

Université Bordeaux Segalen

Année 2013

Thèse n°2055

Thèse

Pour le

Doctorat de l'Université Bordeaux 2

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement

Le 21 Novembre 2013

Par **Mikael Garcia**

Né le 06 Novembre 1984 à Cenon

Rôle du couplage N-cadhérine/actine dans les mécanismes de motilité et de différenciation synaptique dans les neurones

Membres du jury :

| | | |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------|
| Sagot Isabelle | Directeur de recherche (CNRS) | Président du jury |
| Sarrailh Catherine | Directeur de recherche (CNRS) | Rapporteur |
| Mège René-Marc | Directeur de recherche (CNRS) | Rapporteur |
| Villard Catherine | Directeur de recherche (CNRS) | Examineur |
| Balland Martial | Enseignant-Chercheur (CNRS) | Examineur |
| Thoumine Olivier | Directeur de recherche (CNRS) | Directeur de thèse |

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui me font l'honneur d'examiner mon travail : le Dr Isabelle Sagot, le Dr Catherine Sarrailh, le Dr René-Marc Mège, le Dr Catherine Villard et le Dr Martial Balland.

Merci au Ministère de la recherche et de l'Enseignement supérieur, à l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, au Centre National de la Recherche Scientifique et à CYTOO.

Un grand merci à Olivier Thoumine sans qui je ne me serai pas lancé dans cette « folle aventure ». Merci pour ta gentillesse, ta confiance, ta disponibilité et pour tout ce que tu m'as apporté au cours de ces trois années.

Premier ingrédient indispensable pour survivre à une thèse : l'environnement de travail. Je remercie donc toute mon équipe pour la bonne humeur quotidienne et les nombreux moments animés : Olivier (Le plus Américain des Franco-Suisse), Dj Fabinou, Béa (la plus fêtarde de tous), Greg, Spocky, Coca-Fraise, Mr Gentil, Crinière Fougueuse, Katalin (let's take a Maï Thaï in your other world) et maman Magli (et oui, pour moi tu feras toujours partie de l'équipe). Merci aussi aux autres membres de l'IINS : les filles d'à coté, Juju, Juan, Isa, Momo, Noelle et Seb, Christelle, Marilyn, Julie, Elisa, Xander, Anne-SO, Eric, David... et bien d'autres qui sont trop nombreux à citer. Merci à la crossfit team : JB (Boris), Dam (Poète et parolier à ses heures perdues) et le nouveau venu, Rémi.

Deuxième ingrédient, des amis proches sur qui on peut compter. Certains ont été là pour me soutenir, d'autres pour me changer les idées, faire la fête, ou tout cela à la fois. Un grand merci à vous. Les potes Kiné : Beegood et Beegoodi, Bat et Olivia, Charly et Fanny, La Duj et Momo, Flo et Boucle, La Gobe et Gaele, La Marangue et Jess, Norely et Marie-Laure, Pharell et Léa, Zim et Zimette. Les amis du Lycée : Andréa et Guillaume, Mookie et Mariliss, July, Marianne, Cyrille. Les amis de Bio : Anael et Leslie, Lolo et Isa, Pouet Pouet, Vera, Tip et Charly, Tom tom et Muna. Les amis tout court : Aurélie, Chouchou, Sylvain et Nina, Yann et Nat.

Troisième ingrédient, une famille pour vous soutenir. Un immense merci à mes parents, mon frère, ma sœur et Jess. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci pour votre amour et votre soutien permanent.

Quatrième ingrédient, une deuxième famille. Et oui, deux c'est toujours mieux ! Merci à Véro et Denis, Tonton et Marraine, les grands-parents, Mat et Maria, Cécé et Lucas, Terry et Audrey, Sand et Thomas, Pat et Maryse et toute la 'clik'.

Et enfin le dernier ingrédient, l'indispensable, celui sans quoi l'ensemble ne constituerait pas un tout : toi. Toi celle qui m'a soutenu après mes journées difficiles, toi qui m'a aimé, fait évoluer, avec qui j'ai partagé sept ans de ma vie, toi qui porte ce petit bout de nous qui me comble de bonheur, merci mon Amour, Marion.

RESUME

Les protéines d'adhésions homophiles N-cadhérine jouent un rôle majeur dans le développement du cerveau, notamment en agissant sur la croissance et la plasticité synaptique. Au cours de ma thèse, j'ai étudié le rôle de la N-cadhérine dans ces deux processus en utilisant des neurones issus de cultures primaires déposés sur des substrats micropatternés. Ces substrats sont recouverts de N-cadhérine purifiée afin d'induire des adhésions N-cadhérines sélectives au niveau de micro-motifs régulièrement espacés.

Mes deux premières études sont basées sur le modèle d'embrayage moléculaire, décrivant le processus par lequel la motilité du cytosquelette d'actine se couple aux adhésions au niveau de la membrane cellulaire afin de générer des forces de traction aux zones de contact avec le substrat, permettant ainsi l'avancée cellulaire (Giannone et al., 2009). Plusieurs études ont mis en avant l'existence d'un tel modèle (Mitchison et Kirschner, 1988 ; Suter et Forscher, 1998), cependant le mécanisme exact permettant d'expliquer ce couplage mécanique de l'actine aux protéines d'adhésions reste mal connu. Via des techniques de pinces optiques, des travaux précédemment menés dans l'équipe ont prouvé l'existence d'un couplage entre le flux d'actine et les adhésions N-cadhérine permettant la migration du cône de croissance (Bard et al., 2008). Cette technique n'a cependant pas permis la visualisation directe de l'engagement d'un tel mécanisme. Nous avons donc couplé l'utilisation des substrats micro-patternés à la microscopie haute résolution sptPALM/TIRF afin de visualiser directement la dynamique des protéines impliquées dans l'embrayage moléculaire.

Dans le premier article, j'ai montré pour la première fois l'existence d'interactions transitoires entre le flux d'actine et les adhésions N-cadhérines au niveau du cône de croissance, reflétant un embrayage glissant à l'échelle de la molécule unique (Garcia et al., en préparation).

Dans le second article, en travaillant sur des neurones plus matures, nous avons pu montrer l'engagement d'un embrayage moléculaire trans-synaptique entre adhésions N-cadhérines et flux d'actine permettant la stabilisation du filopode dendritique et ainsi sa transition en épine mature (Chazeau/Garcia et al., en préparation).

J'ai également participé à une troisième étude dans laquelle j'ai observé l'effet des substrats micropatternés recouverts de N-cadhérine, sur la synaptogenèse. J'ai ainsi pu prouver que la N-cadhérine déposée sur les micro-motifs, stimule la croissance dendritique et axonale et joue un rôle prépondérant dans la maturation morphologique des neurones. Cependant, la N-cadhérine est incapable d'induire la formation de synapses contrairement aux protéines d'adhésion neurexine/neuroline ou SynCam (Czöndör et al., 2013).

ABSTRACT

The homophilic adhesion molecule N-cadherin plays major roles in brain development, notably affecting axon outgrowth and synaptic plasticity. During my PhD work, I addressed the role of N-cadherin in these two processes, using primary neurons cultured on micro-patterned substrates. These substrates are coated with purified N-cadherin to trigger selective N-cadherin adhesions in a spatially controlled manner.

My two first studies are based on the “molecular clutch” paradigm, by which the actin motile machinery is coupled to adhesion at the cell membrane to generate forces on the substrate and allow cells to move forward (Giannone et al., 2009). Many publications have provided evidence for such a mechanism (Mitchison et Kirschner, 1988 ; Suter et Forscher, 1998), but the exact mechanisms underlying the molecular coupling between the actin retrograde flow and adhesion proteins remain elusive. The team previously inferred, using optical tweezers, that a molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration (Bard et al., 2008), but could not achieve a direct visualization of the engagement process with this technique. Here, we combined the use of micropattern substrates with high resolution microscopy sptPALM/TIRF to visualize directly the dynamics of the main proteins involved in the molecular clutch.

In my first paper, I reveal for the first time transient interactions between the actin flow and N-cadherin adhesions in growth cones, reflecting a slipping clutch process at the individual molecular level (Garcia et al., in preparation).

In a second study, working with more mature neurons, we revealed that engagement of a molecular clutch between trans-synaptic N-cadherin adhesions and the actin flow underlies the stabilization of dendritic filopodia into mature spines (Chazeau/Garcia et al., in preparation).

I also participated to a third study, where I observed the effect of N-cadherin coated substrates on synaptogenesis. I showed that, although N-cadherin on micro-patterned substrates stimulated axonal and dendritic elongation and played a major role in morphological maturation, it was not able to induce synapse formation like neurexin/neuroligin or SynCAM adhesions (Czöndör et al., 2013).

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications:

Boumghar K., Couret-Fauvel T., **Garcia M.**, Armengaud C. (2012). Evidence for a role of GABA- and glutamate-gated chloride channels in olfactory memory. *Pharmacol Biochem Behav.* 103(1):69-75.

Czondör K.*, Mondin M.*, **Garcia M.***, Heine M., Frischknecht R., Sibarita J.B., Choquet D., Thoumine O. (2012). Unified quantitative model of AMPA receptor trafficking at synapses. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 3522-3527. (*) Contribution égale des auteurs.

Czöndör K., **Garcia M.**, Argento A., Constals A., Breillat C., Tessier B., Thoumine O. (2013) Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion proteins for high-content study of synapse formation. *Nature Communications* 4:2252.

Chazeau A., **Garcia M.**, Czöndör K., Argento A., Perrais D., Poujol C., Giannone G. and Thoumine O. A mechanical coupling between N-cadherin adhesion and F-actin flow stabilizes dendritic spines. En préparation.

Garcia M., Leduc C., Argento A., Sibarita J.B., Thoumine O. A slipping clutch revealed by transient single molecule interactions between flowing actin and n-cadherin adhesions in growth cones. En préparation.

Brevet:

n° PCT/FR2012/051688 Juillet 2012, Inventeurs: Czondör K, **Garcia M**, Thoumine O.
Micro-patterned substrates for neuronal cell cultures and applications.

Communications affichées:

Garcia M., Bard L., Argento A., Sibarita J.B., Thoumine O. Nanoscale mechanical coupling between N-cadherin adhesion and actin dynamics in growth cone motility (Workshop Embo, 2011, Heraklion, Grèce)

Garcia M., Argento A., Sibarita J.B., Thoumine O. Mechanical coupling between N-cadherin adhesion and actin dynamics in growth cone motility (Conférence Jacques Monod, 2012, Roscoff, France)

Garcia M., Argento A., Sibarita J.B., Thoumine O. Mechanical coupling between N-cadherin adhesion and actin dynamics in growth cone motility (Journée de l'école doctorale, , 2012, Arcachon, France)

Garcia M., Argento A., Sibarita J.B., Thoumine O. Mechanical coupling between N-cadherin adhesion and actin dynamics in growth cone motility (Journée de l'école doctorale, , 2013, Arcachon, France)

TABLE DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATIONS | 9 |
| INTRODUCTION | 12 |
| I- Adhésion et cytosquelette | 13 |
| 1. Les adhésions cadhérines | 13 |
| 1.1 <u>Le domaine extracellulaire : formation de l'homodimère</u> | 14 |
| 1.2 <u>Le domaine intracellulaire : interaction avec caténines et actine</u> | 15 |
| 1.2.1 <u>La β-caténine</u> | 16 |
| 1.2.2 <u>L'α-caténine</u> | 17 |
| 1.2.3 <u>La vinculine</u> | 18 |
| 2. Autres protéines d'adhésion | 19 |
| 2.1 <u>La neurexine</u> | 19 |
| 2.2 <u>La neuroligine</u> | 20 |
| 2.3 <u>SynCAM</u> | 21 |
| 3. Le cytosquelette d'actine | 23 |
| 3.1 <u>Polymérisation de l'actine</u> | 23 |
| 3.2 <u>La myosine, moteur de l'actine</u> | 25 |
| 4. L'embrayage moléculaire | 26 |
| 4.1. <u>Le modèle</u> | 26 |
| 4.2. <u>Les protéines adaptatrices</u> | 27 |
| 4.3. <u>L'évolution du modèle de couplage cadhérine/actine</u> | 30 |
| II- Les différentes structures et fonctions neuronales | 32 |
| 1. Le cône de croissance | 32 |
| 1.1 <u>Structure du cône</u> | 32 |
| 1.2 <u>Rôle de l'actine dans la motilité et la mobilité du cône de croissance</u> | 33 |
| 1.3 <u>Rôle de la N-cadhérine dans la croissance neuritique et axonale</u> | 34 |
| 2. Le Filopode dendritique | 36 |
| 2.1 <u>Structure et dynamique de l'actine dans le filopode dendritique</u> | 37 |
| 2.2 <u>Rôle du complexe cadhérine/caténine dans la synaptogenèse</u> | 38 |
| 3. La Synapse | 41 |
| 3.1 <u>Structure de la synapse</u> | 41 |
| 3.2 <u>Le cytosquelette d'actine, structure et fonction dans la plasticité de l'épine dendritique</u> | 42 |
| 3.3 <u>Rôle des N-cadhérines dans la plasticité synaptique</u> | 43 |
| ANNEXE METHODES | 46 |
| I- Substrats micro-structurés permettant la culture neuronale | 47 |
| II- Préparation des substrats | 50 |
| III- Culture cellulaire et transfection | 51 |

| | |
|--|------------|
| IV- Microscopie haute résolution : Spt-PALM | 52 |
| V- L'analyse d'image | 54 |
| 1. Localisation, segmentation et suivi de particules uniques | 54 |
| 2. Le déplacement quadratique moyen | 55 |
| 3. Programme MATLAB | 56 |
| 4. Motility Index | 56 |
| RESULTATS | 58 |
| Article 1: “ A slipping clutch revealed by transient single molecule interactions between flowing actin and N-cadherin adhesions in growth cones ”. | 59 |
| A. Contexte et problématique | 59 |
| B. Résultats majeurs | 60 |
| Article 2: “A mechanical coupling between N-cadherin adhesion and F-actin flow stabilizes dendritic spines”. | 91 |
| A. Contexte et problématique | 91 |
| B. Résultats majeurs | 92 |
| Article 3: “Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation”. | 127 |
| A. Contexte et problématique | 127 |
| B. Résultats majeurs | 128 |
| DISCUSSION ET PERSPECTIVES | 150 |
| I. Que sait-on à présent de l’embrayage moléculaire dans le cône de croissance ? | 151 |
| II. Existe-t-il un modèle analogue d’embrayage moléculaire permettant d’expliquer la transition filopode dendritique/épine ? | 156 |
| III. Contrôle spatial du développement neuronal et de la synaptogenèse | 160 |
| BIBLIOGRAPHIE | 163 |

ABREVIATIONS

ABPs : actin binding proteins

AchE : acétylcholine estérase

ADP : adénosine diphosphate

AMPA : acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique

APC : adenomous polyis coli

ApCam : aplysia cam

Arp 2/3 : actin related protein 2/3

ATP : adénosine triphosphate

CAM : cell adhesion molecule

CASK : calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase

CKII : casein kinase 2)

C-ter : c-terminale

EGF : Epidermal Growth Factor

ELCs : essential light chains

EphB : ephrin B

FERM : 4.1 *ezrin radixin moesin*

FGF : fibroblast growth factor

FRAP : fluorescence recovery after photobleaching

FRET : fluorescence resonance energy transfer

GluA2 : récepteur au glutamate (équivalent GluR2)

GSK-3 β : glycogen synthase kinase 3 β

Ig : immunoglobuline

kDa : kilodalton

LNS : laminin neurexin sex-hormone

LRRTM : leucine-rich repeat transmembrane neuronal

LTD : long term depression

LTP : long term potentiation

MEC : matrice extracellulaire
MEF : mouse embryonic fibroblasts
mGluRs : metabotropic glutamate receptors
MIA : multidimensional image analysis
MSD : mean square displacement
N-cad WT : n-cadherin wild type
NLG : neuroligine
NMDA : N-méthyl -D-aspartate
NRX : neurexine
NTD : n-terminal domain
N-ter : n-terminale
PALM : photo-activation localisation microscopy
PDZ : PSD Dlg1 ZO1
PEG : polyéthylène-glycol
Pi : phosphate
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) biphosphate
PKC : protein kinase C
PLL : poly-lysine
ProN : precursor N-cadherin
PSD : post synaptic density
RLCs : regulatory light chains
RNA : ribonucleic acid
ShRNA : small hairpin RNA
siRNA : small Interfering RNA
Spt : single particle tracking
SS (1-5 or A/B) : splicing site
S-SCAM : synaptic scaffolding molecule
SynCAMs : synaptic cell adhesion molecules
TCF/Lef: T cell factor/ limphoid enhancer factor

TIRF : total internal reflexion microscopy

UV : ultraviolet

VH1-3 : vinculin homology domain 1-3

Wnt : compression de Wg (wingless) et Int (integration site)

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I- Adhésion et cytosquelette

1. Les adhésions cadhérines

Les cadhérines sont des molécules d'adhésion cellulaire jouant un rôle prédominant dans la formation et le maintien de contacts intercellulaires. Elles sont essentielles à l'organisation et au maintien des tissus. Le nom de ces protéines renvoie au fait que leur fonction d'adhésion est dépendante des ions calcium : « calcium-dependent adhesion » (Takeichi, 1977).

Les cadhérines appartiennent à une superfamille de plus de 80 membres divisée en sous groupes parmi lesquels : les cadhérines classiques, desmosomales, protocadhérines, et T-cadhérines (cf. figure 1).

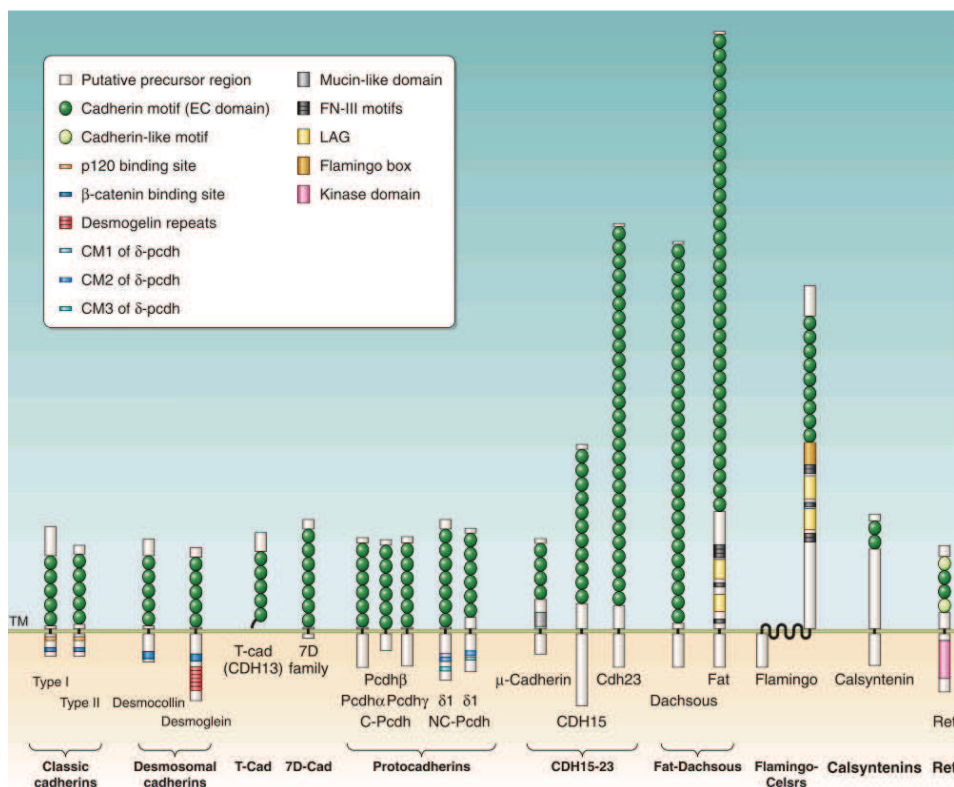


Figure 1 : Superfamille des Cadhérines

Schéma des différentes familles de cadhérines. Malgré leur diversité, notons qu'elles présentent un domaine EC conservé au niveau de la partie extracellulaire. Chaque famille ou sous famille est classée sur la base de séquences cytoplasmiques conservées.

(D'après Hirano et Takeichi, 2012.)

Les cadhérines ont en commun un domaine N-terminal (N-ter) extracellulaire permettant les liaisons intercellulaires, un domaine transmembranaire (sauf la T-cadhérine), et un domaine C-terminal cytosolique servant d'intermédiaire de liaison entre la membrane cellulaire et le cytosquelette d'actine.

Dans la suite de cette introduction, je m'attacherai à la description des cadhérines classiques, protéines transmembranaires de type 1 qui ont la particularité d'avoir un motif HAV conservé dans la partie distale du domaine N-ter. Ces protéines sont nommées par des lettres en fonction du tissu dans lequel elles ont été identifiées. Ainsi, la E-cadhérine est exprimée dans les tissus épithéliaux, la N-cadhérine dans les tissus nerveux, la R-cadhérine dans la rétine ou encore la P-cadhérine dans le placenta.

1.1 Le domaine extracellulaire : formation de l'homodimère

Le domaine extracellulaire de ces protéines est caractérisé par la répétition en tandem de 5 domaines appelés EC (EC1-EC5). Ces domaines EC sont composés d'environ 110 acides aminés et ont une structure proche de celle des immunoglobulines. Entre chaque domaine EC viennent se loger 3 ions calciums (Nagar et al., 1996) ce qui rigidifie l'ectodomaine et permet la formation d'interactions homophiles. Ces interactions peuvent se faire de façon latérale sur la même membrane plasmique et on obtient ainsi des dimères cis (Boggon et al., 2002; Shapiro et Weis, 2009), ou bien de façon anti parallèle avec des dimères trans (Brasch et al., 2012) (cf. figure 2). Il y aurait dans un premier temps formation d'un complexe dimérique transitoire calcium- dépendant en forme de X via une région proche d'EC1-EC2. Puis le tryptophane (W) en position 2 du domaine EC1 d'un des partenaires s'adapterait à la poche hydrophobe formée par le domaine EC1 de l'accepteur, aboutissant ainsi à la formation d'un dimère stable (Harrison et al., 2010). Dans ce modèle, la conformation en cis résulterait d'une liaison latérale entre le domaine EC1 d'une cadhérine et le domaine EC2 du partenaire cadhérine.

Dans les deux cas, la préservation du domaine EC1, domaine EC le plus amino terminal, ainsi que la concentration extracellulaire en calcium semblent jouer un rôle critique dans la formation et le maintien des liaisons cadhérines.

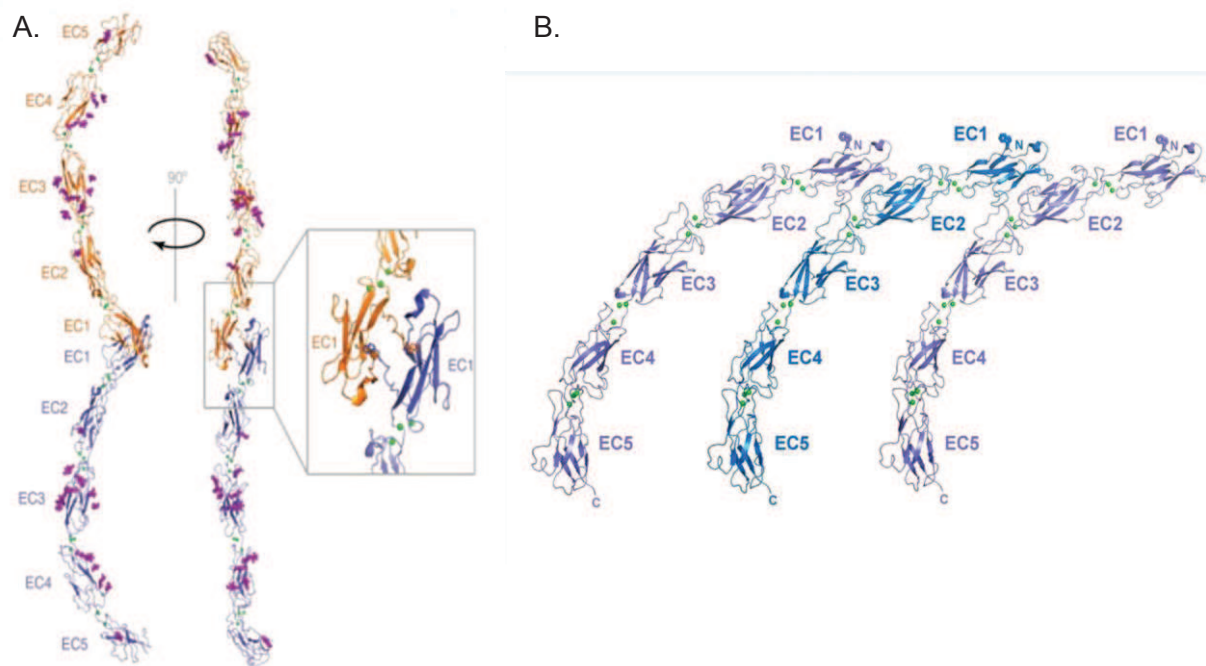


Figure 2 : Représentation tridimensionnelle des interactions Cis et Trans des cadhérines classiques

Représentation en ruban de la structure des 5 motifs EC constituant les ectodomains des cadhérines classiques. Ces cadhérines interagissent (A) en trans via leurs domaines EC-1 et (B) en cis par des liaisons entre le domaine EC1 et EC2 de cadhérines voisines. (D'après Brasch et al., 2012.)

1.2 Le domaine intracellulaire : interaction avec caténines et actine

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la robustesse des contacts adhésifs N-cadhérine ne dépend pas uniquement du domaine extracellulaire qui induirait à lui seul des interactions faibles (Chappuis-Flament et al., 2001), mais également du domaine intracellulaire. Cette région C-terminal (C-ter) est composée d'environ 150 acides aminés relativement bien conservés parmi les différentes cadhérines et peut se lier à différentes caténines, protéines dites d'échafaudage servant d'intermédiaire de liaison entre la membrane cellulaire et les filaments d'actine.

Les caténines peuvent être divisées en deux groupes qui se différencient par la présence ou non de domaines répétés Armadillo. La famille Armadillo regroupe la β -caténine, la γ -caténine ainsi que la p-120 caténine. L'autre famille regroupe quant à elle les différents types d' α -caténine : α E-, α T- et α N-caténine.

1.2.1 La β -caténine

La β -caténine est une protéine de 88 kDa pouvant se lier directement à la région C-ter des cadhérines classiques (cf. fig 3).

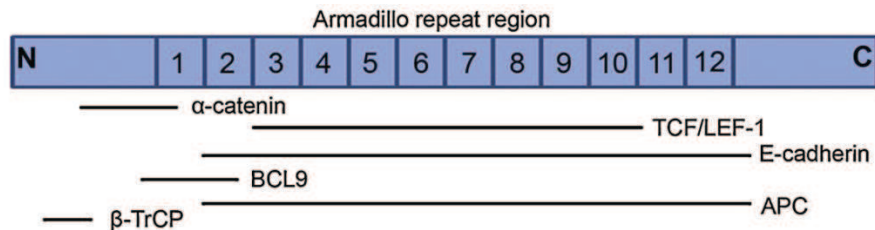


Figure 3 : Représentation schématique de la β -caténine

Ce schéma représente les différents sites d'interactions protéiques de la β -caténine. E-cadherine, LEF/TCF, APC et axine sont en compétition pour la liaison au domaine répété armadillo de la β -caténine.

(D'après Jamieson et al., 2012.)

Elle contient un domaine central conservé d'environ 800 acides aminés correspondant à une répétition de 12 domaines armadillo (R1-R12). Ce domaine relativement rigide correspond à une plateforme avec de multiples sites d'adhésion se chevauchant. Ainsi les différents partenaires, environ une vingtaine, ne peuvent pas se lier en même temps. Dans ces partenaires on trouve notamment TCF/Lef (T-cell factor/Lymphoid enhancer-binding), APC (Adenoma polyposis Coli) ainsi que des cadhérines. C'est une zone critique pour l'adhésion cellulaire ainsi que pour la voie de signalisation des Wnt.

Elle contient aussi deux extrémités flexibles, pouvant entraîner des changements conformationnels de la protéine, modifiant ainsi ses propriétés de liaison aux différents partenaires et donc son activité. Le domaine N-ter correspond à un site de liaison à l' α -caténine et contient des sites tyrosine phosphorylables par les protéines GSK-3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) et CKII (Casein kinase 2).

Le domaine C-terminal possède quant à lui un domaine critique hautement conservé correspondant à une hélice α dans sa partie la plus N-ter. Ce site permet notamment de réguler l'affinité de la β -caténine pour différents facteurs de transcription (Xing et al., 2008).

On peut donc attribuer deux rôles principaux aux β -caténines: co-activateur transcriptionnel dans la voie des wnt (Behrens et al., 1996) et protagoniste de l'adhésion

intercellulaire. En effet, la β -caténine agit en tant que facteur de transcription: elle peut entrer dans le noyau de la cellule-cible des Wnt afin de stimuler, en interaction avec d'autres facteurs de transcription, l'expression de gènes spécifiques nécessaires à l'homéostasie tissulaire. A l'extérieur du noyau, la régulation se fait via l'état de phosphorylation de la β -caténine dépendante de l'activité de GSK-3 β (Hagen et Vidal-Puig, 2002). Une fois à l'intérieur du noyau, la transcription se fait via des facteurs de la famille des TCF/Lef pouvant lier l'ADN et contrôlant ainsi l'expression de gènes spécifiques (Archbold et al., 2012).

Lorsque la voie des wnt n'est pas activée, la β -caténine est localisée au niveau cytoplasmique de la membrane cellulaire. Elle peut lier les cadhérines via sa région N-ter et les domaines armadillo adjacents, empêchant ainsi sa dégradation via des complexes tels que l'APC (Adenomatous Polyposis Coli). Elle joue un rôle déterminant dans l'intégrité des adhésions cellulaires en liant à la fois les cadhérines et l' α -caténine. La liaison à l' α -caténine permet de la stabiliser et renforce son rôle adhésif. Ceci peut aussi être régulé par GSK-3 β et CKII (Huber et Weis, 2001).

1.2.2 L' α -caténine

Les α -caténines sont des protéines d'environ 100 kDA présentant différents isoformes et dont le nom correspond à l'endroit où elles ont été trouvées en premier : l' α -T caténine (Testicules), l' α -E caténine (Epithéliale) et l' α -N caténine (Neuronale). L' α -E caténine est présente de façon ubiquitaire dans les tissus, alors que la N-cadhérine est exprimée de façon plus spécifique au niveau du cerveau. Les α -caténines sont constituées de trois domaines (VH1-3) homologues à la vinculine (cf. figure 4).

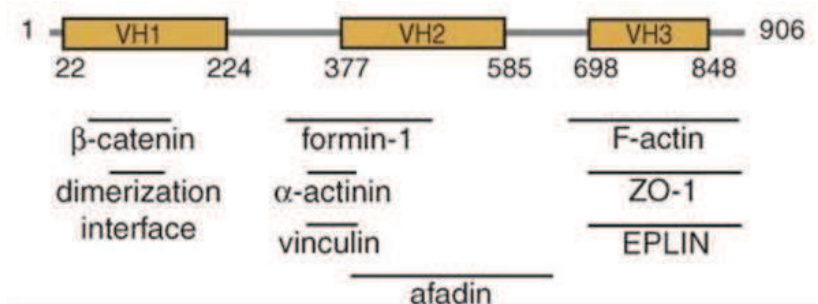


Figure 4 : Représentation schématique de l'organisation moléculaire de l' α -caténine

Ce schéma montre les différents domaines et régions essentiels aux changements conformationnels et aux interactions protéiques de l' α -caténine. (D'après Maiden and Hardin, 2011).

Le domaine VH1, situé en N-ter, permettrait la liaison à la β -caténine ainsi que l'homodimérisation (Nieset et al., 1997; Pokutta et Weis, 2000). Ces deux sites se chevauchent, cela implique donc que l' α -caténine ne peut pas être à la fois dimérique et se lier à la β -caténine. La balance entre les deux états peut être régulée par l'affinité de l' α -caténine pour la β -caténine. Cette régulation peut se faire sur les deux protéines via la phosphorylation de différentes tyrosines. Par exemple, la phosphorylation de tyrosines sur le domaine VH1 de l' α -caténine va augmenter sa translocation à la membrane, son interaction avec la β -caténine et ainsi jouer à la fois sur la polymérisation de l'actine et sur la robustesse des adhésions cellulaires (Burks et Agazie, 2006).

Le domaine central permettrait quant à lui la liaison à la vinculine. Cette liaison serait contrôlée par un domaine modulateur (M) présent sur VH2, dont la flexibilité permettrait à la protéine de changer de conformation en se repliant sur elle-même (Yonemura et al., 2010). D'autres protéines impliquées dans la dynamique de l'actine présentent un site de liaison à VH2 parmi lesquelles : la formine (Kobielak and Fuchs, 2004), l' α -actinine (Knudsen et al., 1995) ou encore l'afadine (Pokutta et al., 2002).

Enfin le domaine C-ter VH3 pourrait interagir de façon directe (Rimm et al., 1995) et/ou indirecte avec l'actine (Abe et Takeichi, 2008). Ce domaine possède aussi un site de liaison à l'Epln, protéine de liaison à l'actine. Cette région C-ter présente de nombreuses homologies avec une autre protéine pouvant interagir avec l'actine : la vinculine.

1.2.3 La vinculine

La vinculine est une protéine de 116 kDa dont la conformation peut changer, permettant ainsi de remplir différentes fonctions. Elle contient 3 domaines principaux : une tête globulaire en N-ter, un domaine riche en proline et une queue C-ter.

La tête de la vinculine correspond au domaine homologue à la région terminale de l' α -caténine qui peut ainsi se lier à elle (cf. figure 5). Ce domaine peut adopter des changements conformationnels en interagissant avec diverses protéines telles que : β -caténine, taline ou encore α -actinine.

Le domaine riche en proline peut interagir dans sa partie C-ter avec le complexe Arp 2/3 (DeMali et al., 2002), qui joue un rôle important dans la régulation du cytosquelette d'actine.

La queue de la vinculine présente des sites d'interactions à la PKC, la paxilline, mais aussi à l'actine. Les deux domaines N-ter et C-ter peuvent interagir entre eux aboutissant à un état replié inactif de la protéine. Le passage d'un état plié, inactif à un état déplié, actif est régulé par la concentration locale en vinculine ainsi que par la présence de PIP2 (Palmer et al., 2009).

L'utilisation de mutants α -caténine incapable de lier la vinculine et empêchant ainsi son recrutement au niveau de jonctions adhérentes a permis de montrer que la vinculine semblait jouer un rôle important dans la régulation des adhésions intercellulaires cadhérine, dans l'expression ainsi que dans la mécanotransduction de ces mêmes protéines (Twiss et al., 2012).

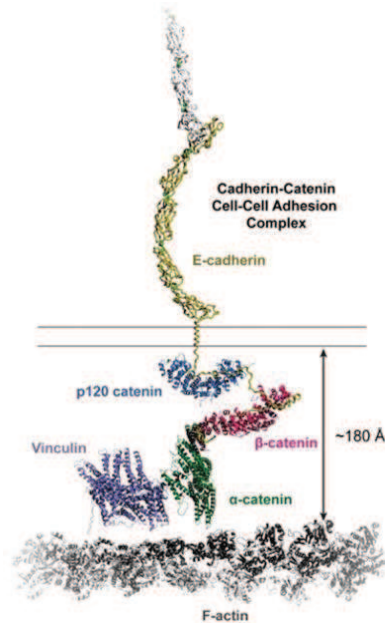


Figure 5 : Représentation hypothétique des interactions entre le domaine intracellulaire des cadhérines, les caténines et l'actine

Structure tridimensionnelle du complexe cadhérine/ caténine dans lequel les caténines servent d'intermédiaire de liaison entre les adhésions et le cytosquelette d'actine.
(D'après Ishiyama et Ikura, 2012.)

2. Autres protéines d'adhésion

2.1 La neurexine

Les neurexines (Nrx) sont des protéines transmembranaires de type I localisées en majorité au niveau de la membrane pré-synaptique. Chez les mammifères, il existe trois gènes codant pour différents isoformes de neurexines (1-3). Via le contrôle de promoteurs indépendants, chacun de ces gènes donne lieu à deux types de neurexines, une forme longue appelée Nrx- α et une forme courte appelée Nrx- β (Tabuchi and Südhof, 2002). Les Nrx- α et β possèdent un domaine intracellulaire similaire, mais différent dans leur domaine extracellulaire.

Le domaine intracellulaire commun aux deux protéines est assez court. Il possède un site de liaison PDZ en C-ter qui lui permet de se lier à différentes protéines telles que la synaptotagmine (Hata et al., 1993) ou CASK (Hata et al., 1996).

Pour ce qui est du domaine extracellulaire, la $Nrx-\beta$ contient un domaine LNS (Laminin, Neurexin, Sex-hormone binding protein domain), alors que la $Nrx-\alpha$ possède six domaines LNS séparés par trois domaines EGF (Epidermal Growth Factor). Ce domaine extracellulaire permet la liaison à d'autres protéines membranaires présentes en post-synaptique telles que la neuroligine ou encore LRRTM (Leucine-Rich Repeat Transmembrane Neuronal) (Südhof et al., 2008). Chaque isoforme présente différents sites d'épissage (SS : splicing site) dont deux sont communs (SS4 et SS5) et trois spécifiques à la forme α (SS1, SS2 et SS3). Le site SS4 est particulièrement important, il semble jouer un rôle décisif dans la spécificité d'interaction avec LRRTM et neuroligine (Siddiqui et al., 2010) ainsi que dans la transmission synaptique (Aoto et al., 2013).

L'existence de différents épissages sur les isoformes neurexines, conduisent à la synthèse de centaines de formes alternatives de neurexines aux propriétés uniques d'affinité pour différents partenaires (Ullrich et al., 1995).

2.2 La neuroligine

La neuroligine (Nlg) est une protéine transmembranaire de type 1 située sur la membrane post synaptique. Il en existe trois types avec une localisation spécifique pour chacune. La Nlg1 s'exprime au niveau de synapses excitatrices (Song et al., 1999), Nlg2 au niveau des synapses inhibitrices (Varoqueaux et al., 2004), quant à Nlg3, elle est ubiquitaire (Budreck et Scheiffele, 2007).

Les Nlgs possèdent un domaine extracellulaire dont la majeure partie correspond à une région homologue à l'Acétylcholine estérase (AChE), mais dépourvue d'activité enzymatique, permettant la liaison trans-synaptique à la neurexine. Ce domaine permet la formation d'homodimères de Nlg (Dean et al., 2003) aboutissant à un complexe hétérotétramérique en liant deux molécules de neurexines (Nrxs) de façon calcium-dépendante (Araç et al., 2007). Tout comme la Nrx, la Nlg présente des sites d'épissages alternatifs. Ces sites d'épissages, au nombre de deux (SSA et SSB), se situent au niveau de la partie extracellulaire des Nlgs. SSA est commun aux trois neuroligines, alors que SSB est uniquement présent au niveau de la neuroligine 1 (Boucard et al., 2005). Le site d'épissage SSB, tout comme SS4 (décrit précédemment pour la neurexine), contrôle l'interaction $Nrx/Nlg1$ (Boucard et al., 2005, Graf et al., 2006). L'insertion d'une séquence de huit acides aminés au niveau du site SSB de Nlg1 a pour conséquence de faire varier son affinité pour la forme α ou la forme β neurexine (Ichtchenko et al., 1996; Lee et al., 2010). Si l'insert en

SSB n'est pas présent, la Nlg lie aussi bien les deux isoformes de Nr_x, indépendamment de la présence d'un insert sur SS4 (SS4+). Si l'insert en SSB est présent, alors cela réduit l'affinité de Nlg1 pour Nr_x-β SS4+ et Nr_x-1α. Ces différents épissages modulent ainsi la fonction synaptique (Lee et al., 2010).

Le domaine intracellulaire possède un motif de liaison à la PDZ lui permettant de se lier à différentes protéines de la densité post synaptique. Ainsi Nlg1 peut interagir avec S-SCAM (Synaptic SCAffolding Molecule) et PSD-95, protéine intracellulaire nécessaire à la mise en place de synapses excitatrices (Irie et al., 1997; Hirao et al., 1998). Nlg 2 interagit aussi avec S-SCAM, mais recrute quand à lui la protéine d'échafaudage gephrine contribuant à la mise en place de synapses inhibitrices (Meyer et al., 2004). Les niveaux relatifs de PSD-95 et gephrine, contrôlés par surexpression ou siRNA, régulent les effets de Nlg1 et Nlg2 (Levinson et al., 2010 ; Levinson et El-Husseini, 2005). Il a été suggéré que le niveau de phosphorylation d'une tyrosine unique conservée parmi les 3 neuroligines présentes sur Nlg1 module le recrutement différentiel de PSD-95 ou gephrine, contrôlant ainsi l'équilibre entre le nombre de synapses excitatrices et inhibitrices (Giannone et al., 2013).

Le couplage de protéines d'échafaudage au niveau de la densité post synaptique permet la mise en place de liens physiques entre neuroligines et récepteurs aux neurotransmetteurs. Au niveau des synapses excitatrices, PSD-95 permet le recrutement direct de récepteurs transmembranaires au glutamate type NMDA (Niethammer et al., 1996) et le recrutement indirect de récepteurs de type AMPA via l'interaction avec la stargazine (Bats et al., 2007). Au niveau des synapses inhibitrices, la gephrine peut se lier directement à différentes sous-unités des récepteurs GABA (Kowalczyk et al., 2013) et ainsi jouer un rôle décisif dans l'agrégation de ces récepteurs au niveau des post synapses inhibitrices (Tretter et al., 2008; Pouloupoulos et al., 2009). Ces protéines d'échafaudage peuvent ainsi jouer un rôle important dans la régulation de l'initiation, la maturation et la fonction synaptique.

2.3 SynCAM

Les SynCAMs (Synaptic Cell Adhesion Molecules) sont des protéines membranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Ig) et se divisent en 4 sous-familles (SynCAM 1-4). Ces protéines possèdent un domaine extracellulaire N-terminale conservé comprenant trois domaines Ig, une région transmembranaire, et un court domaine intracellulaire possédant des sites de liaisons aux domaines FERM ainsi que PDZ (Biederer et al., 2006).

SynCAM1 correspond à la forme la plus exprimée dans le cerveau. Cette protéine peut former des interactions homophiliques via les domaines Ig afin d'engager des liaisons

inter-cellulaires (Biederer et al., 2002). Lors du développement du cerveau, les autres formes de SynCAM sont coexprimées. Il peut alors y avoir formation de complexes hétérophiles régulé par la glycosylation de deux des domaines. Ces hétérodimères régulent ainsi les adhésions engagées lors de la synaptogenèse, et jouent un rôle important dans l'organisation ainsi que la transmission synaptique (Fogel et al., 2007).

Via la séquence C-ter, la protéine interagit en pré-synaptique avec les domaines PDZ de CASK et le recrute au niveau de la membrane (Biederer et al., 2002). Or CASK semble jouer un rôle de couplage entre l'adhésion neuronale et l'exocytose de vésicules synaptiques (Atasoy et al., 2007), révélant ainsi un rôle dans la spécialisation pré-synaptique des synCAM.

De façon générale, il semble que SynCAM1 puisse réguler à la fois le nombre et la plasticité des synapses excitatrices dans le cerveau (Robbins et al., 2010), et ce via la mise en place d'interactions latérales entre différents complexes synCAM au niveau de la fente synaptique (Fogel et al., 2007).

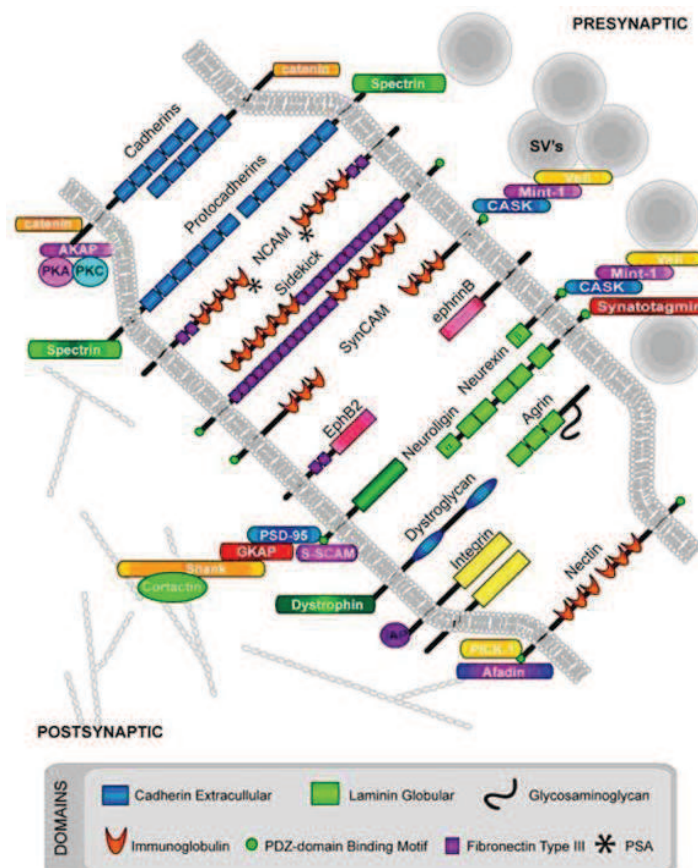


Figure 6 : Organisation des principaux complexes adhésifs au niveau de la synapse

Ce schéma représente les partenaires protéiques des différents complexes adhésifs. SynCam et Neurexine interagissent avec CASK et participent à la formation de présynapses fonctionnelles. La neurologine lie les protéines d'échafaudage postsynaptique PSD-95 et SSCAM contribuant à la mise en place de présynapses excitatrices.

(D'après Gerrow and El-Husseini, 2006.)

3. Le cytosquelette d'actine

Comme énoncé précédemment, la formation de contacts adhésifs cadhérine via leurs domaines extracellulaires n'est pas robuste. Il suffit à initier le contact, mais pour le maintenir, la mise en place de liens avec le cytosquelette d'actine est indispensable.

3.1 Polymérisation de l'actine

L'actine est une protéine de 43 kDa qui est retrouvée soit sous forme de monomère globulaire (actine G) soit sous forme de polymère (actine F).

La polymérisation débute par l'activation de l'actine globulaire en présence de cations divalents (Calcium ou Magnésium) et d'ATP, ce qui aboutit à la création d'un complexe « actine G-ATP ». S'ensuit alors une phase thermodynamiquement défavorable dite de nucléation pendant laquelle des dimères ou trimères se forment (cf. figure 7). Puis des monomères viennent s'ajouter durant une phase dite d'élongation aboutissant à la formation de filaments. Les monomères sont polarisés, ils s'intègrent de manière orientée dans les micro-filaments qui sont donc eux-mêmes polarisés avec une extrémité positive (bout barbé) et une extrémité négative (bout pointu). L'extrémité barbée présente une constante de vitesse d'association (K_{on}) et une constante de dissociation (K_{off}) des monomères d'actine supérieures à celles de l'extrémité pointue. La croissance du filament est donc très rapide au pôle positif et beaucoup plus lente au pôle négatif. Une fois polymérisés, les monomères hydrolysent lentement l'ATP, libérant ainsi un phosphate (P_i). Les molécules d'actine liées à l'ADP vont alors avoir tendance à se détacher aux extrémités pointues des filaments. L'ensemble de ces mécanismes de polymérisation et de dépolymérisation aboutissent à un phénomène dit de tapis roulant (treadmilling en anglais), qui fait que les filaments d'actine peuvent garder une longueur constante, puisque à mesure qu'ils progressent à leur extrémité positive (dans un front de migration), ils se dépolymérisent à l'extrémité négative.

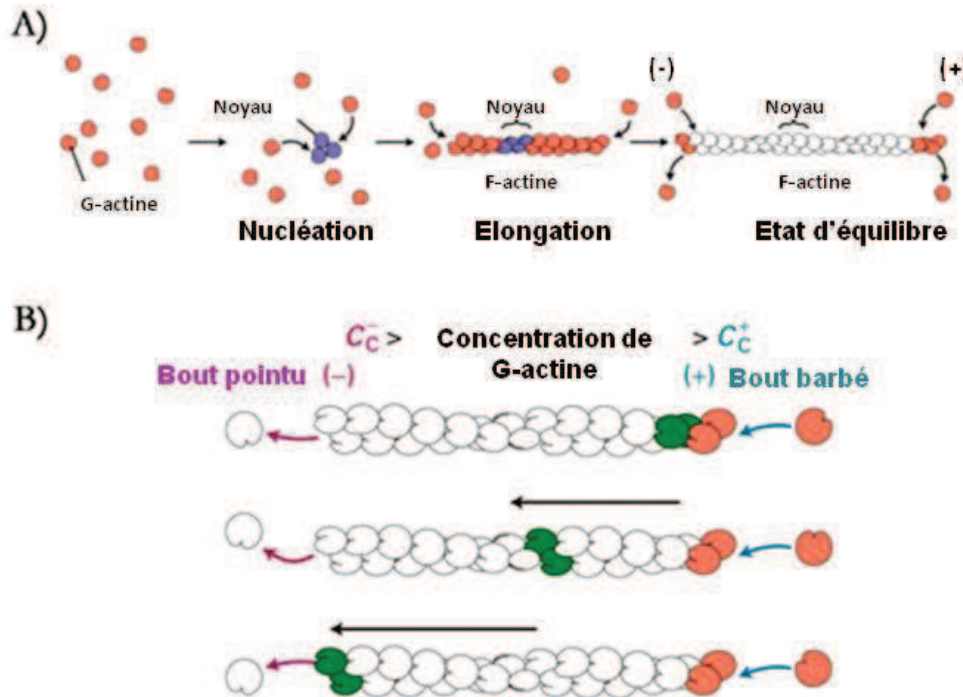


Figure 7 : Représentation schématique de la polymérisation de l'actine

(A) L'actine-G-ATP a tendance à polymériser spontanément dans la cellule pour former les filaments d'actine. Ces filaments sont polarisés avec une extrémité positive (bout barbé) et une extrémité négative (bout pointu). (B) Cette polarité engendre un mécanisme de polymérisation selon le modèle de tapis roulant. L'actine polymérise préférentiellement au niveau du bout barbé, où les monomères de G-ATP-actine s'incorporent (rose). L'hydrolyse en G-ADP-actine (vert) avec la dissociation du Pi intervient au sein du filament. La dépolymérisation intervient au niveau du bout pointu où les monomères d'actine vont pouvoir échanger leurs molécules ADP par de l'ATP et ainsi être réutilisés au bout barbé.

(D'après Lodish et al., 2003.)

Dans les cellules, la formation spontanée de noyaux d'actine est très défavorable. Aussi, les cellules ont recours à des protéines dites nucléateurs. À ce jour, trois types de nucléateurs ont été identifiés : le complexe Arp2/3, les formines, et la protéine Spire.

Arp 2/3 (Actin Related Protein 2/3), seul nucléateur des réseaux branchés d'actine, est un complexe de 220 kDa composé de 7 sous unités. Il tient son nom du fait que 2 de ses sous unités Arp2 et Arp3, sont structurellement proche de l'actine. Quant aux 5 autres sous-unités (5arpC1-5), elles servent de structure de base au positionnement d'Arp2 et 3 à l'extrémité négative des filaments filles. Ainsi Arp 2/3 permet la mise en place de réseaux dynamiques d'actine branché capable de s'étendre et jouer ainsi un rôle important dans la migration cellulaire. Les formines ainsi que la protéine Spire peuvent quant à elles, former

des filaments d'actine linéaires. Il a d'ailleurs été récemment avancé que les formines captent et allongent les filaments initialement générés par Arp 2/3 (Block et al., 2012).

3.2 La myosine, moteur de l'actine

Les myosines appartiennent à une famille de moteurs protéiques ATP-dépendants pouvant lier l'actine, hydrolyser l'ATP et ainsi générer mouvement et force. Il existe différents isoformes dont celui conventionnel: la myosine II. Cette dernière est une protéine hexamérique composée de 2 chaînes lourdes et 4 chaînes légères proche de la structure des calmodulines. Les 2 chaînes lourdes s'associent par leurs parties C-ter qui réalisent une structure en bâtonnet (la queue) se terminant par 2 têtes globulaires. Les têtes constituent le domaine moteur capable de lier l'actine et utiliser l'hydrolyse de l'ATP afin de générer des forces permettant de « marcher » le long des filaments vers l'extrémité barbée. A la base des têtes de myosines, se trouve un cou rigide surenroulé pouvant lier les chaînes légères de calmoduline et jouant un rôle de bras de levier. La queue est divisée en deux domaines : un domaine proximal capable de dimeriser et un domaine distal globulaire.

En association avec ces chaînes lourdes, on retrouve au niveau de chaque tête deux chaînes légères essentielles (ELCs) et 2 chaînes légères régulatrices (RLCs) qui les stabilisent au niveau du cou (cf. figure 8). La myosine II semble réguler le flux rétrograde d'actine et atténue les extensions cellulaires au niveau du cône de croissance (Medeiros et al., 2006). Il permet de désassembler le réseau d'actine jouant ainsi un rôle actif dans le phénomène de « treadmilling » (Wilson et al., 2010).

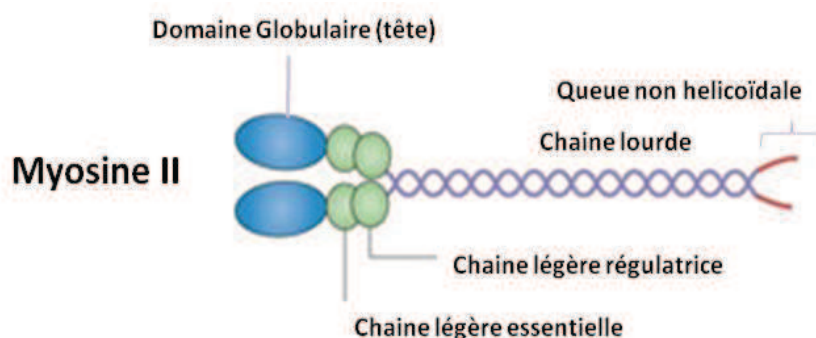


Figure 8 : Le moteur Myosine II

Ce schéma représente l'organisation moléculaire de la Myosine II. Les 2 chaînes lourdes peuvent dimeriser. Les têtes globulaires contiennent la région de liaison à l'actine ainsi que le domaine moteur enzymatique Mg^{2+} -ATPase.

(D'après Kneussel et Wagner, 2013.)

4. L'embrayage moléculaire

4.1. Le modèle

L'embrayage moléculaire (« molecular clutch ») est un concept proposé à la fin des années 1980, il explique la migration cellulaire par un mécanisme de couplage mécanique entre les forces de tractions exercées par le cytosquelette d'actine et les adhésions cellulaires (Mitchison et Kirschner, 1988; Suter et Forscher, 1998).

Dans ce modèle, le moteur correspond au flux rétrograde d'actine. Ce flux est issu d'un équilibre entre polymérisation de l'actine au bout barbé, dépolymérisation au bout pointu, par l'activité des myosines qui tirent sur ces filaments à leurs bases, mais aussi par tension de la membrane (Batchelder et al., 2011). En effet, selon l'état de tension plus ou moins important de la membrane, elle va pouvoir à elle seule, sans les myosines, pouvoir diriger le flux d'actine (Craig et al., 2012).

Ce flux correspond à un état stationnaire de tapis roulant (« treadmill ») et ne permet pas à lui seul de faire avancer la cellule. Pour induire le mouvement, il faut que les forces générées par la dynamique de l'actine soient transmises de façon locale et régulée à l'environnement extérieur. Ceci se fait via des molécules dites adaptatrices qui vont permettre le lien dynamique entre les complexes adhésifs stabilisés à la membrane (cadhérine et intégrines) et le réseau d'actine. Lorsque la connexion est assez forte, le flux rétrograde va ralentir. L'actine continuant à polymériser à la même vitesse à l'extrémité barbée, il va y avoir des extensions cellulaires à ce niveau. Différents niveaux de couplage sont observés : un état couplé, expliqué précédemment, un état non couplé, et un état dit de « glissement » (cf. figure 9). Ce dernier correspond à un état intermédiaire, avec un faible couplage, où l'on observe des connexions transitoires avec des événements de rupture, comme des sauts. Ceci a été observé notamment sur substrat mou (Chan and Odde, 2008) et par des techniques de pinces optiques (Bard et al., 2008). En accord avec ces résultats, il a été montré pour le cône de croissance que son déplacement est inversement proportionnel à la vitesse du flux rétrograde d'actine (Lin et al., 1996).

L'alternance de ces différents états peut être modulée par les forces mécaniques. Ainsi si l'on inhibe l'activité de la myosine II, la vitesse du flux diminue, et la protrusion augmente (Lin et al., 1996). Elle peut aussi être contrôlée par des signaux cellulaires via des phosphorylations modulant la liaison des différentes molécules adaptatrices (dites d'embrayage) entre elles (Xu et al., 2004).

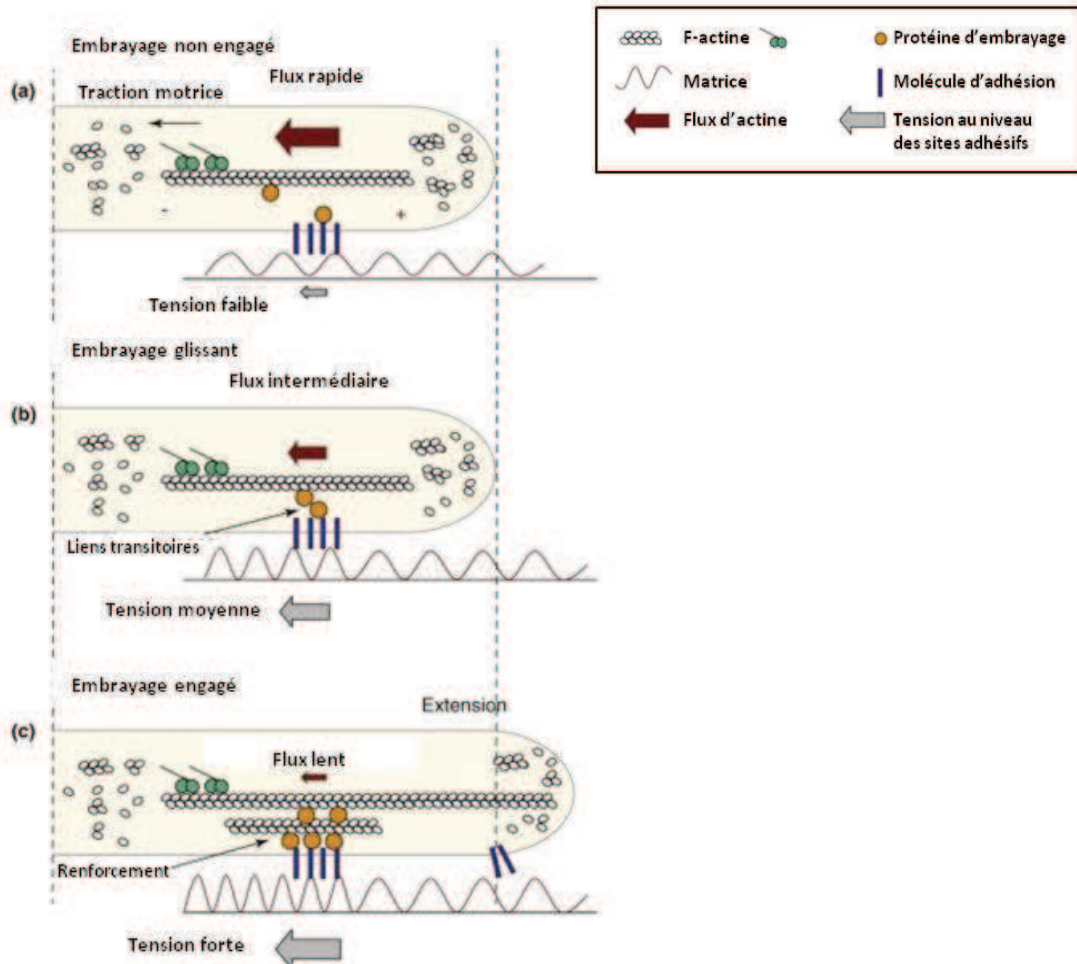


Figure 9 : L'embrayage moléculaire

Ce schéma représente les 3 états d'engagements de l'embrayage moléculaire.

(a) Un état non engagé avec un flux rapide dépendant des moteurs myosine et de la tension de la membrane.

(b) Un état glissant où le flux est ralenti transitoirement et modérément par des phases d'accroches aux adhésions.

(c) Puis l'état engagé où la réduction locale du flux d'actine est assez importante pour permettre l'extension membranaire

(D'après Giannone et al., 2009.)

4.2. Les protéines adaptatrices

Il existe deux modèles principaux d'embrayage moléculaire. Le premier fait intervenir les protéines d'adhésion intégrine pouvant lier la MEC, impliquées dans les protrusions lamellipodiales (cf. figure 10). Dans ce cas, les protéines adaptatrices les plus probables seraient la taline et la vinculine qui pourraient lier la queue cytoplasmique de l'intégrine aux

filaments d'actine (Jiang et al., 2003; Rio et al., 2009). En accord avec ce rôle, il a été montré que la vinculine lie l'actine à la taline et régule les forces dans les contacts focaux (Humphries et al., 2007). De plus le mouvement de la vinculine est partiellement couplé à celui de l'actine dans ces adhésions focales (Hu et al., 2007), et son extinction par siRNA augmente le flux rétrograde d'actine dans les cellules en étalement (Zhang et al., 2008). Cependant, bien que la vinculine soit capable de promouvoir et contrôler le renouvellement des adhésions focales, elle ne semble pas essentielle à la croissance de ces dernières (Thievensen et al., 2013).

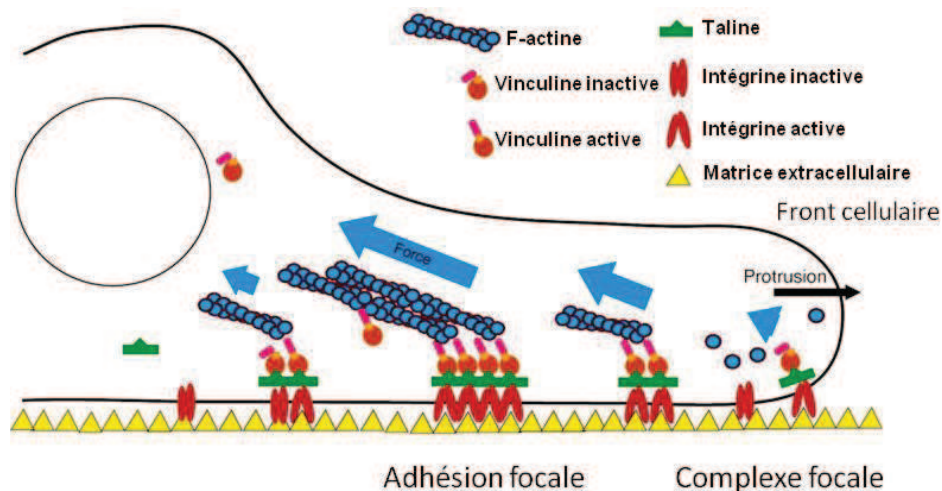


Figure 10 : Le modèle d'embrayage intégrine

Ce schéma représente un modèle d'embrayage dans lequel l'activation de la vinculine augmente son affinité pour la taline qui à son tour stabilise la version active de l'intégrine. La vinculine présente au niveau de ces complexes d'adhésion focale, ainsi élargit et stabilisé, permet l'extension membranaire via sa liaison à l'actine (D'après Humphries et al., 2007.)

Le second modèle fait intervenir les protéines d'adhésion de type cadhérines (cf. figure 11). L'utilisation de pinces optiques a permis de montrer que des billes recouvertes de N-cadhérine pouvaient se coupler au flux rétrograde d'actine. Le fait d'imposer une faible force provoque des glissements avec des bonds de la bille tel que décrit dans le modèle d'embrayage, et si l'on immobilise la bille, cela provoque une accumulation locale d'actine (Bard et al., 2008).

Différentes protéines ont été suspectées de jouer le rôle de molécules d'embrayage mais le mécanisme exact est toujours débattu. Les protéines les plus mises en avant sont l' α caténine et la vinculine. En effet, de nombreuses études ont montré que l' α -caténine pouvait

se lier non seulement à l'actine (Pokutta et al., 2002) mais aussi à des protéines liant directement l'actine comme la vinculine (Weiss et al., 1998). Il a aussi été montré que la réduction de l'expression de l' α -caténine par des Si-RNA réduisait à la fois le développement dendritique et le couplage du flux d'actine aux adhésions cadhérines (Bard et al., 2008). Renforçant ainsi l'idée que le complexe cadhérine/caténine jouait un rôle prédominant dans le modèle d'embrayage moléculaire.

La surexpression de mutants vinculine empêche la transmission de forces entre les adhésions intégrine-dépendantes et le cytosquelette d'actine (Humphries et al., 2007) ; et son absence supprime la contractilité cellulaire (Mierke et al., 2008). La vinculine apparaît donc comme un facteur essentiel à la mécanotransduction au niveau des adhésions intégrines, mais pas seulement. En effet, des études récentes montrent un rôle analogue de la vinculine au niveau de la mécanotransduction cadhérine dépendante dans les cellules épithéliales (le Duc et al., 2010; Twiss et al., 2012).

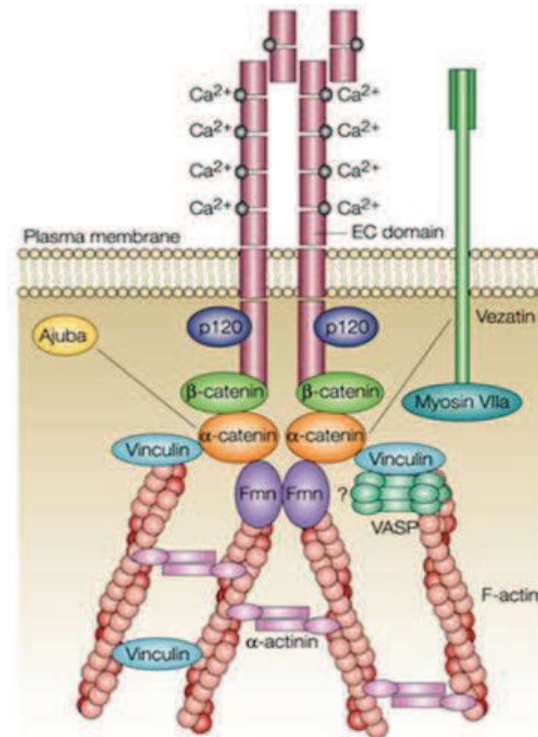


Figure 11 : Le modèle d'embrayage cadhérine

Ce schéma représente un modèle d'embrayage dans lequel la stabilisation des adhésions cadhérines permet leur couplage au cytosquelette d'actine via les caténines et la vinculine. Ce couplage permet la transmission de forces mécaniques régulant ainsi la dynamique du cytosquelette. (D'après Kobiak et Fuchs, 2004.)

4.3. L'évolution du modèle de couplage cadhérine/actine

Pendant de nombreuses années, il a été communément admis que l' α -caténine couplait physiquement à la fois le complexe cadhérine/ β -caténine et le cytosquelette d'actine dans un modèle quaternaire fixe. Aucune expérience n'avait cependant montré clairement que l' α -caténine pouvait lier simultanément ses deux partenaires. En 2005, l'équipe de Nelson a remis ce modèle statique en cause (Yamada et al., 2005; Drees et al., 2005). Pour cela, il a notamment effectué des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) sur les différentes protéines impliquées dans le modèle cadhérine /actine, et il a observé le demi temps de retour de fluorescence, reflétant le degré d'interaction entre les partenaires protéiques. Ils ont observés un temps de renouvellement beaucoup plus court pour l'actine, comparé à l' α -caténine, β -caténine ou la cadhérine. Ceci reflète le fait que les filaments d'actines ne sont pas associés de façon stable au complexe caténine/cadhérine. L'ensemble de ses expériences a permis d'établir un modèle beaucoup plus dynamique où l' α -caténine ne peut lier à la fois le complexe cadhérine/caténine et les filaments d'actine (cf. figure 12A). Il y aurait une transition moléculaire dynamique de cette protéine qui oscillerait entre les deux complexes. L' α -caténine peut exister sous forme d'homodimère ou de monomère. La forme dimérique de l' α -caténine aurait plus d'affinité pour l'actine, alors que la forme monomérique lierait préférentiellement le complexe cadhérine/ β -caténine. L'idée d'une liaison mutuellement exclusive et dictée par la forme oligomérique a été confirmée par une analyse structurale de l' α -caténine qui montre que la liaison de la β -caténine perturbe l'interaction N-ter/C-ter des deux sous unités α -caténine à l'origine de l'asymétrie et de l'intégrité du dimère α -caténine (Rangarajan et Izard, 2013).

Un deuxième point important avancé dans ce modèle de Nelson vient du fait que l' α -caténine liée à l'actine supprime l'activité nucléatrice d'Arp 2/3 de façon concentration-dépendante, agissant ainsi sur la polymérisation des filaments d'actine. Or, l'affinité de la β -caténine pour la cadhérine est beaucoup plus importante que celle de l' α -caténine pour la β -caténine (Huber et Weis, 2001; Pokutta et Weis, 2000). Il a donc été avancé que les cadhérines joueraient un rôle de « piège de diffusion », qui permettrait l'augmentation locale d'un compartiment diffusif d' α -caténine dont la concentration deviendrait alors assez importante pour pouvoir entrer en compétition avec Arp 2/3, et ainsi réguler le cytosquelette d'actine au niveau des zones d'adhésion cellulaire (Drees et al., 2005). En résumé, ce modèle présente l' α -caténine non plus comme un lien physique direct entre adhésion et cytosquelette mais comme régulateur allostérique.

Or en 2013, vient de paraître un papier remettant en cause ce récent modèle. Dans cette étude, il est démontré que l'association constitutive de l' α -caténine à la cadhérine n'avait pas d'effet négatif sur les fonctions biologiques de cette protéine (Desai et al., 2013). Ainsi

l'interaction dynamique entre α -caténine et le complexe β -caténine/cadhérine ne serait pas nécessaire pour la mise en place et le fonctionnement des jonctions adhérentes. L'utilisation de divers mutants a aussi permis de montrer que le complexe cadhérine ne fait pas que recruter l' α -caténine au niveau des jonctions adhérentes, il a besoin de maintenir un couplage physique constant pour assurer le bon fonctionnement de ces complexes adhésifs(cf figure 11B).

Ainsi bien que l' α -caténine semble jouer un rôle prépondérant dans le couplage de l'actine aux adhésions cadhérines-dépendantes, les transitions moléculaires mises en jeu restent discutées. De même l'intervention ou non d'autres protéines modulatrices telles que la vinculine n'est pas exclue et reste à déterminer.

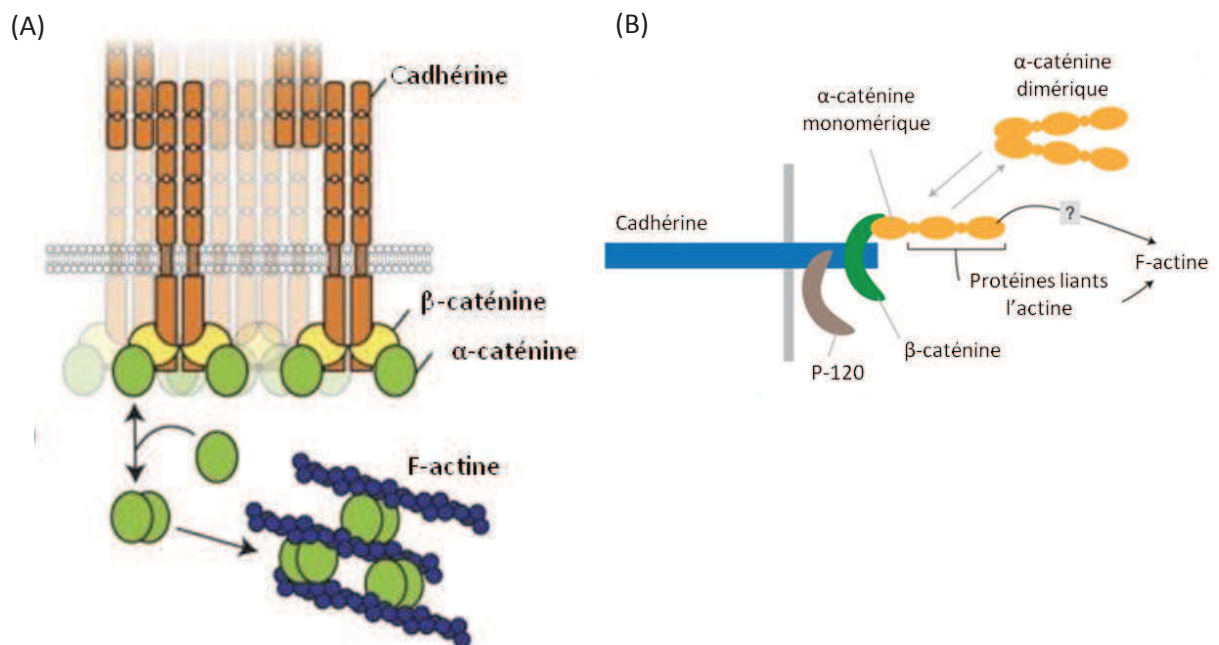


Figure 12 : Différents modèles de couplage cadhérine/actine

(A) Dans ce modèle, l' α -caténine oscille entre une forme monomérique, liée à la cadhérine, et une forme dimérique, liée à l'actine. D'après Drees, 2005.

(B) Dans ce modèle, l' α -caténine est plus stable ; la forme monomérique lie la cadhérine à l'actine directement, ou via des protéines associées.

(D'après Desai et al., 2013.)

II- Les différentes structures et fonctions neuronales

1. Le cône de croissance

Le cône de croissance est une structure motile située à l'extrémité de l'axone en développement. Il navigue dans l'environnement extracellulaire, guidé par des gradients de molécules chimiques qui agissent en attirant ou en repoussant le cône. Ces signaux dirigent l'axone jusqu'à une cellule cible avec laquelle il va pouvoir former des contacts synaptiques. La motilité du cône de croissance est assurée par son cytosquelette d'actine.

1.1 Structure du cône

De nombreuses études visant à comprendre l'organisation ou la fonction des cônes de croissance utilisent comme modèle expérimentale l'Aplysie, un organisme multi-cellulaire avec un système nerveux simple et qui a l'avantage d'avoir des cônes de croissance volumineux (jusqu'à 630µm) et facilement accessibles (Lovell and Moroz, 2006). Ces études ont mis en évidence une organisation en 3 domaines du cytosquelette du cône de croissance (cf. figure 13) (Suter et Forscher, 1998). Tout d'abord le domaine central (C), situé le plus proche de l'axone, qui contient les microtubules. Ensuite un domaine intermédiaire dit de transition (T) composé de myosine II ainsi que de faisceaux antiparallèles d'actine, perpendiculaire aux microtubules, constituant une structure appelée arcs d'actine. Puis un domaine périphérique (P) contenant de l'actine organisé en fibres dit filopodes séparé par une structure en voile de réseaux d'actine denses nommés lamellipodes (Grzywa et al., 2006; Korobova et Svitkina, 2008).

Les filopodes constituent la structure dominante du cône de croissance. Ce sont des faisceaux organisés d'actine ressemblant à des doigts qui s'allongent puis se rétractent de façon rythmique afin de sonder l'environnement, et ainsi jouer un rôle dans le guidage axonal. Ces mouvements caractéristiques permettent aussi, via la liaison à des molécules d'adhésion cellulaire, de propulser en avant le cône et permettant ainsi la croissance axonal.

Entre chaque « doigt » formé par les filopodes se trouve un réseau dense d'actine branché appelé lamellipode. Cette structure, tout comme les filopodes, permet l'exploration de l'environnement chimique autour du cône et de diriger celui-ci. L'actine en arc quant à elle permet d'exercer une force de compression sur les microtubules contenus dans le domaine C, cette contraction est essentielle à l'avancée du cône de croissance (Rodriguez et al.,

2003). Il y a une interdépendance entre actine et microtubules. En effet, si on inhibe l'actine, les microtubules envahissent le domaine P, ce qui montre que la dynamique de l'actine affecte l'organisation des microtubules en les confinant dans la région centrale (Forscher et Smith, 1988). Cependant certains microtubules peuvent pénétrer la région P, se développant préférentiellement le long des filopodes avec lesquels ils sont en interaction (Schaefer et al., 2002). Ces interactions entre filaments d'actine et microtubules semblent jouer un rôle important dans la protrusion des lamellipodes mais aussi dans l'orientation du cône de croissance (Buck et Zheng, 2002).

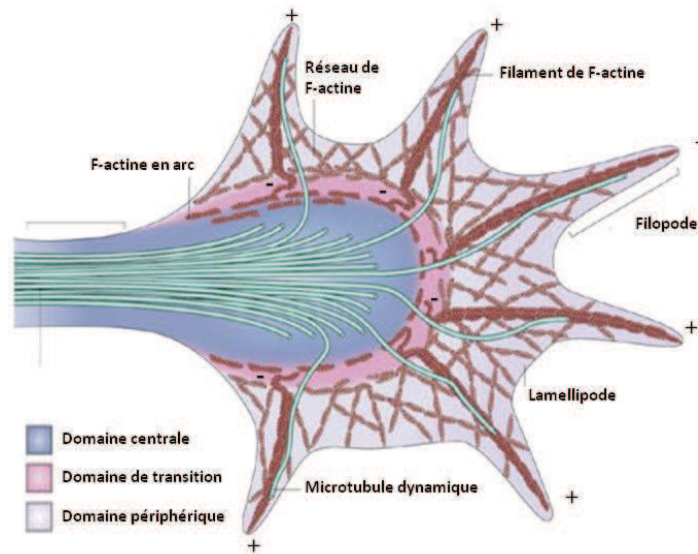


Figure 13 : Structure du cône de croissance

Le cytosquelette du cône de croissance définit sa forme. La zone périphérique est constituée de filaments organisés et polarisés de F-actine (filopodes) séparés par une structure d'actine en voile (lamellipode). La région intermédiaire contient l'actine en arc. La région périphérique contient les microtubules, mitochondries et différents organelles.
(D'après Lowery et Vactor, 2009.)

1.2 Rôle de l'actine dans la motilité et la mobilité du cône de croissance

La motilité du cône de croissance est assurée par un cytosquelette d'actine extrêmement dynamique. Les monomères G-actine s'assemblent en filaments à proximité de la membrane, dans la partie distale du domaine P. Ensuite ils fluent de façon rétrograde jusqu'au domaine T sous forme polymérique de F-actine, et à ce niveau dépolymérisent. L'activité de la myosine II présente au niveau du domaine T participe à la dépolymérisation en provoquant une compression, une flexion voire une rupture des fibres de F-actine provenant du domaine P (Medeiros et al., 2006; Burnette et al., 2008).

Ce flux rétrograde a lieu à la fois dans les filopodes et dans les lamellipodes (Lin et Forscher, 1993). Il permet de fournir la force nécessaire à l'avancée du cône. Des études sur la motilité du cône ont montré que la vitesse d'avancée du cône de croissance était directement corrélée avec la taille et la dynamique des lamellipodes et du filopode (Argiro et al., 1985). Ceci est possible car la motilité du flux va se coupler localement et temporellement aux adhésions grâce au mécanisme d'embrayage moléculaire expliqué précédemment. La liaison temporaire de molécules d'adhésion, présentes au niveau de la membrane, au substrat va former un complexe de liaison transitoire avec l'actine. La force générée par le flux d'actine va être transférée à la membrane, faisant progresser le cône vers l'avant.

L'actine peut interagir avec les microtubules à deux niveaux, dans le domaine T pour l'actine en arc, et dans le domaine P pour l'actine filopodial (Schaefer et al., 2002). Ces interactions vont permettre le guidage spatiotemporel des microtubules, et donc par la même le guidage du cône.

Lors de la croissance axonale, différents signaux moléculaires (ex : netrine, ephrine, semaphorine, neurotrophine, slits) vont guider l'axone pour lui permettre d'atteindre sa cellule cible (Lin et Holt, 2007). La présence de récepteurs spécifiques situés au niveau de ses prolongements permet au cône de croissance de sonder son environnement extracellulaire et détecter ces signaux qui correspondent à des gradients de molécules attractrices ou répulsives (Tessier-Lavigne and Placzek, 1991). Les réponses directionnelles du cône aux signaux de guidage requièrent une synthèse protéique locale (Campbell et Holt, 2001). Cette synthèse locale permettrait une augmentation rapide et localisée de protéines pouvant se lier à l'actine, réguler le cytosquelette et ainsi orienter le cône (Campbell et Holt, 2001).

Ainsi, le cytosquelette d'actine permet à la fois au cône de croissance de progresser vers ses cellules cibles mais aussi de tourner afin de s'orienter dans la bonne direction.

1.3 Rôle de la N-cadhérine dans la croissance neuritique et axonale

Dans un premier temps, des études in vitro ont montré que lorsque des neurones étaient cultivés sur des cellules non neuronales exprimant la N-cadhérine ou bien sur des substrats recouverts avec le domaine extra-cellulaire de la N-cadhérine, alors la croissance neuritique était augmentée (Matsunaga et al., 1988, Bixby et Zhang, 1990). A l'inverse, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la N-cadhérine inhibe la croissance neuritique (Tomaselli et al., 1988).

Les études in vivo sont plus compliquées car la mutation de la protéine N-cadhérine perturbe le bon développement de la plaque neurale et provoque la mort des animaux à des

stades précoces de développement (Radice et al., 1997; Lele et al., 2002). Cependant des études sur le poisson zèbre avec une mutation légère sur les allèles N-cadhérine ont montré que les projections axonales des cellules ganglionnaire de la rétine ainsi que la croissance neuritique des cellules amacrines étaient affectées (Masai et al., 2003). De nombreuses études ont utilisé des mutants N-cadhérines dominants négatifs dans lesquels la partie extracellulaire est tronquée. La surexpression de ces molécules désorganise le complexe cadhérine/ caténine en rentrant en compétition avec la N-cadhérine endogène pour la liaison à l'actine via les caténines (Nieman et al., 1999), et perturbe la voie de signalisation de la β -caténine (Zhang et al., 2013). Ce mutant empêche l'initiation ainsi que l'élongation des axones et dendrites (Riehl et al., 1996).

Deux mécanismes moléculaires majeurs ont été mis en évidence afin d'expliquer l'effet stimulateur de la N-cadhérine sur la croissance neuritique. L'un d'eux fait intervenir une voie de signalisation impliquant les récepteurs FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Williams et al., 2001), et l'autre fait intervenir l'embrayage moléculaire expliqué précédemment.

Dans le premier mécanisme, les FGF sont des protéines solubles impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire (cf. figure 14). Initialement, des travaux ont montré qu'un anticorps bloquant les récepteurs FGF (FGFR) inhibait la croissance neuritique induite par les CAM (*Cell Adhesion Molecule*) dont la N-cadhérine (Williams et al., 1994). Des expériences plus récentes ont précisé un peu plus les mécanismes de cette voie de signalisation alternative. Le récepteur FGF1 et la N-cadhérine interagiraient via leurs domaines extracellulaires, ce qui déclencherait une cascade de second messager contrôlant la croissance neuritique (Boscher and Mège, 2008).

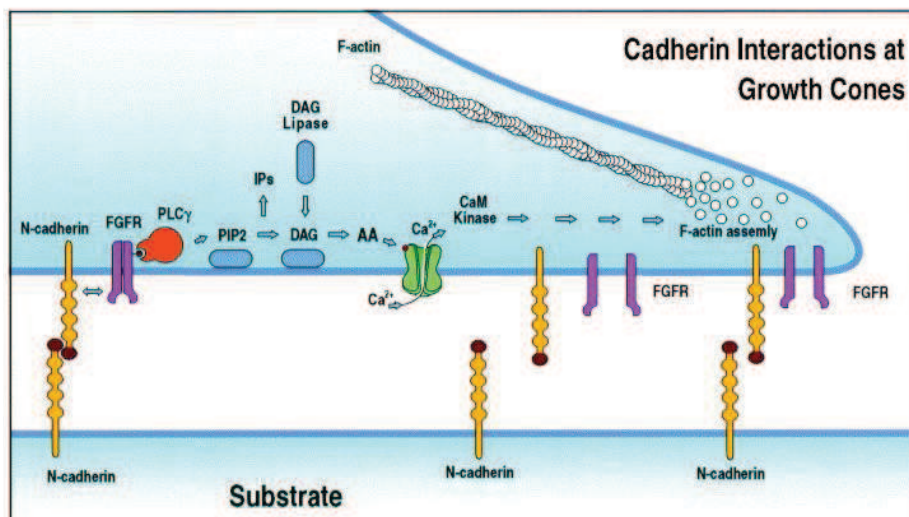


Figure 14 : Mécanisme de croissance dendritique via N-cadhérine et FGFR

La N-cadhérine active une cascade de seconds messagers intracellulaires via les récepteurs FGF. La transduction de tels signaux influence la croissance neuritique en agissant sur le cytosquelette d'actine. (D'après Ranscht, 2000.)

Dans le deuxième modèle, l'embrayage moléculaire conduit à une avancée du cône de croissance (cf. figure 9). Ceci a été particulièrement bien décrit grâce à un modèle simple, l'Aplysie. Des billes recouvertes de protéines d'adhésions ApCam (homologue des N-CAMs) placées sur le cône de croissance d'Aplysie se couplent au flux d'actine. Dans ce cas, l'absence de résistance fait que les billes se déplacent à la vitesse du flux. Cependant si l'on applique une force en restreignant la bille via une micro aiguille, alors on observe un ralentissement du flux dû à l'engagement de l'embrayage. Ceci conduit à l'avancée du cône de croissance qui est proportionnelle au ralentissement du flux d'actine et s'accompagne d'un renforcement des contacts adhésifs via le recrutement d'actine (Lin et Forscher, 1995, (Suter et Forscher, 1998).

En étalant des neurones sur des substrats recouverts de façon homogène par de la cadhérine purifiée, une étude montre que le nombre de neurites, leur longueur ainsi que la longueur de l'axone augmentent avec la densité de N-cadhérine. Et si l'on perturbe l'expression de l' α -caténine par des siRNA, ce type d'effet est réduit, illustrant ainsi un lien entre embrayage et extension neuritique (Bard et al., 2008).

Il a été suggéré que ce mécanisme d'embrayage pouvait aussi jouer un rôle déterminant à des stades plus avancés du développement du système nerveux, dans la stabilisation des filopodes dendritiques et la plasticité morphologique (Giannone et al., 2009).

2.Le Filopode dendritique

Lors du développement neuronal, le corps cellulaire émet une arborescence de prolongements appelés dendrites. Sur ces derniers apparaissent des prolongements longs, fins et sans tête, appelés filopodes. Même s'ils portent le même nom, ces filopodes sont très différents en termes de structure et de motilité par rapport au filopodes des cônes de croissance (Portera-Cailliau et al., 2003). En 1996, Ziv et Smith ont émis l'hypothèse que les filopodes seraient des précurseurs développementaux des épines dendritiques (Ziv et Smith, 1996). Ils ont observé une corrélation entre la baisse du nombre de filopodes au cours du développement, et l'apparition d'épines dendritiques. De plus, cette étude a mis en évidence l'initiation de contacts physiques entre les filopodes et l'axone, aboutissant dans certains cas à l'initiation des présynapses fonctionnelles. Quelques années plus tard, une autre étude est venue nuancer ces propos montrant que certaines synapses pouvaient se former directement entre dendrites et axones sans filopodes (Gerrow et al., 2006).

Les contacts des filopodes dendritiques avec les axones de type GABA sont majoritairement transitoires et ne peuvent pas se stabiliser. Ainsi, les filopodes dendritiques

permettent la formation de synapses glutamatergiques excitatrices ; les synapses inhibitrices nécessitant un contact intime direct entre dendrite et axone (Wierenga et al., 2008).

2.1 Structure et dynamique de l'actine dans le filopode dendritique

Les filopodes ont une structure très dynamique, propriété importante lors du développement où des connexions synaptiques doivent être établies rapidement (Dailey et Smith, 1996). Cette dynamique est soutenue par le cytosquelette d'actine (Portera-Cailliau et al., 2003) et leur permet de sonder l'environnement afin de pouvoir initier des contacts avec un partenaire particulier, l'axone. Les filopodes s'allongent et se rétractent via des mécanismes de polymérisation et dépolymérisation de l'actine (Hotulainen et al., 2009b). Ainsi les filopodes émettent de façon répétée des contacts transitoires avec les axones, et selon la présence ou non de signaux spécifiques, certaines de ces interactions vont aboutir à une stabilisation plus durable et former des épines synaptiques (cf. figure 15) (Sekino et al., 2007). La stabilisation en épines dendritiques passe par une réorganisation du cytosquelette d'actine. Ainsi, il existe deux types de filopodes dendritiques dans les neurones au cours du développement : un type immature assez diffus, et un type mature présent en amas qui aboutirait à la formation d'épines. La transition de l'un à l'autre se ferait par le recrutement de la protéine Débrine qui agirait directement sur la morphologie du cytosquelette, en remodelant le réseau d'actine, permettant ainsi une étape de maturation intermédiaire importante pour le recrutement de la protéine d'échafaudage PSD-95 et donc pour la formation de post-synapses excitatrices (Takahashi et al., 2003). La réorganisation de faisceaux d'actine droits en paquets épais et sinueux passerait aussi par d'autres protéines intermédiaires car la Débrine peut recruter et concentrer différentes protéines jouant un rôle sur l'actine (Sekino et al., 2007). Tout ce qui perturbe la dynamique de l'actine perturbe aussi la formation des épines et également la transmission synaptique. Ainsi des protéines tel que la profiline ou Arp 2/3, pouvant lier l'actine et jouer sur la polymérisation/dépolymérisation sont critiques dans les étapes de stabilisation. Et inversement, l'activité synaptique peut contrôler la dynamique de l'actine (Fischer et al., 2000) et donc influencer la stabilisation des filopodes dendritiques (Maletic-Savatic et al., 1999).

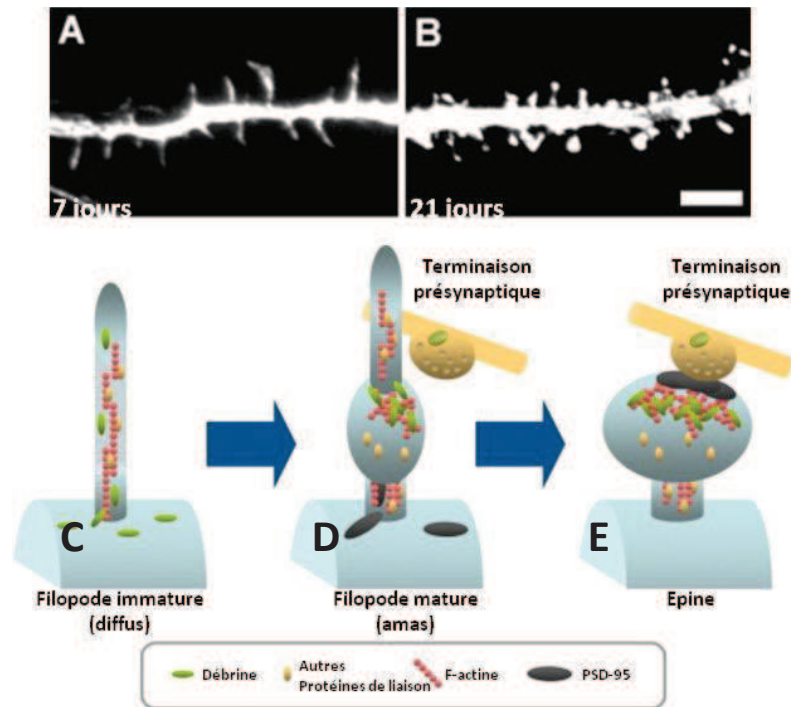


Figure 15 : Réorganisation de l'actine dans la transition filopode/épine

La stabilisation du filopode (A, C) en épine dendritique (B, E) se fait par une réorganisation du cytosquelette d'actine. Cette réorganisation se fait grâce au recrutement de la débrine qui va s'amasser avec l'actine lors de l'engagement de contacts entre dendrites et axones (D). Ceci est suivi par le recrutement de la protéine d'échafaudage PSD-95 permettant la maturation en épine dendritique. (D'après Sekino et al., 2007).

Ainsi, la motilité dépendante du réseau d'actine semble jouer un rôle critique dans la formation d'épines. Ceci a d'ailleurs été confirmé en montrant que l'élimination du récepteur tyrosine-kinase EphB, qui a pour conséquence la baisse de la motilité des filopodes sans affecter celle des épines, accélérerait la synaptogenèse dans les stades précoces de développement (Kayser et al., 2008). Or nous avons vu précédemment que la N-cadhérine jouait un rôle prédominant dans la dynamique de l'actine au niveau du cône de croissance axonal. Qu'en est-il donc au niveau des filopodes et épines dendrites sachant l'importance de la N-cadhérine sur la régulation de la dynamique de l'actine ?

2.2 Rôle du complexe cadhérine/caténine dans la synaptogenèse

Lors de la synaptogenèse, l'exploration et la reconnaissance de partenaires synaptiques par le filopode mène à sa stabilisation via la formation de complexes adhésifs. L'initiation de contacts entre filopode et axone est permise grâce au recrutement de

protéines d'adhésions transmembranaires. Parmi ces protéines, la neuroligine, la neurexine ainsi que SynCam ont la particularité de pouvoir induire à elles seules la formation de synapses actives (Biederer et al., 2002 ; Dean et al., 2003; Scheiffele et al., 2000). Contrairement à ces protéines la N-cadhérine n'a pas de fonction synaptogène proprement dite (Scheiffele et al., 2000 ; Nam et Chen, 2005 ; Sara et al., 2005). Malgré cela, cette protéine est essentielle à l'intégrité synaptique et joue un rôle important à la fois dans l'initiation, la stabilisation mais aussi dans le maintien de l'épine synaptique.

La combinaison de différentes études met en avant que les propriétés adhésives des cadhérines permettent la formation ainsi que la stabilisation transitoire de contacts lors d'étapes précoces de la synaptogenèse. Ceci est mis en évidence tout d'abord par le fait que l'expression de mutants dominants négatifs de N-cadhérine induit une réduction du nombre de synapses excitatrices et altère l'organisation pré-synaptique (Togashi et al., 2002). Mais aussi l'utilisation d'anticorps dirigés contre la N-cadherine a montré une perturbation du ciblage des axones (Poskanzer et al., 2003). Des travaux récents ont tenté de préciser ce rôle précoce de la N-cadhérine et ont montré en culture l'importance d'une forme immature de la N-cadhérine, un précurseur (proN) possédant un pro domaine le rendant adhésivement inactif. Un fort ratio ProN/Ncadhérine serait requis lors du développement pour permettre le ciblage et l'activité exploratoire des filopodes dendritiques, puis l'équilibre s'inverserait pour favoriser la stabilisation du filopode et l'initiation de la synapse (Reinés et al., 2012). Ainsi la ProN régulerait de façon négative et intrinsèque la synaptogenèse.

Lors des contacts initiaux expliqués précédemment, la N-cadhérine se localise de façon diffuse entre les filopodes dendritiques et les axones, puis au fur et à mesure du développement elle se réorganise en amas et permet la stabilisation des synapses, et donc la formation d'épines synaptiques matures (Elste et Benson, 2006). Ainsi, juste après l'engagement transmembranaire survient la stabilisation structurale des sites de contact.

La stabilisation se fait via l'interaction directe entre N-cadhérine et α -caténine, formant un couplage fonctionnel entre adhésion transmembranaire et cytosquelette d'actine. N-cadhérine et β -caténine sont distribuées de façon diffuse dans le filopode dendritique avant que celui-ci ne rencontre l'axone, puis ils se réorganisent et s'accumulent au niveau de la zone de contact entre les deux partenaires (Togashi et al., 2002). La perturbation de ces protéines aboutit à des synapses morphologiquement anormales. L'expression de mutants de la N-cadhérine tronquée dans sa partie extracellulaire, induit la formation d'épines dendritiques motiles d'aspect filopodial ainsi qu'une déformation de la tête de l'épine (Togashi et al., 2002). Un effet similaire est retrouvé sur des neurones hippocampiques déficients pour l' α -N-caténine où apparaissent des protrusions motiles ressemblant à des filopodes émergents de la tête des épines, avec une stabilité réduite. A l'inverse, la surexpression de cette protéine augmente la stabilité des épines, leur densité ainsi que la

taille de leurs têtes (cf. figure 16) (Abe et al., 2004). La surexpression de la β -caténine induite à DIV 10-12 montre elle aussi un effet sur la densité des filopodes dendritiques ainsi que des épines (Yu et Malenka, 2004).

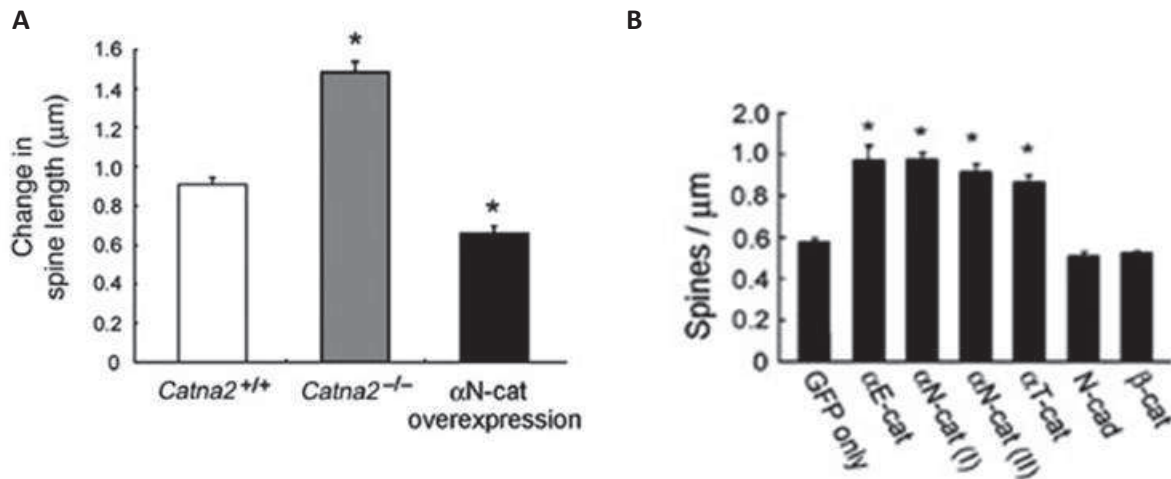


Figure 16 : Implication de l' α -caténine dans la synaptogenèse

(A) Les neurones issues de souris mutante n'exprimant pas l' α -N-caténine (*Catna2*^{-/-}) ont des épines moins motiles que ceux issus de souris sauvages (*Catna2*^{+/+}). Cet effet est supprimé si l'on surexprime l' α -N-caténine chez ces souris mutantes.

(B) La surexpression des différents sous-types d' α -caténine sur les souris *Catna2*^{+/+} augmente la densité des épines excitatrices alors que celle de la N-cadhérine ou la β -caténine n'ont aucun effet à ce niveau.

(D'après Abe et al., 2004.)

Ces expériences suggèrent que lorsqu'on est dans un système où le filopode fonctionne comme un précurseur des épines, la cadhérine instruit les contacts initiaux de façon spécifique entre filopodes dendritiques et axones. Ensuite, en coopération avec les caténines elle inhibe le comportement exploratoire du filopode, ce qui verrouille le contact synaptique et permet sa maturation via le maintien de la structure et de l'organisation des synapses. Malgré tout, l'ensemble de ces études n'identifie pas clairement le rôle de la connexion mécanique entre N-cadhérine et actine dans la transition du filopode à épine. L'article 2 va ainsi tenter d'expliquer comment la dynamique de l'actine, ralentie mécaniquement par l'engagement d'adhésions homophiles N-cadhérine, pourrait engendrer des extensions à l'origine du remodelage de l'extrémité du filopode dendritique en une épine plus stable.

3. La Synapse

La synapse est une structure complexe qui permet à un neurone de communiquer avec une autre cellule (neuronale ou non). Le trafic d'information en fait des structures plastiques, dans le sens où elles sont fortement influencées par leur propre histoire correspondant à la circulation d'impulsions et de différents signaux transmis entre cellules avoisinantes. Les contacts synaptiques sont fondamentaux dans le développement, l'homéostasie ainsi que le remodelage des circuits neuronaux. La transmission d'information peut se faire via deux types de messagers : chimique et électrique. Sachant que la majorité des synapses rencontrées dans le système nerveux central des vertébrés sont de type chimique, nous nous concentrerons sur ces dernières.

3.1 Structure de la synapse

D'après l'observation faite par Edward Gray en microscopie électronique, les synapses chimiques peuvent être divisées en deux groupes : celles de type un dites excitatrices, et celles de type deux dites inhibitrices (Gray, 1959). Colonnier quant à lui sépare les synapses asymétriques et les synapses symétriques (respectivement type 1 et 2) d'après l'observation de la densité post-synaptique (Colonnier, 1968). La synapse symétrique présente une densité d'égale épaisseur entre les éléments pré- et post-synaptiques ; alors que la synapse asymétrique présente une densité plus épaisse en post synaptique. Les synapses de type 1 soutiennent les transmissions excitatrices, alors que celles de type 2 sont inhibitrices (Uchinozo, 1965).

La transmission d'information entre synapses se fait par l'arrivée d'un potentiel d'action qui provoque l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendant avec une entrée de calcium dans la structure présynaptique appelé bouton (Lisman et al., 2007). Ceci induit la fusion de vésicules synaptiques avec la membrane plasmique de cette terminaison axonale provoquant la libération de neurotransmetteur dans la fente synaptique. Ces neurotransmetteurs peuvent se fixer sur des récepteurs spécifiques présents sur la membrane de l'élément post synaptique, induire une dépolarisation et permettre ainsi la transmission du signal chimique (Lisman et al., 2007).

Les synapses excitatrices utilisent le glutamate comme neurotransmetteur et sont généralement présentes au niveau d'épines dendritiques. Ces épines correspondent à des filopodes stabilisés dont le cytosquelette s'est réorganisé. Elles possèdent différents types de récepteurs du glutamate, des récepteurs métabotropiques mGluR (Metabotropic Glutamate Receptor), et des récepteurs ionotropiques différenciés par leurs ligands

pharmacologiques : AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique), NMDA (N-méthyl -D-aspartate) et Kainate. Sous la membrane de ces épines se trouve l'élément dense observé par Colonnier, la densité post synaptique (PSD). Cette PSD correspond à un complexe macromoléculaire protéique, apposé à la pré-synapse active, contenant les récepteurs ainsi que les protéines d'échafaudage associées, dont PSD-95, Homer et Shank. Cet ensemble de récepteurs et de protéines associées sont impliqués dans la signalisation ainsi que dans la plasticité synaptique (Fleming et England, 2010; Kasai et al., 2003).

Cette plasticité correspond à la capacité d'une synapse à se renforcer ou se déstabiliser au cours du temps en fonction de la variation de son activité, jouant ainsi un rôle prépondérant dans la mémoire et l'apprentissage. L'augmentation durable de la force synaptique est appelée potentialisation à long terme ou LTP (Long Term Potentiation). La diminution durable est appelée dépression à long terme ou LTD (Long Term Depression). L'induction de cette plasticité est calcium-dépendante (Sabatini et al., 2001). Elle se traduit par des changements fonctionnels, associés notamment au recyclage des récepteurs, mais aussi morphologiques, avec des changements au niveau de la motilité ainsi que de la taille de l'épine (Buchs et Muller, 1996; Matsuzaki et al., 2004). Au centre de ces deux aspects, se trouve l'actine (Shirao et González-Billault, 2013).

3.2 Le cytosquelette d'actine, structure et fonction dans la plasticité de l'épine dendritique

L'épine contient un réservoir d'actine monomérique soluble, G-actine, et des filaments polymérisés, F-actine (Halpain et al., 2000; Penzes et Rafalovich, 2012). La forme filamenteuse est particulièrement enrichie dans les épines dendritiques et leur confère la capacité de changer de forme rapidement (Fischer et al., 1998). La F-actine contient deux compartiments distincts, un compartiment stable avec un taux de renouvellement de l'ordre de la vingtaine de minutes, et un plus dynamique qui se renouvelle toutes les minutes (Honkura et al., 2008). Selon cette même étude, le réservoir dynamique constitue le réservoir dominant (80-90%), cependant le réservoir stable augmente avec l'élargissement de la tête de l'épine. La F-actine forme de longs faisceaux non branchés, organisés longitudinalement dans le cou de l'épine. Elle forme aussi des réseaux branchés de petits filaments au niveau de la tête et du cou (Korobova et Svitkina, 2010). Les modifications au niveau de la tête de l'épine sont liées à l'alternance de polymérisation et dépolymérisation de l'actine (Star et al., 2002). Ce renouvellement permanent des filaments d'actine au niveau des épines dendritiques fait intervenir le phénomène de tapis roulant développé précédemment, avec la polymérisation au niveau des bouts barbés orientés vers la surface

de l'épine ; et la dépolymérisation au bout pointu (Honkura et al., 2008). L'activité synaptique contrôle la dynamique de l'actine (Fischer et al., 2000). L'utilisation d'agents pharmacologiques (Latrunculine A, Cytochalasin D) bloquant la dynamique de l'actine a pour conséquence d'augmenter légèrement la LTD (Chen et al., 2004) et de bloquer la LTP (Kim and Lisman, 1999; Krucker et al., 2000). Ainsi, les forces générées par la polymérisation de l'actine semblent indispensables pour le grossissement des épines lors de la LTP et pour le maintien de cette plasticité (Kim and Lisman, 1999; Krucker et al., 2000; Fukazawa et al., 2003; Lin et al., 2005). A l'inverse de la LTP, la LTD provoque la dépolymérisation de l'actine, une élongation des épines ainsi qu'un rétrécissement de la tête des épines (Chen et al., 2004; Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004).

Ainsi, les protéines interagissant avec l'actine (ABPs pour Actin Binding Proteins) et influençant sa polymérisation ou sa dépolymérisation ont un impact sur la plasticité synaptique ; il s'agit entre autres de la cofiline (Meng et al., 2002; Fukazawa et al., 2003), de la cortactine (Hering et Sheng, 2003; Iki et al., 2005), de la profiline (Ackermann et Matus, 2003), et de l' α -actinine (Nakagawa et al., 2004). De même, deux cascades de signalisation majeures ont été définies comme pouvant agir sur ces ABPs, ainsi que sur l'influence qu'elles ont sur l'actine, et donc sur la motilité et le maintien des épines. La première fait intervenir des petites GTPases de la famille des Rho tels que Rac1, RhoA et Cdc42 et la seconde correspond aux changements de concentration en calcium intracellulaire (Hall et al., 1994 ; Ethell et Pasquale, 2005; Tada et Sheng, 2006).

3.3 Rôle des N-cadhérines dans la plasticité synaptique

Les adhésions cadhérines jouent un rôle prépondérant dans la stabilisation de contacts précoces entre éléments pré- et post-synaptiques des synapses excitatrices et inhibitrices (Benson et Tanaka, 1998). Cependant, au cours du développement, la N-cadhérine n'est conservée que dans les synapses excitatrices (Benson et Tanaka, 1998). Il reste donc à définir l'implication de ces protéines dans la maturation des synapses excitatrices.

L'inhibition de la N-cadhérine par des anticorps perturbe une phase tardive de la LTP sans affecter la transmission synaptique basale (Tang et al., 1998; Bozdagi et al., 2000). De plus, l'induction de la LTP provoque une augmentation de la synthèse et de la dimérisation de la N-cadhérine (Bozdagi et al., 2000). Cependant, le blocage de la N-cadhérine par des anticorps ne perturbe pas l'induction de la LTP dans cette même étude, mais affecte plutôt son maintien. Il y aurait donc un lien entre expression de la N-cadhérine et persistance synaptique.

Il a en effet été montré que l'activation des récepteurs NMDA réduisait l'endocytose de la N-cadhérine et la stabilisait à la membrane (Tai et al., 2007). Et l'augmentation des niveaux de N-cadhérine dans les épines permettrait la création de nouveaux contacts adhésifs lors de l'élargissement de l'épine. Une activité synaptique accrue concentre la β -caténine dans les épines où son association avec la N-cadhérine peut ainsi augmenter et influencer la taille de la synapse (Murase et al., 2002).

L'utilisation de mutants et de ShRNA dirigés contre la N-cadhérine a permis de montrer que cette protéine pouvait contrôler l'expression de PSD-95 ainsi que l'organisation de la PSD, régulant ainsi la taille des épines, paramètre corrélé à la stabilité des synapses (Mendez et al., 2010). D'autre part, la délétion du gène N-cadhérine au niveau des synapses matures empêche l'induction de la LTP, l'élargissement des épines associé à la LTP et perturbe la stabilité des épines (cf. figure 17) (Bozdagi et al., 2010; Mendez et al., 2010).

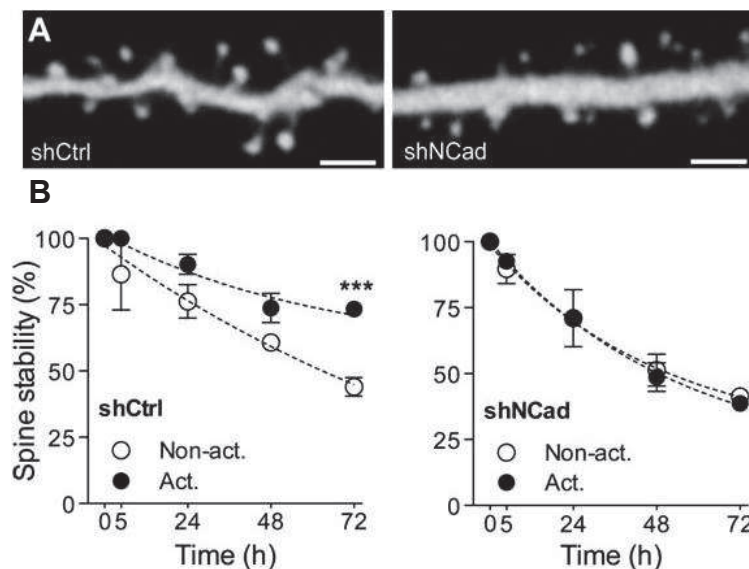


Figure 17 : Effet de l'extinction du gène codant pour N-cadhérine sur la plasticité synaptique

(A) Les épines des neurones qui expriment un ShRNA diminuant l'expression de la N-cadhérine (ShNCad) ont des épines plus petites que les contrôles (ShCtrl). (B) De plus, ces épines mutantes sont incapables de se stabiliser suite à l'induction de LTP contrairement aux contrôles.

(D'après Mendez et al., 2010.)

Il a été récemment montré que le domaine extracellulaire de la N-cadhérine pouvait interagir directement avec le domaine N-terminal (NTD) de la sous unité GluA2 des récepteurs AMPA qui sont impliqués dans la transmission synaptique des synapses excitatrices (Saglietti et al., 2007). Or quelques années plus tôt, il avait été observé que la surexpression de GluA2 augmentait la taille ainsi que la densité des épines ; et que cet effet

était dépendant de son domaine N-terminale (Passafaro et al., 2003). Ceci a aboutit à une étude récente essayant de préciser le mécanisme liant N-cadhérine, récepteur AMPA, et plasticité synaptique (Zhou et al., 2011). En utilisant diverses mutations sur le domaine NTD de GluA2 et des peptides inhibiteurs, ces auteurs ont montré que l'intégrité de l'interaction entre GluA2 et la N-cadhérine ainsi que celle du complexe cadhérine/caténine étaient critiques pour l'induction de la LTD dépendante des mGluR (Zhou et al., 2011). Ce contrôle de la LTD passerait par un remodelage de l'actine induit par l'activation de Rac1/Cofilin.

Il semblerait donc que l'activité synaptique module la distribution des cadhérines et caténines qui en retour agiraient sur la fonction ainsi que sur le remodelage de la synapse permettant son maintien à plus ou moins long terme.

ANNEXE METHODES

ANNEXE METHODES

I- Substrats micro-structurés permettant la culture neuronale

Depuis les années 1970, différentes techniques se sont développées afin de permettre la culture de cellules vivantes sur des substrats avec des micro-motifs. Parmi ces techniques, on retrouve l'impression par microcontacts (Alom Ruiz et Chen, 2007), la micro-lithographie utilisant les UV (Azioune et al., 2010), ou encore la micro-photo-impression utilisant la photo-ablation laser (Doyle, 2010). Chaque méthode présente ses avantages et inconvénients, le choix de l'une ou l'autre dépend des applications envisagées.

Les substrats sur lesquels nous travaillons ont été produits via la technique de micro-lithographie. Le principe est simple: on utilise des lamelles de verre recouvertes d'une fine couche de PLL-PEG (Poly-L-lysine-Polyéthylène-Glycol), composé cytophobe, sur lesquelles on appose directement en contact intime un masque de chrome avec les motifs désirés. L'ensemble est exposé à des UV (180nm), ce qui aura pour conséquence d'activer les zones non couvertes par le masque. Les lamelles de verre ainsi activées sont ensuite traitées avec de la PLL diluée à 40 µg/ml dans l'eau, qui sera alors adsorbée sur les zones hydrophiles.

Nous obtenons un substrat micro-décoré avec des zones adhésives délimitées dans un environnement cytophobe sur lequel la cellule ne peut pas adhérer, contraignant ainsi les possibilités d'extension cellulaire. Or, les neurones sont des cellules fortement polarisés, et cette polarisation est sensible à la géométrie des zones d'adhérence et de non-adhérence, ce qui peut affecter la croissance axonale (Roth et al., 2012). Par exemple, les neurones peuvent ne pas se différencier correctement en réponse à de fortes limitations géométriques imposées par le micro-environnement adhésif, en étant incapables d'étendre leur arborisation axonale et dendritique. De même, le choix des molécules utilisées pour l'adhérence et la non-adhérence est déterminant. Il a donc été nécessaire d'effectuer différents tests afin de trouver les conditions de géométrie et de revêtement optimaux pour cultiver des neurones primaires sur ces substrats, et ce en essayant de rester le plus proche possible de leur environnement physiologique. Après avoir testé des motifs de différentes tailles, espacements et géométries, nous avons choisi d'utiliser des îlots sphériques avec un diamètre de 1 à 2 µm, régulièrement espacés de 5 µm. Ces différents paramètres géométriques permettent la fixation des neurones ainsi que la formation de points d'attachement entre par exemple corps cellulaire, axones ou dendrites et la protéine

d'adhésion immobilisée sur les îlots (cf. figure M1). Différentes protéines ont été testées dans l'équipe telles que la N-cadhérine, la Neurexine 1- β , ou encore SynCam1.

Dans le cadre de ma thèse, ce procédé m'a permis de créer des contacts adhésifs localisés dans l'espace induits par la protéine d'adhérence neuronale N-cadhérine qui joue un rôle critique dans la migration du cône de croissance et le guidage axonal (Bard et al., 2008). Pour cela, j'ai utilisé une N-cadhérine recombinante fusionnée avec le fragment constant (Fc) des IgG humaine (Ncad-Fc). Cette protéine est liée indirectement aux îlots via un anticorps. En effet, avant de déposer la N-cadhérine-Fc, je recouvre les îlots PLL avec l'anticorps secondaire anti-Fc marqué par les fluorophores Dylight 405 ou Cy5. Cet anticorps permet à la fois d'orienter la N-cadhérine-Fc, la rendant plus efficacement disponible pour l'adhésion cellulaire, et de visualiser les îlots grâce au fluorophore auquel il est couplé. Des neurones d'hippocampe sont ensuite déposés et vont pouvoir croître le long des motifs ainsi définis.

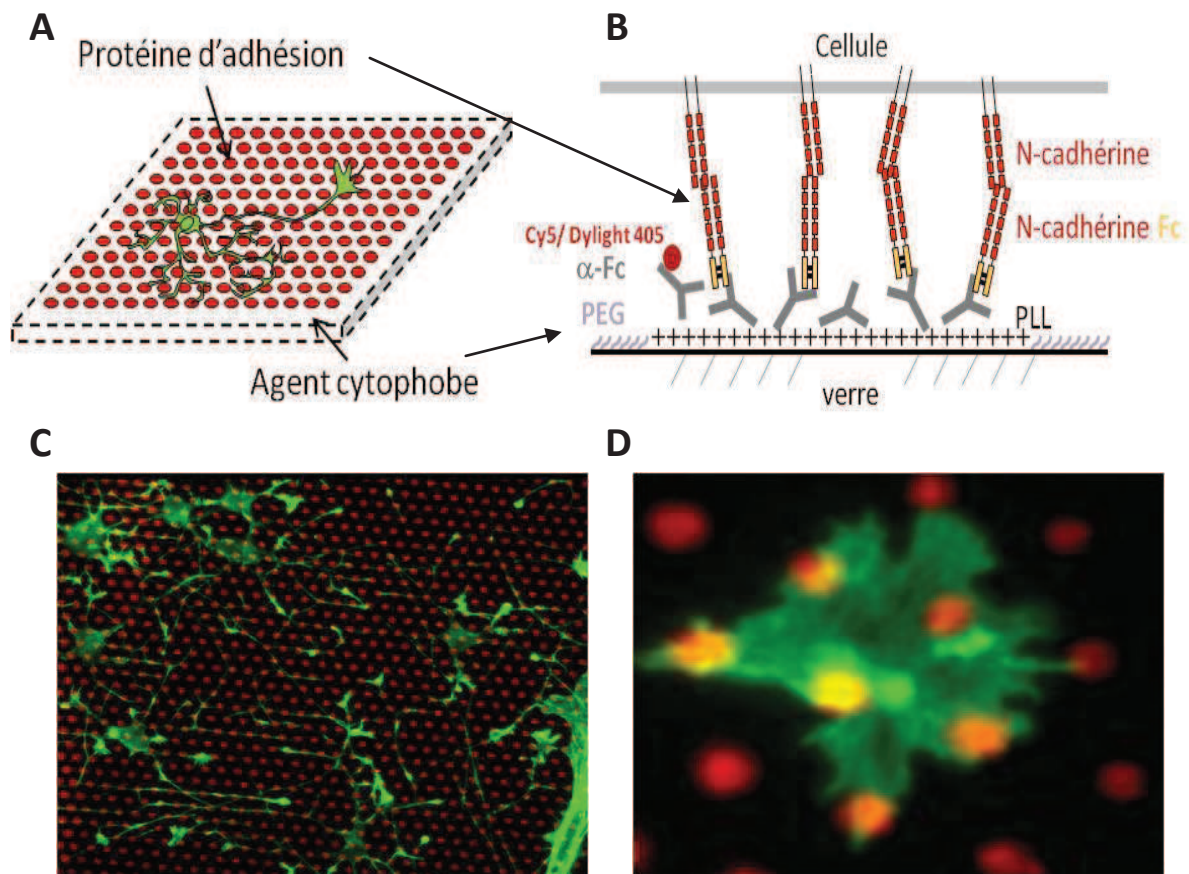


Figure M1 : La croissance de neurones sur substrats CYTOO

(A) Schéma simplifié d'un neurone se développant sur les substrats CYTOO avec des motifs ronds régulièrement espacés. (B) Schéma simplifié d'un motif recouvert par la protéine d'adhésion N-cadhérine. (C) Neurones fixés, marqués par la phalloïdine Bodipy (vert), se développant spécifiquement le long de motifs recouverts de N-cadhérine (ouge). (D) Cône de croissance transfecté avec de l'actine GFP (vert) adhérant sur des motifs recouverts de N-cadhérine (rouge).

D'après les différentes études menées au sein de l'équipe (Articles 1,2 et 3) il apparait que la culture de cellules neuronales sur ces substrats permette l'analyse des propriétés physiologiques des cellules neuronales, notamment leur développement axonal et dendritique ainsi que la formation de synapses, et de tester l'effet de composés sur ces processus.

L'épaisseur du substrat est de 170 μm , ce qui lui permet d'être utilisé dans un dispositif de lecture optique. Nous avons ainsi pu coupler l'utilisation de ces micro-motifs à la microscopie haute résolution PALM/TIRF (cf. chapitre IV méthodes).

II- Préparation des substrats

Les substrats micro décorés CYTOO correspondent à des lames de verre carrées de 20µm. Les motifs que nous avons choisis correspondent à des ronds de 1-2µm espacés de 5 µm. Les substrats sont traités avec de la PLL à 40µg/ml, qui adhère spécifiquement sur les motifs hydrophiles et non sur l'environnement cytophobe. Ces substrats arrivent dans un emballage sec et sont stockés à 4°C. Ces substrats sont préparés un jour avant la dissection. Ils sont tout d'abord placés 30 min, sur chaque face, sous une lampe UV (380nm) afin de les stériliser. Pendant ce temps, je prépare une solution contenant un ratio 9 :1 d'anticorps non marqués (anti-humain Fc, chèvre) et conjugués (anti-humain Fc- Dylight 405/Cy5). Ces anticorps sont dilués à une concentration de 0.023 mg/ml dans un tampon borate (acide borique 0.2 M, PH=8.5). Cette solution finale est centrifugée à 14 000 tours/min pendant 10 min à 4°C. Des gouttes de 160 µl de cette solution sont déposées sur du parafilm stérile. Les substrats sont retournés sur ces gouttes et placés dans un réfrigérateur (4°C) pour la nuit. Le lendemain matin, ces substrats sont rincés avec le tampon borate puis incubés (37°C, 5% CO₂) de la même façon sur parafilm pendant 4 heures avec la N-cadhérine Fc (0.04 mg/ml diluée dans l'acide borique). Les substrats sont rincés de nouveau avec le tampon borate puis placés dans des plaques 6 puits, chaque puits contenant 2,5 ml de MEM supplémenté de 10% de sérum de cheval. Ces plateaux sont placés dans un incubateur (37°C, 5% CO₂) pendant 1-2 heures avant d'être ensemencés par les neurones.

Les substrats homogènes correspondent à des lamelles de verre rondes de diamètre 18 mm. Ces lamelles sont placées dans l'acide nitrique pendant toute une nuit, rincées avec de l'eau déminéralisée, puis passées dans l'autoclave. Les lamelles sont ensuite recouvertes de PLL à 1mg/ml et placées pendant 2H dans un incubateur (37°C, 5% CO₂). La suite du protocole de recouvrement est identique aux substrats CYTOO, nous déposons successivement de l'anti-hu Fc, puis la N-cadhérine Fc (0.1-1µg) ou le contrôle Fc humain (1µg).

III- Culture cellulaire et transfection

Dans mes différentes études, j'ai utilisé des neurones d'hippocampe de rat embryonnaire au stade E18. Le jour de la dissection, avant d'être déposés sur les substrats, les neurones sont électroporés grâce au kit nucleofector Amaxa (Lonza). Pour cela, je centrifuge 500 000 cellules en suspension dans du MEM-HS (préchauffé dans un bain à 37°C) pendant 5 minutes à 900 tours/min. Le milieu est aspiré, et les cellules sont resuspendues dans 88µl d'agent de nucléofection. Après avoir homogénéisé ce mélange, il est transféré dans un eppendorf contenant l'ADN à transférer suspendu dans 10µl d'agent de nucléofection. Après avoir mélangé, l'ensemble est transféré dans la cuvette d'électroporation qui sera placé dans l'appareil *Lonza IID Nucleofector*. J'ai utilisé le programme adapté aux neurones d'hippocampes de rats nommé : « *Neuron Rat Hippocampal O-003* ». Le mélange contenant les neurones est ensuite resuspendu dans du MEM-HS, puisensemencé avec une densité de 100 000 cellules par puit dans des plaques 6 puits. Chaque puit contient un substrat, préalablement recouvert par la protéine d'adhésion N-cadhérine (cf préparation de substrats), immergé dans 2.5ml de MEM supplémenté par 10% de sérum de cheval. Après 2h dans un incubateur (37°C, 5% CO₂), les neurones ont adhéré, et le milieu de chaque puit est remplacé par du milieu enrichi Neurobasal (NB) supplémenté par du B27. Ce milieu est dit « enrichi » car il a été incubé pendant 1 semaine dans une boîte de pétri contenant de la glie et s'est donc enrichi de différents facteurs. Les axones se développant sur N-cadhérine ont une croissance rapide, et sont donc observés à 2 jours. Pour ce qui est des expériences sur filopodes, les observations sont faites à 8-10 jours.

Concernant les neurones sur lamelles homogène recouvertes de PLL (cf préparation des substrats), le protocole d'électroporation est le même. La quantité de neurones par boîte de pétri (contenant 4 lamelles) est de 250 000 cellules. Les cônes de croissance sont observés à 3 jours.

La quantité d'ADN électroporée a une expression et un effet variable selon la construction. J'ai donc effectué différents tests afin d'utiliser la quantité optimale suffisante à l'observation de la protéine d'intérêt sans trop affecter la morphologie et la viabilité des neurones. J'ai donc utilisé les quantités suivantes : 2µg d'ADN pour les constructions α -caténine (-mEOS2, -GFP), vinculine (-mEOS2, -GFP) et N-cadhérine (ΔE , W2A, -mEOS2, -RFP) ; et 3µg pour l'actine (-mEOS2, -GFP).

IV- Microscopie haute résolution : Spt-PALM

La vidéomicroscopie est limitée par la diffraction de la lumière et ne possède donc pas la résolution nous permettant d'étudier les processus biologiques à l'échelle de la molécule unique. Il a donc fallu trouver un moyen de passer en dessous de la limite de diffraction. Ceci a été permis grâce à des méthodes de microscopie dites de super résolution. L'idée de base est simple: deux fluorophores situés à une distance inférieure à la limite de diffraction ne peuvent être résolus spatialement s'ils émettent de la fluorescence en même temps. Par contre, si un seul fluorophore est actif à la fois, on peut calculer le centroïde de chacun et améliorer considérablement la résolution qui peut atteindre jusqu'à environ 30nm. Mais comment peut-on arriver à ce type de condition dans lesquelles deux fluorophores proches ont peu de chance de se retrouver dans un état actif en même temps ?

Ceci est permis grâce à l'utilisation de fluorophores ayant des propriétés de photo-activation ou de photo-conversion dont on peut contrôler l'activation stochastique. Les protéines photo-activables peuvent passer d'un état noir à un état fluorescent ; et les protéines photo-convertibles peuvent changer de spectres d'absorption et d'émission. Ces changements sont dus à des modifications conformationnelles ou à la rupture de ponts chimiques initiés grâce à des radiations avec des longueurs d'ondes spécifiques. Ces changements peuvent être réversibles ou non.

Dans le cadre de ma thèse, j'ai utilisé la microscopie PALM (Photo-Activation Localization Microscopy) qui fait partie des techniques de microscopie de super résolution évoquées précédemment (Betzig et al., 2006). La microscopie PALM est basée sur l'utilisation de protéines photo-convertibles. Nous avons utilisé la protéine photo-convertible mEOS2 (cf. article 1) couplée aux différentes protéines d'intérêt (actine, α -caténine, N-cadhérine, vinculine) afin de pouvoir suivre leur dynamique. Ce fluorophore est dit photo-convertible car il peut passer d'un état vert à un état rouge via l'illumination avec un laser à 405nm. La mEOS2 présente un pic d'émission dans le vert à 519 nm et un pic d'absorbance maximum à 506 nm cf. figure M2). L'illumination par un laser 488 nm convertit l'ensemble de la population de ces fluorophores qui deviennent ainsi visibles dans le vert. Puis, lorsque la mEOS2 est illuminée par un laser UV à 405nm, le pic d'émission passe à 584 nm dans le spectre rouge et le pic d'absorbance à 573 nm.

L'illumination avec un laser 561 nm couplée à la photo-conversion basse puissance d'un laser 405 nm permet de convertir de façon stochastique un petit nombre de fluorophores et de suivre ainsi la localisation de molécules uniques au cours du temps. L'utilisation de temps d'exposition longs (250 ms) couplé à des fréquences d'acquisitions faibles (1 image par demi seconde) nous ont permis de suivre des trajectoires longues

associées à des mouvements lents (ex : flux rétrograde des filaments d'actine), tout en éliminant le bruit de fond généré par le mouvement rapide de particules diffusives (ex : actine monomérique). Inversement, pour observer des mouvements rapides (N-cadhérine, α -caténine et vinculine), nous avons filmé en continu en utilisant des temps d'exposition rapides (20-50ms). Chaque mEOS2 ne pouvant être activé qu'une seule fois, chaque signal observé pourra être associé à une molécule unique. Dans ces conditions, nous avons ainsi pu imager les déplacements de protéines uniques en évitant un photo-blanchiment trop rapide.

Nous avons couplé le PALM à la microscopie de fluorescence par réflexion interne totale ou TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence). Le principe du TIRF est d'illuminer de façon oblique un échantillon au moyen d'un laser en trouvant un certain angle permettant la réflexion totale du rayon (Axelrod, 1981). Ceci crée une onde évanescente qui illumine l'échantillon sur une épaisseur d'environ 100 nm. Ceci nous a permis d'activer et de visualiser spécifiquement les protéines d'intérêt sur une fine section optique à l'interface cellule/substrat, là où se localisent les adhésions N-cadhérines.

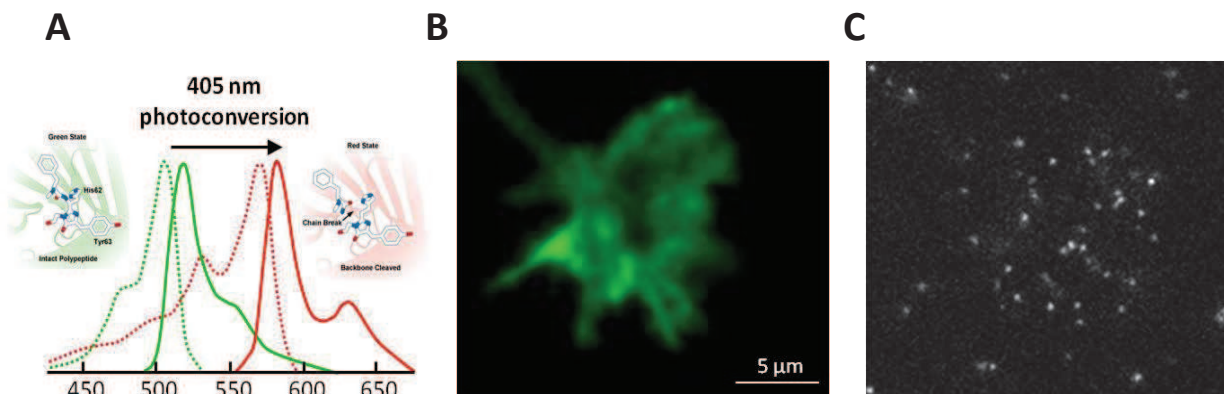


Figure M2 : La photo-conversion de mEos2

(A) Schéma correspondant aux spectres d'absorption et d'émission des deux états de la protéine photo-convertible mEOS2. (B) Image en épifluorescence, dans le vert, d'un cône de croissance exprimant l'actine mEOS2. (C) Image en TIRF, dans le rouge, du même cône après photoconversion stochastique induite par le laser 405nm, permettant la visualisation de molécules individuelles d'actine.

V- L'analyse d'image

1. Localisation, segmentation et suivi de particules uniques

La localisation des molécules uniques est une étape cruciale dans l'analyse des données générées lors des acquisitions PALM. Il convient tout d'abord de détecter la localisation précise de chaque molécule fluorescente (cf figure M3). Nous utilisons pour cela un programme appelé MIA (Multidimensional Image Analysis), développé par Jean-Baptiste Sibarita, se basant sur la segmentation en ondelettes (Izeddin et al., 2012). Ceci nous permet de détecter des molécules uniques avec une précision de 50 nm, qui peut cependant varier en fonction du rapport signal sur bruit de notre échantillon.

Chaque molécule unique ainsi détectée est suivie au cours du temps au moyen d'algorithmes de recuit simulé (Racine et al., 2006). Pour attribuer un déplacement à une certaine molécule et éviter de relier différentes molécules entre elles, le programme permet de considérer un objet comme nouveau, si celui-ci se déplace de plus de n pixels entre deux images prises successivement. Dans nos conditions d'acquisition, nous avons utilisé $n=3$ correspondant à une distance de 480 nm. Le programme nous fournit alors en sortie un fichier texte (.txt) avec les coordonnées x et y de chaque molécule au cours du temps, permettant ainsi de définir des trajectoires. Afin de caractériser les différents types de trajectoires présentes, nous avons calculé le déplacement quadratique moyen ou MSD (Mean Square Displacement).

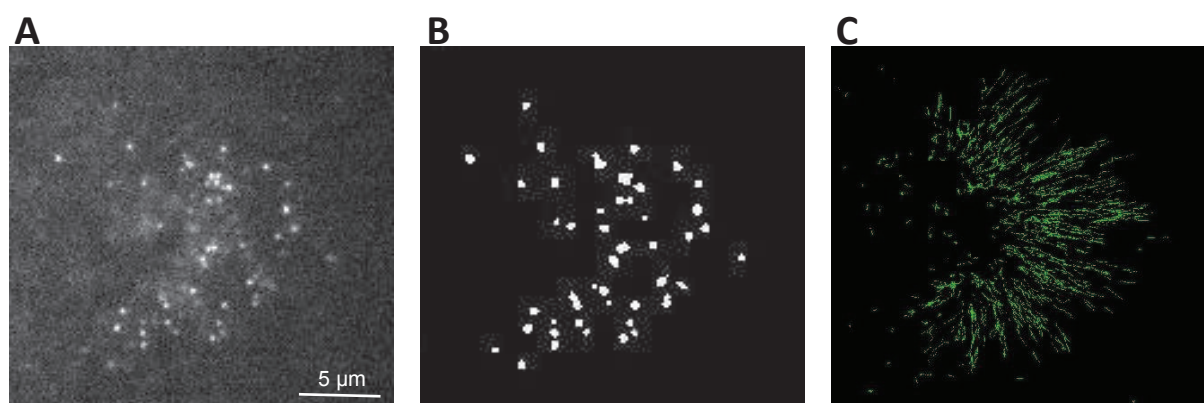


Figure M3 : Le suivi de particules uniques

(A) Image de molécules uniques d'actine mEOS2 avant segmentation. (B) Image de molécules uniques d'actine mEOS2 après segmentation. (C) Image après reconstruction des trajectoires de chaque molécule individuelle d'actine.

2. Le déplacement quadratique moyen

Le MSD est représenté en calculant la somme des pas au carré (axe des ordonnées) au cours du temps (axe des abscisses) (cf. figure M4 B et C). Le MSD est calculé pour un pas de 1 intervalle de temps (trait et point rouges), puis pour un pas de 2 (trait et points vert), un pas de trois (trait et point bleu) et ainsi de suite (cf. figure M4 A et B). La courbure du MSD ainsi tracé va nous renseigner sur le type de mouvement de la trajectoire. Si le MSD est parabolique, la trajectoire observée est dirigée, s'il est linéaire, alors la trajectoire est Brownienne, et enfin s'il est fléchi vers le bas, la trajectoire est confinée. Ainsi, nous avons sélectionné les trajectoires de plus de 8 points et appliqué l'équation suivante :

Dans cette équation x_i et y_i correspondent aux coordonnées de l'objet suivi au temps $i \cdot \Delta t$. Après avoir calculé les MSD, nous avons appliqués à chacune d'entre elle une fonction permettant de classer les différents types de mouvements.

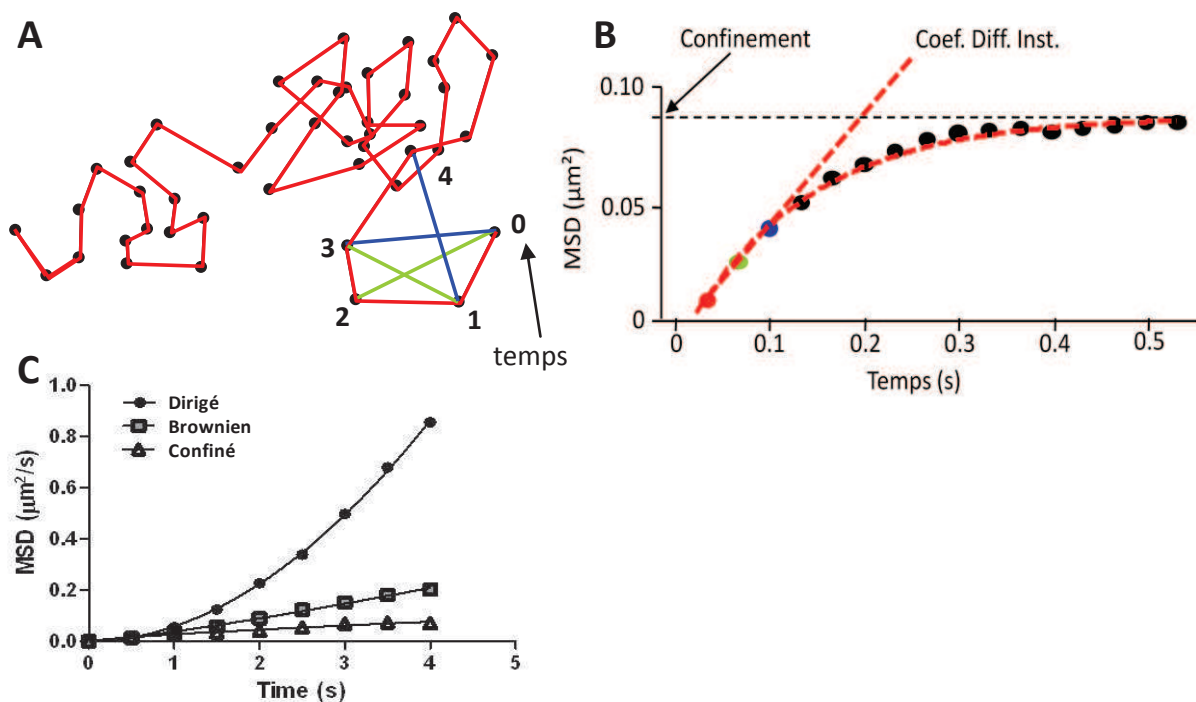


Figure M4 : L'analyse de suivie de particules uniques

(A) Trajectoire fictive de 45 points. Le trait rouge correspond à un pas de 1, le vert, à un pas de 2, et le bleu à un pas de 3. (B) Représentation du MSD pour cette trajectoire en fonction du temps (C) Représentation des différents profils de MSD pour des trajectoires confinées, browniennes ou dirigées.

3. Programme MATLAB

Un programme MATLAB, développé par Cécile Leduc, nous a permis de classer les trajectoires en appliquant la loi de puissance $4Dt^\alpha$ individuellement à chaque MSD. Dans cette équation, D correspond au coefficient de diffusion et α est un exposant dont la valeur se situe entre 0 et 2. La classification des trajectoires peut se faire en fonction de ce α . Dans nos conditions, pour $\alpha < 0.8$, la trajectoire est dite confinée, pour $0.8 < \alpha < 1.2$ elle est considérée comme Brownienne, et pour $\alpha > 1.4$ elle est classée comme dirigée.

Une fois les trajectoires classées, nous avons extrait la vitesse (V) des trajectoires dirigées en appliquant un ajustement du MSD avec la fonction $4Dt + V^2t^2$ (Saxton, 1994).

Afin d'être rigoureux, nous avons utilisé des trajectoires supérieures à 7 points, et les ajustements sont faits sur 70% de la courbe MSD ce qui nous permet d'avoir une meilleure précision globale sur la trajectoire.

4. Motility Index

Afin de comparer le niveau de motilité de différentes structures (ex : filopodes, épines dendritiques, cônes de croissance), nous avons utilisé un programme appelé index de motilité (IM) décrit à l'origine pour analyser la motilité du cône de croissance (Ibarretxe et al., 2007). Nous appliquons tout d'abord une segmentation à l'image en utilisant MIA afin d'obtenir une délimitation précise des contours du filopode et de supprimer le bruit de fond (cf. figure M5 B). Puis, en appliquant un seuil sur la projection maximale obtenu par l'empilement de l'ensemble des images enregistrées au cours du temps, nous arrivons à déterminer la surface maximale explorée par le filopode durant l'acquisition (cf. figure M5 C). Chaque paire d'images consécutives sont ensuite soustraites l'une à l'autre avec l'ajout d'une constante afin d'éviter des valeurs de pixel négatives. Nous obtenons alors de nouvelles images (cf. figure M5 D) dont les pixels blancs correspondent à des structures qui apparaissent, alors que les pixels noirs sont associés à des structures qui disparaissent. Ainsi, plus le filopode est motile, plus il apparait contrasté sur ces images. Ce contraste est estimé grâce à la formule suivante :

Dans cette équation, σ représente l'écart type des valeurs des pixels de la surface totale d'une structure, et I représente l'intensité moyenne. Une première correction est faite par le

bruit. Puis le dénominateur permet de corriger le photo-blanchiment et le fait que l'expression de protéines fluorescentes puisse varier d'un filopode à l'autre

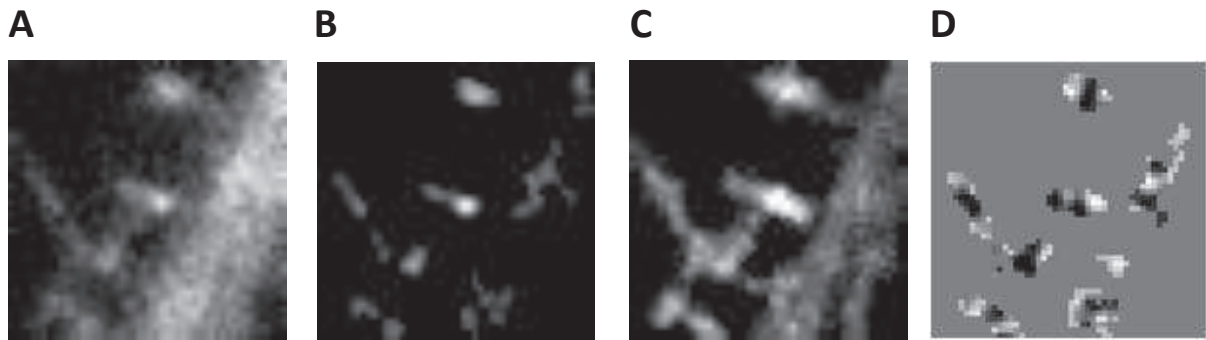


Figure M5 : Index de Motilité

(A) Image en épifluorescence du neurone transfecté actine-GFP, avant segmentation. (B) Image du même neurone après segmentation. (C) Projection maximale après segmentation. (D) Soustraction entre deux images consécutives dont le contraste reflète la motilité.

RESULTATS

Article 1: “A slipping clutch revealed by transient single molecule interactions between flowing actin and N-cadherin adhesions in growth cones”.

Auteurs: Mikaël Garcia, Cécile Leduc, Amélie Argento, Jean-Baptiste Sibarita, Olivier Thoumine

A. Contexte et problématique

La protéine d'adhésion N-cadhérine joue un rôle prépondérant dans la croissance axonale lors du développement du système nerveux central, mais les mécanismes sous-jacents restent mal compris. Un des modèles proposés, appelé l'embrayage moléculaire postule un couplage mécanique entre les adhésions et la motilité du cytosquelette d'actine (Mitchison et Kirschner, 1988). Ce modèle a été initialement décrit pour les intégrines au niveau d'adhésions focales. Dans ce système, la migration cellulaire est permise grâce à la génération de forces de tractions par le cytosquelette au niveau de sites d'adhésions entre cellule et MEC (Matrice Extra Cellulaire) (Lauffenburger et Horwitz, 1996; Heetz et Galbraith, 1997). Cette mécanotransduction serait permise grâce aux adhésions de type intégrines qui pourraient lier simultanément la matrice via son domaine extracellulaire, et le cytosquelette d'actine via son domaine intracellulaire (Choquet et al., 1997). Cette liaison entre intégrine et actine se ferait via des protéines intermédiaires: vinculine et la talin (Gilmore et Burridge, 1996). Il a été plus récemment suggéré que taline et vinculine pouvaient osciller entre un état lié au flux d'actine, et un état lié aux intégrines immobilisées (Hu et al., 2007).

Par la suite, ce type de mécanisme a été décrit entre immunoglobulines et cytosquelette d'actine pour expliquer la migration du cône de croissance d'Aplysie (Lin et Forscher, 1995). Des expériences de billes recouvertes d'ApCAM (Aplysia Cell Adhesion Molecule), homologue des N-CAM (Neural Cell Adhesion Molecule), retenues par des micro-aiguilles ont permis d'observer une accumulation d'actine aux sites d'adhésions. Cette accumulation est associée à un ralentissement local du flux d'actine, qui pendant ce temps continue de polymériser contre la membrane plasmique, et génère ainsi les forces protrusives à l'origine de la progression de la cellule (Suter et Forscher, 2000).

Enfin, ce mécanisme semble aussi pouvoir s'appliquer aux adhésions cadhérines. Ceci a été initialement décrit pour la migration cellulaire, où la transduction de forces aux contacts

cellules/cellules entre cadhérines et cytosquelette via les caténines est cruciale pour le développement et l'intégrité des tissus (Gumbiner, 2005; Ganz et al., 2006). Le couplage physique entre cytosquelette et complexe cadhérine/caténine ne serait ici pas fixe. Des études ont émis l'hypothèse d'une transition moléculaire dynamique de l' α -caténine qui oscillerait entre une forme monomérique liée au complexe cadhérine/caténine, et une forme dimérique liée à l'actine (Drees et al., 2005 ; Yamada et al., 2005). Ce modèle pourrait aussi expliquer l'effet de la N-cadhérine sur la croissance axonale. Grâce à des techniques de pinces optiques, notre équipe a montré il y a quelques années une corrélation entre la vitesse de migration du cône de croissance sur substrats recouverts de N-cadhérine, et le couplage mécanique entre des billes recouvertes de N-cadhérine et le flux rétrograde d'actine (Bard et al., 2008). Cependant le mécanisme exact permettant d'expliquer le couplage mécanique de l'actine aux protéines d'adhésions reste controversé, et aucune étude n'a permis une visualisation directe des processus d'engagements moléculaires entre actine et adhésion.

Ainsi, afin de mieux comprendre les interactions moléculaires mises en jeu dans l'embrayage moléculaire au niveau du cône de croissance, nous avons combiné l'utilisation de substrats micro-imprimés aux techniques d'imagerie haute résolution afin d'observer la dynamique de molécules individuelles de N-cadhérine, d'actine et de molécules supposées d'embrayage (α -caténine, vinculine).

B. Résultats majeurs

Nous avons utilisé des substrats micro-imprimés sur lesquels nous avons déposés des cultures cellulaires de neurones. Les micro-motifs présents sur ces substrats sont recouverts de N-cadhérine permettant d'induire l'engagement d'adhésions homophiliques spécifiques ciblées, et l'espace cytophobe tout autour peut servir de contrôle. Cette spécificité est confirmée par l'observation de la dynamique de molécules uniques de N-cadhérine. Celles-ci ont un comportement principalement Brownien à l'extérieur des zones adhésives, et un comportement confiné sur les motifs recouverts de N-cadhérine, traduisant l'interaction entre la N-cadhérine présente au niveau de la membrane des neurones et celle recouvrant la surface des motifs.

Nous avons ensuite caractérisé la dynamique de l'actine. Nous avons observé un flux rétrograde de l'actine partant de l'extrémité du cône et se dirigeant vers la base. Ce flux diminue spécifiquement au niveau des motifs recouverts de N-cadhérine, en accord avec un modèle d'embrayage moléculaire. Afin de mieux caractériser ce ralentissement, nous avons observé individuellement le comportement de molécules d'actine traversant les zones d'adhésion N-cadhérine. Les molécules d'actine ralentissent lorsqu'elles passent sur les

motifs et accélèrent lorsqu'elles en sortent. L'analyse du déplacement en fonction du temps de ces molécules uniques tend à montrer que l'actine transite entre un état immobile lié à la N-cadhérine et un état où elle flue vers l'arrière du cône.

Afin de prouver la spécificité du ralentissement du flux d'actine via la N-cadhérine nous avons testé des mutants non adhésifs des N-cadhérines. L'expression de N-cadhérine ΔE , mutant cadhérine tronquée au niveau du domaine extracellulaire ne pouvant former de liaisons homologues (Riehl et al., 1996), annule l'effet de ralentissement du flux d'actine sur les patterns recouverts de N-cadhérine. Les molécules d'actine fluent de façon identique à l'extérieur et sur les patterns, montrant l'implication spécifique de la N-cadhérine dans le ralentissement du flux d'actine observé précédemment. De façon intéressante, en reprenant nos résultats antérieurs de la pousse neuronale sur différentes concentrations de N-cadhérine Fc (Bard et al., 2008), nous montrons ici une corrélation inverse entre la longueur des axones et la vitesse du flux d'actine, en accord avec le modèle d'embrayage (Lin et Forscher, 1995).

Nous avons aussi caractérisé la dynamique de l' α -caténine, protéine supposée jouer un rôle d'intermédiaire entre l'actine et la N-cadhérine (Yamada et al., 2005 ; Bard et al., 2008 ; Desai et al., 2013). En microscopie classique, on observe une accumulation de l' α -caténine sur les motifs recouverts de N-cadhérine, montrant un lien fort entre ces deux protéines. En microscopie haute résolution, on observe une association des molécules uniques d' α -caténine mEOS2 à la N-cadhérine, avec des mouvements confinés sur les patterns, mais pas de mouvements dirigés associés au flux d'actine dans nos conditions expérimentales. Il semble donc que cette protéine soit majoritairement liée à la N-cadhérine dans le système du cône de croissance.

Enfin, nous avons testé la vinculine, autre protéine supposée jouer un rôle d'intermédiaire entre l'actine et la N-cadhérine (Yonemura et al., 2010; le Duc et al., 2010; Dufour et al., 2013). Contrairement à l' α -caténine, la vinculine ne s'accumule pas sur les motifs N-cadhérine. De même, l'analyse en molécules uniques montre une dynamique Brownienne qui est la même en dehors et sur les zones d'adhésions N-cadhérine. Nous n'observons pas non plus de mouvements dirigés pouvant être associés à des connexions stables à l'actine dans le flux rétrograde. La vinculine ne semble donc pas jouer le rôle d'intermédiaire entre actine et N-cadhérine.

Ces résultats, au-delà de soutenir la théorie d'embrayage moléculaire, permettent pour la première fois de rendre compte de la dynamique à l'échelle nanométrique d'une partie des protéines impliquées dans ce mécanisme.

Title: A slipping clutch revealed by transient single molecule interactions between flowing actin and N-cadherin adhesions in growth cones

Authors : Mikael Garcia^{1,2}, Cécile Leduc³, Amélie Argento⁴, Jean-Baptiste Sibarita^{1,2}, Olivier Thoumine^{1,2}

Affiliations:

1. Univ. Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France
2. CNRS, Interdisciplinary Institute For Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France
3. Institut Pasteur, Paris
4. CYTOO SA, Minatec, Grenoble, France

Corresponding author: **Olivier Thoumine**

Phone: +33 5 57 57 57 44

Fax: +33 5 57 57 40 82

e-mail: othoumin@u-bordeaux2.fr

Abbreviated title: Micropatterned N-cadherin slows actin flow in growth cones

Key Words: Growth cone migration, micro-patterned substrates, hippocampal neurons, N-cadherin-Fc fusion protein, Single Molecule Tracking (SMT), Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF), Photoactivation Localization Microscopy (PALM).

Abstract

Axonal growth cones move forward by dynamically connecting actin-based motility to substrate adhesion, but the mechanisms of clutch engagement at the level of individual molecular interactions remain elusive. We combined primary neuronal cultures on substrates comprising arrays of micro-patterned dots coated with N-cadherin, with single molecule mapping of photo-convertible fluorescent proteins at the ventral surface of growth cones. N-cadherin and α -catenin were immobilized, while the actin retrograde flow was significantly reduced at N-cadherin coated micro-patterns, compared to non-adhesive regions. Strikingly, individual actin trajectories exhibited pauses of the order of seconds on N-cadherin-coated micro-patterns. Normal actin flow on micro-patterns was restored by expression of a dominant negative N-cadherin construct inhibiting the coupling between endogenous N-cadherin and actin. Vinculin was mostly diffusive and not enriched at N-cadherin adhesions, indicating a minor role in the coupling to actin. These data show that, at the individual level, clutch engagement is characterized by transient molecular interactions between flowing actin filaments and the immobilized N-cadherin/catenin complex.

Introduction

Growth cones are motile structures at the distal extremity of axons responsible for pathfinding and neurite extension during nervous system development and repair. Growth cone motility relies on a coordinated regulation of actin network dynamics, with polymerization occurring preferentially at the leading edge, and depolymerization in the central region (Lin and Forscher, 1995; Mallavarapu and Mitchison, 1999). Such actin treadmilling together with the activity of myosin II pulling on and severing actin filaments result in a continuous retrograde flow of actin from the tip to the base of growth cones (Diefenbach, 2002; Lin, Espreafico, Mooseker, & Forscher, 1997; Medeiros, Burnette, & Forscher, 2006). The molecular clutch model postulates that mechanical coupling between ligand-bound adhesion receptors and the actin flow allows traction forces to be transmitted to the substrate, resulting in local diminution of the retrograde flow and forward progression (Mitchison and Kirschner, 1988; Suter and Forscher, 2000). Experiments using optical tweezers and flexible substrates with beads coated with adhesion molecules have demonstrated clutch-like mechanisms for integrins (Schmidt et al., 1995; Chan and Odde, 2008), IgCAMs (Suter et al., 1998; Suter and Forscher, 2001), and cadherins (Bard et al., 2008; Giannone et al., 2009).

However, the mechanism of clutch engagement at the individual molecular level remains elusive. For integrin-based adhesion, fluorescent speckle microscopy experiments suggested that clutch molecules such as talin and vinculin could switch between a state bound to flowing actin, and a state bound to immobilized integrins (Hu et al., 2007). For cadherin adhesion, it was suggested that α -catenin could transit between a dimeric form bound to actin, and a monomeric form bound to the cadherin/ β -catenin complex (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005), but a direct visualization of such switching behaviour has not been achieved yet. To better characterize clutch engagement at the individual molecular level, we cultured neurons on N-cadherin coated micro-patterned substrates, and examined the dynamics of single actin, N-cadherin and α -catenin molecules in growth cones using single particle tracking (SPT) combined to PhotoActivation Localization Microscopy (PALM). We find that clutch engagement is characterized by transient interactions of several seconds between flowing actin filaments and the cadherin/catenin complex immobilized at micro-patterns.

Results

N-cadherin is selectively immobilized at N-cadherin coated micro-patterns

To elicit specific N-cadherin adhesions at the growth cone ventral surface compatible with single molecule microscopy, rat hippocampal neurons were cultured on micro-patterned substrates comprising a regular array of micron-scale dots coated with recombinant N-cadherin-Fc (Ncad-Fc), and separated by a uniformly cytophobic background, as described (Czöndör et al., 2013). Neurons grew well on these micro-patterned substrates, compared to substrates uniformly coated with poly-lysine, or to micro-patterned substrates coated with control Fc (**Fig. S1**). Moreover, the average axonal length of neurons cultured for 2 days on Ncad-Fc coated micro-patterns ($138 \pm 18 \mu\text{m}$, $n = 14$ cells) (Czöndör et al., 2013) was comparable to that of neurons grown on substrates uniformly coated with Ncad-Fc at similar concentrations (Bard et al., 2008), confirming the growth promoting activity of N-cadherin in these assays. Typically, growth cones were spreading over several dots, allowing a paired-design comparison between N-cadherin adhesions and non-adhesive areas within the same growth cone.

We electroporated neurons with N-cadherin, actin, α -catenin and vinculin constructs fused to GFP or to the photo-convertible protein mEOS2 (McKinney et al., 2009), and visualized these molecules by laser illumination and Total Internal Reflection Fluorescence (TIRF) microscopy. We checked by immunocytochemistry that recombinant proteins were expressed at low levels and incorporated well into the endogenous protein pools (**Fig. S2**). N-cadherin-GFP was strongly accumulated at Ncad-Fc coated dots (**Fig. 1c**), indicating that N-cadherin was engaged in homophilic adhesive interactions with Ncad-Fc at the dots. At the single molecule level, N-cadherin-mEOS2 exhibited Brownian motion with high diffusion coefficients outside micro-patterns, and were mostly confined at Ncad-Fc coated dots (**Fig. 1e**), reflected by a leftward shift in diffusion coefficient and an increase in the immobile fraction (**Fig. 1f,g**). This is reminiscent of the behaviour of mEOS2-tagged integrins outside and within focal adhesions to fibronectin (Rossier et al., 2012). Thus, membrane N-cadherin is mostly trapped at Ncad-Fc coated micropatterns.

The flow of individual actin molecules is slowed down specifically at N-cadherin adhesions

In contrast, actin-GFP was not particularly enriched at N-cadherin coated dots (**Fig. 2a, b**), suggesting that actin was not tightly bound to N-cadherin adhesions in growth cones. Instead, actin-mEOS molecules exhibited a very linear motion from the tip to the rear of growth cones (**Fig. 2c**). Three types of trajectories were distinguished according to the shape of the mean squared displacement (MSD) over time: directed trajectories were characterized by a parabolic MSD, Brownian motion by a fairly linear MSD, and confined trajectories by a MSD bent downwards (**Fig. S3**). Actin molecules displayed a graded behaviour, switching from a highly directed motion at the periphery of growth cones (where actin incorporates into new filaments), to confinement in the central region (where actin filaments disassemble). The peripheral region displaying 80% of directed trajectories was selected throughout the rest of this study. For those directed trajectories, an average actin velocity of 0.14 $\mu\text{m/s}$ was computed, very close to the speed of Ncad-Fc coated beads on the dorsal surface of growth cones (Bard et al., 2008), indicating that mEOS2-actin molecules readily assemble with native actin filaments. Treatment of cells with the actin capping drug cytochalasin D greatly diminished the fraction of rearward-moving molecules (20%) and significantly reduced the velocity of the remaining molecules showing directed motion (0.09 $\mu\text{m/s}$), consistent with a major role of actin polymerization in driving actin flow in growth cones. For neurons were cultured on uniform substrates coated with increasing concentrations of Ncad-Fc, the actin flow velocity decreased to 0.11 $\mu\text{m/s}$ (**Fig. 2e**). Strikingly, when the actin flow rate was plotted with respect to axonal length measured previously (Bard et al., 2008), a strong negative correlation was observed. Since neurite length reflects the rate of growth cone advance (Bard et al., 2008), the expected negative correlation between actin flow rate and growth cone locomotion rate reveals partial clutch engagement between N-cadherin adhesion and actin (Lin and Forscher, 1995a).

At micro-patterns coated with Ncad-Fc, the fraction of confined trajectories was higher than at non-adhesive areas (23% vs 8%), and the proportion of directed trajectories was smaller (56% vs 74%) (**Fig. 2d**). Furthermore, the retrograde velocity of actin molecules displaying directed motion was significantly reduced at Ncad-Fc dots versus non-adhesive areas (**Fig. 2e**). This difference was not due to an increase of the actin flow on the cytophobic substrate, as the velocity of actin molecules outside micro-patterns was similar to that measured for neurons plated on PLL coated substrates (**Data not shown**). To address the molecular mechanism underlying this effect, neurons were co-electroporated with actin-mEOS2 and an N-cadherin construct deleted of the whole extracellular domain (Ncad- ΔE), thus unable to form homophilic adhesions (Riehl et al., 1996). This mutant is believed to act

as a dominant negative by sequestering α - and β -catenins, thereby interfering with the binding of actin to endogenous N-cadherin (Bard et al., 2008; Okamura et al., 2004; Mendez et al., 2010). Upon expression of Ncad- ΔE , the velocity of actin-mEOS2 molecules on Ncad-Fc micro-patterns was rescued to the high levels outside patterns (**Fig. 2e**), indicating that the reduction of actin velocity on N-cad-Fc micro-patterns involves a connection through catenins. This important experiment also demonstrates that the slowing down of actin filaments on Ncad-Fc micro-patterns is not due to a non-specific frictional effect due to molecular crowding at adhesion sites.

Transient pauses of actin filaments on N-cadherin patterns

To better characterize the mechanism of clutch engagement at the molecular level, we analysed in detail actin-mEOS2 trajectories by computing their displacement versus time. Whereas we previously analysed trajectories localized exclusively inside or outside micro-patterns, we focused here on actin molecules which spent part of their time inside a micro-pattern, and the other part outside the micro-pattern (**Fig. 3a,b**). Actin molecules entering a micro-pattern showed a significant reduction in velocity (**Fig. 3c**), while molecules exiting a micro-pattern displayed a significant acceleration in velocity (**Fig. 3d**). This suggests that interaction of individual rearward-moving actin filaments with N-cadherin adhesions can rapidly and significantly reduce their speed, and that these interactions are spatially restricted at Ncad-Fc micro-patterns. We also noticed that actin molecules within Ncad-Fc micro-patterns often exhibited pauses on the second time scale, which appeared less frequently outside patterns (**Fig. 3e**), and may thus reflect transient interactions of actin filaments with the N-cadherin complex. We performed a semi-automatic detection of these pauses and computed the total pause duration per trajectory, normalized by the length of each trajectory. The median pause duration per minute was 5-fold longer for actin trajectories localized within Ncad-Fc micro-patterns than those localized outside patterns (**Fig. 3f**). This increase in pause duration was blocked by the expression of the Ncad- ΔE mutant (**Fig. 3f**), showing that these pauses represent specific labile interactions between actin molecules and N-cadherin adhesions, mediated by catenins. Interestingly, recapture events were previously identified in optical tweezers experiments, which were interpreted as the breakage of individual molecular bonds between the flowing actin network and N-cadherin coated beads (Bard et al., 2008). The force of these bonds was around 1 pN, and their duration was on the order of several seconds (average = 5 sec). In that system, the optical trap is compliant and the force is applied gradually, so it is expected that the bonds will last longer than with the micro-

patterned substrates where immobilized adhesions are infinitely rigid (Evans and Calderwood, 2007).

α -catenin is mostly immobilized at N-cadherin micro-patterns

To further characterize the molecular linkage between N-cadherin and actin, we examined the dynamic behaviour of two important molecules potentially involved in those transient connections, namely α -catenin and vinculin. α -catenin-GFP was strongly recruited at Ncad-Fc micropatterns (**Fig. 4a**). Furthermore, at the individual level, α -catenin-mEOS2 molecules displayed a mixture of Brownian movement and confined diffusion, but no directed motion like actin molecules (**Fig. 4b**). The diffusion coefficient of α -catenin and mobile fraction were significantly lower at Ncad-Fc micropatterns than in outside regions (**Fig. 4c,d**), indicating a preferential association with N-cadherin adhesions. Thus, although α -catenin was postulated to transit between a dimeric state bound to actin, and a monomeric state bound to the cadherin/ β -catenin complex (Drees et al., 2005; Yamada et al., 2005), it seems that in these growth cones, α -catenin is mostly associated with the cadherin/ β -catenin complex.

Vinculin neither accumulates at N-cadherin micro-patterns nor flows with actin

Another important molecule which may provide a link between the tripartite α -catenin/ β -catenin/cadherin complex is vinculin (Rangarajan and Izard, 2013; Choi et al., 2012), which is recruited at sites of force transmission between the actin cytoskeleton and E-cadherin adhesions (le Duc et al., 2010; Yonemura et al., 2010; Thomas et al., 2013). In our conditions, vinculin-GFP did not accumulate at Ncad-Fc micropatterns (**Fig. 5a**), and vinculin-mEOS2 displayed essentially random diffusion (**Fig. 5b**), with no particular confinement at Ncad-Fc micropatterns (**Fig. 5c,d**). In control experiments, vinculin-GFP and vinculin-mEOS2 accumulated at focal contacts in fibroblasts plated on fibronectin, indicating the functionality of these constructs (**Fig. S4**). Thus, it is unlikely that vinculin mediates the linkage between actin and N-cadherin adhesions in growth cones. Instead, it seems that actin itself transits on a second time scale between a flowing state, and a state bound the immobilized N-cadherin/ β -catenin/ α -catenin complex (**Fig. 5e**). Overall, this study demonstrates rapid molecular transitions explaining the differential coupling between the actin motile machinery and trans-membrane adhesions, responsible for growth cone motility.

Materials and Methods

DNA Constructs

The mEos2 fragment was obtained by PCR on PrSet-A mEos2 (Addgene). Chicken N-Cadherin-GFP was described previously (Thoumine et al., 2006). The N-Cadherin-mEos2 construct (Ncad-mEOS2) was generated from Ncad-GFP, replacing GFP by mEos2 using *AgeI/HpaI* insertion sites. The *Xenopus* myc-tagged N-Cadherin deleted of amino acids 33 to 669 in the extracellular domain (Ncad Δ E) was a kind gift of C. Holt (Riehl et al., 1996). Actin-GFP was a gift of A. Matus (Fischer et al., 1998). The human mEos2 actin construct was generated from the actin-GFP construct as described previously (Rossier et al., 2012). Mouse GFP: α -catenin was generously provided by R.M. Mège (Thomas et al., 2013). To produce α -catenin-mEOS2, pcDNA3.1 was first digested by *Bam*HI. Then, a first PCR product was amplified with the primer pair: P1 5'-GGTGTGACCTGATCACCTCTTAAGGGGCCCCCTCGATACTGACGGCA-3' and P2 5'-

TTTCGGTACCTGTCGTAGTGGCCACGGTGGTACTCACGCTAATCCCACACTGGACTAGTG GAGAATCCCCGGGGGAGCTATGACTGCCGT-3' using mouse α E-catenin cDNA as a template. A second PCR product was produced using the primer pair P2 and P3 5'-ACCTAACGGACTGTTACGGTCTGCTAC TAGGCTCGAGCCATGGTTC-3' and mEOS cDNA. Underlined sequences are homologous to pcDNA 3.1 sequences flanking *Bam*HI restriction site. The PCR fragments and the linearized vector were then recombined using the In-Fusion HD Cloning kit (Clontech). The vinculin DNA was obtained by PCR from GFP-vinculin (Galbraith et al., 2002) generously provided by M. Sheetz (Columbia University, New York). Chicken mEos2 vinculin was then obtained by first replacing GFP by mEos2 in pEGFP-C1 (Clontech) at the *AgeI/Bgl*III sites, then inserting the vinculin DNA at *Eco*RI/*Sac*II sites. pEGFP-N1 was from Clontech.

Substrate coating

Micro-patterned 22 mm square glass coverlips 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 μ m diameter separated by 5 μ m, against a uniformly cytophobic environment. Substrates were treated with 40 μ g/ml polylysine (Sigma) which adsorbed to the hydrophilic dots, dried and stored at 4°C. One day before plating cells, a 9:1 ratio of unlabeled and Dylight405-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. Micro-patterned substrates were flipped

onto a 160 µl drop of the antibody mixture on parafilm previously sterilized with UV, and incubated at RT for 4 h. Substrates were then washed with borate buffer and incubated overnight at 4 °C with purified Ncad-Fc (0.04 mg/ml in boric acid, previously centrifuged for 10 min at 14'000 rpm). Substrates were placed into 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). In separate experiments, regular 18 mm glass coverlips were cleaned overnight with 6 M nitric acid, rinsed with de-ionized water, and autoclaved. Coverslips were incubated for 2 hr at 37°C with 1 mg/ml polylysine, then overnight at 4°C with 4 µg goat anti-mouse Fc (Jackson) in 100 µl 0.2 M borate buffer pH = 8.5, and finally 4 hr at room temperature with 0.1-1 µg Ncad-Fc, or 1 µg mouse Fc as a control.

Cell culture and transfection

Hippocampal neurons dissociated from E18 rat embryos as described (Kaech and Banker, 2006), were electroporated using the Amaxa system (Lonza), using 500'000 cells per cuvette. The following plasmid combinations were used: EGFP + actin-mEOS2 (1 µg: 3 µg DNA), EGFP + Ncad-mEOS2 (), actin-mEOS2 + Ncad-DE (). Electroporated neurons were resuspended in MEM-HS and plated on micropatterned substrates at a concentration of 100'000 cells/coverslip. 4-5 hours after plating, substrates were carefully washed with Neurobasal medium (NB) supplemented with B27 (37°C) to remove unattached cells, and medium was replaced with conditioned NB medium (NB + B27 medium previously incubated for 4 days in dishes containing a glial cell layer). In other experiments, neurons were plated at a density of 250'000 cells in 60 mm dishes containing 4 round coverslips uniformly coated coated with Ncad-Fc.

sptPALM experiments

Neurons were observed at DIV2-3, when isolated axonal growth cones can be clearly identified. Coverlips were mounted in an open inox chamber (LSI instruments, Switzerland) placed on the 2D stage of a fully motorized epifluorescence microscope (Nikon Eclipse TiE), equipped with a 100X/1.49 NA objective. A four-colour laser bench (405 nm; 488 nm; 561 nm, and 642 nm, 100 mW each; Roper Scientific) was connected through an optical fiber to the TIRF illumination arm of the microscope. Laser powers were controlled through AOTFs driven by Metamorph. Filter sets were from SemROCK: EGFP (Excitation: FF01-472/30; Dichroic: FF-562Di02; Emission: FF01-593/40); Alexa 568 (Excitation: FF01-543/22; Dichroic FF-495Di02; Emission FF01-520/35); and mEOS2 (Excitation: laser 405/561 nm; Dichroic:

Di01-R561; Emission: FF01-617/73). Cells expressing mEOS2-tagged molecules were detected in the green GFP channel, and individual molecules were detected in the red mEOS2 channel upon illumination with the 561 nm laser, upon simultaneous photo-conversion with a low laser power at 405 nm. This allowed clear identification of a subset of individual molecules over time. Illumination was performed in TIRF mode, allowing visualization of molecules at the ventral surface of the growth cones, where adhesion occurs. Images were captured using an EMCCD camera (Evolve, Roper Scientific). For N-cadherin-mEOS2, α -catenin-mEOS2, and vinculin-mEOS2, images were acquired in stream mode at 50 Hz (20 ms exposure time), so as to capture fast diffusing membrane-associated molecules. For actin-mEOS2, longer exposure times (250 ms) and lower frequency acquisition (1 image every 0.5 s) were chosen to visualize long trajectories reflecting the slow movements of actin filaments, and eliminate the blurry fast movement of freely diffusing monomers (Frost et al., 2010; Tataavarty et al., 2009). In some experiments, 0.2 μ M cytochalasin D (Sigma) was added for 5 min before the recordings.

Trajectory analysis

sptPALM typically provided hundreds of individual trajectories per growth cone. Trajectories above 8 frames (i.e. 4 sec) in regions of interest were reconstructed using home-made algorithms written in Metamorph (Rossier et al., 2012), and the MSD function calculated over time. To classify trajectories, individual MSDs were fitted by the power law $4Dt^\alpha$ (where D is the diffusion coefficient and α is a power exponent between 0 and 2), and the distribution of α exponents was computed. Trajectories with $\alpha < 0.8$ were considered as confined, trajectories with $0.8 < \alpha < 1.2$ were treated as Brownian, and trajectories with $\alpha > 1.4$ were taken as directed. Considering only directed trajectories, we computed a velocity (V) for each trajectory by fitting the MSD with the function $4Dt + V^2t^2$ (Saxton, 1994). The displacement over time was calculated using a routine written in MatLab. Computation of pauses by setting a threshold instantaneous velocity value (30% of the average flow velocity) below which an event was considered as a pause. Events below 1 sec are not significant since they are also detected in regions outside patterns, and can correspond to sideways motion of the molecules, incorrect trajectory reconnection, or non-specific interactions of actin with immobile elements.

Immuno-cytochemistry

Cultures were fixed for 10 min with warm 4% paraformaldehyde- 4% sucrose in PBS, and remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min. Neurons were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, and non-specific binding was blocked with PBS containing 1% BSA (A3059). Cells were incubated for 1 hr at RT in the following primary antibodies: mouse anti-N-cadherin (2 mg/ml, BD Transduction, 610921, 1:200); rabbit anti- α -catenin (C2081, 1:200), or mouse anti-vinculin (CP74, 1:400), followed by incubation with secondary Alexa568-conjugated goat anti-mouse or rabbit antibodies (2 mg/ml, Invitrogen, 1:800) for 30 min at RT. Filamentous actin was stained with phalloidin-Alexa647N (A22287, 1:400), for 30 min at RT. Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem). To estimate the over-expression levels of EOS-tagged molecules, we compared the intensity of fluorescence staining in cells electroporated with EOS-tagged molecules, versus neurons electroporated with EGFP (**Fig. S2**).

References

- 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*. 28:5879–90. doi:10.1523/JNEUROSCI.5331-07.2008.
- Chan, C.E., and D.J. Odde. 2008. Traction dynamics of filopodia on compliant substrates. *Science*. 322:1687–91. doi:10.1126/science.1163595.
- Choi, H.-J., S. Pokutta, G.W. Cadwell, A. a Bobkov, L. a Bankston, R.C. Liddington, and W.I. Weis. 2012. α E-catenin is an autoinhibited molecule that coactivates vinculin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:8576–81. doi:10.1073/pnas.1203906109.
- Czöndör, K., M. Garcia, A. Argento, A. Constals, C. Breillat, B. Tessier, and O. Thoumine. 2013. Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nature communications*. 4:2252. doi:10.1038/ncomms3252.
- Diefenbach, T.J. 2002. Myosin 1c and myosin IIB serve opposing roles in lamellipodial dynamics of the neuronal growth cone. *The Journal of Cell Biology*. 158:1207–1217. doi:10.1083/jcb.200202028.
- 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. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021.
- 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. doi:10.1083/jcb.201001149.
- Evans, E. a, and D. a Calderwood. 2007. Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*. 316:1148–53. doi:10.1126/science.1137592.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2010.05.026.
- Galbraith, C.G., K.M. Yamada, and M.P. Sheetz. 2002. The relationship between force and focal complex development. *The Journal of cell biology*. 159:695–705. doi:10.1083/jcb.200204153.
- Giannone, G., R.-M. Mège, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in cell biology*. 19:475–86. doi:10.1016/j.tcb.2009.07.001.
- Hu, K., L. Ji, K.T. Applegate, G. Danuser, and C.M. Waterman-Storer. 2007. Differential transmission of actin motion within focal adhesions. *Science*. 315:111–5. doi:10.1126/science.1135085.
- Kaech, S., and G. Banker. 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols*. 1:2406–15. doi:10.1038/nprot.2006.356.
- Lin, C.H., E.M. Espreafico, M.S. Mooseker, and P. Forscher. 1997. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *The Biological bulletin*. 192:183–5.
- Lin, C.H., and P. Forscher. 1995a. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron*. 14:763–71.

- Lin, C.H., and P. Forscher. 1995b. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron*. 14:763–71.
- 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.
- 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. doi:10.1038/ncb1367.
- Mendez, P., M. De Roo, L. Poglia, P. Klauser, and D. Muller. 2010. N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *The Journal of cell biology*. 189:589–600. doi:10.1083/jcb.201003007.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1:761–72.
- 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. doi:10.1083/jcb.200406030.
- Rangarajan, E.S., and T. Izard. 2013. Dimer asymmetry defines α -catenin interactions. *Nature structural & molecular biology*. 20:188–93. doi:10.1038/nsmb.2479.
- 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.
- 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 $\beta(1)$ and $\beta(3)$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature cell biology*. 14:1057–67. doi:10.1038/ncb2588.
- Saxton, M.J. 1994. Single-particle tracking: models of directed transport. *Biophysical journal*. 67:2110–9. doi:10.1016/S0006-3495(94)80694-0.
- Schmidt, C.E., J. Dai, D.A. Lauffenburger, M.P. Sheetz, and A.F. Horwitz. 1995. Integrin-cytoskeletal interactions in neuronal growth cones. *The Journal of neuroscience*. 15:3400–7.
- 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. *The Journal of cell biology*. 141:227–40.
- Suter, D.M., and P. Forscher. 2000. Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *Journal of neurobiology*. 44:97–113.
- Suter, D.M., and P. Forscher. 2001. Transmission of growth cone traction force through apCAM-cytoskeletal linkages is regulated by Src family tyrosine kinase activity. *The Journal of cell biology*. 155:427–38. doi:10.1083/jcb.200107063.
- 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. doi:10.1371/journal.pone.0007724.
- Thomas, W. a, C. Boscher, Y.-S. Chu, D. Cuvelier, C. Martinez-Rico, R. Seddiki, J. Heysch, B. Ladoux, J.P. Thiery, R.-M. Mege, and S. Dufour. 2013. α -Catenin and vinculin cooperate to promote high E-cadherin-based adhesion strength. *The Journal of biological chemistry*. 288:4957–69. doi:10.1074/jbc.M112.403774.

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*. 17:862–875. doi:10.1091/mbc.E05-04-0335.

Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*. 123:889–901. doi:10.1016/j.cell.2005.09.020.

Yonemura, S., Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, and M. Shibata. 2010. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology*. 12:533–42. doi:10.1038/ncb2055.

Acknowledgements

We acknowledge RM Mège, PO Strale, MP Sheetz, C. Holt, A. Matus for the generous gift of plasmids, M. Mondin, C. Poujol and S. Marais at the Bordeaux Imaging Center for support in microscopy, O. Rossier and G. Giannone for advice on single molecule tracking, K. Czöndör and A. Azioune for advice on micro-pattern coating, A. Fuchs and M.L. Calvo-Munoz for chip production, B. Tessier, D. Bouchet, C. Breillat, A. Frouin, N. Retailleau for cell culture, and R. Sterling for technical assistance.

This work received funding from the Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale pour la Recherche (grant Synapse-2Dt), Conseil Régional Aquitaine, and Fondation pour la Recherche Médicale.

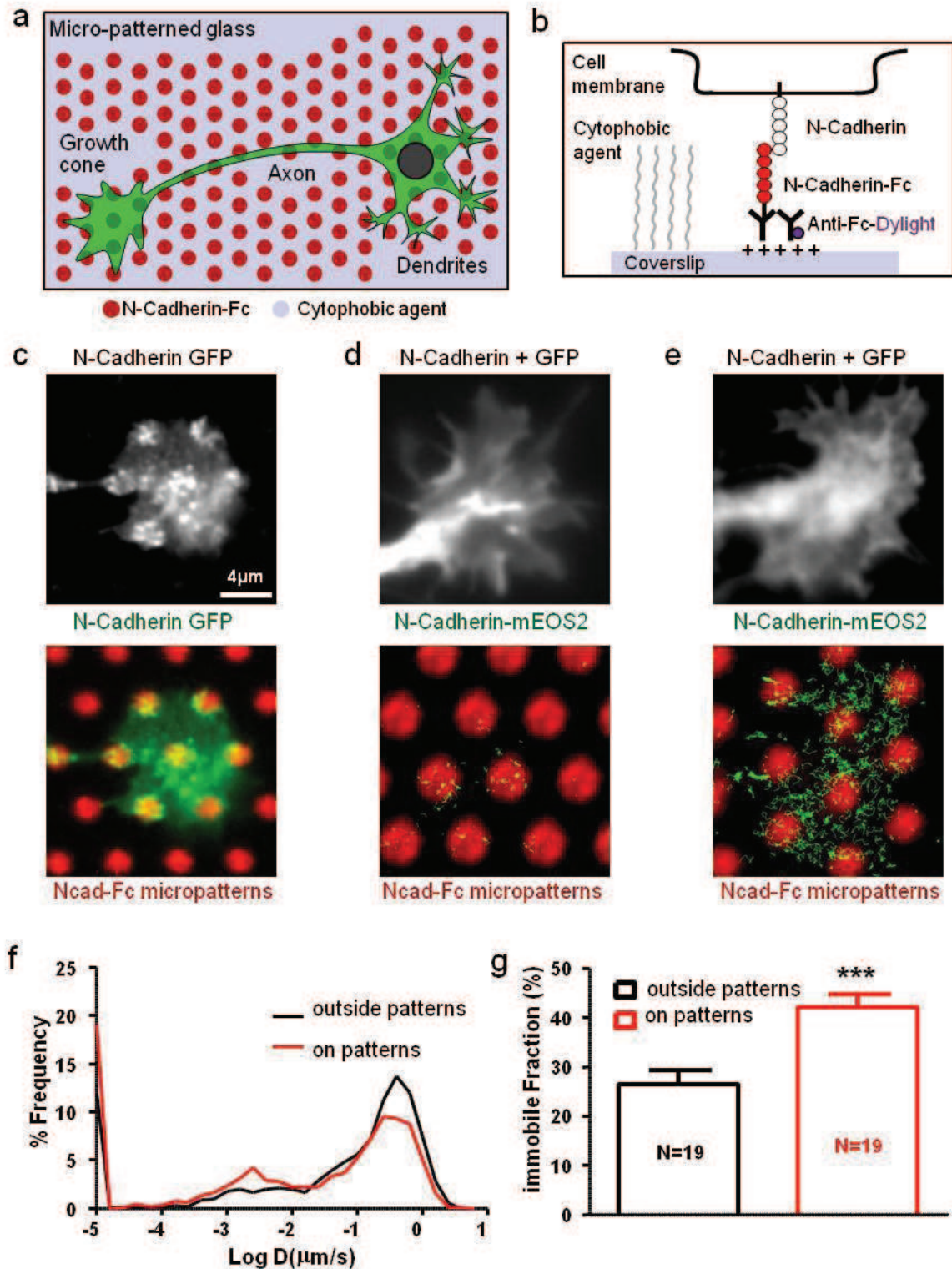


Figure 1. Membrane N-cadherin is confined at Ncad-Fc coated micro-patterns

(a) Top view of the micro-pattern assay. (b) Side view of the N-cadherin homophilic interactions at the micro-patterns. Neurons electroporated with Ncad-GFP or Ncad-mEOS2 were cultured for 2-3 days on Ncad-Fc coated micro-patterned substrates. (c) Growth cone expressing Ncad-GFP (green) on Ncad-Fc coated micropatterns (red). (d, e) Trajectories of individual Ncad-mEOS2 molecules, at two

different magnifications. Distribution of Ncad-GFP in a growth cone migrating on Ncad-Fc coated micro-patterns. **(f)** Distribution of diffusion coefficients of Ncad-mEOS2 on Ncad-Fc micro-patterns or in outside regions. **(g)** Percentage of Ncad-mEOS2 trajectories with $D < 0.01 \mu\text{m}^2/\text{s}$ on micro-patterns or outside regions. Data represent the mean \pm sem of immobile fractions for 19 growth cones (**P < 0.0001 by paired Student's t-test).

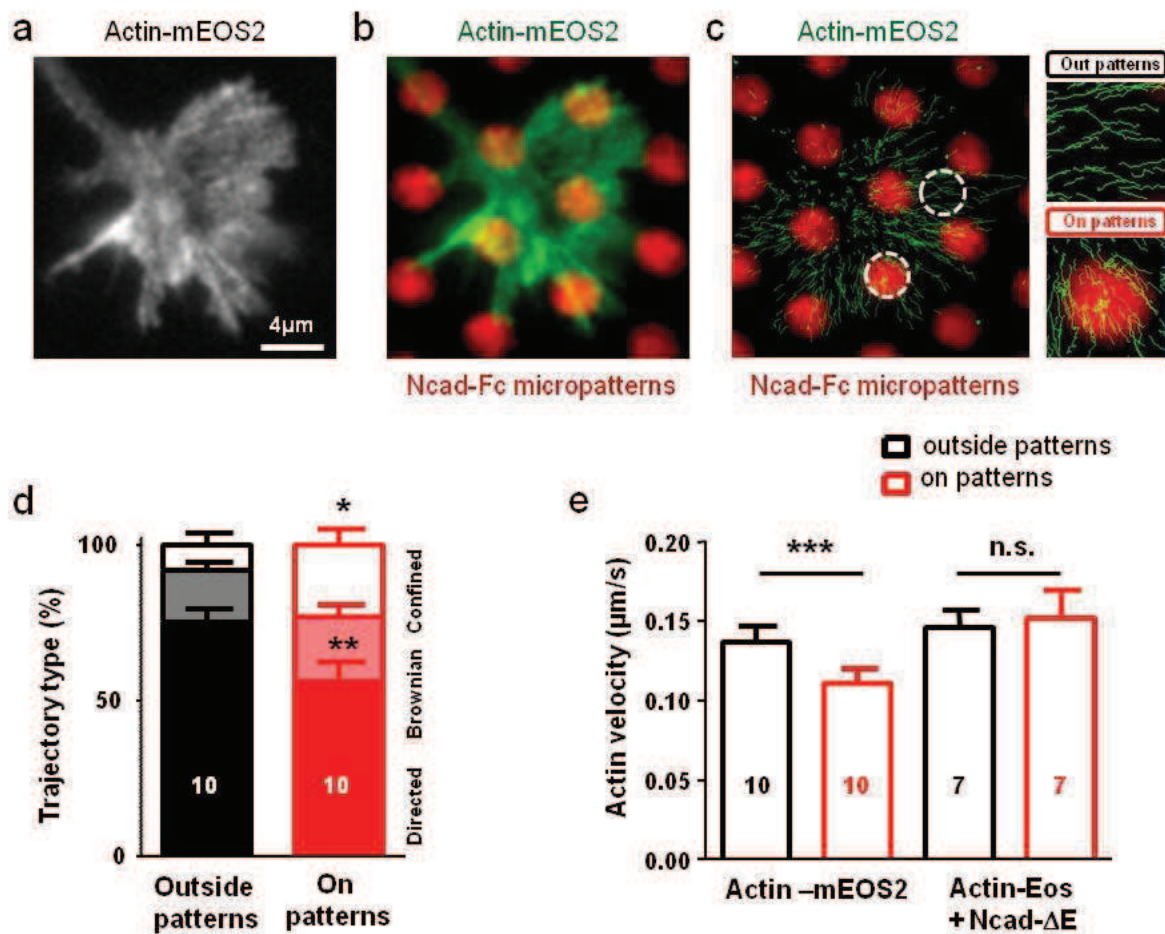


Figure 2. Actin flow is slowed down at N-cadherin-coated micro-patterns

Neurons electroporated with actin-mEOS, or actin-mEOS and Ncad Δ E were cultured for 2-3 days on Ncad-Fc coated micro-patterned or homogeneous substrates. **(a,b)** Localization of actin-mEOS2 in a growth cone migrating on Ncad-Fc coated micro-patterns. **(c)** Trajectories of individual actin-EOS molecules in a growth cone migrating on Ncad-Fc coated micro-patterned substrates, with insets showing micro-patterns and neighbouring non-adhesive regions. **(d)** Distribution of the three types of behaviours (directed, Brownian, and confined), for trajectories outside (black) and inside (red) Ncad-Fc coated micropatterns. Data were compared by paired t-tests (*P =0.04, **P =0.0045). **(e)** Velocity of actin-mEOS2 molecules in growth cones from neurons electroporated with either actin-mEOS alone or actin-mEOS2 plus Ncad- Δ E plated on Ncad-Fc coated micropatterned substrates. Measurements were performed for trajectories exclusively on micropatterns or outside. The mean \pm sem of several

growth cones are shown and the number of growth cones examined is given within each column. Data were compared by paired t-tests (**P = 0.0003).

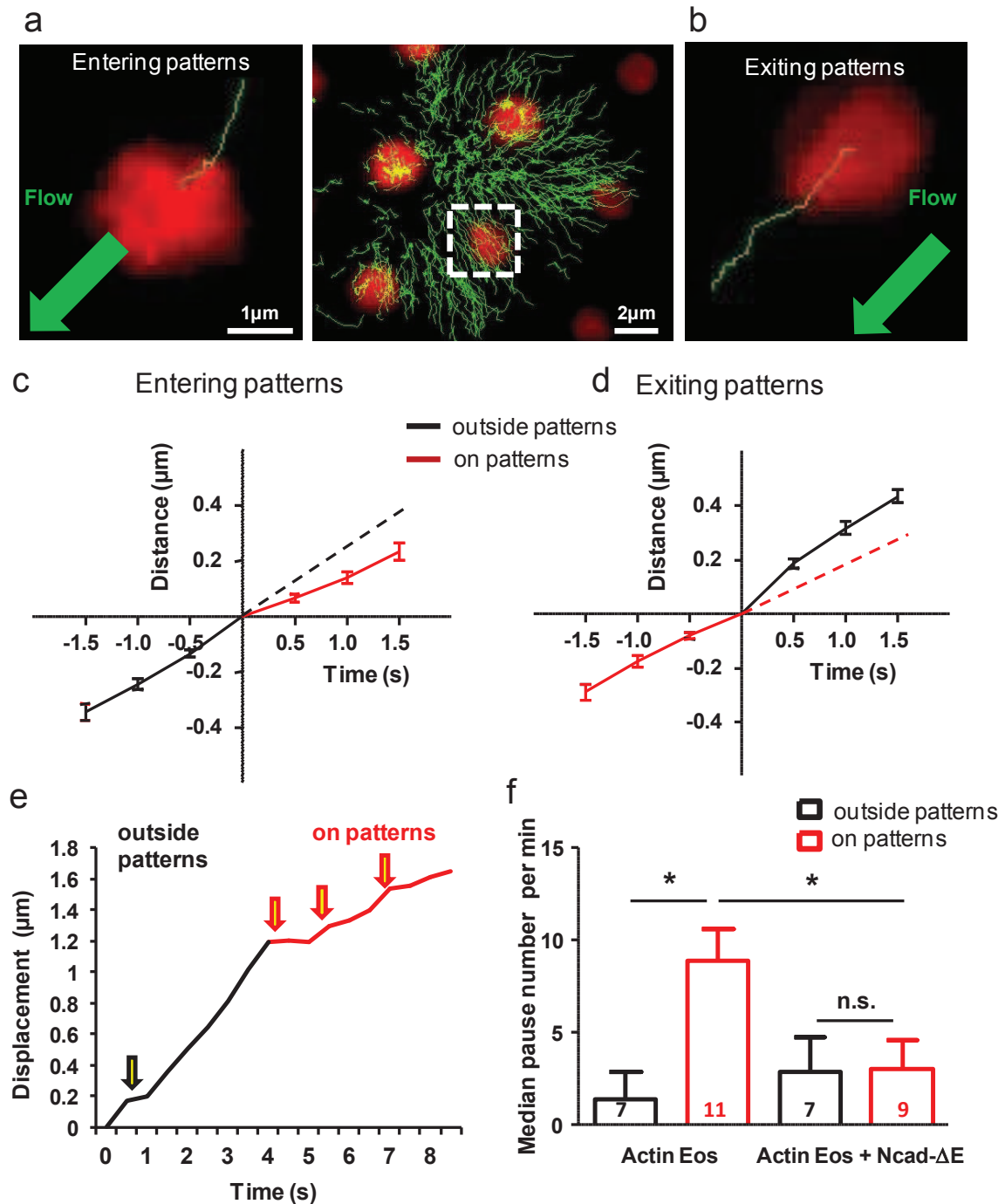


Figure 3. Transient pauses of actin filaments on N-cadherin micro-patterns

(a, b) Examples of actin-mEOS2 trajectories entering and exiting Ncad-Fc coated micropatterns, respectively. (c, d) Graphs showing the displacement versus time of actin-mEOS molecules entering and exiting Ncad-Fc coated micropatterns, respectively. The mean \pm sem of n trajectories are shown in each case. Dashed lines which prolong the initial slopes are a guide to the eye. (e) Individual example showing the displacement of a molecule entering a region coated with N-cad-Fc. Note that the trajectory was fairly linear before entering the region, and showed multiple pauses thereafter. (f)

Median of pause durations, normalized by the total duration of each trajectory, for neurons expressing actin-EOS alone or actin-EOS plus Ncad- ΔE . Data are presented as mean \pm sem of n growth cones (indicated in the columns). Regions within and outside micropatterns were compared by Mann Whitney t-tests (* P <0.05).

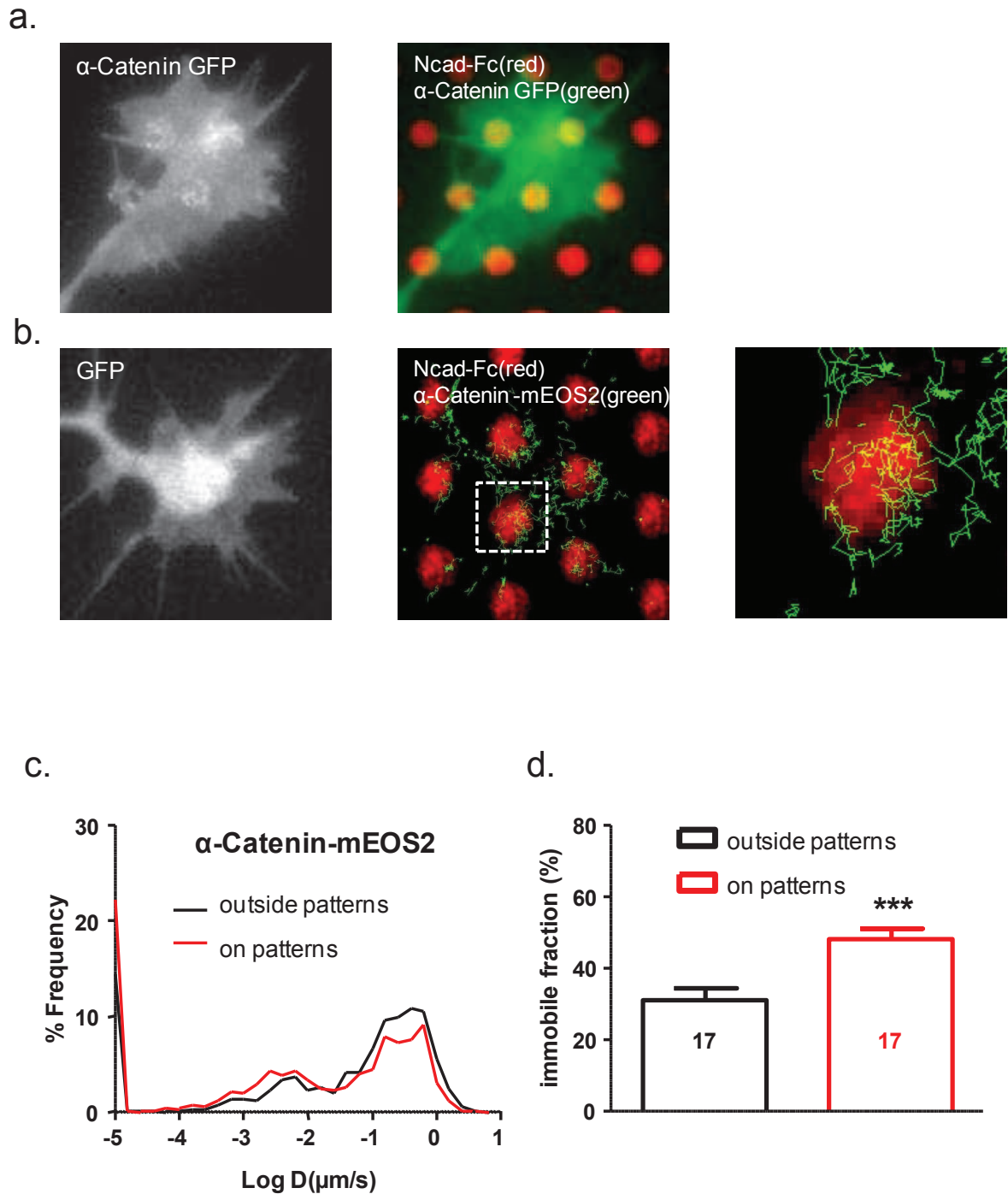


Figure 4. α -catenin immobilization at N-cadherin coated micropatterns

Neurons electroporated with GFP- or mEOS2-tagged α -catenin were cultured for 2 days on Ncad-Fc coated micro-patterned substrates. **(a, b)** Distribution of α -catenin-GFP (green), and trajectories of α -catenin-mEOS2 (green), in growth cones migrating on Ncad-Fc coated micro-patterns (red). **(c, d)** Distribution of diffusion coefficients and corresponding immobile fractions, for α -catenin-mEOS2 molecules inside or outside Ncad-Fc micro-patterns. Data are presented as mean \pm sem of 17 growth cones (as indicated in the columns). Regions within and outside micropatterns were compared by paired t-tests (***) $P < 0.0001$.

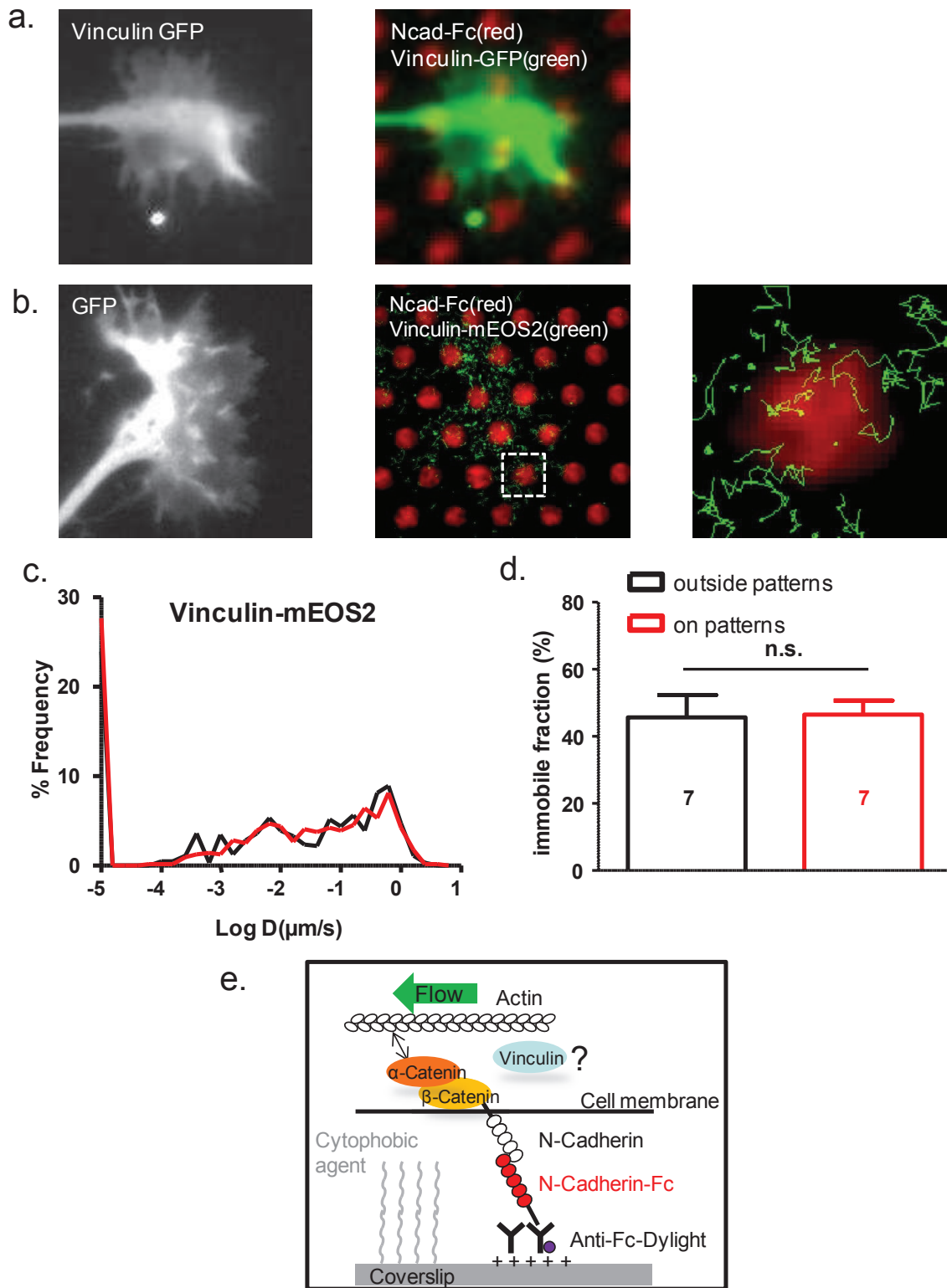
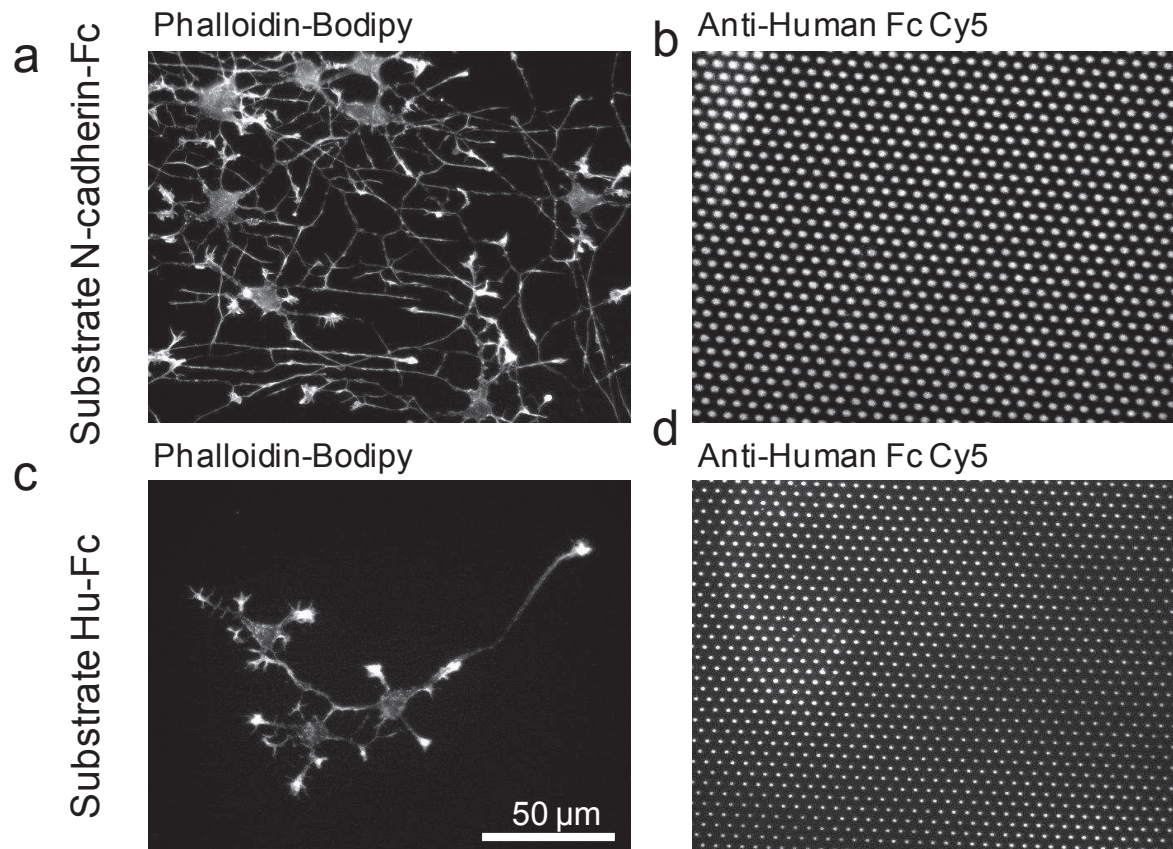


Figure 5. Vinculin behaviour inside and outside N-cadherin coated micropatterns

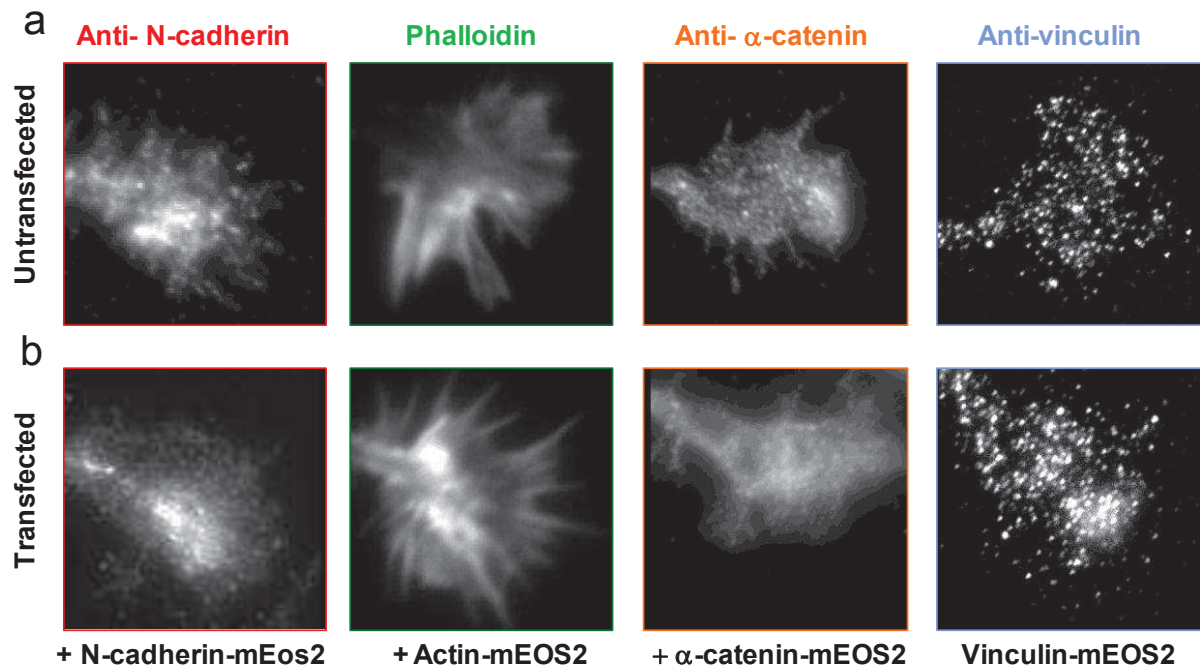
Neurons electroporated with GFP- or mEOS2-tagged vinculin were cultured for 2 days on Ncad-Fc coated micro-patterned substrates. **(a, b)** Distribution of vinculin-GFP (green), and trajectories of vinculin-mEOS2 (green), in growth cones migrating on Ncad-Fc coated micro-patterns (red). **(c, d)** Distribution of diffusion coefficients, and corresponding immobile fractions for vinculin-mEOS2

molecules inside or outside Ncad-Fc micro-patterns. Data are presented as mean \pm sem of 7 growth cones (as indicated in the columns). Regions within and outside micropatterns were compared by paired t-tests (***) $P < 0.0001$). **(e)** Schematic diagram of the molecular interactions at the interface between N-cadherin adhesions and actin flow.

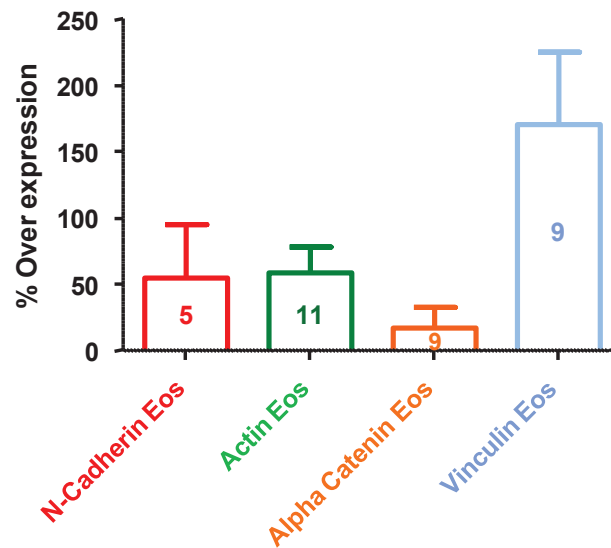


Supplemental Figure 1. Growth and arborization of neurons cultured on micropatterned substrates

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 with phalloidin-Bodipy. (**a, c**) Representative images of the phalloidin staining. (**b, d**) Corresponding Cy5 images showing the patterns.



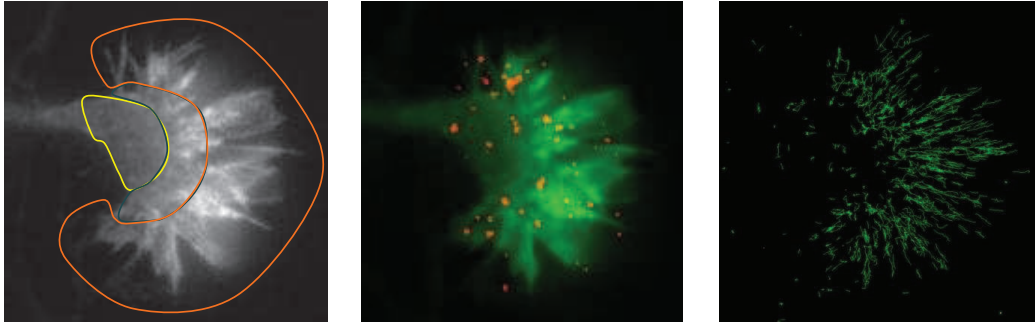
c



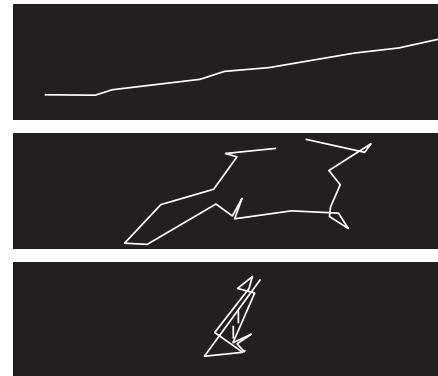
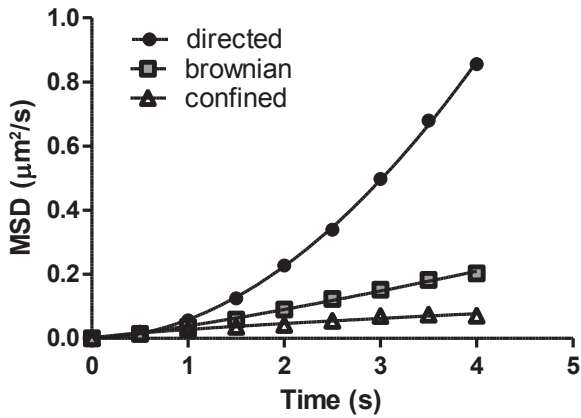
Supplemental Figure 2. Quantification of the over-expression levels of mEOS2-tagged constructs

(a) Untransfected neurons, or (b) neurons electroporated with mEOS2-tagged N-cadherin, actin, α -catenin, and vinculin, were stained for endogenous N-cadherin, actin, α -catenin, and vinculin, respectively, using appropriate primary antibodies (or phalloidin for F-actin). (c) Graph showing the level of staining for each protein normalized by the level of staining in untransfected cells. The number of cells examined per condition is given in each column.

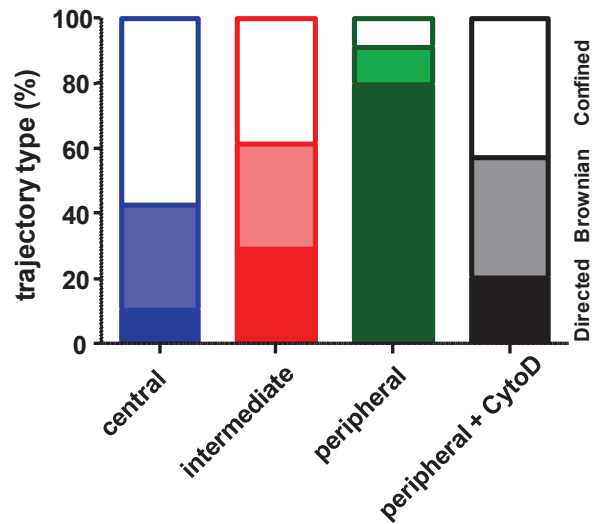
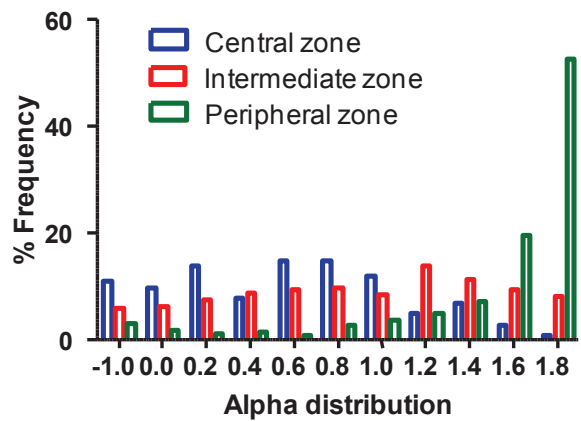
a.



b.



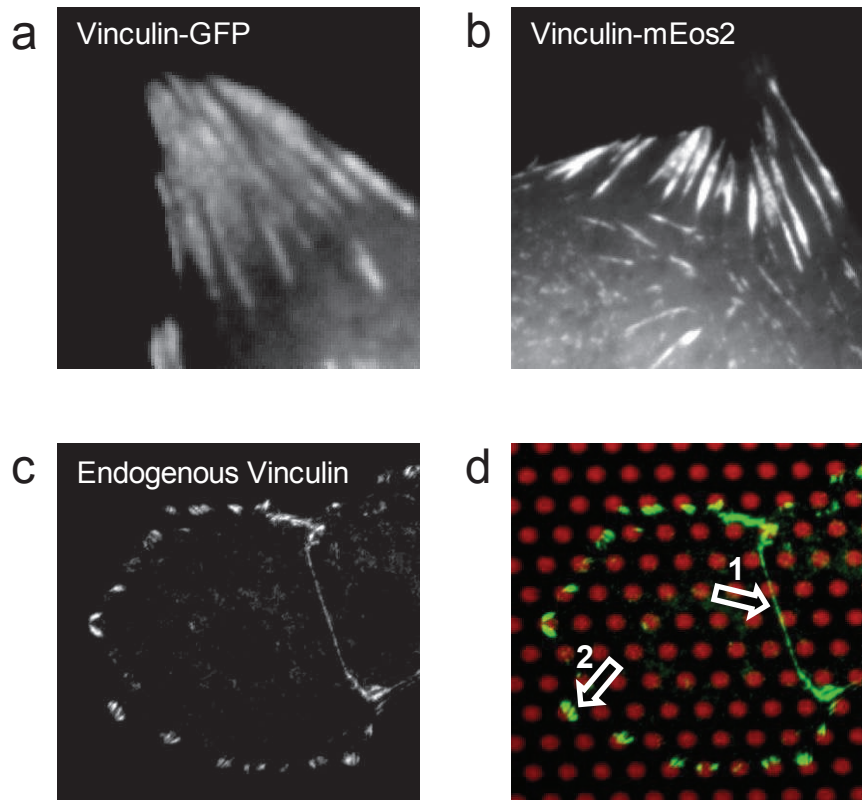
c.



Supplemental Figure 3. Regional differences in actin molecule behaviour within growth cones

(a) Distinction of three different regions (central region, intermediary region, and peripheral region) in a growth cone expressing actin-mEOS2. (b) Corresponding trajectories of single

actin-mEOS molecules. Note very directed motions in the lamellipodial-like peripheral zone, and confined behaviours in the central region. In the intermediary region, actin displayed a mixture of behaviors. **(b, c)** Examples of three different trajectories, with corresponding mean squared displacement (MSD) over time. The plain curves represent fits with the function $MSD = 4Dt^\alpha$, where D is a diffusion coefficient, and α is a power law exponent. **(d)** Distributions of exponents α calculated for trajectories taken in different growth cone regions. **(e)** Repartition of the different types of trajectories in the three growth cone regions.



Supplemental Figure 4. Validation of the vinculin constructs and antibodies in fibroblasts and glial cells.

(a, b) Fibroblasts were electroporated with vinculin GFP or vinculin-EOS, and plated for 4-6 hours on fibronectin-coated glass coverslips, as described (Rossier et al., 2012). Note the accumulation of vinculin-GFP and vinculin-mEOS2 in focal contacts at the periphery of the cells. These results indicate that the vinculin-GFP and vinculin-EOS2 assemble into native vinculin-rich structures in fibroblasts. **(c, d)** Glial cells from neuronal cultures plated on N-cad-Fc coated micro-patterned substrates (red), immunostained with a primary antibody to vinculin (green). Note the accumulation of endogenous vinculin at micropatterns, forming structures resembling focal contacts, and at cell-cell junctions. These images indicate that the primary antibody used to stain vinculin in growth cones does recognize endogenous vinculin in rat glial cells.

Article 2: “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, Grégory Giannone and Olivier Thoumine

A. Contexte et problématique

Les filopodes dendritiques correspondent à de fines extensions membranaires dynamiques impliqués dans la synaptogenèse, ils sont les précurseurs développementaux des épines dendritiques (Ziv et Smith, 1996 ; Mattila et Lappalainen, 2008). La transition entre ces deux structures est sous-tendue par le cytosquelette d'actine et par un ensemble de protéines associées à l'actine (Matus, 2005; Cingolani et Goda, 2008; Hotulainen et Hoogenraad, 2010). Les réarrangements morphologiques des filopodes et des épines sont contrôlés par un important renouvellement du réseau d'actine via un flux rétrograde plus lent que dans le cône de croissance, de l'extrémité jusqu'au cou de l'épine (Honkura et al., 2008 ; Frost et al., 2010; Tataavarty et al., 2012). Les protéines motrices myosines peuvent interagir de façon régulée avec les filaments d'actine, contrôlant ainsi leur contractilité. Cette propriété permet aux myosines de jouer un rôle important dans la motilité ainsi que la morphologie de l'épine (Ryu et al., 2006; Rubio et al., 2011). Les événements de polymérisation/dépolymérisation de l'actine, ainsi que la régulation du flux par la myosine IIB, contrôlent la motilité de l'épine (Tataavarty et al., 2012). Ce mécanisme s'apparente à celui qui a été observé au niveau du cône de croissance (Sutter et Forscher, 1998). Les épines bien que plus petites que les cônes, semblent posséder une machinerie motile semblable. Or il a été montré dans le cône de croissance qu'il existait un couplage mécanique entre le flux rétrograde d'actine et les adhésions N-Cadhérine (Bard et al., 2008). On peut ainsi par extrapolation imaginer un tel mécanisme dans les épines.

Différentes études faites sur la N-cadhérine vont dans ce sens. La perturbation des liaisons homophiliques cadhérines par un peptide inhibiteur augmente la motilité des épines (Mysore et al., 2007). L'inhibition de l'activité N-cadhérine par un dominant négatif affecte la morphologie de l'épine (Togashi et al., 2002). La N-cadhérine joue ainsi un rôle prépondérant dans la stabilisation et l'initiation de la synapse, ainsi que dans la dynamique des épines dendritiques (Elste et Benson, 2006 ; Arikath et Reichardt, 2009; Reinés et al., 2012).

Les caténines, partenaires protéiques des cadhérines pouvant faire le lien avec le cytosquelette d'actine, semblent avoir les mêmes propriétés. En effet, il a été montré que lorsqu'on modifie le niveau d'expression de l' α -caténine, on affecte la motilité, le nombre ainsi que la densité synaptique des épines (Abe et al., 2004). La surexpression de la β -caténine, autre partenaire des cadhérines, augmente l'arborescence dendritique, la densité des filopodes dendritiques ainsi que celle des épines (Yu et Malenka, 2004).

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. Et par analogie au cône de croissance, ces données nous ont amené à émettre l'hypothèse qu'un mécanisme d'embrayage moléculaire entre flux d'actine et adhésions N-cadhérines était impliqué dans la stabilisation du filopode dendritique en épine.

B. Résultats majeurs

Dans cette étude, nous avons tout d'abord utilisé la co-culture de neurones afin de suivre la motilité des filopodes via des neurones transfectés avec l'actine-GFP, et d'observer l'effet que pouvait avoir l'engagement de contacts avec l'axone issus de neurones transfectés RFP. Nous avons montré que lorsque les filopodes sont en contact avec l'axone, leur motilité est diminuée, et parallèlement de l'actine s'accumule à l'extrémité de l'épine. Cette motilité est intermédiaire à celle que nous avons calculée sur les filopodes, plus motiles, et les épines qui sont moins motiles.

Nous avons ensuite utilisés des mutants des N-cadhérines, dont le domaine extracellulaire a été modifié (NcadW2A) ou complètement tronqué (Ncad Δ E) pour empêcher les interactions cadhérines homophiles de l'ectodomaine. Les résultats montrent que ces mutants, notamment Ncad Δ E, perturbent sévèrement le couplage entre les adhésions N-cadhérine et l'actine et augmentent la motilité de l'épine dendritique.

L'activation de la contraction actine/myosine via la calyculine A, induit une rétraction de l'actine de la périphérie vers la base des épines dendritiques, traduisant le couplage mécanique entre ces deux protéines. Cet effet est inhibé par l'expression des mutants N-cadhérine. Ainsi, en plus d'être régulée par l'engagement d'adhésions N-cadhérine, la dynamique des filaments d'actine dépend aussi des forces générées par la myosine. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le réseau d'actine/myosine soit connecté aux adhésions trans-synaptiques N-cadhérine.

La culture de neurones sur substrats micro-imprimés recouverts de N-cadhérine nous a permis d'examiner le rôle de cette protéine dans la maturation du filopode dendritique.

Tandis que des neurones surexprimant la N-cadhérine sauvage (NcadWT) sont capables de former des structures de type épines avec une accumulation d'actine et de N-cadhérine au niveau de la tête en contact avec les micro-motifs, les neurones surexprimant la Ncad Δ E en sont incapables. Ainsi, ces substrats permettent d'observer une maturation morphologique des filopodes dendritiques induite par les adhésions N-cadhérine. Ceci est d'ailleurs confirmé par des expériences de pinces optiques. Des microbilles recouvertes de N-cadhérine ont été placées au contact du filopode dendritique, dans 50% des cas, celles-ci s'échappent du piège optique et ont un mouvement rétrograde montrant un couplage au flux d'actine. Ceci s'accompagne d'une accumulation d'actine et d'une stabilisation du filopode, suggérant la formation d'une structure type épine dendritique.

L'ensemble de ces résultats suggère que l'engagement d'adhésions homophiliques N-cadhérines lors du contact filopode-axone stabilise le flux d'actine par un mécanisme d'embrayage moléculaire, favorisant la maturation du filopode en une structure de type 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}, Grégory 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

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 up to the levels of immature dendritic filopodia. 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 (Ziv and Smith, 1996; Fischer *et al.*, 1998; Korobova and Svitkina, 2010). Dendritic spines grow upon synaptic potentiation and shrink upon synaptic depression (Colicos *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004; Cingolani and Goda, 2008). These morphological rearrangements rely on a dense network of branched actin filaments, whose dynamics is controlled by several actin-binding proteins including capping, nucleating and severing proteins but also small Rho/Rac GTPases (Star *et al.*, 2002; Ackermann and Matus, 2003; Okamoto *et al.*, 2004; Tashiro and Yuste, 2004; Schubert *et al.*, 2006; Korobova and Svitkina, 2010). As a result of this turnover, F-actin slowly flows rearward, from the tip to the neck of the spines (Honkura *et al.*, 2008; Tataavarty *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2010). Spine shape is also influenced by myosins, for example knock-down or pharmacological inhibition of myosin II induces filopodial-like morphologies (Zhang *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2006; Hodges *et al.*, 2011; Rubio *et al.*, 2011). 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), as demonstrated in other motile structures such as growth cones (Medeiros *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2010).

Dendritic spine shape is also regulated by the cadherin/catenin complex (Takeichi and Abe, 2005; Arikath and Reichardt, 2008). 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 (Togashi *et al.*, 2002; Okuda *et al.*, 2007; Mendez *et al.*, 2010). 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 spines 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; Tanaka *et al.*, 2000; Murase *et al.*, 2002; Schuman and Murase, 2003; Tai *et al.*, 2007). 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, the question of 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 micro-patterns, 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

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. Neurons 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 native 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; Izeddin *et al.*, 2011). 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; Korobova and Svitkina, 2010). 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**). Thus, the co-distribution of actin, myosin and N-cadherin within spines 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 subtraction (**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 (0.82) 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 to form homophilic adhesions, thereby acting as competitors of the binding between endogenous N-cadherin and F-actin by sequestering catenin partners (Togashi *et al.*, 2002; Okamura *et al.*, 2004; Bard *et al.*, 2008). 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**). 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 (Zhang *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2006; Rubio *et al.*, 2011) suggested that myosin might exert tension on the actin network, potentially resisted by trans-synaptic N-cadherin adhesions. To further examine the role of N-cadherin adhesion in regulating acto-myosin dynamics in dendritic spines, we treated neurons with calyculin A, a phosphatase inhibitor which enhances myosin contraction and F-actin flow in

keratocytes (Valloiton *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 $\mu\text{m}/\text{min}$ (**Fig. 3b**). This value was about 10 times lower than the typical retrograde actin flow (Honkura *et al.*, 2008; Tatavirt *et al.*, 2009; Frost *et al.*, 2010), 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 ΔE 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 trans-synaptic 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.

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), as described recently (Czöndör *et al.*, 2013). The growth of neurites was guided by the topology of the patterns, reflecting a specific recognition between immobilized Ncad-Fc and endogenous N-cadherin at the neuronal membrane (**Data not shown**).

On Ncad-Fc coated micro-patterns, 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 micro-patterns 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 micro-patterns, 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 micro-patterns 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 micro-patterns 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 micro-patterns, 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 triggering 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 (Honkura *et al.*, 2008; Tataavarty *et al.*, 2009, 2012b; Frost *et al.*, 2010), 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**). 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 rapid actin reorganization and filopodium stabilization.

Discussion

This study demonstrates that a mechanical connection between trans-synaptic N-cadherin adhesions at axon/dendrite contacts and the post-synaptic actin/myosin network, controls dendritic spine morphology and stability. Several pieces of data support this conclusion. First, N-cadherin, myosin II, and F-actin are all present in dendritic spines, with a preference for myosin to be situated downstream of the actin network. This localization suggested that myosin might be pulling on the actin network; indeed, treatment with calyculin A induces a retraction of the actin network from tip to base of the spine, while treatment with blebbistatin induces on the contrary the formation of filopodial-like protrusions (Ryu *et al.*, 2006). Second, the expression of dominant negative N-cadherin constructs drastically increases the motility of dendritic spines to levels comparable to that of filopodia, and inhibits the calyculin-A induced actin retraction. These results suggest that altering the connection between trans-synaptic N-cadherin adhesions and the actin/myosin network decreases dendritic spine stability, associated with a more filopodial phenotype (Togashi *et al.*, 2002; Okamura *et al.*, 2004; Mendez *et al.*, 2010). Third, the engagement of homophilic N-cadherin adhesions using purified N-cadherin immobilized on micro-patterns or microspheres triggered the transition from actively moving dendritic filopodia into stable spines containing a dense actin network.

To interpret these data, we favor the molecular clutch model initially proposed to describe cell locomotion (Mitchison and Kirschner, 1988; Suter and Forscher, 2000), and demonstrated to occur at N-cadherin/actin interface in growth cones from rat hippocampal neurons (Bard *et al.*, 2008). In filopodia not contacting axons, the clutch between N-cadherin adhesions and the actin flow is in a slip mode, associated with fast actin rearward motion and high filopodium motility (**Fig. 6a**). This corresponds to the situation where N-cadherin coated beads in the optical trap are captured by the actin flow and transported from tip to base. Actin-based protrusions and retractions in dendritic filopodia are likely to be dictated by a balance between the rate of actin cytoskeleton assembly at the tip, and retrograde flow (Mallavarapu and Mitchison, 1999). Upon formation of axon/dendrite contacts, the connection between engaged N-cadherin adhesions and actin leads to a reduction of the actin rearward flow, as observed in PALM experiments (Tatavarty *et al.*, 2009, 2012), leading to structural stabilization. Such coupling causes actin polymerization forces to push against the plasma membrane, resulting in filopodia enlargement (**Fig. 6b**). The accumulation of actin at N-cadherin coated microspheres and micro-patterns is reminiscent of that observed in growth cones upon restraining Ncad-Fc beads with a microneedle (Bard *et al.*, 2008), and

may be associated to the force-dependent recruitment of the Arp2/3 complex at cadherin adhesions (Verma *et al.*, 2012). The clutch concept thus explains the positive relationship between spine stability and size observed in optical tweezers experiments, and also documented previously (Okamura *et al.*, 2004; Mendez *et al.*, 2010).

The effects of non-adhesive N-cadherin mutants (Ncad Δ E and NcadW2A) on spine motility and myosin-driven actin contraction, indicates that the connection between N-cadherin adhesions and actin involves intracellular catenin partners. 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). α -catenin may also bind actin indirectly through vinculin, a protein which is recruited at cadherin junctions in a force-dependent manner (le Duc *et al.*, 2010; Yonemura *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2013). The mechanical connection between N-cadherin and actin may involve signaling molecules, including the small GTPases Rac-1, which controls the anchoring of N-cadherin to the actin flow in myogenic cells (Lambert *et al.*, 2002), and 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). Indeed, afadin was shown 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 clutch concept may also explain the spine morphological changes driven by synaptic activity (Giannone *et al.*, 2009). Long term potentiation causes spine enlargement, with concomitant increases in F-actin content (Dillon and Goda, 2005; Okamoto *et al.*, 2004; Star *et al.*, 2002). Interestingly, the cessation of F-actin flow upon synaptic activation (Honkura *et al.*, 2008), may reflect clutch engagement between N-cadherin at the periphery of the post-synaptic density (PSD) (Uchida *et al.*, 1996) and actin filaments (Lin *et al.*, 1995). This may involve regulation of the affinity of β -catenin for cadherin by phosphorylation through the Cdk5 kinase (Schuman and Murase, 2003). The constant push of polymerizing filaments against the plasma membrane on each sides of the PSD, would then increase spine width. Inversely, long term synaptic depression protocols induce spine shrinkage by reducing F-actin content (Dillon and Goda, 2005). One can imagine that a reduced engagement between N-cadherin adhesions and the actin network increases rearward flow and lower net polymerization, inducing spine shrinkage. Indeed, blocking neural activity

suppresses the synaptic accumulation of α N-catenin (Abe *et al.*, 2004), and LTD-like protocols acting on glutamate receptors delocalize RhoA, decrease its activity and induce dendritic spine collapse, possibly through a regulation of cadherin affinity (Schubert *et al.*, 2006).

Overall, the mechanical connection between N-cadherin adhesions and the actin/myosin network revealed here is likely to play an important role in regulating spine morphology in the developing and mature nervous system.

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'CTAGTCTAGATCCATGTGCCGATAGCGGG3'. 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'CGCGGATCCCCGTCATCACCTCCACCGTAC3'. 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 (Ncad Δ E) 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'GATTGGAGGGATAACCGCGTCTCTTCTGTC TC 3'.

To produce α -catenin–mEOS2, pcDNA3.1 was first digested by BamHI. Then, a first PCR product was amplified using the primer pair: P1 5'-GGTGTGACCTGATCACCTCTTAAGGGGCCCCCTCGATACTGACGGCA-3' and P2 5'-TTTCGGTACCTGTCGTAGTGGCCACGGTGGTACTCACGCTAATTCCCACACTGGACTAGTGGAGAATTCCCCGGGGGAGCTATGACTGCCGT-3' using mouse α E-catenin cDNA as a template. A second PCR product was produced using the primer pair P2 and P3 5'-ACCTAACGGACTGTTACGGTCTGCTAC TAGGCTCGAGCCATGGTTC-3' and mEOS cDNA. Underlined sequences are homologous to pcDNA 3.1 sequences flanking BamHI restriction site. The PCR fragments and the linearized vector were then recombined using

the In-Fusion HD Cloning kit (Clontech). 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 $\mu\text{g/ml}$ 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 0.004 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 250'000 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 3 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 30 min 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 (Biopetechs). 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 S490/20 nm, dichroic 86100bs, emission S528/38 nm; TRITC: excitation S555/28 nm, dichroic 101848, emission S617/73; Cy5: excitation S635/20, dichroic 101848, emission S685/40 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, 4.5×10^7 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).

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., Chisaka, O., Van Roy, F., and Takeichi, M. (2004). Stability of dendritic spines and synaptic contacts is controlled by alpha N-catenin. *Nature Neuroscience* 7, 357–363.
- Ackermann, M., and Matus, A. (2003). Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nature Neuroscience* 6, 1194–1200.
- Arikkath, J., and Reichardt, L. F. (2008). Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends in Neurosciences* 31, 487–494.
- Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mège, R.-M., Choquet, D., and Thoumine, O. (2008). A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *The Journal of Neuroscience* 28, 5879–5890.
- Bozdagi, O., Shan, W., Tanaka, H., Benson, D. L., and Huntley, G. W. (2000). Increasing Numbers of Synaptic Puncta during Late- Phase LTP: N-Cadherin Is Synthesized , Recruited to Synaptic Sites , and Required for Potentiation. 28, 245–259.
- Cingolani, L. a, and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nature Reviews. Neuroscience* 9, 344–356.
- Colicos, M., Collins, B., Sailor, M., and Goda, Y. (2001). Remodeling of synaptic actin induced by photoconductive stimulation. *Cell* 107, 605–616.
- Czöndör, K., Garcia, M., Argento, A., Constals, A., Breillat, C., Tessier, B., and Thoumine, O. (2013). Micro-patterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nature Communications in press*.
- Dillon, C., and Goda, Y. (2005). The actin cytoskeleton: integrating form and function at the synapse. *Annual Review of Neuroscience* 28, 25–55.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W. J., and Weis, W. I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell* 123, 903–915.
- Le Duc, Q., Shi, Q., Blonk, I., Sonnenberg, A., Wang, N., Leckband, D., and de Rooij, J. (2010). Vinculin potentiates E-cadherin mechanosensing and is recruited to actin-anchored sites within adherens junctions in a myosin II-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* 189, 1107–1115.
- Elia, L. P., Yamamoto, M., Zang, K., and Reichardt, L. F. (2006). p120 catenin regulates dendritic spine and synapse development through Rho-family GTPases and cadherins. *Neuron* 51, 43–56.
- 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.

- Giannone, G., Mège, R.-M., and Thoumine, O. (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in Cell Biology* 19, 475–486.
- Hodges, J. L., Newell-Litwa, K., Asmussen, H., Vicente-Manzanares, M., and Horwitz, A. R. (2011). Myosin IIb activity and phosphorylation status determines dendritic spine and post-synaptic density morphology. *PLoS One* 6, e24149.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., and Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719–729.
- Ibarretxe, G., Perrais, D., Jaskolski, F., Vimenev, A., and Mulle, C. (2007). Fast regulation of axonal growth cone motility by electrical activity. *The Journal of Neuroscience*: the Official Journal of the Society for Neuroscience 27, 7684–7695.
- 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.
- Korobova, F., and Svitkina, T. (2010). Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis Farida Korobova and Tatyana Svitkina. 21, 165–176.
- Maiden, S. L., and Hardin, J. (2011). The secret life of α -catenin: moonlighting in morphogenesis. *The Journal of Cell Biology* 195, 543–552.
- Mallavarapu, A., and Mitchison, T. (1999). Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *The Journal of Cell Biology* 146, 1097–1106.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761–766.
- Medeiros, N. a, Burnette, D. T., and Forscher, P. (2006). Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature Cell Biology* 8, 215–226.
- Mendez, P., De Roo, M., Poglia, L., Klauser, P., and Muller, D. (2010). N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *The Journal of Cell Biology* 189, 589–600.
- Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–772.
- Murase, S., Mosser, E., Schuman, E. M., and Hhmi, C. (2002). Depolarization Drives N^{L} -Catenin into Neuronal Spines Promoting Changes in Synaptic Structure and Function. 35, 91–105.
- Mysore, S. P., Tai, C.-Y., and Schuman, E. M. (2007). Effects of N-cadherin disruption on spine morphological dynamics. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 1, 1.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nature Neuroscience* 7, 1104–1112.

Okamura, K., Tanaka, H., Yagita, Y., Saeki, Y., Taguchi, A., Hiraoka, Y., Zeng, L.-H., Colman, D. R., and Miki, N. (2004). Cadherin activity is required for activity-induced spine remodeling. *The Journal of Cell Biology* *167*, 961–972.

Okuda, T., Yu, L. M. Y., Cingolani, L. a, Kemler, R., and Goda, Y. (2007). beta-Catenin regulates excitatory postsynaptic strength at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 13479–13484.

Perret, E., Leung, A., Feracci, H., and Evans, E. (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*, 16472–16477.

Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G. B., Cornel, E., Lilienbaum, a, and Holt, C. E. (1996). Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* *17*, 837–848.

Rubio, M. D., Johnson, R., Miller, C. a, Haganir, R. L., and Rumbaugh, G. (2011). Regulation of synapse structure and function by distinct myosin II motors. *The Journal of Neuroscience*: the Official Journal of the Society for Neuroscience *31*, 1448–1460.

Ryu, J., Liu, L., Wong, T. P., Wu, D. C., Burette, A., Weinberg, R., Wang, Y. T., and Sheng, M. (2006). A critical role for myosin IIb in dendritic spine morphology and synaptic function. *Neuron* *49*, 175–182.

Schubert, V., Da Silva, J. S., and Dotti, C. G. (2006). Localized recruitment and activation of RhoA underlies dendritic spine morphology in a glutamate receptor-dependent manner. *The Journal of Cell Biology* *172*, 453–467.

Schuman, E. M., and Murase, S. (2003). Cadherins and synaptic plasticity: activity-dependent cyclin-dependent kinase 5 regulation of synaptic N-catenin – cadherin interactions. *749–756*.

Star, E. N., Kwiatkowski, D. J., and Murthy, V. N. (2002). Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nature Neuroscience* *5*, 239–246.

Suter, D. M., and Forscher, P. (2000). Substrate – Cytoskeletal Coupling as a Mechanism for the Regulation of Growth Cone Motility and Guidance ABSTRACT:

Tai, C.-Y., Mysore, S. P., Chiu, C., and Schuman, E. M. (2007). Activity-Regulated N-Cadherin Endocytosis. *Neuron* *54*, 771–785.

Takeichi, M., and Abe, K. (2005). Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends in Cell Biology* *15*, 216–221.

Tanaka, H., Shan, W., Phillips, G. R., Arndt, K., Bozdagi, O., Shapiro, L., Huntley, G. W., Benson, D. L., and Colman, D. R. (2000). Molecular Modification of N-Cadherin in Response to Synaptic Activity. *25*, 93–107.

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. *Molecular and Cellular Neurosciences* *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. *Molecular Biology of the Cell* 23, 3167–3177.
- 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.
- Thomas, W. a *et al.* (2013). α -Catenin and vinculin cooperate to promote high E-cadherin-based adhesion strength. *The Journal of Biological Chemistry* 288, 4957–4969.
- Togashi, H., Abe, K., Mizoguchi, A., Takaoka, K., Chisaka, O., and Takeichi, M. (2002). Cadherin Regulates Dendritic Spine Morphogenesis. *35*, 77–89.
- Trojanovsky, R. B., Sokolov, E., and Trojanovsky, S. M. (2003). Adhesive and Lateral E-Cadherin Dimers Are Mediated by the Same Interface. *23*, 7965–7972.
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K. R., Wheelock, M. J., and Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *The Journal of Cell Biology* 135, 767–779.
- Vallotton, P., Gupton, S. L., Waterman-Storer, C. M., and Danuser, G. (2004). Simultaneous mapping of filamentous actin flow and turnover in migrating cells by quantitative fluorescent speckle microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9660–9665.
- Verma, S., Han, S. P., Michael, M., Gomez, G. a, Yang, Z., Teasdale, R. D., Ratheesh, A., Kovacs, E. M., Ali, R. G., and Yap, A. S. (2012). A WAVE2-Arp2/3 actin nucleator apparatus supports junctional tension at the epithelial zonula adherens. *Molecular Biology of the Cell* 23, 4601–4610.
- Wilson, C. a, Tsuchida, M. a, Allen, G. M., Barnhart, E. L., Applegate, K. T., Yam, P. T., Ji, L., Keren, K., Danuser, G., and Theriot, J. a (2010). Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmill through network disassembly. *Nature* 465, 373–377.
- Yamada, S., Pokutta, S., Drees, F., Weis, W. I., and Nelson, W. J. (2005). Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell* 123, 889–901.
- Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A., and Shibata, M. (2010). α -Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature Cell Biology* 12, 533–542.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2004). Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nature Reviews. Neuroscience* 5, 24–34.
- Zhang, H., Webb, D. J., Asmussen, H., Niu, S., and Horwitz, A. F. (2005). A GIT1 / PIX / Rac / PAK Signaling Module Regulates Spine Morphogenesis and Synapse Formation through MLC. *25*, 3379–3388.
- Zhou, Q., Homma, K. J., and Poo, M. (2004). Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. *Neuron* 44, 749–757.

Ziv, N. E., and Smith, S. J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91–102.

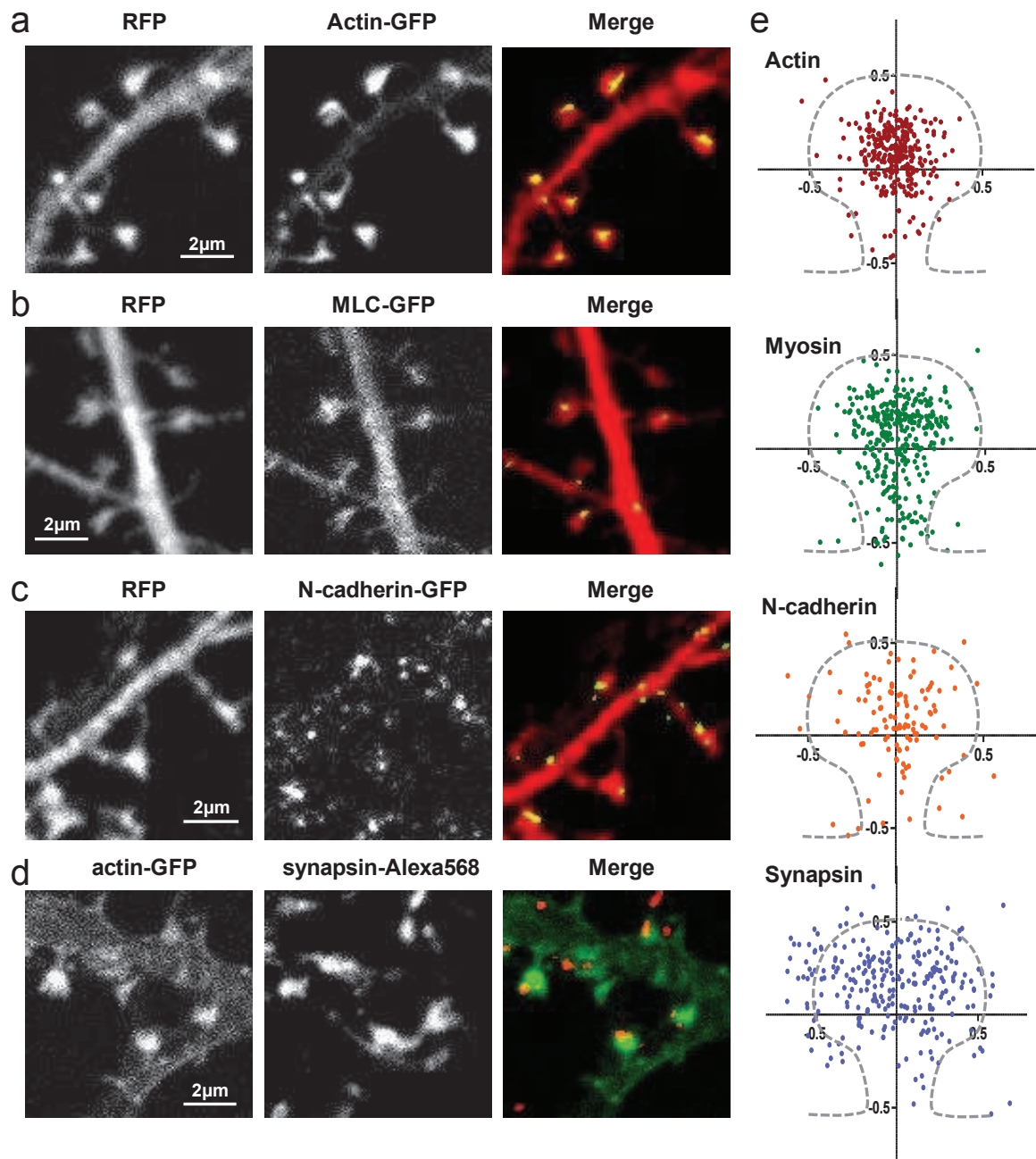


Figure 1. Distribution of N-cadherin, actin and myosin within dendritic spines

(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 (***) $P < 0.005$.

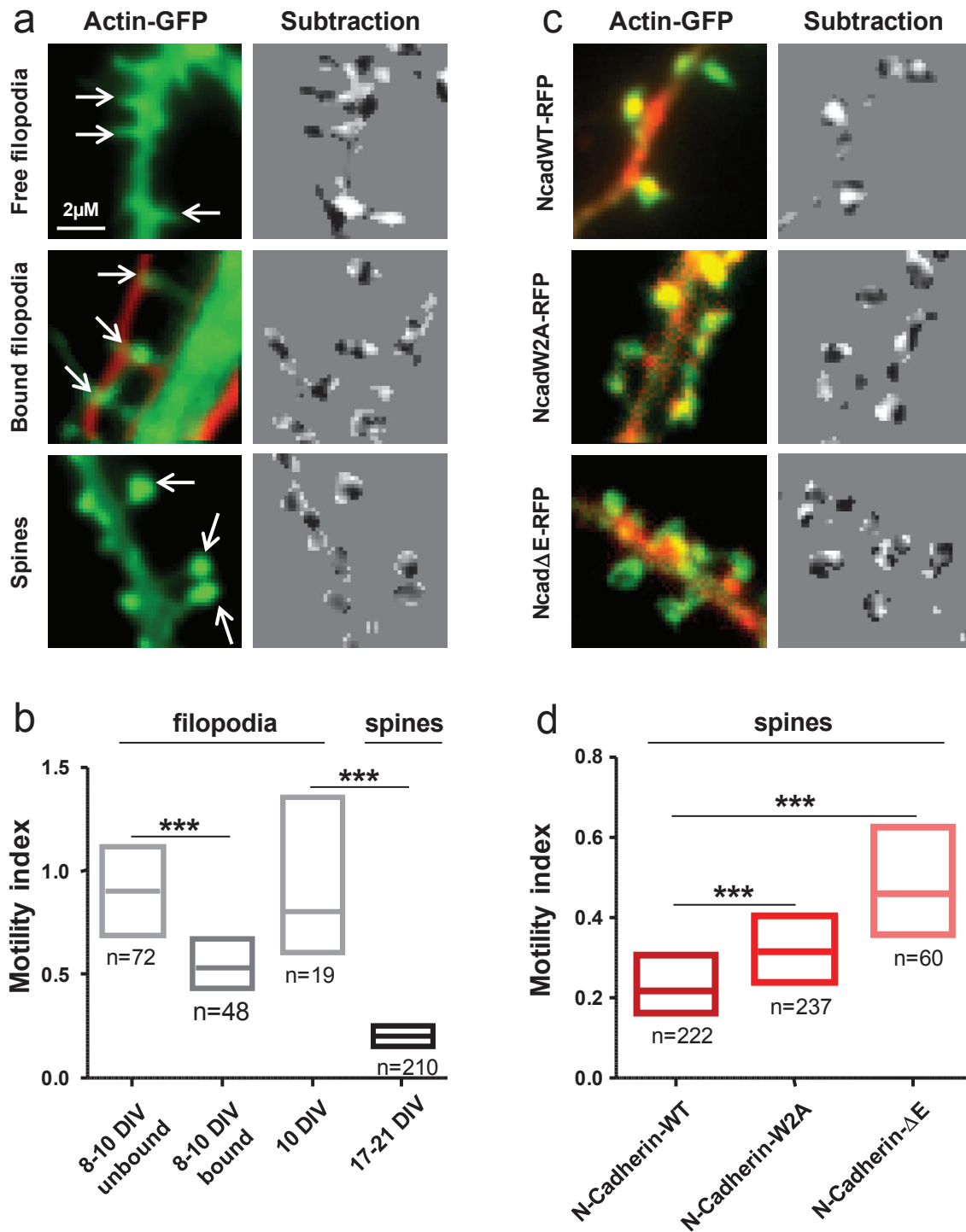


Figure 2. Altering the linkage between N-cadherin and F-actin increases spine motility

(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 (***) $P < 0.005$).

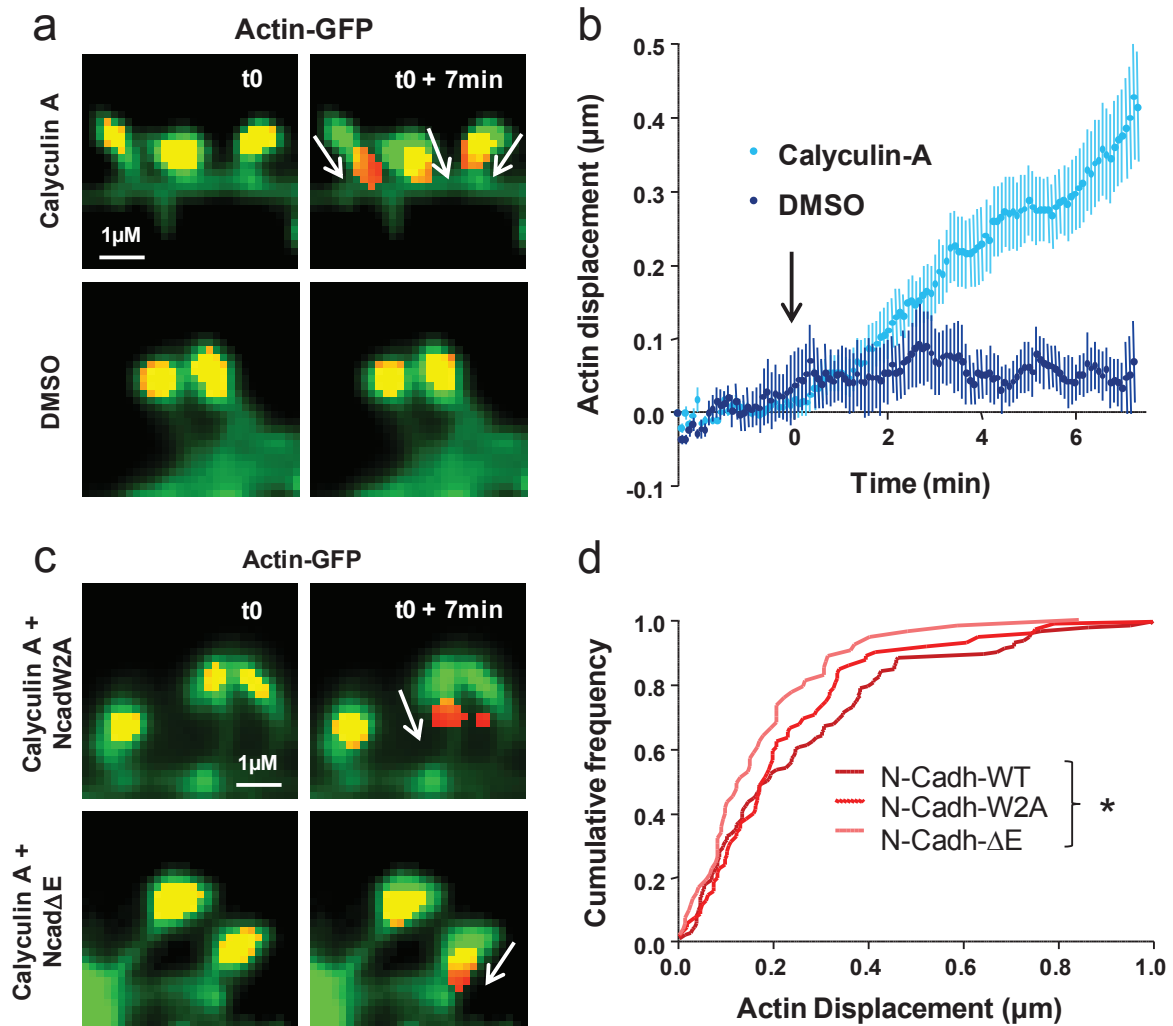


Figure 3. Stimulating myosin contractility induces actin retraction, to a level inversely related to actin/N-cadherin coupling

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.

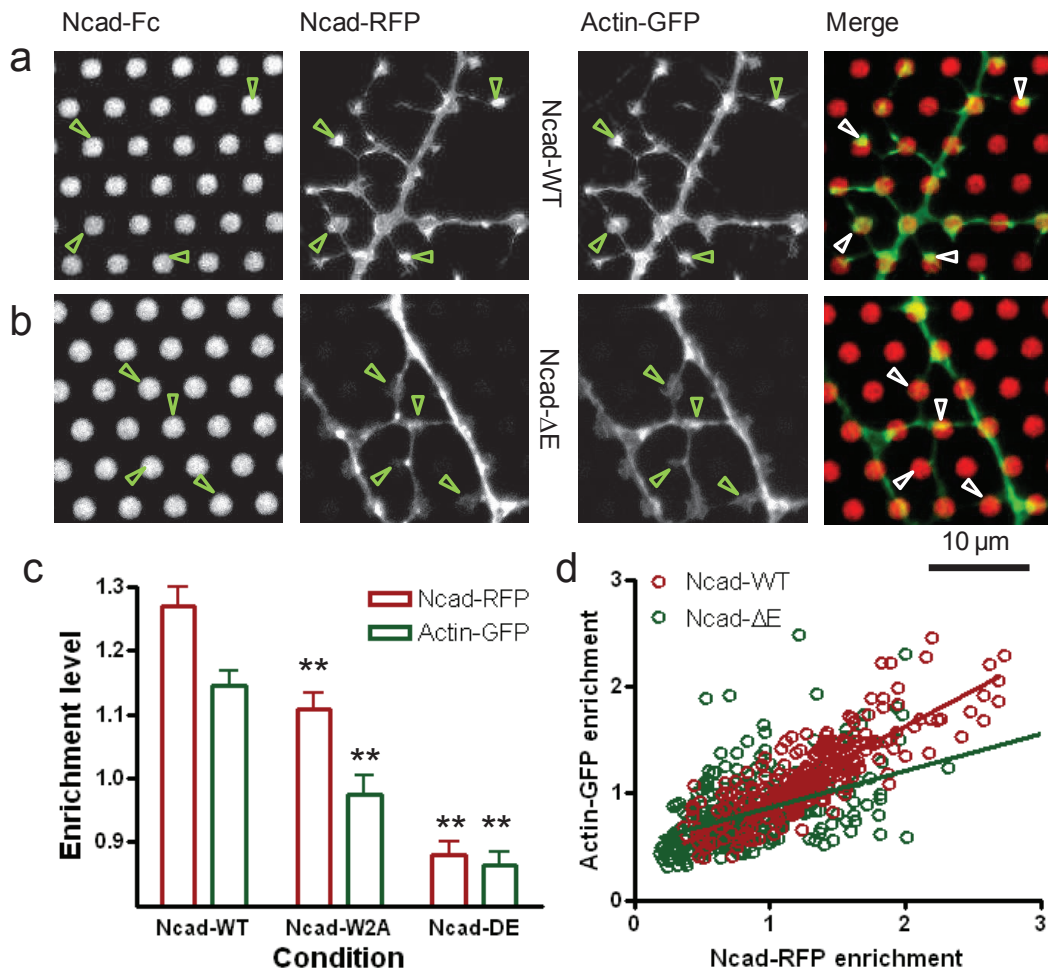


Figure 4. Formation of actin-rich dendritic filopodia in contact with Ncad-Fc coated micropatterns

Neurons were cultured on micropatterned substrates containing a hexagonal array of 2 μm 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 ΔE -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 ΔE 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 ΔE -RFP (4 cells in each condition). (d) Plot of actin-GFP versus Ncad-RFP signals for the NcadWT and Ncad ΔE conditions, respectively. The correlation coefficients were $r = 0.83$ for NcadWT ($P < 0.0001$, $n = 257$ dots) and $r = 0.45$ for Ncad ΔE ($P < 0.0001$, $n = 291$ dots).

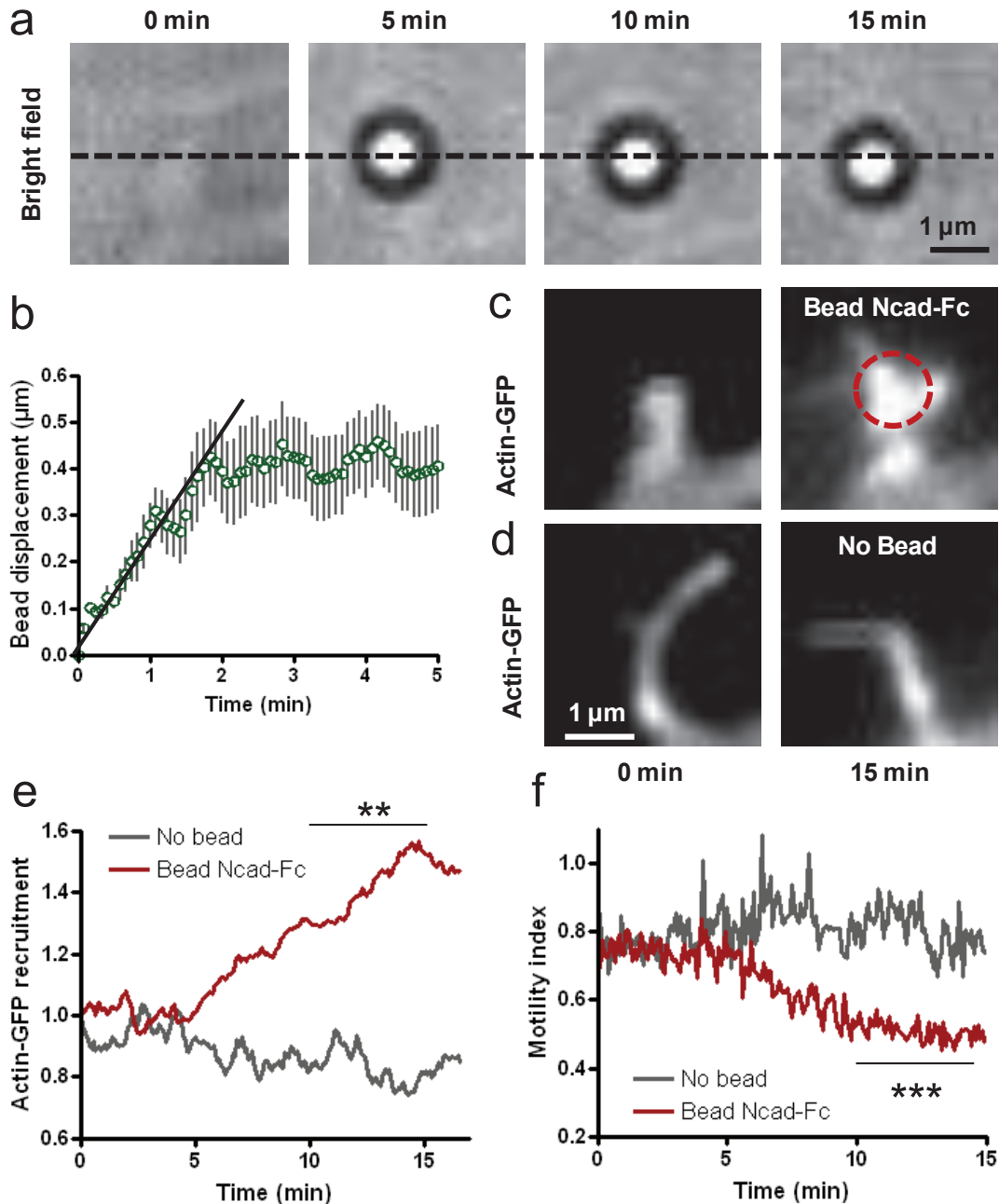


Figure 5. Challenging N-cadherin adhesions with Ncad-Fc coated beads stimulates actin recruitment and stabilizes filopodia

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. (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 (** $P < 0.01$; *** $P < 0.002$).

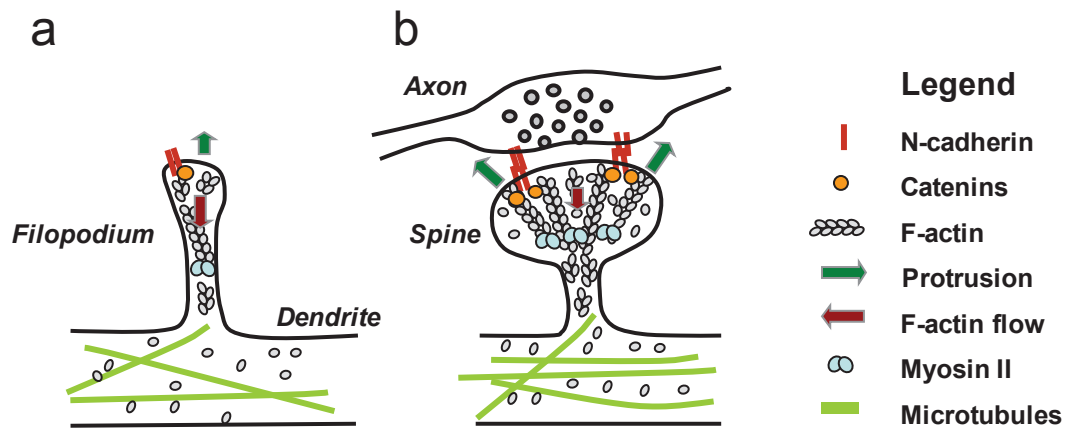
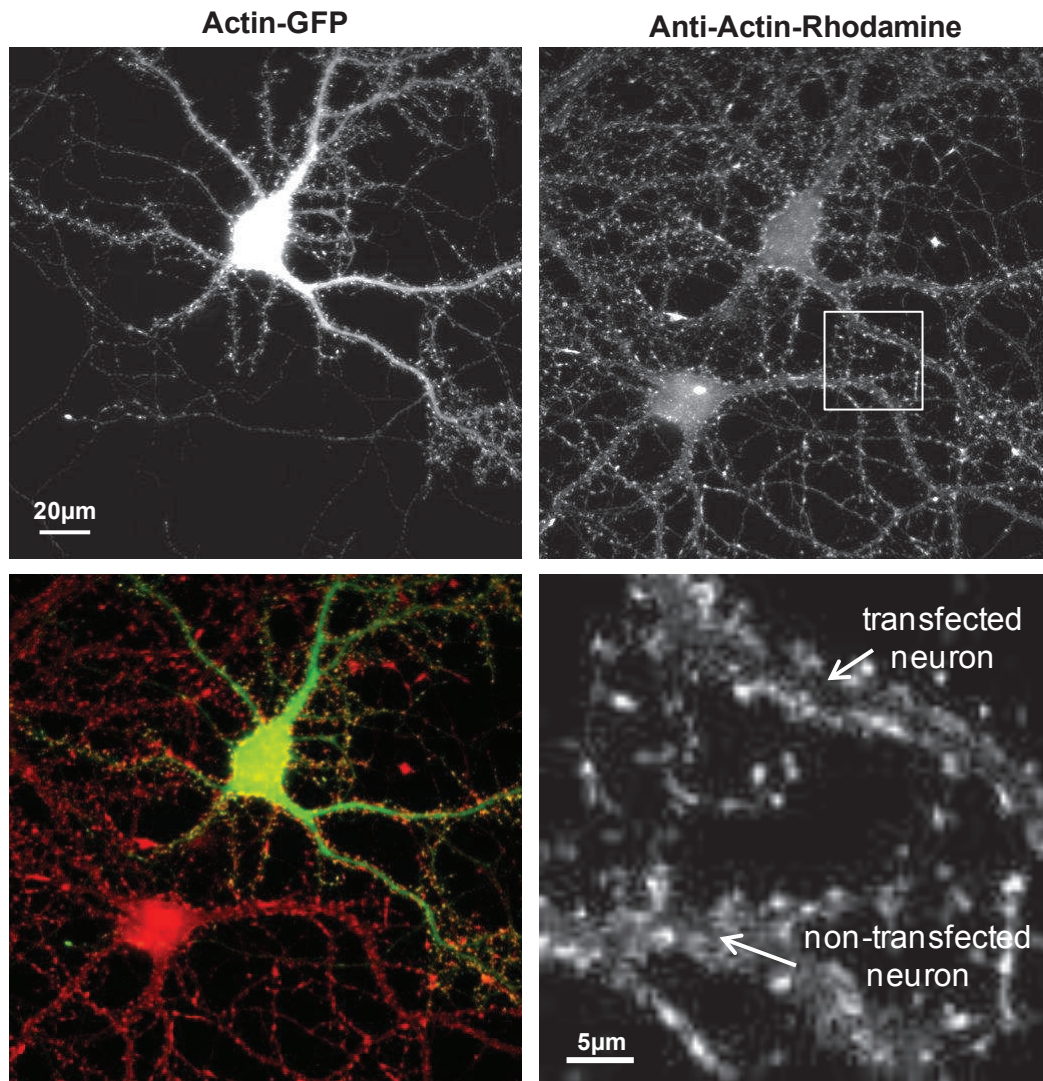


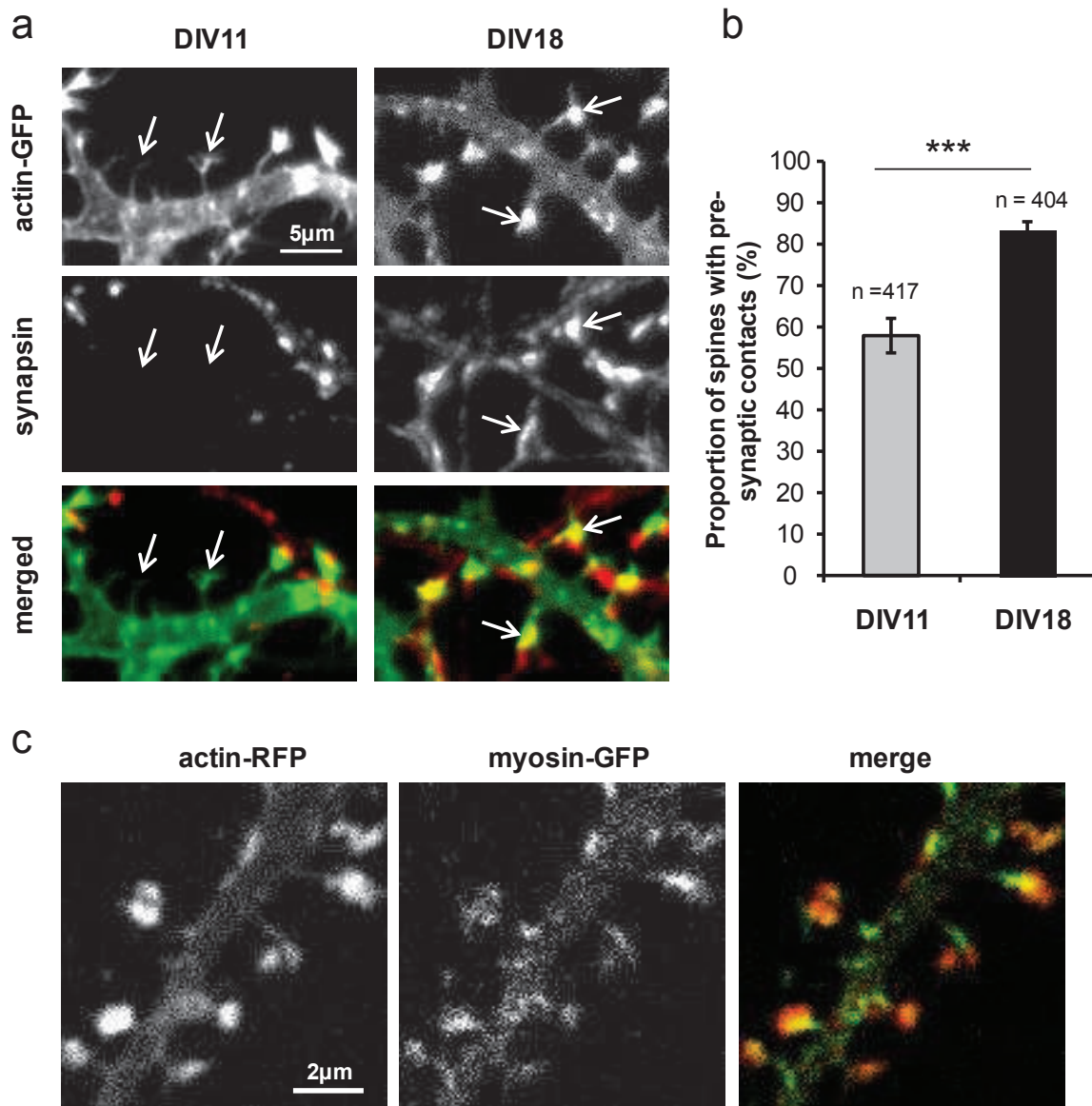
Figure 6. Model of clutch engagement at dendritic filopodia and spines

(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.



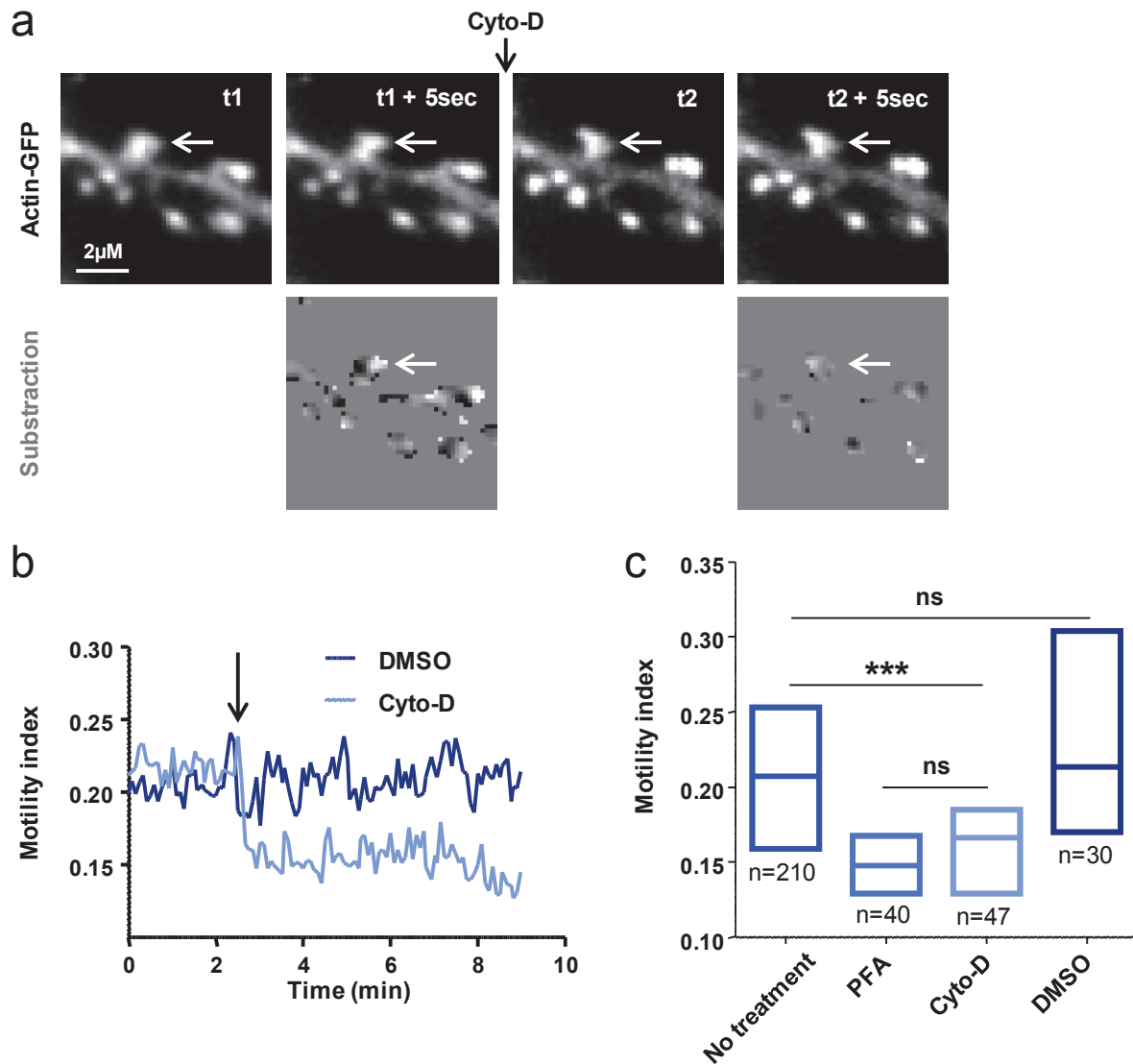
Supplemental Figure 1. Quantification of actin over-expression level

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 (***) $P < 0.005$.

Article 3: “Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation”.

Auteurs: Katalin Czöndör, Mikaël Garcia, Amélie Argento, Audrey Constals, Christelle Breillat, Béatrice Tessier and Olivier Thoumine

A. Contexte et problématique

La synaptogenèse est un processus complexe qui se déroule au niveau des zones de contacts inter-neuronaux. Cet événement est initié par des protéines d'adhésion spécifiques, créant un lien physique entre compartiments pré et post synaptiques, et se poursuit par le recrutement de complexes macromoléculaires protéiques comprenant des récepteurs, des protéines d'échafaudage associées, ainsi que le cytosquelette (Friedman et al., 2000).

Différentes protéines d'adhésion ont été identifiées dans la formation de synapses, telles que la N-cadhérine, la neurexine, la neuroligine, ou encore SynCam. Nous savons que neurexine et neuroligine jouent un rôle important dans la fonction synaptique et dans la synaptogenèse (Bang et Owczarek, 2013). En effet, l'utilisation de billes de latex recouvertes de Nr $x1\beta$ en contact avec les dendrites a permis de montrer l'induction de post-synapses recrutant PSD-95, récepteurs NMDA et GABA (Graf et al., 2004). De même, dans des modèles de co-culture, des axones se développant au contact de cellules non neuronales exprimant la Nlg1 forment des pré-synapses fonctionnelles (Scheiffele et al., 2000). Ainsi, neurexine et neuroligine sont dites synaptogènes, c'est-à-dire qu'elles peuvent à elles seules induire la formation de synapses (Scheiffele et al., 2000; Graf et al., 2004). Pour sa part, Syncam peut former des interactions homo ou hétérophiles, elle est impliquée dans la croissance axonale ainsi que dans la différenciation pré-synaptique mais pas post-synaptique (Biederer et al., 2002 ; Breillat et al., 2007, Robbins et al., 2010 ; Stagi et al., 2010). Contrairement au complexe Nr x /Nlg et à Syncam, la N-cadhérine n'induit pas de différenciation synaptique (Sara et al., 2005), elle est cependant impliquée dans la croissance dendritique et axonale ainsi que dans la plasticité synaptique (Riehl et al., 1996, Bozdagi et al., 2010).

Malgré ces avancées, l'examen approfondi de la fonction et de la dynamique des diverses protéines d'adhésion au sein de la synapse reste compliqué. Nous sommes limités par le fait que la synaptogenèse est un processus aléatoire et imprédictible. Ajouté à cela,

différents systèmes d'adhésions coexistent en parallèles au sein de la synapse, avec des profils développementaux variés, rendent difficile la compréhension de l'apport individuel de chaque mécanisme. Différents outils biomimétiques ont été développés afin d'essayer de contrôler la formation de synapses. Notamment des techniques de co-culture, de réticulation via des anticorps ou des micro-billes (Scheiffele et al., 2000; Dean et al., 2003). Les techniques de billes permettent un contrôle spatial mais avec un rendement faible ; alors que la co-culture ainsi que la réticulation permettent d'augmenter le nombre de synapses mais avec une distribution aléatoire. Il existe donc une réelle nécessité de développer de nouveaux outils permettant l'induction robuste, sélective et ciblée de la formation de synapses, associé à la génération de statistiques importantes.

Nous avons ainsi exploité les propriétés connues, et précédemment détaillées, de différentes molécules d'adhésion afin de tester un nouvel outil permettant de contrôler la formation temporelle et spatiale de synapses. Cet outil correspond à des substrats dotés de miro-motifs régulièrement espacés, recouverts spécifiquement de N-cadhérine, Nr_x ou SynCam, qui nous ont permis d'étudier individuellement le rôle de chacune de ces molécules dans le développement et la fonction synaptique. J'ai pour ma part contribué à cette étude en testant la protéine d'adhésion N-cadhérine.

B. Résultats majeurs

Nos résultats montrent que des motifs microstructurés de 1-2 μm de diamètre, régulièrement espacés de 5 μm permettent l'attachement et la croissance de neurones. Lorsque ces motifs sont recouverts de neurexine 1- β , les neurones transfectés avec la neuroligine présentent un profil de croissance particulier comparés aux contrôles, avec une arborescence dendritique guidée par la topologie des motifs. Cet effet est spécifique aux dendrites ce qui est en accord avec l'expression somato-dendritique de la Neuroligine. De plus, en utilisant divers anticorps et protéines marqués, nous avons mis en évidence l'accumulation spécifique de neuroligine ainsi que de la PSD-95, un marqueur post-synaptique, au niveau des motifs recouverts de neurexine1- β . Ces résultats semblent indiquer l'induction spécifique de post synapses excitatrices au niveau des points recouverts de neurexine1- β . Afin de savoir si ces héli-synapses ainsi induites étaient actives, nous avons eu recours à des expériences de « décageage » de glutamate au moyen d'un laser bi-photon. Les réponses calciques observées au cours de ces expériences semblent indiquer le recrutement de récepteurs glutamatergiques fonctionnels au niveau d'héli synapses actives.

Lorsque les motifs sont recouverts de SynCam1, celle-ci recrute spécifiquement la protéine SynCam1 endogène présente dans les neurones, et ce sans surexpression

contrairement à la neuroligine. La molécule SynCam induit la formation de pré synapses, observables par l'accumulation de synapsine au niveau des zones recouvertes de SynCam1. Ces pré-synapses sont actives, comme le révèle le recyclage actif de la synaptotagmine qui co-localise avec les puncta de synapsines décrits précédemment. Par contre il n'y a pas d'accumulation spécifique de PSD-95 sur les motifs recouverts de SynCam1 au niveau des dendrites, montrant que l'effet synaptogène de SynCam est plus marqué au niveau pré-synaptique que post-synaptique.

Mon travail a consisté à utiliser la N-cadhérine en tant que contrôle afin de valider l'ensemble de ces résultats. Les motifs recouverts de cadhérine accélèrent la croissance de l'arborisation dendritique ainsi que celle de l'axone. La N-cadhérine endogène s'accumule sur les zones d'adhésions montrant la mise en place d'interactions homophiliques, sans pour autant induire de différenciation synaptique spécifique à ce niveau. Ces résultats sont en accord avec la littérature et montrent que la N-cadhérine n'est pas synaptogène à proprement parler (Scheiffele et al., 2000 ; Linhoff et al., 2009)

Nous avons ainsi développé un nouveau type de substrat permettant la croissance neuronale, l'induction ciblée et sélective de la formation d'hémi-synapses, l'étude de diverses protéines d'adhésion, et ce avec un fort rendement statistique.

ARTICLE

Received 26 Apr 2013 | Accepted 5 Jul 2013 | Published 12 Aug 2013

DOI: 10.1038/ncomms3252

Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation

Katalin Czöndör^{1,2}, Mikael Garcia^{1,2,3}, Amélie Argento³, Audrey Constals^{1,2}, Christelle Breillat^{1,2}, Béatrice Tessier^{1,2} & Olivier Thoumine^{1,2}

Studying the roles of different proteins and the mechanisms involved in synaptogenesis is hindered by the complexity and heterogeneity of synapse types, and by the spatial and temporal unpredictability of spontaneous synapse formation. Here we demonstrate a robust and high-content method to induce selectively presynaptic or postsynaptic structures at controlled locations. Neurons are cultured on micropatterned substrates comprising arrays of micron-scale dots coated with various synaptogenic adhesion molecules. When plated on neurexin-1 β -coated micropatterns, neurons expressing neuroligin-1 exhibit specific dendritic organization and selective recruitment of the postsynaptic scaffolding molecule PSD-95. Furthermore, functional AMPA receptors are trapped at neurexin-1 β dots, as revealed by live-imaging experiments. In contrast, neurons plated on SynCAM1-coated substrates exhibit strongly patterned axons and selectively assemble functional presynapses. N-cadherin coating, however, is not able to elicit synapses, indicating the specificity of our system. This method opens the way to both fundamental and therapeutic studies of various synaptic systems.

¹University of Bordeaux, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France. ²CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France. ³CYTOO SA, Minatoc, F-38000 Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to O.T. (email: othoumin@u-bordeaux2.fr).

The assembly of the myriad of synapses between neurons during development of the central nervous system represents a pivotal process, which determines the generation, maintenance and function of neural circuitries. At the level of individual axon/dendrite contacts, synaptogenesis is a complex multi-step process initiated by specific adhesion proteins and followed by the recruitment of scaffold molecules and functional receptors^{1,2}. Several adhesion molecules have been implicated in these processes, including ephrins, cadherins, neurexins (Nrxs), neuroligins (Nlgs), SynCAMs and leucine-rich repeat transmembrane molecules (LRRTMs)^{3–5}. Studying the respective roles of these different proteins and the dynamics of the mechanisms involved in synaptogenesis is highly hindered by the complexity and heterogeneity of synapse types, and by the spatial and temporal unpredictability of spontaneous synapse formation. Thus, the development of simplified experimental systems is highly needed to isolate the role of specific adhesion molecules in synapse assembly for both fundamental and therapeutic approaches.

Among adhesion molecules, Nrxs and Nlgs are critically involved in synapse formation, differentiation and validation^{4,6}. Moreover, pathological mutations in their genes are related to autism, X-linked mental retardation and schizophrenia in humans⁵. Nrxs and Nlgs bind to each other through high-affinity recognition between their ectodomains⁷, thus forming a bridge between pre- and postsynaptic membranes, and serving as synaptic organizing complex via intracellular interactions. At the presynaptic level, Nrxs bind the multimodal scaffolding protein CASK and are involved in presynaptic function⁴. At the postsynaptic level, Nlgs bind molecules, including PSD-95 or gephyrin^{8,9}, serving as scaffolds for the recruitment of glutamate and GABA (γ -aminobutyric acid) receptors, respectively^{9–12}. Importantly, in biomimetic systems like co-cultures or microspheres, Nlgs and Nrxs have the ability to elicit functional pre- and postsynapses, respectively, in contacting primary neurons^{10–15}. Furthermore, overexpressing Nlgs in cultured neurons increases the number and size of synapses, whereas downregulation of Nlgs reduces synapse numbers^{16–19}. Besides Nrxs and Nlgs, SynCAMs represent another family of synaptic organizers. SynCAMs are immunoglobulin cell adhesion molecules that are able to form both homophilic and heterophilic interactions, and connect intracellularly with PDZ and FERM domain-containing proteins^{20–24}. The ability of SynCAMs to trigger synaptic specialization was demonstrated using both knock-out mice and cell culture assays^{20–24}.

Given the diversity in the families, isoforms and splice variants of adhesion molecules potentially implicated in synapse formation, a system allowing high-content screening of synapse formation and function by triggering interaction between specific adhesion molecules would be a valuable tool. The existing biomimetic assays, including beads and co-cultures, are not optimal for such purposes, because of the random distribution of hemisynapses and contamination by endogenous synapses between neurons. To overcome these difficulties, we developed a robust method to spatially control synaptic differentiation, by culturing neurons on micropatterned substrates comprising arrays of individual micron-scale dots coated with N-cadherin, SynCAM1 or Nrx1 β , proteins that triggered neuronal development and selective differentiation of functional excitatory pre- or postsynapses, respectively. Considering the simple coating protocol, this assay can be adapted to a wide range of other neuronal adhesion proteins, thus opening the way to the targeted and selective study of the mechanisms underlying synapse formation with unprecedented spatial resolution and statistical production. Moreover, because of its simple design, it can be used with various microscopy techniques and for screening of pharmaceutical compounds modulating synaptogenesis.

Results

Neuronal growth on Nrx1 β -coated micropatterned substrates.

To allow the precise formation of hemisynapses at regular locations, we cultured primary hippocampal neurons on specifically designed micropatterned substrates containing a hexagonal array of chemically activated dots (1.5 μ m in diameter, separated by 5 μ m), surrounded by a non-adhesive background (Fig. 1a,b). In a first series of experiments, the dots were specifically coated with recombinant Fc-tagged Nrx1 β (Nrx1 β -Fc). Nrx1 β adsorption was made via Cy5-labelled anti-Fc secondary antibodies, allowing both proper orientation of the adhesive ectodomain and fluorescent visualization of micropatterns. Neurons plated on Nrx1 β -coated micropatterned substrates underwent similar developmental stages as described for regular hippocampal cultures grown on homogeneously coated glass coverslips coated with Poly-L-Lysine (PLL)²⁵ (Supplementary Fig. S1). These results indicated that this array of proteins over a cytophobic background did not alter the growth of neurons, in comparison with continuous surfaces classically used for neuronal cultures.

Neurons were transfected with HA-tagged Nlg1, or enhanced green fluorescent protein (EGFP) as a control, 3 days after plating and were allowed to grow for up to 10 days. Cells were either fixed and immunofluorescently stained for Nlg1, PSD-95, or AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate) receptors (AMPA), or alternatively used in live-imaging assays. Neurons expressing Nlg1 exhibited strikingly patterned arborizations in comparison with non-transfected cells, reflecting specific recognition between immobilized Nrx1 β -Fc and Nlg1 present at the neuronal membrane (Fig. 1c). Specifically, the growth of neurites was guided by the topology of the patterns, the overall organization looking like a subway map. Dendrites of neurons expressing Nlg1 grew preferentially along the lines of the Nrx1 β -Fc-coated dots and invaded them to a much higher extent than axons (Supplementary Fig. S2a–c), consistent with Nlg1 being mainly expressed in the somato-dendritic compartment. As a control, neurons plated on micropatterned substrates coated with human Fc did not develop as well as on Nrx1 β -Fc-coated substrates, and the dendritic patterning was not observed even in Nlg1-expressing neurons, revealing specificity of the ligand (Supplementary Fig. S2f). The patterning effect was also less obvious in EGFP-expressing neurons grown on Nrx1 β -Fc-coated micropatterns (Supplementary Fig. S2d–f), indicating that endogenous Nlg1 levels did not accommodate for the large excess of exogenous Nrx1 β ligands on micropatterns. When looking at higher magnification, we often observed structures resembling dendritic spines, with a neck originating from dendritic shafts and a head making specific contacts with neighbouring Nrx1 β -Fc-coated dots, eventually allowing branching between dendrites (Fig. 1d). Thus, by perfectly controlling the adhesive reactivity of the micropatterns, this system induces a directed spreading of the dendritic arbour and selective morphological differentiation of dendrites, mimicking native synaptic structures.

Specific induction of excitatory postsynaptic assembly. To determine whether this system could further elicit excitatory postsynapse assembly, we examined the accumulation of the postsynaptic proteins Nlg1 and PSD-95 at micropatterns (Fig. 2 and Supplementary Fig. S3). We calculated an enrichment index for PSD-95 and Nlg1 by using immunofluorescence images, and compared the level of enrichment in the presence of the Nrx1 β -Fc/Nlg1 interaction and in control conditions, where one of the partners was omitted. Nlg1 and PSD-95:EGFP, as well as endogenous PSD-95, were significantly recruited at dots coated with Nrx1 β -Fc (Fig. 2a,c–e). As neurons were plated at low density

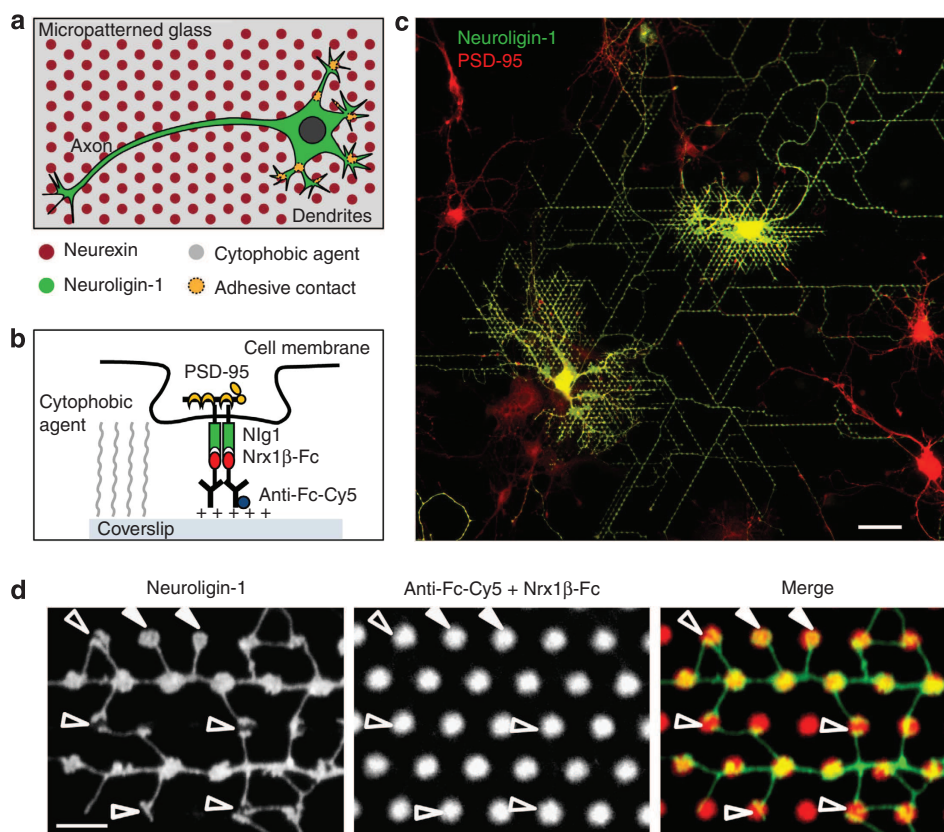


Figure 1 | Growth and differentiation of neurons cultured on Nr1 β -coated micropatterned substrates. (a) Schematic top view of a neuron growing on Nr1 β -coated micropatterns. Dissociated rat hippocampal neurons (green) were plated on substrates containing a hexagonal array of adhesive dots (1.5 μ m) (red) surrounded by a cytophobic agent (grey). Dots were coated with Cy5-conjugated anti-human-Fc antibodies, and either Nr1 β -Fc or human-Fc as a control. (b) Magnified side view of the molecular interactions at a single Nlg1/Nrx1 β contact, leading to the recruitment of post-synaptic proteins, including PSD-95 (yellow). (c) Mosaic image of neurons cultured on Nr1 β -Fc-coated micropatterned substrates, transfected with Nlg1-HA, and double immunostained for anti-HA (green) and endogenous PSD-95 (red) at 8 DIV. Note that neurons expressing Nlg1 (yellow) display a strikingly patterned neurite network resembling a subway map compared with that of non-transfected neurons, which have more random morphology (red). The mosaic image was reconstructed from 24 individual high-resolution images. Scale bar, 40 μ m. (d) Higher magnification images of a part of a neuron overexpressing Nlg1, highlighting the patterned spine growth of the dendritic network induced by Nr1 β -Fc-coated dots. Empty and solid arrowheads point to developing and already formed dendritic spine-like structures, respectively, localized at the Nr1 β dots. Scale bar, 5 μ m.

and observed at relatively young stages (8–9 days *in vitro* (DIV)), endogenous synapses were scarce and rarely localized at Nr1 β -Fc-coated dots (Supplementary Fig. S4); thus, we could neglect their contribution to postsynaptic differentiation induced by Nr1 β -Fc. As controls, neither PSD-95 nor EGFP were recruited at Nr1 β -Fc-coated dots in the absence of Nlg1 expression (Fig. 2b–e), and neither Nlg1 nor PSD-95 were recruited at Fc-coated micropatterns (Fig. 2c–e), demonstrating the specificity of the Nr1 β /Nlg1 interaction in this assay. Importantly, as each neuron was spreading over hundreds of individual dots, we quickly reached very high statistics (Fig. 2e). Taken together, these data indicate that neuronal contacts formed at Nr1 β -coated micropatterns selectively assemble major proteins involved in excitatory postsynaptic differentiation, independently of native synapses.

Contact formation between filopodia and Nr1 β -coated dots.

To gain insight into the dynamics of postsynapse formation, we combined this system with long-term live-cell imaging. Neurons plated on Nr1 β -Fc-coated substrates were cotransfected with Nlg1 and PSD-95:EGFP, and were monitored at DIV 6 for several hours. By focusing on freely moving dendritic filopodia in

relation to the surrounding dots, we observed that filopodia often contained a leader PSD-95 cluster, reaching out to Nr1 β -Fc micropatterns and establishing firm contact within hours (Fig. 3a and Supplementary Movie 1). These mobile precursor complexes containing Nlg1 and PSD-95 are likely to serve as preformed postsynaptic hotspots for establishment of new functional excitatory synapses^{26,27}.

Functional glutamate receptor recruitment at Nr1 β adhesions.

To examine whether PSD-95 scaffolds assembled at Nr1 β -Fc-coated dots were recruiting functional glutamate receptors, we used bi-photon glutamate uncaging and calcium imaging. Neurons were cotransfected with Nlg1 and PSD-95:mCherry to monitor postsynaptic differentiation in live conditions and were incubated with the cell-permeant calcium indicator Fluo-4 (Fig. 3b,c). When 4-methoxy-7-nitroindolyl-caged L-glutamate (MNI-glu) was uncaged in the vicinity of dendritic segments, showing accumulation of PSD-95:mCherry at Nr1 β -Fc dots, local and selective calcium transients were recorded (Fig. 3c,d and Supplementary Movie 2), revealing the presence of functional glutamate receptors. The increase in calcium signal upon glutamate uncaging at Nr1 β -Fc dots was $67 \pm 8\%$ ($n = 12$ cells),

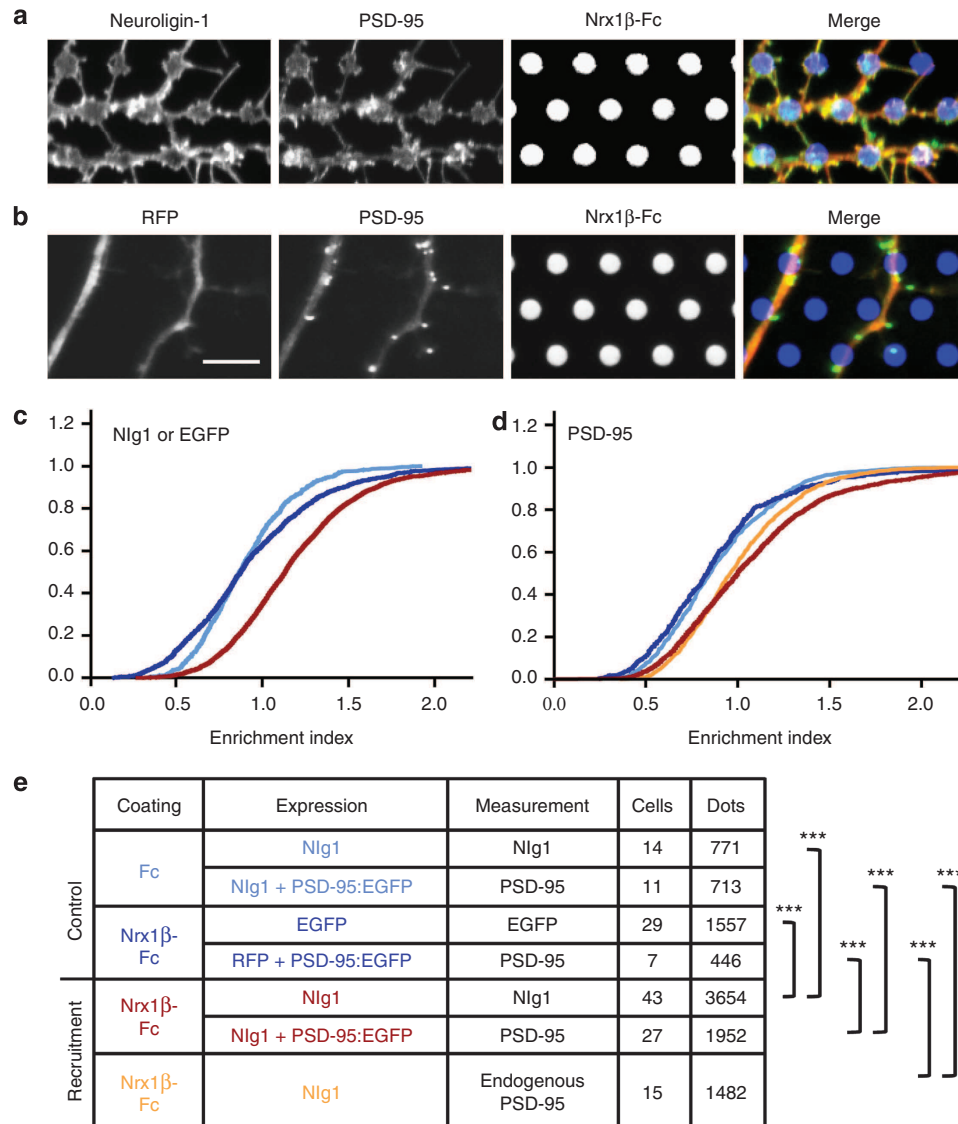


Figure 2 | Quantification of post-synaptic protein recruitment at Nr1 β -coated micropatterns. (a) Dendritic part of a neuron transfected with Nlg1-HA and PSD-95:EGFP, showing the enrichment of Nlg1 (red) and PSD-95 (green) at Nr1 β -Fc-coated dots (blue). (b) Dendritic part of a neuron transfected with red fluorescent protein (RFP) and PSD-95:EGFP, showing the lack of recruitment of RFP (red) and PSD-95 (green) at Nr1 β -Fc-coated dots (blue). Scale bar, 5 μ m. (c,d) Cumulative distributions of the enrichment index of Nlg1 and EGFP (c), or PSD-95 (d), in the different conditions detailed in the table below. The enrichment index was calculated at individual dots by dividing the average fluorescence intensity of the given protein within the area of the dendrite colocalizing with coated dots, by the average fluorescence intensity of dendritic parts located between the patterns. (e) The table contains the different conditions and the number of cells, and dots used for quantification. Data sets were collected from three different neuronal cultures and compared using a two-way analysis of variance followed by Bonferroni's parametric post test ($***P < 0.001$). The two control conditions (in blue) were not statistically different.

identical to the responses obtained in 3-week-old neurons at endogenous synapses ($69 \pm 9\%$, 30 cells), further indicating that molecular complexes assembled at Nr1 β micropatterns resemble native postsynapses. In a previous study using glutamate uncaging at Nr1 β -coated beads, we showed that such calcium transients are due to voltage-gated calcium channels, which open upon membrane depolarization induced by AMPAR activation¹². Thus, it is likely that the glutamate receptors recruited at Nr1 β -coated micropatterns contain AMPARs.

Trapping of surface diffusing AMPARs at Nr1 β adhesions. To directly demonstrate the recruitment of AMPARs at Nr1 β -induced postsynaptic structures, we immunolabelled AMPARs in

neurons expressing Nlg1. Using a monoclonal anti-GluA2 antibody for live labelling, we demonstrated that endogenous surface AMPARs were recruited at Nr1 β dots, and were clearly colocalized with PSD-95 (Fig. 4a). It was previously shown that AMPARs are anchored at the postsynaptic density via specific interactions with scaffolding molecules, such as PSD-95, but they also undergo dynamic exchange between synaptic and extrasynaptic membrane compartments^{15,28,29}. To gain insight into the dynamics of AMPARs recruited at Nr1 β -induced postsynaptic structures, we followed the mobility of individual AMPARs in neurons expressing Nlg1 and grown on micropatterned substrates coated with Nr1 β or Fc (Fig. 4b,c). Surface AMPARs were sparsely labelled by adding anti-GluA2 antibodies conjugated to Atto647N dyes in the observing solution, and

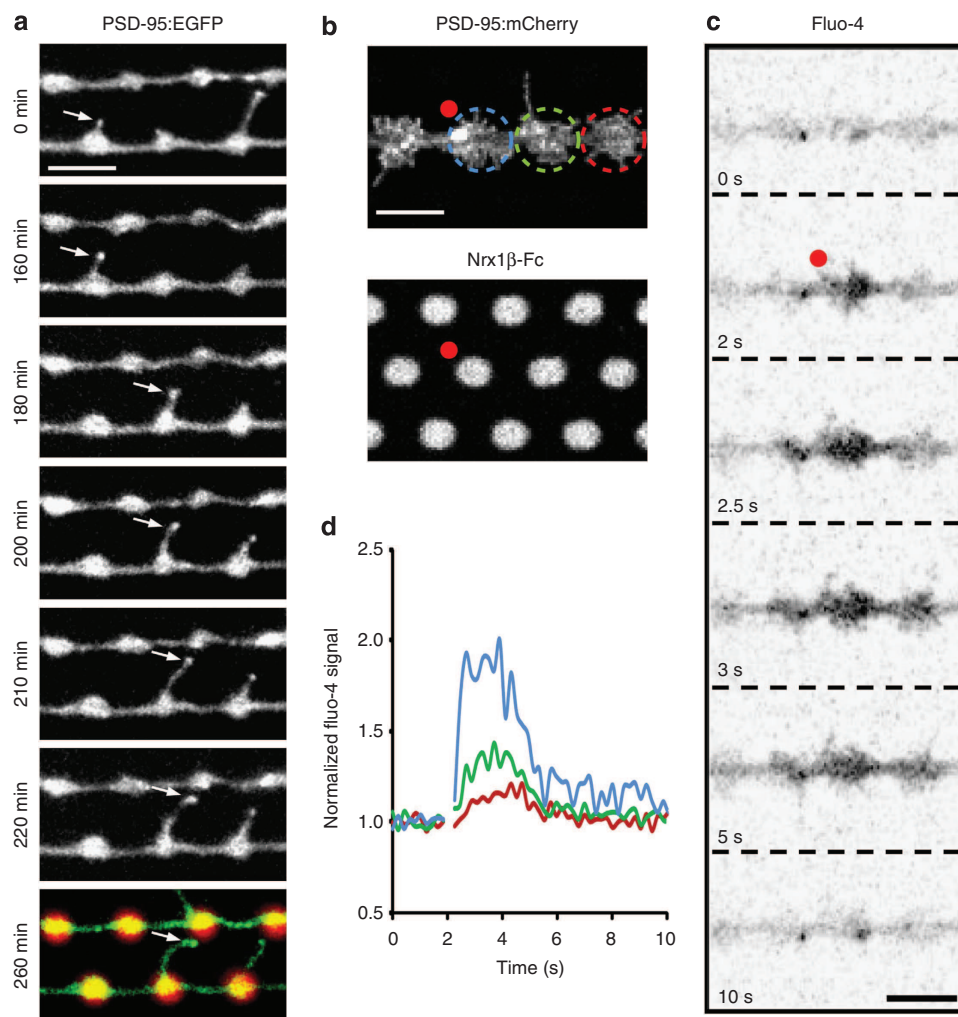


Figure 3 | Synapse dynamics and function observed on Nr1 β -coated micropatterns. (a) Image series showing Nr1 β /Nlg1 contact formation in neurons transfected with Nlg1 and PSD-95:EGFP. Note the presence of pre-assembled PSD-95:EGFP clusters at the tips of dendritic filopodia (arrow), which eventually become the sites of primary contacts with Nr1 β -Fc-coated dots. The specific contacts persisted for at least 50 min after initial adhesion. The merged image showing PSD-95:EGFP (green) and Nr1 β -Fc-coated dots (red) was taken at the end of the experiment. Scale bar, 5 μ m. (b–d) Neurons transfected with Nlg1-HA and PSD-95:mCherry were loaded with Fluo-4 and the changes in intracellular calcium level evoked by MNI-glu uncaging was monitored. (b) Image of a dendritic segment, highlighting PSD-95:mCherry accumulation at Nr1 β -Fc-coated dots. The bi-photon laser pulse used to trigger glutamate uncaging was positioned close to a micropattern (red dot). (c) Corresponding time sequence of the Fluo-4 signal upon glutamate uncaging. Note that the calcium signal starts to increase right after glutamate uncaging, specifically at the dot in closest proximity to the laser position. The signal then propagates to the neighbouring dots and progressively decreases. Scale bar, 5 μ m. (d) The graph shows different calcium transient responses, normalized to the baseline level, measured either at the location of uncaging (blue), or at neighbouring patterns located closer to (green) or further from (red) the uncaging spot, as indicated in b.

two-dimensional trajectories were recorded using a single-molecule tracking technique³⁰. Importantly, oblique laser illumination allowed the detection of single dye fluorescence in focal planes close to the substrate where Nr1 β /Nlg1 adhesions are localized. We calculated the distribution of instantaneous diffusion coefficients (D) of AMPAR trajectories localized on the patterns, and trajectories localized on dendritic parts lying between patterns, for both types of coatings (Fig. 4d,e). In all conditions, the distributions contained two well-separated populations, a fast-diffusing one ($D > 0.01 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) and a slow-diffusing one ($D < 0.01 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$). The proportion of fast-moving AMPARs was significantly reduced at Nr1-Fc patterns compared with the Fc coating, where it remained as high as outside patterns (Fig. 4d,e), revealing that AMPARs get selectively confined at Nr1 β /Nlg1 contacts. These results indicate that

Nr1 β -induced adhesions are capable of trapping surface diffusing AMPARs, similar to native synapses^{15,28}.

Induction of functional presynapses on SynCAM1 substrates. After having thoroughly characterized the properties of Nr1 β -coated micropatterns on postsynaptic induction, we asked whether the design could be reversed to elicit selective presynaptic differentiation in axons. We first tried to culture neurons on substrates coated with purified Nlg1-6His, immobilized on the micropatterns through an anti-6His antibody (Supplementary Fig. S5a,b). We verified by anti-Fc immunostaining that purified Nr1 β -Fc bound specifically to the Nlg1-coated dots, indicating intact adhesive function of Nlg1-6His (Supplementary Fig. S5c). Surprisingly, neurons had difficulties to grow on Nlg1-coated

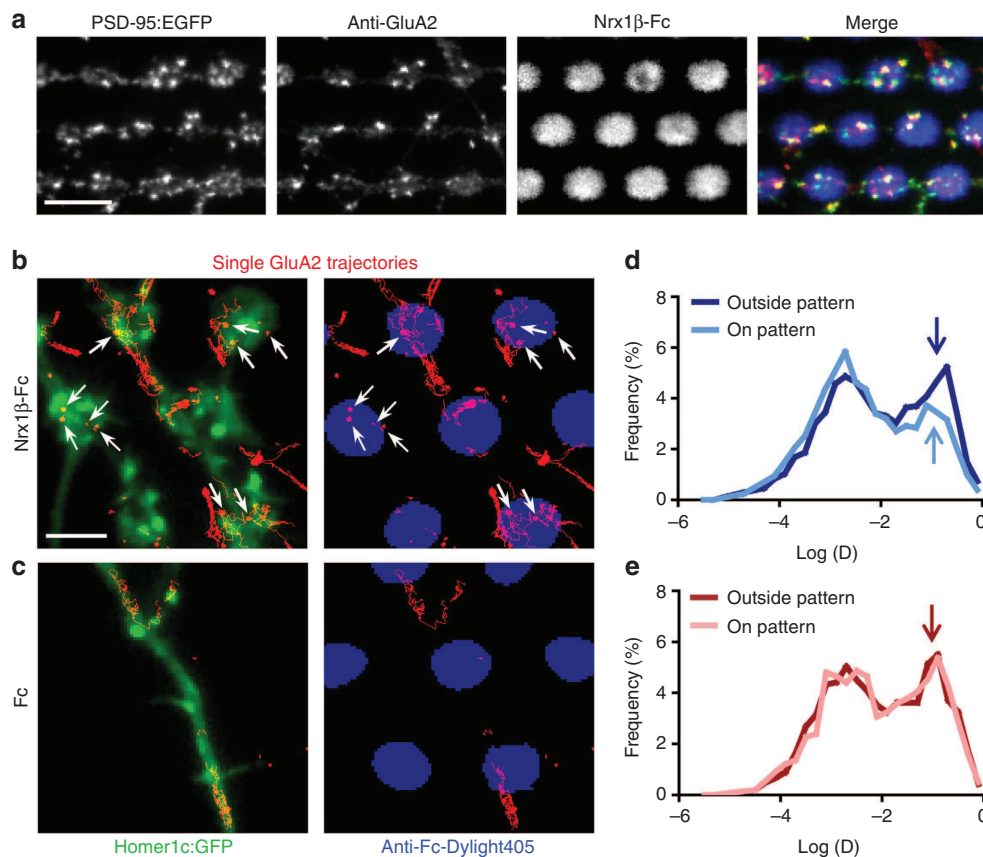


Figure 4 | Single-molecule tracking of surface AMPARs in neurons cultured on Nr1 β -coated micropatterned substrates. (a) Dendritic segments of a neuron transfected with Nlg1-HA and PSD-95:EGFP, where endogenous AMPARs at the cell surface were live labelled with anti-GluA2 antibodies. Note the AMPAR accumulation at Nr1 β -coated micropatterns and the clear colocalization with PSD-95 (arrows). Scale bar, 5 μ m. (b,c) The surface diffusion of endogenous AMPARs was monitored by tracking individual anti-GluA2 antibodies conjugated to Atto-647 dyes (red traces), in neurons cotransfected with Nlg1-HA and Homer1c:GFP, and grown for 8 DIV on micropatterned substrates coated with either Nr1 β -Fc (b) or Fc (c). Note AMPAR confinement at Nr1 β -coated dots, partially colocalizing with Homer1c:GFP puncta (arrows). Scale bar, 2 μ m. (d,e) The graphs show the distributions of the instantaneous diffusion coefficients of individual AMPAR trajectories, calculated and plotted on a logarithmic scale, for neurons grown on micro-patterned substrates coated with Nr1 β -Fc (d) or Fc (e). The trajectories were distinguished according to whether they were localized inside or outside micropatterns. Note a significant drop of the more mobile AMPARs (blue arrows), owing to AMPAR trapping at Nr1 β -induced adhesions, which was not observed in the Fc condition (red arrow). Distributions were calculated from 2,000 to 3,000 individual trajectories from 8 cells for Nr1 β -Fc-coated substrates and 6 cells for Fc-coated substrates. The mobile AMPAR fractions inside and outside Nr1 β -coated micropatterns were 25 \pm 2% (mean \pm s.e.m., seven regions) and 33 \pm 2% (six regions), respectively (P = 0.005 by unpaired Student's t -test). The mobile AMPAR fractions inside and outside Fc-coated micropatterns were 39 \pm 4% (mean \pm s.e.m., seven regions) and 36 \pm 4% (six regions), respectively (not significant). The mobile AMPAR fraction on Nr1 β was significantly lower than on Fc-coated dots (P < 0.005).

substrates and were very sensitive to further treatments, such as immunostaining. Moreover, when we were able to keep the neurons for 10 DIV on Nlg1-coated micropatterned substrates, neither axons nor dendrites were particularly patterned (Supplementary Fig. S5d), and axons did not strongly accumulate the presynaptic marker synapsin, even in neurons expressing Nr1 β -HA (Supplementary Fig. S5e). Thus, in contrast with previously reported effects in co-culture and bead assays^{13,14}, Nlg1 immobilized on micropatterns did not induce robust presynaptic differentiation.

To examine whether our system could be used to induce presynapses using synaptogenic proteins other than Nlg1, we cultured neurons on micropatterned substrates coated with SynCAM1, an adhesion molecule involved in axonal growth and synaptic differentiation^{20,22,24} (Fig. 5a,b). Neurons cultured on SynCAM1-Fc-coated micropatterns grew very well and extended both axons and dendrites, without the need of overexpressing SynCAM1 (Fig. 5c). Neurons accumulated endogenous

SynCAM1 on the dots, reflecting strong homophilic SynCAM1/SynCAM1 interactions (Fig. 5c,d). Strikingly, axons were highly patterned and showed synapsin accumulation at SynCAM1-coated dots, indicating presynaptic differentiation (Fig. 5d). In contrast, dendrites growing on SynCAM1-coated micropatterned substrates were less affected and did not particularly accumulate PSD-95 at SynCAM1-coated dots (Fig. 5c,e).

To show whether the hemisynapses formed on SynCAM1-coated dots were functional, neurons were live-labelled with an antibody against the luminal domain of synaptotagmin. Strong synaptotagmin staining was observed at axonal processes in contact with SynCAM1-Fc-coated dots (Fig. 6a), indicating antibody uptake and, thereby, the presence of actively recycling presynapses. Quantification of the levels of overlap between synaptic puncta and micropatterns (Supplementary Fig. S6) revealed a significant enrichment of both synapsin and synaptotagmin puncta at SynCAM1-coated dots, compared with PSD-95 or the control value expected from a random distribution of puncta (Fig. 6b).

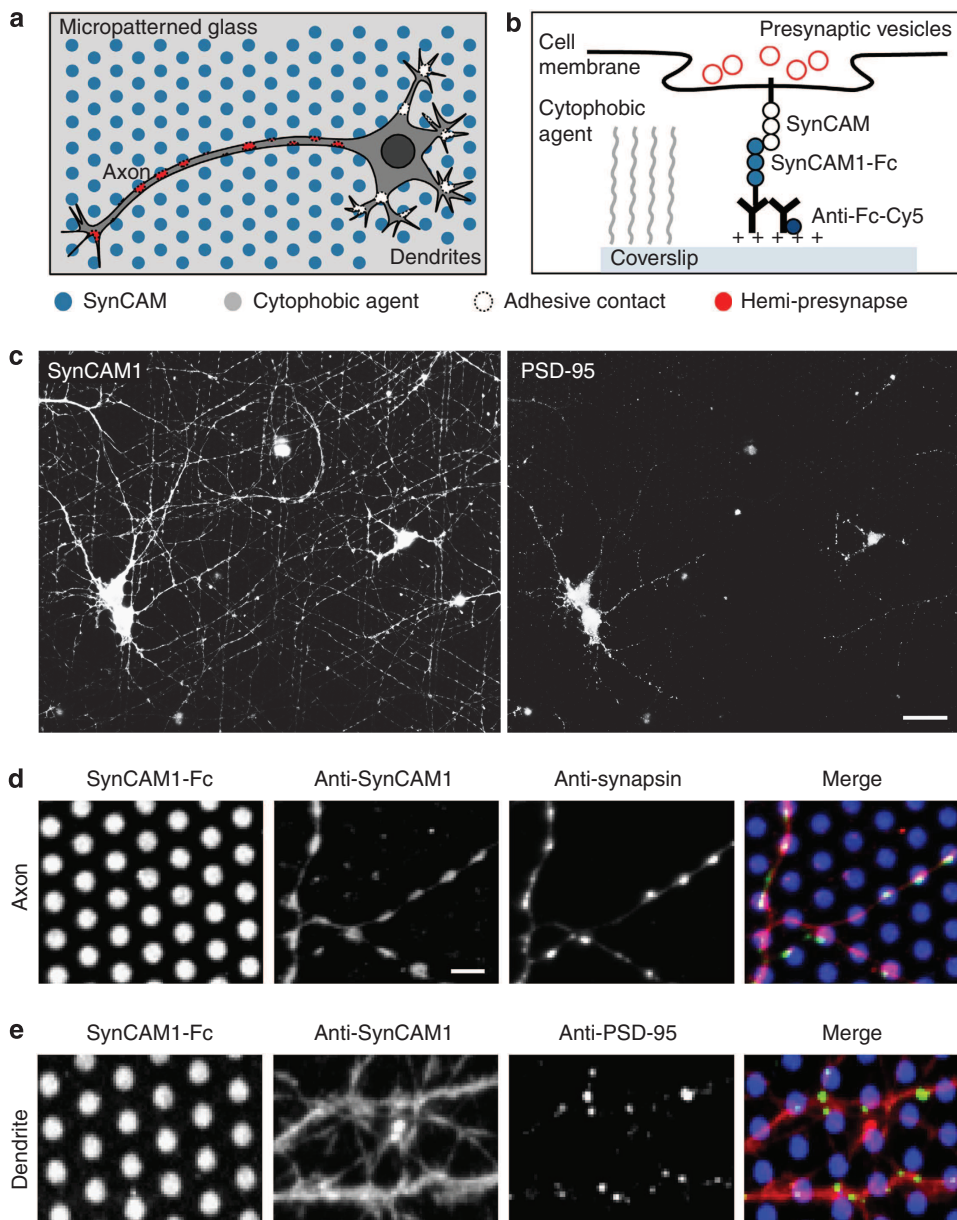


Figure 5 | Neuronal growth and differentiation on SynCAM1-coated micropatterned substrates. (a) Schematic top view of a neuron growing on SynCAM1-Fc-coated micropatterns (blue). Because of the homophilic interaction of SynCAMs, adhesive contacts (dashed outline) are expected on both axon and dendrites. Expected location of induced presynapse formation is marked in dark red. (b) Magnified side view of the interaction at a single SynCAM1/SynCAM contact, leading to the recruitment of presynaptic vesicles (red). (c) Mosaic image of neurons cultured for 7 DIV on micropatterned substrates coated with SynCAM1-Fc. The cells were dual labelled for endogenous SynCAM1 and PSD-95. Note the specific axonal growth along micropatterns and the random growth of dendrites. Scale bar, 30 μ m. (d,e) High-magnification images of DIV 7 neurons dual labelled either for endogenous SynCAM1 and synapsin, or for SynCAM1 and PSD-95, respectively. (d) Axonal segment showing specific accumulation of both SynCAM1 and synapsin at contact sites with SynCAM1-Fc-coated micropatterns. Scale bar, 5 μ m. (e) Image of a dendritic segment showing that PSD-95 accumulation was randomly distributed.

To compare synapse formation on micropatterned substrates versus classical substrates, we also plated neurons on glass substrates homogeneously coated with SynCAM1. In these conditions, neurons grew well, showed disorganized neurite networks and formed synapses at random locations (Fig. 6c,d). Furthermore, it was difficult to assess whether synapsin puncta reflected hemisynapses formed with SynCAM1 ligands immobilized on the substrate, or actual synapses formed between axons and dendrites. Thus, SynCAM1-coated micropatterned substrates are highly efficient to induce functional presynapses in a spatially

controlled manner, thus overcoming limitations of the homogeneously coated substrates.

No synapse induction on N-cadherin-coated substrates. To prove that the induction of pre- and postsynaptic structures in our assay was specific of the adhesion molecule used for coating, we plated neurons on micropatterned substrates coated with N-cadherin-Fc (Fig. 7a,b), a non-synaptogenic adhesion molecule rather involved in axonal growth and neurite branching^{31,32}.

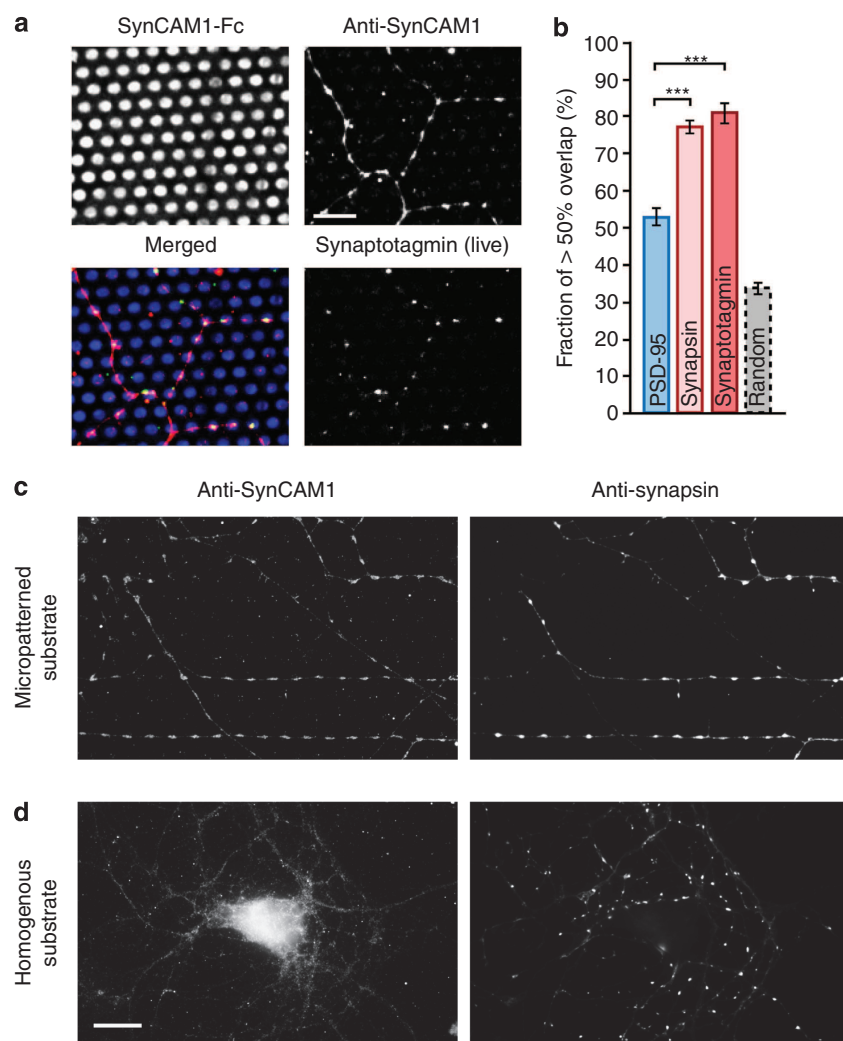


Figure 6 | Formation of functional presynapses on SynCAM1-coated micropatterned substrates. (a) Axonal segments of a neuron cultured for 7 DIV on micropatterned substrates coated with SynCAM1-Fc. Cells were live labelled with Oyster550-conjugated antisynaptotagmin luminal domain, followed by fixation and immunostaining for endogenous SynCAM1. Note the strong accumulation of both SynCAM1 and synaptotagmin at the dots, revealing the presence of actively recycling presynapses. Scale bar, 10 μ m. (b) Neurons at DIV 7 were growing on micropatterned substrates coated with SynCAM1-Fc and either fixed and immunostained for synapsin, or fixed after live incubation with Oyster550-conjugated antisynaptotagmin luminal domain). The graph shows the percentage of synapsin or synaptotagmin puncta having more than 50% overlapping area with the micropatterns (average per cell \pm s.e.m.). Data were collected from three different neuronal cultures (synapsin: 39 cells, 4,121 puncta; PSD-95: 33 cells, 3,438 puncta; synaptotagmin: 5 cells, 233 puncta) and were compared using a one-way analysis of variance followed by Bonferroni's parametric post test ($***P < 0.001$). The grey bar indicates the value for a random distribution of puncta calculated from the percentage of area occupied by dots on the substrate (mean \pm s.e.m., $n = 27$ regions). (c,d) Images of neurons cultured for 7 DIV either on micropatterned substrates coated with SynCAM1-Fc or on coverslips homogeneously coated with SynCAM1-Fc, respectively, and dual labelled for endogenous SynCAM1 and synapsin. Note the random versus patterned distribution of synapses on the homogenous and micropatterned substrate, respectively. Scale bar, 10 μ m.

Neurons developed faster on those substrates than on micropatterned substrates coated with Nr $x1\beta$ -Fc or on regular glass coverslips coated with PLL, but to similar rates as on glass coverslips homogeneously coated with N-cadherin-Fc³² (Supplementary Fig. S1). Similar to SynCAM1, N-cadherin-based adhesion was strong enough to support neuronal growth, and extended patterned arborization of both axons and dendrites in the absence of N-cadherin overexpression (Fig. 7c,d). Endogenous N-cadherin accumulated at N-cadherin-coated dots, revealing specific homophilic interactions, but neither synapsin nor PSD-95 accumulated at N-cadherin-coated dots (Fig. 7c,e). The lack of synapse induction by N-cadherin in our assay is in agreement with previous studies using co-cultures or N-cadherin-

coated beads¹¹⁻¹³, and is compatible with the dispensable effect of N-cadherin in aligning pre- and postsynapses³³.

Discussion

We developed a robust method to induce targeted and selective formation of hemisynapses with high statistics, by culturing neurons on micropatterned substrates coated with Nr $x1\beta$ or SynCAM1. For each neuron, this system can trigger hundreds of micron-scale contacts, specifically recruiting major proteins involved in excitatory postsynaptic differentiation (Nlg1, PSD-95 and AMPARs) or presynaptic assembly (SynCAM1 and synapsin). Our assay can be combined with various imaging

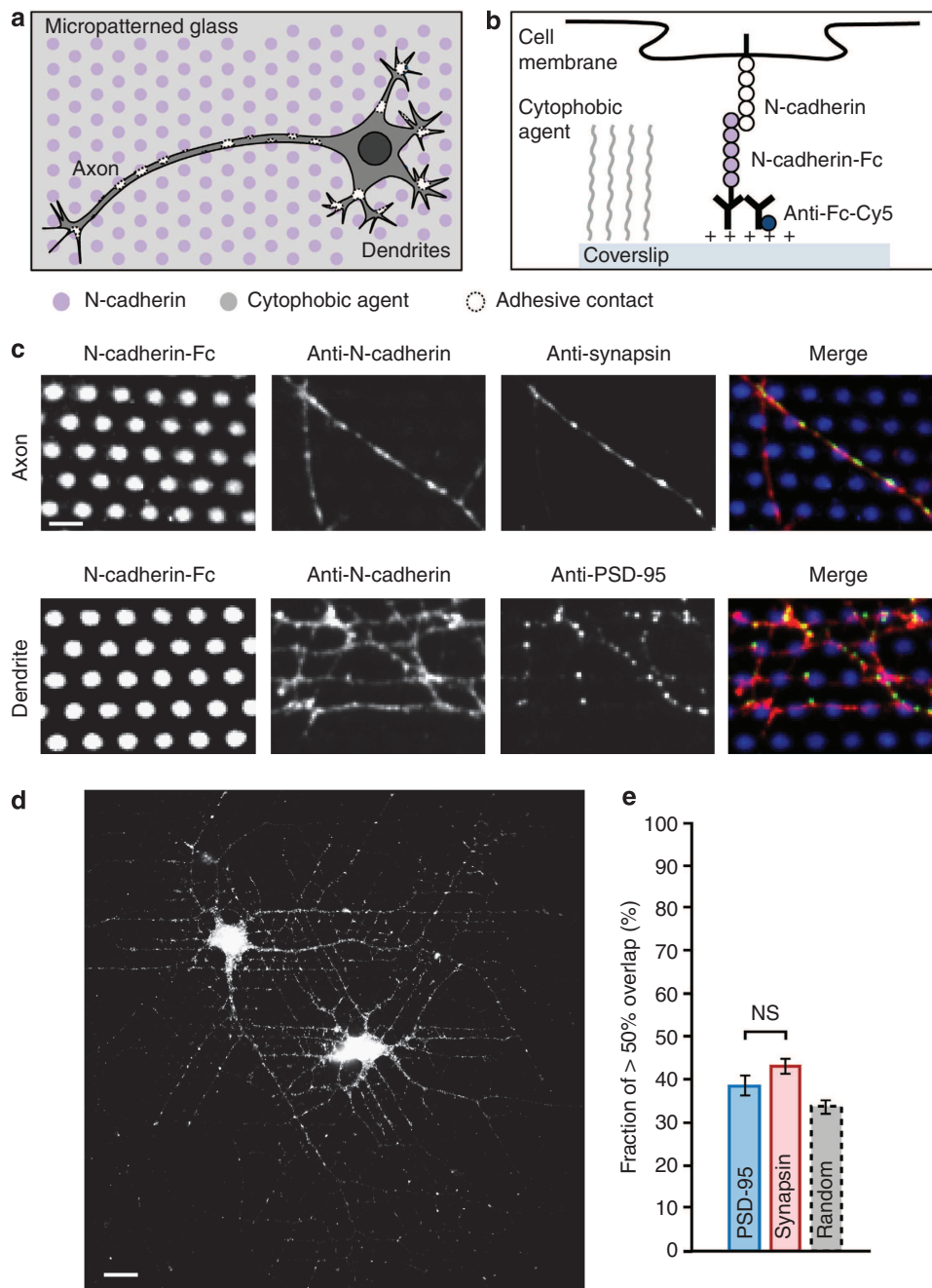


Figure 7 | Neuronal growth and differentiation on N-cadherin-coated micropatterned substrates. (a) Schematic top view of a neuron growing on N-cadherin-Fc-coated micropatterns (purple). Because of the homophilic interaction of N-cadherins, adhesive contacts (dashed outline) are expected on both axon and dendrites. (b) Magnified side view of the molecular interactions at a single N-cadherin contact. (c) Enlarged images showing axonal and dendritic parts of DIV 7 neurons, which were dual labelled either for endogenous N-cadherin and synapsin, or N-cadherin and PSD-95. Note the enrichment of endogenous N-cadherin in both axon and dendrites at N-cadherin-coated micropatterns, whereas synapsin and PSD-95 were randomly distributed in both axon and dendrites. Scale bar, 5 μm . (d) Image of neurons cultured for 7 DIV on N-cadherin-Fc-coated micro-patterned substrates, immunostained for endogenous N-cadherin. Note the patterned arborization of axons and dendrite branching, reflecting the interaction with the N-cadherin-Fc-coated dots. Scale bar, 20 μm . (e) Graph showing the percentage of synapsin or PSD-95 puncta, showing more than 50% overlapping area with the micropatterns. Quantification was made on neurons (DIV 7) cultured on micropatterned substrates coated either with N-cadherin-Fc and immunostained for synapsin or PSD-95 (synapsin: 8 cells, 1,286 puncta; PSD-95: 16 cells, 3,471 puncta). The data for the two conditions were compared using unpaired Student's *t*-test (NS: not significant; $P=0.44$). The grey bar indicates the value for a random distribution of puncta on the substrate (mean \pm s.e.m., $n=27$).

techniques, including immunocytochemistry to screen the accumulation of synaptic components, long-term live cell recordings to probe the kinetics of synapse differentiation, local photo-activation to probe functional synaptic properties and high-resolution single-molecule tracking.

Substrate adhesion, a key parameter that determines the growth and survival of neurons *in vitro*, is governed by a number of factors, including the number of ligand molecules presented to the cells, the number of surface receptors expressed by cells, the affinity of ligand/receptor interactions and the area available for

these interactions. In this micropattern assay, the area available for cell adhesion is around 38% of the total substrate area, the rest being covered by a cytophobic agent. To balance this reduction in adhesion area, we had to modify the other three factors, namely (1) controlling the number of functional ligand molecules using saturating concentrations of secondary antibodies; (2) enhancing the affinity of ligand/receptor interaction by choosing adhesion molecules with high binding affinity; (3) and/or increasing the number of available receptors by transfection. As a result, we could reproduce normal or enhanced growth of neurons on micropatterned substrates coated with *Nrx1 β* , SynCAM1 and N-cadherin compared with regular homogeneously coated substrates. In comparison, coatings of micropatterned substrates with PLL or Fc were not sufficient to support normal neuronal growth.

As patterned neurite development and hemisynaptic differentiation on *Nrx1 β* -coated substrates were selective of Nlg1-expressing neurons, Nlg1 localized at the cell surface is likely to be the primary binding partner for *Nrx1 β* immobilized at the dots. Although soluble *Nrx1 β* can bind endogenous Nlg1 at the surface of hippocampal neurons²⁶, in our system endogenous Nlg1 levels could not accommodate for the large excess of exogenous *Nrx1 β* ligands on the micropatterns. Thus, overexpression of Nlg1 was required to establish *Nrx1 β* /Nlg1 adhesions restricted to the micron-scale dots, ensuring the isolated study of specific molecular interactions. The reason why *Nrx* cannot induce postsynapses in the absence of Nlg1 expression maybe that the levels of *Nrx* receptors, including Nlgs and LRRTMs, in cultured neurons are low compared with that of the receptors for SynCAMs and N-cadherin. Another explanation is that N-cadherin and SynCAM1 (but not *Nrx1*) can form *cis*-dimers through extracellular interactions^{7,34,35}, thereby locally increasing their concentration.

Nlg1 immobilized on micropatterns was unable to induce robust neuronal growth and reproducible presynaptic differentiation in contrast to what was reported in co-cultures and lipid-coated beads^{13,14}. There are several potential explanations for this finding: (1) although *Nrxs* have also been reported in dendrites³⁶, those molecules are mostly presynaptic; thus, neuronal adhesion to Nlg1-coated dots is mediated essentially by axons, which may not be sufficient to promote strong somato-dendritic adhesion and cell survival; (2) purified Nlg1 protein may be more fragile than *Nrx1 β* and get degraded throughout several days at 37 °C; (3) Nlg1 can induce presynaptic differentiation only when it is freely diffusible in lipid membranes and not when immobilized on a substrate^{14,37,38}; and (4) Nlg1, which is assembled as a constitutive dimer through interactions between extracellular AChE-like domains^{14,39}, does not function properly when presented as a Nlg1-6His monomer.

Nevertheless, SynCAM1-coated substrates elicited a very robust patterned axonal arborization and presynaptic differentiation without the need for SynCAM overexpression. Probably, high endogenous SynCAM levels in hippocampal cells and high-affinity binding between SynCAMs^{20,21} enable such strong neuronal differentiation. Moreover, homophilic adhesion has the advantage of expanding the surface of interaction between micropatterns and neurons to both axons and dendrites. The accumulation of endogenous SynCAM1 at SynCAM1-Fc-coated dots indicated homophilic SynCAM1/SynCAM1 interactions, although interactions with presynaptic SynCAM2 may also occur²¹. In contrast, SynCAM1-Fc on micropatterns did not induce strong postsynaptic differentiation, as already reported with SynCAM1-coated beads⁴⁰ or neuronal co-cultures with heterologous cells expressing SynCAM1 (ref. 11). One possibility is that SynCAMs lack postsynaptic organizing capability, or have to work in parallel with other synaptic presynaptic cell adhesion molecules to induce a postsynaptic differentiation⁴¹. Although

SynCAM1 was immobilized on micropatterns through antibodies, thus lacking membrane diffusion as in spontaneous contacts, this did not alter its capacity to induce neurite growth and synapse differentiation. Moreover, the use of recombinant SynCAM1-Fc, which can spontaneously dimerize through disulphide bonds in the Fc moiety, may be important to promote SynCAM1 dimerization through extracellular FNIII domains and enhance its function in this assay³⁵.

Once the specific contacts were generated robustly and reliably, we investigated whether these contacts were able to trigger further processes implicated in pre- and postsynapse assembly. The scaffolding protein PSD-95 is one of the earliest detected proteins at synapses^{1,2} and can interact directly with the carboxy-terminal PDZ domain binding motif of Nlg1 (ref. 8). In addition, PSD-95 was previously shown to be recruited at neuronal contacts with heterologous cells expressing *Nrx1 β* , microbeads coated with purified *Nrx1 β* or antibody cross-linked *Nrx1 β* ^{10–12,15}. In line with these findings, we demonstrated that PSD-95 is enriched at *Nrx1 β* micropatterns, indicating that *Nrx1 β* -Fc/Nlg1 adhesions are able to recruit postsynaptic scaffolding molecules. The recruitment of PSD-95 is likely to involve both directed transport of preformed clusters as indicated by our long-term live cell recordings confirming previous reports^{26,27}, as well as trapping of diffusible PSD-95 (ref. 15).

Besides scaffolding molecules, glutamate receptors are also crucial for synaptic function. By using glutamate uncaging and live antibody staining, we further revealed that functional AMPARs were also present at *Nrx1 β* micropatterns. Although earlier reports indicated minor recruitment of AMPARs at *Nrx1 β* -induced adhesions^{10,11}, we recently showed that AMPARs could be recruited at novel *Nrx1 β* /Nlg1 adhesions in an activity-independent manner, through a mechanism implicating essentially GluA2-containing AMPARs^{12,15}. To significantly improve the detection of synaptic events specifically associated with *Nrx1*/Nlg1 adhesion sites at the substrate level, we used oblique illumination in single-molecule tracking experiments and showed that surface-diffusing AMPARs could be specifically trapped at *Nrx1 β* -induced adhesions. Overall, our assay can be used to specifically induce postsynapse assembly by establishing stable and robust *Nrx1 β* /Nlg1 contacts at spatially controlled locations, triggering the recruitment of scaffolding molecules and functional AMPARs, similar to what was described at native synapses^{15,28}. A recent study using neurons expressing pHluorin-tagged AMPAR subunits and plated on substrates uniformly coated with *Nrx1 β* demonstrated local exocytic events close to *Nrx1 β* /Nlg1 contact sites, upon neuronal stimulation⁴². To unify those observations, we propose a two-step model where AMPAR, which are exocytosed extrasynaptically can subsequently diffuse laterally and get trapped at synapses by PSD scaffolds assembled by *Nrx*/Nlg adhesions⁴³.

On SynCAM1-coated patterns, we demonstrated the differentiation of functional presynapses through the accumulation of endogenous SynCAM1, synapsin and actively recycling synaptotagmin. Given the large proportion of glutamatergic neurons in hippocampal cultures, and the tendency for SynCAM1 to induce more excitatory versus inhibitory synapses in co-culture assays and in transfected neurons^{21,41}, it is likely that most presynapses formed on SynCAM1-Fc-coated micropatterns represent glutamatergic terminals. Given the strong presynaptic differentiation induced by SynCAM1-coated micropatterns, the combination of this assay with total internal reflection fluorescence microscopy may represent a promising tool for high-resolution study of the mechanisms of vesicular release at the presynapse.

The difficulty to study the process of synapse formation has led to the development of several biomimetic tools based on synaptogenic adhesion molecules, including co-cultures^{10,11,13,20},

microspheres^{10,12,14} and protein clusters^{9,15,27}. All these tools aim to trigger synaptogenesis in a more controlled way compared with regular neuronal cultures, where spontaneous axon/dendrite contacts form unpredictably^{1,2}. The strong advantage of micro-patterned substrates over such experiments is that one precisely controls the position where to expect synapse formation. Patterned substrates with large adhesive islands and/or thin lines were previously used to generate autapses, induce axonal elongation and growth cone migration, or build simplified neuronal networks^{44–48}, but not to locally induce synaptogenesis with specific neuronal adhesion molecules, as described here. A ‘synapse microarray’ was recently reported to enable high-throughput screening, using non-neuronal cells expressing Nlg1 in microwells to induce presynaptic differentiation in contacting axons⁴⁹, but this technique used platforms with a diameter of 30 μm , far from the physiological size of a synapse, and its use with most high-resolution microscopy techniques is limited. Microfluidic local perfusion chambers containing two

separate cell populations were also used for the visualization and manipulation of synapses⁵⁰. However, in that technique, endogenous synapses still formed randomly in a 1-mm-long microfluidic channel. In comparison with these studies, our system has the advantage of isolating synaptogenic processes related to one type of adhesion complex using specific coating, and to spatially control synapse formation at a micron-scale resolution. Regarding statistical yield, our technique compares favourably with the previously reported systems (Fig. 8).

By varying ligand coating and transfection of the corresponding receptor in neurons, this assay can easily be adapted to the study of different synaptic complexes. Although we focused here on Nlg1-dependent postsynaptic development, Nr x 1 β -coated micropatterned substrates are also suitable for the study of postsynaptic differentiation mediated by LRRTMs, as these adhesion molecules also bind Nr x s and interact with PSD-95 and AMPARs^{51–53}. Inversely, micropatterns coated with LRRTMs could be used to study presynaptic assembly, as was done here

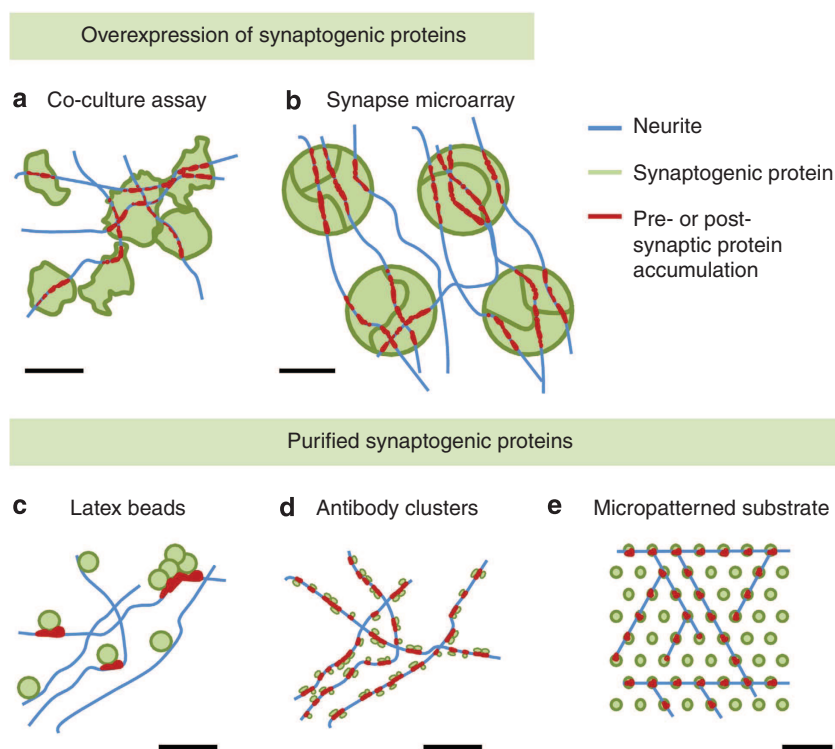


Figure 8 | Comparison of the various biomimetic systems used to induce synapse formation. (a) In co-culture assays, non-neuronal cells (8–17 μm in diameter) expressing synaptogenic proteins are plated on top of 1-week-old primary neuronal cultures, and the co-culture is maintained for 24–48 h. Contacting neurites form hemisynaptic puncta onto the randomly distributed heterologous cells. Because of the high variability in synaptic cluster size and the difficulty to distinguish individual clusters, the level of synapse formation is usually quantified as the global immunofluorescence intensity of synaptic staining per heterologous cell ($n=20$ –120 cells per condition). Scale bar, 10 μm . (b) The synapse microarray is based on the co-culture system, but as non-neuronal cells are plated in an array of microwells, data collection is faster, leading to improved statistics ($n>200$ cells). However, the temporal resolution stays limited to 24–48 h, and synaptic contacts originating from different contacting neurites still form randomly within a 30- μm -diameter well containing the heterologous cells. Scale bar, 20 μm . (c) Synaptogenesis can also be induced by microspheres coated with purified synaptogenic proteins. The temporal resolution, corresponding to the time needed for beads to bind to neurons, is improved to 1–2 h. However, this technique is impaired by low statistics (3–15 beads bound per neuron, 10–20 cells per condition), bead aggregation and limited coverage of the beads with adhesion molecules (<30% of beads show significant recruitment of synaptic proteins). Scale bar, 10 μm . (d) Another assay consists in incubating neurons with purified proteins cross-linked by secondary antibodies, inducing the formation of individual micron-scale clusters containing counter receptors and synaptic markers within 30 min–1 h. Cross-linked adhesion molecules provide much better statistics (100–300 clusters per cell, 10–30 cells) and induce more robust recruitment of synaptic proteins, but as for beads and co-cultures, hemisynapses are still randomly distributed on the cell surface. Scale bar, 10 μm . (e) On micropatterned substrates, purified proteins are bound to ~ 2 μm dots arranged in a regular array, thus providing perfect spatial control, isolation of synaptic development, fairly uniform recruitment levels and large statistics production (100–400 dots per cell, 5–40 cells per condition). Synapse formation can be observed in the course of several hours; thus, the temporal resolution lies between that of co-cultures and microspheres/clusters assays. Scale bar, 10 μm .

with SynCAM1. Interestingly, Nrxs and Nlgs exist as many isoforms and splice variants, and their precise associations contribute to specify synapses^{54–56}. Coating with specific α - or β -Nrx splice variants and/or neuronal transfection with the corresponding Nlg isoforms may enable the selective study of inhibitory versus excitatory synapse formation. For example, expression of Nlg2 in neurons plated on Nrx-coated substrates should favour inhibitory synapse formation^{9,10,16}.

Finally, as pathological mutations in Nrxs and Nlgs are related to autism, schizophrenia and X-linked mental retardation in humans⁴, such cell-chip assays of synaptic differentiation may allow the screening of new therapeutic targets for such disorders. Recent reports have identified histone deacetylase inhibitors as agents that can promote excitatory synapse maturation^{49,57}. Our assay could be easily combined with automatized high-throughput screening systems to find such pharmacological agents, selective of pre- or postsynaptic development, and of the type of adhesion complex involved in synaptogenesis.

Methods

Constructs and purified proteins. Nlg1-HA, Nlg1-6His and Nrx1 β -Fc plasmids were generous gifts from P. Scheiffele (Biozentrum, Basel). Nrx1 β -HA was a gift from M. Missler (Münster University). SynCAM1-Fc was a gift from T. Biederer (Yale University). PSD-95 with a C-terminal GFP or mCherry tags were previously reported¹⁵. The production of Nrx1 β -Fc and SynCAM1-Fc proteins, and the purification on G protein columns was previously described^{12,40}. Nlg1-6His was produced following the same protocols, purified on a Ni-Sepharose column (His Trap HP; GE Healthcare) and eluted using 500 mM imidazole. The imidazole buffer was exchanged with PBS by dialysis. Recombinant N-cadherin-Fc was purchased from R&D Systems as a 100 μ g ml⁻¹ solution.

Micropatterned substrates. Micropatterned substrates were obtained from CYTOO (www.cytooo.com) as a custom designed 'Ready to Coat' product (ref 10-950-00), made according to a previously published protocol²⁸. Specifically, hydrophilic dots of 1.5 μ m diameter were separated by 5 μ m, and were surrounded by a uniform cytophobic environment made of polyethylene glycol. Substrates were then treated with 40 μ g ml⁻¹ polylysine (Sigma), which adsorbed to the hydrophilic dots, dried and stored at 4 °C. One day before plating cells, a 9:1 ratio of unlabelled and Cy5-conjugated goat anti-human Fc antibodies (Jackson ImmunoResearch) or Cy5-conjugated rabbit anti-6His antibodies (Santa Cruz) were diluted at 0.023 mg ml⁻¹ in borate buffer (boric acid 0.2 M, pH 8.5) and were centrifuged for 10 min at 14,000 r.p.m. and 4 °C. Micropatterned substrates were flipped onto a 200- μ l drop of the antibody mixture on parafilm previously sterilized with ultraviolet radiation, and incubated at room temperature for 4–5 h. Substrates were then washed with borate buffer and were incubated overnight at 4 °C with purified Nrx1 β -Fc, SynCAM1-Fc, N-cadherin-Fc or Nlg1-6His (0.04 mg ml⁻¹ in boric acid, previously centrifuged for 10 min at 14,000 r.p.m.). Substrates were placed into six-well plates, washed with borate buffer and left with MEM containing 10% horse serum for 1–2 h in the incubator (37 °C, 5% CO₂).

Cell culture and transfection. Dissociated hippocampal neurons from E18 rat embryos were plated on the substrates (100,000 cells per coverslip). Four to five hours after plating, substrates were carefully washed with neurobasal medium (NB) supplemented with B27 (37 °C) to remove unattached cells, and the medium was replaced with conditioned NB medium (NB + B27 medium previously incubated for 4 days in dishes containing a glial cell layer). Neurons were transfected at DIV 3 using Effectene (Qiagen), according to the manufacturer's instructions, using 1 μ g total DNA per micropatterned coverslip. For cotransfections of Nlg1 and PSD-95:EGFP, or Nlg1 and EGFP, a 2:1 DNA ratio was used. All institutional guidelines on animal welfare were followed.

Immunocytochemistry. Neuronal cultures were fixed for 10 min in warm 4% paraformaldehyde–4% sucrose in PBS, and the remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min. Non-specific binding was blocked with PBS containing 1% BSA. To visualize Nlg1 at the neuronal surface, neurons transfected with Nlg1-HA were stained using rat anti-HA (Roche; 1:400) followed by Alexa568-conjugated goat anti-rat antibody (2 mg ml⁻¹; Invitrogen; 1:800) for 30 min at room temperature. To stain endogenous PSD-95, synapsin, SynCAM1 or N-cadherin, cultures were fixed and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 min, then labelled for 1 h with 1:400 dilutions of mouse anti-PSD-95 (Neuromab), mouse anti-synapsin (Synaptic Systems), mouse anti-N-cadherin (BD Transduction Labs) or rabbit anti-SynCAM1 (Abcam), followed by Alexa568-conjugated goat anti-mouse or anti-rabbit antibodies, respectively (2 mg ml⁻¹;

Molecular Probes; 1:800). To stain endogenous AMPARs, a 10-min live surface labelling was performed at 37 °C with a 1:100 dilution of a monoclonal anti-GluA2 antibody (a gift of E. Gouaux, Vollum Institute, Portland) in culture medium, followed by fixation and BSA blocking. Staining was revealed using Alexa568-conjugated goat anti-mouse antibody (2 mg ml⁻¹; Invitrogen; 1:800). To localize active presynapses, cells were labelled for 10 min using a 1:100 dilution of anti-synaptotagmin1 luminal domain conjugated to Oyster 550 fluorophore (Synaptic Systems) in observation medium, then fixed as described above. Coverslips were mounted in Mowiol (Calbiochem).

Image analysis. Immunostainings were visualized on a Leica DM R upright epifluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a \times 63/1.32 numerical aperture (NA) objective and appropriate filter sets from Chroma (GFP: excitation S490/20 nm, dichroic 86100bs, emission S528/38 nm; TRITC (tetramethylrhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate (5(6)): excitation S555/28 nm, dichroic 101848, emission S617/73; Cy5: excitation S635/20, dichroic 101848, emission S685/40 nm). Images were acquired with a charge-coupled device (CCD) camera (HQ CoolSnap; Roper Scientific, Evry, France), using the Metamorph software (Universal Imaging Corp.). The enrichment factors of Nlg1 and PSD-95 at the patterns were measured on three randomly chosen dendritic areas of each neuron and were calculated using an automatic programme written in Metamorph. Briefly, the outlines of the corresponding patterns were transferred to the Nlg1 and PSD-95 image, where the outline of the neurite was determined by a threshold function (Supplementary Fig. S1). The patterns that did not overlap with the threshold area were eliminated from further quantification. An enrichment index was calculated by dividing the fluorescence intensity within each dot for the thresholded area, by the average intensity measured from dendritic parts located outside patterns.

Detection of synapsin or PSD-95 clusters and quantification of their overlapping area with micropatterns was carried out using a custom-developed plugin for Image J (NIH) described previously¹⁵. Briefly, synapsin or PSD-95 signals of axonal or dendritic segments, respectively, and Cy5 signals corresponding to micropatterns were separately segmented. The overlapping area of synaptic and micropattern signals was then calculated on the overlaid image, and the percentage of synapsin or PSD-95 signal overlapping more than 50% with a micropattern was determined and averaged on a per cell basis (Supplementary Fig. S6). The value for a random distribution of puncta was calculated as the fractional area of micropatterns occupying the field of view.

Live cell imaging. Primary hippocampal neurons (DIV 7) growing on Nrx1 β -Fc-coated micropatterned substrates and expressing Nlg1 and PSD-95:EGFP were mounted on an open chamber containing a 1:1 mixture of Tyrode solution and conditioned NB medium. Cells were then observed on an inverted Leica DMI 6000 microscope (Leica Microsystems), equipped with a CCD camera (CoolSnap HQ2; Roper Scientific) and a thermostatic box (Life Imaging Services, Basel, Switzerland) providing 37 °C and 5% CO₂. Long-term acquisitions were made by using a HCX PL APO CS \times 63 oil 1.32 NA objective and illumination with a mercury lamp and appropriate excitation/emission filters from Chroma (GFP: excitation HQ 480/30 nm, dichroic 86100bs, emission S528/38 nm; Cy5: excitation HQ630/20 nm, dichroic 101848, emission S685/40 nm). PSD-95:EGFP images were recorded every 10 min for 5 h, whereas Cy5 images of the pattern were taken only twice, one before and one after the acquisition. For determination of the growth and stage of differentiation of neurons cultured on micropatterned substrates with different coatings (Nrx1 β -Fc, N-cadherin-Fc and PLL), time-lapse imaging of neurons at DIV 1–2 was carried out using a \times 40 phase-contrast objective on a Biotiation machine equipped with a 5% CO₂ air flow and stable temperature control (a kind loan of Nikon, France). Images were analysed using the NeuroJ plugin (NIH).

Glutamate uncaging. Primary hippocampal neurons (DIV 7–8) growing on Nrx1 β -Fc-coated micropatterned substrates and transfected with PSD-95:mCherry and Nlg1 were loaded with 2.5 μ M Fluo-4-AM (Invitrogen) for 5 min in culture medium, then mounted in Tyrode (30 mM glucose, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ and 25 mM HEPES), supplemented with 5 mM MNI-glu (Tocris), and 1 μ M tetrodotoxin to prevent action potentials. The observation chamber was placed on a confocal scanning laser microscope (TCS SP5; Leica) thermostated to 37 °C and equipped with a pulsed bi-photon laser (Mai Tai; Spectra-Physics) tuned to 750 nm. For the fluorescence recordings, a fivefold zoomed area of 256 \times 256 pixels was scanned at 700 Hz by the 488-nm Argon laser line, and the fluorescence light between 500 and 530 nm was collected by a photomultiplier, using a HCX PL APO CS \times 63/1.32 NA oil objective and a pinhole open to three times the Airy disk (180 μ m). After recording a baseline, one 10 ms pulse of bi-photon light restricted to a small region of interest (\sim 7 μ m²) was given to uncage MNI-glu. Fluorescence signals were then recorded every 200 ms for 1 min. To quantify the calcium responses, the Fluo-4 intensity values at given locations were normalized to the average fluorescence intensity before the bi-photon light pulse. When MNI-glu was omitted, no calcium transient was observed. In some experiments, MNI-glu was uncaged in the vicinity of synapses in 3-week-old neurons transfected with Homer-DsRed and growing on regular glass coverslips.

Mosaic reconstruction. Individual high-magnification images were taken using a HCX PL APO CS $\times 63$ oil 1.32 NA objective on the microscope described above for live cell recordings (Leica DMI 6000), using the Scan slide module of MetaMorph, which drives a motorized stage Scan IM (Märzhäuser, Wetzlar, Germany). Mosaic images were then created from 20–30 individual images using a stitching function.

Single-molecule tracking of AMPARs. Primary hippocampal neurons (DIV 7–8) growing on either Nr1 β -Fc- or Fc-coated micropatterned substrates, and coexpressing Nlg1 and Homer1c:GFP, were mounted in Tyrode in an open observation chamber (Life Imaging Services). The chamber was placed on an inverted microscope (Nikon Ti-E Eclipse) equipped with an electron multiplying CCD camera (Evolve, Roper Scientific), a thermostatic box (Life Imaging Services) providing air at 37 °C, and an APO total internal reflection fluorescence microscope $\times 100$ oil 1.49 NA objective. The lateral movement of individual AMPARs was followed by single-molecule tracking³⁰. Monoclonal anti-GluA2 antibodies were conjugated with ATTO 647N dyes (Attotec) according to the manufacturer's protocol. Surface AMPARs were continuously and stochastically labelled in solution, with a 1:6,000 dilution of ATTO647N-conjugated anti-GluA2 antibodies. The samples were imaged by oblique illumination performed with the 633-nm line of a HeNe laser (Roper Scientific) and dichroic mirror (Di01-R635; SemRock), allowing the excitation of individual ATTO-647N molecules, which are bound to the cell surface, without illuminating the molecules in the solution above. Fluorescence was collected using a 676/29-nm emission filter (SemRock) placed on a filter wheel (Suter). Five stacks of 4,000 consecutive frames were obtained from each cell, with an integration time of 50 ms. Detection of single molecules and the analysis of image stacks were processed using a custom programme running on Metamorph software (Molecular Devices) described earlier⁵⁹. This programme allows the identification of each dye as individual objects, by fitting a two-dimensional Gaussian to the intensity patterns of its fluorescent signal (spots), and connects successive positions. The instantaneous diffusion coefficient, *D*, was calculated for each trajectory, from linear fits of the first four points of the mean square displacement function versus time.

References

- Friedman, H. V., Bresler, T., Garner, C. C. & Ziv, N. E. Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron* **27**, 57–69 (2000).
- Bresler, T. *et al.* Postsynaptic density assembly is fundamentally different from presynaptic active zone assembly. *J. Neurosci.* **24**, 1507–1520 (2004).
- Dalva, M. B., McClelland, A. C. & Kayser, M. S. Cell adhesion molecules: signalling functions at the synapse. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 206–220 (2007).
- Missler, M., Südhof, T. C. & Biederer, T. Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, a005694 (2012).
- Südhof, T. C. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature* **455**, 903–911 (2008).
- Craig, A. M. & Kang, Y. Neurexin-neuroigin signaling in synapse development. *Curr. Opin. Neurobiol.* **17**, 43–52 (2007).
- Leone, P. *et al.* Structural insights into the exquisite selectivity of neurexin/neuroigin synaptic interactions. *EMBO J.* **29**, 2461–2471 (2010).
- Irie, M. Binding of neuroligins to PSD-95. *Science* **277**, 1511–1515 (1997).
- Pouloupoulos, A. *et al.* Neuroigin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* **63**, 628–642 (2009).
- Graf, E. R., Zhang, X., Jin, S.-X., Linhoff, M. W. & Craig, A. M. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell* **119**, 1013–1026 (2004).
- Nam, C. I. & Chen, L. Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroigin interaction and neurotransmitter. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**, 6137–6142 (2005).
- Heine, M. *et al.* Activity-independent and subunit-specific recruitment of functional AMPA receptors at neurexin/neuroigin contacts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 20947–20952 (2008).
- Scheiffele, P., Fan, J., Choih, J., Fetter, R. & Serafini, T. Neuroigin expressed in nonneuronal cells triggers presynaptic development in contacting axons. *Cell* **101**, 657–669 (2000).
- Dean, C. *et al.* Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nat. Neurosci.* **6**, 708–716 (2003).
- Mondin, M. *et al.* Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J. Neurosci.* **31**, 13500–13515 (2011).
- Levinson, J. N. *et al.* Neuroligins mediate excitatory and inhibitory synapse formation: involvement of PSD-95 and neurexin-1 β in neuroigin-induced synaptic specificity. *J. Biol. Chem.* **280**, 17312–17319 (2005).
- Prange, O., Wong, T. P., Gerrow, K., Wang, Y. T. & El-Husseini, A. A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroigin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 13915–13920 (2004).
- Chih, B., Engelman, H. & Scheiffele, P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* **307**, 1324–1328 (2005).
- Ko, J. *et al.* Neuroligin-1 performs neurexin-dependent and neurexin-independent functions in synapse validation. *EMBO J.* **28**, 3244–3255 (2009).
- Biederer, T. *et al.* SynCAM, a synaptic adhesion molecule that drives synapse assembly. *Science* **297**, 1525–1531 (2002).
- Fogel, A. I. *et al.* SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *J. Neurosci.* **27**, 12516–12530 (2007).
- Robbins, E. M. *et al.* SynCAM 1 adhesion dynamically regulates synapse number and impacts plasticity and learning. *Neuron* **68**, 894–906 (2010).
- Biederer, T. & Stagi, M. Signaling by synaptogenic molecules. *Curr. Opin. Neurobiol.* **18**, 261–269 (2008).
- Stagi, M., Fogel, A. I. & Biederer, T. SynCAM 1 participates in axo-dendritic contact assembly and shapes neuronal growth cones. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 7568–7573 (2010).
- Dotti, C. G., Sullivan, C. A. & Banker, G. A. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J. Neurosci.* **8**, 1454–1468 (1988).
- Gerrow, K. *et al.* A preformed complex of postsynaptic proteins is involved in excitatory synapse development. *Neuron* **49**, 547–562 (2006).
- Barrow, S. L. *et al.* Neuroligin1: a cell adhesion molecule that recruits PSD-95 and NMDA receptors by distinct mechanisms during synaptogenesis. *Neural Dev.* **4**, 17 (2009).
- Bats, C., Groc, L. & Choquet, D. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* **53**, 719–734 (2007).
- Opazo, P. *et al.* CaMKII triggers the diffusional trapping of surface AMPARs through phosphorylation of stargazin. *Neuron* **67**, 239–252 (2010).
- Giannone, G. *et al.* Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophys. J.* **99**, 1303–1310 (2010).
- Bixby, J. L. & Zhang, R. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J. Cell. Biol.* **110**, 1253–1260 (1990).
- Bard, L. *et al.* A molecular clutch between the actin flow and N-cadherin adhesions drives growth cone migration. *J. Neurosci.* **28**, 5879–5890 (2008).
- Bozdagi, O., Valcin, M., Poskanzer, K., Tanaka, H. & Benson, D. L. Temporally distinct demands for classic cadherins in synapse formation and maturation. *Mol. Cell. Neurosci.* **27**, 509–521 (2004).
- Hong, S., Troyanovsky, R. B. & Troyanovsky, S. M. Spontaneous assembly and active disassembly balance adherens junction homeostasis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 3528–3533 (2010).
- Fogel, A. I., Stagi, M., Perez de Arce, K. & Biederer, T. Lateral assembly of the immunoglobulin protein SynCAM 1 controls its adhesive function and instructs synapse formation. *EMBO J.* **30**, 4728–4738 (2011).
- Taniguchi, H. *et al.* Silencing of neuroligin function by postsynaptic neuexins. *J. Neurosci.* **27**, 2815–2824 (2007).
- Pautot, S., Lee, H., Isacoff, E. Y. & Groves, J. T. Neuronal synapse interaction reconstituted between live cells and supported lipid bilayers. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 283–289 (2005).
- Baksh, M. M. *et al.* Neuronal activation by GPI-linked neuroligin-1 displayed in synthetic lipid bilayer membranes. *Langmuir* **21**, 10693–10698 (2005).
- Shipman, S. L. & Nicoll, R. A. Dimerization of postsynaptic neuroligin drives synaptic assembly via transsynaptic clustering of neurexin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 19432–19437 (2012).
- Breilhat, C., Thoumine, O. & Choquet, D. Characterization of SynCAM surface trafficking using a SynCAM derived ligand with high homophilic binding affinity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 655–659 (2007).
- Sara, Y. *et al.* Selective capability of SynCAM and neuroigin for functional synapse assembly. *J. Neurosci.* **25**, 260–270 (2005).
- Tanaka, H. & Hirano, T. Visualization of subunit-specific delivery of glutamate receptors to postsynaptic membrane during hippocampal long-term potentiation. *Cell Rep.* **1**, 291–298 (2012).
- Czöndör, K. *et al.* Unified quantitative model of AMPA receptor trafficking at synapses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 3522–3527 (2012).
- Wyart, C. *et al.* Constrained synaptic connectivity in functional mammalian neuronal networks grown on patterned surfaces. *J. Neurosci. Methods* **117**, 123–131 (2002).
- Féréol, S. *et al.* Micropatterned ECM substrates reveal complementary contribution of low and high affinity ligands to neurite outgrowth. *Cytoskeleton* **68**, 373–388 (2011).
- Feinerman, O., Segal, M. & Moses, E. Signal propagation along unidimensional neuronal networks. *J. Neurophysiol.* **94**, 3406–3416 (2005).
- Allen, T. G. J. Preparation and maintenance of single-cell micro-island cultures of basal forebrain neurons. *Nat. Protoc.* **1**, 2543–2550 (2006).
- Von Philipsborn, A. C., Lang, S., Jiang, Z., Bonhoeffer, F. & Bastmeyer, M. Substrate-bound protein gradients for cell culture fabricated by microfluidic networks and microcontact printing. *Sci. STKE* **2007**, pl6 (2007).
- Shi, P. *et al.* Synapse microarray identification of small molecules that enhance synaptogenesis. *Nat. Commun.* **2**, 510 (2011).
- Taylor, A. M., Dieterich, D. C., Ito, H. T., Kim, S. a. & Schuman, E. M. Microfluidic dial perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron* **66**, 57–68 (2010).

51. Linhoff, M. W. *et al.* An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron* **61**, 734–749 (2009).
52. De Wit, J. *et al.* LRRTM2 interacts with Neurexin1 and regulates excitatory synapse formation. *Neuron* **64**, 799–806 (2009).
53. Ko, J., Fuccillo, M. V., Malenka, R. C. & Südhof, T. C. LRRTM2 functions as a neurexin ligand in promoting excitatory synapse formation. *Neuron* **64**, 791–798 (2009).
54. Boucard, A. a., Chubykin, A. a., Comoletti, D., Taylor, P. & Südhof, T. C. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron* **48**, 229–236 (2005).
55. Chih, B., Gollan, L. & Scheiffele, P. Alternative splicing controls selective trans-synaptic interactions of the neuroligin-neurexin complex. *Neuron* **51**, 171–178 (2006).
56. Graf, E. R., Kang, Y., Hauner, A. M. & Craig, A. M. Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 beta LNS domain. *J. Neurosci.* **26**, 4256–4265 (2006).
57. Akhtar, M. W. *et al.* Histone deacetylases 1 and 2 form a developmental switch that controls excitatory synapse maturation and function. *J. Neurosci.* **29**, 8288–8297 (2009).
58. Azioune, A., Carpi, N., Tseng, Q., Théry, M. & Piel, M. Protein micropatterns: A direct printing protocol using deep UVs. *Methods Cell. Biol.* **97**, 133–146 (2010).
59. Rossier, O. *et al.* Integrins $\beta(1)$ and $\beta(3)$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1057–1067 (2012).

Acknowledgements

We acknowledge P. Scheiffele, M. Missler, S. Okabe and T. Biederer for the generous gift of plasmids; E. Gouaux for the anti-GluA2 antibody; P. Legros and C. Poujol at the Bordeaux Imaging Center for support in microscopy; M. Mondin, F. Levet, C. Poujol and

J.B. Sibarita for image analysis programmes; E. Hosity and G. Giannone for advice on single-molecule tracking; M. Sainlos and I. Gauthereau for antibody-dye conjugation; A. Azioune for advice on micropattern coating; A. Fuchs and M.L. Calvo-Munoz for chip production; B. Tessier, D. Bouchet, C. Breillat, A. Frouin and N. Retailleau for cell culture; P. Gonzales and R. Sterling for technical assistance; and D. Grillo-Bosch and M. Sainlos for critical reading of the manuscript. This work was supported by funding from the Centre National de la Recherche Scientifique, Agence Nationale pour la Recherche (grants Neuroligation and Synapse-2Dt), Conseil Régional Aquitaine and Fondation pour la Recherche Médicale.

Author contributions

K.C. and O.T. conceived the project, designed the experiments and wrote the manuscript. K.C. and M.G. performed the experiments and analysed the data. A.A. produced the micropatterned substrates. A.C. produced the ATTO647N-conjugated anti-GluA2 antibodies; and C.B. and B.T. produced and purified the SynCAM-Fc and Nrx1 β -Fc proteins, respectively.

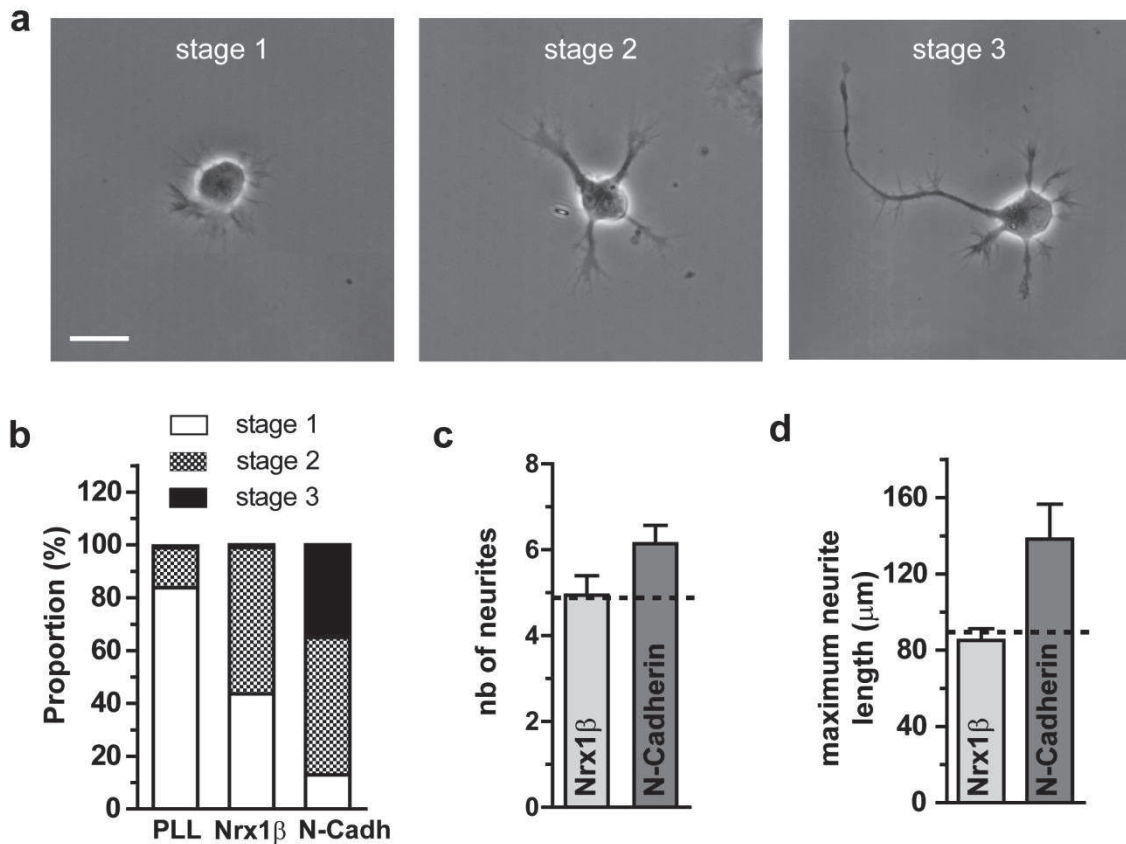
Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <http://www.nature.com/naturecommunications>

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

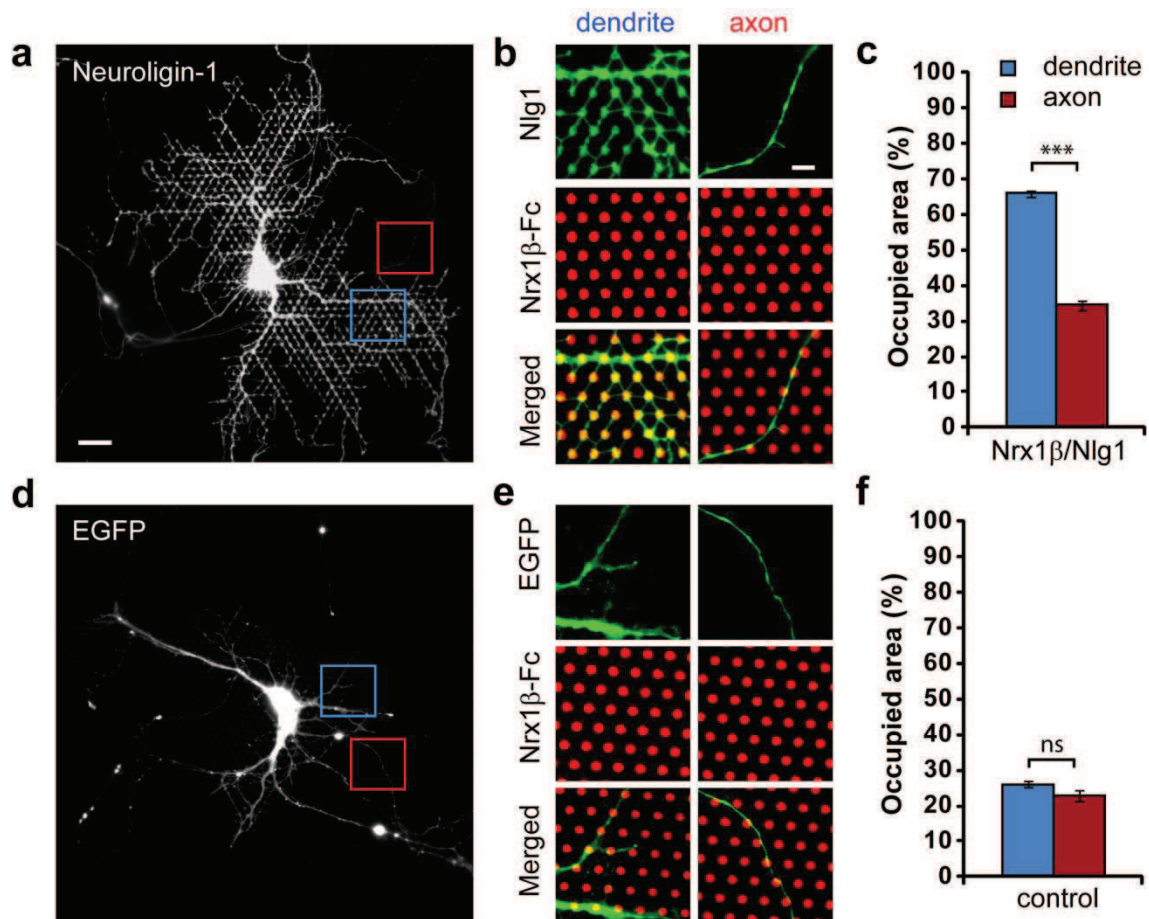
Reprints and permission information is available online at <http://npng.nature.com/reprintsandpermissions/>

How to cite this article: Czöndör, K. *et al.* Micropatterned substrates coated with neuronal adhesion molecules for high-content study of synapse formation. *Nat. Commun.* **4**:2252 doi: 10.1038/ncomms3252 (2013).



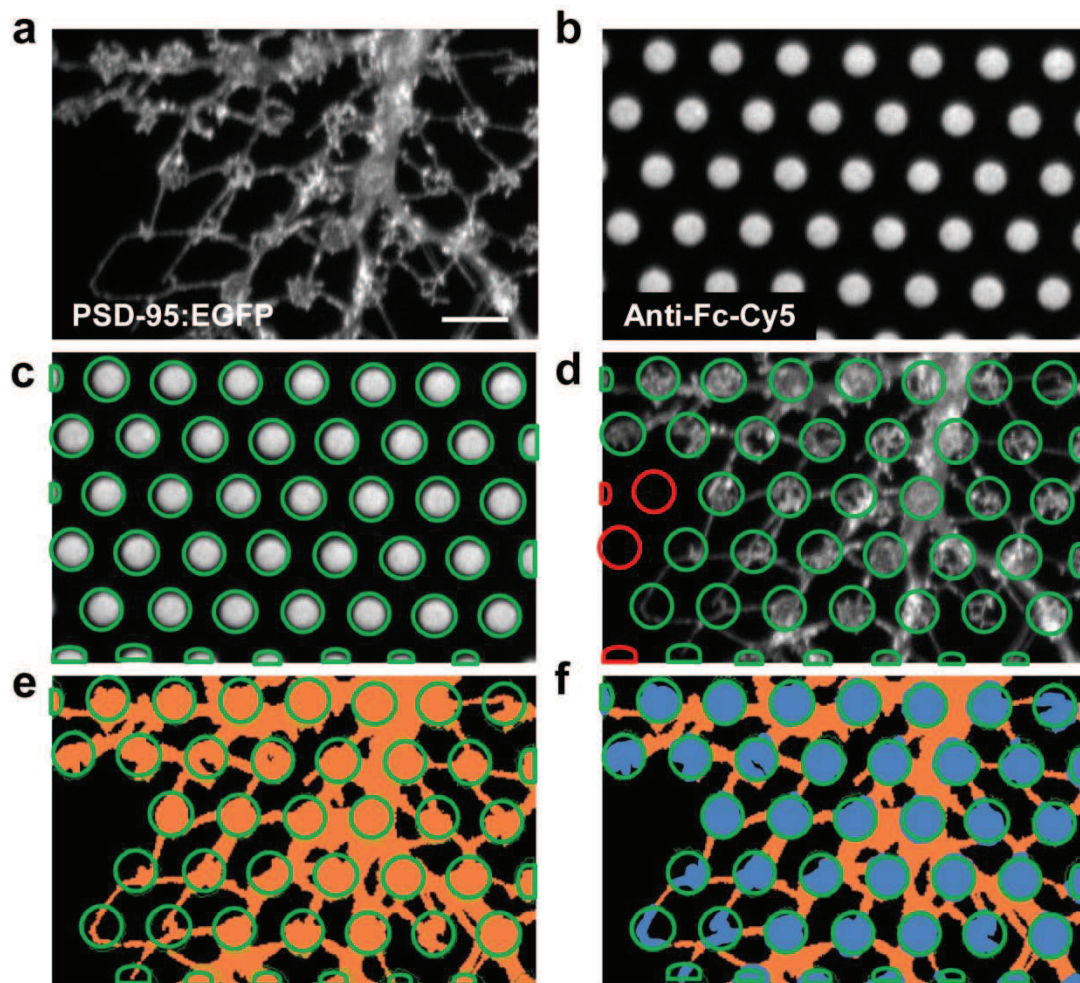
Supplementary Figure S1. Growth of dissociated hippocampal neurons on micro-patterned substrates

(a) Examples of neurons cultured on Nr1 β -Fc coated micro-patterned substrates for 1 day, showing different developmental stages. Stage 1: formation of lamellipodia; stage 2: outgrowth of minor processes; stage 3: polarization and axon growth. Scale bar: 20 μm . **(b)** Proportion of neurons in those three different developmental stages in neuronal cultures cultured for 1 day on micro-patterned substrates coated with PLL (n = 136 cells), Nr1 β -Fc (n = 94 cells) or N-Cadherin-Fc (n = 77 cells). **(c)** Quantification of the number of neurites originating from the soma in stage2/3 neurons growing for 2 days in culture on micro-patterned substrates coated either with Nr1 β -Fc (n = 18 cells) or N-Cadherin-Fc (n = 14 cells). The dashed line indicates the value (4.9) obtained from neurons growing for 2 days on regular coverslips coated homogenously with PLL. **(d)** Quantification of the length of the longest neurite in stage2/3 neurons cultured for 2 days on micro-patterned substrates coated either with Nr1 β -Fc (n = 18 cells) or N-Cadherin-Fc (n = 14 cells). The dashed line indicates the value (90 μm) obtained from neurons cultured for 2 days on regular coverslips coated homogenously with PLL.



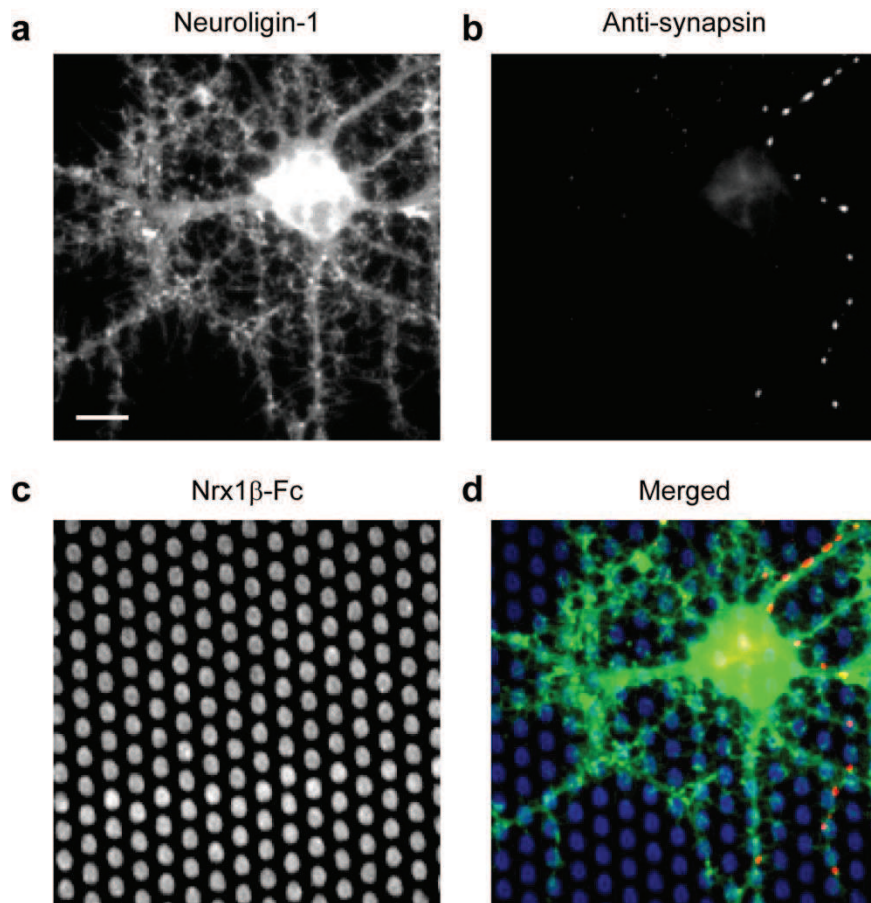
Supplementary Figure S2. Specific effects of Nr1β-coated micro-patterns on neuronal morphology

Neurons were transfected with Nlg1-HA (**a-c**) or EGFP (**d-f**) and cultured on micro-patterned substrates coated with Nr1β-Fc or Fc. Transfected neurons were visualized by immunostaining for the HA-tag labelled with Alexa488, or by the EGFP signal, respectively. (**a, d**) Representative images of Nlg1- or EGFP-expressing neurons on Nr1β-Fc coated substrates. Scale bar: 20 μm. (**b, e**) Enlargement of the regions highlighted in (a) and (d), showing dendritic (blue) and axonal (red) segments of Nlg1- or EGFP-expressing neurons. Scale bar: 5 μm. (**c, f**) The percentage of the dot area occupied by the axon or by the dendrite was measured for neurons growing on substrates coated with Nr1β-Fc and expressing Nlg1 (Nrx1β/Nlg1; 9 cells, dendrite: n = 595; axon: n = 187 dots), or for neurons growing on substrates coated with Fc or Nr1β-Fc and expressing EGFP (control; 8 cells, dendrite: n = 202 dots; axon: n = 148 dots). To compare the data of dendrite vs axon, unpaired t-tests were used (***) $P < 0.001$; ns: not significant).



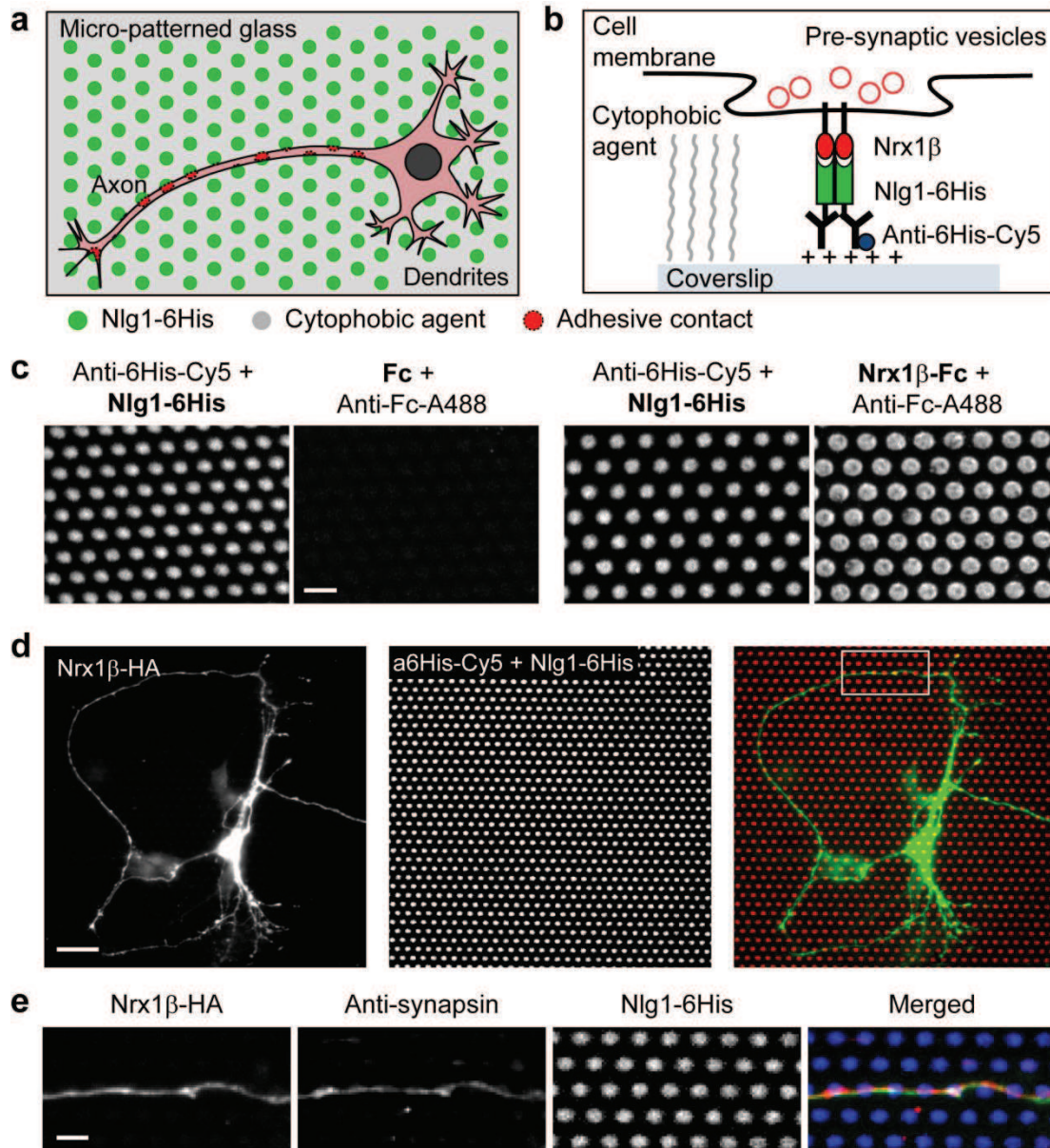
Supplementary Figure S3. Method to quantify post-synaptic protein enrichment at micro-patterns

(a) Image of a PSD-95:EGFP positive dendritic region taken for quantification. Scale bar: 5 μm . (b) Corresponding image of the Nr $x1\beta$ -Fc coated substrate. (c) First, all the patterns were outlined (green) and transferred to the PSD-95:EGFP image. (d) Patterns which did not overlap with the dendritic part (red) were eliminated from further quantification. (e) The remaining pattern outlines were transferred back to the GFP image, where the outline of the neurite was determined by a threshold function. (f) The enrichment index was calculated by measuring the fluorescence intensity within each region for the threshold area (blue), and divided by the average intensity measured from dendritic parts located outside the patterns (orange).



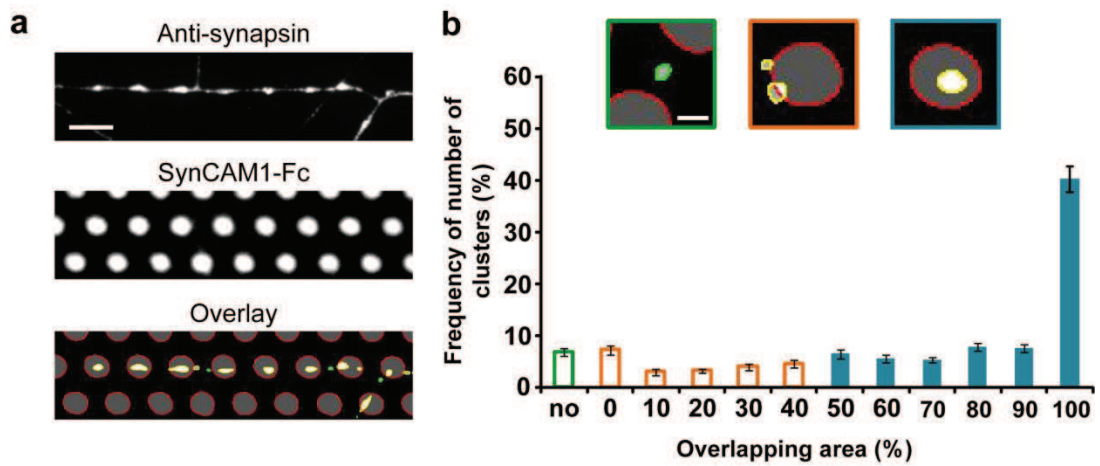
Supplementary Figure S4. Low detection of synapsin at Nx1 β micro-patterns.

(a) Image of a neuron expressing Nlg1-HA growing on a micro-patterned substrate coated with Nx1 β -Fc and stained by anti-HA antibodies (green). Scale bar: 10 μ m. (b) On the same substrate, pre-synapses were labeled using anti-synapsin antibodies (red). (c) The Nx1 β -Fc coated dots are revealed with Cy5 coupled anti-human Fc (blue). (d) Merge image. Note the low density and random distribution of pre-synaptic puncta compared to the high number of dots invaded by the transfected neuron.



Supplementary Figure S5. Difficulties to culture neurons on Nlg1 coated micro-patterned substrates

(a) Schematic top view of a neuron growing on Nlg1 coated micro-patterns. The dots were coated with Cy5-conjugated anti-6His antibodies and Nlg1-6His (green) and dissociated rat hippocampal neurons overexpressing Nrx1β (light red) were cultured on the substrates. Expected location of induced pre-synapse formation is marked in dark red. **(b)** Magnified side view of the molecular interactions at a single Nlg1/Nrx1β contact, leading to the recruitment of pre-synaptic vesicles (red). **(c)** Testing the specificity and functionality of the purified Nlg1-6His. Micro-patterned substrates were sequentially coated with anti-6His and Nlg1-6His, followed by incubation either with Fc (left) or Nrx1β-Fc (right). The level of protein binding was detected with immunostaining using goat anti-Fc and anti-goat-Alexa488. Scale bar: 5 μm. **(d)** Example of a neuron cultured on Nlg1-6His coated micro-patterned substrates (red), transfected with Nrx1β-HA, and immunostained for anti-HA (green) at 8 DIV. Note the absence of patterning of both axons and dendrites. Scale bar: 20 μm. **(e)** Enlargement of a part of the axon indicated on (d), double immunostained for Nrx1β-HA with anti-HA and for endogenous synapsin with anti-synapsin. Note that synapsin shows no particular enrichment at Nlg1 coated dots. Scale bar: 5 μm.



Supplementary Figure S6. Illustration of the method to quantify the apposition levels between synaptic puncta and micro-patterns.

(a) Axonal segment of a neuron growing on SynCAM1-Fc coated micro-patterns, and immunostained for synapsin. The lower panel shows the overlay of the two segmented images. Scale bar: 5 μm . (b) Four cases were distinguished: i) synaptic puncta display no overlap with any micro-pattern (no contact); ii) synaptic puncta touch the border of a micro-pattern, but share no common pixels (0% overlap); ii) the synaptic puncta share some common pixels with the micro-pattern (0-90% overlapping area); and iii) synaptic puncta are entirely localized within a micro-pattern (100% overlapping area). A threshold value of 50% overlapping area (bars highlighted in blue) was defined to represent the accumulation of synaptic markers at micro-patterns. Scale bar: 1 μm .

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION / PERSPECTIVES

I. Que sait-on à présent de l'embrayage moléculaire dans le cône de croissance ?

Le modèle d'embrayage moléculaire n'est pas récent, il a plus de 20 ans, et repose sur l'idée selon laquelle la motilité générée par le cytosquelette d'actine du cône de croissance pourrait se coupler aux adhésions présentes à la surface cellulaire. Ce couplage est susceptible de générer des forces au niveau du substrat, permettant la croissance de l'axone via les protrusions du cône de croissance (Mitchison et Kirschner, 1988).

Depuis, certaines avancées ont été faites dans la compréhension de ce modèle, notamment dans les mécanismes moléculaires à l'origine du flux rétrograde d'actine. Au niveau du cône de croissance d'Aplysie, il a été montré que le flux d'actine dépendait de la myosine II, protéine qui est ancrée au niveau de la zone de transition du cône de croissance, où elle contracte et sectionne les filaments d'actine, provoquant ainsi un effondrement du réseau (Medeiros et al., 2006). Nos observations sur le flux de molécules individuelles d'actine, dans les cônes de croissance de neurones d'hippocampes, est en accord avec ces travaux. Nous observons des trajectoires essentiellement dirigées de l'actine dans la zone périphérique du cône, alors que dans la zone de transition il y a un mélange de trajectoires dirigées, Browniennes et confinées reflétant une perturbation à ce niveau. Dans ce même papier de Medeiros, il a été montré que la polymérisation de l'actine était aussi essentielle au flux d'actine, en poussant sur la membrane au niveau de la zone périphérique. Lorsque nous avons testé l'effet de la cytochalasine D, drogue qui empêche la polymérisation de l'actine, nous avons vu une diminution des mouvements dirigés d'actine au niveau de la région périphérique, ce qui confirme le rôle prépondérant de la polymérisation de l'actine dans le flux rétrograde. Nous avons également testé l'effet d'autres composés agissant sur l'actine tel que la Blebbistatine qui est un inhibiteur de la myosin II. Cette drogue a été testée sur le cône de croissance d'Aplysie où elle provoque une baisse de 50% de la vitesse du flux rétrograde d'actine (Van Goor et al., 2012). Dans nos conditions, nous n'avons cependant pas obtenu d'effets concluants de cette drogue. Ceci peut être dû à l'illumination laser que nous utilisons pour le spt/PALM qui pourrait photo-inactiver la

Blebbistatine (Kolega, 2004), ou encore au fait que notre modèle de cône de croissance diffère de celui d'Aplysie.

Une étude chez l'Aplysie a permis de préciser le mécanisme de Mitchison et Kirschner. Les auteurs ont montré que le couplage local entre molécules d'adhésion et actine provoquait un ralentissement du flux d'actine. Pendant ce temps, l'actine continue à polymériser contre la membrane plasmique, ce qui provoque une force protrusive permettant l'avancée du cône de croissance (Suter et Forscher, 1998). Nos travaux confirment ces résultats chez les neurones d'hippocampe de rat. Nous avons observé un ralentissement du flux rétrograde présent dans la région périphérique du cône de croissance, de façon locale et spécifique au niveau de zones d'adhésion micrométriques recouvertes de N-cadhérine. Afin de mieux comprendre ce ralentissement, nous avons observé à l'échelle de la molécule unique les différents événements de pause de l'actine. Ces observations montrent que l'actine interagit de façon transitoire avec les adhésions N-cadhérine, rendant compte d'un mécanisme d'embrayage glissant. Ce phénomène se rapproche d'observations faites dans un autre système, entre intégrine et actine, au niveau d'adhésions focales où des protéines intermédiaires (taline et vinculine) semblent constituer une interface de glissement couplant les adhésions au cytosquelette (Hu et al., 2007).

L'implication de protéines intermédiaires (dites adaptatrices) modulant la liaison de l'actine aux adhésions et jouant ainsi un rôle central dans le modèle d'embrayage moléculaire, a été avancée pour différents modèles cellulaires. Parmi ces protéines adaptatrices, on trouve notamment l' α -caténine (Drees et al., 2005). Des expériences de pinces optiques combinées à l'utilisation de SiRNA ont montré que la baisse d'expression de l' α -caténine au niveau des neurones conduit à une baisse du couplage actine/N-cadhérine ainsi qu'une diminution de l'extension neuritique N-cadhérine dépendante (Bard et al., 2008). Bien que différentes études s'accordent sur le fait que l' α -caténine fasse le lien entre cadhérine et actine (Yamada et al., 2005 ; Drees et al., 2005 et Desai et al., 2013), le mécanisme précis d'interaction reste incompris et débattu. En 2005, l'équipe de Nelson a remis en cause un modèle pré-établi selon lequel il y avait un complexe quaternaire impliquant des liaisons directes cadhérine/caténines/F-actine. Il avance plutôt un modèle dynamique dans lequel l' α -caténine oscille entre un état lié à la cadhérine et un état lié à l'actine. Pour prouver cela les auteurs ont utilisé des techniques de FRAP sur des cellules MDCK, transfectées avec des protéines exogènes marquées. En calculant le temps de demi-

recouvrement après photo extinction, ils ont observé que l'actine était plus dynamique que le complexe cadhérine/caténine, ce qui va à l'encontre de l'existence d'un complexe quaternaire stable (Yamada et al., 2005). Dans nos conditions, nous voyons que bien que l'actine ralentisse sur les zones d'adhésion N-cadhérine, elle continue son flux. Ces données sont en accord avec les résultats avancés par Nelson dans le sens où nous observons rarement l'actine associée au complexe cadhérine/caténine ternaire. Cependant, concernant le rôle de l' α -caténine dans ce modèle, l'observation directe de l' α -caténine fait apparaître une association spécifique au complexe β -caténine/cadhérine, mais pas au flux d'actine. Ainsi, nos résultats iraient plutôt dans le sens des travaux de Desai, publiés récemment (Desai et al., 2013). Ce dernier montre que le couplage physique entre α -caténine et β -caténine doit persister pour former des jonctions adhérentes fonctionnelles, et que seule la forme monomérique de l' α -caténine (celle qui lie le complexe cadhérine/caténine) semble nécessaire à l'intégrité des jonctions adhérentes. La forme dimérique serait inactive au niveau des adhésions et constituerait un pool cytoplasmique formant un équilibre dynamique avec l' α -caténine monomérique. On peut donc imaginer que l' α -caténine monomérique interagisse au niveau des contacts adhésifs avec la N-cadhérine: une fois stabilisée, elle pourrait interagir de façon directe ou non avec le réseau d'actine et ralentir très transitoirement le flux avec des phases alternatives d'accrochage et de décrochage. Afin de confirmer l'implication de l' α -caténine dans le couplage mécanique entre actine et N-cadhérine, il serait nécessaire d'effectuer des expériences complémentaires en diminuant l'expression de l' α -caténine, ce qui devrait diminuer ou empêcher le ralentissement de l'actine au niveau des contacts adhésifs recouverts de N-cadhérine. Des expériences sont en cours, mais pour l'instant aucun des candidats siRNA testés ne diminuent spécifiquement l'expression de l' α -caténine. Nous devons aussi tester l'effet de l'expression d'une construction N-cadhérine dans laquelle la région intracellulaire est remplacée par le domaine α -caténine liant constitutivement l'actine (Tan et al., 2010), ce qui devrait diminuer de façon encore plus importante le flux d'actine au niveau des motifs adhésifs.

Un autre candidat, la vinculine, pouvant lier l' α -caténine à l'actine (Rangarajan and Izard, 2013) pourrait aussi jouer un rôle central dans l'embrayage moléculaire N-cadhérine dépendant, ce qui a d'ailleurs été montré au niveau du système d'adhésion intégrine (Thievensen et al., 2013). Les auteurs ont utilisé des mutants

ponctuels de la vinculine incapables d'interagir avec l'actine sur des MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) exprimant ou non la vinculine endogène. Ils ont ainsi montré que l'interaction vinculine/actine était nécessaire pour diminuer le flux rétrograde d'actine au niveau de contacts focaux (CF) présents dans le lamellipode. Ils ont aussi montré que la vinculine favorisait les forces de tractions au niveau de CF matures, faisant d'elle un élément central dans la mécanotransduction du système intégrine. Il a également été montré dans le système cadhérine que l' α -caténine pouvait recruter la vinculine au niveau de jonctions adhérentes via des changements conformationnels forces-dépendants (Yonemura et al., 2010). Cependant, il semble d'après nos observations que cette protéine ne joue pas un rôle particulier dans l'embrayage N-cadhérine-dépendant au niveau du cône de croissance car contrairement à l' α -caténine, sa dynamique n'est pas affectée par les zones d'adhésions N-cadhérine, et elle ne présente pas non plus une dynamique permettant d'imaginer une association au flux rétrograde d'actine. Des expériences utilisant des SiRNA permettant de réduire l'expression de la vinculine restent à faire, et permettraient de confirmer ces résultats ou montrer un autre rôle éventuel de la protéine.

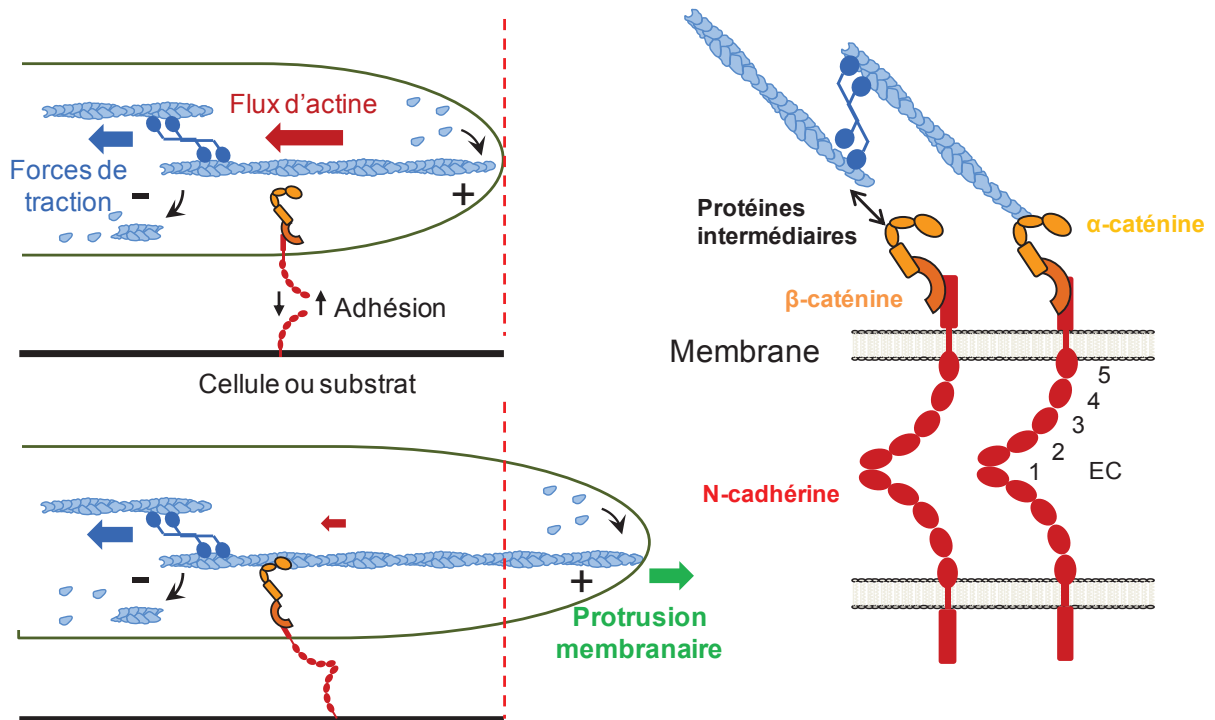
Enfin, d'autres expériences plus générales sont envisagées. Afin de faire le lien entre nos mesures de molécules uniques et la mesure d'ensemble de renouvellement protéique, nous avons prévu des expériences de FRAP sur différentes protéines d'intérêt couplées au marqueur GFP. Cette expérience nous permettrait également de nous positionner par rapport aux expériences de Nelson (décrites précédemment ; Yamada et al., 2005) dans notre système, et de valider ainsi nos résultats obtenus dans le cône de croissance. Nous prévoyons donc un gradient de retour de fluorescence dans le sens vinculine > actine > α -caténine > N-cadhérine, reflétant le degré de connexion à la N-cadhérine.

Enfin, en nous inspirant des techniques de FRET, nous voudrions examiner le degré de transmission de forces à l'interface N-cadhérine/ actine via l'utilisation de senseurs étirables permettant d'observer la déformation de la N-cadhérine (Borghi et al., 2012). Nous prévoyons d'observer une déformation plus importante du senseur FRET au niveau des micro-motifs, là où se transmet la force.

Nous souhaitons aussi inclure des simulations sur la dynamique de l'actine dans le cône croissance fondé sur un modèle développé précédemment par l'équipe pour décrire le trafic des récepteurs AMPA aux synapses (Czöndör et al., 2012). Le

programme est en cours de développement. Nous voulons modéliser le flux d'actine, et montrer que son ralentissement au niveau de micropatterns N-cadhérine provoque l'accumulation d'actine. Pour cela nous définissons différentes zones: une à la base du cône où l'actine diffuse librement, une à la périphérie où l'actine peut se coupler au flux, et enfin des zones d'adhésions, où le flux peut interagir, et où l'actine peut ainsi s'accumuler. Nous voulons ainsi créer un modèle à la fois prédictif et quantitatif des différentes expériences de sptPALM et FRAP nous permettant d'intégrer les différents résultats expérimentaux obtenus.

Ainsi, bien que des expériences complémentaires soient encore nécessaires, les résultats obtenus permettent pour la première fois une visualisation directe et à l'échelle moléculaire des mécanismes impliqués dans l'embrayage moléculaire au niveau du cône de croissance.



II. Existe-t-il un modèle analogue d'embrayage moléculaire permettant d'expliquer la transition filopode dendritique/épine ?

Nous avons travaillé sur des neurones plus matures afin de vérifier si le modèle d'embrayage moléculaire décrit précédemment dans le cône de croissance pouvait aussi jouer un rôle dans des phases plus tardives du développement neuronal, notamment dans la transition entre filopode immature et épine, et de façon plus générale dans la maturation de l'épine. Plusieurs similitudes entre les observations faites sur le cône et celles faites sur les filopodes/épines vont dans le sens d'un modèle d'embrayage analogue.

Tout d'abord au niveau de l'organisation spatiale des principaux acteurs, on retrouve la N-cadhérine au niveau de la périphérie de l'épine, l'actine au niveau central, et la myosine II, bien que moins compartimenté par rapport au cône, présente des amas au niveau du coup de l'épine en accord avec un éventuel rôle de traction. Il existe cependant une différence majeure entre cône et épine: celle-ci se situe au niveau de l'organisation de l'actine. Il existe au niveau du cône de croissance deux populations: des faisceaux de filaments d'actine orientés constituant les filopodes ; séparés par un réseau de filaments plus courts, ramifiés et réticulés constituant les lamellipodes (Lewis et Bridgman, 1992 ; Korobova and Svitkina, 2008). Alors qu'au niveau de l'épine il s'agit plutôt d'un réseau branché de courts filaments d'actines (Korobova et Svitkina, 2010). Le mécanisme de sectionnement des filaments d'actine, opéré par la myosine II, et décrit par Medeiros au niveau du cône de croissance pourraient donc être ici légèrement différent (Medeiros et al., 2006). Malgré tout, l'utilisation de différentes drogues modulant l'activité de cette protéine a démontré que l'activité de la myosine II régulait bel et bien le flux rétrograde de l'actine dans le filopode dendritique et jouait un rôle dans la maturation de l'épine (Ryu et al., 2006 ; Tatavarty et al., 2012). La relation moteur myosine/actine étant relativement établie, qu'en est-il maintenant concernant la relation actine/protéines d'adhésion ?

J'ai comparé la motilité des filopodes libres à celles des filopodes émettant des contacts avec des axones. Les résultats montrent une diminution de la motilité actine dépendante entre les deux états. Cet effet augmente d'ailleurs avec la maturation,

les épines matures (21 jours de culture) étant 4 fois moins motiles que les épines jeunes (10 jours de culture). Ainsi, lorsque des engagements adhésifs sont mis en jeu, la motilité du réseau d'actine diminue. Si l'on transpose avec les observations que j'ai faites sur le cône de croissance, cet effet s'apparente au ralentissement du flux d'actine au niveau des zones adhésives lors de l'engagement du mécanisme d'embrayage. Cependant, les résultats obtenus sur les épines dendritiques concernent la motilité et non pas directement le flux. Il conviendrait donc d'effectuer des expériences de sptPALM pour comparer la vitesse du flux d'actine dans des filopodes libres à celle des filopodes en contact avec l'axone. Des données récentes de l'équipe semblent d'ailleurs aller dans ce sens, le flux d'actine étant plus lent au niveau des épines jeunes (21 nm.s^{-1}) par rapport aux filopodes (34 nm.s^{-1}) (Chazeau et al., en soumission ; Tatavarty et al., 2012).

Afin de montrer que les effets observés sur la dynamique de l'épine étaient bien dus à un couplage entre la F-actine et les adhésions N-cadhérines, nous avons par la suite testé l'effet de dominants négatifs N-cadhérine sur la motilité des épines. Les résultats montrent une augmentation significative de la motilité des épines. Ici encore l'analogie avec les résultats obtenus sur le cône de croissance est possible: l'expression de mutants N-cadhérine inhibent le ralentissement du flux d'actine lorsque la connexion entre adhésions N-cadhérine et cytosquelette d'actine est perturbée. Un mécanisme similaire semble donc nécessaire à la maturation des épines. Ce mécanisme pourrait faire intervenir des protéines adaptatrices comme l' α -caténine et la vinculine qui sont impliqués dans la mécanotransduction au niveau des jonctions adhérentes des cellules épithéliales (Weiss et al., 1998 ; Giannone et al., 2009). Il serait donc intéressant de perturber l'expression de ces protéines et d'observer l'effet à la fois sur la motilité et sur la morphologie de l'épine. Nous pourrions pour cela renouveler les expériences de pinces optiques et de substrats micro décorés recouverts de N-cadhérine en transfectant les neurones avec des SiRNA dirigés contre ces deux protéines.

L'utilisation de micro motifs recouverts de N-cadhérine permet de ralentir spécifiquement le flux d'actine au niveau du cône de croissance via l'engagement de l'embrayage. On a donc émis l'hypothèse que si un tel mécanisme était à l'origine de la transition filopode/épine, alors les motifs N-cadhérine seraient capables d'induire de façon ciblée la maturation morphologique du filopode en épine. Le fait de présenter de multiples zones d'ancrage stables, où des adhésions N-cadhérines

peuvent spécifiquement être engagées, a induit de façon ciblée et spécifique la formation de structures s'apparentant aux épines. Ces structures épineuses présentent une accumulation d'actine et de N-cadhérine au niveau de la zone de contact avec les motifs, effets observés lors de la maturation de l'épine (Elste et Benson, 2006 ; Sekino et al., 2007).

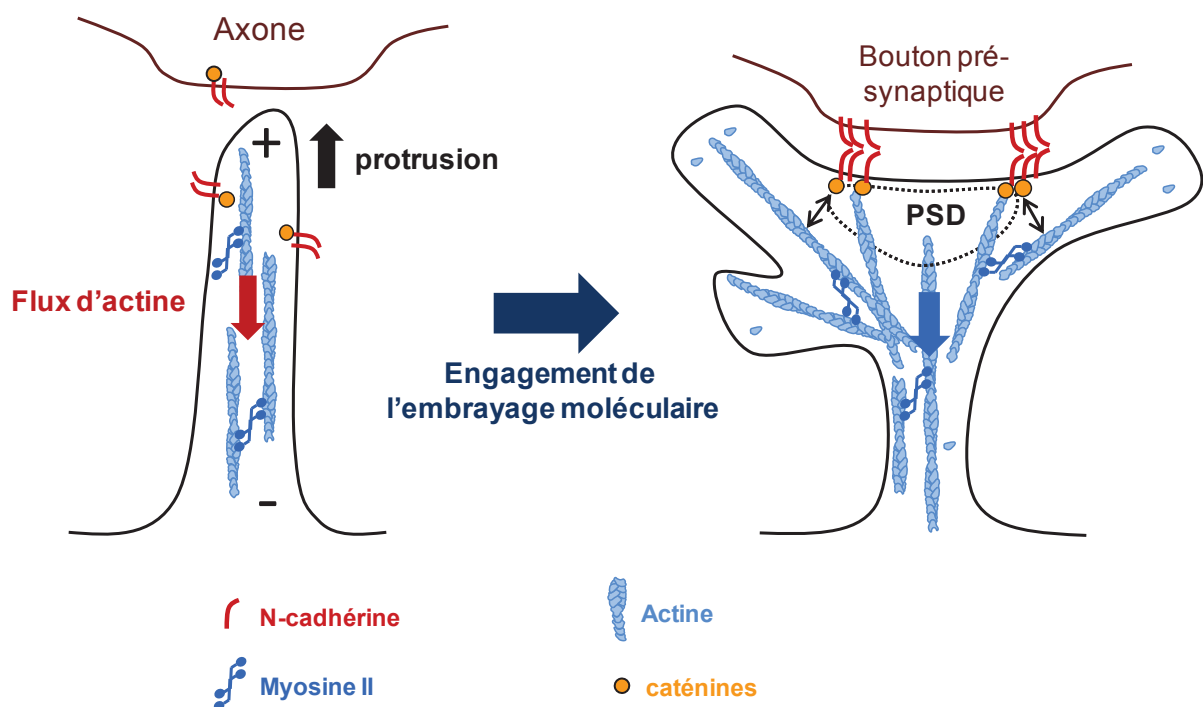
Des expériences de pinces optiques utilisant des billes recouvertes de N-cadhérine ont permis à notre équipe de montrer quelques années plus tôt l'existence d'un couplage mécanique entre flux d'actine et adhésions cadhérines au niveau du cône de croissance (Bard et al., 2008). Nous avons donc reproduit ce type d'expérience sur les filopodes dendritiques, et obtenu des résultats semblables avec une rétraction des billes recouvertes de N-cadhérine qui fluent avec l'actine et une accumulation d'actine au niveau de la zone de contact avec la bille. De plus, on observe un changement morphologique du filopode avec l'apparition d'un renflement d'actine au niveau de la tête, se rapprochant ainsi de la forme d'une épine. Ces résultats viennent renforcer l'idée d'un couplage physique cadhérine/actine aboutissant à une réorganisation du réseau d'actine.

Différentes expériences complémentaires sont envisagées. Notamment des expériences de FRAP sur épines dendritiques afin d'observer la dynamique de l'actine dans des conditions où les liaisons homophiliques N-cadhérines sont perturbées à différents degrés. Nous voudrions ainsi observer le retour de fluorescence de l'actine dans des conditions où l'engagement de liaisons homophiliques N-cadhérine est favorisé avec des neurones surexprimant la N-cadhérine sauvage. Dans des conditions où ces liaisons sont modérément perturbées, par exemple en exprimant un mutant dont le domaine extracellulaire a été modifié (NcadW2A). Et enfin dans des conditions où elles sont fortement perturbées, grâce à un mutant N-cadhérine dont le domaine extracellulaire a été complètement tronqué (Ncad Δ E). Nous pourrions ainsi prouver la relation entre engagement d'adhésions homophiliques N-cadhérines, perturbation de la dynamique d'actine et degré de couplage cadhérine/actine dans l'épine dendritique.

Ensuite, comme pour le cône, nous souhaiterions modéliser la dynamique de l'actine dans le filopode. Différents programmes sont en cours de réalisation: un visant à reproduire l'enrichissement de l'actine observé dans la transition épine/filopode, un autre simulant des expériences de FRAP sur l'actine, et un dernier modélisant l'effet de la cytochalasine D sur le réseau d'actine. Les différents

coefficients utilisés seraient choisis en fonction de nos propres observations et à partir de résultats déjà publiés dans d'autres équipes (Hotulainen et al., 2009 ; Tatavarty et al., 2012).

L'ensemble de nos résultats nous amènent à penser qu'il existe bien un couplage mécanique entre les adhésions cadhérines engagées au contact axon/dendrite, et le réseau d'actine post synaptique. Ce couplage régulant à la fois la morphologie de l'épine et sa stabilité, contrôlant ainsi sa maturation et son maintien. Ce phénomène serait moins fort que dans le cône, possiblement dû au fait que les forces mécaniques nécessaires à faire avancer un cône de croissance sont plus importantes que celles mises en jeu dans le maintien et la plasticité des contacts axones/dendrites.



III. Contrôle spatial du développement neuronal et de la synaptogenèse

Un aspect plus appliqué de ma thèse m'a permis de participer au développement d'un outil technologique autorisant la croissance de neurones sur des micro-motifs pouvant être recouverts par diverses protéines d'adhérence neuronales. L'utilisation de ces substrats dans le cadre d'études fondamentales menées au sein de l'équipe nous a permis de mettre en avant différentes applications de ce produit dans l'étude de divers processus biologiques.

Dans l'article 1, les substrats micro-imprimés nous ont permis d'étudier le couplage mécanique entre la dynamique de l'actine et les adhésions N-cadhérines dans la migration du cône de croissance. Cet outil nous a permis un criblage des protéines d'embrayage supposées être impliquées dans ce mécanisme telles que l' α -caténine et la vinculine. En couplant l'utilisation des substrats à la microscopie PALM, nous avons pu cartographier en haute résolution la répartition et la dynamique de ces différentes molécules au niveau du cône. Ainsi, de façon plus générale, ces substrats pourraient permettre d'étudier à l'échelle moléculaire l'implication de protéines ou de substances chimiques sur la structure, le développement et la migration du cône de croissance.

Dans un second article, les substrats nous ont permis d'étudier des fonctions plus tardives de la N-cadhérine, sur la maturation morphologique des filopodes dendritiques. On a pu effectuer une analyse qualitative sur les filopodes qui d'après nos résultats avaient une morphologie d'épine mature au contact des micro-motifs. Et nous avons aussi pu effectuer une analyse quantitative de l'enrichissement de protéines comme la N-cadhérine ou l'actine sur les zones adhésives cadhérines. Ce support permet donc l'analyse quantitative et qualitative de processus impliqués dans la maturation dendritique.

Enfin, dans le troisième article, nous avons vérifié si ces substrats pouvaient permettre l'induction ciblée de synapses. D'après des études antérieures utilisant la co-culture, il a été montré que les protéines d'adhésion neuroligine et neurexine pouvaient induire à elles seules la formation respective de pré-synapses et de post-

synapses (Scheiffele et al., 2000 ; Graf et al., 2004). Nous avons donc testé l'effet synaptogène de ces protéines sur nos substrats. Dans nos conditions, nous avons été capables d'induire de façon contrôlée la formation d'hémi-post synapses fonctionnelles en recouvrant les substrats de neurexine-1 β . Par contre, concernant les substrats recouverts de neuroligine-1, les neurones ont été incapables de croître et nous n'avons pas pu induire la formation de pré-synapses au moyen de cette protéine. Différentes hypothèses peuvent expliquer ces résultats: tout d'abord le fait que la neurexine qui doit adhérer à la neuroligine immobilisée sur le substrat soit majoritairement présente au niveau de l'axone, ce qui pourrait ne pas être suffisant pour permettre l'adhésion neuronale, surtout à des stades précoces où l'axone n'est pas encore développé. Une autre hypothèse vient d'une contrainte des substrats, à savoir que les protéines utilisées pour recouvrir ces substrats sont immobilisées. On peut supposer que l'effet synaptogène de la neuroligine nécessite la diffusion membranaire de celle-ci. Nous avons tout de même réussi à induire la formation de pré-synapses matures, et ce en recouvrant les substrats par une autre protéine d'adhésion aux propriétés synaptogènes avérées, SynCam 1 (Robbins et al., 2010).

Ces expériences apportent une application supplémentaire aux substrats micro-structurés, à savoir le contrôle spatial de la formation de synapses avec un rendement élevé. D'après nos résultats, les synapses induites par notre système sont fonctionnelles et recrutent spécifiquement différentes protéines caractéristiques des éléments pré-synaptiques (Synapsine) et post-synaptique (PSD-95, AMPAR) qui peuvent être utilisés comme marqueurs. Ainsi, grâce à des techniques d'immunocytochimie, on a pu quantifier le nombre de synapses, et facilement analyser l'effet de composés chimiques et/ou de protéines agissant sur la synaptogenèse.

Ceci m'a permis de confirmer l'effet non synaptogène de la N-cadhérine (Graf et al., 2004 ; Nam et Chen, 2005). J'ai aussi pu aussi montrer que la N-cadhérine stimulait la croissance dendritique et axonale, et qu'elle jouait un rôle essentiel dans la maturation morphologique, en accord avec la littérature (Ye and Jan, 2005). Pour cela, nous avons analysé la croissance des neurites en comparant leur nombre et leur taille, ce qui constitue une application supplémentaire.

L'ensemble de ces données montrent que les substrats micro-patternés pourraient avoir une utilité au niveau de l'industrie pharmaceutique. Ils pourraient permettre le dépistage de nouvelles cibles thérapeutiques pour des pathologies liées

à la neurodégénérescence ou au neurodéveloppement. On sait par exemple que plusieurs mutations dans les gènes humains codant pour la neurexine1 et la neuroligine 3 et 4 ont été associées à certaines formes d'autisme (Jamain et al., 2003 ; Kim et al., 2008). On pourrait donc déposer des neurones issus d'un modèle murin de l'autisme (Tabuchi et al., 2007) sur des substrats recouverts de neurexines, et cribler l'effet de différentes drogues sur le recouvrement de fonctions neuronales au travers de différentes observations (nombre de synapses, organisation protéique) et quantifications du niveau de protéines recrutées (neuroligine, PSD-95, ratio NMDA/AMPA).

Nous allons essayer de valoriser nos résultats en réalisant un criblage de composés pharmacologiques impliqués dans la croissance neuronale (ex : BDNF ; Labelle et Leclerc, 2000 / TSA ; Gaub et al., 2010) et la synaptogénèse (ex : Histone Decarboxylase ; Shi et al., 2013 / Wnt7a ; Ciani et al., 2011), en utilisant le système breveté de neurones cultivés sur substrats micropatternés recouverts de molécules d'adhérence neuronales. Nous essayons actuellement de trouver des solutions pour tenter d'accélérer le criblage. Tout d'abord, afin d'augmenter le rendement des expériences, plutôt que d'utiliser des lamelles CYTOO patternées carrées 20x20 mm, nous utiliserions des lamelles au format lame de microscope sur lesquelles on fixerait des inserts collant 8 puits (Sticky Slide 8 well, Ibidi) autorisant plusieurs conditions. Ensuite, afin de gagner du temps au niveau de l'acquisition et de l'analyse, nous utiliserions un microscope semi-automatique développé par Marouen Bouazzi (équipe Sibarita, Bordeaux 2). Ce projet va être réalisé en collaboration avec CYTOO et serait financé par l'organisme de valorisation Aquitaine Science Transfert, qui gère actuellement notre brevet.

BIBLIOGRAPHIE

- 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. doi:10.1038/nn1212.
- 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. doi:10.1073/pnas.0710504105.
- Ackermann, M., and A. Matus. 2003. Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nature neuroscience*. 6:1194–200. doi:10.1038/nn1135.
- Alom Ruiz, S., and C.S. Chen. 2007. Microcontact printing: A tool to pattern. *Soft Matter*. 3:168. doi:10.1039/b613349e.
- Aoto, J., D.C. Martinelli, R.C. Malenka, K. Tabuchi, and T.C. Südhof. 2013. Presynaptic neurexin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. *Cell*. 154:75–88. doi:10.1016/j.cell.2013.05.060.
- Araç, D., A. a Boucard, E. Ozkan, P. Strop, E. Newell, T.C. Südhof, and A.T. Brunger. 2007. Structures of neuroligin-1 and the neuroligin-1/neurexin-1 beta complex reveal specific protein-protein and protein-Ca²⁺ interactions. *Neuron*. 56:992–1003. doi:10.1016/j.neuron.2007.12.002.
- Archbold, H.C., Y.X. Yang, L. Chen, and K.M. Cadigan. 2012. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta physiologica (Oxford, England)*. 204:74–109. doi:10.1111/j.1748-1716.2011.02293.x.
- Argiro, V., M.. Bunge, and M.. Johnson. 1985. A quantitative study of growth cone filopodial extension. *Journal of Neuroscience Research*.
- Arikkath, J., and L.F. Reichardt. 2009. Cadherins and catenins at synapses: roles in synaptogenesis and synaptic plasticity. *Trends in Cell Biology*. 31:487–494. doi:10.1016/j.tins.2008.07.001.Cadherins.
- Atasoy, D., S. Schoch, A. Ho, K. a Nadasy, X. Liu, W. Zhang, K. Mukherjee, E.D. Nosyreva, R. Fernandez-Chacon, M. Missler, E.T. Kavalali, and T.C. Südhof. 2007. Deletion of CASK in mice is lethal and impairs synaptic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:2525–30. doi:10.1073/pnas.0611003104.
- Axelrod, D. 1981. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*. 89:141–5.
- Azioune, A., N. Carpi, Q. Tseng, M. Théry, and M. Piel. 2010. Protein micropatterns: A direct printing protocol using deep UVs. *Methods in cell biology*. 97:133–46. doi:10.1016/S0091-679X(10)97008-8.

- Bang, M.L., and S. Owczarek. 2013. A matter of balance: role of neurexin and neuroligin at the synapse. *Neurochemical research*. 38:1174–89. doi:10.1007/s11064-013-1029-9.
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.5331-07.2008.
- Batchelder, E.L., G. Hollopeter, C. Campillo, X. Mezanges, E.M. Jorgensen, P. Nassoy, P. Sens, and J. Plastino. 2011. Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:11429–34. doi:10.1073/pnas.1010481108.
- Bats, C., L. Groc, and D. Choquet. 2007. The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*. 53:719–34. doi:10.1016/j.neuron.2007.01.030.
- Behrens, J., J. von Kries, M. Kühl, L. Bruhn, D. Wedlich, R. Grosschedl, and W. Birchmeier. 1996. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 382(6592):638–42.
- 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*. 18:6892–6904.
- 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. doi:10.1126/science.1127344.
- Biederer, T. 2006. Bioinformatic characterization of the SynCAM family of immunoglobulin-like domain-containing adhesion molecules. *Genomics*. 87:139–50. doi:10.1016/j.ygeno.2005.08.017.
- 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. doi:10.1126/science.1072356.
- Bixby, J.L., and R. Zhang. 1990. Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *The Journal of cell biology*. 110:1253–60.
- Block, J., D. Breitsprecher, S. Kühn, M. Winterhoff, F. Kage, R. Geffers, P. Duwe, J.L. Rohn, B. Baum, C. Brakebusch, M. Geyer, T.E.B. Stradal, J. Faix, and K. Rottner. 2012. FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Current biology* □: *CB*. 22:1005–12. doi:10.1016/j.cub.2012.03.064.

- 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. doi:10.1126/science.1071559.
- Borghi, N., M. Sorokina, O.G. Shcherbakova, W.I. Weis, B.L. Pruitt, W.J. Nelson, and A.R. Dunn. 2012. E-cadherin is under constitutive actomyosin-generated tension that is increased at cell–cell contacts upon externally applied stretch. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:19034–19034. doi:10.1073/pnas.1217417109.
- Boscher, C., and R.-M. Mège. 2008. Cadherin-11 interacts with the FGF receptor and induces neurite outgrowth through associated downstream signalling. *Cellular signalling*. 20:1061–72. doi:10.1016/j.cellsig.2008.01.008.
- Boucard, A. a, A. a Chubykin, D. Comoletti, P. Taylor, and T.C. Südhof. 2005. A splice code for trans-synaptic cell adhesion mediated by binding of neuroligin 1 to alpha- and beta-neurexins. *Neuron*. 48:229–36. doi:10.1016/j.neuron.2005.08.026.
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.1223-10.2010.
- 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. doi:10.1016/j.tcb.2012.03.004.
- Breillat, C., O. Thoumine, and D. Choquet. 2007. Characterization of SynCAM surface trafficking using a SynCAM derived ligand with high homophilic binding affinity. *Biochemical and biophysical research communications*. 359:655–9. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.152.
- 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.
- Buck, K.B., and J.Q. Zheng. 2002. Growth cone turning induced by direct local modification of microtubule dynamics. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience. 22:9358–67.

- Budreck, E.C., and P. Scheiffele. 2007. Neuroligin-3 is a neuronal adhesion protein at GABAergic and glutamatergic synapses. *The European journal of neuroscience*. 26:1738–48. doi:10.1111/j.1460-9568.2007.05842.x.
- Burks, J., and Y.M. Agazie. 2006. Modulation of alpha-catenin Tyr phosphorylation by SHP2 positively effects cell transformation induced by the constitutively active FGFR3. *Oncogene*. 25:7166–79. doi:10.1038/sj.onc.1209728.
- Burnette, D.T., L. Ji, A.W. Schaefer, N. a Medeiros, G. Danuser, and P. Forscher. 2008. Myosin II activity facilitates microtubule bundling in the neuronal growth cone neck. *Developmental cell*. 15:163–9. doi:10.1016/j.devcel.2008.05.016.
- Campbell, D.S., and C.E. Holt. 2001. Chemotropic responses of retinal growth cones mediated by rapid local protein synthesis and degradation. *Neuron*. 32:1013–26.
- Chan, C.E., and D.J. Odde. 2008. Traction Dynamics of Filopodia on Compliant Substrates. *Science*. 322:1687–1691.
- Chappuis-Flament, S. 2001. Multiple cadherin extracellular repeats mediate homophilic binding and adhesion. *The Journal of Cell Biology*. 154:231–243. doi:10.1083/jcb.200103143.
- Chen, Y., J. Bourne, V.A. Pieribone, and R.M. Fitzsimonds. 2004. The role of actin in the regulation of dendritic spine morphology and bidirectional synaptic plasticity. *NeuroReport*. 15:5–8. doi:10.1097/01.wnr.0000120102.87037.
- Choquet, D., D.P. Felsenfeld, and M.P. Sheetz. 1997. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 88:39–48.
- Ciani, L., K.A. Boyle, E. Dickins, M. Sahores, D. Anane, D.M. Lopes, A.. Gibb, and P.C. Salinas. 2011. Wnt7a signaling promotes dendritic spine growth and synaptic strength through Ca²⁺ / Calmodulin-dependent protein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:10732–10737. doi:10.1073/pnas.1018132108/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1018132108.
- 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. doi:10.1038/nrn2373.
- Colonnier, M. 1968. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Research*. 268–87.
- Craig, E.M., D. Van Goor, P. Forscher, and A. Mogilner. 2012. Membrane tension, myosin force, and actin turnover maintain actin treadmill in the nerve growth cone. *Biophysical journal*. 102:1503–13. doi:10.1016/j.bpj.2012.03.003.

- Czöndör, K., M. Mondin, M. Garcia, M. Heine, R. Frischknecht, D. Choquet, J.-B. Sibarita, and O.R. Thoumine. 2012. Unified quantitative model of AMPA receptor trafficking at synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:3522–7. doi:10.1073/pnas.1109818109.
- Dailey, E., and S.J. Smith. 1996. The Dynamics of Dendritic Hippocampal Slices Structure in Developing. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience. 76:2983–2994.
- Dean, C., F.G. Scholl, J. Choih, S. DeMaria, J. Berger, E. Isacoff, and P. Scheiffele. 2003. Neurexin mediates the assembly of presynaptic terminals. *Nature neuroscience*. 6:708–16. doi:10.1038/nn1074.
- DeMali, K. a, C. a Barlow, and K. Burridge. 2002. Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion. *The Journal of cell biology*. 159:881–91. doi:10.1083/jcb.200206043.
- Desai, R., R. Sarpal, N. Ishiyama, M. Pellikka, M. Ikura, and U. Tepass. 2013. Monomeric α -catenin links cadherin to the actin cytoskeleton. *Nature Cell Biology*. 15:261–273. doi:10.1038/ncb2685.
- Doyle, A. 2010. Generation of Micropatterned Substrates Using Micro Photopatterning. *Current Protocols in Cell Biology*. 1–47. doi:10.1002/0471143030.cb1015s45.Generation.
- 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. doi:10.1016/j.cell.2005.09.021.
- 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. doi:10.1083/jcb.201001149.
- Dufour, S., R.-M. Mège, and J.P. Thiery. 2013. α -catenin, vinculin, and F-actin in strengthening E-cadherin cell-cell adhesions and mechanosensing. *Cell adhesion & migration*. 7:345–50. doi:10.4161/cam.25139.
- Elste, A.M., and D.L. Benson. 2006. Structural basis for developmentally regulated changes in cadherin function at synapses. *The Journal of comparative neurology*. 495:324–35. doi:10.1002/cne.20876.
- Ethell, I.M., and E.B. Pasquale. 2005. Molecular mechanisms of dendritic spine development and remodeling. *Progress in neurobiology*. 75:161–205. doi:10.1016/j.pneurobio.2005.02.003.
- Fischer, M., S. Kaech, D. Knutti, and a Matus. 1998. Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron*. 20:847–54.

- Fischer, M., S. Kaech, U. Wagner, H. Brinkhaus, and a Matus. 2000. Glutamate receptors regulate actin-based plasticity in dendritic spines. *Nature neuroscience*. 3:887–94. doi:10.1038/78791.
- Fleming, J.J., and P.M. England. 2010. AMPA receptors and synaptic plasticity: a chemist's perspective. *Nature chemical biology*. 6:89–97. doi:10.1038/nchembio.298.
- Fogel, A.I., M.R. Akins, A.J. Krupp, M. Stagi, V. Stein, and T. Biederer. 2007. SynCAMs organize synapses through heterophilic adhesion. *The Journal of neuroscience* *the official journal of the Society for Neuroscience*. 27:12516–30. doi:10.1523/JNEUROSCI.2739-07.2007.
- Forscher, P., and S.J. Smith. 1988. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *The Journal of cell biology*. 107:1505–16.
- Friedman, H. V, T. Bresler, C.C. Garner, and N.E. Ziv. 2000. Assembly of new individual excitatory synapses: time course and temporal order of synaptic molecule recruitment. *Neuron*. 27:57–69.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2010.05.026.
- 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.
- Ganz, A., M. Lambert, A. Saez, P. Silberzan, A. Buguin, R.M. Mège, and B. Ladoux. 2006. Traction forces exerted through N-cadherin contacts. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*. 98:721–30. doi:10.1042/BC20060039.
- Gaub, P., a Tedeschi, R. Puttagunta, T. Nguyen, a Schmandke, and S. Di Giovanni. 2010. HDAC inhibition promotes neuronal outgrowth and counteracts growth cone collapse through CBP/p300 and P/CAF-dependent p53 acetylation. *Cell death and differentiation*. 17:1392–408. doi:10.1038/cdd.2009.216.
- Gerrow, K., and a El-Husseini. 2006. Cell adhesion molecules at the synapse. *Frontiers in Bioscience*. 11:2400–19.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2006.01.015.

- Giannone, G., R.-M. Mège, and O. Thoumine. 2009. Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends in cell biology*. 19:475–86. doi:10.1016/j.tcb.2009.07.001.
- Giannone, G., M. Mondin, D. Grillo-Bosch, B. Tessier, E. Saint-Michel, K. Czöndör, M. Sainlos, D. Choquet, and O. Thoumine. 2013. Neurexin-1 β binding to neuroligin-1 triggers the preferential recruitment of PSD-95 versus gephyrin through tyrosine phosphorylation of neuroligin-1. *Cell reports*. 3:1996–2007. doi:10.1016/j.celrep.2013.05.013.
- Gilmore, A., and K. Burridge. 1996. Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature*. 381(6582):531–5.
- Van Goor, D., C. Hyland, A.W. Schaefer, and P. Forscher. 2012. The Role of Actin Turnover in Retrograde Actin Network Flow in Neuronal Growth Cones. *PloS one*. 7. doi:10.1371/journal.pone.0030959.
- Graf, E.R., Y. Kang, A.M. Hauner, and A.M. Craig. 2006. Structure function and splice site analysis of the synaptogenic activity of the neurexin-1 beta LNS domain. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience. 26:4256–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.1253-05.2006.
- 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. doi:10.1016/j.cell.2004.11.035.
- Gray, E.G. 1959. Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: an electron microscope study. *Nature*. 93:420–33.
- Grzywa, E.L., A.C. Lee, G.U. Lee, and D.M. Suter. 2006. High-Resolution Analysis of Neuronal Growth Cone Morphology by Comparative Atomic Force and Optical Microscopy. *Journal of Neurobiology*. doi:10.1002/neu.
- Gumbiner, B.M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 6(8):622–34.
- Hagen, T., and A. Vidal-Puig. 2002. Characterisation of the phosphorylation of beta-catenin at the GSK-3 priming site Ser45. *Biochemical and biophysical research communications*. 294:324–8. doi:10.1016/S0006-291X(02)00485-0.
- Hall, a. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annual review of cell biology*. 10:31–54. doi:10.1146/annurev.cb.10.110194.000335.
- Halpain, S. 2000. Actin and the agile spine: how and why do dendritic spines dance? *Trends in neurosciences*. 23:141–6.

- 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. doi:10.1038/nsmb.1784.
- Hata, Y., S. Butz, and T.C. Südhof. 1996. CASK β : A Novel dlg / PSD95 Homolog with an N-Terminal Protein Kinase Domain Identified Interaction with Neurexins. *The Journal of neuroscience* β : the official journal of the Society for Neuroscience. 16:2488–2494.
- Hata, Y., B. Davletov, G. Petrenko, R. Jahn, and C. Südhof. 1993. Interaction of Synaptotagmin with the Cytoplasmic Domains of Neurexins fusion. *Neuron*. 10:307–315.
- Heetz, M.I.P.S., and C.G. Galbraith. 1997. A micromachined device provides a new bend on fibroblast traction forces. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:9114–9118.
- Hering, H., and M. Sheng. 2003. Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *The Journal of neuroscience* β : the official journal of the Society for Neuroscience. 23:11759–69.
- Hirano, S., and M. Takeichi. 2012. Cadherins in Brain Morphogenesis and Wiring. *Physiological Reviews*. 92:597–634. doi:10.1152/physrev.00014.2011.
- Hirao, K., Y. Hata, N. Ide, M. Takeuchi, M. Irie, Y. Yao, M. Deguchi, A. Toyoda, T.C. Südhof, and Y. Takai. 1998. A Novel Multiple PDZ Domain-containing Molecule Interacting with N-Methyl-D-aspartate Receptors and Neuronal Cell Adhesion Proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 273:21105–21110. doi:10.1074/jbc.273.33.21105.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2008.01.013.
- Hotulainen, P., and C.C. Hoogenraad. 2010. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *The Journal of cell biology*. 189:619–29. doi:10.1083/jcb.201003008.
- Hotulainen, P., O. Llano, S. Smirnov, K. Tanhuanpää, J. Faix, C. Rivera, and P. Lappalainen. 2009a. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 185:323–39. doi:10.1083/jcb.200809046.
- Hotulainen, P., O. Llano, S. Smirnov, K. Tanhuanpää, J. Faix, C. Rivera, and P. Lappalainen. 2009b. Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 185:323–39. doi:10.1083/jcb.200809046.

- 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. doi:10.1126/science.1135085.
- Huber, a H., and W.I. Weis. 2001. The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell*. 105:391–402.
- Humphries, J.D., P. Wang, C. Streuli, B. Geiger, M.J. Humphries, and C. Ballestrem. 2007. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of cell biology*. 179:1043–57. doi:10.1083/jcb.200703036.
- Ibarretxe, G., D. Perrais, F. Jaskolski, A. Vimeney, and C. Mulle. 2007. Fast regulation of axonal growth cone motility by electrical activity. *The Journal of neuroscience* [the official journal of the Society for Neuroscience]. 27:7684–95. doi:10.1523/JNEUROSCI.1070-07.2007.
- Ichtchenko, K., T. Nguyen, and T.C. Südhof. 1996. Structures, Alternative Splicing, and Neurexin Binding of Multiple Neuroligins. *Journal of Biological Chemistry*. 271:2676–2682. doi:10.1074/jbc.271.5.2676.
- Iki, J., A. Inoue, H. Bito, and S. Okabe. 2005. Bi-directional regulation of postsynaptic cortactin distribution by BDNF and NMDA receptor activity. *The European journal of neuroscience*. 22:2985–94. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04510.x.
- Irie, M., Y. Hata, M. Takeuchi, K. Ichtchenko, A. Toyoda, K. Hirao, Y. Takai, T.W. Rosahl, and T.C. Südhof. 1997. Binding of Neuroligins to PSD-95. *Science*. 277:1511–1515. doi:10.1126/science.277.5331.1511.
- Ishiyama, N., and M. Ikura. 2012. Adherens Junctions: from Molecular Mechanisms to Tissue Development and Disease. 60:39–62. doi:10.1007/978-94-007-4186-7.
- 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.
- Jamain, S., H. Quach, C. Betancur, M. Råstam, C. Colineaux, C. Gillberg, H. Söderström, B. Giros, M. Leboyer, C. Gillberg, and T. Bourgeron. 2003. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nature Genetics*. 1:27–9.
- Jamieson, C., M. Sharma, and B.R. Henderson. 2012. Wnt signaling from membrane to nucleus: β -catenin caught in a loop. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 44:847–50. doi:10.1016/j.biocel.2012.03.001.
- 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. doi:10.1038/nature01794.1.

- Kasai, H., M. Matsuzaki, J. Noguchi, N. Yasumatsu, and H. Nakahara. 2003. Structure-stability-function relationships of dendritic spines. *Trends in neurosciences*. 26:360–8. doi:10.1016/S0166-2236(03)00162-0.
- Kayser, M.S., M.J. Nolt, and M.B. Dalva. 2008. EphB receptors couple dendritic filopodia motility to synapse formation. *Neuron*. 59:56–69. doi:10.1016/j.neuron.2008.05.007.
- 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, H., S. Kishikawa, A.W. Higgins, I. Seong, D.J. Donovan, Y. Shen, E. Lally, L.A. Weiss, J. Najm, K. Kutsche, M. Descartes, L. Holt, S. Braddock, R. Troxell, L. Kaplan, F. Volkmar, A. Klin, K. Tsatsanis, D.J. Harris, I. Noens, D.L. Pauls, M.J. Daly, M.E. Macdonald, C.C. Morton, B.J. Quade, and J.F. Gusella. 2008. Disruption of Neurexin 1 Associated with Autism Spectrum Disorder. *The American Journal of Human Genetics*. 199–207. doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.011.
- Kneussel, M., and W. Wagner. 2013. Myosin motors at neuronal synapses: drivers of membrane transport and actin dynamics. *Nature reviews. Neuroscience*. 14:233–47. doi:10.1038/nrn3445.
- 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.
- Kobielak, A., and E. Fuchs. 2004. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 5:614–25. doi:10.1038/nrm1433.
- Kolega, J. 2004. Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochemical and biophysical research communications*. 320:1020–5. doi:10.1016/j.bbrc.2004.06.045.
- Korobova, F., and T. Svitkina. 2008. Arp2 / 3 Complex Is Important for Filopodia Formation , Growth Cone Motility , and Neuritogenesis in Neuronal Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 19:1561–1574. doi:10.1091/mbc.E07.
- Korobova, F., and T. Svitkina. 2010. Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis Farida Korobova and Tatyana Svitkina. *Molecular Biology of the Cell*. 21:165–176. doi:10.1091/mbc.E09.
- Kowalczyk, S., A. Winkelmann, B. Smolinsky, B. Förstera, I. Neundorf, G. Schwarz, and J.C. Meier. 2013. Direct binding of GABAA receptor β 2 and β 3 subunits to gephyrin. *The European journal of neuroscience*. 37:544–54. doi:10.1111/ejn.12078.

- 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. doi:10.1073/pnas.100139797.
- Labelle, C., and N. Leclerc. 2000. Exogenous BDNF, NT-3 and NT-4 differentially regulate neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons. *Brain research. Developmental brain research*. 123:1–11.
- Lauffenburger, D. a, and a F. Horwitz. 1996. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*. 84:359–69.
- Lee, H., C. Dean, and E. Isacoff. 2010. Alternative splicing of neuroligin regulates the rate of presynaptic differentiation. *The Journal of neuroscience* *the official journal of the Society for Neuroscience*. 30:11435–46. doi:10.1523/JNEUROSCI.2946-10.2010.
- Lele, Z., A. Folchert, M. Concha, G.-J. Rauch, R. Geisler, F. Rosa, S.W. Wilson, M. Hammerschmidt, and L. Bally-Cuif. 2002. Parachute/N-Cadherin Is Required for Morphogenesis and Maintained Integrity of the Zebrafish Neural Tube. *Development (Cambridge, England)*. 129:3281–94.
- Levinson, J.N., and A. El-Husseini. 2005. Building excitatory and inhibitory synapses: balancing neuroligin partnerships. *Neuron*. 48:171–4. doi:10.1016/j.neuron.2005.09.017.
- Levinson, J.N., R. Li, R. Kang, H. Moukhles, a El-Husseini, and S.X. Bamji. 2010. Postsynaptic scaffolding molecules modulate the localization of neuroligins. *Neuroscience*. 165:782–93. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.11.016.
- Lewis, a K., and P.C. Bridgman. 1992. Nerve growth cone lamellipodia contain two populations of actin filaments that differ in organization and polarity. *Journal Of Cell Biology*. 119:1219–43.
- Lin, A.C., and C.E. Holt. 2007. Local translation and directional steering in axons. *The EMBO journal*. 26:3729–36. doi:10.1038/sj.emboj.7601808.
- Lin, B., E. a Kramár, X. Bi, F. a Brucher, C.M. Gall, and G. Lynch. 2005. Theta stimulation polymerizes actin in dendritic spines of hippocampus. *The Journal of neuroscience* *the official journal of the Society for Neuroscience*. 25:2062–9. doi:10.1523/JNEUROSCI.4283-04.2005.
- Lin, C.H., E.M. Espreafico, M.S. Mooseker, and P. Forscher. 1996. Myosin drives retrograde F-actin flow in neuronal growth cones. *Neuron*. 16:769–782.
- Lin, C.H., and P. Forscher. 1993. Cytoskeletal remodeling during growth cone-target interactions. *The Journal of cell biology*. 121:1369–83.
- Lin, C.H., and P. Forscher. 1995. Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron*. 14:763–71.

- Linhoff, M.W., J. Laurén, R.M. Cassidy, F. a Dobie, H. Takahashi, H.B. Nygaard, M.S. Airaksinen, S.M. Strittmatter, and A.M. Craig. 2009. An unbiased expression screen for synaptogenic proteins identifies the LRRTM protein family as synaptic organizers. *Neuron*. 61:734–49. doi:10.1016/j.neuron.2009.01.017.
- 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. doi:10.1038/nrn2191.
- Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zi-pursky, and Darnell. 2003. *Molecular Cell Biology*, 5th edition. W.H.F.& Co, editor.
- Lovell, P., and L.L. Moroz. 2006. The largest growth cones in the animal kingdom: an illustrated guide to the dynamics of *Aplysia* neuronal growth in cell culture. *Integrative and comparative biology*. 46:847–70. doi:10.1093/icb/icl042.
- Lowery, L.A., and D. Van Vactor. 2009. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10. doi:10.1038/nrm2679.
- Maiden, S.L., and J. Hardin. 2011. The secret life of α -catenin: moonlighting in morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 195:543–52. doi:10.1083/jcb.201103106.
- Maletic-Savatic, M. 1999. Rapid Dendritic Morphogenesis in CA1 Hippocampal Dendrites Induced by Synaptic Activity. *Science*. 283:1923–1927. doi:10.1126/science.283.5409.1923.
- Masai, I. 2003. N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development*. 130:2479–2494. doi:10.1242/dev.00465.
- Matsunaga, M., K. Hatta, A. Nagafuchi, and M. Takeichi. 1988. Guidance of optic nerve fibres by N-cadherin adhesion molecules. *Nature*. 334(6177):62–4.
- Matsuzaki, M., N. Honkura, G.C.. Ellis-Davies, and H. Kasai. 2004. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 429. doi:10.1038/nature02594.1.
- Mattila, P.K., and P. Lappalainen. 2008. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:446–54. doi:10.1038/nrm2406.
- Matus, A. 2005. Growth of dendritic spines: a continuing story. *Current Opinion in Neurobiology*. doi:10.1016/j.conb.2005.01.015.
- Medeiros, N.A., D.T. Burnette, and P. Forscher. 2006. Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nature cell biology*. 8:215–226. doi:10.1038/ncb1367.

- Mendez, P., M. De Roo, L. Poglia, P. Klauser, and D. Muller. 2010. N-cadherin mediates plasticity-induced long-term spine stabilization. *The Journal of cell biology*. 189:589–600. doi:10.1083/jcb.201003007.
- 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*. 35:121–133.
- Meyer, G., F. Varoqueaux, A. Neeb, M. Oschlies, and N. Brose. 2004. The complexity of PDZ domain-mediated interactions at glutamatergic synapses: a case study on neuroligin. *Neuropharmacology*. 47:724–33. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.06.023.
- Mierke, C.T., P. Kollmannsberger, D.P. Zitterbart, J. Smith, B. Fabry, and W.H. Goldmann. 2008. Mechano-coupling and regulation of contractility by the vinculin tail domain. *Biophysical journal*. 94:661–70. doi:10.1529/biophysj.107.108472.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1988. Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron*. 1:761–72.
- 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. Tai, and E.M. Schuman. 2007. Effects of N-cadherin disruption on spine morphological dynamics. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 1. doi:10.3389/neuro.03.001.2007.
- Nagar, B., M. Overduin, M. Ikura, and J.M. Rini. 1996. Structural basis of calcium-induced E-cadherin rigidification and dimerization. *Nature*. 380(6572):360–4.
- Nägerl, U.V., N. Eberhorn, S.B. Cambridge, and T. Bonhoeffer. 2004. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. 44:759–67. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.016.
- Nakagawa, T., J. a Engler, and M. Sheng. 2004. The dynamic turnover and functional roles of alpha-actinin in dendritic spines. *Neuropharmacology*. 47:734–45. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.022.
- Nam, C.I., and L. Chen. 2005. Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102:6137–42. doi:10.1073/pnas.0502038102.
- Nieman, M.T., J.B. Kim, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1999. Mechanism of extracellular domain-deleted dominant negative cadherins. *Journal of cell science*. 112 (Pt 1:1621–32.

- Nieset, J.E., A.R. Redfield, F. Jin, K.A. Knudsen, K.R. Johnson, and M.J. Wheelock. 1997. Characterization of the interactions of α -catenin with α -actinin and β . *1022:1013–1022*.
- Niethammer, M., E. Kim, and M. Sheng. 1996. Interaction between the C terminus of NMDA receptor subunits and multiple members of the PSD-95 family of membrane-associated guanylate kinases. *The Journal of neuroscience* *16:2157–63*. *the official journal of the Society for Neuroscience*.
- Palmer, S.M., M.P. Playford, S.W. Craig, M.D. Schaller, and S.L. Campbell. 2009. Lipid binding to the tail domain of vinculin: specificity and the role of the N and C termini. *The Journal of biological chemistry*. 284:7223–31. doi:10.1074/jbc.M807842200.
- Passafaro, M., T. Nakagawa, C. Sala, and M. Sheng. 2003. Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature*. 424:677–681. doi:10.1038/nature01852.1.
- Penzes, P., and I. Rafalovich. 2012. Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 970:81–95. doi:10.1007/978-3-7091-0932-8.
- Pokutta, S., F. Drees, Y. Takai, W.J. Nelson, and W.I. Weis. 2002. Biochemical and structural definition of the β -afadin- and actin-binding sites of α -catenin. *The Journal of biological chemistry*. 277:18868–74. doi:10.1074/jbc.M201463200.
- Pokutta, S., and W.I. Weis. 2000. Structure of the dimerization and β -catenin-binding region of α -catenin. *Molecular cell*. 5:533–43.
- 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* *23:7129–42*. *the official journal of the Society for Neuroscience*.
- Poskanzer, K., L. a Needleman, O. Bozdagi, and G.W. Huntley. 2003. N-cadherin regulates ingrowth and laminar targeting of thalamocortical axons. *The Journal of neuroscience* *23:2294–305*. *the official journal of the Society for Neuroscience*.
- Poulopoulos, A., G. Aramuni, G. Meyer, T. Soykan, M. Hoon, T. Papadopoulos, M. Zhang, I. Paarmann, C. Fuchs, K. Harvey, P. Jedlicka, S.W. Schwarzacher, H. Betz, R.J. Harvey, N. Brose, W. Zhang, and F. Varoquaux. 2009. Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron*. 63:628–42. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.023.
- Racine, V., A. Hertzog, J. Jouanneau, J. Salamero, C. Kervrann, and J.B. Sibarita. 2006. MULTIPLE-TARGET TRACKING OF 3D FLUORESCENT OBJECTS BASED ON SIMULATED ANNEALING. *ISBI*. 1020–1023.

- Radice, G.L., H. Rayburn, H. Matsunami, K. a Knudsen, M. Takeichi, and R.O. Hynes. 1997. Developmental defects in mouse embryos lacking N-cadherin. *Developmental biology*. 181:64–78. doi:10.1006/dbio.1996.8443.
- Rangarajan, E.S., and T. Izard. 2013. Dimer asymmetry defines α -catenin interactions. *Nature Structural & Molecular Biology*. 1–7. doi:10.1038/nsmb.2479.
- Ranscht, B. 2000. Cadherins: molecular codes for axon guidance and synapse formation. *International journal of developmental neuroscience* *the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 18:643–51.
- Reinés, A., L.-P. Bernier, R. McAdam, W. Belkaid, W. Shan, A.W. Koch, P. Séguéla, D.R. Colman, and A.S. Dhaunchak. 2012. N-cadherin prodomain processing regulates synaptogenesis. *The Journal of neuroscience* *the official journal of the Society for Neuroscience*. 32:6323–34. doi:10.1523/JNEUROSCI.0916-12.2012.
- 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.
- Rimm, D.L., E.R. Koslov, P. Kebriaei, C.D. Cianci, and J.O.N.S. Morrow. 1995. the attachment of F-actin to the membrane adhesion complex al (E) -Catenin is an actin-binding and -bundling protein mediating. 92:8813–8817.
- Rio, A., R. Perez-jimenez, R. Liu, P. Roca-cusachs, J.M. Fernandez, and M.P. Sheetz. 2009. Stretching Single Talin Rod. *Science*. 323:638–641.
- Robbins, E.M., A.J. Krupp, K.P. De Arce, A.K. Ghosh, A.I. Fogel, A. Boucard, T.C. Südhof, V. Stein, and T. Biederer. 2010. SynCAM 1 Adhesion Dynamically Regulates Synapse Number and Impacts Plasticity and Learning. *Neuron*. 68:894–906. doi:10.1016/j.neuron.2010.11.003.SynCAM.
- Rodriguez, O.C., A.W. Schaefer, C. a Mandato, P. Forscher, W.M. Bement, and C.M. Waterman-Storer. 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nature cell biology*. 5:599–609. doi:10.1038/ncb0703-599.
- Roth, S., M. Bisbal, J. Brocard, G. Bugnicourt, Y. Saoudi, A. Andrieux, S. Gory-Fauré, and C. Villard. 2012. How morphological constraints affect axonal polarity in mouse neurons. *PloS one*. 7:e33623. doi:10.1371/journal.pone.0033623.
- Rubio, M.D., R. Johnson, C.A. Miller, R.L. Haganir, and G. Rumbaugh. 2011. Myosin II Motors. *The Journal of neuroscience* *the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:1448 –1460. doi:10.1523/JNEUROSCI.3294-10.2011.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2005.12.017.

- Sabatini, B.L., M. Maravall, and K. Svoboda. 2001. Ca²⁺ signaling in dendritic spines. *Current opinion in neurobiology*. 11:349–56.
- Sabine Pokutta‡,§, Frauke Drees§, Yoshimi Takai¶, W. James Nelson§, and W.I., and Weis. 2012. Biochemical and Structural Definition of the I-Afadin- and Actin-binding Sites of α -Catenin. *Journal of Biological Chemistry*. 277:18868–18874. doi:10.1074/jbc.M201463200.Biochemical.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2007.04.012.
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.3165-04.2005.
- Saxton, M.J. 1994. Anomalous diffusion due to obstacles: a Monte Carlo study. *Biophysical Journal*. 66:394–401. doi:10.1016/S0006-3495(94)80789-1.
- Schaefer, A.W., N. Kabir, and P. Forscher. 2002. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *The Journal of cell biology*. 158:139–52. doi:10.1083/jcb.200203038.
- 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.
- Sekino, Y., N. Kojima, and T. Shirao. 2007. Role of actin cytoskeleton in dendritic spine morphogenesis. *Neurochemistry international*. 51:92–104. doi:10.1016/j.neuint.2007.04.029.
- Shapiro, L., and W.I. Weis. 2009. Structure and biochemistry of cadherins and catenins. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 1–21.
- Shi, P., M.A. Scott, B. Ghosh, D. Wan, Z. Wissner-gross, R. Mazitschek, S.J. Haggarty, and M.F. Yanik. 2013. Identification of small molecules that Enhance Synaptogenesis using Synapse Microarrays. *Nature communications*. doi:10.1038/ncomms1518.Identification.
- Shirao, T., and C. González-Billault. 2013. Actin filaments and microtubules in dendritic spines. *Journal of neurochemistry*. 126:155–64. doi:10.1111/jnc.12313.
- 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. doi:10.1523/JNEUROSCI.0470-10.2010.

- Song, J.Y., K. Ichtchenko, T.C. Südhof, and N. Brose. 1999. Neuroligin 1 is a postsynaptic cell-adhesion molecule of excitatory synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:1100–5.
- Stagi, M., A.I. Fogel, and T. Biederer. 2010. SynCAM 1 participates in axo-dendritic contact assembly and shapes neuronal growth cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:7568–73. doi:10.1073/pnas.0911798107.
- 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. doi:10.1038/nn811.
- Südhof, T.C. 2008. Neuroligins and neurexins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*. 455:903–11. doi:10.1038/nature07456.
- Suter, D.M., and P. Forscher. 1998. An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Current opinion in neurobiology*. 8:106–16.
- Suter, D.M., and P. Forscher. 2000. Substrate – Cytoskeletal Coupling as a Mechanism for the Regulation of Growth Cone Motility and Guidance ABSTRACT: *Journal of Neurobiology*.
- Tabuchi, K., J. Blundell, M.R. Etherton, R.E. Hammer, X. ran Liu, C.M. Powell, and T.C. Südhof. 2007. A Neuroligin-3 Mutation Implicated in Autism Increases Inhibitory Synaptic Transmission in Mice. *Science*. 318:71–76. doi:10.1126/science.1146221.A.
- Tabuchi, K., and T.C. Südhof. 2002. Structure and evolution of neurexin genes: insight into the mechanism of alternative splicing. *Genomics*. 79:849–59. doi:10.1006/geno.2002.6780.
- Tada, T., and M. Sheng. 2006. Molecular mechanisms of dendritic spine morphogenesis. *Current opinion in neurobiology*. 16:95–101. doi:10.1016/j.conb.2005.12.001.
- Tai, C.-Y., S.P. Mysore, C. Chiu, and E.M. Schuman. 2007. Activity-regulated N-cadherin endocytosis. *Neuron*. 54:771–85. doi:10.1016/j.neuron.2007.05.013.
- Takahashi, H., Y. Sekino, S. Tanaka, T. Mizui, S. Kishi, and T. Shirao. 2003. Drebrin-dependent actin clustering in dendritic filopodia governs synaptic targeting of postsynaptic density-95 and dendritic spine morphogenesis. *The Journal of neuroscience*: the official journal of the Society for Neuroscience. 23:6586–95.
- Takeichi, M. 1977. FUNCTIONAL CORRELATION BETWEEN CELL ADHESIVE PROPERTIES AND SOME CELL SURFACE PROTEINS Measurement of Cell Aggregation Preparation of Single Cells Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. 464–474.

- Tan, Z.-J., Y. Peng, H.-L. Song, J.-J. Zheng, and X. Yu. 2010. N-cadherin-dependent neuron-neuron interaction is required for the maintenance of activity-induced dendrite growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:9873–8. doi:10.1073/pnas.1003480107.
- Tang, L., C.P. Hung, and E.M. Schuman. 1998. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron*. 20:1165–75.
- 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*. 23:3167–77. doi:10.1091/mbc.E12-02-0165.
- Tessier-Lavigne, M., and M. Placzek. 1991. Target attraction: are developing axons guided by chemotropism? *Trends in neurosciences*. (7):303–10.
- Thievensen, I., P.M. Thompson, S. Berlemont, K.M. Plevock, S. V Plotnikov, A. Zemljic-Harpf, R.S. Ross, M.W. Davidson, G. Danuser, S.L. Campbell, and C.M. Waterman. 2013. Vinculin-actin interaction couples actin retrograde flow to focal adhesions, but is dispensable for focal adhesion growth. *The Journal of cell biology*. 202:163–77. doi:10.1083/jcb.201303129.
- Togashi, H., K. Abe, A. Mizoguchi, K. Takaoka, O. Chisaka, and M. Takeichi. 2002. Cadherin regulates dendritic spine morphogenesis. *Neuron*. 35:77–89.
- Tomaselli, K.J., K.M. Neugebauer, J.L. Bixby, J. Lilien, and L.F. Reichardt. 1988. N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. *Neuron*. 1:33–43.
- Tretter, V., T.C. Jacob, J. Mukherjee, J.-M. Fritschy, M.N. Pangalos, and S.J. Moss. 2008. The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *The Journal of neuroscience* [the official journal of the Society for Neuroscience]. 28:1356–65. doi:10.1523/JNEUROSCI.5050-07.2008.
- Twiss, F., Q. Le Duc, S. Van Der Horst, H. Tabdili, G. Van Der Krogt, N. Wang, H. Rehmann, S. Huveneers, D.E. Leckband, and J. De Rooij. 2012. Vinculin-dependent Cadherin mechanosensing regulates efficient epithelial barrier formation. *Biology open*. 1:1128–40. doi:10.1242/bio.20122428.
- Uchinozo, K. 1965. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*. 207(997):642–3.
- Ullrich, B., Y. a Ushkaryov, and T.C. Südhof. 1995. Cartography of neurexins: more than 1000 isoforms generated by alternative splicing and expressed in distinct subsets of neurons. *Neuron*. 14:497–507.
- Varoqueaux, F., S. Jamain, and N. Brose. 2004. Neuroligin 2 is exclusively localized to inhibitory synapses. *European journal of cell biology*. 83:449–56. doi:10.1078/0171-9335-00410.

- 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.
- Wierenga, C.J., N. Becker, and T. Bonhoeffer. 2008. GABAergic synapses are formed without the involvement of dendritic protrusions. *Nature neuroscience*. 11:1044–52. doi:10.1038/nn.2180.
- Williams, E.J., J. Furness, F.S. Walsh, and P. Doherty. 1994. Activation of the FGF receptor underlies neurite outgrowth stimulated by L1, N-CAM, and N-cadherin. *Neuron*. 13:583–94.
- Williams, E.J., G. Williams, F. V Howell, S.D. Skaper, F.S. Walsh, and P. Doherty. 2001. Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *The Journal of biological chemistry*. 276:43879–86. doi:10.1074/jbc.M105876200.
- 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 treadmill through network disassembly. *Nature*. 465:373–7. doi:10.1038/nature08994.
- Xing, Y., K.-I. Takemaru, J. Liu, J.D. Berndt, J.J. Zheng, R.T. Moon, and W. Xu. 2008. Crystal structure of a full-length beta-catenin. *Structure (London, England)*: 1993). 16:478–87. doi:10.1016/j.str.2007.12.021.
- Xu, G., A.W.B. Craig, P. Greer, M. Miller, P.Z. Anastasiadis, J. Lilien, and J. Balsamo. 2004. Continuous association of cadherin with beta-catenin requires the non-receptor tyrosine-kinase Fer. *Journal of cell science*. 117:3207–19. doi:10.1242/jcs.01174.
- Yamada, S., S. Pokutta, F. Drees, W.I. Weis, and W.J. Nelson. 2005. Deconstructing the Cadherin-Catenin-Actin Complex. *Cell*. 889–901. doi:10.1016/j.cell.2005.09.020.
- Ye, B., and Y.N. Jan. 2005. The cadherin superfamily and dendrite development. *Trends in cell biology*. 15:61–4. doi:10.1016/j.tcb.2004.12.005.
- Yonemura, S., Y. Wada, T. Watanabe, A. Nagafuchi, and M. Shibata. 2010. alpha-Catenin as a tension transducer that induces adherens junction development. *Nature cell biology*. 12:533–42. doi:10.1038/ncb2055.
- Yu, X., and R.C. Malenka. 2004. Multiple functions for the cadherin/catenin complex during neuronal development. *Neuropharmacology*. 47:779–86. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.07.031.
- Zhang, J., J.R. Shemezis, E.R. McQuinn, J. Wang, M. Sverdlov, and A. Chenn. 2013. AKT activation by N-cadherin regulates beta-catenin signaling and neuronal differentiation during cortical development. *Neural development*. 8:7. doi:10.1186/1749-8104-8-7.

- 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*. 10:1062–1068. doi:10.1038/ncb1765.Talin.
- 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. doi:10.1016/j.neuron.2004.11.011.
- Zhou, Z., J. Hu, M. Passafaro, W. Xie, and Z. Jia. 2011. GluA2 (GluR2) regulates metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression through N-cadherin-dependent and cofilin-mediated actin reorganization. *The Journal of neuroscience* *the official journal of the Society for Neuroscience*. 31:819–33. doi:10.1523/JNEUROSCI.3869-10.2011.
- Ziv, N.E., and S.J. Smith. 1996. Evidence for a Role of Dendritic Filopodia in Synaptogenesis and Spine Formation. *Neuron*. 17:91–102.