 0-3), R1 à R13 (domaines rod 1-13) et DD (domaine de dimérisation). Les domaines de liaison à l'actine sont mis en évidence en jaune (F2-F3, R4-R8 et R13). Les domaines de fixation à la vinculine (VBS) sont représentés en vert et ceux de RIAM (RBS) en rouge (adapté de [Vigouroux et al., 2020](#)).

La mécanosensibilité de la taline permet le dépliement de la protéine en réponse à la force exercée par le cytosquelette d'actomyosine. Le dépliement de la taline maintient

la protéine dans une conformation ouverte ce qui permet l'exposition des domaines de liaison cryptiques de la vinculine (VBS) ainsi que la dissociation d'autres protéines partenaires comme RIAM ([Gough et Goult 2018](#); [Vigouroux et al., 2020](#)). Dans les cellules, des expériences utilisant des capteurs moléculaires de force FRET ont mis en évidence que la taline est sous tension d'environ 7 à 10 pN ([Austen et al., 2015](#); [Kumar et al., 2016](#)). Ce mécanisme d'échange de partenaires de la taline en réponse à des forces seuils confère aux adhésions focales la capacité de coder une large gamme de forces en messages biochimiques variés qui permettent aux cellules de s'adapter aux changements de propriétés mécaniques qu'elles perçoivent dans leur environnement.

1.2.3. Analogie et interaction entre jonctions adhérentes et adhésions focales

De multiples similitudes existent entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales. Ces deux structures partagent en effet des composants et possèdent des mécanismes de mécanotransduction et de régulation de l'assemblage de l'actine conceptuellement similaires (Figure 16) ([Han et de Rooij, 2016](#)). Tout d'abord, ces deux types d'adhésion disposent de récepteurs transmembranaires : les intégrines et les cadhérines. L'application d'une tension mécanique de 30 pN pour les intégrines et de 5 pN pour les cadhérines est suffisante pour renforcer les interactions qu'elles établissent avec leurs partenaires ([Kong et al., 2009](#); [Buckley et al., 2014](#)). De même, ces deux structures possèdent des protéines régulatrices de l'assemblage de l'actine en commun comme la vinculine. Bien que les mécanismes de recrutement de la vinculine aux contacts cellule-cellule et cellule-matrice soient basés sur l'exposition de sites cryptiques dans les mécanosenseurs α -caténine et taline respectivement, ces deux mécanismes sont très différents et aboutissent au recrutement de populations de molécules de vinculine distinctes. Au niveau des jonctions adhérentes, l'application d'une force permet le recrutement de la vinculine phosphorylée sur le résidu Y822 ce qui n'est pas le cas au niveau des adhésions focales ([Bays et al., 2014](#)).

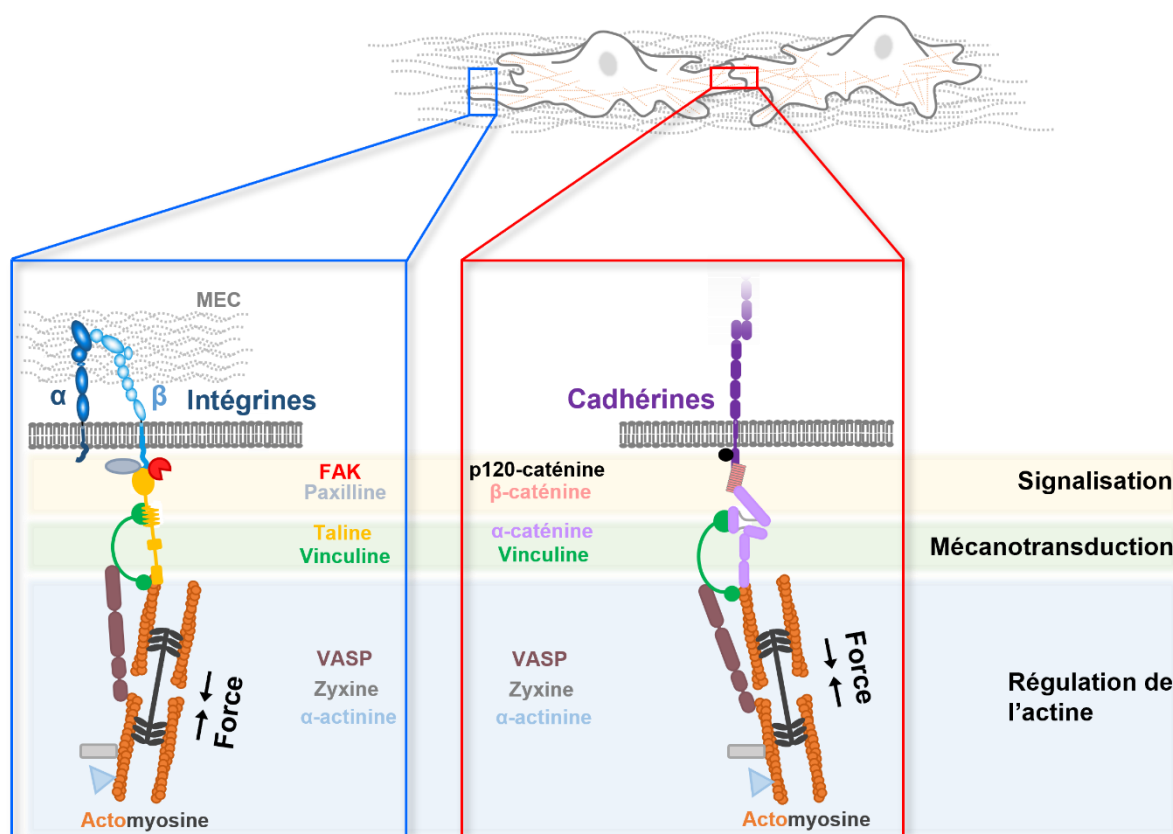


Figure 16. Similarités et différences dans l'organisation moléculaire des complexes d'adhésion intégrines et cadhérines.

À gauche, les adhésions focales à base d'intégrines; à droite, les jonctions adhérentes à base de cadhérines. Leur organisation moléculaire présente des similarités classifiées en quatre niveaux : le premier niveau comprend les protéines transmembranaires spécifiques de chaque type d'adhésion, ensuite un niveau composé des protéines de signalisation, un niveau constitué des protéines adaptatrices dépendantes de la force impliquées dans la mécanotransduction, et un dernier niveau comprenant les protéines régulatrices du cytosquelette d'actine. MEC : matrice extracellulaire. (adapté de [Mui et al., 2016](#) et [Han et de Rooij, 2016](#)).

Lors du processus de migration cellulaire collective, un dialogue fonctionnel entre les complexes des jonctions adhérentes et les adhésions focales est important pour établir des nouveaux sites de liaison au substrat tout en maintenant en équilibre les adhésions intercellulaires ([DeMali et al., 2014](#)). Cette communication équilibrée entre ces deux sites est également cruciale dans d'autres processus comme la morphogenèse des tissus chez le *Xénope* ([Marsden et DeSimone, 2003](#)) ou le développement des cardiomyocytes ([McCain et al., 2012](#)). Dans les cellules épithéliales, l'utilisation de HGF

pour déstabiliser les jonctions cellule-cellule entraîne une dispersion cellulaire et un renforcement des adhésions cellule-matrice (*de Rooij et al., 2005*). De plus, des expériences réalisées sur des cellules étalées sur une matrice de fibronectine et associées à des billes de E-cadhérine, soumises à des forces exercées à l'aide d'un piège optique, montrent un lien fonctionnel entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales (*Al-Kilani et al., 2011*). Une modification de la rigidité ou de la composition du substrat n'augmente pas seulement les forces de traction par le biais des intégrines, mais augmente aussi les forces au niveau des jonctions adhérentes d'une manière qui dépend de la myosine II (*Maruthamuthu et al., 2011*). Il existe une controverse dans la littérature sur la relation entre les jonctions adhérentes et les adhésions focales qui peut être aussi bien antagoniste que coopérative ou même encore indépendante en fonction du type cellulaire et des conditions expérimentales.

I.3. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE : ORGANISATION ET RÉGULATION

Dans les cellules, le cytosquelette constitue la structure dynamique impliquée dans de multiples processus biologiques importants comme le contrôle de la morphologie cellulaire, le trafic intracellulaire, l'adhésion, la migration et la division cellulaire (*Chaigne et al., 2016*). Le cytosquelette est formé de trois types de réseaux de filaments : les microfilaments ou filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires, qui sont trouvés dans tous les types cellulaires. Les paragraphes suivants fournissent un aperçu du cytosquelette d'actine, ses mécanismes de régulation et son rôle au niveau des jonctions adhérentes.

I.3.1. Structure et assemblage de l'actine

L'actine est une des protéines les plus abondantes dans les cellules eucaryotes et joue un rôle crucial dans des nombreuses fonctions cellulaires comme la division cellulaire, le transport intracellulaire, l'adhésion, la migration ou la contraction. L'actine est hautement conservée avec plus de 90% d'identité entre les eucaryotes unicellulaires (levure) et les organismes pluricellulaires (mammifères). Chez les vertébrés, il y a trois

isoformes d'actine : α , β et γ -actine. L' α -actine se trouve dans les muscles squelettiques, lisses et cardiaques. Bien que la β et γ -actine sont présentes dans les cellules non-musculaires, l'isoforme γ peut également se trouver dans les muscles lisses (*Vedula et Kashina, 2018*).

L'actine est une protéine ubiquitaire qui existe dans le cytoplasme sous deux formes : l'actine globulaire monomérique (actine-G) de 42 KDa et de diamètre d'environ 5.5 nm, et l'actine filamenteuse (actine-F) qui est présente sous forme des filaments double-brins hélicoïdaux polarisés. La structure de l'actine est formée de deux lobes, composés chacun de deux domaines, séparés par une cavité. Les quatre domaines sont numérotés de I à IV (Figure 17). Les domaines I et III forment l'extrémité barbée du monomère. Les domaines II et IV forment l'extrémité pointue du monomère. La cavité qui sépare les deux lobes permet la liaison d'un nucléotide (ATP ou ADP) et d'un cation divalent (Ca^{2+} ou Mg^{2+}). L'actine monomérique possède la capacité intrinsèque de s'auto-assembler spontanément pour former les filaments. Cet assemblage se met en place en présence des nucléotides et des cations divalents dans des conditions de forces ioniques physiologiques. L'état du nucléotide et le type d'ion divalent métallique contrôlent la formation et la stabilité des filaments d'actine (*Carlier, 1991*).

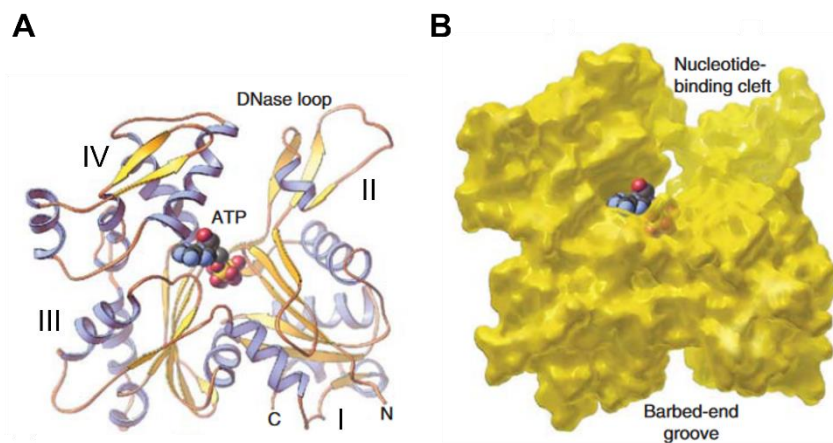


Figure 17. Structure du monomère d'actine.

(A) Représentation de la structure d'un monomère d'actine lié à une molécule d'ATP (PDB : 1ATN). I, II, III et IV représentent les quatre domaines de l'actine. **(B)** Modèle représentant un monomère d'actine lié à une molécule d'ATP (adapté de *Pollard, 2016*).

Les monomères d'actine cytoplasmique sont régulièrement dans un cycle de polymérisation et dépolymérisation. Des études *in vitro* de cinétiques de polymérisation d'actine ont révélé que l'assemblage de l'actine se produit en trois phases : la nucléation, l'élongation et la phase stationnaire (Figure 18 A). Tout d'abord, la phase de nucléation consiste en l'autoassemblage de trois monomères d'actine formant ainsi un oligomère court « le noyau ». Ces trimères adoptent une conformation hélicoïdale stable. La phase de nucléation est thermodynamiquement défavorable. Le noyau forme la base sur laquelle les monomères d'actine s'incorporent pour former le filament. Durant la polymérisation d'actine, la nucléation constitue la phase limitant la vitesse de ce processus. La deuxième phase est l'élongation qui consiste à l'incorporation des monomères d'actine-G aux noyaux pour allonger les filaments. Les filaments d'actine formés possèdent une polarité structurale et dynamique représentée par une extrémité à croissance rapide appelée barbée (+) et une extrémité à croissance lente nommée pointue (-). Les vitesses d'association et de dissociation des monomères d'actine aux deux extrémités des filaments ne sont donc pas équivalentes. Au cours de l'élongation, les constantes de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) des monomères d'actine au bout barbé sont généralement plus élevées que celles au bout pointu. Le ratio entre le k_{off} et le k_{on} représente la concentration critique (C_c) pour laquelle l'association (polymérisation) et la dissociation (dépolymérisation) des monomères d'actine sont en équilibre. L'élongation d'un filament d'actine ne peut se produire que lorsque la concentration des monomères d'actine libres est supérieure à la concentration critique.

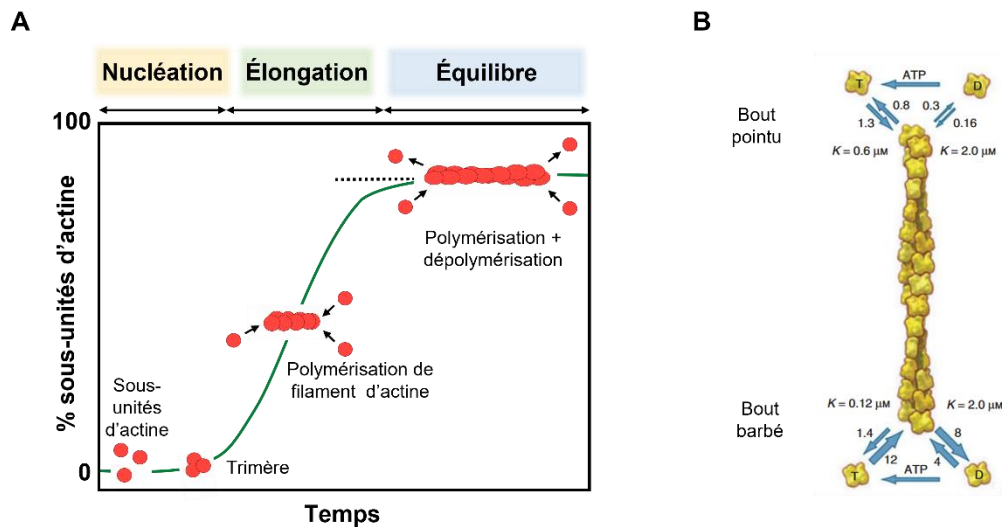


Figure 18. Processus d'assemblage des filaments d'actine.

(A) Cinétique de polymérisation d'actine montrant les différentes phases de l'assemblage d'un filament d'actine : la nucléation, l'élongation et la phase stationnaire (ou phase d'équilibre) lorsque la concentration des monomères d'actine atteint la concentration critique (adapté de [Alberts et al., 2002](#)). **(B)** Représentation d'un filament d'actine avec les constantes d'association et de dissociation des deux extrémités. T et D représentent un monomère d'actine lié à l'ATP ou l'ADP respectivement. Les constantes d'association et de dissociation sont exprimées en $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ et s^{-1} respectivement. K représente la concentration critique qui est le rapport des constantes d'association et de dissociation (adapté de [Pollard, 2016](#)).

L'incorporation d'un monomère d'actine au bout barbé d'un filament induit un changement de sa conformation structurale suivie de l'hydrolyse de l'ATP en ADP ([Blanchoin et Pollard, 2002](#); [Murakami et al., 2010](#)). Ce changement d'ATP en ADP crée une variation entre la concentration critique de l'extrémité barbée (liée à l'ATP) et l'extrémité pointue (liée à l'ADP) (Figure 18 B). Au début de l'étape d'élongation des filaments, la concentration des monomères d'actine est très élevée, ce qui favorise leur association aux deux extrémités plus rapidement que leur dissociation. Lorsque la concentration de l'actine-G libre commence à se réduire et à s'approcher de la concentration critique, la dépolymérisation des sous-unités d'actine liés à l'ADP (ADP-actine-G) aux bouts pointus est suivi d'un rechargement de l'ADP en ATP pour que l'ATP-actine-G soit de nouveau réutilisé et réincorporé aux bouts barbés. Un équilibre se produit entre la polymérisation aux bouts barbés et la dépolymérisation aux bouts pointus ce qui maintient une concentration constante de monomères d'actine libres de 0.1 μM , ce qui caractérise l'état stationnaire. Cet état stationnaire dynamique est

souvent qualifié de tapis roulant (*treadmilling*) (Le Clainche et Carlier, 2008; Blanchoin et al., 2014). Ce processus est régulé par des protéines de liaison à l'actine (ABPs) qui contrôlent l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine.

1.3.2. Régulation de la polymérisation de l'actine

Dans les cellules, la vitesse du tapis roulant de l'actine est beaucoup plus élevée que celui mesuré *in vitro* car ce phénomène est accéléré par un ensemble des protéines de liaison à l'actine régulatrices. Des études *in vitro* de certains agents infectieux, notamment *Listeria monocytogenes* et *Shigella*, qui détournent la machinerie de polymérisation de l'actine des cellules hôtes pour se déplacer, ont permis d'identifier ces protéines de liaison à l'actine (ABPs) (Tilney et Portnoy, 1989; Cossart et Kocks, 1994; Loisel et al., 1999). La régulation de la polymérisation de l'actine par les ABPs joue un rôle crucial dans la migration cellulaire en réponse aux signaux extra-cellulaires et également dans l'adhésion comme nous le verrons plus loin. Les protéines régulatrices de l'actine se fixent directement à l'actine monomérique ou filamenteuse. Les protéines de liaison à l'actine sont classées en plusieurs groupes selon leur fonction : les protéines séquestrantes, les nucléateurs, les protéines de coiffe, les protéines de désassemblage et les protéines de réticulation (*crosslinking*) (Figure 19).

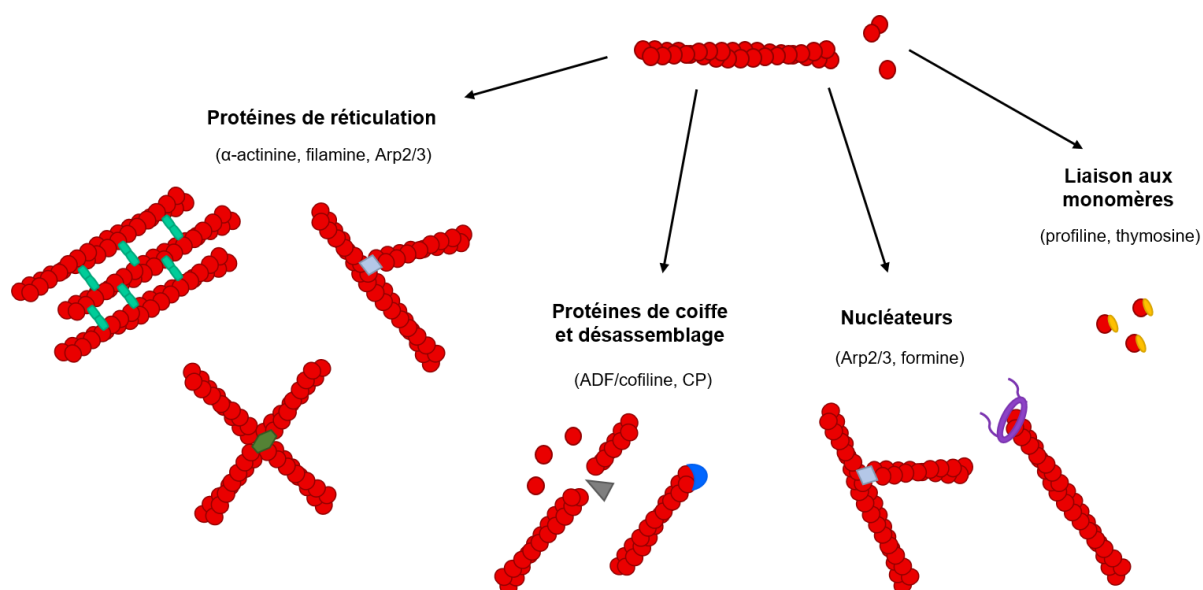


Figure 19. Les différents modes de régulation de l'actine par les ABPs.

Exemples des différents modes de régulation de l'actine par les protéines de liaison à l'actine (ABPs). Les protéines de liaison aux monomères d'actine, les protéines de nucléation, les protéines de coiffe (capping), les protéines de désassemblage et les protéines de réticulation (adapté de [Pollard, 2016](#)).

I.3.2.1. Les protéines séquestrantes

Selon les types cellulaires, la concentration des monomères d'actine-G libres dans le cytosol est mille fois supérieure à la concentration de monomères d'ATP-actine utilisée dans les expériences *in vitro* ([Pollard et al., 2000](#)). Le maintien d'une telle concentration stable d'actine globulaire est assuré par les protéines de liaison à l'actine-G qui sont capables de séquestrer les monomères d'actine et empêcher leur nucléation spontanée ([Skruber et al., 2018](#)). La profiline est une protéine essentielle capable de lier l'actine-G. Elle est très abondante dans le cytoplasme et fortement exprimée chez les eucaryotes. La profiline est capable de tamponner l'actine-G, ce qui inhibe l'auto-assemblage des trimères et empêche la nucléation spontanée. La profiline est aussi capable de catalyser l'échange de l'ADP pour de l'ATP sur l'actine-G (Figure 20) ([Goldschmidt-Clermont et al., 1991](#); [Jégou et al., 2011](#)). De plus, la profiline permet l'association des monomères d'actine-G au bout barbé des filaments, mais pas l'assemblage au bout pointu, ce qui permet de restreindre l'assemblage aux extrémités barbées qui font généralement faces à la membrane. Enfin, la profiline lie certaines protéines contenant des domaines riches en proline et qui sont aussi des partenaires de l'actine. Notamment la profiline

est considérée comme un co-facteur de machineries d'élongation comme les formines et les protéines de la famille Ena/VASP ([Romero et al., 2004](#); [Pernier et al., 2016](#)).

D'autre part, la thymosine- β 4 est une autre protéine séquestrante de l'actine, elle est en compétition avec la profiline pour maintenir une grande quantité d'actine-G non polymérisée dans le cytosol ([Pollard et al., 2000](#)). La thymosine- β 4 inhibe la nucléation spontanée de l'actine et induit un changement de conformation du monomère ce qui inhibe l'échange nucléotidique. Contrairement à la profiline, la thymosine- β 4 inhibe la polymérisation de l'actine aux deux extrémités.

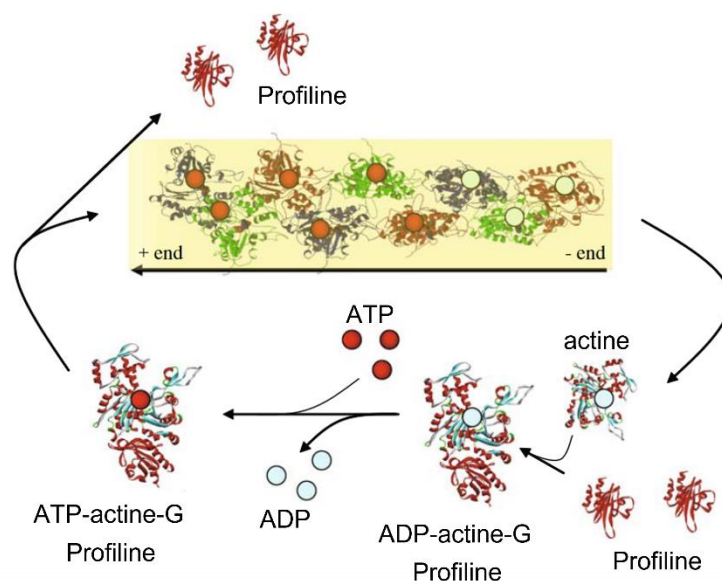


Figure 20. Schéma représentant le mécanisme d'échange ADP/ATP par la profiline lors de la polymérisation d'actine (*adapté de [Krishnan et Moens, 2009](#)*).

I.3.2.2. Les nucléateurs

Bien que l'assemblage spontané des monomères d'actine soit inhibé à cause de l'association de la majorité de l'actine-G à la profiline ou à la thymosine- β 4, d'autres mécanismes existent dans les cellules pour induire la nucléation des filaments d'actine. Diverses protéines de liaison à l'actine, appelées des nucléateurs, sont capables de créer des architectures de réseaux d'actine différents.

Les formines sont des protéines homodimériques qui lient les monomères d'actine. Elles sont constituées de plusieurs domaines avec notamment deux domaines

importants pour leur activité : le domaine FH1 (Formin Homology 1) et le domaine FH2 (Formin Homology 2). Le domaine FH1 est riche en proline et permet aux formines d'interagir avec les complexes actine-G/profiline. De plus, le domaine FH2 lie les bouts barbés des filaments d'actine (actine-F). Les formines stimulent la nucléation de nouveaux filaments d'actine et favorisent leur élongation ([Pruyne et al., 2002](#)). Les domaines FH2 de chaque monomère encerclent le bout barbé du filament d'actine et accompagnent sa croissance processivement pendant que le domaine FH1 accélère l'élongation du filament en ajoutant des monomères au bout barbé ([Romero et al., 2004](#); [Pring et al., 2003](#)). mDia1, qui appartient à la famille des formines chez les souris, accélère fortement la croissance des extrémités barbées lorsque la concentration de profiline-actine est limitée ($\leq 10 \mu\text{M}$) ([Jégou et al., 2013](#)). Dans les cellules, les formines sont auto-inhibées à cause d'une interaction intramoléculaire entre le domaine DID (Dia inhibitory domain) en position N-terminale et le domaine DAD (Dia autoregulatory domain) en position C-terminale. Cette autoinhibition est relâchée suite à l'activation par les petites Rho-GTPases.

Un autre nucléateur majeur de l'actine est le complexe Arp2/3 (actin-related-protein 2/3). Contrairement aux formines qui permettent une nucléation de filaments d'actine linéaires, le complexe Arp2/3 est connu pour nucléer les filaments d'actine en générant, sur un filament d'actine pré-existant, de nouveaux filaments branchés (Figure 21) ([Blanchoin et al., 2000](#); [Rouiller et al., 2008](#)). Structuralement, le complexe Arp2/3 est constitué de sept sous-unités comprenant les deux sous-unités apparentées à l'actine Arp2 et Arp3. L'activité de nucléation du complexe Arp2/3 nécessite sa liaison à l'ATP ([Le Clainche et al., 2001](#)). Il a été montré que les sous-unités Arp2 et Arp3 sont localisées au bout pointu du nouveau filament et ARPC2 et ARPC4 restent attachées au filament mère. Il est nécessaire que Arp2/3 soit activé pour accomplir son activité de nucléation branchée. Ainsi, l'activation du complexe Arp2/3 dépend de facteurs nommés NPFs (*nucleation promoting factors*) présents au niveau de la membrane plasmique. La famille des protéines WASP/WAVE/Scar appartient aux facteurs NPFs. Scar/WAVE (suppressor of cAMP receptor/ WASP-family verprolin-homologous protein) est une sous-unité du complexe WAVE qui est activé par la voie de signalisation Rac. Dans ce processus, le domaine VCA (le domaine catalytique du complexe WAVE) est essentiel. Le domaine VCA contient une séquence acide (A) qui lie le complexe Arp2/3 et une autre séquence homologue à la verproline (V) qui est capable de lier les complexes actine-G-profiline. Lorsque le VCA est lié au complexe Arp2/3 par la séquence A, il induit un changement de conformation de Arp2/3 pour l'activer et stimuler ainsi son activité de nucléation

branchée. En résumé, le domaine VCA est capable de former un complexe rassemblant le complexe Arp2/3, un filament d'actine préexistant et un monomère d'actine pour stimuler la nucléation en formant un nouveau filament d'actine latéral ([Machesky et al., 1999](#)). Le mécanisme de nucléation branchée induit par le complexe Arp2/3 permet d'organiser le cytosquelette d'actine en réseaux branchés qui en polymérisant génèrent la force nécessaire pour la formation des protrusions membranaires appelées lamellipodes qui sont impliquées dans la migration cellulaire et dans l'initiation des jonctions cellule-cellule ([Adams et al., 1998](#); [Le Clainche et Carlier, 2008](#); [Harris et Tepass, 2010](#)).

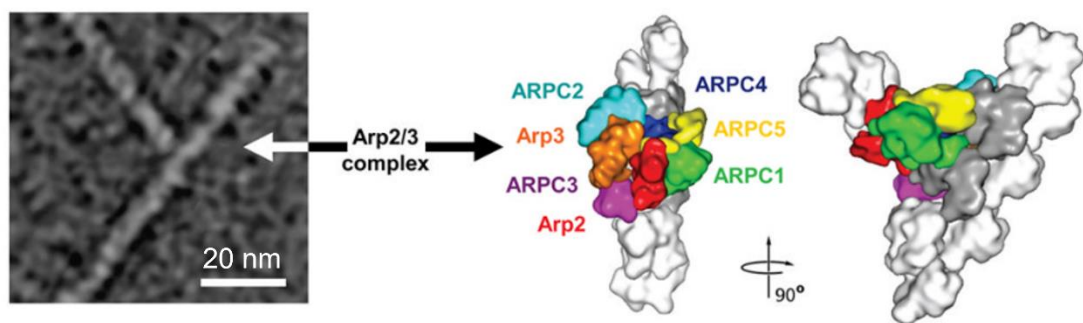


Figure 21. Structure du complexe Arp2/3.

À gauche, image obtenue in vitro en microscopie électronique montrant la morphologie d'un filament d'actine branché en forme de Y. À droite, modèle structural du complexe Arp2/3 obtenu en tomographie électronique représentant les différentes sous-unités (adapté de [Campellone et Welch, 2010](#)).

I.3.2.3. Les protéines de coiffe

Dans les cellules, il existe plusieurs autres ABPs nécessaires pour la régulation du cytosquelette d'actine. En plus des protéines qui favorisent la nucléation et la polymérisation, d'autres facteurs sont capables de réguler la dynamique et la croissance des filaments d'actine en inhibant la polymérisation. Comme mentionné précédemment, la polymérisation spontanée de l'actine peut être inhibée par la profiline ou la thymosine- β 4 en séquestrant les monomères d'actine-G. L'inhibition de la polymérisation est aussi possible sur les filaments en coiffant les bouts barbés par des protéines de coiffe. Diverses protéines sont classifiées comme protéines de coiffe, comme la « Capping Protein » (CP), qui donne son nom à la fonction, et la gelsoline.

La « Capping Protein » (CP), homologue de la protéine « CapZ » des muscles striés, est un hétérodimère α/β qui coiffe les bouts barbés des filaments d'actine dans les cellules non-musculaires. En se fixant avec une grande affinité à l'extrémité barbée, la CP bloque l'assemblage et le désassemblage d'actine-G à cette extrémité et empêche ainsi la polymérisation de ce filament ([Schafer et al., 1996](#); [Cooper et Sept, 2008](#)). Généralement, le processus de coiffe se produit en quelques secondes d'une manière irréversible et peut durer 30 minutes ($t_{1/2}$ de dissociation). L'inhibition par les protéines de coiffe réduit la fraction d'extrémités barbées libres et régule la longueur des filaments d'actine, ce qui est important pour la production de la force pendant le mouvement cellulaire. D'autres protéines de liaison à l'actine entrent en compétition avec la CP pour la liaison aux extrémités barbées des filaments d'actine, notamment les formines et VASP (son mode d'action sera développé ultérieurement) qui protègent les bouts barbés ([Barzik et al., 2005](#); [Shekhar et al., 2015](#)).

La CP n'est pas la seule protéine de coiffe, la gelsoline possède également cette activité. La gelsoline est capable de coiffer les bouts barbés des filaments d'actine en présence de calcium ([Gremm et Wegner, 2000](#)).

I.3.2.4. Les protéines de désassemblage

Les protéines de désassemblage (ou de dépolymérisation) sont essentielles pour le recyclage du cytosquelette d'actine et le maintien de la vitesse du tapis roulant. Ainsi, l'ADF/cofiline (actin depolymerizing factor) fixe les monomères ainsi que les filaments d'actine ([Blanchoin et Pollard, 1998](#)). L'ADF/cofiline se lie sur les côtés des filaments d'actine-ADP et favorise la dépolymérisation des monomères d'actine aux bouts pointus. L'affinité de l'ADF/cofiline pour l'actine-ADP est en effet 40 fois plus élevée que pour l'actine-ATP. Dans ce mécanisme, l'ADF/cofiline diminue l'affinité entre les sous-unités d'actine ce qui aboutit au désassemblage ([Maciver et al., 1991](#); [Carlier et al., 1997](#)). Dans ce processus, l'ADF/cofiline induit un changement de la structure et des propriétés mécaniques des filaments d'actine ([McCullough et al., 2011](#)). Des études récentes ont révélées que la saturation des filaments d'actine par l'ADF/cofiline favorise la dépolymérisation aux extrémités barbées comme aux extrémités pointues, et que l'ADF/cofiline est capable de décoiffer les filaments initialement coiffés au bout barbé

par la CP pour promouvoir ainsi leur dépolymérisation ([Wioland et al., 2017](#)). Dans ces conditions, la croissance et la dépolymérisation aux bouts barbés coexistent ce qui montre que les bouts barbés des filaments d'actine présentent une instabilité dynamique ([Romet-Lemonne et Jégou, 2021](#)). L'augmentation de la concentration des monomères d'actine-G libres qui résulte de la dépolymérisation par l'ADF/cofiline permet l'accélération de l'élongation des bouts barbés des filaments ([Le Clainche et Carlier, 2008](#)) (Figure 22).

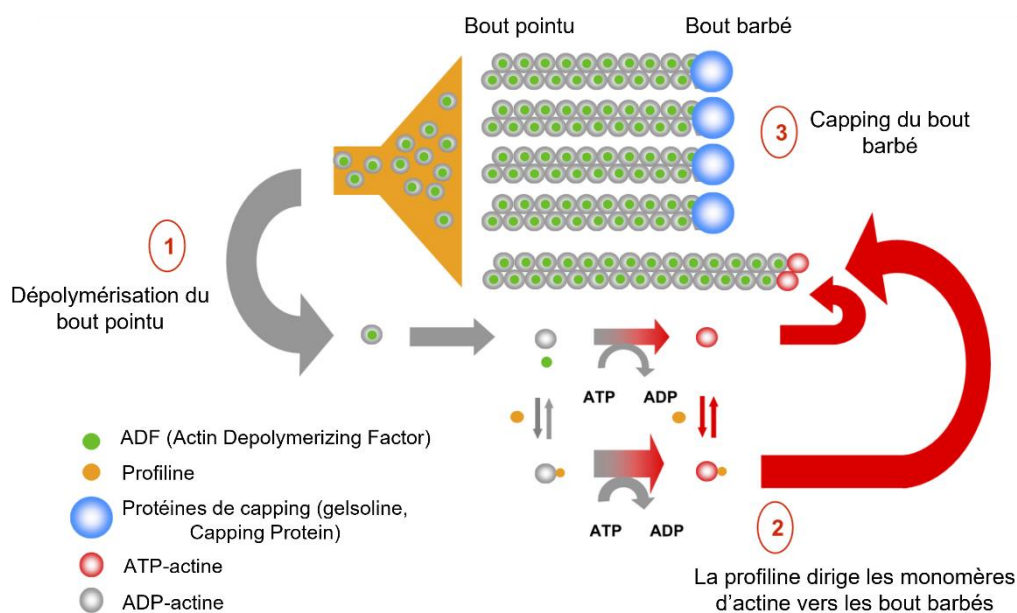


Figure 22. Modèle représentant la régulation du mécanisme « tapis roulant ».

1) La liaison de l'ADF au côté des filaments d'ADP-actine favorise la dépolymérisation aux bouts pointus. 2) Une fois la profiline fixée à l'ADP-actine, elle induit l'échange d'ADP en ATP afin de recycler les monomères d'actine et les complexes profiline-ATP-actine-G seront ensuite incorporés aux bouts barbés des filaments. 3) Les protéines de coiffe bloquent les bouts barbés des filaments d'actine, ce qui permet une augmentation de la concentration des monomères d'actine libre, et dirigent les monomères d'actine vers les filaments non bloqués qui vont polymériser plus rapidement (adapté de [Le Clainche et Carlier, 2008](#)).

I.3.2.5. Les protéines de réticulation (*crosslinking*)

Lors de divers processus cellulaires, le cytosquelette d'actine est soumis à des contraintes mécaniques, ce qui nécessite une connexion physique rigide entre les filaments d'actine. Cette connexion est généralement assurée par les protéines de réticulation (*crosslinking*). Ces protéines regroupent des filaments d'actine en faisceaux, ou en réseaux, en fonction de l'angle imposé aux filaments par ces protéines. La structure et les propriétés mécaniques de ces assemblages de filaments d'actine varient pour s'adapter à des fonctions cellulaires aussi diverses que la migration, l'invasion, l'adhésion, la division et le trafic intracellulaire. L' α -actinine est une protéine de réticulation impliquée dans de nombreuses structures cellulaires. Elle appartient à la famille des spectrines et existe en quatre isoformes : 1 et 4 sont les isoformes non-musculaires, 2 et 3 sont exprimés dans les muscles cardiaques et squelettiques respectivement. L' α -actinine organise les filaments d'actine en faisceaux de filaments parallèles et antiparallèles. De plus, l' α -actinine fixe plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion comme l' α -caténine, la vinculine et l'intégrine ([Revenu et al., 2004](#); [Sjöblom et al., 2008](#); [Stevenson et al., 2012](#)). La fimbrine est aussi une protéine de réticulation qui organise les filaments d'actine en faisceaux polarisés. Elle est spécifiquement trouvée dans les microvillosités. La fascine lie les filaments d'actine et les organise en faisceaux parallèles serrés dans les filopodes ([Kureishy et al., 2002](#); [Vignjevic et al., 2003](#); [2006](#)).

I.3.3. Le réseau contractile d'actomyosine

L'actomyosine est responsable de la contractilité du cytosquelette. Les myosines sont des moteurs moléculaires qui, en se fixant aux filaments d'actine et en hydrolysant l'ATP, génèrent des contractions. La superfamille des myosines regroupe plusieurs isoformes. Généralement, les myosines marchent vers les bouts barbés (+) des filaments d'actine à l'exception de la myosine VI qui se déplacent vers les bouts pointus (-). Le membre le plus étudié parmi ces isoformes est la myosine II qui est présente dans les cellules musculaires et non-musculaires. La myosine II non-musculaire (NM II) est essentielle pour la formation des adhésions cellulaires, l'architecture tissulaire et la migration cellulaire. La structure hexamérique de la NM II est composée de deux chaînes lourdes (MHC : Myosin Heavy Chain), deux chaînes légères essentielles (MELC : Myosin Essential Light Chain) et deux chaînes légères régulatrices (MRLC : Myosin

Regulatory Light Chain) ([Vicente-Manzanares et al., 2009](#)) (Figure 23). Les chaînes lourdes de la myosine sont constituées de la tête qui est la partie motrice responsable de l'interaction avec l'actine et de l'hydrolyse de l'ATP pour générer de la force, d'un « bras de levier » permettant l'activité motrice et d'une queue enroulée constituant le domaine de dimérisation. Les chaînes légères représentent le cou de la myosine localisées entre la tête et la queue, elles jouent un rôle important dans la régulation de l'activité motrice et le renouvellement de la myosine. Chez les mammifères, il existe trois différents isoformes de chaîne lourde de la myosine II non-musculaire : IIA, IIB et IIC, qui contribuent à la contractilité des cellules non-musculaires.

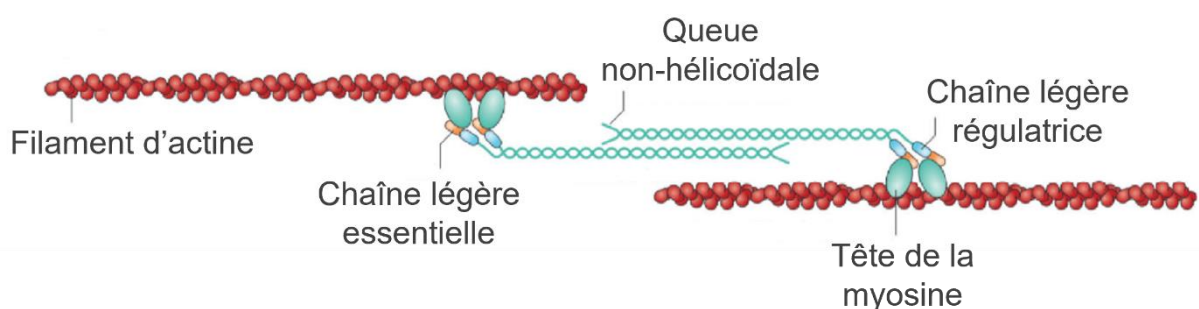


Figure 23. Le cytosquelette d'actomyosine.

La myosine est formée de deux chaînes lourdes (cyan), de deux chaînes légères régulatrices (bleu) et de deux chaînes légères essentielles (orange). La myosine se lie à des filaments d'actine antiparallèles. La liaison de la myosine aux filaments d'actine génère des forces contractiles (adapté de [Parsons et al., 2010](#)).

I.4. RÉGULATION DE LA DYNAMIQUE DE L'ACTINE AU NIVEAU DES JONCTIONS ADHÉRENTES

I.4.1. Organisation et régulation de l'actine au niveau des JA

Dans les cellules, l'observation du processus d'attachement intercellulaire à base des cadhérines montre un enchaînement de trois phases, partant de l'initiation de la formation des contacts cellule-cellule, passant par l'expansion de l'interface de contact, jusqu'à la maturation et la stabilisation des adhésions ([Cavey et Lecuit, 2009](#)). Pendant ce processus, le cytosquelette d'actine est continuellement remodelé et très

dynamique (Figure 24). Avant l'initiation des contacts cellule-cellule, les cellules épithéliales présentent un comportement migratoire comme au cours des processus de développement embryonnaire ou de cicatrisation des plaies chez les embryons de drosophile. Afin d'initier les contacts, les cellules émettent des protrusions membranaires qui sont très mobiles et s'étendent et se rétractent rapidement. La force motrice de ces protrusions lamellipodiales est la polymérisation de l'actine caractérisée par la formation d'un réseau d'actine branché par le complexe Arp2/3 ([Vasioukhin et al., 2000](#); [Kovacs et al., 2002](#)). Au niveau des contacts naissants, les molécules de cadhérines se regroupent pour former des clusters, ce qui favorise un remodelage important de l'actine ([Zhang et al., 2005](#)). L'engagement des cadhérines au niveau des contacts active d'abord la RhoGTPase Rac1, qui recrute les protéines de la famille WASP, qui sont des activateurs du complexe Arp2/3, afin de favoriser la nucléation de l'actine et la génération d'un réseau de filaments d'actine branchés. Rac1 active ensuite le recrutement de la cortactine, qui est une protéine reliant Arp2/3 à l'actine et qui stimule son activité. En plus du complexe Arp2/3, les protéines de la famille Ena/VASP sont aussi recrutées au niveau des protrusions membranaires. Les activités de branchement et de polymérisation d'actine favorisées par Arp2/3 et Ena/VASP sont donc nécessaires à l'extension des contacts en générant la force motrice pour pousser les membranes des cellules adjacentes les unes vers les autres ([Verma et al., 2004](#); [Scott et al., 2006](#)). La voie de signalisation Rac1 participe au recrutement et à l'activation du complexe Arp2/3 et d'une autre protéine régulatrice de la polymérisation d'actine, la formine-1 ([Kovar, 2006](#)), pour soutenir et élargir les jonctions en cours de formation ([Kovacs et al., 2002a](#); [Kobielak et al., 2004](#)).

Cependant, l'accumulation des cadhérines induit une augmentation de la concentration de l' α -caténine au niveau des contacts cellule-cellule qui est un inhibiteur du complexe Arp2/3 ([Drees et al., 2005](#)). L'inhibition du complexe Arp2/3 par l' α -caténine permet de réguler l'organisation des réseaux d'actine, ce qui conduit à l'arrêt de la formation des lamellipodes et ensuite la maturation et la stabilisation des adhésions intercellulaires. La formine serait également capable de lier l' α -caténine pour former des câbles d'actine radiaux, stabilisant ainsi les jonctions ([Grikscheit et al., 2015](#)). L'extension et le renforcement des jonctions sont favorisés par l'activation de la voie de signalisation RhoA qui active la myosine II ([Yamada et Nelson, 2007](#)). Le regroupement des clusters des E-cadhérines au niveau des jonctions adhérentes implique la contractilité de la myosine II qui favorise la formation et la stabilité des câbles d'actomyosine ([Shewan et al., 2005](#)). Le « knock-down » des isoformes de la

myosine II non musculaire (NMIIA et NMIIIB) entraîne une diminution de la quantité de F-actine jonctionnelle et de la densité des extrémités barbées au niveau des JA, suggérant l'existence d'un mécanisme de nucléation de l'actine dépendant de la tension de l'actomyosine (Leerberg et al., 2014). En effet, une fois que les jonctions sont sous tension au niveau de la « *Zonula Adherens* », l' α -caténine étirée recrute la vinculine et Mena/VASP, ce qui induit la polymérisation d'actine et alimente la contractilité actomyosine (Leerberg et al., 2014).

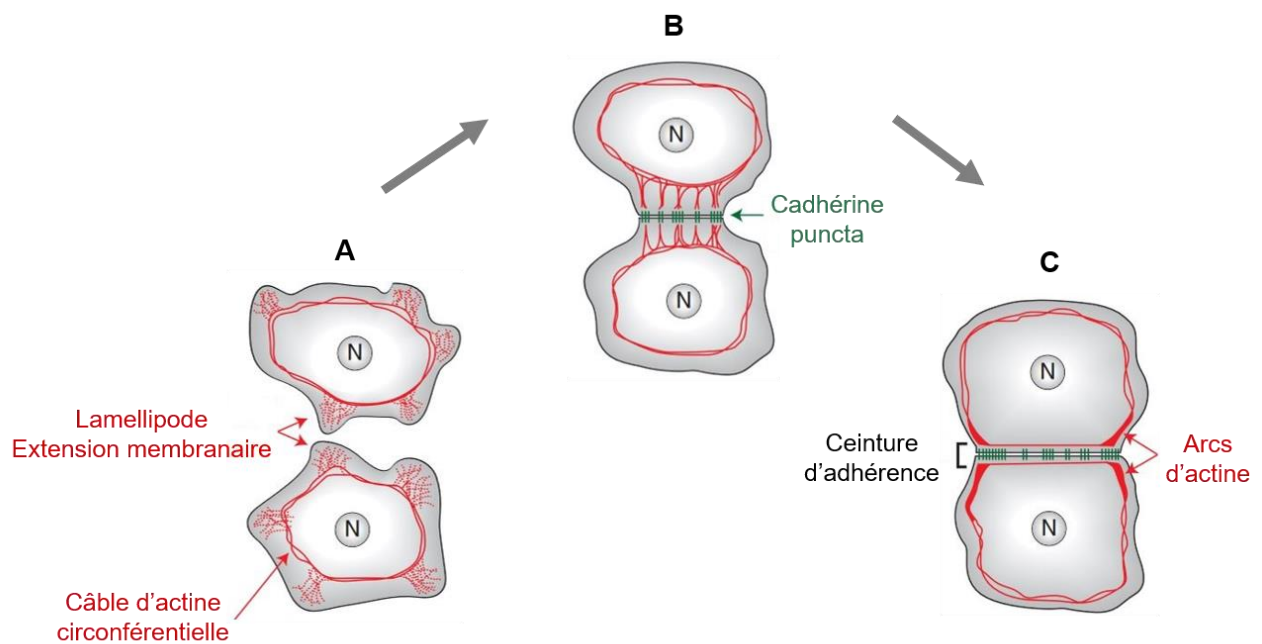


Figure 24. Schéma représentant la réorganisation de l'actine au cours de la formation des contacts cellule-cellule.

A. Les cellules émettent des extensions membranaires (lamellipodes) pour initier les contacts. Le cytosquelette d'actine est organisé en réseaux branchés pour générer la force nécessaire à l'extension des membranes. **B.** Formation des puncta de cadhérines aux extrémités de ces projections. Des faisceaux (*bundles*) d'actine radiaux relient les puncta de cadhérines au câble d'actine circonférentielle. **C.** Au fur et à mesure de l'extension et de la maturation des jonctions cellule-cellule, des arcs d'actine se concentrent aux bords des contacts, puis s'aplatissent pour former une ceinture d'adhérence le long du contact (adapté de Cavey et Lecuit, 2009).

I.4.2. La vinculine

I.4.2.1. Organisation structurale, interactions et régulation

La vinculine est une protéine ubiquitaire membranaire enrichie au niveau des contacts cellule-cellule et cellule-matrice ([Bays et DeMali, 2017](#)). Elle lie indirectement les récepteurs adhésifs au cytosquelette d'actine. Les souris « *knock-out* » pour la vinculine meurent dans des étapes précoces de l'embryogenèse, ce qui implique que la présence de la vinculine est cruciale pour les mouvements et les contacts cellulaires à ce stade. La vinculine est une protéine hautement conservée de 116 kDa composée d'un domaine globulaire nommé tête (V_h) en position N-terminale et d'un domaine appelé queue (V_t) en position C-terminale, reliés par un linker flexible formé de séquences riches en proline ([Bakolitsa et al., 2004](#)) (Figure 25). La tête de la vinculine (V_h), structurée en faisceaux d'hélices α , est subdivisée en quatre sous domaines D1 à D4. La queue, appelée aussi D5, consiste en un seul faisceau de cinq hélices α . Le domaine D1 de la tête interagit avec une variété de protéines, notamment l' α -caténine, la β -caténine, l' α -actinine et la taline ([Carisey et Ballestrem, 2011](#)). La queue de la vinculine est le domaine de liaison aux filaments d'actine (ABD : actin binding domain) ([Menkel et al., 1994](#)), et elle se lie aussi aux phospholipides acides membranaires comme le PIP2. Le linker de la vinculine se lie à de nombreuses protéines comme VASP et Arp2/3 ([Brindle et al., 1996](#); [DeMali et al., 2002](#); [Bays et DeMali, 2017](#)). Dans les cellules, la vinculine existe sous deux conformations distinctes : une forme ouverte (active), et une forme fermée (inactive). Dans la forme fermée, la tête V_h est masquée par une interaction intramoléculaire avec la queue V_t (Figure 25). Cette interaction intramoléculaire auto-inhibitrice fait intervenir des contacts entre les domaines D1 et D4 de V_h et le domaine V_t . La conformation fermée empêche la liaison de la vinculine avec une multitude de partenaires dans les adhésions focales et les jonctions adhérentes ([Borgon et al., 2004](#)). L'interaction V_h - V_t inhibe la liaison de V_t aux filaments d'actine et empêche la liaison de V_h à la plupart de ses ligands, notamment l' α -caténine ([Johnson et Craig, 1995](#)).

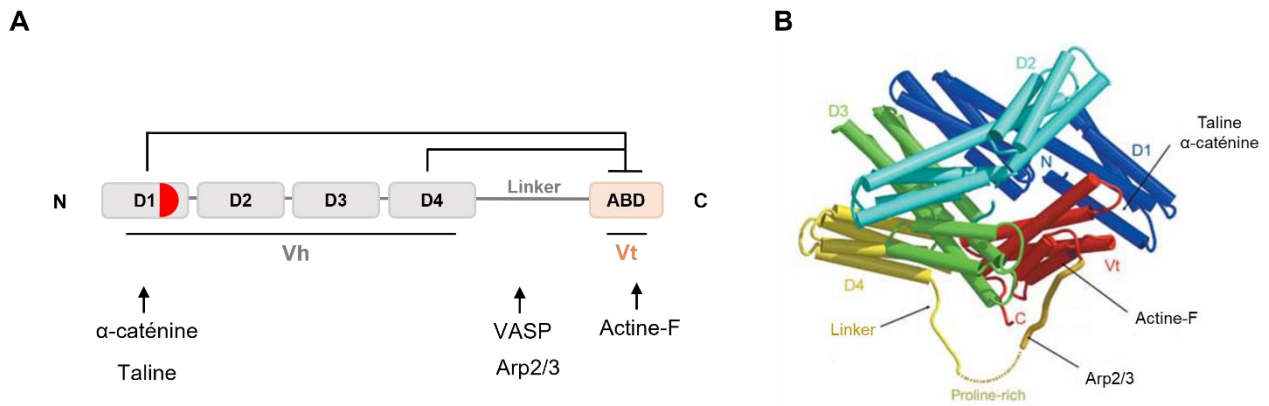


Figure 25. Structure et organisation en domaines de la vinculine.

A. Représentation schématique de l'organisation en domaines de la vinculine. V_h (vinculin head) : tête de la vinculine ; V_t (vinculin tail) : queue de la vinculine ; D1 à D4 : les sous-domaines de la tête ; ABD (actin binding domain) : domaine de liaison à l'actine-F. La vinculine est autoinhibée par l'interaction intramoléculaire entre les domaines D1 et D4 de la tête V_h et la queue (domaine V_t). Le domaine de fixation à l' α -caténine est mis en évidence en rouge. L' α -caténine et la taline se fixent au domaine D1, VASP et Arp2/3 se lient au linker de la vinculine. N : N-terminal ; C : C-terminal. **B.** Modèle structurale de la vinculine (adapté de [Bakolitsa et al., 2004](#)).

De multiples modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme d'activation de la vinculine au niveau des jonctions adhérentes. Comme l'interaction V_h - V_t est très forte, plusieurs partenaires de liaison sont nécessaires pour dissocier cette interaction. L'utilisation d'un mutant ponctuel de l' α -caténine perturbant le site de liaison à la vinculine suggère que la liaison directe de l' α -caténine à la vinculine est essentielle pour l'ouverture de la protéine et que cette activation nécessite également la liaison de la vinculine aux filaments d'actine ([Peng et al., 2012](#)). L'action combinée de l'actine-F, qui se lie à V_t , et de l' α -caténine, qui se lie à V_h , serait donc suffisante pour induire la transition de la conformation fermée à la conformation ouverte active de la vinculine. Enfin, l'activation de la vinculine et sa liaison à l' α -caténine dépendent de l'activité de la myosine II ([Yonemura et al., 2010](#)). Des simulations de dynamique moléculaire ont révélé que des forces élevées appliquées à la vinculine peuvent accélérer son ouverture ([Sun et al., 2017](#)). Le recrutement et l'activation de la vinculine aux jonctions adhérentes pourrait aussi faire intervenir la phosphorylation de sa tyrosine 822. En effet, la phosphorylation du résidu Y822 par la tyrosine kinase Abelson (Abl), en réponse à la force appliquée aux E-cadhérines, est importante pour le recrutement de la vinculine aux contacts cellule-cellule ([Bays et al., 2014](#); [Bertocchi et al., 2017](#)).

I.4.2.2. Rôle dans la régulation de l'assemblage de l'actine

La vinculine n'est pas seulement impliquée dans l'ancrage du cytosquelette d'actine, elle régule également la dynamique de l'actine. L'injection de la protéine de *Shigella* IpaA dans la cellule hôte inhibe la polymérisation d'actine d'une manière dépendante de la vinculine révélant ainsi le mécanisme par lequel IpaA se fixe à V_h pour activer la vinculine. Des études *in vitro* du complexe IpaA-vinculine ont montré que ce complexe inhibe de 40% le taux d'élongation des bouts barbés des filaments d'actine, ce qui suggère que la vinculine activée contrôle l'assemblage de l'actine en coiffant les extrémités barbées ([Ramarao et al., 2007](#)). Plus tard, des mesures de cinétique de polymérisation de l'actine en spectroscopie de fluorescence et des observations de filaments d'actine uniques en microscopie TIRF ont mis en évidence le rôle de la vinculine dans la régulation de la polymérisation de l'actine ([Le Clainche et al., 2010](#)). Cette étude montre que dans les conditions physiologiques le domaine V_t inhibe l'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine par un mécanisme de coiffe. Alors que dans des conditions de faible force ionique, V_t est capable d'accélérer les cinétiques de polymérisation en nucléant les filaments d'actine coiffés à leur extrémité barbée. Ces résultats révèlent la nature électrostatique de l'interaction entre le domaine V_t de la vinculine et l'actine ([Wen et al., 2009](#); [Le Clainche et al., 2010](#)).

En plus de son rôle dans la polymérisation de l'actine, la vinculine organise également les filaments en faisceaux. Des études ont révélé l'implication de deux sites distincts pour la liaison de la vinculine à l'actine-F localisés à proximité des hélices 2 et 3 de la queue V_t . Dans la conformation inactive de la vinculine, un des deux sites est masqué et n'est pas accessible pour la liaison à l'actine-F alors que le deuxième est entièrement exposé. Un réarrangement local du domaine V_t est mis en place suite à la liaison de l'actine-F aux deux sites, ce qui favorise la dimérisation de la protéine et l'organisation des filaments d'actine en faisceaux ([Johnson et Craig, 2000](#); [Janssen et al., 2006](#)).

I.4.3. VASP

La famille des protéines Ena/VASP (Enabled/Vasodilator-stimulated phosphoprotein) est composée de protéines multifonctionnelles modulatrices de l'actine qui jouent un rôle central dans le mouvement et le changement de forme cellulaire chez les vertébrés et les invertébrés. Ces protéines sont actives dans de nombreux types cellulaires et sont localisées au niveau des contacts cellule-cellule, des adhésions cellule-matrice, à

l'extrémité des filopodes, ainsi qu'au niveau du bord avant des lamellipodes des cellules en migration ([Faix et Rottner, 2022](#)). Les protéines Ena/VASP sont impliquées dans la maturation des adhésions cellule-cellule ([Scott et al., 2006](#)).

I.4.3.1. Organisation structurale et interactions

La famille des protéines Ena/VASP est composée de plusieurs membres : Mena (mouse Ena), VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein) and Evl (Enabled/ Vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein). L'organisation structurale des protéines Ena/VASP est caractérisée par plusieurs domaines spécifiques qui sont conservés par tous les membres de la famille. Il s'agit notamment d'un domaine en position N-terminale EVH1 (Ena/VASP homology 1), une région centrale riche en proline et un domaine en position C-terminale EVH2 (Ena/VASP homology 2). Les protéines Ena/VASP interagissent avec plusieurs partenaires et remplissent ainsi diverses fonctions (Figure 26). Le domaine EVH1 fixe des protéines contenant des motifs spécifiques de polyproline de type FPPPP (FP4) telles que la protéine de *Listeria* ActA, la vinculine, la lamellipodine et la zyxine ([Reinhard et al., 1996](#); [Brindle et al., 1996](#)). La région centrale riche en proline assure la liaison avec la profiline et les protéines contenant des domaines SH3 ([Ferron et al., 2007](#); [Bear et Gertler, 2009](#); [Hansen et Mullins, 2010](#)). Le domaine EVH2 en position C-terminale comprend un site de liaison à l'actine-G (GAB : globular actin binding) et un deuxième à l'actine-F (FAB : filamentous actin binding), et un domaine de tétramérisation. Les domaines EVH1 et EVH2 permettent tous les deux de localiser les protéines Ena/VASP dans les cellules.

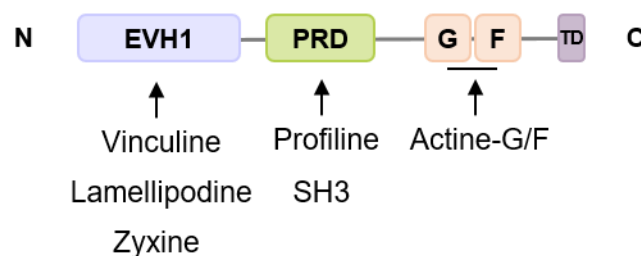


Figure 26. Organisation en domaines de VASP et ses partenaires.

EVH1 (Ena/VASP Homology 1); PRD (Proline-rich domain): domaine riche en proline; G et F : domaines de liaison à l'actine-G et -F respectivement; TD (tetramerization domain) : domaine de tétramérisation. Les domaines de liaison à l'actine-G et -F ainsi que le domaine de tétramérisation constituent le domaine EVH2.

I.4.3.2. Rôle dans la régulation de l'assemblage de l'actine

Premièrement, la protéine VASP possède la propriété de se fixer aux cotés des filaments d'actine (Laurent et al., 1999). *In vitro*, VASP est capable de nucléer les filaments d'actine à faible force ionique (Hüttelmaier et al., 1999; Laurent et al., 1999). L'activité de nucléation de VASP dépend de sa capacité à tétramériser et à lier l'actine-G. Néanmoins, dans des conditions de force ionique physiologique, VASP ne peut pas nucléer les filaments d'actine efficacement (Barzik et al., 2005). VASP joue un rôle important dans la protection des bouts barbés contre l'action des protéines de coiffe, ce qui permet aux filaments d'actine de s'allonger plus longtemps avant d'être coiffés. Des billes enrobées avec les protéines VASP sont capables de fixer les filaments d'actine et de les allonger, ce qui n'est pas le cas quand les filaments sont coiffés (Bear et al., 2002). De même, les essais *in vitro* en pyrène ont montré que la protéine VASP inhibe l'activité de CP (capping protein) et favorise l'élongation des filaments d'actine d'une manière dose dépendante (Bear et al., 2002; Barzik et al., 2005). Des observations de filaments uniques d'actine en microscopie TIRF révèlent une croissance des filaments d'actine en présence de la CP uniquement lorsque VASP est ajouté (Hansen et Mullins, 2010; Breitsprecher et al., 2011). Ces résultats confirment clairement l'activité anti-coiffage (anti-capping) de VASP, mais pas le décoiffage (uncapping). L'utilisation de microbilles recouvertes de de VASP de *Dictyostelium* montre que VASP favorise l'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine d'une manière processive en présence de CP (Breitsprecher et al., 2008; 2011). Ce processus d'élongation processive est permis par la formation de clusters de VASP qui aident à la protection des bouts barbés du coiffage par la CP (Figure 27)(Brühmann et al., 2017). Bien que l'activité d'élongation processive existe également pour VASP humain, elle est beaucoup moins efficace que celle mesurée pour VASP de *Dictyostelium* (Hansen et Mullins, 2010). En effet, le temps de résidence de VASP humain à l'extrémité barbée des filaments d'actine est plus court que celui de VASP *Dictyostelium*. De plus, les activités d'anti-coiffage et d'élongation de VASP humain dans les conditions physiologiques sont favorisées par la liaison de la profiline au domaine riche en proline de VASP (Hansen et Mullins, 2010). La liaison des complexes profiline-actine au domaine riche en proline et le domaine de liaison à l'actine-G de VASP sont importants pour ce processus de coopération entre la profiline et VASP. D'autre part, les protéines Ena/VASP possèdent également la capacité de former des faisceaux de filaments d'actine (Bachmann et al., 1999). La capacité de VASP à former des tétramères ainsi qu'à lier les filaments d'actine (actine-F) sont nécessaire pour cette activité.

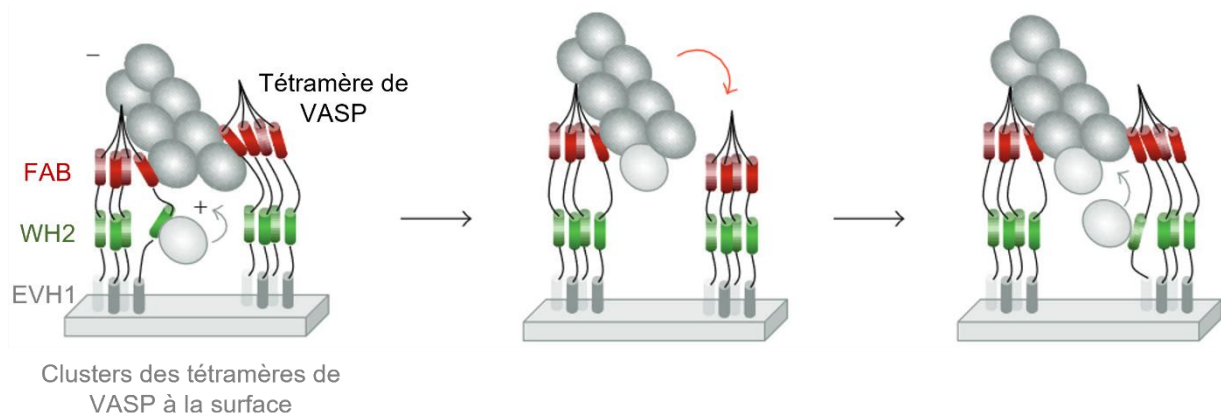


Figure 27. Mécanisme d'élongation processive des filaments d'actine par VASP.

Les clusters de tétramères de VASP fixent les monomères d'actine par leur domaine WH2, qui est le domaine de fixation à l'actine-G (GAB), ce qui apporte plus de monomères d'actine aux bouts barbés des filaments. De cette manière VASP accélère l'élongation aux bouts barbés tout en restant fixé aux filaments d'actine en croissance par son domaine FAB (adapté de [Ciobanasu et al., 2012](#)).

II. POSITION DU SUJET

Divers processus physiologiques, tels que la morphogenèse, la régénération tissulaire ou la cicatrisation des plaies, nécessitent une cohésion tissulaire et une adaptation des cellules aux perturbations mécaniques, intra- ou extracellulaires, auxquelles elles sont régulièrement soumises. Les cellules sont capables de détecter, de transmettre et enfin de traduire ces informations mécaniques en informations biochimiques de manière à adapter leur forme, leur dynamique et leurs activités à ces perturbations. Ce processus nécessite une adhésion adaptative entre les cellules. Grâce à leur propriété mécanosensible, les jonctions adhérentes (JA), contenant des cadhérines, contribuent au maintien de l'intégrité des tissus. La formation ainsi que la réparation des JA nécessitent que les cellules émettent initialement des protrusions membranaires, grâce à l'assemblage de réseaux d'actine, pour rapprocher leurs membranes et favoriser le contact de leurs cadhérines. Une fois formées, les JA développent un couplage mécanique entre leurs cadhérines transmembranaires et le cytosquelette d'actine, via des protéines de liaison à l'actine spécifiques des JA. Les réseaux d'actine formés dans les protrusions membranaires initiales sont constitués de filaments d'actine branchés dont les propriétés mécaniques et la polymérisation sont adaptées à la production de la force nécessaire pour déformer la membrane. Les filaments d'actine associés aux JA matures, en revanche, possèdent une organisation et une dynamique très différentes puisqu'ils forment des câbles compacts et contractiles mais conservent la capacité de polymériser. Au début de ce travail de thèse, nous ignorions largement les mécanismes par lesquels les réseaux se réorganisent pendant la formation et la maturation des JA. De plus, les mécanismes par lesquels la polymérisation de l'actine se produit dans les JA matures n'étaient pas connus.

Les **objectifs** de mon projet de thèse étaient donc de comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels **les complexes d'adhésion régulent la dynamique et l'assemblage de l'actine** et les **bases moléculaires qui dirigent la transition entre les différents réseaux d'actine** durant la formation et la maturation des JA.

Les hypothèses de travail sur lesquelles repose cette thèse sont basées sur un ensemble de résultats obtenus par notre équipe et par d'autres groupes au cours des années précédentes et qui sont synthétisées ci-dessous.

Les cadhérines couplent le cytosquelette d'actine des cellules voisines via un complexe d'adhésion formé par les protéines interconnectées α -caténine, vinculine, et VASP. La

force générée par la contraction de l'actomyosine, transmise au domaine de liaison à l'actine (ABD) de l' α -caténine, libère son autoinhibition induisant le recrutement de la vinculine, ce qui conduit au renforcement des JA ([le Duc et al., 2010](#); [Seddiki et al., 2018](#)). Dans ce processus, la protéine régulatrice de l'actine, VASP, interagit avec la vinculine en se fixant sur le motif FPPPP riche en proline de son linker. Une étude démontre que ce complexe protéique α -caténine-vinculine-VASP induit la polymérisation de l'actine d'une manière dépendante de la force produite par l'actomyosine ([Leerberg et al., 2014](#)). Le mécanisme par lequel ces trois protéines coopèrent pour former des nouveaux filaments d'actine aux JA reste inconnu. Cependant, des études biochimiques des mécanismes de régulation de l'assemblage de l'actine sont disponibles pour les trois protéines séparément. Ainsi, l' α -caténine, via son domaine de liaison à l'actine ABD, coiffe les bouts barbés des filaments d'actine ([Hansen et al., 2013](#)). De même, le domaine V_t (ABD) de la vinculine est capable de nucléer les filaments d'actine, de coiffer leur extrémité barbée et de former des faisceaux de filaments ([Le Clainche et al., 2010](#)). Les tétramères de VASP possèdent des activités de nucléation, d'élongation des bouts barbés et de formation de faisceaux de filaments ([Laurent et al., 1999](#); [Hansen et Mullins, 2010](#); [Breitsprecher et al., 2008](#); [2011](#)). Ces activités sont mises en œuvre après l'établissement des contacts entre cadhérines et remplacent l'activité d'assemblage de réseaux de filaments d'actine qui avaient initialement permis de rapprocher ces cadhérines grâce à la formation de lamellipodes. Le facteur essentiel à la formation de ces réseaux d'actine est le complexe Arp2/3 qui branche les filaments d'actine préexistants pour produire une force qui rapproche les membranes cellulaires voisines et favorise les contacts entre cadhérines ([Li et al., 2021](#)).

L'ensemble de ces observations nous a incité à **déterminer l'activité du complexe α -caténine-vinculine-VASP**, les activités séparées de ses composants ne permettant pas de la prédire, **et à comprendre l'effet de cette machinerie sur la formation des filaments branchés par le complexe Arp2/3**. Pour cela, j'ai mis en œuvre un projet de biochimie avec des protéines purifiées. J'ai utilisé des **constructions mutées d' α -caténine et de vinculine** qui interagissent d'une manière constitutive sans stimulus mécanique pour exposer leurs interfaces de liaison masquées. J'ai étudié *in vitro* **l'activité du complexe α -caténine-vinculine-VASP** sur la régulation de l'assemblage de l'actine non branchée ou branchée par le complexe **Arp2/3** en combinant des mesures de **cinétique de polymérisation de l'actine en spectroscopie de fluorescence** avec l'observation de la polymérisation et de l'organisation des **filaments d'actine uniques en microscopie à fluorescence**.

III. MATÉRIELS ET MÉTHODES

III.1. PURIFICATION DES PROTÉINES ÉTUDIÉES

Cette étude a été menée en utilisant des protéines purifiées. J'ai utilisé les constructions d'ADN codant pour ces protéines qui avaient été récemment conçues par des collègues de l'équipe et des collaborateurs comme les constructions de l' α -caténine entière (WT) et son mutant Δ mod ([Seddiki et al., 2018](#)) et le mutant de la vinculine V_{1ab4} ([Wang et al., 2022](#)). La construction entière de VASP humain (WT) était disponible au laboratoire de longue date. Bien que les constructions d'ADN codant pour les protéines mentionnées ci-dessus étaient disponibles, j'ai mis en œuvre leur purification à plusieurs reprises au cours de ce travail. D'autres protéines, comme le complexe Arp2/3 purifié à partir de cervelle de mouton ([Le Clainche et Carlier, 2004](#)), étaient disponibles dans les stocks de notre laboratoire. J'ai purifié l'actine de muscle squelettique de lapin ([Wiesner, 2006](#)) et la profiline recombinante ([Le Clainche et Carlier, 2004](#)) en me référant aux protocoles du laboratoire. Les amorces (*seeds*) de spectrine-actine extraites des érythrocytes humaines ont été préparées comme décrit précédemment ([Casella et al., 1986](#)).

III.1.1. Purification et marquage de l'actine

L'actine est extraite de muscle squelettique de lapin et conservée à -20°C sous forme de poudre acétonique ([Wiesner, 2006](#)). La purification de l'actine à partir de la poudre acétonique est basée sur des cycles de dépolymérisation de l'actine dans un tampon de faible force ionique, de polymérisation par ajout du sel, et de sédimentation de l'actine polymérisée par ultra-centrifugation. L' α -actinine est ensuite éliminée par sédimentation à basse vitesse et la tropomyosine est dissociée de la F-actine à forte force ionique. L'actine est rendue monomérique par une longue dialyse de plusieurs jours dans un tampon de dialyse (5 mM Tris pH 7.8, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃, 1 mM DTT), et soumise à une dernière étape de purification par filtration sur gel sur une colonne Superdex G-200 (GE Healthcare) et finalement conservée sur glace pendant un mois environ.

L'actine a été ensuite marquée pour la microscopie avec le fluophore Alexa-488 ([Ciobanasu et Le Clainche, 2015](#)) ou atto-488, fonctionnalisé avec un groupement réactif acide carboxylique succinimidyl ester qui marque les amines primaires contenues dans les lysines. Dans cette procédure, l'actine est marquée sous forme

polymérisée pour protéger les interfaces entre sous-unités. Pour les expériences de cinétiques de polymérisation de l'actine en spectroscopie de fluorescence, l'actine est marquée sur sa cystéine 374 avec le N- (1-pyrene)iodoacetamide (*Kouyama et Mihashi, 1981*).

III.1.2. α -caténine

L' α -caténine se lie à la tête de la vinculine (V_h) par son domaine MI (*Rangarajan et Izard, 2012; Ishiyama et al., 2013*), qui est masqué par les domaines MII et MIII (Figure 28). L'application d'une force est nécessaire pour l'activation de l' α -caténine en conformation ouverte et le recrutement de la vinculine (*Yao et al., 2014; Choi et al., 2012*). Pour rendre l'interaction entre l' α -caténine et la vinculine constitutive, nous avons utilisé une construction mutante de l' α -caténine, appelée α -caténine Δ mod, dans laquelle les domaines MII et MIII (résidus 509 – 628) ont été enlevés (*Seddiki et al., 2018*), afin d'exposer le site de fixation à la vinculine (VBD) présent dans MI.

Les deux constructions de l' α -caténine, entière (WT) et Δ mod, utilisées dans cette étude ont été conçues à partir d'un ADNc codant pour l' α -E-caténine de souris. La construction d'ADN codant pour l' α -caténine WT a été clonée dans un plasmide pETM avec une étiquette Avi (Avi tag) en position N-terminale et une étiquette de 6 histidines (His_6 tag) en position C-terminale.

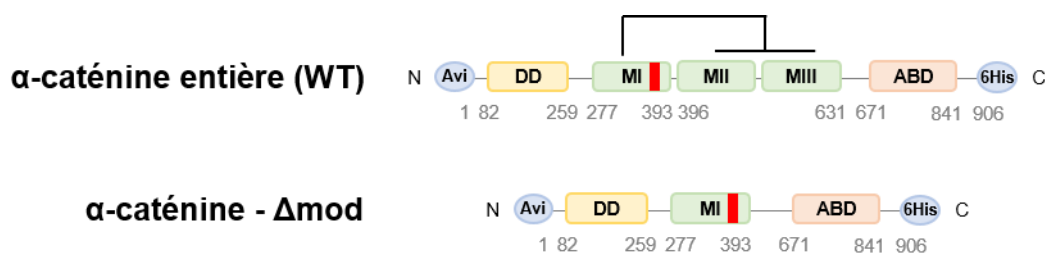


Figure 28. Les constructions d' α -caténine utilisées dans cette étude.

DD (domaine de dimérisation), MI à MIII (domaines modulateurs I à III), ABD (domaine de liaison à l'actine), Avi (étiquette Avi, biotinylable si besoin), 6His (étiquette 6 histidines). Le domaine de fixation à la vinculine (VBD : vinculin binding domain) est indiqué en rouge.

De même, l' α -caténine Δ mod a été clonée dans un plasmide pDW363 avec une étiquette Avi (Avi tag) en position N-terminale et une étiquette de 6 histidines (His_6 tag) en position C-terminale.

L'expression de l' α -caténine WT et le mutant Δ mod a été réalisée en suivant le même protocole (Ciobanasu et Le Clainche, 2015). Après transformation du plasmide dans *Escherichia coli* (BL21 DE3, Invitrogen), les bactéries ont été cultivées dans 3 litres de milieu LB contenant 0.1 mg.ml^{-1} d'antibiotiques (ampicilline ou kanamycine) à 37°C jusqu'à ce que l'absorbance atteigne $0.6 - 0.8$ à 600nm . La température a alors été abaissée à 16°C et 1mM d'isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) a été ajouté au milieu pour induire l'expression des protéines à 16°C durant 16h. Après centrifugation à basse vitesse, les culots bactériens ont été lysés par plusieurs cycles de sonication dans un tampon de lyse (20 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, $10 \text{ }\mu\text{g.ml}^{-1}$ benzamidine et 1 mM PMSF). Après centrifugation à haute vitesse pour éliminer les débris cellulaires, les extraits clarifiés d' α -caténine WT et Δ mod ont été déposés sur une colonne contenant une résine de chromatographie d'affinité Ni-NTA (Ni^{2+} - acide nitrilotriacétique) – agarose (Qiagen). Après un lavage avec de tampon A (50 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol), les protéines contenant des étiquettes 6 histidines ont été éluées avec le tampon d'élution (50 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol). Une dernière étape de chromatographie par filtration sur gel (colonne Superdex 200, 16/60, GE Healthcare) a été réalisée. Les protéines purifiées ont été finalement dialysées dans le tampon de conservation (20 mM Tris pH 7.8, 150 mM KCl, 1 mM DTT), congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C .

III.1.3. Vinculine

La vinculine entière est normalement auto-inhibée par une interaction intramoléculaire entre la tête (V_h /D1-D4) et la queue (V_t /ABD) (Figure 29). Des outils ont été conçus dans notre laboratoire pour mimer la forme ouverte de la vinculine en utilisant une construction de la vinculine « V_{1ab4} » contenant des mutations ponctuelles dans le sous-domaine D1 (E28K, D33H), (D110H, R113E), et le sous-domaine D4 (N773I, E775K) pour exposer le domaine de fixation à l' α -caténine contenu dans le sous-domaine D1 de V_h ainsi que le domaine de fixation à l'actine (ABD) dans V_t . L'ADNc codant pour la vinculine V_{1ab4} a été synthétisé et sous-cloné dans le site NcoI de pET-3d par Genscript

avec une étiquette de 8 histidines (*His₈ tag*) en position C-terminale. Cette construction a été vérifiée par séquençage ([Wang et al., 2022](#)). La construction V_{1ab4} a été exprimée dans *Escherichia coli* BL21 comme décrit précédemment (voir III.1.2). Le culot bactérien contenant V_{1ab4} a été lysé par sonication dans un tampon de lyse (20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ benzamidine et 1 mM PMSF). La protéine a d'abord été purifiée par chromatographie d'affinité sur Ni-NTA (Ni²⁺-acide nitrilotriacétique)-sepharose.

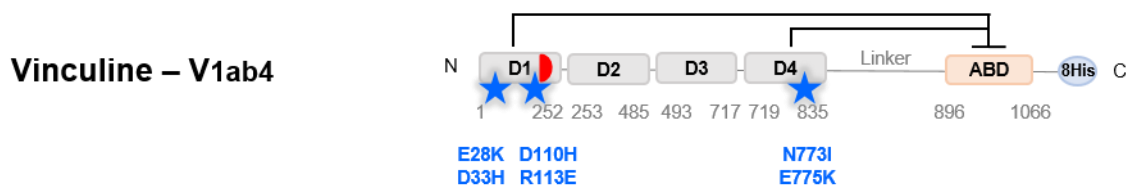


Figure 29. La construction de la vinculine utilisée dans cette étude.

V_h (tête de la vinculine), D1 à D4 (V_h), ABD (site de liaison à l'actine également appelé V_t ou queue de la vinculine), 8His (étiquette 8 histidines). Le domaine de fixation à l' α -caténine est indiqué en rouge. Les étoiles bleues représentent les mutations ponctuelles.

Après fixation de V_{1ab4}, la colonne Ni-NTA-sepharose a été lavée avec le tampon B (20 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol). La protéine a ensuite été éluée avec le tampon d'élué (20 mM Tris pH 8, 1 M NaCl, 250 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol, et dialysée avec 20 mM Tris pH 9, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA). La protéine V_{1ab4} a ensuite été fixée sur une colonne échangeuse d'ions Q-sépharose, lavée avec le tampon de lavage (20 mM Tris pH 9, 15 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA), et éluée avec un tampon d'élué (20 mM Tris pH 9, 250 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA). Finalement, la protéine a été dialysée dans le tampon de conservation (20 mM Tris pH 7.8, 0.1 mM EDTA), congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C.

III.1.4. VASP

La protéine VASP de *Dictyostelium* est une protéine dont l'activité d'élongation processive des filaments d'actine est beaucoup plus forte que celle de VASP humain. La protéine humaine est beaucoup moins processive ce qui se traduit par des temps de résidence au bout barbée des filaments très courts (*Hansen et Mullins, 2010; Breitsprecher et al., 2008, 2011*). Plusieurs études ont montré des résultats contradictoires sur le rôle de la profiline en tant que cofacteur de VASP, proposant qu'elle accélère l'élongation par VASP humain, alors qu'elle n'assiste pas le VASP de *Dictyostelium* (*Hansen et Mullins, 2010; Breitsprecher et al., 2008, 2011*). Il aurait été tentant d'utiliser le VASP de *Dictyostelium*, mais les protéines que nous utilisons par ailleurs sont humaines ou mammifères, c'est pourquoi nous avons utilisé une protéine recombinante VASP entière (FL) humaine dans cette étude (Figure 30).

L'ADNc codant pour VASP FL humain a été cloné dans un plasmide pGEX-6P1, avec une étiquette Glutathione-S-transférase (GST) clivable en position N-terminale. VASP-FL a été exprimé dans *Escherichia coli* BL21 comme décrit précédemment (voir III.1.2). Les extraits bactériens contenant la construction de VASP FL ont d'abord été déposés sur une colonne de Glutathion-sépharose dans un tampon contenant 50 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl. La colonne a ensuite été lavée dans le même tampon, puis incubée avec la protéase PreScission pour cliver la protéine de fusion GST-VASP et ainsi libérer VASP en solution. La protéine collectée a ensuite été dialysée dans son tampon de conservation (20 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT), congelée dans l'azote liquide et stockée à -80°C.

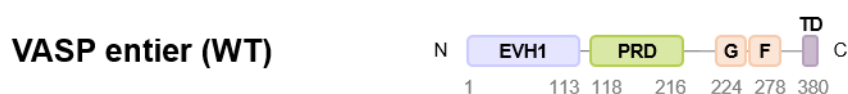


Figure 30. La construction de VASP utilisée dans cette étude.

EVH1 (Ena/VASP homology 1), PRD (domaine riche en proline), G (site de liaison à l'actine-G), F (site de liaison à l'actine-F), TD (domaine de tetramérisation).

III.2. ÉTUDE *IN VITRO* DE L'ASSEMBLAGE ET DE L'ORGANISATION DE L'ACTINE

Pour mesurer la vitesse de polymérisation et l'assemblage de l'actine en super-structures telles que des faisceaux ou des réseaux, il est utile de combiner plusieurs méthodes. Ces différentes méthodes peuvent être utilisées pour confirmer les résultats et parvenir à des conclusions plus solides ou pour identifier des résultats erronés dus à l'utilisation d'une méthode inadaptée. Une autre raison d'utiliser plusieurs méthodes est bien sûr qu'elles ne fournissent pas les mêmes informations. Enfin, d'un point de vue stratégique, certaines méthodes permettent de tester plus rapidement un grand nombre de conditions pour converger vers un résultat préliminaire intéressant, mais peu précis, qui pourra ensuite être exploré par une méthode plus sophistiquée. Dans notre cas, nous avons d'abord utilisé la spectroscopie de fluorescence pour mesurer des cinétiques de polymérisation d'actine pour passer au crible un grand nombre de conditions expérimentales en faisant varier les combinaisons de protéines, leur concentration ou la force ionique du milieu. Cette technique permet de mesurer 10 conditions à l'heure avec un temps d'analyse très court et de déterminer si les protéines affectent l'assemblage de l'actine ou pas. Cependant, il est difficile d'assigner un mécanisme avec certitude sur la seule base de ces analyses cinétiques. C'est pourquoi les conditions qui montraient un effet significatif sur la polymérisation ont été étudiées en microscopie de fluorescence TIRF. Cette approche permet d'observer et de quantifier l'allongement des filaments d'actine uniques en temps réel et de déterminer avec certitude le mécanisme par lequel les protéines ajoutées affectent leur polymérisation. Le temps d'analyse reste malheureusement une limitation. Nous avons également utilisé une autre méthode de spectroscopie pour mesurer la formation de super-structures d'actine par les protéines qui consiste à mesurer la diffusion de la lumière. Cette approche permet d'obtenir rapidement une information quantitative robuste sur la capacité des combinaisons de protéines testées à former des super-structures d'actine, sans toutefois pouvoir en déterminer l'organisation. Pour cela, les conditions qui indiquaient la présence de faisceaux ou de réseaux ont été directement étudiées en microscopie de fluorescence.

III.2.1. Mesure et analyse in vitro de la cinétique de polymérisation d'actine-pyrène par spectroscopie de fluorescence

III.2.1.1. Principe

Pour mesurer la cinétique de polymérisation de l'actine in vitro, nous avons utilisé l'actine marquée au pyrène décrite précédemment (III.1.1.). Le pyrène lié à la cystéine 374 est très sensible à son environnement. L'incorporation d'un monomère d'actine marqué au pyrène dans un filament augmente la fluorescence du pyrène de 20 fois environ (Figure 31). La cinétique de polymérisation de l'actine est donc simplement mesurée en suivant l'augmentation de l'intensité de fluorescence du pyrène lié à l'actine dans le temps ([Kouyama et Mihashi, 1981](#); [Cooper et al., 1983](#); [Doolittle et al., 2013](#)).

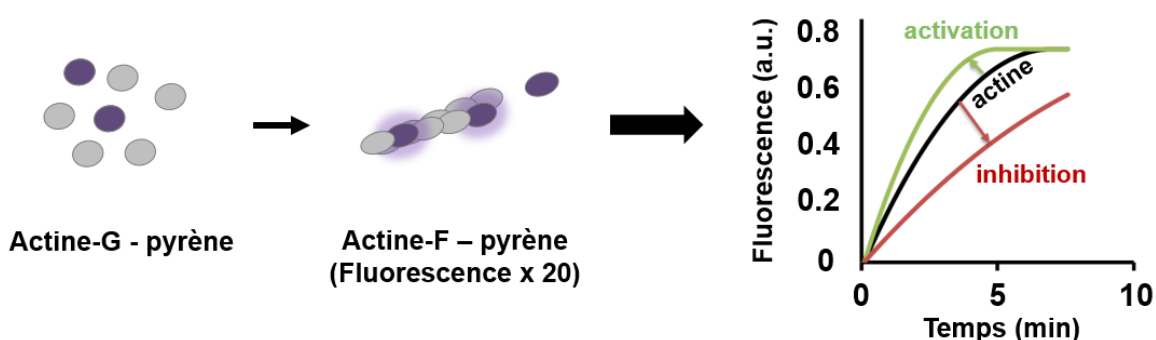


Figure 31. Principe de l'essai pour mesurer des cinétiques de polymérisation d'actine in vitro par spectroscopie de fluorescence.

L'actine-G monomérique a été marquée au pyrène. La polymérisation d'actine en solution a été suivie au cours du temps, en présence de KCl, $MgCl_2$, EGTA et les protéines d'intérêt. L'intensité de fluorescence du pyrène augmente avec la polymérisation de l'actine. Les cinétiques de polymérisation de l'actine sont mesurées par spectroscopie de fluorescence (fluorimétrie).

III.2.1.2. Considérations biochimiques et techniques et analyse des données

La polymérisation de l'actine, sous forme Ca-ATP-actine-G marquée à 10% au pyrène, a été induite en ajoutant une concentration de sel qui varie entre 25 et 100 mM KCl supplémentée par 1 mM $MgCl_2$ et 0.2 mM EGTA. Dans nos expériences de cinétiques,

la concentration totale de sel a parfois été diminuée à 25 mM KCl, ce qui est assez faible par rapport à la concentration reconnue comme physiologique de 100 mM KCl. Nous avons fait ce choix car certaines protéines de liaison à l'actine changent d'activité en fonction de la force ionique, comme la vinculine ([Le Clainche et al., 2010](#)) et VASP ([Laurent et al., 1999](#)), étudiés dans cette thèse, qui deviennent capables de nucléer des filaments d'actine à faible force ionique. L'analyse des cinétiques de polymérisation d'actine reflète souvent une combinaison de différents processus de nucléation et d'élongation des filaments d'actine. Pour mieux comprendre le mécanisme, une de ces activités a été éliminée ou favorisée en variant la force ionique de 25 mM à 100 mM KCl. Nous avons par exemple travaillé à 100 mM KCl dans certaines expériences pour supprimer la contribution de la nucléation par la vinculine et VASP et observer seulement leur effet sur l'élongation. En général, nous avons toujours inclus les conditions les plus physiologiques dans nos séries d'expériences et avons retenu ces résultats comme les plus pertinents. Une autre manière de rendre la nucléation négligeable est d'initier la réaction de polymérisation par des filaments préformés. Pour cela nous avons à notre disposition des amorces de spectrine-actine ajoutées à 100 pM dans la réaction. Ces amorces sont des petits filaments d'actine stabilisés par la spectrine extrait du cortex de globules rouges. Dans les cellules eucaryotes, la majorité de l'actine monomérique cytoplasmique est complexée avec la profiline. La profiline-actine constitue donc le principal réservoir pour la polymérisation ([Pollard et Borisy, 2003](#)). La profiline a donc été ajoutée dans nos réactions avec des concentrations respectant un rapport profiline/actine $\approx 6:1$ pour atteindre un taux de saturation de l'actine par la profiline important. La profiline empêche ainsi la nucléation spontanée et sert de co-facteur à VASP ([Hansen et Mullins, 2010](#)). La présence de la profiline rend donc nos conditions plus physiologiques et pertinentes.

En plus de ces considérations d'ordre biochimique, nous avons également fait certains choix pour l'acquisition, l'analyse et la présentation des données. L'intensité de fluorescence a été mesurée dans des cuvettes en quartz avec un intervalle de temps de 20s entre chaque mesure, et en utilisant un spectrofluorimètre Safa Xenius FLX (Safas, Monaco). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission choisies étaient respectivement de 366 nm et 407 nm. Les valeurs d'intensité de fluorescence collectées par le spectrofluorimètre ont été utilisées pour tracer les courbes de polymérisation en fonction du temps. La plupart des courbes ont été normalisées à 0 au temps t_0 en retranchant la valeur de fluorescence initiale qui correspond à la fluorescence faible de l'actine-pyrène monomérique. La quantification de la fraction d'élongation des bouts

barbés a été établie en calculant le rapport entre la vitesse initiale d'élongation en présence de la protéine d'intérêt et la vitesse initiale d'élongation de l'actine seule. Toutes les expériences de cinétiques ont été reproduites de deux à quatre fois avec les mêmes conclusions pour confirmer la reproductibilité du travail. Les triplicatas sont représentés sur la même graphique avec des points de différents couleurs qui montrent trois expériences indépendantes avec les mêmes conditions. Tous les graphiques ont été assemblés et analysés par Excel ou Kaleidagraph.

III.2.2. Mesure de la formation de faisceaux d'actine en diffusion de la lumière suivie d'une observation en microscopie à épifluorescence

Au niveau des JA, les filaments d'actine sont organisés en super-structures. Cette organisation spécifique est contrôlée par des protéines de liaison à l'actine. L'oligomérisation de ces protéines de liaison aux filaments d'actine et leur capacité à s'associer entre elles génèrent des complexes qui regroupent les filaments d'actine en super-structures qui peuvent être des réseaux en 3D ou des faisceaux. Les protéines étudiées dans cette thèse sont toutes des oligomères. L' α -caténine et la vinculine sont des dimères alors que VASP est un tétramère.

La capacité de nos protéines à former des faisceaux de filaments d'actine a d'abord été déterminée par des mesures de diffusion de la lumière pendant la polymérisation de l'actine en solution. Un spectrofluorimètre Safas Xenius FLX (Safas, Monaco) a été utilisé pour cela avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 400 nm. La réaction de polymérisation de l'actine a été induite en ajoutant 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂ et 0.2 mM EGTA à la solution d'actine-G (marquée à 2% d'Alexa-488 pour des observations parallèles en microscopie), en présence des protéines d'intérêt. L'augmentation de signal reflète la présence de grosses structures qu'on peut interpréter en première approximation comme des faisceaux d'actine. Cependant, la sensibilité des mesures de diffusion de la lumière est faible et ces mesures sont indirectes. C'est pourquoi nous avons observé en microscopie de fluorescence les faisceaux et les réseaux d'actine formés à l'issue des cinétiques de diffusion de la lumière.

Les cinétiques de diffusion de la lumière ont été assemblées et analysées par Excel ou Kaleidagraph. L'amplitude de la diffusion de la lumière a été mesurée au même

moment pour toutes les conditions, c'est-à-dire au temps où les réactions avaient atteint l'état d'équilibre dans la majorité des conditions. Les expériences ont été reproduites trois fois avec les mêmes conclusions. Les triplicatas sont représentés sur le même graphique avec des points de différents couleurs qui montrent trois expériences indépendantes avec les mêmes conditions. Les images en épifluorescence ont été acquises avec un microscope inversé Olympus IX71 équipé d'un objectif à immersion d'huile 60X (Olympus, 1.45 NA) et couplé à une camera EMCCD (Cascade, Photometrics). Les images ont été acquises par le programme MicroManager, puis assemblées avec le logiciel ImageJ.

III.2.3 Observation in vitro de filaments d'actine uniques en microscopie de fluorescence TIRF.

III.2.3.1. Principe et stratégie expérimentale

Pendant longtemps, il n'a pas été possible d'imager la croissance d'un seul filament d'actine en temps réel par microscopie de fluorescence car les conditions biochimiques nécessaires à une polymérisation raisonnablement rapide (environ 1 μ M d'actine) produisaient un enchevêtrement de nombreux filaments qui ne pouvaient être distingués. Une méthode apparue dans notre domaine au début des années 2000 a permis de contourner ce problème en observant uniquement les filaments qui se développent à la surface d'un échantillon. Cette méthode est la microscopie à fluorescence par réflexion interne totale (TIRFM), ou microscopie à ondes évanescentes, qui permet d'examiner une tranche très fine d'un échantillon (100-200 nm). Le principe de base de cette méthode est d'exciter la fluorescence à une très faible profondeur, près de l'interface verre/eau. Les molécules fluorescentes sont excitées par une onde évanescente qui est créée lorsque la lumière laser incidente à un angle critique est totalement réfléchi à cette interface.

III.2.3.2. Préparations des chambres et considérations techniques

Le protocole suivi dans ce travail est une modification des protocoles utilisés précédemment pour étudier l'activité de la vinculine ([Le Clainche et al., 2010](#)) et de la taline ([Ciobanasu et al., 2018](#)). Tout d'abord, les lamelles de verre (24 mm x 40 mm, Thermo Scientific/Menzel-Glaser) ont été lavées et soniquées dans de l'eau milliQ, de l'éthanol, puis de l'eau milliQ à nouveau. Après irradiation pendant 1 min aux UV profonds à 180nm (Ossila), les lamelles ont été incubées avec 0.1 mg.mL⁻¹ PLL-g-PEG (SuSoS) dissout dans 10 mM HEPES pH 7.4 pendant 1h à température ambiante (Figure 32). Les lamelles ont ensuite été lavées avec de l'eau milliQ et séchées à l'air comprimé. Une chambre, d'un volume de 50 à 70 μ L, a été assemblée en fixant la lamelle (côté passivé avec le PLL-PEG) sur une lame en verre (Super Frost, Thermo Scientific) à l'aide de fines bandes d'adhésif double-face.

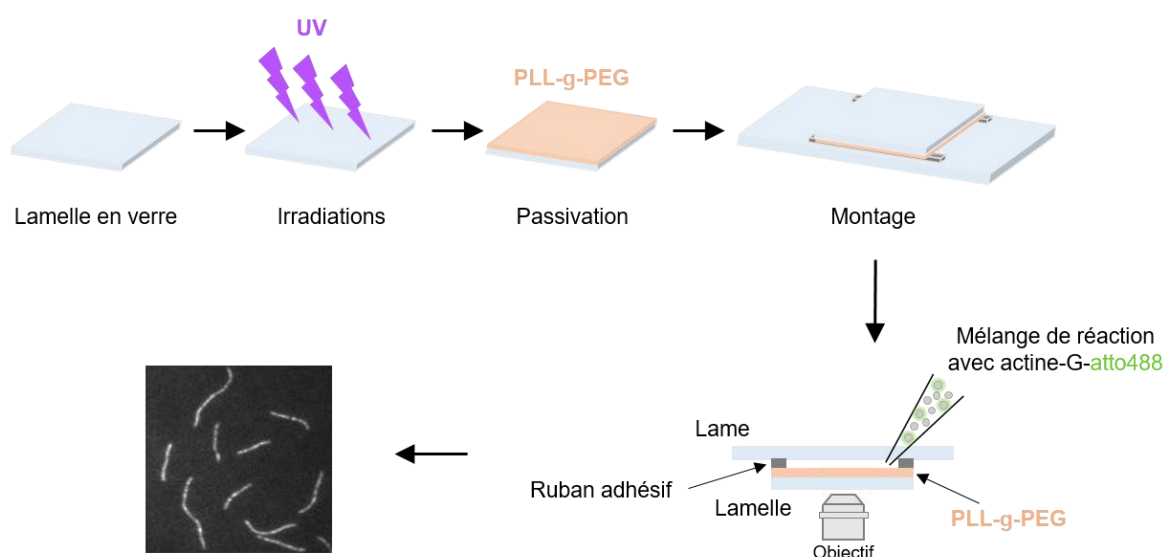


Figure 32. Illustration des étapes de préparation des chambres pour l'observation in vitro des filaments uniques d'actine en microscopie à fluorescence TIRF.

Après lavage dans de l'eau et de l'éthanol, les lamelles ont été irradiées aux UV puis passivées avec du PLL-g-PEG. Les chambres ont été montées en fixant chacune (côté passivé) sur une lame à l'aide des rubans adhésifs double-face. Le mélange d'actine-G marquée au atto-488 avec ou sans les protéines d'intérêt est ensuite injecté dans la chambre.

La chambre a été d'abord lavée avec le tampon de lavage (5 mM Tris pH 7.8, 200 μ M ATP, 1 mM DTT, 1 mM $MgCl_2$, 25 or 100 mM KCl) pendant 1 min, saturée avec 10% d'albumine de sérum bovin (BSA) pendant 5 min, et ensuite lavée avec le tampon de lavage à nouveau. La réaction de polymérisation a été induite en présence de 5 mM Tris pH 7.8, 200 μ M ATP, 0.4% méthyl-cellulose, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 100 mM KCl (or 25 mM KCl), 1 mM $MgCl_2$, 200 μ M EGTA, 20 mM DTT, 0.8 μ M actine-G (10% atto-488) supplémentés par nos protéines d'intérêt. Après injection de la réaction finale, la chambre a été fermée avec de l'huile ou un mélange de vaseline, lanoline et paraffine (VALAP).

Dans cette approche microscopique, les conditions expérimentales sont les plus proches possibles de celles utilisées précédemment dans les approches cinétiques pour permettre la comparaison. Cependant il faut garder à l'esprit que ces essais de microscopie, contrairement aux cinétiques en spectroscopie, sont réalisés en présence de méthylcellulose pour limiter le mouvement des filaments d'actine qui entraîne leur cassure. De plus, ce polymère, qui imite l'encombrement stérique des protéines dans les cellules, a un effet de coussin qui tend à confiner les filaments proches de la surface ce qui pourrait modifier la formation des faisceaux. Pour cette raison, nous n'avons pas quantifié les faisceaux observés en microscopie TIRF.

III.2.3.3. Observation microscopique et analyse des données

L'actine-atto488 a été excitée avec un laser de longueur d'onde 488nm. Des films de 10 min, avec des intervalles de temps de 10s, ont été acquis par MicroManager avec un microscope inversé Olympus IX71 équipé d'un objectif à immersion d'huile 60X (Olympus, 1.45 NA) et couplé à une camera EMCCD (Cascade, Photometrics). Les films ont été analysés en utilisant ImageJ. Des kymographes ont été obtenus à l'aide du plugin KymoToolBox dans ImageJ pour mesurer les vitesses d'élongation des filaments d'actine. Les expériences ont été répétées trois fois avec les mêmes conclusions. Les triplicatas sont représentés sur le même graphique avec des points de différents couleurs qui montrent trois expériences indépendantes avec les mêmes conditions. Tous les graphiques ont été assemblées et analysées par Excel ou Kaleidagraph.

IV. RÉSULTATS

ARTICLE 1: LES PROTÉINES DES JONCTIONS ADHÉRENTES α -CATÉNINE, VINCULINE ET VASP COOPÈRENT POUR FAVORISER L'ASSEMBLAGE DE L'ACTINE
Référence BiorXiv : <https://doi.org/10.1101/2022.12.04.518837> (SOUMIS)

La cohésion des tissus nécessite que les cellules établissent des contacts entre elles. Afin d'établir ce type d'adhésion, les cellules forment différentes extensions membranaires dont les lamellipodes. La dynamique et l'organisation de ces structures sont dépendantes du complexe Arp2/3 qui branche les filaments d'actine pour créer un réseau de filaments qui déforme la membrane. Les lamellipodes entrent en contact les uns avec les autres initiant ainsi la formation des jonctions adhérentes (JA) contenant des cadhérines. La maturation des JA implique des changements de l'architecture et de la dynamique d'assemblage de l'actine qui dépendent de la force exercée sur les complexes mécanosensibles formés par les protéines de liaison à l'actine des jonctions. Plusieurs études cellulaires ont montré que les protéines α -caténine, vinculine et VASP forment une chaîne d'interaction protéique qui relie les cadhérines au cytosquelette d'actine. La formation de cet assemblage protéique dépend de la force appliquée à l' α -caténine par le cytosquelette contractile d'actine et de myosine II. Lorsque ce complexe est formé, il induit la polymérisation de l'actine au niveau des JA. Cette activité nécessite que les trois protéines interagissent entre elles et avec l'actine. Le mécanisme par lequel ces trois protéines coopèrent pour induire l'assemblage de l'actine n'est cependant pas compris. En particulier, il est difficile de déterminer si ces protéines stimulent la formation de nouveaux filaments ou si elles accélèrent l'élongation de filaments existants ou les deux. Il existe des informations, issues d'études *in vitro*, sur les activités des trois protéines prises séparément. Ainsi la vinculine possède des activités de nucléation et de coiffe et promeut la formation de faisceaux d'actine, l' α -caténine coiffe les filaments et VASP stimule la nucléation, l'élongation et l'assemblage des filaments en faisceaux. Toutefois, l'activité du complexe ternaire α -caténine-vinculine-VASP n'a pas été étudiée en raison de la difficulté d'appliquer une force sur ce complexe *in vitro* pour induire sa formation.

L'objectif de ce travail était d'abord de comprendre l'activité de régulation de la polymérisation de l'actine et d'organisation spatiale des filaments qui résultent de

l'action coordonnée des protéines α -caténine, vinculine et VASP. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer comment ce complexe remodèle le réseau de filaments d'actine branché par Arp2/3. Pour cela nous avons combiné différentes approches *in vitro* comme la cinétique de polymérisation de l'actine en spectroscopie de fluorescence avec l'observation de filaments uniques d'actine en microscopie à fluorescence par réflexion interne totale (TIRFM).

Dans ce travail, nous avons d'abord purifié et mis au point l'utilisation de mutants de ces protéines qui peuvent interagir constitutivement, indépendamment de l'application d'une force. En particulier, nous avons utilisé une construction d' α -caténine appelée Δ mod, dans laquelle les domaines MII et MIII ont été supprimés, exposant ainsi le domaine de liaison à la vinculine (VBS) de manière constitutive. Nous avons également utilisé un mutant de vinculine appelé V_{1ab4} contenant six mutations ponctuelles dans le domaine V_h ce qui affaiblit son autoinhibition permettant son interaction avec le VBS de la construction Δ mod de l' α -caténine. Une fois ces mutants validés, nous avons étudié l'effet sur la polymérisation et l'organisation de l'actine de différentes combinaisons d' α -caténine, vinculine et VASP. Les variations de force ionique entre les conditions nous ont permis de découpler certaines activités comme la nucléation et l'élongation, ce qui s'est avéré précieux pour la compréhension des mécanismes. L'utilisation de la profiline était nécessaire car le complexe profiline-actine est considéré comme l'espèce polymérisante dans les cellules. En effet, cette protéine sature l'actine. La profiline est également un cofacteur de VASP.

À faible force ionique, l' α -caténine, la vinculine et VASP stimulent synergiquement l'assemblage de l'actine en absence et en présence de la profiline. L'étude cinétique dans des conditions favorables pour l'élongation des filaments d'actine (forte force ionique), qui rendent la nucléation spontanée négligeable, montre que ces trois protéines coopèrent pour stimuler l'élongation des bouts barbus en absence et en présence de la profiline. Comme l'interprétation des études cinétiques atteint inévitablement ses limites en présence de trois protéines et afin de confirmer les résultats de ces études, nous avons ensuite observé l'effet du complexe ternaire sur des filaments d'actine uniques en microscopie TIRF. Une augmentation de la densité des filaments est observée en présence des trois protéines combinées à faible et forte force ionique, ce qui indique un effet sur la nucléation. De plus, une quantification des vitesses d'élongation des filaments d'actine, à faible et forte force ionique, montre que lorsque l' α -caténine, la vinculine et VASP sont combinées la vitesse d'élongation des

filaments augmente de 2 à 3 fois par rapport à la vitesse d'élongation de l'actine seule. Cet effet est conservé en présence de profiline. En conséquence, nos observations directes en microscopie confirment les essais cinétiques en montrant que les trois protéines agissent en synergie pour nucléer les filaments d'actine et accélérer l'élongation de leur extrémité barbée en présence de la profiline.

Pour comprendre l'effet de ces protéines sur l'organisation des filaments d'actine nous avons utilisé des approches complémentaires. En effet, l'observation des filaments d'actine en microscopie TIRF révèlent une organisation spécifique des filaments d'actine en faisceaux en présence de l' α -caténine, la vinculine et VASP. Cependant, cette approche est peu appropriée pour une analyse rapide de la quantité de faisceaux d'actine formés. Pour cela, des cinétiques de diffusion de la lumière ont permis de démontrer que les trois protéines agissent d'une manière synergique pour lier les filaments en larges structures. Les observations directes des réactions de diffusion de la lumière en microscopie à épifluorescence ont confirmé la formation de ces faisceaux de filaments.

Enfin, pour étudier l'effet de ce complexe ternaire sur la formation des réseaux de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3, des cinétiques de polymérisation suivies d'observations des filaments d'actine en microscopie TIRF ont été menées. Nos résultats montrent que la formation du réseau branché de filaments par le complexe Arp2/3, activé par le domaine catalytique VCA de la protéine N-WASP, est inhibée par le complexe ternaire α -caténine-vinculine-VASP. Cet effet est accompagné par la formation de faisceaux de filaments d'actine au sein desquels l'élongation des filaments est accélérée.

En conclusion, ces résultats mettent en lumière les mécanismes moléculaires par lesquels les régulateurs de l'actine contrôlent en synergie la transition de l'architecture et de la dynamique de l'actine qui accompagne la formation et la maturation des AJ.

Dans cet article, j'ai réalisé et quantifié toutes les expériences présentées en utilisant les protéines que j'ai purifiées. J'ai également préparé les différentes figures du manuscrit. Hemalatha Narassimprakash a participé à la purification et au marquage de l'actine. Cet article est disponible dans *BioRxiv*, sous forme d'une pré-publication, et a été soumis pour publication à *eLife*.

**The adherens junction proteins α -catenin, vinculin and VASP
cooperate to promote actin assembly**

Rayan Said¹, Hong Wang¹, Julien Pernier¹, Hemalatha Narassimprakash¹,
Stéphane Roméro², Alexis M. Gautreau²,
René-Marc Mège³, Christophe Le Clainche^{1#}

¹ Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

² Laboratoire de Biologie Structurale de la Cellule, CNRS, Ecole Polytechnique, Institut Polytechnique de Paris, Palaiseau, France.

³ Université de Paris Cité, CNRS, Institut Jacques Monod, Paris, France.

To whom correspondence should be addressed:

christophe.leclainche@i2bc.paris-saclay.fr

Abstract

The cohesion of tissues requires that cells establish cell-cell junctions. Cells contact each other by forming Arp2/3-dependent lamellipodia before they initiate the formation of cadherin-based adherens junctions (AJs). Maturing AJs then assemble actin under force through the formation of a mechanosensitive complex comprising the actin-binding proteins α -catenin, vinculin and VASP, which individually act on the nucleation, elongation and organisation of actin filaments in different ways. However, the activity of the ternary complex that these actin-regulatory proteins form has not been investigated due to the difficulty of assembling this complex *in vitro* in the absence of force. Here, we first designed mutants of these proteins that interact independently of force. We then studied their activity by combining actin polymerization kinetics in fluorescence spectroscopy with observation of single actin filaments in TIRF microscopy. Our results reveal how α -catenin, vinculin and VASP combine their activities in a complex to inhibit Arp2/3-mediated branching, stimulate the nucleation and elongation of linear actin filaments from profilin-actin and crosslink these filaments into bundles. These findings shed light on the molecular mechanisms by which actin regulators synergistically control the transition of actin architecture and dynamics that accompanies the formation and maturation of AJs.

Introduction

The formation and dynamics of tissues during the development of multicellular organisms, their constant repair during wound healing and tissue regeneration, and their adaptation to mechanical perturbations in adults, require adaptative adhesion between cells. Among the cell-cell adhesion structures, cadherin-dependent adherens junctions (AJs) contribute significantly to tissue integrity and maintenance (Collins and Nelson, 2015; Guillot and Lecuit, 2013; Takeichi, 2014). Their action is not limited to passive adhesion since they also act as mechanosensors that trigger adaptation mechanisms to variations in the forces transmitted throughout tissues (Hoffman and Yap, 2015; Ladoux and Mège, 2017; Lecuit and Yap, 2015).

The formation of AJs requires cells to emit membrane protrusions, dependent on the formation of branched actin networks by the Arp2/3 complex, for their cadherins to make contact (Kovacs et al., 2002; Verma et al., 2004; Le Clainche and Carlier, 2008). Once formed, AJs mature into stable structures that assemble an actin network whose organization and dynamics is influenced by the tension that results from the recruitment of myosin II (Heuzé et al., 2019; Mège and Ishiyama, 2017). AJ repair also requires Arp2/3-dependent protrusive activity to bring neighbouring cell membranes together and promote cadherin binding (Li et al., 2021). Deciphering the molecular mechanisms that govern the transition between actin networks of different dynamics and architecture is key to understand the formation and permanent remodelling of AJs. However, the molecular mechanisms underlying actin dynamics associated to AJs is poorly understood.

Cadherins are coupled to the actin cytoskeleton via the interconnected proteins β -catenin, α -catenin, vinculin and VASP. α -catenin has a major structural and regulatory role since its N-terminal dimerization domain dissociates into a monomer that interacts with β -catenin, itself associated with the cytoplasmic domain of cadherins, its central part includes a vinculin binding domain (VBD), and the C-terminal actin-binding domain (ABD) binds to actin filaments (Kobielak and Fuchs, 2004). Along this force transmission pathway, the α -catenin-vinculin interaction is the main mechanosensitive switch that responds to myosin II activity. The actomyosin force transmitted to the ABD domain of α -catenin induces vinculin recruitment to AJs by releasing the autoinhibition of the VBD domain in α -catenin, leading to the reinforcement of AJs (le Duc et al., 2010; Seddiki et al., 2018; Thomas et al., 2013; Yonemura et al., 2010). Single-molecule experiments, using magnetic tweezers and AFM, showed that stretching the central fragment of α -catenin reveals a unique cryptic vinculin binding site (VBS) which reversibly binds vinculin at 5 pN (Yao et al., 2014; Maki et al., 2018). Although the binding of β -catenin to α -catenin breaks the α -catenin dimer and reduces its affinity for actin filaments in solution (Drees et al., 2005), subsequent manipulations of single molecules with optical tweezers and structural studies showed that β -catenin- α -catenin heterodimers bind actin under force through a catch bond with an optimum at a force of 5 pN (Buckley et al., 2014; Mei et al., 2020; Xu et al., 2020). Finally, the actin

regulator VASP interacts with a FPPPP motif in the proline-rich linker of vinculin (Brindle et al., 1996).

Several lines of evidence suggest that the proteins that link cadherins to actin, mentioned above, also regulate actin polymerization in a force-dependent manner. Indeed, the knock-downs of non-muscle myosin II isoforms (NMIIA and NMIIB) cause a decrease in the amount of junctional F-actin and barbed end density at AJs, suggesting the existence of an actin nucleation mechanism dependent on actomyosin tension (Leerberg et al., 2014). This activity involves the recruitment of vinculin to AJs through its force-dependent interaction with the vinculin binding site (VBS) of α -catenin. This mechanism also requires the binding of Mena/VASP to the FPPPP motif of the proline-rich linker of vinculin (Leerberg et al., 2014; Vasioukhin et al., 2000). These data suggest that the force-dependent formation of a ternary complex containing α -catenin, vinculin and VASP induces actin assembly through an unknown mechanism. At the molecular level, α -catenin, vinculin and VASP possess ABDs that act on actin polymerization and organisation in different ways. Vinculin, via its actin filament binding domain V_t , nucleates actin filaments capped at their barbed ends and bundles these filaments (Le Clainche et al., 2010). The bundling activity of vinculin requires the dimerization of V_t (Thompson et al., 2017). α -catenin possesses barbed end capping activity through its ABD domain (Hansen et al., 2013). Finally, tetrameric proteins of the VASP family cumulate nucleation, barbed end elongation, and bundling activities (Breitsprecher et al., 2011, 2008; Hansen and Mullins, 2010; Laurent et al., 1999).

The individual activities of the AJ proteins on actin polymerization detailed above do not allow to predict the relative importance of these proteins, nor the activity that results from their combination in AJ dynamics. Here, we used mutated versions of the proteins that interact constitutively without the action of a mechanical stimulus to reconstitute the α -catenin-vinculin-VASP complex and determined its activity by combining kinetic measurements in fluorescence spectroscopy with quantification of the polymerization and organisation of actin filaments by microscopy. Our results reveal the mechanism by which α -catenin, vinculin and VASP combine their activities to inhibit Arp2/3-mediated branching, enhance actin filament nucleation and barbed end growth from profilin-actin, and bundle these filaments.

Results

α -catenin, vinculin and VASP combine their activities to stimulate actin assembly in the presence of profilin.

To determine whether and how the machinery composed of the proteins α -catenin, vinculin and VASP regulates actin polymerization, we used purified recombinant proteins (Supplementary Figure 1). The formation of a complex containing these three proteins is not constitutive because, in α -catenin, the VBS is masked by the interaction of the M1 α -helix bundle that contains it with the adjacent α -helix bundles MII and

MMIII. Similarly, vinculin is auto-inhibited by a well-documented intramolecular interaction between vinculin head (Vh), which interacts with the VBS of several proteins including α -catenin, and vinculin tail (Vt), which interacts with actin filaments. We therefore used an α -catenin construct called Δ mod, deleted from the MII and MIII domains, that constitutively exposes the VBS domain (Seddiki et al., 2018). We also used a vinculin construct called V_{1ab4} containing point mutations in the Vh domain that weakens its autoinhibition, allowing its interaction with the VBS of α -catenin (Wang et al., 2022)(Supplementary Figure 1). As a first step, we determined the actin polymerization activity of these proteins by measuring the polymerization kinetics of pyrene-labelled actin in fluorescence spectroscopy (Figure 1). This method allows the detection of small variations and the rapid screening of multiple conditions before the direct observation of actin filaments in fluorescence microscopy. Because physicochemical conditions in the vicinity of a membrane vary due to ionic fluxes, enrichment with charged lipids such as PIP2, or molecular crowding with proteins of different charge, we varied the ionic strength conditions of the assays from 25 mM KCl to 100 mM KCl. Of the three proteins tested alone, only VASP had significant actin polymerization stimulating activity, while α -catenin (WT and Δ mod) and Vinculin V_{1ab4} showed little or no activity at 25 mM KCl (Figure 1A, B). The pairwise association of the proteins showed that V_{1ab4}, which is inactive alone, increased the activity of VASP at 25 mM KCl in a dose dependent manner (Figure 1A, B, C, Supplementary Figure 2A). Similarly, the combination of V_{1ab4} and Δ mod resulted in stimulation of actin assembly, which appeared to be the result of the exposure of the V_t domain of V_{1ab4} following its activation by Δ mod (Figure 1B, D, Supplementary Figure 2B). This hypothesis is supported by the fact that the activity was not observed with WT α -catenin, which does not bind vinculin (Figure 1A). The fact that VASP and α -catenin/ Δ mod, which are not known to interact directly, stimulated actin assembly in a synergistic manner was not expected, but suggests that these two ABPs cooperate when combined in the same protein complex. Finally, we observed the strongest stimulation of actin assembly in the presence of all three proteins (Figure 1A, B). Increasing ionic strength reduced the ability of the three proteins to stimulate actin assembly. The maximum effect was observed at 25 mM KCl, while the activity remained strong at 50 mM KCl, which is the ionic strength used in many studies, and little effect was observed at 100 mM KCl (Figure 1E, Supplementary Figure 2C).

Profilin is an essential protein in the mechanisms governing actin assembly in cells, as it is generally accepted that the majority of the polymerizable cytoplasmic actin pool is complexed to profilin. One of the main functions of profilin is to prevent spontaneous nucleation of actin in the cytoplasm so that it can be controlled in time and space by specific machineries. In addition, profilin serves as a co-factor for many actin regulatory proteins, including VASP or formins (Breitsprecher et al., 2008; Romero et al., 2004). In agreement, we observed here, in the presence of profilin, the strongest stimulation of actin assembly in the presence of all three proteins at 25 mM KCl (Figure 1F, G).

These experiments also confirmed that α -catenin Δ mod, with an exposed VBS, conferred more activity than α -catenin WT (Figure 1F, G). Profilin did not abolish the ability of V_{1ab4} to synergize with VASP and Δ mod (Figure 1H, I, Supplementary Figure 2D, E). Our data suggest that VASP is likely the protein that plays the most important role in inducing actin polymerization in the presence of profilin, as it alone possesses this activity, whereas the role of the other proteins seems to be to increase the activity of VASP (Figure 1F, G). Increasing the ionic strength in the presence of profilin also reduced the ability of all three proteins to stimulate actin polymerization. The maximum effect was observed at 25 mM KCl, remained strong at 50 mM KCl, and was greatly reduced at 100 mM KCl (Figure 1J, Supplementary Figure 2F).

As the kinetics of spontaneous actin assembly can reflect a concomitant stimulation of nucleation and elongation, we decided to uncouple these two activities by adding spectrin-actin seeds in our reactions, which boosts elongation and makes the spontaneous nucleation of actin a negligible parameter (Figure 2). To avoid the contribution of V_{1ab4} and VASP nucleation activities, which are favoured at low ionic strength, the experiments were performed only at 100 mM KCl. In these conditions, VASP effectively protected against the capping activity of V_{1ab4} and α -catenin (Figure 2A, C, Supplementary Figure 3A), but only modestly protected against the Δ mod capping activity (Figure 2B), suggesting that the absence of the MII-MIII domains in Δ mod leads to a better exposure of the C-terminal ABD of α -catenin that caps actin filament barbed ends. Surprisingly, when the three proteins were added together, they synergised to accelerate elongation at a rate that was greater than that of VASP alone. This observation suggests that VASP protects the barbed ends of actin filaments against the combined capping activity of V_{1ab4} and α -catenin/ Δ mod, but also that V_{1ab4} and α -catenin/ Δ mod assist VASP to increase the elongation of these actin filaments (Figure 2A, B). The surprising loss of influence of Δ mod capping activity in the presence of V_{1ab4} and VASP could result from a hierarchy between the activities, leading to V_{1ab4} imposing its activity on Δ mod. This would explain why Δ mod capping activity did not add to that of V_{1ab4} when the 2 proteins were together in the absence of VASP (Figure 2B). Importantly, in the presence of profilin, VASP, combined with V_{1ab4} and α -catenin/ Δ mod, also promoted barbed-end elongation (Figure 2D-F, Supplementary Figure 3B).

The stimulation of actin assembly by the combined action of α -catenin, vinculin and VASP results from an increase in both nucleation and barbed end elongation.

As the interpretation of kinetic studies of actin polymerization inevitably reaches its limits in the presence of three proteins that combine their individual activities, we observed their effect on single actin filaments in TIRF microscopy to confirm nucleation and barbed-end elongation activities. In this series of experiments, we used the

experimental conditions tested previously to determine the density of actin filaments, reflecting actin nucleation, and their elongation rate in the presence of V_{1ab4}, Δ mod and VASP, alone or in combination, at low (25 mM KCl) and high (100 mM KCl) ionic strength, with and without profilin. We first compared the density of filaments that form in the presence of these proteins over time. Although very few filaments were observed in the presence of the proteins alone, we observed an increase in the density of filaments when the three proteins were combined at both 25 mM and 100 mM KCl (Figure 3A, C, D, Supplementary movie 1, Supplementary movie 2), indicating an effect on nucleation. In the presence of the three proteins, the filaments were also longer, suggesting an effect on elongation (Figure 3A). We also observed, when the three proteins were combined, an increase in the density and length of actin filaments produced in the presence of profilin (Figure 3B, C, D, Supplementary movie 3, Supplementary movie 4).

From the same experiments, we also measured the elongation rate of the barbed ends of actin filaments (Figure 4). At low ionic strength (25 mM KCl), proteins alone moderately affected filament elongation positively or negatively (Figure 4C). However, their combination resulted in a 2-3 fold increase in the rate of actin filament barbed end elongation, which was a specific activity of the V_{1ab4}- Δ mod-VASP combination, as it did not correspond to the sum of the activities measured for the isolated proteins (Figure 4A, C). The addition of profilin, under the same low ionic strength conditions, allowed the combination of V_{1ab4}, Δ mod and VASP to accelerate actin filament elongation by up to a factor of 5 compared to the control with actin alone (Figure 4B, C). Observation of the details of single filament elongation revealed that it was regularly interrupted by marked pauses, reflecting capping events of the barbed ends by V_{1ab4} and Δ mod (Figure 4B). These events were rarely observed in the presence of the same combination of proteins without profilin (Figure 4A). At high ionic strength (100 mM KCl), the combination of V_{1ab4}, Δ mod and VASP also led to the acceleration of actin filament elongation in the absence and presence of profilin (Figure 4D, E). The detailed quantification of these experiments revealed that this elongation activity emerges from the combined action of V_{1ab4}, Δ mod and VASP and was not the simple sum of the inhibitions and activations observed for the proteins alone (Figure 4F).

Taken together, our direct observations in microscopy confirm the kinetic assays by showing that the three proteins synergize to nucleate actin filaments and accelerate the elongation of their barbed ends in the presence of profilin.

α -catenin, vinculin and VASP synergise to form actin filament bundles.

The TIRF microscopy observations presented above revealed the formation of actin filament bundles when all three proteins V_{1ab4}, Δ mod, and VASP were present, while no bundles were observed when actin filaments were grown alone (Figure 3A, B). To quantify this activity precisely, we combined kinetics of actin filament bundling measured by light scattering with fluorescence microscopy observations of the same

reactions (Figure 5). Light scattering kinetics showed that neither V_{1ab4} nor Δ mod alone induced bundle formation, whereas VASP showed low activity (Figure 5A-D). These experiments also revealed synergies between the protein pairs and the three proteins to form actin bundles (Figure 5A-D). Replacement of α -catenin with Δ mod, in which VBS is exposed, allowed for a higher bundling activity when combined with V_{1ab4} and VASP (Figure 5C, D), indicating that the α -catenin-vinculin complex contributes to actin filament crosslinking. Direct observation of the reactions in fluorescence microscopy confirmed the formation of sparse bundles by the proteins alone and larger bundles by the protein pairs and the combination of the three proteins (Figure 5E).

α -catenin, vinculin and VASP inhibit Arp2/3-mediated branching of actin filaments to promote their cross-linking into fast-growing bundles.

Early actin polymerization kinetics experiments showed that α -catenin inhibits the formation of branched actin networks by the Arp2/3 complex (Drees et al., 2005), while more recent studies showed that talin-activated vinculin reorganizes branched actin networks into bundles (Boujemaa-Paterski et al., 2020). These observations led us to test the effect of combinations of α -catenin, vinculin and VASP on the formation and organization of Arp2/3 dependent actin networks. Actin polymerization kinetics (Figure 6A), quantified by measuring the half-time of polymerization (Figure 6B), showed that Δ mod and vinculin V_{1ab4} alone inhibited the actin polymerization normally stimulated by the Arp2/3 complex in the presence of the VCA domain of N-WASP. In contrast, VASP alone had little effect on this reaction. The combination of Δ mod, V_{1ab4} and VASP stimulated actin polymerization in the presence of Arp2/3 and VCA at a level identical to that stimulated by these three proteins in the absence of Arp2/3 and VCA, suggesting that Δ Mod, V_{1ab4} and VASP imposed their combined activity to the branched reaction (Figure 6A, B). The direct observation of this reaction in TIRF microscopy revealed a progressive reorganization of the branched actin network by Δ mod, V_{1ab4} and VASP (Figure 6C, Supplementary movie 5). From a densely branched network of filaments in the presence of Arp2/3-VCA, the network became sparse and weakly branched in the presence of Δ mod, weakly branched and denser in the presence of Δ mod and V_{1ab4}, and densely populated with long, unbranched and strongly bundled filaments in the presence of Δ mod, V_{1ab4} and VASP (Figure 6C, Supplementary movie 5). Kymographs showed not only the transition from a branched to a bundled network, but also the acceleration of the growth of filaments that develop from the bundles (Figure 6D), recapitulating the actions of Δ mod, V_{1ab4} and VASP on the bundling and elongation of filaments.

Discussion

Our study shows how three proteins cooperate to adapt the architecture and dynamics of actin networks during the formation of adherens junctions (Figure 7A). Specifically,

we showed that α -catenin, vinculin and VASP combine their activities to inhibit Arp2/3-mediated branching, stimulate the nucleation and elongation of linear actin filaments from profilin-actin and crosslink these filaments into bundles (Figure 7B, C).

Isolated proteins have often been considered as functional entities and many studies have naturally sought to correlate their actin polymerization activities measured in vitro with actin dynamics observed in cells. In reality, many proteins are only parts of more complex machineries, as our study illustrates. Indeed, α -catenin was first described to cap actin filaments barbed ends (Hansen et al., 2013), while vinculin caps and nucleates filaments (Le Clainche et al., 2010), and VASP combines capping, nucleation and elongation activities (Breitsprecher et al., 2011, 2008; Hansen and Mullins, 2010; Laurent et al., 1999). Surprisingly we show here that the activity that results from their combination is not the sum of their individual activating and inhibiting activities. The mechanisms by which α -catenin, vinculin and VASP combine their activities to stimulate actin assembly seem to depend on the activities of VASP, such as nucleation and elongation which are enhanced by vinculin and α -catenin.

The mechanism of actin nucleation by VASP is not fully understood, but it can be hypothesised that the tetrameric state of this protein allows its monomeric actin binding domains (GABs) to bring actin monomers together to create an actin filament nucleus (Zimmermann et al., 2002; Chereau and Dominguez, 2006; Laurent et al., 1999; Ferron et al., 2007). It is possible that, in our in vitro assays, the formation of a complex, containing α -catenin dimers, vinculin dimers and VASP tetramers, results in complexes containing up to four VASP tetramers, further increasing the efficiency of actin nucleation. In cells, however, α -catenin forms heterodimers with β -catenin (Drees et al., 2005), preventing its homodimerization, and associates with a single vinculin dimer, which in turn associates with two VASP tetramers. This nucleation mechanism probably exists in cells because we observed it at different ionic strengths and in the presence of profilin.

The mechanism of actin filament barbed end elongation by VASP is well established as it requires the clustering of VASP tetramers, allowing the clusters of monomeric actin-binding domains (GABs) to feed actin monomers to the ends of filaments held by the actin-filament binding domains (FABs) (Breitsprecher et al., 2008, 2011; Brühmann et al., 2017). Bringing more VASP tetramers together through the formation of α -catenin-vinculin-VASP complexes is likely the reason for the increased elongation observed in our assays. In this process, VASP seems to protect the growing barbed ends from the capping activities of vinculin or α -catenin, as it protects against the action of the heterodimeric capping protein (CP) (Bear et al., 2002; Breitsprecher et al., 2008; Hansen and Mullins, 2010). However, our results cannot be explained by a simple competition between the three proteins for actin filament barbed ends since vinculin and α -catenin significantly increases the activity of VASP. Interestingly, the effect of vinculin and α -catenin, two bundling proteins, on VASP elongation activity is reminiscent of the effect of the bundling protein fascin on the elongation activity of the

Drosophila Ena protein, a member of the Ena/VASP proteins (Winkelman et al., 2014), suggesting a general mechanism of stimulation of VASP elongation activity by bundling proteins.

Finally, our biochemical study must be placed in the context of cell-cell junctions. In cells, the mechanism of junction formation involves actin polymerization, which has been proposed to promote lateral clustering of cadherins (Truong Quang et al., 2013), while the tensile force of actomyosin would strengthen the junctions (Yonemura et al., 2010). More recent studies in kidney epithelial cell sheets (MDCK cells) indicate that cadherin puncta observed in cells in fluorescence microscopy correspond to interdigitations of the plasma membrane (Li et al., 2021). These interdigitations are membrane protrusions whose formation requires actin polymerization under the control of the Arp2/3 complex, EVL and CRMP-1 (Li et al., 2020). Electron microscopy experiments revealed that two distinct actin network are associated to AJs; a juxtamembrane branched actin network and a perijunctional bundle of filaments parallel to the membrane (Efimova and Svitkina, 2018) (Figure 7A). Interestingly, junctional myosin isoforms have specific localization and functions, as NMIIA is associated with actin bundles to generate force, while NMIIB is associated with the branched network to promote force transmission (Heuzé et al., 2019). Other studies have shown that the α -catenin-vinculin-VASP complex induces the polymerization of actin filaments at AJs in response to the force generated by actomyosin (Leerberg et al., 2014). Our results suggest that, in response to actomyosin force, the branched actin network associated with AJs is also reorganized into bundles. Consistent with this hypothesis, NMIIB knock-down cells exhibit AJs that contain less open α -catenin and are associated with thicker Arp2/3-containing actin networks (Heuzé et al., 2019). However, to date there have been no comparative electron microscopy studies of the ultrastructure of actin networks associated with AJs subjected to increasing forces to test this hypothesis.

In addition to Arp2/3 and α -catenin-vinculin-VASP machineries, formins, such as Dia-1 and formin-1, known to promote the elongation of unbranched actin filaments (Romero et al., 2004), play a role in actin assembly at AJs (Acharya et al., 2017; Carramusa et al., 2007; Kobiela et al., 2004). Further studies are needed to understand the organization and dynamics of actin networks that result from coordination between the activities of Arp2/3, formins, α -catenin-vinculin-VASP, and the myosins NMIIA and NMIIB.

Materials and methods

cDNA constructs

α -catenin WT and Δ mod cDNA were cloned into a pDW363 plasmid with a C-terminal His₆ tag (Seddiki & al., 2017). cDNA encoding for vinculin E28K/D33H/D110H/R113E/N773I/E775K (V_{1ab4}) was synthesized and subcloned in the NcoI site of pET-3d by Genscript, with a C-terminal His₈ tag (Wang et al., 2022). The construct was verified by sequencing. The cDNA encoding for human full-length VASP was cloned into a pGEX-6P1 plasmid to produce a N-terminal cleavable Glutathione-S-transferase (GST)-fused VASP.

Protein purification

Rabbit skeletal muscle actin was purified from acetone powder (Wiesner, 2006). Cycles of polymerization and depolymerization were followed by dialysis in 5 mM Tris pH 7.8, 0.2 mM ATP, 0.1 mM CaCl₂, 0.01% NaN₃, 1 mM DTT, and gel filtration on a Superdex G-200 column (GE Healthcare). Actin was labelled with N-pyrenyliodoacetamide, and Alexa Fluor 488 (Invitrogen) or Atto 488 (Atto-TEC) Succinimidyl Ester as previously described (Ciobanasu et al., 2015). Arp2/3 and profilin were purified as previously described (Le Clainche and Carlier, 2004). Spectrin-actin seeds were prepared as previously described (Casella et al., 1986).

Expression of all the recombinant proteins in this study was performed with the same protocol. After plasmid transformation in *Escherichia coli* (BL21 DE3, Invitrogen), bacteria were grown in 3-6 liter of LB medium containing 0.1 mg.ml⁻¹ of appropriate antibiotics (ampicillin or kanamycin) at 37°C until the absorbance reached 0.6-0.8 at 600 nm. 1 mM of isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG) was added to the medium to induce the expression of the recombinant proteins of interest during 16h at 16°C. After centrifugation, the α -catenin WT, α -catenin Δ mod and VASP FL bacterial pellets were lysed by sonication in 20 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 μ g.ml⁻¹ benzamidine and 1 mM PMSF. The V_{1ab4} bacterial pellets were lysed by sonication in 20 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 μ g.ml⁻¹ benzamidine and 1 mM PMSF.

Lysates of His-tagged α -catenin WT and Δ mod were bound to Ni-NTA (Ni²⁺-nitrilotriacetic acid)-sepharose affinity chromatography (Qiagen), washed with 50 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol, eluted with 50 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, 1 mM β -mercaptoethanol, and purified on a gel filtration column (Superdex 200, 16/60, GE Healthcare). α -catenin constructs were finally dialyzed in 20 mM Tris pH 7.8, 150 mM KCl, 1 mM DTT, frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C.

V_{1ab4} was purified by Ni-NTA-sepharose affinity chromatography (Qiagen), followed by a Q-Sepharose ion exchange column. V_{1ab4} protein was finally dialyzed in 20 mM Tris pH 7.8, 1 mM DTT, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Human full-length VASP lysates were first bound to Glutathione Sepharose in 50 mM Tris pH 7.8, 500 mM NaCl, then cleaved from GST by Prescission protease. The protein was dialyzed in 20 mM Tris, 100 mM KCl, 1 mM DTT, frozen in liquid nitrogen and stored at - 80°C.

Actin polymerization assay

Actin polymerization was measured by the increasing in fluorescence of 10% pyrene-labelled actin. For barbed-end elongation measurements, 100 pM of spectrin-actin seeds were added to the reaction and actin polymerization was induced by adding 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 0.2 mM EGTA to a solution of 10% pyrene-labeled Ca-ATP-G-actin containing the proteins of interest. To test the nucleation activity of proteins, spontaneous polymerization was induced by adding 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 0.2 mM EGTA to a 10% pyrene-labeled Ca-ATP-G-actin solution in the presence of proteins of interest. Fluorescence measurements were carried out with a Safas Xenius FLX spectrophotometer (Safas, Monaco). The graphs and plots were assembled with Excel or Kaleidagraph. The experiments were reproduced 2 to 3 times with the same conclusions.

Light scattering measurements and microscopy observation of actin bundling

The actin filaments bundling during actin polymerization was examined by measuring the light scattering at 400 nm with a Safas Xenius FLX spectrophotometer (Safas, Monaco). Actin polymerization was induced by adding 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂ and 0.2 mM EGTA to a solution of 2% Alexa488-labeled-G-actin in the presence of the proteins of interest. A 5 µl sample was taken from the reaction after 1500 s for epifluorescence microscopy observation. The graphs and plots for light scattering kinetics were assembled with Excel or Kaleidagraph. For epifluorescence microscopy, the images were acquired with an Olympus IX71 inverted microscope equipped with a 60X oil immersion objective (Olympus, 1.45 NA) and coupled to an EMCCD camera (Cascade, Photometrics). Images were acquired with MicroManager and then assembled with ImageJ software. The experiments were reproduced 3 times with the same conclusions.

Observation of single actin filaments in TIRF microscopy

Our protocol is based on a modification of previously published methods (Ciobanasu et al., 2018; Le Clainche et al., 2010). After sonication with milliQ water and ethanol, the coverslips (24 mm x 40 mm, Thermo Scientific/Menzel-Glaser) were irradiated for 1 min under a deep UVs lamp (Ossila), and then incubated with 0.1 mg.ml⁻¹ PLL-g-PEG (SuSoS) dissolved in 10 mM HEPES pH 7.4 for 1 h at room temperature. The coverslips were then washed with milliQ water and dried. Flow chamber, with a typical volume of 50 - 70 µl, was created by sticking the PLL-PEG passivated side of the coverslip to a glass slide (Super Frost, Thermo Scientific) using a double-sided adhesive tape. After incubation with washing buffer (5 mM Tris pH 7.8, 200 µM ATP,

1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 25 or 100 mM KCl) for 1 min, the chamber was saturated with 10% bovine serum albumin (BSA) for 5 min, and then washed with washing buffer. A final reaction composed of 1.5 μM G-actin (10% Alexa Fluor or Atto 488-labeled) in 5 mM Tris pH 7.8, 200 μM ATP, 0.4% methylcellulose, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 100 mM KCl or 25 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 200 μM EGTA, 10 mM DTT supplemented with our proteins of interest, was injected in the chamber. The chamber was sealed with oil or VALAP (mix of vaseline, lanolin and paraffin), and then observed on an Olympus IX71 inverted microscope equipped with a 60X oil immersion objective (Olympus, 1.45 NA) and coupled to an EMCCD camera (Cascade, Photometrics). The time-lapse videos were acquired with MicroManager and analyzed by ImageJ. The plots were assembled with Excel or Kaleidagraph. All the experiments were reproduced 3 times with the same conclusions. Statistical analyses were carried out with a Mann-Whitney non parametric test in Microsoft Excel.

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche grants ANR-18-CE13-0026-01 RECAMECA to CLC, ANR-20-CE13-0016 MECOLLECT to CLC and AMG, ANR-21-CE13-0010-03 MYOCORTEX to CLC. HW is supported by a PhD fellowship from the China Scholarship Council (CSC). RS is supported by a PhD fellowship from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique. The present work has benefited from the Light Microscopy facility of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBiSA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Sciences” (ANR-10-LABX-0040-SPS). We thank the members of the “Cytoskeleton Dynamics and Motility” team for helpful discussions.

Reference

- Acharya BR, Wu SK, Lieu ZZ, Parton RG, Grill SW, Bershadsky AD, Gomez GA, Yap AS. 2017. Mammalian Diaphanous 1 Mediates a Pathway for E-cadherin to Stabilize Epithelial Barriers through Junctional Contractility. *Cell Reports* **18**:2854–2867. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.078
- 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**:509–521. doi:10.1016/S0092-8674(02)00731-6
- Boujemaa-Paterski R, Martins B, Eibauer M, Beales CT, Geiger B, Medalia O. 2020. Talin-activated vinculin interacts with branched actin networks to initiate bundles. *eLife* **9**:e53990. doi:10.7554/eLife.53990
- 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. doi:10.1038/emboj.2008.211
- 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: Actin-filament elongation by Ena/VASP. *The EMBO Journal* **30**:456–467. doi:10.1038/emboj.2010.348
- Brindle NPJ, Holt MR, Davies JE, Price CJ, Critchley DR. 1996. The focal-adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) binds to the proline-rich domain in vinculin. *Biochemical Journal* **318**:753–757. doi:10.1042/bj3180753
- Brühmann S, Ushakov DS, Winterhoff M, Dickinson RB, Curth U, Faix J. 2017. Distinct VASP tetramers synergize in the processive elongation of individual actin filaments from clustered arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**. doi:10.1073/pnas.1703145114
- Buckley CD, Tan J, Anderson KL, Hanein D, Volkmann N, Weis WI, Nelson WJ, Dunn AR. 2014. The minimal cadherin-catenin complex binds to actin filaments under force. *Science* **346**:1254211–1254211. doi:10.1126/science.1254211
- Carramusa L, Ballestrem C, Zilberman Y, Bershadsky AD. 2007. Mammalian diaphanous-related formin Dia1 controls the organization of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. *Journal of Cell Science* **120**:3870–3882. doi:10.1242/jcs.014365
- Casella JF, Maack DJ, Lin S. 1986. Purification and initial characterization of a protein from skeletal muscle that caps the barbed ends of actin filaments. *J Biol Chem* **261**:10915–10921.
- Chereau D, Dominguez R. 2006. Understanding the role of the G-actin-binding domain of Ena/VASP in actin assembly. *Journal of Structural Biology* **155**:195–201. doi:10.1016/j.jsb.2006.01.012
- Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. 2015. Reconstituting actomyosin-dependent mechanosensitive protein complexes in vitro. *Nat Protoc* **10**:75–89. doi:10.1038/nprot.2014.200
- Ciobanasu C, Wang H, Henriot V, Mathieu C, Fente A, Csillag S, Vigouroux C, Faivre B, Le Clainche C. 2018. Integrin-bound talin head inhibits actin filament barbed-end elongation. *Journal of Biological Chemistry* **293**:2586–2596. doi:10.1074/jbc.M117.808204

- Collins C, Nelson WJ. 2015. Running with neighbors: coordinating cell migration and cell–cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology* **36**:62–70. doi:10.1016/j.ceb.2015.07.004
- Drees F, Pokutta S, Yamada S, Nelson WJ, Weis WI. 2005. α -Catenin Is a Molecular Switch that Binds E-Cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly. *Cell* **123**:903–915. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021
- Efimova N, Svitkina TM. 2018. Branched actin networks push against each other at adherens junctions to maintain cell–cell adhesion. *Journal of Cell Biology* **217**:1827–1845. doi:10.1083/jcb.201708103
- 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. doi:10.1038/sj.emboj.7601874
- Guillot C, Lecuit T. 2013. Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis. *Science* **340**:1185–1189. doi:10.1126/science.1235249
- Hansen SD, Kwiatkowski AV, Ouyang C-Y, Liu H, Pokutta S, Watkins SC, Volkman N, Hanein D, Weis WI, Mullins RD, Nelson WJ. 2013. α E-catenin actin-binding domain alters actin filament conformation and regulates binding of nucleation and disassembly factors. *MBoC* **24**:3710–3720. doi:10.1091/mbc.e13-07-0388
- Hansen SD, Mullins RD. 2010. VASP is a processive actin polymerase that requires monomeric actin for barbed end association. *Journal of Cell Biology* **191**:571–584. doi:10.1083/jcb.201003014
- Heuzé ML, Sankara Narayana GHN, D’Alessandro J, Cellerin V, Dang T, Williams DS, Van Hest JC, Marcq P, Mège R-M, Ladoux B. 2019. Myosin II isoforms play distinct roles in adherens junction biogenesis. *eLife* **8**:e46599. doi:10.7554/eLife.46599
- Hoffman BD, Yap AS. 2015. Towards a Dynamic Understanding of Cadherin-Based Mechanobiology. *Trends in Cell Biology* **25**:803–814. doi:10.1016/j.tcb.2015.09.008
- Kobielak A, Fuchs E. 2004. α -catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:614–625. doi:10.1038/nrm1433
- Kobielak A, Pasolli HA, Fuchs E. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol* **6**:21–30. doi:10.1038/ncb1075
- Kovacs EM, Goodwin M, Ali RG, Paterson AD, Yap AS. 2002. Cadherin-Directed Actin Assembly. *Current Biology* **12**:379–382. doi:10.1016/S0960-9822(02)00661-9
- Ladoux B, Mège R-M. 2017. Mechanobiology of collective cell behaviours. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**:743–757. doi:10.1038/nrm.2017.98
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe 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*. *Journal of Cell Biology* **144**:1245–1258. doi:10.1083/jcb.144.6.1245
- Le Clainche C, Carlier M. 2004. Actin-Based Motility Assay. *CP Cell Biology* **24**. doi:10.1002/0471143030.cb1207s24
- Le Clainche C, Carlier M-F. 2008. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiological Reviews* **88**:489–513.

doi:10.1152/physrev.00021.2007

Le Clainche C, Dwivedi SP, Didry D, Carlier M-F. 2010. Vinculin Is a Dually Regulated Actin Filament Barbed End-capping and Side-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* **285**:23420–23432. doi:10.1074/jbc.M110.102830

le Duc Q, Shi Q, Blonk I, Sonnenberg A, Wang N, Leckband D, de Rooij J. 2010. Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II–dependent manner. *Journal of Cell Biology* **189**:1107–1115. doi:10.1083/jcb.201001149

Lecuit T, Yap AS. 2015. E-cadherin junctions as active mechanical integrators in tissue dynamics. *Nat Cell Biol* **17**:533–539. doi:10.1038/ncb3136

Leerberg JM, Gomez GA, Verma S, Moussa EJ, Wu SK, Priya R, Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA, Yap AS. 2014. Tension-Sensitive Actin Assembly Supports Contractility at the Epithelial Zonula Adherens. *Current Biology* **24**:1689–1699. doi:10.1016/j.cub.2014.06.028

Li JXH, Tang VW, Boateng KA, Brieher WM. 2021. Cadherin puncta are interdigitated dynamic actin protrusions necessary for stable cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **118**:e2023510118. doi:10.1073/pnas.2023510118

Li JXH, Tang VW, Brieher WM. 2020. Actin protrusions push at apical junctions to maintain E-cadherin adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**:432–438. doi:10.1073/pnas.1908654117

Maki K, Han S-W, Hirano Y, Yonemura S, Hakoshima T, Adachi T. 2018. Real-time TIRF observation of vinculin recruitment to stretched α -catenin by AFM. *Sci Rep* **8**:1575. doi:10.1038/s41598-018-20115-8

Mège RM, Ishiyama N. 2017. Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**:a028738. doi:10.1101/cshperspect.a028738

Mei L, Espinosa de los Reyes S, Reynolds MJ, Leicher R, Liu S, Alushin GM. 2020. Molecular mechanism for direct actin force-sensing by α -catenin. *eLife* **9**:e62514. doi:10.7554/eLife.62514

Romero S, Le Clainche C, Didry D, Egile C, Pantaloni D, Carlier M-F. 2004. Formin Is a Processive Motor that Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis. *Cell* **119**:419–429. doi:10.1016/j.cell.2004.09.039

Seddiki R, Narayana GHNS, Strale P-O, Balcioglu HE, Peyret G, Yao M, Le AP, Teck Lim C, Yan J, Ladoux B, Mège RM. 2018. Force-dependent binding of vinculin to α -catenin regulates cell–cell contact stability and collective cell behavior. *MBoC* **29**:380–388. doi:10.1091/mbc.E17-04-0231

Takeichi M. 2014. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**:397–410. doi:10.1038/nrm3802

Thomas WA, Boscher C, Chu Y-S, Cuvelier D, Martinez-Rico C, Seddiki R, Heysch J, Ladoux B, Thiery JP, Mege R-M, Dufour S. 2013. α -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-cadherin-based Adhesion Strength. *Journal of Biological Chemistry* **288**:4957–4969. doi:10.1074/jbc.M112.403774

Thompson PM, Ramachandran S, Case LB, Tolbert CE, Tandon A, Pershad M, Dokholyan NV, Waterman CM, Campbell SL. 2017. A Structural Model for Vinculin Insertion into PIP2-Containing Membranes and the Effect of Insertion on Vinculin

- Activation and Localization. *Structure* **25**:264–275. doi:10.1016/j.str.2016.12.002
- Truong Quang B-A, Mani M, Markova O, Lecuit T, Lenne P-F. 2013. Principles of E-Cadherin Supramolecular Organization In Vivo. *Current Biology* **23**:2197–2207. doi:10.1016/j.cub.2013.09.015
- Vasioukhin V, Bauer C, Yin M, Fuchs E. 2000. Directed Actin Polymerization Is the Driving Force for Epithelial Cell–Cell Adhesion. *Cell* **100**:209–219. doi:10.1016/S0092-8674(00)81559-7
- Verma S, Shewan AM, Scott JA, Helwani FM, Elzen NR den, Miki H, Takenawa T, Yap AS. 2004. Arp2/3 Activity Is Necessary for Efficient Formation of E-cadherin Adhesive Contacts. *Journal of Biological Chemistry* **279**:34062–34070. doi:10.1074/jbc.M404814200
- Wang H, Vigouroux C, Said R, Henriot V, Pernier J, Le Clainche C. 2022. Talin and vinculin combine their activities to trigger actin assembly (preprint). *Biochemistry*. doi:10.1101/2022.12.01.518757
- Wiesner S. 2006. Purification of Skeletal Muscle Actin *Cell Biology*. Elsevier. pp. 173–175. doi:10.1016/B978-012164730-8/50097-6
- Winkelman JD, Bilancia CG, Peifer M, Kovar DR. 2014. Ena/VASP Enabled is a highly processive actin polymerase tailored to self-assemble parallel-bundled F-actin networks with Fascin. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**:4121–4126. doi:10.1073/pnas.1322093111
- Xu X-P, Pokutta S, Torres M, Swift MF, Hanein D, Volkmann N, Weis WI. 2020. Structural basis of α E-catenin–F-actin catch bond behavior. *eLife* **9**:e60878. doi:10.7554/eLife.60878
- Yao M, Qiu W, Liu R, Efremov AK, Cong P, Seddiki R, Payre M, Lim CT, Ladoux B, Mège R-M, Yan J. 2014. Force-dependent conformational switch of α -catenin controls vinculin binding. *Nat Commun* **5**:4525. doi:10.1038/ncomms5525
- Yonemura S, Wada Y, Watanabe T, Nagafuchi A, Shibata M. 2010. α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nat Cell Biol* **12**:533–542. doi:10.1038/ncb2055
- Zimmermann J, Labudde D, Jarchau T, Walter U, Oschkinat H, Ball LJ. 2002. Relaxation, Equilibrium Oligomerization, and Molecular Symmetry of the VASP (336–380) EVH2 Tetramer. *Biochemistry* **41**:11143–11151. doi:10.1021/bi020379x

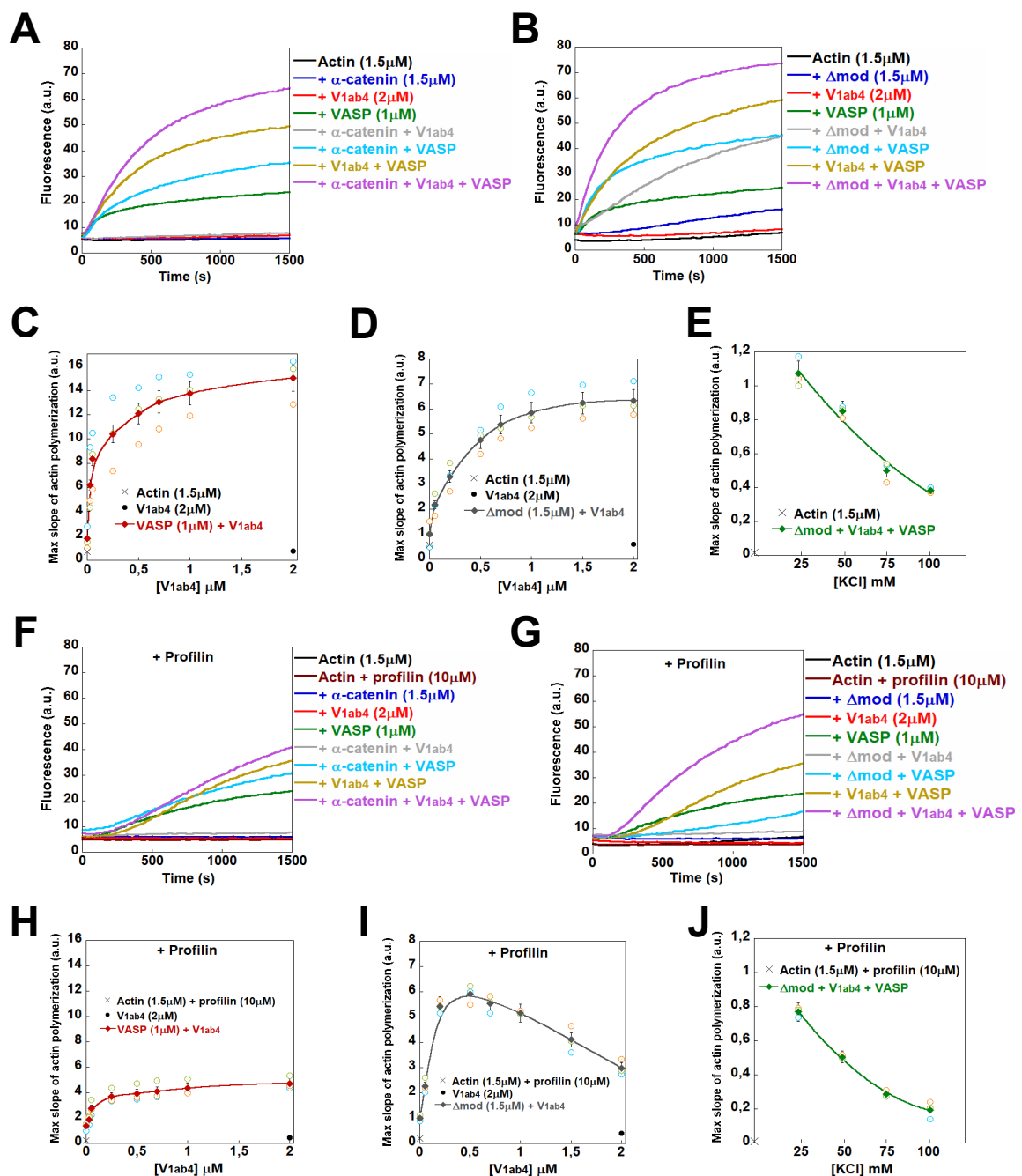


Figure 1. α -catenin, vinculin and VASP cooperate to stimulate actin polymerization in the presence of profilin. (A,B) Spontaneous nucleation of 1.5 μ M G-actin (10% pyrene-labeled) was measured in the presence of the indicated combinations of 1.5 μ M α -catenin, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (A), or 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (B) in a low salt buffer (25 mM KCl). (C, D) The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) is plotted as a function of increasing concentrations of V_{1ab4} in the presence of 1 μ M VASP (C) or 1.5 μ M Δ mod (D). (E) The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) is plotted against increasing concentrations of KCl in the presence of 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP. (F,G) Spontaneous nucleation of 1.5 μ M G-actin (10% pyrene-labeled) was measured in the presence of 10 μ M profilin and the indicated combinations of 1.5 μ M α -catenin, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (F), or 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (G), in a low salt buffer (25 mM KCl). (H, I) The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) is plotted as a function of increasing concentrations of vinculin V_{1ab4} in the presence of 10 μ M profilin and 1 μ M VASP (H) or 10 μ M profilin and 1.5 μ M Δ mod (I). (J) The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrenyl-labeled) is plotted against increasing concentrations of KCl in the presence of 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP and 10 μ M profilin. These experiments were performed three times with the same conclusions. Open symbols with different colors represent three independent experiments in the same conditions, and closed symbols indicate the average of the triplicates. Error bars represent $\pm$ SEM (n=3).

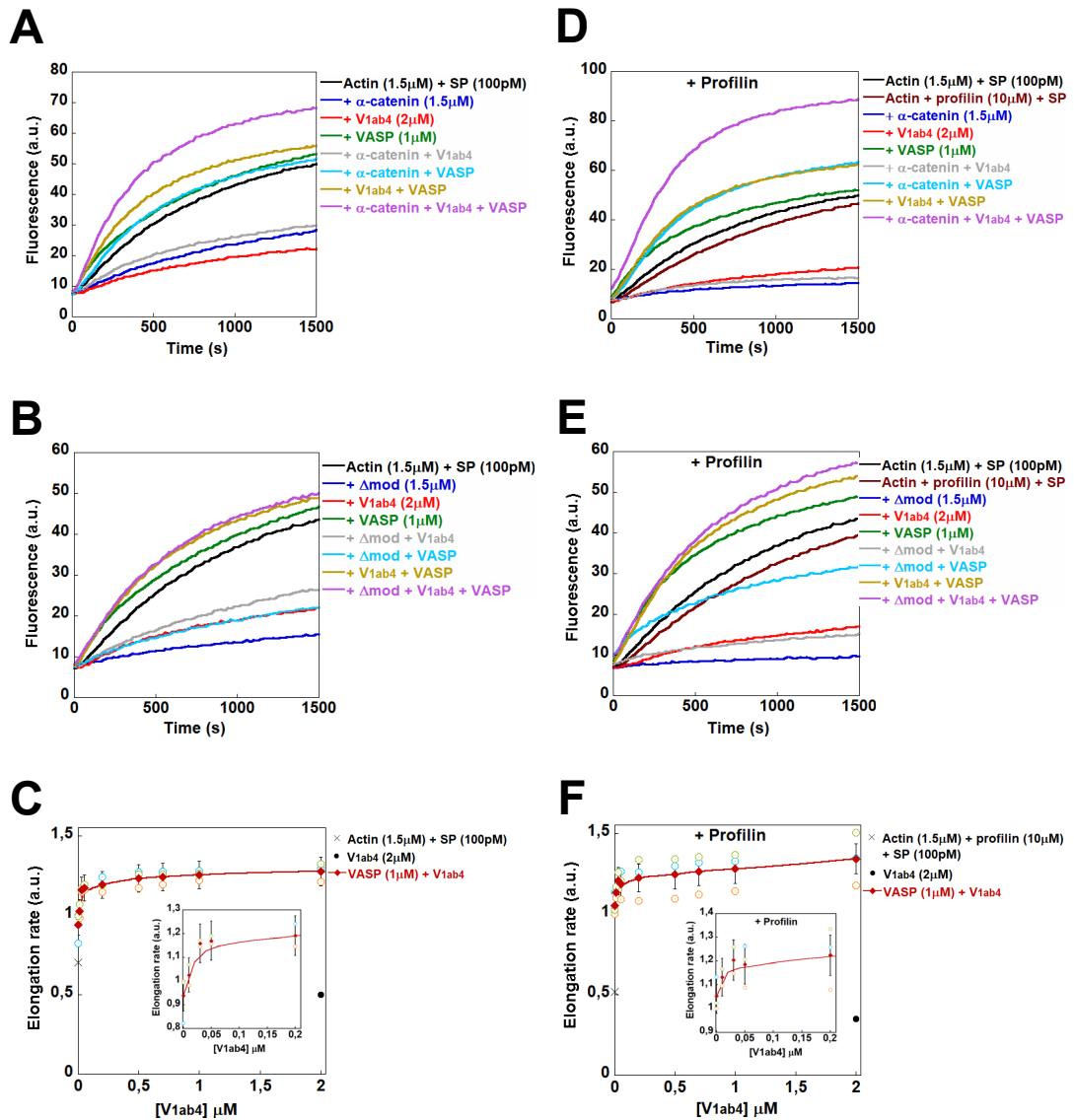


Figure 2. α -catenin, vinculin and VASP synergize to promote barbed-end elongation in the presence of profilin. (A,B) Barbed end elongation was measured in the presence of 100 pM spectrin-actin seeds (SP), 1.5 μ M G-actin (10% pyrene-labeled) and the indicated combinations of 1.5 μ M α -catenin, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (A) or 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (B) in a high salt buffer (100 mM KCl). (C) Barbed end elongation was measured in the presence of 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μ M G-actin (10% pyrene-labeled), 1 μ M VASP, and increasing concentrations of V_{1ab4} in a high salt buffer (100 mM KCl). The fraction of barbed end elongation was then calculated as the ratio between the elongation rate in the presence of the indicated proteins and the elongation rate of actin alone. (D,E) Barbed end elongation was measured in the presence of 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μ M G-actin (10% pyrene-labeled) in the presence of 10 μ M profilin and the indicated combinations of 1.5 μ M α -catenin, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (D), or 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} , 1 μ M VASP (E), in a high salt buffer (100 mM KCl). (F) Barbed end elongation was measured in the presence of 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μ M G-actin (10% pyrenyl-labeled), 1 μ M VASP and 10 μ M profilin, and increasing concentrations of V_{1ab4} . The fraction of barbed end elongation was then calculated as the ratio between the elongation rate in the presence of the indicated proteins and the elongation rate of actin alone. These experiments were performed three times with the same conclusions. Open symbols with different colors represent three independent experiments in the same conditions, and closed symbols indicate the average of the triplicates. Error bars represent $\pm$ SEM (n=3).

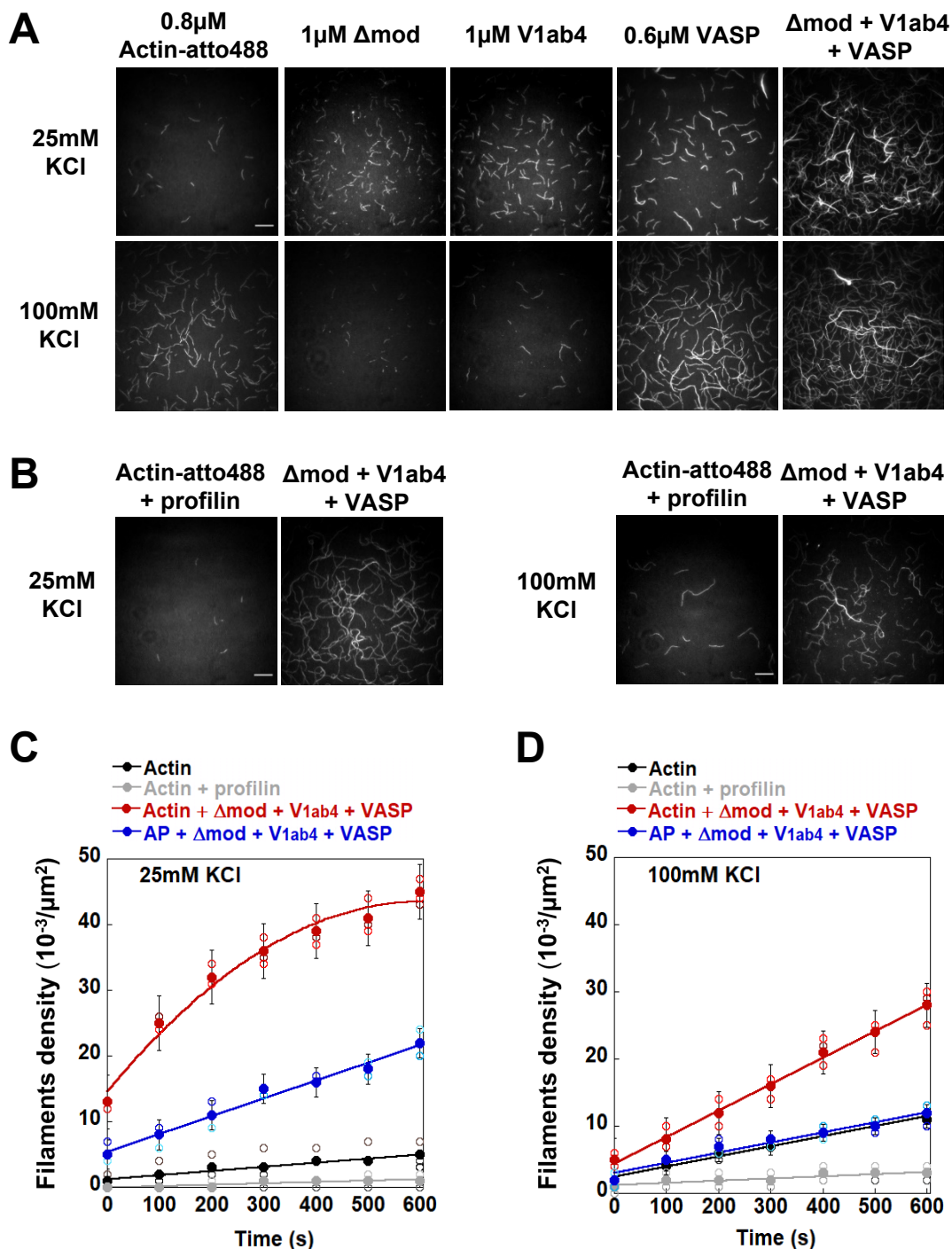


Figure 3. Direct observation of single actin filaments in TIRF microscopy in the presence of Δ mod, V_{1ab4} and VASP. (A) Single actin filaments observed in TIRF microscopy in the presence of 0.8 μ M actin (10% Atto488-labelled) alone and supplemented with the indicated combinations of 1 μ M Δ mod, 1 μ M V_{1ab4} and 0.6 μ M VASP, in low salt (25 mM KCl) or high salt (100 mM KCl). See supplementary movies 1 and 2. (B) Single actin filaments observed in TIRF microscopy in the presence of 0.8 μ M actin (10% Atto488-labelled) and 5 μ M profilin, and supplemented with the indicated combinations of 1 μ M Δ mod, 1 μ M V_{1ab4} and 0.6 μ M VASP, in low salt (25 mM KCl) or high salt (100 mM KCl). See supplementary movies 3 and 4. Each image represents a complete field. (A,B) Scale bar = 15 μ m. (C,D) Quantification of filament density as a function of time from the experiments shown in (A,B) at 25 mM KCl (C) and 100 mM KCl (D). In (C) and (D) AP stands for actin + profilin. These experiments were performed three times with the same conditions. Open symbols with different colors represent three independent experiments in the same conditions, and closed symbols indicate the average of the triplicates. Error bars represent $\pm$ SEM (n=3). Images were acquired in 590 s.

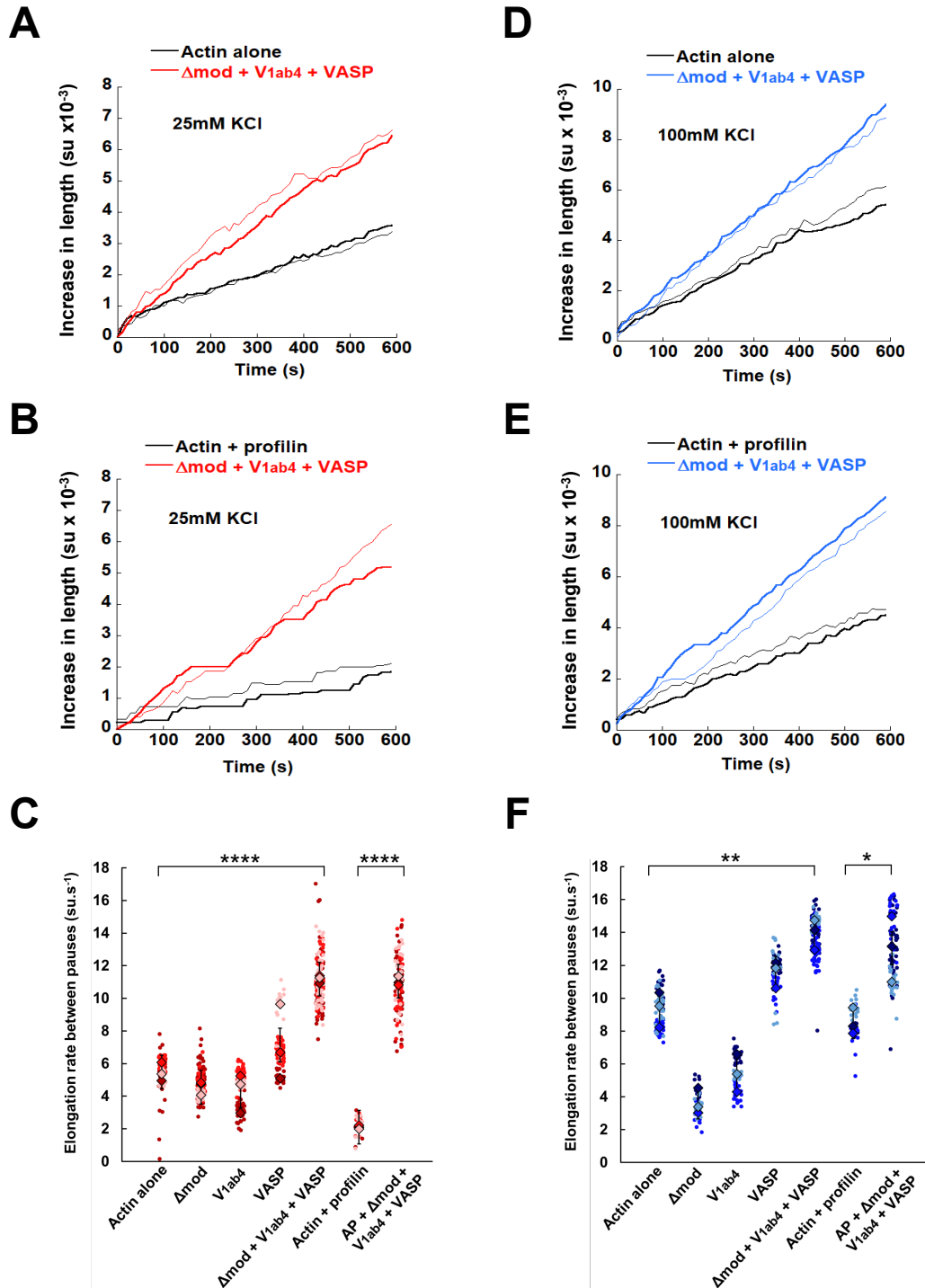


Figure 4. Stimulation of actin filaments elongation by α -catenin, vinculin and VASP. (A,B) Traces corresponding to the elongation of two filaments under the indicated conditions (from Figure 3A) in low salt conditions (25 mM KCl) in the absence (A) or presence of profilin (B). (C) Quantification of the elongation rate of the barbed end of filaments between pauses under the indicated conditions at 25 mM KCl. (D,E) Traces corresponding to the elongation of two filaments under the indicated conditions (from Figure 3B) in high salt conditions (100mM KCl) in the absence (D) or presence of profilin (E). (F) Quantification of the elongation rate of the barbed end of filaments between pauses under the indicated conditions at 100 mM KCl. (A,B,D,E) The two traces with same color represent two filaments from two independent experiments in the same conditions. (C,F) Closed circle symbols with three different colors represent filaments elongation rate from three independent experiments in the same conditions. The mean of each independent experiment is represented by diamond symbols of three different colors. Error bars represent $\pm$ SEM (n=3). A significant difference was found using a two-tailed *t*-test comparing the mean values. ****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

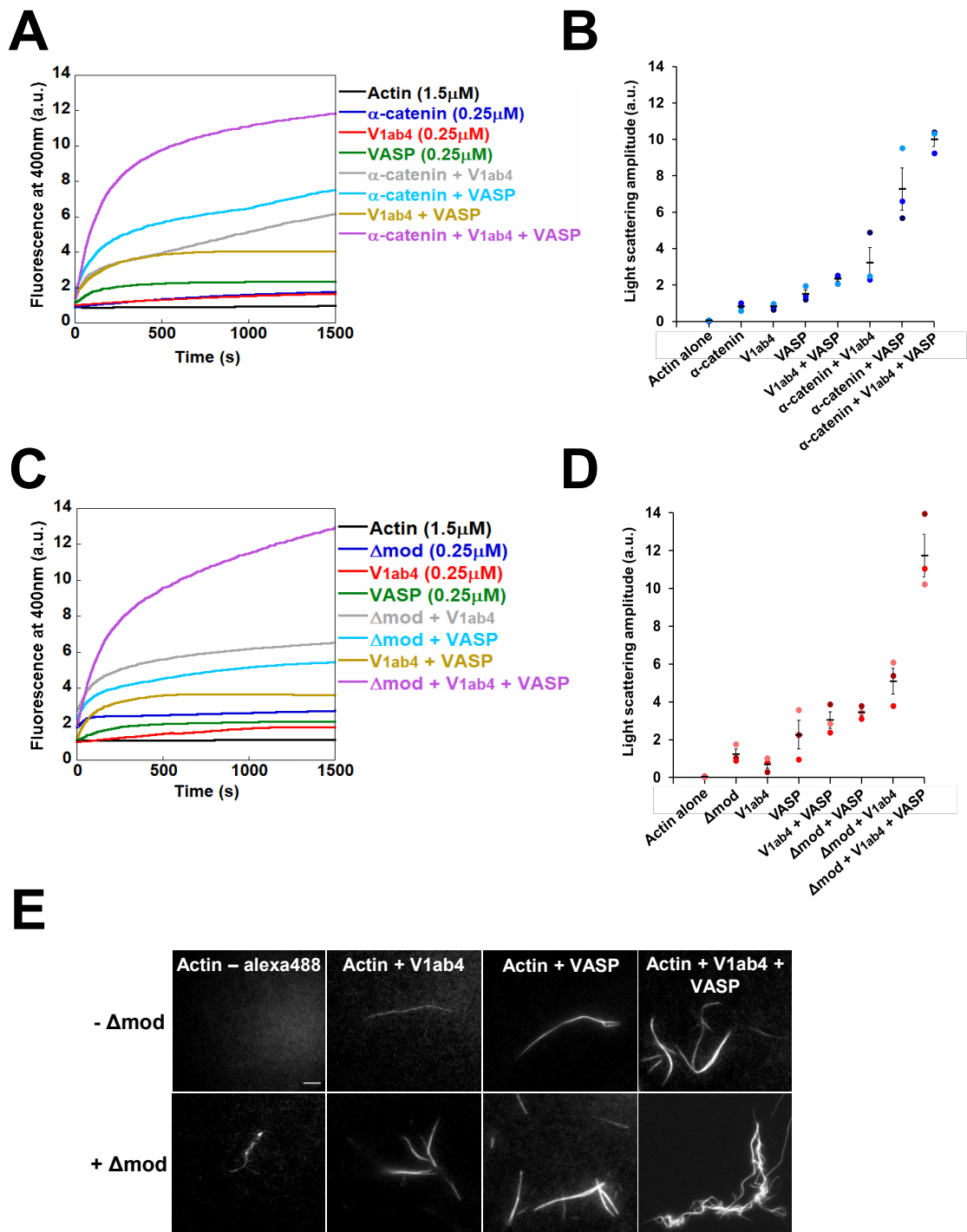


Figure 5. α -catenin, vinculin and VASP bundle actin filaments synergistically. (A) Light scattering was measured during the polymerization of actin alone (1.5 μ M G-actin), and in the presence of all the combinations of 0.25 μ M α -catenin WT, 0.25 μ M V_{1ab4} and 0.25 μ M VASP, in low salt (25 mM KCl). (B) Quantification of light scattering amplitude at 1500 s for each conditions indicated in (A). (C) Light scattering was measured during the polymerization of actin alone (1.5 μ M G-actin), and in the presence of all the combinations of 0.25 μ M α -catenin Δ mod, 0.25 μ M V_{1ab4} and 0.25 μ M VASP, in low salt (25 mM KCl). (D) Quantification of light scattering amplitude at 1500 s for each conditions indicated in (C). (A-D) These experiments were performed three times with the same conditions. (B, D) Symbols with different colors represent three independent experiments. Error bars represent $\pm$ SEM (n=3). (E) Representative epifluorescence images of Alexa-488 actin filament bundles observed alone and in the presence of all the combinations of Δ mod, V_{1ab4} and VASP. Conditions: 1.5 μ M G-actin (2% Alexa-488-labeled), 0.25 μ M Δ mod, 0.25 μ M V_{1ab4} and 0.25 μ M VASP. Scale bar = 15 μ m.

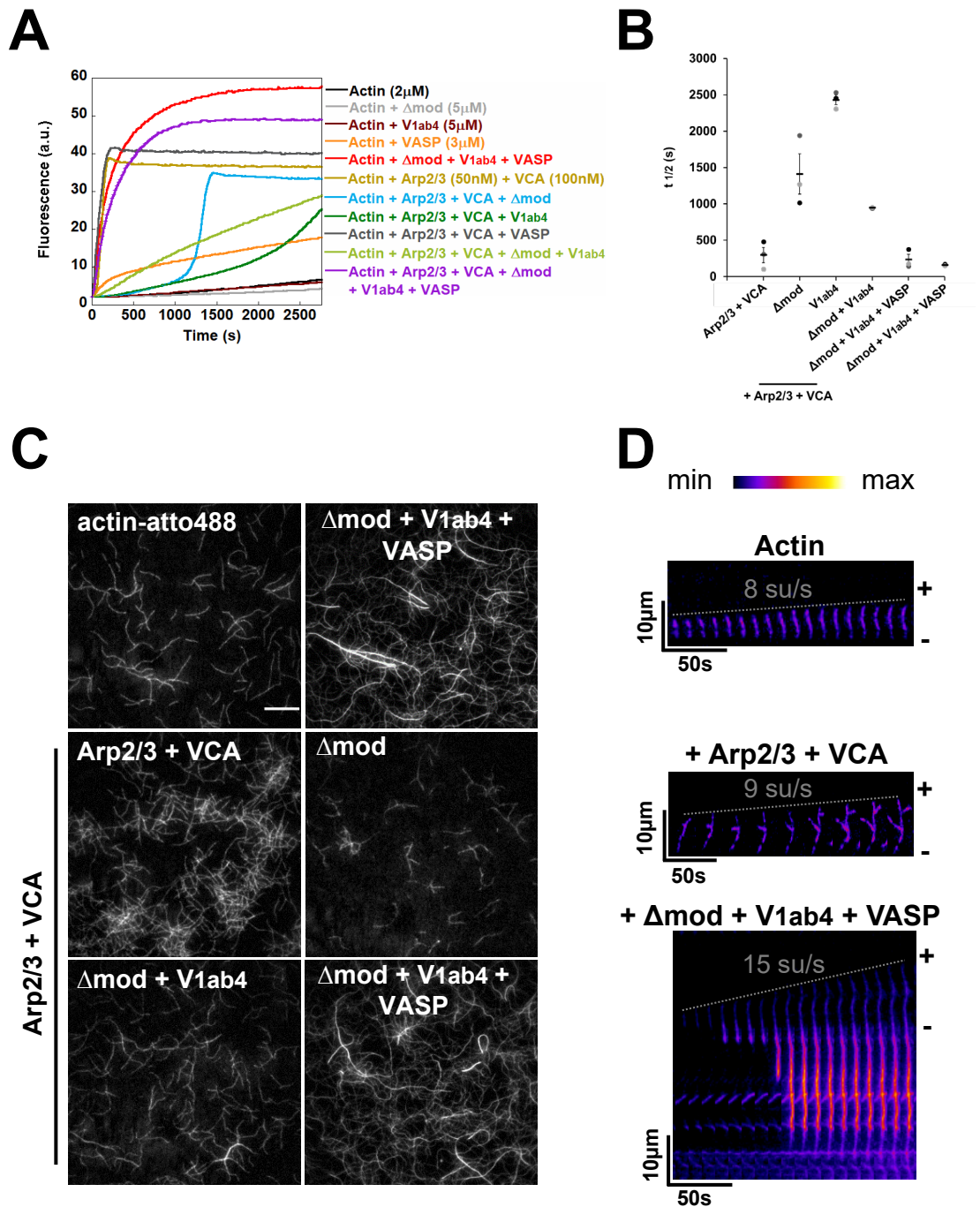


Figure 6. Remodeling of Arp2/3-mediated branched actin into fast-growing bundles by α -catenin, vinculin and VASP. (A) Kinetics of actin polymerization were measured in the presence of 2 μ M G-actin (10% pyrene-labelled), 50 nM Arp2/3, 100 nM VCA, 5 μ M Δ mod, 5 μ M V_{1ab4} and 3 μ M VASP, in conditions that allow nucleation and elongation (50 mM KCl). (B) Quantification of the polymerization half-time ($t_{1/2}$) for conditions indicated in (A). These experiments were performed three times with the same conclusions. Symbols with different colors represent three independent experiments. Error bars represent $\pm$ SEM ($n=3$). (C) TIRF microscopy observation of the transition from actin filaments branching to bundling in the presence of 0.8 μ M actin (10% Atto488-labelled), supplemented with the indicated combinations of 50 nM Arp2/3, 100 nM VCA, 1 μ M Δ mod, 1 μ M V_{1ab4} and 0.6 μ M VASP. The images show the reaction at 590 s. See supplementary movie 5. Scale bar = 15 μ m. (D) Kymographs from (C) showing the elongation of a single actin filaments (top), actin filament branching in the presence of Arp2/3 + VCA (elongation rate $\sim$ 9 su/s) (middle), and bundling in the presence of Arp2/3 + VCA supplemented with Δ mod, V_{1ab4} and VASP (elongation rate $\sim$ 15su/s) (bottom). (-) pointed end, (+) barbed end.

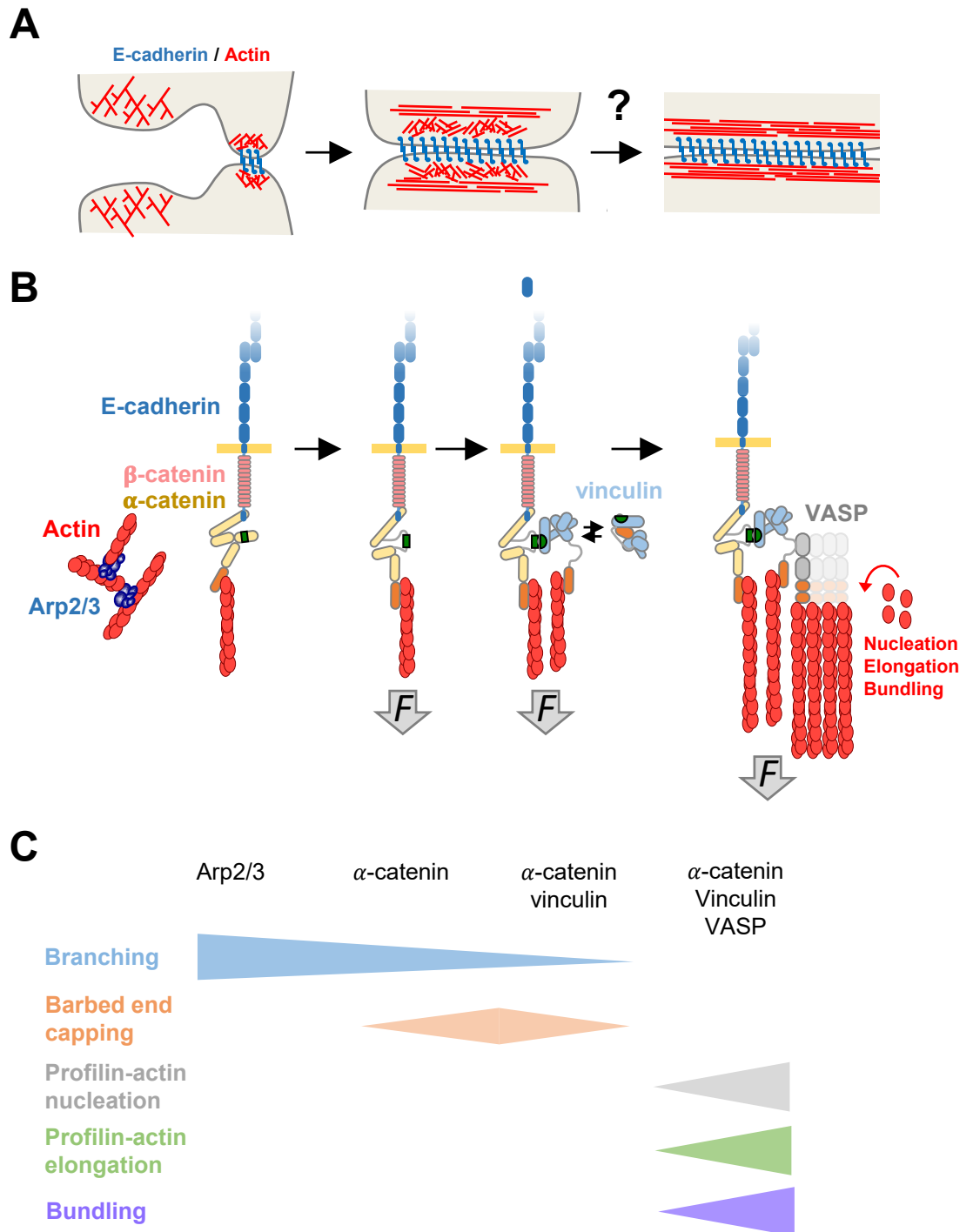
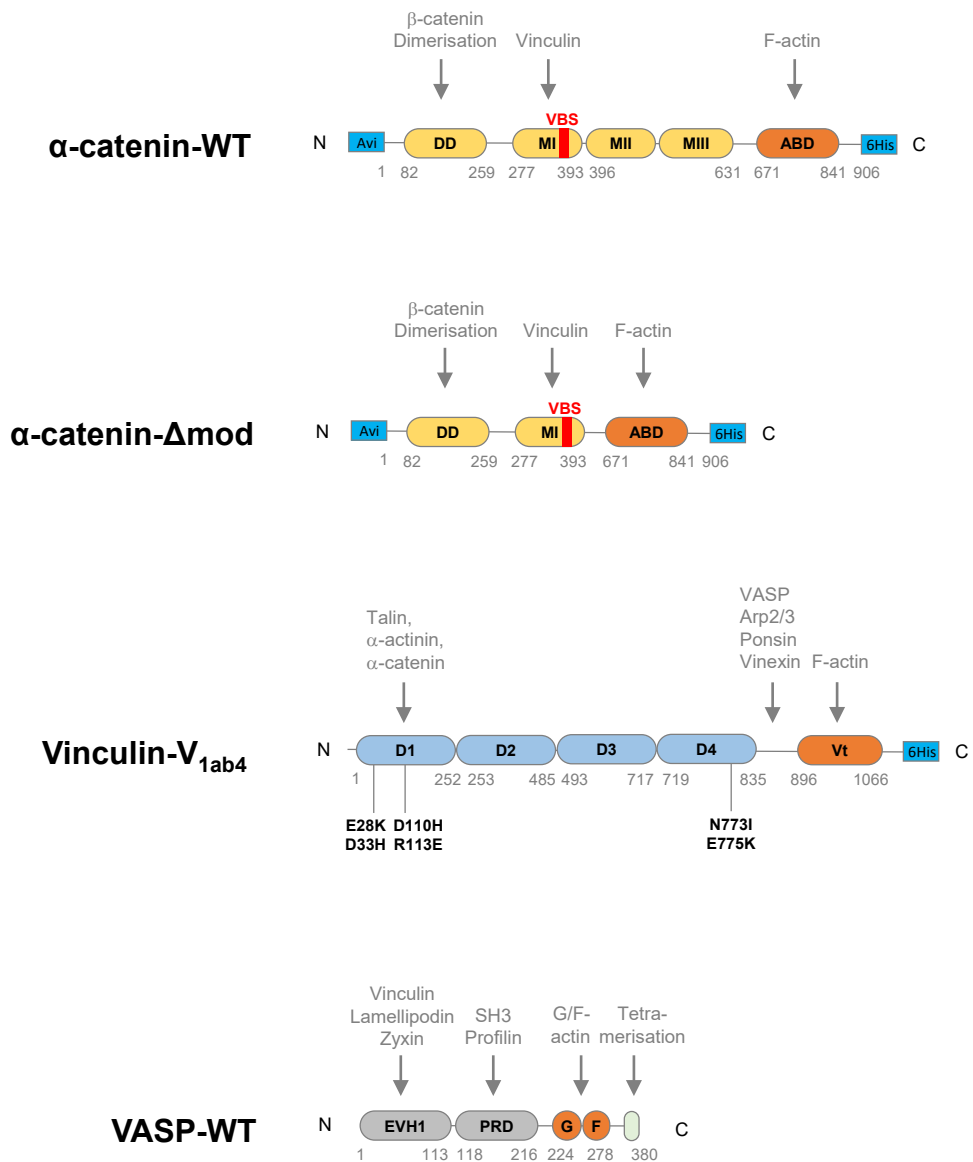


Figure 7. Mechanism by which α -catenin, vinculin and VASP regulate actin assembly during cell-cell junction formation. (A) Transition from nascent to mature adherens junctions. (B,C) Regulation of actin assembly associated to cadherin-based cell-cell adhesions. (C) The color code correspond to the activities mentioned on the left side.

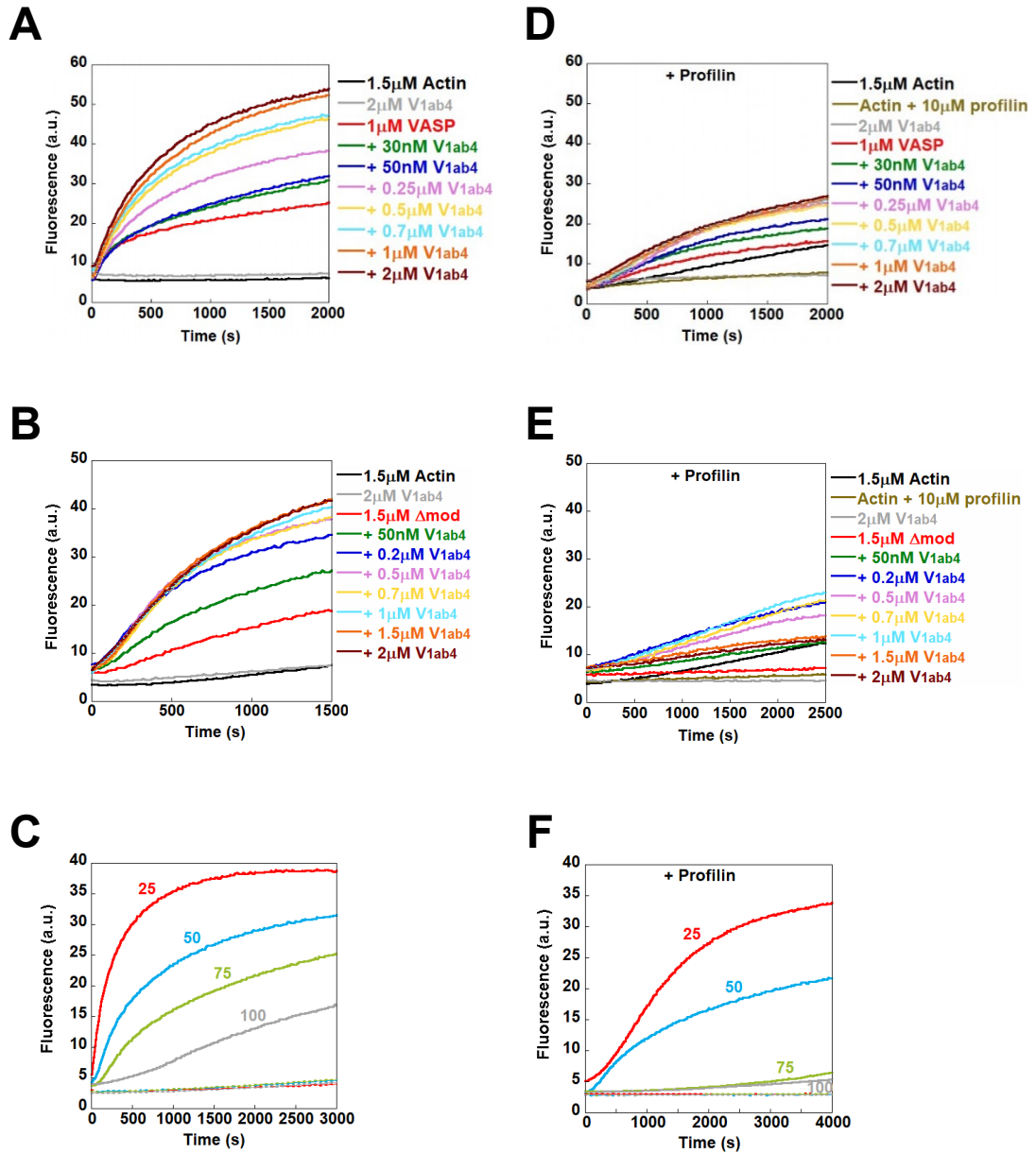
The adherens junction proteins α -catenin, vinculin and VASP cooperate to promote actin assembly.

Said et al.

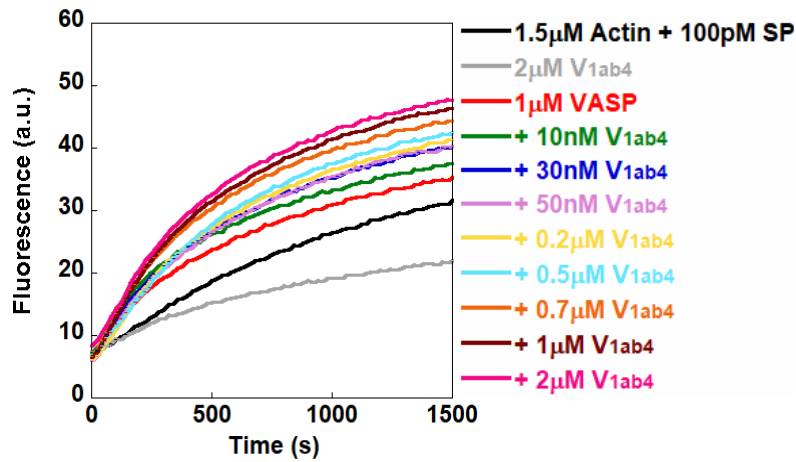
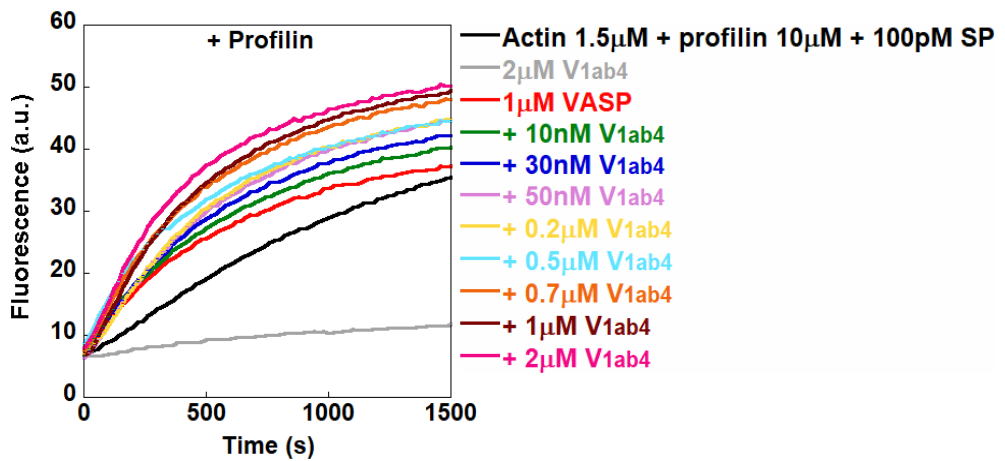
Supplementary Figures.



Supplementary Figure 1. Schematic representation of proteins constructs used in this study. DD, dimerization domain; MI-MII-MIII, modulator domain; ABD, actin binding domain (orange); VBS, vinculin binding site (red); Vt, vinculin tail; EVH1, Ena/VASP homology domain 1; PRD, proline-rich domain; E28K/D33H, D110H/R113E, N773I/E775K, point mutations in vinculin-V_{1ab4} mutant. Proteins partners shown in gray can link to the corresponding domain of each protein of interest.



Supplementary Figure 2. Vinculin V_{1ab4} synergizes with α -catenin Δ mod or VASP to stimulate actin polymerization. (A,B) Spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) was measured in the presence of increasing concentrations of V_{1ab4} in the presence of 1 μ M VASP (A) or 1.5 μ M Δ mod (B). (C) Spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) was measured in the presence of increasing concentrations of KCl in the presence of 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} and 1 μ M VASP. (D,E) Spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) was measured in the presence of 10 μ M profilin and increasing concentrations of V_{1ab4} in the presence of 1 μ M VASP (D) or 1.5 μ M Δ mod (E). (F) Spontaneous actin polymerization (1.5 μ M G-actin, 10% pyrene-labeled) was measured in the presence of increasing concentrations of KCl, 10 μ M profilin, 1.5 μ M Δ mod, 2 μ M V_{1ab4} and 1 μ M VASP. The dashed lines in (C) and (F) correspond to the control with actin alone at 25, 50, 70 and 100 mM KCl.

A**B**

Supplementary Figure 3. Elongation of actin filament barbed ends by VASP in the presence of V_{1ab4} . (A,B) The elongation of actin filament barbed ends was measured in the presence of 100 pM spectrin-actin seeds (SP), 1.5 μ M G-actin (10% pyrene-labeled), 1 μ M VASP, and increasing concentration of V_{1ab4} in the absence (A) or the presence of 10 μ M profilin (B).

Legends of supplementary movies

Supplementary Movie 1. Observation of the α -catenin-vinculin-VASP activity on single actin filaments in TIRF microscopy at 25 mM KCl.

Conditions: 0.8 μ M G-actin (10% atto 488-labeled) in fluorescence buffer (5 mM Tris pH7.8, 200 μ M ATP, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 0.4% methylcellulose, 25 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 200 μ M EGTA, 20 mM DTT), supplemented with 1 μ M Δ mod or 1 μ M V_{1ab4} or 0.6 μ M VASP or the combination of the three proteins together. Scale bar = 15 μ m.

Supplementary Movie 2. Observation of the α -catenin-vinculin-VASP activity on single actin filaments in TIRF microscopy at 100 mM KCl.

Conditions: 0.8 μ M G-actin (10% atto 488-labeled) in fluorescence buffer (5 mM Tris pH7.8, 200 μ M ATP, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 0.4% methylcellulose, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 200 μ M EGTA, 20 mM DTT), supplemented with 1 μ M Δ mod or 1 μ M V_{1ab4} or 0.6 μ M VASP or the combination of the three proteins together. Scale bar = 15 μ m.

Supplementary Movie 3. Observation of the α -catenin-vinculin-VASP activity on single actin filaments in TIRF microscopy in the presence of profilin, at 25 mM KCl.

Conditions: 0.8 μ M G-actin (10% atto 488-labeled) in fluorescence buffer (5 mM Tris pH7.8, 200 μ M ATP, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 0.4% methylcellulose, 25 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 200 μ M EGTA, 20 mM DTT), supplemented with 5 μ M profilin alone and in the presence of 1 μ M Δ mod, 1 μ M V_{1ab4} and 0.6 μ M VASP. Scale bar = 15 μ m.

Supplementary Movie 4. Observation of the α -catenin-vinculin-VASP activity on single actin filaments in TIRF microscopy in the presence of profilin, at 100 mM KCl.

Conditions: 0.8 μ M G-actin (10% atto 488-labeled) in fluorescence buffer (5 mM Tris pH7.8, 200 μ M ATP, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 0.4% methylcellulose, 100 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 200 μ M EGTA, 20 mM DTT), supplemented with 5 μ M profilin alone and in the presence of 1 μ M Δ mod, 1 μ M V_{1ab4} and 0.6 μ M VASP. Scale bar = 15 μ m.

Supplementary Movie 5. Remodeling of Arp2/3-mediated branched actin into fast-growing bundles by α -catenin, vinculin and VASP.

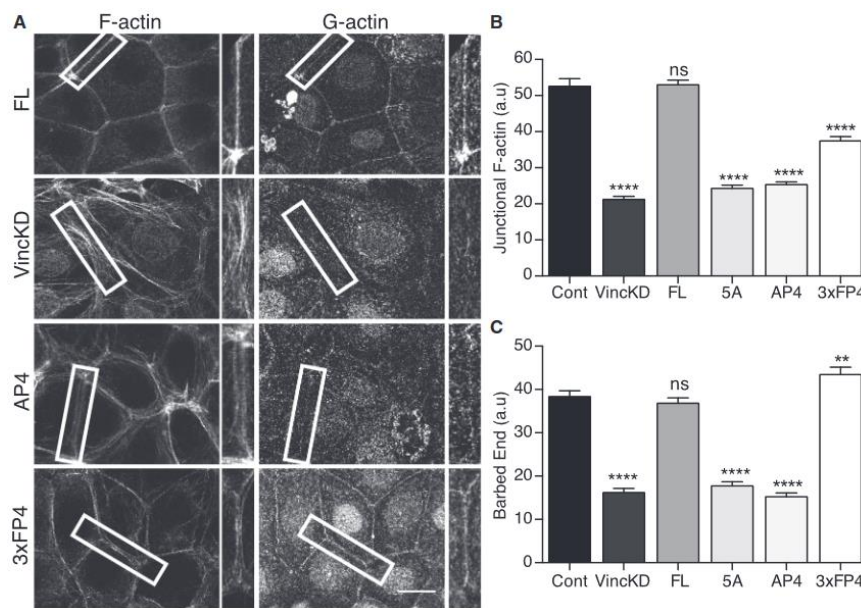
Conditions: 0.8 μ M G-actin (10% atto 488-labeled) in fluorescence buffer (5 mM Tris pH7.8, 200 μ M ATP, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 0.4% methylcellulose, 50 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 200 μ M EGTA, 20 mM DTT), supplemented with the indicated combinations of 50 nM Arp2/3, 100 nM VCA, 1 μ M Δ mod, 1 μ M V_{1ab4} and 0.6 μ M VASP. Scale bar = 15 μ m.

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans les cellules, la dynamique et la stabilité des jonctions adhérentes résultent de la formation des complexes adhésifs entre cadhérines et du recrutement des protéines de régulation du cytosquelette d'actine dont l'activité dépend de la tension exercée sur ses jonctions. Dans cette étude, nous révélons un nouveau mécanisme de régulation de l'assemblage de l'actine médié par un complexe protéique, formé des protéines α -caténine, vinculine et VASP, impliqué dans la formation et la maturation des jonctions adhérentes. Notre travail décrypte les mécanismes moléculaires par lesquels cette machinerie mécanosensible contribue à l'adaptation de l'architecture et de la dynamique des réseaux d'actine lors de la formation des jonctions adhérentes. En particulier, nous avons montré que l' α -caténine, la vinculine et VASP combinent leurs activités pour inhiber le branchement des filaments d'actine par le complexe Arp2/3, stimuler la nucléation et l'élongation des filaments d'actine linéaires à partir des complexes profiline-actine et regrouper ces filaments en faisceaux.

Les protéines isolées ont souvent été considérées comme des entités fonctionnelles dans des travaux préliminaires. L' α -caténine est capable de coiffer les bouts barbés des filaments d'actine ([Hansen et al., 2013](#)). La vinculine coiffe les extrémités barbées et nucléée les filaments ([Le Clainche et al., 2010](#)). VASP agit sur la nucléation, l'élongation et la formation des faisceaux ([Laurent et al., 1999](#); [Hansen et Mullins, 2010](#); [Breitsprecher et al., 2008; 2011](#)). Ces activités n'existent probablement pas, ou rarement, de manière isolée car toutes les protéines qui les portent sont de simples rouages de machineries plus complexes. La connaissance des activités de chaque pièce d'une machinerie ne permet pas non plus de prédire l'activité de la machinerie une fois assemblée. En effet, certaines propriétés ou activités émergent de cet assemblage. Ainsi, l'activité qui émerge de la combinaison de l' α -caténine avec la vinculine et VASP n'est pas la somme des activités des protéines prises séparément. Ces trois protéines combinent leurs activités de coiffe, de nucléation et d'élongation pour former une machinerie dont l'activité la plus prononcée est l'élongation et, dans une moindre mesure la nucléation de filaments, à partir de profiline-actine, qui est l'espèce polymérisable majoritaire des cellules. Comme nous avons utilisé une construction d' α -caténine Δ mod qui mime la conformation étirée par l'application d'une force, le mécanisme que nous avons décrit est celui mis en œuvre en réponse à la tension de l'actomyosine dans les jonctions adhérentes.

Notre étude biochimique peut aisément être replacée dans le contexte cellulaire et fournir une explication mécanistique manquante à des observations faites précédemment par d'autres groupes. En effet, les observations en cellules Caco-2 de Leerberg et ses collaborateurs en 2014 révélèrent que les jonctions induisent l'assemblage de l'actine en réponse à la tension de l'actomyosine (Leerberg et al., 2014). Ils ont montré une diminution de la quantité d'actine-F et de la quantité d'extrémités barbées libres au niveau des jonctions adhérentes lorsque l'expression des isoformes de myosine IIA ou IIB était réduite par shRNA, ou lorsque les interactions entre l' α -caténine, la vinculine et VASP étaient interrompues (Figure 33). De même, une suppression des domaines auto-inhibiteurs MII et MIII dans l' α -caténine exprimée dans des cellules MDCK (construction Δ mod utilisée dans notre travail qui permet la liaison de la vinculine sans l'application d'une force), entraîne une augmentation de la quantité de vinculine et d'actine jonctionnelle (Seddiki et al., 2018). Nos résultats sont parfaitement en accord avec ces travaux et en précisent les mécanismes sous-jacents.



Les mécanismes par lesquels cette machinerie nucléée et allonge des filaments d'actine ne sont pas complètement compris. En ce qui concerne la nucléation, une hypothèse qui peut être formulée est que l'état tétramérique de VASP permet à ses domaines de liaison aux monomères d'actine (GAB) de rapprocher les monomères pour créer un noyau de filaments d'actine ([Laurent et al., 1999](#); [Zimmermann et al., 2002](#); [Chereau et Dominguez, 2006](#); [Ferron et al., 2007](#)). Comme l' α -caténine et la vinculine sont des protéines dimériques, on peut proposer que, dans nos essais *in vitro*, l'association de dimères d' α -caténine avec des dimères de vinculine et des tétramères de VASP crée des complexes contenant jusqu'à quatre tétramères de VASP, ce qui augmenterait considérablement l'efficacité de la nucléation de l'actine-profiline. Toutefois, l' α -caténine forme des hétérodimères avec la β -caténine ([Drees et al., 2005](#)), ce qui empêche son homodimérisation. On peut tout de même proposer que dans les jonctions adhérentes, l'association d'hétérodimères de β -caténine/ α -caténine avec des dimères de vinculine qui, à leur tour, s'associent à deux tétramères de VASP, constitue un mécanisme de nucléation efficace.

L'accélération de l'élongation des bouts barbés des filaments d'actine observée en présence du complexe α -caténine-vinculine-VASP pourrait, comme la nucléation discutée ci-dessus, être le résultat d'une association de tétramères de VASP par la vinculine et l' α -caténine. En effet, le mécanisme d'élongation des extrémités barbées par VASP nécessite le regroupement des tétramères de VASP en clusters ([Breitsprecher et al., 2008](#)). Dans un tétramère de VASP, chaque domaine FAB fixe un filament d'actine et chaque domaine de liaison à l'actine monomérique (domaine GAB) délivre des monomères d'actine à l'extrémité barbée de ce filament ou d'un filament voisin ([Breitsprecher et al., 2011](#); [Brühmann et al., 2017](#)). On peut donc proposer que l'augmentation de la vitesse d'élongation observée dans nos essais est probablement due au regroupement des tétramères de VASP par la formation des complexes α -caténine-vinculine-VASP. Il est intéressant de rappeler que des études antérieures ont montré que VASP protège les bouts barbés contre l'activité de coiffe de la CP ([Bear et al., 2002](#); [Hansen et Mullins, 2010](#)). De même, dans nos essais, VASP ne favorise pas seulement mais protège les extrémités barbées en croissance contre les activités de coiffe de l' α -caténine et de la vinculine. Nos résultats en spectroscopie de fluorescence montrent également que l' α -caténine et la vinculine augmentent significativement l'activité de VASP, ce qui suggère que l' α -caténine et la vinculine assistent VASP pour favoriser l'élongation des filaments d'actine. Nos résultats ne peuvent donc pas être

expliqués par une simple compétition entre les trois protéines pour l'extrémité barbée des filaments, mais par une synergie.

Le mécanisme que nous avons étudié est similaire à celui observé pour les clusters de la protéine Ena de *Drosophila*, qui appartient à la famille des protéines Ena/VASP. Ainsi, il a été démontré que les bouts barbés associés à Ena, dans des faisceaux de filaments d'actine formés par la protéine de réticulation filopodiale fascine, s'allongent deux fois plus rapidement, ce qui suggère une coopération entre Ena et la fascine pour allonger les filopodes ([Winkelman et al., 2014](#)). Ce mécanisme ressemble donc à l'effet observé dans nos essais où l' α -caténine et la vinculine, deux protéines capables de contribuer à la formation de faisceaux, favorise l'élongation des filaments par VASP. Ces observations suggèrent un mécanisme général de stimulation de l'activité de l'élongation de VASP par les protéines de réticulation. De façon intéressante, lorsque les filaments d'actine organisés en faisceaux par la fascine sont allongés par des formines immobilisées sur une surface, avec une liberté de rotation et de translation réduite, la vitesse d'élongation et la processivité sont réduites ([Suzuki et al., 2020](#)). Il serait intéressant de déterminer l'élongation des faisceaux d'actine en présence d' α -caténine, vinculine et VASP dans une expérience similaire qui reproduit bien le contexte des jonctions.

La formation des contacts cellule-cellule est associée à des changements spectaculaires dans la dynamique des membranes et des réseaux d'actine. Le chevauchement des lamellipodes des cellules en contact initie la formation des adhésions cellule-cellule. La formation d'un réseau de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3 activé par la cortactine contrôle l'extension de ces lamellipodes ([Kovacs et al., 2002](#)). L'activité lamellipodiale diminue au fur et à mesure de l'accumulation du complexe cadhérine-caténine et de la maturation des contacts en jonctions intercellulaires stables. Dans ce contexte, la protéine α -caténine joue un rôle essentiel dans la régulation de l'assemblage de l'actine. En effet, des observations de souris qui ont subi un « *knockout* » de l' α -caténine révèlent une perte d'inhibition de contact et une augmentation de l'activité migratoire des kératinocytes ([Vasioukhin et al., 2001](#)). De même, une surexpression de l' α -caténine entraîne une suppression de l'activité membranaire dans les neurones de l'hippocampe, alors qu'une diminution du niveau d' α -caténine augmente l'activité membranaire, suggérant ainsi que l' α -caténine réprime l'activité protrusive de la membrane ([Abe et al., 2004](#)). Dans des essais cinétiques *in vitro*, comparables à ceux utilisés dans notre travail, l' α -caténine inhibe la

polymérisation d'actine par le complexe Arp2/3. Cet effet est probablement dû à une compétition directe entre l' α -caténine et le complexe Arp2/3 pour la fixation aux filaments d'actine (Drees et al., 2005). L'activité de formation de faisceaux d'actine par l' α -caténine pourrait également contribuer à l'inhibition du branchement par Arp2/3. D'autre part, la vinculine joue un rôle fondamental dans la formation des adhésions cellule-cellule et cellule-matrice. La vinculine activée interagit avec les filaments d'actine et induit une réorganisation du réseau de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3 en faisceaux de filaments de polarité mixte (Boujemaa-Paterski et al., 2020). Ce mécanisme, discuté par les auteurs dans le contexte de l'adhésion cellule-matrice, devrait également exister dans le contexte de l'adhésion cellule-cellule. Notre étude révèle cependant un rôle différent de celui proposé par ces auteurs puisque nous avons observé, dans des essais cinétiques et microscopiques, que la vinculine inhibe tout simplement la formation des branches. Comme les branches ne se forment pas, nous n'avons pas pu observer l'effet de réorganisation du réseau branché par la vinculine proposé ci-dessus. Enfin, plusieurs études ont montré que les protéines de la famille Ena/VASP réduisent la fréquence de branchement par le complexe Arp2/3 (Skoble et al., 2001; Bear et al., 2002; Plastino et al., 2004). Ce mécanisme, qui reste débattu, pourrait être expliqué par une compétition entre Ena/VASP et Arp2/3 pour les monomères d'actine qui sont des cofacteurs nécessaires pour le branchement. Par ailleurs, VASP pourrait inhiber directement le branchement en empêchant la fixation du complexe Arp2/3 au filament d'actine mère. Une autre explication invoquée a pour origine la capacité de VASP à inhiber l'action de la CP. En présence de VASP, les filaments s'allongeraient donc plus longtemps entre chaque branchement, car ils ne sont plus coiffés, ce qui aurait pour conséquence une fréquence de branchement par unité de longueur de filament plus faible (Akin et Mullins, 2008). On pourrait proposer une explication similaire de nos résultats qui montrent que l'addition de l' α -caténine, la vinculine et VASP inhibe le branchement par Arp2/3 en microscopie TIRF. Dans nos expériences, VASP, en empêchant la coiffe des filaments d'actine par la vinculine et l' α -caténine, réduirait le taux de branchement. Une autre explication est que ces trois protéines réorganisent *a posteriori* le réseau branché en formant des faisceaux d'actine.

Nos résultats obtenus *in vitro* montrent donc que l' α -caténine, la vinculine et VASP combinent leurs activités pour réorganiser le réseau d'actine en inhibant le branchement et en formant des faisceaux. Cependant, l'observation de l'organisation des réseaux d'actine au niveau des jonctions adhérentes dans les cellules aboutit à des conclusions plus complexes. Ainsi, l'observation de cellules épithéliales de rein (MDCK)

en microscopie à fluorescence et en microscopie électronique indique que les ponctuations de cadhérines, connues de longue date, correspondent à des interdigitations de protrusions membranaires riches en actine, et non pas à des macro-clusters de cadhérines le long de membranes lisses ([Li et al., 2021](#)). La formation de ces protrusions membranaires nécessite la polymérisation de l'actine sous le control de Arp2/3, EVL (Ena-VASP like) et CRMP-1 ([Li et al., 2020](#)). Le complexe Arp2/3 nucléé des nouveaux filaments d'actine branchés, tandis que EVL et CRMP-1 forment un complexe qui favorise l'élongation des extrémités barbées des filaments d'actine. L'élimination de ces trois facteurs entraîne la dissociation des liens adhésifs entre cadhérines. Cette étude suggère que, dans les cellules épithéliales, l'activité protrusive dépendante de la polymérisation de l'actine agit régulièrement pour maintenir les jonctions cellule-cellule et pour empêcher la déchirure des contacts par la contractilité dépendante de la myosine II. Cette étude suggère aussi que le réseau de filaments branchés devrait être majoritaire au niveau des jonctions. Pourtant, d'autres études ont révélé une autre organisation du cytosquelette d'actine au niveau des JA des cellules endothéliales. Les observations en microscopie électronique ont montré l'existence de deux réseaux d'actine distincts aux JA linéaires : un réseau d'actine branché juxtamembranaire et des faisceaux de filaments périjonctionnels parallèles à la membrane ([Efimova et Svitkina, 2018](#)) (Figure 34). La VE-cadhérine interagit principalement avec le réseau d'actine branché contenant Arp2/3, alors que les faisceaux de filaments d'actine sont localisés en position plus distale. Ces derniers contiennent de la myosine IIA (NMIIA) et sont liés indirectement à la jonction via le réseau d'actine branché.

Des études plus récentes ont exploré l'implication des deux isoformes de la myosine II A et B (NMIIA et NMIIIB) pendant les étapes précoces de la formation des jonctions intercellulaires épithéliales ([Heuzé et al., 2019](#)). Chaque isoforme possède sa localisation spécifique au niveau des jonctions et ses propres fonctions. Les résultats de cette étude montrent que la NMIIA est associée aux faisceaux de filaments d'actine parallèles périjonctionnels, qui sont liés à un réseau branché d'actine juxtamembranaire distinct, auquel la NMIIIB est associée. Ces deux localisations distinctes de la NMIIA et NMIIIB au niveau des jonctions naissantes reflètent des contributions distinctes au fonctionnement des jonctions. La NMIIA est responsable de la génération de la force de traction nécessaire à la croissance des jonctions, alors que la NMIIIB possède un rôle dans la transmission de la force générée par la NMIIA aux clusters de cadhérines membranaires nécessaire au maintien des jonctions. La force générée par la NMIIIB est responsable de l'étirement de l' α -caténine qui induit sa conformation ouverte active (Figure 35).

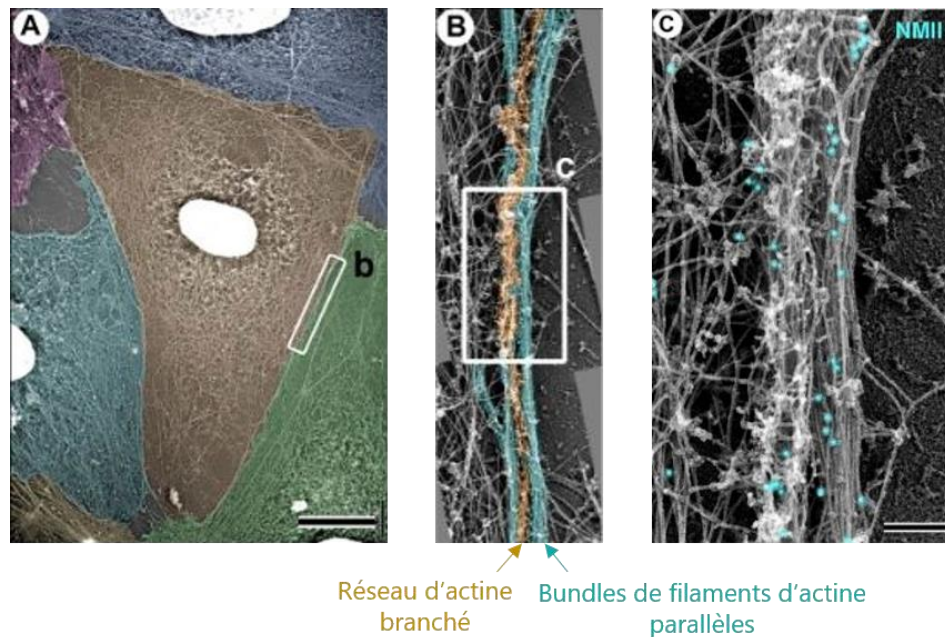


Figure 34. Images en microscopie électronique montrant deux types de réseaux d'actine au niveau des JA.

A. Vue d'ensemble d'une cellule formant des jonctions adhérentes (JA) linéaires avec les cellules voisines. **B.** Agrandissement de la région encadrée en A. Deux types de réseaux d'actine sont observés au niveau de la jonction linéaire : une étroite bande d'actine branchée (orange) flanquée de deux faisceaux de filaments d'actine (cyan). La myosine IIA (NMIIA) est présentée en cyan et est colocalisée avec les faisceaux, mais pas avec le réseau branché. **C.** Agrandissement de la région encadrée en B. (adapté de [Efimova et Svitkina, 2018](#)).

Dans cette étude il est intéressant de noter que les cellules dépourvues de NMIIIB présentent des jonctions contenant moins d' α -caténine ouverte et sont associées à des réseaux de filaments d'actine branchés contenant le complexe Arp2/3 plus épais ([Heuzé et al., 2019](#)). Cette observation est compatible avec nos résultats qui montrent que l' α -caténine ouverte, mimée par le mutant Δ mod dans notre travail, recrute la vinculine et VASP pour inhiber le branchement par Arp2/3 (Figure 36).

En résumé, l'initiation des contacts cellule-cellule nécessite des extensions membranaires formées grâce à l'assemblage d'un réseau de filaments d'actine branchés par le complexe Arp2/3. L'assemblage de ce réseau d'actine génère les forces de poussée qui permettent aux cellules d'entrer en contact. Durant les étapes précoces de la biogenèse des contacts intercellulaires, deux réseaux d'actine distincts sont impliqués : un réseau branché juxtamembranaire et des faisceaux contractiles parallèles périjonctionnels. Le rôle des deux isoformes de la myosine II A et B est crucial dans ce

processus. La NMIIB localisée très proche de la membrane est responsable du regroupement des clusters de cadhérines membranaires ainsi que de la transmission de la force nécessaire à l'activation de l' α -caténine. La NMIIA génère la force de traction nécessaire à la croissance des jonctions. Au niveau moléculaire, la formation des complexes cadhérines-caténines à cette étape contribue au contrôle de l'organisation de l'actine en réduisant la densité des réseaux branchés et en contribuant à la formation des faisceaux contractiles (Figure 36). Au fur et à mesure de l'augmentation de la tension et de l'extension des jonctions naissantes, l' α -caténine, étirée mécaniquement par l'activité de l'actomyosine, recrute la vinculine qui à son tour recrute VASP. Ce complexe ternaire agit sur la nucléation, l'élongation et l'organisation en faisceaux des filaments d'actine, contribuant ainsi à la réorganisation de l'actine jonctionnel en faisceaux parallèles à la membrane et donc à la maturation et la stabilité des JA (Figure 36).

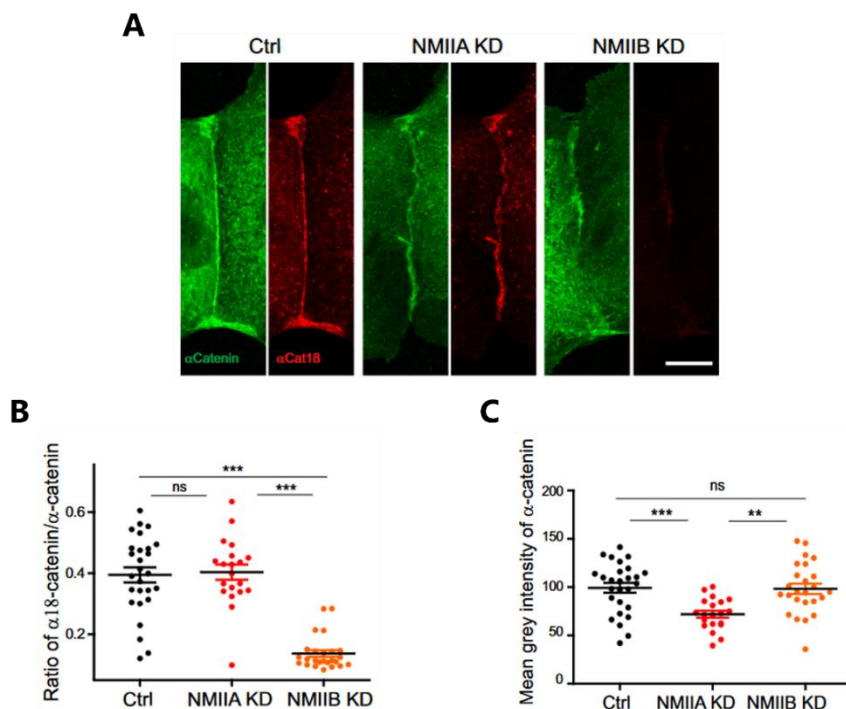


Figure 35. L'isoforme NMIIB contrôle le dépliement de l' α -caténine au niveau des contacts cellule-cellule.

A. Images confocales de la zone jonctionnelle des cellules MDCK ayant subi une déplétion de la myosine IIA (NMIIA KD), ou une déplétion de la myosine IIB (NMIIB KD). L' α -cat18 est un anticorps monoclonal qui reconnaît la conformation ouverte de l' α -caténine. Barre d'échelle : 10 μ m. **B, C.** Graphiques représentant les rapports des signaux α -cat18/ α -caténine (B) et les niveaux d'intensité moyenne du signal de l' α -caténine au niveau de la jonction (C). (adapté de [Heuzé et al., 2019](#)).

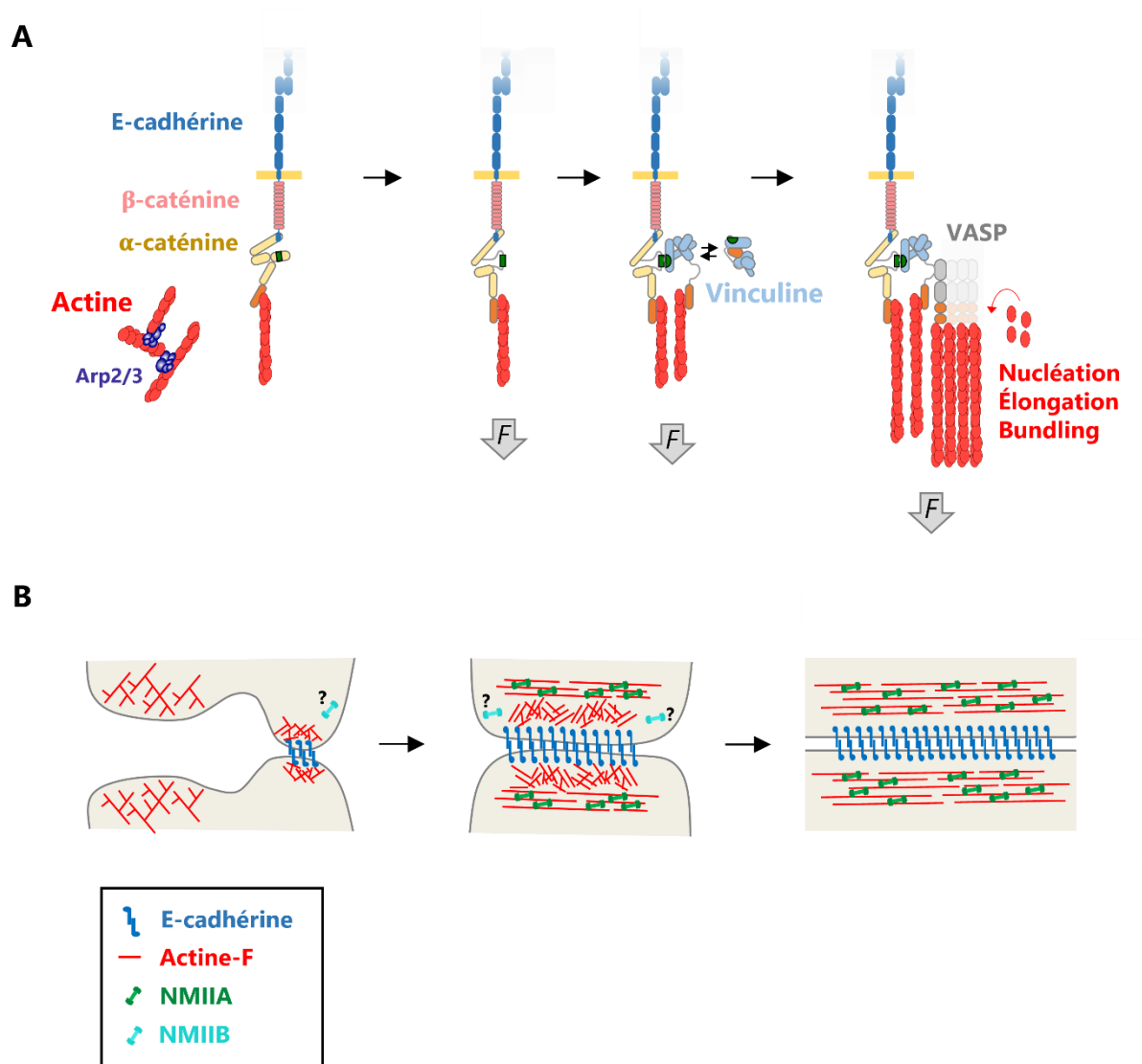


Figure 36. Modèle du mécanisme par lequel l'α-caténine, la vinculine et VASP régulent l'assemblage et l'organisation de l'actine durant la formation des contacts cellule-cellule.

A. Mécanisme moléculaire de la régulation de l'assemblage de l'actine par les complexes d'adhésion associés aux jonctions adhérentes. **B.** Schéma montrant la transition des jonctions naissantes en jonctions matures ainsi que la réorganisation du réseau d'actine durant ce processus.

Après avoir décrit l'activité du complexe α -caténine-vinculine-VASP sur la régulation de l'assemblage de l'actine, nous pouvons envisager plusieurs perspectives.

Comme dans notre étude nous avons utilisé des mutants qui miment les conformations actives des protéines mécanosensibles, une suite logique de ce projet serait de développer une stratégie expérimentale *in vitro* pour étudier l'activité du complexe α -caténine-vinculine-VASP en fonction de la force appliquée par l'actomyosine. L'adaptation du dispositif expérimental précédemment développé par le laboratoire qui utilise des surfaces micro-imprimées (*micropatterned*) semble être une base idéale pour atteindre cet objectif ([Ciobanasu et al., 2015](#)). Nous pourrions ainsi immobiliser l' α -caténine dans ces structures et observer l'effet de la force actomyosine sur le recrutement de la vinculine et de VASP fluorescents tout en mesurant la polymérisation de l'actine et l'organisation des filaments.

La contribution du complexe Arp2/3 dans la formation des jonctions adhérentes est bien établie dans la littérature. En revanche la persistance du réseau branché d'actine au niveau des JA matures et le rôle de la NMIIB à ce stade ne sont toujours pas clairs. Il semble nécessaire d'avoir des études cellulaires comparatives par microscopie électronique de l'ultrastructure des réseaux d'actine associés aux JA et soumis à des forces croissantes pour tester cette hypothèse.

Enfin, il serait intéressant de déterminer le rôle des autres partenaires de cette machinerie dans la régulation de l'actine, notamment les formines, Dia-1 et formine-1, qui sont connues pour réguler l'assemblage de l'actine aux JA ([Romero et al., 2004](#); [Kobielak et al., 2004](#); [Carramusa et al., 2007](#); [Acharya et al., 2017](#)). L'objectif ultime serait de développer un système *in vitro* pour comprendre l'organisation et la dynamique des réseaux d'actine qui résultent de la coordination entre les activités d'Arp2/3, des formines, du complexe α -caténine-vinculine-VASP et des myosines NMIIA et NMIIB.

BIBLIOGRAPHIE

- Abe, Kentaro, Osamu Chisaka, Frans van Roy, et Masatoshi Takeichi. 2004. « Stability of Dendritic Spines and Synaptic Contacts Is Controlled by AN-Catenin ». *Nature Neuroscience* 7 (4): 357-63. <https://doi.org/10.1038/nn1212>.
- Aberle, H., S. Butz, J. Stappert, H. Weissig, R. Kemler, et H. Hoschuetzky. 1994. « Assembly of the Cadherin-Catenin Complex in Vitro with Recombinant Proteins ». *Journal of Cell Science* 107 (12): 3655-63. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.12.3655>.
- Aberle, Hermann, Hillel Schwartz, Heinz Hoschuetzky, et Rolf Kemler. 1996. « Single Amino Acid Substitutions in Proteins of the Armadillo Gene Family Abolish Their Binding to α -Catenin ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (3): 1520-26. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.3.1520>.
- Abreu-Blanco, Maria Teresa, Jeffrey M. Verboon, Raymond Liu, James J. Watts, et Susan M. Parkhurst. 2012. « *Drosophila* Embryos Close Epithelial Wounds Using a Combination of Cellular Protrusions and an Actomyosin Purse String ». *Journal of Cell Science* 125 (24): 5984-97. <https://doi.org/10.1242/jcs.109066>.
- Acharya, Bipul R., Selwin K. Wu, Zi Zhao Lieu, Robert G. Parton, Stephan W. Grill, Alexander D. Bershadsky, Guillermo A. Gomez, et Alpha S. Yap. 2017. « Mammalian Diaphanous 1 Mediates a Pathway for E-Cadherin to Stabilize Epithelial Barriers through Junctional Contractility ». *Cell Reports* 18 (12): 2854-67. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.078>.
- Adams, Cynthia L., Yih-Tai Chen, Stephen J Smith, et W. James Nelson. 1998. « Mechanisms of Epithelial Cell–Cell Adhesion and Cell Compaction Revealed by High-Resolution Tracking of E-Cadherin– Green Fluorescent Protein ». *Journal of Cell Biology* 142 (4): 1105-19. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.4.1105>.
- Akin, Orkun, et R. Dyche Mullins. 2008. « Capping Protein Increases the Rate of Actin-Based Motility by Promoting Filament Nucleation by the Arp2/3 Complex ». *Cell* 133 (5): 841-51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.04.011>.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff., K. Roberts, et P. Waltes. 2002. *Molecular Biology of the Cell*.
- Al-Kilani, Alia, Olivier de Freitas, Sylvie Dufour, et François Gallet. 2011. « Negative Feedback from Integrins to Cadherins: A Micromechanical Study ». *Biophysical Journal* 101 (2): 336-44. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.009>.
- Austen, Katharina, Pia Ringer, Alexander Mehlich, Anna Chrostek-Grashoff, Carleen Kluger, Christoph Klingner, Benedikt Sabass, Roy Zent, Matthias Rief, et Carsten Grashoff. 2015. « Extracellular Rigidity Sensing by Talin Isoform-Specific Mechanical Linkages ». *Nature Cell Biology* 17 (12): 1597-1606. <https://doi.org/10.1038/ncb3268>.
- Bachmann, Christiane, Lieselore Fischer, Ulrich Walter, et Matthias Reinhard. 1999. « The EVH2 Domain of the Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Mediates Tetramerization, F-Actin Binding, and Actin Bundle Formation ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (33): 23549-57.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.23549>.
- Bakolitsa, Constantina, Daniel M. Cohen, Laurie A. Bankston, Andrey A. Bobkov, Gregory W. Cadwell, Lisa Jennings, David R. Critchley, Susan W. Craig, et Robert C. Liddington. 2004. « Structural Basis for Vinculin Activation at Sites of Cell Adhesion ». *Nature* 430 (6999): 583-86. <https://doi.org/10.1038/nature02610>.
- Barry, Adrienne K., Hamid Tabdili, Ismaeel Muhamed, Jun Wu, Nitesh Shashikanth, Guillermo A. Gomez, Alpha S. Yap, et al. 2014. « α -Catenin Cytomechanics – Role in Cadherin-Dependent Adhesion and Mechanotransduction ». *Journal of Cell Science* 127 (8): 1779-91. <https://doi.org/10.1242/jcs.139014>.
- Barzik, Melanie, Tatyana I. Kotova, Henry N. Higgs, Larnele Hazelwood, Dorit Hanein, Frank B. Gertler, et Dorothy A. Schafer. 2005. « Ena/VASP Proteins Enhance Actin Polymerization in the Presence of Barbed End Capping Proteins ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28653-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503957200>.
- Baum, Buzz, et Marios Georgiou. 2011. « Dynamics of Adherens Junctions in Epithelial Establishment, Maintenance, and Remodeling ». *Journal of Cell Biology* 192 (6): 907-17. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009141>.
- Bays, Jennifer L., et Kris A. DeMali. 2017. « Vinculin in Cell–Cell and Cell–Matrix Adhesions ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 74 (16): 2999-3009. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2511-3>.
- Bays, Jennifer L., Xiao Peng, Catlin E. Tolbert, Christophe Guilluy, Ashley E. Angell, Yuan Pan, Richard Superfine, Keith Burridge, et Kris A. DeMali. 2014. « Vinculin Phosphorylation Differentially Regulates Mechanotransduction at Cell–Cell and Cell–Matrix Adhesions ». *Journal of Cell Biology* 205 (2): 251-63. <https://doi.org/10.1083/jcb.201309092>.
- Bazellières, Elsa, Vito Conte, Alberto Elosegui-Artola, Xavier Serra-Picamal, María Bintanel-Morcillo, Pere Roca-Cusachs, José J. Muñoz, Marta Sales-Pardo, Roger Guimerà, et Xavier Trepas. 2015. « Control of Cell–Cell Forces and Collective Cell Dynamics by the Intercellular Adhesome ». *Nature Cell Biology* 17 (4): 409-20. <https://doi.org/10.1038/ncb3135>.
- Bear, James E., et Frank B. Gertler. 2009. « Ena/VASP: Towards Resolving a Pointed Controversy at the Barbed End ». *Journal of Cell Science* 122 (12): 1947-53. <https://doi.org/10.1242/jcs.038125>.
- Bear, James E., Tatyana M. Svitkina, Matthias Krause, Dorothy A. Schafer, Joseph J. Loureiro, Geraldine A. Strasser, Ivan V. Maly, et al. 2002. « Antagonism between Ena/VASP Proteins and Actin Filament Capping Regulates Fibroblast Motility ». *Cell* 109 (4): 509-21. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00731-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00731-6).
- Bertocchi, Cristina, Yilin Wang, Andrea Ravasio, Yusuke Hara, Yao Wu, Talgat Sailov, Michelle A. Baird, et al. 2017. « Nanoscale Architecture of Cadherin-Based Cell Adhesions ». *Nature Cell Biology* 19 (1): 28-37. <https://doi.org/10.1038/ncb3456>.
- Blanchoin, L., K. J. Amann, H. N. Higgs, J. B. Marchand, D. A. Kaiser, et T. D. Pollard. 2000. « Direct Observation of Dendritic Actin Filament Networks Nucleated by Arp2/3 Complex and WASP/Scar Proteins ». *Nature* 404 (6781): 1007-11.

- <https://doi.org/10.1038/35010008>.
- Blanchoin, Laurent, Rajaa Boujemaa-Paterski, Cécile Sykes, et Julie Plastino. 2014. « Actin Dynamics, Architecture, and Mechanics in Cell Motility ». *Physiological Reviews* 94 (1): 235-63. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2013>.
- Blanchoin, Laurent, et Thomas D. Pollard. 1998. « Interaction of Actin Monomers with Acanthamoeba Actophorin (ADF/Cofilin) and Profilin ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (39): 25106-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.39.25106>.
- Blanchoin, Laurent, et Thomas D. Pollard. 2002. « Hydrolysis of ATP by Polymerized Actin Depends on the Bound Divalent Cation but Not Profilin ». *Biochemistry* 41 (2): 597-602. <https://doi.org/10.1021/bi011214b>.
- Borghi, N., M. Sorokina, O. G. Shcherbakova, W. I. Weis, B. L. Pruitt, W. J. Nelson, et A. R. Dunn. 2012. « E-Cadherin Is under Constitutive Actomyosin-Generated Tension That Is Increased at Cell-Cell Contacts upon Externally Applied Stretch ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (31): 12568-73. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204390109>.
- Borgon, Robert A., Clemens Vornrhein, Gerard Bricogne, Philippe R.J. Bois, et Tina Izard. 2004. « Crystal Structure of Human Vinculin ». *Structure* 12 (7): 1189-97. <https://doi.org/10.1016/j.str.2004.05.009>.
- Boujemaa-Paterski, Rajaa, Bruno Martins, Matthias Eibauer, Charlie T Beales, Benjamin Geiger, et Ohad Medalia. 2020. « Talin-Activated Vinculin Interacts with Branched Actin Networks to Initiate Bundles ». *ELife* 9 (novembre): e53990. <https://doi.org/10.7554/eLife.53990>.
- Brasch, Julia, Oliver J. Harrison, Barry Honig, et Lawrence Shapiro. 2012. « Thinking Outside the Cell: How Cadherins Drive Adhesion ». *Trends in Cell Biology* 22 (6): 299-310. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2012.03.004>.
- Breitsprecher, Dennis, Antje K Kiesewetter, Joern Linkner, Claus Urbanke, Guenter P Resch, J Victor Small, et Jan Faix. 2008. « Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation ». *The EMBO Journal* 27 (22): 2943-54. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.211>.
- Breitsprecher, Dennis, Antje K Kiesewetter, Joern Linkner, Marlene Vinzenz, Theresia E B Stradal, John Victor Small, Ute Curth, Richard B Dickinson, et Jan Faix. 2011. « Molecular Mechanism of Ena/VASP-Mediated Actin-Filament Elongation: Actin-Filament Elongation by Ena/VASP ». *The EMBO Journal* 30 (3): 456-67. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.348>.
- Brindle, Nicholas P. J., Mark R. Holt, Joanna E Davies, Caroline J Price, et David R. Critchley. 1996. « The Focal-Adhesion Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP) Binds to the Proline-Rich Domain in Vinculin ». *Biochemical Journal* 318 (3): 753-57. <https://doi.org/10.1042/bj3180753>.
- Brühmann, Stefan, Dmitry S. Ushakov, Moritz Winterhoff, Richard B. Dickinson, Ute Curth, et Jan Faix. 2017. « Distinct VASP Tetramers Synergize in the Processive Elongation of Individual Actin Filaments from Clustered Arrays ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (29). <https://doi.org/10.1073/pnas.1703145114>.

- Buckley, Craig D., Jiongyi Tan, Karen L. Anderson, Dorit Hanein, Niels Volkmann, William I. Weis, W. James Nelson, et Alexander R. Dunn. 2014. « Cell Adhesion. The Minimal Cadherin-Catenin Complex Binds to Actin Filaments under Force ». *Science* (New York, N.Y.) 346 (6209): 1254-211. <https://doi.org/10.1126/science.1254211>.
- Calderwood, David A., Iain D. Campbell, et David R. Critchley. 2013. « Talins and Kindlins: Partners in Integrin-Mediated Adhesion ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (8): 503-17. <https://doi.org/10.1038/nrm3624>.
- Campellone, Kenneth G., et Matthew D. Welch. 2010. « A Nucleator Arms Race: Cellular Control of Actin Assembly ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (4): 237-51. <https://doi.org/10.1038/nrm2867>.
- Carisey, Alex, et Christoph Ballestrem. 2011. « Vinculin, an Adapter Protein in Control of Cell Adhesion Signalling ». *European Journal of Cell Biology* 90 (2-3): 157-63. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.06.007>.
- Carlier, M. F. 1991. « Actin: Protein Structure and Filament Dynamics ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (1): 1-4.
- Carlier, M F, C Jean, K J Rieger, M Lenfant, et D Pantaloni. 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. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (11): 5034-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.11.5034>.
- Carlier, Marie-France, Valérie Laurent, Jérôme Santolini, Ronald Melki, Dominique Didry, Gui-Xian Xia, Yan Hong, Nam-Hai Chua, et Dominique Pantaloni. 1997. « Actin Depolymerizing Factor (ADF/Cofilin) Enhances the Rate of Filament Turnover: Implication in Actin-Based Motility ». *Journal of Cell Biology* 136 (6): 1307-22. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.6.1307>.
- Carramusa, Letizia, Christoph Ballestrem, Yuliya Zilberman, et Alexander D. Bershadsky. 2007. « Mammalian Diaphanous-Related Formin Dia1 Controls the Organization of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Junctions ». *Journal of Cell Science* 120 (21): 3870-82. <https://doi.org/10.1242/jcs.014365>.
- Casella, J. F., D. J. Maack, et S. Lin. 1986. « Purification and Initial Characterization of a Protein from Skeletal Muscle That Caps the Barbed Ends of Actin Filaments ». *The Journal of Biological Chemistry* 261 (23): 10915-21.
- Castañó, Julio, Guiomar Solanas, David Casagolda, Imma Raurell, Patricia Villagrasa, Xosé R. Bustelo, Antonio García de Herreros, et Mireia Duñach. 2007. « Specific Phosphorylation of P120-Catenin Regulatory Domain Differently Modulates Its Binding to RhoA ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (5): 1745-57. <https://doi.org/10.1128/MCB.01974-06>.
- Cavey, M., et T. Lecuit. 2009. « Molecular Bases of Cell-Cell Junctions Stability and Dynamics ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (5): a002998-a002998. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002998>.
- Cavey, Matthieu, Matteo Rauzi, Pierre-François Lenne, et Thomas Lecuit. 2008. « A Two-Tiered Mechanism for Stabilization and Immobilization of E-Cadherin ». *Nature*

- 453 (7196): 751-56. <https://doi.org/10.1038/nature06953>.
- Chaigne, Agathe, Clément Campillo, Raphaël Voituriez, Nir S. Gov, Cécile Sykes, Marie-Hélène Verlhac, et Marie-Emilie Terret. 2016. « F-Actin Mechanics Control Spindle Centring in the Mouse Zygote ». *Nature Communications* 7 (1): 10253. <https://doi.org/10.1038/ncomms10253>.
- Chen, Chi-Shuo, Soonjin Hong, Indrajyoti Indra, Alina P. Sergeeva, Regina B. Troyanovsky, Lawrence Shapiro, Barry Honig, et Sergey M. Troyanovsky. 2015. « α -Catenin-Mediated Cadherin Clustering Couples Cadherin and Actin Dynamics ». *Journal of Cell Biology* 210 (4): 647-61. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412064>.
- Chen, Yih-Tai, Daniel B. Stewart, et W. James Nelson. 1999. « Coupling Assembly of the E-Cadherin/ β -Catenin Complex to Efficient Endoplasmic Reticulum Exit and Basal-Lateral Membrane Targeting of E-Cadherin in Polarized MDCK Cells ». *Journal of Cell Biology* 144 (4): 687-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.687>.
- Chereau, David, et Roberto Dominguez. 2006. « Understanding the Role of the G-Actin-Binding Domain of Ena/VASP in Actin Assembly ». *Journal of Structural Biology* 155 (2): 195-201. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.01.012>.
- Choi, Hee-Jung, Andrew H. Huber, et William I. Weis. 2006. « Thermodynamics of β -Catenin-Ligand Interactions ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (2): 1027-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511338200>.
- Choi, H.-J., S. Pokutta, G. W. Cadwell, A. A. Bobkov, L. A. Bankston, R. C. Liddington, et W. I. Weis. 2012. « E-Catenin Is an Autoinhibited Molecule That Coactivates Vinculin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (22): 8576-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203906109>.
- Choi, Wangsun, Bipul R. Acharya, Grégoire Peyret, Marc-Antoine Fardin, René-Marc Mège, Benoit Ladoux, Alpha S. Yap, Alan S. Fanning, et Mark Peifer. 2016. « Remodeling the Zonula Adherens in Response to Tension and the Role of Afadin in This Response ». *Journal of Cell Biology* 213 (2): 243-60. <https://doi.org/10.1083/jcb.201506115>.
- Chu, Yeh-Shiu, William A. Thomas, Olivier Eder, Frederic Pincet, Eric Perez, Jean Paul Thiery, et Sylvie Dufour. 2004. « Force Measurements in E-Cadherin-Mediated Cell Doublets Reveal Rapid Adhesion Strengthened by Actin Cytoskeleton Remodeling through Rac and Cdc42 ». *Journal of Cell Biology* 167 (6): 1183-94. <https://doi.org/10.1083/jcb.200403043>.
- Ciobanasu, Corina, Bruno Faivre, et Christophe Le Clainche. 2012. « Actin Dynamics Associated with Focal Adhesions ». *International Journal of Cell Biology* 2012: 1-9. <https://doi.org/10.1155/2012/941292>.
- Ciobanasu, Corina, Bruno Faivre, et Christophe Le Clainche. 2015. « Reconstituting Actomyosin-Dependent Mechanosensitive Protein Complexes in Vitro ». *Nature Protocols* 10 (1): 75-89. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.200>.
- Ciobanasu, Corina, Hong Wang, Véronique Henriot, Cécile Mathieu, Annabelle Fente, Sandrine Csillag, Clémence Vigouroux, Bruno Faivre, et Christophe Le Clainche. 2018. « Integrin-Bound Talin Head Inhibits Actin Filament Barbed-End

- Elongation ». *Journal of Biological Chemistry* 293 (7): 2586-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.808204>.
- Clainche, Christophe, et Marie-France Carlier. 2004. « Actin-Based Motility Assay ». *Current Protocols in Cell Biology* 24 (1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1207s24>.
- Collins, Caitlin, et W. James Nelson. 2015. « Running with Neighbors: Coordinating Cell Migration and Cell-Cell Adhesion ». *Current Opinion in Cell Biology* 36 (octobre): 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.07.004>.
- Cooper, J. A., S. B. Walker, et T. D. Pollard. 1983. « Pyrene Actin: Documentation of the Validity of a Sensitive Assay for Actin Polymerization ». *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 4 (2): 253-62. <https://doi.org/10.1007/BF00712034>.
- Cooper, John A., et David Sept. 2008. « New Insights into Mechanism and Regulation of Actin Capping Protein ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, 267:183-206. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00604-7](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00604-7).
- Cossart, Pascale, et Christine Kocks. 1994. « The Actin-Based Motility of the Facultative Intracellular Pathogen *Listeria Monocytogenes* ». *Molecular Microbiology* 13 (3): 395-402. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00434.x>.
- Critchley, David R. 2009. « Biochemical and Structural Properties of the Integrin-Associated Cytoskeletal Protein Talin ». *Annual Review of Biophysics* 38 (1): 235-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133744>.
- Danik, Stephan B., Fangyu Liu, Jie Zhang, H. Jacqueline Suk, Gregory E. Morley, Glenn I. Fishman, et David E. Gutstein. 2004. « Modulation of Cardiac Gap Junction Expression and Arrhythmic Susceptibility ». *Circulation Research* 95 (10): 1035-41. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000148664.33695.2a>.
- D'arcy Thompson, W. 1917. On Growth and Form. *Cambridge Univ. Press*.
- Daugherty, Rebecca Leadem, et Cara J. Gottardi. 2007. « Phospho-Regulation of β -Catenin Adhesion and Signaling Functions ». *Physiology* 22 (5): 303-9. <https://doi.org/10.1152/physiol.00020.2007>.
- Davis, Michael A., Renee C. Ireton, et Albert B. Reynolds. 2003. « A Core Function for P120-Catenin in Cadherin Turnover ». *Journal of Cell Biology* 163 (3): 525-34. <https://doi.org/10.1083/jcb.200307111>.
- De La Cruz, Enrique M., E.Michael Ostap, Rodney A. Brundage, K.S. Reddy, H. Lee Sweeney, et Daniel Safer. 2000. « Thymosin-B4 Changes the Conformation and Dynamics of Actin Monomers ». *Biophysical Journal* 78 (5): 2516-27. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76797-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76797-X).
- Delva, E., D. K. Tucker, et A. P. Kowalczyk. 2009. « The Desmosome ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (2): a002543-a002543. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002543>.
- DeMali, Kris A., Christy A. Barlow, et Keith Burridge. 2002. « Recruitment of the Arp2/3 Complex to Vinculin ». *Journal of Cell Biology* 159 (5): 881-91. <https://doi.org/10.1083/jcb.200206043>.
- DeMali, Kris A., Xiaowen Sun, et Gabrielle A. Bui. 2014. « Force Transmission at Cell-Cell and Cell-Matrix Adhesions ». *Biochemistry* 53 (49): 7706-17.

- <https://doi.org/10.1021/bi501181p>.
- Doolittle, Lynda K., Michael K. Rosen, et Shae B. Padrick. 2013. « Measurement and Analysis of In Vitro Actin Polymerization ». In *Adhesion Protein Protocols*, édité par Amanda S. Coutts, 1046:273-93. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_16.
- Doxzen, Kevin, Sri Ram Krishna Vedula, Man Chun Leong, Hiroaki Hirata, Nir S. Gov, Alexandre J. Kabla, Benoit Ladoux, et Chwee Teck Lim. 2013. « Guidance of Collective Cell Migration by Substrate Geometry ». *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 5 (8): 1026-35. <https://doi.org/10.1039/c3ib40054a>.
- Drees, Frauke, Sabine Pokutta, Soichiro Yamada, W. James Nelson, et William I. Weis. 2005. « α -Catenin Is a Molecular Switch That Binds E-Cadherin- β -Catenin and Regulates Actin-Filament Assembly ». *Cell* 123 (5): 903-15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.021>.
- Duc, Quint le, Quanming Shi, Iris Blonk, Arnoud Sonnenberg, Ning Wang, Deborah Leckband, et Johan de Rooij. 2010. « Vinculin Potentiates E-Cadherin Mechanosensing and Is Recruited to Actin-Anchored Sites within Adherens Junctions in a Myosin II-Dependent Manner ». *Journal of Cell Biology* 189 (7): 1107-15. <https://doi.org/10.1083/jcb.201001149>.
- Efimova, Nadia, et Tatyana M. Svitkina. 2018. « Branched Actin Networks Push against Each Other at Adherens Junctions to Maintain Cell-Cell Adhesion ». *Journal of Cell Biology* 217 (5): 1827-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708103>.
- Evans, W. Howard, et Patricia E. M. Martin. 2002. « Gap Junctions: Structure and Function (Review) ». *Molecular Membrane Biology* 19 (2): 121-36. <https://doi.org/10.1080/09687680210139839>.
- Ewald, Andrew J., Audrey Brenot, Myhanh Duong, Bianca S. Chan, et Zena Werb. 2008. « Collective Epithelial Migration and Cell Rearrangements Drive Mammary Branching Morphogenesis ». *Developmental Cell* 14 (4): 570-81. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.003>.
- Faix, Jan, et Klemens Rottner. 2022. « Ena/VASP Proteins in Cell Edge Protrusion, Migration and Adhesion ». *Journal of Cell Science* 135 (6): jcs259226. <https://doi.org/10.1242/jcs.259226>.
- Fanning, Alan S., Brian J. Jameson, Lynne A. Jesaitis, et James Melvin Anderson. 1998. « The Tight Junction Protein ZO-1 Establishes a Link between the Transmembrane Protein Occludin and the Actin Cytoskeleton ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (45): 29745-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29745>.
- Ferron, François, Grzegorz Rebowksi, Sung Haeng Lee, et Roberto Dominguez. 2007. « Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP ». *The EMBO Journal* 26 (21): 4597-4606. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601874>.
- Gavard, Julie, Mireille Lambert, Inna Grosheva, Véronique Marthiens, Theano Irinopoulou, Jean-François Riou, Alexander Bershadsky, et René-Marc Mège.

2004. « Lamellipodium Extension and Cadherin Adhesion: Two Cell Responses to Cadherin Activation Relying on Distinct Signalling Pathways ». *Journal of Cell Science* 117 (2): 257-70. <https://doi.org/10.1242/jcs.00857>.
- Gingras, Alexandre R., Wolfgang H. Ziegler, Ronald Frank, Igor L. Barsukov, Gordon C.K. Roberts, David R. Critchley, et Jonas Emsley. 2005. « Mapping and Consensus Sequence Identification for Multiple Vinculin Binding Sites within the Talin Rod ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 37217-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508060200>.
- Goldschmidt-Clermont, P J, L M Machesky, S K Doberstein, et T D Pollard. 1991. « Mechanism of the Interaction of Human Platelet Profilin with Actin. » *Journal of Cell Biology* 113 (5): 1081-89. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.5.1081>.
- Goodenough, D. A., et D. L. Paul. 2009. « Gap Junctions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1 (1): a002576-a002576. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002576>.
- Gough, Rosemarie E., et Benjamin T. Goult. 2018. « The Tale of Two Talins - Two Isoforms to Fine-Tune Integrin Signalling ». *FEBS Letters* 592 (12): 2108-25. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13081>.
- Goult, Benjamin T., Jie Yan, et Martin A. Schwartz. 2018. « Talin as a Mechanosensitive Signaling Hub ». *Journal of Cell Biology* 217 (11): 3776-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808061>.
- Grashoff, Carsten, Brenton D. Hoffman, Michael D. Brenner, Ruobo Zhou, Maddy Parsons, Michael T. Yang, Mark A. McLean, et al. 2010. « Measuring Mechanical Tension across Vinculin Reveals Regulation of Focal Adhesion Dynamics ». *Nature* 466 (7303): 263-66. <https://doi.org/10.1038/nature09198>.
- Green, Kathleen J, Avinash Jaiganesh, et Joshua A Broussard. 2019. « Desmosomes: Essential Contributors to an Integrated Intercellular Junction Network ». *F1000Research* 8 (décembre): 2150. <https://doi.org/10.12688/f1000research.20942.1>.
- Green, Kathleen J., et Jonathan C. R. Jones. 1996. « Desmosomes and Hemidesmosomes: Structure and Function of Molecular Components ». *The FASEB Journal* 10 (8): 871-81. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.8.8666164>.
- Gremm, Dagmar, et Albrecht Wegner. 2000. « Gelsolin as a Calcium-Regulated Actin Filament-Capping Protein: Gelsolin as a Calcium-Regulated Actin Filament-Capping Protein ». *European Journal of Biochemistry* 267 (14): 4339-45. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01463.x>.
- Grikscheit, Katharina, Tanja Frank, Ying Wang, et Robert Grosse. 2015. « Junctional Actin Assembly Is Mediated by Formin-like 2 Downstream of Rac1 ». *Journal of Cell Biology* 209 (3): 367-76. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412015>.
- Guillot, Charlène, et Thomas Lecuit. 2013. « Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 340 (6137): 1185-89. <https://doi.org/10.1126/science.1235249>.
- Gumbiner, Barry M. 2005. « Regulation of Cadherin-Mediated Adhesion in Morphogenesis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (8): 622-34.

- <https://doi.org/10.1038/nrm1699>.
- Gumbiner, Barry M., et Pierre D. McCrea. 1993. « Catenins as Mediators of the Cytoplasmic Functions of Cadherins ». *Journal of Cell Science* 1993 (Supplement_17): 155-58. https://doi.org/10.1242/jcs.1993.Supplement_17.22.
- Han, Mitchell K. L., et Johan de Rooij. 2016. « Converging and Unique Mechanisms of Mechanotransduction at Adhesion Sites ». *Trends in Cell Biology* 26 (8): 612-23. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.03.005>.
- Hansen, Scott D., Adam V. Kwiatkowski, Chung-Yueh Ouyang, HongJun Liu, Sabine Pokutta, Simon C. Watkins, Niels Volkmann, et al. 2013. « AE-Catenin Actin-Binding Domain Alters Actin Filament Conformation and Regulates Binding of Nucleation and Disassembly Factors ». Édité par Alpha Yap. *Molecular Biology of the Cell* 24 (23): 3710-20. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-07-0388>.
- Hansen, Scott D., et R. Dyche Mullins. 2010. « VASP Is a Processive Actin Polymerase That Requires Monomeric Actin for Barbed End Association ». *Journal of Cell Biology* 191 (3): 571-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003014>.
- Harris, Tony J. C., et Ulrich Tepass. 2010. « Adherens Junctions: From Molecules to Morphogenesis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (7): 502-14. <https://doi.org/10.1038/nrm2927>.
- Hartsock, Andrea, et W. James Nelson. 2008. « Adherens and Tight Junctions: Structure, Function and Connections to the Actin Cytoskeleton ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1778 (3): 660-69. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.07.012>.
- Hervé, Jean-Claude, et Mickaël Derangeon. 2013. « Gap-Junction-Mediated Cell-to-Cell Communication ». *Cell and Tissue Research* 352 (1): 21-31. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1485-6>.
- Heuzé, Méline L, Gautham Hari Narayana Sankara Narayana, Joseph D'Alessandro, Victor Cellerin, Tien Dang, David S Williams, Jan CM Van Hest, Philippe Marcq, René-Marc Mège, et Benoit Ladoux. 2019. « Myosin II Isoforms Play Distinct Roles in Adherens Junction Biogenesis ». *ELife* 8 (septembre): e46599. <https://doi.org/10.7554/eLife.46599>.
- Hoffman, Brenton D., et Alpha S. Yap. 2015. « Towards a Dynamic Understanding of Cadherin-Based Mechanobiology ». *Trends in Cell Biology* 25 (12): 803-14. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.008>.
- Huang, Juan, Lynn Huang, Yi-Jiun Chen, Erin Austin, Caitlin E. Devor, Fabrice Roegiers, et Yang Hong. 2011. « Differential Regulation of Adherens Junction Dynamics during Apical-Basal Polarization ». *Journal of Cell Science* 124 (23): 4001-13. <https://doi.org/10.1242/jcs.086694>.
- Huber, Andrew H., et William I. Weis. 2001. « The Structure of the β -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by β -Catenin ». *Cell* 105 (3): 391-402. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00330-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00330-0).
- Hull, B E, et L A Staehelin. 1979. « The Terminal Web. A Reevaluation of Its Structure and Function. » *Journal of Cell Biology* 81 (1): 67-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.81.1.67>.

- Hüttelmaier, Stefan, Birgit Harbeck, Nils Ole Steffens, Tania Meßerschmidt, Susanne Illenberger, et Brigitte M Jockusch. 1999. « Characterization of the Actin Binding Properties of the Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein VASP ». *FEBS Letters* 451 (1): 68-74. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00546-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00546-3).
- Ishiyama, Noboru, Ritu Sarpal, Megan N. Wood, Samantha K. Barrick, Tadateru Nishikawa, Hanako Hayashi, Anna B. Kobb, et al. 2018. « Force-Dependent Allostery of the α -Catenin Actin-Binding Domain Controls Adherens Junction Dynamics and Functions ». *Nature Communications* 9 (1): 5121. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07481-7>.
- Ishiyama, Noboru, Nobutoshi Tanaka, Kentaro Abe, Yoo Jeong Yang, Yazan M. Abbas, Masataka Umitsu, Bhushan Nagar, et al. 2013. « An Autoinhibited Structure of α -Catenin and Its Implications for Vinculin Recruitment to Adherens Junctions ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (22): 15913-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.453928>.
- Ivanov, Andrei I., Moshe Bachar, Brian A. Babbitt, Robert S. Adelstein, Asma Nusrat, et Charles A. Parkos. 2007. « A Unique Role for Nonmuscle Myosin Heavy Chain IIA in Regulation of Epithelial Apical Junctions ». Édité par Nils Cordes. *PLoS ONE* 2 (8): e658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000658>.
- Janssen, Mandy E.W., Eldar Kim, Hongjun Liu, L. Miya Fujimoto, Andrey Bobkov, Niels Volkmann, et Dorit Hanein. 2006. « Three-Dimensional Structure of Vinculin Bound to Actin Filaments ». *Molecular Cell* 21 (2): 271-81. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.11.020>.
- Jeanes, A, C J Gottardi, et A S Yap. 2008. « Cadherins and Cancer: How Does Cadherin Dysfunction Promote Tumor Progression? » *Oncogene* 27 (55): 6920-29. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.343>.
- Jefferson, Julius J., Conrad L. Leung, et Ronald K. H. Liem. 2004. « Plakins: Goliaths That Link Cell Junctions and the Cytoskeleton ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (7): 542-53. <https://doi.org/10.1038/nrm1425>.
- Jégou, Antoine, Marie-France Carlier, et Guillaume Romet-Lemonne. 2013. « Formin MDia1 Senses and Generates Mechanical Forces on Actin Filaments ». *Nature Communications* 4 (1): 1883. <https://doi.org/10.1038/ncomms2888>.
- Jégou, Antoine, Thomas Niedermayer, József Orbán, Dominique Didry, Reinhard Lipowsky, Marie-France Carlier, et Guillaume Romet-Lemonne. 2011. « Individual Actin Filaments in a Microfluidic Flow Reveal the Mechanism of ATP Hydrolysis and Give Insight Into the Properties of Profilin ». Édité par Thomas Pollard. *PLoS Biology* 9 (9): e1001161. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001161>.
- Johnson, Robert P., et Susan W. Craig. 1995. « F-Actin Binding Site Masked by the Intramolecular Association of Vinculin Head and Tail Domains ». *Nature* 373 (6511): 261-64. <https://doi.org/10.1038/373261a0>.
- Johnson, Robert P., et Susan W. Craig. 2000. « Actin Activates a Cryptic Dimerization Potential of the Vinculin Tail Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (1): 95-105. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.1.95>.

- Kechagia, Jenny Z., Johanna Ivaska, et Pere Roca-Cusachs. 2019. « Integrins as Biomechanical Sensors of the Microenvironment ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20 (8): 457-73. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0134-2>.
- Kim, Tae-Jin, Shuai Zheng, Jie Sun, Ismaeel Muhamed, Jun Wu, Lei Lei, Xinyu Kong, Deborah E. Leckband, et Yingxiao Wang. 2015. « Dynamic Visualization of α -Catenin Reveals Rapid, Reversible Conformation Switching between Tension States ». *Current Biology* 25 (2): 218-24. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.017>.
- Knudsen, K A, A P Soler, K R Johnson, et M J Wheelock. 1995. « Interaction of Alpha-Actinin with the Cadherin/Catenin Cell-Cell Adhesion Complex via Alpha-Catenin. » *Journal of Cell Biology* 130 (1): 67-77. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.1.67>.
- Kobielak, Agnieszka, et Elaine Fuchs. 2004. « Alpha-Catenin: At the Junction of Intercellular Adhesion and Actin Dynamics ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (8): 614-25. <https://doi.org/10.1038/nrm1433>.
- Kobielak, Agnieszka, H. Amalia Pasolli, et Elaine Fuchs. 2004. « Mammalian Formin-1 Participates in Adherens Junctions and Polymerization of Linear Actin Cables ». *Nature Cell Biology* 6 (1): 21-30. <https://doi.org/10.1038/ncb1075>.
- Kong, Fang, Andrés J. García, A. Paul Mould, Martin J. Humphries, et Cheng Zhu. 2009. « Demonstration of Catch Bonds between an Integrin and Its Ligand ». *Journal of Cell Biology* 185 (7): 1275-84. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810002>.
- Koslov, Erika R., Pam Maupin, Deepti Pradhan, Jon S. Morrow, et David L. Rimm. 1997. « α -Catenin Can Form Asymmetric Homodimeric Complexes and/or Heterodimeric Complexes with β -Catenin ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (43): 27301-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.43.27301>.
- Kourtidis, Antonis, Siu P. Ngok, et Panos Z. Anastasiadis. 2013. « P120 Catenin ». In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 116:409-32. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394311-8.00018-2>.
- Kouyama, T., et K. Mihashi. 1981. « Fluorimetry Study of N-(1-Pyrenyl)iodoacetamide-Labelled F-Actin. Local Structural Change of Actin Protomer Both on Polymerization and on Binding of Heavy Meromyosin ». *European Journal of Biochemistry* 114 (1): 33-38.
- Kovacs, Eva M., Radiya G. Ali, Ailsa J. McCormack, et Alpha S. Yap. 02/2002a. « E-Cadherin Homophilic Ligation Directly Signals through Rac and Phosphatidylinositol 3-Kinase to Regulate Adhesive Contacts ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (8): 6708-18. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109640200>.
- Kovacs, Eva M., Marita Goodwin, Radiya G. Ali, Andrew D. Paterson, et Alpha S. Yap. 03/2002b. « Cadherin-Directed Actin Assembly ». *Current Biology* 12 (5): 379-82. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00661-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00661-9).
- Kovar, David R. 2006. « Molecular Details of Formin-Mediated Actin Assembly ». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (1): 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.12.011>.
- Krishnan, Kannan, et Pierre D. J. Moens. 2009. « Structure and Functions of Profilins ».

- Biophysical Reviews* 1 (2): 71-81. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0010-y>.
- Kumar, Abhishek, Mingxing Ouyang, Koen Van den Dries, Ewan James McGhee, Keiichiro Tanaka, Marie D. Anderson, Alexander Groisman, Benjamin T. Goult, Kurt I. Anderson, et Martin A. Schwartz. 2016. « Talin Tension Sensor Reveals Novel Features of Focal Adhesion Force Transmission and Mechanosensitivity ». *Journal of Cell Biology* 213 (3): 371-83. <https://doi.org/10.1083/jcb.201510012>.
- Kumar, Sanjay, Iva Z. Maxwell, Alexander Heisterkamp, Thomas R. Polte, Tanmay P. Lele, Matthew Salanga, Eric Mazur, et Donald E. Ingber. 2006. « Viscoelastic Retraction of Single Living Stress Fibers and Its Impact on Cell Shape, Cytoskeletal Organization, and Extracellular Matrix Mechanics ». *Biophysical Journal* 90 (10): 3762-73. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.071506>.
- Kureishy, Nina, Vasileia Sapountzi, Soren Prag, N. Anilkumar, et Josephine Clare Adams. 2002. « Fascins, and Their Roles in Cell Structure and Function ». *BioEssays* 24 (4): 350-61. <https://doi.org/10.1002/bies.10070>.
- Ladoux, Benoit, et René-Marc Mège. 2017. « Mechanobiology of Collective Cell Behaviours ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (12): 743-57. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.98>.
- Lambert, Mireille, Daniel Choquet, et René-Marc Mège. 2002. « Dynamics of Ligand-Induced, Rac1-Dependent Anchoring of Cadherins to the Actin Cytoskeleton ». *Journal of Cell Biology* 157 (3): 469-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107104>.
- Lambert, Mireille, Olivier Thoumine, Julien Brevier, Daniel Choquet, Daniel Riveline, et René-Marc Mège. 2007. « Nucleation and Growth of Cadherin Adhesions ». *Experimental Cell Research* 313 (19): 4025-40. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.07.035>.
- Larue, L, M Ohsugi, J Hirchenhain, et R Kemler. 1994. « E-Cadherin Null Mutant Embryos Fail to Form a Trophoblast Epithelium. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (17): 8263-67. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.17.8263>.
- Laurent, Valérie, Thomas P. Loisel, Birgit Harbeck, Ann Wehman, Lothar Gröbe, Brigitte M. Jockusch, Jürgen Wehland, Frank B. Gertler, et Marie-France Carlier. 1999. « Role of Proteins of the Ena/VASP Family in Actin-Based Motility of *Listeria Monocytogenes* ». *Journal of Cell Biology* 144 (6): 1245-58. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.6.1245>.
- Le Clainche, C., D. Didry, M. F. Carlier, et D. Pantaloni. 2001. « Activation of Arp2/3 Complex by Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Is Linked to Enhanced Binding of ATP to Arp2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (50): 46689-92. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100476200>.
- Le Clainche, Christophe, et Marie-France Carlier. 2008. « Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration ». *Physiological Reviews* 88 (2): 489-513. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2007>.
- Le Clainche, Christophe, Satya Prakash Dwivedi, Dominique Didry, et Marie-France Carlier. 2010. « Vinculin Is a Dually Regulated Actin Filament Barbed End-Capping and Side-Binding Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (30): 23420-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.102830>.

- Leckband, D. E., et J. de Rooij. 2014. « Cadherin Adhesion and Mechanotransduction ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30: 291-315. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013212>.
- Lecuit, Thomas, et Alpha S. Yap. 2015. « E-Cadherin Junctions as Active Mechanical Integrators in Tissue Dynamics ». *Nature Cell Biology* 17 (5): 533-39. <https://doi.org/10.1038/ncb3136>.
- Leerberg, Joanne M., Guillermo A. Gomez, Suzie Verma, Elliott J. Moussa, Selwin K. Wu, Rashmi Priya, Brenton D. Hoffman, Carsten Grashoff, Martin A. Schwartz, et Alpha S. Yap. 2014. « Tension-Sensitive Actin Assembly Supports Contractility at the Epithelial Zonula Adherens ». *Current Biology* 24 (15): 1689-99. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.028>.
- LeGoff, Loïc, et Thomas Lecuit. 2016. « Mechanical Forces and Growth in Animal Tissues ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (3): a019232. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019232>.
- Li, John Xiao He, Vivian W. Tang, Kingsley A. Boateng, et William M. Brieher. 2021. « Cadherin Puncta Are Interdigitated Dynamic Actin Protrusions Necessary for Stable Cadherin Adhesion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118 (24): e2023510118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2023510118>.
- Li, John Xiao He, Vivian W. Tang, et William M. Brieher. 2020. « Actin Protrusions Push at Apical Junctions to Maintain E-Cadherin Adhesion ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (1): 432-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908654117>.
- Li, Li, Robert Hartley, Bjoern Reiss, Yaohui Sun, Jin Pu, Dan Wu, Francis Lin, et al. 2012. « E-Cadherin Plays an Essential Role in Collective Directional Migration of Large Epithelial Sheets ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 69 (16): 2779-89. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0951-3>.
- Ligon, Lee A., Sher Karki, Mariko Tokito, et Erika L. F. Holzbaur. 2001. « Dynein Binds to β -Catenin and May Tether Microtubules at Adherens Junctions ». *Nature Cell Biology* 3 (10): 913-17. <https://doi.org/10.1038/ncb1001-913>.
- Lilien, Jack, et Janne Balsamo. 2005. « The Regulation of Cadherin-Mediated Adhesion by Tyrosine Phosphorylation/Dephosphorylation of β -Catenin ». *Current Opinion in Cell Biology* 17 (5): 459-65. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.08.009>.
- Loisel, Thomas P., Rajaa Boujemaa, Dominique Pantaloni, et Marie-France Carlier. 1999. « Reconstitution of Actin-Based Motility of *Listeria* and *Shigella* Using Pure Proteins ». *Nature* 401 (6753): 613-16. <https://doi.org/10.1038/44183>.
- Machesky, Laura M., R. Dyche Mullins, Henry N. Higgs, Donald A. Kaiser, Laurent Blanchoin, Robin C. May, Margaret E. Hall, et Thomas D. Pollard. 1999. « Scar, a WASp-Related Protein, Activates Nucleation of Actin Filaments by the Arp2/3 Complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 3739-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3739>.
- Maciver, S K, H G Zot, et T D Pollard. 1991. « Characterization of Actin Filament Severing by Actophorin from *Acanthamoeba Castellanii*. » *Journal of Cell Biology* 115 (6): 1611-20. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.6.1611>.

- Maki, Koichiro, Sung-Woong Han, Yoshinori Hirano, Shigenobu Yonemura, Toshio Hakoshima, et Taiji Adachi. 2018. « Real-Time TIRF Observation of Vinculin Recruitment to Stretched α -Catenin by AFM ». *Scientific Reports* 8 (1): 1575. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20115-8>.
- Marsden, Mungo, et Douglas W. DeSimone. 2003. « Integrin-ECM Interactions Regulate Cadherin-Dependent Cell Adhesion and Are Required for Convergent Extension in *Xenopus* ». *Current Biology* 13 (14): 1182-91. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00433-0](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00433-0).
- Maruthamuthu, Venkat, Benedikt Sabass, Ulrich S. Schwarz, et Margaret L. Gardel. 2011. « Cell-ECM Traction Force Modulates Endogenous Tension at Cell-Cell Contacts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (12): 4708-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011123108>.
- McCain, Megan L., Hyungsuk Lee, Yvonne Aratyn-Schaus, André G. Kléber, et Kevin Kit Parker. 2012. « Cooperative Coupling of Cell-Matrix and Cell-Cell Adhesions in Cardiac Muscle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (25): 9881-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203007109>.
- McCullough, Brannon R., Elena E. Grintsevich, Christine K. Chen, Hyeran Kang, Alan L. Hutchison, Arnon Henn, Wenxiang Cao, et al. 2011. « Cofilin-Linked Changes in Actin Filament Flexibility Promote Severing ». *Biophysical Journal* 101 (1): 151-59. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.049>.
- Mège, René Marc, et Noboru Ishiyama. 2017. « Integration of Cadherin Adhesion and Cytoskeleton at Adherens Junctions ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (5): a028738. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028738>.
- Mei, Lin, Santiago Espinosa de los Reyes, Matthew J Reynolds, Rachel Leicher, Shixin Liu, et Gregory M Alushin. 2020. « Molecular Mechanism for Direct Actin Force-Sensing by α -Catenin ». *ELife* 9 (septembre): e62514. <https://doi.org/10.7554/eLife.62514>.
- Menkel, A R, M Kroemker, P Bubeck, M Ronsiek, G Nikolai, et B M Jockusch. 1994. « Characterization of an F-Actin-Binding Domain in the Cytoskeletal Protein Vinculin. » *Journal of Cell Biology* 126 (5): 1231-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.5.1231>.
- Moon, Randall T., Bruce Bowerman, Michael Boutros, et Norbert Perrimon. 2002. « The Promise and Perils of Wnt Signaling Through β -Catenin ». *Science* 296 (5573): 1644-46. <https://doi.org/10.1126/science.1071549>.
- Mouw, Janna K., Yoshihiro Yui, Laura Damiano, Russell O. Bainer, Johnathon N. Lakins, Irene Acerbi, Guanqing Ou, et al. 2014. « Tissue Mechanics Modulate MicroRNA-Dependent PTEN Expression to Regulate Malignant Progression ». *Nature Medicine* 20 (4): 360-67. <https://doi.org/10.1038/nm.3497>.
- Muhamed, Ismaeel, Jun Wu, Poonam Sehgal, Xinyu Kong, Arash Tajik, Ning Wang, et Deborah E. Leckband. 2016. « E-Cadherin-Mediated Force Transduction Signals Regulate Global Cell Mechanics ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.185447. <https://doi.org/10.1242/jcs.185447>.
- Mui, Keeley L., Christopher S. Chen, et Richard K. Assoian. 2016. « The Mechanical

- Regulation of Integrin–Cadherin Crosstalk Organizes Cells, Signaling and Forces ». *Journal of Cell Science*, janvier, jcs.183699. <https://doi.org/10.1242/jcs.183699>.
- Murakami, Kenji, Takuo Yasunaga, Taro Q.P. Noguchi, Yuki Gomibuchi, Kien X. Ngo, Taro Q.P. Uyeda, et Takeyuki Wakabayashi. 2010. « Structural Basis for Actin Assembly, Activation of ATP Hydrolysis, and Delayed Phosphate Release ». *Cell* 143 (2): 275-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.09.034>.
- Nabeshima, K., T. Inoue, Y. Shima, H. Kataoka, et M. Kono. 1999. « Cohort Migration of Carcinoma Cells: Differentiated Colorectal Carcinoma Cells Move as Coherent Cell Clusters or Sheets ». *Histology and Histopathology* 14 (4): 1183-97. <https://doi.org/10.14670/HH-14.1183>.
- Nanes, Benjamin A., Christine Chiasson-MacKenzie, Anthony M. Lowery, Noboru Ishiyama, Victor Faundez, Mitsuhiko Ikura, Peter A. Vincent, et Andrew P. Kowalczyk. 2012. « P120-Catenin Binding Masks an Endocytic Signal Conserved in Classical Cadherins ». *Journal of Cell Biology* 199 (2): 365-80. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205029>.
- Nordenfelt, Pontus, Hunter L. Elliott, et Timothy A. Springer. 2016. « Coordinated Integrin Activation by Actin-Dependent Force during T-Cell Migration ». *Nature Communications* 7 (1): 13119. <https://doi.org/10.1038/ncomms13119>.
- Overduin, Michael, Timothy S. Harvey, Stefan Bagby, Kit I. Tong, Patrick Yau, Masatoshi Takeichi, et Mitsuhiko Ikura. 1995. « Solution Structure of the Epithelial Cadherin Domain Responsible for Selective Cell Adhesion ». *Science* 267 (5196): 386-89. <https://doi.org/10.1126/science.7824937>.
- Ozawa, Masayuki, Jürgen Engel, et Rolf Kemler. 1990. « Single Amino Acid Substitutions in One Ca²⁺ Binding Site of Uvomorulin Abolish the Adhesive Function ». *Cell* 63 (5): 1033-38. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90506-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90506-A).
- Pacquelet, Anne, et Pernille Rørth. 2005. « Regulatory Mechanisms Required for DE-Cadherin Function in Cell Migration and Other Types of Adhesion ». *Journal of Cell Biology* 170 (5): 803-12. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506131>.
- Parsons, J. Thomas, Alan Rick Horwitz, et Martin A. Schwartz. 2010. « Cell Adhesion: Integrating Cytoskeletal Dynamics and Cellular Tension ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (9): 633-43. <https://doi.org/10.1038/nrm2957>.
- Peglion, Florent, Flora Lense, et Sandrine Etienne-Manneville. 2014. « Adherens Junction Treadmilling during Collective Migration ». *Nature Cell Biology* 16 (7): 639-51. <https://doi.org/10.1038/ncb2985>.
- Peng, Xiao, Jessica L. Maier, Dilshad Choudhury, Susan W. Craig, et Kris A. DeMali. 2012. « α -Catenin Uses a Novel Mechanism to Activate Vinculin ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (10): 7728-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.297481>.
- Pernier, Julien, Shashank Shekhar, Antoine Jegou, Bérengère Guichard, et Marie-France Carlier. 2016. « Profilin Interaction with Actin Filament Barbed End Controls Dynamic Instability, Capping, Branching, and Motility ». *Developmental Cell* 36 (2): 201-14. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.12.024>.

- Pertz, O. 1999. « A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation ». *The EMBO Journal* 18 (7): 1738-47. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.7.1738>.
- Plastino, Julie, Ioannis Lelidis, Jacques Prost, et Cécile Sykes. 2004. « The Effect of Diffusion, Depolymerization and Nucleation Promoting Factors on Actin Gel Growth ». *European Biophysics Journal* 33 (4). <https://doi.org/10.1007/s00249-003-0370-3>.
- Pokutta, Sabine, Frauke Drees, Yoshimi Takai, W. James Nelson, et William I. Weis. 2002. « Biochemical and Structural Definition of the L-Afadin- and Actin-Binding Sites of α -Catenin ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (21): 18868-74. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201463200>.
- Pollard, Thomas D. 2016. « Actin and Actin-Binding Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (8): a018226. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018226>.
- Pollard, Thomas D., Laurent Blanchoin, et R. Dyché Mullins. 2000. « Molecular Mechanisms Controlling Actin Filament Dynamics in Nonmuscle Cells ». *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29 (1): 545-76. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.29.1.545>.
- Pollard, Thomas D., et Gary G. Borisy. 2003. « Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments ». *Cell* 112 (4): 453-65. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00120-x).
- Pring, Martin, Marie Evangelista, Charles Boone, Changsong Yang, et Sally H. Zigmond. 2003. « Mechanism of Formin-Induced Nucleation of Actin Filaments ». *Biochemistry* 42 (2): 486-96. <https://doi.org/10.1021/bi026520j>.
- Pruyne, David, Marie Evangelista, Changsong Yang, Erfei Bi, Sally Zigmond, Anthony Bretscher, et Charles Boone. 2002. « Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association ». *Science* 297 (5581): 612-15. <https://doi.org/10.1126/science.1072309>.
- Ramarao, Nalini, Christophe Le Clainche, Tina Izard, Raphaëlle Bourdet-Sicard, Elisabeth Ageron, Philippe J. Sansonetti, Marie-France Carlier, et Guy Tran Van Nhieu. 2007. « Capping of Actin Filaments by Vinculin Activated by the *Shigella* IpaA Carboxyl-Terminal Domain ». *FEBS Letters* 581 (5): 853-57. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.01.057>.
- Rangarajan, Erumbi S., et Tina Izard. 2012. « The Cytoskeletal Protein α -Catenin Unfurls upon Binding to Vinculin ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (22): 18492-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.351023>.
- Reinhard, Matthias, Manfred Rüdiger, Brigitte M. Jockusch, et Ulrich Walter. 1996. « VASP Interaction with Vinculin: A Recurring Theme of Interactions with Proline-Rich Motifs ». *FEBS Letters* 399 (1-2): 103-7. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(96\)01295-1](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(96)01295-1).
- Revenu, Céline, Rafika Athman, Sylvie Robine, et Daniel Louvard. 2004. « The Co-Workers of Actin Filaments: From Cell Structures to Signals ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (8): 635-46. <https://doi.org/10.1038/nrm1437>.

- Rimm, D. L., E. R. Koslov, P. Kebriaei, C. D. Cianci, et J. S. Morrow. 1995. « Alpha 1(E)-Catenin Is an Actin-Binding and -Bundling Protein Mediating the Attachment of F-Actin to the Membrane Adhesion Complex. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (19): 8813-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.19.8813>.
- Romero, Stéphane, Christophe Le Clainche, Dominique Didry, Coumaran Egile, Dominique Pantaloni, et Marie-France Carlier. 2004. « Formin Is a Processive Motor That Requires Profilin to Accelerate Actin Assembly and Associated ATP Hydrolysis ». *Cell* 119 (3): 419-29. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.09.039>.
- Romet-Lemonne, Guillaume, et Antoine Jégou. 2021. « The Dynamic Instability of Actin Filament Barbed Ends ». *Journal of Cell Biology* 220 (4): e202102020. <https://doi.org/10.1083/jcb.202102020>.
- Rooij, Johan de, Andre Kerstens, Gaudenz Danuser, Martin A. Schwartz, et Clare M. Waterman-Storer. 2005. « Integrin-Dependent Actomyosin Contraction Regulates Epithelial Cell Scattering ». *Journal of Cell Biology* 171 (1): 153-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.200506152>.
- Rouiller, Isabelle, Xiao-Ping Xu, Kurt J. Amann, Coumaran Egile, Stephan Nickell, Daniela Nicastro, Rong Li, Thomas D. Pollard, Niels Volkmann, et Dorit Hanein. 2008. « The Structural Basis of Actin Filament Branching by the Arp2/3 Complex ». *Journal of Cell Biology* 180 (5): 887-95. <https://doi.org/10.1083/jcb.200709092>.
- Schafer, D A, P B Jennings, et J A Cooper. 1996. « Dynamics of Capping Protein and Actin Assembly in Vitro: Uncapping Barbed Ends by Polyphosphoinositides. » *Journal of Cell Biology* 135 (1): 169-79. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.169>.
- Scott, Jeanie A., Annette M. Shewan, Nicole R. den Elzen, Joseph J. Loureiro, Frank B. Gertler, et Alpha S. Yap. 2006. « Ena/VASP Proteins Can Regulate Distinct Modes of Actin Organization at Cadherin-Adhesive Contacts ». *Molecular Biology of the Cell* 17 (3): 1085-95. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-07-0644>.
- Seddiki, Rima, Gautham Hari Narayana Sankara Narayana, Pierre-Olivier Strale, Hayri Emrah Balcioglu, Grégoire Peyret, Mingxi Yao, Anh Phuong Le, et al. 2018. « Force-Dependent Binding of Vinculin to α -Catenin Regulates Cell–Cell Contact Stability and Collective Cell Behavior ». Édité par Manuel Théry. *Molecular Biology of the Cell* 29 (4): 380-88. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-04-0231>.
- Shekhar, Shashank, Mikael Kerleau, Sonja Kühn, Julien Pernier, Guillaume Romet-Lemonne, Antoine Jégou, et Marie-France Carlier. 2015. « Formin and Capping Protein Together Embrace the Actin Filament in a Ménage à Trois ». *Nature Communications* 6 (1): 8730. <https://doi.org/10.1038/ncomms9730>.
- Shewan, Annette M., Madhavi Maddugoda, Astrid Kraemer, Samantha J. Stehbins, Suzie Verma, Eva M. Kovacs, et Alpha S. Yap. 2005. « Myosin 2 Is a Key Rho Kinase Target Necessary for the Local Concentration of E-Cadherin at Cell–Cell Contacts ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (10): 4531-42. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-04-0330>.
- Sjöblom, B., A. Salmazo, et K. Djinić-Carugo. 2008. « α -Actinin Structure and Regulation ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 65 (17): 2688-2701. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8080-8>.

- Skoble, Justin, Victoria Auerbuch, Erin D. Goley, Matthew D. Welch, et Daniel A. Portnoy. 2001. « Pivotal Role of VASP in Arp2/3 Complex-Mediated Actin Nucleation, Actin Branch-Formation, and *Listeria Monocytogenes* Motility ». *Journal of Cell Biology* 155 (1): 89-100. <https://doi.org/10.1083/jcb.200106061>.
- Skruber, Kristen, Tracy-Ann Read, et Eric A. Vitriol. 2018. « Reconsidering an Active Role for G-Actin in Cytoskeletal Regulation ». *Journal of Cell Science* 131 (1): jcs203760. <https://doi.org/10.1242/jcs.203760>.
- Stevenson, Richard P., Douwe Veltman, et Laura M. Machesky. 2012. « Actin-Bundling Proteins in Cancer Progression at a Glance ». *Journal of Cell Science* 125 (5): 1073-79. <https://doi.org/10.1242/jcs.093799>.
- Stricker, Jonathan, Yvonne Aratyn-Schaus, Patrick W. Oakes, et Margaret L. Gardel. 2011. « Spatiotemporal Constraints on the Force-Dependent Growth of Focal Adhesions ». *Biophysical Journal* 100 (12): 2883-93. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.05.023>.
- Sun, Li, Jeffrey K. Noel, Herbert Levine, et José N. Onuchic. 2017. « Molecular Simulations Suggest a Force-Dependent Mechanism of Vinculin Activation ». *Biophysical Journal* 113 (8): 1697-1710. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.08.037>.
- Suzuki, Emiko L., Jahnavi Chikireddy, Serge Dmitrieff, Bérengère Guichard, Guillaume Romet-Lemonne, et Antoine Jégou. 2020. « Geometrical Constraints Greatly Hinder Formin MDIA1 Activity ». *Nano Letters* 20 (1): 22-32. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b02241>.
- Takada, Yoshikazu, Xiaojing Ye, et Scott Simon. 2007. « The integrins ». *Genome Biology* 8 (5): 215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>.
- Takeichi, M. 1977. « Functional Correlation between Cell Adhesive Properties and Some Cell Surface Proteins. » *Journal of Cell Biology* 75 (2): 464-74. <https://doi.org/10.1083/jcb.75.2.464>.
- Takeichi, Masatoshi. 2014. « Dynamic Contacts: Rearranging Adherens Junctions to Drive Epithelial Remodelling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15 (6): 397-410. <https://doi.org/10.1038/nrm3802>.
- Tepass, Ulrich, Kevin Truong, Dorothea Godt, Mitsuhiko Ikura, et Mark Peifer. 2000. « Cadherins in Embryonic and Neural Morphogenesis ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (2): 91-100. <https://doi.org/10.1038/35040042>.
- Thiery, Jean Paul. 2002. « Epithelial-Mesenchymal Transitions in Tumour Progression ». *Nature Reviews Cancer* 2 (6): 442-54. <https://doi.org/10.1038/nrc822>.
- Thomas, William A., Cécile Boscher, Yeh-Shiu Chu, Damien Cuvelier, Clara Martinez-Rico, Rima Seddiki, Julie Heysch, et al. 2013. « α -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-Cadherin-Based Adhesion Strength ». *Journal of Biological Chemistry* 288 (7): 4957-69. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.403774>.
- Tilney, L G, et D A Portnoy. 1989. « Actin Filaments and the Growth, Movement, and Spread of the Intracellular Bacterial Parasite, *Listeria Monocytogenes*. » *Journal of Cell Biology* 109 (4): 1597-1608. <https://doi.org/10.1083/jcb.109.4.1597>.
- Trepat, Xavier, et Jeffrey J. Fredberg. 2011. « Plithotaxis and Emergent Dynamics in

- Collective Cellular Migration ». *Trends in Cell Biology* 21 (11): 638-46. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.006>.
- Trepat, Xavier, Michael R. Wasserman, Thomas E. Angelini, Emil Millet, David A. Weitz, James P. Butler, et Jeffrey J. Fredberg. 2009. « Physical Forces during Collective Cell Migration ». *Nature Physics* 5 (6): 426-30. <https://doi.org/10.1038/nphys1269>.
- Truong Quang, Binh-An, Madhav Mani, Olga Markova, Thomas Lecuit, et Pierre-François Lenne. 2013. « Principles of E-Cadherin Supramolecular Organization In Vivo ». *Current Biology* 23 (22): 2197-2207. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.09.015>.
- Vasioukhin, Valeri, Christoph Bauer, Linda Degenstein, Bart Wise, et Elaine Fuchs. 2001. « Hyperproliferation and Defects in Epithelial Polarity upon Conditional Ablation of α -Catenin in Skin ». *Cell* 104 (4): 605-17. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00246-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00246-X).
- Vasioukhin, Valeri, Christoph Bauer, Mei Yin, et Elaine Fuchs. 2000. « Directed Actin Polymerization Is the Driving Force for Epithelial Cell–Cell Adhesion ». *Cell* 100 (2): 209-19. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81559-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81559-7).
- Vedula, Pavan, et Anna Kashina. 2018. « The Makings of the 'actin Code': Regulation of Actin's Biological Function at the Amino Acid and Nucleotide Level ». *Journal of Cell Science* 131 (9): jcs215509. <https://doi.org/10.1242/jcs.215509>.
- Vedula, Sri Ram Krishna, Man Chun Leong, Tan Lei Lai, Pascal Hersen, Alexandre J. Kabla, Chwee Teck Lim, et Benoît Ladoux. 2012. « Emerging Modes of Collective Cell Migration Induced by Geometrical Constraints ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (32): 12974-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119313109>.
- Verma, Suzie, Annette M. Shewan, Jeanie A. Scott, Falak M. Helwani, Nicole R. den Elzen, Hiroaki Miki, Tadaomi Takenawa, et Alpha S. Yap. 2004. « Arp2/3 Activity Is Necessary for Efficient Formation of E-Cadherin Adhesive Contacts ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 34062-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404814200>.
- Vicente-Manzanares, Miguel, Xuefei Ma, Robert S. Adelstein, et Alan Rick Horwitz. 2009. « Non-Muscle Myosin II Takes Centre Stage in Cell Adhesion and Migration ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10 (11): 778-90. <https://doi.org/10.1038/nrm2786>.
- Vignjevic, Danijela, Shin-ichiro Kojima, Yvonne Aratyn, Oana Danciu, Tatyana Svitkina, et Gary G. Borisy. 2006. « Role of Fascin in Filopodial Protrusion ». *Journal of Cell Biology* 174 (6): 863-75. <https://doi.org/10.1083/jcb.200603013>.
- Vignjevic, Danijela, Defne Yazar, Matthew D. Welch, John Peloquin, Tatyana Svitkina, et Gary G. Borisy. 2003. « Formation of Filopodia-like Bundles in Vitro from a Dendritic Network ». *Journal of Cell Biology* 160 (6): 951-62. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208059>.
- Vigouroux, Clémence, Véronique Henriot, et Christophe Le Clainche. 2020. « Talin Dissociates from RIAM and Associates to Vinculin Sequentially in Response to

- the Actomyosin Force ». *Nature Communications* 11 (1): 3116. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16922-1>.
- Volk, T, et B Geiger. 1986. « A-CAM: A 135-KD Receptor of Intercellular Adherens Junctions. II. Antibody-Mediated Modulation of Junction Formation. » *The Journal of Cell Biology* 103 (4): 1451-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.4.1451>.
- Wang, Hong, Clémence Vigouroux, Rayan Said, Véronique Henriot, Julien Pernier, et Christophe Le Clainche. 2022. « Talin and Vinculin Combine Their Activities to Trigger Actin Assembly ». Preprint. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1101/2022.12.01.518757>.
- Wang, Ning, James P. Butler, et Donald E. Ingber. 1993. « Mechanotransduction Across the Cell Surface and Through the Cytoskeleton ». *Science* 260 (5111): 1124-27. <https://doi.org/10.1126/science.7684161>.
- Weiss, Elisabeth E., Martina Kroemker, Angelika-H. Rüdiger, Brigitte M. Jockusch, et Manfred Rüdiger. 1998. « Vinculin Is Part of the Cadherin–Catenin Junctional Complex: Complex Formation between α -Catenin and Vinculin ». *Journal of Cell Biology* 141 (3): 755-64. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.3.755>.
- Wen, Kuo-Kuang, Peter A. Rubenstein, et Kris A. DeMali. 2009. « Vinculin Nucleates Actin Polymerization and Modifies Actin Filament Structure ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (44): 30463-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.021295>.
- Wiesner, S. 2006. « Purification of Skeletal Muscle Actin ». In *Cell Biology*, 2:173-75. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012164730-8/50097-6>.
- Winkelman, Jonathan D., Colleen G. Bilancia, Mark Peifer, et David R. Kovar. 2014. « Ena/VASP Enabled Is a Highly Processive Actin Polymerase Tailored to Self-Assemble Parallel-Bundled F-Actin Networks with Fascin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (11): 4121-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322093111>.
- Wioland, Hugo, Berengere Guichard, Yosuke Senju, Sarah Myram, Pekka Lappalainen, Antoine Jégou, et Guillaume Romet-Lemonne. 2017. « ADF/Cofilin Accelerates Actin Dynamics by Severing Filaments and Promoting Their Depolymerization at Both Ends ». *Current Biology* 27 (13): 1956-1967.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.05.048>.
- Xiao, Kanyan, Rebecca G. Oas, Christine M. Chiasson, et Andrew P. Kowalczyk. 2007. « Role of P120-Catenin in Cadherin Trafficking ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1773 (1): 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.005>.
- Xu, Xiao-Ping, Sabine Pokutta, Megan Torres, Mark F Swift, Dorit Hanein, Niels Volkmann, et William I Weis. 2020. « Structural Basis of AE-Catenin–F-Actin Catch Bond Behavior ». *ELife* 9 (septembre): e60878. <https://doi.org/10.7554/eLife.60878>.
- Yamada, Soichiro, et W. James Nelson. 2007. « Localized Zones of Rho and Rac Activities Drive Initiation and Expansion of Epithelial Cell–Cell Adhesion ». *Journal of Cell Biology* 178 (3): 517-27. <https://doi.org/10.1083/jcb.200701058>.

- Yamada, Soichiro, Sabine Pokutta, Frauke Drees, William I. Weis, et W. James Nelson. 2005. « Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex ». *Cell* 123 (5): 889-901. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.020>.
- Yano, Tomoki, Takeshi Matsui, Atsushi Tamura, Masami Uji, et Sachiko Tsukita. 2013. « The Association of Microtubules with Tight Junctions Is Promoted by Cingulin Phosphorylation by AMPK ». *Journal of Cell Biology* 203 (4): 605-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.201304194>.
- Yao, Mingxi, Wu Qiu, Ruchuan Liu, Artem K. Efremov, Peiwen Cong, Rima Seddiki, Manon Payre, et al. 2014. « Force-Dependent Conformational Switch of α -Catenin Controls Vinculin Binding ». *Nature Communications* 5 (1): 4525. <https://doi.org/10.1038/ncomms5525>.
- Yonemura, S., M. Itoh, A. Nagafuchi, et S. Tsukita. 1995. « Cell-to-Cell Adherens Junction Formation and Actin Filament Organization: Similarities and Differences between Non-Polarized Fibroblasts and Polarized Epithelial Cells ». *Journal of Cell Science* 108 (1): 127-42. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.1.127>.
- Yonemura, Shigenobu. 2017. « Actin Filament Association at Adherens Junctions ». *The Journal of Medical Investigation: JMI* 64 (1.2): 14-19. <https://doi.org/10.2152/jmi.64.14>.
- Yonemura, Shigenobu, Yuko Wada, Toshiyuki Watanabe, Akira Nagafuchi, et Mai Shibata. 2010. « Alpha-Catenin as a Tension Transducer That Induces Adherens Junction Development ». *Nature Cell Biology* 12 (6): 533-42. <https://doi.org/10.1038/ncb2055>.
- Zhang, Juankun, Martha Betson, Jennifer Erasmus, Kostas Zeikos, Maryse Bailly, Louise P. Cramer, et Vania M. M. Braga. 2005. « Actin at Cell-Cell Junctions Is Composed of Two Dynamic and Functional Populations ». *Journal of Cell Science* 118 (23): 5549-62. <https://doi.org/10.1242/jcs.02639>.
- Zhang, Yunxiang, Sanjeevi Sivasankar, W. James Nelson, et Steven Chu. 2009. « Resolving Cadherin Interactions and Binding Cooperativity at the Single-Molecule Level ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (1): 109-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811350106>.
- Zihni, Ceniz, Clare Mills, Karl Matter, et Maria S. Balda. 2016. « Tight Junctions: From Simple Barriers to Multifunctional Molecular Gates ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17 (9): 564-80. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>.
- Zimmermann, Jürgen, Dirk Labudde, Thomas Jarchau, Ulrich Walter, Hartmut Oschkinat, et Linda J. Ball. 2002. « Relaxation, Equilibrium Oligomerization, and Molecular Symmetry of the VASP (336–380) EVH2 Tetramer ». *Biochemistry* 41 (37): 11143-51. <https://doi.org/10.1021/bi020379x>.

ANNEXE

ARTICLE 2: La TALINE ET LA VINCULINE COMBINENT LEURS ACTIVITÉS POUR DÉCLENCHER L'ASSEMBLAGE DE L'ACTINE. (EN RÉVISION)

Référence BiorXiv : <https://doi.org/10.1101/2022.12.01.518757>

Les adhésions focales (AF) renforcent leur lien avec le cytosquelette d'actine pour résister à la force. L'association taline-vinculine pourrait renforcer l'ancrage de l'actine aux AF en contrôlant la polymérisation de l'actine. Cependant, l'activité de polymérisation de l'actine du complexe taline-vinculine n'est pas connue car elle nécessite la reconstitution des étapes d'activation mécanique et biochimique qui contrôlent l'association de la taline et de la vinculine et l'exposition de leurs domaines de liaison à l'actine. En combinant des essais cinétiques et de liaison avec des observations de filaments d'actine uniques en microscopie TIRF, nous montrons que l'association de mutants de taline et de vinculine, mimant différents degrés d'activation, entraîne une variété d'activités. En particulier, la taline étirée mécaniquement et la vinculine activée se combinent pour stimuler l'assemblage de l'actine de manière synergique par un mécanisme séquentiel dans lequel les filaments sont nucléés, coiffés et libérés pour s'allonger. Nos résultats suggèrent un mécanisme polyvalent pour la régulation de l'assemblage de l'actine dans les AF soumises à diverses combinaisons de signaux biochimiques et mécaniques.

Dans ce travail, j'ai contribué à la purification des protéines, aux expériences de cinétiques présentées dans les figures 1, 2 et 3 et à leur quantification.

Talin and vinculin combine their activities to trigger actin assembly

Hong Wang, Clémence Vigouroux*, Rayan Said*, Véronique Henriot, Julien Pernier
and Christophe Le Clainche #

Université Paris-Saclay, CEA, CNRS,
Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC),
91198, Gif-sur-Yvette, France.

To whom correspondence should be addressed:
christophe.leclainche@i2bc.paris-saclay.fr

* Equal contribution

Abstract

Focal adhesions (FAs) strengthen their link with the actin cytoskeleton to resist force. Talin-vinculin association could reinforce actin anchoring to FAs by controlling actin polymerization. However, the actin polymerization activity of the talin-vinculin complex is not known because it requires the reconstitution of the mechanical and biochemical activation steps that control the association of talin and vinculin and the exposure of their actin-binding domains. By combining kinetic and binding assays with single actin filament observations in TIRF microscopy, we show that the association of talin and vinculin mutants, mimicking different degrees of activation, results in a variety of activities. In particular, mechanically stretched talin and activated vinculin combine to stimulate actin assembly synergistically through a sequential mechanism in which filaments are nucleated, capped and released to elongate. Our findings suggest a versatile mechanism for the regulation of actin assembly in FAs subjected to various combinations of biochemical and mechanical cues.

Keywords: adhesion, actin, talin, vinculin

Introduction

To migrate efficiently in different tissues, cells must sense and adapt to variations of the mechanical properties of their environment. In this adaptive process, focal adhesions (FAs) can strengthen their link with the extracellular matrix (ECM) and the actomyosin stress fibers (Ciobanasu et al., 2013; Gardel et al., 2010; Geiger et al., 2009). FAs are composed of transmembrane integrins that mechanically couple the ECM to the actomyosin cytoskeleton, via a variety of actin binding proteins (ABPs) (Bachmann et al., 2019; Ciobanasu et al., 2013; Le Clainche and Carlier, 2008; Romero et al., 2020).

The mechanical coupling of stress fibers to FAs is highly regulated. The anchoring of actin filaments to FAs can be modulated by the degree of engagement of a molecular clutch composed of sliding layers of interacting proteins, including ABPs (Gardel et al., 2010; Hu et al., 2007). The regulation of the polymerization of the actin filaments that compose the stress fibers may also determine the level of their mechanical coupling to FAs (Ciobanasu et al., 2013). Interestingly, FAs associated with elongating dorsal stress fibers are associated with low traction forces, whereas FAs associated with non-elongating ventral stress fibers are associated with high traction forces (Tojkander et al., 2015). This inverse correlation between the elongation of the actin filaments and the transmission of force to the ECM sheds light on the importance of force-dependent ABPs which control actin assembly in FAs.

Biochemical and cellular studies have described a variety of ABPs associated with FAs that regulate the elongation of actin filament barbed ends. Early in vitro studies showed that the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) nucleates actin filaments and assembles them into bundles (Laurent et al., 1999). More recent studies demonstrate that VASP can also elongate actin filament barbed ends in a processive manner (Breitsprecher et al., 2011, 2008; Hansen and Mullins, 2010). Similarly, a series of studies suggested that formins are involved in the processive elongation of stress fibers in cells (Hotulainen and Lappalainen, 2006; Tojkander et al., 2011). Talin and vinculin, which associate in response to the actomyosin force, could link force sensing to the control of actin polymerization in FAs.

Vinculin is an autoinhibited ABP in which the single actin-binding domain (ABD), called vinculin tail (V_t), is masked by an intramolecular interaction with vinculin head (V_h) (Johnson and Craig, 1995). Biochemical studies showed that isolated V_t binds actin filaments and assembles them into bundles (Huttelmaier et al., 1997; Janssen et al., 2006). We showed that V_t also caps actin filament barbed ends and nucleates actin filaments (Le Clainche et al., 2010). All these activities of V_t are masked by V_h in the autoinhibited conformation of vinculin.

Talin is a large ABP composed of a FERM domain, subdivided into F0, F1, F2, F3,

and a rod domain made of 13 helical bundles (R1 to R13) (Ciobanasu et al., 2013). The two major intramolecular interactions F3-R9 and F2-R12 keep talin in an autoinhibited form (Dedden et al., 2019; Goult et al., 2009). Talin contains three ABDs. ABD1, ABD2 and ABD3 correspond to the head (F2F3), the central region (R4-R8) and the last C-terminal bundle (R13) respectively (Hemmings et al., 1996). We previously demonstrated that the N-terminal ABD1 of talin blocks the elongation of actin filament barbed ends in low ionic strength conditions, whereas ABD2 and ABD3 do not affect actin dynamics (Ciobanasu et al., 2018). Full-length talin is inactive because ABD1 is inhibited by the F3-R9 intramolecular interaction.

Biochemical and structural studies revealed the presence of 11 vinculin binding sites (VBSs) buried in some of the 13 helical bundles of talin (Gingras et al., 2005). The stretching of single molecules of talin revealed that force exposes several of these 11 cryptic VBSs along talin rod domain (del Rio et al., 2009; Goult et al., 2018; Yao et al., 2016). Using an *in vitro* reconstitution approach, we demonstrated that the actomyosin force is sufficient to stretch talin, allowing its binding to vinculin (Ciobanasu et al., 2014). The release of talin autoinhibition also favors the low-affinity constitutive binding of vinculin (Atherton et al., 2020).

In order for the V_h domain of vinculin to interact with talin VBSs, it is necessary to release it from its autoinhibitory interaction with V_t (Johnson and Craig, 1994). Although the mechanism of activation of vinculin is not fully understood, several studies show that once vinculin is bound to talin, the interaction of V_t with actomyosin keeps vinculin under tension in its open conformation (Carisey et al., 2013; Chen et al., 2006; Grashoff et al., 2010; Hirata et al., 2014; Humphries et al., 2007). In this mechanism, the actomyosin-dependent talin-vinculin complex acts as a catch-bond that releases V_t to strengthen the anchoring to actomyosin whose contraction initially induced its formation (Atherton et al., 2015; Ciobanasu et al., 2014; Hirata et al., 2014).

Because force is required to trigger vinculin association to talin, and because the two proteins are autoinhibited, it has so far been impossible to determine the ability of the talin-vinculin complex to regulate actin polymerization. Here, we designed a series of talin and vinculin mutants that associate constitutively into a stable complex. By combining kinetic studies in fluorescence spectroscopy, actin binding assays and single actin filament observations in TIRF microscopy, we determined the activities of these mutants and their complexes on actin binding and polymerization. Altogether our data reveal a force-dependent mechanism of actin assembly in FAs.

Results

The release of the two autoinhibitory contacts of vinculin allows F-actin binding and barbed-end capping but not nucleation.

Before starting the study of the talin-vinculin complex, we deciphered the complex mechanism that links the autoinhibition of vinculin and its activities. Indeed, biochemical and structural studies have revealed that the auto-inhibition of vinculin is controlled by two interfaces between V_t and the D1 and D4 subdomains of the head (Bakolitsa et al., 2004; Cohen et al., 2005; Le Clainche et al., 2010) (Figure 1A).

In order to disrupt specifically both autoinhibitory interfaces, we designed a series of point mutations of amino acids in D1 and D4 that interact with V_t . Because the contact surface between V_t and D1 is significantly larger than the D4- V_t one, we mutated two separate groups of charged amino acids in the D1- V_t interface: E28K, D33H referred to as V_{1a} and D110H, R113E referred to as V_{1b} (Figure 1A). Their combination is referred to as V_{1ab} . In D4, we designed a double mutation N773I, E775K called V_4 (Figure 1A). In most of our comparative studies, we used full-length vinculin (V_{FL}), the isolated ABD V_t and the following combinations of point mutants: V_{1a} , V_{1ab} , V_4 , V_{1a4} , V_{1b4} , V_{1ab4} .

We first characterized these vinculin mutants by measuring their binding to actin filaments (F-actin) using a cosedimentation assay. As previously reported, the autoinhibited V_{FL} does not cosediment with F-actin (Le Clainche et al., 2010) (Figure 1B, Supplementary Figure 1A). Among the mutants, V_{1a4} and V_{1ab4} display the highest affinity for F-actin, close to that of V_t , which indicates that V_t is almost completely exposed in these mutants (Figure 1B, Supplementary Figure 1B, C, D). In contrast V_4 and V_{1b4} do not bind to F-actin (Figure 1B, Supplementary Figure 1E, F). Finally, V_{1a} and V_{1ab} display low to intermediate binding levels (Figure 1B, Supplementary Figure 1G, H). Altogether, these data demonstrate that the complete release of the D1- V_t contact is sufficient to partially expose the F-actin binding site of V_t , whereas releasing D4 alone is not sufficient. The combined release of D4 and D1 is required to fully expose V_t (Supplementary Table 1).

We then tested the effect of these vinculin mutants on actin nucleation by measuring the acceleration of the kinetics of pyrenyl-labeled actin assembly in low ionic strength condition, which corresponds to 25 mM KCl, while the salt concentration normally used by the vast majority of laboratories is 50 mM KCl and sometimes 100 mM KCl. Several studies have revealed regulation mechanisms and activities of FA proteins, such as vinculin, talin and VASP, by varying the ionic strength of in vitro assays (Dedden et al., 2019; Laurent et al., 1999; Le Clainche et al., 2010). We first confirmed that V_t nucleates actin filament in a dose-dependent manner (Le Clainche et al., 2010) (Figure 1C, Supplementary Figure 2A). Unlike V_t , most vinculin mutants

do not show significant actin nucleation activities (Figure 1C, Supplementary Figure 2B-G, Supplementary Table 1). Although their activities are very weak, the kinetics showed that V_{1a4} and V_{1ab4} are the only mutants to display a measurable activity (inset in Figure 1C, Supplementary Figure 2F, G), suggesting that the release of V_t from both D1 and D4 is necessary to nucleate actin, but not sufficient to fully expose this activity of V_t .

These two series of experiments lead to an apparent contradiction, since the release of the 2 contacts D1- V_t and D4- V_t is sufficient to expose V_t and allow it to bind to F-actin (Figure 1B), but not to nucleate actin filaments (Figure 1C). We hypothesized that, in addition to releasing the D1- V_t and D4- V_t contacts, F-actin, which is present in cosedimentation assays but absent at the beginning of the nucleation assays, contributes to the opening of vinculin by binding to V_t . To test this hypothesis, we compared the ability of vinculin mutants to cap preexisting actin filament barbed ends. The effect of vinculin mutants on barbed end capping was first assessed by measuring the inhibition of pyrenyl-labeled actin polymerization in the presence of spectrin-actin seeds (Le Clainche et al., 2010). Although V_{FL} , V_{1a} , V_{1ab} and V_4 display only weak activity (Figure 1D, Supplementary Figure 3A-D), V_{1a4} and V_{1ab4} strongly inhibit the elongation of preexisting actin filament barbed ends, in agreement with our hypothesis (Figure 1D, Supplementary Figure 3E, F, Supplementary Table 1).

An isolated vinculin-binding domain of talin promotes vinculin binding to F-actin but has no effect on barbed-end capping and nucleation.

Before determining the activity of the talin-vinculin complex, it was necessary to determine whether and how the simple binding of talin to vinculin, independently of the activities of talin ABDs, influences the activities of vinculin described above (Figure 1). We therefore used a short domain of talin, called VBS_1 (talin 482-636) corresponding to R1 deleted from its last helix, which exposes one VBS (Le Clainche et al., 2010) (Supplementary Figure 4).

We tested the effect of increasing concentrations of VBS_1 (0-10 μ M) on the ability of vinculin mutants to bind to F-actin, using a cosedimentation assay (Figure 1E). VBS_1 induces the binding of vinculin to F-actin with various efficiencies, depending on mutations in vinculin autoinhibitory contacts. VBS_1 induces a near two-fold increase in V_{FL} binding to F-actin (Figure 1E, Supplementary Figure 5A). The weakening of D1- V_t increases the effect of VBS_1 , which results in a three-fold increase in the binding of V_{1a} to F-actin (Figure 1E, Supplementary Figure 5B). Finally, mutations in D4, alone or combined with mutations in D1, conferred to VBS_1 its highest efficiency, as shown by the 5-6-fold increase in V_4 and V_{1b4} binding of F-actin (Figure 1E, Supplementary Figure 5C, D). Taken together, our data show that VBS_1 binding to D1 mimics mutations in D1, explaining why the combination of VBS_1 with mutations in D4 mimics the effect of mutations in both D1 and D4 observed previously in Figure

1B (Supplementary Table 1).

VBS₁ did not increase the nucleation activity of vinculin mutants (Figure 1F, Supplementary Figure 6A-H, Supplementary Table 1), which remains negligible compared to that of V_t (Figure 1F, Supplementary Figure 6I). This assay, in which F-actin is initially absent, further supports the importance of F-actin as a co-activator of vinculin.

Surprisingly, increasing concentrations of VBS₁ do not change the ability of vinculin mutants to cap actin filament barbed ends in a spectrin-actin seed assay (Figure 1G, Supplementary Figure 7A-E, Supplementary Table 1). The fact that VBS₁ does not increase the ability of V₄ to inhibit barbed end elongation at the same level as V_{1ab4} alone indicates that VBS₁ binding to D1 is less efficient than D1 mutations in this polymerization assay. The fact that VBS₁ activates V₄ in the cosedimentation assay described above (Figure 1E), and not in a kinetic assay (Figure 1G), could be due to the higher concentration of the co-activator F-actin in the cosedimentation assay.

Talin with exposed VBSs promotes vinculin-dependent barbed-end capping but has no effect on nucleation.

After determining the contribution of an isolated talin VBS to the activity of vinculin, we designed a series of full-length talin constructs (T_{Δ1}, T_{Δ2}, T_{Δ3}) in which VBSs are exposed (Figure 2A, Supplementary Figure 4), in order to study the activity of a constitutive talin-vinculin complex harbouring the ABDs of both proteins. We first designed a construct, referred to as T_{Δ1}, in which the helix 5 of the helical bundle R1 is deleted, which exposes the same VBS than that of the construct called VBS₁ used in Figure 1. Talin T_{Δ2} has been designed to expose two consecutive VBSs in R3, thanks to the deletion of the 2 helices 10 and 13 located on both sides of the two VBSs. Talin T_{Δ3} combines the mutations of T_{Δ1} and T_{Δ2}. We first verified the efficiency of deletions performed in T_{Δ1}, T_{Δ2}, T_{Δ3} using a micropatterning-based binding assay adapted from our previous work (Ciobanasu et al., 2015, 2014; Vigouroux et al., 2020). Hence, T_{Δ1}, T_{Δ2}, T_{Δ3} constructs immobilized on micropatterned surfaces recruit the head of vinculin fused to EGFP (V_h-EGFP) more efficiently than the wild-type T_{FL} (Figure 2B, C). Because it is impossible to distinguish the relative contribution of each protein in the talin-vinculin complex to F-actin binding, we did not perform cosedimentation assays for this part of the study.

We already showed that VBS₁, which does not include the ABDs of talin, is not sufficient to promote vinculin capping activity (Figure 1G). We then determined the contribution of the ABD domains of talin to the barbed-end capping activity of the talin-vinculin complex. To this aim, we combined the talin mutants with the V_{1a} mutant of vinculin which does not efficiently cap actin barbed ends alone (Figure 1D), nor in the presence of VBS₁ (Figure 1G). In the presence of a fixed concentration of V_{1a},

addition of increasing concentrations of $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$ and $T_{\Delta 3}$ induced a dose-dependent inhibition of barbed-end elongation in a spectrin-actin seed assay (Figure 2D, Supplementary Figure 8B-D, Supplementary Table 1). Wild-type full-length talin (T_{FL}) also induced barbed-end inhibition in the presence of V_{1a} , but with a lower efficiency than $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$ and $T_{\Delta 3}$ (Figure 2D, Supplementary Figure 8A, Supplementary Table 1). This effect is not due to talin constructs alone and requires the presence of V_{1a} since T_{FL} , $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$ and $T_{\Delta 3}$ alone had no effect on barbed end elongation (Figure 2D, Supplementary Figure 9A-D). The fact that the fully autoinhibited V_{FL} does not combine with T_{FL} , $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$ and $T_{\Delta 3}$ to inhibit barbed end elongation confirms that vinculin activation is required for this activity (Supplementary Figure 10A-E).

We then tested the ability of the talin-vinculin complex to stimulate actin assembly by combining the talin mutants with the vinculin mutant V_{1ab4} . The mutant V_{1ab4} appeared to be the ideal choice here because it is close to the fully open conformation (Figure 1A). We hypothesized that the weak nucleation activity of V_{1ab4} , (Figure 1C, Supplementary Figure 2G), could be increased by talin binding to vinculin head and the activity of talin ABDs. However, kinetic assays containing V_{1ab4} and T_{FL} , $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$ or $T_{\Delta 3}$, do not reveal a significant nucleation activity compared to the activity of V_t alone, and it was not higher than that of V_{1ab4} alone (Figure 2E, Supplementary Figure 11A-D, Supplementary Table 1).

A talin-vinculin complex, in which all autoinhibitory contacts are released, nucleates actin filaments transiently capped at their barbed ends.

The results obtained with the previous talin mutants may only partially reflect the activity of the talin-vinculin complex because talin remains autoinhibited by the F3-R9 and F2-R12 contacts (Dedden et al., 2019; Goult et al., 2009). We previously demonstrated that the F3-R9 contact masks the capping activity of talin ABD1 (Ciobanasu et al., 2018). Therefore, we hypothesized that releasing these autoinhibitory contacts in talin may unravel additional activities of the talin-vinculin complex. To test this hypothesis, we designed three talin constructs, called $T_{\Delta AI}$, $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ (Figure 3A, Supplementary Figure 4). $T_{\Delta AI}$ corresponds to T_{FL} deleted from the region encompassing the auto-inhibitory (AI) modules R9 and R12. $T_{\Delta 1\Delta AI}$ combines the deletion of the AI region (ΔAI) and the deletion that exposes a VBS in R1 ($\Delta 1$). $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ combines the ΔAI and $\Delta 1$ deletions with the deletion of the second actin binding domain ($\Delta ABD2$).

In a spectrin-actin seed assay, increasing concentrations of $T_{\Delta AI}$ and $T_{\Delta 1\Delta AI}$ stimulated the barbed-end capping activity of V_{1a} but not that of V_{FL} (Figure 3B, Supplementary Figure 12A-E, Supplementary Table 1). Altogether these experiments show that releasing the autoinhibitions of talin favors its association with vinculin to form a complex that caps actin filament barbed ends, provided that vinculin autoinhibition is

also weakened. The fact that $T_{\Delta 1\Delta AI}$ is much more effective than $T_{\Delta AI}$ for this activity further indicates that the release of the autoinhibition of talin adds to the VBS exposure in R1 to promote vinculin binding. The strong barbed-end capping activity of the complex made of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and V_{1a} , but not V_{FL} , also indicates that talin ABD2 is not required for this activity (Figure 3C, Supplementary Figure 13A-C, Supplementary Table 1). The number and position of exposed VBSs influence the barbed end capping activity of the complex since $T_{\Delta 2\Delta AI}$, in which two VBSs are exposed in R3, and $T_{\Delta 3\Delta AI}$, in which three VBSs are exposed in R1 and R3, combine efficiently with V_{FL} to cap actin filaments (Supplementary Figure 14A-E, Supplementary Table 1), in contrast with $T_{\Delta 1\Delta AI}$, in which only one VBS is exposed in R1 (Figure 3B).

We then tested the effect of complexes composed of $T_{\Delta AI}$, $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and vinculin mutants on actin nucleation. Increasing concentrations of $T_{\Delta AI}$ and $T_{\Delta 1\Delta AI}$ stimulated actin assembly in the presence of V_{1ab4} but not in the presence of V_{FL} (Figure 3D, Supplementary Figure 15A-D, Supplementary Table 1). As for the capping activity (Figure 3B), $T_{\Delta 1\Delta AI}$ is much more effective than $T_{\Delta AI}$ for the nucleation activity, indicating that, in addition to the release of talin autoinhibition, VBS exposure is required for talin and vinculin to form a nucleation complex (Figure 3D, Supplementary Figure 15C,D). The number and position of exposed VBSs influence this activity of the complex since a complex made of V_{1ab4} and $T_{\Delta 3\Delta AI}$, in which three VBSs are exposed in R1 and R3, is slightly more active than complexes made of V_{1ab4} and $T_{\Delta 1\Delta AI}$ or $T_{\Delta 2\Delta AI}$, in which one or two VBSs are exposed respectively (Supplementary Figure 16A-F, Supplementary Table 1).

The fact that combinations of activated vinculin V_{1ab4} with auto-inhibited talin ($T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$ and $T_{\Delta 3}$) do not stimulate actin assembly indicates that autoinhibited ABDs in talin play a critical role in this mechanism. To determine the relative importance of the ABDs of talin and vinculin for the activity of the complex, we tested various constructs of the two proteins deleted for ABDs and we added competitors of ABDs to polymerization reactions. First, we showed that talin ABD2 is not necessary since $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$, lacking ABD2, efficiently combines with V_{1ab4} to stimulate actin assembly (Figure 3E, Supplementary Figure 17A-C, Supplementary Table 1). We also compared the ability of talin constructs containing VBSs and either ABD1 or ABD3 to stimulate actin assembly in the presence of V_{1ab4} . We found that ABD1 and ABD3 can combine with vinculin to stimulate actin polymerization, suggesting redundancy between ABD1 and ABD3 (Supplementary Figure 18A). Interestingly, the addition of the isolated R9 domain of talin to a polymerization reaction containing $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and V_{1ab4} reduces the stimulation of actin assembly (Supplementary Figure 18B). This result confirms that ABD1, which is masked by R9 in inactive talin (Ciobanasu et al., 2018), is involved in this activity. Finally, combinations of various activated talin constructs with vinculin head (V_h), which lacks its ABD V_t , failed to block the

elongation of actin filament barbed ends or stimulate actin assembly, indicating a critical role of V_t in all activities of the talin-vinculin complex (Supplementary Figure 19A-B). Altogether our observations indicate that ABD1 and ABD3 domains of talin, as well as the V_t domain of vinculin, are involved in the activities of the complex.

To confirm the mechanism by which the talin-vinculin complex regulates actin assembly, we observed in TIRF microscopy the actin filaments produced by the complex made of V_{1ab4} and $T_{\Delta 1\Delta AI}$ or $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ described above. Representative images and quantifications showed that the $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} complex induces the formation of a higher number of actin filaments than $T_{\Delta 1\Delta AI}$ alone or V_{1ab4} alone (Figure 4A, C, Supplementary Movie 1). We found the same result for $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ - V_{1ab4} complex (Figure 4B, D, Supplementary Movie 2). Interestingly, the analysis of actin filament elongation showed that they undergo frequent pauses reflecting barbed end capping events (Figure 4E, F). The exponential fit of the distribution of the pause duration gave an estimated dissociation rate constant of 0.006 s^{-1} ($t_{1/2} = 110\text{ s}$) for $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} and 0.009 s^{-1} ($t_{1/2} = 75\text{ s}$) for $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ - V_{1ab4} (Figure 4G).

Finally, we followed fluorescent molecules of vinculin, talin and actin in real time during the nucleation and capping of individual actin filaments. We first immobilized pre-formed complexes of $T_{\Delta 1\Delta AI}$ -Alexa594 and V_{1ab4} -Alexa647 at low concentration on a glass surface passivated with PLL-PEG and added actin-Alexa488 under conditions that allowed nucleation and capping. This experimental setup allowed us to capture sequences of events in which spots, containing both talin and vinculin, associate with actin and release a growing actin filament (Figure 5A, Supplementary Movie 3). In this experiment, as in FAs that form in cells, talin, and under certain conditions vinculin, are dimers that assemble with high stoichiometry. The observed spots therefore contain several molecules of $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and V_{1ab4} that assemble via the exposed VBS of $T_{\Delta 1\Delta AI}$ but also via other VBSs with lower affinity as indicated by the activity of the $T_{\Delta AI}$ - V_{1ab4} experiments (Figure 3D). The stationary fiduciary marks along actin filaments indicate that the talin-vinculin complex remains associated with the pointed end while the barbed end is free to grow on the other side (black arrow head, Figure 5A). Interestingly, nucleation events are often characterized by the existence of a delay between actin recruitment by a talin-vinculin complex and the elongation of a filament (Figure 5B, Supplementary Movie 4). In this series of experiments, pre-existing filaments are also captured and capped at their barbed end (Figure 5C, Supplementary Movie 5). Barbed-end capping is transient as many of the capped filaments are eventually left free to elongate after a delay (Figure 5D, Supplementary Movie 6). These activities lead to a distribution of talin-vinculin complexes at the pointed end of the filaments, following their nucleation, at the barbed end of the filaments, following their capping, or on the side of the filaments (Figure 5E). Quantification of the delay between actin recruitment and elongation allows to determine a rate (0.0047 s^{-1} , $t_{1/2} = 147\text{ s}$, Figure 5E), that is close to the

dissociation rate of the barbed ends from the talin-vinculin complex observed previously (Figure 4G), suggesting that the talin-vinculin complex nucleates filaments initially capped at their barbed end.

Altogether, our direct observations reveal a mechanism in which talin and vinculin, in their active conformations, form a complex that nucleates actin filaments transiently capped at their barbed ends before being released and free to elongate (Figure 6). The talin-vinculin complex may also follow part of this mechanism to cap pre-existing filaments (Figure 6).

Discussion

The assembly of the talin-vinculin complex is a key step in the reinforcement of cell-matrix adhesions subjected to a mechanical stimulus such as the force generated by the actomyosin stress fibers. This complex strengthens the link with the tensile actomyosin cytoskeleton to resist the force it applies. However, the mechanisms by which the force-dependent complex acts on actin filaments was poorly understood.

The mechanistic study of the talin-vinculin complex has long been limited by the fact that the assembly of the complex depends on the release of multiple autoinhibitory interactions both in talin and in vinculin. Although it is established that force exposes cryptic vinculin binding sites in talin by stretching helical bundles, the mechanisms allowing the release of the additional autoinhibitory interactions between distant domains in talin are not fully understood. The structure of full-length talin in its autoinhibited form has been reported recently and revealed that, in addition to the known interaction between F3 and R9, the F2 domain interacts with the R12 domain (Dedden et al., 2019; Goult et al., 2009). These autoinhibitory contacts mask the binding interface of ABD1, corresponding to F2 and F3, with F-actin, while ABD2, composed of R4 and R8, is masked by an interaction with R3 (Atherton et al., 2020; Ciobanasu et al., 2018; Dedden et al., 2019) (Figure 6). The mechanism by which these contacts are disrupted is unclear. The binding of RIAM and PIP2 to talin F3 is known to disrupt the F3-R9 autoinhibition (Yang et al., 2014). Once these two interdomain interactions are disrupted, talin can be pulled by actomyosin force, which stretches helical bundles to expose cryptic VBSs (del Rio et al., 2009; Yao et al., 2016) (Figure 6). Force application to the ABD3/R13 domain of talin could also contribute to disrupting its auto-inhibitions, but no experimental evidence of such a mechanism has been reported to date. This mechanism is possible because the ABD3 domain is exposed, at least partially, in the inactive talin, as suggested by the flexibility of the neighboring domains (Dedden et al., 2019). In this study, we show that combining various deletions, including the part of talin that contains the R9 and R12 autoinhibitory domains, with the deletion of individual helices, which exposes VBSs, mimics the open and mechanically stretched conformation of talin (Figure 6).

Our results show that the release of talin autoinhibition is sufficient to allow the binding of vinculin and form a complex that caps and nucleates actin, which explains the observation made by others that a mutation in talin that disrupts the F3-R9 interaction is sufficient to recruit vinculin in cells (Atherton et al., 2020). Our data also support the findings that the association of talin and vinculin without tension is required for efficient nascent adhesion maturation (Han et al., 2021). This interaction likely corresponds to a low degree of saturation of the partially exposed VBSs in this open talin structure that has become very flexible. Indeed, exposure of a single VBS motif in R1 significantly increases vinculin binding as evidenced by the enhanced activity of the talin-vinculin complex.

Vinculin is autoinhibited by an intramolecular interaction between the head (V_h) and the tail (V_t) domains. Talin binding to the D1 subdomain of V_h is controlled by the D1- V_t interaction (Johnson and Craig, 1994), whereas F-actin binding to V_t is controlled by a more complex mechanism involving interactions of D1 and D4 with both sides of V_t (Cohen et al., 2005; Johnson and Craig, 1995; Le Clainche et al., 2010). The identification of several intermediate open conformations of vinculin suggests that the level of activation of vinculin is controlled by the number of auto-inhibitory contacts removed (Chorev et al., 2018). Our vinculin mutagenesis strategy confirmed that V_t activities are controlled by different combinations of V_h - V_t autoinhibitory contacts. The disruption of D1- V_t is sufficient to induce F-actin binding to V_t , but the combination of D1 and D4 mutations provides a higher affinity for F-actin. In the present study we show that the disruption of D1- V_t is not sufficient to expose the capping activity of V_t , which requires the combined disruption of D1 and D4 contacts with V_t , as previously suggested (Le Clainche et al., 2010). Early studies showed that the coincidental binding of talin and F-actin to D1 and V_t respectively keep vinculin in its open conformation (Chen et al., 2006). In agreement with this model, full-length vinculin dissociates rapidly from FAs after actomyosin inhibition, whereas V_h remains stably associated, demonstrating that tensile actomyosin stress fibers bound to V_t maintain the open conformation of talin-bound vinculin (Carisey et al., 2013; Humphries et al., 2007). This observation is further explained by the discovery that V_t forms a catch bond with F-actin in response to force (Huang et al., 2017). It is therefore not surprising that the release of D1 and D4 from V_t in our experiments releases the capping activity of vinculin that occurs in the presence of actin filaments, but results in very little actin nucleation initiated without actin filaments.

Solving the problem of releasing the auto-inhibitory contacts of talin and vinculin was a prerequisite for determining the activity that results from the combination of their ABDs. It is interesting to remember that the combination of actin-binding proteins within transient complexes is often found in important signal-responsive mechanisms for regulating actin dynamics. However, the results of such combinations cannot be predicted from the activities of the isolated proteins, as exemplified by the formation

of branched actin filaments resulting from the combination of WASP and Arp2/3 (Le Clainche and Carlier, 2008). Here, we show that the combination of talin ABDs with vinculin V_t in a complex creates a machinery that nucleates actin filaments transiently capped at their barbed end (Figure 6). In this mechanism, talin and vinculin cooperate to form a new filament through a mechanism that is not yet understood but which probably involves the stabilization of actin nuclei that form spontaneously in solution by the ABDs of talin and vinculin. This mechanism leads to the transient barbed-end capping of the newly formed actin filaments. After being released from capping, the actin filament elongates by its free barbed end, while the complex remains attached to the side of the filament, near the pointed end (Figure 6). It would be tempting to attribute to vinculin alone the nucleation and capping activities of the talin-vinculin complex, since V_t has these activities (Le Clainche et al., 2010; Wen et al., 2009). However, our previous report indicates that the capping activity of the complex involves the ABD1 of talin (Ciobanasu et al., 2018). The fact that a complex, composed of active vinculin and talin with exposed VBSs but masked ABD1, does not nucleate, shows unambiguously the importance of ABD1 for nucleation. Although the function of the ABD1 domain of talin is generally restricted to integrin activation in a membrane-bound conformation that does not allow its binding to actin, it is important to recall here that talin is in equilibrium between actin and the plasma membrane as evidenced by its retrograde movement in FAs (Hu et al., 2007). ABD2 is not involved in capping or nucleation mechanisms as demonstrated by the strong activities of a mutant that does not contain this domain. However, ABD3 can also combine with V_t to nucleate, suggesting a possible redundancy of ABD1 and ABD3 in this mechanism. It is interesting to see that the three domains of talin are redundant for the bundling of actin filaments (Kelley et al., 2020), but are involved more selectively in the actin polymerization activities of talin in combination with vinculin. It is very likely that actin filaments nucleated by talin and vinculin will end up forming large bundles, but our microscopy experiments, where the filaments are short and spaced out, disadvantages this activity and we have not explored this direction already widely documented by recent studies (Boujemaa-Paterski et al., 2020; Kelley et al., 2020).

In the context of a stress fiber anchored to a focal adhesion, where this talin-vinculin complex resides, it is unlikely that this release of actin filaments, occurring with a half-time of 75 s to 110 s, allows the fast processive elongation of a stress fiber. However, this release is fast enough to feed stress fibers with new actin filaments and reinforce stress fibers. It would be interesting to determine how the talin-vinculin complex cooperates with other ABPs in FAs, such as VASP, parvin or tensin, to regulate actin assembly.

Material and methods

Recombinant cDNA Constructs

cDNAs encoding for vinculin 1-1066 (V_{FL}), vinculin E28K/D33H (V_{1a}), vinculin E28K/D33H/D110H/R113E (V_{1ab}), vinculin N773I/E775K (V_4), vinculin E28K/D33H/N773I/E775K (V_{1a4}), vinculin D110H/R113E/N773I/E775K (V_{1b4}), vinculin E28K/D33H/D110H/R113E/N773I/E775K (V_{1ab4}) were synthesized and subcloned in the NcoI site of pET-3d by Genscript. cDNAs encoding for vinculin 879-1066 (V_t), talin-1 482–636 (VBS_1), talin-1 1655–1822 (R9), full-length talin-1 (T_{FL}), full-length vinculin (V_{FL}) were described previously (Ciobanasu et al., 2018, 2015; Le Clainche et al., 2010). cDNAs encoding for $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$, $T_{F2F3R1R2R3}$, $T_{R2R3ABD3}$ were constructed by different PCR amplifications of the full length talin cDNA and subcloning in a pETM plasmid. N-terminal Strep-tag II, PreScission site and C-terminal His₆ tag were introduced by PCR. cDNAs of $T_{\Delta AI}$, $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$, $T_{\Delta 3}$, $T_{\Delta 1\Delta AI}$, $T_{\Delta 2\Delta AI}$, $T_{\Delta 3\Delta AI}$ were constructed and subcloned into pET-29a+ by Genscript. The constructs were verified by sequencing. See Supplementary Figure 4 for the detail of the talin constructs.

Protein Purification

V_{FL} , V_t , V_{1a} , V_{1ab} , V_4 , V_{1a4} , V_{1b4} , V_{1ab4} , T_{FL} , $T_{\Delta AI}$, $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$, $T_{\Delta 3}$, $T_{\Delta 1\Delta AI}$, $T_{\Delta 2\Delta AI}$, $T_{\Delta 3\Delta AI}$, $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$, $T_{F2F3R1R2R3}$, $T_{R2R3ABD3}$ and VBS_1 were expressed in *E. Coli* BL21 as previously described (Ciobanasu et al., 2015). Briefly, 1mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) was used for induction. Bacterial pellets of V_{FL} , V_t , V_{1a} , V_{1ab} , V_4 , V_{1a4} , V_{1b4} , V_{1ab4} were lysed by sonication in 20 mM Tris, pH 8.0, 1 M NaCl, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 μ g/ml benzamidine and 1 mM PMSF. Lysates of His-tagged vinculin constructs were purified by Ni-NTA-sepharose affinity chromatography (Ni²⁺-nitrilotriacetic acid, Qiagen), followed by a Q-Sepharose ion exchange column. V_t was purified as previously described (Le Clainche et al., 2010). Vinculin proteins were finally dialyzed in 20 mM Tris, pH 7.8, 1mM DTT. Bacterial pellets of T_{FL} , $T_{\Delta AI}$, $T_{\Delta 1}$, $T_{\Delta 2}$, $T_{\Delta 3}$, $T_{\Delta 1\Delta AI}$, $T_{\Delta 2\Delta AI}$, $T_{\Delta 3\Delta AI}$, $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$, $T_{F2F3R1R2R3}$, $T_{R2R3ABD3}$ were lysed by sonication in 50 mM Tris, pH 7.8, 500 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM β -mercaptoethanol, 10 μ g/ml benzamidine and 1 mM PMSF. Lysates of His-tagged talin constructs were purified by Ni-NTA-sepharose affinity chromatography (Ni²⁺-nitrilotriacetic acid, Qiagen), followed by a gel filtration column (Superdex 200, 16/600, GE Healthcare). VBS_1 was purified as previously described (Le Clainche et al., 2010). Talin constructs were finally dialyzed in 20 mM Tris, pH 7.8, 100 mM KCl, 1 mM DTT.

F-actin co-sedimentation assay

F-actin co-sedimentation assays were performed to determine the affinity of vinculin constructs for F-actin in the absence and presence of talin VBS_1 . In F-actin co-

sedimentation assay with vinculin alone, 2 μ M of vinculin (V_{FL} , V_t , V_{1a} , V_{1ab} , V_4 , V_{1a4} , V_{1b4} , V_{1ab4}) was incubated with 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 10, 20 μ M F-actin in 5 mM Tris, pH 7.8, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EGTA, 200 μ M ATP, 1 mM DTT during 15 min at room temperature. To test the effect of VBS_1 , F-actin co-sedimentation assays were also performed in the presence of 2 μ M of vinculin (V_{FL} , V_{1a} , V_4 , V_{1b4}), 10 μ M F-actin, with or without 1, 3, 5, 10 μ M VBS_1 in 5 mM Tris, pH 7.8, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EGTA, 200 μ M ATP, 1 mM DTT during 15 min at room temperature. After centrifugation at 90,000 rpm in a TLA-120.1 rotor (Beckman) during 30 min, the pellets and supernatants were separated and loaded on SDS-PAGE. Gels were scanned and analyzed with the ImageJ software.

Polymerization assay

Actin polymerization was measured by the increase in fluorescence of 10 % pyrenyl-labeled actin in a SAFAS Xenius spectrofluorimeter (Safas, Monaco). To measure the elongation of actin filament barbed ends, actin polymerization was induced by 100 pM spectrin-actin seeds in 10 % pyrenyl-labeled CaATP-G-actin, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, and 0.2 mM EGTA in presence of indicated proteins. The fraction of barbed end elongation was calculated as the ratio between the elongation rates in the presence and absence of proteins of interest. To test the ability of proteins to nucleate actin filaments, spontaneous polymerization was induced by adding 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, and 0.2 mM EGTA to 10% pyrenyl-labeled CaATP-G-actin solution in presence of the proteins of interest.

Observation of talin, vinculin and single actin filaments in TIRF microscopy

Our protocol is a modification of protocols used to study talin and vinculin activities (Ciobanasu et al., 2018; Le Clainche et al., 2010). To prevent the nonspecific binding of actin filaments to the surface of the coverslip, we first irradiated coverslips with deep UVs for 3 min and incubated them with 0.1 mg/mL PLL-PEG for 1 h at room temperature. The coverslip was then washed extensively with water and dried. Flow cells containing 40-60 μ l of liquid were prepared by sticking the PLL-PEG-coated coverslip to a slide with double-sided adhesive spacers. In experiments to observe and count single filament number, the chamber was first incubated with washing buffer (5 mM Tris, pH 7.8, 200 μ M ATP, 1 mM DTT, 1 mM $MgCl_2$, 0.2 mM $CaCl_2$, 25 mM KCl) for 1 min. The chamber was then saturated with 10% BSA for 5 min and washed with washing buffer. The final reaction was then injected into the chamber. A typical reaction was composed of 1 μ M actin (5% Alexa488-labeled) in 5 mM Tris, pH 7.8, 200 μ M ATP, 1% methylcellulose, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane, 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 200 μ M EGTA, 40 mM DTT supplemented with various talin and vinculin mutants. To observe talin, vinculin and actin simultaneously, 0.2 μ M $T_{\Delta 1\Delta AI}$ (78% Alexa594-labelled) and 1 μ M V_{1ab4} (18% Alexa647-labelled) were first

mixed, diluted 20 times to reach final concentrations of 10 nM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 50 nM V_{1ab4} , injected on a flow chamber to immobilize $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} complexes non-specifically on the surface passivated with PLL-PEG, and finally supplemented with 0.8 μ M actin (5% Alexa488-labelled). Finally, we sealed the flow chamber with VALAP (a mixture of Vaseline, lanolin, and paraffin) and observed the reaction on an Nikon Eclipse Ti-E inverted microscope equipped with 60X/1.49NA objective (Nikon). The time-lapse videos were acquired by Metamorph and subsequently analyzed by the ImageJ software.

Protein labeling

For 3-color imaging, actin is labeled with Alexa Fluor 488 carboxylic acid, succinimidyl ester, which reacts with the NH_2 groups of basic amino acids (Ciobanasu et al., 2015). $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and V_{1ab4} are labeled on free cysteines with Alexa Fluor 594 maleimide and Alexa Fluor 647 maleimide respectively.

Quantification and statistical analysis

All experiments presented in this manuscript were repeated independently two to four times. Where appropriate, data points from two independent experiments are overlaid to demonstrate reproducibility. For unambiguous negative results, a single data set is presented.

References

- Atherton P, Lausecker F, Carisey A, Gilmore A, Critchley D, Barsukov I, Ballestrem C. 2020. Relief of talin autoinhibition triggers a force-independent association with vinculin. *J Cell Biol* **219**. doi:10.1083/jcb.201903134
- Atherton P, Stutchbury B, Wang DY, Jethwa D, Tsang R, Meiler-Rodriguez E, Wang P, Bate N, Zent R, Barsukov IL, Goult BT, Critchley DR, Ballestrem C. 2015. Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery. *Nat Commun* **6**. doi:10.1038/ncomms10038
- Bachmann M, Kukkurainen S, Hytönen VP, Wehrle-Haller B. 2019. Cell Adhesion by Integrins. *Physiol Rev* **99**:1655–1699. doi:10.1152/physrev.00036.2018
- Bakolitsa C, Cohen DM, Bankston LA, Bobkov AA, Cadwell GW, Jennings L, Critchley DR, Craig SW, Liddington RC. 2004. Structural basis for vinculin activation at sites of cell adhesion. *Nature* **430**:583–586. doi:10.1038/nature02610
- Boujemaa-Paterski R, Martins B, Eibauer M, Beales CT, Geiger B, Medalia O. 2020. Talin-activated vinculin interacts with branched actin networks to initiate bundles. *Elife* **9**. doi:10.7554/eLife.53990
- 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. doi:10.1038/emboj.2008.211
- 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. doi:10.1038/emboj.2010.348
- Carisey A, Tsang R, Greiner AM, Nijenhuis N, Heath N, Nazgiewicz A, Kemkemer R, Derby B, Spatz J, Ballestrem C. 2013. Vinculin regulates the recruitment and release of core focal adhesion proteins in a force-dependent manner. *Curr Biol* **23**. doi:10.1016/j.cub.2013.01.009
- Chen H, Choudhury DM, Craig SW. 2006. Coincidence of Actin Filaments and Talin Is Required to Activate Vinculin. *J Biol Chem* **281**:40389–40398. doi:10.1074/jbc.M607324200
- Chorev DS, Volberg T, Livne A, Eisenstein M, Martins B, Kam Z, Jockusch BM, Medalia O, Sharon M, Geiger B. 2018. Conformational states during vinculin unlocking differentially regulate focal adhesion properties. *Sci Rep* **8**:2693. doi:10.1038/s41598-018-21006-8
- Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. 2015. Reconstituting actomyosin-dependent mechanosensitive protein complexes in vitro. *Nat Protoc* **10**:75–89. doi:10.1038/nprot.2014.200
- Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. 2014. Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin–vinculin complex reinforces actin anchoring. *Nat Commun* **5**:3095. doi:10.1038/ncomms4095
- Ciobanasu C, Faivre B, Le Clainche C. 2013. Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: The multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions. *Eur J Cell Biol* **92**:339–348. doi:10.1016/j.ejcb.2013.10.009
- Ciobanasu C, Wang H, Henriot V, Mathieu C, Fente A, Csillag S, Vigouroux C, Faivre B, Le Clainche C. 2018. Integrin-bound talin head inhibits actin filament barbed-end elongation. *J Biol Chem* **293**:2586–2596. doi:10.1074/jbc.M117.808204
- Cohen DM, Chen H, Johnson RP, Choudhury B, Craig SW. 2005. Two Distinct Head-Tail Interfaces Cooperate to Suppress Activation of Vinculin by Talin. *J Biol Chem* **280**:17109–17117. doi:10.1074/jbc.M414704200
- Dedden D, Schumacher S, Kelley CF, Zacharias M, Biertümpfel C, Fässler R, Mizuno N. 2019. The Architecture of Talin1 Reveals an Autoinhibition Mechanism. *Cell* **179**:120–131.e13. doi:10.1016/j.cell.2019.08.034
- del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. 2009. Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science (80-)* **323**:638–641. doi:10.1126/science.1162912
- Gardel ML, Schneider IC, Aratyn-Schaus, Y, Waterman CM. 2010. Mechanical Integration of

- Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26**:315–333. doi:10.1146/annurev.cellbio.011209.122036
- Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD. 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:21–33. doi:10.1038/nrm2593
- Gingras AR, Ziegler WH, Frank R, Barsukov IL, Roberts GCK, Critchley DR, Emsley J. 2005. Mapping and Consensus Sequence Identification for Multiple Vinculin Binding Sites within the Talin Rod. *J Biol Chem* **280**:37217–37224. doi:10.1074/jbc.M508060200
- Goult BT, Bate N, Anthis NJ, Wegener KL, Gingras AR, Patel B, Barsukov IL, Campbell ID, Roberts GCK, Critchley DR. 2009. The Structure of an Interdomain Complex That Regulates Talin Activity. *J Biol Chem* **284**:15097–15106. doi:10.1074/jbc.M900078200
- Goult BT, Yan J, Schwartz MA. 2018. Talin as a mechanosensitive signaling hub. *J Cell Biol* **217**:3776–3784. doi:10.1083/jcb.201808061
- Grashoff C, Hoffman BD, Brenner MD, Zhou R, Parsons M, Yang MT, McLean MA, Sligar SG, Chen CS, Ha T, Schwartz MA. 2010. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics. *Nature* **466**:263–266. doi:10.1038/nature09198
- Han SJ, Azarova E V., Whitewood AJ, Bachir A, Gutierrez E, Groisman A, Horwitz AR, Goult BT, Dean KM, Danuser G. 2021. Pre-complexation of talin and vinculin without tension is required for efficient nascent adhesion maturation. *Elife* **10**. doi:10.7554/eLife.66151
- 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. doi:10.1083/jcb.201003014
- Hemmings L, Rees DJG, Ohanian V, Bolton SJ, Gilmore AP, Patel B, Priddle H, Trevithick JE, Hynes RO, Critchley DR. 1996. Talin contains three actin-binding sites each of which is adjacent to a vinculin-binding site. *J Cell Sci* **109**:2715–2726.
- Hirata H, Tatsumi H, Lim CT, Sokabe M. 2014. Force-dependent vinculin binding to talin in live cells: a crucial step in anchoring the actin cytoskeleton to focal adhesions. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**. doi:10.1152/ajpcell.00122.2013
- Hotulainen P, Lappalainen P. 2006. Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *J Cell Biol* **173**:383–394. doi:10.1083/jcb.200511093
- Hu K, Ji L, Applegate KT, Danuser G, Waterman-Storer CM. 2007. Differential Transmission of Actin Motion Within Focal Adhesions. *Science (80-)* **315**:111–115. doi:10.1126/science.1135085
- Huang DL, Bax NA, Buckley CD, Weis WI, Dunn AR. 2017. Vinculin forms a directionally asymmetric catch bond with F-actin. *Science (80-)* **357**:703–706. doi:10.1126/science.aan2556
- Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *J Cell Biol* **179**. doi:10.1083/jcb.200703036
- Huttelmaier S, Bubeck P, Rudiger M, Jockusch BM. 1997. Characterization of Two F-Actin-Binding and Oligomerization Sites in the Cell-Contact Protein Vinculin. *Eur J Biochem* **247**:1136–1142. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.01136.x
- Janssen ME, Kim E, Liu H, Fujimoto LM, Bobkov A, Volkmann N, Hanein D. 2006. Three-dimensional structure of vinculin bound to actin filaments. *Mol Cell* **21**. doi:10.1016/j.molcel.2005.11.020
- Johnson RP, Craig SW. 1995. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature* **373**:261–264. doi:10.1038/373261a0
- Johnson RP, Craig SW. 1994. An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem* **269**:12611–12619. doi:10.1016/S0021-9258(18)99920-5
- Kelley CF, Litschel T, Schumacher S, Dedden D, Schwille P, Mizuno N. 2020. Phosphoinositides regulate force-independent interactions between talin, vinculin, and actin. *Elife* **9**. doi:10.7554/eLife.56110
- Laurent V, Loisel TP, Harbeck B, Wehman A, Gröbe 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. doi:10.1083/jcb.144.6.1245
- Le Clainche C, Carlier M-F. 2008. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol Rev* **88**:489–513. doi:10.1152/physrev.00021.2007
- Le Clainche C, Dwivedi SP, Didry D, Carlier M-F. 2010. Vinculin is a dually regulated actin filament barbed end-capping and side-binding protein. *J Biol Chem* **285**. doi:10.1074/jbc.M110.102830
- Romero S, Le Clainche C, Gautreau AM. 2020. Actin polymerization downstream of integrins: signaling pathways and mechanotransduction. *Biochem J* **477**:1–21. doi:10.1042/BCJ20170719
- Tojkander S, Gateva G, Husain A, Krishnan R, Lappalainen P. 2015. Generation of contractile actomyosin bundles depends on mechanosensitive actin filament assembly and disassembly. *Elife* **4**. doi:10.7554/eLife.06126
- Tojkander S, Gateva G, Schevzov G, Hotulainen P, Naumanen P, Martin C, Gunning PW, Lappalainen P. 2011. A Molecular Pathway for Myosin II Recruitment to Stress Fibers. *Curr Biol* **21**:539–550. doi:10.1016/j.cub.2011.03.007
- Vigouroux C, Henriot V, Le Clainche C. 2020. Talin dissociates from RIAM and associates to vinculin sequentially in response to the actomyosin force. *Nat Commun* **11**:3116. doi:10.1038/s41467-020-16922-1
- Wen K-K, Rubenstein PA, DeMali KA. 2009. Vinculin Nucleates Actin Polymerization and Modifies Actin Filament Structure. *J Biol Chem* **284**:30463–30473. doi:10.1074/jbc.M109.021295
- Yang J, Zhu L, Zhang H, Hirbawi J, Fukuda K, Dwivedi P, Liu J, Byzova T, Plow EF, Wu J, Qin J. 2014. Conformational activation of talin by RIAM triggers integrin-mediated cell adhesion. *Nat Commun* **5**:5880. doi:10.1038/ncomms6880
- Yao M, Gault BT, Klapholz B, Hu X, Toseland CP, Guo Y, Cong P, Sheetz MP, Yan J. 2016. The mechanical response of talin. *Nat Commun* **7**. doi:10.1038/ncomms11966

Acknowledgements

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche grants ANR-16-CE13-0007-02 PHAGOMECANO and ANR ANR-18-CE13-0026-01 RECAMECA (to CLC). HW is supported by a PhD fellowship from the China Scholarship Council (CSC). RS is supported by a PhD fellowship from Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique. The present work has benefited from the Light Microscopy facility of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBiSA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-Biolmaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Sciences” (ANR-10-LABX-0040-SPS). We thank the members of the “Cytoskeleton Dynamics and Motility” team for helpful discussions.

Author contributions

HW performed the binding assays, the kinetic assays and the microscopy experiments, purified most of the proteins, analyzed the data and prepared the figures. RS performed additional kinetic assays. VH designed and cloned some of the cDNAs. CV performed binding assays on micropatterned surfaces. JP contributed to single filament microscopy assays. CLC designed the experiments, supervised the project and wrote the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Figure legends

Figure 1. The release of the autoinhibitory contacts of vinculin allows F-actin binding and barbed-end capping but not nucleation.

(A) Structure of vinculin featuring the subdomains and the auto-inhibitory contacts D1- V_t (blue box) and D4- V_t (green box). In D1, the double mutations E28K/D33H and D110H/R113E are referred to as V_{1a} and V_{1b} respectively. The double mutation N773I/E775K in D4 is referred to as V_4 . The mutated amino acids are in magenta. A schematic representation of the vinculin mutants is shown on the right. **(B)** Quantification of the cosedimentation of vinculin mutants (2 μ M) in the presence of increasing concentration of F-actin. The fraction of vinculin depletion in the supernatants is plotted against F-actin concentration (Supplementary Figure 1). **(C)** The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μ M, 10% pyrenyl-labeled) is plotted against the concentration of vinculin mutants (Supplementary Figure 2). V_t is used as a positive control for nucleation. The inset is a zoom without V_t . **(D)** Actin filament barbed end elongation is measured in the presence of spectrin-actin seeds (100 pM), 2 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) and increasing concentrations of vinculin mutants (Supplementary Figure 3). The fraction of barbed end elongation is the ratio between the elongation rates in the presence and absence of vinculin. Open and closed circle indicate independent experiments in the same conditions. **(E)** The binding of the vinculin mutants (2 μ M) to F-actin (10 μ M) is measured in a co-sedimentation assay in the presence of increasing concentrations of talin VBS₁ (Supplementary Figure 5). The ratio between vinculin bound to F-actin in the presence and absence of VBS₁ is plotted against the concentration of VBS₁. **(F)** The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μ M, 10% pyrenyl-labeled) is plotted against the concentration of V_{1ab4} in the absence or presence of 1 μ M VBS₁ (Supplementary Figure 6). V_t alone is used as a positive control for nucleation. The inset is a zoom without V_t . **(G)** Actin filament barbed end elongation is measured in the presence of spectrin-actin seeds (100 pM), 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled), vinculin mutants (2 μ M) and increasing concentrations of VBS₁ (Supplementary Figure 7). The fraction of barbed end elongation is the ratio of elongation rates in the presence of vinculin and VBS₁ and in the presence of actin alone.

Figure 2. Full-length talin with exposed VBSs promotes vinculin-dependent barbed-end capping but not nucleation.

(A) Schematic representation of talin constructs with increasing numbers of exposed VBS used in (B-E). **(B, C)** Exposure of VBSs in talin increases the binding of vinculin. **(B)** A micropatterned surface is incubated with 1 μ M of the indicated talin constructs, washed, incubated with 0.5 μ M, 1 μ M and 5 μ M EGFP- V_h and imaged in TIRF microscopy. Scale bar = 10 μ m. **(C)** Quantification of the experiment presented in

(A). Each data point represents the mean fluorescence of EGFP-V_h in one disk. The bar shows the mean. **(D)** Actin filament barbed end elongation is measured in the presence of spectrin-actin seeds (100 pM), actin (1.5 μM, 10% pyrenyl-labeled) and increasing concentration of talin mutants, in the absence and presence of vinculin V1a (2 μM) (Supplementary Figure 8). The fraction of barbed end elongation was calculated as the ratio of the elongation rate in the presence of increasing concentrations of talin, in the presence or absence of V_{1a}, to the elongation rate of actin alone. Note the break between 0.5 μM and 1 μM on the x-axis. Open and closed symbols indicate independent experiments in the same conditions. **(E)** The maximal rate of spontaneous actin polymerization (1.5 μM, 10% pyrenyl-labeled) is plotted against increasing concentrations of V_{1ab4} alone and in the presence of 1 μM of the indicated talin mutants (Supplementary Figure 11). V_t alone is used as a positive control for nucleation. The inset is a zoom without V_t.

Figure 3. A complex of talin and vinculin, in which all autoinhibitory contacts are released and VBSs are exposed, nucleates and caps actin filaments.

(A) Schematic representation of the talin and vinculin constructs used in (B-E). **(B, C)** Actin filament barbed end elongation is measured in the presence of 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled), 2 μM V_{FL} (blue) or 2 μM V_{1a} (red) and increasing concentrations of **(B)** T_{ΔAI} (dash line) or T_{Δ1ΔAI} (solid line) (Supplementary Figure 12), or **(C)** T_{Δ1ΔAIΔABD2} (Supplementary Figure 13). The fraction of barbed end elongation was then calculated as the ratio between the elongation rate in the presence of the indicated combinations of vinculin and talin and the elongation rate of actin alone. **(D, E)** The maximal rate of spontaneous actin polymerization (2.5 μM, 10% pyrenyl-labeled) is plotted as a function of increasing concentrations of **(D)** T_{ΔAI} or T_{Δ1ΔAI}, **(E)** T_{Δ1ΔAIΔABD2} alone and in the presence of V_{FL} or V_{1ab4} (Supplementary Figure 15 and 17). (B-E) Open and closed symbols indicate independent experiments in the same conditions.

Figure 4. Direct observation of the nucleation and capping of single actin filaments by the talin-vinculin complex.

(A,B) Single actin filaments observed in TIRF microscopy in the presence of 1 μM actin (5% Alexa488-labeled) alone and supplemented with 2.5 μM T_{Δ1ΔAI} alone, 5 μM V_{1ab4} alone and 2.5 μM T_{Δ1ΔAI} with 5 μM V_{1ab4} **(A)**, and in the presence of 1 μM actin (5% Alexa488-labeled) alone and supplemented with 2.5 μM T_{Δ1ΔAIΔABD2} alone, 5 μM V_{1ab4} alone and 2.5 μM T_{Δ1ΔAIΔABD2} with 5 μM V_{1ab4} **(B)**. Scale bar = 15 μm. See Supplementary Movie 1 (A) and Supplementary Movie 2 (B). **(C, D)** Quantification of filament density as a function of time from the experiments in (A) and (B). **(E)** Kymographs of single actin filaments in the presence of the indicated proteins from the experiment in (A) and (B). **(F)** Elongation traces of two filaments for each of the

conditions indicated from the experiment in (A) and (B). **(G)** Exponential fit of 1-cumulative frequency of barbed end pause times measured in the presence of 1 μM actin, 2.5 μM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ with 5 μM V_{1ab4} (blue line, $t_{1/2} = 110.35 \pm 4.62$ s, $n = 1023$) and 2.5 μM $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ with 5 μM V_{1ab4} (green line, $t_{1/2} = 75.37 \pm 1.83$ s, $n = 1619$) from experiments in (A) and (B).

Figure 5. Direct observation of talin, vinculin and actin during the nucleation and barbed-end capping of single actin filaments.

(A-E) 10 nM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ (78% Alexa594-labelled) and 50 nM V_{1ab4} (18% Alexa647-labelled) are immobilized on a glass surface passivated with PLL-PEG, followed by the addition of 0.8 μM actin (5% Alexa488-labelled). **(A)** Kymographs showing the nucleation of an actin filament by a talin-vinculin complex. The stationary fiduciary marks on the right side indicate that the talin-vinculin complex remains associated with the pointed end (-) while the barbed end (+) grows on the other side (Supplementary Movie 3). **(B)** Recruitment of actin by a talin-vinculin complex followed by the elongation of a filament after a delay indicated by the arrowheads (Supplementary Movie 4). The delays are quantified in (E). **(C)** Kymographs showing the capture and barbed-end capping of an existing filament by a talin-vinculin complex (Supplementary Movie 5). **(D)** Kymographs showing the transient barbed-end capping of a filament by a talin-vinculin complex followed by its release (Supplementary Movie 6). **(E)** (Left) Position of talin-vinculin complexes measured along 62 single filaments aligned on their pointed end (-). This quantification reveals that talin-vinculin complexes are found at the pointed end of newly nucleated filaments (black dots, $n = 22$), along the side of actin filaments (white dots, $n = 26$) or at the barbed end of capped filaments (grey dots, $n = 21$). Some of these events are on the same filaments. (Right) Exponential fit of 1-cumulative frequency of the time between actin recruitment by talin-vinculin complexes and barbed end elongation measured in the conditions described above and illustrated in (B), $t_{1/2} = 146.69 \pm 18.95$ s, $n = 18$.

Figure 6. Working model for the activities and regulation of talin, vinculin and the talin-vinculin complex.

On the left side, talin (top) and vinculin (bottom) are shown according to their increasing degree of activation towards the central grey box in which the fully activated talin and vinculin form a complex. On the right side, a lower resolution representation shows the activity of the talin-vinculin complex nucleating an actin filament that is transiently capped at its barbed end before being released to elongate.

Legends of supplementary figures and movies

Supplementary figure 1. The high affinity binding of vinculin to the side of actin filaments requires the disruption of the contacts made by V_t with both D1 and D4. (A-H) SDS-PAGE gels showing the supernatant and pellet fractions of cosedimentation assays containing 2 μ M of the indicated vinculin mutants and increasing concentrations of F-actin (0, 1.5, 3, 4.5, 6, 10, 20 μ M).

Supplementary figure 2. The release of the D1- V_t and D4- V_t contacts does not allow actin nucleation by vinculin. (A-G) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated vinculin mutants and 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). The control kinetics corresponding to 1.5 μ M actin alone are the same in all panel.

Supplementary figure 3. The release of the D1- V_t and D4- V_t contacts allows barbed-end capping by vinculin. (A-F) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated vinculin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds, 2 μ M actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics showing the polymerization of 2 μ M actin alone are the same in all panels.

Supplementary figure 4. Talin constructs used in the study. Domain organisation of full-length talin and talin constructs featuring intramolecular autoinhibitions in red, VBSs in green and ABDs in pink. Grey bars indicate α -helices in the rod. Red stars indicate exposed VBSs.

Supplementary figure 5. Talin VBS₁ combined with D4- V_t release induces vinculin binding to F-actin. (A-D) SDS-PAGE gels showing the pellet fractions of F-actin co-sedimentation reactions containing 2 μ M of the indicated vinculin mutants, 10 μ M F-actin and increasing concentrations of talin VBS₁ (0, 1, 3, 5, 10 μ M).

Supplementary figure 6. Talin VBS₁ combined with D4- V_t release has no effect on nucleation by vinculin. (A-I) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated vinculin mutants and 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl) in the absence of VBS₁ (A-D, I) and in presence of 1 μ M VBS₁ (E-H). The control kinetics showing the polymerization of 1.5 μ M actin in the presence of 1 μ M V_t , as a positive control, or in the presence of 1 μ M VBS₁ alone, as a negative control, are the same in all panels.

Supplementary figure 7. Talin VBS₁ combined with D4- V_t release has no effect on barbed-end capping by vinculin. (A-E) The elongation of actin filament barbed

end was measured in the presence of 2 μM of the indicated vinculin mutants with increasing concentrations of VBS₁ (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2 μM), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics showing the polymerization of 1.5 μM actin alone are the same in all panels.

Supplementary figure 8. A complex composed of full-length talin with exposed VBSs and V_{1a} caps actin filament barbed ends. (A-D) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of 2 μM V_{1a} with increasing concentrations of the indicated talin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics showing the polymerization of 1.5 μM actin in the presence of 2 μM V_{1a} are the same in all panels.

Supplementary figure 9. Talin mutants with exposed VBSs alone do not cap barbed ends. (A-D) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated talin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The kinetics with 1.5 μM G-actin, 2 μM V_{FL} or 2 μM V_{1a}, used here as additional negative controls, are the same in all panels.

Supplementary figure 10. Addition of full-length talin with exposed VBSs to V_{FL} does not cap actin filament barbed ends. (A-D) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of 2 μM V_{FL}, increasing concentrations of the indicated talin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The kinetics with 1.5 μM actin and 2 μM V_{FL} are the same in all panels. **(E)** The fraction of barbed end elongation was calculated as the ratio of the elongation rate in the presence of V_{FL} and talin mutants to the elongation rate of 1.5 μM actin alone.

Supplementary figure 11. Talin mutants with exposed VBSs combined with V_{1ab4} do not stimulate actin assembly. (A-D) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of 1 μM of the indicated talin mutants, increasing concentrations of V_{1ab4} and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). The kinetics with 1.5 μM actin and 1 μM V_t alone, used as a positive control for nucleation, or 1.5 μM actin and 4 μM V_{1ab4} alone are the same in all panels.

Supplementary figure 12. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and one exposed VBS combine with V_{1a} to cap actin filament barbed ends. The elongation of actin filament barbed end was measured in the absence and presence of 2 μM V_{FL} or 2 μM V_{1a} or 1 μM T _{ΔAI} or 1 μM T _{$\Delta\text{1}\Delta\text{AI}$} **(A)**, in the presence of increasing

concentrations of indicated talin mutants and 2 μM V_{FL} (**B-C**) or 2 μM V_{1a} (**D-E**), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics with 1.5 μM actin and 2 μM V_{FL} (**A-C**) or 1.5 μM actin and 2 μM V_{1a} (**D-E**) are the same in all panels.

Supplementary figure 13. A talin mutant, with released autoinhibitory contacts, one exposed VBS and lacking ABD2, combines efficiently with V_{1a} , but not with V_{FL} , to cap actin filament barbed ends. (A-C) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta\text{AI}\Delta\text{ABD2}}$, 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) (A), increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta\text{AI}\Delta\text{ABD2}}$, 2 μM V_{FL} (B) or 2 μM V_{1a} (C), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The kinetics with 1.5 μM actin alone and 1.5 μM actin and V_t are the same in all panels.

Supplementary figure 14. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and two or three exposed VBSs, combine with V_{FL} and V_{1a} to cap actin filament barbed ends. (A-E) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of $T_{\Delta 2\Delta\text{AI}}$ and 2 μM of V_{FL} (A), increasing concentrations of $T_{\Delta 2\Delta\text{AI}}$ and 2 μM of V_{1a} (B), increasing concentrations of $T_{\Delta 3\Delta\text{AI}}$ and 2 μM of V_{FL} (C), increasing concentrations of $T_{\Delta 3\Delta\text{AI}}$ and 2 μM of V_{1a} (D), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics with 1.5 μM actin and 2 μM V_t or 1 μM $T_{\Delta 2\Delta\text{AI}}$ or 1 μM $T_{\Delta 3\Delta\text{AI}}$ or 2 μM V_{FL} or 2 μM V_{1a} are the same in all panels. (E) Quantification of the experiments in (A-D).

Supplementary figure 15. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and one exposed VBS, combine efficiently with V_{1ab4} to stimulate actin nucleation. (A-D) Actin polymerization was measured in the absence and presence of 5 μM of V_{FL} or V_{1ab4} with increasing concentrations of $T_{\Delta\text{AI}}$ or $T_{\Delta 1\Delta\text{AI}}$ and 2.5 μM G-actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). The kinetics with 2.5 μM actin alone, used as a negative control, and 2.5 μM actin and 5 μM V_t , used as a positive control for nucleation, are the same in all panels.

Supplementary figure 16. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and two or three exposed VBSs, combine efficiently with V_{1ab4} to stimulate actin nucleation. (A-D) Actin polymerization was measured in the presence of 5 μM of V_{FL} or V_{1ab4} with increasing concentrations of $T_{\Delta 2\Delta\text{AI}}$ or $T_{\Delta 3\Delta\text{AI}}$ and 2.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). (E) Additional negative control showing the polymerization of 2.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) in the presence of 5 μM V_{FL} or 5 μM V_{1ab4} or 1.5 μM $T_{\Delta 2\Delta\text{AI}}$ or 2.5 μM $T_{\Delta 3\Delta\text{AI}}$. The kinetics with 2.5 μM actin alone, used as a negative control, and 2.5 μM actin and 5 μM V_t , used as a positive

control for nucleation, are the same in all panels. **(F)** The maximal rate of spontaneous actin polymerization is plotted against increasing concentrations of talin mutants in the presence of V_{FL} or V_{1ab4} as described in (A-D). Data for $T_{\Delta 1\Delta AI} + V_{FL}$ or V_{1ab4} and $T_{\Delta AI} + V_{FL}$ or V_{1ab4} are the same as in Figure 3D.

Supplementary figure 17. A talin mutant, with released autoinhibitory contacts, one exposed VBS and lacking ABD2, combines efficiently with V_{1ab4} to stimulate actin nucleation. (A-C) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of 2.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) and increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ alone (A), increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and 5 μ M V_{FL} (B) and increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and 5 μ M V_{1ab4} (C) in a low salt buffer (25 mM KCl). The kinetics with 2.5 μ M actin and 5 μ M V_t alone, used as a positive control or 5 μ M V_{1ab4} alone are the same in all panels.

Supplementary figure 18. Importance of talin ABDs for the activities of the talin-vinculin complex. (A,B) Spontaneous actin polymerization was measured in presence of 2.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) and the indicated talin and vinculin mutants in a low salt buffer (25 mM KCl). The black arrows in (B) indicate the stimulation of actin polymerization by V_{1ab4} alone and $V_{1ab4} + T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$. The dark green arrow in (B) indicates that R9 reverses the actin polymerization induced by $V_{1ab4} + T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$.

Supplementary figure 19. A talin-vinculin complex, in which vinculin lacks V_t , does not nucleate and cap actin filaments. (A) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of the indicated proteins, 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled). **(B)** Spontaneous actin polymerization was measured in presence of 2.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) and the indicated proteins in a low salt buffer (25 mM KCl).

Supplementary Movie 1. Observation of the activity of $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and V_{1ab4} on single actin filaments in TIRF microscopy. Conditions: 1 μ M actin (5% Alexa 488-labeled) in 5 mM Tris, pH 7.8, 200 μ M ATP, 1% methylcellulose, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 200 μ M EGTA, 40 mM DTT supplemented with 2.5 μ M $T_{\Delta 1\Delta AI}$ or 5 μ M V_{1ab4} or 2.5 μ M $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 5 μ M V_{1ab4} . Scale bar = 15 μ m.

Supplementary Movie 2. Observation of the activity of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and V_{1ab4} on single actin filaments in TIRF microscopy. Conditions: 1 μ M actin (5% Alexa 488-labelled) in 5 mM Tris, pH 7.8, 200 μ M ATP, 1% methylcellulose, 5 mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)-octane (DABCO), 25 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 200 μ M EGTA, 40

mM DTT supplemented with 2.5 μM $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ or 5 μM V_{1ab4} or 2.5 μM $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$ and 5 μM V_{1ab4} . Scale bar = 15 μm .

Supplementary Movie 3. Observation of talin, vinculin and actin during the nucleation of a single actin filament. 0.2 μM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ (78% Alexa594-labelled) and 1 μM V_{1ab4} (18% Alexa647-labelled) were first mixed, diluted 20 times to reach final concentrations of 10 nM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 50 nM V_{1ab4} , injected on a flow chamber to immobilize $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} complexes non-specifically on the surface, and finally supplemented with 0.8 μM actin (5% Alexa488-labelled).

Supplementary Movie 4. Recruitment of actin by a talin-vinculin complex followed by the elongation of a filament after a delay. 0.2 μM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ (78% Alexa594-labelled) and 1 μM V_{1ab4} (18% Alexa647-labelled) were first mixed, diluted 20 times to reach final concentrations of 10 nM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 50 nM V_{1ab4} , injected on a flow chamber to immobilize $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} complexes non-specifically on the surface, and finally supplemented with 0.8 μM actin (5% Alexa488-labelled).

Supplementary Movie 5. Capture and barbed-end capping of an existing filament by a talin-vinculin complex. 0.2 μM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ (78% Alexa594-labelled) and 1 μM V_{1ab4} (18% Alexa647-labelled) were first mixed, diluted 20 times to reach final concentrations of 10 nM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 50 nM V_{1ab4} , injected on a flow chamber to immobilize $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} complexes non-specifically on the surface, and finally supplemented with 0.8 μM actin (5% Alexa488-labelled).

Supplementary Movie 6. Transient barbed-end capping of a filament by a talin-vinculin complex followed by its release. 0.2 μM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ (78% Alexa594-labelled) and 1 μM V_{1ab4} (18% Alexa647-labelled) were first mixed, diluted 20 times to reach final concentrations of 10 nM $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 50 nM V_{1ab4} , injected on a flow chamber to immobilize $T_{\Delta 1\Delta AI}$ - V_{1ab4} complexes non-specifically on the surface, and finally supplemented with 0.8 μM actin (5% Alexa488-labelled).

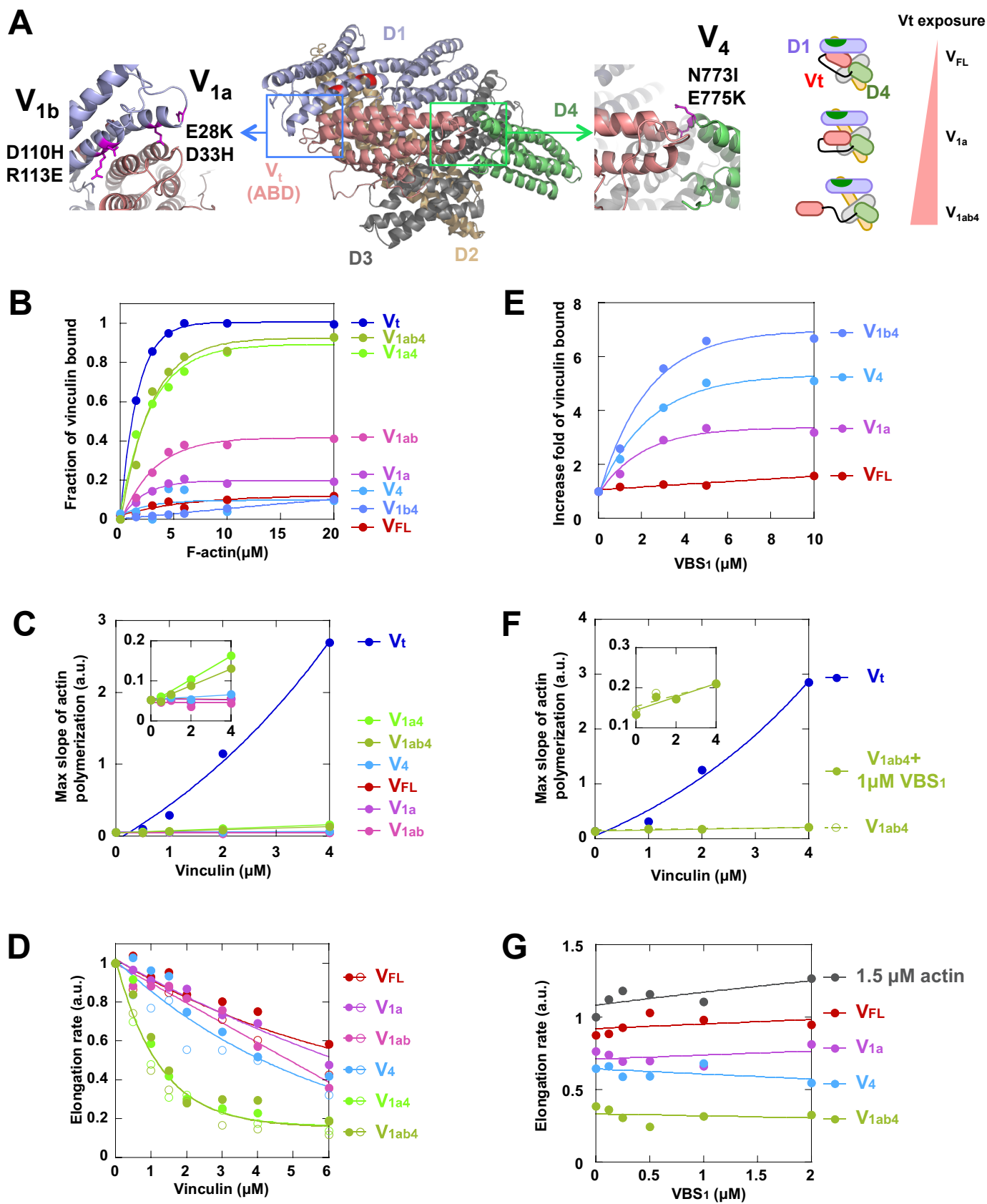


Figure 1

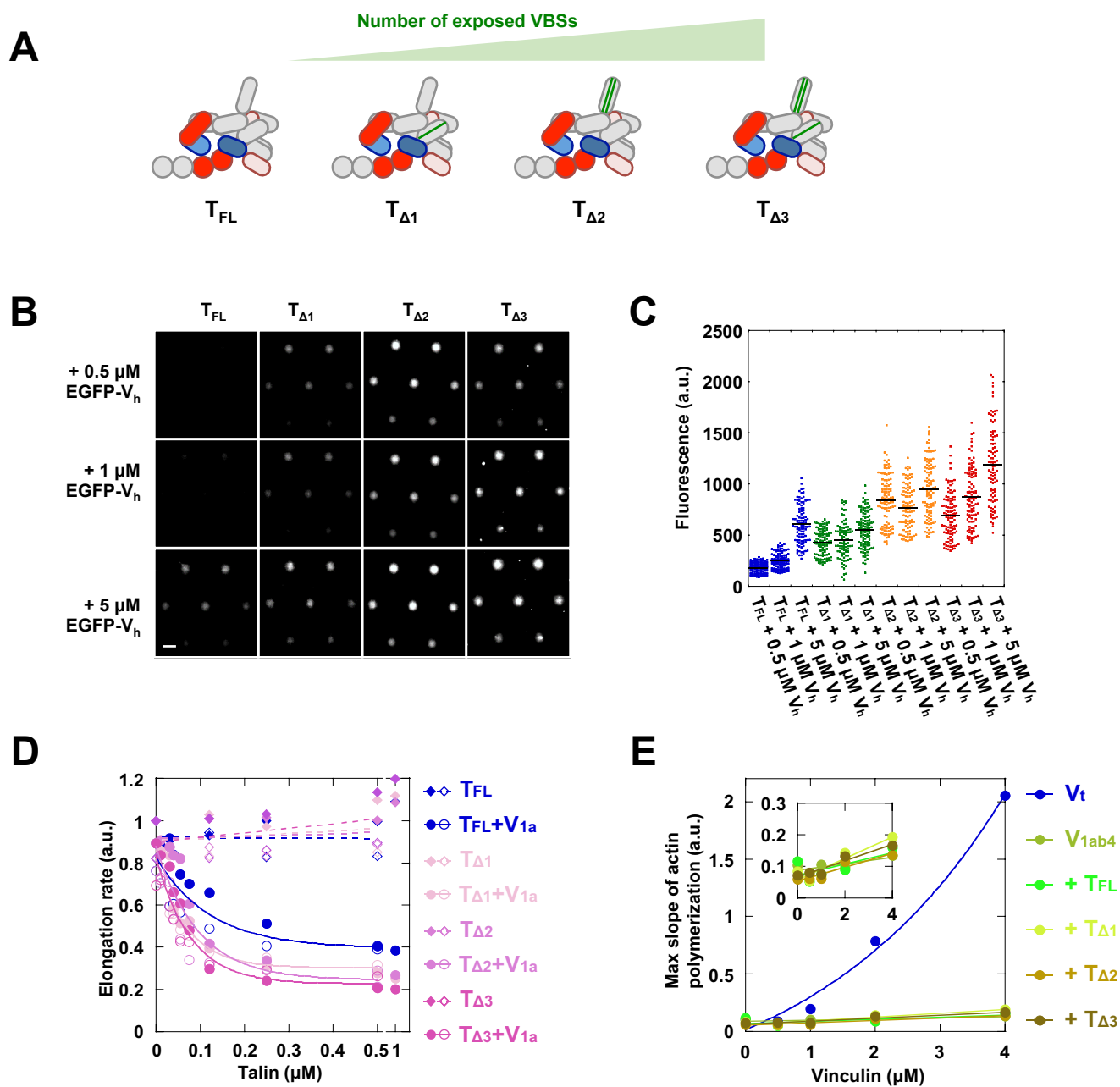


Figure 2

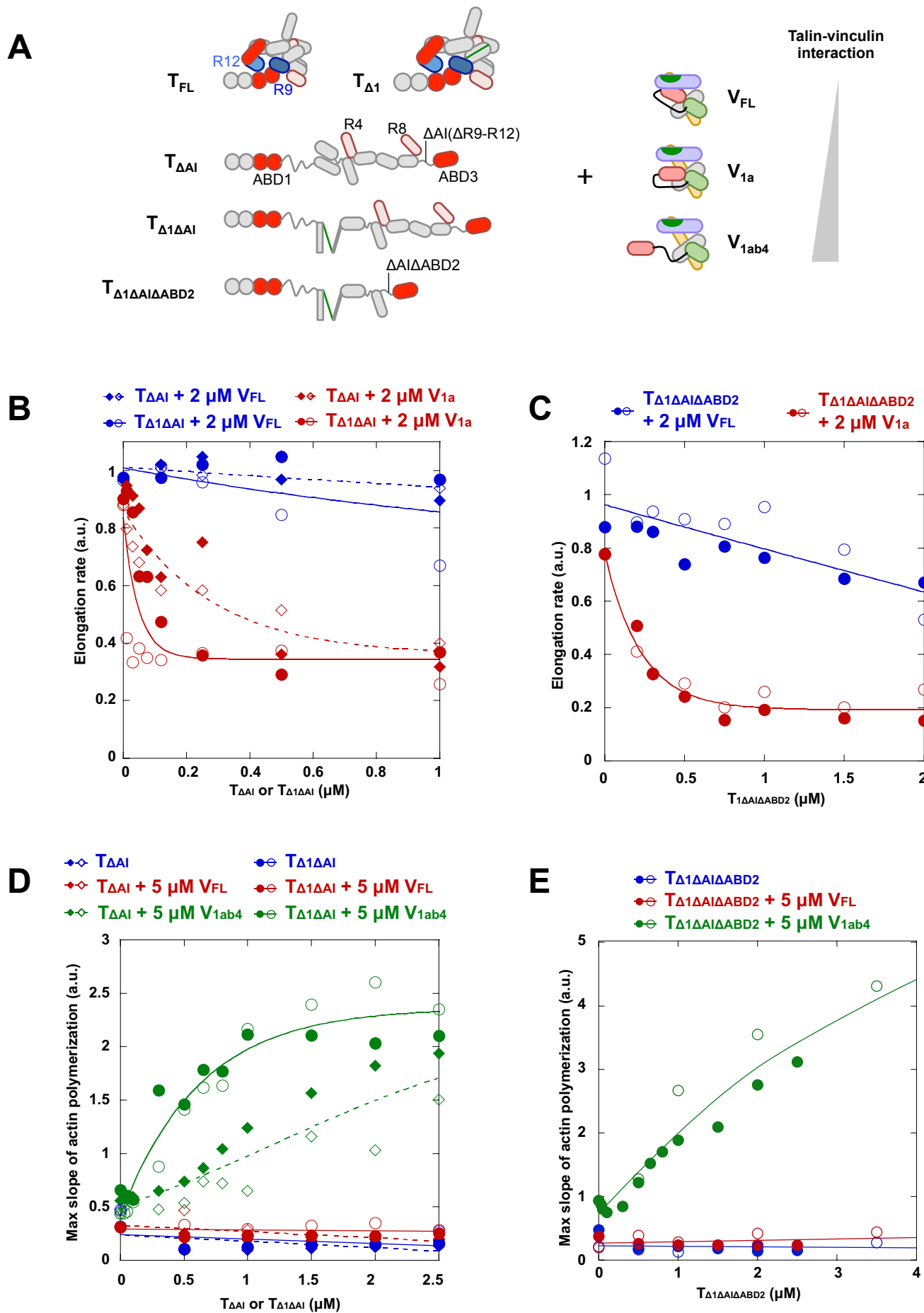


Figure 3

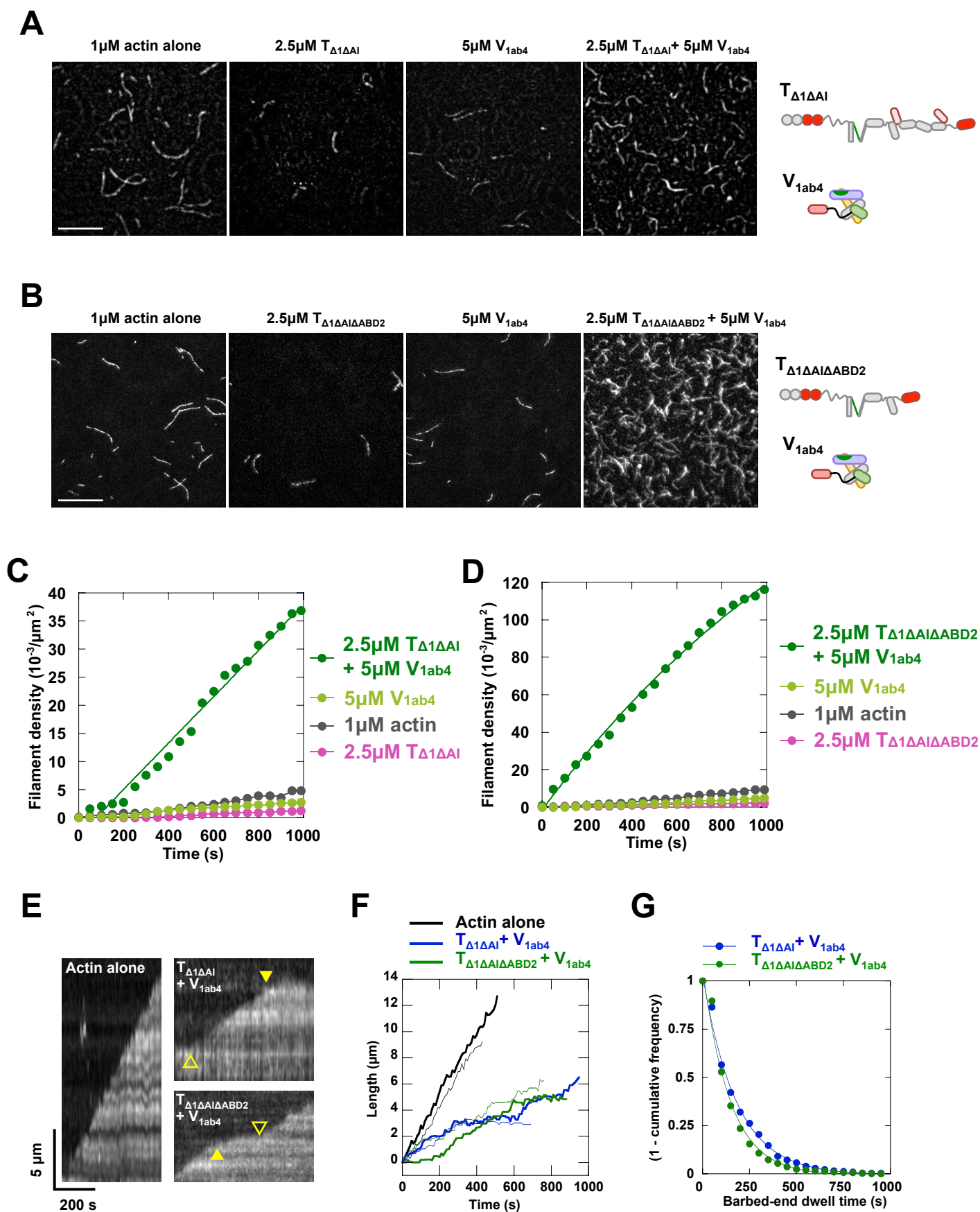


Figure 4

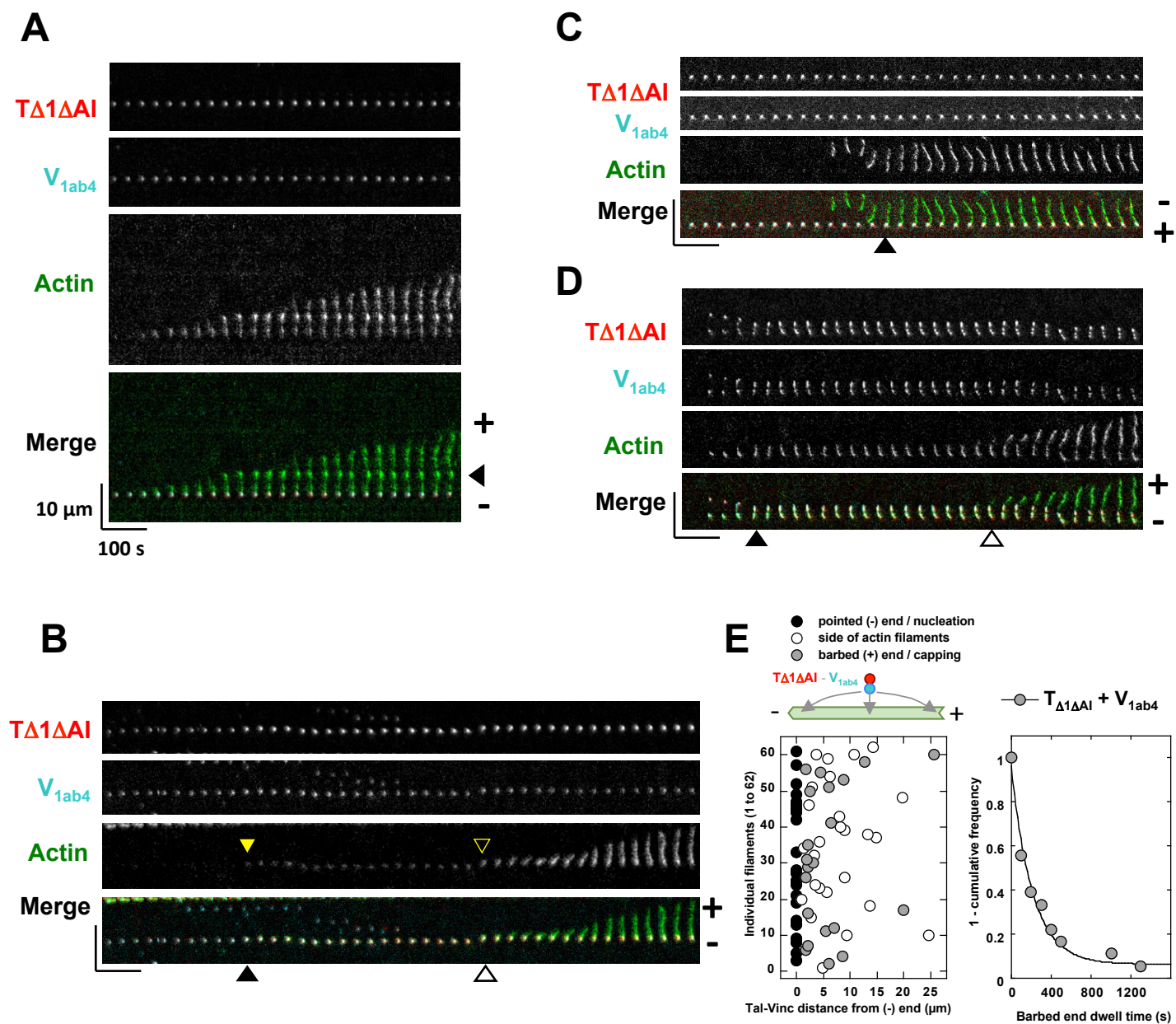


Figure 5

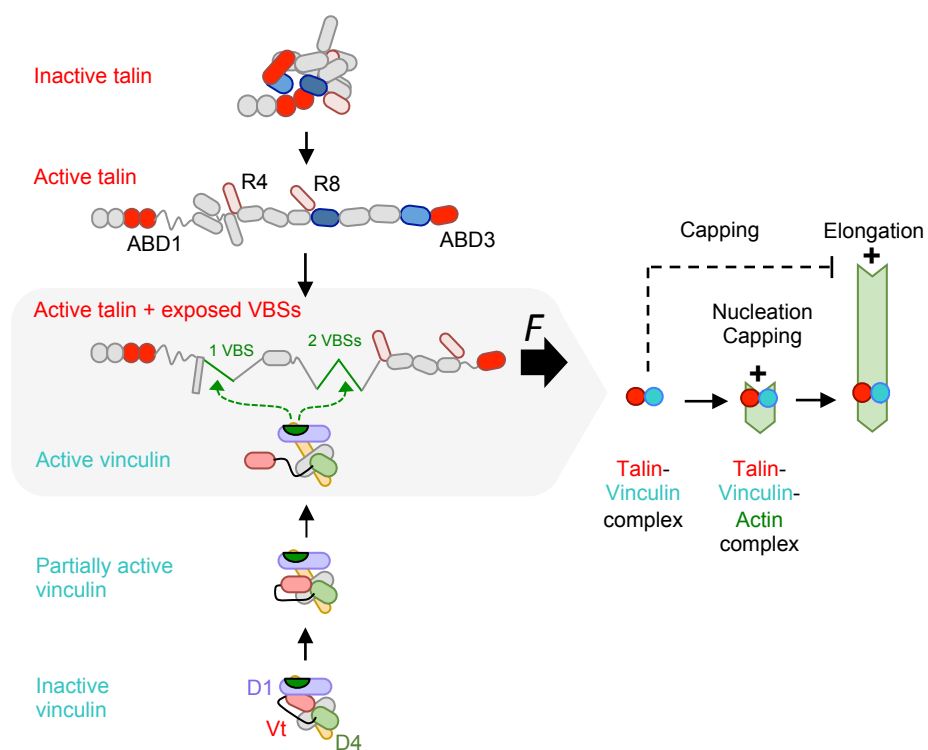


Figure 6

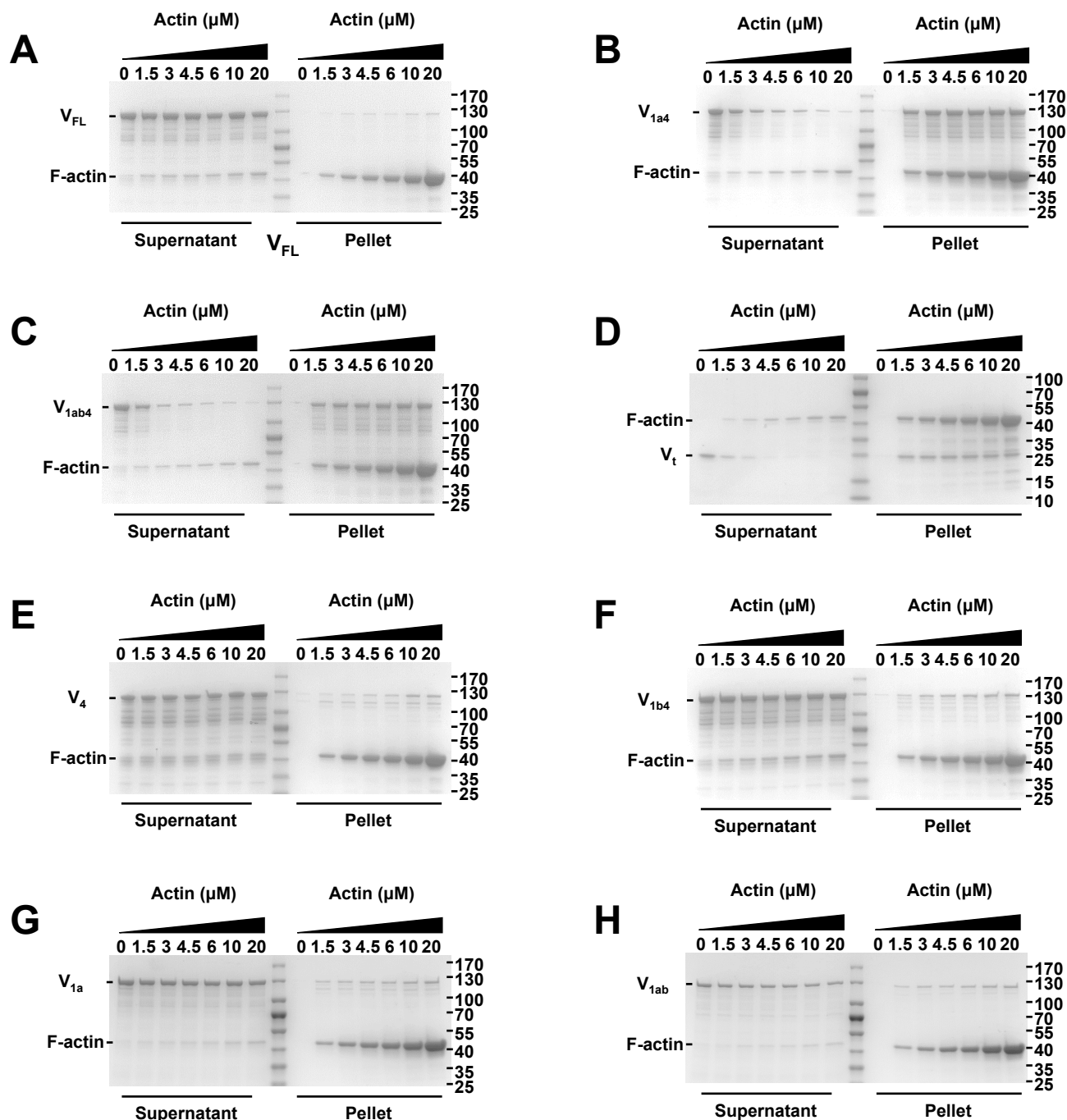
Supplementary Table 1: Summary of the activities of talin and vinculin mutants and their complexes measured in kinetic assays

Talin constructs						Vinculin constructs			Talin-vinculin complex activities			
Name	ABD exposed			AI released	exposed VBS in:					Side binding	Capping	Nucleation
	ABD1	ABD2	ABD3		R1 (1)	R3 (2)	VFL	V1a	V1ab4			
							x			-	-	-
								x		+	-	-
									x	++	+	+/-
VBS ₁	na	na	na	na	x		x			+	-	-
	na	na	na	na	x			x		++	-	-
	na	na	na	na	x				x	+++	+	+/-
TFL (WT)			x				x				-	-
								x			+	
									x			+/-
TΔ1			x			x	x				-	-
								x			++	
TΔ2			x				x		x		-	-
								x			++	
TΔ3			x			x	x		x		-	-
								x			++	
									x			+/-
TΔAI	x		x	x			x				-	-
								x			++	
									x			+
TΔ1ΔAI	x		x	x	x		x				-	-
								x			+++	
TΔ2ΔAI	x		x	x		x		x			++	++
									x		++	-
											+++	
TΔ3ΔAI	x		x	x	x	x	x				++	++
								x			++	+
									x		+++	
									x			++
TΔ1ΔAIΔABD2			x	x	x		x				-	-
								x			+++	

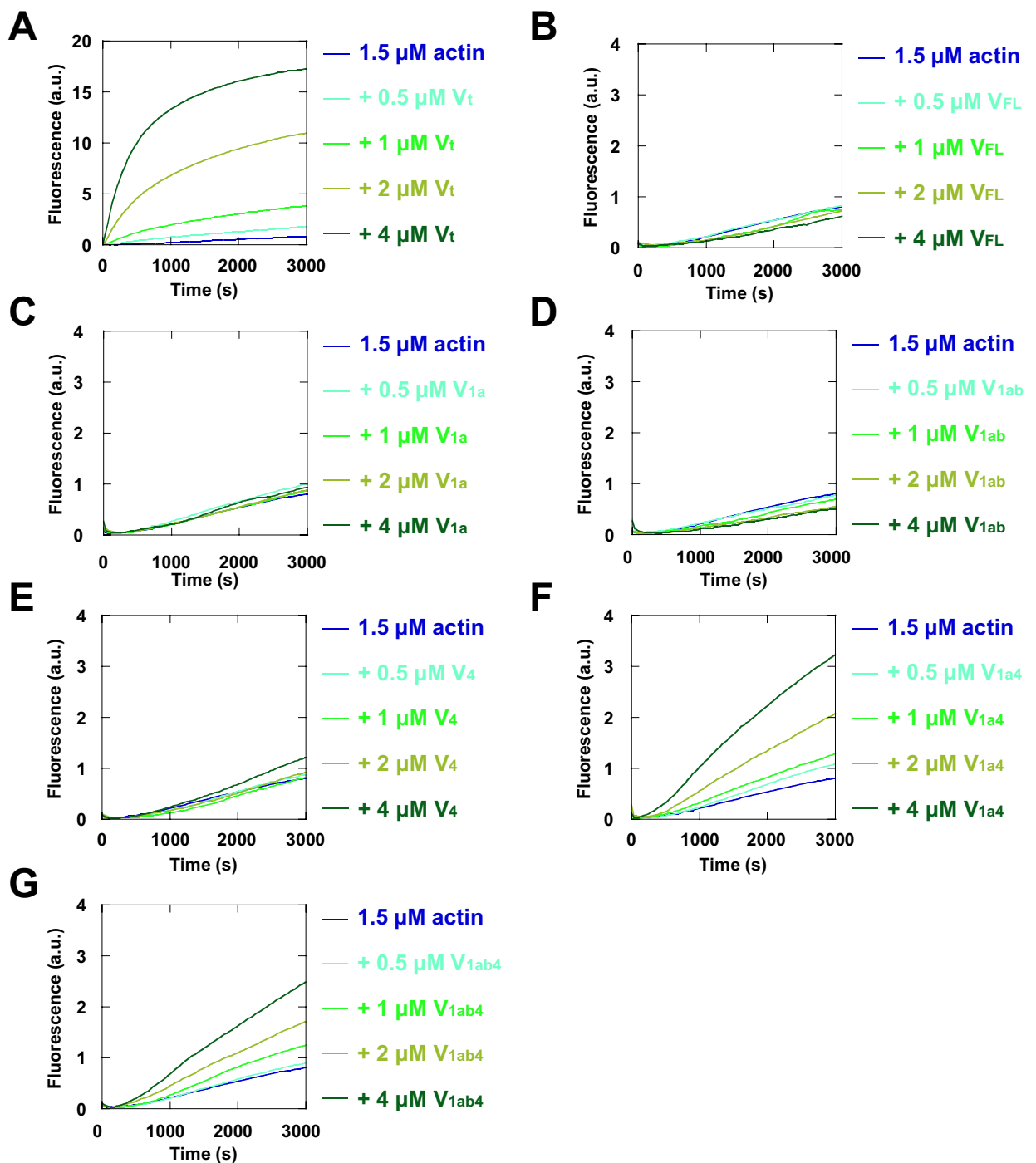
Talin and vinculin combine their activities to trigger actin assembly.

Wang et al.

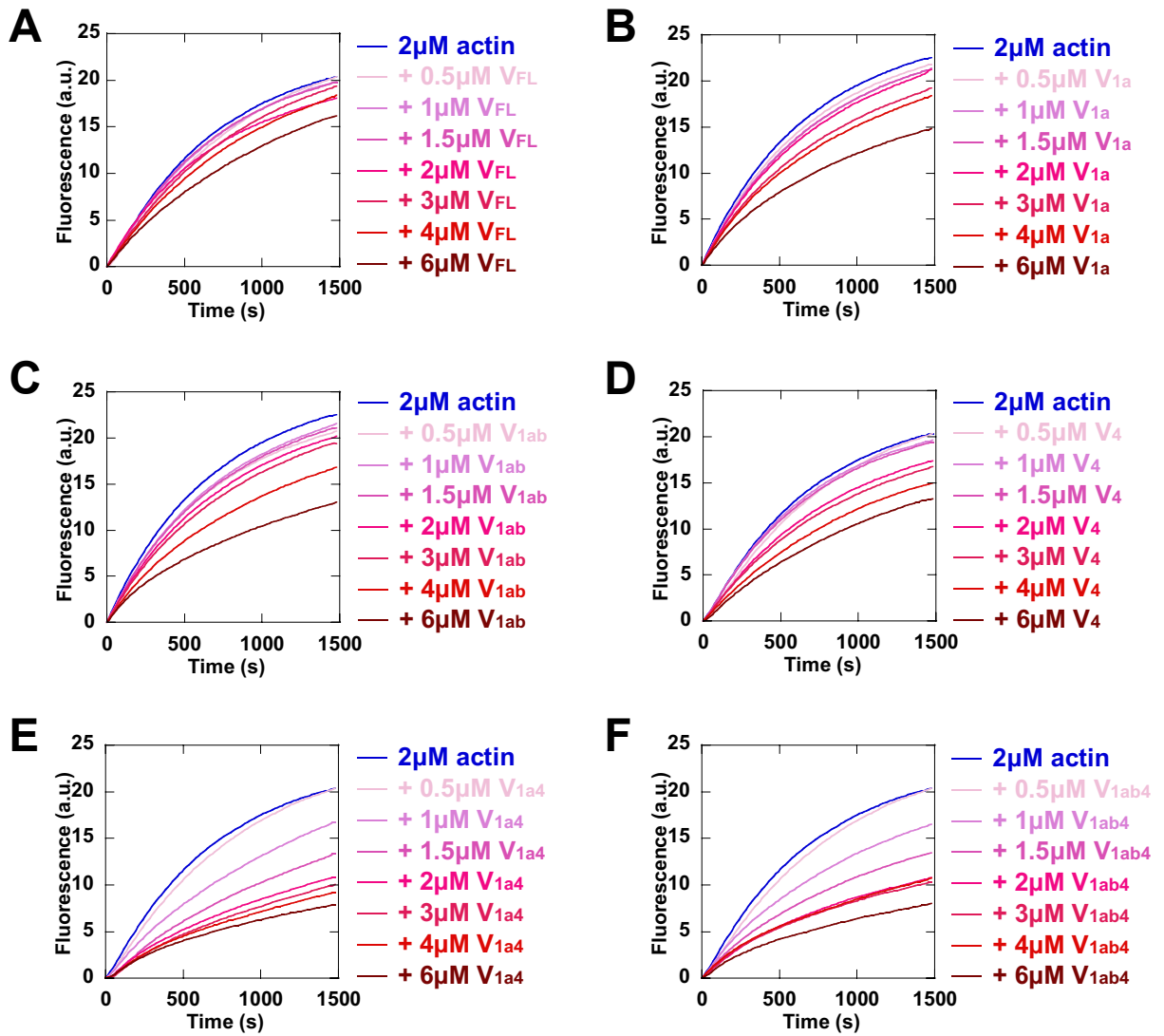
Supplementary Figures.



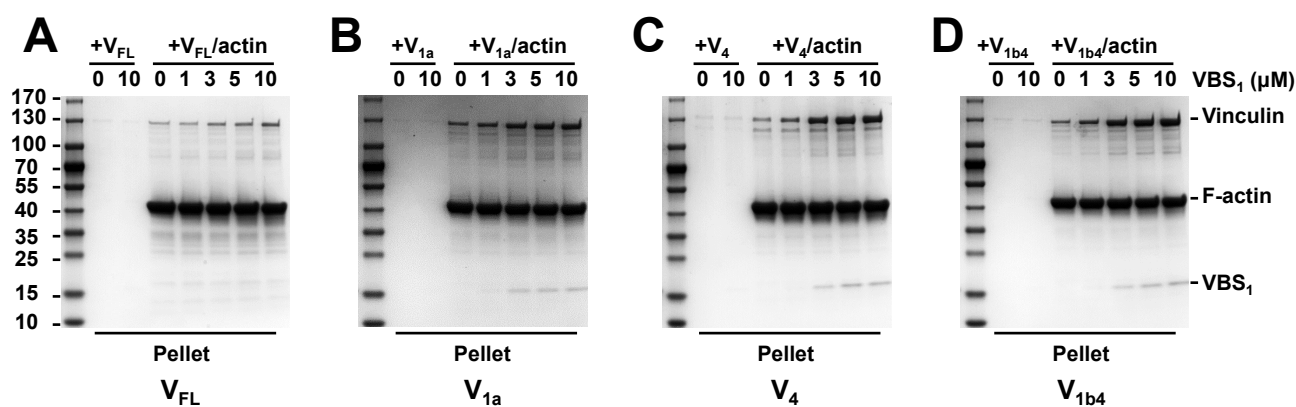
Supplementary figure 1. The high affinity binding of vinculin to the side of actin filaments requires the disruption of the contacts made by V_t with both D1 and D4. (A-H) SDS-PAGE gels showing the supernatant and pellet fractions of cosedimentation assays containing 2 μM of the indicated vinculin mutants and increasing concentrations of F-actin (0, 1.5, 3, 4.5, 6, 10, 20 μM).



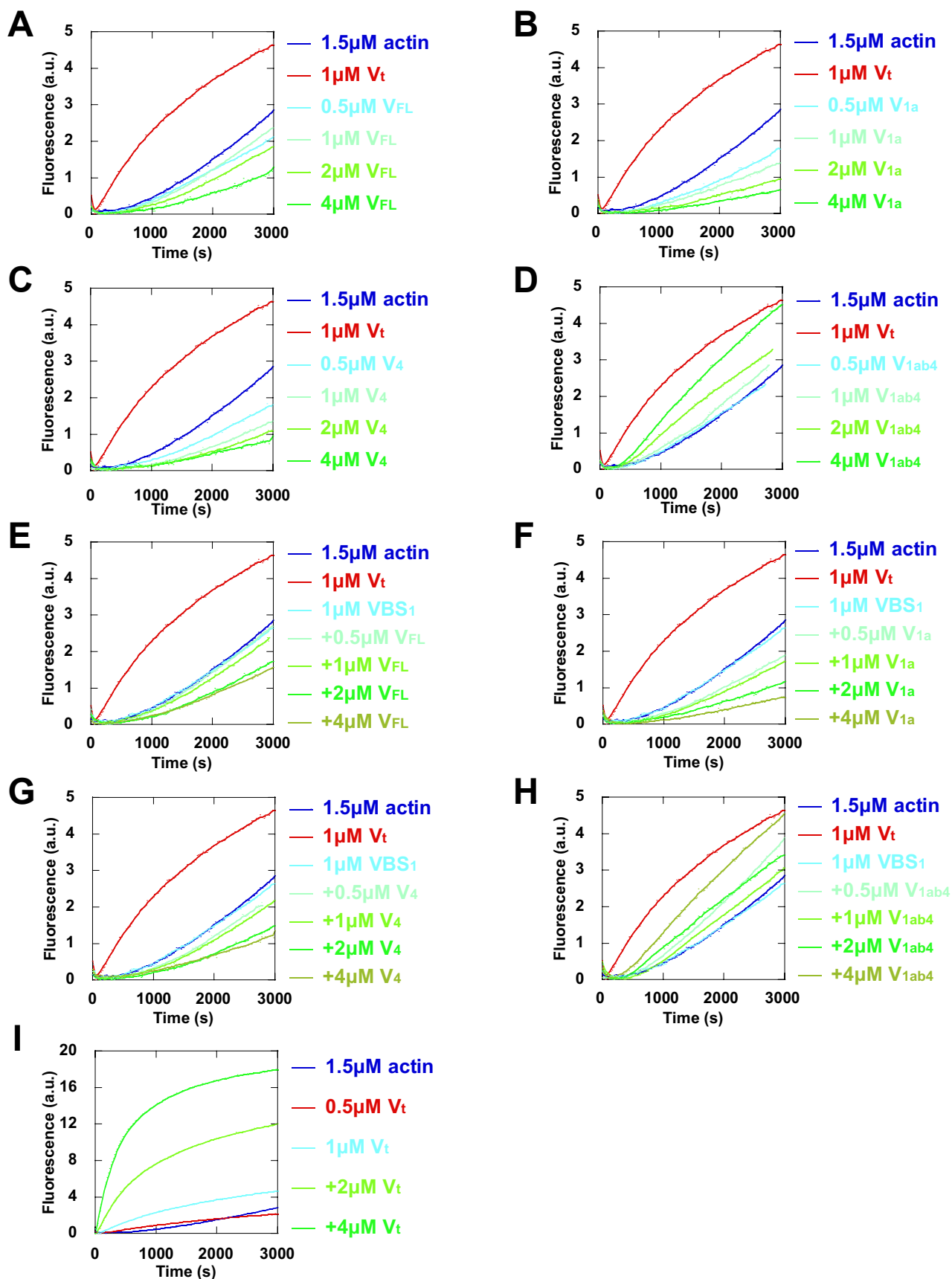
Supplementary figure 2. The release of the D1- V_t and D4- V_t contacts does not allow actin nucleation by vinculin. (A-G) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated vinculin mutants and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). The control kinetics corresponding to 1.5 μM actin alone are the same in all panel.



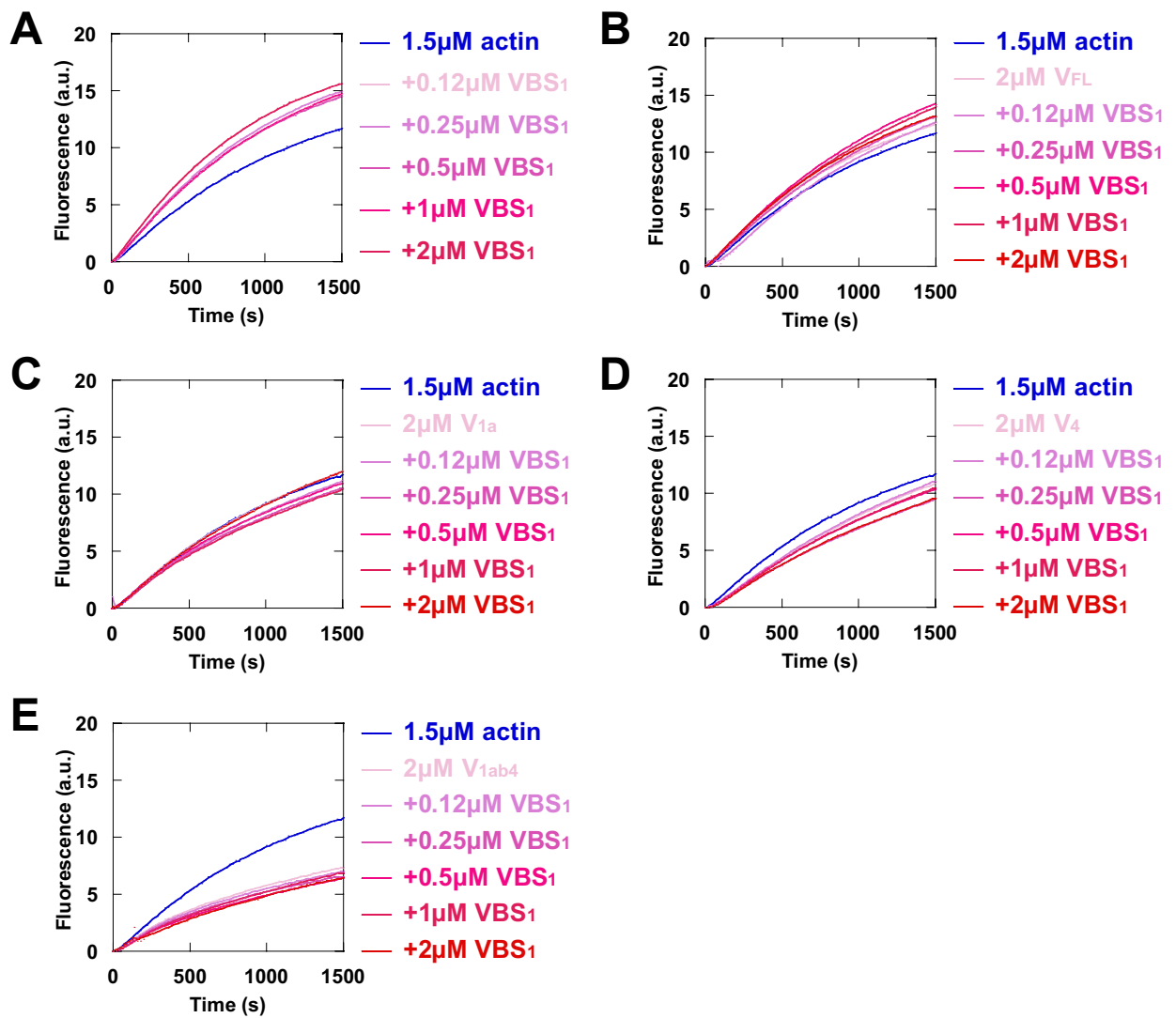
Supplementary figure 3. The release of the D1-V_t and D4-V_t contacts allows barbed-end capping by vinculin. (A-F) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated vinculin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds, 2 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics showing the polymerization of 2 μM actin alone are the same in all panels.



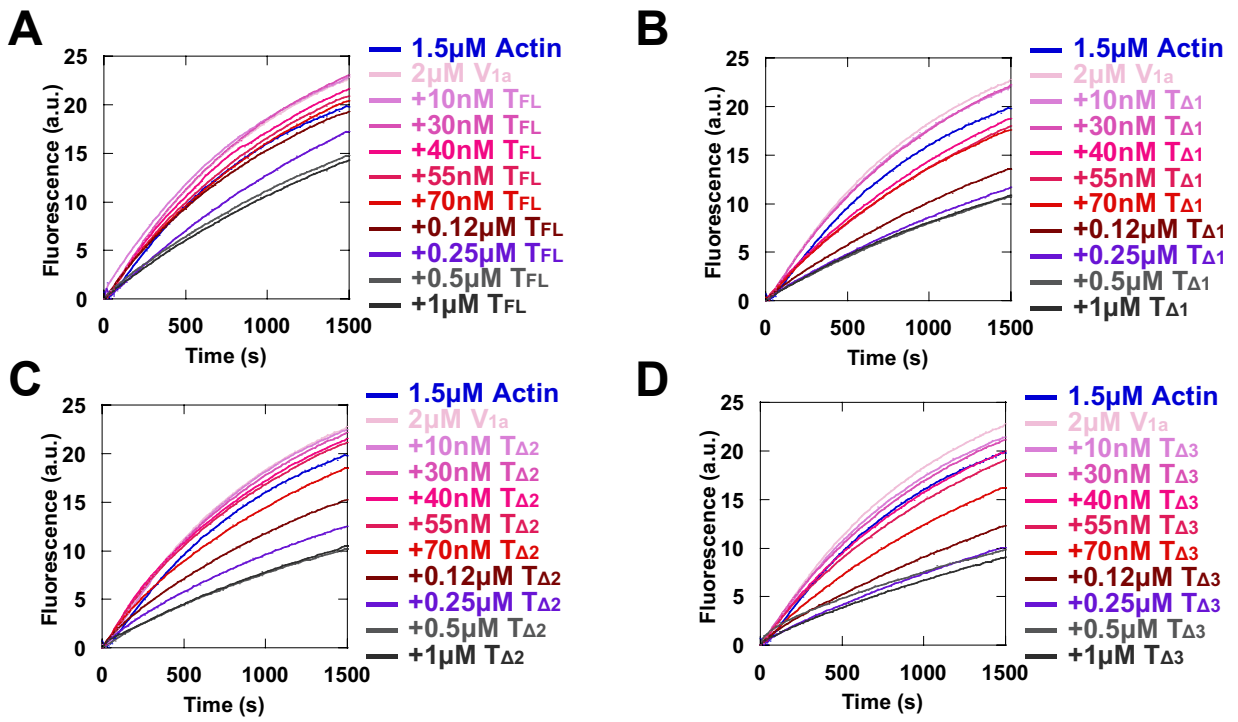
Supplementary figure 5. Talin VBS₁ combined with D4-V_t release induces vinculin binding to F-actin. (A-D) SDS-PAGE gels showing the pellet fractions of F-actin co-sedimentation reactions containing 2 μM of the indicated vinculin mutants, 10 μM F-actin and increasing concentrations of talin VBS₁ (0, 1, 3, 5, 10 μM).



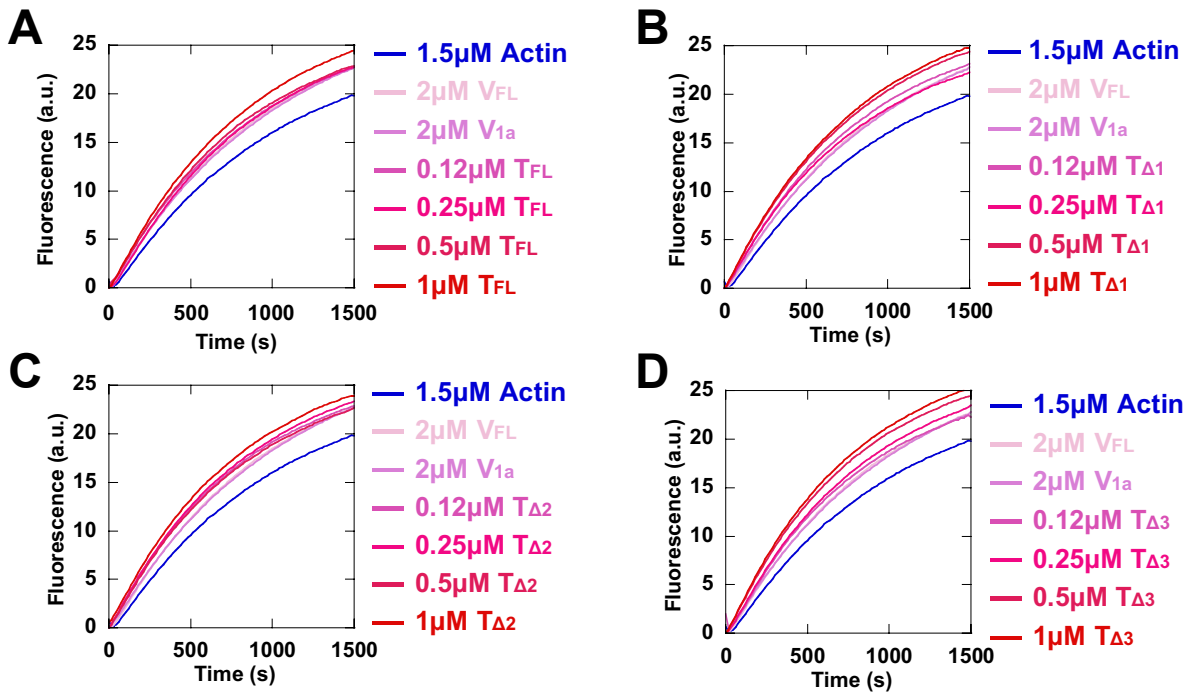
Supplementary figure 6. Talin VBS_1 combined with D4- V_t release has no effect on nucleation by vinculin. (A-I) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated vinculin mutants and 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl) in the absence of VBS_1 (A-D, I) and in presence of 1 μ M VBS_1 (E-H). The control kinetics showing the polymerization of 1.5 μ M actin in the presence of 1 μ M V_t , as a positive control, or in the presence of 1 μ M VBS_1 alone, as a negative control, are the same in all panels.



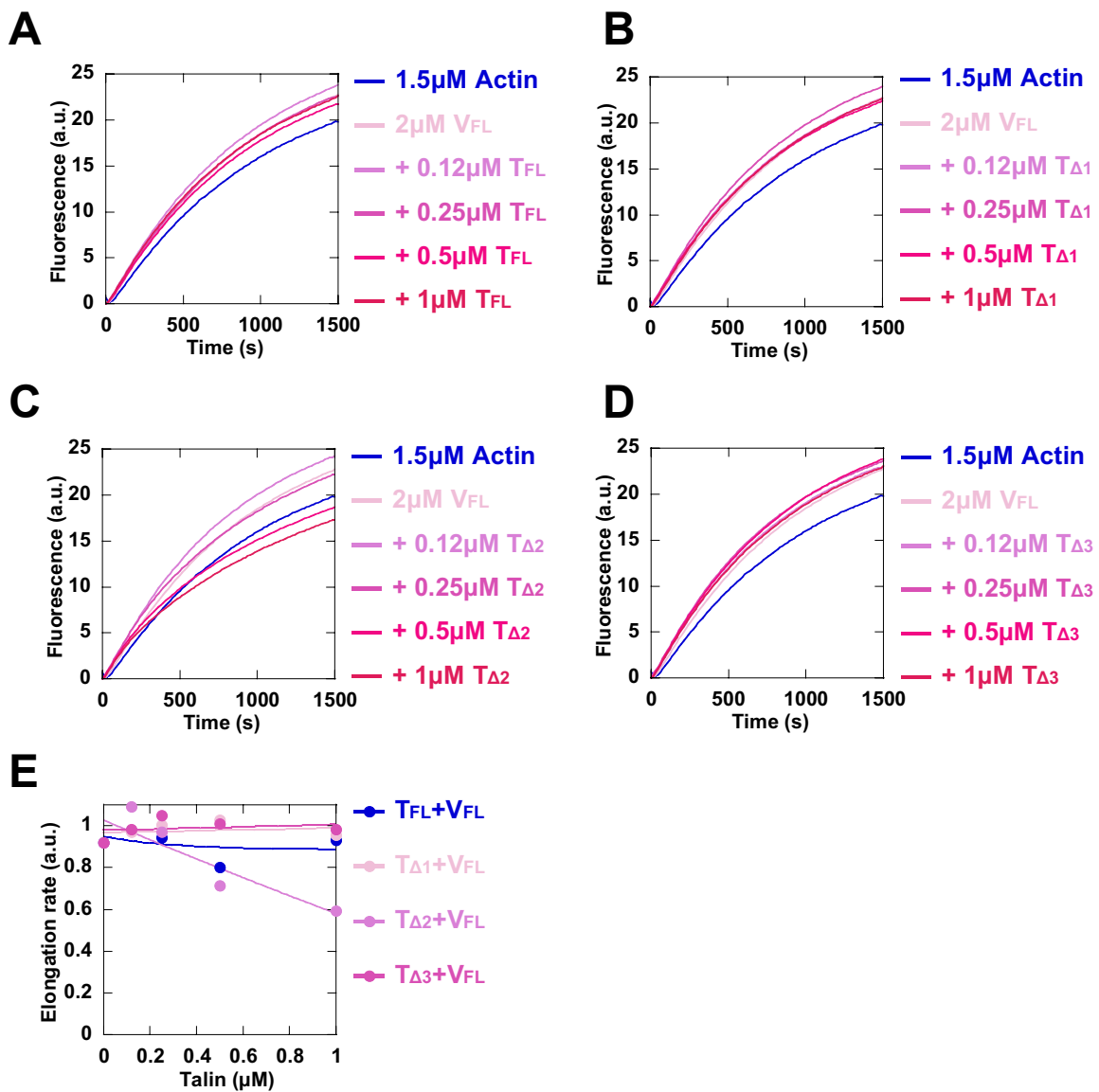
Supplementary figure 7. Talin VBS₁ combined with D4-V_t release has no effect on barbed-end capping by vinculin. (A-E) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of 2 μM of the indicated vinculin mutants with increasing concentrations of VBS₁ (0.12, 0.25, 0.5, 1, 2 μM), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics showing the polymerization of 1.5 μM actin alone are the same in all panels.



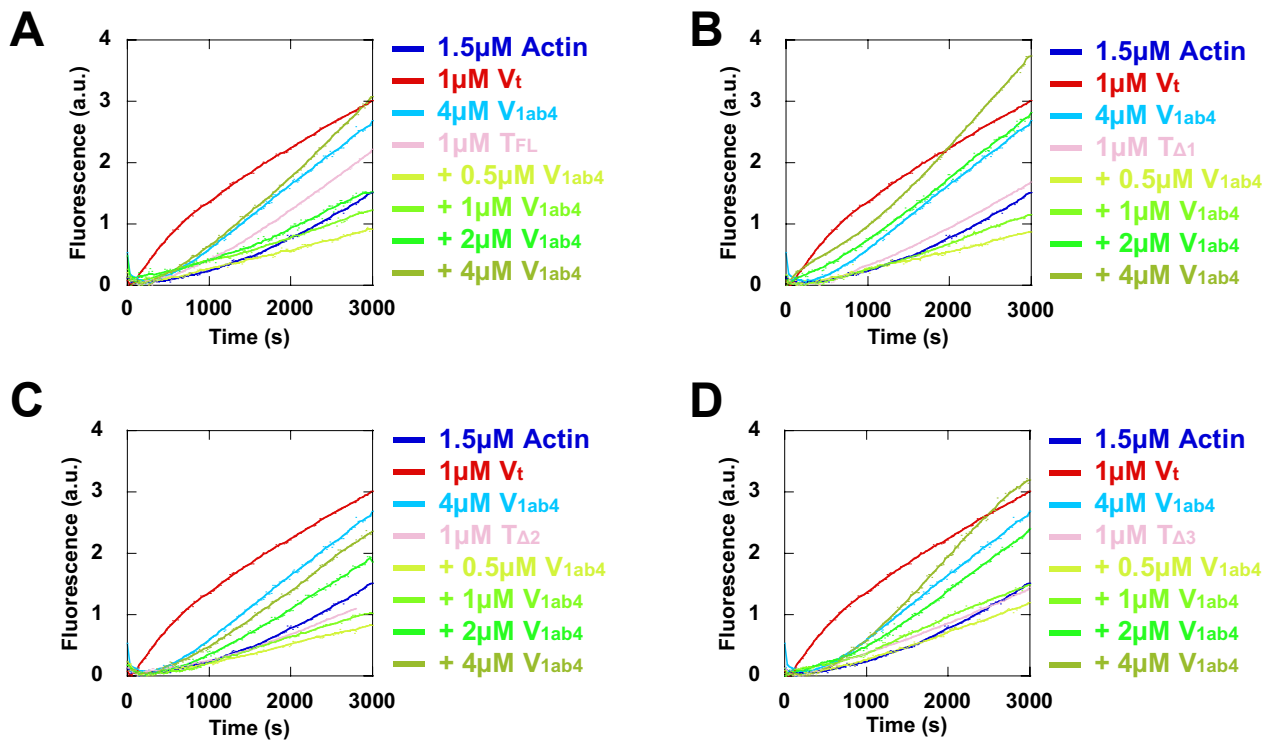
Supplementary figure 8. A complex composed of full-length talin with exposed VBSs and V_{1a} caps actin filament barbed ends. (A-D) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of 2 μM V_{1a} with increasing concentrations of the indicated talin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics showing the polymerization of 1.5 μM actin in the presence of 2 μM V_{1a} are the same in all panels.



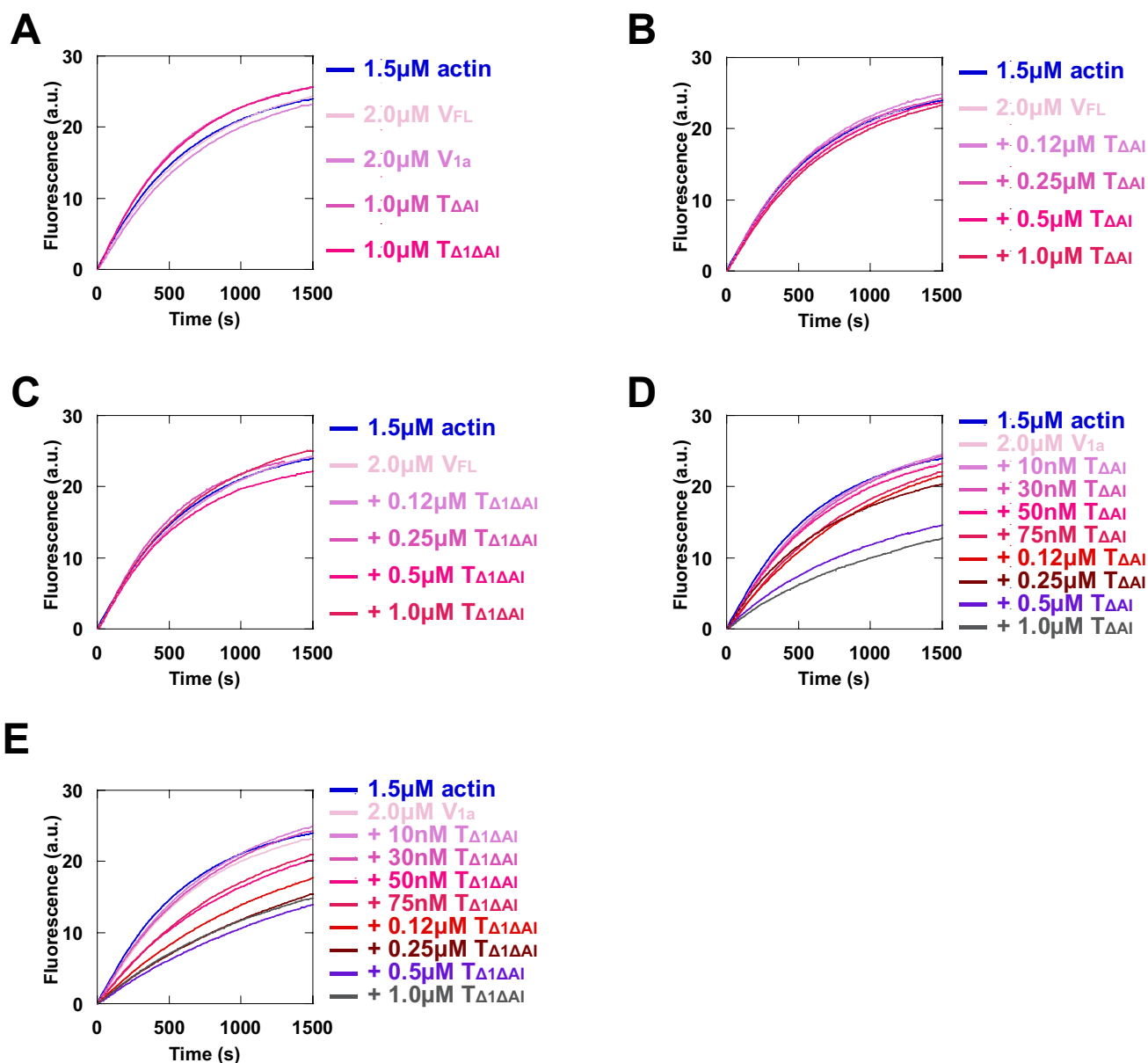
Supplementary figure 9. Talin mutants with exposed VBSs alone do not cap barbed ends. (A-D) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of the indicated talin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The kinetics with 1.5 μM G-actin, 2 μM V_{FL} or 2 μM V_{1a}, used here as additional negative controls, are the same in all panels.



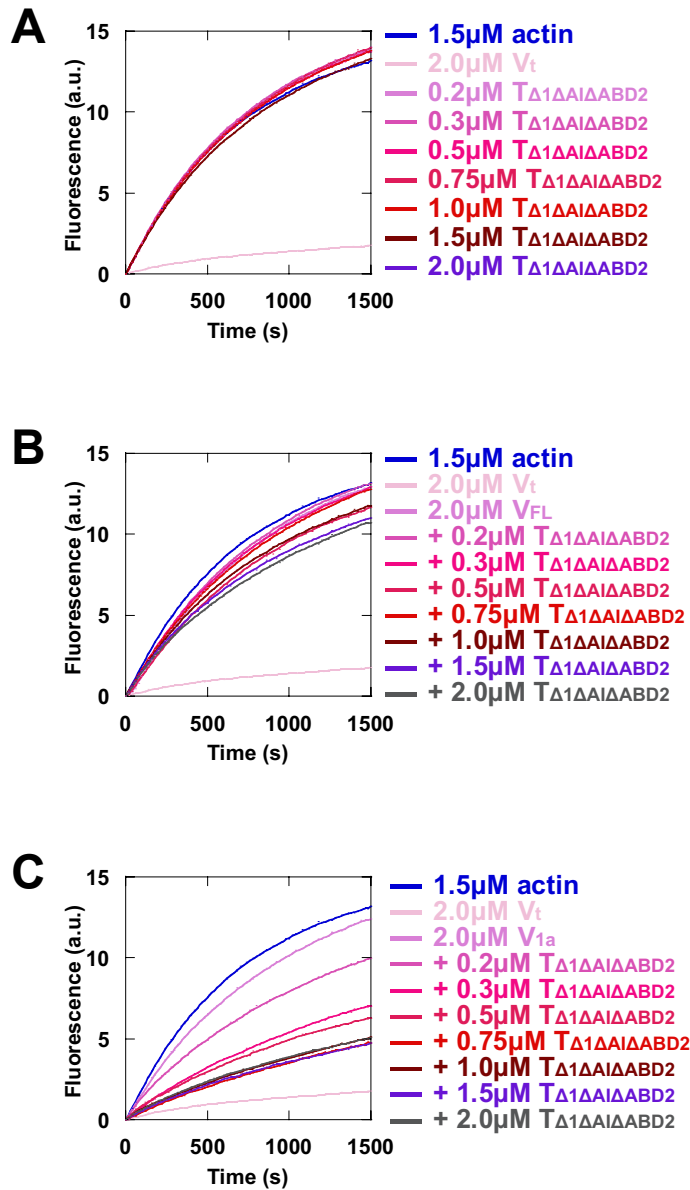
Supplementary figure 10. Addition of full-length talin with exposed VBSs to V_{FL} does not cap actin filament barbed ends. (A-D) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of 2 μ M V_{FL}, increasing concentrations of the indicated talin mutants, 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled). The kinetics with 1.5 μ M actin and 2 μ M V_{FL} are the same in all panels. **(E)** The fraction of barbed end elongation was calculated as the ratio of the elongation rate in the presence of V_{FL} and talin mutants to the elongation rate of 1.5 μ M actin alone.



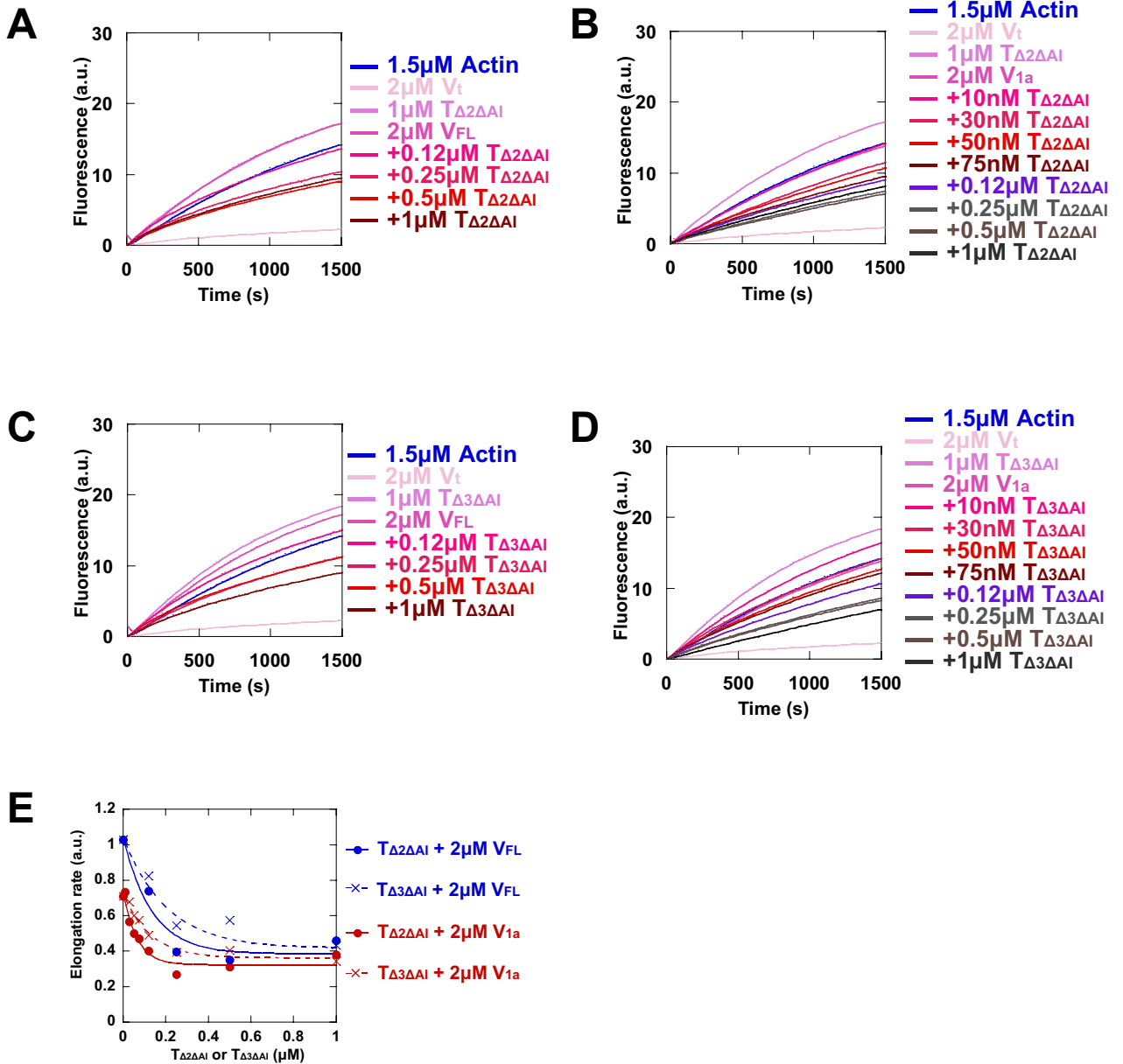
Supplementary figure 11. Talin mutants with exposed VBSs combined with V_{1ab4} do not stimulate actin assembly. (A-D) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of 1 μ M of the indicated talin mutants, increasing concentrations of V_{1ab4} and 1.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). The kinetics with 1.5 μ M actin and 1 μ M V_t alone, used as a positive control for nucleation, or 1.5 μ M actin and 4 μ M V_{1ab4} alone are the same in all panels.



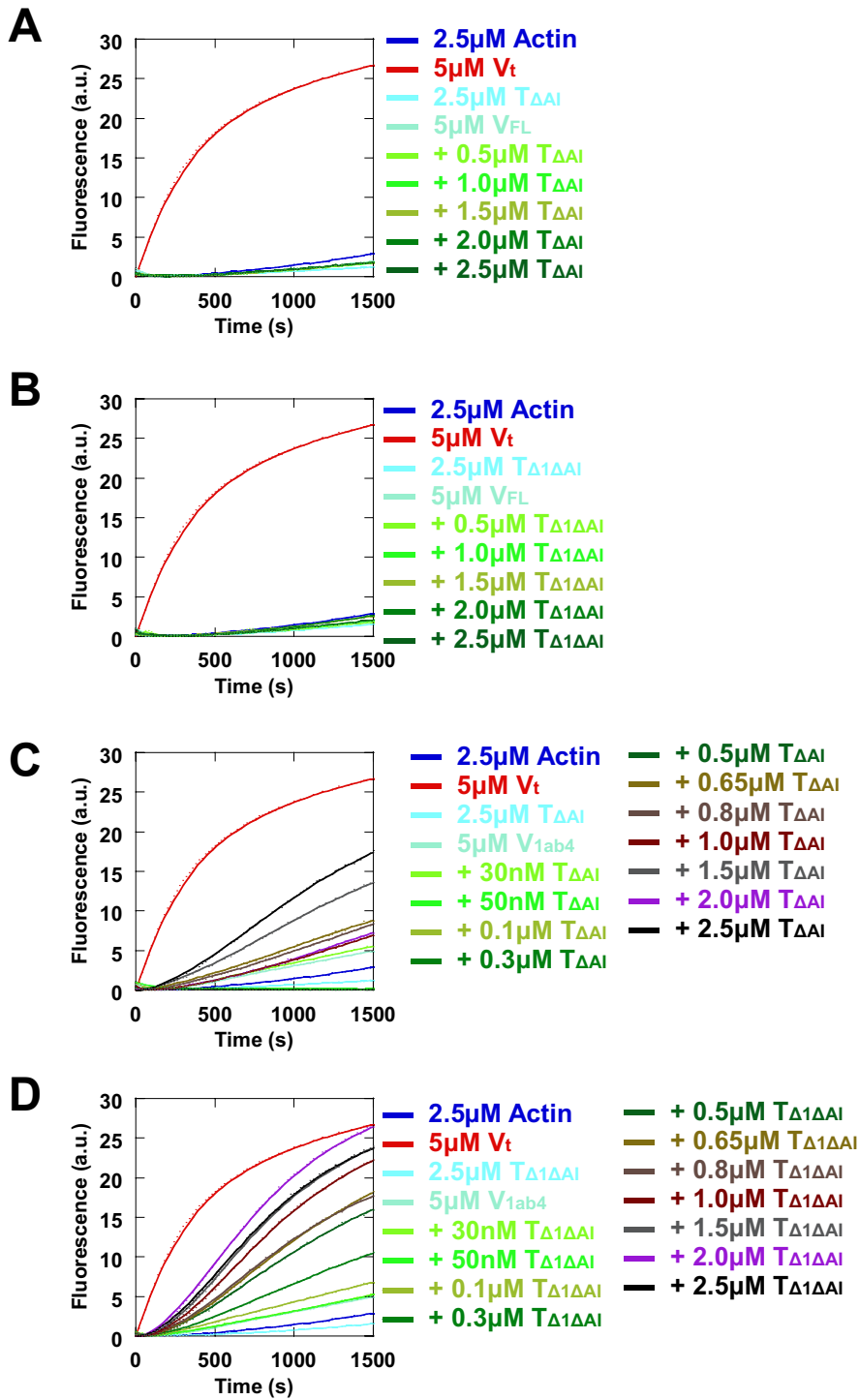
Supplementary figure 12. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and one exposed VBS combine with V_{1a} to cap actin filament barbed ends. The elongation of actin filament barbed end was measured in the absence and presence of 2 μM V_{FL} or 2 μM V_{1a} or 1 μM T_{ΔAI} or 1 μM T_{Δ1ΔAI} (**A**), in the presence of increasing concentrations of indicated talin mutants and 2 μM V_{FL} (**B-C**) or 2 μM V_{1a} (**D-E**), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics with 1.5 μM actin and 2 μM V_{FL} (**A-C**) or 1.5 μM actin and 2 μM V_{1a} (**D-E**) are the same in all panels.



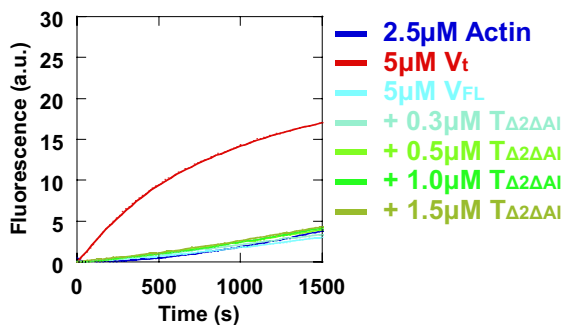
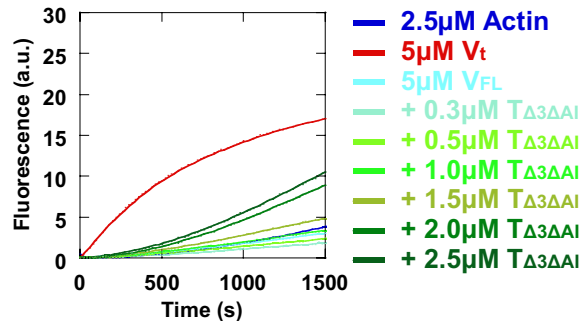
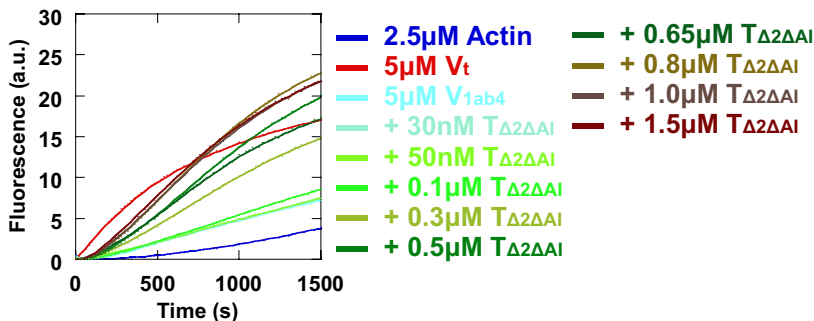
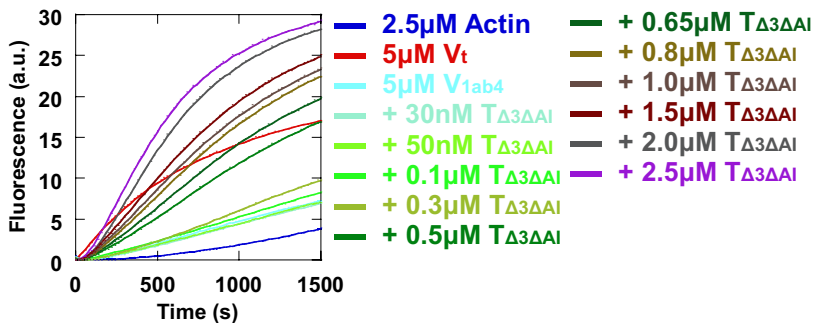
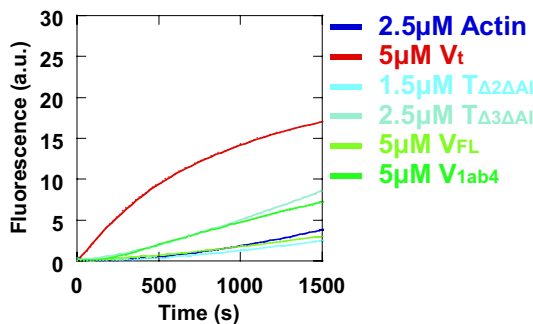
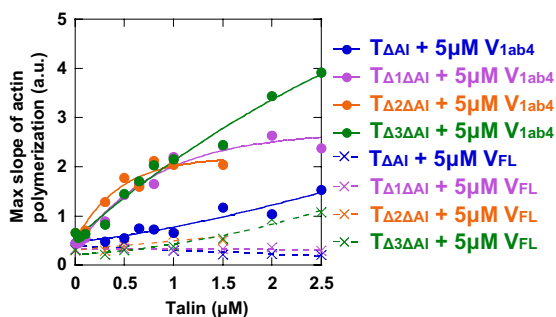
Supplementary figure 13. A talin mutant, with released autoinhibitory contacts, one exposed VBS and lacking ABD2, combines efficiently with V_{1a} , but not with V_{FL} , to cap actin filament barbed ends. (A-C) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$, 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) (A), increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta AI\Delta ABD2}$, 2 μM V_{FL} (B) or 2 μM V_{1a} (C), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The kinetics with 1.5 μM actin alone and 1.5 μM actin and V_t are the same in all panels.



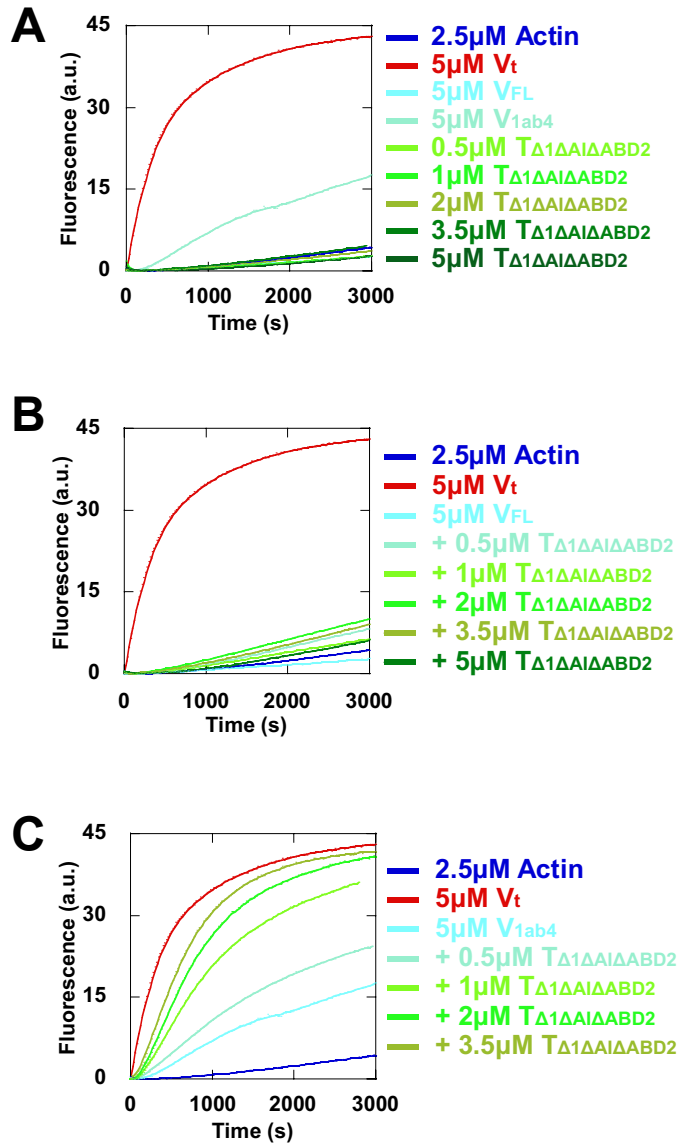
Supplementary figure 14. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and two or three exposed VBSs, combine with V_{FL} and V_{1a} to cap actin filament barbed ends. (A-E) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of increasing concentrations of $T_{\Delta 2\Delta AI}$ and 2 μM of V_{FL} (**A**), increasing concentrations of $T_{\Delta 2\Delta AI}$ and 2 μM of V_{1a} (**B**), increasing concentrations of $T_{\Delta 3\Delta AI}$ and 2 μM of V_{FL} (**C**), increasing concentrations of $T_{\Delta 3\Delta AI}$ and 2 μM of V_{1a} (**D**), 100 pM spectrin-actin seeds and 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). The control kinetics with 1.5 μM actin and 2 μM V_t or 1 μM $T_{\Delta 2\Delta AI}$ or 1 μM $T_{\Delta 3\Delta AI}$ or 2 μM V_{FL} or 2 μM V_{1a} are the same in all panels. (**E**) Quantification of the experiments in (A-D).



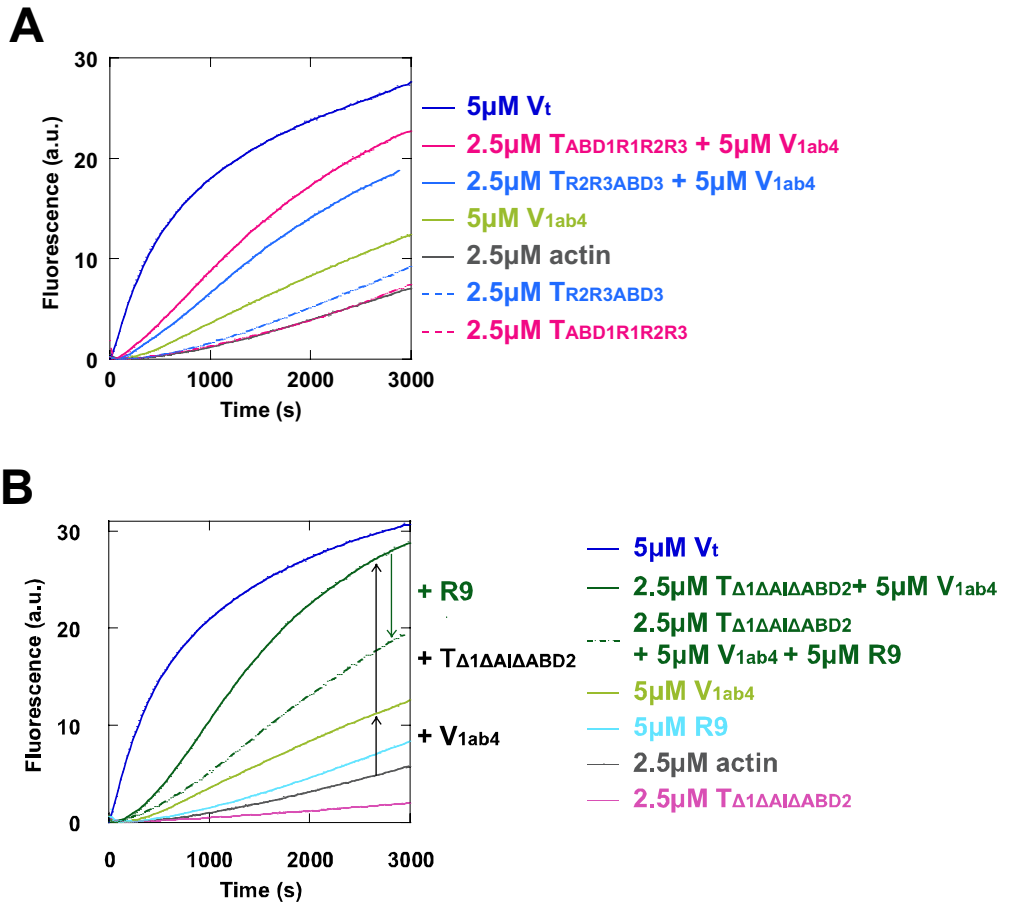
Supplementary figure 15. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and one exposed VBS, combine efficiently with V_{1ab4} to stimulate actin nucleation. (A-D) Actin polymerization was measured in the absence and presence of 5 μM of V_{FL} or V_{1ab4} with increasing concentrations of $T_{\Delta AI}$ or $T_{\Delta 1\Delta AI}$ and 2.5 μM G-actin (10% pyreyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). The kinetics with 2.5 μM actin alone, used as a negative control, and 2.5 μM actin and 5 μM V_t , used as a positive control for nucleation, are the same in all panels.

A**B****C****D****E****F**

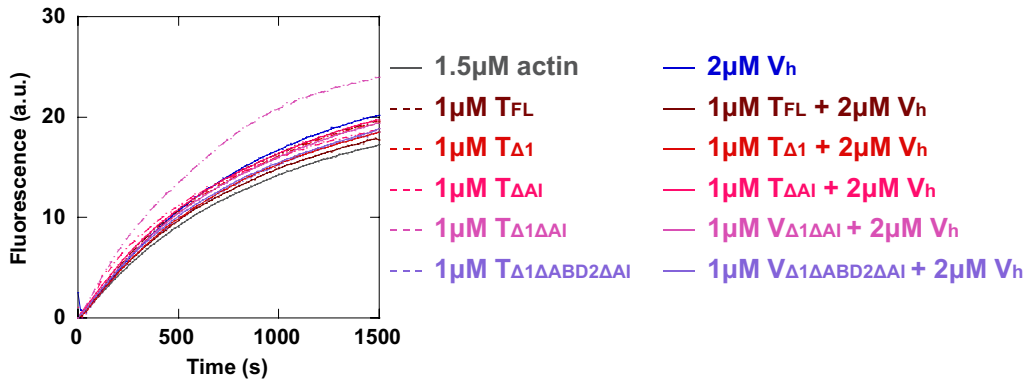
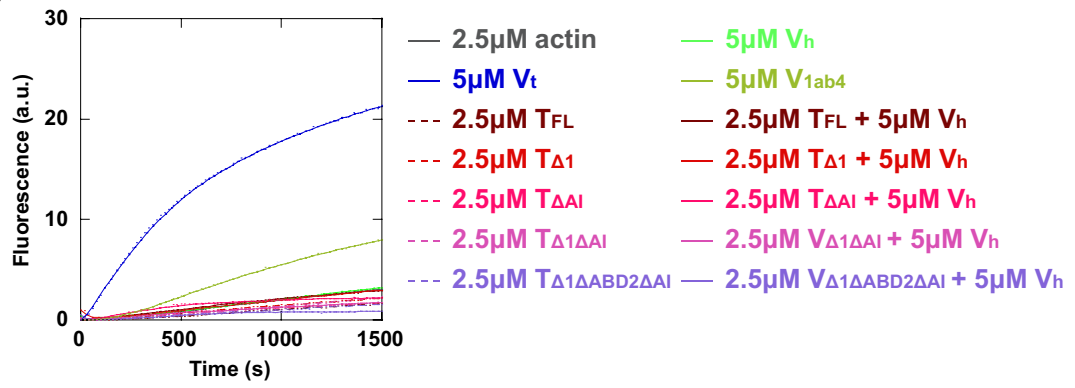
Supplementary figure 16. Talin mutants, with released autoinhibitory contacts and two or three exposed VBSs, combine efficiently with V_{1ab4} to stimulate actin nucleation. (A-D) Actin polymerization was measured in the presence of 5 μM of V_{FL} or V_{1ab4} with increasing concentrations of $T_{\Delta 2\Delta AI}$ or $T_{\Delta 3\Delta AI}$ and 2.5 μM actin (10% pyreyl-labeled) in a low salt buffer (25 mM KCl). **(E)** Additional negative control showing the polymerization of 2.5 μM actin (10% pyreyl-labeled) in the presence of 5 μM V_{FL} or 5 μM V_{1ab4} or 1.5 μM $T_{\Delta 2\Delta AI}$ or 2.5 μM $T_{\Delta 3\Delta AI}$. The kinetics with 2.5 μM actin alone, used as a negative control, and 2.5 μM actin and 5 μM V_t , used as a positive control for nucleation, are the same in all panels. **(F)** The maximal rate of spontaneous actin polymerization is plotted against increasing concentrations of talin mutants in the presence of V_{FL} or V_{1ab4} as described in (A-D). Data for $T_{\Delta 1\Delta AI}$ + V_{FL} or V_{1ab4} and $T_{\Delta AI}$ + V_{FL} or V_{1ab4} are the same as in Figure 3D.



Supplementary figure 17. A talin mutant, with released autoinhibitory contacts, one exposed VBS and lacking ABD2, combines efficiently with V_{1ab4} to stimulate actin nucleation. (A-C) Spontaneous actin polymerization was measured in the presence of 2.5 μ M actin (10% pyreyl-labeled) and increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta A I \Delta A B D 2}$ alone (A), increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta A I \Delta A B D 2}$ and 5 μ M V_{FL} (B) and increasing concentrations of $T_{\Delta 1\Delta A I \Delta A B D 2}$ and 5 μ M V_{1ab4} (C) in a low salt buffer (25 mM KCl). The kinetics with 2.5 μ M actin and 5 μ M V_t alone, used as a positive control or 5 μ M V_{1ab4} alone are the same in all panels.



Supplementary figure 18. Importance of talin ABDs for the activities of the talin-vinculin complex. (A,B) Spontaneous actin polymerization was measured in presence of 2.5 μ M actin (10% pyrenyl-labeled) and the indicated talin and vinculin mutants in a low salt buffer (25 mM KCl). The black arrows in (B) indicate the stimulation of actin polymerization by V_{1ab4} alone and V_{1ab4} + $T_{\Delta1\Delta AI\Delta ABD2}$. The dark green arrow in (B) indicates that R9 reverses the actin polymerization induced by V_{1ab4} + $T_{\Delta1\Delta AI\Delta ABD2}$.

A**B**

Supplementary figure 19. A talin-vinculin complex, in which vinculin lacks V_t, does not nucleate and cap actin filaments. (A) The elongation of actin filament barbed end was measured in the presence of the indicated proteins, 100 pM spectrin-actin seeds, 1.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled). **(B)** Spontaneous actin polymerization was measured in presence of 2.5 μM actin (10% pyrenyl-labeled) and the indicated proteins in a low salt buffer (25 mM KCl).