

Université Bordeaux Segalen

Année 2012

Thèse n°1967

Thèse

Pour le

Doctorat de l'Université Bordeaux 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 04 Décembre 2012

Par **Anaël Chazeau**

Né le 18 Octobre 1986 à Nancy

Rôle de l'organisation du cytosquelette d'actine branché et des adhésions N-cadhérine dans la dynamique des épines dendritiques

Membres du jury :

Nägerl Valentin	Professeur (Université Bordeaux 2)	Président du jury
Muller Dominique	Professeur (Université de Genève)	Rapporteur
Mège René-Marc	Directeur de recherche (CNRS)	Rapporteur
Gautreau Alexis	Directeur de recherche (CNRS)	Examineur
Dahan Maxime	Directeur de recherche (CNRS)	Examineur
Thoumine Olivier	Directeur de recherche (CNRS)	Membre invité
Giannone Grégory	Chargé de recherche (CNRS)	Directeur de thèse

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail de thèse et m'honorent de leur présence: le Pr. Valentin Nägerl, le Pr. Dominique Muller, le Dr. René-Marc Mège, le Dr. Alexis Gautreau et le Dr. Maxime Dahan.

Merci au Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, au Centre National de la Recherche Scientifique, au Conseil Régional d'Aquitaine, à la Fondation pour la Recherche Médicale et à l'Agence Nationale de la Recherche d'avoir soutenu nos projets.

Le paradoxe de la condition humaine, c'est qu'on ne peut devenir soi-même que sous l'influence des autres (Boris Cyrulnik). Je tiens donc à remercier les personnes qui font ce que je suis aujourd'hui.

Tous ceux qui ont, un jour, croisé ma route entre le Lycée Français Charles Lepierre, l'Université Bordeaux 2, l'Université de Montréal et les différents laboratoires où j'ai travaillé.

Plus récemment les membres de notre équipe, Olivier Thoumine, Magali Mondin, Béatrice Tessier, Olivier Rossier, Katalin Czöndör, Fabien Neca et mon directeur de thèse Grégory Giannone. J'espère un jour pouvoir re-travailler avec vous.

Mes plus proches amis, qui je l'espère, continueront de me façonner, Mikael Garcia, Laurent Ladépêche, Thomas Larrieu, Muna Hilal, Tiphaine Chevalier, Marion Sintes, Charly Ray, Marion Petregne, Aline Lacan, Bertrand Vialet, Maïlys Decognier, Lionel Arnaud, Ronan Richard, Sonia Richard, Romain Duquennoy, Allyson Duquennoy, Fabrina Olive et Johann Cazemajou.

Ma famille et plus particulièrement Papa, Maman et Meïdy. Si vous me voyez tel que je suis aujourd'hui c'est grâce à votre amour éternel et inconditionnel.

Ma meilleure amie, mon amante, celle qui fera de moi l'homme que je serai demain, Leslie Cherry.

Il ne me reste donc plus qu'un devoir, celui de vous aimer.

Résumé

Les épines dendritiques sont de petites protrusions post-synaptiques présentant des changements morphologiques corrélés avec la plasticité synaptique. Elles ont pour origine les filopodes dendritiques qui s'élargissent lors du contact avec l'axone. Ces changements morphologiques impliquent une grande variété de molécules dont des protéines associées à l'actine et des protéines d'adhésion. Cependant, comment ces différentes protéines sont coordonnées dans le temps et l'espace est encore largement méconnu. De plus, les techniques de microscopie conventionnelle ne permettent pas d'étudier l'organisation et la dynamique de ces protéines dans les épines dont la taille est proche de la limite de résolution. L'objectif de ma thèse a donc été d'explorer le rôle des protéines associées à l'actine ainsi que celui des protéines d'adhésion N-cadhérines dans l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine des épines dendritiques.

Dans une première étude, nous avons suivi la motilité des filopodes et épines dendritiques de neurones en visualisant l'actine-GFP. Nous avons couplé cette approche avec : 1) une technique de piégeage optique de microsphères recouvertes de N-cadhérines ou des substrats micro-imprimés également recouverts de N-cadhérines afin de contrôler temporellement et spatialement les adhésions cadhérine-cadhérine, 2) la stimulation pharmacologique de la myosine II afin d'induire la contraction F-actine/myosine et 3) l'expression de mutants de N-cadhérine non adhésifs. Nous avons ainsi démontré que la stabilisation des filopodes en épines était dépendante de l'engagement d'un embrayage moléculaire entre les adhésions trans-synaptiques N-cadhérine et le flux rétrograde d'actine généré par les myosines II.

Dans une deuxième étude, nous avons utilisé la microscopie super-résolutive (PALM et dSTORM) et le suivi de protéines individuelles (sptPALM) pour étudier l'organisation et la dynamique à l'échelle nanométrique des protéines à l'origine des réseaux d'actine branchés dans les épines. Ainsi, nous avons caractérisé la localisation et la dynamique de l'actine, du complexe Arp2/3, du complexe WAVE, d'IRSp53, de VASP et de Rac-1. Nous avons montré que, contrairement aux structures motiles classiques comme lamellipode, le réseau d'actine branché dans les épines n'est pas formé aux extrémités protrusives puis incorporé dans un flux rétrograde d'actine. Ce réseau est initié à la PSD puis croît vers l'extérieur afin de générer les protrusions membranaires responsables des changements morphologiques de l'épine. Nos résultats montrent également qu'un contrôle strict de l'activité de Rac-1 est nécessaire au maintien de la morphologie des épines dendritiques et de l'architecture du réseau d'actine branché.

L'ensemble de mon travail souligne l'importance du rôle de l'organisation à l'échelle nanométrique du réseau d'actine branché et des adhésions N-cadhérine dans la dynamique et la formation des épines dendritiques. Ces résultats pourraient avoir un rôle important dans la compréhension des changements morphologiques lors de la plasticité synaptique.

Mots clés: épines dendritiques, protéines régulatrices de l'actine, N-cadherine, PSD, microscopie super-résolutive, suivi de protéines individuelles.

Abstract

Dendritic spines are tiny post-synaptic protrusions exhibiting changes in morphology correlated with synaptic plasticity. They originate from motile dendritic filopodia, which enlarge after contacting axons. These morphological changes involve a wide number of molecular actors, including actin-binding proteins, and adhesion molecules. However, how these various molecular components are coordinated temporally and spatially to tune changes in spine shape remains unclear. Furthermore, conventional photonic microscopy techniques could not achieved the spatial resolution required to study the dynamic nanoscale organization of these proteins within the micron size dendritic spines. The objective of my Ph.D. was to unravel how actin-binding proteins and N-cadherin adhesion regulate the organization and dynamics of F-actin network in dendritic spines.

In a first study, we measured the motility of dendritic filopodia and spines by time lapse imaging of actin-GFP in primary hippocampal neurons. We combined those measurements with: 1) manipulation of N-cadherin coated beads with optical tweezers, or micropatterns to control the timing and location of nascent N-cadherin adhesions, 2) pharmacological stimulation of myosin II to trigger contraction of the F-actin/myosin network and 3) expression of non-adhesive N-cadherin mutants to compete for the interaction between N-cadherin adhesion and F-actin. Using these different approaches we demonstrated that the stabilization of dendritic filopodia into mature spines was dependent on the engagement of a molecular clutch between trans-synaptic N-cadherin adhesions and the myosin driven F-actin flow.

In a second study, we used super resolution microscopy (PALM and dSTORM) and single protein tracking (sptPALM) to study the dynamic nanoscale organizations of branched actin networks within dendritic spines. Using these technics, we characterized within dendritic spines, the localization and dynamics of actin, Arp2/3 complex, WAVE complex, IRSp53, VASP and Rac-1. We established that, opposite to classical motile structures such as the lamellipodium, branched F-actin networks in dendritic spines are not formed at the tip of membrane protrusions and incorporated in a retrograde flow. On the contrary, they are growing outwards from the PSD generating membrane protrusions responsible for spine motility. We also show that a thigh control of Rac1 activity is required to maintain dendritic spine morphology and branched actin network organization.

Altogether, these studies point out the role of the nanoscale functional organization of F-actin networks and its linkage to adhesion proteins in the regulation of dendritic spine formation and dynamics. These findings may have important implications in the understanding of spine morphology changes driven by synaptic activity.

Key words: dendritic spine, actin-binding proteins, N-cadherin, PSD, super resolution microscopy and single protein tracking.

Publications et communications

Publications:

Chazeau A.^{1,2}, Garcia M.^{1,2,3}, Czöndör K.^{1,2}, Argento A.³, Perrais D.^{1,2}, Poujol C.⁴, Giannone G.^{1,2} and Thoumine O.^{1,2}. *A mechanical coupling between N-cadherin adhesion and F-actin flow stabilizes dendritic spines*. In preparation.

Chazeau A.^{1,2}, Nair D.^{1,2}, Gautier J.³, Leduc C.⁴, Thoumine O.^{1,2}, Choquet D.^{1,2}, Gautreau A.³, Sibarita J.B.^{1,2} and Giannone G.^{1,2}. *Dynamic nanoscale organizations of branched actin networks within dendritic spines*. In preparation.

Communications affichés:

Chazeau A., Garcia M., Czöndör K., Levet F., Perrais D., Giannone G. and Thoumine O. *Evidence for a mechanical coupling between N-cadherin adhesions and F-actin in stabilizing dendritic spines*. (8th FENS Forum of Neuroscience, 2012, Barcelona, Spain).

Chazeau A., Garcia M., Czöndör K., Levet F., Perrais D., Giannone G. and Thoumine O. *Evidence for a mechanical coupling between N-cadherin adhesions and F-actin in stabilizing dendritic spines*. (Journée de l'école doctorale, 2012, Arcachon, France).

Chazeau A., Czöndör K., Garcia M., Levet F., Perrais D., Giannone G. and Thoumine O. *Evidence for a mechanical coupling between N-cadherin adhesions and F-actin in stabilizing dendritic spines*. (EMBO workshop, 2011, Heraklion, Greece).

Chazeau A., Czöndör K., Garcia M., Levet F., Perrais D., Giannone G. and Thoumine O. *Evidence for a mechanical coupling between N-cadherin adhesions and F-actin in stabilizing dendritic spines*. (Journée de l'école doctorale, 2011, Arcachon, France).

Chazeau A., Czöndör K., Levet F., Giannone G. and Thoumine O. *Evidence for a mechanical coupling between N-cadherin adhesions and F-actin in shaping dendritic spines*. (Jacques Monod Conference, 2010, Roscoff, France).

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	9
INTRODUCTION	13
Avant-propos	14
I. Assemblage et désassemblage de l'actine	14
a. Du monomère d'actine (G-actine) au filament d'actine (F-actine) : mécanisme du "tapis roulant"	14
b. Les séquestrateurs : profiline, B-thymosines	16
c. Les nucléateurs	16
i. Les formines	17
ii. Spire et Cordon bleu	19
iii. Le complexe ARP2/3 et ses activateurs	20
d. Les protéines de coiffe : gelsoline, Eps8, CapZ	24
e. Le désassemblage du réseau d'actine : rôle de l'ADF/Cofiline	25
f. Les petites RhoGTPases	27
II. Création de différentes architectures à partir d'un réseau d'actine	29
a. Le filopode conventionnel	29
i. L'initiation d'un filopode	29
ii. L'élongation et la stabilisation du filopode	31
iii. Filopode et déformation membranaire	32
iv. Le désassemblage du réseau d'actine dans le filopode	34
b. Le lamellipode de cellule motile	36
i. Le modèle de nucléation dendritique	36
ii. La controverse sur le modèle de nucléation dendritique	40
iii. Le désassemblage du réseau d'actine dans le lamellipode	41

III. Régulation du cytosquelette d'actine par les adhésions cadhérines	42
a. La structure des cadhérines	42
b. Le complexe cadhérine/caténines : un point d'ancrage pour la régulation du cytosquelette d'actine	45
c. Le modèle de l'embrayage moléculaire	49
IV. Le cytosquelette d'actine dans la structure post-synaptique	51
a. Formation, structure et dynamique du filopode dendritique	55
b. Du contact filopode-axone à la synaptogenèse	57
c. Rôle du complexe N-cadhérine/caténines dans la synaptogenèse structurale	60
d. Architecture et dynamique du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques	62
V. Le cytosquelette d'actine et la plasticité synaptique	69
a. Rôle du Ca^{2+} et de la CAMKII dans la régulation du cytosquelette d'actine	70
b. La plasticité synaptique et le remodelage du cytosquelette d'actine	72
c. Rôle du cytosquelette d'actine dans le maintien de la plasticité synaptique	75
d. Rôle de la N-cadhérine dans la plasticité synaptique	77
Objectifs	79
SUPPLEMENT INFORMATIONS VIDEOS	80
ANNEXE METHODE	81
I. Microscopie super-résolution : PALM	83
II. Microscopie super-résolution : STORM et dSTORM	84
III. Le TIRF	85
IV. Segmentation, localisation et reconstruction	86
V. Le sptPALM	87
VI. 3D et résolution en (z)	89

RESULTATS	90
I. Etude n°1: "A mechanical coupling between N-cadherin adhesion and F-actin flow stabilizes dendritic spines"	91
a. Contexte et problématique	91
b. Résumé des résultats	92
c. Manuscrit	94
II. Etude n°2: "Dynamic nanoscale organizations of branched actin networks within dendritic spines"	130
a. Contexte et problématique	130
b. Résumé des résultats	130
c. Manuscrit	133
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	181
I. Localisation de la myosine et dynamique de l'actine	182
II. Rôle de la composante mécanique de l'embrayage moléculaire dans la transition filopode/épine dendritique	183
III. Rôle de la composante signalétique de l'embrayage moléculaire dans la transition filopode/épine dendritique	184
IV. Quel flux d'actine dans les épines dendritiques?	186
V. N-cadhérine et PSD comme point d'ancrage du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques	187
VI. PSD, contrainte physique et protrusions membranaires	188
VII. Réorganisation du cytosquelette d'actine des épines dendritiques lors de la plasticité synaptique	189
VIII. Conclusion	191
BIBLIOGRAPHIE	192

ABREVIATIONS

Abi:	Abelson interactor
Abl:	Ableson non-receptor tyrosine kinase
ABP:	Actin binding protein
ABP ₂ :	AMPA receptor binding protein
Abp1:	actin binding protein 1
ADP:	Adénosine Diphosphate
AF-6:	afadine
APV:	DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid
APC:	adenomatous polyposis coli
ARP2/3:	actin-related-protein 2/3
ARVCF:	armadillo repeat protein deleted in velo-cardio-facial syndrome
ATP:	Adénosine Triphosphate
BAR:	Bin-Amphiphysin-Rvs161/167
Bni1:	bud neck involved
βPIX:	β Pak-interacting exchange factor
CAMKI:	calcium/calmodulin dependant protein kinase I
CAMKII:	calcium/calmodulin dependant protein kinase II
CAMKK:	calcium/calmodulin dependant protein kinase kinase
CapZα/β:	Capping protein α/β
Ccdc53:	coiled-coil domain-containing protein 53
Cdc-42:	cell division cycle 42
cLTP:	chemical LTP
Cobl:	Cordon Bleu
COS:	Cercopithecus aethiops Origin-defective SV40
CP:	Capping Protein
CPI:	capping protein interactin
DAD:	Dia autoregulatory domain
DID:	Dia inhibitory domain
Dlg1:	Drosophile disc large tumor suppressor
DN :	dominant négatif
dSTORM:	direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy
EC:	ectodomaine

EGRF:	epidermal growth factor receptor
EPLIN:	epithelial protein lost in neoplasm
Eps8:	EGRF substrate pathway #8
ERM:	ezrin/radixin/moesin
EVH1/2:	ENA/VASP homology 1/2
FAB:	F-actin-binding site
F-BAR:	FER-CIP4-homology BAR
Fc:	Fragment constant
FH1:	Formin Homology 1
FH2:	Formin Homology 2
fPALM:	fluorescence photoactivation localization microscopy
FRAP:	Fluorescence Recovery after Photobleaching
FRET:	fluorescence resonance energy transfer
GAB:	G-actin-binding site
GABA:	acide γ -aminobutyrique
GBD:	GTPase-binding domain
GDP:	Guanosine Diphosphate
GEF:	guanine nucleotide exchange factor
GluA:	ou rAMPA: α -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-isoxalone propionic acid
GluN:	ou NMDA: N-méthyl-D-aspartate
GPI	glycosyl phosphatidyle inositol
GSD:	ground state depletion
GTP:	Guanosine Triphosphate
HEK:	Human Embryonic Kidney 293 cells
I-BAR:	inverse BAR
ICAMs:	Intercellular adhesion molecules
Ig:	immunoglobuline
IMD:	IRSp53-MIM-homology domain
IQGAP1:	IQ motif-containing GTPase-activating protein 1
IRSp53:	Insulin Receptor Substrate p53
JMY:	junction-mediating regulatory protein
Lbc:	lymphoid blast crisis
Lfc:	Lbc's first cousin
LIMK:	LIM-Kinase

LTD:	long term depression
LTP:	long term potentiation
mDia1:	mouse Diaphanous 1
MEC:	matrice extracellulaire
MLC:	myosin light chain
MSD:	mean square displacement
NAB-1:	neurabine-I
Nap1:	NCK-associated protein 1
NPF:	Nucleating promoting factor
N-WASP:	Neural-WASP
PA-GFP:	Photoactivable green fluorescent protein
Pak:	p21-activated kinase
PALM:	Photoactivated localization microscopy
PDZ:	PSD Dlg1 ZO1
PH:	pleckstrin homology
Pi:	Phosphate inorganique
PICK-1:	protein interacting with C kinase 1
PIP2:	Phosphatidylinositol (4, 5) biphosphate
PIP3:	Phosphatidylinositol (3, 4, 5) triphosphate
PRD:	proline rich domain
PSD:	densité post-synaptique
Rac1:	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBD:	Rho binding domain
RNA:	Ribonucleic acid
rEph:	récepteur éphrine
RhoA:	Ras homologous member A
RhoGTPase:	Ras homologous member Guanine Triphosphatase
RICS:	RhoGAP involved in the β -catenin-N-cadherin ans NMDA receptor signaling
ROCK:	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase ou Rho kinase.
sh:	small hairpin
SH3:	Src homology domain 3
SHD:	SCAR homology domain
si:	small interfering
SNC:	système nerveux central

sptPALM:	single particle tracking PALM
Sra1:	specifically Rac-associated protein 1
SSIM:	saturated structured illumination
STED:	Stimulated emission depletion microscopy
SWIP:	strumpellin and WASH-interacting protein
SynCAM:	Synaptic Cell Adhesion Molecule
Tβ-4:	Thymosine-Beta-4
TBR:	tubulin-binding region
TIRF:	total internal reflection fluorescence
TLCN:	télencéphaline
Toca-1:	Transducer of Cdc42-dependent actin assembly
TTX:	tétrodotoxine
VASP:	vasodilator-stimulated phosphoprotein
WASH:	WASP and SCAR homologue
WASP:	Wiskott-Aldrich syndrome protein
WAVE:	WASP-family verprolin homologue
WH1 ou 2:	WASP Homology 1 ou 2
WHAMM:	WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules
Wnt:	contraction de Wg (wingless) et Int (integration site)
ZO1:	zonula occludens protein 1

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Avant-propos

Le monde vit aujourd'hui dans une idéologie que l'on appelle le scientisme, apparue au 19^{ème} siècle et découlant du rationalisme de Descartes. Le scientisme est une idéologie selon laquelle toute vérité, toute connaissance ne peut être atteinte que par les sciences. Dans cette perspective, il n'existe pas de vérités philosophiques, religieuses ou morales supérieures aux théories scientifiques. Le biologiste Félix le Dantec disait en 1911 : "[...] je crois que la Science et la Science seule résoudra toutes les questions qui ont un sens ; je crois qu'elle pénétrera jusqu'aux arcanes de notre vie sentimentale [...]". Or depuis un siècle, les succès indéniables de la recherche scientifique et de la technologie ont contribué à répandre la mentalité scientifique étant donnée la manière dont elle a pénétré les différentes cultures, nos raisonnements et notre manière d'appréhender le monde.

Ainsi je considère que la Science est devenue la religion de notre société et nous en sommes les prophètes. Je dirais même plus que nous en sommes les créateurs. Cependant comme le disait Anatole France "les vérités découvertes par l'intelligence demeurent stériles. Le cœur est seul capable de féconder ses rêves".

Voici donc mon prêche.

I. Assemblage et désassemblage de l'actine

a. Du monomère d'actine (G-actine) au filament d'actine (F-actine) : mécanisme du "tapis roulant"

Tout commence il y a trois milliards d'années par un ancêtre commun aux cellules eucaryotes. Parmi les 400 gènes de cet ancêtre il y a celui qui code pour l'ancêtre de l'actine. Cette dernière est donc hautement conservée dans les cellules eucaryotes. Il n'y a d'ailleurs qu'une seule exception, le spermatozoïde de nématode (Roberts and Stewart, 1997). L'actine est une protéine de 43 KDa, sa forme monomérique globulaire est nommée G-actine. Ces monomères d'actine peuvent polymériser en filaments hélicoïdaux polaires double-brins que l'on nomme F-actine (figure 1). L'assemblage des trois premiers monomères est thermodynamiquement défavorable et est appelé nucléation. Ces trimères adopteront une conformation hélicoïdale stable et l'addition de nouveaux monomères sera appelée élongation. Lorsqu'un monomère d'actine s'incorpore dans le filament il subit un changement de conformation. De plus, les monomères d'actine ont tous la même orientation dans ce filament. Ceci confère une polarité structurale dont découle la polarité biochimique et thermodynamique. En effet, le bout barbé (ou extrémité barbée) a une

constante de vitesse d'association (k_{on}) et de dissociation (k_{off}) des monomères d'actine supérieures à celles du bout pointu (ou extrémité pointue). Le ratio entre la constante de dissociation et d'association définira la concentration critique ($k_{off}/k_{on} = C_c$) pour chaque extrémité, c'est-à-dire la concentration pour laquelle l'assemblage (polymérisation) et le désassemblage (dépolymérisation) sont à l'équilibre.

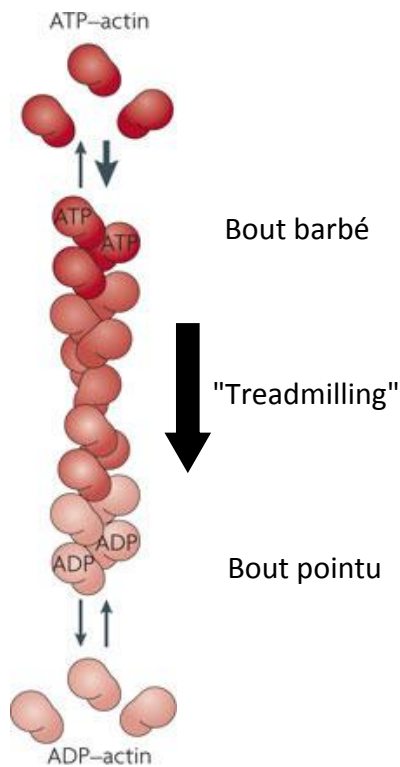


Figure 1 : L'horloge interne du filament d'actine

Schéma représentant la polymérisation de monomères G-actine-ATP au bout barbé du filament. Une fois incorporé dans le filament le monomère va subir une variation structurale induisant le processus d'hydrolyse de l'ATP en ADP+Pi. Puis le Pi se dissocie du monomère. Enfin, le monomère d'actine-ADP se dissocie au bout pointu du filament, c'est la dépolymérisation. Le filament possède ainsi une polarité structurale et la propriété d'être un véritable tapis roulant. D'après Campellone and Welch, 2010.

Il faut noter également que les monomères d'actine sont associés à l'Adénosine TriPhosphate (ATP) et à un cation divalent (Mg^{2+} ou Ca^{2+}). Lorsqu'il s'incorpore au filament le monomère subit une variation structurale qui induit un processus d'hydrolyse irréversible de l'ATP en ADP+Pi (Adénosine DiPhosphate + Phosphate inorganique) en 2-3 secondes, le Pi se dissociant du monomère 6 à 9 minutes après (figure 1 ; Blanchoin and Pollard, 2002 ; Murakami et al., 2010). Cette variation structurale participe à la polarité structurale du filament d'actine et donc à sa polarité thermodynamique. En effet, la constante de vitesse d'association au bout barbé étant supérieure celle du bout pointu, la polymérisation de G-actine-ATP sera plus rapide que l'hydrolyse de l'ATP au bout barbé et inversement au bout pointu. Or la concentration critique (C_c) d'une extrémité actine-ADP est supérieure à celle d'une extrémité actine-ATP. Ainsi pour une concentration de G-actine-ATP supérieure à la C_c de l'extrémité barbé actine-ATP mais inférieure à la C_c de l'extrémité pointu actine-ADP, des G-actine-ATP sont incorporés au bout barbé du filament d'actine alors que les monomères d'actine-ADP sont dissociés au bout pointu du filament. Ceci confère aux filaments d'actine la propriété remarquable d'être un "tapis roulant" ou "treadmill". On parlera alors de "treadmilling" de filaments d'actine. Ce mécanisme joue le rôle d'horloge interne du

filament donnant le vieillissement des sous-unités d'actine au sein du filament. Ceci contrôlera l'affinité avec les protéines associées à l'actine ou "actin binding proteins" (ABPs). Or contrairement à l'actine, hautement conservée, les ABPs ont considérablement évoluées sur la même période de temps (Galkin et al., 2012). Ainsi, l'architecture et la dynamique du réseau d'actine dépendra de la fonction de ces ABPs.

b. Les séquestrateurs : profiline, B-thymosines

La cellule ne peut pas se permettre de générer des filaments d'actine de façon spontanée et non contrôlée. De plus, elle doit maintenir une concentration stable de G-actine afin d'engendrer une polymérisation rapide, localisée et structurée dans la cellule. Un moyen pour la cellule de contrôler la nucléation spontanée est de séquestrer les monomères d'actine par des ABPs. La thymosine-beta-4 ($T\beta$ -4) est une petite protéine capable de lier un monomère d'actine avec un ratio 1:1. En se liant aux G-actines, $T\beta$ -4 induirait un changement de conformation de celui-ci et inhiberait l'échange de nucléotide (De La Cruz et al., 2000). Une fois le complexe G-actine-ATP/ $T\beta$ -4 formé, les monomères ne peuvent plus s'assembler spontanément et ne peuvent plus s'incorporer aux filaments d'actine. Ce complexe agit donc ainsi comme un tampon (Lodish et al., 2000). Une autre protéine essentielle est la profiline qui comme $T\beta$ -4 forme un complexe 1:1 avec G-actine-ATP et empêche la nucléation spontanée (Goldschmidt-Clermont et al., 1991 ; Lodish et al., 2000). Cependant sa capacité à tamponner les monomères est moins importante que celle de $T\beta$ -4. De plus, contrairement à la $T\beta$ -4, la profiline possède également la capacité à catalyser l'échange ADP vers ATP puis d'inhiber l'hydrolyse de l'ATP (Goldschmidt-Clermont et al., 1991), ce qui confère au complexe profiline/G-actine la propriété de favoriser l'association au bout barbé des filaments mais pas au bout pointu. Ainsi la profiline permet non seulement de limiter une nucléation spontanée mais également de favoriser une polymérisation au bout barbé.

c. Les nucléateurs

Par quel processus la cellule est-elle capable de créer de nouvelles extrémités barbées à partir du complexe G-actine/profiline ? Ce processus, appelé nucléation *de novo* (Pollard et al., 2000), peut en fait être catalysé par plusieurs ABPs comme les formines, le complexe "Actin Related Proteins 2/3" (ARP2/3), spire et cordon-bleu (Cobl). De part leur spécificité, ces nucléateurs formeront des architectures de réseaux d'actine différents.

i. Les formines

Les formines sont des protéines dimériques à multidomains qui possèdent notamment deux domaines essentiels à son activité : "Formin Homology 1" (FH1) et "Formin Homology 2" (FH2). Les domaines FH1 contiennent le site de liaison à la profiline et permettent de recruter le complexe G-actine/profiline. Cependant, ils ne peuvent à eux seuls initier la nucléation (Paul and Pollard, 2009). Les deux domaines FH2 forment un "doughnut" qui encercle et suit l'extrémité barbée lors de l'élongation du filament (figure 2 ; Chesarone et al., 2010).

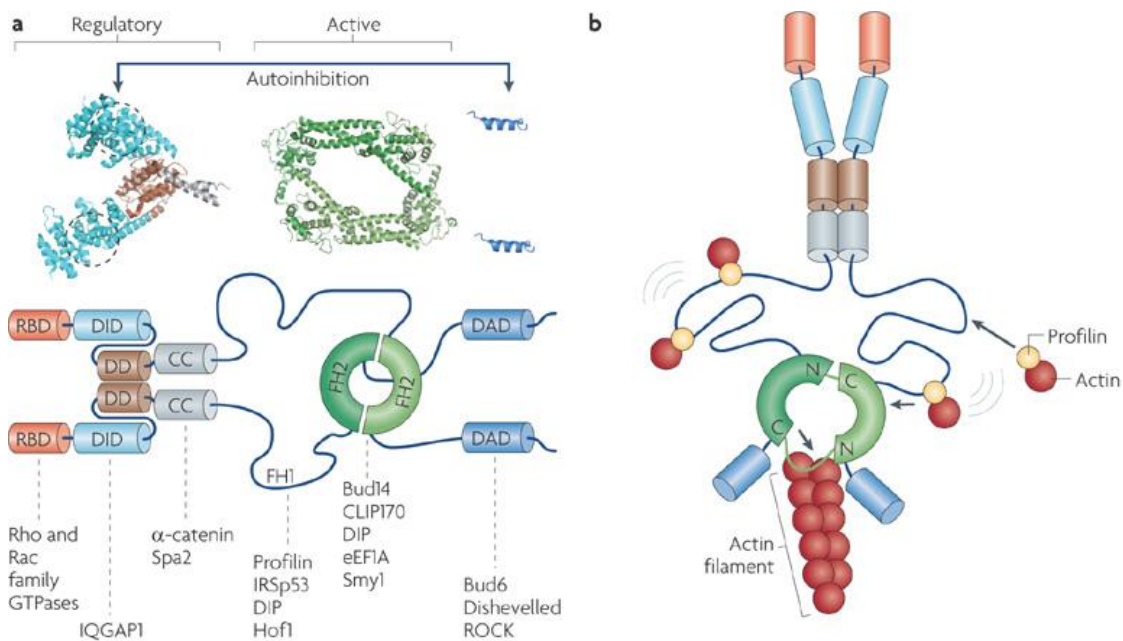


Figure 2 : Les formines

a) Structure et schéma des différents domaines du nucléateur formine et liste des interacteurs pour chaque domaine. b) Schéma d'un dimère de formine en action, le domaine FH2 forme un "doughnut" qui encercle et suit l'extrémité barbée lors de l'élongation du filament alors que le domaine FH1 recrute le complexe G-actine/profiline. D'après Chesarone et al., 2010.

Il a été montré qu'*in vitro* le domaine FH2 était suffisant pour catalyser la nucléation à partir du complexe G-actine/profiline (Sagot et al., 2002; Kovar et al., 2006), néanmoins ceci nécessiterait tout de même un pré-assemblage spontané de dimères et trimères d'actine. Or *in vivo*, comme il a été dit précédemment les monomères d'actine sont séquestrés par la profiline et Tβ-4. De plus, il est important de noter que les formines seraient auto-inhibées dans le cytosol des cellules. Cette auto-inhibition se ferait à travers la liaison entre "Dia autoregulatory domain" (DAD) en C-terminal et "Dia inhibitory domain"

(DID) en N-terminal (figure 2 ; Li and Higgs, 2003). Comme indiqué dans la figure 2, plusieurs régulateurs et co-facteurs seront donc nécessaires à l'état d'activation des formines afin d'initier la nucléation. Plusieurs études suggèrent notamment que les interactions entre des petites Rho-GTPases et le domaine RBD ("Rho binding domain") des formines ainsi que l'interaction de IQGAP1 ("IQ motif-containing GTPase-activating protein 1") avec DID seraient nécessaires à la dissociation des interactions entre DID et DAD et par conséquent à la désinhibition des formines (Rose et al., 2005 ; Nezami et al., 2006 ; Brandt et al., 2007). Cependant, il faut préciser qu'en fonction de la formine l'activateur nécessaire à la nucléation peut varier. Ainsi, Bud6 semble être le "nucleating promoting factor" (NPF) essentiel de la formine Bni1 ("bud neck involved") chez la levure. Bud6 lie les monomères d'actine ainsi que la formine Bni1 et initie la nucléation en surmontant la séquestration des G-actine par la profiline (Moseley et al., 2004 ; Graziano et al., 2011). Alors que des études récentes montrent que "adenomatous polyposis coli" (APC) lie également les monomères d'actine ainsi que la formine "mouse Diaphanous 1" (mDia1) afin d'activer la nucléation en présence de profiline (Okada et al., 2010 ; Breitsprecher et al., 2012). Cette dernière étude propose une analogie entre la nucléation par APC-mDia1 et un lance-roquettes (figure 3 ; Breitsprecher et al., 2012). En effet, après l'initiation de la nucléation, APC et mDia1 se dissocient, APC reste associé à l'extrémité pointue et mDia1 se déplace avec l'extrémité barbée. Ce mécanisme soulève des questions quant à la coopération entre différents nucléateurs.

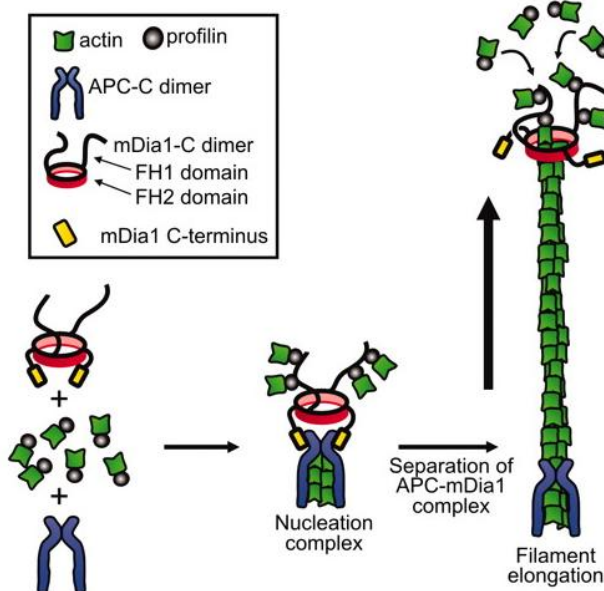


Figure 3 : Le modèle du lance-roquettes APC-mDia1

Schéma du modèle de coopération entre APC et la formine mDia1. APC et mDia1 s'associe afin d'initier la nucléation puis se dissocie lors de l'élongation. APC reste à l'extrémité pointue alors que mDia1 suit l'extrémité barbée. D'après Breitsprecher et al., 2012

Comme suggéré précédemment, une fois la nucléation amorcée, les formines vont également favoriser l'élongation du filament. Ceci est dû à la propriété du "doughnut" FH2 de se déplacer de manière processive en suivant le bout barbé du filament d'actine mais également à la propriété des domaines FH1 de recruter et augmenter la concentration du complexe G-actin/profiline à proximité du bout barbé. Ainsi, alors que le complexe G-

actin/profiline inhibe la nucléation, il est essentiel à l'élongation par les formines (Romero et al., 2004). La régulation de cette élongation est encore peu étudiée, cependant les domaines FH1 possèdent des sites de liaisons aux domaines "Src homology domain 3" (SH3). Or des protéines I-BAR ("Inverse Bin-Amphiphysin-Rvs161/167") comme IRSp53 ("Insulin Receptor Substrate p53") impliquées dans la coordination entre le remodelage membranaire et le remodelage du cytosquelette d'actine possèdent des domaines SH3 (Scita et al., 2008; Suetsugu and Gautreau, 2012). Une étude a même montré qu'une formine (mDia1) pouvait lier IRSpR3 (Fujiwara et al., 2000). Il serait donc intéressant de déterminer la régulation des formines par IRSp53.

Ainsi les formines nucléent les filaments d'actine linéaires à partir des monomères d'actine puis favorisent l'élongation en restant attachées à l'extrémité barbée. Cependant il existe une diversité de formines, certaines ont une activité de nucléation et d'élongation, d'autres uniquement d'élongation (Chesarone et al., 2010). Il est donc délicat de conclure sur leur rôle exact *in vivo*.

ii. Spire et Cordon bleu

Récemment, d'autres classes de nucléateurs ont été identifiées comme Cordon bleu (Cobl) et Spire (Ahuja et al., 2007 ; Quinlan et al., 2005). Ce dernier a la particularité de posséder quatre domaines WH2 pour "WASP Homology 2" qui lient les monomères d'actine avec un ratio 1:1 pour chaque domaine WH2 (figure 4 ; Hertzog et al., 2004 ; Chereau et al., 2005; Campellone and Welch, 2010 ; Renault et al., 2008). *In vitro*, Spire peut être un nucléateur si le ratio Spire/G-actine est faible mais également un séquestrateur si le ratio est élevé (Bosch et al., 2007). Dans cette même étude, il est suggéré que Spire aurait également une propriété de coiffe du filament d'actine au bout barbé et augmenterait ainsi le désassemblage au bout pointu. Spire pourrait également agir en synergie avec les formines à travers leur interaction. La nucléation par Spire inhiberait la nucléation par les formines mais favoriserait l'élongation par les formines (Quinlan et al., 2007).

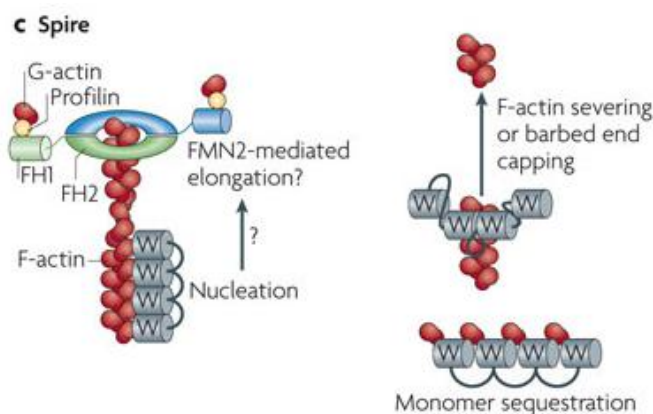


Figure 4 : Spire le nucléateur polyvalent

A gauche, schéma du nucléateur Spire et de ses quatre domaines WH2, ainsi que sa coopération avec formine. En haut à droite rôle de Spire comme protéine de coiffe. En bas à droite rôle de Spire comme séquestrateur. D'après Campellone and Welch, 2010.

iii. Le complexe ARP2/3 et ses activateurs

Les nucléateurs présentés précédemment permettent une nucléation de filaments linéaires. Le complexe ARP2/3 ("actin-related-protein 2/3") a d'abord été identifié comme ligand de la profiline (Machesky et al., 1994) et il est le seul nucléateur connu capable de générer des filaments branchés sur un filament d'actine mère (figure 5). Le nouveau filament généré formera un angle de 70° avec le filament mère (Amann and Pollard, 2001 ; Goley and Welch, 2006).

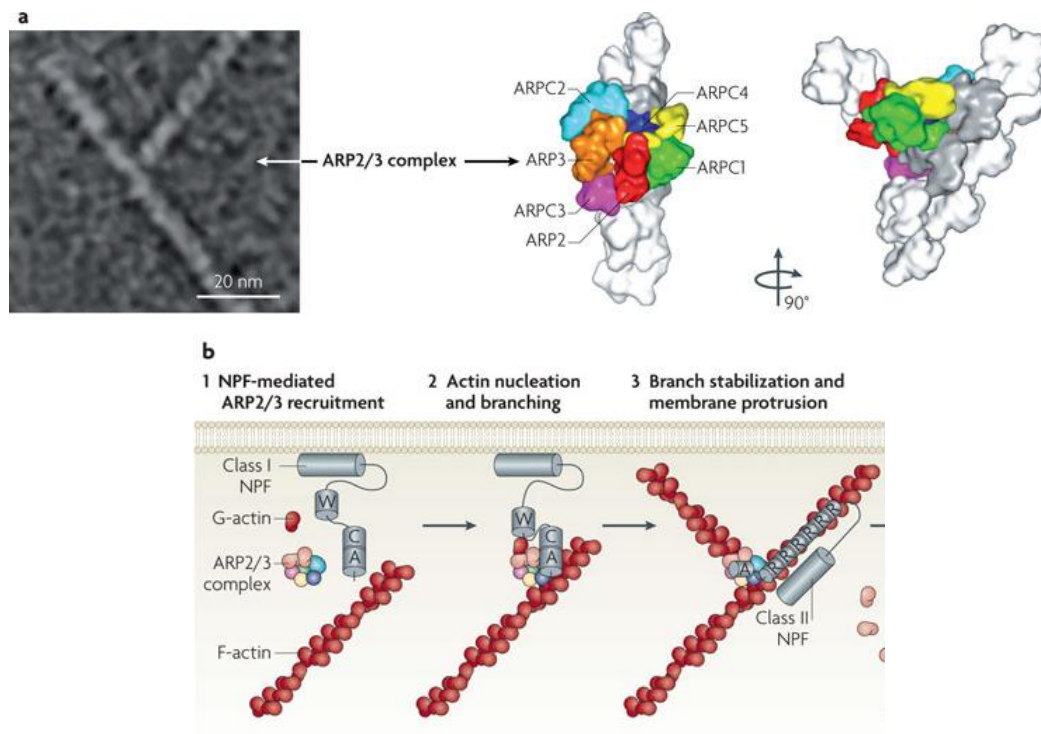


Figure 5 : La nucléation de filament branché par ARP2/3

a) A gauche, morphologie d'une branche d'actine à 70° visualisée *in vitro* en microscopie électronique. A droite, schéma structural obtenu par tomographie électronique du complexe ARP2/3 et de ses 7 sous-unités. b) Modèle de nucléation par le complexe ARP2/3 à la membrane. Le recrutement d'un NPFs à la membrane est suivi du recrutement et de l'activation par le NPF du nucléateur ARP2/3. La nucléation par ARP2/3 de la branche peut ainsi être initié. D'après Campellone and Welch, 2010.

Le complexe ARP2/3 de 220 kDa est composé de sept sous-unités dont deux ARP2 et ARP3 apparentées à l'actine et cinq sous-unités supplémentaires ARPC1, ARPC2, ARPC3, ARPC4 et ARPC5 (figure 5 ; Campellone and Welch, 2010). Comme des monomères d'actines, les sous unités ARP2 et ARP3 peuvent lier un ATP et cette liaison est cruciale pour la

nucléation par ARP2/3 *in vitro* (Martin et al., 2005). Les résultats d'une étude de modélisation moléculaire (Beltzner and Pollard, 2004) et d'une étude de tomographie (Rouiller et al., 2008) suggèrent que les sous unités ARPC2 et ARPC4 contactent le filament mère. Ensuite le complexe ARP2/3 subit une variation conformationnelle et les sous-unités ARP2 et ARP3 se réorientent puis se positionnent comme les deux premières sous-unités du nouveau filament. Cependant ARP2/3 possède intrinsèquement une faible activité nucléatrice. Ceci est dû à l'éloignement entre les deux sous-unités ARP2 et ARP3 à l'état inactif. Néanmoins plusieurs activateurs que l'on nomme "nucleation promoting factors" (NPFs) ont été identifiés (figure 6).

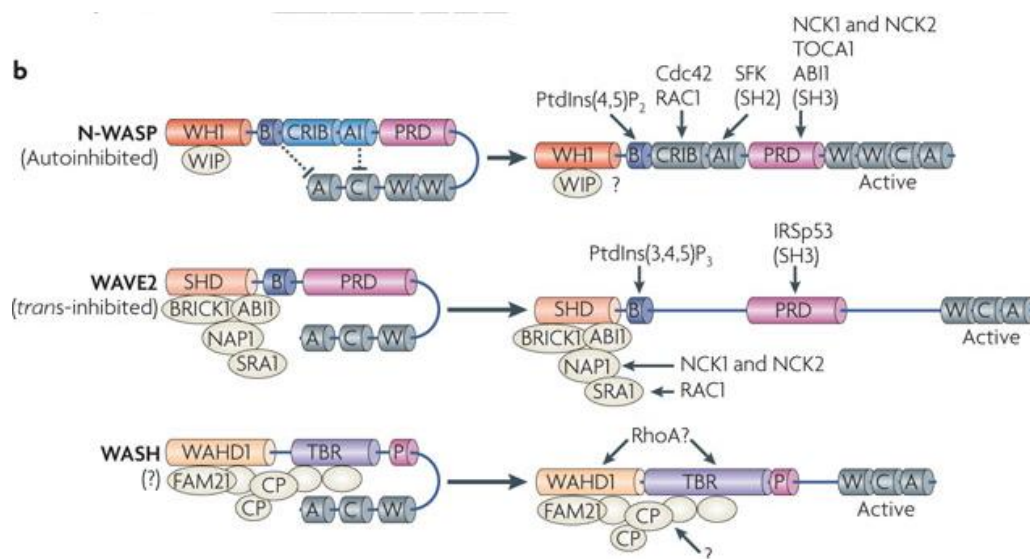


Figure 6 : NPFs de classe 1

Les NPFs de classe 1 se caractérisent par un domaine WCA capable de lier un monomère d'actine et le complexe ARP2/3. N-WASP s'auto-inhibe et forme un complexe avec WIP, il sera activé par la liaison de plusieurs molécules comme Cdc42, PIP2 et Toca-1. WAVE s'associe avec 4 protéines afin de former un complexe stable mais non actif, son activation fera intervenir des molécules comme Rac1, PIP3 et IRSp53. WASH forme également un complexe multiprotéique dont des protéines de coiffe, son mécanisme d'activation fera intervenir RhoA. D'après Campellone and Welch, 2010.

Il existe des NPFs de classe 1, que nous allons détailler, et des NPFs de classe 2 comme la cortactine dont nous ne détaillerons pas le mécanisme d'action dans ce manuscrit (Campellone and Welch, 2010). Les NPFs de classe 1 se caractérisent par la présence en C-terminal du domaine WCA : "W" pour la présence d'un ou plusieurs domaines WH2 qui, comme cité précédemment, lie un monomère d'actine, "C" pour la présence d'une région connectrice qui peut interagir avec ARP2 et l'actine (Kelly et al., 2006 ; Boczkowska et al., 2008) et "A" pour un peptide acide qui participerait également à l'interaction avec ARP2/3. Ainsi, le domaine WCA induit non seulement le rapprochement entre le filament d'actine et le complexe ARP2/3, mais aussi un changement conformationnel du complexe ARP2/3 afin

de réorienter les sous-unités ARP2 et ARP3. De par la diversité de leur N-terminal et de leur région régulatrice centrale, les NPFs ont été subdivisés en 5 groupes (Campellone and Welch, 2010): WASP et Neural-WASP (N-WASP), "WASP-family verprolin homologue" (WAVE ou SCAR), "WASP and SCAR homologue" (WASH), "WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules" (WHAMM) et "junction-mediating regulatory protein" (JMY).

Afin de mieux comprendre les différences entre ces NPFs je me focaliserai sur N-WASP, WAVE, et WASH (figure 6). Le fonctionnement de N-WASP est plutôt simple. Celui-ci possède un domaine WH1 qui interagit avec le C-terminus de "WASP-interacting protein" (WIP) afin de former un complexe dimérique (figure 6 ; Martinez-Quiles et al., 2001 ; Antón et al., 2007). Ce complexe est inactif par l'action de trois mécanismes. Tout d'abord, N-WASP s'auto-inhibe par l'interaction entre le domaine WCA et le "GTPase-binding domain" (GBD), ce qui empêche la liaison et donc l'activation du complexe ARP2/3 (Rohatgi et al., 1999 ; Kim et al., 2000). Puis WIP va stabiliser la forme inactive de N-WASP (Ho et al., 2004). Enfin, un motif basique présent dans N-WASP contribue à cette auto-inhibition (Prehoda et al., 2000 ; Rohatgi et al., 2000). Plusieurs protéines seront ensuite nécessaires à son activation. Dans ces mêmes études, il a été montré que la liaison de la petite RhoGTPase Cdc-42 ("cell division cycle 42") au domaine GBD ainsi que la liaison de PIP2 au motif basique était suffisant pour libérer le domaine WCA de N-WASP. "Transducer of Cdc42-dependent actin assembly" (Toca-1) qui est un effecteur de la petite Rho-GTPase Cdc42, se lie par son domaine SH3 à N-WASP et est également nécessaire à l'activation de N-WASP (Ho et al., 2004). De plus, Toca-1 de par son domaine F-BAR (FER-CIP4-homology Bin-Amphiphysin-Rvs161/167) peut lier PIP2 (Takano et al., 2008). Ainsi, l'activation du complexe N-WASP/WIP passe par l'action synergique de plusieurs protéines : Cdc42, PIP2 et Toca-1. De plus, de par les propriétés de ses activateurs, cette activation se ferait à la membrane. De ce fait la nucléation de filaments branchés sera initiée à la membrane par l'activation du complexe N-WASP/WIP.

Comme il a été dit précédemment il existe d'autres activateurs de la nucléation par ARP2/3. WAVE existe sous trois isoformes : WAVE1, WAVE2 et WAVE3. WAVE possède en N-terminal un "SCAR homology domain" (SHD) (figure 6). Ce domaine lui permet de recruter d'autres protéines avec lesquelles il va former le complexe WAVE. En effet, le domaine SHD se lie à Brk1 (ou BRICK1 ou encore HSPC300) et "Abelson interactor" (Abi) (Innocenti et al., 2004). Abi faisant le lien avec "NCK-associated protein 1" (Nap1) et "specifically Rac-associated protein 1" (Sra1) (Gautreau et al., 2004 ; Ismail et al., 2009). Enfin Nap1 et Sra1 peuvent également interagir avec le domaine WCA de WAVE (Ismail et al., 2009 ; Chen et al., 2010). Le complexe WAVE est donc un pentamère composé de WAVE/Brk1/Abi/Nap1/Sra1 (figure 6 et 7). Différentes études ont montré que ce complexe était intrinsèquement inactif par des interactions *trans*-moléculaires complexes (Ismail et al., 2009 ; Derivery et al., 2009a) et que l'absence d'une des protéines du complexe perturbait sa stabilité (Gautreau et al., 2004 ; Innocenti et al., 2004). Cependant, comme le complexe N-WASP/WIP, le complexe

WAVE peut être activé par différentes voies. La petite Rho-GTPase Rac1 ("Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1") est connue comme le principal activateur du complexe WAVE. Rac1 lie le N-terminal de Sra1 ce qui induirait un changement conformationnel du complexe et aurait pour conséquence de libérer le domaine WCA de WAVE afin d'activer la nucléation par ARP2/3 (Kobayashi et al., 1998 ; Steffen et al., 2004 ; Ismail et al., 2009). D'après Lebensohn and Kirschner, 2009, Rac1 doit être sous sa forme GTP et prénylée afin d'activer le complexe. Afin de localiser dans une cellule l'activation de la nucléation il semblerait que Rac1 agisse en synergie avec d'autres molécules. Comme il a été précisé précédemment IRSp53 est impliquée dans la coordination entre le remodelage membranaire et le remodelage du cytosquelette d'actine (Scita et al., 2008 et Suetsugu and Gautreau, 2012). Or le "proline rich domain" (PRD) de WAVE peut lier le domaine SH3 d'IRSp53 (Miki et al., 2000) et pourrait aider à l'activation du complexe WAVE à la membrane (figure 6 et 7 ; Suetsugu et al., 2006 ; Abou-Kheir et al., 2008). Des études ont montré que le Phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate (PIP3) pouvait se lier à WAVE2 ce qui localiserait aussi le complexe à la membrane (Oikawa et al., 2004). De plus, PIP3 serait, lui, imbriqué dans une boucle de rétroaction positive avec Rac et WAVE (Weiner et al., 2006). Le modèle proposé dans la figure 7 suggère que Rac1, IRSp53 et PIP3 agirait en synergie afin d'activer le complexe WAVE à la membrane (Suetsugu et al., 2006 ; Derivery and Gautreau, 2010 ; Campellone and Welch, 2010). Ainsi l'activation locale à la membrane du complexe N-WASP/WIP ou du complexe WAVE passe par la coordination spatiale et temporelle de tous leurs activateurs. Par conséquent, l'activation du complexe ARP/3 et la formation de filaments d'actine branchés sont hautement régulées spatialement et temporellement. Comme nous le verrons par la suite, des études d'imagerie en dynamique et notamment une approche de suivi de molécules uniques *in vitro* et *in cellulo* apporteront une meilleure compréhension sur cette coordination spatiale et temporelle entre les différentes protéines.

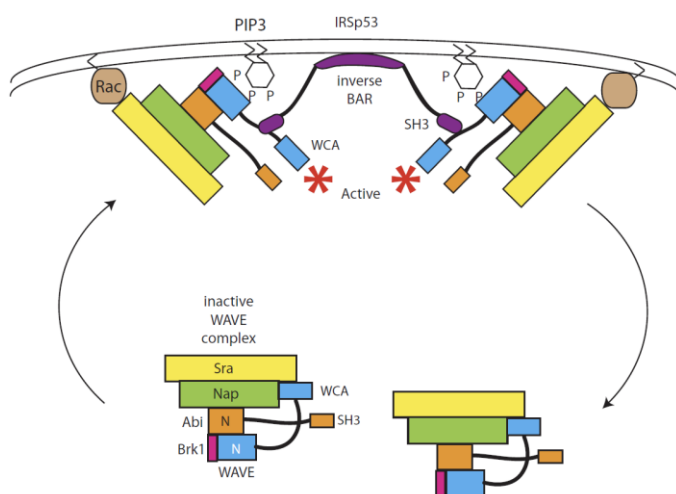


Figure 7 : Synergie des activateurs du complexe WAVE à la membrane

L'activation du complexe WAVE nécessite la coordination spatiale et temporelle de Rac1, IRSp53 et PIP3. Son activation entraîne un changement conformationnel du complexe et libère le domaine WCA. D'après Derivery and Gautreau, 2010.

Plus récemment, WASH a été découvert pour activer ARP2/3 et la polymérisation de l'actine (Linardopoulou et al., 2007 ; Derivery et al., 2009b ; Rottner et al., 2010). Comme WAVE et N-WASP, WASH possède un domaine WCA (avec un seul domaine WH2) essentiel à l'activation de la nucléation branchée. WASH, à travers son domaine WAHD1, va également former un complexe multi-protéique avec six autres protéines (figure 6). Ce complexe serait composé de FAM21, Strumpellin (KIAA0196), SWIP ("strumpellin and WASH-interacting protein" ou KIAA1033), Ccdc53 ("coiled-coil domain-containing protein 53"), CapZ α et CapZ β (Capping protein α/β). La composition de ce complexe est intéressante car, comme nous le détaillerons dans le paragraphe suivant, les protéines de coiffe (CapZ α et CapZ β) sont essentielles dans l'inhibition de la polymérisation du filament d'actine. Or FAM21 possède en C-terminal un motif "capping protein interactin" (CPI) qui s'associe à CapZ α afin d'inhiber son activité (Jia et al., 2010 ; Hernandez-Valladares et al., 2010). Il serait donc intéressant d'explorer comment le complexe WASH en séquestrant les protéines de coiffe sous leur forme inactive favoriserait la nucléation par le complexe ARP2/3 puis la polymérisation des filaments. Puis par quels mécanismes le complexe relâche cette inhibition. Le complexe WASH n'a pas été montré comme étant auto- ou trans-inhibé, cependant les protéines SWIP/Strumpellin sont analogues à Sra1/Nap1 et une étude suggère que le complexe serait régulé par la petite Rho-GTPase Rho1/RhoA (Liu et al., 2009).

Nous avons vu jusqu'à présent que les propriétés des différents nucléateurs permettent de former des filaments d'actine linéaires (formine, Spire, Cobl) ou branchés (ARP2/3). Puis, que dans le cas d'ARP2/3, il existe une diversité d'activateurs (NPFs). Enfin, qu'il y avait une spécificité et une coordination spatiale et temporelle des activateurs des NPFs (petites RhoGTPase, protéines BAR, PIP2/PIP3). Comme nous le verrons ultérieurement, ceci sera déterminant dans l'architecture et la dynamique du réseau d'actine.

d. Les protéines de coiffe : gelsoline, Eps8, CapZ

Mais tout d'abord, il me semble important de parler d'autres facteurs essentiels dans la régulation de la dynamique du filament d'actine et par conséquent la régulation de l'architecture du réseau de filaments d'actine. Si plusieurs ABPs peuvent générer des filaments d'actine et ainsi induire sa polymérisation, d'autres seront essentiels afin d'inhiber cette polymérisation et induire le désassemblage des filaments d'actine. Comme il a été vu précédemment, il est possible d'inhiber la polymérisation spontanée de l'actine en séquestrant les monomères d'actine par la profiline et T β -4. Il est également possible d'inhiber cette polymérisation sur les filaments. Pour cela, la cellule dispose de ce que l'on appelle des protéines de coiffe. Il existe plusieurs familles de protéines de coiffe, les "Capping Protein" (CP ou CapZ), les gelsolines et "EGRF substrate pathway #8" (Eps8).

La CapZ est un α/β hétérodimère se fixant au bout barbé des filaments afin de bloquer l'assemblage ainsi que le désassemblage des monomères d'actine à cette extrémité (Narita et al., 2006 ; Cooper and Sept, 2008). CapZ peut cependant être inhibée par différentes molécules. Il a été démontré que la protéine CARMIL pouvait se lier au CapZ et induire une augmentation des bouts barbés non coiffés (Yang et al., 2005). PIP2 induit également un décoiffage rapide des bouts barbés en se fixant en C-terminal de la sous-unité CapZ α (Kim et al., 2007). Or il semblerait qu'il s'agisse du site de liaison au monomère d'actine (Narita et al., 2006). D'autres protéines agissent comme compétiteur de la CapZ pour la liaison au bout barbé. Notamment les formines, qui par leur capacité à encercler et suivre le bout barbé du filament lors de l'élongation, empêchent l'accès de cette extrémité aux CapZ (Zigmond et al., 2003). VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), qui promeut l'élongation du filament en restant liée au bout barbé, possède également un rôle d'anti coiffe (Barzik et al., 2005). Le mécanisme d'action de VASP sur les filaments d'actine sera détaillé ultérieurement.

Une autre protéine de coiffe, Eps8, a tout d'abord été identifiée et caractérisée comme faisant partie d'un complexe protéique qui transduisait le signal entre les petites GTPases Ras et Rac (Scita et al., 1999 ; Dianza et al., 2004). Eps8 possède notamment un domaine SH3 et en C-terminal une région qui lie l'actine. Lorsque Eps8 est auto-inhibée, la partie en C-terminal ne peut interagir avec l'actine, cependant l'interaction avec Abi1 relâche cette inhibition (Dianza et al., 2004). Or, comme cité précédemment, Abi1 fait partie du complexe WAVE qui active la nucléation par ARP2/3. Il est donc fort probable que l'activité de coiffe d'Eps8 agisse en synergie avec l'activation de la nucléation par le complexe WAVE afin de remodeler le cytosquelette d'actine. Il est intéressant de noter que comme pour le complexe WASH et CapZ il existe un lien étroit entre la nucléation branchée et l'activité des protéines de coiffe. Enfin, Eps8 va également à travers son domaine SH3 interagir avec IRSp53 afin de réguler le pontage de l'actine (Dianza et al., 2006).

CapZ et Eps8 ne sont pas les seules protéines de coiffe. La famille des Gelsolines, dont le prototype est la gelsoline, aurait la particularité de coiffer les bouts barbés en fonction de la concentration en Calcium (Ca^{2+}) (Gremm and Wegner, 2000 ; dos Remedios et al., 2003). Cependant gelsoline ne serait pas uniquement une protéine de coiffe, elle induirait également le désassemblage par fragmentation des filaments d'actine (Selden et al., 1998).

e. Le désassemblage du réseau d'actine : rôle de l'ADF/Cofiline

Afin de réguler l'architecture du cytosquelette d'actine, il faut non seulement limiter la polymérisation des filaments d'actine mais également induire le désassemblage des filaments d'actine. Ce désassemblage sera également nécessaire afin de permettre un recyclage des monomères d'actine et du complexe ARP2/3 dans la cellule. Gelsoline peut induire ce désassemblage par fragmentation. Cependant une autre protéine a été identifiée

comme ayant un rôle majeur dans ce désassemblage des filaments d'actine : "l'actin depolarising factor" l'ADF/Cofiline.

Comme expliqué précédemment, le monomère subit lors de son incorporation au filament une variation structurale qui induit un processus d'hydrolyse irréversible de L'ATP en ADP+Pi en 2-3 secondes. Et il faudrait attendre 6 à 9 minutes pour que le Pi se dissocie et que G-actine/ADP se dissocie du filament. Or ce processus semble bien trop lent pour compenser l'assemblage rapide des monomères aux bouts barbés et rendre compte du renouvellement en moins d'une minute du cytosquelette d'actine dans le lamellipode (Wang, 1985 ; Lai et al., 2008 ; Koestler et al., 2009). Il est donc indispensable que la cellule dispose d'un mécanisme de désassemblage rapide des filaments d'actine. Le principal facteur responsable de ce mécanisme est l'ADF/cofiline. Cette dernière est une ABP dont l'affinité varie selon la nature du nucléotide associé au monomère d'actine dans le filament. Cette affinité peut être 40 fois plus élevée pour actine/ADP que pour actine/ATP ou actine/ADP+Pi (Blanchoin and Pollard, 1999 ; Nishida, 1985).

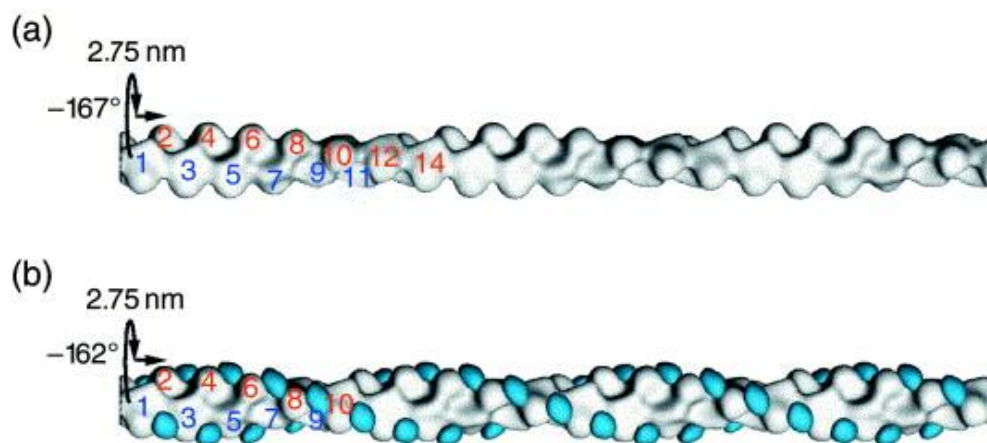


Figure 8 : Décoration d'un filament d'actine par l'ADF/cofiline

a) et b) Reconstitutions de la structure d'un filament d'actine obtenu en cryomicroscopie.
b) La liaison de l'ADF/cofiline induit une torsion sur le filament d'actine ce qui fragilise le filament et abouti à sa fragmentation. D'après Bamburg et al., 1999.

L'ADF/cofiline va ainsi décorer le filament d'actine en s'insérant entre les monomères et induire par la suite une torsion de celui-ci qui peut se propager sur plusieurs centaines de monomères (figure 8 ; Bamburg et al., 1999). Cette modification de structure engendre une augmentation de la flexibilité et une fragilité du filament qui aboutissent à des événements de fragmentation (figure 13 ; McCullough et al., 2008 ; McCullough et al., 2011). Selon une étude récente cette fragmentation se ferait à l'interface entre portion décorée et portion non décorée (Suarez et al., 2011). De plus, l'ADF/cofiline accélère la dissociation du phosphate des monomères d'actine adjacents (Blanchoin and Pollard, 1999). C'est par cette

action combinée de fragmentation des filaments en "burst" (en rafale) et son effet d'accélération de la dissociation du phosphate que l'ADF/cofiline semble être le facteur majeur du désassemblage et de la réorganisation du cytosquelette d'actine dans les cellules (Lappalainen and Drubin, 1997 ; Miyoshi et al., 2006 ; Iwasa and Mullins, 2007 ; Kueh et al., 2008). Le mécanisme qui permet de dissocier les fragments de filaments d'actine en nouveaux monomères d'actine est méconnu. Cependant, ces fragments sont composés de d'actine/ADP. Or la constante de dissociation de monomères G-actine/ADP est plus importante que la constante d'association de nouveaux monomères sur ces fragments.

L'activité de l'ADF/cofiline peut être régulée par la phosphorylation/déphosphorylation sur la Serine3. En effet, il a été montré que la LIM-Kinase (LIMK) pouvait phosphoryler l'ADF/cofiline afin d'inhiber sa liaison à l'actine (Arber et al., 1998 ; Bernstein and Bamburg, 2010). Et inversement sa déphosphorylation par des phosphatases comme slingshot peuvent activer l'ADF/cofiline (Niwa et al., 2002). Il est intéressant de noter que la composition membranaire peut également réguler l'activité de l'ADF/cofiline puisque sa liaison à PIP2 inhibe son activité (Yonezawa et al., 1990 ; Bernstein and Bamburg, 2010). L'inhibition de la liaison entre l'actine et l'ADF/cofiline soit par PIP2 soit par phosphorylation est un mécanisme intéressant pour limiter l'activité de la l'ADF/cofiline à proximité de la membrane.

f. Les petites RhoGTPases

L'activation des nucléateurs et des NPFs ("nucleation promoting factors") passe par une sous-famille de protéines appelées les petites RhoGTPases ("Ras homologous member Guanine Triphosphatase") appartenant à la super-famille des protéines Ras (Wennerberg et al., 2005). Il me semble donc important de décrire brièvement leur fonctionnement (figure 9 ; Luo, 2000). Ces protéines permutent entre deux états moléculaires. Un état RhoGDP (Guanosine Diphosphate) inactif et un état RhoGTP (Guanosine Triphosphate) actif. Deux classes de protéines vont ensuite faciliter les permutations entre les deux états. Les GEFs ("Guanosine nucleotide exchange factors") facilitent l'échange GDP en GTP et activent les petites RhoGTPases (figure 9). Alors que les GAPs ("GTPase activating proteins") en activant les RhoGTPases facilitent l'échange GTP en GDP et rendent les petites RhoGTPases inactives.

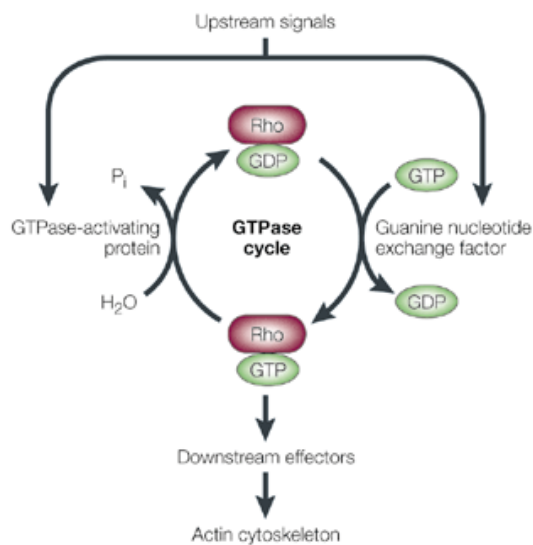


Figure 9 : Les petites RhoGTPases

Des voies de signalisations aboutissent à l'activation ou l'inhibition des GEFs et des GAPs. Les GEFs facilitent l'échange GDP en GTP et active les petites RhoGTPases alors que les GAPs en activant les RhoGTPases facilitent l'échange GTP en GDP et rende les petites RhoGTPases inactives. Sous leur forme GTP celles-ci vont activer leurs effecteurs et notamment des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine. Luo, 2000.

Les petites RhoGTPases les mieux caractérisées sont Rac1 ("Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1"), Cdc-42 ("cell division cycle 42") et RhoA ("Ras homologous member"). Toutes trois vont de par leurs effecteurs induire un remodelage du cytosquelette d'actine (figure 9). Par exemple, Rac1 est plus connu dans le remodelage du réseau d'actine du lamellipode par l'activation du complexe WAVE et ARP2/3, Cdc42 est impliqué dans le remodelage du cytosquelette des filopodes par l'activation de N-WASP et ARP2/3 et RhoA est notamment important dans la formation de fibre de stress et des sites d'adhésion par l'activation de ROCK (ou Rho kinase) et la phosphorylation de la MLC ("myosin light chain"). Cependant comme nous le verrons leur rôle n'est pas exclusif, ces protéines sont impliquées dans une diversité de processus et de structures nécessitant un remodelage du cytosquelette d'actine (Riento and Ridley, 2003 ; Heasman and Ridley, 2008 ; Guilluy et al., 2011). Cette diversité sera également dépendante de la diversité des GEFs, GAPs et des effecteurs.

Nous venons de voir qu'il existait une diversité d'ABPs : formine, ARP2/3, CapZ, Eps8, profiline, ADF/cofiline ou encore les protéines de pontages (α -actinine, fascine, etc) que nous n'avons pas décrit (Bartles, 2000 ; Jayo and Parsons, 2010). Celles-ci seront déterminantes dans la régulation de la dynamique du filament d'actine. De plus, l'activation de ces ABPs nécessite une coordination spatiale et temporelle des multiples activateurs (petites RhoGTPase, protéines BAR, PIP2/PIP3 etc). C'est cette diversité et cette coordination qui déterminera la formation locale et la dynamique d'architectures de réseaux d'actine différentes.

II. Création de différentes architectures à partir d'un réseau d'actine

Dans cette deuxième partie de ma thèse je détaillerai l'architecture et la dynamique du réseau d'actine de deux structures cellulaires : le filopode conventionnel et le lamellipode. Je me suis focalisé sur ces deux types de structures car ils permettent de comprendre comment le cytosquelette d'actine est capable de générer des forces dont découleront les protrusions membranaires. De plus, les modèles proposés afin d'expliquer la formation, l'architecture et la dynamique de ces structures permettront une meilleure compréhension sur la formation, l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine dans les filopodes et les épines dendritiques des neurones.

a. Le filopode conventionnel

L'année où la loi sur le repos hebdomadaire a été votée mais où Pierre Curie fut renversé par une voiture à cheval (que de changements depuis), les filopodes ont été observés pour la première fois (Ellermann, 1906 ; Harrison, 1907). Ils sont décrits aujourd'hui comme étant de fines structures "finger like" (100-300nm d'épaisseur) capables de sonder leur environnement. Ces structures sont impliquées dans différents processus cellulaires comme la migration cellulaire, le développement embryonnaire, l'adhésion à la matrice extracellulaire (MEC), la cicatrisation cellulaire, le guidage des cônes de croissance neuronaux et ils sont également les précurseurs des épines dendritiques des neurones. Cependant, il est important de noter que sous la houlette du mot filopode peut se cacher différentes compositions moléculaires et structures selon le type cellulaire. En effet, c'est le cas pour ce que l'on appelle les "microspikes" mais également pour les filopodes précurseurs des épines dendritiques dont les différences avec les filopodes de cellules motiles seront discutées ultérieurement. C'est justement dans un souci de comparaison que je me focaliserai tout d'abord sur la structure des filopodes de cellules en migration. Ces filopodes sont des structures enrichies en filaments parallèles d'actine qui sont connectés entre eux par des protéines de pontage. Et c'est l'élongation des bouts barbés des filaments d'actine, faisant face à la membrane, qui permet de générer une protrusion de type filopodiale (figure 10 ; Mattila and Lappalainen, 2008 ; Yang and Svitkina, 2011b). La rétraction de la protrusion filopodiale sera due, elle, au flux rétrograde des filaments d'actine et à l'ADF/cofiline (Mallavarapu and Mitchison, 1999).

i. L'initiation d'un filopode

Le mécanisme d'initiation d'un filopode est encore débattu. Il oppose deux modèles, celui de "l'élongation par convergence" et celui de "la nucléation à l'extrémité" (figure 10 ; Yang and Svitkina, 2011b). Les deux modèles ne s'excluent pas l'un l'autre. Cependant,

plusieurs études et spécialistes semblent converger vers le modèle "d'élongation par convergence" que je présenterai (Yang and Svitkina, 2011b).

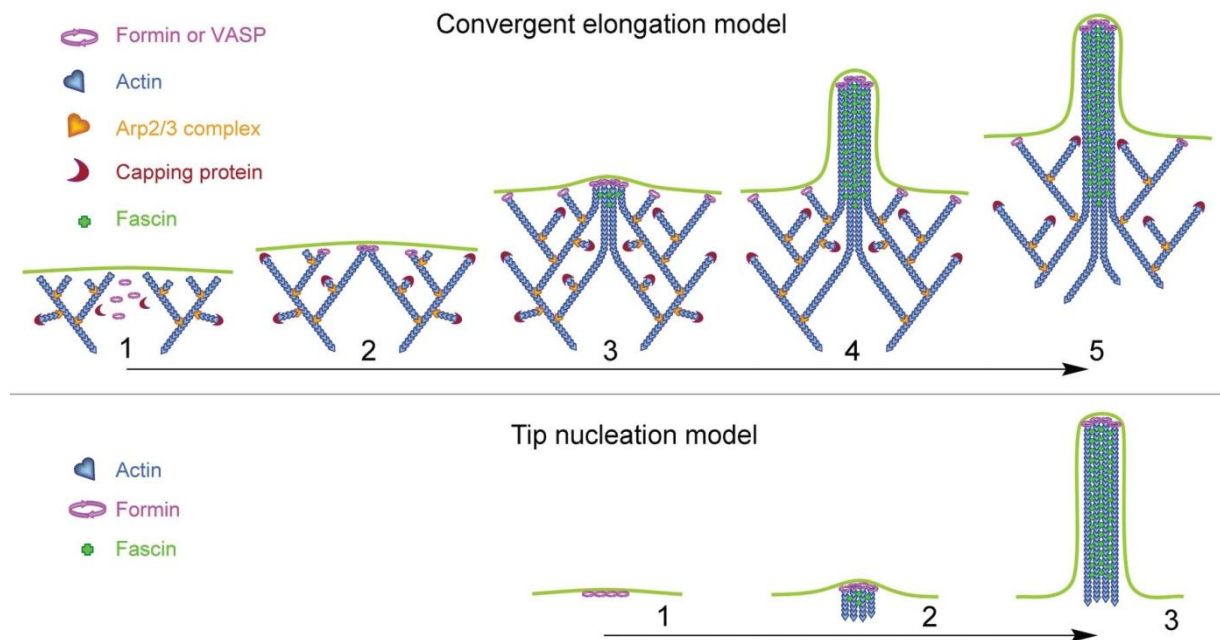


Figure 10 : Modèles d'initiation du filopode conventionnel

En haut, le modèle d'initiation d'un filopode appelé "élongation par convergence". Ce modèle se base sur la convergence de filaments d'actine branchés en faisceaux. En bas, s'oppose le modèle de "nucléation à l'extrémité" dans lequel une concentration membranaire du nucléateur formine permet de générer les faisceaux de filaments d'actine. D'après Yang and Svitkina, 2011b.

Le filopode étant constitué de filaments d'actine en faisceaux, il peut sembler contre-intuitif que le complexe ARP2/3 qui initie des filaments branchés soit nécessaire à la formation du filopode. Toutefois une première étude a montré que la délocalisation du complexe ARP2/3 inhibait la formation des filopodes dans les macrophages (Machesky and Insall, 1998). Puis deux études de cinétique structurale et de microscopie électronique sur des cellules de mélanome de souris et des cônes de croissance de rat ont montré que les filaments d'actine pouvaient être originellement des filaments branchés qui convergeaient en filaments parallèles (figure 10 Yang and Svitkina, 2011b ; Svitkina et al., 2003 ; Korobova and Svitkina, 2008). Ce modèle est soutenu par un modèle mathématique (Brill-Karniely et al., 2009) ainsi que par des études *in vitro* (Vignjevic et al., 2003 ; Haviv et al., 2006 ; Lee et al., 2010). Cette dernière étude montre la reconstruction *in vitro* de structures filopodiales sur une bicouche lipidique contenant du PIP2 en présence d'extraits cytoplasmiques. Cette étude détaille également la séquence temporelle de recrutement de différentes protéines. La protéine à domaine F-BAR Toca-1 est la première recrutée à la bicouche lipidique contenant du PIP2. Le NPF N-WASP, qui active le complexe ARP2/3, est la deuxième protéine

recrutée ; vient ensuite le recrutement du complexe ARP2/3 et de l'actine. Comme dit précédemment, l'activation du complexe N-WASP/WIP à la membrane passe par l'action synergique de plusieurs protéines : Cdc42, PIP2 et Toca-1. Or plusieurs études fonctionnelles sur ces protéines régulatrices de la nucléation par ARP2/3, montrent leur rôle dans la formation de filopodes (Cdc42 : Nobes and Hall, 1995 ; PIP2 : Hilpela et al., 2004 ; Cdc42 et WASP : Pellegrin and Mellor, 2005 ; Toca-1 et N-WASP : Bu et al., 2009).

Il ne faut cependant pas associer exclusivement Cdc42 et N-WASP à la formation de filopodes. Tout d'abord, parce que plusieurs études montrent qu'il peut y avoir formation de filopodes lorsque l'on déplete Cdc42 (Pellegrin and Mellor, 2005 ; Czuchra et al., 2005). De même, plusieurs études montrent qu'il peut y avoir formation de filopodes lorsque l'on inhibe N-WASP (Lommel et al., 2001 ; Snapper et al., 2001). Ensuite, il ne faut pas oublier que le complexe ARP2/3 est activé par le complexe WAVE dans le lamellipode et donc que les filaments d'actine des filopodes peuvent provenir de ces filaments branchés. Mais surtout, N-WASP est aussi impliqué dans d'autres processus cellulaires et aurait notamment un rôle prépondérant dans l'endocytose (Benesch et al., 2005 ; Innocenti et al., 2005 ; Bu et al., 2009 ; Kaksonen et al., 2006).

ii. L'élongation et la stabilisation du filopode

Après l'initiation du filopode par ARP2/3, d'autres protéines vont être nécessaires à l'élongation et l'organisation des filaments d'actine en faisceaux. Dans l'étude de reconstruction *in vitro* de structures filopodiales sur une bicouche lipidique, ils observent, après le recrutement d'ARP2/3, le recrutement de facteurs d'élongation comme la formine mDia2 et ENA/VASPs (Lee et al., 2010). De plus, ces facteurs s'enrichissent graduellement au bout du filopode après l'initiation (Svitkina et al., 2003 ; Yang et al., 2007). Comme il a déjà été expliqué, les formines possèdent cette double compétence de nucléation et d'élongation des filaments d'actine. Il n'est donc pas surprenant d'observer que la surexpression de la formine mDia2 induit la formation de filopodes (Pellegrin and Mellor, 2005 ; Yang et al., 2007) et que sa déplétion ou sa suppression perturbe sa formation (Peng et al., 2003 ; Schirenbeck et al., 2005).

Les protéines de la famille ENA/VASP sont de larges et multifonctionnelles ABP. Les protéines de cette famille possèdent principalement un domaine riche en prolines qui lie la profiline, un domaine "ENA/VASP homology 1" (EVH1) se liant à des motifs riches en prolines et un domaine EVH2 nécessaire à la tetramérisation et qui possède un domaine de liaison à la G-actine (GAB) et à la F-actine (FAB). Le domaine GAB possède d'ailleurs des homologies de séquences avec les motifs WH2. Des études de biochimie et de microscopie ont montré que les protéines ENA/VASP avaient la propriété de protéger le bout barbé des filaments d'actine des protéines de coiffe (Bear et al., 2002 ; Barzik et al., 2005 ; Pasic et al., 2008). Cependant le rôle des protéines ENA/VASP ne se limiterait pas à un rôle de protection contre les protéines de coiffe. En effet, elles auraient également un rôle d'élongation du filament, qui serait dû à leur capacité à recruter des monomères d'actine par le domaine GAB (Ferron

et al., 2007 ; Breitsprecher et al., 2008 ; Breitsprecher et al., 2011). De plus, de part leur capacité à former des tétramères, les protéines ENA/VASP sont des candidats intéressants pour l'élongation des filaments en faisceaux dans les filopodes. Deux études suggèrent notamment que les tétramères de ENA/VASP agiraient comme des protéines de pontage aux extrémités barbées et favoriseraient la formation de filopodes (Bachmann et al., 1999 ; Schirenbeck et al., 2006). D'autres études du groupe de Gertler modulant l'expression d'ENA/VASP montrent également que c'est un facteur essentiel pour la formation de filopodes neuritiques (Lebrand et al., 2004 ; Dent et al., 2007 ; Kwiatkowski et al., 2007). Après l'initiation du filopode, formine et ENA/VASP agiraient comme des élongateurs des filaments d'actine afin d'induire une protrusion filopodiale rapide.

Toujours d'après l'étude de reconstruction *in vitro* de structures filopodiales de Lee et al., 2010, la dernière protéine à être recrutée dans la formation d'un filopode est une protéine de pontage. Il existe plusieurs protéines de pontage, comme la fimbrine, l' α -actinine, la filamine, la drebrine, la neurabine-I (NAB-1) etc. Cependant celle qui semble avoir un rôle prépondérant dans l'organisation et la dynamique des filaments d'actine des filopodes est la fascine. Cette dernière fait partie d'une famille de protéines contenant 4 domaines " β -trefoil" et possède un site de liaison à l'actine en N-terminal ainsi qu'un en C-terminal (Jayo and Parsons, 2010). Une déplétion de la fascine ou l'expression d'une forme inactive entraîne une réduction du nombre de filopodes. De plus, les filopodes restants ont une morphologie perturbée et disposent de filaments d'actine moins empaquetés en faisceaux. Inversement l'expression d'une forme active de la fascine induit une augmentation du nombre et de la taille des filopodes (Vignjevic et al., 2006). La fascine serait donc un acteur majeur dans l'organisation des filaments d'actine en faisceaux. Malgré son rôle stabilisateur, l'interaction entre les filaments d'actine et la fascine est réversible et a une demi-vie de l'ordre de 6 à 9 secondes (Vignjevic et al., 2006). Le pontage par la fascine est donc dynamique et cela lui permettrait de faire de nouvelles liaisons transversales lors de la polymérisation des filaments d'actines à l'extrémité du filopode (Kureishy et al., 2002 ; Vignjevic et al., 2006). On peut également émettre l'hypothèse que la réduction rapide et locale du pontage des filaments permettrait au filopode d'effectuer des courbures. Il ne faut cependant pas exclure la coopération avec d'autres protéines de pontage. Ceci est suggéré par une étude récente dans laquelle l'expression d'une fascine mutée, empêchant son rôle de pontage, restaure un phénotype filopodiale sur des macrophages n'exprimant pas de fascine (Zanet et al., 2012).

iii. Filopode et déformation membranaire

La protrusion induite par la polymérisation des filaments en faisceaux nécessite une déformation membranaire. Or ces dernières années des protéines contenant le domaine Bin-Amphiphysin-Rvs161/167 (BAR) ont été reconnues comme étant capable de sculpter la forme de la membrane. Ces domaines BAR ont une structure incurvée et interagissent avec des constituants de la membrane comme PIP2 et PIP3 de par leurs compositions en acides

aminés basiques. Ces protéines sont de surcroît impliquées dans la coordination entre le remodelage membranaire et le remodelage du cytosquelette d'actine. Deux d'entre elles ont déjà été citées dans cette thèse (Toca-1 et IRSp53) sans que plus de détail ne soit donné sur leur mode d'action. Cependant il me semble nécessaire dans cette partie de la thèse de clarifier brièvement la classification de ces protéines. Ces protéines ont été catégorisées en fonction de leur domaine en trois sous-classes : BAR, F-BAR et I-BAR. Les protéines contenant le domaine BAR ou F-BAR se lient aux déformations membranaires concaves et induisent des invaginations (invadopodes, endocytose etc). Les protéines I-BAR (inverse BAR) se lient elles aux déformations membranaires convexes et sont impliquées dans les protrusions filopodiales et lamellipodiales (figure 11 ; Scita et al., 2008 et Suetsugu and Gautreau, 2012). Cependant une question subsiste, à savoir si ces protéines à domaine BAR sont des senseurs, des stabilisateurs ou des inducteurs de déformation membranaire. Comme il a été dit précédemment, Toca-1, une protéine à domaine BAR, est recrutée lors de l'initiation du filopode. Cependant, la littérature est plus exhaustive quant au rôle d'une protéine à domaine I-BAR, IRSp53. La surexpression du domaine I-BAR induit notamment des déformations membranaires de type filopodial (Suetsugu et al., 2006b) et la surexpression d'IRSp53 la formation de filopodes (Yang et al., 2009). Ce rôle d'IRSp53 dans la formation des filopodes n'est pas surprenant lorsque l'on regarde la liste de ses interacteurs. Comme il a été cité, IRSp53 lie notamment les Rho-GTPases Cdc42 et Rac1, les NPF WAVE et N-WASP, l'élongateur ENA/VASP, le nucléateur formine et une protéine de coiffe Eps8 (Lim et al., 2008 ; Suetsugu et al., 2006 ; Abou-Kheir et al., 2008 ; Krugmann et al., 2001 ; Fujiwara et al., 2000 ; Disanza et al., 2006). Notamment ses interactions avec WAVE2 et la formine mDia1 dans les filopodes sont impliquées dans la formation de ces derniers (Goh et al., 2012). L'induction de filopode par Cdc42 passe également par la formation d'un complexe IRSp53-Eps8 qui aurait une activité de pontage des filaments d'actine (Disanza et al., 2006). La diversité de ses interacteurs potentiels rend difficile d'élucider, outre son action de déformer la membrane, son rôle régulateur dans l'initiation, l'élongation et la stabilisation du filopode.

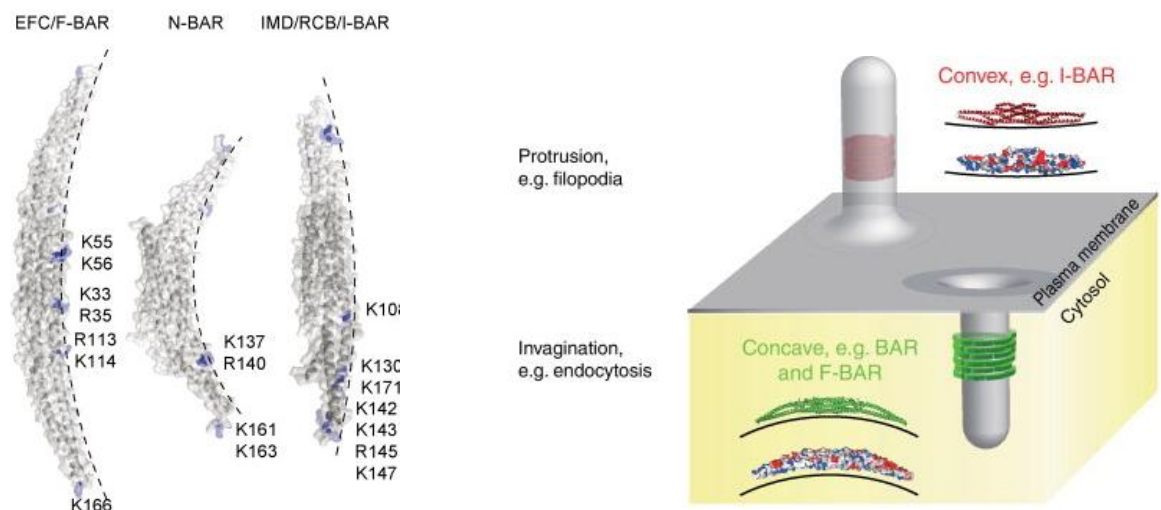


Figure 11 : Déformation membranaire et protéines à domaine BAR

A gauche, structure des différents domaines BAR, les acides aminés en bleus sont responsables de la liaison à la membrane. F-BAR et N-BAR induisent des déformations membranaires concaves. I-BAR une déformation convexe. A droite, une protéine à domaine F-BAR peut être recrutée et/ou induire une invagination alors qu'une protéine à domaine I-BAR peut être recrutée et/ou induire une déformation filopodiale. D'après Scita et al., 2008 et Suetsugu and Gautreau, 2012.

iv. Le désassemblage du réseau d'actine dans le filopode

La dynamique du filopode passe également par la dépolymérisation des filaments d'actine. De par son affinité pour les bouts pointus des filaments d'actine riches en actine/ADP et son activité de fragmentation, l'ADF/cofiline semble être un bon candidat pour le désassemblage rapide des filaments à la base du filopode. Plusieurs revues partent d'ailleurs de ce postulat dans leur modèle de désassemblage du filopode conventionnel (Faix et al., 2009 ; Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Cependant, l'étude de Breitsprecher et al., 2011b remet en question ce postulat. En effet, comme le montre la figure 12, lors de la rétraction des filopodes, l'ADF/cofiline s'enrichit à l'extrémité du filopode et non à la base du filopode. Ce résultat étonnant suggère qu'il y a dépolymérisation des filaments d'actine proche des extrémités barbées normalement riche en actine/ATP. Or l'ADF/cofiline se lie préférentiellement aux actine/ADP. Les auteurs proposent, en s'appuyant sur l'étude de Romero et al., 2004, que la formine pourrait, en favorisant l'hydrolyse de l'ATP lors de l'élongation, générer des actine/ADP aux extrémités des filopodes et ainsi donner accès à l'ADF/cofiline. Cependant, même si cela explique la présence d'ADF/cofiline à l'extrémité du filopode, cela n'explique pas son enrichissement à cette extrémité sachant que l'intégralité du filopode possède des filaments d'actine riches en ADP. D'autres facteurs seront donc

nécessaires à la localisation de l'ADF/cofiline et à son état d'activation. Il serait donc intéressant d'étudier la localisation de LIMK et de slingshot qui inhibe et active l'ADF/cofiline respectivement (Arber et al., 1998 ; Niwa et al., 2002). Sachant que la liaison de PIP2 inhibe l'activité de l'ADF/cofiline (Yonezawa et al., 1990 ; Bamburg and Bernstein, 2010) il serait également pertinent d'analyser la composition membranaire du filopode en phase d'élongation et de rétraction.

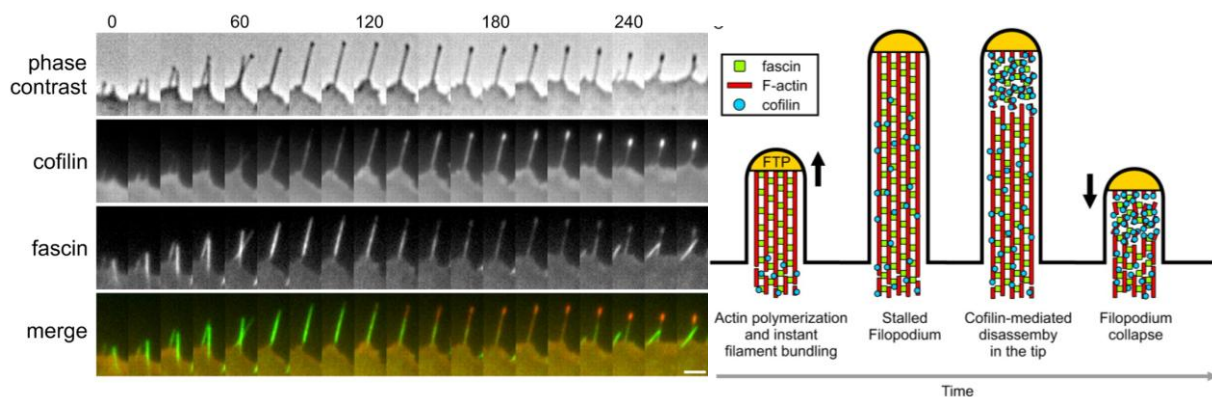


Figure 12 : L'ADF/cofiline et le désassemblage à l'extrémité du filopode

A gauche, dynamique de la fascine et de la cofiline au cours du temps dans un filopode conventionnel (intervalle de temps entre chaque image 15 sec ; échelle : 2µm). A droite, schéma du mécanisme de désassemblage du filopode par la coopération cofiline/fascine. La cofiline et la cofiline s'enrichissent au bout du filopode lors de la rétraction de celui-ci. D'après Breitsprecher et al., 2011b.

L'étude de Breitsprecher et al., 2011b propose également, par des expériences *in vitro*, que l'ADF/cofiline coopère avec la fascine afin de désassembler les filaments (figure 12). Malgré une plus faible affinité de l'ADF/cofiline pour les filaments d'actine en présence de fascine, le taux de dépolymérisation de l'ADF/cofiline en présence de fascine est plus important. Les auteurs proposent tout d'abord que l'activité de pontage de la fascine empêche la torsion des filaments d'actine (induite par la fixation de l'ADF/cofiline) de se propager dans les filaments, sachant que cette torsion augmente la dissociation du phosphate et l'association de nouvelles ADF/cofilines au filament. Il semble donc logique que l'inhibition de la torsion induite par la fascine diminue l'affinité de l'ADF/cofiline envers le filament d'actine. Suarez et al., 2011 propose que la fragmentation par l'ADF/cofiline se fasse à l'interface entre portion de filament décoré et non décoré par l'ADF/cofiline. Or le pontage par la fascine empêchant la propagation de la torsion il y aurait une augmentation du nombre d'interfaces entre portions décorées et non décorées augmentant ainsi la fragmentation et le taux de dépolymérisation. Sur la figure 12 on peut notamment observer un enrichissement en fascine à l'extrémité du filopode colocalisant avec l'enrichissement en

ADF/cofiline. Il faut cependant noter que des concentrations locales trop élevées en fascine lors de l'élongation du filopode pourraient diminuer drastiquement l'affinité de l'ADF/cofiline et inhiber totalement son activité.

Le filopode est un très bel exemple d'une architecture que le cytosquelette d'actine et ses ABP peuvent créer. De plus, la formation et la dynamique du filopode est dépendante de la coordination temporelle (Lee et al., 2010) et spatiale (Breitsprecher et al., 2011b) des ABPs, des NPFs et leurs activateurs. Cependant cette coordination temporelle n'a pas été définie *in cellulo* et la coordination spatiale n'a pas été identifiée pour l'ensemble de ces protéines. Des études d'imagerie en dynamique et notamment une approche de suivi de molécule unique pourraient compléter ces études et apporteront une meilleure compréhension sur ces coordinations.

b. Le lamellipode de cellule motile

i. Le modèle de nucléation dendritique

1970, année de la mort du dictateur portugais Salazar ainsi que celle de la naissance du champion de tennis André Agassi, Monsieur Abercrombie décrit et nomme pour la première fois la région motile à l'avant d'un fibroblaste en migration : le lamellipode. Il s'agit d'une large protrusion qui se caractérise par une structure plate presque en 2D (100-200nm d'épaisseur). Il a encore aujourd'hui un débat quant à la structure du réseau d'actine dans le lamellipode. Cependant, le modèle le plus communément accepté est celui de la nucléation dendritique (figure 13 ; Pollard, 2003). Dans ce modèle, l'assemblage des monomères d'actine et du complexe ARP2/3 aurait lieu à la membrane afin de créer dans une première partie du lamellipode un réseau dense d'actine branché (figure 14 et figure 15 ; Svitkina and Borisy, 1999 ; Lai et al., 2008). Celui-ci produirait la force nécessaire afin d'induire une protrusion membranaire. Le désassemblage des filaments d'actine et du complexe ARP2/3 se ferait quant à lui dans l'ensemble du lamellipode notamment grâce à la fragmentation/dépolymérisation par l'ADF/cofiline (figure 13). Ceci permettra le recyclage des monomères, grâce notamment à l'action de la profiline qui a la capacité à catalyser l'échange ADP vers ATP. Ainsi de nouveaux monomères d'actine peuvent s'associer aux extrémités barbées des filaments à l'avant du lamellipode. Comme à l'échelle du filament, on a un mécanisme de tapis roulant du réseau d'actine au sein du lamellipode (figure 15).

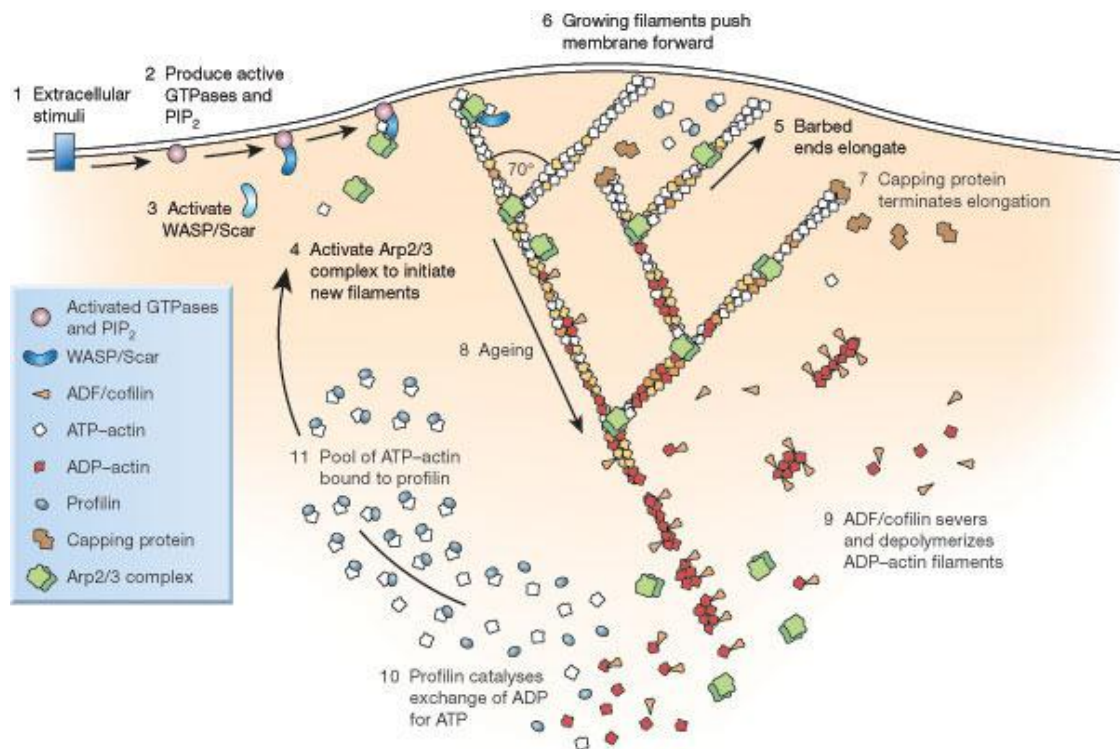


Figure 13 : Le modèle de nucléation dendritique

Ce schéma montre l'assemblage contrôlé au niveau de la membrane du réseau d'actine branché constituant le lamellipode. Cet assemblage peut générer une force protrusive. Le désassemblage se ferait dans l'ensemble du lamellipode grâce à la l'ADF/cofiline. Le recyclage des monomères se fait par l'action de la profiline afin que de nouveaux monomères d'actine s'associent aux extrémités barbées des filaments à l'avant du lamellipode. Ceci génère un flux du réseau d'actine. D'après Pollard, 2003.

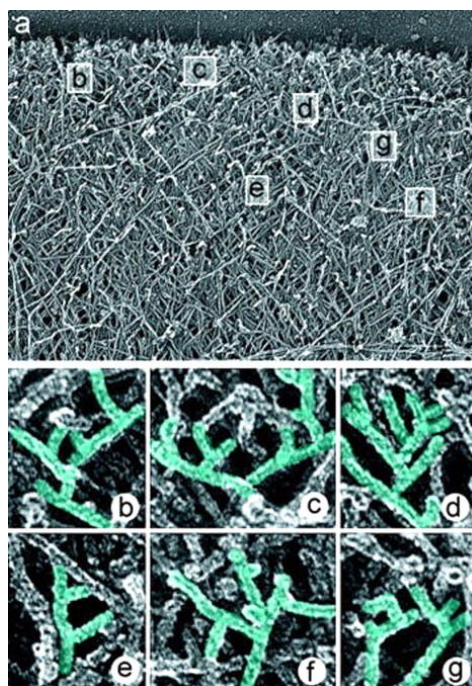


Figure 14 : Les filaments branchés dans un lamellipode

En haut, image de microscopie électronique d'un lamellipode de kératocyte. Le réseau d'actine est dense et branché (échelle : 0.5µm). En bas, inserts de l'image du haut, montrant les multiples filaments branchés dans le lamellipode. On notera qu'un seul filament possède plusieurs branches et que celles-ci peuvent s'orienter en 3D. D'après Svitkina and Borisy, 1999.

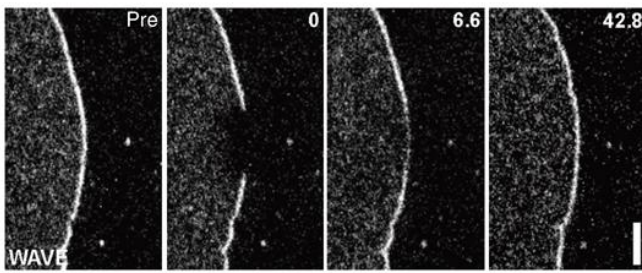
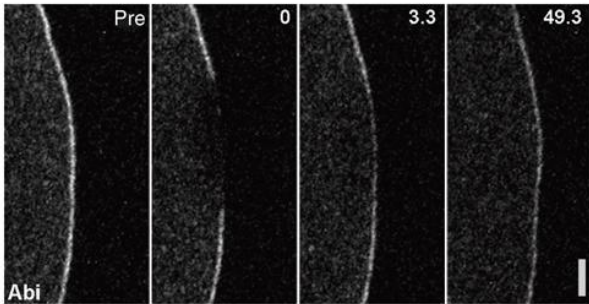
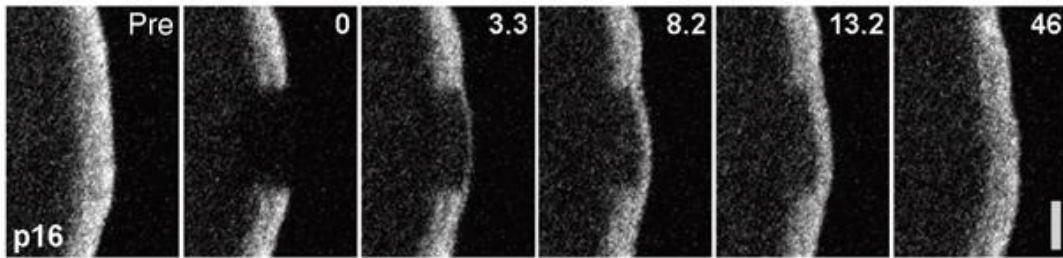


Figure 15 : Dynamique du complexe ARP2/3 et du complexe WAVE dans le lamellipode

En haut, FRAP sur ARPC5B-GFP révélant l'incorporation du complexe ARP2/3 à l'extrémité du lamellipode et le flux rétrograde d'actine dans l'ensemble du lamellipode. Milieu, FRAP sur Abi-1-GFP localisé et incorporé à l'extrémité du lamellipode. En bas, FRAP sur WAVE2-GFP localisé et incorporé à l'extrémité du lamellipode. Echelle : 2 μ m D'après Lai et al., 2008.

Le complexe ARP2/3 semble en effet être essentiel à la formation et à la stabilité du lamellipode. Sa suppression ou sa séquestration dans le cytosol inhibe la formation du lamellipode (Machesky and Insall, 1998 ; Wu et al., 2012). Afin de créer des filaments courts et branchés, comme le suggère le modèle de nucléation dendritique, il faut également stopper la croissance des nouveaux filaments. Or les protéines de coiffe de la famille des "capping proteins" (CapZ) sont présentes à l'extrémité du lamellipode et sont essentielles à sa stabilité (Mejillano et al., 2004 ; Iwasa and Mullins, 2007 ; Lai et al., 2008). Comme il a été expliqué précédemment, le complexe ARP2/3 est activé par des "Nucleator Promotin Factor" (NPF). D'après plusieurs études, le NPF responsable de l'activation d'ARP2/3 à la membrane est le complexe WAVE (WAVE/Brk1/Abi/Nap1/Sra1 ; figure 7). En effet, celui-ci est localisé à l'extrémité membranaire du lamellipode et régule la dynamique du cytosquelette d'actine (figure 15 ; Lai et al., 2008 ; Machesky and Insall, 1998 ; Miki et al., 1998). Ainsi la régulation de la nucléation par le complexe ARP2/3 conjointement avec la régulation des protéines CapZ semblent déterminantes pour la structure et la dynamique du cytosquelette d'actine dans le lamellipode.

Les RhoGTPases Rac1, RhoA et Cdc42 sont localisées dans le lamellipode lors de la protrusion (Machacek et al., 2009). De plus, l'activation de Rac1 par photoactivation est suffisante pour induire une protrusion lamellipodiale (Wu et al., 2009). Or, comme il a été précisé dans la première partie de cette thèse, Rac1 est un activateur du complexe WAVE. En effet, Rac1 ciblerait Sra1 ce qui induirait un changement conformationnel du complexe et aurait pour conséquence de libérer le domaine WCA de WAVE afin d'activer la nucléation par ARP2/3 (Kobayashi et al., 1998 ; Steffen et al., 2004 ; Ismail et al., 2009). Cependant Rac1 semble localisé dans tout le lamellipode (Machacek et al., 2009). D'autres facteurs vont donc être nécessaires afin de localiser l'activation du complexe WAVE et ainsi la nucléation à la membrane. La composition membranaire semble être un facteur déterminant, notamment la conversion de PIP2 en PIP3 par la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). L'étude d'Oikawa et al., 2004, montre que PIP3, en liant le complexe WAVE, le localise à la membrane et est essentiel à la formation du lamellipode. Les protéines à domaine BAR sont également localisées à la membrane. IRSp53 qui a été décrit précédemment pour son rôle dans la formation des filopodes est impliqué dans la dynamique du lamellipode (Miki et al., 2000 ; Suetsugu et al., 2006b). Ceci car sa liaison au complexe WAVE participe à l'activation de ce dernier à la membrane (Suetsugu et al., 2006 ; Abou-Kheir et al., 2008). Un autre niveau de régulation intervient grâce aux phosphorylations sur la protéine WAVE. En effet, des mutations qui miment une phosphorylation constante du complexe active la formation du lamellipode (Chen et al., 2010). La protéine Abi (Ablleson interactor) du complexe WAVE, recruterait la tyrosine kinase Abl (Ablleson non-receptor) afin de phosphoryler WAVE et induire son activation (Stuart et al., 2006). Cette phosphorylation serait requise afin d'induire la formation du lamellipode (Stuart et al., 2006 ; Sossey-Alaoui et al., 2007). La création d'un réseau d'actine branché passe donc par l'activation du complexe WAVE. Cette activation se fait grâce à la présence et à l'action synergique de plusieurs molécules à la membrane : Rac1, IRSp53, tyrosine kinase Abl et PIP3 (figure13 ; Pollard, 2003 ; Suetsugu et al., 2006 ; Lebensohn and Kirschner, 2009 ; Campellone and Welch, 2010 ; Suetsugu and Gautreau, 2012).

Afin d'obtenir un réseau d'actine branché dense il faut stopper la croissance des nouveaux filaments par l'action des protéines de coiffe. La régulation locale de ces protéines sera donc elle aussi importante et devra se faire en synergie avec l'activation du complexe ARP2/3. Il est intéressant de noter que PIP2 induit un décoiffage rapide des bouts barbés en se fixant en C-terminal de la sous-unité CapZ α (Kim et al., 2007). Donc par un raisonnement inverse, la conversion de PIP2 en PIP3 à la membrane favoriserait le coiffage des filaments d'actine. Une autre protéine de coiffe, Eps8 interagit avec Abi1, ce qui a pour effet de lever l'auto-inhibition d'Eps8 (Disanza et al., 2004). Ces deux mécanismes me semblent attrayants afin d'expliquer un recrutement et une activation des protéines de coiffe proches de sites de nucléation et de coordonner la nucléation et l'inhibition de la croissance des filaments d'actine.

ii. La controverse sur le modèle de nucléation dendritique

Ce modèle de nucléation dendritique dans le lamellipode a été quelque peu chahuté ces dernières années et la controverse a atteint son paroxysme entre l'équipe de Svitkina et celle de Small lors d'une correspondance (Yang and Svitkina, 2011 ; Small et al., 2011).

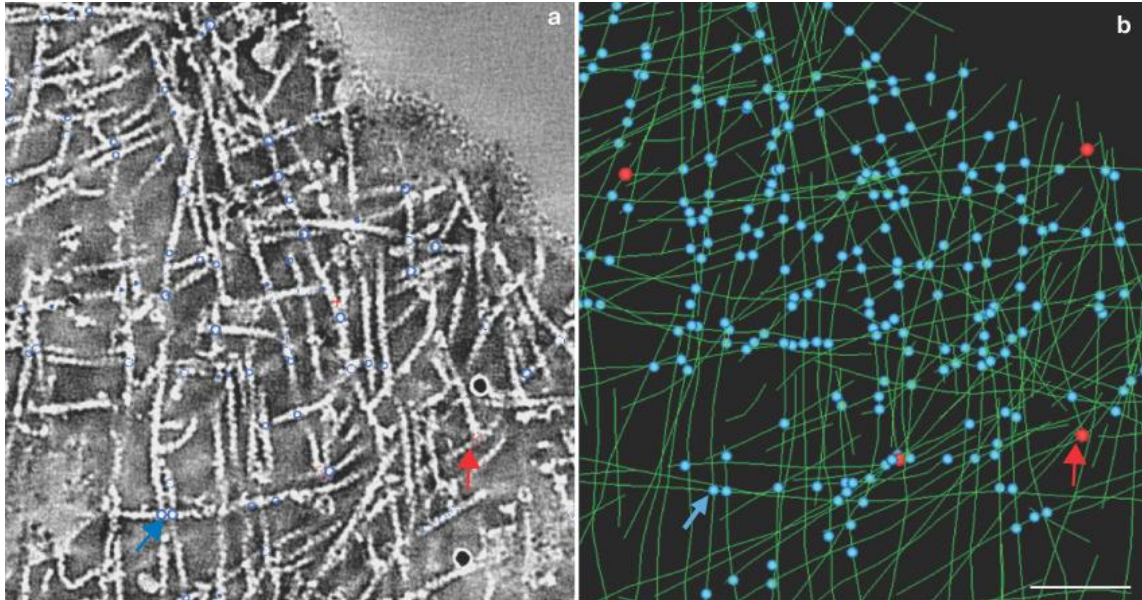


Figure 16 : Un réseau d'actine non branché dans le lamellipode ?

A gauche, tomographie électronique d'un lamellipode de kératocyte montrant un réseau moins dense et moins branché. A droite, Modèle de reconstruction des filaments, les points bleus représentent des filaments qui se chevauchent, les points rouges représentent les filaments branchés. Echelle : 100 nm. D'après Urban et al., 2010.

Plusieurs études tendent à pondérer le modèle de nucléation dendritique. Tout d'abord, les travaux de tomographie électronique de l'équipe de Small, suggèrent que les réseaux d'actine dans le lamellipode de différents types cellulaires seraient très peu branchés (figure 16 ; Urban et al., 2010). Les auteurs vont même jusqu'à proposer que le complexe ARP2/3 serait à l'extrémité pointue de filaments non branchés. Cependant il semble que cela dépende du type de préparation lors de la fixation, même si là encore il y a débat (Insall, 2011 ; Higgs, 2011 ; Small, 2011). Si depuis, ces résultats ont été pondérés par Small, il semble cependant que le lamellipode ne serait pas constitué de filaments courts d'actine branchés mais plutôt de filaments long d'actines branchés (Vinzenz et al., 2012). Un mécanisme indispensable afin de générer des filaments d'actines plus longs est l'élongation. Les élongateurs formines et VASP sont présents à l'extrémité du lamellipode (VASP: Rottner et al., 1999 ; Bear et al., 2002 ; mDia2 : Yang et al., 2007). Or même si le rôle des formines est encore contradictoire dans la littérature (Yang et al., 2007 ; Beli et al., 2008), l'étude de Machacek et al., 2009 a montré que l'activité de RhoA, un activateur des formines mDia,

était augmentée à l'extrémité du lamellipode lors des phases de protrusion. L'activité de VASP semble elle être importante dans l'architecture et la dynamique du lamellipode (Rottner et al., 1999 ; Bear et al., 2002). Cette dernière étude montre notamment que la déplétion de VASP entraîne une diminution de la vitesse de protrusion corrélée avec une augmentation de filaments courts branchés alors que sa surexpression augmente la vitesse de protrusion ainsi que des filaments plus longs et moins branchés. La vitesse de protrusion du lamellipode semble donc être le nœud de la controverse plus qu'un problème de préparation lors de la fixation. En effet, le type cellulaire et l'état protrusif dans lequel se trouve le lamellipode lors de la fixation peuvent donner des architectures du réseau d'actine différentes lors de l'observation en microscopie électronique. Ainsi certains auteurs se sont peut être focalisés (de part les conditions expérimentales ou volontairement) sur des lamellipodes constitués de filaments courts d'actine branchés et d'autres sur des lamellipodes constitués de filaments longs d'actine peu branchés.

iii. Le désassemblage du réseau d'actine dans le lamellipode

Quelque soit le modèle, le désassemblage des filaments d'actine par l'ADF/cofiline sera nécessaire afin de réorganiser le réseau d'actine et de promouvoir le recyclage des monomères d'actines et du complexe ARP2/3 (figure 13). La déplétion d'ADF/cofiline empêche la formation du lamellipode (Hotulainen et al., 2005) et diminue la vitesse du flux d'actine ainsi que la vitesse de protrusion (Iwasa and Mullins, 2007). Ceci car le désassemblage permet le recyclage des monomères nécessaire au maintien et à la formation du lamellipode mais également car l'ADF/cofiline permet de former de nouveaux bouts barbés (Kiuchi et al., 2007). De par son affinité pour les bouts pointus des filaments d'actine riches en actine/ADP on pourrait supposer que le désassemblage se ferait à l'arrière du lamellipode. Or les résultats de FRAP ("Fluorescence Recovery After Photobleaching") dans l'étude Lai et al., 2008 montrent que l'ADF/cofiline est présente dans l'ensemble du lamellipode et que sa dynamique est rapide et indépendante de sa localisation. Comme pour le filopode, il est donc possible qu'*in vivo* certains facteurs accélèrent l'hydrolyse de l'ATP afin que l'ADF/cofiline fragmente les filaments d'actine dans l'ensemble du lamellipode.

Un autre mécanisme semble intervenir dans le désassemblage des filaments et ainsi participer au flux rétrograde d'actine. Cependant ce désassemblage n'aurait pas lieu dans le lamellipode mais à l'arrière de celui-ci. En effet, sous l'action du moteur moléculaire myosine II, enrichie à l'arrière du lamellipode, le réseau d'actine du lamellipode rétracte (Giannone et al., 2004 ; Giannone et al., 2007 ; Burnette et al., 2011). Puis toujours sous l'action de la myosine II, les filaments d'actine se réorganise en filaments parallèles à la membrane nommés arcs d'actine (Giannone et al., 2007 ; Burnette et al., 2011). Un mécanisme identique semble avoir lieu dans une zone intermédiaire du cône de croissance neuronal également enrichie en myosine II (Medeiros et al., 2006 ; Yang et al., 2012). Enfin, ses arcs d'actine seraient désassemblés sous l'action de la myosine II. En effet, son inhibition induit une perte du flux d'actine ainsi qu'une perturbation du désassemblage (Medeiros et al.,

2006 ; Wilson et al., 2010). Ceci pourrait être expliqué par une étude *in vitro* dans laquelle il a été décrit que l'orientation des filaments d'actine déterminait son désassemblage par la myosine. En effet, les filaments d'actine antiparallèles se désassemblent contrairement aux filaments d'actine parallèles sous l'action de la contraction par les myosines VI et II (Reymann et al., 2012). Ainsi il est possible de spéculer que dans une cellule, la myosine II participe au désassemblage des filaments d'actine en les réorganisant de façon antiparallèle à l'arrière du lamellipode.

Il est important de noter pour la suite de la thèse que deux réseaux d'actine peuvent coexister dans une même structure, ce qui sera important pour la dynamique de celle-ci. En effet, il a été montré que le lamellipode colocalisait avec un autre réseau d'actine moins dynamique et constitué de filaments d'actine plus longs et moins branchés : le lamellum (Ponti et al., 2004 ; Giannone et al., 2007 ; Xu et al., 2012). Or l'existence de différentes architectures de réseaux d'actine suggère la présence de différentes ABPs, différents NPFs et différentes petites RhoGTPases dans une même structure (Machacek et al., 2009). Ainsi comme le filopode conventionnel, la formation et la dynamique de ces réseaux d'actine dépendra de la coordination temporelle et spatiale de ces protéines.

III. Régulation du cytosquelette d'actine par les adhésions cadhérines

Par un souci de clarté et de continuité, je n'ai pas abordé le rôle de l'adhésion dans la dynamique de ses structures. Cependant, lors de la motilité cellulaire les interactions intercellulaires et l'interaction avec la matrice extracellulaire (MEC) sont dépendantes des protéines d'adhésion. Plusieurs études ont donc montré que la formation, l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine sont régulées par plusieurs protéines d'adhésions, notamment les cadhérines.

a. La structure des cadhérines

1977, meurt Hamida Djandoubi, dernier condamné à mort exécuté en France ainsi que dernière personne au monde à être guillotinée (officiellement). Cela n'empêchera pas, la même année, monsieur Takeichi de découvrir les cadhérines lorsqu'il observa que l'absence de Ca^{2+} induisait une dissociation des cellules d'où leur nom : "Calcium-dépendant adhesion" (Takeichi, 1977).

La superfamille des cadhérines compte plus de 80 membres dont la classification en sous-famille varie légèrement en fonction des revues (Yagi and Takeichi, 2000 ; Nollet et al., 2000). On peut ainsi identifier les cadhérines classiques (type I), les atypiques (type II), les desmocollines, les desmogléines, les protocadhérines, les "Fat-like", les "seven-pass

transmembrane" plus des inclassables (figure 17 : Tepass et al., 2000). Cependant toutes ces cadhérines se caractérisent par une partie extracellulaire formée d'ectodomains (ECs) structurellement proches des immunoglobulines (Igs). Le nombre d'EC varie en fonction de la cadhérine (5 à 34) et c'est à l'interface entre deux ECs que se trouve le site de liaison au Ca^{2+} . Plus précisément 3 Ca^{2+} peuvent se lier entre deux domaines EC d'une même cadhérine (figure 18 et 19 ; Gumbiner, 2005). Les cadhérines possèdent généralement un domaine transmembranaire sauf les cadhérines "seven-pass transmembrane" qui en possèdent donc 7 et la cadhérine-13 qui n'en possède pas et qui s'ancre à la membrane par un glycosil phosphatidyle inositol (GPI) (Nollet et al., 2000). A l'exception donc de cette dernière, les cadhérines disposent d'un domaine cytoplasmique. Je me concentrerai dans la suite de cette partie sur la description de la structure des cadhérines classiques (type I). C'est dans cette sous-famille que l'on retrouve la E-cadhérine exprimée dans le tissu épithélial, la P-cadhérine (placenta), la R-cadhérine (rétine) ainsi que la N-cadhérine exprimée dans le tissu nerveux.

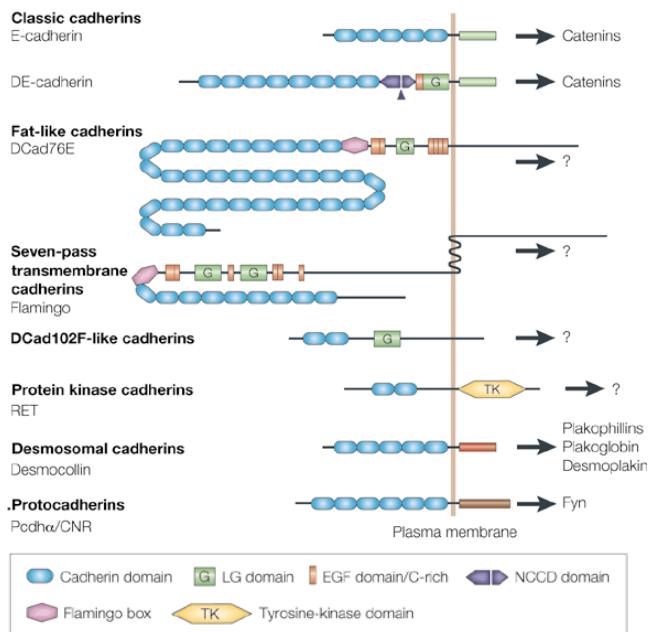


Figure 17 : Diversité structurale de la superfamille des cadhérines

Schéma des différentes familles de cadhérines. Notons la variabilité dans le nombre de domaines ECs (bleu). Notons également que beaucoup de partenaire cytosolique ne sont pas connus. D'après Tepass et al., 2010.

Les cadhérines classiques possèdent 5 ECs et sont responsable de l'adhésion homotypique Ca^{2+} dépendante. Elles peuvent s'associer latéralement pour former des oligomères en *cis* mais également de façon antiparallèle pour former des dimères en *trans* (figure 18 ; Brasch et al., 2012). Plusieurs modèles ont été avancé afin d'expliquer les interactions en *cis* et en *trans* des cadherines classiques. Cependant les équipes de Shapiro et Honig ont montré que l'interaction en *trans* est due à l'insertion du tryptophane (W2) de chaque domaine EC1 dans la poche hydrophobe de l'EC1 en *trans* afin de former des dimères (figure 18a ; Boggon et al., 2002 ; Harrison et al., 2011). Ils ont également montré que cette interaction entre deux domaines ECs passe par la formation d'un dimère transitoire, un "X-dimer" (Harrison et al., 2010). Dans ce modèle les interactions en *cis* sont

dues à une liaison latérale entre la base du domaine EC1 d'une cadhérine avec l'extrémité du domaine EC2 d'une autre cadhérine (figure 18b ; Boggon et al., 2002 ; Harrison et al., 2011). Comme il a été dit précédemment, le Ca^{2+} joue un rôle important dans l'adhésion homophile des cadhérines. Tout d'abord, il participe à l'interaction en *trans* car il facilite l'insertion du W2 dans la poche hydrophobe par sa liaison à un acide glutamique (Vendome et al., 2011). Le Ca^{2+} est également essentiel dans la rigidification entre les ECs afin que les 5 ECs adoptent cette forme "en croissant" (figure 18 ; Pokutta et al., 1994). Or cette forme est géométriquement nécessaire afin que les ECs puissent interagir en *cis* et en *trans* (Boggon et al., 2002 ; Harrison et al., 2011). Ainsi, en absence de Ca^{2+} le domaine extracellulaire des cadhérines est déstructuré et une mutation dans le domaine de liaison au Ca^{2+} induit une diminution de l'adhésion (Pertz et al., 1999 ; Ozawa et al., 1990).

Cependant les propriétés adhésives des cadhérines ne dépendent pas uniquement des interactions en extracellulaire. Des études de biophysique ont notamment montré que l'affinité de la liaison cadhérine-cadhérine est faible (Baumgartner et al., 2000 ; Chappuis-Flament, 2001) et des mutations dans le domaine cytoplasmique perturbent la dimérisation des cadhérines et l'adhésion cellulaire (Ozawa and Kemler, 1998 ; Takeda et al., 1999).

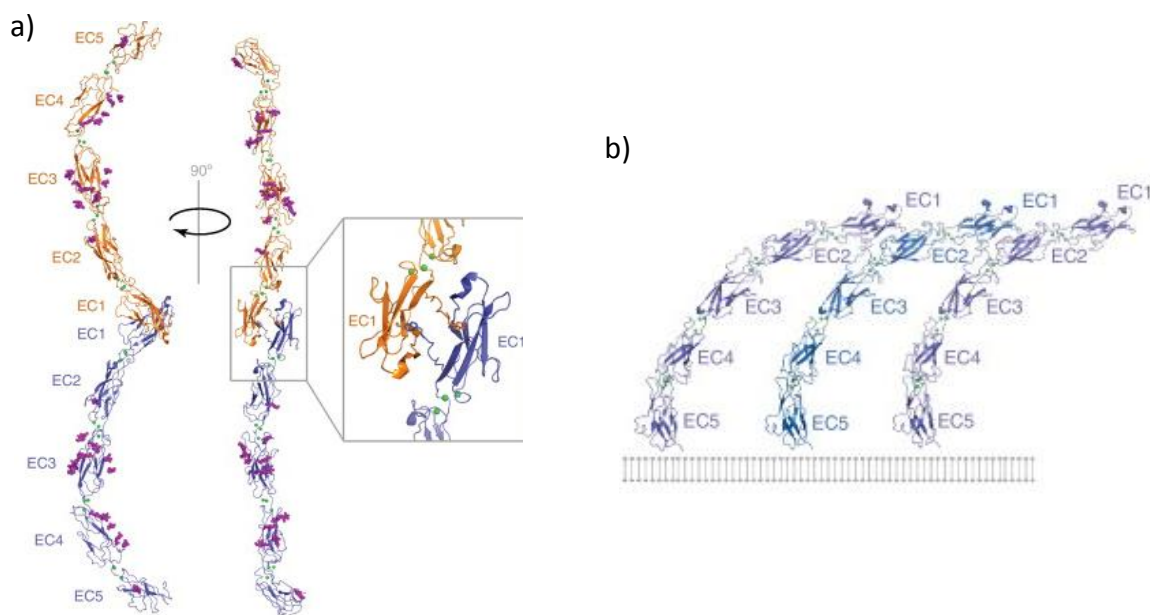


Figure 18 : Modèle des interactions *cis* et *trans* des cadhérines classiques

Schémas 3D (diagramme de ribbon) : Les cadhérines classiques possèdent 5 ECs qui sont stabilisés par la liaison de 3 Ca^{2+} entre deux domaines EC d'une même cadhérine (ronds verts) ce qui rigidifie la structure en forme de croissant. a) Les dimères en *trans* se créés par l'insertion des tryptophanes (W2) de chaque domaine EC1 dans la poche hydrophobe de l'autre EC1. b) L'oligomérisation en *cis* se fait par l'interaction entre le domaine EC1 et EC2 des cadhérines adjacentes. D'après Brasch et al., 2012.

b. Le complexe cadhérine/caténines: un point d'ancrage pour la régulation du cytosquelette d'actine

Le domaine intracellulaire est lui aussi bien conservé dans la sous-famille des cadhérines classiques. Il permet l'interaction avec différentes caténines, qui feront le lien avec le cytosquelette d'actine (figure 19 ; Gumbiner, 2005). La β -caténine, la γ -caténine et la caténine p120 sont des protéines qui possèdent des "armadillo repeat" qui sont nécessaires à la liaison à la cadhérine ainsi qu'à la liaison à d'autres partenaires. L' α -caténine est un homologue de la vinculine qui permet le lien entre les autres caténines et l'actine.

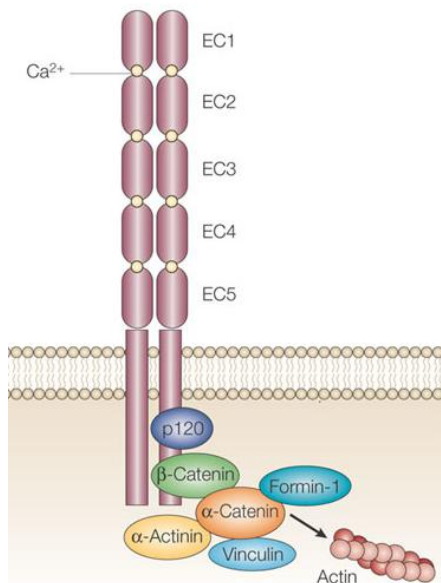


Figure 19 : Le complexe cadhérine/caténines

Schéma simplifié du complexe protéique formé entre les cadhérines et les différentes caténines. Ainsi le domaine intracellulaire peut lier la caténine p120 en juxtamembranaire, mais aussi la β -caténine en C-terminal. Cette dernière fait le lien avec l' α -caténine qui à son tour fait le lien avec le cytosquelette d'actine directement ou indirectement. D'après Gumbiner, 2005.

La β -caténine et la γ -caténine se lient à la région C-terminale des cadhérines et assurent la liaison avec l' α -caténine. Mais elles ont également d'autres rôles que celui de lier. En effet, la β -caténine serait impliquée dans l'adressage membranaire des cadhérines (Chen et al., 1999). Ceci se ferait par son association aux microtubules via la dynéine (Ligon et al., 2001). De plus, l'affinité de la β -caténine envers les cadhérines est régulée par différentes phosphorylations sur les deux partenaires ce qui est déterminant pour l'adhésion cellulaire (Lilien and Balsamo, 2005 ; Daugherty and Gottardi, 2007). Enfin, c'est une protéine importante dans la voie de signalisation du facteur de croissance Wnt (Moon et al., 2002).

La famille des caténine p120 regroupe la δ -caténine, p0071, ARVCF et la caténine p120. Elles lient les cadhérines dans leur région juxtamembranaire et régule les contacts adhésifs intercellulaires. La liaison de la caténine p120 masque un motif impliqué dans l'internalisation des cadhérines et leur dégradation par les lysosomes (Miyashita and Ozawa, 2007). Ainsi une réduction de l'expression de p120 endogène par des siRNAs ("small interfering Ribonucleic acid") conduit à la perte de l'adhésion cellulaire et une diminution de

l'expression des cadhérines (Davis et al., 2003). Ces résultats doivent être pondérés car d'autres études ont montré qu'une mutation du domaine juxtamembranaire, empêchant la liaison de la caténine p120, n'induisait qu'un ralentissement de l'adressage des cadhérines à la membrane et un ralentissement du renouvellement des adhésions (Chen et al., 2003 ; Thoumine et al., 2006). La caténine p120 possède également un rôle de régulation du cytosquelette d'actine. En effet, sa surexpression induit de longues protrusions, ce qui coïncide avec son rôle dans l'activation des petites GTPases Rac1 et Cdc42 (Noren et al., 2000). De plus, une mutation du domaine de liaison à la caténine p120 inhibe l'activation de Rac1 (Goodwin et al., 2003). D'autres expériences ont montré que lors de l'utilisation d'un substrat de culture recouvert de cadhérines chimériques, il y a un recrutement de Rac1 aux zones adhésives (Kovacs et al., 2002). Ce recrutement a pour effet de stimuler la formation de lamellipodes (Kovacs et al., 2002 ; Gavard et al., 2004). Or ces effets sont dépendants de l'expression de la caténine p120 (Gavard et al., 2004). Ainsi la caténine p120 pourrait recruter Rac1 lors de la formation de contact adhésif. Ceci permettrait de coupler l'adhésion avec la nucléation de filaments branchés par l'activation de la voie Rac1-WAVE-ARP2/3. Cette hypothèse se confirme tout d'abord par l'étude de Yamazaki et al., 2007 qui montre que lors de la formation de nouveaux contacts adhésifs il y a un recrutement de WAVE2 par Rac1. Puis par l'observation d'un recrutement de ARP2/3, colocalisé avec E-cadhérine, lorsque des cellules sont cultivées sur un substrat recouvert de cadhérines (Kovacs et al., 2002b) ainsi que lors de la formation de contact intercellulaire (Ivanov et al., 2005).

Le deuxième point de contrôle de la dynamique de l'actine passe par l' α -caténine et sa capacité à lier directement et indirectement l'actine (figure 20). Ceci en fait une protéine de choix afin de coordonner les adhésions cadhérine-cadhérine et le cytosquelette d'actine. Son domaine de liaison à la β -caténine et à la γ -caténine se trouve en N-terminal (Obama and Ozawa, 1997), alors que le domaine permettant la liaison directe à l'actine serait en C-terminal (Rimm et al., 1995 ; Pappas and Rimm, 2006). Cette interaction binaire soutient un modèle dans lequel l' α -caténine lie physiquement la β -caténine et l'actine afin de former un complexe quaternaire cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine. Cependant les travaux du laboratoire de Weis et Nelson sont venus infirmer cette hypothèse. Il a d'abord été montré *in vitro* que c'était l' α -E-caténine sous sa forme dimérique qui liait l'actine alors que sous sa forme monomérique elle liait E-cadhérine/ β -caténine (Pokutta and Weis, 2000 ; Drees et al., 2005). De plus le site de dimérisation de l' α -E-caténine chevauche le site de liaison à la β -caténine, suggérant ainsi que sa liaison aux filaments d'actine ou au complexe E-cadhérine/ β -caténine est mutuellement exclusive (Pokutta and Weis, 2000). Les travaux suivants ont confirmés que le complexe quaternaire cadhérine/ β -caténine/ α -caténine/actine n'existait pas *in vitro* et l'addition de vinculine, d' α -actinine ou d'extrait de cytoplasme n'induit pas sa formation (Yamada et al., 2005). Les auteurs proposent ainsi un modèle dans lequel, lors de l'adhésion, le complexe cadhérine/ β -caténine recrute l' α -caténine ce qui engendre une augmentation de la concentration de l' α -caténine localement. Ceci entraîne la formation de dimères α -caténine qui peuvent ainsi se lier à l'actine. De plus, le laboratoire de Weis et Nelson a également montré que cette liaison rentre en compétition avec le

nucléateur ARP2/3 afin d'inhiber la nucléation de filaments d'actine branchés (figure 20 ; Drees et al., 2005 ; Pokutta et al., 2008).

L' α -caténine peut, en plus d'inhiber la nucléation par ARP2/3, lier plusieurs protéines associées importantes pour l'organisation et la dynamique de l'actine : l' α -actinine (Knudsen et al., 1995), la formine (Kobielak et al., 2004), la vinculine (Weiss et al., 1998), "zonula occludens protein 1" (ZO1 ; Imamura et al., 1999), l'afadine ou AF-6 (Pokutta et al., 2002) ou plus récemment "epithelial protein lost in neoplasm" (EPLIN ; Abe and Takeichi, 2008). De plus, l'organisation du cytosquelette d'actine aux jonctions adhérentes dépend de certaines de ces protéines et de leur liaison à l' α -caténine (Imamura et al., 1999 ; Kobielak et al., 2004 ; Abe and Takeichi, 2008 ; Benjamin et al., 2010).

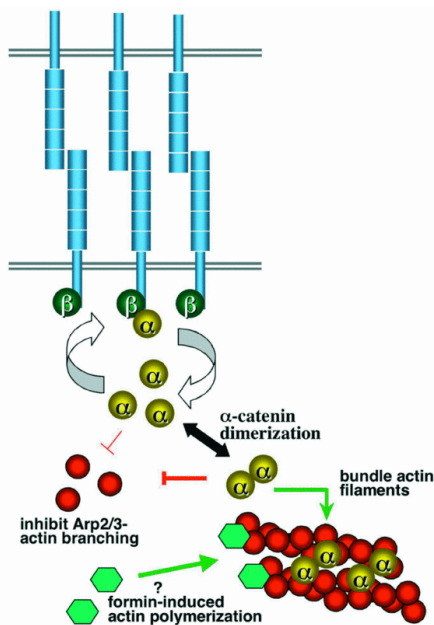


Figure 20 : La polyvalence de l' α -caténine.

Schéma représentant les différentes interactions de l' α -caténine. Le monomère d' α -caténine lie le complexe cadhérine/ β -caténine, alors qu'en dimérisant l' α -caténine va plutôt lier directement les filaments d'actine. La liaison de l' α -caténine au filament rentre en compétition avec la liaison du complexe ARP2/3. Enfin l' α -caténine pourrait indirectement lier les filaments par l'intermédiaire des formines et autres ABPs. D'après Pokutta et al., 2008.

Il est important de noter que le couplage entre le complexe cadhérine/caténines et l'actine n'est pas uniquement important pour la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, la réorganisation du cytosquelette d'actine permet en contre-partie de former et de stabiliser les adhésions. Ainsi un mutant inactif de Rac1 empêche la formation de contact adhésif (Braga et al., 1997). L'inhibition de ARP2/3, des formines et d'ENA/VASP perturbe l'organisation et la formation de jonction cellulaire (Verma et al., 2004 ; Kobielak et al., 2004 ; Scott et al., 2006). IQGAP ("IQ motif-containing GTPase-activating protein 1"), qui interagit avec Cdc42 et Rac1 dans leur forme active, est également impliqué dans la maturation des sites d'adhésion (Noritake et al., 2004). La petite RhoGTPase semble également jouer un rôle important dans le maintien des jonctions adhérentes par le biais de l'activation des formines et de la myosine (Harris and Tepass, 2010).

L'ensemble de ces études permettent de générer un modèle intéressant quand à l'interaction entre le cytosquelette d'actine et le complexe adhésif cadhérine/caténines dans

la formation de l'adhésion intercellulaire (figure 21). Tout d'abord, le cytosquelette d'actine générerait une protrusion qui initierait un contact par recrutement et agrégation des cadhérines. Cette agrégation activerait à son tour une polymérisation des filaments d'actine afin de promouvoir les protrusions membranaires et de générer plus d'adhésion. Ces deux premières étapes seraient soutenues par la caténine p120 et de la voie de nucléation Rac1/WAVE/ARP2/3. Elles seraient suivies d'une étape d'agrégation des complexes cadhérine-caténines ce qui induirait un recrutement de l' α -caténine et une activation de Rho. Ceci engendrerait une inhibition de la nucléation par ARP2/3, un recrutement et une activation de protéines comme formine, α -actinine et myosine afin de réorganiser le cytosquelette d'actine et permettre une stabilisation de l'adhésion (figure 21 ; Harris and Tepass, 2010). Encore une fois (au risque de paraître répétitif), ce modèle montre que la réorganisation du réseau d'actine est dépendante de la coordination temporelle et spatiale entre plusieurs ABPs, leurs activateurs et des protéines d'adhésion. Des études d'imagerie en dynamique apporteraient une meilleure compréhension sur ces coordinations.

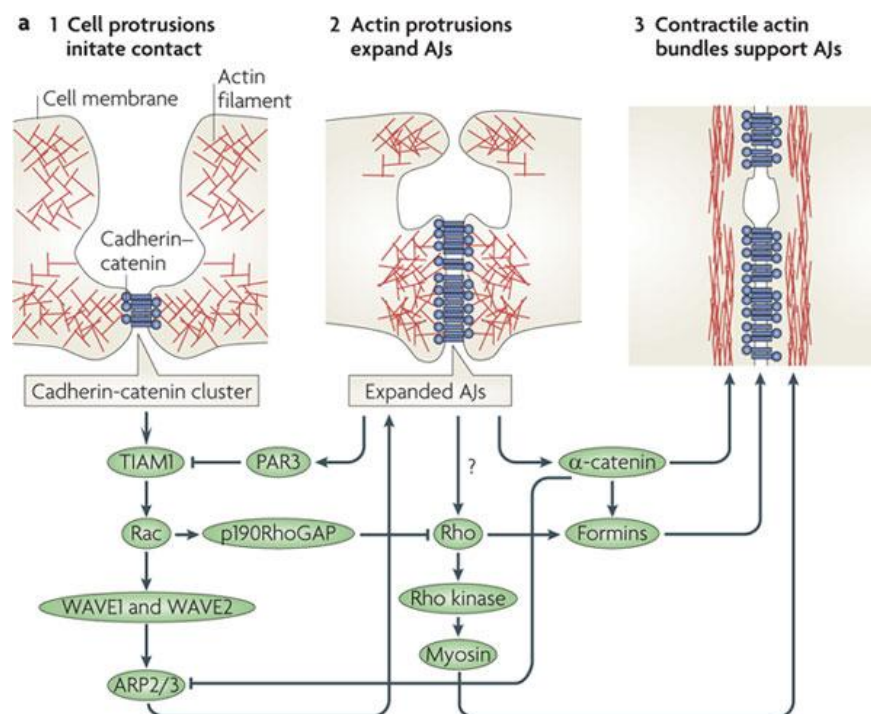


Figure 21 : Modèle du remodelage du cytosquelette d'actine lors de la formation de jonctions adhérentes

Schéma : le cytosquelette d'actine génère une protrusion, afin d'initier un contact cadhérine dépendant. Puis l'agrégation initiale stimule les protrusions membranaires par les voies indiquées. Ceci est suivi d'une étape d'agrégation massive des complexes cadhérine-caténines induisant un recrutement de l' α -caténine et une activation des voies indiquées. Ces voies permettront ensuite de réorganiser le cytosquelette d'actine afin de stabiliser l'adhésion. D'après Harris and Tepass, 2010.

c. Le modèle de l'embrayage moléculaire

Le couplage entre les protéines d'adhésion et le cytosquelette d'actine n'est pas uniquement biochimique mais également mécanique. En effet, afin de générer de la motilité cellulaire, les forces générées par la dynamique des filaments d'actine sont transmises physiquement à l'environnement extérieur par les protéines d'adhésion. Ainsi Mitchison et Kirschner ont proposé un modèle qu'ils nommeront "molecular clutch" ou embrayage moléculaire (Mitchison and Kirschner, 1988). Celui-ci se base sur la transmission des forces à travers un groupe de protéines adaptatrices qui font le lien dynamique entre le flux de F-actine et les protéines d'adhésion. Ainsi, en fonction de la force de couplage entre les différentes protéines, l'embrayage moléculaire est plus ou moins engagé (figure 22 ; Giannone et al., 2009). Lorsque l'embrayage moléculaire n'est pas engagé, le flux généré par la polymérisation des filaments d'actine ainsi que par les moteurs moléculaires est important alors que la protrusion membranaire est faible. A l'inverse, si l'embrayage est engagé, il y a une réduction locale du flux d'actine et une protrusion membranaire importante.

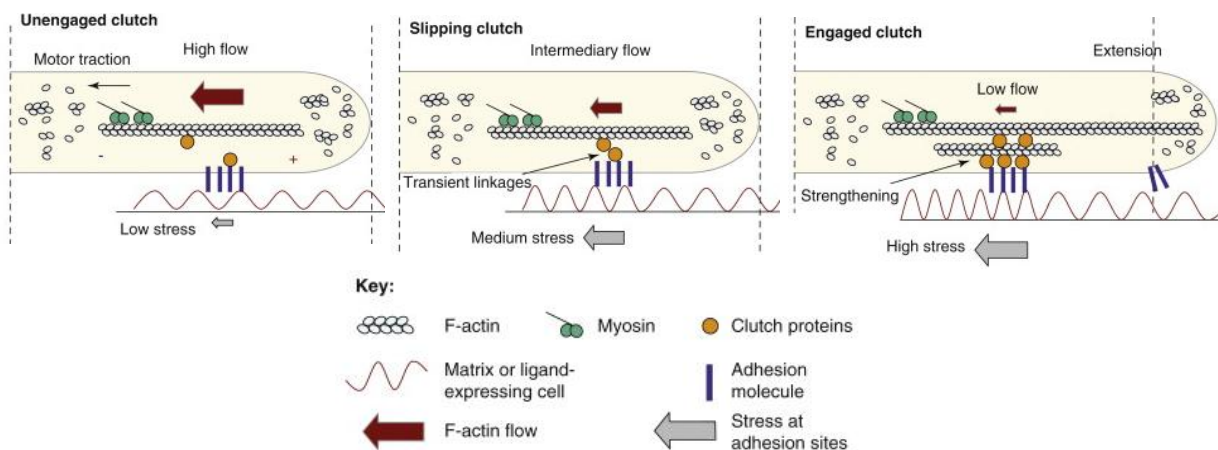


Figure 22 : Le modèle de l'embrayage moléculaire

Shéma des trois états de l'embrayage moléculaire. L'état non engagé avec un flux d'actine rapide induit par les moteurs moléculaires. Un deuxième état glissant où l'embrayage n'est pas totalement engagé et le flux d'actine n'est que modérément ralenti. Dans le troisième état, l'embrayage est totalement engagé et il y a une réduction locale du flux d'actine et une protrusion membranaire importante. D'après Giannone et al., 2009.

Les protrusions lamellipodiales utilisent notamment un mécanisme d'embrayage moléculaire par l'intermédiaire des adhésions intégrines avec la matrice extracellulaire (MEC). En effet, des billes recouvertes de fibronectine liant les intégrines suivent le flux rétrograde d'actine (Choquet et al., 1997). Puis la formation de sites d'adhésion enrichis en intégrines induit des protrusions locales alors que la rupture du lien entre les intégrines et

l'actine induit une rétraction membranaire (Giannone et al., 2007). La taline et la vinculine seraient les protéines adaptatrices liant la queue cytoplasmique de l'intégrine et les filaments d'actine (Jiang et al., 2003 ; Rio et al., 2009). Ceci est soutenu par des expériences de "fluorescent speckle microscopy" qui ont montré que ces protéines avaient un flux rétrograde intermédiaire entre le flux d'actine et le comportement stationnaire des intégrines (Hu et al., 2007). De plus une déplétion de la taline augmente le flux d'actine (Zhang et al., 2008). Ces études suggèrent que l'engagement d'un embrayage moléculaire entre les intégrines, la taline, la vinculine et la F-actine induit un ralentissement du flux d'actine (figure 22 ; Giannone et al., 2009).

De même, un embrayage moléculaire semble exister entre les adhésions cadhérine et la F-actine. Lorsque des billes recouvertes de N-cadhérines sont amenées par piégeage optique sur un lamellipode ou sur un cône de croissance, celles-ci sont emportées par le flux d'actine (Lambert et al., 2002 ; Bard et al., 2008). De plus, des événements de rupture entre le flux d'actine et les billes recouvertes de N-cadhérines sont observés, reflétant des interactions transitoires correspondant au "slipping clutch" ou littéralement "embrayage glissant" (figure 22 ; Bard et al., 2008 ; Giannone et al., 2009). Cette hypothèse de l'embrayage moléculaire dans le cône de croissance est également soutenue par les expériences montrant une augmentation de la vitesse de migration lorsque ces derniers sont placés sur un substrat recouvert de N-cadhérines et celles montrant que la force du couplage était corrélée à la vitesse du cône (Bard et al., 2008). Comme dit précédemment, l' α -caténine est capable de lier directement le complexe N-cadhérine/ β -caténine et directement et indirectement la F-actine. Elle pourrait donc être la protéine adaptatrice impliquée dans cet embrayage moléculaire. Or dans cette même étude l'expression d'un mutant de la N-cadhérine incapable de lier la β -caténine ainsi que l'expression de petits siRNAs dirigés contre l' α -caténine empêche le couplage des billes recouvertes de N-cadhérines avec le flux d'actine.

Nous avons donc vu, qu'un couplage biochimique, moléculaire et mécanique entre les adhésions N-cadhérine et les filaments d'actine est prépondérant dans la formation, l'architecture, et la dynamique du cytosquelette d'actine.

IV. Le cytosquelette d'actine dans la structure post-synaptique

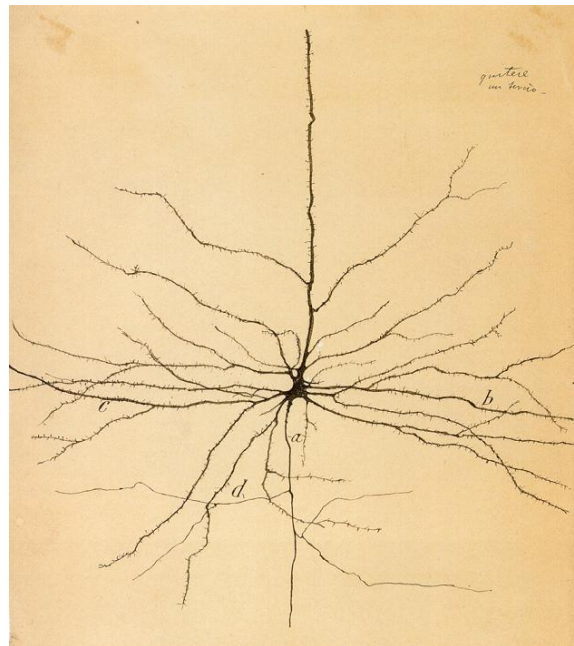
L'une des plus vieilles traces écrites de l'esclavage date du 18^{ème} siècle avant J.C., il s'agit du Code de Hammurabi. A un siècle près, date la plus vieille référence au cerveau qui provient d'un papyrus découvert par Edwin Smith et traduit par James Breasted pour la première fois en 1930 (figure 23). Cependant il faudra attendre la fin du 19^{ème} siècle pour voir l'abolition de l'esclavage dans la plupart des pays mais aussi pour que Santiago Ramón y Cajal identifie un neurone et qu'il soit nommé ainsi par Heinrich Wilhelm Waldeyer (figure 24 ; Ramón y Cajal, 1899). Ramón y Cajal identifiera les neurones comme des cellules polarisées constituées d'un corps cellulaire, d'un axone et d'une arborescence dendritique. A la même époque, Sir Charles Scott Sherrington proposa le terme "synapse" afin de désigner le point de contact entre deux neurones. Le terme "synapse" vient du grec "syn" qui veut dire "ensemble" et "haptin" qui signifie "contact".

Figure 23 : Le mot cerveau en hiéroglyphe



Figure 24 : Dessin d'un neurone pyramidal

Dessin ci-contre: il est possible de distinguer sur les dendrites les petites protrusions dessinées avec beaucoup de justesse par Ramón y Cajal en 1899. Ces petites protrusions sont les filopodes et les épines dendritiques.



Ces synapses seraient, selon une estimation, de l'ordre de la centaine de milliards pour une centaine de milliards de neurones ce qui ferait un milliard de synapses par mm^3 dans le cortex cérébral (Drachman, 2005). Dans le système nerveux central (SNC) des vertébrés la plupart des synapses sont des synapses chimiques. En 1959, grâce à l'émergence de la microscopie électronique, George Gray montra pour la première fois le contact entre la structure pré-synaptique et la structure post-synaptique (figure 25 ; Gray 1959 dans Guillery, 2000). Il identifia deux types de synapses, les synapses asymétriques avec une densité post-synaptique (PSD) plus épaisse que celle de la pré-synapse et les synapses symétriques avec des densités d'égale épaisseur entre les deux structures. Les synapses asymétriques sont aujourd'hui associées aux synapses excitatrices. Elles soutiennent la neurotransmission excitatrice par la libération d'un neurotransmetteur : le glutamate. Les synapses symétriques sont elles associées aux synapses inhibitrices qui soutiennent la neurotransmission inhibitrice (Glycine et acide γ -aminobutyrique : GABA). Les synapses sont la base du transfert d'information d'un neurone à un autre dans le SNC. En effet, la structure pré-synaptique est le siège de la conversion d'un potentiel d'action en fusion de vésicules synaptiques avec la membrane plasmique (figure 26 ; Lisman et al., 2007). Cette fusion entraîne la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, un espace de 20-25nm entre les deux structures. Ces neurotransmetteurs peuvent ensuite se lier à des récepteurs membranaires en pré- et en post-synaptique. L'activation des récepteurs en post-synaptique, induit leur ouverture, ce qui permet un flux ionique. Ce flux induit une dépolymérisation du neurone post-synaptique et la transmission du signal (figure 26 ; Lisman et al., 2007).

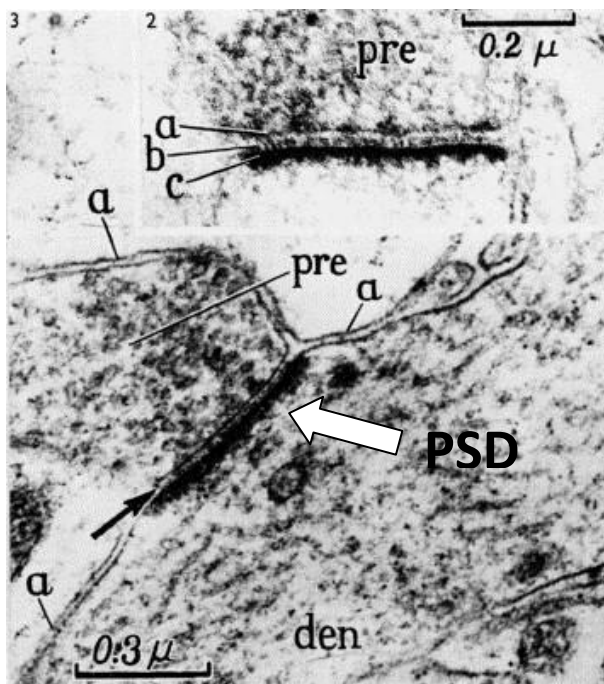


Figure 25 : Le contact pré- et post-synaptique

Image de microscopie électronique d'une synapse excitatrice, dites asymétrique. En effet, la densité post-synaptique (PSD) est plus épaisse que celle en pré-synaptique. Abréviations, "pre" : présynapse, den : dendrite. Echelle 0.3 μm . D'après Gray, 1959 modifié par Guillery, 2000.

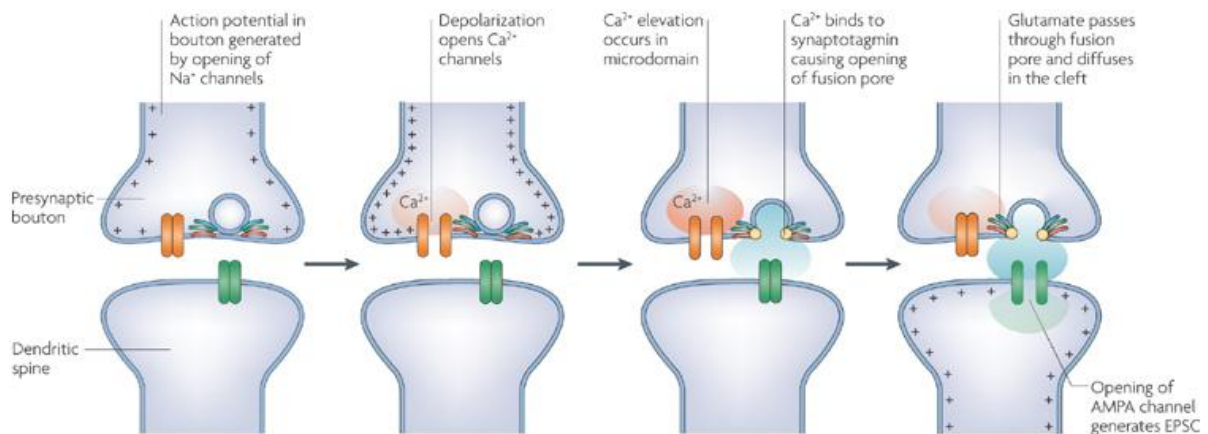


Figure 26 : La transmission synaptique, le transfert d'information dans le SNC

Shéma : séquence d'évènements entraînant la transmission d'un signal de la pré-synapse à post-synapse. La structure pré-synaptique convertie un potentiel d'action en fusion de vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Cette fusion entraîne la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique qui vont se lier à des récepteurs membranaires post-synaptique. L'activation des récepteurs induit leur ouverture et permet un flux ionique. Ce flux ionique induit une dépolymérisation du neurone post-synaptique et la transmission du signal. D'après Lisman et al., 2007.

Les structures post-synaptiques des synapses excitatrices sont appelées épines dendritiques. Ce sont de petites protrusions présentes sur les dendrites des neurones pyramidaux du cortex et de l'hippocampe ainsi que sur les neurones de Purkinje du cervelet. Les épines dendritiques sont composées d'une multitude de protéines, des protéines d'adhésion, des protéines d'échafaudage, des récepteurs membranaires et canaux, des moteurs moléculaires, des GTPases et régulateurs, des kinases et phosphatase et leurs régulateurs, des protéines pour le trafic de membranes, des protéines du cytosquelette et bien d'autres (Sheng and Hoogenraad, 2007). La forme et la taille des épines dendritiques est variable ce qui a permis de les classer en 4 catégories : "thin", "mushroom", "stubby" et "branched" (figure 27 ; Harris et al., 1992 ; Bourne and Harris, 2008). La majorité des épines dendritiques font partie des deux premières catégories et se caractérisent par deux structures, une tête ayant un diamètre compris entre 200 nm et 1 µm attachée au dendrite par un cou étroit d'environ 100 à 200 nm de diamètre (Harris et al., 1992 ; Nägerl et al., 2008 ; Izeddin et al., 2011). Cependant, les épines dendritiques ne sont pas des structures figées. Elles sont dynamiques et présentent des déformations membranaires sur une échelle de temps de l'ordre de la dizaine de secondes (vidéo 1 ; Matus, 2005). Il n'est donc pas étonnant d'observer que l'actine est enrichie dans les épines dendritiques et qu'elle soutient leur taille, leur motilité, leurs changements morphologiques et par conséquent leur fonction (Matus, 2005 ; Cingolani and Goda, 2008 ; Hotulainen and Hoogenraad, 2010). Dans cette avant dernière partie je vais donc détailler, comment le cytosquelette d'actine est nécessaire

à la formation, la morphologie et la dynamique des épines dendritiques de neurones pyramidaux. Je détaillerai notamment l'architecture du cytosquelette d'actine en présentant les différentes ABP ("actin binding proteins") impliquées. Je développerai également comment la protéine d'adhérence N-cadhérine intervient dans ces processus en me focalisant sur son interaction moléculaire avec l'actine.

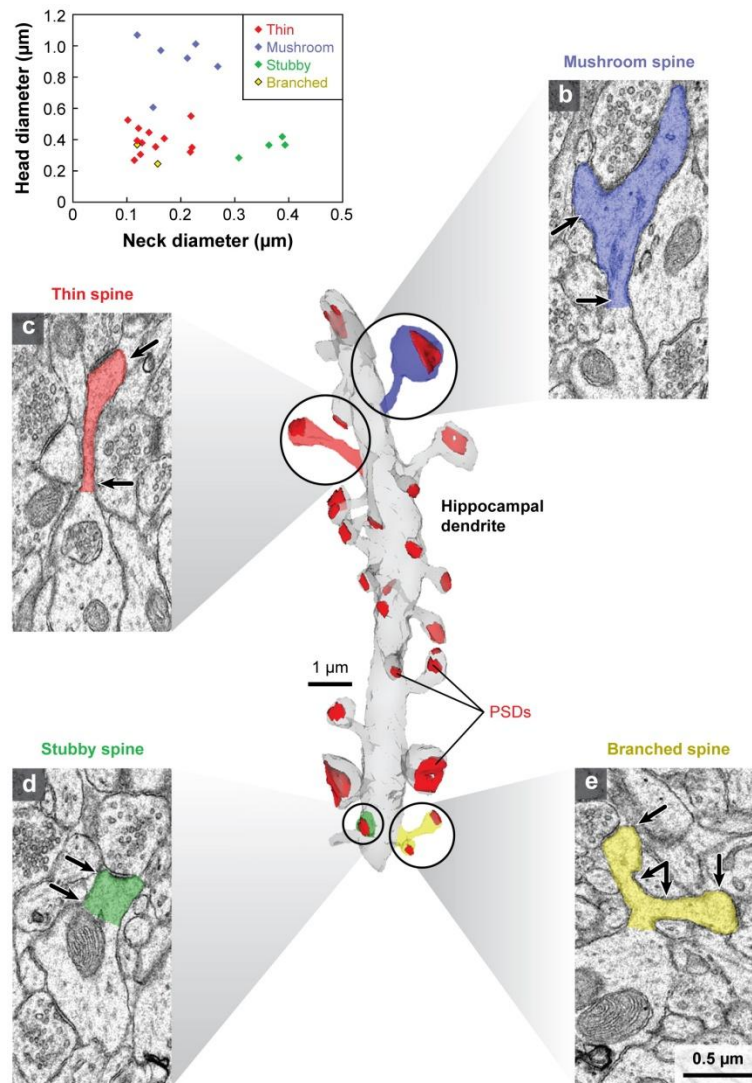


Figure 27 : La morphologie des épines dendritiques

Reconstruction en 3D d'un dendrite de neurone d'hippocampe avec les quatre catégories d'épines dendritiques. En bleu, une épine dendritique de type "mushroom", en rouge de type "thin", en jaune de type "branched" et en vert de type "stubby". En haut à gauche, graphique représentant la taille de la tête des épines (y) en fonction de la taille du cou (x). Notons que les épines "thin" et "mushroom" sont les plus fréquentes. D'après Bourne and Harris, 2008.

a. Formation, structure et dynamique du filopode dendritique

Lors du développement neuronal se construit une arborescence dendritique. Sur cette arborescence apparaissent les précurseurs des épines dendritiques, les filopodes. Comme les filopodes conventionnels, ce sont de longues et fines protrusions riches en actine. Plusieurs études, *in cellulo* et *in vivo*, ont montré que ces filopodes sont dynamiques et ont une durée de vie qui va de la seconde à l'heure (Ziv and Smith, 1996 ; Dailey and Smith, 1996 ; Zuo et al., 2005). De plus, cette dynamique est soutenue par le cytosquelette d'actine (Portera-Cailliau et al., 2003).

Les études d'imagerie suggèrent que les filopodes se forment spontanément sur le dendrite. Comme nous avons vu précédemment, le filopode conventionnel émerge du réseau branché d'actine du lamellipode. Cependant le dendrite n'est pas composé d'un réseau branché, la question se pose de savoir de quelle structure émerge ces filopodes neuronaux. L'étude de Korobova and Svitkina, 2010 montre que ces filopodes proviennent soit d'une zone dense en matière sur le dendrite soit de mini lamellipodes dendritiques. Les images ME montrent que ces deux structures, appelées "patches", sont en fait composées d'un réseau branché d'actine plus ou moins dense en trois ou en deux dimensions (figure 28f et 28g ; Korobova and Svitkina, 2010). De plus la surexpression de Rac1, qui est un activateur du complexe WAVE (figure 7), induit une augmentation de la naissance de nouveaux filopodes (Andersen et al., 2005). Un mécanisme similaire semble avoir lieu lors de la formation de filopodes axonaux qui deviendront par la suite les branches responsables de l'arborisation du neurone. En effet, ces "patches" sont présents sur l'axone et sont enrichis en ARP2/3 et en WAVE (Spillane et al., 2011).

Néanmoins, la présence seule de ces patches n'est pas suffisante pour expliquer comment les filaments d'actine vont converger afin de générer une protrusion de type filopodiale. Comme il a été dit précédemment les protéines ENA/VASP peuvent former des tétramères afin de permettre une élongation de plusieurs filaments parallèles ce qui pourrait initier une protrusion filopodiale dans les neurones. Or plusieurs études montrent qu'ENA/VASP est nécessaire à la formation des filopodes ainsi qu'à la genèse des neurites (Lin et al., 2007 ; Dent et al., 2011 ; Kwiatkowski et al., 2007). Le rôle des formines a, lui, été peu exploré dans la formation des filopodes dendritiques, une seule étude montre que la déplétion de la formine mDia2 induit une réduction du nombre de filopodes (Hotulainen et al., 2009). La convergence des filaments nécessite probablement que certaines protéines exercent une activité de pontage. La myosine II pourrait jouer ce rôle de part sa capacité à réorganiser les filaments en parallèle et antiparallèle (Medeiros et al., 2006 ; Burnette et al., 2011). L'équipe de Yoshihara a montré que les protéines de pontage ezrin/radixin/moesin (ERM) induisaient la formation de filopodes (Furutani et al., 2007). Cette famille de protéines est intéressante car elles font le lien entre la membrane et le cytosquelette d'actine. PIP2 étant notamment impliqué dans son activation (Fievet et al., 2004 ; Ben-Aissa et al., 2012). De plus, elles interagissent avec une protéine d'adhésion, la télencéphaline (TLCN ou ICAM-

5) abondamment présente dans les filopodes dendritiques des neurones hippocampaux (Matsuno et al., 2006). Le rôle de TLCN dans la genèse des filopodes semble prépondérant car elle interagit également avec la protéine de pontage α -actinine dont la surexpression induit un phénotype filopodial (Hoe et al., 2009).

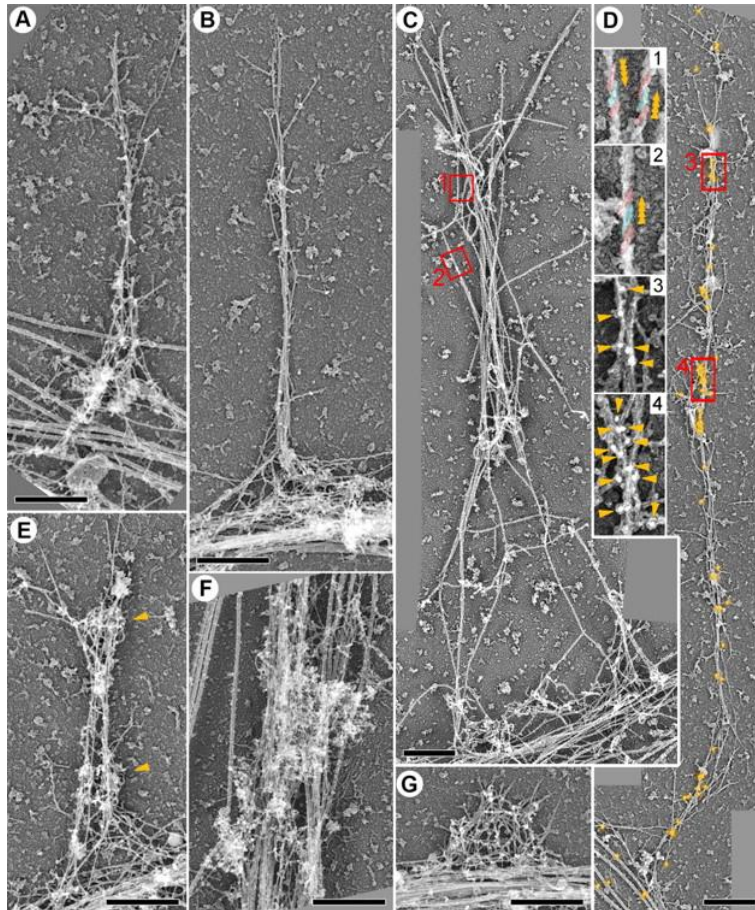


Figure 28 : Filopodes et précurseurs dendritiques

Images de microscopie électronique platinum replica. a) filopode dendritique classique. b) filopode en faisceau rare. c) filopode décoré avec des têtes de myosine afin d'observer la polarité mixte des filaments d'actine. d) filopode immunomarké contre la myosine II. e) filopode avec des petits réseaux branchés. f) et g) "patches" précurseurs des filopodes. (f) "patches" dense (g) "patches" mini-lamellipode. D'après Korobova and Svitkina, 2010.

Le rôle des protéines de pontage dans les filopodes neuronaux semble cependant se limiter à la formation des filopodes neuronaux et non à leur structure. En effet, alors que des filaments d'actine convergent en faisceaux dans les filopodes conventionnels, la structure des filopodes dendritiques semble totalement différente. Ces derniers sont composés d'un mélange de filaments branchés ainsi que de filaments longs mais peu empaquetés (figure 28a et 28c à 28e ; de Korobova and Svitkina, 2010). De plus, un immunomarkage a révélé la présence de protéines de coiffe et du complexe ARP2/3, mais l'absence de fascine (Korobova and Svitkina, 2010). Une étude de microscopie électronique et deux études de FRAP ont également montré que la polarité des filaments d'actines était mixte dans les filopodes dendritiques (Hotulainen et al., 2009 ; Korobova and Svitkina, 2010 ; Tatavarty et al., 2012). Les expériences de FRAP montrent cependant que la polymérisation de l'actine est deux fois plus rapide à l'extrémité des filopodes qu'à la base de celui-ci (Hotulainen et al., 2009 ; Tatavarty et al., 2012). De plus, grâce au développement de techniques de suivi de particules uniques comme le sptPALM ("single particle tracking Photoactivation Localisation

Microscopy" ; cf Annexe Méthode), une étude a montré que les monomères d'actine incorporés dans un filament fluent de manière rétrograde dans le filopode (Tatavarty et al., 2012). Ceci peut être dû notamment à la présence de la myosine II, absente des filopodes conventionnels, mais concentrée à la base des filopodes dendritiques (Korobova and Svitkina, 2010 ; Tatavarty et al., 2012). Cette dernière étude montre effectivement que l'inhibition de la myosine II diminue le flux rétrograde d'actine ainsi que la dynamique du filopode. Cette dynamique n'est cependant pas totalement abolie par l'inhibition de la myosine II, ce qui conforte sa dépendance vis-à-vis de la polymérisation de l'actine (Portera-Cailliau et al., 2003 ; Tatavarty et al., 2012).

Malgré toutes ces pistes il n'y a pas encore de modèle complet expliquant la formation des filopodes sur un dendrite et des questions subsistent. Quel est le signal initial dans le dendrite engendrant la naissance de ces patches ? Comment ce signal active localement et transitoirement la cascade Rac1-WAVE-ARP2/3 afin de créer un réseau d'actine branché ? Il serait donc intéressant de voir le rôle des protéines à domaine BAR comme IRSp53 dans la déformation initiale de la membrane. L'étude de la composition membranaire (PIP2 vs PIP3) de ces patches d'actine pourrait également apporter des pistes dans la compréhension du mécanisme de formation des filopodes neuronaux. Enfin, la dynamique des filopodes dépendant également de libérations locales et transitoires de calcium (Lohmann et al., 2005), il serait pertinent d'étudier plus en détail le rôle de certaines protéines capables de faire le lien entre les variations de Ca^{2+} et la régulation du cytosquelette d'actine comme "calcium/calmodulin dependant protein kinase II" (CAMKII) et "IQ motif-containing GTPase-activating protein 1" (IQGAP1) (Jourdain et al., 2003 ; Kholmanskikh et al., 2006).

b. Du contact filopode-axone à la synaptogenèse

Une fois le filopode formé, celui-ci va sonder son environnement afin de rencontrer le partenaire pré-synaptique ce qui sera déterminant dans la formation de la synapse. Il faut cependant préciser, que même si le modèle suggérant que les filopodes sont les précurseurs des épines dendritiques est le plus communément accepté depuis les travaux de l'équipe de Smith (Ziv and Smith, 1996 ; Yoshihara et al., 2009 ; Hotulainen and Hoogenraad, 2010), d'autres modèles existent afin de créer des synapses. Tout d'abord, le cône de croissance de l'axone pré-synaptique peut contacter des synapses immatures sur le dendrite et exercer des forces capables d'induire une protrusion qui deviendra une épine dendritique (figure 29 ; Yuste and Bonhoeffer, 2004 ; Washbourne et al., 2002 ; Meyer and Smith, 2006). Les filopodes des cônes de croissance dendritiques peuvent eux aussi contacter des zones préférentielles de l'axone (Sabo et al., 2006). Il a également été montré que des synapses peuvent se créer directement entre le dendrite et l'axone sans filopode (Washbourne et al., 2002 ; Gerrow et al., 2006). Enfin, l'axone pré-synaptique étant également capable de protrusions filopodiales (Spillane et al., 2011 ; Greif et al., 2012) il est possible que celles-ci

contactent le dendrite ou les filopodes dendritiques. Cependant, ces modèles ne s'excluent pas les uns les autres et il est fort probable que tous ces cas de figure aient lieu *in vivo*.

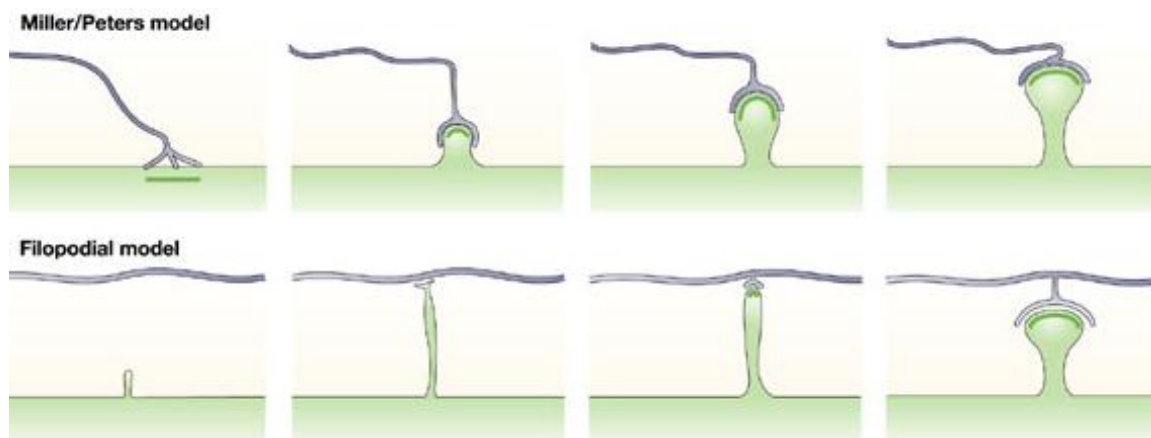


Figure 29 : Deux modèles de la formation d'une synapse

Schéma : en haut, modèle Miller/Peters le cône de croissance contacte des synapses immatures sur le dendrite ce qui induit une protrusion qui deviendra une épine. En bas, modèle du filopode précurseur dans lequel le filopode sonde son environnement puis rencontre l'axone et se différencie en épine. D'après Yuste and Bonheffer, 2004.

Malgré cette diversité, ce contact initial sera permis grâce à l'intervention de protéines d'adhérence. Or plusieurs études suggèrent que la N-cadhérine jouerait ce rôle d'initiation de l'adhésion entre le compartiment pré- et post-synaptique. Tout d'abord, la N-cadhérine ainsi que la β -caténine sont présentes *in cellulo* dans les axones et les dendrites avant la formation de synapses de manière diffuse (Benson and Tanaka, 1998 ; Togashi et al., 2002). Ceci pourrait correspondre à un réservoir de protéines pouvant être recrutées aux filopodes et dans l'axone. Puis à des étapes précoces de la synaptogenèse ces deux protéines s'agrègent dans l'épine dendritique (Benson and Tanaka, 1998 ; Togashi et al., 2002). Ces mêmes agrégats ont été observés *in vivo* dans le compartiment pré-synaptique (Jontes et al., 2004).

Cependant, le rôle de la N-cadhérine dans la synaptogenèse est complexe et ambigu. L'utilisation de siRNA contre la N-cadhérine à des stades précoces du développement neuronal induit une diminution du nombre d'épines dendritiques *in cellulo* (Saglietti et al., 2007). Le même effet est obtenu pour des siRNA contre d'autres cadhérines neuronales (11 et 13 ; Paradis et al., 2007). L'expression d'une N-cadhérine délétée de son domaine extracellulaire, agit comme un dominant négatif (DN) et induit une diminution du nombre de "punctas" de la protéine d'échafaudage post-synaptique PSD-95 et le nombre de "punctas" de la protéine pré-synaptique synapsine (Togashi et al., 2002). Une étude intéressante montre, grâce à un peptide qui perturbe les adhésions cadhérine-cadhérine, qu'en 3h il y a un plus grand nombre d'épines qui disparaissent (Mysore et al., 2008). Des résultats

similaires ont été obtenus pour les partenaires des cadhérines. En effet, des cultures de neurones provenant de souris invalidées pour le gène de la caténine p120, présentent une diminution de la densité des épines corrélée avec une diminution de la densité de PSD-95 et synaptophysine (Elia et al., 2006). Enfin la surexpression précoce de l' α -caténine augmente la densité des épines (Abe et al., 2004). Cependant, même si le complexe cadhérine-caténines est important pour le nombre de synapses, il ne semble pas prépondérant dans la synaptogenèse fonctionnelle, c'est-à-dire l'accumulation des éléments essentiels nécessaires à l'induction et la différenciation pré- et post-synaptique comme la formation des zones actives pré-synaptique et des PSDs. En effet, la co-culture de neurones avec des cellules HEK ("Human Embryonic Kidney 293 cells") exprimant la N-cadhérine n'induit ni le recrutement de synapsine ni l'induction de relargage de glutamate (Scheiffele et al., 2000 ; Sara et al., 2005). De plus la co-culture de neurones avec des cellules COS ("Cercopithecus aethiops Origin-defective SV40") exprimant de la N-cadhérine n'induit pas de recrutement de PSD-95 (Graf et al., 2004). Et la liaison entre des billes de latex recouvertes de N-cadhérine et la surface de neurones en culture ne recrute également pas la PSD-95 (Heine et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats suggèrent que la N-cadhérine serait impliquée dans la formation de contacts initiaux et non dans la synaptogenèse fonctionnelle pré- et post-synaptique. Ce rôle est réservé à d'autres complexes adhésifs : neurexine/neurologine (Scheiffele et al., 2000 ; Graf et al., 2004 ; Mondin et al., 2011), neurexine/LRRTM (Ko et al., 2009 ; Siddiqui et al., 2010), SynCAM (Biederer et al., 2002 ; Sara et al., 2005) et éphrines/rEph (Kayser et al., 2006). Néanmoins il me semble logique de coupler la synaptogenèse fonctionnelle avec l'initiation du contact axone-filopode. Ceci pourrait se faire par l'interaction entre les différents complexes adhésifs. Deux études récentes ont justement montré que l'agrégation post-synaptique de la neurologine-1 dépendait de l'expression de la N-cadhérine. La surexpression de N-cadhérine induit une augmentation de l'agrégation de neurologine-1 (Aiga et al., 2011) alors que des neurones n'exprimant pas de N-cadhérine ont une diminution du nombre d'agrégats de neurologine-1 (Stan et al., 2010). Stan et al., 2010 ont également montré que l'augmentation d'amas de vésicules pré-synaptiques induite par la surexpression de neurologine-1 est abolie dans des neurones n'exprimant pas de N-cadhérine. Ce recrutement de neurologine-1 par N-cadhérine se ferait par l'intermédiaire d'une protéine d'échafaudage (S-SCAM ; Stan et al., 2010). La N-cadhérine semble également interagir indirectement avec le récepteur EphB2. En effet, l'afadine (AF-6) lie, par son domaine PDZ (PSD Dlg1 ZO1), EphB2 et induit son agrégation (Buchert et al., 1999). Or comme dit précédemment l'AF-6 est une protéine qui lie l' α -caténine (Pokutta et al., 2002). Une étude récente a ainsi montré qu'une délétion du gène de l'AF-6 induisait une diminution du nombre de "punctas" de N-cadhérine, une diminution de la densité des "punctas" de EphB2 ainsi qu'une diminution de la densité d'épines dendritiques (Beaudoin et al., 2012). Ainsi la N-cadhérine pourrait participer à la synaptogenèse fonctionnelle par son interaction indirecte avec la neurologine-1 ou avec Eph. De plus, l'interaction entre les Ephs et la N-cadhérine est d'autant plus intéressante car le couple ephrinB/rEphB est impliqué dans la dynamique des filopodes (Kayser et al., 2008). En

effet, des neurones provenant de souris délétés des gènes des EphBs ont une dynamique des filopodes réduite et une diminution de la densité de synapses. Les auteurs proposent, que lors de l'initiation du contact avec l'axone, EphB phosphorylerait et activerait des Rho-GEF ("guanine exchange factors") qui à leur tour activeraient Rac1 ou Cdc42 ce qui serait responsable de la dynamique de l'actine dans les filopodes (Irie and Yamaguchi, 2002 ; Penzes et al., 2003 ; Tolia et al., 2007 ; Kayser et al., 2008). Il est donc possible que les EphBs soutiennent la dynamique du filopode par la voie Rac1-WAVE-ARP2/3 lors des contacts transitoires avec l'axone. Il y aurait ensuite un recrutement du "pool" de N-cadhérines par AF-6 afin d'initier totalement le contact axone-filopode. Puis plusieurs mécanismes, dont le recrutement de neuroligine-1 par N-cadhérine, permettraient la synaptogenèse fonctionnelle nécessaire au maintien des synapses.

c. Rôle du complexe N-cadhérine/caténines dans la synaptogenèse structurale

Comme il a été expliqué précédemment, les cadhérines sont essentielles dans la formation des jonctions adhérentes et le remodelage du cytosquelette d'actine sous-jacent. Plusieurs questions doivent donc être posées. Comment faire la transition entre une protrusion longue et fine qu'est le filopode dendritique à une protrusion ronde et enrichie en actine qu'est l'épine dendritique ? Quel est le rôle de la N-cadhérine et des caténines dans cette transition ? Quelles sont les voies de régulation intracellulaire impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine par la N-cadhérine ? Un mécanisme d'embrayage moléculaire est-il impliqué dans cette transition du filopode à l'épine ?

Dans les mêmes études que celles citées précédemment, il a été observé que l'expression du mutant de la N-cadhérine délété de sa partie extracellulaire induit la formation d'épines dendritiques plus filopodiales et une déformation de la tête de l'épine (Togashi et al., 2002). Ces effets ont été confirmés sur des tranches organotypiques d'hippocampe par des reconstructions en 3D d'images de microscopie électronique (Mendez et al., 2010). Le même mutant induit une diminution de la taille de la tête de l'épine ainsi qu'une diminution de la taille de la PSD, alors que la surexpression de la N-cadhérine a les effets inverses (figure 30 ; Mendez et al., 2010). De plus une étude montre que la perturbation des adhésions cadhérine-cadhérine avec un peptide augmente les variations morphologiques au cours du temps (motilité ; Mysore et al., 2007). Lorsque l'on s'intéresse aux partenaires de la N-cadhérine, des phénotypes similaires sont constatés. Ainsi des neurones n'exprimant plus de β -caténine ont une diminution du nombre d'épines dendritiques de type "mushroom" et parallèlement une augmentation du nombre d'épines "thin" (Okuda et al., 2007). Des cultures de neurones provenant de souris délétées du gène de l' α -N-caténine possèdent également des épines plus filopodiales (Togashi et al., 2002 ; Abe et al., 2004). De plus ces épines ont une motilité accrue (Abe et al., 2004). Enfin, des neurones provenant de souris délétées du gène de la caténine p120, ont une diminution de la taille de la tête des épines avec cependant une diminution de la longueur des épines, ce

qui nuance les résultats précédents (Elia et al., 2006). Ces changements morphologiques suggèrent un remodelage du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques. De plus, les études de Togashi et al., 2002 et Abe et al., 2004, font plus que suggérer un remodelage de l'actine puisque les changements morphologiques ont été visualisés et quantifiés sur des neurones exprimant de l'actine-GFP. Il serait donc intéressant de savoir si ce remodelage d'actine fait intervenir des RhoGTPases comme pour l'assemblage des jonctions adhérentes.

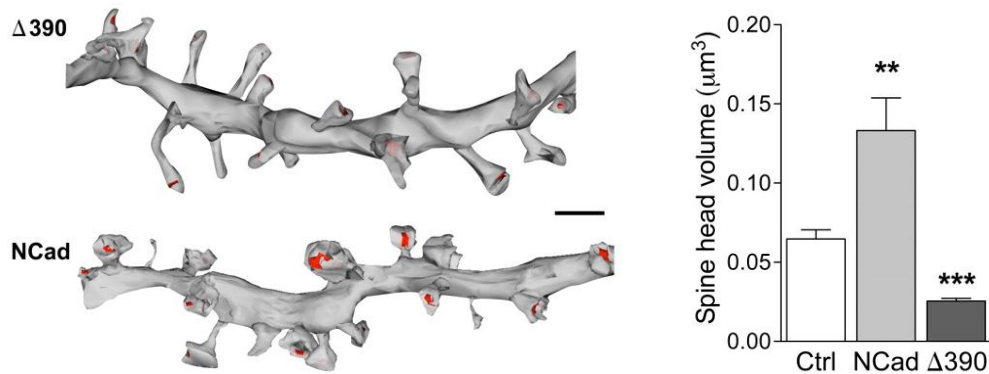


Figure 30 : Effet de l'expression de la N-cadhérine mutée sur la morphologie des épines

A gauche, reconstructions 3D de deux segments de dendrites après transfection d'une N-cadhérine délété de son domaine extracellulaire ($\Delta 390$) + EGFP ou d'une N-cadherine non mutée (NCad) + EGFP, échelle : 2 μm . A droite, histogramme représentant le volume de la tête de l'épine dans les deux conditions citées précédemment et la condition contrôle EGFP seule. Vous remarquerez la diminution de la taille de la tête de l'épine pour l'expression de $\Delta 390$. D'après Mendez et al., 2010.

Très peu d'études font directement le lien entre le complexe N-cadhérine/caténines et les RhoGTPases dans la régulation de la morphologie des épines. La première étude date de 2003 où les auteurs ont montré que RICS, une RhoGAP ("Rho GTPase-activating protein") de Rac1 et Cdc42, co-immunoprécipite avec N-cadherine, β -catenine, PSD95 et GluN2A/B (Okabe et al., 2003). Les expériences d'immunofluorescence ont également montré que ces protéines colocalisent dans les épines (Okabe et al., 2003). Cependant ces résultats restent préliminaires. Une autre étude montre que la délétion du gène de la caténine p120 entraîne une diminution du nombre d'épines et de la taille de la tête de l'épine corrélée avec une augmentation de l'activité de RhoA et une diminution de l'activité de Rac1. Les auteurs ont observé, que chez ces mutants, la densité des épines était restaurée en exprimant une caténine p120 capable d'interagir avec RhoA. Alors que la taille de la tête de l'épine est partiellement restaurée en exprimant de la N-cadhérine ou un Rac1 constitutionnellement actif. Ainsi les auteurs suggèrent que l'accroissement de la taille de la tête de l'épine ne serait pas régulé directement par la caténine p120 mais par une autre fonction de la N-cadhérine capable d'activer Rac1 (Elia et al., 2006). En s'appuyant sur les travaux précédents

(Togashi et al., 2002 ; Abe et al., 2004) les auteurs suggèrent dans la discussion que cela pourrait dépendre de l' α -N-caténine. En effet, les travaux de l'équipe de Penzes montrent comment les adhésions N-cadhérine pouvaient être couplées par la voie α -N-caténine/AF-6/kalirine-7 à la RhoGTPase Rac1 (Xie et al., 2008). Or comme il a été expliqué précédemment, Rac1 est une protéine essentielle dans l'activation du complexe WAVE, un NPF du complexe ARP2/3. Je tiens à préciser que cette étude ne s'intéresse pas à la transition filopode/épine dendritique mais au processus de plasticité structurale dans des neurones matures. Il est cependant possible de faire le parallèle avec le modèle des jonctions adhérentes où une agrégation des cadhérines promouvrait une protrusion par la voie de nucléation Rac1/WAVE/ARP2/3 afin de générer plus d'adhésion (figure 21 ; Harris and Tepass, 2010). Cependant si ce mécanisme fait plutôt intervenir la caténine p120 dans les jonctions adhérentes il semble que l' α -N-caténine soit impliquée dans l'activation de Rac1 dans les épines dendritiques. Ainsi, si le rôle de la N-cadhérine dans la synaptogenèse fonctionnelle semble limité, son rôle dans la synaptogenèse structurale post-synaptique, c'est-à-dire le remodelage du cytosquelette lors de la transition morphologique filopode/épine, semble prépondérant.

Enfin la transition du filopode à l'épine par l'intermédiaire des adhésions N-cadhérine pourrait également faire intervenir le mécanisme de l'embrayage moléculaire présenté précédemment (figure 22). En effet, la dynamique rapide des filaments d'actine dans les filopodes pourrait être ralentie mécaniquement par l'engagement des adhésions N-cadhérine. Ceci engendrerait des protrusions qui pourraient être à l'origine de l'accroissement initial de la tête de l'épine. Aucune étude n'a vérifié cette hypothèse ce qui nous a amenés à la vérifier dans l'étude numéro 1.

d. Architecture et dynamique du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques

Comme il a été dit précédemment les épines dendritiques ne sont pas des structures figées. Leur dynamique a été observée sur des neurones issus de cultures primaires d'hippocampes (vidéo 1 ; Fischer et al., 1998), sur des tranches d'hippocampes (Dailey and Smith, 1996) mais également dans le cortex *in vivo* (Lendvai et al., 2000). De plus ces déformations membranaires sont sous-tendues par le cytosquelette d'actine (Fischer et al., 1998 ; Dunaevsky et al., 1999). Il a ainsi été largement décrit que les épines dendritiques sont enrichies en filaments d'actine (vidéo 1 ; Fifková and Delay, 1982 ; Matus et al., 1982 ; Izeddin et al., 2011 ; Urban et al., 2011). Nous avons vu précédemment que différents réseaux d'actine pouvaient exister au sein d'une structure. Par exemple, le lamellipode et le lamellum sont interconnectés et possèdent une architecture et une dynamique différente (Ponti et al., 2004 ; Giannone et al., 2007 ; Xu et al., 2012). Il semble que dans l'épine dendritique deux réseaux d'actine coexistent également. En effet, des expériences de FRAP (actine-EGFP) et de photo-activation (PAGFP-actine) ont montré qu'il existait un "pool"

dynamique et un "pool" stable de filaments d'actine (Star et al., 2002 ; Honkura et al., 2008). Le "pool" stable a un taux de renouvellement de l'ordre de la vingtaine de minutes. Alors que le "pool" dynamique a un taux de renouvellement de l'ordre de la minute. Ces mêmes études ont montré que la majorité (80-90%) des filaments d'actine appartenait au "pool" dynamique. Le rôle exact du "pool" stable n'a pas été clairement défini, cependant sa proportion est plus importante lorsque la taille de la tête de l'épine augmente (Honkura et al., 2008). La question se pose de savoir, si comme dans le lamellipode, ce "pool" dynamique génère un flux rétrograde d'actine dans les épines de l'extrémité membranaire vers le centre de l'épine. Or, lors de la photo-activation de la PAGFP-actine à l'extrémité de l'épine, deux études ont observé un flux rétrograde d'actine de l'extrémité à la base de l'épine à des vitesses de 5 à 20 nm/sec (Honkura et al., 2008 ; Frost et al., 2010). Une étude de sptPALM ("single particle tracking Photoactivation Localization Microscopy", cf Annexe Méthode) montre qu'un monomère d'actine incorporé dans un filament se déplace à une vitesse moyenne de 39 nm/sec dans les épines et préférentiellement vers le centre de l'épine (Frost et al., 2010). De plus, ce mouvement est dépendant de la polymérisation d'actine. Les auteurs s'accordent à dire qu'il y aurait un "treadmilling" des filaments d'actine dirigé des extrémités membranaires et de la PSD vers le centre de l'épine. Cependant il est important de noter qu'un flux rétrograde d'actine n'implique pas qu'il y ait nécessairement un "treadmilling" des filaments actine. Un modèle récent explique que le flux d'actine serait généré par la création de nouveaux réseaux d'actine exerçant une force sur des réseaux formés précédemment (figure 31 ; Sykes and Plastino, 2010). Ces expériences se basent sur une étude *in vitro* ayant montré que lorsque les bouts barbés des filaments rencontrent une contrainte physique ils se réorientent pour ne plus faire face à cette contrainte (figure 31 ; Sykes and Plastino, 2010 ; Achard et al., 2010). Ainsi le flux de l'ensemble du réseau d'actine ne correspondra pas au sens du "treadmilling" du filament. Si ce modèle se heurte aux études de microscopie électronique dans le lamellipode ayant montré que les extrémités barbées faisaient face à la membrane (figure 13, 14 et 16 ; Svitkina and Borisy, 1999 ; Urban et al., 2010), quelques études le rendent attrayant dans le contexte de l'épine dendritique. En effet, l'étude de microscopie électronique de Fífková and Delay, 1982 a élégamment montré que les filaments d'actine dans les épines ont une polarité mixte et que plusieurs filaments sont orientés parallèlement à la PSD. Ainsi, la PSD représenterait cette contrainte physique et forcerait une réorganisation des filaments d'actine dans les épines dendritiques. Ce modèle est supporté par une étude de sptPALM très complète montrant que les filaments d'actine dans les épines ont une polarité mixte et que les monomères d'actine dans les filaments sont majoritairement stationnaires ou fluent à des vitesses faibles (8 à 20 nm/sec ; Tataavarty et al., 2009). Il est notamment intéressant de noter que les vitesses mesurées dans cette étude se rapprochent de celles mesurées par photoactivation (Honkura et al., 2008). Ainsi les auteurs suggèrent également que les vitesses de flux observées seraient majoritairement générées par la création de nouveaux réseaux d'actine exerçant une force sur d'autres réseaux d'actine (figure 31 ; Tataavarty et al., 2009 ; Sykes and Plastino, 2010). Quant aux mouvements stationnaires des monomères d'actine dans les filaments, les

auteurs proposent que la polymérisation de ces petits filaments ne rencontrerait pas de contrainte physique ce qui ne permettrait pas d'induire un "treadmilling" (Tatavarty et al., 2009). Le réseau d'actine est également capable de générer des protrusions membranaires (spinules) comme nous pouvons l'observer sur les épines par vidéo microscopie et microscopie électronique (vidéo 1 ; figure 32 ; Spacek and Harris, 2004 ; Tao-Cheng et al., 2009). Se peut-il que la génération et le désassemblage de celles-ci jouent un rôle dans les mouvements et les forces exercées sur l'ensemble du réseau d'actine?

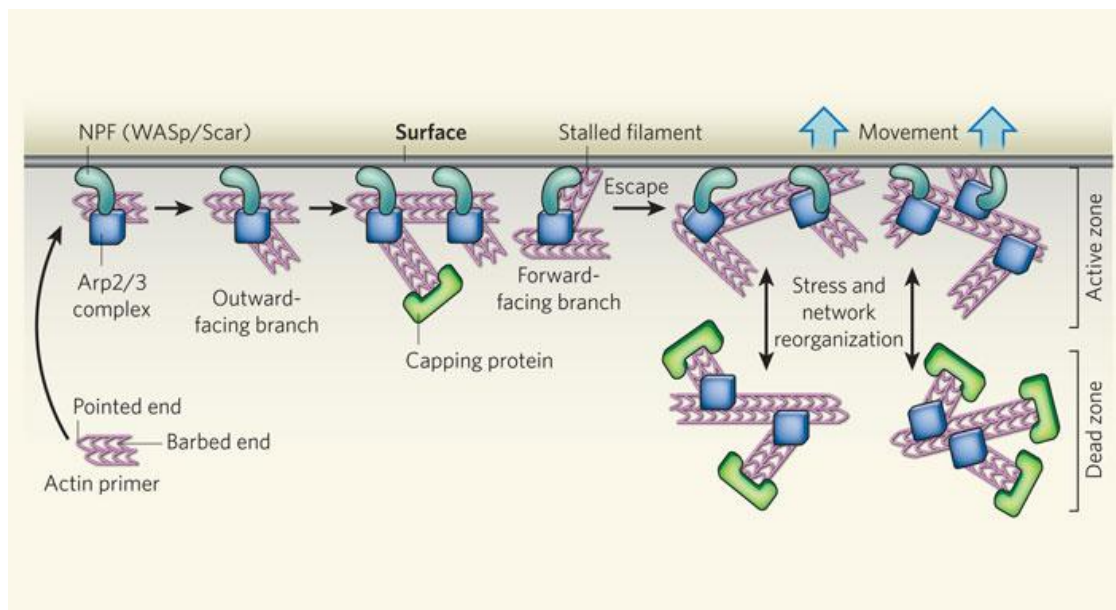


Figure 31 : Modèle de la contrainte physique et de la réorientation des filaments

Schéma : Achard et al., 2010 propose qu'après le recrutement du complexe ARP2/3 par un NPF, la contrainte physique que représente la surface entraîne une réorientation des extrémités barbées. Puis la création d'autres réseaux sur la même surface pousse les réseaux précédents entraînant un flux par contrainte spatiale. Ainsi le flux de l'actine ne serait pas uniquement dû au "treadmilling" des filaments. D'après Sykes and Plastino., 2010.

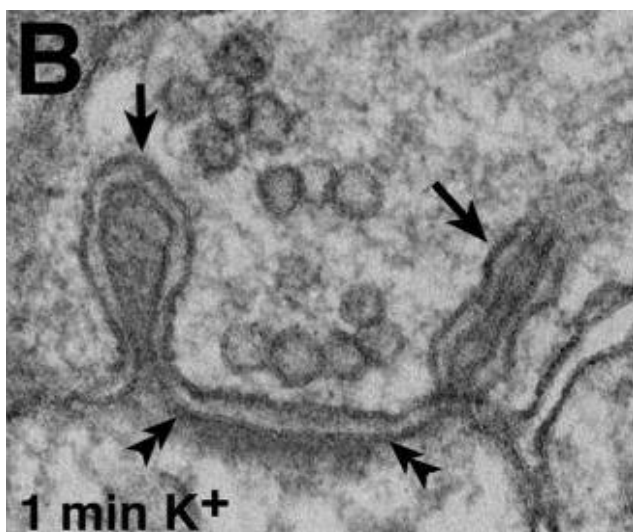


Figure 32 : Les Spinules

Image de microscopie électronique d'une synapse. Une forte dépolarisation au K^+ induit la formation de protrusions membranaires (spinules) indiquées par les flèches simples. On notera que ces spinules poussent la membrane du bouton pré-synaptique. D'après Tao-Cheng et al., 2009.

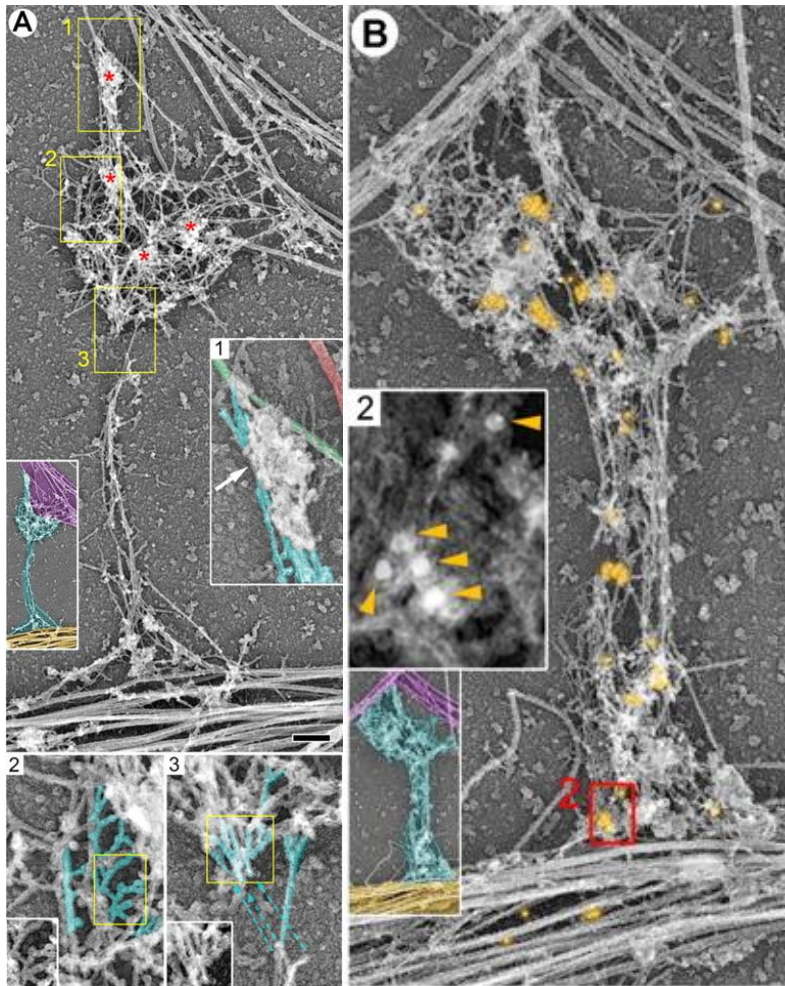


Figure 33 : Un réseau d'actine branché dans les épines

Images de microscopie électronique platinum replica. A) épine de type "mushroom"; 1) interaction entre filament d'actine et PSD ; 2) et 3) réseau d'actine branché. B) immunomarquage aux particules d'or du complexe ARP2/3 (en jaune). Code couleur, violet : axone, bleu : réseau d'actine dans l'épine, jaune : microtubule du dendrite. Echelle : 0.2 μ m. D'après Korobova and Svitkina, 2010.

Nous avons vu précédemment que l'architecture et la dynamique du filopode conventionnel et du lamellipode étaient dépendantes de la présence et de la localisation de différentes ABP ("actin binding proteins") et de leurs régulateurs. Afin de comprendre la dynamique du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques, il me semble donc important de faire le même parallèle. Plusieurs études ont montré que le réseau d'actine dans les épines était composé de filaments branchés. Tout d'abord, des immunomarquages ont révélé que le complexe Arp2/3 est enrichi dans les neurones pyramidaux d'hippocampes en tranches (Rácz and Weinberg, 2008) puis dans la tête des épines dendritiques de neurones d'hippocampes dissociés (Hotulainen et al., 2009 ; Korobova and Svitkina, 2010). Les images de microscopie électronique ont confirmé que le cou et la tête de l'épine comportent des filaments d'actine branchés (figure 33 ; Korobova and Svitkina, 2010). En couplant des anticorps à des particules d'or l'étude de microscopie électronique de Rácz and Weinberg, 2008, indique que le complexe ARP2/3 est localisé à une distance de 20 à 100nm (67 nm en moyenne) de la membrane et de la PSD vers le centre de l'épine. Cependant, les auteurs se focalisent sur des coupes d'épines où le cytosquelette d'actine se situe entre la PSD et le dendrite. Or cette vision de l'épine est incomplète car elle ne tient pas compte des protrusions membranaires observées lors de la motilité des épines (vidéo 1). De plus, il

semble que le complexe ARP2/3 soit impliqué dans la morphologie des épines. En effet, la déplétion du complexe ARP2/3 par siRNA ou sa délocalisation par l'expression du domaine WA de WAVE induit une diminution du nombre d'épines de type "thin" et "mushroom" sans altérer le nombre de filopodes (Hotulainen et al., 2009). Cependant les épines ne sont pas uniquement constituées de petits filaments branchés mais également de longs filaments non branchés non empaquetés notamment dans le cou de l'épine (Korobova and Svitkina, 2010). Or comme nous l'avons expliqué précédemment, le nucléateur formine peut nucléer des filaments non branchés. Il est donc possible que la nucléation par les formines intervienne dans la morphologie des épines. L'expression d'un siRNA dirigé contre la formine mDia2 ou l'expression d'une forme inactive de la petite Rho GTPase Rif, censée activer mDia2, induit un changement de proportion dans le type d'épines. Les auteurs ont observé une augmentation du nombre d'épines de type "mushroom" et "stubby" et une diminution du nombre d'épines de type "thin" ainsi que du nombre de filopodes (Hotulainen et al., 2009). Ainsi en favorisant la nucléation de longs filaments non branchés, les formines pourraient inhiber le grossissement de la tête de l'épine. De façon intéressante cette augmentation du nombre d'épines de type "mushroom" et "stubby" est perdue lorsque que le complexe ARP2/3 est inhibé. Les résultats de cette étude confirment que la morphologie de la tête des épines est bien soutenue par un réseau d'actine branchée. Alors que la nucléation de filaments non branchés par les formines soutiendrait éventuellement la morphologie du cou de l'épine. A l'image du modèle du lance-roquette entre APC et la formine mDia1 (figure 3 ; Breitsprecher et al., 2012), nous pourrions également imaginer une coordination entre ARP2/3 et une formine, dans laquelle ARP2/3 initierait la formation d'un filament branché et le formine se chargerait de l'élongation. Aucune étude à ce jour n'a vérifié l'existence d'une telle coopération.

Les NPFs ("nucleation promoting factors") capables d'activer ARP2/3 sont donc logiquement impliqués dans la morphologie des épines. WAVE (Pilpel and Segal, 2005 ; Soderling et al., 2007) et Abi (Grove et al., 2004 ; Proepper et al., 2007), qui font parties du complexe WAVE (figure 7), sont tout d'abord localisés dans les épines et des souris délétées pour les gènes codant ces protéines présentent une diminution du nombre d'épines (Grove et al., 2004 ; Kim et al., 2006 ; Soderling et al., 2007). De plus, l'étude de Kim et al., 2006 montre notamment que les neurones des souris délétées du gène WAVE-1 présentent une diminution des épines de type "thin", "mushroom" et "stubby" et une augmentation des protrusions filopodiales. De même, N-WASP, cortactine et Abp1 ("actin binding protein 1"), également présents dans les épines, ont été impliqués dans la morphologie et la densité des épines (Hering and Sheng, 2003 ; Racz and Weinberg, 2004 ; Wegner et al., 2008 ; Haeckel et al., 2008). Enfin les travaux du laboratoire de Hanley ont montré que PICK-1 ("protein interacting with C kinase 1"), était un inhibiteur du complexe ARP2/3 et que son expression restreignait la taille des épines via ARP2/3 (Rocca et al., 2008 ; Nakamura et al., 2011). Nous avons vu précédemment, que dans le lamellipode, il y a une relation étroite entre la localisation des NPFs, leur fonction et l'architecture du réseau d'actine. Ainsi, les NPFs de classe 1, comme le complexe WAVE, sont localisés et activés à la membrane. La question se

pose donc de savoir où sont localisées les NPFs de classe 1 dans les épines dendritiques. Cependant, de part la taille nanoscopique des épines (0,5-1 μ m) et la résolution spatiale limitée de la microscopie à fluorescence conventionnel, cette localisation n'a pas pu être déterminée. Seule la localisation de la cortactine (NPF de classe 2) a été déterminée par microscopie électronique. Les particules d'or couplées à des anticorps dirigés contre la cortactine se localisent dans l'ensemble de l'épine avec un pic à une distance de 100 à 150 nm de la membrane vers le centre de l'épine (Racz and Weinberg, 2004). Cela pourrait paraître surprenant mais la cortactine est localisée dans l'ensemble du lamellipode et non à l'extrémité membranaire de celui-ci comme les NPFs de classe 1 (Cai et al., 2008). Malgré cette localisation, la cortactine pourrait être recrutée à la PSD de part sa capacité à lier Shank (Naisbitt et al., 1999). Une étude, permet d'émettre l'hypothèse que le complexe WAVE serait localisé à la membrane proche de la PSD. En effet, Abi-1 et WAVE ont été détectés en Western Blot comme étant enrichis dans la fraction de la PSD. Cette même étude montre notamment que Abi-1 serait retenu par son interaction avec Shank3 une protéine de la PSD. Ceci se ferait par la liaison du domaine SH3 de Abi-1 au motif riche en proline de Shank3 (Proepper et al., 2007). Cette étude permet notamment de faire le lien avec d'autres travaux montrant l'importance de la protéine Shank dans la morphologie des épines (Sala et al., 2001 ; Roussignol et al., 2005 ; Grabrucker et al., 2011 ; Durand et al., 2012). Cette idée que le complexe WAVE soit localisé à la PSD est soutenue par les interactions d'un de ses activateurs : IRSp53 ("Insulin Receptor Substrate p53"). En effet, cette I-BAR protéine, qui suit et/ou induit des déformations membranaires, se lie par son domaine SH3 à Shank et par son "PDZ binding motif" à PSD-95 (Bockmann et al., 2002 ; Soltau et al., 2002 ; Soltau et al., 2004 ; Choi et al., 2005). Une étude montre qu'IRSp53 pourrait également être impliqué dans la morphologie des épines dendritiques (Choi et al., 2005) mais ces résultats n'ont pas été confirmés par une autre étude (Sawallisch et al., 2009). L'ensemble de ces études confortent l'hypothèse que la nucléation de filaments branché par ARP2/3 pourrait être initiée proche de la PSD sans pour autant le démontrer. L'ensemble des études présentées jusqu'à présent ne permettent pas de clarifier si le flux rétrograde d'actine est dû au "treadmilling" des filaments d'actine ou juste aux forces générées par la création de nouveaux réseaux d'actine sur le réseau. Ces résultats ne permettent pas non plus d'expliquer les protrusions membranaires (spinules) observés sur les épines par vidéo microscopie et microscopie électronique (vidéo 1 ; figure 32 ; Spacek and Harris, 2004 ; Tao-Cheng et al., 2009). Se peut-il que le complexe WAVE soit également localisé aux extrémités des protrusions membranaires comme dans le lamellipode?

Afin de générer des filaments courts d'actine branchés dans le lamellipode, l'activité des protéines de coiffe est également nécessaire. La protéine de coiffe Eps8 est enrichie dans les épines dendritiques. De plus, des neurones provenant de souris n'exprimant pas Eps8 possèdent des changements morphologiques des épines dendritiques (poster Zambetti et al., 2012 FENS Barcelona). Eps8 pourrait indirectement être localisé à la PSD de part ses interactions avec Abi-1 et IRSp53 (Dianza et al., 2004 ; Dianza et al., 2006). D'autres études ont montré que les épines sont également enrichies en protéines de coiffe de la famille des

CapZ (Korobova and Svitkina, 2010 ; Fan et al., 2011) et l'expression d'un shRNA ("small hairpin RNA") contre CapZ β 2 induit des épines plus filopodiales ainsi que des épines avec de longues protrusions (Fan et al., 2011). Il est intéressant de noter que les extrémités barbées des filaments d'actine libérées de leurs protéines de coiffe se trouvent accessibles aux protéines de la famille ENA/VASP qui promeuvent l'élongation des filaments. Ceci expliquerait les longues protrusions sur la tête des épines lors de l'expression des shRNA contre CapZ β 2 ainsi que l'augmentation de la taille de la tête de l'épine lors de la surexpression de VASP (Lin et al., 2010). Se peut-il que l'élongation des filaments par VASP soit à l'origine des protrusions membranaires ?

Comme pour le filopode conventionnel et le lamellipode de cellule motile un désassemblage du réseau d'actine dans les épines est essentiel. L'ADF/cofiline permet ce désassemblage par son action de fragmentation/désassemblage des portions actine-ADP des filaments (figure 13). Alors que celle-ci se localise dans l'ensemble du lamellipode, elle peut se concentrer aux extrémités des filopodes conventionnels (Lai et al., 2008 ; Breitsprecher et al., 2011b). La localisation de protéines comme l'ADF/cofiline est donc importante afin de comprendre l'organisation et la dynamique du cytosquelette d'actine dans les épines. Tout d'abord, plusieurs études montrent l'importance de l'ADF/cofiline et de ses régulateurs, LIMK-1 et slingshot, dans la morphologie des épines. Ainsi une augmentation de l'activité de l'ADF/cofiline induit une diminution de la taille de la tête des épines (Meng et al., 2002 ; Zhou et al., 2004 ; Zhou et al., 2012), alors qu'un siRNA dirigé contre celle-ci induit de longues protrusions sur la tête des épines (Hotulainen et al., 2009). Cependant, une seule étude a observé la localisation de la l'ADF/cofiline dans les épines (Racz and Weinberg, 2006). D'après cette étude de microscopie électronique, les particules d'or couplées à des anticorps dirigés contre l'ADF/cofiline indiquent que celle-ci se localise principalement dans les 50 premiers nanomètres après la membrane ou la PSD vers le centre de l'épine. Les auteurs proposent que l'absence d'ADF/cofiline au centre de l'épine explique la présence du "pool" stable d'actine. Cependant cela n'explique pas le taux de renouvellement rapide du "pool" dynamique qui représente 80-90% du réseau d'actine. Cette localisation est tout de même intéressante car elle permettrait la rétraction rapide des protrusions à l'image du recrutement de l'ADF/cofiline aux extrémités du filopode conventionnel (figure 12 ; Breitsprecher et al., 2011b). Or comme dit précédemment, un siRNA dirigé contre l'ADF/cofiline induit de longues protrusions sur la tête des épines (Hotulainen et al., 2009). L'activité de l'ADF/cofiline dans l'épine pourrait également expliquer la présence de petits filaments et les faibles vitesses de "treadmilling" qui leur sont associées (Tatavarty et al., 2009). Encore une fois, je tiens à préciser, que dans l'ensemble de ces études en microscopie électronique, les auteurs se focalisent sur des coupes d'épines où le cytosquelette d'actine se situe entre la PSD et le dendrite (Racz and Weinberg, 2012). Cette vision de l'épine est incomplète car elle ne tient pas compte des protrusions membranaires.

La présence et la localisation dans les épines de moteurs moléculaires comme la myosine-II pourrait expliquer en partie le flux rétrograde d'actine dans les épines. La

myosine II est tout d'abord enrichie dans les épines dendritiques (Zhang et al., 2005 ; Korobova and Svitkina, 2010 ; Tatavarty et al., 2012). Sa surexpression induit une augmentation du nombre d'épines ainsi qu'une augmentation des épines de types "mushroom" et une diminution des épines de type "thin" (Zhang et al., 2005 ; Hodges et al., 2011), alors que l'inhibition pharmacologique de son activité ou l'expression de siRNA induit des épines plus filopodiales (Zhang et al., 2005 ; Ryu et al., 2006 ; Hodges et al., 2011). Quant à sa localisation dans les différents compartiments de l'épine, deux études se contredisent. Dans la première étude un immunomarquage révèle que les punctas de myosine-II sont plus présents dans le cou de l'épine versus la tête et la base, ce que les auteurs ont confirmé en microscopie électronique (Korobova and Svitkina, 2010). De plus les auteurs précisent que la myosine-II est présente à la base de la tête de l'épine et non aux extrémités. Cette localisation pourrait notamment expliquer le flux rétrograde d'actine de la tête à la base de l'épine par les forces générées par la myosine-II. Cependant, la deuxième étude vient pondérer ses résultats. L'immunomarquage de la chaîne légère de la myosine indique que celle-ci serait plus dans la tête que dans le cou, ce que les auteurs confirment localisant la myosine en haute résolution par la technique de PALM (Tatavarty et al., 2012 ; cf Annexe Méthode). Ces résultats sont plus en accord avec la polarité mixte des filaments d'actine observés dans de précédentes études (Fifková and Delay, 1982 ; Tatavarty et al., 2009).

Comme nous avons pu le voir la littérature présente encore des contradictions et des incohérences quant à la polarité, l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine. Notre travail dans l'étude numéro 2 apportera plusieurs pistes afin d'éclaircir ce débat.

V. Le cytosquelette d'actine et la plasticité synaptique

Si vous avez, qu'un temps soit peu, retenu ma prose en lisant cette thèse, c'est que j'ai quelque part changé votre cerveau, changé votre mémoire. Il est ainsi fort probable que j'ai modifié quelques unes de vos synapses et notamment la morphologie de vos épines dendritiques. Dans cette dernière partie nous allons donc résumer le lien entre le cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques, les adhésions N-cadhérine et l'activité synaptique, la plasticité synaptique et des processus cognitifs comme l'apprentissage.

Brièvement, dans le cas des synapses glutamatergiques, l'efficacité ainsi que la force de transmission sont dépendantes de la mise en place d'éléments essentiels tels que les récepteurs du glutamate GluA (ou rAMPA : α -amino-3-hydroxy-5-méthylthiazol-4-isoxalone propionic acid) et GluN (ou NMDA : N-méthyl-D-aspartate) ainsi que les protéines d'échafaudage permettant d'ancrer et de stabiliser les récepteurs au niveau des sites de libération pré-synaptique. Les GluA sont responsables de la majorité de la transmission excitatrice rapide, alors que les GluN présentent des cinétiques plus lentes et jouent un rôle

déterminant dans l'induction de la potentiation et la dépression à long terme (LTP et LTD) (Malinow and Malenka, 2002 ; Derkach et al., 2007 ; Lau et al., 2009). Puis l'efficacité de la transmission synaptique sera modulée par l'ajout ou la suppression rapide de GluA en post-synaptique. En effet, l'ajout de GluA supporte la LTP alors que leur suppression la LTD (Malinow and Malenka, 2002). Ces mécanismes de LTP et LTD sont considérés comme étant les corrélats moléculaires des phénomènes d'apprentissage.

a. Rôle du Ca^{2+} et de la CAMKII dans la régulation du cytosquelette d'actine

L'activité synaptique régule la dynamique de l'actine par de multiples voies de signalisation (Star et al., 2002 ; Cingolani and Goda, 2008 ; Penzes et al., 2008). L'activation des GluN induit leur ouverture et l'entrée de Ca^{2+} . L'élévation du Ca^{2+} intracellulaire permet la translocation de la CAMKII (" Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II") dans les épines dendritiques (Thalhammer et al., 2006). Le Ca^{2+} se lie à la calmoduline pour former un complexe (CaM) capable de lier CAMKII, ce qui va lever l'autoinhibition de CAMKII, qui va à son tour s'autophosphoryler pour s'activer (Okamoto et al., 2009). Une fois activée la CAMKII peut phosphoryler et activer plusieurs protéines, notamment des GEFs ("guanine exchange factor" ; figure 34 ; Okamoto et al., 2009). Ainsi, les GEFs de Rac-1 comme Tiam1 et kalirin-7 sont directement phosphorylées par CAMKII (Fleming et al., 1999 ; Tolia et al., 2005 ; Xie et al., 2007). CAMKII peut également phosphoryler la kinase CAMK (CAMKK) qui phosphoryle CAMKI qui phosphoryle la GEF de Rac-1, β PIX ("Pak-interacting exchange factor" ; Saneyoshi et al., 2008 ; Wayman et al., 2008). Or ces trois GEF activent la petite RhoGTPase Rac-1 (figure 9 et 34). Comme nous l'avons vu précédemment Rac-1 est l'activateur principal du complexe WAVE qui à son tour active la nucléation de filaments branchés par ARP2/3. Le remodelage du cytosquelette d'actine par ces voies fait également intervenir les Pak ("p21-activated kinase"). En effet, Rac-1 peut activer Pak1 et Pak3 qui vont à leur tour phosphoryler la LIM Kinase (LIMK ; figure 34). Comme il a été dit précédemment, la LIMK phosphoryle l'ADF/cofiline afin d'inhiber sa liaison à l'actine (Arber et al., 1998 ; Bernstein and Bamberg, 2010). Il est intéressant de noter que la GEF β PIX peut former un complexe avec Pak1 et Shank (Park et al., 2003) tout en rappelant que Shank peut recruter le complexe WAVE à la PSD (Proepper et al., 2007). Ainsi l'activation de β PIX par le Ca^{2+} et les cascades de phosphorylation pourraient permettre une action synergique entre la nucléation par Rac1 et l'inhibition de la fragmentation/dépolymérisation par l'ADF/cofiline proche de la PSD. Ainsi le remodelage du cytosquelette d'actine par l'activité synaptique à la PSD passe par la coordination spatiale et temporelle de toutes ces protéines.

La CAMKII phosphoryle également la spinophiline (ou neurabine) qui est une ABP possédant un domaine PDZ (Nakanishi et al., 1997 ; Grossman et al., 2004). Ceci entraîne le recrutement de Lfc ("Lbc's first cousin"), une GEF de RhoA et par conséquent le recrutement de RhoA et ROCK (Leung et al., 1995 ; Ryan et al., 2005 ; Schubert et al., 2006). ROCK est une kinase multifonction capable notamment d'activer la profiline, et la MLC ("myosin light

chain") et d'inhiber l'ADF/cofiline par activation de la LIMK. Or toutes ces protéines sont importantes dans la dynamique du filament d'actine (figure 34).

Enfin, la CAMKII peut lier directement l'actine et agir comme une protéine de pontage. En effet, la surexpression de la sous unité β de la CAMKII induit des faisceaux de filaments d'actine (Okamoto et al., 2007). De plus cette même surexpression induit un retour de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) de l'actine plus lent (Okamoto et al., 2007). Les auteurs ont ensuite montré que cela n'était pas dépendant de son activité catalytique mais de son domaine de liaison à l'actine. La liaison du complexe CaM à la CAMKII inhibe l'activité de pontage de la CAMKII en la détachant des filaments d'actine (Okamoto et al., 2007 ; Lin and Redmond, 2008). Ainsi l'activité synaptique pourrait en dissociant la CAMKII des filaments d'actine permettre non seulement de défaire les faisceaux d'actine mais également permettre à la CAMKII d'induire le remodelage du cytosquelette d'actine par les voies de signalisation citées précédemment. Je tiens à préciser que ces faisceaux d'actine ont été observés dans les épines grâce à de la microscopie super-résolutive STED ("Stimulated emission depletion microscopy") et pourrait expliquer le "pool" stable d'actine (Urban et al., 2011 ; Honkura et al., 2008).

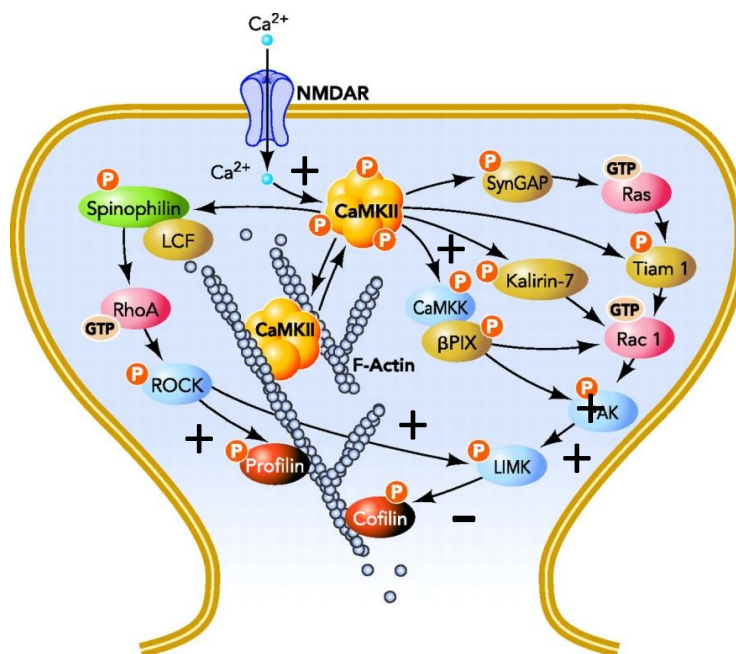


Figure 34 : Régulation du cytosquelette d'actine par l'activation de la CAMKII

Schéma : l'entrée de Ca^{2+} dépendante des GluNs (récepteurs NMDA) entraîne l'activation de la CAMKII. Cette dernière peut lier les filaments d'actine et agir comme une protéine de pontage. La CAMKII active plusieurs protéines, dont des GEFs et d'autres kinases. Ceci permet l'activation de petites RhoGTPases (Rac1, Cdc42, RhoA). Les petites RhoGTPases vont à leur tour activer d'autres kinases (Pak, ROCK) mais aussi des NPFs (WAVE, N-WASP). Ces voies de signalisation aboutissent sur des ABPs comme le complexe ARP2/3, l'ADF/cofiline et la profiline. D'après Okamoto et al., 2009.

b. La plasticité synaptique et le remodelage du cytosquelette d'actine

Plusieurs études ont montré que l'induction d'une potentiation à long terme (LTP) en tranches induisait la formation de nouvelles épines dendritiques ainsi que l'augmentation des protrusions (spinules) des épines stimulées (Buchs and Muller, 1996 ; Engert and Bonhoeffer, 1999 ; Toni et al., 1999 ; Colicos et al., 2001). Puis une première étude a montré que lors de l'activation, par décaage de glutamate, d'une épine dendritique individuelle, cette dernière voyait son volume augmenter (figure 35 ; Matsuzaki et al., 2004). Cet élargissement comporte deux phases, une première phase transitoire avec un accroissement important du volume suivie d'une phase de diminution de ce volume (<5 min) et une deuxième phase avec une augmentation du volume durable (100 min). Cet élargissement est sous tendu par le cytosquelette d'actine puisque la latrunculin-A, qui induit la dépolymérisation de l'actine en séquestrant les G-actine, empêche cet élargissement (Matsuzaki et al., 2004). D'autres études confirment que l'augmentation de l'activité synaptique induit un remodelage du cytosquelette d'actine. En effet, l'induction d'une LTP *in vivo* entraîne une augmentation de F-actine dans les épines dendritiques visualisées en microscopie électronique par marquage à la phalloïdine (Fukazawa et al., 2003). De plus l'induction de l'élargissement des épines, par stimulus téτανique dans des tranches organotypiques, est corrélée avec une augmentation du ratio F-actine/G-actine mesuré par FRET ("fluorescence resonance energy transfer") entre monomères d'actine, suggérant une augmentation de la polymérisation de l'actine (Okamoto et al., 2004). Enfin l'équipe de Kasai a également montré que lors d'un protocole de décaage de glutamate sur une épine individuelle il y avait une augmentation de la fluorescence en PAGFP-actine générant ce qu'ils appelleront le "pool" d'élargissement (vidéo 2 ; Honkura et al., 2008). Cependant ce "pool" disparaît après un maximum de 15 min et ne peut rendre compte, à lui seul, de l'élargissement de l'épine à plus long terme (figure 35 ; Matsuzaki et al., 2004). Il est fort probable que ce "pool" soit par la suite réorganisé pour former un nouveau "pool" stable et un nouveau "pool" dynamique plus important.

Cette augmentation de la polymérisation de l'actine suggère qu'il y ait une activation des voies intracellulaires présentées précédemment. L'équipe de Kasai a tout d'abord montré que ce grossissement de la tête de l'épine était dépendant de l'activation des récepteurs GluN (NMDA) et de la calmoduline (Matsuzaki et al., 2004). Puis, une inhibition pharmacologique de la CAMKII ou l'expression d'un mutant de la CAMKII (K24R) empêche la stabilisation de l'élargissement et réduit partiellement l'augmentation rapide du volume de moins de 5 min (Matsuzaki et al., 2004 ; Lee et al., 2009 ; Yamagata et al., 2009). L'équipe de Yasuda a notamment montré, par une approche de FRET, que lors de cette augmentation de volume de l'épine il y avait une augmentation de l'activité de la CAMKII (Lee et al., 2009). Ainsi la CAMKII pourrait activer les voies de signalisation citées précédemment (figure 34). Cependant cette activation est transitoire (2 min) ce qui suggère qu'elle soit être relayée par l'activité d'autres protéines. L'équipe de Yasuda a donc montré plus récemment, par une approche de FRET, que lors de l'augmentation du volume de l'épine il y avait une

augmentation transitoire (2 min) puis durable (40 min) de l'activité des petites RhoGTPases, RhoA et Cdc42 (Murakoshi et al., 2011). Or cette augmentation d'activité est dépendante des GluN et de la CAMKII. Les auteurs ont également montré que l'inhibition de RhoA ou de son effecteur ROCK inhibait les changements de volume transitoires et durables. Alors que l'inhibition de Cdc42 ou de son effecteur Pak1 inhibait uniquement les changements de volume durables. Il est difficile d'interpréter les effets de RhoA/ROCK de part la diversité de leurs effecteurs (figure 34). Cependant de part son activation de la profiline et l'inhibition de l'ADF/cofiline il est probable que cette voie soutienne activement la polymérisation de filaments d'actine. Une activité accrue et soutenue de la voie Cdc42/Pak1 permettrait elle aussi une inhibition de l'ADF/cofiline limitant ainsi la dépolymérisation. Comme il a été dit précédemment, Pak1 est également un effecteur de la RhoGTPase Rac1 (figure 34). Or Penzes et ses collaborateurs ont montré que l'intégrité de la voie kalirin-7/Rac1/Pak1 était nécessaire dans la plasticité structurale des épines (Xie et al., 2007 ; Xie et al., 2008 ; Hayashi-Takagi et al., 2010). Cependant ces résultats sont contradictoires avec une autre étude non publiée montrant qu'il y avait un enrichissement important de l'ADF/cofiline lors du grossissement de l'épine dans les premières minutes (poster Bosch et al., 2012 FENS Barcelone). Les auteurs proposent, que l'activité de l'ADF/cofiline soit nécessaire à la réorganisation initiale du cytosquelette d'actine lors de la plasticité structurale. Ainsi par analogie avec le lamellipode, l'ADF/cofiline pourrait être nécessaire à la génération d'une protrusion membranaire lors de l'augmentation de la taille de l'épine (vidéo 2 ; Hotulainen et al., 2005 ; Kiuchi et al., 2007 ; Iwasa and Mullins, 2007 ; Honkura et al., 2008).

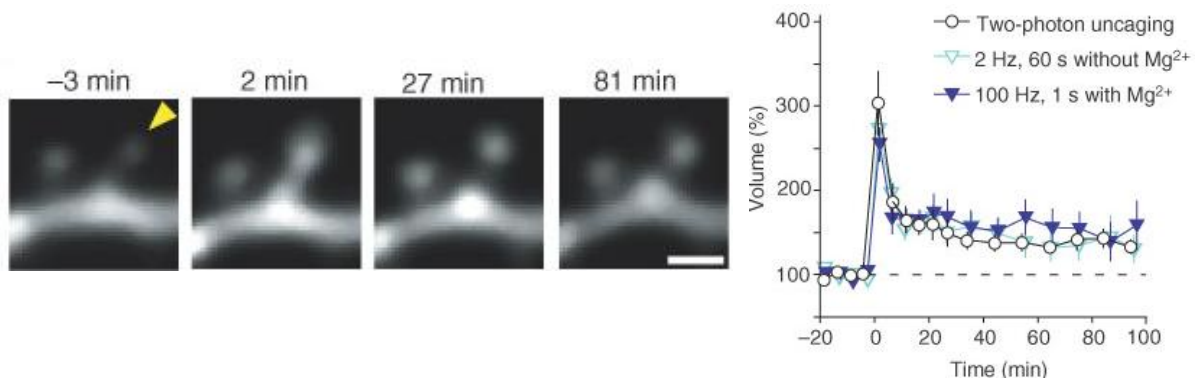


Figure 35 : Stimulation d'une épine individuelle par décaage de glutamate

A gauche : frise temporelle représentant une épine dendritique exprimant eGFP avant (-3 min) et après (2 min, 27 min et 77 min) le décaage de MNI-glutamate (flèche jaune). Echelle : 1 μ m. A droite, graphique des changements de volume au cours du temps. Stimulation à t=0min. Le décaage de glutamate est comparé (cercle) à deux types de stimulations électriques (triangles). L'augmentation de volume se fait en deux phases, une phase transitoire (<5min) d'augmentation de volume de plus de 100% puis une phase durable (100 min) où l'augmentation se stabilise à + 50% du volume initial. D'après Matsuzaki et al., 2004.

Ces effets sur le volume de l'épine pourraient également être dus à l'augmentation de la nucléation de filaments branchés. En effet, Cdc42 active N-WASP qui active le complexe ARP2/3. Or l'augmentation de la taille de l'épine est corrélée à une augmentation de la concentration en ARP2/3 (poster Bosch et al., 2012 FENS Barcelone). Une étude récente montre que la CAMKII interagit avec une protéine du complexe WAVE, Abi1 entraînant leur inhibition (Park et al., 2012). L'entrée de Ca²⁺ et la formation du complexe CaM (Ca²⁺ + calmodulin) dissocient les deux protéines ce qui entraîne leur activation. Il serait donc intéressant de reproduire ces expériences de FRET sur la RhoGTPase Rac1 afin d'étudier le profil d'activation de Rac1 au cours du processus d'augmentation de la taille de l'épine ainsi que de regarder si l'augmentation de la taille de l'épine est dépendante de l'activation du complexe ARP2/3 par le complexe WAVE.

Enfin d'autres voies indépendantes de la CAMKII existent. Le complexe CaM se lie notamment à IQGAP ("IQ motif-containing GTPase-activating protein 1") qui n'est pas une GAP de Rac1 ou Cdc42 mais stabilise leur forme active (Hart et al., 1996 ; Swart-Mataraza et al., 2002 ; Noritake et al., 2004). Une entrée de Ca²⁺ pourrait donc induire le recrutement de IQGAP et augmenter l'activité de ces deux RhoGTPases afin d'induire le grossissement de l'épine.

Nous avons donc vu dans cette partie que des protocoles de LTP induisaient une augmentation de la tête de l'épine ainsi qu'une augmentation de la polymérisation de l'actine. Puis nous avons détaillé les voies de signalisations intracellulaires sous-tendant ces modifications. Cependant des questions subsistent. Comment les RhoGTPases soutiennent l'augmentation de leur activité pendant plus de 1h si l'activation de GEFs par la CAMKII ne se fait que sur une période de 2 min ? Il se pourrait notamment que l'augmentation de la taille de la tête de l'épine entraîne une augmentation des adhésions entre le compartiment pré- et post-synaptique. Or les adhésions cadhérines soutiennent la plasticité structurale de l'épine par la voie α -N-caténine/AF-6/kalirine-7/Rac1/Pak (Xie et al., 2008). Celle-ci pourrait ainsi prendre le relai dans l'activation accrue des RhoGTPases. De plus, l'expression de mutants non adhésifs bloque l'élargissement de la tête de l'épine induit par une forte dépolarisation (Okamura et al., 2004). Il serait donc intéressant de reproduire les expériences de FRET en sur-exprimant des mutants de la N-cadhérine non adhésifs ou en utilisant des siRNA contre l' α -caténine afin d'observer si l'activité des RhoGTPases est stable pendant la phase de changement de volume durable (figure 35). Enfin, une approche de suivi de particules uniques couplée à de la microscopie super-résolue pourrait également apporter des informations quant aux changements locaux de comportement des différentes protéines et quant à la coordination spatiale et temporelle de celles-ci lors de l'induction de la plasticité structurale.

Comme la LTP, la LTD est également considérée comme un corrélat moléculaire des phénomènes d'apprentissage et de mémorisation (Xia and Storm, 2005 ; Collingridge et al., 2010). Au contraire de la LTP, des stimulations qui induisent une LTD entraîne une diminution de la taille et du nombre d'épines ainsi qu'une diminution du ratio F-actine/G-actine (Okamoto et al., 2004 ; Nägerl et al., 2004 ; Zhou et al., 2004). Cette augmentation de la dépolymérisation serait due à l'activation de l'ADF/cofiline par la calcineurine (Zhou et al., 2004 ; Wang et al., 2007). Mais pourrait également être dû à une diminution de la nucléation de filaments d'actine. En effet, il a été observé qu'un shRNA dirigé contre PICK-1, l'inhibiteur de ARP2/3, empêchait la réduction de la taille de l'épine lors d'un protocoles de LTD chimique (Nakamura et al., 2011).

c. Rôle du cytosquelette d'actine dans le maintien de la plasticité synaptique

La question se pose donc de savoir si le remodelage du cytosquelette d'actine est nécessaire au maintien de la potentiation et la dépression à long terme ?

L'inhibition de la polymérisation de l'actine par la cytochalasine ou la latrunculine empêche le maintien de la LTP dans des tranches d'hippocampes mais également *in vivo* (figure 36 ; Kim and Lisman, 1999 ; Krucker et al., 2000 ; Fukazawa et al., 2003). De même, des souris délétées du gène de Rac1 ont une diminution de la LTP et un déficit de mémoire spatiale et de la mémoire de travail (Haditsch et al., 2009). Cependant, des souris délétées du gène de WAVE-1 ont une augmentation de la LTP mais une diminution de la LTD (Soderling et al., 2007). Ces souris présentent également un déficit d'apprentissage et de mémoire spatiale (Soderling et al., 2003). De même des souris délétées du gène d'une autre protéine du complexe WAVE, Abi2 ont un déficit d'apprentissage et de mémoire à long terme (Grove et al., 2004). Ainsi, la polymérisation de l'actine et notamment la nucléation par ARP2/3 soutiennent la plasticité synaptique. Rac1 peut également réguler la dynamique de l'actine en activant Pak1 et Pak3 qui vont activer la LIMK qui inhibe la dépolymérisation par l'ADF/cofiline (figure 34). Or la transfection d'un mutant dominant négatif de Pak1 ou Pak3 ainsi que la délétion de leurs gènes entraînent une diminution de la LTP, des troubles de la mémoire et des troubles comportementaux (Hayashi et al., 2004 ; Boda et al., 2004 ; Meng et al., 2005 ; Asrar et al., 2009). Enfin, des souris mutantes n'exprimant pas LIMK ou n'exprimant pas la cofiline possèdent également des perturbations de la LTP et de la LTD ainsi que des troubles de la mémoire et d'apprentissage (Meng et al., 2002 ; Rust et al., 2010). Ainsi, le cytosquelette d'actine est nécessaire au maintien des processus de LTP et LTD.

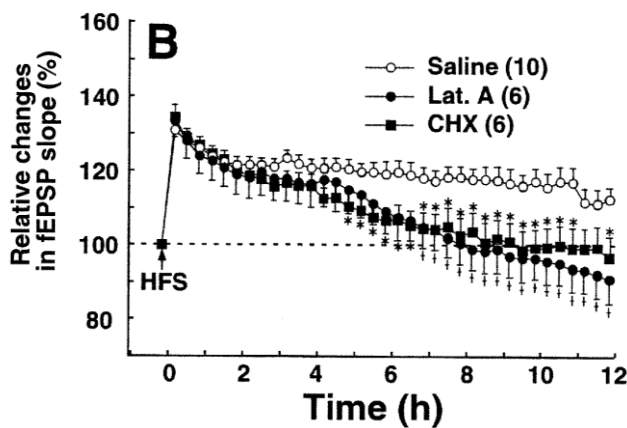


Figure 36 : Inhibition de la polymérisation de l'actine bloque la LTP *in vivo*

La LTP est induite *in vivo* dans le gyrus denté de rat par stimulation haute fréquence (HFS). Inhibition de la LTP par la latrunculine-A qui séquestre les G-actine (Lat.A, rond noir) et par un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide (CHX, carré noir). D'après Fukazawa et al., 2003.

Cependant, par quels mécanismes le cytosquelette d'actine soutient la plasticité synaptique ? Une étude récente a montré que la réorganisation dynamique de GluA est fortement réduite lors de l'inhibition de la polymérisation (Kerr and Blanpied, 2012). Se pourrait-il alors que le cytosquelette d'actine ancre les récepteurs du glutamate à la membrane ? En ce qui concerne les GluN l'ancrage aux filaments d'actine pourrait se faire par l'intermédiaire de l' α -actinine une protéine de pontage de l'actine (Wyszynski et al., 1997). Cependant l' α -actinine est supposée se dissocier des récepteurs lors de l'influx de Ca^{2+} et donc lors de la potentiation synaptique. De plus, le désassemblage rapide du cytosquelette d'actine n'induit pas une diminution du nombre de GluA dans les épines (Kerr and Blanpied, 2012). Il est donc plus probable que la stabilisation de ces récepteurs soit soutenue indirectement par des interactions entre le cytosquelette d'actine et des protéines de la PSD. En effet, la dynamique des filaments d'actine régule le remodelage dynamique et la stabilité de plusieurs protéines d'échafaudage (Kuriu et al., 2006 ; Blanpied et al., 2008 ; Kerr and Blanpied, 2012). De plus, comme il a été dit précédemment, la cortactine et le complexe WAVE, peuvent lier la protéine de la PSD Shank (Hering and Sheng, 2003 ; Proepper et al., 2007). Ainsi l'inhibition rapide de la polymérisation induit une diminution de la concentration de Shank, Homer et GKAP dans les épines (Kerr and Blanpied, 2012). Ceci pourrait entraîner à long terme une déstabilisation de l'ensemble de la PSD et notamment de la PSD-95 essentielle dans l'ancrage des GluAs (Malinow and Malenka, 2002 ; Bats et al., 2007 ; Opazo et al., 2012). Ainsi, ceci expliquerait la diminution du nombre de GluA et de GluN lors d'une inhibition de la polymérisation de l'actine sur le long terme (Allison et al., 1998) et les déficits de LTP observés *in vitro* et *in vivo* par l'inhibition de la polymérisation pendant plusieurs heures (Krucker et al., 2000 ; Fukazawa et al., 2003). Le cytosquelette d'actine est également important dans l'endocytose de vésicules (Taylor et al., 2011 ; Mooren et al., 2012). Or la LTD GluN-dépendante induit l'endocytose de GluA (Collingridge et al., 2010). Ceci pourrait expliquer les perturbations de la LTD observées chez des souris mutantes n'exprimant pas LIMK ou la cofiline (Meng et al., 2002 ; Rust et al., 2010).

Il faut cependant noter que certaines études ont montré qu'il pouvait y avoir une dissociation entre la LTP ou LTD avec les changements morphologiques des épines dendritiques (Kopec et al., 2006 ; Sdrulla and Linden, 2007 ; Wang et al., 2007 ; Cingolani and Goda, 2008). Il est également important de préciser que la dynamique de l'actine est impliquée dans différentes fonctions du compartiment pré-synaptique notamment dans l'organisation des différents réservoirs de vésicules, leurs mobilisations, leurs trafics et l'éveil du bouton pré-synaptique après stimulation (Cingolani and Goda, 2008 ; Sun and Bamji, 2011).

d. Rôles de la N-cadhérine dans la plasticité synaptique

Nous avons vu précédemment que les adhésions cadhérines étaient essentielles dans la formation d'un contact initial entre le compartiment pré- et post-synaptique et le remodelage du cytosquelette d'actine des épines dendritiques lors de la synaptogenèse structurale. Cependant nous n'avons pas détaillé le lien existant entre les adhésions cadhérines et la plasticité synaptique (Arikkath and Reichardt, 2008).

L'induction d'une LTP augmente l'expression de la N-cadherine dans l'épine (Bozdagi et al., 2000 ; Mendez et al., 2010). Une étude montre notamment que l'activation des GluNs déphosphorylerait et recruterait la β -caténine, augmentant la formation d'un complexe N-cadhérine/ β -caténine réduisant l'endocytose de la N-cadhérine dans les épines (Tai et al., 2007). Ceci confirme le rôle de la β -caténine dans l'adressage membranaire des cadhérines dans d'autres systèmes (Chen et al., 1999). Ainsi cette augmentation des niveaux de N-cadhérine dans les épines permettrait la création de nouveaux contacts adhésifs lors de l'élargissement de l'épine. Nous avons vu précédemment, qu'à travers les caténines, la N-cadhérine pouvait induire un remodelage du cytosquelette d'actine (figure 19, 20, 21). Nous avons notamment déjà mentionné une étude montrant que les adhésions cadhérines soutiennent la plasticité structurale de l'épine par la voie α -N-caténine/AF-6/kalirine-7/Rac1/Pak (Xie et al., 2008). Ainsi, l'expression de mutants non adhésifs bloque l'élargissement de la tête de l'épine induit par une forte dépolarisation (Okamura et al., 2004). Ces études suggèrent que la N-cadhérine induirait l'inhibition de l'ADF/cofiline par la voie Pak/LIMK, et éventuellement la nucléation branchée via Rac1. Ces mécanismes soutiendraient l'élargissement de la tête de l'épine lors de la potentiation à long terme et l'engagement d'un nombre plus important de contacts adhésifs. Il n'est donc pas surprenant que la délétion du gène de la N-cadhérine empêche l'induction de la LTP (figure 37 ; Bozdagi et al., 2010). Dans cette même étude les auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de perturbations de la LTD. Ainsi, la N-cadhérine soutient probablement la LTP par le remodelage du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques. Cependant, d'autres études montrent que le complexe N-cadhérine/caténines peut directement interagir avec d'autres protéines essentielles à la plasticité synaptique. La δ -caténine, qui appartient à la famille des caténines p120, possède notamment un domaine de liaison au motif PDZ ce qui

lui permet de lier une multitude de protéines (Arikkath and Reichardt, 2008). Ainsi il a été montré que la δ -caténine stabilisait les GluA (AMPA) contenant la sous unité GluA2 à la surface à travers une "AMPA receptor binding protein" (ABP₂; Silverman et al., 2007) et que le motif liant les domaines PDZ était impliqué dans la densité des épines (Arikkath et al., 2009). La β -caténine régulerait également le nombre de GluA par l'intermédiaire d'un motif de liaison aux domaines PDZ (Okuda et al., 2007). Enfin, la N-cadhérine et les GluA2 pourraient interagir par leur domaine extracellulaire (Saglietti et al., 2007). Ainsi, lors de la LTP, les GluAs pourraient être stabilisés par les interactions avec le complexe N-cadherine/caténines et parallèlement l'insertion de GluAs recruterait le complexe N-cadherine/caténines en post-synaptique. Ceci permettrait notamment à N-cadhérine de soutenir la polymérisation de l'actine lors de l'élargissement de l'actine par les voies de signalisation citées précédemment.

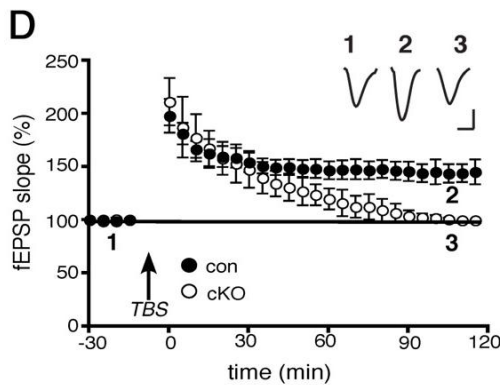


Figure 37 : Deletion de la N-cadhérine bloque la LTP

La LTP est induite par stimulation theta-burst (TBS) en tranche. Les souris cKO pour le gène de la N-cadhérine ne maintiennent pas la LTP contrairement au souris contrôle (con). D'après Bozdagi et al., 2010.

Nous avons donc vu dans cette dernière grande partie que les processus de potentiation et de dépression à long terme induisent un remodelage du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques. Puis nous avons vu que ce remodelage est nécessaire au maintien de ces processus. Enfin, la N-cadhérine soutient l'induction du remodelage du cytosquelette d'actine lors de la LTP et contribue à son maintien.

OBJECTIFS

Nous avons vu dans cette introduction que la diversité des protéines associées à l'actine, la diversité de leurs régulateurs, la coordination spatiale et temporelle de ces protéines ainsi que leurs interactions avec des protéines d'adhérence et les moteurs moléculaires sont déterminantes dans la création de différentes architectures cellulaires et la dynamique du cytosquelette d'actine de celles-ci. Nous avons notamment détaillé comment l'architecture et la dynamique du cytosquelette d'actine des structures post-synaptiques (filopode et épine) dépendent de la protéine d'adhésion N-cadhérine, des caténines, de la myosine, de protéines associées à l'actine (complexe ARP2/3, VASP, ADF/cofiline, etc) et de multiples régulateurs (complexe WAVE, Rac-1, IRSp53, etc). Enfin nous avons vu que la transition morphologique du filopode à l'épine dendritique lors de la synaptogenèse ainsi que la plasticité structurale des épines dendritiques sont sous-tendues par ces protéines.

Cependant, comment les adhésions N-cadhérine et le cytosquelette d'actine sont coordonnées dans le temps et l'espace lors de ces processus synaptiques est encore méconnu. De plus, si la littérature apporte des pistes quant aux mécanismes impliqués dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, il est difficile d'en construire un modèle car la polarité, l'architecture et la dynamique de ce réseau dans les épines dendritiques sont encore indéterminées. Ceci en partie car les techniques de microscopie conventionnelle ne permettent pas d'étudier l'organisation et la dynamique de ces protéines dans les épines dont la taille est proche de la limite de résolution. Ainsi, nous nous sommes fixés deux objectifs principaux lors de ces trois années de thèse.

Tout d'abord, dans une première étude, nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'un mécanisme d'embrayage moléculaire entre les adhésions N-cadhérine et le réseau d'actine/myosine était impliqué lors de la transition morphologique du filopode à l'épine. Puis dans une deuxième étude, nous avons utilisé de la microscopie super-résolutive afin d'étudier l'organisation et la dynamique à l'échelle nanométrique des protéines à l'origine des réseaux d'actine branchés dans les épines (complexe ARP2/3, complexe WAVE, IRSp53, Rac-1).

SUPPLEMENT INFORMATIONS VIDEOS

Vidéo 1: Motilité des épines dendritiques

Culture de neurone d'hippocampe

Actine-GFP

Fréquence d'acquisition: 0.2 Htz

Fréquence de la vidéo: 30Htz

Vidéo 2: élargissement de la tête de l'épine par décaage de glutamate

(Honkura et al., 2008)

Tranche organotypique d'hippocampe

PAGFP-actin

500 plans d'une acquisition de 4000 images

Fréquence d'acquisition: 0.1 Htz

Fréquence de la vidéo: 10Htz

Vidéo 3: sptPALM

Culture de neurone d'hippocampe

Actine-mEos2

500 plans d'une acquisition de 4000 images

Fréquence d'acquisition: 20 Htz

Fréquence de la vidéo: 15Htz

ANNEXE METHODE

ANNEXE METHODE

Le développement de la microscopie à fluorescence plein champ, de la microscopie confocale et de la microscopie multiphoton a révolutionné le domaine de la biologie cellulaire. Cependant ces techniques, limitées par la diffraction de la lumière, ne sont pas capables d'atteindre une résolution en (x,y) de moins de 200 nm et une résolution en (z) de moins de 500 nm. Or l'épine dendritique est une structure d'une taille de 0,5 à 1 μm . De plus, plusieurs structures subcellulaires, comme les filaments d'actine, ont une organisation et une dynamique bien en dessous de cette limite de résolution. Dans les dix dernières années, deux approches ont été développées afin de pouvoir étudier ces structures subcellulaires à une échelle proche de l'échelle moléculaire.

La première approche, que je ne détaillerai pas, est basée sur de l'ingénierie des conditions d'illumination afin de manipuler la "point spread function" (PSF). Elle regroupe la microscopie STED ("stimulated emission depletion microscopy"), GSD ("ground state depletion") et SSIM ("saturated structured illumination"). Pour plus de détails sur ces techniques je renvoie aux publications originelles STED : (Hell and Wichmann, 1994), GSD : (Hell and Kroug, 1995), SSIM : (Gustafsson, 2000), quelques revues (Hell, 2007 ; Toomre and Bowersdorf, 2010 ; Leung and Chou, 2011) et le site de Zeiss (<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/index.html>). Ainsi le STED et la SSIM peuvent théoriquement approcher des résolutions de 20 et 50 nm en (x,y) respectivement.

La deuxième approche se base sur l'utilisation de fluorophore ou couple de fluorophore photoactivable ou photoconvertible (figure M1 ; Lukyanov et al., 2005). Cette approche a été développée par trois équipes simultanément et nommée "Photoactivated localisation microscopy" (PALM) par la première (Betzig et al., 2006), "fluorescence photoactivation localization microscopy" (fPALM) par la deuxième (Hess et al., 2006) et stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) par la troisième (Rust et al., 2006). Alors que le PALM et le fPALM utilisent des protéines fluorescentes, comme la PA-GFP ou la mEos2 (figure M1), le STORM utilise des sondes fluorescentes synthétiques couplées à des anticorps, comme le couple Cy5-Cy3.

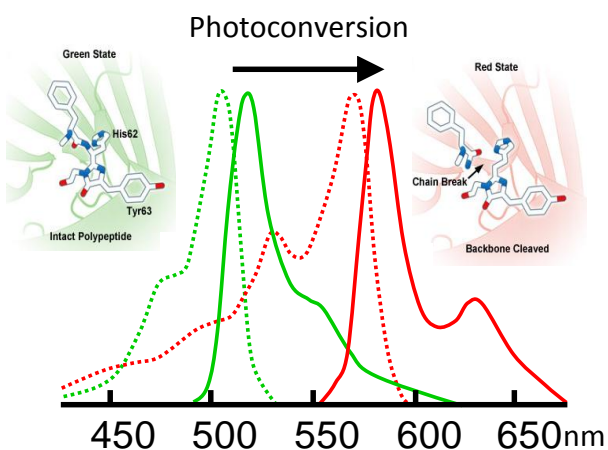


Figure M1 : La photoconversion

Schéma et graphique des spectres d'absorbance/emission des deux états du fluorophore photoconvertible mEos2. Avant la photoconversion la mEos2 se comporte comme une GFP. Un laser à 405 nm induit la photoconversion stochastique de celle-ci qui se comporte désormais comme une RFP.

I. Microscopie super-résolution : PALM

La photoactivation ou photoconversion fait passer des fluorophores individuels d'un état à un autre. On parlera de photoactivation lorsque le fluorophore passe d'un état non fluorescent à un état fluorescent et de photoconversion lorsque le fluorophore passe d'un état fluorescent à un autre état fluorescent. Par exemple, la mEos2, que nous utilisons dans la deuxième étude, est un fluorophore photoconvertible car il passe d'un état vert (type GFP) à un état rouge (type RFP ; figure M1). Puis ces fluorophores sont photoblanchis sous leur deuxième état (à 561 nm pour la mEos2). La photoactivation ou photoconversion en PALM des protéines fluorescentes est induite, pour la majorité d'entre elles, par une faible illumination avec un laser à 405 nm (figure M1). Cette illumination induit des modifications chimiques différentes en fonction des fluorophores dont découleront les modifications spectrales (Lukyanov et al., 2005).

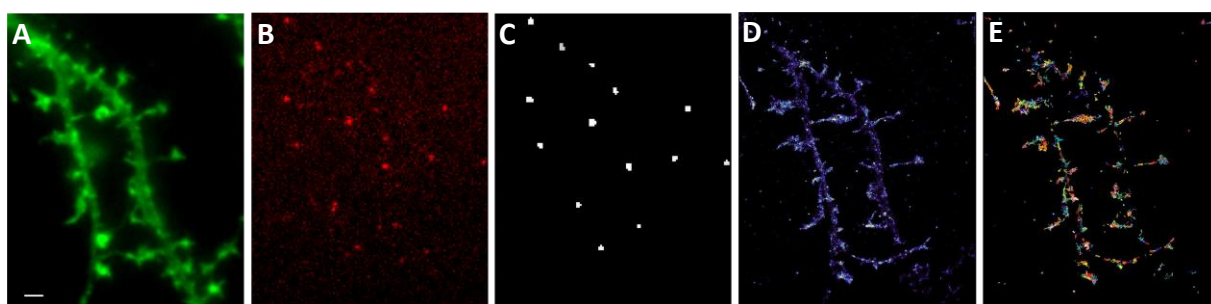


Figure M2 : Le principe du PALM

A) Image d'épifluorescence de la mEos2-actine avant photoconversion (état vert). B) La photoconversion stochastique, induite par un laser à 405 nm, permet la visualisation de molécule individuelle de la mEos2-actine (état rouge). C) Détection et segmentation des molécules individuelles sur 2000 à 4000 plans. D) Les détections sont sommées afin de reconstruire une seule image super-résolue de la localisation de l'actine. E) S'il s'agit d'expérience sur cellules vivantes il est possible de reconstruire les trajectoires des mEos2-actines pour l'ensemble des 2000 à 4000 plans de l'acquisition. Echelle : 2 µm.

Le point le plus important dans cette technique est que la photoactivation et la photoconversion des fluorophores individuels est stochastique. Ceci permet d'activer de manière itérative un petit nombre de fluorophores au sein d'une population dense de fluorophores inactivés (figure M2A et M2B ; vidéo 3). Ainsi, en acquérant plusieurs images (20000 dans notre étude) à des fréquences élevées (20-100 Htz), il est possible de photoconvertir des dizaines de milliers de fluorophores. Puis, la localisation de molécules individuelles peut fournir une précision de pointée de l'ordre de la dizaine de nanomètre bien inférieure à la limite de diffraction d'environ 200 nanomètre (figure M2C et M4; Betzig et al., 2006). Enfin, en additionnant toutes ces détections il est donc possible de reconstruire une image super-résolue (figure M2D et M5). Ainsi le PALM peut atteindre une résolution

théorique de l'ordre de 10 à 20 nm en (x,y). Cette résolution nous sera nécessaire afin d'observer les différentes localisations en super-résolution des protéines régulatrices de l'actine et ainsi comprendre l'architecture du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques. Il est également possible de faire du PALM deux couleurs afin d'observer deux protéines en super-résolution (Shroff et al., 2007). Dans cette étude les auteurs utilisent la Dronpa une protéine photoactivable qui passe d'un état non fluorescent à un état vert (GFP) ainsi qu'une tandemEos (tdEos) une protéine photoconvertible qui passe d'un état vert (GFP) à un état rouge (RFP) pour révéler la localisation en super-résolution de deux protéines associées aux sites d'adhésion (vinculine et α -actinine). Il est important de noter que ces protéines fluorescentes peuvent "photo-clignoter" ("blinking" ; Annibale et al., 2010). Une seule protéine peut donc être imagée plusieurs fois avant de photoblanchir pendant l'acquisition.

II. Microscopie super-résolution : STORM et dSTORM

Comme il a été dit précédemment le STORM se base sur l'utilisation de sondes fluorescentes synthétiques couplées à des anticorps. Initialement le STORM a été développé par l'équipe de Zhuang en utilisant le couple Cy5-Cy3 (Rust et al., 2006). Cy5 est excité à 633 nm (ou 647 ou 657 nm) ce qui le fait passer d'un état fluorescent à un état non fluorescent puis il est reconverti en état fluorescent lorsqu'il est excité à 532 nm. Cette photoactivation est accélérée par la présence à moins de 3 nm de Cy3 (Bates et al., 2005). Ainsi cette photoactivation stochastique peut être répétée des centaines de fois avant que le fluorophore ne photoblanchisse. Cette même équipe a été la première à avoir fait de la super-résolution deux couleurs en utilisant plusieurs couples de fluorophores (Bates et al., 2007). Le couple Cy2-Alexa647 a été utilisé pour imager les microtubules et le couple Cy3-Alexa647 pour imager les vésicules recouvertes de clathrine. Cependant il est possible d'utiliser un seul fluorophore afin de faire du dSTORM (direct STORM). Pour cela, les fluorophores synthétiques doivent passer dans un état métastable non fluorescent, l'état triplet (Fölling et al., 2008). Ce passage à l'état triplet est permis grâce à l'utilisation de fortes puissances lasers, de l'ordre du kiloWatt par cm^2 dans notre étude pour l'AlexaFluor 647. Puis le retour à l'état fluorescent sera stochastique. Enfin un fluorophore cycle entre son état triplet et l'état fluorescent. Comme pour le "blinking" des protéines fluorescentes, les fluorophores synthétiques qui cyclent entre ces deux états peuvent être imagés plusieurs fois avant de photoblanchir. Le dSTORM est également appelé GSDIM ("ground state depletion individual molecule return" ; Fölling et al., 2008). Ainsi comme pour le PALM, le STORM et le dSTORM permettent d'activer de manière itérative un petit nombre de fluorophores au sein d'une population dense de fluorophores inactivés. La résolution théorique sera comme celle du PALM de l'ordre de 10 à 20 nm en (x,y). Il faut cependant préciser qu'afin de passer l'Alexa Fluor 647 dans un état triplet le dSTORM doit être effectué dans une solution pauvre en oxygène (glucose + glucose oxydase) et des thiols aliphatiques. Ce milieu et l'utilisation de sondes fluorescentes synthétiques ne permettent pas de faire du

STORM ou du dSTORM sur des cellules vivantes. Cependant deux études ont réussi à contourner ce problème (Wombacher et al., 2010 ; Jones et al., 2011).

Afin de localiser en super-résolution les protéines régulatrices de l'actine avec une protéine de la densité post synaptique (PSD-95) nous avons associé le PALM et le dSTORM sur des cellules fixées.

III. Le TIRF

Nous avons vu qu'une raison *sine qua non* pour obtenir un signal à l'échelle de la molécule unique était une photoconversion stochastique entre les différents états du fluorophore. Cependant, une illumination de l'ensemble de l'échantillon induit la photoconversion d'un nombre trop important de molécules. Le PALM en deux dimensions (2D) doit donc être couplé à de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne ou "total internal reflection fluorescence" ("TIRF" ; figure M3). Brièvement, l'excitation laser doit illuminer l'échantillon de manière oblique afin d'être totalement réfléchi. Ceci crée une onde évanescente qui pénètre dans les 200 à 300 premiers nanomètres de l'échantillon et va permettre d'exciter les fluorophores dans cet espace (figure M3). Couplé au PALM et au STORM, il sera possible d'observer en super-résolution la localisation et la dynamique (cf sptPALM) de protéines proches de la membrane. Pour plus de détails sur cette technique je renvoie à la publication originelle (Axelrod, 1981), deux revues (Axelrod, 2003 ; Schneckenburger, 2005) et le site de Nikon (<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/tirf/tirfintro.html>). Cependant, les épines dendritiques ne sont pas totalement étalées sur la lamelle de verre. Nous avons donc dévié légèrement l'excitation laser afin d'obtenir une illumination rasante (Giannone et al., 2010). Il est ainsi possible d'imager le volume de l'épine sur une profondeur de quelques microns tout en gardant des conditions de photoactivation en molécules individuelles.

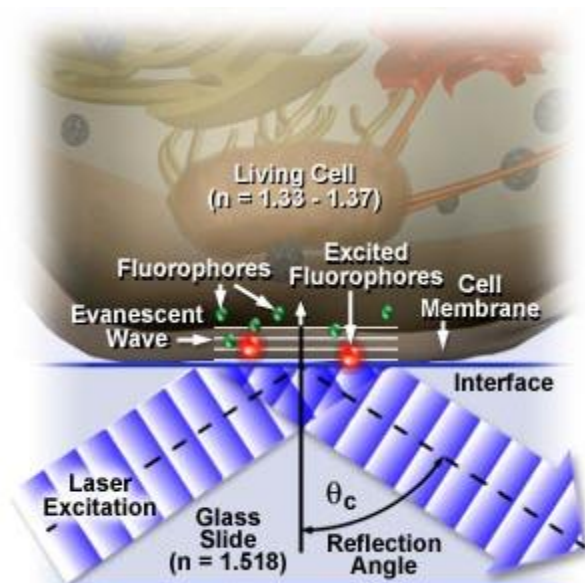


Figure M3 : Illumination en TIRF

Schéma du principe de la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne. L'excitation laser se fait avec un certain angle, ce qui entraîne une réflexion de celui-ci. Néanmoins cela crée une onde évanescente qui pénètre dans les 200 à 300 premiers nanomètres de l'échantillon et excite les fluorophores. Couplé au sptPALM cela permet de suivre la dynamique des protéines à la membrane.

IV. Segmentation, localisation et reconstruction

La localisation des molécules uniques est une étape cruciale dans l'analyse des données générées lors des acquisitions PALM et STORM. C'est en localisant les dizaines de milliers de fluorophores individuels couplés à la protéine d'intérêt qu'il est possible de reconstruire une image super-résolue (figure M2B, M2C et M2D). La première étape consiste donc à déterminer la position de la molécule unique avec une précision de l'ordre de la dizaine de nanomètre. Il s'agit notamment de définir le centre de la "point spread function" (PSF) pour chaque molécule unique. Le modèle mathématique standard utilisé est une fonction gaussienne à deux dimensions (Cheezum et al., 2001 ; Abraham et al., 2009). Cependant d'autres techniques de localisation ont été développées afin d'améliorer les vitesses de calcul. Ainsi l'équipe de Maxime Dahan et celle de Jean-Baptiste Sibarita ont conjointement développé une autre technique de localisation que nous avons notamment utilisée (Izeddin et al., 2012). Brièvement celle-ci se base sur la segmentation en ondelette ("wavelet") et la détermination du centroïde des particules détectées (figure M2B et M4). Ainsi la résolution spatiale (x,y) dépendra de ces algorithmes de segmentation ainsi que du rapport signal sur bruit (Cheezum et al., 2001 ; Izeddin et al., 2012). L'ensemble des molécules localisées seront ensuite sommées sur une image sous-pixélisée afin de générer l'image super-résolue (figure M2D et M5). A l'image du pointillisme inventé par Georges Seurat il y a plus de cent ans.

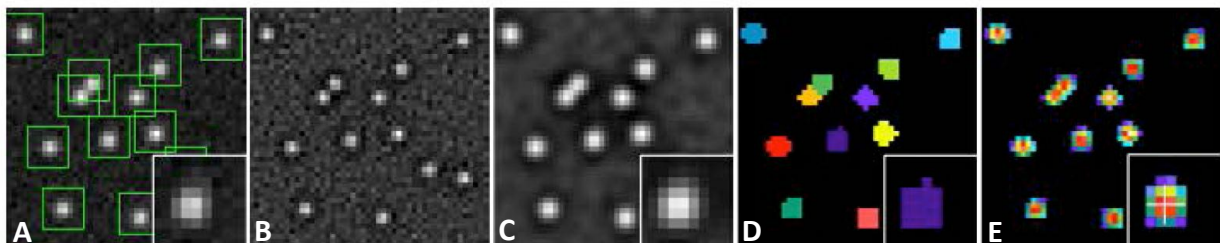


Figure M4 : Détection, segmentation, localisation

A) Image source avec la détection des molécules individuelles (encadré vert). B) 1^{er} plan d'ondelette. C) 2^{ème} plan d'ondelette. D) Image segmentée. E) Localisation du centroïde sur l'image segmentée pour chaque molécule individuelle. D'après Izeddin et al., 2012



Figure M5 : Reconstruction d'une image super-résolue

Cette série d'image démontre comment la PALM ou le SORM peuvent reconstruire une image super-résolue de la tête de Bossy la vache par sommation de plusieurs points. Elle démontre également que la densité des points récoltés lors de l'acquisition est indispensable afin de reconstruire cette image. Echelle : 15 cm. D'après Patterson et al., 2010.

V. Le sptPALM

Le développement de techniques de suivi de particules individuelles a permis d'étudier le comportement de différentes protéines, comme le suivi du moteur moléculaire myosine V (Yildiz et al., 2003) ou encore la diffusion des récepteurs au glutamate (Heine et al., 2008). Ainsi les équipes de Betzig et Lippincott-Schwartz ont couplé le suivi de molécules individuelles à la technique de PALM afin de pouvoir suivre le comportement de dizaines de milliers de trajectoires sur des cellules vivantes (Manley et al., 2008). Si une molécule unique ne se déplace pas de plus d'une certaine distance entre deux images successives (3 pixels soit 480 nm dans notre étude) ces deux points seront reliés. Ainsi d'une image à l'autre plusieurs points seront reliés afin de former une trajectoire (figure M6A). Cette trajectoire prend fin lorsque le fluorophore photoblanchi ou "blink" (vidéo 3). Il est donc possible de représenter l'ensemble des trajectoires également en super-résolution (figure M2E). Afin d'étudier et de comparer différents comportements de trajectoires, il est possible de calculer le déplacement quadratique moyen ou "mean square displacement" (MSD). Le MSD est représenté en calculant la somme des pas au carré (axe y) au cours du temps (axe x) (figure M6B et M6C). Le MSD sera calculé pour un pas de un (trait et point rouge), un pas de deux (trait et point vert), un pas de trois (trait et point bleu) et ainsi de suite (figure M6A et M6B). Trois types de mouvements peuvent ainsi être analysés, des mouvements confinés lorsque la particule unique ne se déplace pas ou très peu, des mouvements browniens lorsque celle-ci diffuse librement et des mouvements dirigés quand la molécule se déplace dans une direction préférentielle (figure M6C). Puis le coefficient de diffusion instantané (D) est calculé en mesurant la pente de la droite passant par les quatre premiers points de la courbe MSD (figure M6C). Enfin, en représentant le logarithme décimal du coefficient de diffusion il est possible de comparer le comportement d'une protéine immobile (β 3-WT; figure M6D) à celui d'une protéine membranaire ou transmembranaire (mEos2-TM; figure M6D; Rossier et al., 2012). Une protéine est considérée comme immobile si sa surface

d'exploration, pendant l'intervalle de temps utilisé pour calculer le coefficient de diffusion instantané, est inférieure à la précision de pointée. Dans nos conditions expérimentales elle est de 55 nm donc toutes les protéines ayant un D inférieur à $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ sont considérées comme immobiles. Nous avons ainsi utilisé la technique de sptPALM afin d'étudier le comportement des protéines régulatrices de l'actine. Comme nous le verrons dans la deuxième étude, cette approche apportera une meilleure compréhension sur la coordination spatiale et temporelle entre ces différentes protéines.

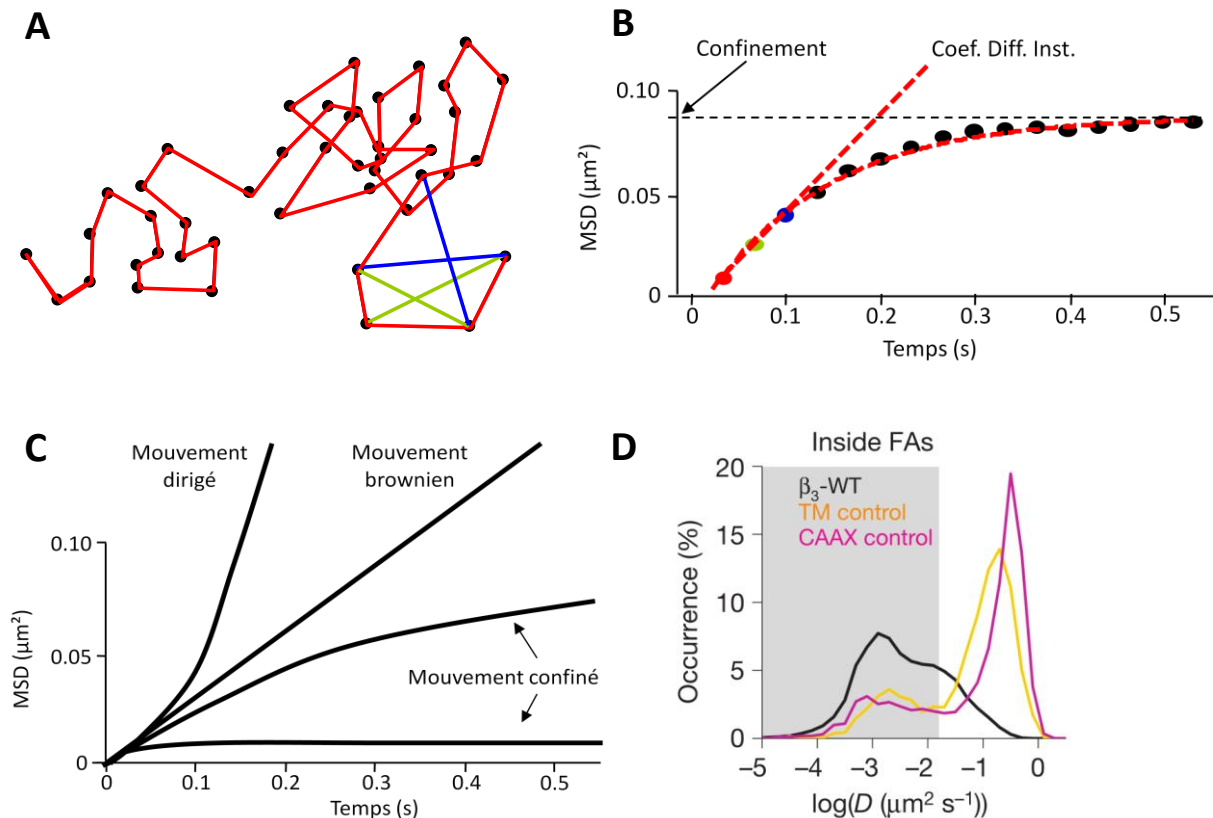


Figure M6 : L'analyse de suivi de particule individuelle

A) Trajectoire fictive de 45 points. Trait rouge : pas de 1 entre les points de la trajectoire ; trait vert : pas de 2 ; trait bleu : pas de 3. B) Calcul du MSD. La somme des pas au carré (axe y) en fonction du temps (axe x). Point rouge : MSD pour un pas de 1 ; point vert : MSD pour un pas de 2 ; point bleu : MSD pour un pas de 3. Le coefficient de diffusion instantané (Coef. Diff. Inst.) est la pente des quatre premiers points de la courbe MSD. C) Différents comportements de la courbe MSD. La trajectoire peut être immobile ou confinée (mouvement immobile), diffusive (mouvement brownien), dirigée (mouvement dirigé). D) Histogramme du logarithme décimal des coefficients de diffusion instantané pour une protéine aux mouvements (β_3 -intégrine-mEOS2 sauvage dans des sites d'adhésions), une protéine transmembranaire et membranaire diffusant librement dans les sites d'adhésions (TM-mEOS2 et CAAX-mEOS2). D'après Rossier et al., 2012.

VI. 3D et résolution en (z)

L'avenir de ces différentes techniques réside probablement dans le développement de la reconstruction d'images super-résolues en 3D. Or, l'équipe de Zhuang a considérablement apporté dans ce domaine. Dès 2008, cette équipe a été capable de réaliser du STORM 3D avec une résolution de 20 à 30 nm en (x,y) et de 50 à 70 nm en (z) en une puis deux couleurs (Huang et al., 2008b ; Huang et al., 2008a). Puis cette équipe a par la suite développé le STORM 3D deux couleurs sur des cellules vivantes (Jones et al., 2011). Enfin ils ont amélioré la résolution du STORM 3D en une couleur en utilisant deux objectifs et en générant de l'astigmatisme avec une lentille cylindrique (Xu et al., 2012). Les auteurs ont donc pu observer que deux réseaux d'actine se superposaient : le lamellum et le lamellipode grâce à une résolution de moins de 10 nm en (x,y) et moins de 20 nm en (z). Le STORM 3D serait un outil intéressant afin de visualiser les deux "pools" d'actine dans les épines dendritiques et comprendre comment ils sont architecturalement organisés et interconnectés. Cette technique permettrait également de visualiser l'organisation "en strates" de plusieurs protéines de la densité post-synaptique (Gold, 2012).

RESULTATS

RESULTATS

I. Etude n°1: "A mechanical coupling between N-cadherin adhesion and F-actin flow stabilizes dendritic spines".

Auteurs: Anaël Chazeau, Mikaël Garcia, Katalin Czondör, Amélie Argento, David Perrais, Christel Poujol, Grégory Giannone and Olivier Thoumine

a. Contexte et problématique

Les épines dendritiques sont de petites protrusions (0.5-1 μ m) formant la structure post-synaptique des synapses excitatrices des neurones (Bourne and Harris, 2008). Les précurseurs de ces structures sont les filopodes dendritiques (Ziv and Smith, 1996). En effet, ces derniers s'élargissent au contact de l'axone lors de la synaptogenèse (Yuste and Bonhoeffer, 2004). Plusieurs études ont notamment montré que la dynamique des filopodes, des épines et la transition entre ces deux structures sont sous-tendues par le cytosquelette d'actine et par un ensemble de protéines associées à l'actine (Matus, 2005 ; Cingolani and Goda, 2008 ; Hotulainen and Hoogenraad, 2010). De plus, des études récentes suggèrent que dans ces petites protrusions les filaments d'actine flux lentement de manière rétrograde de l'extrémité à la base (Honkura et al., 2008 ; Tatavarty et al., 2009 ; Frost et al., 2010 ; Tatavarty et al., 2012). Par analogie avec d'autres structures motiles il est possible que le flux rétrograde d'actine dépende en partie des forces exercées par un moteur moléculaire comme la myosine II (Medeiros et al., 2006 ; Wilson et al., 2010 ; Yang et al., 2012). En effet, l'inhibition pharmacologique de l'activité de la myosine II, altère la dynamique des épines dendritiques et diminue le flux rétrograde d'actine dans les filopodes (Ryu et al., 2006 ; Tatavarty et al., 2012). De plus, la myosine II aurait également un rôle dans la synaptogenèse car l'inhibition pharmacologique de son activité ou l'expression de siRNA induit des épines plus filopodiales (Zhang et al., 2005 ; Ryu et al., 2006 ; Hodges et al., 2011).

En parallèle, d'autres études ont montré que les adhésions homophiliques N-cadhérine sont essentielles à la dynamique des épines dendritiques ainsi qu'à la transition filopode/épine (Arikath and Reichardt, 2008). En effet, la perturbation des adhésions cadhérine-cadhérine avec un peptide augmente la motilité des épines (Mysore et al., 2007) et l'expression d'un mutant délété de sa partie extracellulaire induit la formation d'épines dendritiques plus filopodiales (Togashi et al., 2002 ; Mendez et al., 2010). Lorsque l'on s'intéresse aux partenaires de la N-cadhérine, des phénotypes similaires sont constatés. Ainsi des neurones n'exprimant plus de β -caténine ont une diminution du nombre d'épines dendritiques de type "mushroom" et parallèlement une augmentation du nombre d'épines "thin" (Okuda et al., 2007). Des cultures de neurones provenant de souris délétées du gène de l' α -N-caténine possèdent également des épines plus filopodiales (Togashi et al., 2002 ;

Abe et al., 2004). De plus ces épines ont une motilité accrue (Abe et al., 2004). Enfin, des neurones provenant de souris délétées du gène de la caténine p120, ont une diminution de la taille de la tête des épines (Elia et al., 2006).

L'ensemble de ces données suggère que les adhésions N-cadhérine ainsi que la dynamique du cytosquelette d'actine/myosine ont un rôle dans la synaptogenèse structurale, c'est-à-dire le remodelage du cytosquelette lors de la transition morphologique filopode/épine. De plus, notre équipe a précédemment démontré qu'un embrayage moléculaire existait entre les adhésions N-cadhérine et le flux rétrograde d'actine dans le cône de croissance (Bard et al., 2008). Nous avons ainsi émis l'hypothèse qu'un mécanisme d'embrayage moléculaire entre les adhésions N-cadhérine et le réseau d'actine/myosine, était impliqué lors de la transition morphologique du filopode à l'épine.

b. Résumé des résultats

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons étudié la dynamique du cytosquelette d'actine dans les filopodes et les épines dendritiques de neurones d'hippocampes. Puis nous avons utilisé plusieurs approches afin d'induire ou de perturber les adhésions N-cadhérine. Nous avons notamment utilisé une technique de piégeage optique sur des microsphères recouvertes de N-cadhérines, des substrats micro-imprimés ainsi que des mutants de la N-cadhérine dans le domaine extracellulaire. La dynamique de l'actine ainsi que l'activité contractile de la myosine IIB ont quant à elles été modifiées pharmacologiquement.

Dans un premier temps nous avons déterminé, par immunofluorescence, la localisation de l'actine-GFP, de la MLC-GFP ("myosin light-chain") et de la N-cadhérine-GFP. Ainsi, l'actine se distribue principalement au centre de la tête de l'épine, la myosine s'organise en petits amas dans la tête de l'épine mais également dans le cou de l'épine et la N-cadhérine s'organise en petits amas localisés dans la tête de l'épine. Ces résultats confirment que la localisation des différentes protéines est cohérente avec un possible lien physique entre elles. Nous avons ensuite quantifié la dynamique de l'actine-GFP en épifluorescence afin de déterminer si la dynamique des structures post-synaptiques était dépendante du couplage entre le cytosquelette d'actine et l'adhésion trans-synaptique N-cadhérine. Nous avons montré que les filopodes dendritiques sont 4 à 5 fois plus motiles que les épines dendritiques. De plus, lorsque les filopodes sont en contact avec un axone leur motilité est diminuée de presque moitié. Nous avons ensuite perturbé le lien entre les adhésions N-cadhérine endogènes et les filaments d'actine. Pour cela nous avons surexprimé des mutants de la N-cadhérine qui vont agir comme des séquestrateurs des caténines. Ainsi une mutation ponctuelle dans le domaine EC1 (N-cadhW2A) ou la délétion du domaine extracellulaire (N-cadhΔE) entraînent toutes deux une augmentation de la motilité des épines. Ces résultats suggèrent que la dynamique de l'actine dans les structures post-synaptiques dépend de l'engagement d'un contact pré- et post-synaptique et notamment de l'intégrité du couplage entre l'actine et les adhésions N-cadhérine. La dynamique des filaments d'actine dépend également des forces générées par la myosine IIB. Ainsi, afin

d'approfondir le rôle des adhésions N-cadhérine dans la régulation de la dynamique du cytosquelette d'actine/myosine, nous avons visualisé la dynamique de l'actine-GFP lors d'un traitement pharmacologique activant la contraction actine/myosine (calyculine-A). Nous avons observé dans un premier temps une rétraction de l'actine de la tête à la base des épines dendritiques. Puis nous avons montré que ce flux rétrograde d'actine était inhibé par l'expression des mutants N-cadhérine (N-cadhW2A et N-cadhΔE) suggérant que dans ces conditions le réseau d'actine serait dissocié des adhésions trans-synaptique et potentiellement déplacé sur des distances plus courtes. De plus, le réseau d'actine étant désorganisé, la contraction induite par l'activation de la myosine n'engendrerait plus un mouvement d'ensemble coordonné de la tête à la base de l'épine. L'ensemble de ces résultats suggère que le réseau d'actine/myosine est connecté aux adhésions trans-synaptiques N-cadhérine.

Nous avons ensuite exploré le rôle des adhésions N-cadhérine dans l'induction de la synaptogenèse structurale et la stabilisation des épines dendritiques. Nous avons ainsi cultivé des neurones sur des substrats micro-imprimés recouvert de N-cadhérine. Les neurones surexprimant de la N-cadhérine non mutée sont ainsi capables de former des structures de type épine dendritique avec notamment un coup émergeant du dendrite et une tête d'épine enrichie en actine-GFP et en N-cadhWT-RFP. Tandis que la surexpression des mutants N-cadhW2A et N-cadhΔE diminue l'enrichissement en actine-GFP. De plus, la surexpression des mutants N-cadhΔE empêche la formation de structures de type épine. Afin de confirmer ce rôle de la N-cadhérine dans la synaptogenèse structurale nous avons utilisé une approche de piégeage optique de microsphère recouverte de N-cadhérine. Lorsque la microsphère rentre en contact avec un filopode dendritique celle-ci va, dans 50% des cas, s'échapper du piège optique et se déplacer de la tête à la base du filopode. Ceci s'explique par un engagement de l'adhésion N-cadhérine qui se couple au flux rétrograde d'actine du filopode. Ce couplage induit de surcroît une stabilisation de la dynamique du filopode, un enrichissement en actine et la formation d'une structure de type épine dendritique. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'engagement des adhésions N-cadhérine lors du contact filopode-axone stabilise, par un mécanisme d'embrayage moléculaire, le cytosquelette d'actine et induit la formation d'une épine dendritique.

Title: A mechanical coupling between N-cadherin adhesion and F-actin flow stabilizes dendritic spines

Authors: Anaël Chazeau^{1,2}, Mikael Garcia^{1,2,3}, Katalin Czöndör^{1,2}, Amélie Argento³, David Perrais^{1,2}, Florian Levet^{1,2,4}, Gregory Giannone^{1,2}, Olivier Thoumine^{1,2}

Affiliations :

1. Univ. Bordeaux, IINS, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France
2. CNRS, IINS, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France
3. CYTOO SA, CEA, Grenoble, F-38054, France
4. CNRS, Bordeaux Imaging Center, UMS 3420, F-33000 Bordeaux, France

Running title: Molecular clutch in dendritic spines

Abstract

The morphology of neuronal dendritic spines is regulated by both the actin/myosin cytoskeleton and N-cadherin adhesions, but how these components mechanically interact remains unclear. We hypothesized that engagement of a molecular clutch between trans-synaptic N-cadherin adhesions and the actin flow could underlay the stabilization of dendritic filopodia into mature spines. Dendritic spine motility, as measured by live imaging of actin-GFP in primary hippocampal neurons, was increased by expression of non-adhesive N-cadherin constructs. Furthermore, the rearward motion of F-actin structures upon pharmacological stimulation of myosin, and that of N-cadherin coated beads manipulated by optical tweezers, revealed a mechanical coupling between N-cadherin adhesions at the spine tip and the contractile actin/myosin network. Finally, stimulation of dendritic filopodia by N-cadherin coated beads or micropatterns induced the formation of stable spine-like structures enriched in F-actin. These data show that the connection between N-cadherin adhesions and the actin/myosin network stabilizes dendritic spines, a mechanism which may have important implications in synaptic development and plasticity.

Introduction

Dendritic spines are micron-scale structures protruding out of the neurite shaft, and forming the post-synaptic components of excitatory synapses (Yuste and Bonhoeffer, 2004). They originate from motile dendritic filopodia, which enlarge after contacting axons (Korobova and Svitkina, 2010; Roelandse et al., 2003; Ziv and Smith, 1996). Dendritic spines grow upon synaptic potentiation and shrink upon synaptic depression (Cingolani and Goda, 2008; Colicos et al., 2001; Matsuzaki et al., 2004; Matus, 2000; Zhou et al., 2004). These morphological rearrangements rely on a dense network of branched actin filaments, whose dynamics is controlled by several actin-binding proteins (ABP) including capping, nucleating and severing proteins but also small RhoGTPases (Ackermann and Matus, 2003; Korobova and Svitkina, 2010; Okamoto et al., 2004; Schubert et al., 2006; Star et al., 2002; Tashiro and Yuste, 2004). As a result of this turnover, F-actin slowly flows rearward, from the tip to the neck of the spines (Frost et al., 2010; Honkura et al., 2008; Tataavarty et al., 2009). Spine shape is also influenced by myosins, for example knock-down or pharmacological inhibition of myosin II induces filopodial-like morphologies (Hodges et al., 2011; Rubio et al., 2011; Ryu et al., 2006; Zhang et al., 2005). One interesting possibility would be that myosin II contributes to the retrograde flow in dendritic spines by pulling and/or severing F-actin (Tataavarty et al., 2012; Wilson et al., 2010), as demonstrated in growth cones (Chan and Odde, 2008; Lin et al., 1996; Suter et al., 1998).

In parallel, dendritic spine shape is also regulated by the cadherin/catenin complex (Arikkath and Reichardt, 2008; Takeichi and Abe, 2005). Perturbing N-cadherin adhesions in hippocampal neurons enhances spine motility and reduces spine length (Mysore et al., 2007), while down-regulating N-cadherin or β -catenin levels induces thin filopodial-like spines (Mendez et al., 2010; Okuda et al., 2007; Togashi et al., 2002). Similarly, knockdown of p120-catenin reduces spine and synapse densities (Elia et al., 2006). Furthermore, in the absence of α N-catenin, neurons have abnormally motile spine and actively protruding filopodia, whereas neurons over-expressing α N-catenin show reduced spine turnover and higher spine density (Abe et al., 2004). The cadherin/catenin complex is strongly affected by synaptic activation, which inhibits N-cadherin endocytosis, causes synaptic N-cadherin to

dimerize and become protease resistant, and triggers a redistribution of β -catenin from neurite shaft to spine head (Bozdagi et al., 2000; Murase et al., 2002; Schuman and Murase, 2003; Tai et al., 2007; Tanaka et al., 2000). Finally, spine head expansion induced by synaptic activation is blocked by expression of non-adhesive cadherin mutants (Okamura et al., 2004), pointing to a role for the connection between N-cadherin and the cytoskeleton in morphological spine plasticity.

Despite these advances, how the actin/myosin cytoskeleton and cadherin adhesions mechanically interact to produce spine morphing remains unclear. We previously demonstrated that a molecular clutch between N-cadherin adhesions and the actin flow drives growth cone locomotion (Bard et al., 2008), and suggested that a similar mechanism may control dendritic spine morphology (Giannone et al., 2009). To evaluate this model, we examined actin dynamics in the dendritic spines and filopodia of primary hippocampal neurons, upon challenging N-cadherin adhesions with N-cadherin coated beads or micropatterns, expressing dominant negative N-cadherin mutants, and/or pharmacologically perturbing myosin contractility. We show that engagement of a mechanical connection between trans-synaptic N-cadherin adhesions and the actin/myosin network stabilizes dendritic spines.

Results and Discussion

Co-distribution of N-cadherin, actin and myosin in dendritic spines

To determine if the spatial distribution of N-cadherin, actin, and myosin within dendritic spines could be consistent with a physical connection between them, the relative localization of these proteins in primary hippocampal neurons was examined by confocal microscopy. Cells were co-transfected with RFP and actin-GFP, myosin-light-chain (MLC)-GFP, or N-cadherin-GFP constructs and processed at DIV 18-21 for dual immunofluorescent labeling of GFP and RFP. The volume marker RFP provided the outline of the spine, while the GFP signals indicated sub-spine localizations of the three proteins. Stainings with anti-actin or phalloidin revealed that actin-GFP represents only 15% of the total actin pool, and that actin-GFP can assemble into filaments (Fig. S1). Actin most often distributed as a single mass at the center of the spine (Fig. 1a,e), in agreement with high resolution EM and PALM images (Frost et al., 2010; Korobova and Svitkina, 2010). MLC usually formed several clusters distributed throughout the spine volume, some preferentially localizing at the neck of spines, but others forming at more distal locations (Fig. 1b,e; Fig. S2C). This localization is in agreement with previous reports (Korobova and Svitkina, 2010; Tatavarty et al., 2012). N-cadherin staining also revealed discrete puncta localized at the edge of dendritic spines (Fig. 1c,e), consistent with immunogold electron microscopy data and reflecting their function in trans-synaptic adhesion (Korobova and Svitkina, 2010; Uchida et al., 1996). As a control for these quantifications, we examined the pre-synaptic marker synapsin, which distributed mostly at the periphery of spines, as expected (Fig. 1d,e). The co-distribution of actin, myosin and N-cadherin within spines thus supports a potential interaction between transynaptic N-cadherin adhesions and the actin/myosin network.

A molecular linkage between N-cadherin and actin restrains dendritic spine motility

To determine if dendritic spine dynamics relied on the coupling between F-actin and N-cadherin adhesions, we imaged neurons expressing actin-GFP by time lapse epifluorescence microscopy. A motility index characterizing actin-dependent spine morphing was quantified as the normalized variance of the intensity distribution obtained from two by two image subtractions (Ibarretxe et al., 2007) (Fig. S3). The average motility index of dendritic spines in DIV 21 neurons was 0.22 (Fig. 2a,b). Addition of the actin-capping drug cytochalasin D significantly decreased the motility index to a steady state value of 0.17, demonstrating that the observed changes in spine shape were driven by actin dynamics (Fig. S3). Fixation of cells with PFA resulted in a significantly lower motility index of 0.15, a residual value due to image noise at such small length scales (Fig. S3). Dendritic filopodia from DIV 10 neurons, which represent *bona fide* spine precursors (Korobova and Svitkina, 2010), exhibited a 4-fold higher motility index (0.8) than spines (Fig. 2a,b). One explanation for this difference may come from the fact that only 55% of dendritic filopodia at DIV 10 were in contact with a pre-synaptic element, for 85% of dendritic spines in older neurons (Fig. S2). In fact, dendritic filopodia which were contacting axons from co-cultured RFP-transfected cells were significantly less motile than free filopodia (Fig. 2a,b), showing that trans-synaptic axon/dendrite interactions reduce actin-dependent motility. In addition, dendritic filopodia in contact with axons often showed local actin accumulation at their tips, similar to what was observed in mature spines but not in free filopodia (Fig. 2a), suggesting that actin recruitment at contact sites is linked to the reduction in motility.

To perturb the molecular linkage between N-cadherin adhesions and F-actin, neurons were co-transfected with actin-GFP and N-cadherin mutants unable of homophilic adhesion, thereby acting as competitors of the binding between endogenous N-cadherin and F-actin by sequestering catenin partners (Bard et al., 2008; Okamura et al., 2004). Specifically, we used an RFP-tagged N-cadherin construct lacking the full extracellular domain (Ncad Δ E-RFP) (Riehl et al., 1996), and an N-cadherin construct with a crucial point mutation in the EC1 adhesive domain (NcadW2A-RFP) (Okamura et al., 2004). Wild type N-cadherin (NcadWT-RFP) was used as a positive control. Dendritic spines from cells transfected with Ncad Δ E and NcadW2A displayed significantly higher motility indexes than cells transfected with NcadWT-RFP

(NcadWT: 0.22; NcadW2A: 0.32; Ncad Δ E: 0.46), indicating that an intact connection between N-cadherin and actin is required to stabilize dendritic spines (Fig. 2c,d). In our hands, neurons expressing Ncad mutants did not really exhibit filopodial like phenotypes, as reported earlier (Mendez et al., 2010; Okamura et al., 2004), but showed a lower number of spines than neurons expressing NcadWT. NcadW2A had milder effects on motility, possibly because this mutant may dimerize with endogenous N-cadherin through its ectodomain (Trojanovsky et al., 2003), or form residual homophilic trans-interactions with pre-synaptic N-cadherin (Perret et al., 2004).

Myosin-driven F-actin retraction is altered by N-cadherin mutants

The localization of myosin throughout dendritic spines and the filopodial-like phenotype induced by down-regulation of myosin II function (Rubio et al., 2011; Ryu et al., 2006; Zhang et al., 2005) suggested that myosin might exert tension on the actin network, potentially resisted by transynaptic N-cadherin adhesions. To further examine the role of N-cadherin adhesion in regulating actomyosin dynamics in dendritic spines, we treated neurons with calyculin A, a phosphatase inhibitor which enhances myosin contraction and F-actin flow in keratocytes (Valloton et al., 2004), while monitoring actin-GFP redistribution. Calyculin A induced a significant retraction of GFP-actin spots from the tip to the base of the spine (Fig. 3a,b), suggesting that myosin II was pulling rearward on actin filaments. As a control, addition of the vehicle (DMSO) did not produce significant actin retraction (Fig. 3a,b). The displacement of the actin spots with calyculin A was roughly linear over time, allowing calculation of a retraction velocity, in the order of 0.05 μ m/min (Fig. 3b). This value was about 10 times lower than the typical retrograde actin flow (Frost et al., 2010; Honkura et al., 2008; Tataavarty et al., 2009), suggesting that a significant fraction of the actin flow is due to actin treadmilling alone, independently of myosin activity. To examine if the link between N-cadherin and actin altered this process, neurons co-transfected with actin-GFP and Ncad mutants were treated with calyculin A (Fig. 3c). The induced displacement of F-actin spots was significantly lower in cells co-transfected with Ncad Δ E or NcadW2A than in cells transfected with NcadWT (Fig. 3d). One explanation for these findings is that upon expression of Ncad mutants, the actin network becomes loosely connected to endogenous

transynaptic adhesions, thus susceptible to be dragged over shorter distances by myosin, and potentially displaying unregulated dynamics responsible for the higher motility phenotype. These observations support the model that, under normal conditions, the actin-network is tightly bound to N-cadherin adhesions at the tip of spines.

Although further work will be required to identify the molecular mechanism, such connection may imply several cytosolic partners, including catenins. Whereas β -catenin can directly bind the intracellular domain of cadherins, α -catenin seems to alternate between being bound to β -catenin and to actin, and is implicated in the regulation of actin polymerization (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005). Given the strong bidirectional effects of α -catenin expression on spine morphology (Abe et al., 2004; Takeichi and Abe, 2005), α -catenin is likely to play a major role in the dynamic mechanical coupling between N-cadherin and actin (Maiden and Hardin, 2011). Binding of α -catenin to actin could also be mediated by vinculin, EPLIN, α -actinin (Knudsen et al., 1995), or formin (Kobielak et al., 2004). Interestingly, vinculin and EPLIN were recently implicated in E-cadherin-mediated mechanotransduction at epithelial junctions (le Duc et al., 2010; Taguchi et al., 2011).

N-cadherin-coated micropatterns induce morphological maturation of dendritic filopodia

To examine whether exogenous N-cadherin adhesions could stabilize dendritic spines by locally organizing the actin network, neurons were cultured on micro-patterned substrates comprising thousands of spatially defined micron-scale dots coated with recombinant N-cadherin (Ncad-Fc). The growth of neurites was guided by the topology of the patterns (Fig. S4), reflecting a specific recognition between immobilized Ncad-Fc and endogenous N-cadherin at the neuronal membrane. In contrast, neurons grown on control Fc-coated micropatterns did not develop well and exhibited random arborizations (Fig. S4). On Ncad-Fc coated micropatterns, neurons often formed structures resembling dendritic spines, with a neck originating from dendritic shafts and a head making specific contacts with neighbouring Ncad-Fc coated dots, eventually allowing branching between dendrites (Fig. 4a).

To examine the role of N-cadherin/actin coupling in these processes, neurons cultured on Ncad-Fc micropatterns were co-transfected with actin-GFP and Ncad-RFP mutants. The GFP and RFP signals were quantified at dendritic filopodia in contact with dots. NcadWT-RFP displayed significant accumulation at the micropatterns, reflecting specific adhesion to Ncad-Fc. In contrast, neurons transfected with NcadW2A-RFP and Ncad Δ E-RFP showed little accumulation at the dots, demonstrating that the mutants were defective in making homophilic interactions (Fig. 4b,c). Similarly, actin-GFP enrichment at Ncad-Fc micropatterns was high for NcadWT-RFP and lower for NcadW2A-RFP and Ncad Δ E-RFP, indicating that these mutants prevented the connection between actin and N-cadherin adhesions at the tips of filopodia. In particular, neurons expressing Ncad Δ E did not form spine-like structures at micropatterns as observed in the NcadWT condition (Fig. 4a,b). Interestingly, there was a stronger correlation between Ncad-RFP and actin-GFP enrichment measured at the same micropatterns, compared to the one between Ncad Δ E-RFP and actin-GFP enrichments (Fig. 4d). These data thus suggest that structural maturation of dendritic filopodia into dendritic spines involves an integral connection between N-cadherin adhesions and the actin network.

N-cadherin-coated microspheres stabilize dendritic filopodia into spine-like structures

To examine the dynamic structural changes in response to local trigger of N-cadherin adhesions, we placed Ncad-Fc coated microspheres at the tip of dendritic filopodia of 10 DIV neurons using optical tweezers. We chose dendritic filopodia that were not engaged in adhesive interactions with axons, thus accessible to external manipulation. We then monitored the bead motion in bright field, and the distribution of actin-GFP in epifluorescence for 15 min, while the trap was continuously ON. In 50% of the cases, beads escaped the optical trap and moved rearward at a velocity of $0.4 \pm 0.1 \mu\text{m}/\text{min}$ ($n = 7$ beads), before stopping at the base of the filopodium (Fig. 5a,b). This velocity was close to the speed of the rearward actin flow in dendritic spines measured by local photo-activation or single molecule tracking (Frost et al., 2010; Honkura et al., 2008; Tatavarty et al., 2009), and may thus represent transmembrane coupling between engaged N-cadherin receptors at the bead contact and the actin flow, as observed in growth cones (Bard et al., 2008; Giannone et al.,

2009; Suter and Forscher, 1998). In the same time, actin-GFP progressively accumulated at bead contacts, dendritic filopodia often adopting mushroom shapes resembling spines (Fig. 5c,e), which was not the case for control dendritic filopodia not in contact with beads (Fig. 5d,e). This phenomenon was reminiscent of the actin accumulation observed in growth cones upon restraining Ncad-Fc beads with a microneedle (Bard et al., 2008), and may be associated to the recruitment of the Arp2/3 complex at cadherin adhesions (Korobova and Svitkina, 2008; Kovacs et al., 2002). In parallel, the motility index of filopodia decreased over time (Fig. 5f), reaching values between those measured in mature dendritic spines and in dendritic filopodia contacting axons (Fig. 2a,b). Thus, N-cadherin adhesions physically couple to the actin network in dendritic filopodia and this connection promotes both actin reorganization and filopodium stabilization.

This process may involve small GTPases such as Rac-1, which regulates the connection of N-cadherin to the actin flow in myogenic cells (Lambert et al., 2002), and/or RhoA whose activity regulates N-cadherin function under the control of δ -catenin/p120 (Arikkath et al., 2009; Elia et al., 2006). Reverse signaling between actin and N-cadherin adhesion is also possible through afadin, a Rap-regulated, actin-binding protein that promotes cadherin complex assembly (Beaudoin et al., 2012). Interestingly, afadin was also shown to be essential to mediate spine growth through an intracellular pathway involving α -catenin, afadin, kalirin-7 and Rac1 (Pokutta et al., 2002; Xie et al., 2008). The filopodium/spine transition may also be favored by synaptic activity, which regulates the affinity of β -catenin for cadherin by phosphorylation through the Cdk5 kinase (Schuman and Murase, 2003).

Clutch engagement explains the spine morphological plasticity

To interpret these data, we favor the molecular clutch model initially proposed to describe growth cone motion (Mitchison and Kirschner, 1988; Suter and Forscher, 1998). During transient axon/dendrite contacts, the clutch between N-cadherin adhesions and the actin flow would be in a slip mode, associated with fast actin rearward motion and high filopodium motility (Fig. 6a). In that situation, protrusion and retraction would be dictated by a balance between the rate of actin cytoskeleton assembly at the tip and retrograde flow

(Mallavarapu and Mitchison, 1999). In contrast, engagement of trans-synaptic N-cadherin adhesions to actin would be associated with a reduction of rearward flow, as observed in PALM experiments (Tatavarty et al., 2012; Tatavarty et al., 2009), and lead to spine stabilization. Such strong coupling would cause actin polymerization forces to push against the plasma membrane, resulting in filopodia enlargement (Fig. 6b). This concept thus explains the relationship between spine stability and changes in spine size documented previously (Mendez et al., 2010; Okamura et al., 2004). Interestingly, the cessation of F-actin flow observed after synaptic activation (Honkura et al., 2008), may also reflect clutch engagement (Lin and Forscher, 1995). The continuous polymerization of actin filaments against the plasma membrane on each side of the post-synaptic density where cadherins are located (Uchida et al., 1996) may enlarge spines and increase F-actin content, in an N-cadherin dependent manner, partly explaining the morphological plasticity observed upon synaptic potentiation (Dillon and Goda, 2005; Okamoto et al., 2004; Okamura et al., 2004; Star et al., 2002).

Materials and Methods

A complete description of the experimental procedures is available as supplemental information. Briefly, dissociated E18 rat hippocampal neurons were cultured on polylysine-coated glass coverslips on top of a feeder layer of astrocytes (Goslin et al., 1991). In some experiments, neurons were plated on micropatterned substrates (CYTOO) coated with purified N-cadherin-Fc via secondary anti-Fc antibodies. Neurons were transfected using electroporation or lipofection with actin-GFP and various N-cadherin-RFP constructs, or with RFP and actin-GFP, MLC-GFP, or N-cadherin-GFP. Experiments on dendritic filopodia were performed at DIV 8-10, and those on dendritic spines at DIV 17-21. Immunostainings GFP and RFP-tagged proteins were visualized by confocal microscopy and analyzed with the Metamorph® software, as described (Mondin et al., 2011). The motility of dendritic filopodia spines was monitored by live imaging of actin-GFP and quantified by semi-automated image analysis. Optical tweezers experiments using 1 μm microspheres coated with purified N-cadherin-Fc were performed as described (Bard et al., 2008).

Acknowledgements

We acknowledge A. Bresnick, C. Holt, A. Matus, RM Mège, and R. Tsien for the generous gifts of reagents. We thank B. Tessier, C. Breillat, A. Frouin, D. Bouchet, and N. Retailleau for cell culture; P. Gonzales, R. Sterling, and A. Barbet for technical assistance. We thank C. Poujol, S. Marais, M. Mondin, and P. Legros at the Bordeaux Imaging Center for help in microscopy and image analysis, and the Genomic Transcriptomic Facility of Bordeaux for DNA sequencing. The research leading to these results has received funding from the Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale pour la Recherche (grants Neuroligation, Synapse-2Dt, and Preciput), Conseil Régional Aquitaine, and Fondation pour la Recherche Médicale.

References

- Abe, K., O. Chisaka, F. Van Roy, and M. Takeichi. 2004. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alphaN-catenin. *Nat Neurosci.* 7:357-63. Epub 2004 Mar 21.
- Ackermann, M., and A. Matus. 2003. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci.* 6:1194-200.
- Arikkath, J., I.F. Peng, Y.G. Ng, I. Israely, X. Liu, E.M. Ullian, and L.F. Reichardt. 2009. Delta-catenin regulates spine and synapse morphogenesis and function in hippocampal neurons during development. *J Neurosci.* 29:5435-42.
- Arikkath, J., and L.F. Reichardt. 2008. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 31:487-94.
- Bard, L., C. Boscher, M. Lambert, R.M. Mege, D. Choquet, and O. Thoumine. 2008. A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *J Neurosci.* 28:5879-90.
- Beaudoin, G.M., 3rd, C.M. Schofield, T. Nuwal, K. Zang, E.M. Ullian, B. Huang, and L.F. Reichardt. 2012. Afadin, a Ras/Rap effector that controls cadherin function, promotes spine and excitatory synapse density in the hippocampus. *J Neurosci.* 32:99-110.
- Bozdagi, O., W. Shan, H. Tanaka, D.L. Benson, and G.W. Huntley. 2000. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron.* 28:245-59.
- Campbell, R.E., O. Tour, A.E. Palmer, P.A. Steinbach, G.S. Baird, D.A. Zacharias, and R.Y. Tsien. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7877-82.
- Chan, C.E., and D.J. Odde. 2008. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science.* 322:1687-91.
- Cingolani, L.A., and Y. Goda. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci.* 9:344-56.
- Colicos, M.A., B.E. Collins, M.J. Sailor, and Y. Goda. 2001. Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell.* 107:605-16.

- Dillon, C., and Y. Goda. 2005. The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annu Rev Neurosci.* 28:25-55.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell.* 123:903-15.
- Elia, L.P., M. Yamamoto, K. Zang, and L.F. Reichardt. 2006. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron.* 51:43-56.
- Fischer, M., S. Kaech, D. Knutti, and A. Matus. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron.* 20:847-54.
- Frost, N.A., H. Shroff, H. Kong, E. Betzig, and T.A. Blanpied. 2010. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron.* 67:86-99.
- Giannone, G., R.M. Mege, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* 19:475-86.
- Goslin, K., H. Asmussen, and G. Banker. 1991. Rat hippocampal neurons in low-density culture. *In* Culturing nerve cells. G. Banker and K. Goslin, editors. The MIT Press, Cambridge. 339-370.
- Hodges, J.L., K. Newell-Litwa, H. Asmussen, M. Vicente-Manzanares, and A.R. Horwitz. 2011. Myosin IIb activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. *PLoS One.* 6:e24149.
- Honkura, N., M. Matsuzaki, J. Noguchi, G.C. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron.* 57:719-29.
- Ibarretxe, G., D. Perrais, F. Jaskolski, A. Vimeney, and C. Mulle. 2007. Fast regulation of axonal growth cone motility by electrical activity. *J Neurosci.* 27:7684-95.
- Izeddin, I., J. Boulanger, V. Racine, C.G. Specht, A. Kechkar, D. Nair, A. Triller, D. Choquet, M. Dahan, and J.B. Sibarita. 2012. Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express.* 20:2081-95.
- Knudsen, K.A., A.P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *J Cell Biol.* 130:67-77.
- Kobiela, A., H.A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat Cell Biol.* 6:21-30.
- Korobova, F., and T. Svitkina. 2008. Arp2/3 complex is important for filopodia formation, growth cone motility, and neuriteogenesis in neuronal cells. *Mol Biol Cell.* 19:1561-74.
- Korobova, F., and T. Svitkina. 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 21:165-76.
- Kovacs, E.M., M. Goodwin, R.G. Ali, A.D. Paterson, and A.S. Yap. 2002. Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Curr Biol.* 12:379-82.
- Lambert, M., D. Choquet, and R.M. Mege. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol.* 157:469-79.
- Lambert, M., O. Thoumine, J. Brevier, D. Choquet, D. Riveline, and R.M. Mege. 2007. Nucleation and growth of cadherin adhesions. *Exp Cell Res.* 313:4025-40.
- le Duc, Q., Q. Shi, I. Blonk, A. Sonnenberg, N. Wang, D. Leckband, and J. de Rooij. 2010. Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *J Cell Biol.* 189:1107-15.
- Lin, C.H., E.M. Espreafico, M.S. Mooseker, and P. Forscher. 1996. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron.* 16:769-82.
- Lin, C.H., and P. Forscher. 1995. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron.* 14:763-71.
- Maiden, S.L., and J. Hardin. 2011. The secret life of alpha-catenin: moonlighting in morphogenesis. *J Cell Biol.* 195:543-52.

- Mallavarapu, A., and T. Mitchison. 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol.* 146:1097-106.
- Matsuzaki, F., R.M. Mege, S.H. Jaffe, D.R. Friedlander, W.J. Gallin, J.I. Goldberg, B.A. Cunningham, and G.M. Edelman. 1990. cDNAs of cell adhesion molecules of different specificity induce changes in cell shape and border formation in cultured S180 cells. *J Cell Biol.* 110:1239-52.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, G.C. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature.* 429:761-6.
- Matus, A. 2000. Actin-based plasticity in dendritic spines. *Science.* 290:754-8.
- Mendez, P., M. De Roo, L. Poglia, P. Klausner, and D. Muller. 2010. N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *J Cell Biol.* 189:589-600.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron.* 1:761-72.
- Mondin, M., V. Labrousse, E. Hosy, M. Heine, B. Tessier, F. Levet, C. Poujol, C. Blanchet, D. Choquet, and O. Thoumine. 2011. Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J Neurosci.* 31:13500-15.
- Murase, S., E. Mosser, and E.M. Schuman. 2002. Depolarization drives beta-Catenin into neuronal spines promoting changes in synaptic structure and function. *Neuron.* 35:91-105.
- Mysore, S.P., C.Y. Tai, and E.M. Schuman. 2007. Effects of N-cadherin disruption on spine morphological dynamics. *Front Cell Neurosci.* 1:1.
- Okamoto, K., T. Nagai, A. Miyawaki, and Y. Hayashi. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci.* 7:1104-12.
- Okamura, K., H. Tanaka, Y. Yagita, Y. Saeki, A. Taguchi, Y. Hiraoka, L.H. Zeng, D.R. Colman, and N. Miki. 2004. Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *J Cell Biol.* 167:961-72. Epub .
- Okuda, T., L.M. Yu, L.A. Cingolani, R. Kemler, and Y. Goda. 2007. beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:13479-84.
- Perret, E., A. Leung, H. Feracci, and E. Evans. 2004. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16472-7. Epub 2004 Nov 16.
- Pokutta, S., F. Drees, Y. Takai, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2002. Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *J Biol Chem.* 277:18868-74.
- Riehl, R., K. Johnson, R. Bradley, G.B. Grunwald, E. Cornel, A. Lilienbaum, and C.E. Holt. 1996. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron.* 17:837-48.
- Roelandse, M., A. Welman, U. Wagner, J. Hagmann, and A. Matus. 2003. Focal motility determines the geometry of dendritic spines. *Neuroscience.* 121:39-49.
- Rubio, M.D., R. Johnson, C.A. Miller, R.L. Haganir, and G. Rumbaugh. 2011. Regulation of synapse structure and function by distinct myosin II motors. *J Neurosci.* 31:1448-60.
- Ryu, J., L. Liu, T.P. Wong, D.C. Wu, A. Burette, R. Weinberg, Y.T. Wang, and M. Sheng. 2006. A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron.* 49:175-82.
- Schubert, V., J.S. Da Silva, and C.G. Dotti. 2006. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *J Cell Biol.* 172:453-67.
- Schuman, E.M., and S. Murase. 2003. Cadherins and synaptic plasticity: activity-dependent cyclin-dependent kinase 5 regulation of synaptic beta-catenin-cadherin interactions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 358:749-56.
- Star, E.N., D.J. Kwiatkowski, and V.N. Murthy. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci.* 5:239-46.
- Suter, D.M., L.D. Errante, V. Belotserkovsky, and P. Forscher. 1998. The Ig superfamily cell adhesion molecule, apCAM, mediates growth cone steering by substrate-cytoskeletal coupling. *J Cell Biol.* 141:227-40.

- Suter, D.M., and P. Forscher. 1998. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol.* 8:106-16.
- Taguchi, K., T. Ishiuchi, and M. Takeichi. 2011. Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *J Cell Biol.* 194:643-56.
- Tai, C.Y., S.P. Mysore, C. Chiu, and E.M. Schuman. 2007. Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron.* 54:771-85.
- Takeichi, M., and K. Abe. 2005. Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol.* 15:216-21.
- Tanaka, H., W. Shan, G.R. Phillips, K. Arndt, O. Bozdagi, L. Shapiro, G.W. Huntley, D.L. Benson, and D.R. Colman. 2000. Molecular modification of N-cadherin in response to synaptic activity. *Neuron.* 25:93-107.
- Tashiro, A., and R. Yuste. 2004. Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci.* 26:429-40.
- Tatavarty, V., S. Das, and J. Yu. 2012. Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron. *Mol Biol Cell.* 23:3167-77.
- Tatavarty, V., E.J. Kim, V. Rodionov, and J. Yu. 2009. Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS One.* 4:e7724.
- Thoumine, O., M. Lambert, R.M. Mege, and D. Choquet. 2006. Regulation of N-cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Mol Biol Cell.* 17:862-75.
- Togashi, H., K. Abe, A. Mizoguchi, K. Takaoka, O. Chisaka, and M. Takeichi. 2002. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron.* 35:77-89.
- Trojanovsky, R.B., E. Sokolov, and S.M. Trojanovsky. 2003. Adhesive and lateral E-cadherin dimers are mediated by the same interface. *Mol Cell Biol.* 23:7965-72.
- Uchida, N., Y. Honjo, K.R. Johnson, M.J. Wheelock, and M. Takeichi. 1996. The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J Cell Biol.* 135:767-79.
- Vallotton, P., S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:9660-5.
- Wilson, C.A., M.A. Tsuchida, G.M. Allen, E.L. Barnhart, K.T. Applegate, P.T. Yam, L. Ji, K. Keren, G. Danuser, and J.A. Theriot. 2010. Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature.* 465:373-7.
- Xie, Z., H. Photowala, M.E. Cahill, D.P. Srivastava, K.M. Woolfrey, C.Y. Shum, R.L. Hugarir, and P. Penzes. 2008. Coordination of synaptic adhesion with dendritic spine remodeling by AF-6 and kalirin-7. *J Neurosci.* 28:6079-91.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell.* 123:889-901.
- Yuste, R., and T. Bonhoeffer. 2004. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci.* 5:24-34.
- Zhang, H., D.J. Webb, H. Asmussen, S. Niu, and A.F. Horwitz. 2005. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *J Neurosci.* 25:3379-88.
- Zhou, Q., K.J. Homma, and M.M. Poo. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron.* 44:749-57.
- Ziv, N.E., and S.J. Smith. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron.* 17:91-102.

Figure Legends

Figure 1. Distribution of N-cadherin, actin and myosin within dendritic spines

(a-c) Neurons co-transfected with RFP and actin-GFP, MLC-GFP, or N-cadherin-GFP, were fixed at DIV 18-21, dual-immunolabeled for GFP and RFP, and examined by confocal microscopy. (d) In some experiments, neurons transfected with actin-GFP were labeled for synapsin. (e) Images were segmented to yield the coordinates of actin, MLC, N-cadherin and synapsin puncta, relatively to the centroid of the spine obtained from the RFP image. Those data were normalized by the width and length of the spine, providing a plot of the relative distributions of each protein. An average spine profile is indicated in dashes. Some of the synapsin staining which seems to appear within the spine is likely due to the 3D architecture not resolved in these 2D images, and the diffraction limits of conventional microscopy. Data were analyzed by Mann Whitney test (***) $P < 0.005$.

Figure 2. Altering the linkage between N-cadherin and F-actin increases spine motility

(a) Hippocampal neurons were transfected with actin-GFP and imaged at DIV 8-10 for observation of dendritic filopodia, or at DIV 17-21 for observation of dendritic spines. Images of actin-GFP (left panels) were taken every 5 sec for 5 min. Consecutive images were segmented and subtracted (right panels), making protrusions appear white, and retractions appear dark. The normalized intensity variance of these images was calculated for each spine or filopodium, and defined as the instantaneous motility index. (b) The individual motility index integrated over time is presented as interquartile distributions of many filopodia or spines, in each condition. The number of filopodia or spines examined is given under each bar. (c) Neurons were co-transfected with actin-GFP and either NcadWT-RFP, NcadW2A-RFP, or Ncad Δ E-RFP and observed at DIV 17-21. (Left panels) The actin-GFP images (green) were merged to the RFP images (red) to show the distribution of the N-cadherin mutants. (Right panels) Corresponding subtracted images of actin-GFP. (d) Interquartile distributions of the motility index for the Ncad mutants. Data were analyzed by one-way ANOVA and compared two by two using Dunnett's post-test (***) $P < 0.005$.

Figure 3. Stimulating myosin contractility induces actin retraction, to a level inversely related to actin/N-cadherin coupling

Neurons transfected with actin-GFP alone, or co-transfected with NcadWT-RFP, NcadW2A-RFP, or Ncad Δ E-RFP, were observed at DIV 17-21. Images of actin-GFP were taken every 5 sec for 10 min. Calyculin A (1 μ M) or the vehicle DMSO (1:2000), were added 2.5 min after the start of the recording. (a) Representative images of actin-GFP rich structures (red) superimposed to the spine outline (green), for calyculin A or DMSO treatments. (b) Relative displacements of actin-GFP spots over time, for the two conditions (average \pm sem for 8 spines). (c) Representative images of actin-GFP rich structures (red) superimposed to the spine outline (green), for cells expressing NcadW2A or Ncad Δ E mutants. (d) Cumulative distribution of the maximal displacement of actin-GFP spots within 10 min after drug addition for the different conditions.

Figure 4. Formation of actin-rich dendritic filopodia in contact with Ncad-Fc coated micropatterns

Neurons were cultured on micropatterned substrates containing a hexagonal array of 2 μ m polylysine-activated dots, surrounded by a cytophobic background. The dots were coated with purified Ncad-Fc via Cy5-labelled anti-Fc secondary antibodies, allowing both proper orientation of the adhesive ectodomain and fluorescent visualization of micropatterns. Neurons were co-transfected with actin-GFP and NcadWT-RFP, NcadW2A-RFP, or Ncad Δ E-RFP, and observed at DIV 8-10. (a, b) Representative images of Cy5-conjugated anti-Fc antibodies, Ncad-RFP, and actin-GFP images are shown for the NcadWT and Ncad Δ E conditions, respectively. (c) Enrichment levels of actin-GFP and Ncad-RFP at Ncad-Fc micropatterns, in the different conditions. Data were analyzed by one-way ANOVA separately for each staining (actin-GFP or Ncad-RFP), and conditions were compared to the NcadWT condition by Dunnett's test (**P < 0.01). The number of dots analyzed was 257 for NcadWT-RFP, 326 for NcadW2A-RFP, and 291 for Ncad Δ E-RFP (4 cells in each condition). (d) Plot of actin-GFP versus Ncad-RFP signals for the NcadWT and Ncad Δ E conditions, respectively. The correlation coefficients were $r = 0.83$ for NcadWT (P < 0.0001, n = 257 dots) and $r = 0.45$ for Ncad Δ E (P < 0.0001, n = 291 dots).

Figure 5. Challenging N-cadherin adhesions with Ncad-Fc coated beads stimulates actin recruitment and stabilizes filopodia

Neurons transfected with actin-GFP were imaged at DIV 9-10. After an initial 5 min observation period to check for filopodial motility, an Ncad-Fc coated microsphere was placed at the tip of a filopodium with optical tweezers, and the trap was maintained ON for 15 min. (a) Bright field and (c, d) actin-GFP fluorescence images were taken every 5 sec for 20 min. (a) In some cases, beads escaped the trap and moved in a retrograde fashion. The dashed line gives the reference position. (b) Average displacement of 14 beads over time (\pm sem), the initial slope (plain line) being defined as the rearward velocity of the bead. (c) Note the shape change of the filopodium and accumulation of actin-GFP, red dashed circle represents bead localization. (d) Control filopodia without beads did not show such a response. (e) Actin-GFP enrichment versus time at filopodia in contact with Ncad-Fc coated beads, compared to control filopodia without beads (average \pm sem of 14 filopodia from 12 different cells). (f) Corresponding measurements of motility index over time, performed on the same filopodia. Data integrated over time between 10-15 min were compared by unpaired t-tests (** $P < 0.01$; *** $P < 0.002$).

Figure 6. Model of clutch engagement at dendritic filopodia and spines

(a) In motile filopodia, the actin flow is high, and protrusions are not stabilized. (b) Upon axon/dendrite encounter, the mechanical connection between homophilic N-cadherin adhesions and the actin network reduces the actin flow, stabilizes the structure, and allows spine enlargement by actin polymerization on the sides of the adhesive zone.

Supplemental Figure 1. Quantification of actin over-expression level

Hippocampal neurons transfected with actin-GFP were fixed at DIV 21 and immunostained with anti-actin primary antibodies followed by rhodamine-conjugated secondary antibodies. A transfected neuron is shown next to a non-transfected counterpart. Note the weak level of actin over-expression in the actin-GFP expressing neuron, which may reflect the fact that neurons are able to degrade excess actin. The ratio of actin staining in transfected versus non-transfected counterparts was 1.15 ± 0.02 (n = 15 cells). Also note the actin localization in dendritic spines for both neurons.

Supplemental Figure 2. Quantification of the number of dendritic filopodia and spines in contact with axons.

(a) Representative images of hippocampal neurons transfected with actin-GFP were fixed at DIV 11 or 18, and immunostained for the pre-synaptic marker synapsin. Note that almost all dendritic spines at DIV 18 make contacts with synapsin spots, while certain dendritic filopodia at DIV 11 are not in contact with pre-synaptic boutons (arrows). (b) Quantification of the percentage of filopodia or spines in close apposition to synapsin puncta, for the two different conditions. 10 cells for each condition were examined. The number of filopodia and spines quantified is indicated on top of each column (10 cells in each condition). Data were compared by unpaired t-test (***) $P < 0.0001$. (c) Representative images of hippocampal neurons transfected with actin-RFP and MLC-GFP, clearly showing the localization of myosin downstream of actin.

Supplemental Figure 3. Quantification of the motility index

Hippocampal neurons were transfected with actin-GFP and imaged at DIV 17-21. (a) Time lapse images of actin-GFP, separated by 5 sec intervals. Consecutive images were segmented and subtracted making protrusions appear white and retractions appear dark. In some experiments, PFA or cytochalasin D were added, resulting in a rapid immediate blockade of spine motility (note the absence of contrast in the subtracted image). (b) Instantaneous motility index upon addition of 1 μ M cytochalasin D, or 1:2000 DMSO at time 5 min (arrow).

Note the rapid and sustained decrease in motility index. (c) Interquartile distributions of motility index integrated for 5 min for the different conditions (control, PFA, cytochalasin D, DMSO). The number of spines examined for each condition is given below each column. Data were analyzed by one-way ANOVA and compared two by two using Dunnett's post-test (***) $P < 0.005$).

Supplemental Figure 4. Growth and arborization of neurons cultured on micropatterned substrates

Neurons were cultured for 5 DIV on micropatterned substrates coated with Cy5-conjugated anti-Human Fc antibodies and Ncad-Fc (a, b) or human Fc (c, d), then fixed, permeabilized and stained for phalloidin-bodipy. (a, c) Representative images of the phalloidin staining. (b, d) Corresponding Cy5 images showing the patterns.

Supplemental Materials and Methods

Molecular constructs

Actin–GFP was a gift of A. Matus (Fischer et al., 1998). MLC-GFP was a gift from Ann Bresnick (Albert Einstein College, New York). The plasmid coding for C-terminal GFP-tagged chicken wild type chicken N-cadherin (NcadWT-GFP) was described earlier (Thoumine et al., 2006). To construct the plasmid expressing full length chicken N-cadherin C-terminally fused to RFP (NcadWT-RFP), a 1400 bp BamHI–HindIII DNA fragment encoding the monomeric DsRed sequence (Campbell et al., 2002) was subcloned into pCDNA 3.1 hygro (Invitrogen) to generate pCD mDsRed (Lambert et al., 2007). A XbaI–SacI 2500 bp fragment encompassing the 5' end of the chicken N-cadherin cDNA (Matsuzaki et al., 1990) was amplified by PCR using the following oligonucleotides: 5'GGAATTAAGAGAGCTCAAGGATC3' and 5'CTAGTCTAGATCCATGTGCCGGATAGCGGG3'. A second PCR was performed to prepare a SacI–BamHI 100 bp fragment corresponding to the 3' end of the N-cadherin cDNA using the oligonucleotides: 5'TCCTTGAGCTCTCTTAATTCC3' and 5'CGCGGATCCCCGTATCACCTCCACCGTAC3'. Each PCR fragment was digested to reveal their cohesive ends and cloned into the XbaI and BamHI sites of pCD mDsRed. N-terminal myc-tagged *Xenopus laevis* N-cadherin lacking the extracellular domain (NcadΔE) was a kind gift of C. Holt (Riehl et al., 1996). mRFP1 was amplified by PCR and inserted after the signal peptide, in place of the myc tag using two BamHI sites. N-Cadherin W2A mDsRed was generated by site-directed mutagenesis using the QuickChange® II XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). PCR was performed on N-Cadherin mDsRed. Oligonucleotides used were as follows : NcadhW2A-F, 5'GAGACAGAAGAGAGACGCGGTTATCCCTCCAATC 3' ; NcadhW2A-R, 5' GATTGGAGGGATAACCGGTCTCTTCTGTC TC 3'. The fidelity of all constructs was verified by sequencing at the Genomic Transcriptomic Facility of Bordeaux.

Substrate coating

22-mm square micropatterned glass coverslips were obtained from CYTOO (www.cytoo.com) as a custom designed “Ready to Coat” product (ref 10-950-00), according to our specifications: hydrophilic dots of 1.5 μm diameter separated by 5 μm, against a

uniformly cytophobic environment. Substrates were then treated with 40 µg/ml polylysine (Sigma) which adsorbed to the hydrophilic dots, dried and stored at 4°C. Anti-Human Fc antibodies (Jackson ImmunoResearch) were conjugated to Cy5 fluorophores using a kit from Amersham and recovered on a size exclusion column (Biorad). One day before plating cells, a 9:1 ratio of unlabelled and Cy5-conjugated goat anti-human Fc antibodies (Jackson ImmunoResearch) were diluted at 0.023 mg/ml in borate buffer (boric acid 0.2 M, pH = 8.5), and centrifuged for 10 min at 14'000 rpm and 4°C. Micropatterned substrates were flipped onto a 200 µl drop of the antibody mixture on parafilm previously sterilized with UV, and incubated at RT for 4-5 h. Substrates were then washed with borate buffer and incubated overnight at 4 °C with recombinant rat N-cadherin fused to the constant fragment of human IgG (Ncad-Fc) (R&D Systems) diluted at 0.04 mg/ml in boric acid and previously centrifuged for 10 min at 14'000 rpm. For all other experiments, 18 mm glass coverlips were cleaned overnight with 6 M nitric acid, rinsed with de-ionized water, autoclaved, and marked with three paraffin dots. These coverslips were incubated for 2 hr at 37°C with 1 mg/ml polylysine, then rinsed with water. Regular coverslips were placed in 60 mm dishes (4 per dish) and micropatterned coverslips in 6 well plates, washed with borate buffer and left with MEM containing 10% horse serum for 1-2 hours in the incubator (37°C, 5% CO₂) before seeding the cells.

Cell culture and transfection

Dissociated hippocampal neurons from E18 rat embryos were plated on regular 18 mm coverslips at a density of 200'000 cells/dish, or on micropatterned substrates (100'000 cells/coverslip). 4-5 hours after plating, coverslips were flipped onto dishes containing a feeder layer of astrocytes and cultured in neurobasal medium (NB) supplemented with B27 (Goslin et al., 1991). Alternatively, micropatterned substrates were washed with NB supplemented with B27 (37°C) to remove unattached cells, and medium was replaced with conditioned medium previously incubated for 4 days in dishes containing a feeder glial cell layer. Neurons were cultured up to 3 weeks at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Neurons were transfected at DIV7 using lipofection, according to the manufacturer's protocol (Effectene kit, Qiagen), using 1 µg total DNA per micropatterned coverslip or 1 µg per regular dish (4

coverslips). For co-transfections of actin-GFP and Ncad-RFP or RFP constructs, a 2:1 DNA ratio was used. Alternatively, 500'000 neurons taken right after dissection were electroporated with the Amaxa system (Lonza) using 5 µg DNA of RFP or actin-GFP. The two neuronal populations were then mixed and cultured on 18 mm coverslips for 8-10 DIV.

Immunocytochemistry

Neurons co-transfected with RFP plus N-cadherin-GFP, actin-GFP, or MLC-GFP at DIV 17-21 or just with actin-GFP were fixed for 10 min in warm 4% paraformaldehyde- 4% sucrose in PBS. Remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min, then cultures were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, and non-specific binding was blocked with PBS containing 1% BSA for 1 hr at RT. Neurons were dual immunolabeled using mouse anti-GFP (Invitrogen, 1:200) plus rabbit anti-dsRed (Clontech, 1:200) for 1 hr at RT, followed by Alexa488-conjugated goat anti-mouse (2 mg/ml, Invitrogen, 1:400) and Atto647N-conjugated goat anti-rabbit (Sigma, 1:400) secondary antibodies, respectively for 30 min at room temperature. In some experiments, cells transfected with actin-GFP were immunolabeled with mouse anti-synapsin (Synaptic systems) primary antibodies, followed by Alexa568-conjugated goat anti-mouse (2 mg/ml, Invitrogen, 1:400). For quantification of actin-GFP over-expression, cultures were fixed for 5 min in -20°C methanol, blocked and stained with mouse anti-actin (Millipore, 1:400) followed by Alexa568-conjugated goat anti-mouse (2 mg/ml, Invitrogen, 1:400) Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem).

Microscopy observation of fixed cells and sub-spine distribution of proteins

For observation of protein distribution within spines, cells were examined using a SP-5 Leica confocal microscope, using a 100x/1.40 N.A. objective and a 100 µm pinhole aperture. GFP images were acquired using the 488 nm Argon laser line, and emission band 500-550nm, while RFP images were acquired using the 532 nm laser line, and emission band 560-600nm. GFP and RFP images were segmented using a custom macro written in the Metamorph® software (Universal Imaging), providing the coordinates of the GFP signals, relatively to the

centroid of the spine obtained from the RFP signal. These values were normalized by the width and length of each spine, respectively. This semi-automatic image analysis performed for hundreds of dendritic spines provided a plot of the relative distributions of each protein within spines. To quantify the level of apposition between actin-GFP and synapsin puncta, we used a program written as a plugin for Image J described previously (Mondin et al., 2011).

Live cell imaging and motility index

Neurons were mounted in an open chamber containing 500 μ L Tyrode solution (in mM: 120 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 25 HEPES and 30 D-Glucose, pH = 7.4), and observed under an Olympus IX70 microscope thermostated at 37°C using a Plexiglas box filled with an air blower (World Precision Instruments) and an objective heater (Bioptechs). Fluorescence images were taken using a 100X/1.40 PlanApo oil objective and an EMCCD camera (QuantEM, Roper Scientific, Evry, France), upon illumination with a 150 W Xenon lamp and filter cubes from Chroma (GFP: excitation HQ 480/30 nm, dichroic 86100bs, emission S528/38 nm; RFP: excitation HQ630/20 nm, dichroic 101848, emission S685/40 nm). Actin-GFP images were acquired every 5 sec for 10 min using a shutter (Uniblitz) driven by Metamorph, while axonal RFP and Ncad-RFP images were taken only once at the beginning of the acquisition. In some experiments, 1 μ M cytochalasin D (Sigma), 1 μ M calyculin A (Tocris), or 1:2000 DMSO (Sigma) were added to the cells 5 min after beginning the recording. Stock solutions of cytochalasin D and calyculin A in DMSO were 2 mM and 1 mM, respectively.

Dendritic spine (or filopodium) motility was assessed by a motility index constructed as follows (Ibarretxe et al., 2007). An initial wavelet-based segmentation was performed on the images using a custom-made program provided by JB Sibarita (University Bordeaux Segalen) (Izeddin et al., 2012), giving very good delineation of the dendritic spine outline, and putting the background to zero. The area covered by the dendritic spine or filopodium during the recording period (up to 15 min) was determined by a threshold on the maximal image projection of the whole image stack over time. Pairs of consecutive frames were subtracted from each other with an added constant (1000) to avoid negative pixel values (Fig. S3a). In

these images, pixels with newly appearing structures are white, while disappearing structures are black. Highly motile structures will thus appear as highly contrasted on this type of image. Such contrast is estimated by the standard deviation of pixel values over the total area covered, divided by the average intensity over the total dendritic spine or filopodium area. This normalization corrects for different fluorescent protein expression levels and for photobleaching.

Actin and cadherin enrichments for filopodia in contact with micropatterns

For the observation of filopodia in contact with Ncad-Fc micropatterns, neurons were visualized on a Leica DM R up-right epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a 63x/1.32 NA objective and appropriate filter sets from Chroma (GFP: excitation 490/20 nm, dichroic 86100bs, emission 528/38 nm; TRITC: excitation 555/28 nm, dichroic 101848, emission 617/73; Cy5: excitation 635/20, dichroic 101848, emission 685/40 nm). Images were acquired with a CCD camera (HQ CoolSnap, Roper scientific, Evry, France), using the Metamorph software (Universal Imaging). The enrichment factors of actin-GFP and RFP at the N-cadherin-coated micropatterns were measured on three randomly chosen dendritic areas of each neuron and were calculated using an automatic program written in Metamorph (Mondin et al., 2011). Briefly, the outlines of the patterns from the Cy5 channel corresponding to the Cy5-conjugated anti-Fc antibody were transferred to the corresponding actin-GFP and RFP images, where the outline of the neurite was determined by a threshold function. The patterns which did not overlap with the threshold area were eliminated from further quantification. An enrichment index was calculated by dividing the GFP or RFP fluorescence intensity within each dot for the thresholded area, by the corresponding average intensity measured from dendritic parts located outside patterns.

Microsphere preparation and optical tweezers experiments

5 μ l of 1- μ m sulfate latex microspheres (Polysciences, $4.5 \cdot 10^7$ particles/ μ l) were incubated overnight at 4°C with 10 μ g goat anti-Fc antibody (Jackson Immunoresearch) in 50 μ l borate

buffer 0.2 M, pH = 8.5. Microspheres were rinsed in borate buffer containing 0.3% BSA, and 20 μ l of the suspension were incubated at room temperature for 3 hr with 3 μ g Ncad-Fc. Beads were rinsed again 3 times, resuspended in 100 μ l and kept on ice during the experiments. An Olympus IX70 inverted microscope was fed through its epifluorescence port by a fixed colinear Nd:YAG laser beam (Compass Coherent, 1064 nm, 100 mW), filling the back aperture of a 100x/1.40 oil objective (Thoumine et al., 2006). Two shutters (Uniblitz) driven by Metamorph (Universal Imaging) and combined with appropriate filters and dichroics allowed dual bright field and epifluorescence illumination of GFP. Images in each channel were taken every 5 sec with an EMCCD camera (QuantEM, Roper Scientific). A shutter controlled by a foot switch was used to activate the laser and capture microspheres in suspension. Beads were then moved using a motorized stage (MarzHauser) and brought to the tip of motile dendritic filopodia. The trap was maintained ON for 12 min. The bead position was monitored using the “track objects” function in Metamorph, and the intensity of actin-GFP in the filopodium in contact with the bead, relative to the baseline value, was computed using macros developed in Metamorph (Mondin et al., 2011).

Figure 1

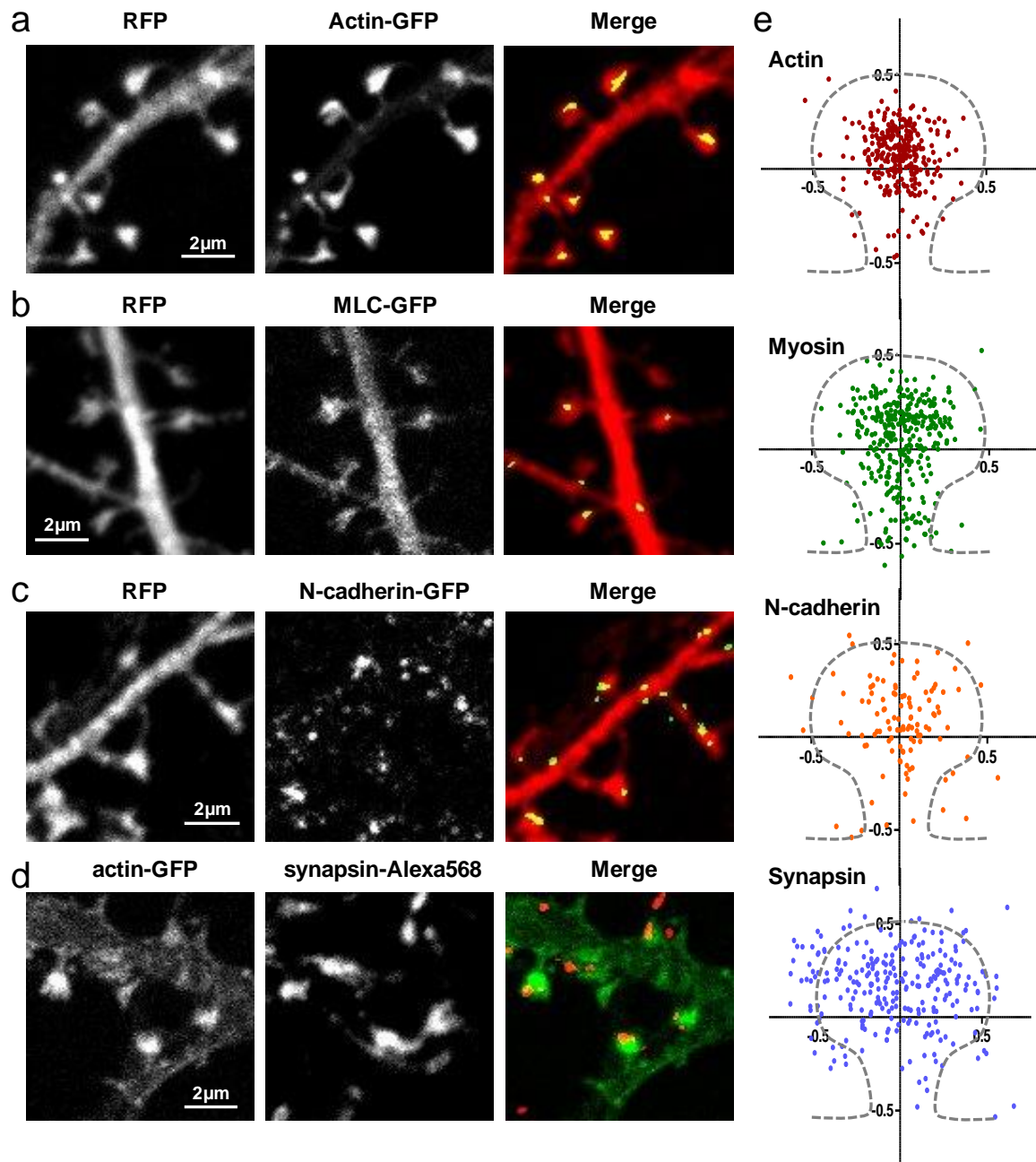


Figure 2

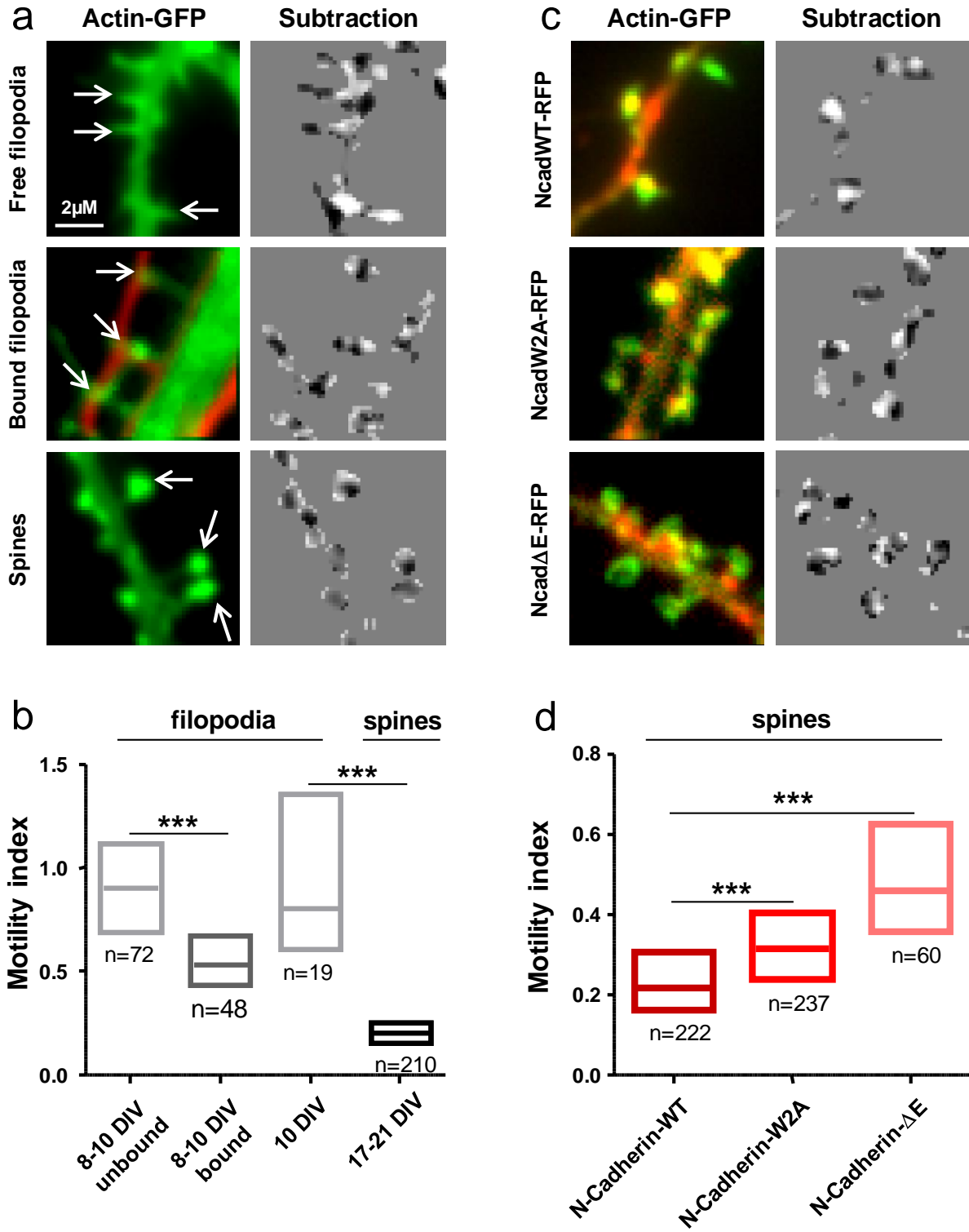


Figure 3

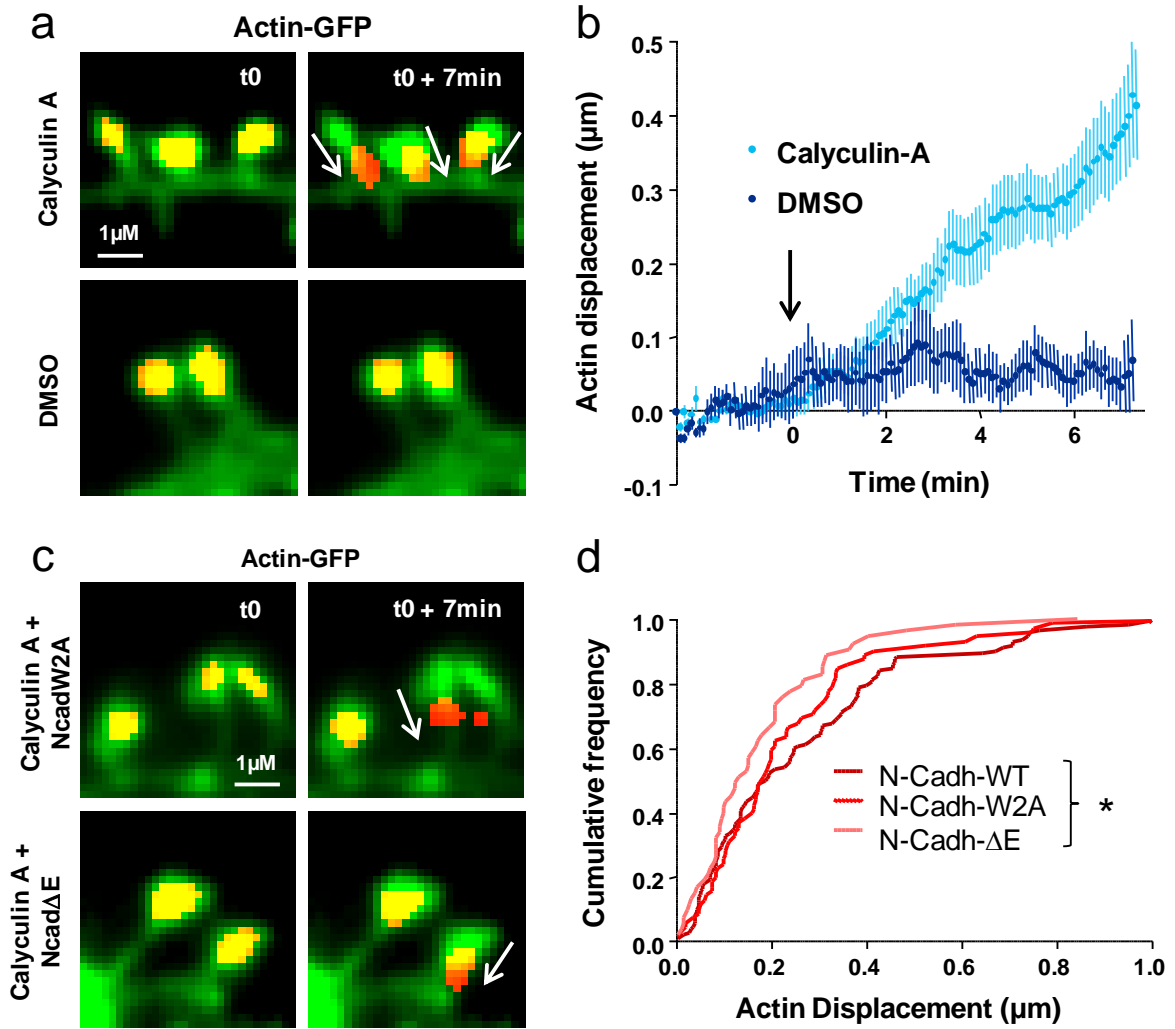


Figure 4

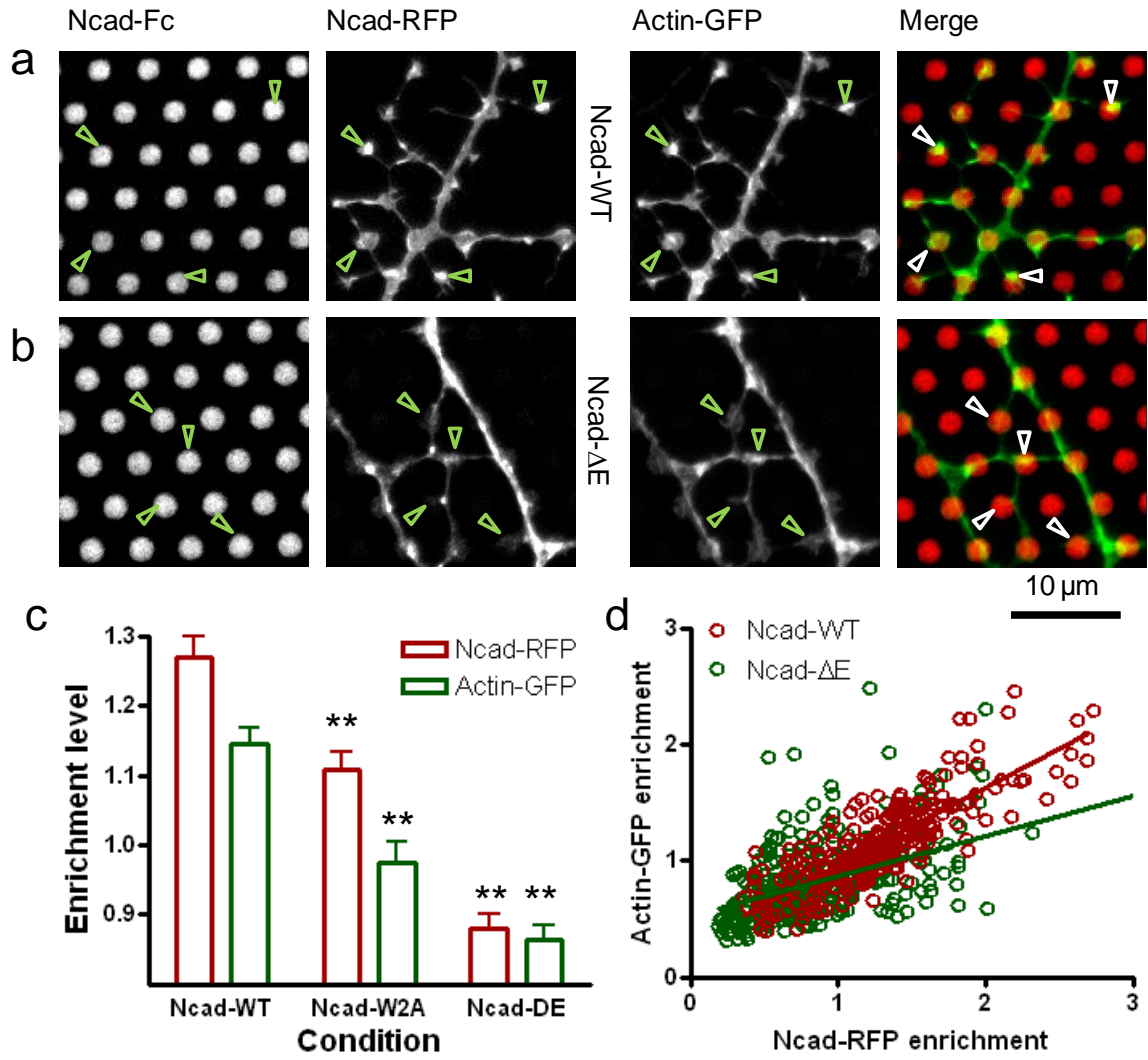


Figure 5

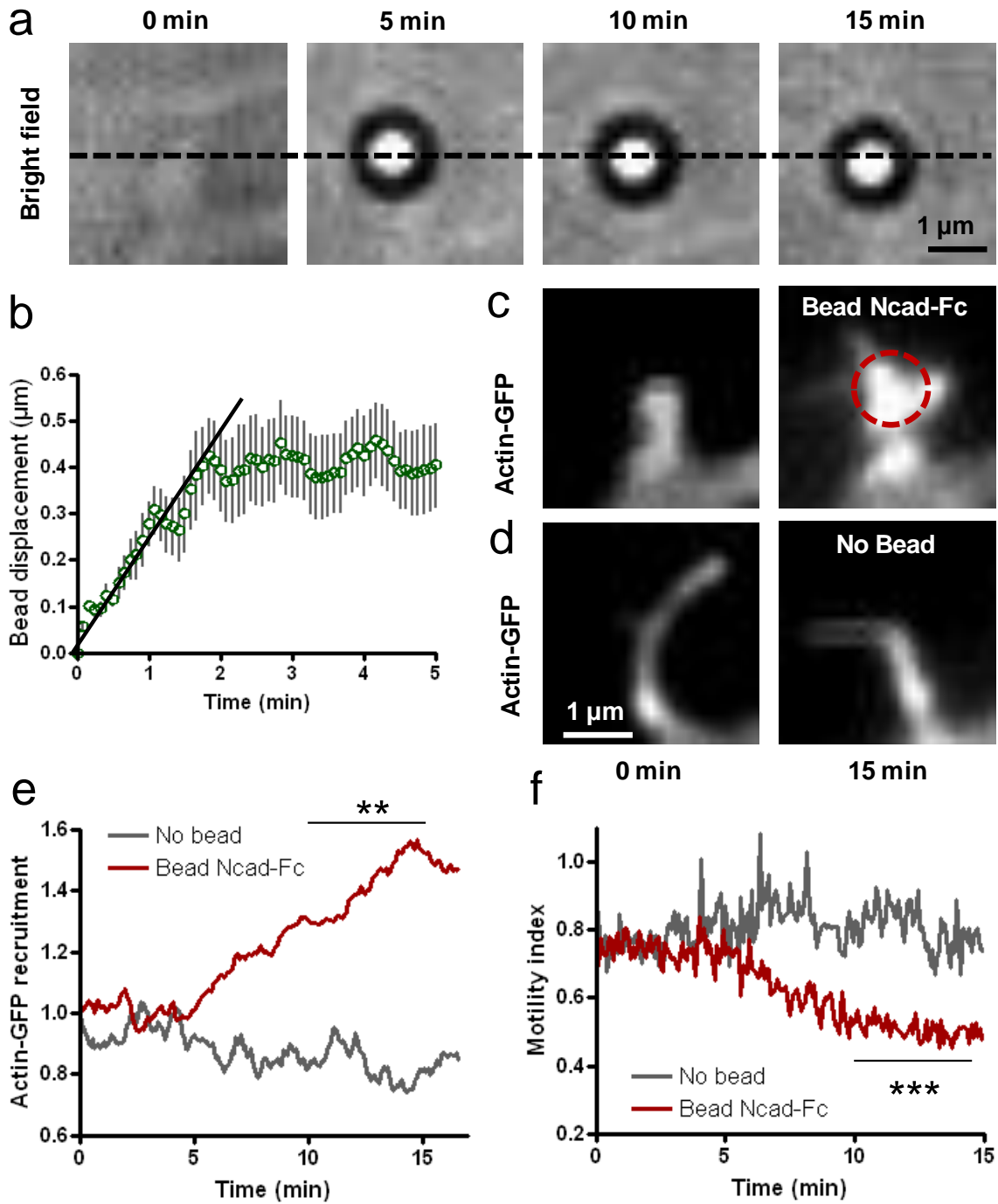
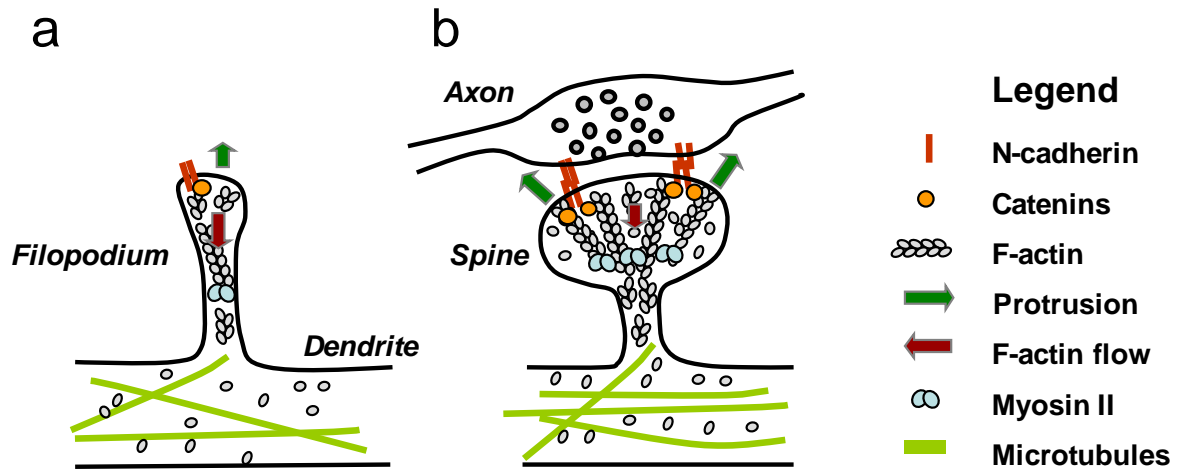
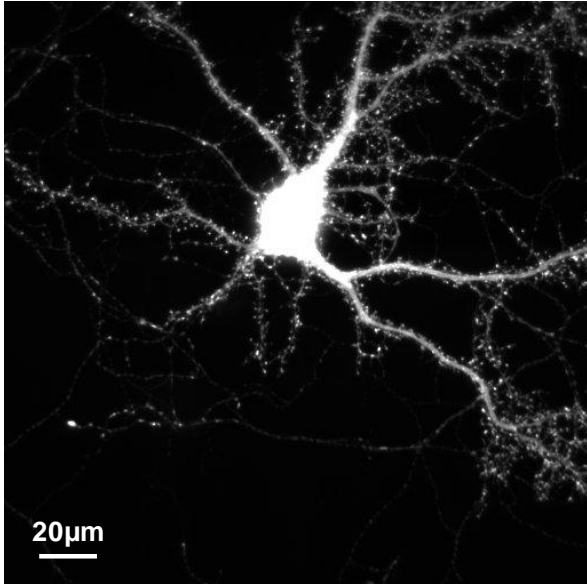


Figure 6

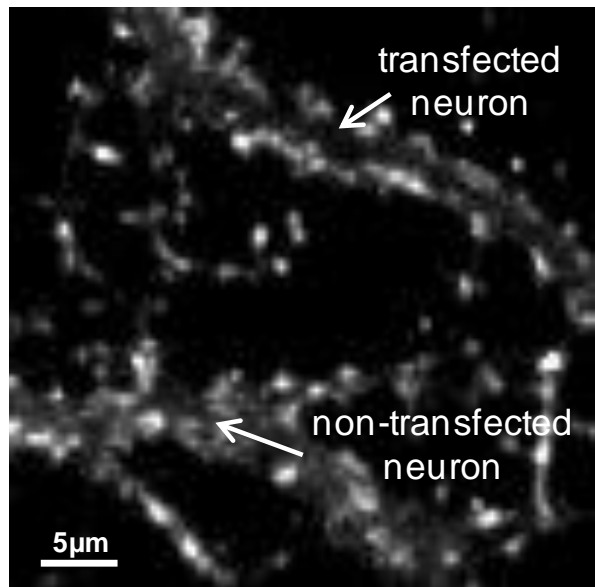
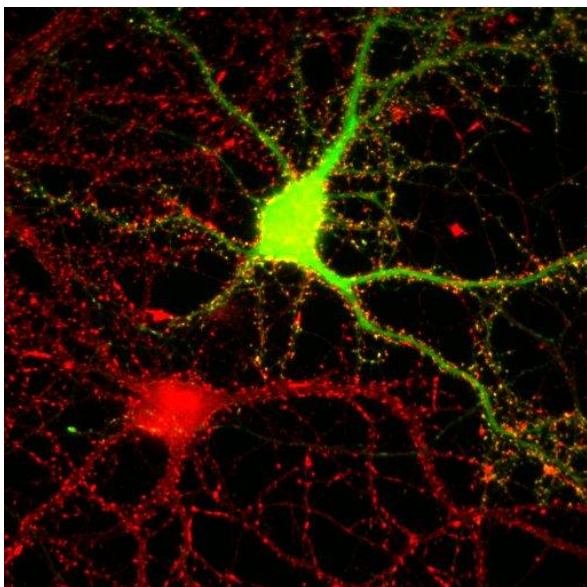
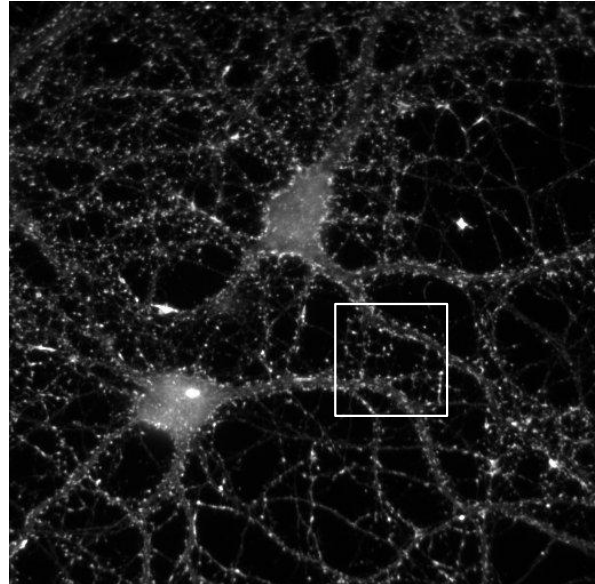


Supplementary Figure 1

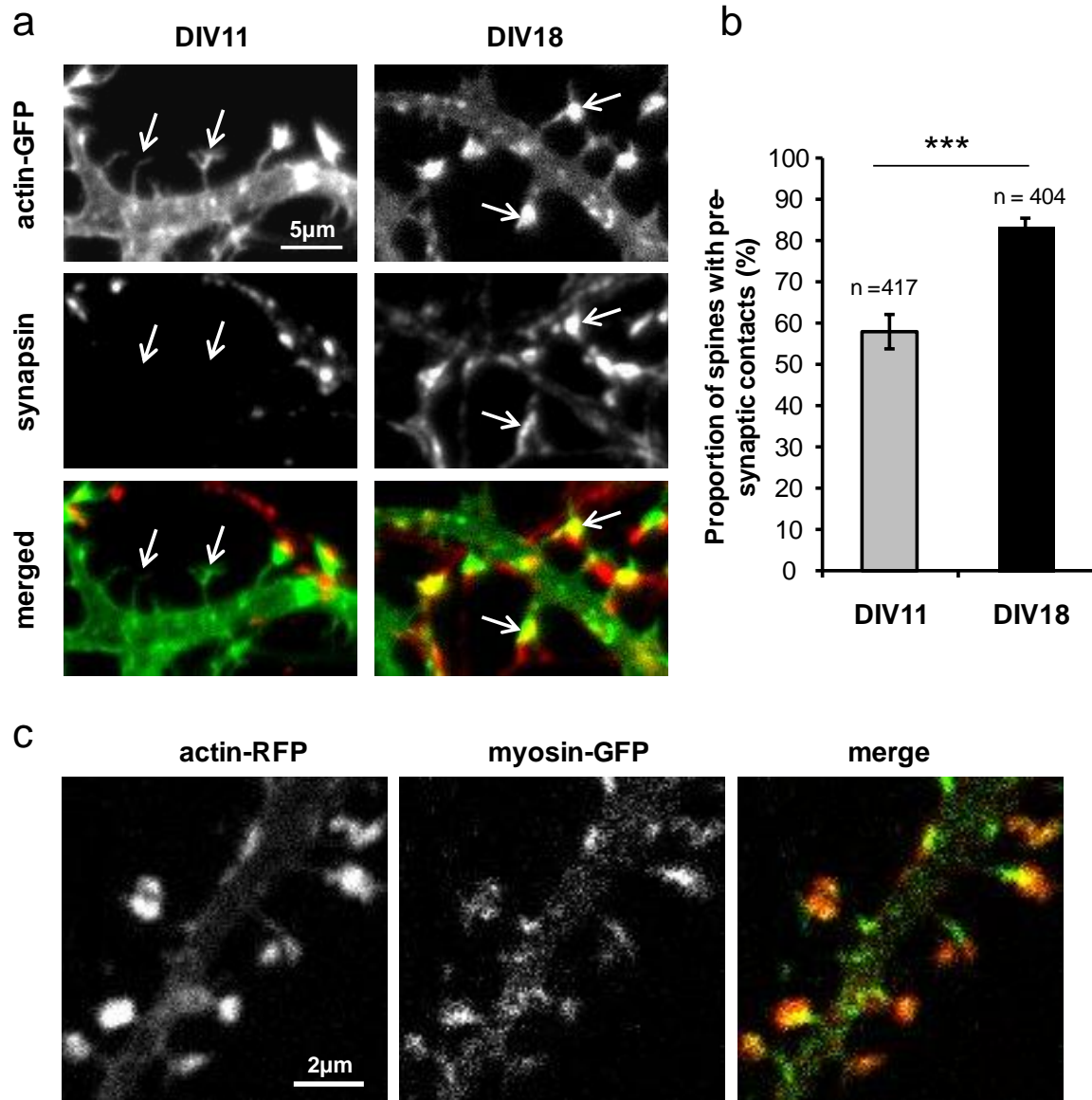
Actin-GFP



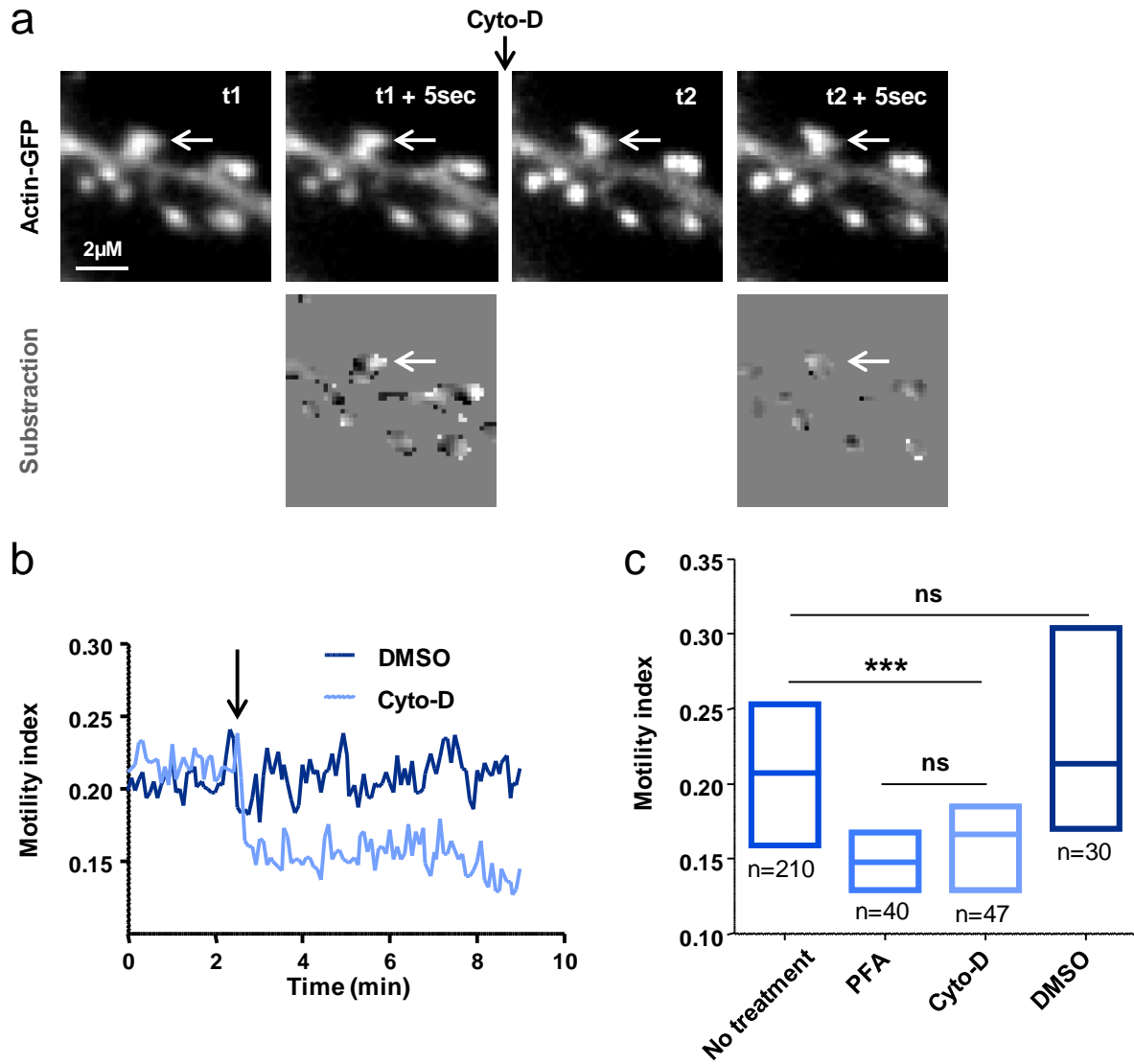
Anti-Actin-Rhodamine



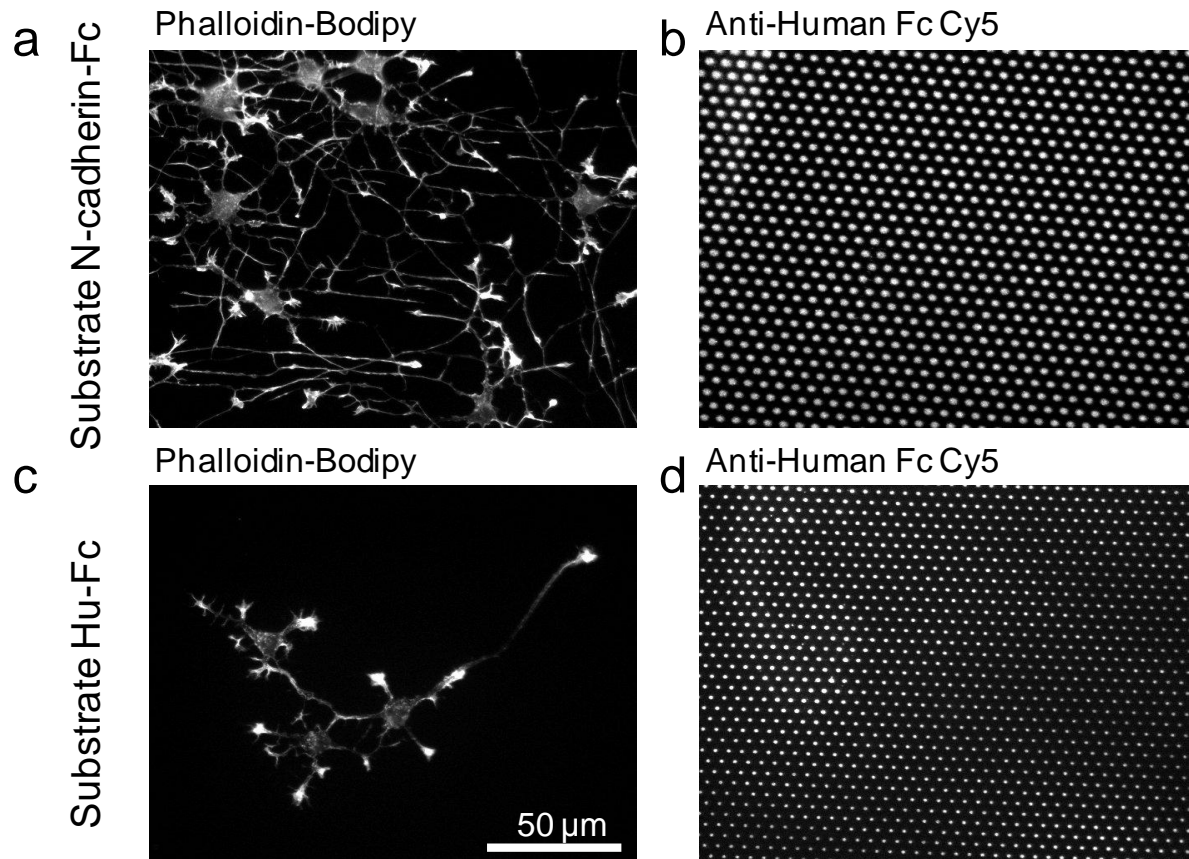
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 4



II. Etude n°2: "Dynamic nanoscale organizations of branched actin networks within dendritic spines".

Auteurs: Anaël Chazeau, Jérémie Gautier, Cécile Leduc, Deepak Nair, Daniel Choquet, Olivier Thoumine, Alexis Gautreau, Jean-Baptiste Sibarita et Grégory Giannone

a. Contexte et problématique

Les filaments d'actine (F-actine) sont enrichies dans les épines dendritiques et contrôlent leurs tailles, leurs motilités, leurs changements morphologiques et par conséquent la plasticité synaptique (Matus, 2005 ; Cingolani and Goda, 2008 ; Hotulainen and Hoogenraad, 2010). En accord avec le rôle essentiel des réseaux d'actine, plusieurs actin binding proteins (ABPs) ainsi que leurs régulateurs sont également présents dans les épines dendritiques. Ceci inclus notamment des protéines impliquées dans la formation de réseaux d'actine branchés dont la petite GTPase Rac1 et la protéine à domaine I-BAR IRSp53, mais également leur effecteur le complexe WAVE indispensable à l'activation du nucléateur ARP2/3 (Tashiro and Yuste, 2004 ; Choi et al., 2005 ; Soderling et al., 2007 ; Haditsch et al., 2009 ; Hotulainen et al., 2009). De nombreuses études sur les structures motiles classique comme le lamellipode montrent que la localisation et la dynamique de ces protéines définissent l'architecture et la dynamique du réseau d'actine (Lai et al., 2008). Dans ces structures, la nucléation et l'élongation des réseaux d'actine branchés sont catalysés à l'extrémité des protrusions membranaires. En effet, les bouts barbés de F-actine, WAVE, IRSp53 et VASP sont concentrés à l'extrémité du lamellipode. Cette organisation implique qu'ARP2/3 et les monomères d'actine s'incorporent dans un réseau d'actine assemblé au front de migration et se déplaçant de façon rétrograde. La taille des épines dendritiques, proche de la limite de résolution spatiale de la microscopie de fluorescence conventionnelle, ne permet pas de définir le lien entre la localisation et la dynamique de ces protéines et l'architecture dynamique du réseau d'actine. Nous avons donc utilisé la microscopie super-résolutive et le suivi de protéines individuelles afin d'élucider l'organisation nanométrique dynamique des protéines à l'origine des réseaux d'actine branchés dans les épines dendritiques.

b. Résumé des résultats

Nous avons tout d'abord utilisé la technique de sptPALM ("single particle tracking Photoactivation Localisation Microscopy") afin d'étudier les mouvements du complexe ARP2/3 dans les épines. Nous avons montré que ses propriétés diffusives sont semblables à celle de l'actine, présentant principalement des événements d'immobilisation. Ceci suggère que le complexe ARP2/3 est incorporé dans des réseaux d'actine branchés dans les épines dendritiques. De plus lorsqu'un désassemblage des filaments d'actine est induit pharmacologiquement l'enrichissement du complexe ARP2/3 dans les épines diminue, et est corrélé avec une augmentation de la diffusion du complexe Arp2/3 dans l'épine. Cependant contrairement à l'actine, une proportion non négligeable du complexe ARP2/3 diffuse

librement et pourrait représenter un réservoir d'ARP2/3 disponible pour de nouveaux événements de nucléation. Afin de définir le temps d'incorporation d'ARP2/3 dans le réseau d'actine nous avons généré des frises temporelles d'images super-résolues. Nous avons pu identifier que ces immobilisations d'ARP2/3 sont transitoires et rapidement redistribuées dans l'épine suggérant un assemblage et un désassemblage dynamique du réseau branché d'actine. Une fois incorporé dans le réseau d'actine, le complexe ARP2/3 devrait suivre la dynamique des réseaux d'actine. Ainsi des acquisitions sptPALM à basse fréquence révèlent que contrairement aux filopodes dendritiques et aux cônes de croissance le flux d'actine dans les épines est lent et non polarisé. Ceci suggère que l'organisation des ABPs dans les épines est différente de celles de structure motile comme le lamellipode ou le cône de croissance. Pour déterminer la localisation nanométrique des complexes ARP2/3 et WAVE, nous avons effectué des expériences de PALM à haute fréquence nous permettant d'imager rapidement et intégralement ces protéines dans l'épine. Nous avons également généré des images super-résolues deux couleurs en combinant la technique de PALM et de dSTORM. Nous avons ainsi révélé que le complexe ARP2/3 s'immobilise à proximité de la densité post synaptique (PSD), marquée par la PSD-95. Son activateur, le complexe WAVE, est co-localisé avec la PSD. IRSp53, une protéine membranaire nécessaire à l'activation du complexe WAVE, co-localise également avec la PSD. L'étude des propriétés de diffusion du complexe WAVE et d'IRSp53 en utilisant le sptPALM a également montré que ces derniers sont immobilisés et confinés à la PSD formant un large domaine stable au cours du temps. Ainsi, la zone de rencontre la plus probable entre le complexe ARP2/3 et les protéines nécessaires à son activation se situe dans un domaine, probablement membranaire, proche de la PSD. En revanche, l'élongation des bouts barbés de F-actine, visualisée grâce à la protéine VASP, est délocalisée en périphérie de la PSD. De plus VASP, est concentré à l'extrémité des protrusions membranaire de l'épine. Tous ces résultats démontrent que dans les épines, à l'inverse du lamellipode, la formation de réseaux branchés d'actine a lieu au niveau de la PSD et non pas à l'extrémité des protrusions membranaires. Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation et aux propriétés diffusives de Rac1, activateur du complexe WAVE. La protéine Rac1 sauvage et son dominant négatif (Rac1-T17N) diffusent librement à la membrane. Par contre, une forme constitutivement active de Rac1 (Rac1-Q61L) s'immobilise dans les épines. L'état actif de Rac1 est donc associé à son immobilisation. Ceci suggère que le complexe WAVE est confiné à la PSD où il est prêt à être activé par une interaction transitoire avec son activateur Rac1. En accord avec un rôle essentiel de Rac1 dans la morphologie des épines, l'inhibition (Rac1-T17N) et la sur-activation (Rac1-Q61L) induisent respectivement la disparition de protrusions membranaire et la transformation des épines en structures lamellipodiales. Ces dernières comportent un large front de migration où VASP est localisé, démontrant que l'élongation des réseaux branchés d'actine peut être induite par VASP dans les épines. De plus, le complexe WAVE est délocalisé de la PSD vers les extrémités membranaires. Ces résultats démontrent que les épines comportent tous les éléments nécessaires à la formation de lamellipodes. Cependant, un contrôle strict de l'activité de Rac-1 permet d'éviter la transformation des épines en mini-lamellipodes.

L'ensemble de ces résultats démontre que la formation d'un réseau d'actine branché dans les épines dendritiques est spatialement régulée par la séquestration du complexe WAVE et d'IRSp53 à la PSD. Ceci crée une architecture originale dans laquelle la nucléation par ARP2/3 a lieu proche de la PSD et génère un réseau d'actine branché peu dynamique. Puis de part la contrainte physique que représente la PSD, l'élongation des filaments se délocalise à l'extérieur de la PSD afin de générer des protrusions membranaires. La formation de ces réseaux d'actine branchés pourrait être fortement contrôlée par l'état d'activation de Rac1 et pourrait représenter l'amorce afin d'induire un élargissement de l'épine dendritique lors de la plasticité synaptique.

Title: Dynamic nanoscale organizations of branched actin networks within dendritic spines

Anaël Chazeau^{1,2}, Deepak Nair^{1,2}, Jérémie Gautier³, Cécile Leduc^{4,5}, Olivier Thoumine^{1,2}, Daniel Choquet^{1,2}, Alexis Gautreau³, Jean-Baptiste Sibarita^{1,2}, and Grégory Giannone^{1,2†}

¹Univ. Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

²CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

³CNRS UPR3082, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

⁴Univ Bordeaux, LP2N, F-33405 Talence, France

⁵CNRS & Institut d'Optique, LP2N, F-33405 Talence, France

†Corresponding author

Key Words: actin binding proteins, Arp2/3 complex, WAVE complex, dendritic spine, single protein tracking, super-resolution microscopy

Abbreviations:

ABPs: actin binding proteins

Arp2/3: actin related proteins 2/3

D: diffusion coefficient

DIV: days *in vitro*

dSTORM: direct stochastic optical reconstruction microscopy

F-actin: actin filaments

FRAP: fluorescent recovery after photobleaching

IRSp53: insulin receptor tyrosine kinase substrate p53

PSD: post synaptic density

PALM: photoactivation localization microscopy

r_{conf} : confinement radius

spt: single protein tracking

sptPALM: single protein tracking by photoactivation localization microscopy

TM: transmembrane protein

VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein

WAVE: WASP-family verprolin homologue

Abstract

Morphological remodeling of dendritic spines in neurons is constant and coupled to changes in synaptic transmission. Spines movements are driven by actin filaments (F-actin) assembly, yet the dynamic organization of actin regulatory proteins initiating branched F-actin in spines is unknown. Using single protein tracking and super-resolution imaging we show that in spines branched F-actin networks are growing outwards from the post-synaptic density (PSD) but not inward from the tip of membrane protrusions. The zone of highest convergence between the Arp2/3 complex and its activators is close to the PSD. This includes the WAVE complex, IRSp53 and Rac GTPase. This is consistent with nucleation of branched F-actin surrounding the PSD visualized by Arp2/3 immobilization, but also with the slow rate and weak polarity of Arp2/3 movements in spines. In contrast, elongating F-actin barbed ends, visualized by VASP, delocalized outwards from the PSD with the tip of Rac-dependent membrane protrusions. This organization is opposite to classical motile structures such as the lamellipodium where branched F-actin nucleation and elongation are triggered at the tip of protrusions. The spatial association of the PSD with branched actin nucleations might support a temporal relationship between synaptic activity and spine structural plasticity.

Introduction

In the brain most excitatory post-synapses are small protrusions called dendritic spines. The morphological remodeling of spines is coupled to changes in synaptic transmission. This constitutes a structural plasticity often associated with learning and memory. Indeed, studies indicate that long term potentiation and depression could be supported respectively by spine head enlargement and shrinkage (Cingolani and Goda, 2008; Matsuzaki et al., 2004; Okamoto et al., 2004; Zhou et al., 2004). A hallmark of spines is their constant movements, with timescales ranging from minutes for the PSD (Blanpied et al., 2008) to tenth of seconds for spine membrane outline (Ackermann and Matus, 2003; Dunaevsky et al., 1999; Fischer et al., 1998). Two coordinated processes are required to induce spine morphological remodeling, regulation of membrane surface area (Park et al., 2006) and reorganization of the actin cytoskeleton (Cingolani and Goda, 2008). The later is based on assembly, stabilization and disassembly of actin filaments (F-actin) which are concentrated in dendritic spines (Fukazawa et al., 2003; Okamoto et al., 2004). Thus spines could be considered as genuine motile structures both in dissociated neuronal cultures and in intact brains (Berning et al., 2012; Dunaevsky et al., 1999; Matus, 2005) as F-actin dynamics can generate and relive forces on the PSD (Blanpied et al., 2008) and spine membranes (Dunaevsky et al., 1999; Fischer et al., 1998). The organization of F-actin in spines could control neurotransmitter receptors and scaffolds anchoring independently or in coordination with changes in PSD and spine sizes (Allison et al., 1998; Kerr and Blanpied, 2012; Kuriu et al., 2006). However, the exact organization and dynamics of F-actin and actin regulatory proteins in dendritic spines are still unknown.

Essential actin regulatory proteins are located in spines. Among them, proteins involved in the polymerization, stabilization and depolymerization of branched F-actin network are critical in the control of spinogenesis and spine morphology. This includes the Rho GTPase Rac which activates the nucleating promoting factors the WAVE complex (Impey et al., 2009; Kim et al., 2006; Soderling et al., 2007; Tashiro and Yuste, 2004). WAVE activates the Arp2/3 complex triggering nucleation of branched F-actin (Hotulainen et al., 2009; Korobova and Svitkina, 2010). After nucleation, the control of F-actin length and turnover is ensured by elongating factors such as VASP (Lin et al., 2010), capping proteins (Fan et al.,

2011; Korobova and Svitkina, 2010), and F-actin severing proteins such as ADF/cofilin (Gu et al., 2010). Numerous studies demonstrated that perturbation of these key proteins alters synaptic transmission, synaptic plasticity and cognitive functions (Haditsch et al., 2009; Lin et al., 2010; Soderling et al., 2007; Soderling et al., 2003).

The actin regulatory proteins present in spines matches the ones controlling the formation of motile structures such as the lamellipodium (Hotulainen et al., 2009; Vicente-Manzanares et al., 2009) suggesting that assembly and disassembly of branched F-actin networks in spines use similar mechanisms. The respective localization and dynamics of actin regulatory proteins in the lamellipodium determine the polarity, architecture and movements of branched F-actin networks. Consequently, the mechanisms regulating their localization and dynamics will control the direction and extend of forces generated by F-actin and the function associated with these forces. Using conventional fluorescent microscopy with spatial resolution above the diffraction limit (200 nm) the localization and dynamics of actin regulatory proteins could be directly linked to their function in large structures such as the lamellipodium. For instance, WAVE and VASP driving respectively actin nucleation and elongation are localized at the tip of membrane protrusion where free actin barbed ends are concentrated (Miki et al., 2000; Rottner et al., 1999). Activated Arp2/3 complex and G-actin are incorporated in F-actin branched networks growing inward from the tip, while ADF/cofilin associates with the entire protruding network inducing depolymerization/severing of the F-actin network (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008). This organization agrees with the treadmilling model of F-actin incorporation leading to a concerted retrograde flow of the branched actin network (Pollard and Cooper, 2009). However, within the micron size spines, classical photonic microscopy techniques could not achieved the spatial resolution required to study the relationship between actin regulatory proteins dynamic organization and their functions.

Using single protein tracking and super-resolution microscopy we deciphered the dynamic nanoscale organization of actin regulatory proteins associated with branched F-actin networks in mature neuronal dendritic spines. We reveal a zone of highest convergence between free diffusing Arp2/3 complex and its activators, the WAVE complex, IRSp53 and Rac1 GTPase. Dual color super-resolution images of actin regulatory proteins and PSD95 demonstrate that this zone of convergence is close to the PSD. Accordingly, the

region surrounding the PSD is the location where nucleation of branched F-actin networks occurs with the highest probability. In contrast, VASP which elongates F-actin barbed ends is enriched and moves outwards with the tip of membrane protrusions. This organization supports that in spines, contrary to the lamellipodium, branched F-actin networks are not growing inward from the tip of membrane protrusions, but are growing outwards from the PSD, which is consistent with the slow rate and weak polarity of Arp2/3 and F-actin movements. Inhibition and stimulation of Rac activity respectively eliminates membrane protrusions or turns normal spines into lamellipodial-like structures. These results suggest that activation of Rac and downstream effectors are tightly controlled during basal synaptic activity, but that their enhanced activation could be essential to trigger spine enlargement during structural plasticity.

Results

Free-diffusing Arp2/3 complexes become immobilized in F-actin networks in spines

The Arp2/3 complex, which nucleates branched F-actin, is involved in dendritic spine formation, suggesting that the continual nucleation of branched F-actin networks maintain the globular shape of the spine head (Hotulainen et al., 2009; Wegner et al., 2008). We performed single protein tracking (spt) and super-resolution microscopy to characterize Arp2/3 displacements and distributions within spines at a resolution well below the diffraction limit. We first studied the diffusion properties of Arp2/3 in mature spines of 17-21 DIV primary rat hippocampal neurons. The ArpC5A subunit of the Arp2/3 complex was fused to a photo-switchable mEOS2 fluorescent protein (ArpC5A-mEOS2). After mEOS2 photo-activation and localization we generated super-resolution intensity images (PALM) (Betzig et al., 2006) or performed single protein tracking (sptPALM) (Manley et al., 2008). Diffraction limited and super-resolution fluorescence images showed that ArpC5A is concentrated in the spine compared to the dendritic shafts (Fig. 1a, Supplementary Fig. S1). Using sptPALM, we reconstructed thousands ArpC5A-mEOS2 trajectories in dendritic spines and shafts (Fig. 1b). For trajectories lasting more than 600 ms (12 points<), we computed the mean square displacement (MSD), which describes the diffusion properties of a molecule. We sorted trajectories according to their diffusion modes (immobile, confined, free-diffusive; Fig. 1b,i) and extracted diffusion coefficients (D) (Fig. 1g,j, Supplementary Table S1, see Methods) (Rossier et al., 2012). Within the spatial resolution of our experiments (~55 nm, see methods), all the molecules with a D inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ are seen as immobile.

Mapping trajectories and associated D within dendritic shafts and spines, showed a high heterogeneity of Arp2/3 diffusion modes in both sub-cellular regions. The distribution of D showed that ArpC5A-mEOS2 were mainly immobile in spines ($57 \pm 3\%$, Fig. 1g,i), the remaining ones displaying either confined diffusion ($24 \pm 2\%$, Fig. 1i; $D_{\text{conf}} = 0.027 \pm 0.001 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, Supplementary Table S1) or free-diffusion ($19 \pm 1\%$; $D_{\text{diff}} = 0.056 \pm 0.001 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, Fig. 1i,j). In the shaft, the fraction of immobile ($54 \pm 2\%$), confined ($22 \pm 1\%$) and free-diffusive ($24 \pm 2\%$) Arp2/3 were similar (Fig. 1i), but confined and free-diffusion were faster compared to spines ($D_{\text{conf}} = 0.036 \pm 0.002 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $D_{\text{diff}} = 0.084 \pm 0.003 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, Fig. 1j). The distribution of D for actin-mEOS2 was similar to that of Arp2/3 (Fig. 1c,d,g). Like the Arp2/3 complex, actin-mEOS2

were mainly immobile in spines ($56\pm 2\%$) and in shafts ($68\pm 3\%$)(Fig. 1i). However, actin free and confined diffusion were slower than for Arp2/3 both inside and outside spines and close to values measured for fixed actin-mEOS2 (Fig. 1j, Supplementary Table S1). Therefore, these results suggest that large fractions of Arp2/3 complex and actin are incorporated in F-actin networks both in the shaft and in the spine. However, Arp2/3 complex displaying fast free-diffusion are detected both in spines and shafts and could thus constitute a dynamic pool readily available for new nucleation events.

To test if ArpC5A immobilization in spines depends on its incorporation in branched F-actin networks, we disrupted F-actin using Latrunculin A (LatA, $1\mu\text{M}$), which sequesters actin monomers (Allison et al., 1998). Diffraction limited fluorescence images displayed loss of actin-GFP and Arp2/3-GFP accumulation in spines but without disassembly of Homer1C-DsRed, used as a PSD reporter (Supplementary Fig. S1). Disassembly of F-actin should increase the fraction of free-diffusing actin-mEOS and ArpC5A-mEOS2. Indeed, LatA treatment induced a redistribution of D towards faster diffusion and lowers the fraction of immobilization for Arp2/3 and actin both in spines and shafts (Fig. 1h,i, Supplementary Fig. S1). Diffusion properties in LatA conditions tends towards values measured for cytosolic mEOS2 and mEOS2 anchored to inner leaflet lipids (CAAX-mEOS2) (Fig. 1e,h-j, Supplementary Fig. S1). Thus in spines and shafts Arp2/3 are mainly incorporated in branched actin networks.

To assess the time of Arp2/3 insertion in F-actin networks, we used the previous sptPALM experiments to measure the duration of immobilization zones, identified as locations where repetitive mEOS2 fluorescence were detected (Fig. 2a) (Rossier et al., 2012; Shroff et al., 2008). Arp2/3 immobilizations in spines were transient with 80% of events lasting less than 30 s (Supplementary Fig. S2). As a control, the duration measured for Arp2/3 in fixed cells were longer than in live cells. Furthermore, Arp2/3 immobilization locations were changing continually within the spine (Fig. 2a). Actin-mEOS2 also exhibited transient immobilizations relocating within spines (Fig. 2b). This is in contrast to long-lasting (45 min) domains of immobilization observed for AMPA receptors using the same protocol, which corresponds to several AMPAR associated in clusters (Nair et al., unpublished). The short durations of Arp2/3 and actin immobilization zones are consistent with ensemble measurements using fluorescence recovery after photobleaching or photo-activation

experiments demonstrating that F-actin in spines is mainly composed of a dynamic pool (Honkura et al., 2008; Star et al., 2002b). Thus Arp2/3 immobilization zones are associated with transient structures probably related to the assembly and disassembly of F-actin branched networks within dendritic spines.

F-actin branches are not exhibiting a concerted rearward flow in spines

Once free-diffusive Arp2/3 complexes are incorporated in F-actin branches their movements should follow the movements of F-actin networks. Studies reported slow velocity of the bulk rearward F-actin flow in dendritic spines (7-20 nm.s⁻¹) (Frost et al., 2010; Honkura et al., 2008). However, tracking individual actin in spines revealed both stationary to slow moving F-actin (0-20 nm.s⁻¹) (Tatavarty et al., 2009) and fast moving F-actin (~40 nm.s⁻¹) (Frost et al., 2010). In the lamellipodium and growth cone, the F-actin rearward movements are highly polarized and fast (30-100 nm.s⁻¹) and could be univocally attributed to F-actin networks growth against the tip of membrane protrusions (Giannone et al., 2007; Lai et al., 2008; Medeiros et al., 2006; Ponti et al., 2004). Although, F-actin stabilization induced by Jasplakinolide decreases F-actin motion in spines (Frost et al., 2010), strong evidences that a concerted F-actin rearward movements exist in spines are lacking. Using sptPALM, we measured the occurrence of actin movements in the growth cone compare to dendritic spines using actin-mEOS2. To measure this flow we used low frequency acquisition (0.5 Hz) to capture actin slow movements (Frost et al., 2010; Tatavarty et al., 2009). We analyzed trajectories longer than 4 s and measured the start to end rate of movements, giving a minimal resolution of 6 nms/s (see methods). In the growth cone a large fraction (71 %) of actin-mEOS2 were moving rearward at speeds superior to 30 nm.s⁻¹ (Fig. 2c,f; median 52 nm.s⁻¹). This fast flow of F-actin was highly polarized rearward and drastically decreased by Cytochalasin D treatment (CD, 1μM), demonstrating that F-actin flow was largely powered by actin polymerization (Fig. 2f; >30 nm.s⁻¹, 32%; median 21 nm.s⁻¹). On the contrary, only a reduced fraction of F-actin in spines was moving with fast velocities (Fig. 2c,f; >30 nm.s⁻¹, 31%; median 21 nm.s⁻¹). In addition, those movements were not polarized demonstrating the absence of concerted F-actin flow. CD treatment, which stops membrane protrusions in spines (Fischer et al., 1998), decreased the occurrence and velocities of F-actin movements to the level measured in fixed cells (Fig. 2c,e,f; >30 nm.s⁻¹, 22%; median 14 nm.s⁻¹

¹). Therefore, those movements could depend on forces generated by assembly and disassembly of F-actin networks during spine motility. To ensure, that the slow rates and absence of polarity of F-actin movements were not a bias of the small size of spines, we performed the same experiments in dendritic filopodia precursors of spines. F-actin rearward movements in dendritic filopodia were highly polarized from the tip to the shaft and faster (Fig. 2e,f; $>30 \text{ nm.s}^{-1}$, 57%; median 34 nm.s^{-1}). To directly measure movements of branched F-actin networks we performed the same experiments on ArpC5A-mEOS2. Like actin-mEOS2, a large fraction of ArpC5A-mEOS2 displayed fast rearward flow in the growth cone (Fig. 2d,f; $>30 \text{ nm.s}^{-1}$, 70 %, median 55 nm.s^{-1}). In spines, the movements of ArpC5A-mEOS2 were not polarized and as slow as actin-mEOS2 (Fig. 2d,f; $>30 \text{ nm.s}^{-1}$, 39 %; median 22 nm.s^{-1}). All together, those results demonstrate that in spines branched F-actin slow motions are not driven by a concerted actin flow like in the dendritic filopodium, growth cones or lamellipodium.

Arp2/3 nucleations occur close to the PSD while elongation are delocalized outwards with the tip of membrane protrusions

Working hypotheses on F-actin dynamics in dendritic spines were built in analogy with the lamellipodium and the growth cone (Frost et al., 2010; Vicente-Manzanares et al., 2009). In those structures, the WAVE complex is localized at the tip of membrane protrusions where free actin barbed ends are concentrated (Miki et al., 2000). Thus, activated Arp2/3 complex and G-actin are incorporated in an F-actin branched networks flowing inward from the tip (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008). However, the low occurrence and weak polarity of F-actin rearward flow in spines suggest that actin regulatory proteins are organized differently. The WAVE complex is composed of five proteins: WAVE, Abi, Nap, Brick, Sra (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004). Diffraction limited fluorescent images showed that WAVE and Abi1 are located in spines (Proepper et al., 2007; Soderling et al., 2007), consistent with the involvement of the WAVE complex in shaping dendritic spine morphology, synaptic plasticity and behavior (Kim et al., 2006; Soderling et al., 2007; Soderling et al., 2003). We used Abi1-mEOS2 to determine the sub-spine organization of the WAVE complex. To determine the global nanoscale distribution of actin regulatory proteins in living spines we enhanced laser illumination and acquisition frequency (100 Hz) to

increase the rate of mEOS2 photobleaching and the frequency of localization (high frequency sptPALM). This protocol allowed the fast (80 s) localization of most mEOS2 in the spine (Fig. 3a-c). Super-resolution intensity images were reconstructed to measure the dispersion of immobile to slowly mobile mEOS2 within spines (Fig. 3d,e)(see methods). This was quantified by the median distance from the center of mass of detections per spine. This analysis confirmed that ArpC5-mEOS2 is organized as multiple immobilization zones scattered within the spine (Fig. 3a,d,e). Surprisingly, Abi1-mEOS2 fluorescence events were less scattered and detected in the same area within the spine, forming a large central domain (Fig. 3b,d,e).

To directly examine the relative nanoscale distribution of Arp2/3 and WAVE complexes compare to the PSD we performed dual colors super-resolution microscopy using sequential PALM and direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) (van de Linde et al., 2011) in fixed neurons. Arp2/3 complexes were imaged using PALM of ArpC5A-mEOS2, while the PSD was imaged using dSTORM of endogenous PSD-95. In spines, super-resolution dSTORM images demonstrated that PSD-95 signal were regrouped into a single large zone, or more rarely multiple apposed zones (Fig. 3f-h). Arp2/3 complex densities were surrounding the PSD-95 zone but without complete co-localization (Fig. 3f). Strikingly, the central domain of Abi1-mEOS2 was co-localized with PSD-95 (Fig. 3g). These results demonstrate that a zone of convergence between Arp2/3 and WAVE is localized in close proximity to the PSD, suggesting that the majority of WAVE-dependent activation of Arp2/3 probably occurs at this zone.

IRSp53 is localized like the Wave complex at the tip of the lamellipodium and was demonstrated to bind and regulate the WAVE complex (Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006). This membrane and F-actin binding protein encompasses an I-BAR domain forming a convex surface enabling binding to outwardly curved membrane protrusions (Suetsugu and Gautreau, 2012). IRSp53 is concentrated in spines and regulate spine morphology (Bockmann et al., 2002; Choi et al., 2005). Experiments performed with IRSp53-mEOS2 demonstrated that like Abi1-mEOS2, IRSp53 formed a large central domain co-localized with PSD-95 (Supplementary Fig. S3). These results suggest that a membrane domain targeted by IRSp53 and apposed to the PSD, like at the lamellipodium tip, is involved in initiation of branched F-actin networks.

After nucleation of F-actin branches, elongation of F-actin could extend out of the PSD allowing the generation of forces punching membrane outward responsible for spine motility. Accordingly, actin-mEOS2 extensions passed beyond the PSD-95 zone (Supplementary Fig. S4) and might correspond to membrane protrusion composed of F-actin branches since Arp2/3-mEOS2 densities were also found surrounding PSD-95. The VASP elongating/anti-capping protein interacts with free F-actin barbed end and localizes at the tip of membrane protrusion in the lamellipodium and growth cone (Bear et al., 2002; Lanier et al., 1999; Rottner et al., 1999). VASP is located in spines and regulates spine morphology and enlargement (Ackermann and Matus, 2003; Lin et al., 2010). We used VASP-mEOS2 to determine the sub-spine location of F-actin elongation and free F-actin barbed ends. Strikingly, high frequency sptPALM demonstrated that VASP-mEOS2 is concentrated at the very tip of membrane protrusions in spines (Fig. 3c,d,e, Supplementary Figure S4). This localization was confirmed by dual colors PALM/dSTORM images, demonstrating that most VASP-mEOS2 densities were located away from the PSD-95 zone (Fig. 3h). This localization is in agreement with the localization of VASP-mEOS2 at the tip of membrane protrusion in the lamellipodium and in the growth cone (Bear et al., 2002; Lanier et al., 1999; Rottner et al., 1999). However, on the contrary to the lamellipodium and the growth cone, in spines VASP is not co-localized with the WAVE complex and IRSp53. This organization is not in agreement with the treadmill model of actin incorporation where branched actin networks nucleation and elongation occur at the tip of membrane protrusions. The central location of the WAVE complex and IRSp53 rather suggest that in dendritic spines branched F-actin network are growing outwards from the PSD.

WAVE and IRSp53 are associated with confined components of the PSD

Both the WAVE complex and IRSp53 are interacting with PSD components, respectively CAMKII, ProSAP2/Shank3 (Park et al., 2012; Proepper et al., 2007) or PSD-95, Shank1 (Bockmann et al., 2002; Choi et al., 2005). Next we investigated WAVE and IRSp53 displacements at the PSD-95 domain. AMPA receptors are recruited to the PSD by a diffusion/trapping mechanisms involving indirect binding to PSD-95 leading to immobilization (Bats et al., 2007; Opazo et al., 2010). To study the diffusion properties of the

WAVE complex in spines, we performed sptPALM experiment using Abi1-mEOS2 (Fig. 4a,b). Distributions of D were shifted towards faster diffusions compared to F-actin and Arp2/3 (Fig. 4e). Both in shafts and spines, the fraction of immobilized Abi1-mEOS2 were lower, and the fractions of confined and free-diffusion were larger (Fig. 4f, Supplementary Table S1). On the contrary to ArpC5-mEOS2, which displayed transient zones of immobilization continually relocating in the spine (Fig. 2a), numerous Abi1-mEOS2 trajectories were detected in the same area within the spine (Fig. 4h), forming the larger domain observed using high frequency sptPALM experiments (Fig. 3b,g). This central Abi1-mEOS2 domain was long-lasting since it remained for the entire duration of the sptPALM sequence (800 s) (Fig. 4h). Interestingly, this central pool corresponded to both immobile and confined Abi1-mEOS2 trajectories (Fig. 4h). In addition, LatA treatment did not induce loss of Abi1-GFP accumulation in spines, which remained associated with the PSD (Supplementary Fig. S5), demonstrating that WAVE recruitment at the PSD is not mediated by interactions with the F-actin networks. Experiments performed with IRSp53-mEOS2 demonstrated that IRSp53 shared similar dynamics and sub-spine localization than Abi1 (Fig. 4e-g, Supplementary Fig. S3). Many immobile and confined trajectories formed a IRSp53 domain located close to the PSD (Supplementary Fig. S3). Thus, on the contrary to F-actin and Arp2/3 which are immobilized in spines, these results suggest that the WAVE complex and IRSp53 are retained in spines by an association with immobile but also confined molecules. Compared to Abi1-mEOS2, distribution of D for IRSp53-mEOS2 and VASP-mEOS2 were further shifted towards faster diffusions converging to values measured for CAAX, especially on shafts (Fig. 4c-g). This suggests that compare to WAVE, larger fractions of IRSp53 and VASP are freely diffusing at the inner plasma membrane. However, both the WAVE complex, IRSp53 and VASP need to be associated with the plasma membrane to perform their functions (Breitsprecher et al., 2011a; Chen et al., 2010; Lebensohn and Kirschner, 2009; Miki et al., 2000). Thus, the membrane apposed to the PSD, like the lamellipodium tip, could be a domain where the WAVE complex and IRSp53 are confined to perform their functions.

Rac activation is correlated to Rac membrane immobilization

The Rac GTPase are targeted to the plasma membrane where they activate the WAVE complex and consequently Arp2/3-dependent nucleation (Chen et al., 2010; Lebensohn and Kirschner, 2009; Miki et al., 2000). In agreement with the involvement of Arp2/3 in determining the shape of dendritic spines, gain and loss of Rac1 activity induce respectively spine growth and shrinkage (Tashiro and Yuste, 2004). We next examine the dynamic organization of Rac using Rac-mEOS2 (Fig. 5a,b). The diffusive properties of Rac-mEOS2 were similar to CAAX-mEOS2 (Fig. 5g-i), supporting that Rac has a large free-diffusing membrane pool. Activation of Arp2/3 in cells probably requires the coordination in space and times of different signals including WAVE, IRSp53, PIP3, prenylated and GTP-bound Rac (Chen et al., 2010; Lebensohn and Kirschner, 2009; Miki et al., 2000). Since the WAVE complex and IRSp53 displayed confinement and immobilization close to the PSD, Rac interactions with those proteins should trigger Rac confinement and/or immobilization. The fast membrane free-diffusion of Rac-mEOS2 suggests either that Rac binding and activation of WAVE is a process faster than our acquisition frequency, or that such events are infrequent. We then tested the dynamic organization of a dominant negative mutant of Rac, RacT17N-mEOS2 (Fig. 5e,f). RacT17N-mEOS2 exhibited, like wild type Rac, a large free-diffusing membrane pool (Fig. 5g-i). Over-expression of RacT17N-mEOS2 induced the transformation of spines into filopodia (Fig. 5e), demonstrating that Rac activity is critical to maintain the globular shape of the spine head, probably through WAVE and Arp2/3 activation. To force Rac activation we used the constitutively active RacQ61L-mEOS2 (Fig. 5c,d). This mutation locks Rac in the GTP-bound state preventing inactivation. Strikingly, RacQ61L-mEOS2 was strongly immobilized both in spines and shafts (Fig. 5c,d). Distributions of D were shifted towards slower diffusion (Fig. 5g), fractions of immobilization were increased close to values measured for F-actin and Arp2/3 (Fig. 5h), and free-diffusion were drastically slow down (Fig. 5i). Thus mEOS2 fusion to RacQ61L and RacT17N does not prevent respectively Rac inactivation and activation, suggesting that fusion to wild type Rac will preserve its function. These results strongly suggest that Rac activation is correlated to Rac membrane immobilization and confinement only detectable in our experimental conditions when Rac is lock in its active state.

Rac activity controls the nanoscale organization of actin regulatory proteins in spines

Since GTP-bound Rac interacts and activates the WAVE complex (Chen et al., 2010), we tested if RacQ61L could challenge the organization of actin regulatory proteins involved in branched F-actin nucleation and elongation within the spines. We co-transfected RacQ61L-cerulean with mEOS2 fused proteins and performed sequential PALM and dSTORM of respectively mEOS2 and endogenous PSD-95. Over-expression of RacQ61L-cerulean induced profound morphological alterations of dendritic spines, being either transformed into individual small lamellipodial-like extension or merge into larger lamellipodial-like extension (Fig. 6, Supplementary Fig. S6). Like in spines, PSD-95 was located in the head of smaller extensions, while in larger extension PSD-95 was relocated at the junction with the shaft (Fig. 6, Supplementary Fig. S6). We examined if VASP localization at the tip of membrane protrusions was affected. Both in small and large extensions VASP formed a distinct rim at the tip of extensions matching the organization of VASP in the lamellipodium of motile cells (Fig. 6a, Supplementary Fig. S6). This result confirms that VASP-mEOS2 densities in normal spines correspond to tip of membrane protrusions (Fig. 3, Supplementary Fig. S4, Supplementary Movie S1), and suggests that the generation of those protrusions involve Rac-dependent Arp2/3 activation. Next we examine if Abi1-mEOS2 localization close to the PSD was perturbed by constitutively active RacQ61L (Fig. 6b, Supplemental Fig. S6). Strikingly, Abi1-mEOS2 were displaced from the PSD and localized like VASP at the tip of membrane extensions, like in the lamellipodium. These results suggest that all the machinery responsible for the generation of lamellipodial-like protrusion are present and could be activated in normal spines. However, in basal conditions critical upstream activators of the Arp2/3 complex, such as the WAVE complex and IRSp53, are sequestered close to the PSD by active processes. Our results demonstrate that those active processes could be overcome when Rac is abnormally active, suggesting that Rac activity is tightly controlled during basal synaptic transmission.

Discussion

The exact organization and polarity of F-actin networks in spines are still undefined. First, distinct pools of F-actin are co-existing in spines. Therefore, a unique polarity is probably unlikely. Ensemble measurement using fluorescence recovery after photobleaching or photo-activation showed that F-actin in spines is composed of a dynamic and stable pools (Honkura et al., 2008; Star et al., 2002b). Membrane protrusions of motile cells are also based on a dual F-actin organization, where a dynamic lamellipodium is co-localized with a more static lamella (Giannone et al., 2007; Ponti et al., 2004; Xu et al., 2012). Inhibition of actin polymerization by CD greatly reduces the fraction of the dynamic pool (Star et al., 2002a), though the stable pool remains localized in spines (Allison et al., 1998). Since, CD also rapidly stops the formation of membrane protrusion and resulting spine motility (Dunaevsky et al., 1999; Fischer et al., 1998), these studies suggest that the F-actin dynamic pool is associated with actin-driven membrane protrusions in spines. Second, electron microscopy (EM) studies are based on thin sectioning of spines. Therefore, the resulting EM micrographs give an incomplete picture of F-actin networks in spines, often focusing on F-actin and ABPs localized in the spine cytoplasm between the PSD and the shaft (Racz and Weinberg, 2012). Within this region, early EM studies showed that F-actin barbed ends could contact the PSD, implying that pointed ends are directed towards the shaft (Fifkova and Delay, 1982). This orientation is consistent with F-actin movements directed from the PSD towards the shaft (Frost et al., 2010) or with myosinV-driven ER incursion within the spine (Wang et al., 2008). However, EM micrographs also demonstrated the existence of thin actin-dependent protrusions emerging from the spine head named spinules (Weiler and Janssen-Bienhold, 1993). These spinules could correspond to F-actin membrane projection extending from and retracting towards the spine center and described using diffraction limited light microscopy (Edwards, 1998; Fischer et al., 1998), super-resolution STED (Berning et al., 2012) and PALM (Izeddin et al., 2011). However, the architecture and polarity of actin-driven membrane protrusions in spines remains uncertain.

The classical model for actin-driven membrane protrusions suggests that growing F-actin barbed ends are directed towards the tip of cell extension, where nucleation and elongation of F-actin branches are catalysed (Fig. 7). The location of the WAVE complex,

VASP and capping proteins at the tip of membrane protrusion support that model (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008; Rottner et al., 1999), where the formation of new branched actin networks leads to forward protrusions of the tip and/or F-actin and Arp2/3 rearward flow. However, a recent study suggests that this organization could be turned upside down, with growing F-actin barbed ends going away from the zone of nucleation (Sykes and Plastino, 2010). This was demonstrated in *in vitro* reconstitution experiments where actin branched networks elongate with all barbed ends growing away from a nucleating promoting factors-coated surface (Achard et al., 2010). This orientation of barbed ends away from the site of nucleation could result from the physical barrier of the stiff coated-surface. The respective nanoscale dynamic organization of actin regulatory proteins in spines provide multiple evidences that branched F-actin networks are oriented with their pointed ends towards the PSD and their barbed ends extending out of the PSD. First, the tip of membrane protrusions is enriched in VASP, showing that they contain fast growing F-actin barbed ends. The rate of VASP enriched protrusions is close to the rate of actin-dependent membrane protrusions (around $20 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$) described using diffraction limited and super-resolution imaging (Berning et al., 2012; Fischer et al., 1998), suggesting that they correspond to the same structures. Second, Arp2/3 complex immobilizations are distributed around the PSD, supporting that Arp2/3 incorporations into F-actin branched networks occur at the vicinity of the PSD and not at the tip of protrusions. Third, the WAVE complex and IRSp53 are actively retained close to the PSD, which support once more that Arp2/3 nucleations are initiated close to the PSD. Thus, like *in vitro* systems, the PSD could represent the physical constrain forcing F-actin barbed ends to grow away from the nucleation zone (Achard et al., 2010). Once nucleated, branched F-actin could be anchored to the PSD through cortactin which bridges Arp2/3 and Shank (Hering and Sheng, 2003). In this model (Fig. 7), branched F-actin polymerization from the PSD will not generate a concerted fast rearward flow of actin and Arp2/3 in spines, consistent with our results and previous studies on actin dynamics (Tatavarty et al., 2012; Tatavarty et al., 2009). Disassembly of formed protrusions could occur through ADF/cofilin like in lamellipodium and filopodium (Breitsprecher et al., 2011b; Lai et al., 2008). Accordingly, in cofilin knock down neurons abnormally long protrusions arise from the spine head (Hotulainen et al., 2009).

Activation of the Arp2/3 complex is the final step of synchronized events involving the WAVE complex, IRSp53, prenylated Rac-GTP and acidic phospholipids (PIP3) (Chen et al.,

2010; Lebensohn and Kirschner, 2009; Miki et al., 2000). Arp2/3 regulators are components of the plasma membrane or targeted to it. Consistent with membrane targeting, the fraction of free-diffusing trajectories for IRSp53 and Rac were as high as CAAX. Mixed diffusion modes of Arp2/3, WAVE and RacQ61L prevent to conclude on their membrane targeting. However, on the contrary to F-actin which displays only slow free-diffusion, those proteins also exhibited fast free-diffusion similar to membrane associated proteins. Thus, in agreement with previous reports our study suggests that Arp2/3 is activated in a membrane domain (Lebensohn and Kirschner, 2009; Millius et al., 2011). In addition, our results support that Arp2/3 activation occurs close to the PSD, since both the WAVE complex and IRSp53 exhibit high densities of confinement and immobilization events close to the PSD. Rac can bind and activate WAVE at the membrane surface (Chen et al., 2010). Our experiments using wild type Rac and constitutively active RacQ61L show that Rac immobilization is correlated with Rac activation. However, the larger fraction of WAVE immobilization compared to wild type Rac suggests that Rac bindings to WAVE are transient events difficult to detect in our experimental conditions. Nevertheless, Rac could diffuse close to the PSD to meet and rapidly activate stationary or confined WAVE complexes. In extreme cases, where Rac is locked in its active state, the WAVE complex is relocated to the tip of membrane protrusions together with activated Rac (not shown), supporting that immobilized/activated Rac compete with WAVE binding sites at the PSD. Thus, the zone of highest convergence between all the major effectors of Arp2/3 activation is close to the PSD. Consistent with this hypothesis, PSD components are directly associating with branched F-actin regulatory proteins, and could be responsible for their sequestration. Studies demonstrate that Abi1 is directly interacting with Shank3 and CAMKII α (Park et al., 2012; Proepper et al., 2007), while IRSp53 interacts with Shank1 and PSD95 (Bockmann et al., 2002; Choi et al., 2005). Furthermore PSD-95, which also need membrane targeting to fulfill its functions at the PSD (Craven et al., 1999), exhibits the same confined but not strictly immobile movements than Abi1 and IRSp53 (Nair et al., unpublished). This suggests that those proteins are retained in spines in the same membrane domain.

Synaptic plasticity is associated with modulation of F-actin organization, this structural plasticity is involved during long-term potentiation which depends on F-actin polymerization and spine head growth (Honkura et al., 2008; Matsuzaki et al., 2004; Okamoto et al., 2004). Consistent with the involvement of F-actin cytoskeleton, Rho family

of GTPases have important roles in the morphogenesis of the dendritic spines (Saneyoshi and Hayashi, 2012). It was demonstrated that Rho and cdc42 GTPases are respectively involved in initial spine growth and maintenance of sustained enlargement during structural plasticity (Murakoshi et al., 2011). Rac is the convergence of various signaling pathways triggered following synaptic activity mainly through NMDA calcium influx stimulation of CAMKII (Okamoto et al., 2009). CAMKII is phosphorylating guanine-nucleotide-exchange factors (GEFs) that activate Rac including Kalirin-7 which is involved in spine enlargement (Xie et al., 2007). In addition, CAMKII activation could lead to the release and activation of the WAVE complex (Park et al., 2012). Thus Rac1 could as well be implied in spine structural plasticity, which is consistent with previous studies demonstrating that Rac activity affect spine morphology (Tashiro and Yuste, 2004). Our results showed that uncontrolled Rac activation induced a strong reorganization of actin regulatory proteins in spines, increasing the number of VASP associated protrusions and delocalizing WAVE to the tip of membrane protrusions. However, in basal conditions WAVE and IRSp53 are sequestered close to the PSD where they are ideally located to be rapidly activated by strong synaptic activity. These results imply that Rac activity is tightly controlled during basal synaptic activity, which is consistent with its fast free-diffusion reporting that Rac is mainly in its inactivated state. However, enhanced Rac-dependent Arp2/3 activation could be essential to trigger spine enlargement during structural plasticity. Our study builds stronger bases on the dynamic organization of branched F-actin networks in spines, which is the condition to understand changes in F-actin architecture during synaptic plasticity.

Methods

Cell culture

Preparation of cultured neurons for single particle tracking was performed as previously described (Heine et al., 2008). Hippocampal neurons from 18 day old rat embryos were cultured on glass coverslips following the Banker protocol (Soderling et al., 2007). Neurons were transfected using Effectene at 7 days in vitro (DIV) for spines and for filopodia experiments. For experiments performed on growth cones, neurons were transfected by Nucleofection at the time of plating (Nucleofector™ II Device, Lonza Cologne GmbH, Germany). Experiments were performed at 17-21 DIV for mature dendritic spines, 9-11 DIV for dendritic filopodia, and 3-4 DIV for growth cones. The Latrunculin A used at 1 μ M was purchased from Enzo life science and Cytochalasin-D used at 1 μ M from Sigma.

Antibodies and DNA constructs

Mouse-Anti-PSD95 antibody (MA1-046, Thermo Fisher Scientific, USA). Alexa647 coupled anti-mouse IgG secondary (Invitrogen). Abi1-mEOS2, ArpC5A-mEOS2, CAAX-mEOS2, IRSp53-mEOS2, Rac1-mEOS2, Rac1Q61L-mEOS2, Rac1T17N-mEOS2, VASP-mEOS2 were generated by PCR of the Coding DNA Sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAm-FRT-PC-mEOS2blue at the Fse1 / Asc1 site. Actin-mEOS2 construct was generated by replacing GFP from pEGFP Actin (provided by A. Matus, Friedrich Miescher Institut for Biomedical Research, Switzerland) by mEOS2 at the AgeI/XhoI sites; mEOS2 fragment was obtained by PCR on PrSet-A mEOS2 (Addgene). The fidelity of all constructs was verified by sequencing.

sptPALM

Neurons were imaged at 37°C in a Ludin chamber (Life Imaging Services) with an inverted motorized microscope (Nikon Ti) equipped with a 100x1.45 NA PL-APO objective and a perfect focus system, allowing long acquisition in oblique illumination mode. For photoactivation localization microscopy, neurons expressing mEOS2 tagged constructs were photoactivated using a 405 nm laser (Omicron) and the resulting photoconverted single molecule fluorescence was excited with a 561 nm laser (Cobolt Jive™). Both lasers illuminated the sample simultaneously. Their respective power was adjusted to keep the number of the stochastically activated molecules constant and well separated during the acquisition. Fluorescence was collected by the combination of a dichroic and emission filters (D101-R561 and F39-617 respectively, Chroma) and a sensitive EMCCD (Evolve, Photometric). The acquisition was steered by Metamorph software (Molecular Devices). For trajectories and immobilization zones analysis acquisition were performed at 20 Hz, with low power 561 nm laser illumination (Fig. 1; Fig. 2a,b; Fig. 4; Fig. 5; Fig. S1; Fig. S2; Fig. S3b,c). For high frequency localization of mEOS2 fused proteins we used full power 561 nm laser illumination and 100 Hz acquisition frequency to increase the rate of mEOS2 photobleaching and the frequency of localization (Fig. 3a-e). For flow measurements of actin-mEOS2 and Arp2/3-mEOS2 we used low frequency acquisition (0.5 Hz) to capture mEOS2 slow movements (Fig. 2c-f). For diffraction limited fluorescence images of mEOS2 and GFP constructs were imaged using a conventional GFP filter cube (ET470/40, T495LPXR,

ET525/50, Chroma). We used multicolor fluorescent 100 nm-beads (Tetraspeck, Invitrogen) to register long term acquisitions and correct for lateral drifts.

Single molecule segmentation and tracking

A typical sptPALM experiment leads to a set of 20.000 images per cell analysed in order to extract molecule localization and dynamics. Single molecule fluorescent spots were localized and tracked over time using a combination of wavelet segmentation and simulated annealing algorithms (Izeddin et al., 2012; Racine et al., 2006; Racine et al., 2007). Under the experimental conditions described above, the resolution of the system was quantified to 55 nm (Full Width at Half Maximum, FWHM). This spatial resolution depends on the image signal to noise ratio and the segmentation algorithm (Cheezum et al., 2001) and was determined using fixed mEOS2 samples. We analysed 130 2D distributions of single molecule positions belonging to long trajectories (>30 frames) by bi-dimensional Gaussian fitting, the resolution being determined as $2.3\sigma_{xy}$, where σ_{xy} is the pointing accuracy. For the trajectory analysis, spines and shafts were identified manually in the corresponding super-resolution intensity images. The corresponding region of interests were used to sort single particle data analyses to specific regions.

We analyzed trajectories lasting at least 12 points (>600 ms) with a custom routine written for Matlab using the mean squared displacement MSD computed as (Eq. 1):

$$MSD(t = n \cdot \Delta t) = \frac{\sum_{i=1}^{N-n} (x_{i+n} - x_i)^2 + (y_{i+n} - y_i)^2}{N - n} \quad Eq. 1$$

where x_i and y_i are the coordinates of the label position at time $i \cdot \Delta t$. We defined the measured diffusion coefficient D as the slope of the affine regression line fitted to the $n = 1$ to 4 values of the $MSD(n \cdot \Delta t)$. The MSD was computed then fitted on a duration equal to 80% (minimum of 10 points, 500 ms) of the whole stretch by (Eq 2):

$$MSD(t) = \frac{4r_{conf}^2}{3} (1 - e^{-t/\tau}) \quad Eq. 2$$

where r_{conf} is the measured confinement radius and τ the time constant ($\tau = r_{conf}^2 / 3D_{conf}$). To reduce the inaccuracy of the MSD fit due to down sampling for larger time intervals, we used a weighted fit. Trajectories were sorted in 3 groups: immobile, confined diffusion and free-diffusion. Immobile trajectories were defined as trajectories with $D < 0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, corresponding to molecules which explored an area inferior to the one defined by the image spatial resolution $\sim (0.055 \mu\text{m})^2$ during the time used to fit the initial slope of the MSD (Tardin et al., 2003) (4 points, 80 ms): $D_{\text{threshold}} = (0.055 \mu\text{m})^2 / (4 \times 4 \times 0.05 \text{s}) \sim 0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. To separate trajectories displaying free-diffusion from confined diffusion, we used the time constant τ calculated for each trajectory. Confined and free-diffusing trajectories were defined as trajectories with a time constant τ respectively inferior and superior to half the time interval used to compute the MSD (250 ms).

For flow measurements of actin-mEOS2 and Arp2/3-mEOS2, localized and tracking was performed as described above. We analyzed trajectories longer than 4 s (>8 points), giving a minimal resolution of $6 \text{ nm} \cdot \text{s}^{-1}$ ($55 \text{ nm} / 2.3 / 4 \text{s}$). Start to end rates of movements were computed using a custom routine written for Matlab.

Localization of immobilization zones and measurement of their durations

Immobilization zones correspond to locations where bursts of mEOS2 fluorescence were repeatedly detected during the course of a sptPALM sequence. The duration of immobilization zones was defined as the time interval between the first and the last mEOS2 detection at the same location. We first generated a sptPALM intensity image for each cell (20000 frames, 1000s). Then, the images were processed with a wavelet-based segmentation algorithm to define immobilization zones and generate the corresponding binary mask. Then from the same set of data we generated a super-resolved time-lapse movie (frame rate 1s) and we used the binary mask, to study time evolution of the fluorescence emission within immobilization zones. To eliminate the events stemming from molecules crossing the immobilization area, single molecule detections were taken into account only if at least 3 fluorescent events were occurring within 1 s. To account for blinking (Annibale et al., 2010) of mEOS2, up to 20 s off-times were allowed in a time trace for defining an immobilization event.

Sequential dSTORM and PALM

Primary neuronal cultures transfected with the appropriate mEOS2 construct were fixed using 4% paraformaldehyde and sucrose and washed with PBS and then PBS containing 1% BSA. They were incubated with NH_4Cl 50mM for 15 minutes prior to permeabilization. They were permeabilized using 0.1% Triton and incubated with PBS containing 1% BSA for 30 minutes. They were then incubated with mouse-Anti-PSD95 antibody (MA1-046, Thermo Fisher Scientific, USA) for 30 minutes and washed several times with PBS containing 1% BSA. The primary antibodies were then revealed by incubating Alexa647 coupled anti-mouse IgG secondary (Invitrogen) for 30 min at room temperature.

The stained cover slips were imaged the next day at room temperature in a closed Ludin chamber (Life Imaging Services) mounted on an inverted motorized microscope (Nikon Ti, Japan) equipped with a 100x1.45NA PL-APO objective and a perfect focus system, allowing long acquisition in oblique illumination mode. Imaging was performed in an extracellular solution containing reducing and oxygen scavenging system. For dSTORM, ensemble fluorescence of Alexa647 were first converted in to dark state using a 561 nm laser or 640 nm laser at 30-50 kw/cm^2 intensity. Once the ensemble fluorescence was converted into the desired density of single molecules per frame, the laser power was reduced to 7-15 kw/cm^2 and imaged continuously at 50 Hz for 20,000 frames. The level of single molecules per frame was controlled by using a 405 nm laser (Omicron, Germany). The laser powers were adjusted to keep a specific level of stochastically activated molecules which were well separated during the acquisition. The PALM sequence of the mEOS2 construct (50 Hz for 20,000 frames) was performed just after the dSTORM sequence. Both the ensemble and single molecule fluorescence was collected by the combination of a dichroic and emission filter (D101-R561 and F39-617 respectively, Chroma, USA and quad-band dichroic filter (Di01-R405/488/561/635, Semrock, USA)). The fluorescence was collected using a sensitive EMCCD (Evolve, Photometric, USA). The acquisition sequence was driven by Metamorph software (Molecular Devices, USA) in streaming mode at 50 Hz using an area equal to or less than 256x256 pixels region of interest. We used multicolour fluorescent microbeads (Tetraspeck, Invitrogen) to register long term acquisitions and correct for lateral drifts and chromatic shifts.

References

- Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guerin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol* 20, 423-428.
- Ackermann, M., and Matus, A. (2003). Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci* 6, 1194-1200.
- Allison, D.W., Gelfand, V.I., Spector, I., and Craig, A.M. (1998). Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *J Neurosci* 18, 2423-2436.
- Annibale, P., Scarselli, M., Kodiyan, A., and Radenovic, A. (2010). Photoactivatable Fluorescent Protein mEos2 Displays Repeated Photoactivation after a Long-Lived Dark State in the Red Photoconverted Form. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1, 1506-1510.
- Bats, C., Groc, L., and Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53, 719-734.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., *et al.* (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521.
- Berning, S., Willig, K.I., Steffens, H., Dibaj, P., and Hell, S.W. (2012). Nanoscopy in a living mouse brain. *Science* 335, 551.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642-1645.
- Blanpied, T.A., Kerr, J.M., and Ehlers, M.D. (2008). Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12587-12592.
- Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., and Bockers, T.M. (2002). ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem* 83, 1013-1017.
- Breitsprecher, D., Kiesewetter, A.K., Linkner, J., Vinzenz, M., Stradal, T.E., Small, J.V., Curth, U., Dickinson, R.B., and Faix, J. (2011a). Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J* 30, 456-467.
- Breitsprecher, D., Koestler, S.A., Chizhov, I., Nemethova, M., Mueller, J., Goode, B.L., Small, J.V., Rottner, K., and Faix, J. (2011b). Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments. *J Cell Sci* 124, 3305-3318.
- Cheezum, M.K., Walker, W.F., and Guilford, W.H. (2001). Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys J* 81, 2378-2388.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B., Gomez, T.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M., Umetani, J., Billadeau, D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468, 533-538.
- Choi, J., Ko, J., Racz, B., Burette, A., Lee, J.R., Kim, S., Na, M., Lee, H.W., Kim, K., Weinberg, R.J., *et al.* (2005). Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci* 25, 869-879.
- Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9, 344-356.
- Craven, S.E., El-Husseini, A.E., and Brecht, D.S. (1999). Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 22, 497-509.
- Dunaevsky, A., Tashiro, A., Majewska, A., Mason, C., and Yuste, R. (1999). Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13438-13443.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790-793.
- Edwards, F.A. (1998). Dancing dendrites. *Nature* 394, 129-130.

- Fan, Y., Tang, X., Vitriol, E., Chen, G., and Zheng, J.Q. (2011). Actin capping protein is required for dendritic spine development and synapse formation. *J Neurosci* 31, 10228-10233.
- Fifkova, E., and Delay, R.J. (1982). Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95, 345-350.
- Fischer, M., Kaech, S., Knutti, D., and Matus, A. (1998). Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20, 847-854.
- Frost, N.A., Shroff, H., Kong, H., Betzig, E., and Blanpied, T.A. (2010). Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* 67, 86-99.
- Fukazawa, Y., Saitoh, Y., Ozawa, F., Ohta, Y., Mizuno, K., and Inokuchi, K. (2003). Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron* 38, 447-460.
- Gautreau, A., Ho, H.Y., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4379-4383.
- Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Dobereiner, H.G., Freund, Y., Borisy, G., *et al.* (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561-575.
- Gu, J., Lee, C.W., Fan, Y., Komlos, D., Tang, X., Sun, C., Yu, K., Hartzell, H.C., Chen, G., Bamburg, J.R., *et al.* (2010). ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 13, 1208-1215.
- Haditsch, U., Leone, D.P., Farinelli, M., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., Mansuy, I.M., McConnell, S.K., and Palmer, T.D. (2009). A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci* 41, 409-419.
- Heine, M., Groc, L., Frischknecht, R., Beique, J.C., Lounis, B., Rumbaugh, G., Hugarir, R.L., Cognet, L., and Choquet, D. (2008). Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320, 201-205.
- Hering, H., and Sheng, M. (2003). Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23, 11759-11769.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C., and Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719-729.
- Hotulainen, P., Llano, O., Smirnov, S., Tanhuanpaa, K., Faix, J., Rivera, C., and Lappalainen, P. (2009). Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 185, 323-339.
- Impey, S., Davare, M., Lesiak, A., Fortin, D., Ando, H., Varlamova, O., Obrietan, K., Soderling, T.R., Goodman, R.H., and Wayman, G.A. (2009). An activity-induced microRNA controls dendritic spine formation by regulating Rac1-PAK signaling. *Mol Cell Neurosci* 43, 146-156.
- Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol* 17, 395-406.
- Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, C.G., Kechkar, A., Nair, D., Triller, A., Choquet, D., Dahan, M., and Sibarita, J.B. (2012). Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express* 20, 2081-2095.
- Izeddin, I., Specht, C.G., Lelek, M., Darzacq, X., Triller, A., Zimmer, C., and Dahan, M. (2011). Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS One* 6, e15611.
- Kerr, J.M., and Blanpied, T.A. (2012). Subsynaptic AMPA receptor distribution is acutely regulated by actin-driven reorganization of the postsynaptic density. *J Neurosci* 32, 658-673.
- Kim, Y., Sung, J.Y., Ceglia, I., Lee, K.W., Ahn, J.H., Halford, J.M., Kim, A.M., Kwak, S.P., Park, J.B., Ho Ryu, S., *et al.* (2006). Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 442, 814-817.

- Korobova, F., and Svitkina, T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell* 21, 165-176.
- Kuriu, T., Inoue, A., Bito, H., Sobue, K., and Okabe, S. (2006). Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *J Neurosci* 26, 7693-7706.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *Embo J*.
- Lanier, L.M., Gates, M.A., Witke, W., Menzies, A.S., Wehman, A.M., Macklis, J.D., Kwiatkowski, D., Soriano, P., and Gertler, F.B. (1999). Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22, 313-325.
- Lebensohn, A.M., and Kirschner, M.W. (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* 36, 512-524.
- Lin, W.H., Nebhan, C.A., Anderson, B.R., and Webb, D.J. (2010). Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) induces actin assembly in dendritic spines to promote their development and potentiate synaptic strength. *J Biol Chem* 285, 36010-36020.
- Manley, S., Gillette, J.M., Patterson, G.H., Shroff, H., Hess, H.F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* 5, 155.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- Matus, A. (2005). Growth of dendritic spines: a continuing story. *Curr Opin Neurobiol* 15, 67-72.
- Medeiros, N.A., Burnette, D.T., and Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol* 8, 215-226.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408, 732-735.
- Millius, A., Watanabe, N., and Weiner, O.D. (2011). Diffusion, capture and recycling of SCAR/WAVE and Arp2/3 complexes observed in cells by single-molecule imaging. *J Cell Sci* 125, 1165-1176.
- Murakoshi, H., Wang, H., and Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 472, 100-104.
- Okamoto, K., Bosch, M., and Hayashi, Y. (2009). The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology (Bethesda)* 24, 357-366.
- Okamoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7, 1104-1112.
- Opazo, P., Labrecque, S., Tigaret, C.M., Frouin, A., Wiseman, P.W., De Koninck, P., and Choquet, D. (2010). CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* 67, 239-252.
- Park, E., Chi, S., and Park, D. (2012). Activity-Dependent Modulation of the Interaction between CaMKIIalpha and Abi1 and Its Involvement in Spine Maturation. *J Neurosci* 32, 13177-13188.
- Park, M., Salgado, J.M., Ostroff, L., Helton, T.D., Robinson, C.G., Harris, K.M., and Ehlers, M.D. (2006). Plasticity-induced growth of dendritic spines by exocytic trafficking from recycling endosomes. *Neuron* 52, 817-830.
- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208-1212.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 305, 1782-1786.
- Proepper, C., Johannsen, S., Liebau, S., Dahl, J., Vaida, B., Bockmann, J., Kreutz, M.R., Gundelfinger, E.D., and Boeckers, T.M. (2007). Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J* 26, 1397-1409.

- Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C., and Sibarita, J.B. (2006). Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging*, 1020-1023.
- Racine, V., Sachse, M., Salamero, J., Fraissier, V., Trubuil, A., and Sibarita, J.B. (2007). Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells. *J Microsc* 225, 214-228.
- Racz, B., and Weinberg, R.J. (2012). Microdomains in Forebrain Spines: an Ultrastructural Perspective. *Mol Neurobiol*.
- Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J.B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Tampe, R., *et al.* (2012). Integrins beta(1) and beta(3) exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* 14, 1057-1067.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1, 321-322.
- Saneyoshi, T., and Hayashi, Y. (2012). The Ca(2+) and Rho GTPase signaling pathways underlying activity-dependent actin remodeling at dendritic spines. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69, 545-554.
- Shroff, H., Galbraith, C.G., Galbraith, J.A., and Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods* 5, 417-423.
- Soderling, S.H., Guire, E.S., Kaech, S., White, J., Zhang, F., Schutz, K., Langeberg, L.K., Banker, G., Raber, J., and Scott, J.D. (2007). A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci* 27, 355-365.
- Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J.A., Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J., and Scott, J.D. (2003). Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1723-1728.
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., and Murthy, V.N. (2002a). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5, 239-246.
- Star, E.N., Kwiatkowski, D.J., and Murthy, V.N. (2002b). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5, 239-246.
- Suetsugu, S., and Gautreau, A. (2012). Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends Cell Biol* 22, 141-150.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol* 173, 571-585.
- Sykes, C., and Plastino, J. (2010). Cell biology: actin filaments up against a wall. *Nature* 464, 365-366.
- Tardin, C., Cognet, L., Bats, C., Lounis, B., and Choquet, D. (2003). Direct imaging of lateral movements of AMPA receptors inside synapses. *Embo J* 22, 4656-4665.
- Tashiro, A., and Yuste, R. (2004). Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci* 26, 429-440.
- Tatavarty, V., Das, S., and Yu, J. (2012). Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron. *Mol Biol Cell*.
- Tatavarty, V., Kim, E.J., Rodionov, V., and Yu, J. (2009). Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS One* 4, e7724.
- van de Linde, S., Loschberger, A., Klein, T., Heidebreder, M., Wolter, S., Heilemann, M., and Sauer, M. (2011). Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* 6, 991-1009.
- Vicente-Manzanares, M., Hodges, J., and Horwitz, A.R. (2009). Dendritic Spines: Similarities with Protrusions and Adhesions in Migrating Cells. *Open Neurosci J* 3, 87-96.
- Wang, Z., Edwards, J.G., Riley, N., Provance, D.W., Jr., Karcher, R., Li, X.D., Davison, I.G., Ikebe, M., Mercer, J.A., Kauer, J.A., *et al.* (2008). Myosin Vb mobilizes recycling endosomes and AMPA receptors for postsynaptic plasticity. *Cell* 135, 535-548.
- Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M., and Webb, D.J. (2008). N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J Biol Chem* 283, 15912-15920.

- Weiler, R., and Janssen-Bienhold, U. (1993). Spinule-type neurite outgrowth from horizontal cells during light adaptation in the carp retina: an actin-dependent process. *J Neurocytol* 22, 129-139.
- Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J., and Penzes, P. (2007). Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* 56, 640-656.
- Xu, K., Babcock, H.P., and Zhuang, X. (2012). Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nat Methods* 9, 185-188.
- Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M.M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44, 749-757.

Acknowledgements

We thank B. Tessier, F. Neca, C. Breillat, A. Frouin, D. Bouchet, and P. Gonzales for technical assistance; M. Garcia, J. Petersen, O. Rossier, M. Mondin for helpful discussions; M. Mondin, P. Legros and C. Poujol (Bordeaux Imaging Center) for PALM imaging. We acknowledge financial support from the French Ministry of Research and CNRS, ANR grant Nanomotility (GG), Conseil Régional Aquitaine, Fondation pour la Recherche Médicale, the ERC Program n° 232942 Nano-Dyn-Syn (DC) and n° 235552 Glutraf (DN).

Author Information Correspondence and requests for materials should be addressed to G.G (Gregory.giannone@u-bordeaux2.fr).

Figure legends

Figure 1. Fast free-diffusing Arp2/3 complexes are immobilized in F-actin networks in spines

(a) Super-resolution intensity image of ArpC5A-mEOS2 in a primary rat hippocampal neurons obtained from a sptPALM sequence (duration: 600s)(inset: fluorescence image of ArpC5A-mEOS2), scale bars, 2 μm . Boxed area (left) is shown on the right, scale bars, 500 nm. **(b)** sptPALM of ArpC5A-mEOS2. Trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red), scale bars, 2 μm . Boxed area (left), region shown on the right, scale bars, 500 nm. **(c,d)** Same as **a,b** for actin-mEOS2. **(e,f)** Same as **a,b** for CAAX-mEOS2. **(g)** Distribution of LOG(D) for ArpC5A-mEOS2 (red), actin-mEOS2 (black) and fixed actin-mEOS2 (dotted black) in spines (left) and shafts (right) (mean for cells). The gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(h)** Same as **g** for LatA ArpC5A-mEOS2 (1 μM)(dotted red), LatA actin-mEOS2 (dotted black), cytosolic mEOS2 (violet) and CAAX-mEOS2 (magenta). **(i)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right) (mean \pm SEM for cells). **(j)** D for free-diffusive events in spines (left) and shafts (right) (mean \pm SEM for trajectories).

Figure 2. F-actin branches are not exhibiting a concerted rearward flow in spines

(a) Super-resolution intensity image time-lapse of Arp2/3-mEOS2 in a spine (upper panels), corresponding sptPALM trajectories (lower panels), scale bars, 500 nm. Transient zones of immobilization are indicated by arrows. **(b)** Same as **a** for actin-mEOS2. **(c)** Actin-mEOS2 trajectories acquired using low frequency (0.5 Hz) sptPALM sequence in a 3-4 DIV primary rat hippocampal growth cone (left) and in 17-21 DIV primary rat hippocampal spines (right). Trajectories are represented by arrows starting at the beginning and finishing at the end of the trajectories. Arrows are color-coded to show their directions (upper left to center, red; upper right to center, green; lower right to center, yellow; lower left to center, blue) and superimposed on actin-mEOS low resolution fluorescent image (gray scale), scale bar, 2 μm (left), 1 μm (right). **(d)** Same as **c** for ArpC5A-mEOS2. **(e)** Same as **c** for actin-mEOS2 in 9-11 DIV primary rat hippocampal filopodia (left) in 17-21 DIV primary rat hippocampal spines

treated with CD (1 μ M) (right), scale bar 1 μ m. **(f)** Median of start to end speed distribution. Actin spines control: 19 cells, 2665 trajectories; Actin spines CD: 7 cells, 841 trajectories; actin spines fixed: 5 cells, 699 trajectories; ArpC5A spines: 4 cells, 665 trajectories; actin filopodia control: 9 cells, 730 trajectories; actin filopodia CD: 10 cells, 512 trajectories; actin growth cones control: 11 cells, 1699 trajectories; actin growth cones CD: 11 cells, 780 trajectories; ArpC5A growth cones: 16 cells, 1565 trajectories.

Figure 3. Branched actin nucleation occurs close to the PSD while elongation are delocalized from the PSD

(a) High frequency intensity images of ArpC5A-mEOS2 in spines, scale bars, 500 nm. **(b)** Same as **a** for Abi1-mEOS2. **(c)** Same as **a** for VASP-mEOS2. **(d)** Plots of the distances from the centroid of detections per spine for ArpC5A-mEOS2 (red; 5 cells; 31 spines; 2173 spots), Abi1-mEOS2 (green; 5 cells; 31 spines; 1904 spots) and VASP-mEOS2 (yellow; 3 cells; 16 spines; spots: 2972). **(e)** Median of distances distribution. **(f)** Dual colors super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively ArpC5A-mEOS2 (green, left) and endogenous PSD-95 (red, middle) in fixed neurons, scale bars, 1 μ m. Merge (right). Left insets: fluorescence image of ArpC5A-mEOS2 (upper panel) and PSD-95 labeled with Alexa647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines marked by stars in the merge image. **(g)** Same as **f** for Abi1-mEOS2. **(h)** Same as **f** for VASP-mEOS2.

Figure 4. WAVE and IRSp53 are associated with confined components of the PSD

(a) Super-resolution intensity image of Abi1-mEOS2 in a 17-21 DIV primary rat hippocampal neurons obtained from a sptPALM sequence (duration: 600s)(inset: fluorescence image of Abi1-mEOS2), scale bars, 2 μ m. Boxed area (left) is shown on the right, scale bars, 500 nm. **(b)** sptPALM of Abi1-mEOS2. Trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red), scale bars, 2 μ m. Boxed area (left), region shown on the right, scale bars, 500 nm. **(c,d)** Same as **a,b** for VASP-mEOS2. **(e)** Distribution of LOG(D) for Abi1-mEOS2 (dark green), IRSp53-mEOS2 (light green), VASP-mEOS2 (yellow) and CAAX (magenta) in spines (left) and shafts (right) (mean for cells). The

gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(f)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right) (mean \pm SEM for cells). **(g)** D for free-diffusive events in spines (left) and shafts (right) (mean \pm SEM for trajectories). **(h)** Super-resolution intensity image time-lapse of Abi1-mEOS2 in a spine (upper panels), corresponding sptPALM trajectories (lower panels), scale bars, 500 nm.

Figure 5. Rac activation is correlated to Rac membrane immobilization

(a) Super-resolution intensity image of Rac-mEOS2 in a 17-21 DIV primary rat hippocampal neurons obtained from a sptPALM sequence (duration: 600s)(inset: fluorescence image of Rac-mEOS2), scale bars, 2 μm . Boxed area (left) is shown on the right, scale bars, 500 nm. **(b)** sptPALM of Rac-mEOS2. Trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red), scale bars, 2 μm . Boxed area (left), region shown on the right, scale bars, 500 nm. **(c,d)** Same as **a,b** for RacQ61L-mEOS2. **(e,f)** Same as **a,b** for RacT17N-mEOS2. **(g)** Distribution of LOG(D) for Rac-mEOS2 (blue), RacQ61L-mEOS2 (dark blue), RacT17N-mEOS2 (light blue) and CAAX (magenta) in spines (left) and shafts (right) (mean for cells). The gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(h)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right) (mean \pm SEM for cells). **(i)** D for free-diffusive events in spines (left) and shafts (right) (mean \pm SEM for trajectories).

Figure 6. Rac activity controls the nanoscale organization of actin regulatory proteins in spines

(a) Dual colors super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively Abi1-mEOS2 (green, left) and endogenous PSD-95 (red, middle) in fixed neurons expressing Rac1Q61L, scale bars, 1 μm . Merge (right). Left insets: fluorescence image of Abi1-mEOS2 (upper panel) and PSD-95 labeled with Alexa647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines marked by stars in the merge image. **(b)** Same as **a** for VASP-mEOS2.

Figure 7. The organization of actin regulatory proteins in spines is opposite to the lamellipodium

(a) Model of actin-driven membrane protrusions in the lamellipodium transposed to dendritic spines. Growing F-actin barbed ends are directed towards the tip of membrane protrusions, where nucleation (WAVE, green; Arp2/3, red) and elongation (VASP, yellow) of F-actin branches are catalysed. In this model, the formation of new branched F-actin networks leads to forward protrusions of the tip and/or F-actin and Arp2/3 concerted rearward flow. (b) Schematic representation, built from our study, of the dynamic nanoscale organizations of branched F-actin regulatory proteins in spines. Growing F-actin barbed ends are directed towards the tip of membrane protrusions, where elongation (VASP, yellow) of F-actin branches is catalysed. However, nucleation (WAVE, green; Arp2/3, red) of branched F-actin networks occurs close to the PSD, which is consistent with Arp2/3 complex immobilizations distributed around the PSD, and the co-localization of WAVE/IRSp53 with PSD-95. In this model, branched F-actin polymerization from the PSD will not generate a concerted fast rearward flow of actin and Arp2/3 in spines. For simplicity IRSp53, which is co-localized with WAVE in both models, is not represented.

Supplementary figure legends

Figure S1. F-actin depolymerization using Latrunculin A decreased Arp2/3 immobilization in spines

(a) Super-resolution intensity image of ArpC5A-mEOS2 in a 17-21 DIV primary rat hippocampal neurons treated with 1 μ M of LatA obtained from a sptPALM sequence (duration: 600s)(inset: fluorescence image of ArpC5A-mEOS2), scale bars, 2 μ m. Boxed area (left) is shown on the right, scale bars, 500 nm. **(b)** sptPALM of ArpC5A-mEOS2 in LatA treated neurons. Trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red), scale bars, 2 μ m. Boxed area (left), region shown on the right, scale bars, 500 nm. **(c,d)** Same as **a,b** for LatA actin-mEOS2. **(e,f)** Same as **a,b** for cytosolic mEOS2. **(g)** Fluorescence images of actin-GFP (green, left) and Homer1C-DsRed (red, right) in control (upper panels) and LatA treated neurons (lower panels), scale bars, 1 μ m.. Merge (right). **(h)** Same as **g** for ArpC5A-GFP.

Figure S2. Duration of Arp2/3 immobilization zones

Cumulative distribution of immobilization duration measured from sptPALM in spines for Arp2/3-mEOS2 in live (red, 3 cells, 582 immobilization events) and fixed neurons (black, dashed, 3 cells, 568 immobilization events).

Figure S3. Dynamic nanoscale organization of IRSp53 in spines

(a) Dual colors super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively IRSp53-mEOS2 (green, left) and endogenous PSD-95 (red, middle) in fixed neurons, scale bars, 1 μ m. Merge (right). Left insets: fluorescence image of IRSp53-mEOS2 (upper panel) and PSD-95 labeled with Alexa647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines marked by stars in the merge image. **(b)** Super-resolution intensity image of IRSp53-mEOS2 in a 17-21 DIV primary rat hippocampal neurons obtained from a sptPALM sequence (duration: 600s)(inset: fluorescence image of IRSp53-mEOS2), scale bars, 2 μ m. Boxed area (left) is shown on the right, scale bars, 500 nm. **(c)** Super-resolution intensity image time-

lapse of IRSp53-mEOS2 in a spine (upper panels), corresponding sptPALM trajectories (lower panels), scale bars, 500 nm.

Figure S4. VASP is localized at the tip of membrane protrusions in spines

(a) Dual colors super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively actin-mEOS2 (green, left panel) and endogenous PSD-95 (red, middle panel) in fixed neurons, scale bars, 1 μm . Merge (right panel). **(b)** High frequency intensity images of VASP-mEOS2 in a neuron, scale bars, 2 μm . Boxed area (left) is shown on the middle, scale bars, 500 nm. Kymograph (right) generated from the high frequency sptPALM time-lapse along the length of the dashed line displayed in the middle image. Arrows correspond to the acquisition time of images displayed in **c**. **(c)** Super-resolution intensity image time-lapse of VASP-mEOS2 in the same spine, scale bars, 500 nm. Arrows correspond to the formation of a membrane protrusion enriched in VASP.

Figure S5. WAVE complex localization in spines is independent from F-actin cytoskeleton

(a) Fluorescence images of Abi1-GFP (green, left) and Homer1C-DsRed (red, right) in control (upper panels) and LatA treated neurons (lower panels), scale bars, 1 μm . Merge (right).

Figure S6. Localization of Abi1 and VASP in small lamellipodial-like extension induced by RacQ61L

(a) Dual colors super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively Abi1-mEOS2 (green, left) and endogenous PSD-95 (red, middle) in fixed neurons expressing Rac1Q61L, scale bars, 1 μm . Merge (right). Left insets: fluorescence image of Abi1-mEOS2 (upper panel) and PSD-95 labeled with Alexa647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines marked by stars in the merge image. **(b)** Same as **a** for VASP-mEOS2.

Supplementary Tables and legends: Table S1: Results obtained by sptPALM in 17-21 DIV primary rat hippocampal neurons.

	Arp2/3-mEOS2		actin-mEOS2		actin-mEOS2 fixed	
trajectories, cells	11097, 11		6113, 4		4849, 5	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	58 ± 3	<4	56 ± 2	<4	62 ± 5	<4
confined spines	24 ± 2	27 ± 1	25 ± 2	17 ± 1	23 ± 3	16 ± 1
free-diffusive spines	18 ± 1	56 ± 2	19 ± 2	35 ± 1	15 ± 2	29 ± 1
immobile shafts	54 ± 2	<4	68 ± 3	<4	80 ± 5	<4
confined shafts	22 ± 1	36 ± 2	18 ± 1	16 ± 1	12 ± 3	15 ± 1
free-diffusive shafts	24 ± 2	84 ± 3	14 ± 2	36 ± 2	8 ± 2	30 ± 2
r _{conf} spines (nm)	111 ± 1		96 ± 2		99 ± 1	
r _{conf} shafts (nm)	123 ± 3		91 ± 2		93 ± 3	
	ArpC5A-mEOS2 LatA		actin-mEOS2 LatA		mEOS2 cytosolic	
trajectories, cells	4464, 6		3807, 4		1700, 3	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	39 ± 5	<4	43 ± 4	<4	40 ± 3	<4
confined spines	33 ± 2	34 ± 2	31 ± 2	46 ± 2	34 ± 2	60 ± 5
free-diffusive spines	28 ± 3	64 ± 3	26 ± 2	89 ± 4	26 ± 2	89 ± 7
immobile shafts	34 ± 7	<4	34 ± 4	<4	40 ± 3	<4
confined shafts	34 ± 3	48 ± 3	35 ± 2	43 ± 2	33 ± 2	55 ± 5
free-diffusive shafts	32 ± 4	78 ± 3	31 ± 3	88 ± 4	27 ± 2	101 ± 8
r _{conf} spines (nm)	131 ± 2		137 ± 4		166 ± 6	
r _{conf} shafts (nm)	154 ± 3		155 ± 3		161 ± 6	
	CAAX-mEOS2		Abi1-mEOS2		IRSp53-mEOS2	
trajectories, cells	3549, 3		11885, 7		17974, 5	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	16 ± 2	<4	35 ± 2	<4	24 ± 3	<4
confined spines	45 ± 1	105 ± 4	38 ± 2	21 ± 1	45 ± 4	27 ± 1
free-diffusive spines	39 ± 3	163 ± 6	27 ± 2	42 ± 1	31 ± 3	51 ± 1
immobile shafts	14 ± 1	<4	38 ± 4	<4	16 ± 2	<4
confined shafts	43 ± 1	92 ± 3	30 ± 2	30 ± 1	36 ± 1	45 ± 1
free-diffusive shafts	43 ± 1	184 ± 5	32 ± 3	58 ± 2	48 ± 1	74 ± 1
r _{conf} spines (nm)	230 ± 4		110 ± 1		131 ± 1	
r _{conf} shafts (nm)	219 ± 4		118 ± 2		150 ± 1	

	VASP-mEOS2		Rac-mEOS2		RacQ61L-mEOS2	
trajectories, cells	13785, 7		5896, 4		5514, 5	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	15 ± 2	<4	18 ± 3	<4	54 ± 2	<4
confined spines	40 ± 2	52 ± 1	41 ± 3	109 ± 3	25 ± 1	34 ± 2
free-diffusive spines	45 ± 2	82 ± 2	41 ± 1	169 ± 4	21 ± 1	71 ± 3
immobile shafts	14 ± 3	<4	14 ± 2	<4	54 ± 4	<4
confined shafts	36 ± 1	58 ± 1	35 ± 2	123 ± 5	23 ± 1	33 ± 2
free-diffusive shafts	52 ± 3	96 ± 1	51 ± 2	211 ± 6	23 ± 4	75 ± 3
r _{conf} spines (nm)	160 ± 2		233 ± 3		123 ± 3	
r _{conf} shafts (nm)	174 ± 2		239 ± 5		120 ± 3	
	RacT17N-mEOS2					
trajectories, cells	8759, 6					
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)				
immobile spines	14 ± 2	<4				
confined spines	40 ± 2	116 ± 3				
free-diffusive spines	46 ± 3	188 ± 3				
immobile shafts	11 ± 2	<4				
confined shafts	38 ± 2	122 ± 3				
free-diffusive shafts	51 ± 4	196 ± 3				
r _{conf} spines (nm)	222 ± 3					
r _{conf} shafts (nm)	236 ± 3					

Values correspond to mean ± SEM

Figure 1

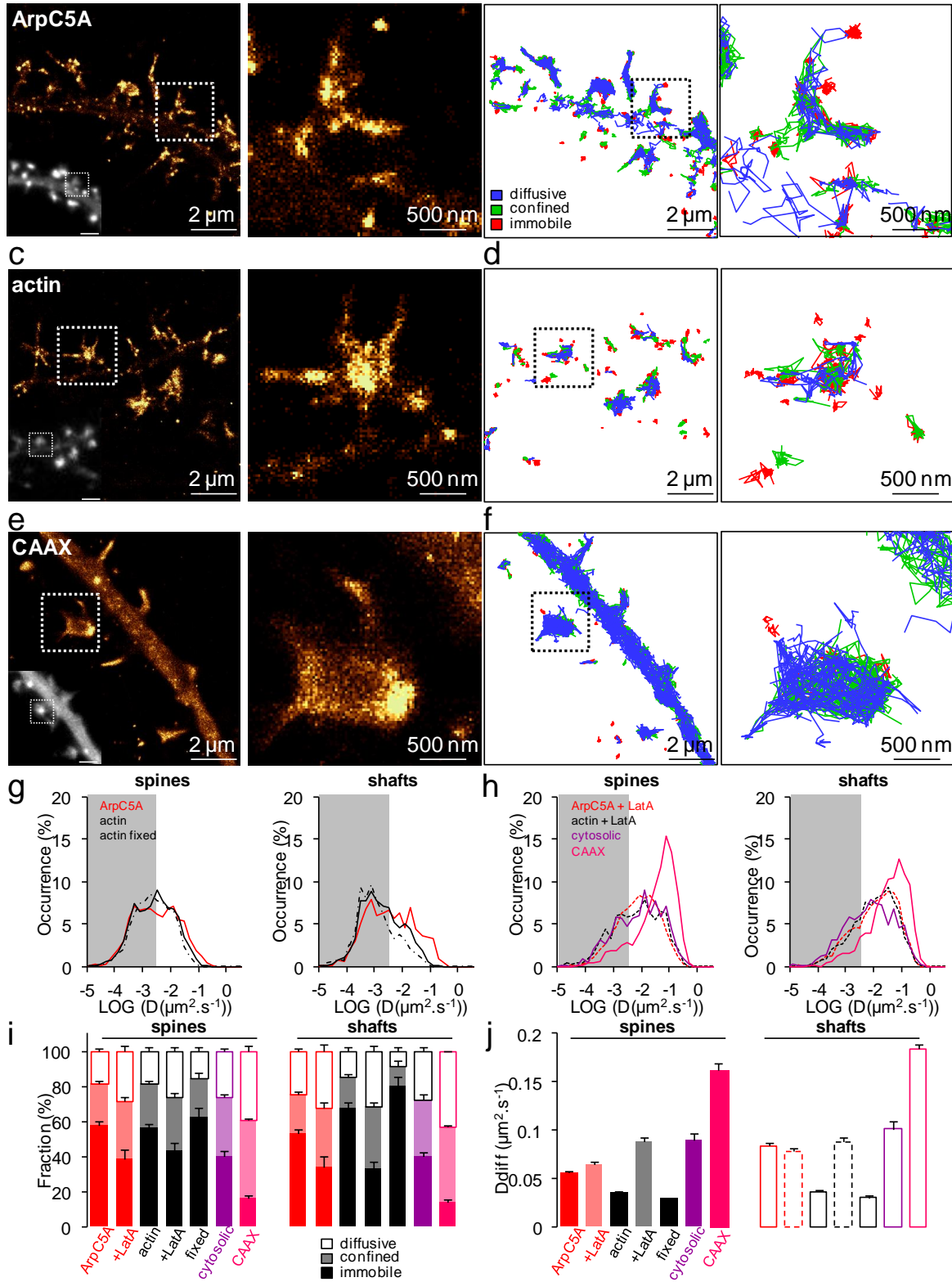


Figure 2

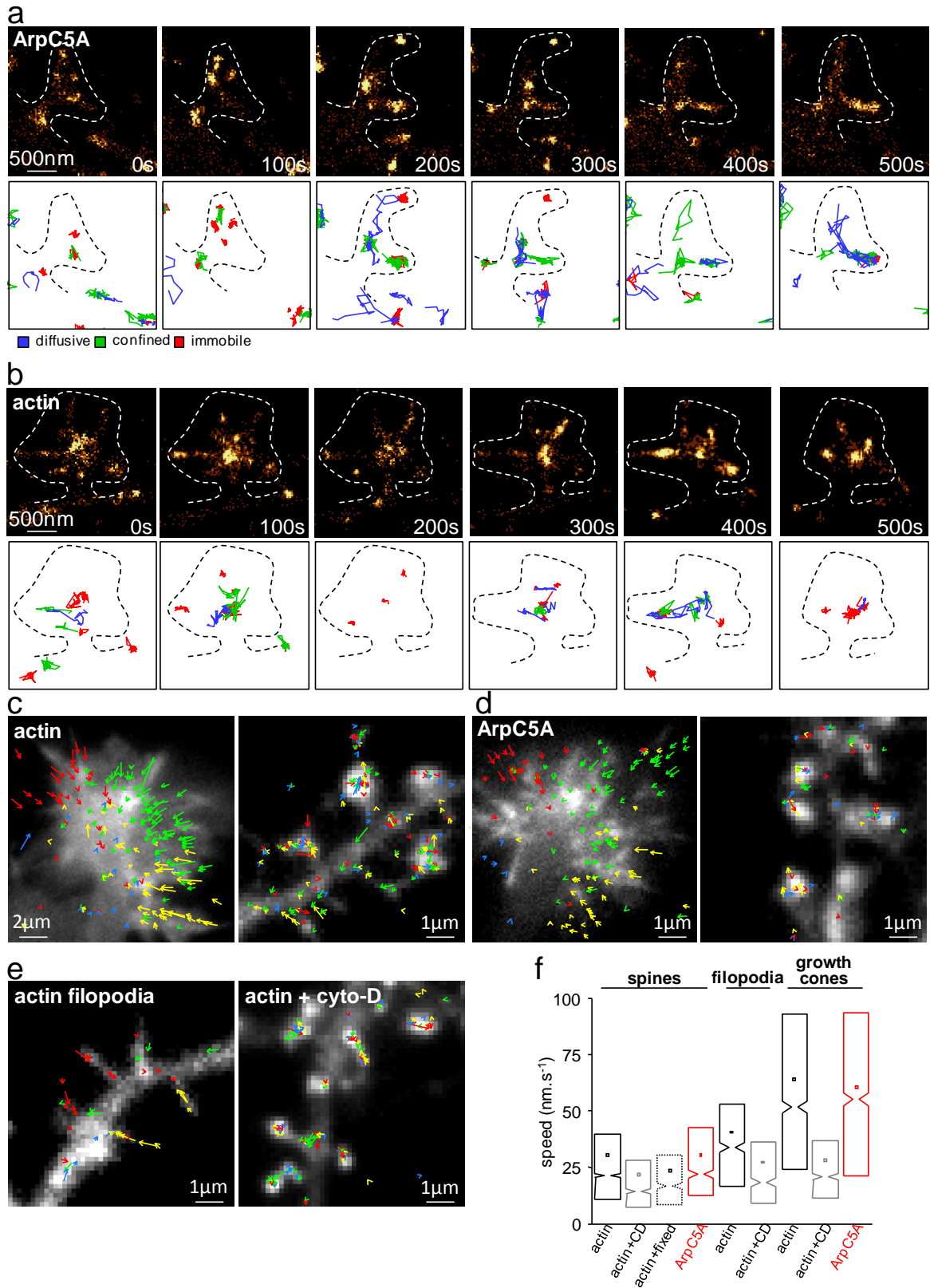


Figure 3

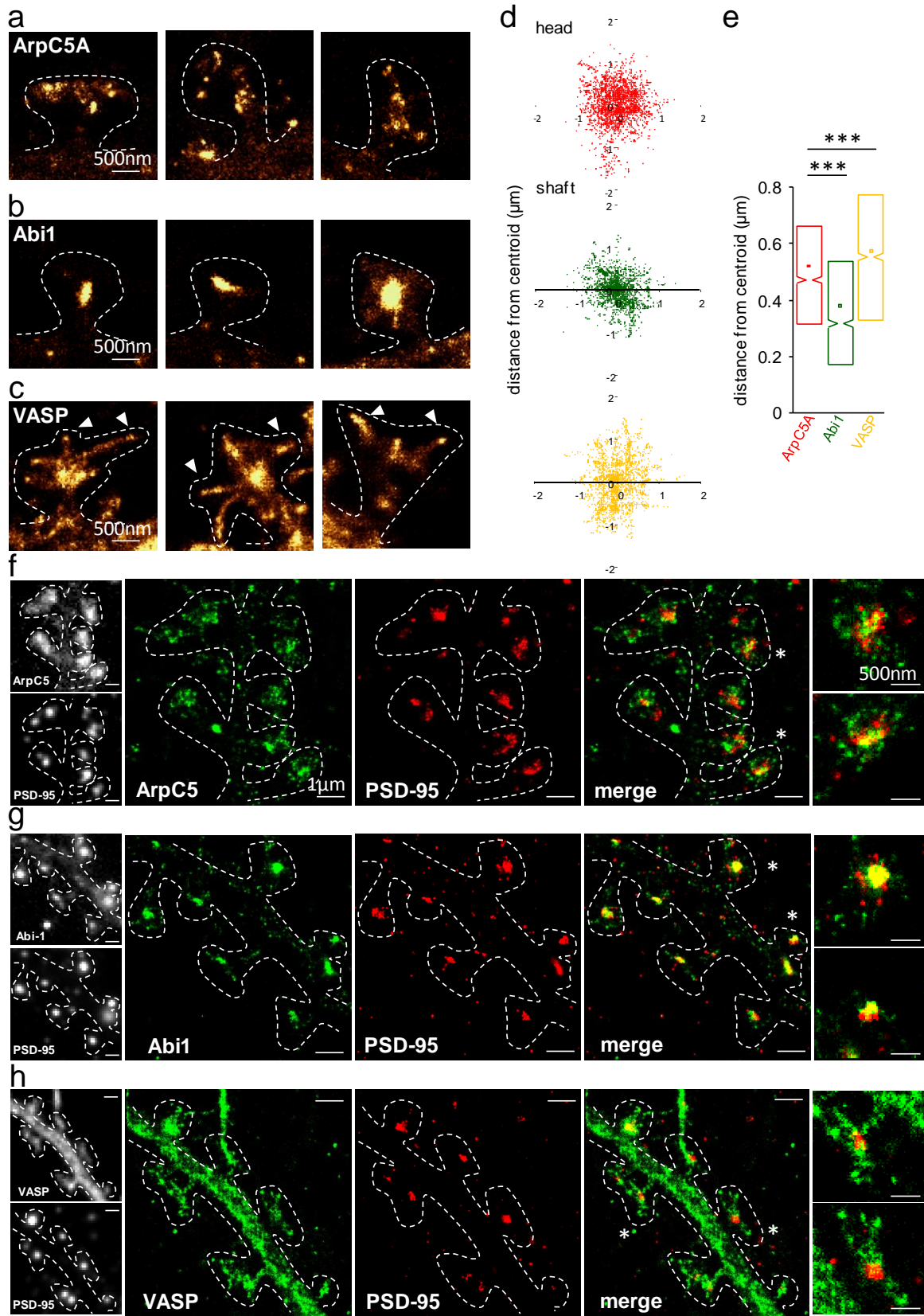


Figure 4

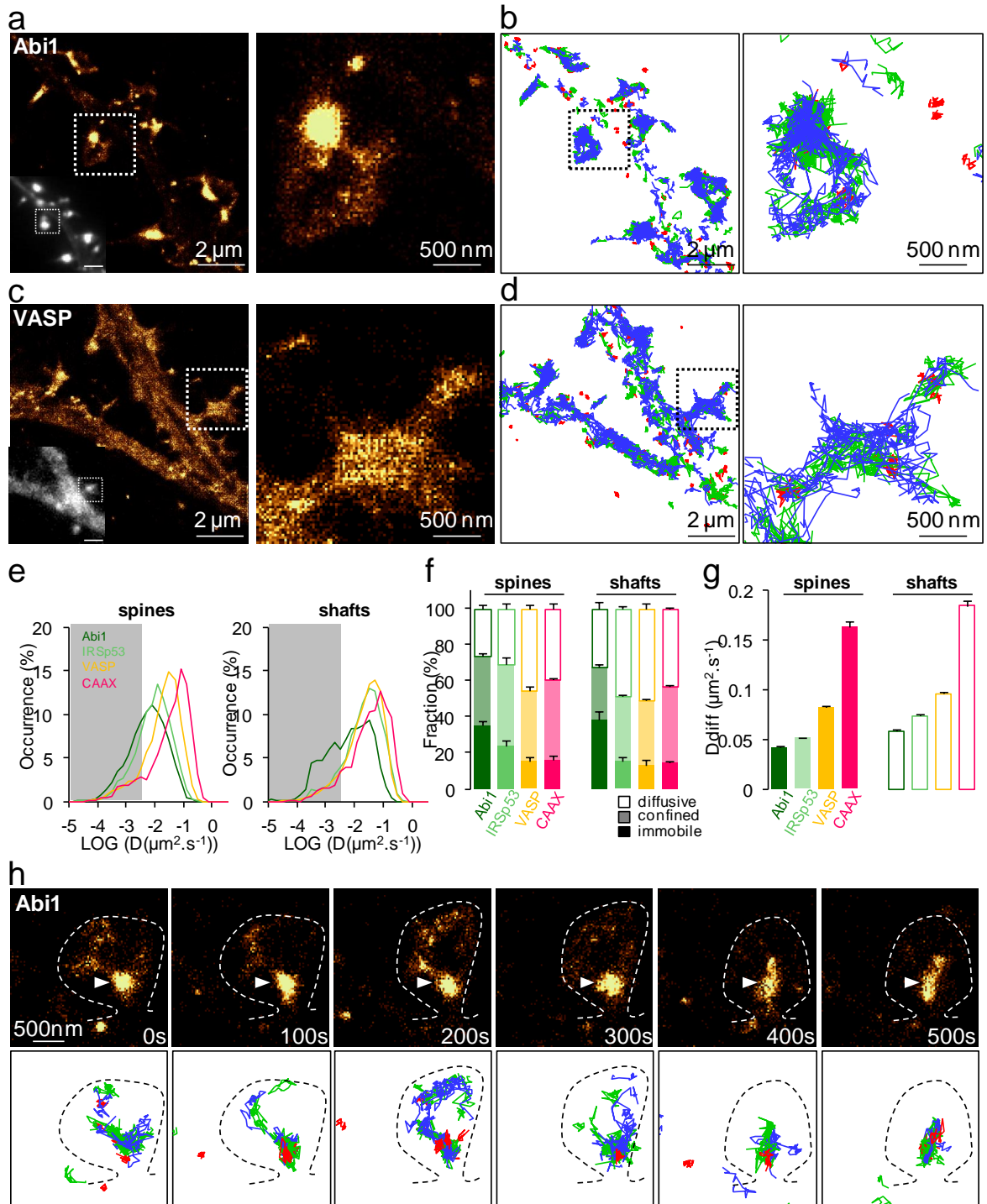


Figure 5

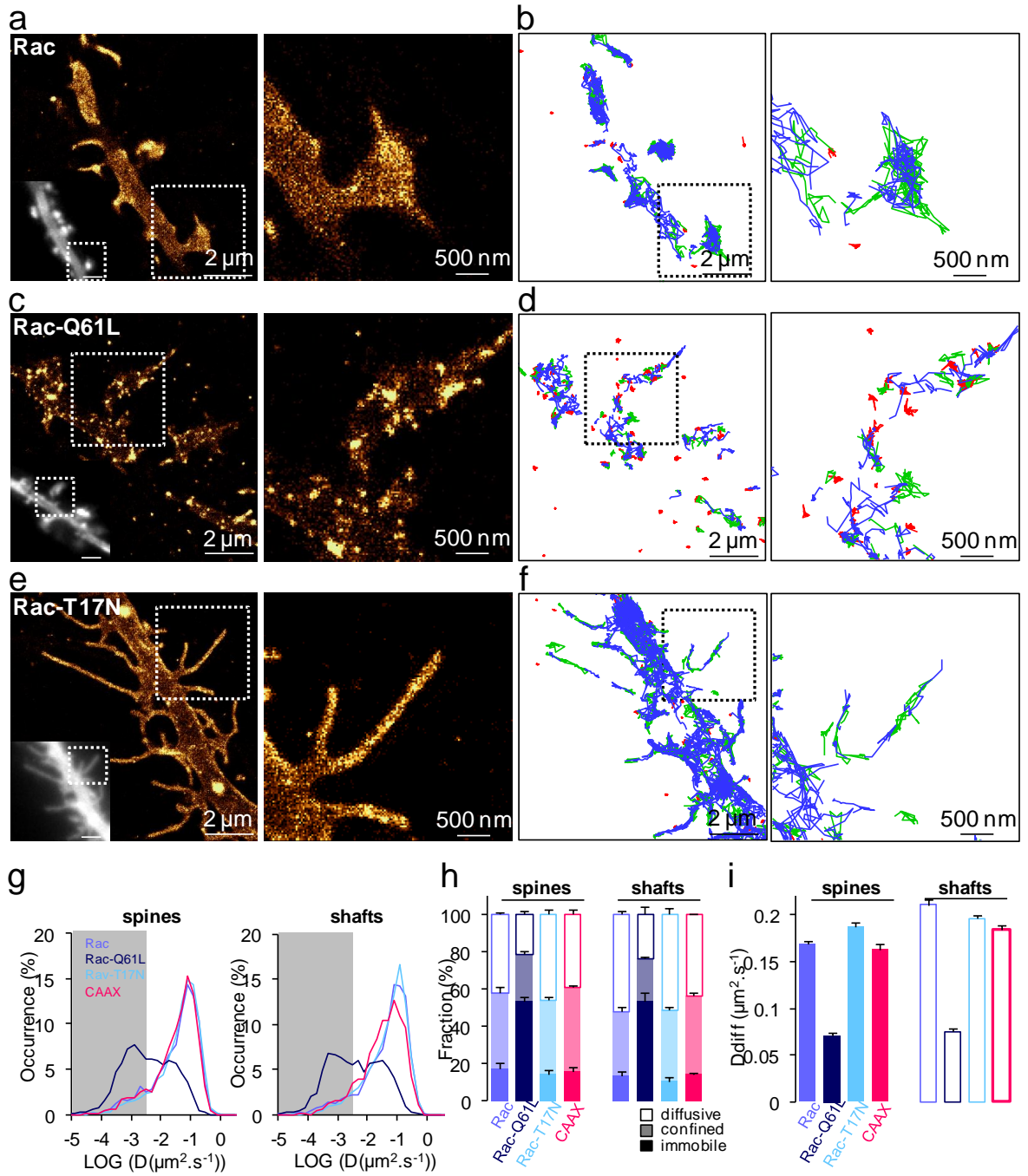


Figure 6

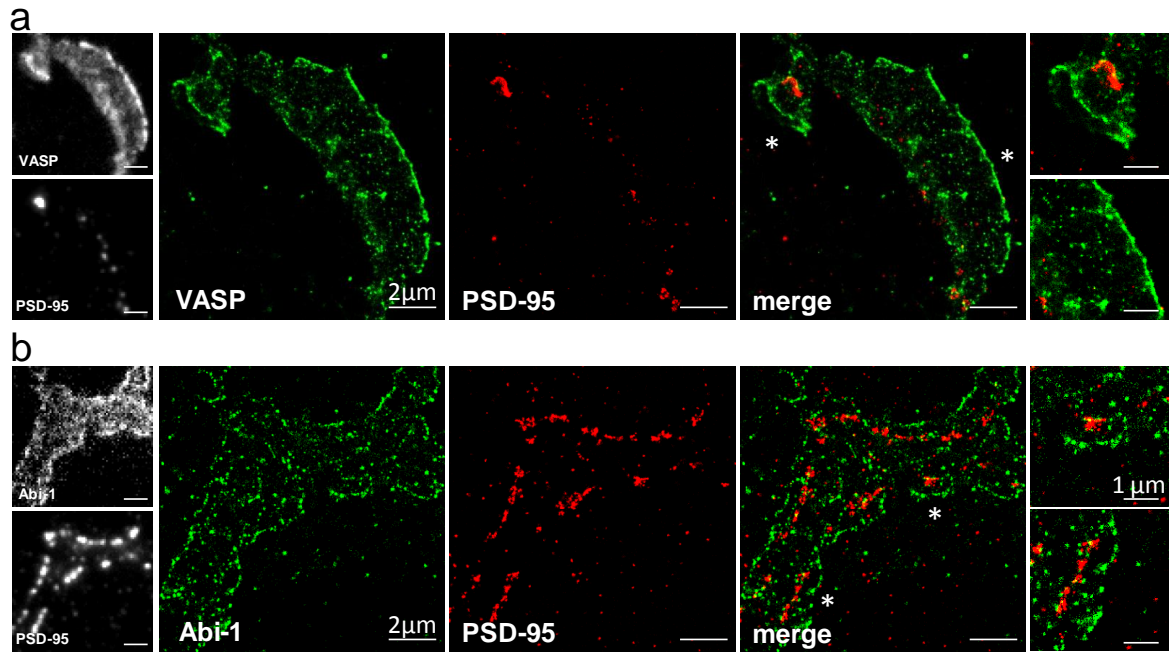
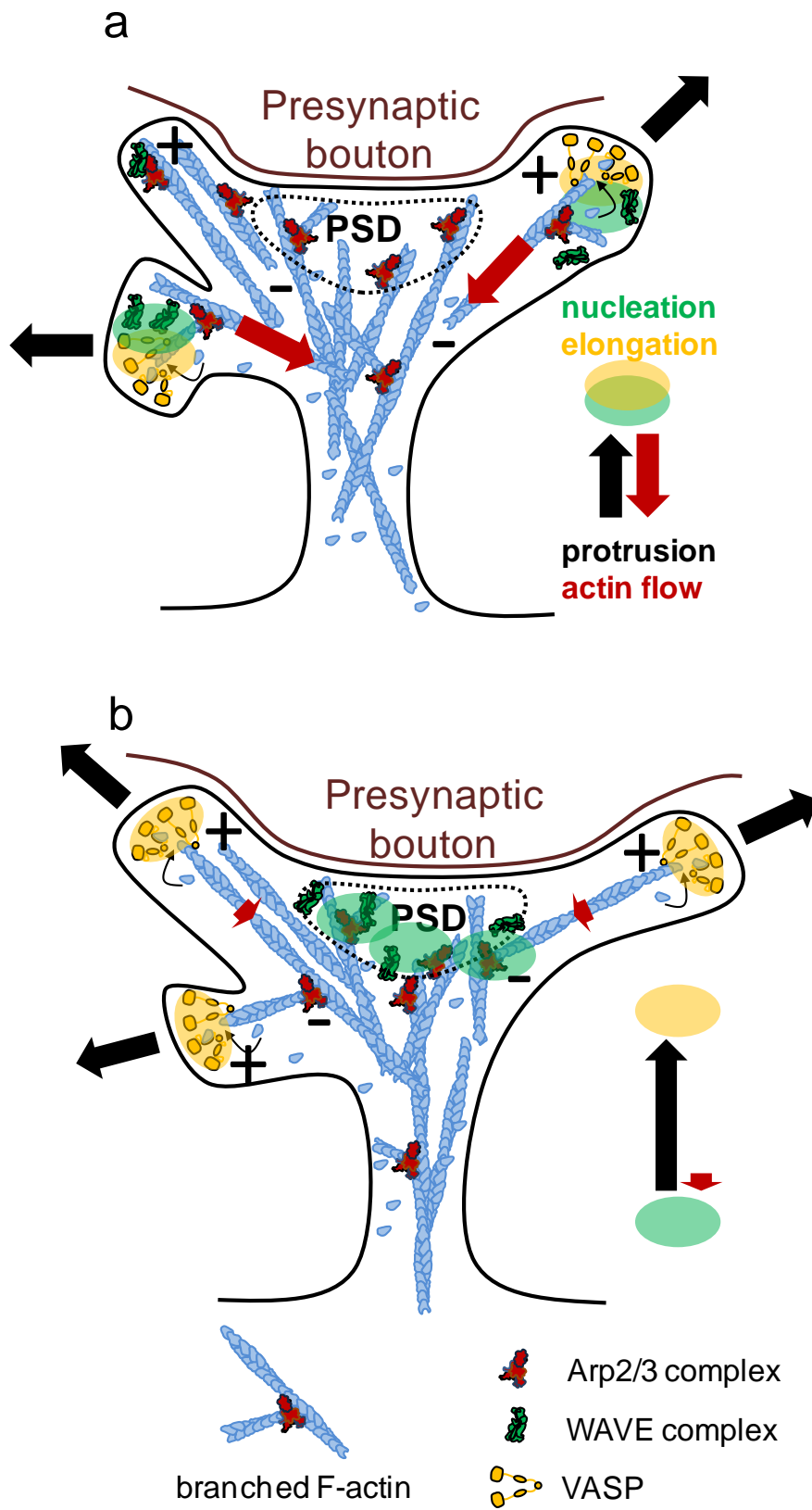
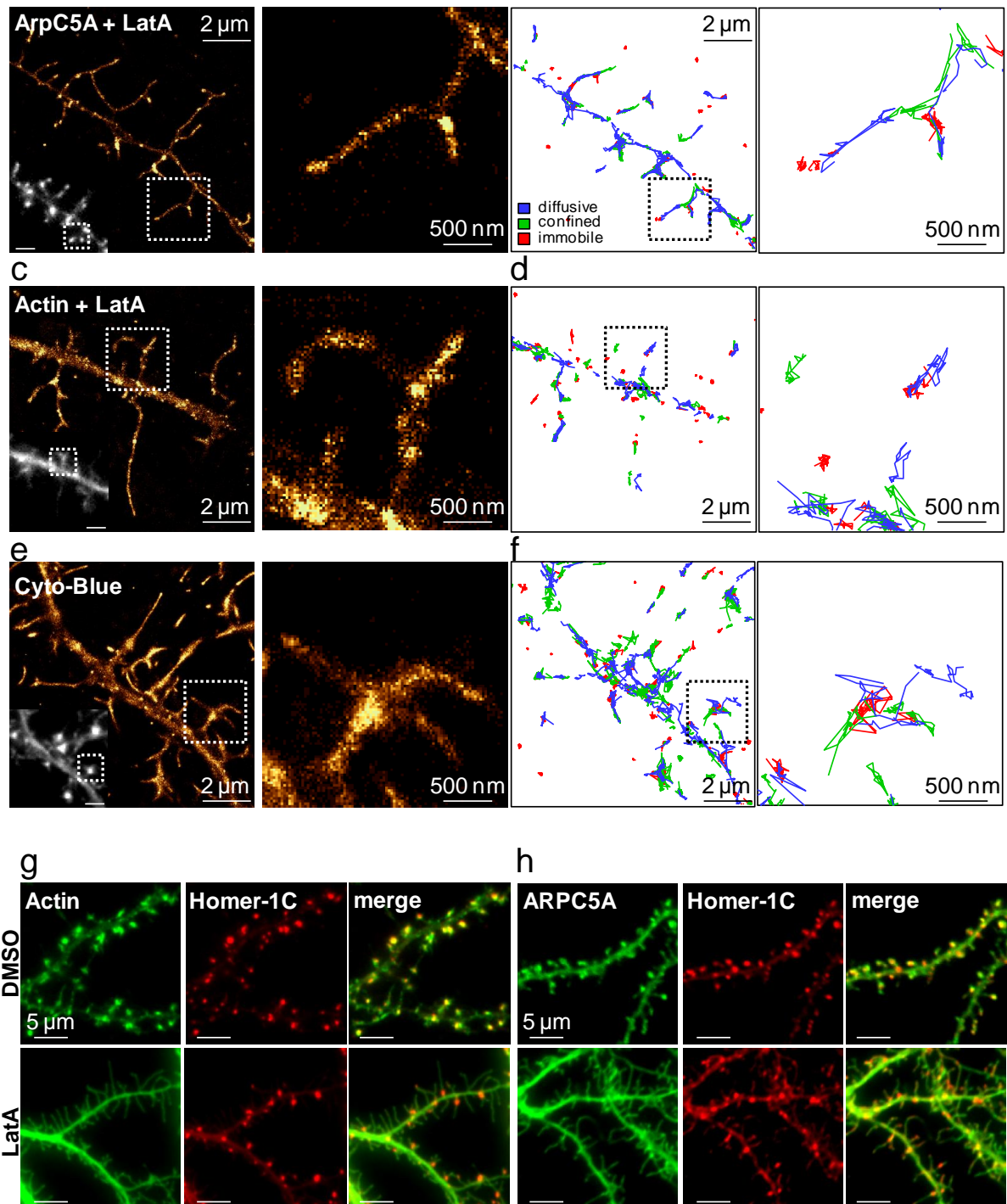


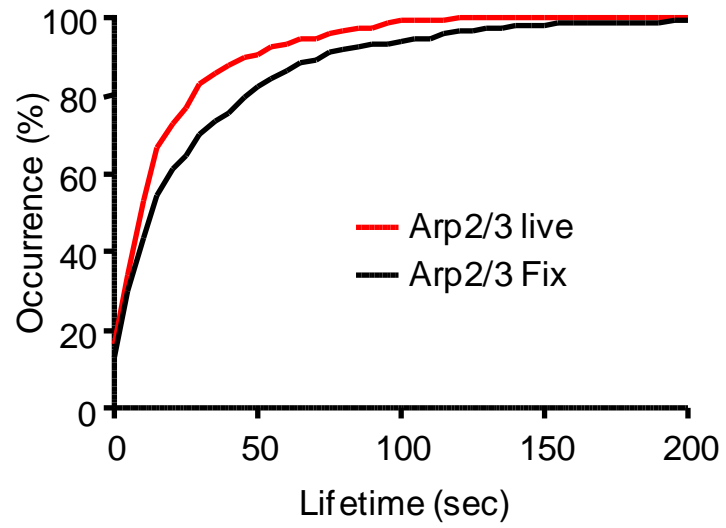
Figure 7



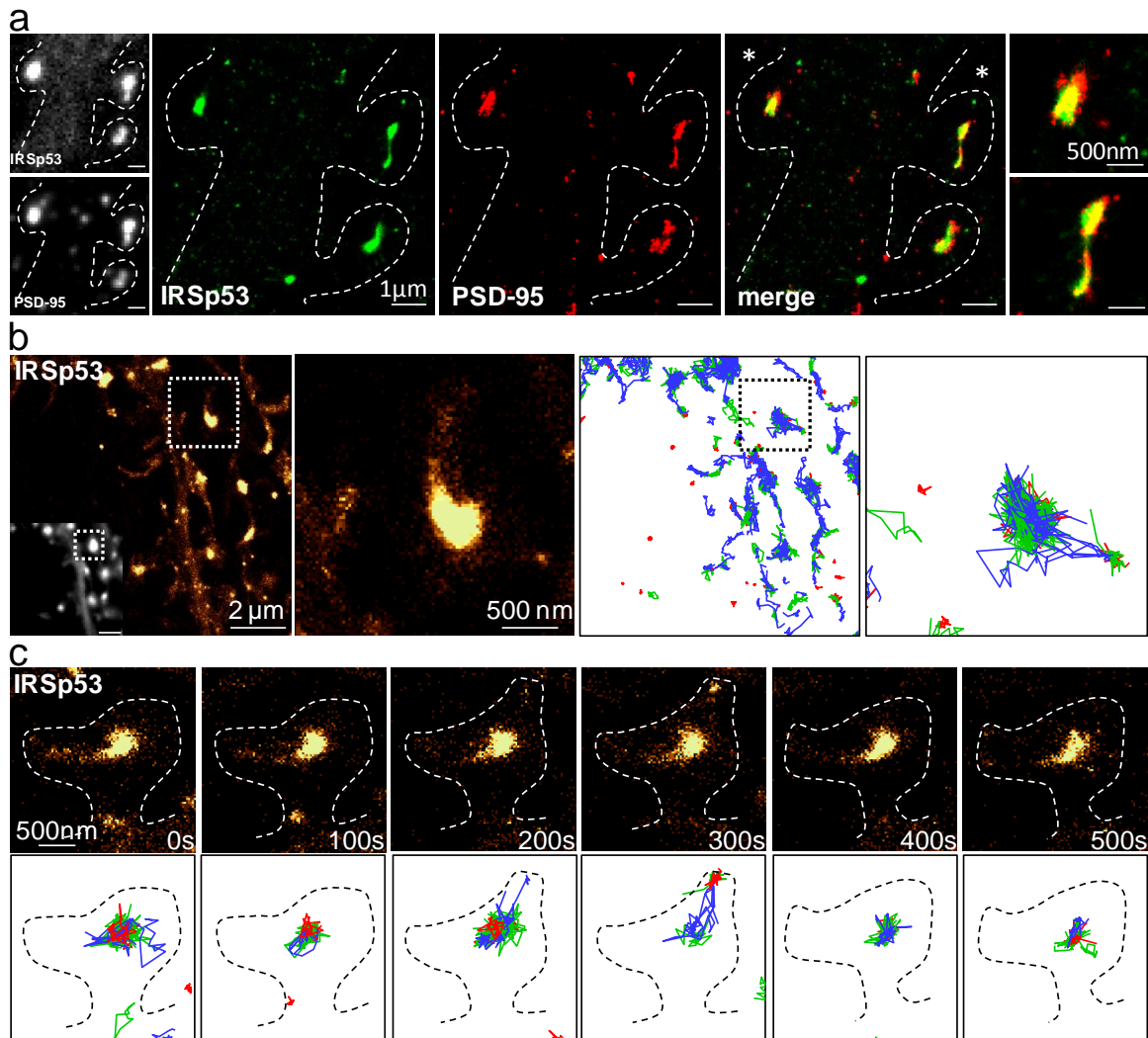
Supplementary Figure 1



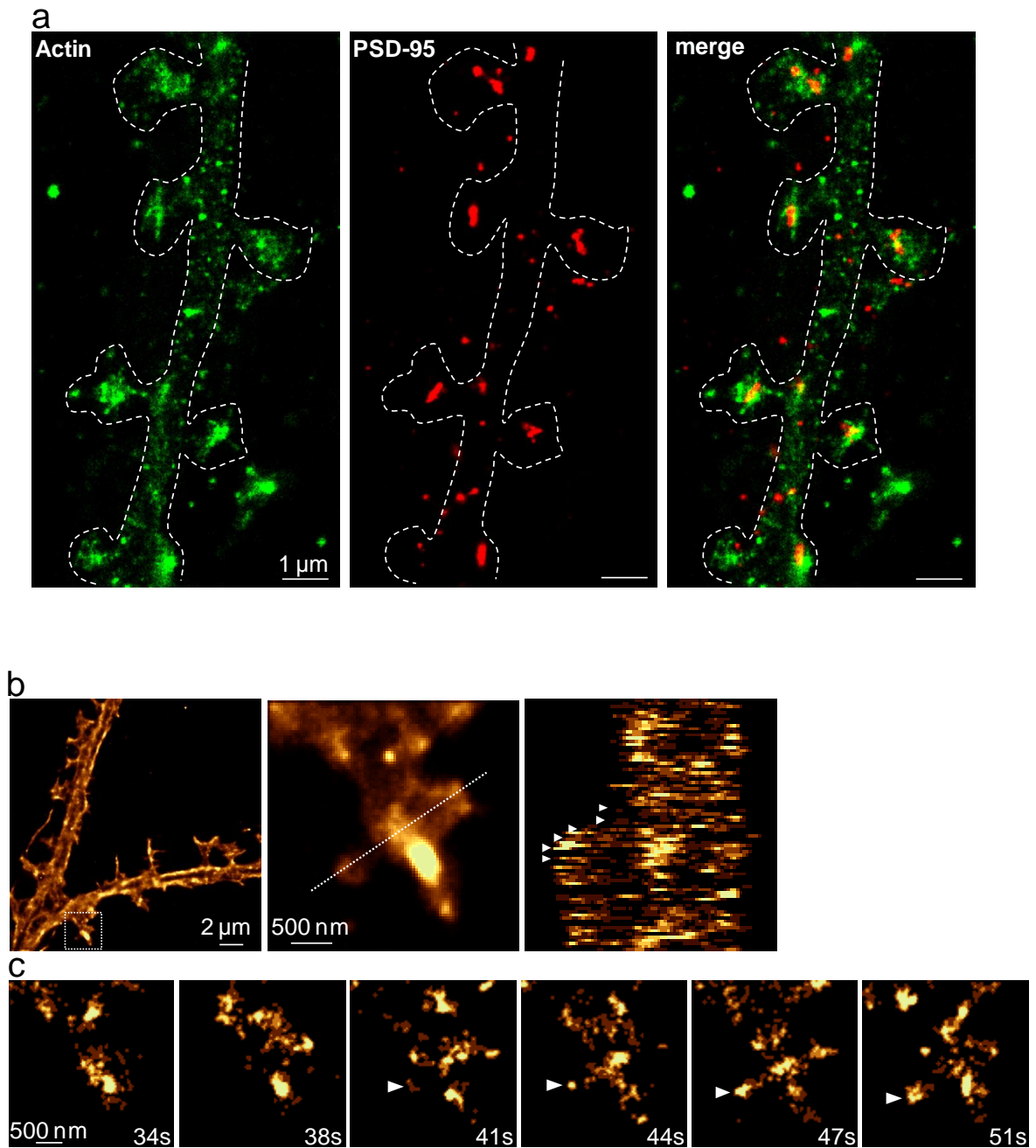
Supplementary Figure 2



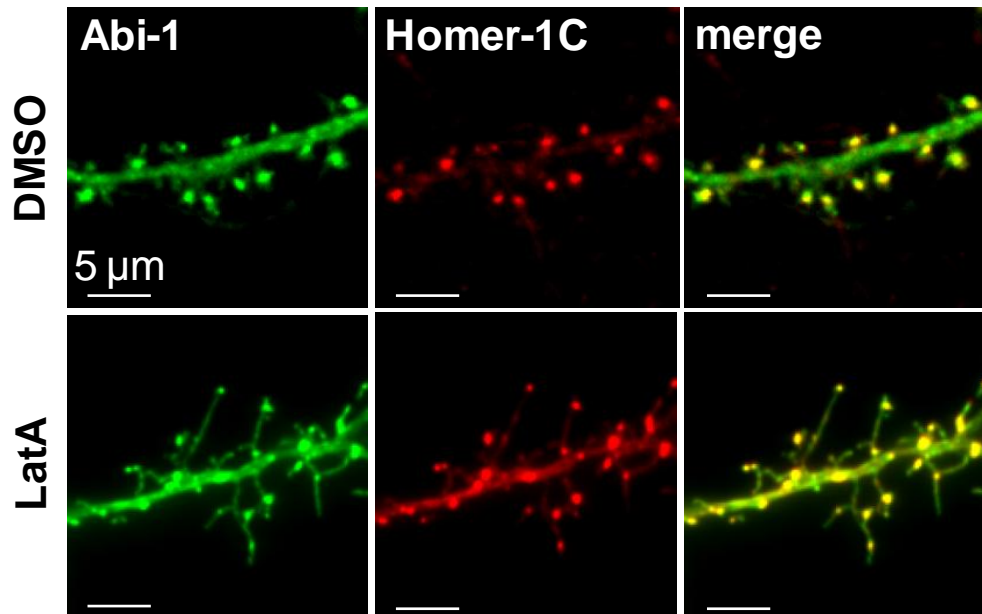
Supplementary Figure 3



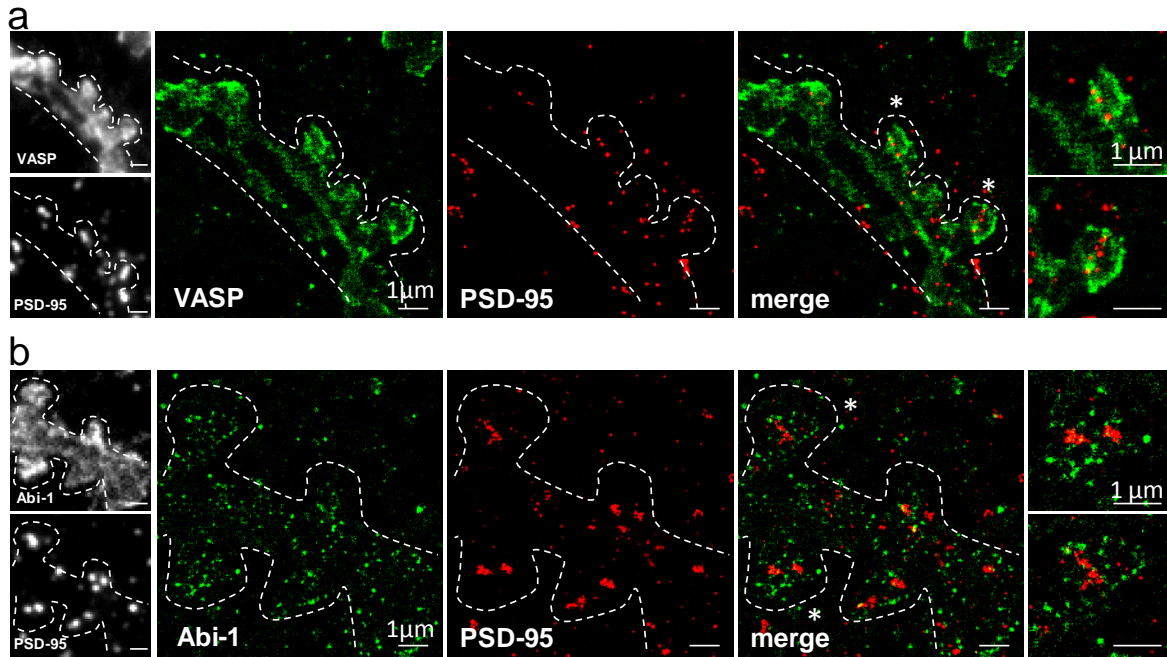
Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 6



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Pendant ces trois années de recherche nous avons déterminé l'architecture et la dynamique, à l'échelle nanométrique, du réseau d'actine branché dans les épines dendritiques des neurones. Ceci nous a permis d'expliquer la dynamique des épines et notamment comment les protrusions membranaires sont générées dans ces structures motiles. Nous avons également étudié le rôle des adhésions N-cadhérine dans la dynamique du cytosquelette d'actine et le processus de synaptogenèse structurale. Cependant plusieurs points doivent être abordés afin d'évaluer ce que ces deux études nous apportent vis-à-vis de la compréhension de ces différents mécanismes. De plus, il sera important d'aborder les futurs axes de recherche afin de pouvoir répondre aux questions qui restent en suspens.

I. Localisation de la myosine et dynamique de l'actine

Dans cette première étude, nous avons vu que l'embrayage moléculaire dépendait de la présence de plusieurs acteurs au sein de l'épine dendritique. S'il est admis que l'actine est enrichie dans les épines et que la N-cadhérine est présente dans la tête des épines (Korobova and Svitkina, 2010), la localisation de la myosine est plus controversée. Une première étude de microscopie électronique a montré que celle-ci était présente préférentiellement dans le cou et à la base de l'épine (Korobova and Svitkina, 2010), alors qu'une deuxième étude indique, grâce à la technique de super-résolution PALM (cf Annexe Méthode), que celle-ci se trouve préférentiellement dans la tête de l'épine mais également dans le cou (Tatavarty et al., 2012). Notre étude confirme que la myosine est bien présente dans la tête de l'épine, comme l'actine, mais qu'une proportion non négligeable se retrouve également dans le cou de l'épine, confirmant les résultats de la deuxième étude. De plus, cette localisation dans l'ensemble de l'épine coïnciderait avec la polarité mixte des filaments individuels observée dans la deuxième étude. Nous avons également remarqué lors d'expériences PALM que les épines avec un long cou étaient celles qui présentaient le plus de myosine dans celui-ci. Pour confirmer cette localisation morphologie-dépendante il serait intéressant de représenter la localisation de la myosine en fonction de la longueur de l'épine ou de celle du cou. Malgré la prépondérance de la myosine dans la tête de l'épine la stimulation pharmacologique de la contraction actine/myosine induit un flux rétrograde d'actine lent de la tête vers la base de l'épine. Une explication possible est qu'il existe deux "pools" de myosine comme il existe deux "pools" d'actine (poster Koskinen et al., 2012 ; FENS Barcelona). Ainsi un premier "pool" de myosine, dans la tête de l'épine, participerait à la dynamique du "pool" dynamique d'actine alors que le deuxième "pool" de myosine, à la base de l'épine et dans le cou, pourrait organiser les filaments d'actine afin de les faire converger vers le cou. Les très faibles vitesses (1nm/sec) de flux lors de l'activation de la

myosine IIB pourraient donc s'expliquer par le fait qu'une majorité du réseau d'actine ne soit pas directement lié à ce deuxième "pool" de myosine. Le flux d'actine résulterait d'un mouvement d'ensemble des différents réseaux d'actine de la tête vers la base de l'épine. Nous avons également observé un nombre non négligeable d'épines ne répondant pas à la stimulation pharmacologique. Il serait donc pertinent de corrélérer la localisation de la myosine ou la longueur des épines avec la probabilité de rétraction ou la distance parcourue de l'actine.

II. Rôle de la composante mécanique de l'embrayage moléculaire dans la transition filopode/épine dendritique

L'embrayage moléculaire dépend de l'interaction entre le réseau d'actine/myosine et des protéines d'adhésion (Giannone et al., 2009). Ainsi ce couplage mécanique peut être observé par la rétraction d'une bille recouverte de N-cadhérine lorsqu'elle entre en contact avec l'extrémité du filopode dendritique. Malheureusement pour cause de problèmes de poste de travail nous n'avons pu confirmer la spécificité de ce couplage par des expériences de pinces optiques avec les mutants N-cadhW2A et N-cadh Δ E. Ces problèmes devraient être résolus sous peu. Néanmoins nous avons montré que la rétraction de l'actine, induite par l'activation de la myosine, était perturbée lors de l'expression de ces mutants dans les épines dendritiques. Il existe donc bien un couplage mécanique entre ces protéines. Comme proposé dans le modèle, l'engagement de l'embrayage moléculaire ferait intervenir des protéines adaptatrices capables d'assurer un couplage mécanique entre la N-cadhérine et les filaments d'actine (Mitchison and Kirschner, 1988 ; Giannone et al., 2009). Ainsi l' α -caténine semble être un bon candidat, de part sa capacité à lier alternativement le complexe N-cadhérine/ β -caténine et les filaments d'actine. Afin de savoir si l' α -N-caténine est nécessaire à la transition filopode/épine, il serait intéressant de reproduire les expériences de pinces optiques ou de substrats micro-imprimés en transfectant des shRNAs contre l' α -N-caténine. De plus, cela nous permettrait d'exclure d'autres mécanismes comme le recrutement de GluA ou GluN qui pourrait indirectement induire la polymérisation de l'actine (Arikkath and Reichardt, 2008 ; Saglietti et al., 2007). La question se pose ensuite de savoir comment le complexe N-cadhérine/ β -caténine/ α -N-caténine induit cet élargissement de la tête de l'épine. Tout d'abord, comme proposé dans le modèle de l'embrayage moléculaire, l'engagement des adhésions induit un ralentissement du flux rétrograde d'actine (figure 22). Or, nous avons justement vu dans la deuxième étude, que le flux d'actine dans les filopodes était plus rapide que celui dans les épines dendritiques. Ainsi lorsque le filopode contacte l'axone, la N-cadhérine pourrait se lier aux filaments d'actine par l'intermédiaire de l' α -N-caténine et induire mécaniquement un ralentissement du flux d'actine. Par conséquent la polymérisation de l'actine générerait une protrusion membranaire. Afin de confirmer cette hypothèse nous pourrions proposer des expériences de sptPALM afin d'observer le flux d'actine dans les filopodes ayant initié un contact avec

l'axone et le comparer à des filopodes libres. Si l' α -caténine se révèle comme indispensable dans la mécanotransduction il faudra également déterminer si cela dépend de sa capacité à lier directement les filaments d'actine ou s'il s'agit d'une interaction indirecte. Des études en cours dans le laboratoire, dans lesquelles nous étudions la dynamique de l'actine, de l' α -caténine et de la N-cadhérine dans le cône de croissance grâce à des substrats micro-imprimés recouverts de N-cadhérines, suggèrent que l' α -caténine se comporte comme la N-cadhérine et ne se déplace jamais avec le flux d'actine (Garcia et Thoumine). Ces résultats remettent quelque peu en cause le rôle de l' α -caténine comme seule protéine adaptatrice dans le modèle de l'embrayage moléculaire cadhérine dépendant. De plus d'autres études ont montré que la vinculine et l'EPLIN, deux protéines capables de lier l' α -caténine (Weiss et al., 1998 ; Abe and Takeichi, 2008), étaient impliquées dans la mécanotransduction dans les jonctions épithéliales (le Duc et al., 2010 ; Taguchi et al., 2011). Il serait donc intéressant, tout d'abord, de vérifier que ces deux protéines sont des protéines adaptatrices de l'embrayage moléculaire dans le cône de croissance, puis si celles-ci sont recrutées dans les épines dendritiques et enfin si elles sont indispensables dans la transition du filopode à l'épine.

III. Rôle de la composante signalétique de l'embrayage moléculaire dans la transition filopode/épine dendritique

S'il existe une composante mécanique lors de l'engagement des adhésions, il existe aussi une composante signalétique afin de réorganiser le cytosquelette d'actine. En effet, si les filopodes sont composés de filaments longs non branchés et de filaments branchés, la tête de l'épine dendritique est principalement composée de filaments courts branchés (Korobova and Svitkina, 2010). Ainsi par analogie avec la formation des jonctions adhérentes l'agrégation initiale de N-cadhérine pourrait induire l'activation de voies de nucléation de filaments branchés par ARP2/3 (figure 21 ; Harris and Tepass, 2010). Dans les épines, le complexe N-cadhérine/ β -caténine/ α -N-caténine est notamment capable de recruter l'afadine (AF-6) qui à son tour recrute la RhoGEF kalirine-7 qui active la RhoGTPase Rac1 (Xie et al., 2008). L'activation de cette voie, puis celle d'ARP2/3, permettrait une réorganisation du réseau d'actine par la formation d'un réseau branché et induirait un élargissement de la tête de l'épine lors de la synaptogenèse structurale. En effet, la surexpression d'un mutant dominant négatif de Rac1 induit un phénotype filopodial (étude n°2). Nous pourrions donc confirmer grâce aux substrats micro-imprimés le recrutement de ces différentes protéines. Mais également reproduire les expériences de pinces optiques en exprimant des mutants de l'AF-6 incapables de recruter kalirine-7, en utilisant des cultures Rac-KO ou encore en exprimant des siRNA dirigés contre le complexe ARP2/3. Ceci nous permettrait de déterminer si l'intégrité de cette voie est nécessaire à la transition filopode épine ou si cela fait intervenir d'autres partenaires de l' α -N-caténine comme l' α -actinine, ZO1 ou les formines (Knudsen et al., 1995 ; Imamura et al., 1999 ; Kobiela et al., 2004). L'activation de

Rac1 entraîne également la phosphorylation et l'activation de Pak qui à son tour phosphoryle et active la LIMK afin qu'elle inhibe l'ADF/cofiline (figure 34). Or une inhibition de la dépolymérisation pourrait se révéler indispensable lors de l'initiation de l'élargissement de l'épine. Cependant, comme il a été dit précédemment, l'activité de l'ADF/cofiline est nécessaire dans le remodelage du cytosquelette d'actine. Ainsi son inhibition pourrait être transitoire afin d'inhiber initialement la dépolymérisation dans le filopode mais elle ne peut être maintenue tout au long de la formation de la tête de l'épine.

S'il existe un couplage mécanique entre les adhésions N-cadhérine et le réseau d'actine/myosine ainsi qu'un couplage signalétique entre la N-cadhérine et l'organisation des filaments d'actine, se peut-il qu'il existe un couplage signalétique entre les adhésions N-cadhérine et l'activité de la myosine ? Si cela n'a pas été directement démontré, l'étude de Zhang et al., 2005 apporte des pistes quant à sa possible existence. En effet, les auteurs ont montré que l'activation de la myosine se fait par la voie Rac1/Pak dans les épines. Une autre étude montre que la localisation de la myosine et le flux rétrograde d'actine dans les filopodes, sont perturbés lors de l'expression d'un mutant dominant négatif de Rac1 (Tatavarty et al., 2012). Ainsi, lors de la formation du contact adhésif entre le filopode et l'axone, une activation de la voie Rac1/Pak pourrait coordonner le remodelage du cytosquelette d'actine par ARP2/3 et la cofiline avec l'activité de la myosine. L'expression de mutant de la N-cadhérine pourrait ainsi relocaliser la myosine dans les épines dendritiques et expliquer en partie l'inhibition de la rétraction de l'actine lors de l'activation de la contraction actine/myosine lors de l'expression de ces mutants. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait pertinent de localiser la myosine lors de l'expression de ces mutants afin de les comparer à nos résultats dans la première étude.

Il est ainsi possible de s'appuyer sur le modèle de l'embrayage moléculaire ainsi que sur le modèle de formation des jonctions adhérentes afin de comprendre la réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la transition du filopode à l'épine (figure 21). Tout d'abord, le filopode générerait des protrusions sous tendues par une polymérisation et une dépolymérisation des filaments d'actine. Puis le filopode entrerait en contact avec l'axone par l'intermédiaire des protéines d'adhésion N-cadhérine. En engageant l'embrayage moléculaire, le flux d'actine serait ralenti ce qui stimulerait les protrusions membranaires. L'augmentation de contacts adhésifs entre la structure pré- et post-synaptique induirait une agrégation de la N-cadhérine. Ce recrutement de N-cadhérines induirait un recrutement de ses partenaires, les caténines. L' α -N-caténine pourrait ainsi activer plusieurs cascades de signalisation afin d'inhiber la dépolymérisation et d'activer la formation d'un réseau branché d'actine. Ceci induirait une réorganisation du réseau d'actine nécessaire lors de la synaptogenèse structurale.

IV. Quel flux d'actine dans les épines dendritiques?

L'intérêt porté à l'architecture et à la dynamique du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques est très récent. De plus, la taille de l'ordre de 1 μm représente une contrainte expérimentale non négligeable dans cette étude. Il a donc été difficile de construire un modèle comme dans le lamellipode et le filopode conventionnel, tout en sachant que même dans ces modèles des controverses subsistent (Achard et al., 2010 ; Sykes and Plastino, 2010).

Nous avons cependant démontré que le réseaux d'actine branchés faisait partie du "pool" dynamique des épines dendritiques (Star et al., 2002 ; Honkura et al., 2008). En effet, les immobilisations d'ARP2/3 sont transitoires et durent rarement plus d'une minute, suggérant qu'il y a bien renouvellement du réseau branché d'actine dans les épines. Depuis l'étude de photoactivation de l'actine de l'équipe de Kasai, puis celle de sptPALM de l'équipe de Blanpied, il est communément admis qu'il y aurait un flux rétrograde du "pool" dynamique de l'extrémité membranaire ou de la PSD vers le centre de l'épine généré par le "treadmilling" des filaments (Honkura et al., 2008 ; Frost et al., 2010). Ces résultats sont confortés par les études de microscopie électronique se focalisant sur le réseau d'actine entre la PSD et la base du cou de l'épine montrant que les bouts barbés des filaments contactent la PSD (Fifková and Delay, 1982 ; Rácz and Weinberg, 2012).

Cependant, les épines dendritiques sont des structures en 3D dans lesquelles le cytosquelette d'actine génère des protrusions membranaires *in cellulo* et *in vivo* (Fischer et al., 1998 ; Berning et al., 2012). Dans notre deuxième étude nous avons notamment confirmé en PALM-dSTORM 2D que des protrusions riches en actine s'étendent au-delà de la PSD. Il est ainsi fort probable que l'assemblage et le désassemblage de ces protrusions génèrent des forces complexes sur l'ensemble du réseau d'actine. Communément avec une étude de sptPALM précédente, nos résultats montrent qu'à l'échelle du filament d'actine il n'existe que très rarement un flux rétrograde concerté de l'extrémité à la base de l'épine (Tatavarty et al., 2009). L'étude de la direction des trajectoires de monomères d'actine ou du complexe ARP2/3 incorporé dans le réseau montre qu'il existe une polarité mixte des filaments d'actine dans les épines dendritiques. Cependant la cytochalasine, qui inhibe la polymérisation de l'actine et bloque la formation de protrusions membranaires (étude n°1 ; Fischer et al., 1998), diminue significativement la distance parcourue par ces trajectoires (étude n°2). Ces résultats confirment que la nucléation et la croissance d'un réseau d'actine génèrent des forces sur d'autres réseaux dans l'épine. Ces forces complexes, exercées sur un réseau d'actine en 3D, expliquent les mouvements non concertés des monomères d'actine incorporés dans un filament.

Comment expliquer alors le flux rétrograde d'actine observé par l'équipe de Kasai et celle de Blanpied ? Trois explications me semblent possibles. Tout d'abord, nous ne pouvons exclure que certaines épines soient localement polarisées et génèrent des flux rétrogrades

d'actine liés au treadmilling des filaments de la membrane au centre de l'épine. En effet nous avons parfois observé ce type d'évènement et il pourrait être notamment dû à une localisation sub-cellulaire du moteur moléculaire myosine II. Une approche de sptPALM deux couleurs permettant d'observer simultanément le flux d'actine et la localisation de la myosine pourrait apporter une réponse. Cependant dans notre deuxième étude ces évènements sont peu fréquents. La deuxième explication possible est que ce flux rétrograde soit dû au désassemblage d'une protrusion membranaire. Or cela ne reflète pas forcément un treadmilling de filaments mais plutôt une action de dépolymérisation par l'ADF/cofiline. Il a été précédemment décrit que l'ADF/cofiline se concentre aux extrémités des protrusions filopodiales afin d'induire leur désassemblage (figure 12 ; Breitsprecher et al., 2011b). Au cours de ma thèse, nous avons notamment observé que l'ADF/cofiline est présente dans l'ensemble de l'épine et dans les protrusions membranaires. Dans ce cas le flux d'actine lors de la photoactivation représenterait un mouvement d'ensemble lors de la rétraction de la protrusion. Une étude détaillée quant à la distribution en super-résolution de l'ADF/cofiline lors de la motilité des épines pourrait infirmer ou confirmer cette hypothèse. Enfin, il a été montré que dans le lamellipode de cellule motile il y avait des évènements de "ruffling" qui sont des mouvements de protrusions non liés directement à la dépolymérisation de l'actine mais aux forces générées par la myosine II (Giannone et al., 2007). Sachant que l'épine est une protrusion en 3D, il pourrait y avoir des évènements de "ruffling" dans toutes les directions induisant des mouvements d'ensemble du réseau interprétés comme du flux d'actine.

V. N-cadhérine et PSD comme point d'ancrage du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques

L'autre point important quant à la dynamique des réseaux d'actines dans l'épine, vient de l'observation qu'une proportion importante des monomères d'actine incorporés dans un filament soient stationnaires (Tatavarty et al., 2009 ; étude n°2). Ceci suggère qu'il n'y aurait pas de "treadmilling" à l'échelle du filament. Tatavarty et al., 2009, propose un modèle dans lequel le réseau d'actine dans l'épine serait principalement composé de filaments courts. Ces derniers ne rencontreraient pas de contrainte physique comme la membrane lors de leur polymérisation ce qui ne générerait pas de "treadmilling". Cependant, l'épine est une structure très dense en protéines, notamment dans la PSD. De plus, si l'épine est composée de petit réseaux d'actine comment expliquer qu'elle puisse générer des protrusions de l'ordre de 100 à 500 nm ? Nos deux études apportent d'autres explications possibles. Tout d'abord, comme nous l'avons expliqué précédemment, les épines forment un contact adhésif avec l'axone par l'intermédiaire de la N-cadhérine. Puis par le mécanisme de l'embrayage moléculaire, la N-cadhérine ralentit le flux d'actine. Il est donc possible que les adhésions N-cadhérine représentent dans l'épine des points d'ancrages. Dans notre deuxième étude nous avons également montré que le complexe

WAVE et l'un de ses activateurs IRSp53 sont séquestrés puis immobilisés à la PSD. Probablement de part leur interaction avec des protéines comme Shank, PSD-95 et CAMKII (Bockmann et al., 2002 ; Soltau et al., 2004 ; Proepper et al., 2007 ; Park et al., 2012). Ainsi le confinement et l'immobilisation du complexe WAVE dans ce domaine représente un point d'ancrage du complexe ARP2/3 et du réseau d'actine branché. Ces deux points d'ancrage que sont la N-cadhérine et le complexe WAVE pourraient localement et temporairement immobiliser les filaments d'actine afin d'arrêter le "treadmilling". Cependant, dans ce modèle la N-cadhérine et le complexe WAVE sont localisés respectivement à la membrane et proche de celle-ci. Or l'actine est enrichie dans l'ensemble de l'épine et les mouvements stationnaires des monomères dans les filaments ne sont pas préférentiellement localisés aux extrémités membranaires. Il est donc envisageable que les deux modèles coexistent dans l'épine. Il serait donc intéressant de perturber le lien entre ces points d'ancrage et le cytosquelette d'actine. Nous pourrions utiliser des siRNA dirigés contre l' α -N-caténine ou exprimer des mutants de Shank pour perturber la liaison au complexe WAVE, puis suivre les mouvements de l'actine ou d'ARP2/3 en sptPALM. Cependant, au vu de la littérature, l'expression de ce siRNA ou du mutant de Shank induiront des phénotypes filopodiaux. Il sera donc difficile de dissocier l'aspect mécanique de l'aspect développemental et signalétique sur le comportement des trajectoires. Enfin, un jeu complexe de forces s'exercent sur les réseaux d'actines dans l'épine dendritique. Nous ne pouvons donc pas exclure qu'il y ait des mouvements avec des directions opposées qui exercent des forces opposées sur un réseau d'actine qui résulterait en un mouvement nul ou très faible de ce réseau.

VI. PSD, contrainte physique et protrusions membranaires

En s'appuyant sur cette idée originale qu'une contrainte physique réoriente les bouts barbés vers l'extérieur (Achard et al., 2010 ; Sykes and Plastino, 2010), nous proposons que la PSD représente dans l'épine dendritique cette contrainte physique de part sa densité de protéines. Nous avons notamment montré dans la deuxième étude que l'élongation des bouts barbés des filaments d'actine par VASP s'oriente vers l'extérieur de la PSD-95 alors que l'initiation de la nucléation par ARP2/3 a lieu proche de la PSD. Ceci serait à l'origine de la formation des protrusions membranaires et de la motilité des épines. Au cours de l'introduction nous avons vu que la nucléation pouvait être coordonnée dans l'espace avec l'activité des protéines de coiffe qui inhibent la polymérisation aux bouts barbés. Abi1 ainsi qu'IRSp53 peuvent notamment interagir avec la protéine de coiffe Eps8 (Dianza et al., 2004 ; Dianza et al., 2006). Il serait donc pertinent d'étudier en super-résolution si Eps8 est également séquestrée à la PSD ou si elle se trouve dans l'ensemble du réseau d'actine. Ainsi si l'activité de cette protéine de coiffe est accrue au niveau de la PSD, la réorientation des bouts barbés vers l'extérieur de la PSD serait un mécanisme intéressant afin d'échapper à cette inhibition de la polymérisation. Les bouts barbés seraient ainsi disponibles à des

élongateurs comme VASP qui en augmentant la polymérisation induirait les protrusions membranaires. Les études montrant que l'expression d'un shRNA de CapZ β 2, une autre protéine de coiffe, induit de longues protrusions membranaires sur la tête de l'épine (Fan et al., 2011) confortent ce modèle. Ce même phénotype a été observé après l'expression d'un siRNA de la cofiline (Hotulainen et al., 2009), renforçant l'idée que le désassemblage des protrusions fait intervenir la dépolymérisation par l'ADF/cofiline. Afin de valider notre modèle nous pourrions donc exprimer un siRNA contre CapZ β 2 ou un shRNA contre la cofiline afin vérifier la séquestration du complexe WAVE à la PSD et la localisation de VASP au bout de ces longues protrusions.

Cependant le rôle de ces protrusions est encore méconnu et beaucoup de questions restent en suspens. S'agit-il juste d'une propriété découlant de la dynamique du réseau d'actine dans l'épine ? Cela permet-il de sonder l'environnement synaptique afin de s'ajuster aux changements d'activité ? Ces protrusions peuvent-elles interagir avec les cellules gliales ? Cela permet-il à l'épine dendritique de créer de nouveaux contacts adhésifs ? Se peut-il que la N-cadhérine soit présente dans ses protrusions ?

VII. Réorganisation du cytosquelette d'actine des épines dendritiques lors de la plasticité synaptique

Des protocoles de LTP réalisés en tranches organotypiques d'hippocampe ont révélé que les synapses activées voient leur nombre de protrusions membranaires (ou spinules) augmentées 30 min après la stimulation (Toni et al., 1999). Les auteurs ont également remarqué une augmentation de synapses présentant une PSD divisé en deux parties, ce qui pourrait éventuellement représenter le début d'une protrusion ou la fin de celle-ci. Puis une étude a montré que le décaageage de glutamate sur une synapse individuelle induit une grande protrusion enrichie en actine qui permet l'élargissement de la tête de l'épine (vidéo 2 ; Honkura et al., 2008). Enfin l'équipe de Yasuda a corrélé cet élargissement de la tête de l'épine avec une augmentation de l'activité de la CAMKII relayée par les petites RhoGTPases Cdc42 et RhoA (Lee et al., 2009 ; Murakoshi et al., 2011). Dans notre deuxième étude, nous avons notamment montré que l'activation de Rac1, en surexprimant sa forme constitutivement active, induit un élargissement des épines ainsi que des protrusions lamellipodiales. Il est donc possible de faire le parallèle avec les études précédentes et de suggérer qu'il y ait une activation de Rac1 lors de la LTP. Il serait donc judicieux de reproduire les expériences de FRET sur la RhoGTPase Rac1 afin d'étudier le profil d'activation de Rac1 au cours du processus d'élargissement de la tête de l'épine. Nous avons également montré que cette activation de Rac1 induisait une délocalisation du complexe WAVE. Cependant ces expériences ont été faites sur cellules fixées ce qui nous permet pas d'avoir l'aspect temporelle lors de cette activation. Ainsi il serait intéressant d'utiliser un Rac photoactivable (Wu et al., 2009) afin d'activer Rac1 à l'échelle de l'épine individuelle. Nous

pourrions coupler cette photoactivation avec du sptPALM et regarder les changements de localisation et de dynamique du complexe WAVE, du complexe ARP2/3 et de l'actine.

Nous pourrions également induire des protocoles de LTP chimique (cLTP) afin d'observer la réorganisation du cytosquelette d'actine dans les épines dendritiques. Au cours de ma thèse, nous avons tenté de reproduire ce type de protocole sans grand succès. Les effets escomptés n'étant pas reproductibles nous n'avons pas pu observer les changements de localisation et de dynamique pour les différentes protéines d'intérêt. Nous avons également tenté des protocoles plus simple, d'inhibition de l'activité synaptique (TTX : tétrodontoxine) ou d'inhibition de l'activité des GluN (APV : "DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid"), mais nous n'avons pas observé de changements dans la dynamique du complexe ARP2/3 et du complexe WAVE. Comme le suggère nos expériences dans la deuxième étude, l'activité de Rac1 semble étroitement régulé dans les épines. L'induction d'une forte dépolarisation, notamment par décaageage de glutamate pourrait permettre d'induire son activation. Nous pensons donc qu'il serait judicieux d'utiliser des tranches organotypiques d'hippocampe, dans lesquelles ce protocole a été développé, afin d'induire le grossissement d'une épine individuelle. De plus, l'élargissement de la tête de l'épine comporte deux phases, une première phase de moins de 5 min avec une augmentation du volume de plus de 100% suivie d'une phase stable de plus de 1h où le volume est augmenté de 50% (figure 35 ; Matsuzaki et al., 2004). Il serait donc possible d'étudier les changements de coordinations spatiales et temporelles des différentes protéines régulatrices de l'actine lors de ces deux phases et de construire un modèle de la réorganisation du cytosquelette d'actine lors de la plasticité synaptique structurale.

Enfin, le développement de la microscopie super-résolutive en 3D sur des cellules vivantes permettra probablement de répondre à plusieurs questions soulevées lors de cette discussion. Sachant qu'il est aujourd'hui possible d'obtenir une résolution de moins de 10 nm en (x,y) et de moins de 20 nm en (z) (Xu et al., 2012), nous pourrions tout d'abord visualiser les deux "pools" d'actine dans les épines dendritiques et comprendre comment ils sont architecturalement organisés et interconnectés. Il serait également possible de trancher quant à l'existence ou non d'un flux rétrograde d'actine concerté dans les épines. Puis nous pourrions visualiser le domaine membranaire composé de PSD-95, du complexe WAVE et d'IRSp53. En effet, le complexe WAVE et IRSp53 sont-ils localisés uniformément dans la PSD ou sont-ils localisés dans des domaines membranaires distincts de celui d'une protéine comme PSD-95 ? Enfin, comment sont réorganisés en 3D les différentes protéines de la PSD et les récepteurs du glutamate lors de la plasticité synaptique structurale ?

Conclusion

Ainsi s'achève cette thèse. Bien d'autres sujets auraient pu être discutés mais je dois vous remettre ce manuscrit dans quelques heures. J'aimerais remercier encore une fois Grégory Giannone, Olivier Thoumine, Mikael Garcia et Katalin Czöndor qui ont participé à l'élaboration de ce manuscrit.

Je ne saurais finir cette thèse sans une note philosophique et cette citation qui résume la vie du chercheur mais également celle de l'Homme.

"La passion trouve plaisir et satisfaction dans l'esclavage" (Kant).

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/superresolution/index.html>

<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/tirf/tirfintro.html>

- Abe, K., O. Chisaka, F. Van Roy, and M. Takeichi. 2004. Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nature neuroscience*. 7:357–63.
- Abe, K., and M. Takeichi. 2008. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:13–9.
- Abou-Kheir, W., B. Isaac, H. Yamaguchi, and D. Cox. 2008. Membrane targeting of WAVE2 is not sufficient for WAVE2-dependent actin polymerization: a role for IRSp53 in mediating the interaction between Rac and WAVE2. *Journal of cell science*. 121:379–90.
- Abraham, A.V., S. Ram, J. Chao, E.S. Ward, and R.J. Ober. 2009. Quantitative study of single molecule location estimation techniques. *Optics express*. 17:23352–73.
- Achard, V., J.-L. Martiel, A. Michelot, C. Guérin, A.-C. Reymann, L. Blanchoin, and R. Boujemaa-Paterski. 2010. A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Current biology : CB*. 20:423–8.
- Ahuja, R., R. Pinyol, N. Reichenbach, L. Custer, J. Klingensmith, M.M. Kessels, and B. Qualmann. 2007. Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*. 131:337–50.
- Aiga, M., J.N. Levinson, and S.X. Bamji. 2011. N-cadherin and neuroligins cooperate to regulate synapse formation in hippocampal cultures. *The Journal of biological chemistry*. 286:851–8.
- Allison, D.W., V.I. Gelfand, I. Spector, and a M. Craig. 1998. Role of actin in anchoring postsynaptic receptors in cultured hippocampal neurons: differential attachment of NMDA versus AMPA receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:2423–36.
- Amann, K.J., and T.D. Pollard. 2001. Direct real-time observation of actin filament branching mediated by Arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 98:15009–13.
- Andersen, R., Y. Li, M. Resseguie, and J.E. Brenman. 2005. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alters structural plasticity and cytoskeletal dynamics in Drosophila. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:8878–88.
- Annibale, P., M. Scarselli, A. Kodiyam, and A. Radenovic. 2010. Photoactivatable Fluorescent Protein mEos2 Displays Repeated Photoactivation after a Long-Lived Dark State in the Red Photoconverted Form. *The Journal of Physical Chemistry Letters*. 1:1506–1510.
- Antón, I.M., G.E. Jones, F. Wandosell, R. Geha, and N. Ramesh. 2007. WASP-interacting protein (WIP): working in polymerisation and much more. *Trends in cell biology*. 17:555–62.
- Arber, S., F. a Barbayannis, H. Hanser, C. Schneider, C. a Stanyon, O. Bernard, and P. Caroni. 1998. Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature*. 393:805–9.
- Arikkath, J., I.-F. Peng, Y.G. Ng, I. Israely, X. Liu, E.M. Ullian, and L.F. Reichardt. 2009. Delta-catenin regulates spine and synapse morphogenesis and function in hippocampal neurons during development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29:5435–42.
- Arikkath, J., and L.F. Reichardt. 2008. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*. 31:487–94.
- Asrar, S., Y. Meng, Z. Zhou, Z. Todorovski, W.W. Huang, and Z. Jia. 2009. Regulation of hippocampal long-term potentiation by p21-activated protein kinase 1 (PAK1). *Neuropharmacology*. 56:73–80.

- Axelrod, D. 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*. 89:141–5.
- Axelrod, D. 2003. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Methods in enzymology*. 361:1–33.
- Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter, and M. Reinhard. 1999. The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *The Journal of biological chemistry*. 274:23549–57.
- Bamburg, J.R., and B.W. Bernstein. 2010. Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *F1000 biology reports*. 2:62.
- Bamburg, J.R., a McGough, and S. Ono. 1999. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends in cell biology*. 9:364–70.
- Bard, L., C. Boscher, M. Lambert, R.-M. Mège, D. Choquet, and O. Thoumine. 2008. A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:5879–90.
- Bartles, J.R. 2000. Parallel actin bundles and their multiple actin-bundling proteins. *Current opinion in cell biology*. 12:72–8.
- Barzik, M., T.I. Kotova, H.N. Higgs, L. Hazelwood, D. Hanein, F.B. Gertler, and D. a Schafer. 2005. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *The Journal of biological chemistry*. 280:28653–62.
- Bates, M., T.R. Blosser, and X. Zhuang. 2005. Short-range spectroscopic ruler based on a single-molecule optical switch. *Physical Review Letters*. 94:108101.
- Bates, M., B. Huang, G.T. Dempsey, and X. Zhuang. 2007. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science (New York, N.Y.)*. 317:1749–53.
- Bats, C., L. Groc, and D. Choquet. 2007. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*. 53:719–34.
- Baumgartner, W., P. Hinterdorfer, W. Ness, a Raab, D. Vestweber, H. Schindler, and D. Drenckhahn. 2000. Cadherin interaction probed by atomic force microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:4005–10.
- Bear, J.E., T.M. Svitkina, M. Krause, D. a Schafer, J.J. Loureiro, G. a Strasser, I.V. Maly, O.Y. Chaga, J. a Cooper, G.G. Borisy, and F.B. Gertler. 2002. Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell*. 109:509–21.
- Beaudoin, G.M.J., C.M. Schofield, T. Nuwal, K. Zang, E.M. Ullian, B. Huang, and L.F. Reichardt. 2012. Afadin, a Ras/Rap effector that controls cadherin function, promotes spine and excitatory synapse density in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:99–110.
- Beli, P., D. Mascheroni, D. Xu, and M. Innocenti. 2008. WAVE and Arp2/3 jointly inhibit filopodium formation by entering into a complex with mDia2. *Nature cell biology*. 10:849–57.
- Ben-Aissa, K., G. Patino-Lopez, N.V. Belkina, O. Maniti, T. Rosales, J.-J. Hao, M.J. Kruhlak, J.R. Knutson, C. Picart, and S. Shaw. 2012. Activation of moesin, a protein that links actin cytoskeleton to the plasma membrane, occurs by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding sequentially to two sites and releasing an autoinhibitory linker. *The Journal of biological chemistry*. 287:16311–23.
- Benesch, S., S. Polo, F.P.L. Lai, K.I. Anderson, T.E.B. Stradal, J. Wehland, and K. Rottner. 2005. N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *Journal of cell science*. 118:3103–15.
- Benjamin, J.M., A.V. Kwiatkowski, C. Yang, F. Korobova, S. Pokutta, T. Svitkina, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2010. AlphaE-catenin regulates actin dynamics independently of cadherin-mediated cell-cell adhesion. *The Journal of cell biology*. 189:339–52.
- Benson, D.L., and H. Tanaka. 1998. N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 18:6892–904.

- Berning, S., K.I. Willig, H. Steffens, P. Dibaj, and S.W. Hell. 2012. Nanoscopy in a living mouse brain. *Science (New York, N.Y.)*. 335:551.
- Bernstein, B.W., and J.R. Bamburg. 2010. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends in cell biology*. 20:187–95.
- Betzig, E., G.H. Patterson, R. Sougrat, O.W. Lindwasser, S. Olenych, J.S. Bonifacino, M.W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H.F. Hess. 2006. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science (New York, N.Y.)*. 313:1642–5.
- Biederer, T., Y. Sara, M. Mozhayeva, D. Atasoy, X. Liu, E.T. Kavalali, and T.C. Südhof. 2002. SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science (New York, N.Y.)*. 297:1525–31.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 1999. Mechanism of interaction of Acanthamoeba actophorin (ADF/Cofilin) with actin filaments. *The Journal of biological chemistry*. 274:15538–46.
- Blanchoin, L., and T.D. Pollard. 2002. Hydrolysis of ATP by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*. 41:597–602.
- Blanpied, T. a, J.M. Kerr, and M.D. Ehlers. 2008. Structural plasticity with preserved topology in the postsynaptic protein network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:12587–92.
- Bockmann, J., M.R. Kreutz, E.D. Gundelfinger, and T.M. Böckers. 2002. ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *Journal of neurochemistry*. 83:1013–7.
- Boczkowska, M., G. Rebowski, M.V. Petoukhov, D.B. Hayes, D.I. Svergun, and R. Dominguez. 2008. X-ray scattering study of activated Arp2/3 complex with bound actin-WCA. *Structure (London, England : 1993)*. 16:695–704.
- Boda, B., S. Alberi, I. Nikonenko, R. Node-Langlois, P. Jourdain, M. Moosmayer, L. Parisi-Jourdain, and D. Muller. 2004. The mental retardation protein PAK3 contributes to synapse formation and plasticity in hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24:10816–25.
- Boggon, T.J., J. Murray, S. Chappuis-Flament, E. Wong, B.M. Gumbiner, and L. Shapiro. 2002. C-cadherin ectodomain structure and implications for cell adhesion mechanisms. *Science (New York, N.Y.)*. 296:1308–13.
- Bosch M., J. Castro, T. Saneyoshi, M. Sur, and Y. Hayashi. 2012. Structural and molecular remodeling of single dendritic spines during long-term potentiation. *Poster FENS Barcelona*.
- Bosch, M., K.H.D. Le, B. Bugyi, J.J. Correia, L. Renault, and M.-F. Carlier. 2007. Analysis of the function of Spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Molecular cell*. 28:555–68.
- Bourne, J.N., and K.M. Harris. 2008. Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annual review of neuroscience*. 31:47–67.
- Bozdagi, O., W. Shan, H. Tanaka, D.L. Benson, and G.W. Huntley. 2000. Increasing numbers of synaptic puncta during late-phase LTP: N-cadherin is synthesized, recruited to synaptic sites, and required for potentiation. *Neuron*. 28:245–59.
- Bozdagi, O., X. Wang, J.S. Nikitczuk, T.R. Anderson, E.B. Bloss, G.L. Radice, Q. Zhou, D.L. Benson, and G.W. Huntley. 2010. Persistence of coordinated long-term potentiation and dendritic spine enlargement at mature hippocampal CA1 synapses requires N-cadherin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:9984–9.
- Braga, V.M., L.M. Machesky, a Hall, and N. a Hotchin. 1997. The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. *The Journal of cell biology*. 137:1421–31.
- Brandt, D.T., S. Marion, G. Griffiths, T. Watanabe, K. Kaibuchi, and R. Grosse. 2007. Dia1 and IQGAP1 interact in cell migration and phagocytic cup formation. *The Journal of cell biology*. 178:193–200.
- Brasch, J., O.J. Harrison, B. Honig, and L. Shapiro. 2012. Thinking outside the cell: how cadherins drive adhesion. *Trends in cell biology*. 22:299–310.

- Breitsprecher, D., R. Jaiswal, J.P. Bombardier, C.J. Gould, J. Gelles, and B.L. Goode. 2012. Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science (New York, N.Y.)*. 336:1164–8.
- Breitsprecher, D., A.K. Kieseewetter, J. Linkner, C. Urbanke, G.P. Resch, J.V. Small, and J. Faix. 2008. Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *The EMBO journal*. 27:2943–54.
- Breitsprecher, D., A.K. Kieseewetter, J. Linkner, M. Vinzenz, T.E.B. Stradal, J.V. Small, U. Curth, R.B. Dickinson, and J. Faix. 2011a. Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *The EMBO journal*. 30:456–67.
- Breitsprecher, D., S. a Koestler, I. Chizhov, M. Nemethova, J. Mueller, B.L. Goode, J.V. Small, K. Rottner, and J. Faix. 2011b. Cofilin cooperates with fascin to disassemble filopodial actin filaments. *Journal of cell science*. 124:3305–18.
- Brill-Karniely, Y., Y. Ideses, A. Bernheim-Groswasser, and A. Ben-Shaul. 2009. From branched networks of actin filaments to bundles. *Chemphyschem: a European journal of chemical physics and physical chemistry*. 10(16):2818–27.
- Bu, W., A.M. Chou, K.B. Lim, T. Sudhakaran, and S. Ahmed. 2009. The Toca-1-N-WASP complex links filopodial formation to endocytosis. *The Journal of biological chemistry*. 284:11622–36.
- Buchert, M., S. Schneider, V. Meskenaite, M.T. Adams, E. Canaani, T. Baechli, K. Moelling, and C.M. Hovens. 1999. The junction-associated protein AF-6 interacts and clusters with specific Eph receptor tyrosine kinases at specialized sites of cell-cell contact in the brain. *The Journal of cell biology*. 144:361–71.
- Buchs, P. a, and D. Muller. 1996. Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:8040–5.
- Burnette, D.T., S. Manley, P. Sengupta, R. Sougrat, M.W. Davidson, B. Kachar, and J. Lippincott-Schwartz. 2011. A role for actin arcs in the leading-edge advance of migrating cells. *Nature cell biology*. 13:371–81.
- Cai, L., A.M. Makhov, D. a Schafer, and J.E. Bear. 2008. Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell*. 134:828–42.
- Campellone, K.G., and M.D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:237–51.
- Chappuis-Flament, S. 2001. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *The Journal of Cell Biology*. 154:231–243.
- Cheezum, M.K., W.F. Walker, and W.H. Guilford. 2001. Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophysical journal*. 81:2378–88.
- Chen, X., S. Kojima, G.G. Borisy, and K.J. Green. 2003. P120 Catenin Associates With Kinesin and Facilitates the Transport of Cadherin-Catenin Complexes To Intercellular Junctions. *The Journal of cell biology*. 163:547–57.
- Chen, Y.T., D.B. Stewart, and W.J. Nelson. 1999. Coupling assembly of the E-cadherin/beta-catenin complex to efficient endoplasmic reticulum exit and basal-lateral membrane targeting of E-cadherin in polarized MDCK cells. *The Journal of cell biology*. 144:687–99.
- Chen, Z., D. Borek, S.B. Padrick, T.S. Gomez, Z. Metlagel, A.M. Ismail, J. Umetani, D.D. Billadeau, Z. Otwinowski, and M.K. Rosen. 2010. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature*. 468:533–8.
- Chereau, D., F. Kerff, P. Graceffa, Z. Grabarek, K. Langsetmo, and R. Dominguez. 2005. Actin-bound structures of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP)-homology domain 2 and the implications for filament assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:16644–9.
- Chesarone, M. a, A.G. DuPage, and B.L. Goode. 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:62–74.
- Choi, J., J. Ko, B. Racz, A. Burette, J.-R. Lee, S. Kim, M. Na, H.W. Lee, K. Kim, R.J. Weinberg, and E. Kim. 2005. Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a

- downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:869–79.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 88:39–48.
- Cingolani, L. a, and Y. Goda. 2008. Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature reviews. Neuroscience*. 9:344–56.
- Colicos, M. a, B.E. Collins, M.J. Sailor, and Y. Goda. 2001. Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell*. 107:605–16.
- Collingridge, G.L., S. Peineau, J.G. Howland, and Y.T. Wang. 2010. Long-term depression in the CNS. *Nature reviews. Neuroscience*. 11:459–73.
- Cooper, J. a, and D. Sept. 2008. New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *International review of cell and molecular biology*. 267:183–206.
- Czuchra, A., X. Wu, and H. Meyer. 2005. Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Molecular biology of the cell*. 16:4473–4484.
- Dailey M.E., and S.J. Smith. 1996. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *The Journal of Neuroscience*. 16(9):2983–2994.
- Daugherty, R.L., and C.J. Gottardi. 2007. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda, Md.)*. 22:303–9.
- Davis, M. a, R.C. Ireton, and A.B. Reynolds. 2003. A core function for p120-catenin in cadherin turnover. *The Journal of cell biology*. 163:525–34.
- Dent, E.W., A.V. Kwiatkowski, L.M. Mebane, U. Philippar, M. Barzik, D. a Rubinson, S. Gupton, J.E. Van Veen, C. Furman, J. Zhang, A.S. Alberts, S. Mori, and F.B. Gertler. 2007. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nature cell biology*. 9:1347–59.
- Dent, E.W., E.B. Merriam, and X. Hu. 2011. The dynamic cytoskeleton: backbone of dendritic spine plasticity. *Current opinion in neurobiology*. 21:175–81.
- Derivery, E., and A. Gautreau. 2010. Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 32:119–31.
- Derivery, E., B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau. 2009a. The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell motility and the cytoskeleton*. 66:777–90.
- Derivery, E., C. Sousa, J.J. Gautier, B. Lombard, D. Loew, and A. Gautreau. 2009b. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Developmental cell*. 17:712–23.
- Derkach, V. A, M.C. Oh, E.S. Guire, and T.R. Soderling. (2007). Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*, 8(2), 101–13.
- DeRosier, D.J., and K.T. Edds. 1980. Evidence for fascin cross-links between the actin filaments in coelomocyte filopodia. *Experimental cell research*. 126(2):490-4.
- Disanza, A., M.-F. Carlier, T.E.B. Stradal, D. Didry, E. Frittoli, S. Confalonieri, A. Croce, J. Wehland, P.P. Di Fiore, and G. Scita. 2004. Eps8 controls actin-based motility by capping the barbed ends of actin filaments. *Nature cell biology*. 6:1180–8.
- Disanza, A., S. Mantoani, M. Hertzog, S. Gerboth, E. Frittoli, A. Steffen, K. Berhoerster, H.-J. Kreienkamp, F. Milanesi, P.P. Di Fiore, A. Ciliberto, T.E.B. Stradal, and G. Scita. 2006. Regulation of cell shape by Cdc42 is mediated by the synergic actin-bundling activity of the Eps8-IRSp53 complex. *Nature cell biology*. 8:1337–47.
- Drachman D.A. 2005. Do we have brain to spare? *Neurology*. 64(12):2004-2005.
- Drees, F., S. Pokutta, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2005. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*. 123:903–15.
- le Duc, Q., Q. Shi, I. Blonk, A. Sonnenberg, N. Wang, D. Leckband, and J. de Rooij. 2010. Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *The Journal of cell biology*. 189:1107–15.

- Dunaevsky, a, A. Tashiro, A. Majewska, C. Mason, and R. Yuste. 1999. Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:13438–43.
- Durand, C.M., J. Perroy, F. Loll, D. Perrais, L. Fagni, T. Bourgeron, M. Montcouquiol, and N. Sans. 2012. SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Molecular psychiatry*. 17:71–84.
- Elia, L.P., M. Yamamoto, K. Zang, and L.F. Reichardt. 2006. p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron*. 51:43–56.
- Ellermann, V. 1906. On the detection of rhizopods in two cases of acute anterior poliomyelitis. In: Bruce A., Bramwell E., Campbell M., Eds. *Review of neurology and psychiatry*. 353.
- Engert, F., and T. Bonhoeffer. 1999. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 399:66–70.
- Faix, J., D. Breitsprecher, T.E.B. Stradal, and K. Rottner. 2009. Filopodia: Complex models for simple rods. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 41:1656–64.
- Fan, Y., X. Tang, E. Vitriol, G. Chen, and J.Q. Zheng. 2011. Actin capping protein is required for dendritic spine development and synapse formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:10228–33.
- Ferron, F., G. Rebowski, S.H. Lee, and R. Dominguez. 2007. Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *The EMBO journal*. 26:4597–606.
- Fievet, B.T., A. Gautreau, C. Roy, L. Del Maestro, P. Mangeat, D. Louvard, and M. Arpin. 2004. Phosphoinositide binding and phosphorylation act sequentially in the activation mechanism of ezrin. *The Journal of cell biology*. 164:653–9.
- Fifková E., and R.J. Delay. 1982. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *Journal of Cell Biology*. 95(1):345–50.
- Fischer, M., S. Kaech, D. Knutti, and A. Matus. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*. 20:847–54.
- Fleming I.N., C.M. Elliott, F.G. Buchanan, C.P. Downes, and J.H. Exton. Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II regulates Tiam1 by reversible protein phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 274(18):12753–8.
- Frost, N. a, H. Shroff, H. Kong, E. Betzig, and T. a Blanpied. 2010. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron*. 67:86–99.
- Fujiwara, T., a Mammoto, Y. Kim, and Y. Takai. 2000. Rho small G-protein-dependent binding of mDia to an Src homology 3 domain-containing IRSp53/BAIAP2. *Biochemical and biophysical research communications*. 271:626–9.
- Fukazawa, Y., Y. Saitoh, F. Ozawa, Y. Ohta, K. Mizuno, and K. Inokuchi. 2003. Hippocampal LTP is accompanied by enhanced F-actin content within the dendritic spine that is essential for late LTP maintenance in vivo. *Neuron*. 38:447–60.
- Furutani, Y., H. Matsuno, M. Kawasaki, T. Sasaki, K. Mori, and Y. Yoshihara. 2007. Interaction between telencephalin and ERM family proteins mediates dendritic filopodia formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:8866–76.
- Fölling, J., M. Bossi, H. Bock, R. Medda, C.A. Wurm, B. Hein, S. Jakobs, C. Eggeling, and S.W. Hell. 2008. Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature methods*. 5:943–5.
- Galkin, V.E., A. Orlova, and E.H. Egelman. 2012. Actin filaments as tension sensors. *Current biology : CB*. 22:R96–101.
- Gautreau, A., H.H. Ho, J. Li, H. Steen, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2004. Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:4379–83.

- Gavard, J., M. Lambert, I. Grosheva, V. Marthiens, T. Irinopoulou, J.-F. Riou, A. Bershadsky, and R.-M. Mège. 2004. Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *Journal of cell science*. 117:257–70.
- Gerrow, K., S. Romorini, S.M. Nabi, M. a Colicos, C. Sala, and A. El-Husseini. 2006. A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron*. 49:547–62.
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, H.-G. Döbereiner, N. Kieffer, A.R. Bresnick, and M.P. Sheetz. 2004. Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell*. 116:431–43.
- Giannone, G., B.J. Dubin-Thaler, O. Rossier, Y. Cai, O. Chaga, G. Jiang, W. Beaver, H.-G. Döbereiner, Y. Freund, G. Borisy, and M.P. Sheetz. 2007. Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell*. 128:561–75.
- Giannone, G., E. Hosy, F. Levet, A. Constals, K. Schulze, A.I. Sobolevsky, M.P. Rosconi, E. Gouaux, R. Tampé, D. Choquet, and L. Cognet. 2010. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical journal*. 99:1303–10.
- Giannone, G., R.-M. Mège, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in cell biology*. 19:475–86.
- Goh, W.I., K.B. Lim, T. Sudhaharan, K.P. Sem, W. Bu, A.M. Chou, and S. Ahmed. 2012. mDia1 and WAVE2 proteins interact directly with IRSp53 in filopodia and are involved in filopodium formation. *The Journal of biological chemistry*. 287:4702–14.
- Gold, M.G. 2012. A frontier in the understanding of synaptic plasticity: solving the structure of the postsynaptic density. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 34:599–608.
- Goldschmidt-Clermont, P.J., L.M. Machesky, S.K. Doberstein, and T.D. Pollard. 1991. Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *The Journal of cell biology*. 113:1081–9.
- Goley, E.D., and M.D. Welch. 2006. The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:713–26.
- Goodwin, M., E.M. Kovacs, M. a Thoreson, A.B. Reynolds, and A.S. Yap. 2003. Minimal mutation of the cytoplasmic tail inhibits the ability of E-cadherin to activate Rac but not phosphatidylinositol 3-kinase: direct evidence of a role for cadherin-activated Rac signaling in adhesion and contact formation. *The Journal of biological chemistry*. 278:20533–9.
- Grabrucker, A.M., M.J. Knight, C. Proepper, J. Bockmann, M. Joubert, M. Rowan, G.U. Nienhaus, C.C. Garner, J.U. Bowie, M.R. Kreutz, E.D. Gundelfinger, and T.M. Boeckers. 2011. Concerted action of zinc and ProSAP/Shank in synaptogenesis and synapse maturation. *The EMBO journal*. 30:569–81.
- Graf, E.R., X. Zhang, S.-X. Jin, M.W. Linhoff, and A.M. Craig. 2004. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell*. 119:1013–26.
- Gray E.G. 1959. Electron Microscopy of Synaptic Contacts on Dendrite Spines of the Cerebral Cortex. *Nature*. 183, 1592-1593.
- Graziano, B.R., A.G. DuPage, A. Michelot, D. Breitsprecher, J.B. Moseley, I. Sagot, L. Blanchoin, and B.L. Goode. 2011. Mechanism and cellular function of Bud6 as an actin nucleation-promoting factor. *Molecular biology of the cell*. 22:4016–28.
- Greif, K.F., N. Asabere, G.J. Lutz, and G. Gallo. 2012. Synaptotagmin-1 promotes the formation of axonal filopodia and branches along the developing axons of forebrain neurons. *Developmental neurobiology*. 1.
- Gremm, D., and a Wegner. 2000. Gelsolin as a calcium-regulated actin filament-capping protein. *European journal of biochemistry / FEBS*. 267:4339–45.
- Grossman, S.D., M. Futter, G.L. Snyder, P.B. Allen, A.C. Nairn, P. Greengard, and L.C. Hsieh-Wilson. 2004. Spinophilin is phosphorylated by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II resulting in regulation of its binding to F-actin. *Journal of neurochemistry*. 90:317–24.
- Grove M., G. Demyanenko, A. Echarri, P.A. Zipfel, M.E. Quiroz, R.M. Rodriguiz, M. Playford, SA. Mertensen, M.R. Robinson, W.C. Wetsel, P.F. Maness, and A.M. Pendergast. 2004. ABI2-

- deficient mice exhibit defective cell migration, aberrant dendritic spine morphogenesis, and deficits in learning and memory. *Molecular and Cellular Biology*. 24(24):10905-22.
- Guillery, R.W. 2000. Early electron microscopic observations of synaptic structures in the cerebral cortex: a view of the contributions made by George Gray (1924-1999). *Trends in neurosciences*. 23:594-8.
- Guilluy, C., R. Garcia-Mata, and K. Burridge. 2011. Rho protein crosstalk: another social network? *Trends in cell biology*. 21:718-26.
- Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6:622-34.
- Gustafsson, M.G. 2000. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*. 198:82-7.
- Haditsch, U., D.P. Leone, M. Farinelli, A. Chrostek-Grashoff, C. Brakebusch, I.M. Mansuy, S.K. McConnell, and T.D. Palmer. 2009. A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Molecular and cellular neurosciences*. 41:409-19.
- Haeckel, A., R. Ahuja, E.D. Gundelfinger, B. Qualmann, and M.M. Kessels. 2008. The actin-binding protein Abp1 controls dendritic spine morphology and is important for spine head and synapse formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:10031-44.
- Harris, K.M., F.E. Jensen, and B. Tsao. 1992. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 12:2685-705.
- Harris, T.J.C., and U. Tepass. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:502-14.
- Harrison, R.G. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Anat Rec*. 1:116-8.
- Harrison, O.J., F. Bahna, P.S. Katsamba, X. Jin, J. Brasch, J. Vendome, G. Ahlsen, K.J. Carroll, S.R. Price, B. Honig, and L. Shapiro. 2010. Two-step adhesive binding by classical cadherins. *Nature structural & molecular biology*. 17:348-57.
- Harrison, O.J., X. Jin, S. Hong, F. Bahna, G. Ahlsen, J. Brasch, Y. Wu, J. Vendome, K. Felsovalyi, C.M. Hampton, R.B. Troyanovsky, A. Ben-Shaul, J. Frank, S.M. Troyanovsky, L. Shapiro, and B. Honig. 2011. The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Structure (London, England : 1993)*. 19:244-56.
- Hart M.J., G.C. Marinella, B. Souza, and P. Polakis. 1996. IQGAP1, a clamodulin-binding protein with a rasGAP-related domain, is a potential effector for cdc42Hs. *The EMBO Journal*. 15(12):2997-3005.
- Haviv, L., Y. Brill-Karniely, R. Mahaffy, F. Backouche, A. Ben-Shaul, T.D. Pollard, and A. Bernheim-Groswasser. 2006. Reconstitution of the transition from lamellipodium to filopodium in a membrane-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:4906-11.
- Hayashi, M.L., S.-Y. Choi, B.S.S. Rao, H.-Y. Jung, H.-K. Lee, D. Zhang, S. Chattarji, A. Kirkwood, and S. Tonegawa. 2004. Altered cortical synaptic morphology and impaired memory consolidation in forebrain-specific dominant-negative PAK transgenic mice. *Neuron*. 42:773-87.
- Hayashi-Takagi, A., M. Takaki, N. Graziane, S. Seshadri, H. Murdoch, A.J. Dunlop, Y. Makino, A.J. Seshadri, K. Ishizuka, D.P. Srivastava, Z. Xie, J.M. Baraban, M.D. Houslay, T. Tomoda, N.J. Brandon, A. Kamiya, Z. Yan, P. Penzes, and A. Sawa. 2010. Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nature neuroscience*. 13:327-32.
- Heasman, S.J., and A.J. Ridley. 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:690-701.
- Heine, M., L. Groc, R. Frischknecht, J.-C. Béïque, B. Lounis, G. Rumbaugh, R.L. Huganir, L. Cognet, and D. Choquet. 2008. Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science (New York, N.Y.)*. 320:201-5.

- Heine M., O. Thoumine, M. Mondin, B. Tessier, G. Giannone, and D. Choquet. 2008. Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroigine contacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105(52):20947-52.
- Hell, S.W. 2007. Far-field optical nanoscopy. *Science (New York, N.Y.)*. 316:1153-8.
- Hell S.W., and M. Kroug. 1995. Ground-state-depletion fluorescence microscopy: a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Applied Physics B*. 60:495-497.
- Hell, S.W., and J. Wichmann. 1994. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*. 19:780-2.
- Hering, H., and M. Sheng. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:11759-69.
- Hernandez-Valladares, M., T. Kim, B. Kannan, A. Tung, A.H. Aguda, M. Larsson, J. a Cooper, and R.C. Robinson. 2010. Structural characterization of a capping protein interaction motif defines a family of actin filament regulators. *Nature structural & molecular biology*. 17:497-503.
- Hertzog, M., C. van Heijenoort, D. Didry, M. Gaudier, J. Coutant, B. Gigant, G. Didelot, T. Pr eat, M. Knossow, E. Guittet, and M.-F. Carlier. 2004. The beta-thymosin/WH2 domain; structural basis for the switch from inhibition to promotion of actin assembly. *Cell*. 117:611-23.
- Hess, S.T., T.P.K. Girirajan, and M.D. Mason. 2006. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical journal*. 91:4258-72.
- Higgs, H.N. 2011. Discussing the morphology of actin filaments in lamellipodia. *Trends in cell biology*. 21:2-4; author reply 4-5.
- Hilpel a, P., M.K. Vartiainen, and P. Lappalainen. 2004. Regulation of the actin cytoskeleton by PI(4,5)P2 and PI(3,4,5)P3. *Current topics in microbiology and immunology*. 282:117-63.
- Ho, H.-Y.H., R. Rohatgi, A.M. Lebensohn, Le Ma, J. Li, S.P. Gygi, and M.W. Kirschner. 2004. Toca-1 mediates Cdc42-dependent actin nucleation by activating the N-WASP-WIP complex. *Cell*. 118:203-16.
- Hodges, J.L., K. Newell-Litwa, H. Asmussen, M. Vicente-Manzanares, and A.R. Horwitz. 2011. Myosin IIb activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. *PloS one*. 6:e24149.
- Hoe, H.-S., J.-Y. Lee, and D.T.S. Pak. 2009. Combinatorial morphogenesis of dendritic spines and filopodia by SPAR and alpha-actinin2. *Biochemical and biophysical research communications*. 384:55-60.
- Honkura, N., M. Matsuzaki, J. Noguchi, G.C.R. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2008. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron*. 57:719-29.
- Hotulainen, P., and C.C. Hoogenraad. 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*. 189:619-29.
- Hotulainen, P., O. Llano, S. Smirnov, K. Tanhuanp a, J. Faix, C. Rivera, and P. Lappalainen. 2009. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 185:323-39.
- Hotulainen, P., E. Paunola, M.K. Vartiainen, and P. Lappalainen. 2005. Actin-depolymerizing factor and cofilin-1 play overlapping roles in promoting rapid F-actin depolymerization in mammalian nonmuscle cells. *Molecular biology of the cell*. 16:649-64.
- Hu, K., L. Ji, K.T. Applegate, G. Danuser, and C.M. Waterman-Storer. 2007. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science (New York, N.Y.)*. 315:111-5.
- Huang, B., S.A. Jones, B. Brandenburg, and X. Zhuang. 2008a. Whole-cell 3D STORM reveals interactions between cellular structures with nanometer-scale resolution. *Nature methods*. 5:1047-52.
- Huang, B., W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. 2008b. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science (New York, N.Y.)*. 319:810-3.

- Imamura, Y., M. Itoh, Y. Maeno, S. Tsukita, and a Nagafuchi. 1999. Functional domains of alpha-catenin required for the strong state of cadherin-based cell adhesion. *The Journal of cell biology*. 144:1311–22.
- Innocenti, M., S. Gerboth, K. Rottner, F.P.L. Lai, M. Hertzog, T.E.B. Stradal, E. Frittoli, D. Didry, S. Polo, A. Disanza, S. Benesch, P.P. Di Fiore, M.-F. Carlier, and G. Scita. 2005. Abi1 regulates the activity of N-WASP and WAVE in distinct actin-based processes. *Nature cell biology*. 7:969–76.
- Innocenti, M., A. Zucconi, A. Disanza, E. Frittoli, L.B. Areces, A. Steffen, T.E.B. Stradal, P.P. Di Fiore, M.-F. Carlier, and G. Scita. 2004. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nature cell biology*. 6:319–27.
- Insall, R.H. 2011. Dogma bites back--the evidence for branched actin. *Trends in cell biology*. 21:2; author reply 4–5.
- Irie, F., and Y. Yamaguchi. 2002. EphB receptors regulate dendritic spine development via intersectin, Cdc42 and N-WASP. *Nature neuroscience*. 5:1117–8.
- Ismail, A.M., S.B. Padrick, B. Chen, J. Umetani, and M.K. Rosen. 2009. The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nature structural & molecular biology*. 16:561–3.
- Ivanov, A., D. Hunt, and M. Utech. 2005. Differential roles for actin polymerization and a myosin II motor in assembly of the epithelial apical junctional complex. *Molecular biology of the ...* 16:2636–2650.
- Iwasa, J.H., and R.D. Mullins. 2007. Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Current biology : CB*. 17:395–406.
- Izeddin, I., J. Boulanger, V. Racine, C.G. Specht, A. Kechkar, D. Nair, A. Triller, D. Choquet, M. Dahan, and J.B. Sibarita. 2012. Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Optics express*. 20:2081–95.
- Izeddin, I., C.G. Specht, M. Lelek, X. Darzacq, A. Triller, C. Zimmer, and M. Dahan. 2011. Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS one*. 6:e15611.
- Jayo, A., and M. Parsons. 2010. Fascin: a key regulator of cytoskeletal dynamics. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 42:1614–7.
- Jia, D., T.S. Gomez, Z. Metlagel, J. Umetani, and Z. Otwinowski. 2010. WASH and WAVE actin regulators of the Wiskott – Aldrich syndrome protein (WASP) family are controlled by analogous structurally related complexes. 2–7.
- Jiang G., G. Giannone, D.R. Critchley, E. Fukumoto, and M.P. Sheetz. 2003. Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature*. 424(6946):334-7.
- Jones, S. a, S.-H. Shim, J. He, and X. Zhuang. 2011. Fast, three-dimensional super-resolution imaging of live cells. *Nature methods*. 8:499–508.
- Jontes, J.D., M.R. Emond, and S.J. Smith. 2004. In vivo trafficking and targeting of N-cadherin to nascent presynaptic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24:9027–34.
- Jourdain, P., K. Fukunaga, and D. Muller. 2003. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to activity-dependent filopodia growth and spine formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 23:10645–9.
- Kaksonen, M., C.P. Toret, and D.G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 7:404–14.
- Kayser, M.S., A.C. McClelland, E.G. Hughes, and M.B. Dalva. 2006. Intracellular and trans-synaptic regulation of glutamatergic synaptogenesis by EphB receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:12152–64.
- Kayser, M.S., M.J. Nolt, and M.B. Dalva. 2008. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron*. 59:56–69.
- Kelly, A.E., H. Kranitz, V. Dötsch, and R.D. Mullins. 2006. Actin binding to the central domain of WASP/Scar proteins plays a critical role in the activation of the Arp2/3 complex. *The Journal of biological chemistry*. 281:10589–97.

- Kerr, J.M., and T. a Blanpied. 2012. Subsynaptic AMPA receptor distribution is acutely regulated by actin-driven reorganization of the postsynaptic density. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:658–73.
- Kholmanskikh, S.S., H.B. Koeller, A. Wynshaw-Boris, T. Gomez, P.C. Letourneau, and M.E. Ross. 2006. Calcium-dependent interaction of Lis1 with IQGAP1 and Cdc42 promotes neuronal motility. *Nature neuroscience*. 9:50–7.
- Kim, a S., L.T. Kakalis, N. Abdul-Manan, G. a Liu, and M.K. Rosen. 2000. Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature*. 404:151–8.
- Kim, C.H., and J.E. Lisman. 1999. A role of actin filament in synaptic transmission and long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 19:4314–24.
- Kim, K., M.E. McCully, N. Bhattacharya, B. Butler, D. Sept, and J. a Cooper. 2007. Structure/function analysis of the interaction of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with actin-capping protein: implications for how capping protein binds the actin filament. *The Journal of biological chemistry*. 282:5871–9.
- Kim, Y., J.Y. Sung, I. Ceglia, K.-W. Lee, J.-H. Ahn, J.M. Halford, A.M. Kim, S.P. Kwak, J.B. Park, S. Ho Ryu, A. Schenck, B. Bardoni, J.D. Scott, A.C. Nairn, and P. Greengard. 2006. Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature*. 442:814–7.
- Kiuchi, T., K. Ohashi, S. Kurita, and K. Mizuno. 2007. Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *The Journal of cell biology*. 177:465–76.
- Knudsen, K. a, a P. Soler, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1995. Interaction of alpha-actinin with the cadherin/catenin cell-cell adhesion complex via alpha-catenin. *The Journal of cell biology*. 130:67–77.
- Ko, J., M.V. Fuccillo, R.C. Malenka, and T.C. Südhof. 2009. LRRTM2 functions as a neuroligin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron*. 64:791–8.
- Kobayashi, K., S. Kuroda, M. Fukata, T. Nakamura, T. Nagase, N. Nomura, Y. Matsuura, N. Yoshida-Kubomura, a Iwamatsu, and K. Kaibuchi. 1998. p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *The Journal of biological chemistry*. 273:291–5.
- Kobielak, A., H.A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nature cell biology*. 6:21–30.
- Koestler, S. a, K. Rottner, F. Lai, J. Block, M. Vinzenz, and J.V. Small. 2009. F- and G-actin concentrations in lamellipodia of moving cells. *PLoS one*. 4:e4810.
- Kopeck, C.D., B. Li, W. Wei, J. Boehm, and R. Malinow. 2006. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:2000–9.
- Korobova, F., and T. Svitkina. 2008. Arp2 / 3 Complex Is Important for Filopodia Formation , Growth Cone Motility , and Neuritegenesis in Neuronal Cells. 19:1561–1574.
- Korobova, F., and T. Svitkina. 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Molecular biology of the cell*. 21:165–76.
- Koskinen M., E. Bertling, and P. Hotulainen. 2012. Dendritic spine motility and actin dynamics during neuron maturation. *Poster FENS Barcelona*.
- Kovacs, E.M., R.G. Ali, A.J. McCormack, and A.S. Yap. 2002a. E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *The Journal of biological chemistry*. 277:6708–18.
- Kovacs, E.M., M. Goodwin, R.G. Ali, A.D. Paterson, and A.S. Yap. 2002b. Cadherin-directed actin assembly: E-cadherin physically associates with the Arp2/3 complex to direct actin assembly in nascent adhesive contacts. *Current biology : CB*. 12:379–82.
- Kovar, D.R., E.S. Harris, R. Mahaffy, H.N. Higgs, and T.D. Pollard. 2006. Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell*. 124:423–35.

- Krucker, T., G.R. Siggins, and S. Halpain. 2000. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:6856–61.
- Krugmann, S., I. Jordens, K. Gevaert, M. Driessens, J. Vandekerckhove, and A. Hall. 2001. Cdc42 induces filopodia by promoting the formation of an IRSp53 : Mena complex. *Current Biology: CB*. 11(21):1645–1655.
- Kueh, H.Y., G.T. Charras, T.J. Mitchison, and W.M. Brieher. 2008. Actin disassembly by cofilin, coronin, and Aip1 occurs in bursts and is inhibited by barbed-end cappers. *The Journal of cell biology*. 182:341–53.
- Kureishy, N., V. Sapountzi, S. Prag, N. Anilkumar, and J.C. Adams. 2002. Fascins, and their roles in cell structure and function. *Bioessays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 24(4):350-61.
- Kuriu, T., A. Inoue, H. Bito, K. Sobue, and S. Okabe. 2006. Differential control of postsynaptic density scaffolds via actin-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:7693–706.
- Kwiatkowski, A.V., D. a Rubinson, E.W. Dent, J. Edward van Veen, J.D. Leslie, J. Zhang, L.M. Mebane, U. Philippar, E.M. Pinheiro, A. a Burds, R.T. Bronson, S. Mori, R. Fässler, and F.B. Gertler. 2007. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex. *Neuron*. 56:441–55.
- De La Cruz, E.M., E.M. Ostap, R. a Brundage, K.S. Reddy, H.L. Sweeney, and D. Safer. 2000. Thymosin-beta(4) changes the conformation and dynamics of actin monomers. *Biophysical journal*. 78:2516–27.
- Lai, F., M. Szczodrak, and J. Block. 2008. Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *The EMBO* 27:982–92.
- Lambert, M., D. Choquet, and R.-M. Mège. 2002. Dynamics of ligand-induced, Rac1-dependent anchoring of cadherins to the actin cytoskeleton. *The Journal of cell biology*. 157:469–79.
- Lappalainen, P., and D.G. Drubin. 1997. Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature*. 388(6637) :78-82.
- Lau, C.G., K. Takeuchi, A. Rodenas-Ruano, Y. Takayasu, J. Murphy, M.V.L. Bennett, and R.S. Zukin. 2009. Regulation of NMDA receptor Ca²⁺ signalling and synaptic plasticity. *Biochemical Society transactions*. 37:1369–74.
- Lebensohn, A.M., and M.W. Kirschner. 2009. Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Molecular cell*. 36:512–24.
- Lebrand, C., E.W. Dent, G. a Strasser, L.M. Lanier, M. Krause, T.M. Svitkina, G.G. Borisy, and F.B. Gertler. 2004. Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1. *Neuron*. 42:37–49.
- Lee, K., J.L. Gallop, K. Rambani, and M.W. Kirschner. 2010. Self-assembly of filopodia-like structures on supported lipid bilayers. *Science (New York, N.Y.)*. 329:1341–5.
- Lee, S.R., Y. Escobedo-Lozoya, E.M. Szatmari, and R. Yasuda. 2009. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature*. 458:299–304.
- Lendvai, B., E. a Stern, B. Chen, and K. Svoboda. 2000. Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature*. 404:876–81.
- Leung, B.O., and K.C. Chou. 2011. Review of super-resolution fluorescence microscopy for biology. *Applied spectroscopy*. 65:967–80.
- Leung T., E. Manser, L. Tan, and L. Lim. 1995. A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *The Journal of biological chemistry*. 270(49):29051-4.
- Li, F., and H.N. Higgs. 2003. The Mouse Formin mDia1 Is a Potent Actin Nucleation Factor Regulated by Autoinhibition. 13:1335–1340.
- Ligon, L. a, S. Karki, M. Tokito, and E.L. Holzbaaur. 2001. Dynein binds to beta-catenin and may tether microtubules at adherens junctions. *Nature cell biology*. 3:913–7.

- Lilien, J., and J. Balsamo. 2005. The regulation of cadherin-mediated adhesion by tyrosine phosphorylation/dephosphorylation of beta-catenin. *Current opinion in cell biology*. 17:459–65.
- Lim, K.B., W. Bu, W.I. Goh, E. Koh, S.H. Ong, T. Pawson, T. Sudhaharan, and S. Ahmed. 2008. The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *The Journal of biological chemistry*. 283:20454–72.
- Lin, W.-H., C. a Nebhan, B.R. Anderson, and D.J. Webb. 2010. Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) induces actin assembly in dendritic spines to promote their development and potentiate synaptic strength. *The Journal of biological chemistry*. 285:36010–20.
- Lin, Y.-C., and L. Redmond. 2008. CaMKIIbeta binding to stable F-actin in vivo regulates F-actin filament stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:15791–6.
- Lin, Y.-L., Y.-T. Lei, C.-J. Hong, and Y.-P. Hsueh. 2007. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway. *The Journal of cell biology*. 177:829–41.
- Linardopoulou, E.V., S.S. Parghi, C. Friedman, G.E. Osborn, S.M. Parkhurst, and B.J. Trask. 2007. Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS genetics*. 3:e237.
- Lisman, J.E., S. Raghavachari, and R.W. Tsien. 2007. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature reviews. Neuroscience*. 8:597–609.
- Liu, R., M.T. Abreu-Blanco, K.C. Barry, E.V. Linardopoulou, G.E. Osborn, and S.M. Parkhurst. 2009. Wash functions downstream of Rho and links linear and branched actin nucleation factors. *Development (Cambridge, England)*. 136:2849–60.
- Lodish H., A. Berk, S.L. Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, and J. Darnell. 2000. Section 18.2: The dynamics of actin assembly. *Molecular Cell Biology 4th Edition*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/>.
- Lohmann, C., A. Finski, and T. Bonhoeffer. 2005. Local calcium transients regulate the spontaneous motility of dendritic filopodia. *Nature neuroscience*. 8:305–12.
- Lommel, S., S. Benesch, K. Rottner, T. Franz, J. Wehland, and R. Kühn. 2001. Actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli and intracellular motility of Shigella flexneri are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO reports*. 2:850–7.
- Lukyanov K.A., D.M. Chudakov, S. Lukyanov, and V.V. Verkhushka. 2005. Innovation: Photoactivable fluorescent proteins. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6(11):885-91.
- Luo, L. 2000. Rho GTPases in neuronal morphogenesis. *Nature reviews. Neuroscience*. 1:173–80.
- Machacek, M., L. Hodgson, C. Welch, H. Elliott, O. Pertz, P. Nalbant, A. Abell, G.L. Johnson, K.M. Hahn, and G. Danuser. 2009. Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature*. 461:99–103.
- Machesky, L.M., S.J. Atkinson, C. Ampe, and J. Vandekerckhove. 1994. Purification of a Cortical Complex Containing Two Unconventional Actins from. 127:107–115.
- Machesky, L.M., and R.H. Insall. 1998. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Current biology : CB*. 8:1347–56.
- Malinow, R., and R.C. Malenka. 2002. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annual review of neuroscience*. 25:103–26.
- Mallavarapu, a, and T. Mitchison. 1999. Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *The Journal of cell biology*. 146:1097–106.
- Manley, S., J.M. Gillette, G.H. Patterson, H. Shroff, H.F. Hess, E. Betzig, and J. Lippincott-Schwartz. 2008. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature methods*. 5:155–7.
- Martin, A.C., X.-P. Xu, I. Rouiller, M. Kaksonen, Y. Sun, L. Belmont, N. Volkman, D. Hanein, M. Welch, and D.G. Drubin. 2005. Effects of Arp2 and Arp3 nucleotide-binding pocket mutations on Arp2/3 complex function. *The Journal of cell biology*. 168:315–28.

- Martinez-Quiles, N., R. Rohatgi, I.M. Antón, M. Medina, S.P. Saville, H. Miki, H. Yamaguchi, T. Takenawa, J.H. Hartwig, R.S. Geha, and N. Ramesh. 2001. WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nature cell biology*. 3:484–91.
- Matsuno, H., S. Okabe, M. Mishina, T. Yanagida, K. Mori, and Y. Yoshihara. 2006. Telencephalin slows spine maturation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:1776–86.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, G. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 429(6993):761-6.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:446–54.
- Matus, a, M. Ackermann, G. Pehling, H.R. Byers, and K. Fujiwara. 1982. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 79:7590–4.
- Matus, A. 2005. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Current opinion in neurobiology*. 15:67–72.
- McCullough, B.R., L. Blanchoin, J.-L. Martiel, and E.M. De la Cruz. 2008. Cofilin increases the bending flexibility of actin filaments: implications for severing and cell mechanics. *Journal of molecular biology*. 381:550–8.
- McCullough, B.R., E.E. Grintsevich, C.K. Chen, H. Kang, A.L. Hutchison, A. Henn, W. Cao, C. Suarez, J.-L. Martiel, L. Blanchoin, E. Reisler, and E.M. De La Cruz. 2011. Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophysical journal*. 101:151–9.
- Medeiros, N. a, D.T. Burnette, and P. Forscher. 2006. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature cell biology*. 8:215–26.
- Mejillano, M.R., S. Kojima, D.A. Applewhite, F.B. Gertler, T.M. Svitkina, and G.G. Borisy. 2004. of the Actin Nanomachinery : Pivotal Role of the Filament Barbed End. 118:363–373.
- Mendez, P., M. De Roo, L. Poglia, P. Klausner, and D. Muller. 2010. N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *The Journal of cell biology*. 189:589–600.
- Meng, J., Y. Meng, A. Hanna, C. Janus, and Z. Jia. 2005. Abnormal long-lasting synaptic plasticity and cognition in mice lacking the mental retardation gene Pak3. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:6641–50.
- Meng Y., Y. Zhang, V. Tregoubov, C. Janus, L. Cruz, M. Jackson, W. Lu, J.F. MacDonald, J.Y Wang, D.L. Falls, and Z. Jia. 2002. Abnormal spine morphology and enhanced LTP in LIMK-1 knockout mice. *Neuron*. 35(1):121-33.
- Meyer, M.P., and S.J. Smith. 2006. Evidence from in vivo imaging that synaptogenesis guides the growth and branching of axonal arbors by two distinct mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:3604–14.
- Miki, H., S. Suetsugu, and T. Takenawa. 1998. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO journal*. 17:6932–41.
- Miki, H., H. Yamaguchi, S. Suetsugu, and T. Takenawa. 2000. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature*. 408:732–5.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1:761–72.
- Miyashita, Y., and M. Ozawa. 2007. Increased internalization of p120-uncoupled E-cadherin and a requirement for a dileucine motif in the cytoplasmic domain for endocytosis of the protein. *The Journal of biological chemistry*. 282:11540–8.
- Miyoshi, T., T. Tsuji, C. Higashida, M. Hertzog, A. Fujita, S. Narumiya, G. Scita, and N. Watanabe. 2006. Actin turnover-dependent fast dissociation of capping protein in the dendritic nucleation actin network: evidence of frequent filament severing. *The Journal of cell biology*. 175:947–55.
- Mondin, M., V. Labrousse, E. Hosy, M. Heine, B. Tessier, F. Levet, C. Poujol, C. Blanchet, D. Choquet, and O. Thoumine. 2011. Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:13500–15.

- Moon, R.T., B. Bowerman, M. Boutros, and N. Perrimon. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science (New York, N.Y.)*. 296:1644–6.
- Mooren, O.L., B.J. Galletta, and J. a Cooper. 2012. Roles for actin assembly in endocytosis. *Annual review of biochemistry*. 81:661–86.
- Moseley, J.B., I. Sagot, A.L. Manning, Y. Xu, M.J. Eck, D. Pellman, and B.L. Goode. 2004. A Conserved Mechanism for Bni1- and mDia1-induced Actin Assembly and Dual Regulation of Bni1 by Bud6 and Profilin. 15:896–907.
- Murakami, K., T. Yasunaga, T.Q.P. Noguchi, Y. Gomibuchi, K.X. Ngo, T.Q.P. Uyeda, and T. Wakabayashi. 2010. Structural basis for actin assembly, activation of ATP hydrolysis, and delayed phosphate release. *Cell*. 143:275–87.
- Murakoshi, H., H. Wang, and R. Yasuda. 2011. Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*. 472:100–4.
- Mysore, S.P., C.-Y. Tai, and E.M. Schuman. 2007. Effects of N-cadherin disruption on spine morphological dynamics. *Frontiers in cellular neuroscience*. 1:1.
- Naisbitt S., E. Kim, J.C. Tu, B. Xiao, C. Sarla, J. Valtschanoff, R.J. Weinberg, P.F. Worley, and M. Sheng. 1999. Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron*. 23(3):569–82.
- Nakamura, Y., C.L. Wood, A.P. Patton, N. Jaafari, J.M. Henley, J.R. Mellor, and J.G. Hanley. 2011. PICK1 inhibition of the Arp2/3 complex controls dendritic spine size and synaptic plasticity. *The EMBO journal*. 30:719–30.
- Nakanishi, H., H. Obaishi, A. Satoh, M. Wada, K. Mandai, K. Satoh, H. Nishioka, Y. Matsuura, A. Mizoguchi, and Y. Takai. 1997. Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *The Journal of cell biology*. 139:951–61.
- Narita, A., S. Takeda, A. Yamashita, and Y. Maéda. 2006. Structural basis of actin filament capping at the barbed-end: a cryo-electron microscopy study. *The EMBO journal*. 25:5626–33.
- Nezami, A.G., F. Poy, and M.J. Eck. 2006. Structure of the autoinhibitory switch in formin mDia1. *Structure (London, England : 1993)*. 14:257–63.
- Nishida, E. 1985. Opposite effects of cofilin and profilin from porcine brain on rate exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*. 24(5):1160–4.
- Niwa, R., K. Nagata-Ohashi, M. Takeichi, K. Mizuno, and T. Uemura. 2002. Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell*. 108:233–46.
- Nobes, C.D., and a Hall. 1995. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. 81:53–62.
- Nollet, F., P. Kools, and F. van Roy. 2000. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *Journal of molecular biology*. 299:551–72.
- Noren, N.K., B.P. Liu, K. Burridge, and B. Kreft. 2000. p120 catenin regulates the actin cytoskeleton via Rho family GTPases. *The Journal of cell biology*. 150:567–80.
- Noritake, J., M. Fukata, and K. Sato. 2004. Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actin-meshwork formation at sites of cell-cell contact. *Molecular biology of ...* 15:1065–1076.
- Nägerl, U.V., N. Eberhorn, S.B. Cambridge, and T. Bonhoeffer. 2004. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. 44:759–67.
- Nägerl, U.V., K.I. Willig, B. Hein, S.W. Hell, and T. Bonhoeffer. 2008. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:18982–7.
- Obama, H., and M. Ozawa. 1997. Identification of the domain of alpha-catenin involved in its association with beta-catenin and plakoglobin (gamma-catenin). *The Journal of biological chemistry*. 272:11017–20.
- Oikawa, T., H. Yamaguchi, T. Itoh, M. Kato, T. Ijuin, D. Yamazaki, S. Suetsugu, and T. Takenawa. 2004. PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nature cell biology*. 6:420–6.

- Okabe, T., T. Nakamura, Y.N. Nishimura, K. Kohu, S. Ohwada, Y. Morishita, and T. Akiyama. 2003. RICS, a novel GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1, is involved in the beta-catenin-N-cadherin and N-methyl-D-aspartate receptor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 278:9920–7.
- Okada, K., F. Bartolini, A.M. Deaconescu, J.B. Moseley, Z. Dogic, N. Grigorieff, G.G. Gundersen, and B.L. Goode. 2010. Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *The Journal of cell biology*. 189:1087–96.
- Okamoto, K., M. Bosch, and Y. Hayashi. 2009. The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology (Bethesda, Md.)*. 24:357–66.
- Okamoto, K.-I., T. Nagai, A. Miyawaki, and Y. Hayashi. 2004. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature neuroscience*. 7:1104–12.
- Okamoto, K.-I., R. Narayanan, S.H. Lee, K. Murata, and Y. Hayashi. 2007. The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:6418–23.
- Okamura, K., H. Tanaka, Y. Yagita, Y. Saeki, A. Taguchi, Y. Hiraoka, L.-H. Zeng, D.R. Colman, and N. Miki. 2004. Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *The Journal of cell biology*. 167:961–72.
- Okuda, T., L.M.Y. Yu, L. a Cingolani, R. Kemler, and Y. Goda. 2007. beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:13479–84.
- Opazo, P., M. Sainlos, and D. Choquet. 2012. Regulation of AMPA receptor surface diffusion by PSD-95 slots. *Current opinion in neurobiology*. 22:453–60.
- Ozawa, M., J. Engel, and R. Kemler. 1990. Single amino acid substitutions in one Ca²⁺ binding site of uvomorulin abolish the adhesive function. *Cell*. 63:1033–8.
- Ozawa, M., and R. Kemler. 1998. The membrane-proximal region of the E-cadherin cytoplasmic domain prevents dimerization and negatively regulates adhesion activity. *The Journal of cell biology*. 142:1605–13.
- Pappas, D.J., and D.L. Rimm. 2006. Direct interaction of the C-terminal domain of alpha-catenin and F-actin is necessary for stabilized cell-cell adhesion. *Cell communication & adhesion*. 13:151–70.
- Paradis, S., D.B. Harrar, Y. Lin, A.C. Koon, J.L. Hauser, E.C. Griffith, L. Zhu, L.F. Brass, C. Chen, and M.E. Greenberg. 2007. An RNAi-based approach identifies molecules required for glutamatergic and GABAergic synapse development. *Neuron*. 53:217–32.
- Park, E., S. Chi, and D. Park. 2012. Activity-Dependent Modulation of the Interaction between CaMKII α and Abi1 and Its Involvement in Spine Maturation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:13177–88.
- Park, E., M. Na, J. Choi, S. Kim, J.-R. Lee, J. Yoon, D. Park, M. Sheng, and E. Kim. 2003. The Shank family of postsynaptic density proteins interacts with and promotes synaptic accumulation of the beta PIX guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42. *The Journal of biological chemistry*. 278:19220–9.
- Pasic, L., T. Kotova, and D. a Schafer. 2008. Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *The Journal of biological chemistry*. 283:9814–9.
- Patterson, G., M. Davidson, S. Manley, and J. Lippincott-Schwartz. 2010. Superresolution imaging using single-molecule localization. *Annual review of physical chemistry*. 61:345–67.
- Paul, A.S., and T.D. Pollard. 2009. Energetic requirements for processive elongation of actin filaments by FH1FH2-formins. *The Journal of biological chemistry*. 284:12533–40.
- Pellegrin S., and H. Mellor. 2005. The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. *Current Biology: CB*. 15(2):129-33.

- Peng, J., B.J. Wallar, A. Flanders, P.J. Swiatek, A.S. Alberts, and G. Rapids. 2003. Disruption of the Diaphanous-Related Formin Drf1 Gene Encoding mDia1 Reveals a Role for Drf3 as an Effector for Cdc42. *13*:534–545.
- Penzes, P., A. Beeser, J. Chernoff, M.R. Schiller, B. a Eipper, R.E. Mains, and R.L. Huganir. 2003. Rapid induction of dendritic spine morphogenesis by trans-synaptic ephrinB-EphB receptor activation of the Rho-GEF kalirin. *Neuron*. *37*:263–74.
- Penzes, P., M.E. Cahill, K. a Jones, and D.P. Srivastava. 2008. Convergent CaMK and RacGEF signals control dendritic structure and function. *Trends in cell biology*. *18*:405–13.
- Perret, E., A. Leung, H. Feracci, and E. Evans. 2004. Trans-bonded pairs of E-cadherin exhibit a remarkable hierarchy of mechanical strengths. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *101*(47):16472-7.
- Pertz, O., D. Bozic, a W. Koch, C. Fauser, a Brancaccio, and J. Engel. 1999. A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *The EMBO journal*. *18*:1738–47.
- Pilpel, Y., and M. Segal. 2005. Rapid WAVE dynamics in dendritic spines of cultured hippocampal neurons is mediated by actin polymerization. *Journal of neurochemistry*. *95*:1401–10.
- Pokutta, S., F. Drees, Y. Takai, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2002. Biochemical and structural definition of the I-afadin- and actin-binding sites of alpha-catenin. *The Journal of biological chemistry*. *277*:18868–74.
- Pokutta, S., F. Drees, S. Yamada, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2008. Biochemical and structural analysis of alpha-catenin in cell-cell contacts. *Biochemical Society transactions*. *36*:141–7.
- Pokutta, S., K. Herrenknecht, R. Kemler, and J. Engel. 1994. Conformational changes of the recombinant extracellular domain of E-cadherin upon calcium binding. *European journal of biochemistry / FEBS*. *223*:1019–26.
- Pokutta, S., and W.I. Weis. 2000. Structure of the dimerization and beta-catenin-binding region of alpha-catenin. *Molecular cell*. *5*:533–43.
- Pollard, T.D. 2003. The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature*. *422*:741–5.
- Pollard T.D., L. Blanchoin, and R.D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. *29*:545-76.
- Ponti, a, M. Machacek, S.L. Gupton, C.M. Waterman-Storer, and G. Danuser. 2004. Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science (New York, N.Y.)*. *305*:1782–6.
- Portera-Cailliau, C., D.T. Pan, and R. Yuste. 2003. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. *23*:7129–42.
- Prehoda, K.E., J. a Scott, R.D. Mullins, and W. a Lim. 2000. Integration of multiple signals through cooperative regulation of the N-WASP-Arp2/3 complex. *Science (New York, N.Y.)*. *290*:801–6.
- Proepper, C., S. Johannsen, S. Liebau, J. Dahl, B. Vaida, J. Bockmann, M.R. Kreutz, E.D. Gundelfinger, and T.M. Boeckers. 2007. Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *The EMBO journal*. *26*:1397–409.
- Quinlan, M.E., J.E. Heuser, E. Kerkhoff, and R.D. Mullins. 2005. Drosophila Spire is an actin nucleation factor. *Nature*. *433*:382–8.
- Quinlan, M.E., S. Hilgert, A. Bedrossian, R.D. Mullins, and E. Kerkhoff. 2007. Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *The Journal of cell biology*. *179*:117–28.
- Racz, B., and R.J. Weinberg. 2004. The subcellular organization of cortactin in hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. *24*:10310–7.
- Racz, B., and R.J. Weinberg. 2006. Spatial organization of cofilin in dendritic spines. *Neuroscience*. *138*:447–56.
- dos Remedios, C.G., D. Chhabra, M. Kekic, I.V. Dedova, M. Tsubakihara, D. a Berry, and N.J. Nosworthy. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiological reviews*. *83*:433–73.

- Renault, L., B. Bugyi, and M.-F. Carrier. 2008. Spire and Cordon-bleu: multifunctional regulators of actin dynamics. *Trends in cell biology*. 18:494–504.
- Reymann, A.-C., R. Boujemaa-Paterski, J.-L. Martiel, C. Guérin, W. Cao, H.F. Chin, E.M. De La Cruz, M. Théry, and L. Blanchoin. 2012. Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science (New York, N.Y.)*. 336:1310–4.
- Riento, K., and A.J. Ridley. 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 4:446–56.
- Rimm, D.L., E.R. Koslov, P. Kebriaei, C.D. Cianci, and J.S. Morrow. 1995. α 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 of the United States of America*. 92(19):8813–7.
- Rio, A., R. Perez-jimenez, R. Liu, P. Roca-cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science*. 323(5914):638–41.
- Roberts, T.M., and M. Stewart. 1997. Nematode sperm: amoeboid movement without actin. *Trends in cell biology*. 7:368–73.
- Rocca, D.L., S. Martin, E.L. Jenkins, and J.G. Hanley. 2008. Inhibition of Arp2/3-mediated actin polymerization by PICK1 regulates neuronal morphology and AMPA receptor endocytosis. *Nature cell biology*. 10:259–71.
- Rohatgi, R., H.Y. Ho, and M.W. Kirschner. 2000. Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *The Journal of cell biology*. 150:1299–310.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa, and M.W. Kirschner. 1999. The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*. 97:221–31.
- Romero, S., C. Le Clainche, D. Didry, C. Egile, D. Pantaloni, and M.-F. Carrier. 2004. Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell*. 119:419–29.
- Rose, R., M. Weyand, M. Lammers, T. Ishizaki, M.R. Ahmadian, and a Wittinghofer. 2005. Structural and mechanistic insights into the interaction between Rho and mammalian Dia. *Nature*. 435:513–8.
- Rossier, O., V. Oceau, J.-B. Sibarita, C. Leduc, B. Tessier, D. Nair, V. Gatterdam, O. Destaing, C. Albigès-Rizo, R. Tampé, L. Cognet, D. Choquet, B. Lounis, and G. Giannone. 2012. Integrins β (1) and β (3) exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature cell biology*. 14:1057–67.
- Rottner, K., B. Behrendt, J.V. Small, and J. Wehland. 1999. VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nature cell biology*. 1:321–2.
- Rottner, K., J. Hänisch, and K.G. Campellone. 2010. WASH, WHAMM and JMY: regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends in cell biology*. 20:650–61.
- Rouiller, I., X.-P. Xu, K.J. Amann, C. Egile, S. Nickell, D. Nicastro, R. Li, T.D. Pollard, N. Volkman, and D. Hanein. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *The Journal of cell biology*. 180:887–95.
- Roussignol, G., F. Ango, S. Romorini, J.C. Tu, C. Sala, P.F. Worley, J. Bockaert, and L. Fagni. 2005. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:3560–70.
- Rust, M.B., C.B. Gurniak, M. Renner, H. Vara, L. Morando, A. Görlich, M. Sassoè-Pognetto, M.A. Banachaabouchi, M. Giustetto, A. Triller, D. Choquet, and W. Witke. 2010. Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *The EMBO journal*. 29:1889–902.
- Rust, M.J., M. Bates, and X. Zhuang. 2006. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*. 3:793–5.
- Ryan, X.P., J. Alldritt, P. Svenningsson, P.B. Allen, G.-Y. Wu, A.C. Nairn, and P. Greengard. 2005. The Rho-specific GEF Lfc interacts with neurabin and spinophilin to regulate dendritic spine morphology. *Neuron*. 47:85–100.

- Ryu, J., L. Liu, T.P. Wong, D.C. Wu, A. Burette, R. Weinberg, Y.T. Wang, and M. Sheng. 2006. A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron*. 49:175–82.
- Rácz, B., and R.J. Weinberg. 2008. Organization of the Arp2/3 complex in hippocampal spines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:5654–9.
- Rácz, B., and R.J. Weinberg. 2012. Microdomains in Forebrain Spines: an Ultrastructural Perspective. *Molecular neurobiology*.
- Sabo, S.L., R. a Gomes, and a K. McAllister. 2006. Formation of presynaptic terminals at predefined sites along axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 26:10813–25.
- Saglietti, L., C. Dequidt, K. Kamieniarz, M.-C. Rousset, P. Valnegri, O. Thoumine, F. Beretta, L. Fagni, D. Choquet, C. Sala, M. Sheng, and M. Passafaro. 2007. Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron*. 54:461–77.
- Sagot, I., A. a Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nature cell biology*. 4:626–31.
- Sala, C., V. Piëch, N.R. Wilson, M. Passafaro, G. Liu, and M. Sheng. 2001. Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron*. 31:115–30.
- Saneyoshi, T., G. Wayman, D. Fortin, M. Davare, N. Hoshi, N. Nozaki, T. Natsume, and T.R. Soderling. 2008. Activity-dependent synaptogenesis: regulation by a CaM-kinase kinase/CaM-kinase I/betaPIX signaling complex. *Neuron*. 57:94–107.
- Sara, Y., T. Biederer, D. Atasoy, A. Chubykin, M.G. Mozhayeva, T.C. Südhof, and E.T. Kavalali. 2005. Selective capability of SynCAM and neuroligin for functional synapse assembly. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:260–70.
- Sawallisch, C., K. Berhörster, A. Disanza, S. Mantoani, M. Kintscher, L. Stoenica, A. Dityatev, S. Sieber, S. Kindler, F. Morellini, M. Schweizer, T.M. Boeckers, M. Korte, G. Scita, and H.-J. Kreienkamp. 2009. The insulin receptor substrate of 53 kDa (IRSp53) limits hippocampal synaptic plasticity. *The Journal of biological chemistry*. 284:9225–36.
- Scheiffele, P., J. Fan, J. Choih, R. Fetter, and T. Serafini. 2000. Neuroligin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell*. 101:657–69.
- Schirenbeck, A., R. Arasada, T. Bretschneider, T.E.B. Stradal, M. Schleicher, and J. Faix. 2006. The bundling activity of vasodilator-stimulated phosphoprotein is required for filopodium formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 103:7694–9.
- Schirenbeck, A., T. Bretschneider, R. Arasada, M. Schleicher, and J. Faix. 2005. The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nature cell biology*. 7:619–25.
- Schneckenburger, H. 2005. Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications. *Current opinion in biotechnology*. 16:13–8.
- Schubert, V., J.S. Da Silva, and C.G. Dotti. 2006. Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *The Journal of cell biology*. 172:453–67.
- Scita, G., S. Confalonieri, P. Lappalainen, and S. Suetsugu. 2008. IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends in cell biology*. 18:52–60.
- Scita G., J. Nordstrom, R. Carbone, P. Tenca, G. Giardina, S. Gutkind, M. Bjarnegard, C. Betsholtz, and P.P. Di Fiore. 1999. EPS8 and E3B1 transduce signals from Ras to Rac. *Nature*. 401(6750):290-3.
- Scott, J.A., A.M. Shewan, N.R.D. Elzen, J.J. Loureiro, F.B. Gertler, and A.S. Yap. 2006. Ena / VASP Proteins Can Regulate Distinct Modes of Actin Organization at Cadherin-adhesive Contacts □. 17:1085–1095.
- Sdrulla, A.D., and D.J. Linden. 2007. Double dissociation between long-term depression and dendritic spine morphology in cerebellar Purkinje cells. *Nature neuroscience*. 10:546–8.

- Selden, L. a, H.J. Kinoshian, J. Newman, B. Lincoln, C. Hurwitz, L.C. Gershman, and J.E. Estes. 1998. Severing of F-actin by the amino-terminal half of gelsolin suggests internal cooperativity in gelsolin. *Biophysical journal*. 75:3092–100.
- Shapiro L., A.M. Fannon, P.D. Kwong, A. Thompson, M.S. Lehmann, G. Gröbel, J. Legrand, J. Ans-Nielsen, D.R. Colman, and W.A. Hendrickson. 1995. Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins. *Nature*. 374(6520):327-37.
- Sheng, M., and C.C. Hoogenraad. 2007. The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annual review of biochemistry*. 76:823–47.
- Shroff, H., C.G. Galbraith, J. a Galbraith, H. White, J. Gillette, S. Olenych, M.W. Davidson, and E. Betzig. 2007. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:20308–13.
- Siddiqui, T.J., R. Pancaroglu, Y. Kang, A. Rooyakkers, and A.M. Craig. 2010. LRRTMs and neuroligins bind neurexins with a differential code to cooperate in glutamate synapse development. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:7495–506.
- Silverman J.B., S. Restituto, W. Lu, L. Lee-Edwards, L. Khatri, and E.B. Ziff. 2007. Synaptic anchorage of AMPA receptors by cadherins through neural plakophilin-related arm protein AMPA receptor-binding protein complexes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27(32):8505-16.
- Small J.V. 2011. Actin networking in lamellipodia and beyond. *Trends in cell biology*. 21:2–4; author reply 4–5.s
- Small, J.V., C. Winkler, M. Vinzenz, and C. Schmeiser. 2011. Reply: Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nature Cell Biology*. 13:1013–1014.
- Snapper, S.B., F. Takeshima, I. Antón, C.H. Liu, S.M. Thomas, D. Nguyen, D. Dudley, H. Fraser, D. Purich, M. Lopez-Illasaca, C. Klein, L. Davidson, R. Bronson, R.C. Mulligan, F. Southwick, R. Geha, M.B. Goldberg, F.S. Rosen, J.H. Hartwig, and F.W. Alt. 2001. N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nature cell biology*. 3:897–904.
- Soderling, S.H., E.S. Guire, S. Kaech, J. White, F. Zhang, K. Schutz, L.K. Langeberg, G. Banker, J. Raber, and J.D. Scott. 2007. A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:355–65.
- Soderling, S.H., L.K. Langeberg, J. a Soderling, S.M. Davee, R. Simerly, J. Raber, and J.D. Scott. 2003. Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:1723–8.
- Soltau, M., K. Berhörster, S. Kindler, F. Buck, D. Richter, and H.-J. Kreienkamp. 2004. Insulin receptor substrate of 53 kDa links postsynaptic shank to PSD-95. *Journal of neurochemistry*. 90:659–65.
- Soltau M., D. Richter, and H.J Kreienkamp. 2002. The insulin receptor substrate IRSp53 links postsynaptic shank1 to the small G-protein cdc42. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 21(4):575-83.
- Sossey-Alaoui, K., X. Li, and J.K. Cowell. 2007. c-Abl-mediated phosphorylation of WAVE3 is required for lamellipodia formation and cell migration. *The Journal of biological chemistry*. 282:26257–65.
- Spacek, J., and K.M. Harris. 2004. Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 24:4233–41.
- Spillane, M., A. Ketschek, S.L. Jones, F. Korobova, B. Marsick, L. Lanier, T. Svitkina, and G. Gallo. 2011. The actin nucleating Arp2/3 complex contributes to the formation of axonal filopodia and branches through the regulation of actin patch precursors to filopodia. *Developmental neurobiology*. 71:747–58.
- Stan, a, K.N. Pielarski, T. Brigadski, N. Wittenmayer, O. Fedorchenko, a Gohla, V. Lessmann, T. Dresbach, and K. Gottmann. 2010. Essential cooperation of N-cadherin and neuroligin-1 in the

- transsynaptic control of vesicle accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:11116–21.
- Star, E.N., D.J. Kwiatkowski, and V.N. Murthy. 2002. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature neuroscience*. 5:239–46.
- Steffen, A., K. Rottner, J. Ehinger, M. Innocenti, G. Scita, J. Wehland, and T.E.B. Stradal. 2004. Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *The EMBO journal*. 23:749–59.
- Stuart, J.R., F.H. Gonzalez, H. Kawai, and Z.-M. Yuan. 2006. c-Abl interacts with the WAVE2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *The Journal of biological chemistry*. 281:31290–7.
- Suarez, C., J. Roland, R. Boujemaa-Paterski, H. Kang, B.R. McCullough, A.-C. Reymann, C. Guérin, J.-L. Martiel, E.M. De la Cruz, and L. Blanchoin. 2011. Cofilin tunes the nucleotide state of actin filaments and severs at bare and decorated segment boundaries. *Current biology : CB*. 21:862–8.
- Suetsugu, S., and A. Gautreau. 2012. Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends in cell biology*. 22:141–50.
- Suetsugu, S., S. Kurisu, T. Oikawa, D. Yamazaki, A. Oda, and T. Takenawa. 2006a. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *The Journal of cell biology*. 173:571–85.
- Suetsugu, S., K. Murayama, A. Sakamoto, K. Hanawa-Suetsugu, A. Seto, T. Oikawa, C. Mishima, M. Shirouzu, T. Takenawa, and S. Yokoyama. 2006b. The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *The Journal of biological chemistry*. 281:35347–58.
- Sun, Y., and S.X. Bamji. 2011. β -Pix modulates actin-mediated recruitment of synaptic vesicles to synapses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:17123–33.
- Svitkina, T.M., and G.G. Borisy. 1999. Organization and Treadmilling of Actin Filament Array in Lamellipodia. 145:1009–1026.
- Svitkina, T.M., E. a Bulanova, O.Y. Chaga, D.M. Vignjevic, S. Kojima, J.M. Vasiliev, and G.G. Borisy. 2003. Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *The Journal of cell biology*. 160:409–21.
- Swart-Mataraza, J.M., Z. Li, and D.B. Sacks. 2002. IQGAP1 is a component of Cdc42 signaling to the cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 277:24753–63.
- Sykes C., and J. Plastino. 2010. Cell biology: actin filaments up against a wall. *Nature*. 464(7287):365-6.
- Taguchi, K., T. Ishiuchi, and M. Takeichi. 2011. Mechanosensitive EPLIN-dependent remodeling of adherens junctions regulates epithelial reshaping. *The Journal of cell biology*. 194:643–56.
- Tai, C.-Y., S.P. Mysore, C. Chiu, and E.M. Schuman. 2007. Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron*. 54:771–85.
- Takano, K., K. Takano, K. Toyooka, and S. Suetsugu. 2008. EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *The EMBO journal*. 27:2817–28.
- Takeda H., Y. Shimoyama, A. Nagafuchi, and S. Hirohashi. 1999. E-cadherin functions as a cis-dimer at the cell-cell adhesive interface *in vivo*. *Nature Structural Biology*. 6(4):310-2.
- Takeichi M. 1977. Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *Journal of Cell Biology*. 75(2 Pt 1): 464-74.
- Tao-Cheng, J.-H., a Dosemeci, P.E. Gallant, S. Miller, J. a Galbraith, C. a Winters, R. Azzam, and T.S. Reese. 2009. Rapid turnover of spinules at synaptic terminals. *Neuroscience*. 160:42–50.

- Tatavarty, V., S. Das, and J. Yu. 2012. Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron. *Molecular biology of the cell*. 23:3167–3177.
- Tatavarty, V., E.-J. Kim, V. Rodionov, and J. Yu. 2009. Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS one*. 4:e7724.
- Taylor, M.J., D. Perrais, and C.J. Merrifield. 2011. A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS biology*. 9:e1000604.
- Tepass U., K. Truong, D. Godt, M. Iruka, and M. Peifer. 2000. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1(2):91-100.
- Thalhammer, A., Y. Rudhard, C.M. Tigaret, K.E. Volynski, D. a Rusakov, and R. Schoepfer. 2006. CaMKII translocation requires local NMDA receptor-mediated Ca²⁺ signaling. *The EMBO journal*. 25:5873–83.
- Thoumine O., M. Lambert, R.M. Mège, and D. Choquet. 2006. Regulation of N-Cadherin dynamics at neuronal contacts by ligand binding and cytoskeletal coupling. *Molecular Biology of the Cell*. 17(2):862-75.
- Togashi, H., K. Abe, A. Mizoguchi, K. Takaoka, O. Chisaka, and M. Takeichi. 2002. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*. 35:77–89.
- Tolias, K.F., J.B. Bikoff, A. Burette, S. Paradis, D. Harrar, S. Tavazoie, R.J. Weinberg, and M.E. Greenberg. 2005. The Rac1-GEF Tiam1 couples the NMDA receptor to the activity-dependent development of dendritic arbors and spines. *Neuron*. 45:525–38.
- Tolias, K.F., J.B. Bikoff, C.G. Kane, C.S. Tolias, L. Hu, and M.E. Greenberg. 2007. The Rac1 guanine nucleotide exchange factor Tiam1 mediates EphB receptor-dependent dendritic spine development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:7265–70.
- Toni N., P.A. Buchs, I. Nikonenko, C.R. Bron, and D. Muller. 1999. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature*. 402(6760):421-5.
- Toomre, D., and J. Bewersdorf. 2010. A new wave of cellular imaging. *Annual review of cell and developmental biology*. 26:285–314.
- Troyanovsky, R.B., E. Sokolov, and S.M. Troyanovsky. 2003. Adhesive and Lateral E-Cadherin Dimers Are Mediated by the Same Interface Adhesive and Lateral E-Cadherin Dimers Are Mediated by the Same Interface. 23(22):7965-72.
- Urban, E., S. Jacob, M. Nemethova, G.P. Resch, and J.V. Small. 2010. Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nature cell biology*. 12:429–35.
- Urban, N.T., K.I. Willig, S.W. Hell, and U.V. Nägerl. 2011. STED nanoscopy of actin dynamics in synapses deep inside living brain slices. *Biophysical journal*. 101:1277–84.
- Vendome, J., S. Posy, X. Jin, F. Bahna, G. Ahlsen, L. Shapiro, and B. Honig. 2011. Molecular design principles underlying β -strand swapping in the adhesive dimerization of cadherins. *Nature structural & molecular biology*. 18:693–700.
- Verma, S., A.M. Shewan, J. a Scott, F.M. Helwani, N.R. den Elzen, H. Miki, T. Takenawa, and A.S. Yap. 2004. Arp2/3 activity is necessary for efficient formation of E-cadherin adhesive contacts. *The Journal of biological chemistry*. 279:34062–70.
- Vignjevic, D., S. Kojima, Y. Aratyn, O. Danciu, T. Svitkina, and G.G. Borisy. 2006. Role of fascin in filopodial protrusion. *The Journal of cell biology*. 174:863–75.
- Vignjevic, D., D. Yarar, M.D. Welch, J. Peloquin, T. Svitkina, and G.G. Borisy. 2003. Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *The Journal of cell biology*. 160:951–62.
- Vinzenz, M., M. Nemethova, F. Schur, J. Mueller, A. Narita, E. Urban, C. Winkler, C. Schmeiser, S. a Koestler, K. Rottner, G.P. Resch, Y. Maeda, and J.V. Small. 2012. Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *Journal of cell science*. 2775–2785.
- Wang, X., Y. Yang, and Q. Zhou. 2007. Independent expression of synaptic and morphological plasticity associated with long-term depression. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:12419–29.

- Wang, Y.L. 1985. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: possible role of treadmilling. *The Journal of cell biology*. 101:597–602.
- Washbourne, P., J.E. Bennett, and a K. McAllister. 2002. Rapid recruitment of NMDA receptor transport packets to nascent synapses. *Nature neuroscience*. 5:751–9.
- Wayman, G. a, Y.-S. Lee, H. Tokumitsu, A.J. Silva, A. Silva, and T.R. Soderling. 2008. Calmodulin-kinases: modulators of neuronal development and plasticity. *Neuron*. 59:914–31.
- Wegner, A.M., C. a Nebhan, L. Hu, D. Majumdar, K.M. Meier, A.M. Weaver, and D.J. Webb. 2008. N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *The Journal of biological chemistry*. 283:15912–20.
- Weiner, O.D., M.C. Rentel, A. Ott, G.E. Brown, M. Jedrychowski, M.B. Yaffe, S.P. Gygi, L.C. Cantley, H.R. Bourne, and M.W. Kirschner. 2006. Hem-1 complexes are essential for Rac activation, actin polymerization, and myosin regulation during neutrophil chemotaxis. *PLoS biology*. 4:e38.
- Weiss, E.E., M. Kroemker, a H. Rüdiger, B.M. Jockusch, and M. Rüdiger. 1998. Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between alpha-catenin and vinculin. *The Journal of cell biology*. 141:755–64.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 118:843–6.
- Wilson, C.A., M.A. Tsuchida, G.M. Allen, E.L. Barnhart, K.T. Applegate, P.T. Yam, L. Ji, K. Keren, G. Danuser, and J.A. Theriot. 2010. Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmilling through network disassembly. *Nature*. 465:373–7.
- Wombacher, R., M. Heidbreder, S. van de Linde, M.P. Sheetz, M. Heilemann, V.W. Cornish, and M. Sauer. 2010. Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nature methods*. 7:717–9.
- Wu, C., S.B. Asokan, M.E. Berginski, E.M. Haynes, N.E. Sharpless, J.D. Griffith, S.M. Gomez, and J.E. Bear. 2012. Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell*. 148:973–87.
- Wu, Y.I., D. Frey, O.I. Lungu, A. Jaehrig, I. Schlichting, B. Kuhlman, and K.M. Hahn. 2009. A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature*. 461:104–8.
- Wyszynski M., J. Lin, A. Rao, E. Nigh, A.H. Beggs, A.M. Craig and M. Sheng. 1997. Competitive binding of alpha-actinin and calmodulin to the NMDA receptor. 385(6615):439-42.
- Xia, Z., and D.R. Storm. 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nature reviews. Neuroscience*. 6:267–76.
- Xie, Z., H. Photowala, M.E. Cahill, D.P. Srivastava, K.M. Woolfrey, C.Y. Shum, R.L. Haganir, and P. Penzes. 2008. Coordination of synaptic adhesion with dendritic spine remodeling by AF-6 and kalirin-7. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 28:6079–91.
- Xie, Z., D.P. Srivastava, H. Photowala, L. Kai, M.E. Cahill, K.M. Woolfrey, C.Y. Shum, D.J. Surmeier, and P. Penzes. 2007. Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron*. 56:640–56.
- Xu, K., H.P. Babcock, and X. Zhuang. 2012. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton. *Nature methods*. 9:185–8.
- Yagi T., and M. Takeichi. 2000. Cadherin superfamily genes : functions, genomic organization, and neurologic diversity. *Genes & development*. 14(10):1169–80.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889–901.
- Yamagata, Y., S. Kobayashi, T. Umeda, A. Inoue, H. Sakagami, M. Fukaya, M. Watanabe, N. Hatanaka, M. Totsuka, T. Yagi, K. Obata, K. Imoto, Y. Yanagawa, T. Manabe, and S. Okabe. 2009. Kinase-dead knock-in mouse reveals an essential role of kinase activity of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IIalpha in dendritic spine enlargement, long-term potentiation, and learning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 29:7607–18.

- Yamazaki, D., T. Oikawa, and T. Takenawa. 2007. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *Journal of cell science*. 120:86–100.
- Yang, C., L. Czech, S. Gerboth, S. Kojima, G. Scita, and T. Svitkina. 2007. Novel Roles of Formin mDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells. 5.
- Yang, C., M. Hoelzle, A. Disanza, G. Scita, and T. Svitkina. 2009. Coordination of membrane and actin cytoskeleton dynamics during filopodia protrusion. *PloS one*. 4:e5678.
- Yang, C., M. Pring, M. a Wear, M. Huang, J. a Cooper, T.M. Svitkina, and S.H. Zigmond. 2005. Mammalian CARMIL inhibits actin filament capping by capping protein. *Developmental cell*. 9:209–21.
- Yang, C., and T. Svitkina. 2011. Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nature cell biology*. 13:1012–3; author reply 1013–4.
- Yang C., and T. Svitkina. 2011b. Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins. *Cell adhesion & migration*. 5(5): 402-8.
- Yang, Q., X.-F. Zhang, T.D. Pollard, and P. Forscher. 2012. Arp2/3 complex-dependent actin networks constrain myosin II function in driving retrograde actin flow. *The Journal of cell biology*. 197:939–56.
- Yildiz, A., J.N. Forkey, S. a McKinney, T. Ha, Y.E. Goldman, and P.R. Selvin. 2003. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science (New York, N.Y.)*. 300:2061–5.
- Yonezawa, N., E. Nishida, K. Iida, I. Yahara, and H. Sakai. 1990. Inhibition of the interactions of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *The Journal of biological chemistry*. 265:8382–6.
- Yoshihara, Y., M. De Roo, and D. Muller. 2009. Dendritic spine formation and stabilization. *Current opinion in neurobiology*. 19:146–53.
- Zambetti S., R. Morini, G. Fossati, D. Braidà, A. Donzelli, S. Condiffe, M. Orlando, M. Francolini, C. Regondi, C. Frassoni, M. Sala, M. Matteoli, and E. Menna. 2012. The actin regulatory protein Eps8 plays a crucial role in synapse formation and plasticity. *Poster FENS Barcelona*.
- Zanet, J., A. Jayo, S. Plaza, T. Millard, M. Parsons, and B. Stramer. 2012. Fascin promotes filopodia formation independent of its role in actin bundling. *The Journal of cell biology*. 197:477–86.
- Zhang X., G. Jiang, Y. Cai, S.J. Monkley, D.R. Critchley, and M.P. Sheetz. 2008. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nature Cell Biology*. 10(9):1062-8.
- Zhang, H., D.J. Webb, H. Asmussen, S. Niu, and A.F. Horwitz. 2005. A GIT1/PIX/Rac/PAK signaling module regulates spine morphogenesis and synapse formation through MLC. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:3379–88.
- Zhou, L., E.V. Jones, and K.K. Murai. 2012. EphA signaling promotes actin-based dendritic spine remodeling through slingshot phosphatase. *The Journal of biological chemistry*. 287:9346–59.
- Zhou, Q., K.J. Homma, and M. Poo. 2004. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 44:749–57.
- Zigmond, S.H., M. Evangelista, C. Boone, C. Yang, A.C. Dar, F. Sicheri, J. Forkey, M. Pring, and O. Kl. 2003. Formin Leaky Cap Allows Elongation in the Presence of Tight Capping Proteins. 13:1820–1823.
- Ziv, N.E., and S.J. Smith. 1996. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*. 17:91–102.
- Zuo, Y., A. Lin, P. Chang, and W.-B. Gan. 2005. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*. 46:181–9.