



HAL
open science

Rôle de la clathrine dans la formation des lamellipodes

Jérémie Gautier

► **To cite this version:**

Jérémie Gautier. Rôle de la clathrine dans la formation des lamellipodes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA112158 . tel-00647325

HAL Id: tel-00647325

<https://theses.hal.science/tel-00647325>

Submitted on 1 Dec 2011

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

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



UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11
FACULTÉ DES SCIENCES D'ORSAY



ÉCOLE DOCTORALE :
GÈNES, GÉNOMES, CELLULES

THÈSE DE DOCTORAT
soutenue le 21 septembre 2011
par

Jérémie Gautier

pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris-Sud 11

Rôle de la clathrine dans la formation des lamellipodes

Directeur de thèse	Alexis	GAUTREAU	
Composition du jury	Oliver	NÜSSE	Président
	Alexandre	BENMERAH	Rapporteur
	Michel	FRANCO	Rapporteur
	Catherine	JACKSON	Examineur
	Grégory	GIANNONE	Examineur
	Alexis	GAUTREAU	Directeur de thèse

Thèse préparée au LABORATOIRE D'ENZYMLOGIE ET BIOCHIMIE STRUCTURALES
Bâtiment 34 - UPR 3082 CNRS
Avenue de La Terrasse, 91198 GIF-SUR-YVETTE Cedex

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé dans l'équipe « Cytosquelette et morphogénèse cellulaire », dirigée par le Dr. Alexis GAUTREAU, au sein du *Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales* (LEBS) situé sur le campus du CNRS de GIF-SUR-YVETTE.

Je tiens donc à remercier, en premier lieu, Alexis GAUTREAU, pour m'avoir ouvert les portes de son groupe il y a maintenant plus de 4 ans lors de mon Master. Je le remercie pour son encadrement, pour l'attention et la disponibilité dont il a fait preuve tout au long de mon doctorat. Je le remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien le ("son") projet clathrine. Tout en me laissant une grande autonomie, il a su me guider et m'aider pour faire avancer nos projets. J'ai beaucoup apprécié son efficacité et sa rigueur lors de notre collaboration dans l'écriture de mon article. Je le remercie de m'avoir impliqué dans l'écriture de cet article, et de m'avoir enseigné les bases de l'écriture, même si, il faut le reconnaître, ce n'est pas encore ça ! Pour conclure, je dirais juste MERCI d'avoir toujours été là dans les bons, comme dans les mauvais moments (quelques tours de révisions...)

Je tiens à remercier le Pr. Oliver Nüsse, le Dr. Michel Franco, le Dr. Alexandre Benmerah, le Dr. Catherine Jackson et le Dr. Grégory Giannone d'avoir acceptés d'être membre de mon jury de thèse. Un grand merci à Alexandre Benmerah et à Michel Franco pour avoir accepté la lourde tâche d'être rapporteur.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 07 et tout particulièrement Manux dit "Garcimore". Il a toujours été là pour moi, d'une extrême disponibilité, même pour m'aider dans mes manip le weekend à l'insitut Curie. Et surtout il m'a fait découvrir Didier Super, fantastique chanteur qui nous tenait compagnie tard le soir au labo.

Je remercie également toutes les personnes du labo Carla, Goran, ManuE, Hélène, Véro, Fabienne et Roman. Un grand merci à Goran pour ces blagues

irrésistibles et son incroyable connaissance de la flore du campus de Gif.

Je remercie tous mes collègues du LEBS, en particulier les membres de l'équipe 01, Christophe, Guillaume et Antoine pour leurs discussions plus ou moins scientifiques et pour nos matchs de football incroyables. Je tiens à remercier chaleureusement Amandine pour sa très grande capacité d'écoute, sa non moins grande disponibilité, sa bonne humeur et son humour, et pour tous les bon moments passés ensemble.

Je remercie mes parents pour leurs encouragements durant toutes ces années et pour m'avoir permis de continuer dans cette voie.

Enfin je tiens à remercier Céline, qui a toujours été là pour moi, dans les moments difficiles (et il y en a eu) comme dans les bons moments (pas assez au cours d'une thèse). Elle m'a toujours encouragé, et poussé vers l'avant lorsque les choses n'avançaient pas, donc MERCI doud's. Je remercie également Lou, ma fille, qui, en faisant ses nuits complètes au bout d'un mois, m'a permis de rester en forme pour ma dernière année de thèse.

Sommaire

Remerciements	i
Liste des abréviations	ix
I Introduction	1
1 Le cytosquelette d'actine remodèle les membranes	3
1.1 Rôle clé de l'actine dans le remodelage des membranes	4
1.2 Protrusions membranaires et migration cellulaire	6
1.3 Rôle de l'actine dans l'endocytose	9
1.3.1 Vue d'ensemble de l'endocytose	9
1.3.1.1 Structure du manteau de clathrine	10
Les complexes hétérotétramériques	12
L'epsine	13
AP180/CALM	14
Les protéines accessoires	14
Eps15	15
1.3.1.2 Formation des vésicules recouvertes de clathrine	16
1.3.1.3 Désassemblage du manteau de clathrine	17
1.3.2 Rôle du cytosquelette d'actine dans l'endocytose	18
1.3.2.1 Rôle de l'actine dans la scission des puits re-	
couverts de clathrine	18
1.3.2.2 Rôle de l'actine dans la scission des endosomes	19
2 Dynamique de l'actine	21
2.1 Dynamique de l'actine	21
2.2 Régulation de la dynamique de l'actine	25
2.2.1 Les protéines de liaison à l'actine	25
2.2.1.1 La profiline et la thymosine $\beta 4$	25

2.2.1.2	Les facteurs de dépolymérisation de l'actine (ADF) et la cofiline	26
2.3	Les nucléateurs de l'actine	28
2.3.1	Le complexe Arp2/3 génère un réseau branché de filament d'actine	28
2.3.1.1	Organisation et structure du complexe Arp2/3 .	30
2.3.1.2	Activation du complexe Arp2/3	33
2.3.1.3	Régulation du complexe Arp2/3 par l'ATP . . .	33
2.3.1.4	La cortactine stabilise le réseau branché d'actine	34
2.3.1.5	Les fonctions cellulaires du complexe Arp2/3 .	35
2.3.2	Les formines	36
2.3.2.1	Mécanisme de nucléation	36
2.3.2.2	Régulation des formines	39
2.3.3	Spire et Cordon bleu	39
3	Les activateurs du complexe Arp2/3 : les NPFs	43
3.1	Polymérisation de l'actine par N-WASP	43
3.1.1	Rôle cellulaire de N-WASP	44
3.1.2	N-WASP forme un complexe stable avec WIP	45
3.1.3	Activation du complexe N-WASP	47
3.1.4	Régulation de N-WASP au sein du complexe stable N-WASP/WIP	48
3.2	Polymérisation de l'actine par le complexe WAVE	50
3.2.1	Rôles cellulaires des protéines WAVE	50
3.2.2	Le complexe WAVE	50
3.2.3	Le complexe WAVE connecte Rac au complexe Arp2/3 .	52
3.2.4	Architecture et assemblage du complexe WAVE	52
3.2.4.1	Architecture du complexe WAVE	52
3.2.4.2	Assemblage <i>in vivo</i> du complexe WAVE	55
3.2.5	Le complexe WAVE, actif ou inactif?	57
3.2.6	Activation du complexe WAVE	59
3.3	WHAMM et son homologue JMY	61
3.3.1	WHAMM contrôle la morphogénèse de l'appareil de Golgi	61
3.3.2	JMY régule la migration cellulaire	61
3.4	WASH	63
3.4.1	Rôle cellulaire de WASH	63
3.4.1.1	WASH est localisée sur les endosomes	63
3.4.1.2	WASH recrute et active le complexe Arp2/3 aux endosomes	63

3.4.1.3	WASH contrôle la forme des endosomes	65
3.4.1.4	WASH est impliquée dans la scission endosomale	65
3.4.2	Le complexe WASH	67
II	Résultats	69
4	Gautier <i>et al.</i> (2011) <i>Journal of Cell Science</i>	73
III	Discussion	123
4.1	Les différents rôles atypiques de la clathrine	125
4.1.1	Rôle de la clathrine dans la mitose	125
4.1.1.1	La clathrine est localisée au fuseau mitotique	125
4.1.1.2	La clathrine stabilise les microtubules kinéto- choriens	125
4.1.1.3	Comment la clathrine interagit avec les micro- tubules ?	127
4.1.2	Rôle de la clathrine dans la transcription contrôlée par p53	128
4.1.3	La clathrine contrôle l'activation de NF- κ B	129
4.1.4	La clathrine est impliquée dans divers cancers	129
4.1.5	La clathrine contrôle la formation des lamellipodes	130
4.2	Rôle de la tension membranaire	132
4.2.1	Définition de la tension membranaire	132
4.2.2	La tension membranaire contrôle l'endocytose	133
4.2.3	La tension membranaire contrôle la formation des lamel- lipodes	133
4.2.4	Contrôle de la tension membranaire par l'apport de mem- branes	135
IV	Annexes	163
A	Derivery <i>et al.</i> (2009) <i>Developmental Cell</i> , 17, 712-723	165

Liste des figures

1.1	Les trois composants du cytosquelette	3
1.2	L'actine conduit les processus de remodelage membranaire dans les cellules eukaryotes	5
1.3	Les 5 étapes du cycle de migration	7
1.4	Observation de bourgeons et de vésicules recouverts d'un manteau	9
1.5	La clathrine est un hexamère appelé triskelion	11
1.6	Assemblage de la clathrine	11
1.7	Structure du complexe AP2	13
1.8	Structure de l'epsine	14
1.9	Structure de AP180/CALM	15
1.10	Cycle de la formation des vésicules mantelées par la clathrine	17
1.11	La polymérisation brusque de l'actine est associée à une internalisation des vésicules	18
1.12	Assemblage de l'actine au cours de l'endocytose	19
2.1	Les deux formes de l'actine	22
2.2	Hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation de l'actine	24
2.3	Les protéines de liaison à l'actine	27
2.4	Le complexe Arp2/3 génère un réseau branché de filaments d'actine	29
2.5	Changement conformationnel du complexe Arp2/3 au niveau de la branche	31
2.6	Voie de formation du réseau branché d'actine par le complexe Arp2/3	32
2.7	Nucléation des filaments d'actine par les formines	37
2.8	Effet de la profiline sur l'élongation	38
2.9	Rôle de Spire et de Cordon bleu sur la dynamique de l'actine	41
3.1	Organisation modulaire des NPFs	44
3.2	Architecture du complexe N-WASP/WIP	46
3.3	Activation de la protéine N-WASP	47

3.4	Les protéines à domaine BAR sont des senseurs et des inducteurs de courbures qui déforment les membranes	49
3.5	Localisation de WAVE au lamellipode	51
3.6	Architecture du complexe WAVE	53
3.7	Structure du complexe WAVE	54
3.8	Voie d'assemblage du complexe WAVE	56
3.9	Modèles d'activation du complexe WAVE	58
3.10	Modèle d'activation du complexe WAVE	60
3.11	Localisation de WHAMM et de JMY	62
3.12	WASH est localisée sur les endosomes	64
3.13	WASH se localise avec le retromère sur les endosomes	64
3.14	La déplétion de WASH induit une tubulation endosomale	66
3.15	Rôle de WASH dans la scission endosomale	66
4.1	La clathrine est présente dans le fuseau mitotique	126
4.2	La clathrine stabilise le fuseau mitotique	127
4.3	Mesure de la force d'adhérence	132
4.4	La déplétion du complexe WAVE entraîne la formation de blebs	135

Liste des abréviations

ADF	Actin Depolymerization Factor
AP	Adaptor Protein
Arp	Actin related protein
BAR/F-BAR	Bin-Amphiphysin-Rvs/Fer-CIP4 homology-BAR
CCPs	Clathrin Coated Pits
CCVs	Clathrin Coated Vesicles
CRIB	Cdc42-Rac-Interactive-Binding-domain
DAD	Diaphanous Autoregulatory Domain
DID	Diaphanous Inhibition Domain
DRF	Diaphanous Related Formin
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FRET	Förster resonance energy transfer
GAP	GTPase Activating Proteins
GBD	GTPase Binding Domain
GPI	glycosyl-phosphatidylinositol
Hsc70	Heat Shock protein Cognate 70
IRSp53	Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p53
JMY	Junction-Mediating and -regulatory protein
MTOC	Microtubule Organising Center
NPF	Nucleation Promoting Factor
PI(3)P	Phosphatidylinositol 3 Phosphate
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5) Biphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5) Triphosphate
PRD	Proline Rich Domain
SH3	Src Homology 3
TGN	Trans-Golgi Network
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence

TOCA-1	Transducer Of Cdc42 Activity 1
WASH	Wiskott-Aldrich syndrome protein and Scar Homolog
WASP	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
WAVE	WASP Family Verprolin Homologous Protein
WCA	WH2, Connecting Region, Acidic Domain
WH1	WASP Homology Domain 1
WH2	WASPHomology Domains 2
WHAMM	WASP homologue associated with actin, membranes, and microtubules
WIP	WAS/WASL interacting protein

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Le cytosquelette d'actine remodèle les membranes

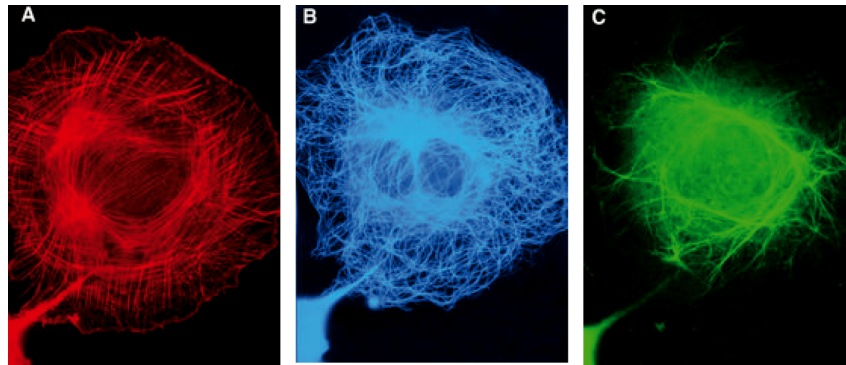


FIGURE 1.1 – Les trois composants du cytosquelette

Immunofluorescence des filaments d'actine (rouge), microtubules (bleu) et des filaments intermédiaires (vert) dans la même cellule. Adapté de Herzog *et al.* (1994).

Le terme *Cytosquelette* à été introduit pour la première fois au début des années 1930 par l'embryologiste Paul Wintrebert. Les premières structures filamenteuses intracellulaires ont été observées 20 ans plus tard par microscopie électronique.

Le cytosquelette est composé de 3 familles : les filaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires (Figure 1.1). Les filaments d'actine sont des polymères dynamiques et flexibles, issus de la polymérisation de l'actine, qui remodèlent les membranes. Les microtubules sont des filaments linéaires et polarisés issus de la polymérisation de la tubuline. Ils sont dynamiques et alternent entre des phases de polymérisation et de dépolymérisation. Les microtubules polymérisent à partir des centres organisateurs de microtubules

(MTOC, MicroTubule Organising Center). Les microtubules sont utilisés pour guider le mouvement de certaines organelles et sont également très important pour la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose. Les filaments intermédiaires sont formés de protéines fibrillaires et sont les structures les plus stable du cytosquelette. Les filaments intermédiaires sont impliqués dans le maintien de la forme cellulaire, dans l'ancrage des organites cellulaires ou encore dans l'adhérence cellulaire. Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressé au cytosquelette d'actine.

1.1 L'actine joue un rôle majeur dans le remodelage des membranes

La polymérisation de l'actine provoque la déformation et le mouvement des membranes. En effet, la polymérisation de l'actine génère une force permettant la projection de la membrane plasmique vers l'avant formant ainsi des structures protrusives appelées lamellipodes ou filopodes (Figure 1.2). De plus, la polymérisation de l'actine peut s'effectuer à la surface de membranes intracellulaires telles que les endosomes ou certains pathogènes, permettant ainsi leur mouvement dans le cytoplasme. Enfin, le cytosquelette d'actine joue également un rôle important dans l'internalisation de la membrane. Cette propriété est utilisée pour faciliter la scission des vésicules internalisées au cours de l'endocytose.

L'association entre des filaments d'actine et des moteurs moléculaires appartenant à la famille des myosines, forme des fibres contractiles. Ces fibres constituent les fibres de stress, dont la contraction génère une tension dans la cellule, permettant à celle-ci de tirer sur un substrat. Ces fibres de stress jouent donc un rôle important dans l'adhérence des cellules à la matrice cellulaire. L'actine et les myosines permettent également la formation de l'anneau contractile qui permet la séparation des deux cellules filles au cours de la cytokinèse.

L'organisation du réseau de filaments d'actine est différente entre les lamellipodes et les filopodes. En effet, les lamellipodes sont constitués principalement de filaments d'actine branchés alors que les filopodes sont constitués de filaments non branchés (Figure 1.2). Nous verrons dans le prochain chapitre que la polymérisation de l'actine est orchestrée par différentes machines moléculaires qui coopèrent pour générer ces différentes structures.

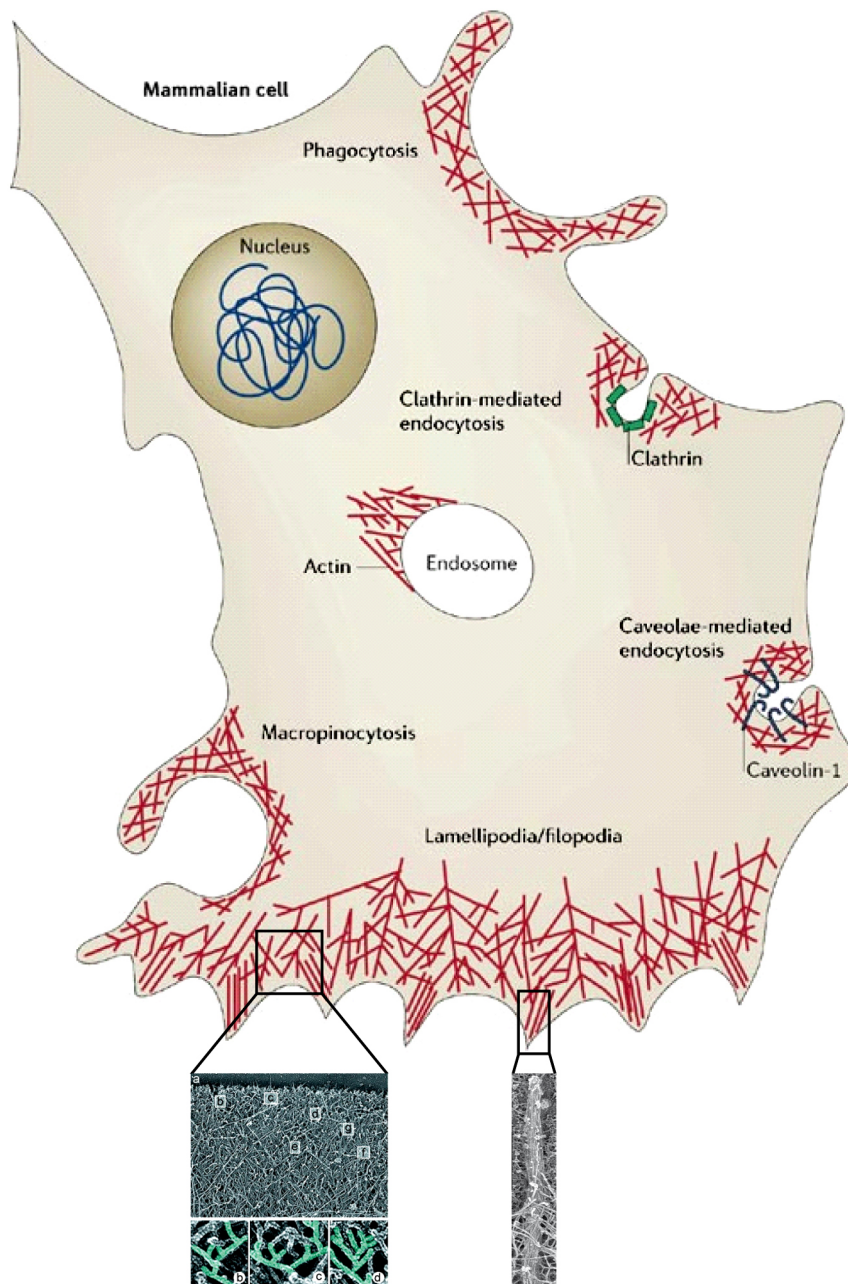


FIGURE 1.2 – L'actine conduit les processus de remodelage membranaire dans les cellules eukaryotes

Modifié de [Kaksonen et al., 2006]. Panneaux inférieurs : microscopie électronique montrant les différences d'architecture entre les lamellipodes et les filopodes. Les lamellipodes sont constitués de filaments d'actine branchés, les filopodes de filaments d'actine non branchés. Modifié de Svitkina et Borisy (1999) [Svitkina and Borisy, 1999] et Svitkina *et al.* (2003) [Svitkina et al., 2003].

La polymérisation de l'actine est régulée dans l'espace et dans le temps par des stimuli extra-cellulaires reconnus par des récepteurs transmembranaires qui déclenchent des cascades de signalisation. Ces cascades vont à leur tour activer des GTPases de la famille Rho, connues pour être des protéines régulatrices fondamentales du cytosquelette d'actine [Hall, 1998]. Les GTPases sont des interrupteurs moléculaires qui alternent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP. Bien que certains travaux remettent en cause les rôles exacts de certaines de ces GTPases, il est admis que la GTPase Rac contrôle la formation des lamellipodes, Cdc42 contrôle la formation des filopodes et Rho contrôle la formation des fibres de stress [Hall, 1998]. Nous verrons dans un prochain chapitre que le contrôle de la polymérisation de l'actine en réponse aux GTPases est réalisé par des complexes multi-protéiques. Dans le but de déclencher spécifiquement la polymérisation de l'actine à certains endroits de la cellule, ces complexes multi-protéiques sont capables d'intégrer différents signaux. Au cours de ma thèse, je me suis particulièrement intéressé au rôle de la polymérisation de l'actine dans la formation des lamellipodes.

1.2 Protrusions membranaires et migration cellulaire

La migration, est un processus cellulaire essentiel à une grande variété d'évènements biologiques. Au cours du développement embryonnaire, les cellules migrent vers des localisations spécifiques pour réaliser la morphogenèse des tissus et des organes. Les cellules vasculaires endothéliales migrent pour former de nouveaux capillaires au cours de l'angiogénèse. Les globules blancs migrent vers les sites d'infection. Au cours de la tumorigénèse, les cellules adhérentes deviennent motiles, ce qui représente, avec la perte des jonctions cellules-cellules, l'une des premières étapes vers la formation des métastases. Elucider les mécanismes de la motilité cellulaire apparaît donc critique pour une meilleure compréhension des processus physiologiques et pathologiques, et pour le développement de stratégies efficaces ayant pour but de traiter et d'empêcher certaines maladies.

La migration cellulaire est un processus fondamental qui requiert la coordination de plusieurs processus cellulaires de manière cyclique. Ce processus de 5 étapes fut tout d'abord décrit au début des années 1970 par les travaux pionniers d'Abercrombie *et al.* [Abercrombie et al., 1970](Figure 1.3) et repose sur des cycles de projection de la membrane plasmique. Dans un premier temps,

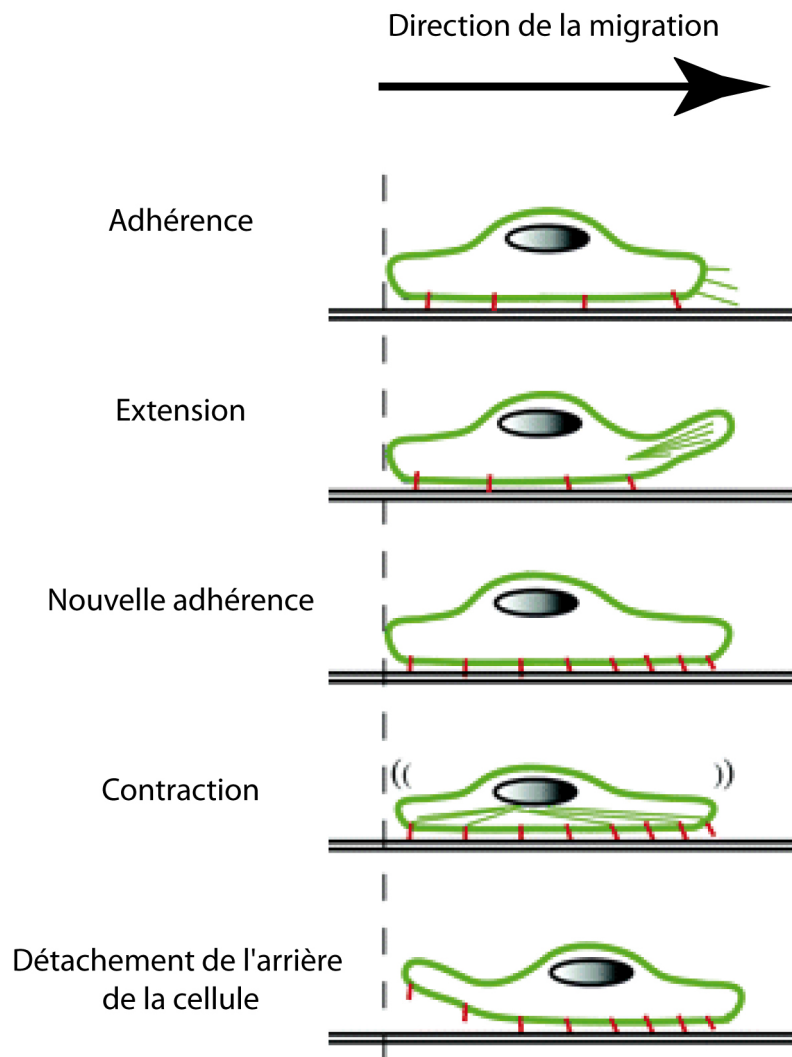


FIGURE 1.3 – Les 5 étapes du cycle de migration

Adapté de [Lamallice et al., 2007]. La migration cellulaire débute par la création de points de contacts avec la matrice appelés points focaux d'adhésion. Tout en restant adhérente aux points focaux, la cellule émet des extensions plus fines appelées lamellipodes ou filopodes qui établissent de nouveaux contacts avec le substrat. De nouveaux points focaux sont alors créés. Le cytosquelette d'actine se contracte, permettant une progression vers l'avant. Les forces de traction médiées par les fibres de stress permettent un relâchement des points focaux d'adhésion à l'arrière de la cellule.

la cellule crée des points de contacts avec la matrice appelés points focaux d'adhérence. La cellule émet ensuite des lamellipodes qui établissent alors de nouveaux points d'ancrage de la cellule à la matrice. Puis, une contraction du cytosquelette d'actine associée à un relâchement des sites d'adhérence à l'arrière de la cellule permet à la cellule de progresser vers l'avant [Sheetz et al., 1999, Lauffenburger and Horwitz, 1996]. Un nouveau cycle peut alors débiter.

Les cellules en migration peuvent également former des filopodes. Ces structures contiennent de nombreux récepteurs qui détectent différents signaux présents dans le milieu extracellulaire et qui initient alors une réponse cellulaire [Gupton and Gertler, 2007]. Par exemple, en réponse à la nétrine, les filopodes peuvent initier la guidance axonale [Bentley and Toroian-Raymond, 1986, Dent et al., 2003]. De plus, les filopodes contiennent des molécules d'adhérence, et sont aussi considérés comme des extrémités "collantes" permettant l'adhérence cellulaire [Galbraith et al., 2007]. La polymérisation de l'actine est un évènement clé dans le processus migratoire puisqu'elle génère la force permettant la formation de ces structures membranaires et la contraction du cytosquelette. De plus, il a été montré que l'actine polymérisait à l'avant du lamellipode et dépolymérisait à l'arrière de celui-ci [Wang, 1985].

La migration cellulaire peut être également initiée par des facteurs physico-chimiques. En effet, un gradient de concentration d'une substance chémoattractante induit la chémotaxie [Devreotes and Zigmond, 1988], un gradient immobilisé de matrice extra-cellulaire induit quant à lui l'haptotaxie [Carter, 1967]. Ces signaux extra-cellulaires sont détectés par des récepteurs mécanosensoriels distribués à la surface ou dans le cytoplasme des cellules pour initier la réponse migratoire.

Bien que les trois types de cytosquelette soient impliqués dans la migration cellulaire, l'actine y joue un rôle central.

1.3 Rôle de l'actine dans l'endocytose

1.3.1 Vue d'ensemble de l'endocytose

Les molécules et les récepteurs sont internalisés au niveau d'invaginations de la membrane plasmique, les mieux caractérisés étant les puits recouverts de clathrine. Ces zones ont été observées pour la première fois par microscopie électronique en 1964 dans des oocytes de moustiques [ROTH and PORTER, 1964]. Ces observations ont montré l'existence de "manteaux" aussi bien à la surface de la membrane plasmique qu'à la surface de vésicules cytoplasmiques (Figure 1.4). Ces premières observations correspondaient en fait à des puits et à des vésicules mantelés de clathrine (CCPs, Clathrin Coated Pits et CCVs, Clathrin Coated Vesicles). Ces manteaux sont constitués de clathrine et de protéines adaptatrices. Il existe d'autres mécanismes d'internalisation indépendants de la clathrine telles les cavéoles, mais ceux-ci sont moins bien caractérisés [Johannes and Lamaze, 2002]. Au cours de ma thèse je me suis particulièrement intéressé à l'endocytose dépendante de la clathrine.

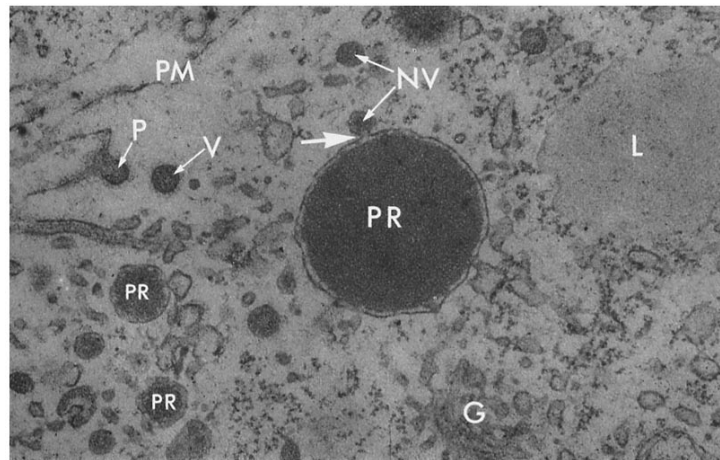


FIGURE 1.4 – Observation de bourgeons et de vésicules recouverts d'un manteau

Adapté de [ROTH and PORTER, 1964]. Image de microscopie électronique du cortex d'un oocyte montrant la fusion d'une vésicule non recouverte (NV) avec la membrane de l'oeuf (PR). On remarque la présence de vésicules recouvertes (V) et de puits recouverts (P) à la membrane plasmique. On note également la présence de corps lipidiques (L) et des composants de l'appareil de Golgi (G). Grossissement X56500.

L'endocytose dépendante de la clathrine est utilisée pour l'internalisation de nutriments et pour le recyclage de récepteurs activés à la surface de la cellule. En plus de son rôle dans l'endocytose à la membrane plasmique, la clathrine joue également un rôle majeur dans le transport vésiculaire intracellulaire [Brodsky et al., 2001]. En effet, la clathrine participe au tri des cargos et au bourgeonnement des membranes à d'autres sites de la cellule tels que les endosomes et le réseau Trans-Golgien (TGN, Trans-Golgi Network) [Kirchhausen, 2000].

La clathrine permet de concentrer des complexes récepteur-ligand sous forme d'agrégats à la surface des cellules. Ces agrégats vont être invaginés et décrochés de la membrane plasmique pour former des vésicules recouvertes de clathrine transportant leurs cargos dans la cellule.

1.3.1.1 Structure du manteau de clathrine

10 ans après les premières observations de Roth et Porter [ROTH and PORTER, 1964] au milieu des années 1960, la clathrine fut identifiée comme composant majeur des puits recouverts et des vésicules mantelées par Pearce *et al.* [Pearse, 1975, Pearce, 1976]. La clathrine est un hexamère [Ungewickell and Branton, 1981] composé de 3 chaînes lourdes (190 kDa) associées à 3 chaînes légères (30 kDa) qui empêchent l'auto-assemblage des chaînes lourdes à un pH physiologique (Figure 1.5) [Liu et al., 1995, Ungewickell and Ungewickell, 1991, Ybe et al., 1998]. Deux classes de chaînes légères A et B existent [Ungewickell and Branton, 1981, Kirchhausen and Harrison, 1981]. Ce complexe hexamérique appelé triskelion, s'autoassemble pour former des cages vides. Cette cage prend alors la forme d'un "ballon de football" [Kanaseki and Kadota, 1969], où les triskelions de clathrine représente les "coutures" de ce "ballon" (Figure 1.6). Les triskelions peuvent aussi former des pentagones et des hexagones [Fotin et al., 2004, Fotin et al., 2006] à la surface des membranes biologiques et des vésicules recouvertes. La chaîne lourde de la clathrine possède une région proximale comprenant le domaine de liaison aux chaînes légères, une région distale et un domaine N-terminal qui lie les protéines adaptrices.

La clathrine purifiée s'assemble spontanément en cage *in vitro* [Ungewickell and Branton, 1981, Crowther and Pearce, 1981, Keen et al., 1979] et ce, même en l'absence des chaînes légères [Greene et al., 2000, Ungewickell et al., 1982]. En accord avec ces résultats, la déplétion des chaînes légères par ARN interférence d'une culture cellulaire issue de tissu, n'affecte pas l'endocytose [Wilbur et al.,

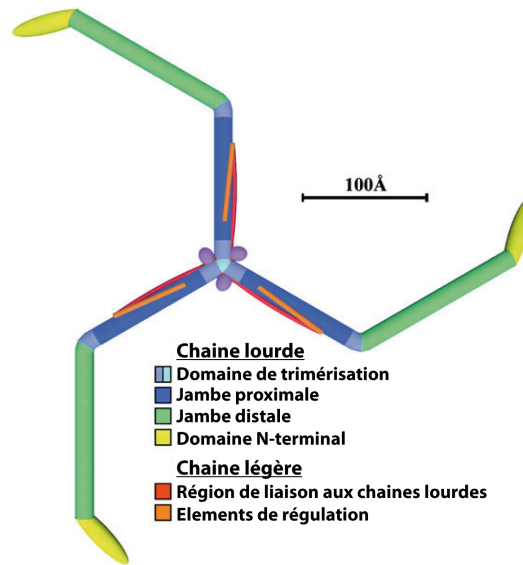


FIGURE 1.5 – La clathrine est un hémamère appelé triskelion

Adapté de [Chen et al., 2002].

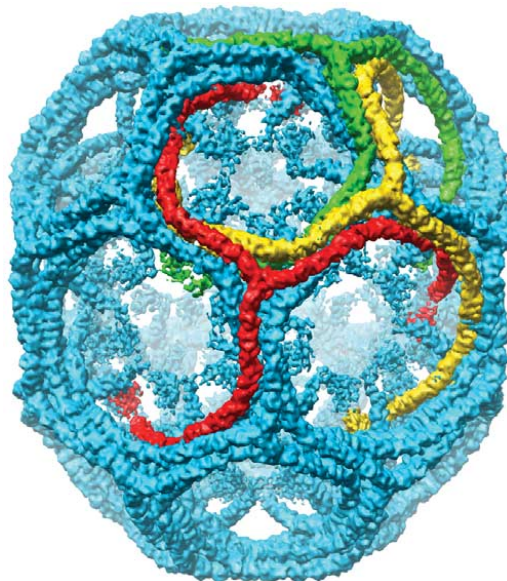


FIGURE 1.6 – Assemblage de la clathrine

Adapté de [Fotin et al., 2004]. Reconstruction d'une cage de clathrine constituée de 36 triskelions avec une résolution de 7.9 Å°.

2008, Poupon et al., 2008, Wang et al., 2006, Chen and Brodsky, 2005]. Ces résultats montrent que les chaînes légères de la clathrine ont un rôle régulateur dans l'assemblage de la clathrine. Une étude récente utilisant une approche cristallographique a permis de mieux comprendre ce rôle régulateur [Wilbur et al., 2010]. En effet, cette étude montre que des interactions électrostatiques

contrôlent la manière avec laquelle les chaînes légères s'associent aux chaînes lourdes, favorisant ou non l'assemblage de la clathrine. Ce modèle explique la sensibilité de la régulation de l'assemblage de la clathrine au pH.

Bien que la clathrine puisse s'assembler spontanément en cage *in vitro*, en conditions physiologiques, son assemblage nécessite la présence de protéines d'assemblage [Zaremba and Keen, 1983], qui sont les autres constituants majeurs du manteau des vésicules. Il existe une vingtaine de protéines d'assemblage parmi lesquelles les complexes hétérotétramériques adapteurs (APs), l'epsine ou encore AP180/CALM.

Les complexes hétérotétramériques Dans les complexes hétérotétramériques, on distingue le complexe AP1, (γ , $\beta 1$, $\mu 1$, $\sigma 1$), qui se localise sur des vésicules associées au réseau trans-Golgien. Puis, le complexe AP2, (α , $\beta 2$, $\mu 2$, $\sigma 2$) qui se localise à la surface des vésicules mantelées associées à la membrane plasmique [Ahle et al., 1988, Robinson and Pearse, 1986]. On distingue ensuite le complexe AP3 ($\delta 3$, $\beta 3$, $\mu 3$, $\sigma 3$), qui se localise aux endosomes [Simpson et al., 1997, Dell'Angelica et al., 1998, Dell'Angelica et al., 1999]. Enfin, le complexe AP4 ($\sigma 4$, $\beta 4$, $\mu 4$, $\epsilon 4$) se localise au niveau du réseau trans-Golgien [Simpson et al., 1997, Dell'Angelica et al., 1999].

Ces complexes établissent le lien entre l'assemblage de la clathrine et l'incorporation de molécules appelées cargo. En effet, le complexe AP2 dirige l'endocytose de récepteurs de ligands tels que la transferrine, les lipoprotéines de faible densité et les facteurs de croissance épidermiques. Ces récepteurs sont ensuite transférés aux endosomes, à partir desquels ils seront recyclés à la membrane plasmique ou aux lysosomes. De la même manière, le complexe AP1 dirige l'incorporation du récepteur au mannose-6-phosphate et le complexe AP3 l'incorporation d'une tyrosinase [Kirchhausen, 2000] au niveau du réseau trans-Golgien.

Chaque sous-unité des différents complexes adapteurs possède une ou plusieurs activités particulières (Figure 1.7). En effet, la sous-unité $\beta 2$ du complexe AP2 et la sous-unité $\beta 1$ du complexe AP1 interagissent avec le domaine N-terminal de la chaîne lourde de la clathrine au niveau de motifs spécifiques, appelés "clathrin box" [Dell'Angelica et al., 1998] et permettent également son assemblage en manteau. Les sous-unité μ interagissent avec des motifs hydrophobes contenant notamment des tyrosines. Les sous-unités $\alpha 2$ et $\gamma 1$ interagissent avec les lipides présents dans les membranes. En effet, la sous-unité $\alpha 2$ interagit avec le posphatidylinositol-4,5-biphosphate (PI(4,5)P2) présent dans la membrane plasmique [Collins et al., 2002, Gaidarov and Keen, 1999] et la

AP180/CALM CALM (Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia protein) est exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères, son homologue AP180, est lui cerveau-spécifique. La protéine CALM est constituée d'un domaine ANTH (AP180 N-Terminal Homology domain) qui interagit avec les phospholipides et plus précisément avec le PI(4,5)P₂ présent dans la membrane plasmique. Ce domaine est structuralement similaire au domaine ENTH de l'epsine. En revanche, le domaine ANTH, contrairement au domaine ENTH de l'epsine, n'induit pas de courbures membranaires. Le reste de la protéine n'a pas de structure secondaire précise mais contient certains motifs de liaison à la clathrine ou à Eps15 (Figure 1.9). Dans la cellule, la protéine CALM maintient le manteau de clathrine sous la membrane plasmique à partir duquel les vésicules vont bourgeonner [Morgan et al., 1999]. Certains travaux rapportent également un rôle de CALM dans le contrôle de la taille des cages de clathrine [Zhang et al., 1998] en collaboration avec la protéine accessoire Eps15 [Morgan et al., 2003].

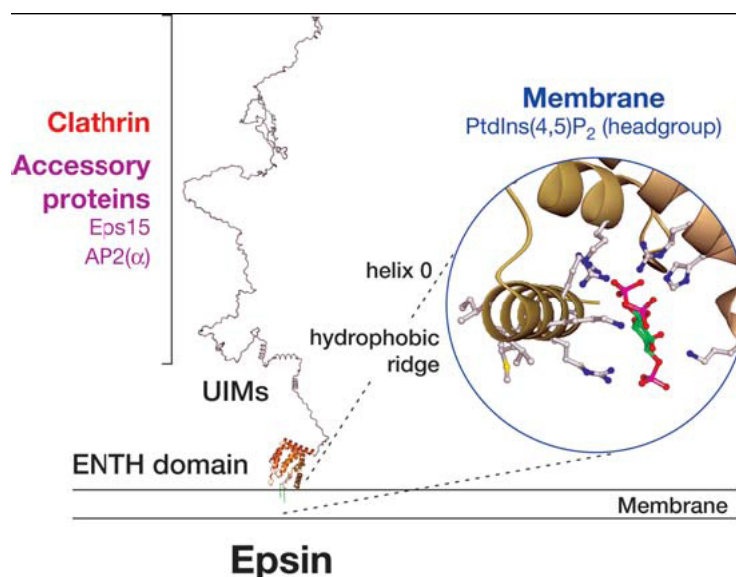


FIGURE 1.8 – Structure de l'epsine

Adapté de [Owen et al., 2004]. Modèle de l'epsine avec le domaine ENTH coloré en jaune et le reste de la protéine contenant les motifs de reconnaissance ubiquitine en gris (PDB ID 1HOA).

Les protéines accessoires Outre les protéines adaptatrices, on retrouve, parmi les protéines importantes à l'endocytose, une famille de protéines appelée protéines accessoires. Ces protéines aident à coordonner la formation du manteau

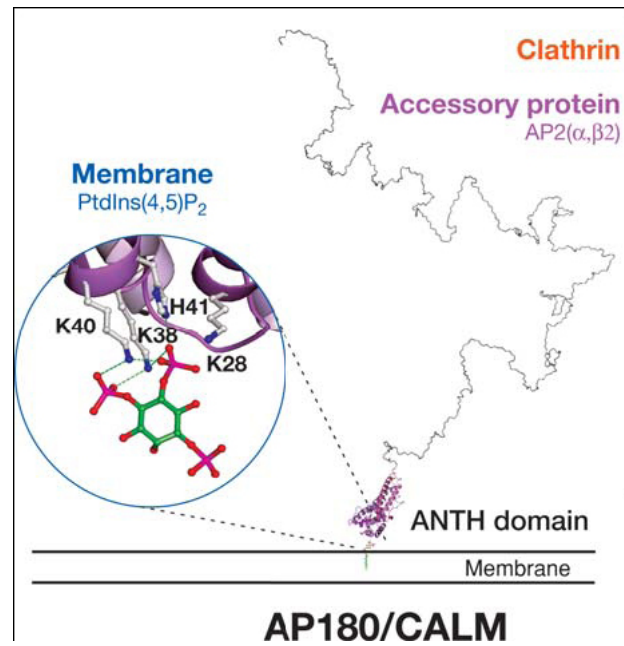


FIGURE 1.9 – Structure de AP180/CALM

Adapté de [Owen et al., 2004]. Modèle d'AP180/CALM avec le domaine ANTH en violet et le rest de la protéine en gris (PDB ID 1HFA).

de clathrine en sélectionnant les cargos [Raiborg et al., 2002, Sachse et al., 2002, Luttrell and Lefkowitz, 2002], ainsi qu'en recrutant d'autres protéines impliquées dans l'assemblage et le désassemblage du manteau de clathrine. Les protéines accessoires sont constituées de domaines structurés reliés par des connecteurs longs et flexibles. Ces connecteurs longs et flexibles interagissent avec de nombreux partenaires. Bien que ces interactions soient faibles, la coopérativité de toutes ces interactions génère un assemblage ordonné permettant la formation du manteau de clathrine. Ce réseau va ensuite se dissocier et les interactions rompues vont entraîner une dissociation du manteau de clathrine.

Eps15 Au sein de cette famille de protéines accessoires, on trouve notamment la protéine Eps15 (Epidermal growth factor receptor substrate 15). Eps15 a été identifiée pour la première fois comme étant un substrat de l'activité kinase du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor). Cette protéine interagit de manière constitutive avec le complexe AP2 [Benmerah et al., 1995] mais aussi avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose et/ou dans le recyclage des vésicules synaptiques comme la synaptojanine ou l'epsine [Salcini et al., 1999]. Eps15 est localisée avec d'autres marqueurs de l'endocytose au niveau des puits recouverts de clathrine. Eps15 est constituée d'un domaine N-terminal constitué de 3 domaines EH (Eps15 Homology domain) qui interagissent avec

des protéines constituées d'acides aminés tels que l'asparagine, la proline et la phénylalanine. La partie centrale d'Eps15 est constituée de répétitions qui vont former des coiled-coil. Cette région est importante pour l'homodimérisation/oligomérisation d'Eps15. Enfin, la région C-terminale est caractérisée par des répétitions de séquences d'acides aminés tels que l'aspartate, la proline et la phénylalanine. Cette région se lie au complexe adaptateur AP2. Eps15 joue un rôle très important au cours de l'endocytose puisque son inhibition altère dramatiquement l'endocytose des récepteurs à l'EGF et à la transferrine. En plus de son rôle dans l'endocytose, Eps15 est également impliquée dans divers processus biologiques. En effet, son association à la protéine Rab/hRIP et à la protéine Numb suggère une autre fonction pour Eps15. Le rôle de Rab/hRIP dans le transport de protéines entre le noyau et le cytoplasme et la localisation de Numb au cours de la mitose indiquent une fonction pour Eps15 dans le triage des protéines qui est indépendante du transport vésiculaire. De plus, l'interaction entre Eps15 et le proto-oncogène Crk-SH3, ainsi que l'activité de transformation de la protéine Eps15 surexprimée, suggèrent un rôle d'Eps15 dans la signalisation mitogénique [Salcini et al., 1999].

1.3.1.2 Formation des vésicules recouvertes de clathrine

La formation des vésicules mantelées par la clathrine se fait en plusieurs étapes (Figure 1.10). Le cargo se lie tout d'abord à son récepteur. Le complexe AP2 interagit ensuite, par l'intermédiaire de la sous-unité $\beta 2$, avec le récepteur après reconnaissance d'un motif particulier. Le complexe AP2 permet de concentrer les récepteurs à la membrane plasmique. Le complexe AP2 recrute alors la clathrine par l'intermédiaire de la sous-unité $\beta 2$. La clathrine polymérise et s'assemble.

Un travail récent a permis d'établir la séquence des évènements permettant l'internalisation d'une vésicule [Taylor et al., 2011]. Ce travail montre que l'assemblage de clathrine induit une courbure de la membrane reconnue par des protéines à domaine BAR/F-BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs/Fer-CIP4 homology-BAR), telles que les protéines FCHo1 et FCHo2 [Taylor et al., 2011]. Ces protéines polymérisent et induisent une courbure plus importante. Les protéines à domaine BAR/F-BAR ainsi que le PIP2 présent dans la membrane, recrutent et activent alors la protéine N-WASP qui est un activateur du complexe Arp2/3 (NPFs, Nucleation Promoting Factors). Le complexe Arp2/3 déclenche alors une polymérisation brusque de l'actine. Des protéines telles que la cortactine, l'amphiphysine et l'endophiline sont ensuite recrutées [Taylor et al., 2011]. La cortactine, qui est un stabilisateur du réseau d'actine généré

par le complexe Arp2/3, recrute à son tour la GTPase dynamine. La dynamine s'assemble de manière hélicoïdale autour du cou de la vésicule [Hinshaw and Schmid, 1995]. Enfin, la coopération entre la polymérisation brusque de l'actine et la dynamine déclenche la scission et permet l'internalisation de la vésicule [Collins et al., 2011] (Figure 1.12).

1.3.1.3 Désassemblage du manteau de clathrine

Une fois la vésicule internalisée, le manteau de clathrine commence à se désassembler (Figure 1.10). La synaptojanine, une phosphatase lipidique, joue un rôle majeur au cours de ce processus [de Heuvel et al., 1997, Haffner et al., 2000]. Cette protéine est recrutée au niveau des membranes mantelées de clathrine par l'amphiphysine, et déphosphoryle le PIP2 [de Heuvel et al., 1997]. Cette déphosphorylation affaiblit l'interaction entre les vésicules et les protéines d'assemblage et la clathrine. D'autres protéines telles Hsc70 (Heat shock protein cognate) [Schlossman et al., 1984], une chaperone, et l'auxiline [Unge-wickell et al., 1995, Lemmon, 2001], sont également impliquées dans le désassemblage du manteau de clathrine. Cette réaction de désassemblage permet un recyclage de la clathrine et une fusion des vésicules entre elles ou avec des endosomes précoces former des endosomes.

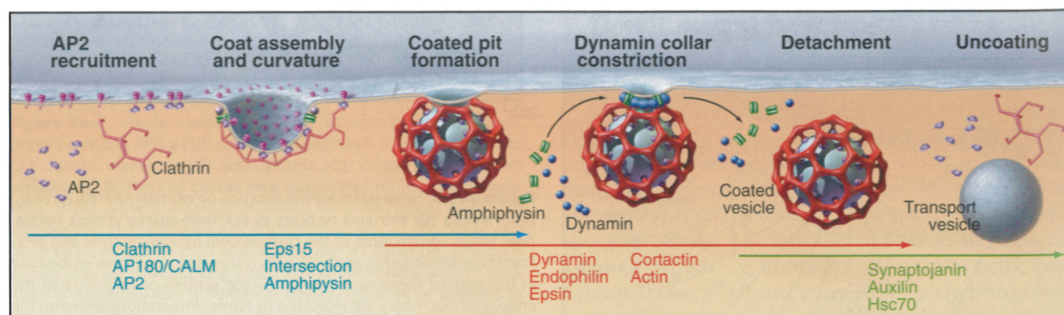


FIGURE 1.10 – Cycle de la formation des vésicules mantelées par la clathrine

La description du cycle de formation des vésicules mantelées de clathrine est faite dans le texte ci-dessus. Modifié de [Thomas D Pollard, 2010].

1.3.2 Rôle du cytosquelette d'actine dans l'endocytose

1.3.2.1 Rôle de l'actine dans la scission des puits recouverts de clathrine

Le cytosquelette d'actine est impliqué dans de nombreuses étapes de l'endocytose et plus particulièrement au cours de la scission des vésicules. En effet, les travaux pionniers et ingénieux de Merrifield *et al.* utilisant la microscopie à onde évanescente (TIRF, Total Internal Reflexion Fluorescence), montrent qu'une augmentation brusque de la polymérisation de l'actine accompagne la disparition des vésicules mantelées par la clathrine au niveau de la membrane plasmique [Merrifield *et al.*, 2002] (Figure 1.11). Cette augmentation brusque de la polymérisation de l'actine doit faciliter la réaction de scission, mais également propulser la vésicule de la membrane plasmique vers l'intérieur de la cellule. Ces hypothèses ont été validées par des travaux très récents montrant que la polymérisation de l'actine permet la constriction du cou de la vésicule, la scission et l'expulsion de celle-ci dans le cytoplasme [Collins *et al.*, 2011] (Figure 1.12). Il est important de signaler que tous ces résultats obtenus en cellules de mammifères découlent des travaux pionniers réalisés par Kaksonen *et al.*. En effet, le rôle de l'actine dans la scission des vésicules d'endocytose à tout d'abord été observé chez la levure [Kaksonen *et al.*, 2003, Kaksonen *et al.*, 2005]. Tous ces travaux confirment et expliquent les résultats précédents montrant qu'une perturbation de la dynamique de l'actine inhibait l'endocytose [Lamaze *et al.*, 1997].

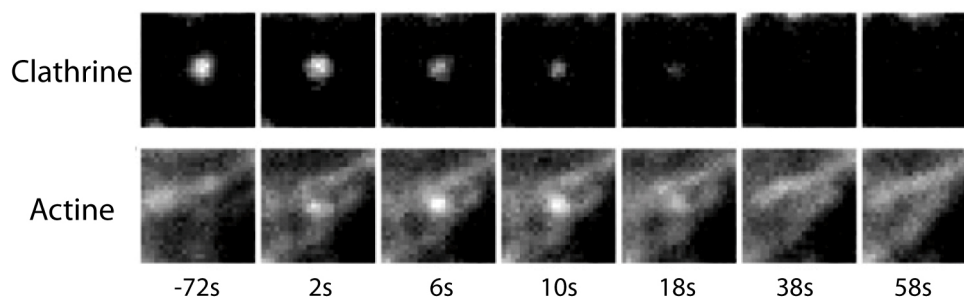


FIGURE 1.11 – La polymérisation brusque de l'actine est associée à une internalisation des vésicules

Adapté de [Merrifield *et al.*, 2002]. Une séquence d'images prises au cours du temps montrant le recrutement de l'actine et de la clathrine au niveau du bourgeon mantelé en utilisant la microscopie à onde évanescente. On s'aperçoit que l'augmentation brusque de la polymérisation de l'actine accompagne la disparition du bourgeon du champ TIRF.

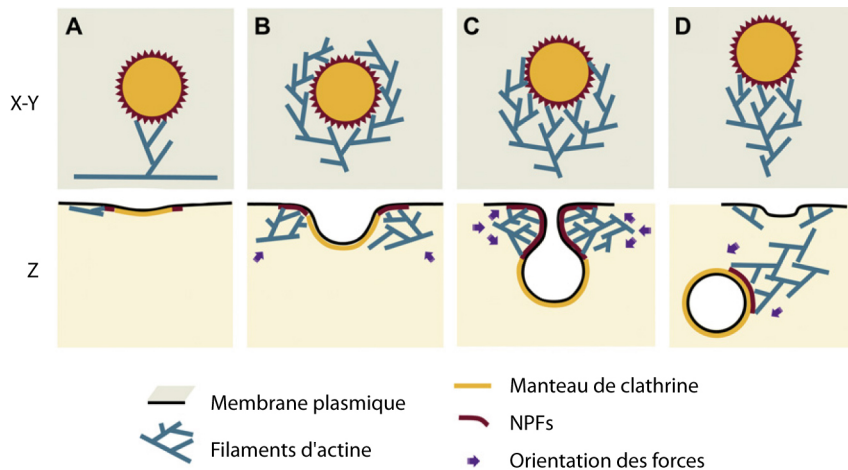


FIGURE 1.12 – Assemblage de l'actine au cours de l'endocytose

Adapté de [Collins et al., 2011]. Les différentes étapes de l'assemblage de l'actine vue de profil (z) ou de face (X - Y). (A) L'assemblage de l'actine débute lorsque le complexe Arp2/3 est activé par des NPFs (en rouge) recrutés au niveau du manteau de clathrine. (B) Le réseau d'actine se propage et encercle la vésicule. La force générée par la polymérisation de l'actine conduit le mouvement de la vésicule. (C) Le réseau d'actine dendritique permet la constriction et l'élongation du cou de la vésicule. (D) Le réseau d'actine se réorganise en queue de comète et propulse la vésicule de la membrane plasmique après la scission.

1.3.2.2 Rôle de l'actine dans la scission des endosomes

Le cytosquelette d'actine joue également un rôle important dans le trafic endosomal. En effet, la perturbation du cytosquelette d'actine associé aux endosomes affecte les trois grandes voies endosomales de tri : la dégradation (récepteur à l'EGF (epidermal growth factor) [Morel et al., 2009]), le recyclage (récepteur à la transferrine [Derivery et al., 2009]) et le transport vers le Golgi (récepteur au mannose 6-phosphate [Gomez and Billadeau, 2009]). Nous verrons en détail dans le chapitre 3 de cette introduction comment la protéine WASH contrôle la polymérisation de l'actine à la surface des endosomes en recrutant et en activant le complexe Arp2/3. Enfin, nous verrons également que la polymérisation de l'actine, via la protéine WASH, est impliquée dans la scission des endosomes.

Chapitre 2

Dynamique de l'actine

Comme nous venons de le voir, les filaments d'actine jouent un rôle majeur dans le remodelage des membranes. Dans le but de mieux comprendre ce rôle, il est important de comprendre comment les filaments d'actine sont assemblés. L'actine s'assemble spontanément en filaments dans les conditions physiologiques. Au cours de l'évolution, la cellule a donc dû développer un répertoire de protéines permettant de contrôler cette polymérisation spontanée [Pollard and Cooper, 2009]. Nous verrons au cours de ce chapitre quels sont les moyens mis en oeuvre par la cellule pour permettre la polymérisation de l'actine et pour la contrôler.

2.1 Dynamique de l'actine

L'actine est une protéine globulaire de 42 kDa hautement conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes. Elle hydrolyse l'ATP et polymérise sous forme de filaments. L'actine existe sous deux formes, une forme monomérique appelée actine Globulaire (actine G) et une forme polymérisée dans les filaments, l'actine Filamenteuse (actine F) (Figure 2.1). Le site de liaison au nucléotide (ADP ou ATP) se situe dans une crevasse au centre de la structure (Figure 2.1). La liaison du nucléotide nécessite la présence d'un cation divalent tel que le calcium ou le magnésium (magnésium *in vivo*). Le monomère d'actine est polaire, la crevasse qui s'étend jusqu'au site de liaison du nucléotide, définit le côté pointu, le côté opposé correspondant au côté barbu. Dans les conditions physiologiques, l'actine polymérise spontanément en filaments. Ce filament est une double hélice, avec un tour d'hélice comportant 13 monomères d'actine G, longue de 37 nm avec un diamètre de 7 nm. Les monomères d'actine sont orientés de la même manière dans le filament provoquant une polarisation du

filament lui-même avec une extrémité pointue et une extrémité barbue. Ces termes pointu et barbu proviennent de clichés de microscopie électronique de filaments d'actine décorés par des myosines qui adoptent une forme de tête de flèche. Un modèle atomique du filament d'actine [Holmes et al., 1990] montre que chacun des monomères interagit latéralement avec les sous-unités $n-1$ et $n+1$ et longitudinalement avec les monomères $n+2$ et $n-2$ (Figure 2.1).

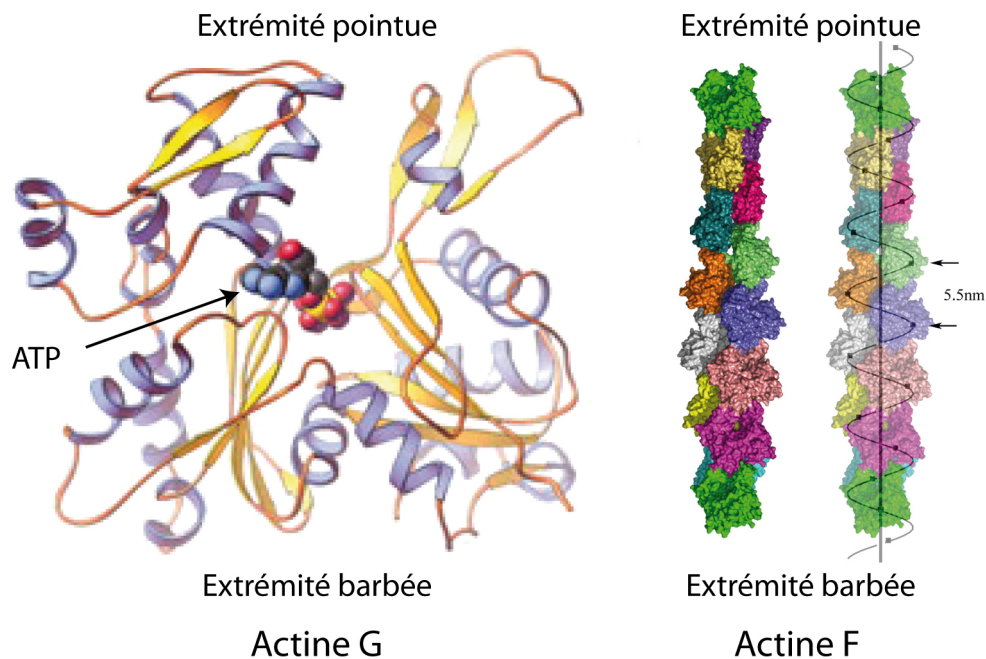


FIGURE 2.1 – Les deux formes de l'actine

Modifié de [Holmes, 2010] et de [Pollard and Cooper, 2009]. Panneau de gauche : Structure atomique d'un monomère d'actine. Le site de liaison à l'ATP est localisé au centre de la molécule. La crevasse s'étend jusqu'au site de liaison au nucléotide et définit le côté pointu. La face opposée est exposée à l'extrémité barbue du filament. Panneau de droite : Modèle du filament d'actine (Actine F). Les sous-unités ayant toutes la même orientation dans le filament, le filament se trouve lui aussi polarisé.

La polymérisation de l'actine se déroule en plusieurs étapes. La première de ces étapes, l'étape de nucléation, aboutit à la formation d'un noyau constitué de 3 monomères d'actine. Cette étape est la réaction limitante de la réaction de la polymérisation de l'actine. En effet, l'affinité d'un monomère d'actine pour un autre monomère d'actine est faible. En revanche l'addition d'un troisième monomère stabilise le noyau [McCammon, 2011]. Cette phase lente de nucléation est ensuite suivie par une phase rapide d'élongation au cours de laquelle l'actine polymérise aux deux extrémités du filament. Toutefois, les deux extrémités ne polymérisent pas à la même vitesse, la polymérisation est plus rapide à l'extrémité barbée. La vitesse de polymérisation de l'actine dépend de la concentration présente de monomères d'actine G. La phase rapide d'élongation va donc progressivement ralentir puisque la concentration d'actine G va diminuer. Le système atteint ensuite un état stationnaire où les deux extrémités du filament sont à l'équilibre avec l'actine G.

Une concentration critique est définie à chaque extrémité du filament. Cette concentration est un rapport entre les constantes de dissociation et d'association. Lorsque la concentration en monomères d'actine est supérieure à cette concentration critique, l'actine polymérise. Inversement, lorsque cette concentration est inférieure, l'actine dépolymérise.

L'hydrolyse de l'ATP s'effectue rapidement après l'incorporation du monomère dans le filament. En revanche, la libération des molécules de phosphate hydrolysées est plus lente. Dans un filament, les sous-unités nouvellement incorporées sont associées à l'ATP, les sous-unités présentes dans le filament sont associées à l'ADP et à une molécule de phosphate inorganique (Pi), et les sous-unités les plus "agées" sont elles associées à l'ADP [Korn et al., 1987] (Figure 2.2). Le relargage du phosphate inorganique déclenche un changement conformationnel diminuant l'affinité entre les sous-unités, entraînant la dépolymérisation du filament. Les deux extrémités du filament ont des concentrations critiques différentes qui sont de $0.1 \mu\text{M}$ et $0.7 \mu\text{M}$ aux extrémités barbées et pointues respectivement [Pollard, 1986]. La concentration de l'actine est de $0.1 \mu\text{M}$ à l'état stationnaire. Il y a donc un flux de monomères au sein du filament. En effet, les monomères d'actine sont ajoutés à l'extrémité barbée du filament, et enlevés à l'extrémité pointue. Cependant, bien que des sous-unités soient ajoutées, la longueur du filament reste la même. C'est le phénomène du "tapis roulant" ou encore "treadmilling".

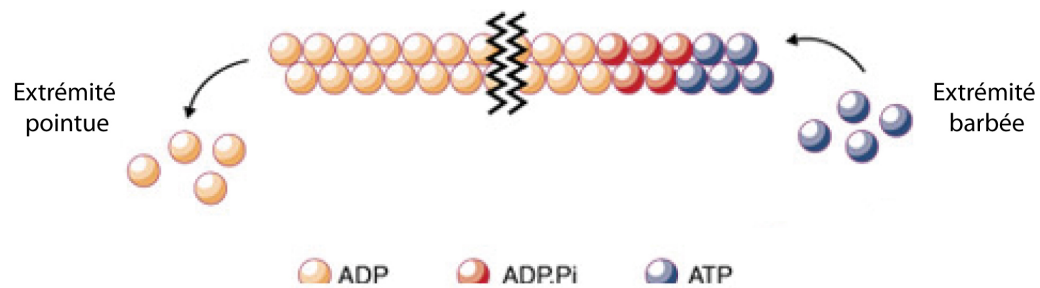


FIGURE 2.2 – Hydrolyse de l'ATP au cours de la polymérisation de l'actine

Modifié de [Littlefield and Fowler, 2002]. L'hydrolyse de l'ATP a lieu rapidement après l'incorporation dans le filament. La dissociation du phosphate inorganique est plus lente. L'hydrolyse de l'ATP et la dissociation du phosphate inorganique entraîne un changement conformationnel qui favorise la dissociation des sous-unités.

2.2 Régulation de la dynamique de l'actine

2.2.1 Les protéines de liaison à l'actine

La polymérisation de l'actine est contrôlée par la cellule. Ce contrôle s'exerce par l'intermédiaire des protéines de liaison à l'actine (ABP, Actin Binding Proteins) (Figure 2.3). On dénombre plus de 60 familles de protéines de liaison à l'actine. Ces protéines assurent le contrôle de la longueur des filaments d'actine, leur renouvellement, leur vitesse d'élongation et leur assemblage. De manière générale ces protéines collaborent pour exercer leur activité. Nous verrons brièvement dans cette section les rôles de la profiline, de la thymosine $\beta 4$, des facteurs de dépolymérisation de l'actine et de la cofiline (ADF/cofilin).

2.2.1.1 La profiline et la thymosine $\beta 4$

Dans la cellule, le monomère d'actine est complexé à des protéines séquestrantes telles la thymosine $\beta 4$ et la profiline. La profiline est essentielle au développement de la souris [Witke et al., 2001] et sa déplétion abolie la formation des lamellipodes dans les cellules de *Drosophile* [Rogers et al., 2003]. L'état du nucléotide détermine l'affinité pour la profiline. En effet, la profiline interagit préférentiellement avec l'actine dépourvu de nucléotide puis avec de l'actine associée à l'ATP et enfin avec de l'actine associée à l'ADP. Elle interagit avec la face barbée du monomère, inhibant ainsi la nucléation spontanée en empêchant la formation du trimère [Pollard and Cooper, 1984]. De plus, le complexe profiline/actine s'associe à l'extrémité barbée du filament mais ne s'associe pas à l'extrémité pointue [Pantaloni and Carlier, 1993, Pollard and Cooper, 1984, Pring et al., 1992]. La profiline se dissocie juste après l'assemblage du monomère sur le filament.

La profiline catalyse l'échange de l'ADP pour l'ATP [Mockrin and Korn, 1980, Vinson et al., 1998]. La profiline permet donc un renouvellement de l'actine sous forme ATP à partir de monomères d'actine ADP.

Seulement trouvée chez les vertébrés, la thymosine $\beta 4$ est une protéine qui se lie préférentiellement à l'actine-ATP. Contrairement à la profiline, c'est une protéine vraiment séquestrante qui inhibe la polymérisation de l'actine et l'échange nucléotidique. La thymosine $\beta 4$ et la profiline sont donc en compétition pour s'associer aux monomères d'actine.

2.2.1.2 Les facteurs de dépolymérisation de l'actine (ADF) et la cofiline

Les membres de la famille des facteurs de dépolymérisation de l'actine, également appelés cofiline, sont essentiels à la viabilité de nombreux eucaryotes. Cette famille de protéines très conservée est requise pour la formation des lamellipodes [Rogers et al., 2003] et pour la motilité cellulaire *in vitro* [Loisel et al., 1999]. Ces protéines sont inhibées par des phosphorylations réalisées par la kinase LIM [Arber et al., 1998].

Les membres de cette famille se lient préférentiellement à l'actine ADP-Pi et provoque un relargage du phosphate inorganique [Blanchoin and Pollard, 2002]. Le mécanisme de dépolymérisation des filaments d'actine par cette famille de protéines est toujours source de débat. En effet, la liaison de la cofiline induit une torsion du filament d'actine [McGough et al., 1997] provoquant soit, une augmentation de la dépolymérisation au bout pointu [Carlier et al., 1997], soit, une coupure des filaments [Andrianantoandro and Pollard, 2006, Maciver et al., 1991]. De plus, ces protéines inhibent l'échange nucléotidique mais pas la polymérisation de l'actine.

Ces protéines coopèrent avec d'autres protéines pour stimuler le renouvellement de l'actine telles que la coronine et Aip1 [Brieher et al., 2006].

Différentes familles de protéines associées à l'actine coopèrent donc pour maintenir un réservoir de monomères d'actine disponible pour la polymérisation. Ce réservoir est très important pour la force générée par la polymérisation de l'actine. En effet, puisque le taux d'élongation de l'actine est proportionnel à la concentration d'actine monomérique présente, une concentration importante d'actine monomérique permet une polymérisation de l'actine plus rapide.

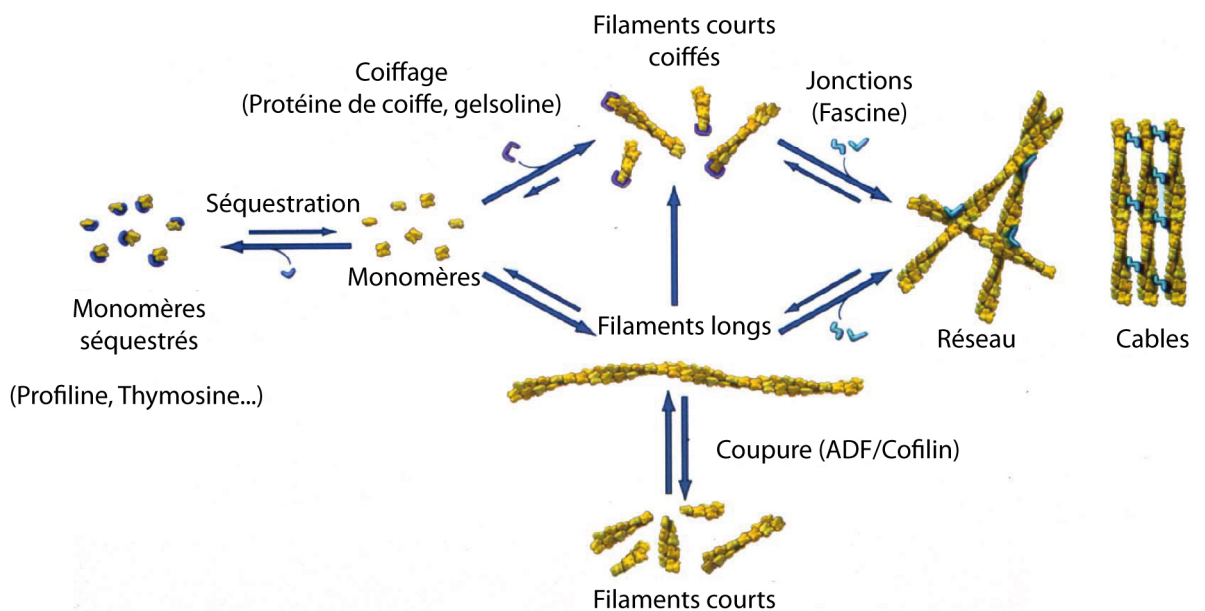


FIGURE 2.3 – Les protéines de liaison à l'actine

Modifié de [Pollard, 2007]. Les protéines de coiffe inhibent l'élongation des filaments. ADF/Cofilin accélère le renouvellement des filaments en les coupant. La profiline et la thymosine séquestrent les monomères d'actine constituant ainsi une réserve de monomères disponible pour l'assemblage en filament.

2.3 Les nucléateurs de l'actine

Comme nous venons de le voir précédemment, la profiline empêche la nucléation spontanée de l'actine. Dans le but de déclencher la polymérisation de l'actine à un instant donné (migration, endocytose...), la cellule dispose donc de plusieurs protéines appelées nucléateurs qui déclenchent l'étape de nucléation. Dans ces nucléateurs on distingue le complexe Arp2/3, les formines, Spire et Cordon bleu.

2.3.1 Le complexe Arp2/3 génère un réseau branché de filament d'actine

Le complexe Arp2/3 a été purifié pour la première fois à partir d' *Acanthamoeba castellanii* grâce à son affinité pour la profiline, comme un complexe stable constitué de sept sous-unités [Machesky et al., 1994]. Deux de ses sous-unités, sont des protéines apparentées à l'actine appartenant aux sous-familles Arp2 et Arp3. Les 5 autres sous-unités sont appelées ArpC1, ArpC2, ArpC3, ArpC4 et ArpC5. ArpC1 et ArpC5 possèdent deux isoformes chez les mammifères, ArpC1A/B et ArpC5A/B respectivement. Ce complexe est très conservé puisque depuis sa première purification, le complexe Arp2/3 a été purifié à partir de levures [Winter et al., 1997] et de vertébrés [Welch et al., 1997]. De plus, la plupart des eucaryotes dont le génome a été séquencé, possèdent les gènes capables d'encoder les 7 sous-unités du complexe à l'exception de l'*apicomplexe* et de *Leishmania major* [Berriman et al., 2005]. Le complexe Arp2/3 possède une activité biochimique intrinsèque très faible. Cependant, lorsqu'il est activé par des NPFs, il initie la formation d'un nouveau filament (filament fille) à partir d'un filament préexistant (filament mère). Il se forme alors une branche d'un angle de 70°C [Blanchoin et al., 2000a, Mullins et al., 1998, Amann and Pollard, 2001] (Figure 2.4). Ce couplage entre la nucléation et le branchement est appelé nucléation dendritique.

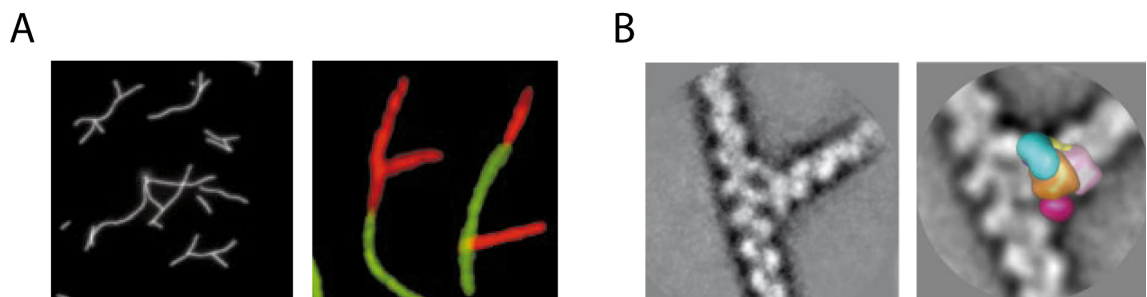


FIGURE 2.4 – Le complexe Arp2/3 génère un réseau branché de filaments d'actine

Modifié de [Blanchoin et al., 2000b], [Egile et al., 2005] et [Volkman et al., 2001]. A) Observation directe d'un réseau branché de filaments d'actine en microscopie à fluorescence. Panneau de droite : nucléation d'un filament fille (rouge) sur un filament mère préexistant (vert). B) Image de microscopie électronique montrant la localisation du complexe Arp2/3 à la branche.

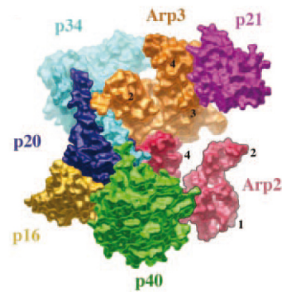
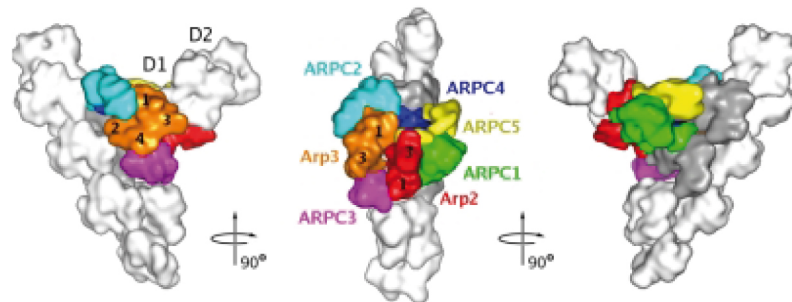
2.3.1.1 Organisation et structure du complexe Arp2/3

Lorsque le complexe Arp2/3 est inactif, les deux sous-unités Arp2 et Arp3 sont distantes [Pollard, 2007]. Lorsque le complexe est actif, ces deux mêmes sous-unités sont proches l'une de l'autre [Rouiller et al., 2008]. Ces résultats indiquent donc un changement conformationnel entre la forme inactive et la forme active du complexe Arp2/3. Un tel réarrangement conformationnel implique un changement conformationnel concerté de toutes les sous-unités du complexe Arp2/3.

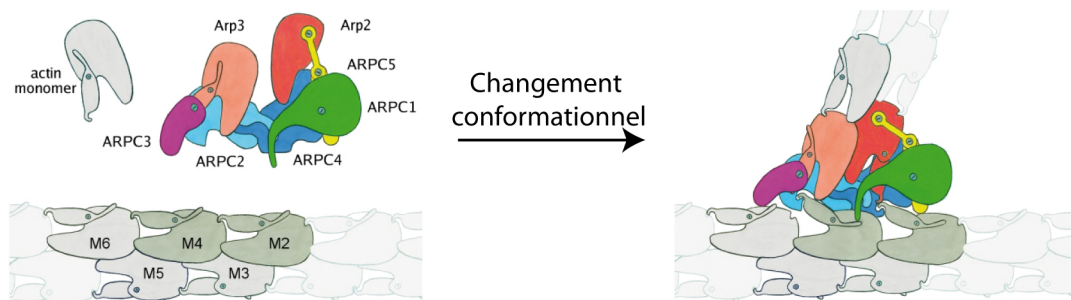
Ces études structurales suggèrent le mécanisme suivant pour la nucléation de l'actine par le complexe Arp2/3. Dans la forme active du complexe Arp2/3, les deux sous-unités Arp se rapprochent de telle manière qu'elles imitent l'organisation d'un filament. Le NPF vient alors apporter un monomère d'actine G à ce dimère pour former un noyau de trois monomères qui va croître par le bout barbé. L'interaction entre le complexe Arp2/3, le filament d'actine et le NPF stabilise la forme active du complexe [Goley et al., 2004, Rodal et al., 2005] (Figure 2.5). Bien que ce modèle de nucléation soit généralement accepté, certaines incertitudes demeuraient. En effet, dans ce modèle, le monomère d'actine délivré par le NPF était ajouté sur la sous-unité Arp3. Cependant, d'autres études suggèraient une addition du monomère sur la sous-unité Arp2 et non sur la sous-unité Arp3 [Aguda et al., 2005, Boczkowska et al., 2008, Goley et al., 2004]. Deux études récentes viennent de lever le doute sur ces différents modèles. En effet, ces travaux montrent que le complexe Arp2/3 possèdent deux sites de liaisons aux NPFs [Padrick et al., 2011, Ti et al., 2011]. Le premier NPF apporte un monomère qui s'associe à la sous-unité Arp3, le deuxième monomère apporté par le deuxième NPF, s'associe aux sous-unités Arp2 et ArpC1.

La question intéressante à laquelle ne répondent pas ces études structurales concerne l'ordre des événements permettant l'activation du complexe Arp2/3. En effet, est-ce que le complexe Arp2/3 s'associe au filament préexistant avant ou après avoir fixé le NPF ? En déterminant les constantes d'association/dissociation entre les différentes espèces (NPF, actine), un modèle a pu être proposé [Beltzner and Pollard, 2008, Marchand et al., 2001] (Figure 2.6). Dans ce modèle, le NPF se lie tout d'abord au monomère d'actine. Ce complexe intermédiaire NPF-actine interagit ensuite avec le complexe Arp2/3. Ce nouveau complexe s'associe ensuite au filament mère préexistant. Le changement conformationnel a lieu et le filament néoformé peut s'allonger côté barbé.

A

Le complexe Arp2/3
sous forme inactiveLe complexe Arp2/3 sous
forme active dans la branche

B

**FIGURE 2.5 – Changement conformationnel du complexe Arp2/3 au niveau de la branche**

Adapté de [Pollard and Cooper, 2009]. A : Comparaison entre la structure cristalline du complexe Arp2/3 inactif (code PDB : 1K8K) et la structure active obtenue par microscopie électronique [Rouiller et al., 2008]. B : Changement conformationnel associé à la nucléation. Modifié de Rouillet *et al.* (2008) [Rouiller et al., 2008].

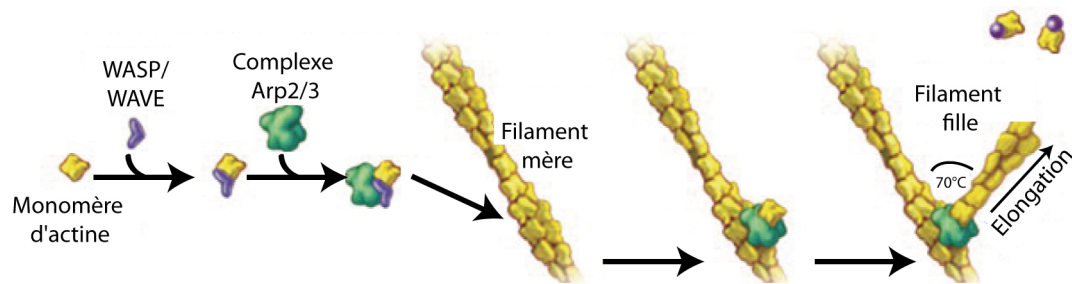


FIGURE 2.6 – Voie de formation du réseau branché d'actine par le complexe Arp2/3

Adapté de [Pollard and Cooper, 2009].

2.3.1.2 Activation du complexe Arp2/3

Comme indiqué précédemment, le complexe Arp2/3 possède une activité intrinsèque faible et la nucléation nécessite une interaction avec un filament d'actine et un NPF [Achard et al., 2010, Machesky et al., 1999, Welch et al., 1998]. De manière importante, l'activité de ces NPFs est régulée par des voies de signalisation qui coordonnent la polymérisation de l'actine dans le temps et l'espace.

Ces NPFs possèdent une organisation en domaines similaires : un domaine N-Terminal qui est spécifique à chaque famille de NPF, une région riche en proline et un domaine C-Terminal WCA (Figure 3.1). Ce dernier est nécessaire et suffisant pour activer le complexe Arp2/3. Les NPFs apportent une régulation spatiale et temporelle de l'activité du complexe Arp2/3. En effet, les NPFs sont localisés sur des membranes spécifiques dans la cellule et exposent leur domaine WCA uniquement sous la signalisation des GTPases de la famille Rho.

Le domaine WCA est constitué de 3 motifs : un motif interagissant avec l'actine G (WH2), un domaine connecteur (C) et un domaine acide (A). Dans certaines publications le domaine WCA est appelé VCA car le domaine WH2 est aussi connu sous le nom de "Verprolin homology". Le domaine connecteur (C) et le domaine acide (A) interagissent avec le complexe Arp2/3. Le domaine WH2 permet également l'attachement du réseau dendritique d'actine généré par le NPF à la membrane cellulaire à laquelle il est recruté [Co et al., 2007].

2.3.1.3 Régulation du complexe Arp2/3 par l'ATP

De manière similaire à l'actine, l'hydrolyse et la liaison au nucléotide par les sous-unités Arp2 et Arp3 influencent la structure et la fonction du complexe Arp2/3. Ces deux sous-unités sont capable d'interagir avec l'ATP avec une affinité de l'ordre du micromolaire [Clainche et al., 2001, Goley et al., 2004]. Des mutations entraînant une diminution de l'affinité du complexe Arp2/3 pour le nucléotide provoque une réduction de l'activité du complexe [Goley et al., 2004]. Ces résultats montrent l'importance de la liaison au nucléotide par les sous-unités Arp2 et Arp3. La structure cristalline du complexe Arp2/3 associé à l'ATP [Nolen et al., 2004] ainsi que des expériences de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) [Goley et al., 2004] montrent que l'interaction de l'ATP avec la sous-unité Arp3 referme le site de liaison au nucléotide et provoque un changement conformationnel du complexe. De plus,

l'interaction d'un NPF avec le complexe Arp2/3 augmente l'affinité de celui-ci pour le nucléotide [Dayel et al., 2001, Clainche et al., 2001], et la liaison du nucléotide au complexe Arp2/3 augmente l'affinité de celui-ci pour le NPF [Dayel et al., 2001].

En plus de la liaison au nucléotide, l'hydrolyse de ce dernier exerce également un rôle sur la fonction du complexe Arp2/3. L'hydrolyse de l'ATP par la sous-unité Arp2 est observée *in vitro* en utilisant le complexe Arp2/3 purifié, un NPF et de l'ATP [Dayel and Mullins, 2004, Clainche et al., 2003]. En revanche, l'hydrolyse de l'ATP par la sous-unité Arp3 n'a pas été observée. L'hydrolyse du nucléotide par les sous-unités Arp2 et /ou Arp3 est considérée comme essentielle à l'activité du complexe Arp2/3 puisque la nucléation et le branchement sont inhibés par l'utilisation d'analogues non-hydrolysable de l'ATP [Dayel and Mullins, 2004, Clainche et al., 2003]. Cependant, des mutants incapables d'hydrolyser l'ATP chez la levure, sont capables de promouvoir l'assemblage de l'actine *in vivo* [Martin et al., 2006].

Le rôle exact de l'hydrolyse de l'ATP par Arp2 est soumis à la controverse car il est à la fois important pour la nucléation [Dayel and Mullins, 2004] et pour le désassemblage des branches et le recyclage du complexe Arp2/3 [Clainche et al., 2003]. Il reste donc à déterminer comment l'hydrolyse de l'ATP et le désassemblage peuvent être couplés. Il se peut que l'hydrolyse de l'ATP diminue l'affinité du complexe Arp2/3 pour l'actine, comme c'est le cas pour l'hydrolyse de l'ATP dans un filament d'actine.

2.3.1.4 La cortactine stabilise le réseau branché d'actine

La cortactine est une protéine qui interagit avec le complexe Arp2/3 via son domaine N-terminal acide. La cortactine possède également une région riche en proline et un domaine SH3 qui se lie à de nombreuses protéines régulant la dynamique de l'actine telles que N-WASP (Neural-Wiskott Aldrich Syndrome Protein), WIP (WAS/WASL interacting protein), Hip1R (Huntingtin-interacting protein 1-related protein) et la dynamine [Kinley et al., 2003, Clainche et al., 2007, Martinez-Quiles et al., 2004, McNiven et al., 2000].

La cortactine n'a pas de localisation cellulaire précise lorsqu'elle est inactive, elle diffuse simplement à travers le cytoplasme. En revanche, une fois phosphorylée, la cortactine devient active et se localise au niveau des réseaux branchés de filaments d'actine, comme au lamellipode ou au niveau des vésicules d'endocytose [Frischknecht and Way, 2001, Merrifield et al., 2005].

La cortactine est un activateur du complexe Arp2/3 *in vitro* [Urano et al.,

2001, Weaver et al., 2001]. Cependant, cette activation est beaucoup plus faible que l'activation générée par les NPFs. La relevance physiologique du rôle activateur de la cortactine est donc remise en cause. De plus, une étude utilisant des cellules knockout pour la cortactine montre qu'elle n'est pas indispensable à la formation des lamellipodes et à l'internalisation de vésicules à la membrane plasmique [Lai et al., 2009].

La cortactine est plutôt un régulateur du complexe Arp2/3. En effet, la cortactine stabilise les branches générées par le complexe Arp2/3 [Cai et al., 2008, Weaver et al., 2002, Weaver et al., 2001] en inhibant le débranchement. La cortactine est capable d'interagir à la fois avec le complexe Arp2/3 et avec un filament d'actine [Weaver et al., 2002]. La cortactine doit certainement contrôler le renouvellement des branches. De plus, grâce à son rôle stabilisateur des branches, la cortactine est un excellent marqueur du réseau d'actine branché.

2.3.1.5 Les fonctions cellulaires du complexe Arp2/3

La coordination du branchement et de la nucléation par le complexe Arp2/3 joue un rôle important de nombreux processus cellulaires. Des études génétiques montrent que le complexe Arp2/3 est essentiel à la viabilité d'organismes unicellulaires et pluricellulaires. En effet, l'inactivation de gènes codant pour des sous-unités du complexe Arp2/3 entraîne des défauts de croissance ou conduit à la létalité chez *S.cerevisiae*, *S.pombe* [Lees-Miller et al., 1992, Winter et al., 1997]. Chez *Drosophila menaogaster*, la perturbation de la fonction du complexe Arp2/3 conduit à létalité avant le stade adulte, avec des défauts d'organisation de l'oeil et du système axonal [Hudson and Cooley, 2002, Zallen et al., 2002]. La fonction du complexe Arp2/3 est donc très importante pour certains organismes, mais pas essentielle chez tous les eucaryotes. En effet, la déplétion du complexe Arp2/3 dans les cellules HeLa affecte la morphologie des cellules sans conduire à la létalité [Derivery et al., 2008]. De plus, des mutations des sous-unités du complexe Arp2/3 chez *Arabidopsis thaliana*, entraînent un changement de la forme des cellules épithéliales mais n'affectent pas la viabilité de la plante [Mathur et al., 2003].

La migration cellulaire nécessite un assemblage de l'actine en structures appelées lamellipodes, pseudopodes et filopodes. Le complexe Arp2/3 est localisé dans les lamellipodes et dans les pseudopodes mais est absent des filopodes. Le complexe Arp2/3 est essentiel à la formation des lamellipodes. En effet, l'inactivation du complexe Arp2/3 par ARN interférence [Steffen et al., 2006] ou par l'utilisation d'un anticorps bloquant [Bailly et al., 2001], abolie la formation des lamellipodes. De plus, l'inactivation du complexe Arp2/3 et de ses

activateurs chez la levure et chez les mammifères provoquent des défauts d'endocytose [Benesch et al., 2005]. Enfin, le complexe Arp2/3 et les protéines associées à l'actine sont également impliqués dans le trafic membranaire [Stamnes, 2002].

2.3.2 Les formines

Les formines constituent la deuxième classe de nucléateurs. Les formines sont impliquées dans la formation des fibres de stress, dans la cytokinèse et dans la formation des filopodes [Goode and Eck, 2007]. Contrairement au complexe Arp2/3, ces protéines sont constituées de plusieurs domaines et fonctionnent sous forme de dimères. Elles catalysent la formation de filaments d'actine non branchés. Les formines les plus caractérisées appartiennent à la famille Diaphanous (DRFs : Diaphanous Related Formins).

2.3.2.1 Mécanisme de nucléation

Les formines nucléent l'actine et agissent en tant que facteurs d'élongation en interagissant de manière processive avec les extrémités barbées des filaments. Cette association permet à la formine d'ajouter des monomères d'actine à l'extrémité barbée du filament en empêchant les protéines de coiffe d'arrêter la polymérisation. Les formines sont caractérisées par les domaines conservés FH1 et FH2 (Formin Homology 1 et 2) (Figure 2.7). Le domaine FH2 homodimérise pour adopter la forme d'un "beignet". Il s'associe aux extrémités de deux monomères d'actine [Otomo et al., 2005b, Pring et al., 2003] et catalyse la nucléation du filament d'actine en stabilisant les dimères d'actine. Contrairement aux protéines de coiffe, ce domaine permet l'addition de nouveaux monomères à l'extrémité barbée du filament avec lequel il interagit.

L'élongation du filament d'actine est ensuite stimulée par le domaine FH1 de la formine. En effet, ce domaine possède une région riche en proline qui interagit avec la profiline elle-même liée à l'actine. Cette interaction permet d'augmenter localement la concentration en monomères d'actine à proximité du domaine FH2 qui peut alors ajouter les monomères sur le filament (Figure 2.8).

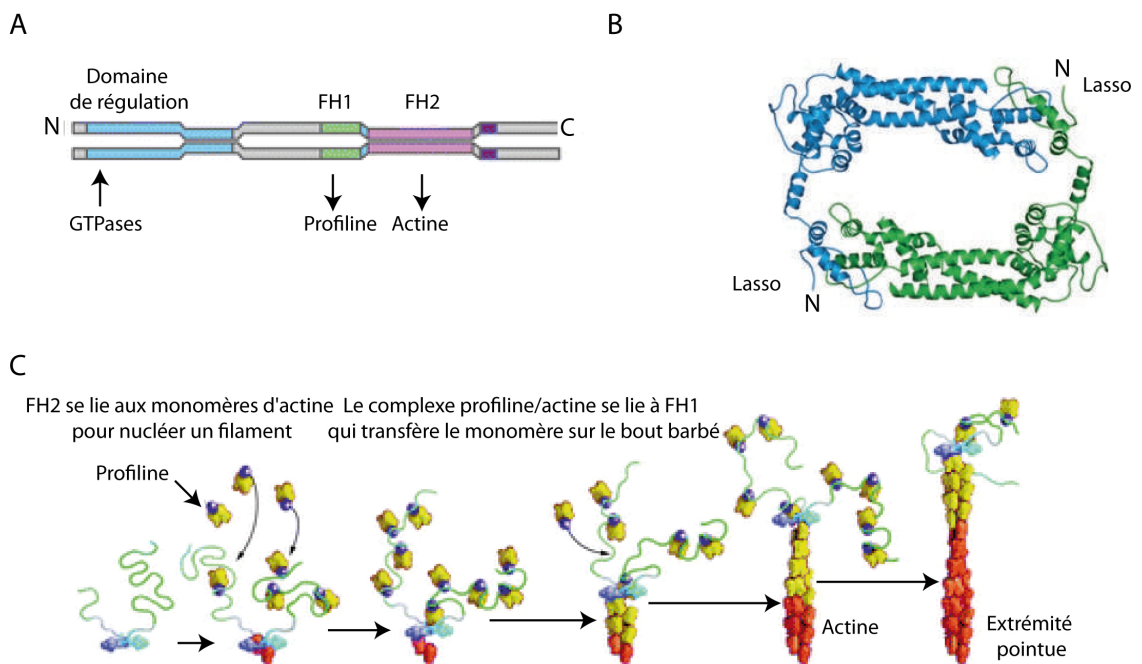


FIGURE 2.7 – Nucléation des filaments d'actine par les formines

Modifié de [Pollard, 2007]. A : Organisation en domaine de la formine.

B : Structure de l'homodimère Bnip1 de FH2 chez *S. cerevisiae*. C :

Mécanisme d'élongation de la formine.

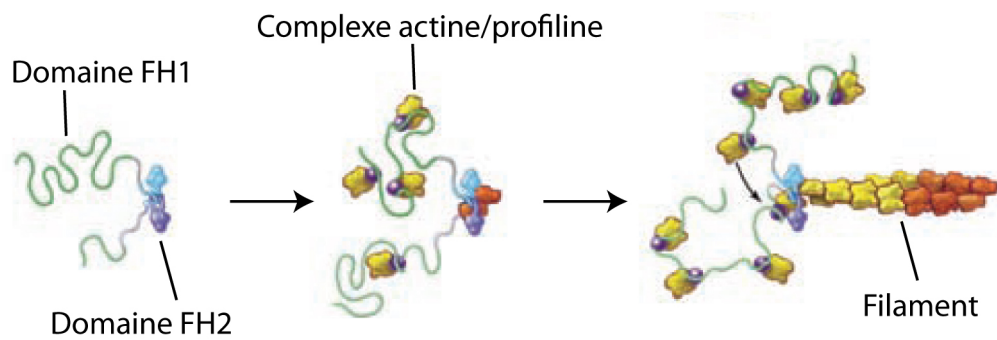


FIGURE 2.8 – Effet de la profiline sur l'élongation

Modifié de [Pollard and Cooper, 2009]. Le domaine FH1 lie plusieurs complexes Profiline/actine et augmente la concentration locale des monomères d'actine à proximité du domaine FH2. Cela provoque une augmentation de la vitesse de polymérisation.

2.3.2.2 Régulation des formines

L'activité des formines peut être régulée à différentes étapes telles que l'activation initiale, la nucléation, l'élongation, l'inactivation et le recyclage. Le mécanisme de régulation le plus caractérisé concerne l'autoinhibition allostérique des formines appartenant à la famille Diaphanous, par une interaction intramoléculaire entre le domaine d'autorégulation (DAD, Diaphanous Auto-regulatory Domain) et le domaine d'inhibition (DID, Diaphanous Inhibitory Domain) [Chesarone et al., 2010]. Le domaine DID est flanqué par un domaine de liaison aux GTPases. L'association des protéines de la famille des Rho GTPases avec ce domaine, permet de lever cette interaction intramoléculaire [Alberts, 2001, Otomo et al., 2005a]. Cependant, les GTPases ne sont pas les seules protéines régulant l'activité des formines.

En effet, des études montrent que les protéines DIP/WISH (Dia-interacting protein/WASP interacting SH3 protein) et Spire sont capables d'inhiber l'activité de la formine *in vitro* [Eisenmann et al., 2007, Quinlan et al., 2007], alors que Spire et les formines coopèrent pour assembler les filaments d'actine lors de la division assymétrique des oocytes de *Drosophila melanogaster in vivo* [Dahlggaard et al., 2007, Pfender et al., 2011]. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour mieux comprendre les résultats obtenus *in vitro*. Récemment, la protéine Bud14p de *S. cerevisiae* a été identifiée comme inhibiteur de la formine Bnr1p. Bud14p déplace Bnr1p des de l'extrémité barbée du filament et impose une longueur pour les filaments assemblés par les formines *in vitro* et dans les cellules [Chesarone et al., 2010].

2.3.3 Spire et Cordon bleu

Le troisième groupe de nucléateurs est constitué de Spire et de Cordon bleu qui ont été récemment découverts et qui ont la particularité de posséder plusieurs domaines WH2 en tandem (3 pour Cordon bleu et 4 pour Spire) proposés pour être nucléateur [Ahuja et al., 2007, Quinlan et al., 2005].

Spire à tout d'abord été décrit comme un nucléateur de l'actine stabilisant 4 monomères d'actine dans l'orientation du filament, formant ainsi un noyau. Dans ce modèle, Spire est s'associe à l'extrémité pointue du filament permettant une élongation à l'extrémité barbée [Quinlan et al., 2005]. Cependant, sa qualification de nucléateur est remise en question puisque Spire, contrairement aux formines et au complexe Arp2/3, ne nucléer pas les filaments à partir de monomères d'actine complexés à la profiline. De plus, la déplétion de Spire

n'entraîne pas de perte de structures d'actines. En accord avec ces résultats, il a été montré que Spire bloquait l'élongation du filament à partir de monomères d'actine associés à la profiline [Bosch et al., 2007]. Il semble donc que Spire interagisse avec l'extrémité barbée du filament d'actine empêchant ainsi son élongation par les complexes profiline/actine (Figure 2.9). Cela provoquerait une augmentation de la concentration de profiline/actine améliorant ainsi la processivité de l'assemblage du filament par les formines. Cette synergie entre Spire, la profiline et la formine est observée chez *D. melanogaster* durant l'oogenèse [Dahlgaard et al., 2007].

Le rôle cellulaire de Spire chez les mammifères n'est pas très clair. En effet, la localisation endogène de Spire n'a jamais été rapportée. Seule des expériences de surexpression indiquent que Spire est localisé aux niveaux des endosomes [Kerkhoff et al., 2001, Kerkhoff, 2006]. Il est également impliqué dans la biogenèse des endosomes tardifs mais son rôle moléculaire dans cette fonction reste à déterminer [Morel et al., 2009].

Cordon bleu contrôle le développement et la morphologie des neurones [Ahuja et al., 2007]. Pour nucléer les filaments d'actine, Cordon bleu stabiliserait des trimères d'actine grâce à ses 3 domaines WH2. Cordon bleu resterait associé à l'extrémité pointue du filament permettant ainsi une élongation à l'extrémité barbée [Ahuja et al., 2007]. Alors que son rôle dans le développement neuronal ne fait pas de doute, est-ce que ce rôle est dû à son activité nucléatrice reste une question ouverte. De plus, on ne sait pas si Cordon bleu nucléer les filaments à partir de complexes profiline/actine. Comme Spire, Cordon bleu est peut être impliqué dans la régulation de l'élongation du filament plutôt que dans la nucléation.

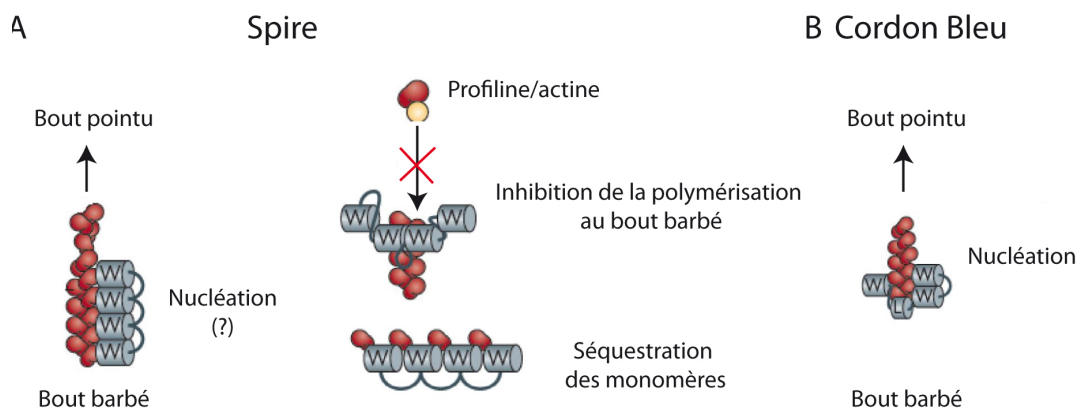


FIGURE 2.9 – Rôle de Spire et de Cordon bleu sur la dynamique de l'actine

Modifié de [Campellone and Welch, 2010]. Trois rôles ont été proposés pour Spire : nucléer les filaments d'actine, séquestrer les monomères d'actine, et inhiber l'assemblage des complexes profiline/actine aux bouts barbés. Cordon bleu nucléer les filaments d'actine en stabilisant des trimères d'actine.

Chapitre 3

Les activateurs du complexe Arp2/3 : les NPFs

La régulation spatiale et temporelle du complexe Arp2/3 est assurée davantage par les NPFs que par le complexe Arp2/3 lui-même. En effet, le complexe Arp2/3 est distribué de manière homogène dans le cytoplasme alors que les NPFs sont localisés à des endroits précis de la cellule, permettant une activation locale du complexe Arp2/3. De plus, les NPFs sont eux-mêmes des complexes multiprotéiques qui exposent leur domaine WCA lors de certains événements de signalisation.

Les NPFs ont une organisation en domaine similaire, avec un domaine WCA en position C-terminale, un domaine N-terminal qui définit la famille à laquelle le NPF appartient. Cette classe d'activateur est constituée de 4 familles différentes : WASP, WAVE, WASH et JMY/WHAMM chez les mammifères [Campellone and Welch, 2010]. Certains de ces NPFs ont été identifiés par méthodes bioinformatiques en utilisant le domaine caractéristique WCA comme critère. Les familles WASP et WAVE sont connues depuis plus de 10 ans. En revanche, les familles WASH et JMY/WHAMM ont été récemment découvertes.

3.1 Polymérisation de l'actine par N-WASP

La protéine WASP (Wiskott Aldrich Syndrome Protein) est exprimée dans les cellules hématopoïétiques. Des mutations de cette protéine sont à l'origine du syndrome de Wiskott-Aldrich qui provoque un déficit immunitaire en lymphocytes T et B. WASP est une protéine modulaire constituée d'un domaine N-terminal appelé WH1 (WASP Homology Domain 1) suivie d'une région

basique (B), d'un domaine de liaison aux GTPases (GBD appelé également CRIB : Cdc42/Rac-interactive binding domain), d'une région riche en proline et du domaine C-terminal WCA. (Figure 3.1). Dans cette section, nous nous concentrerons seulement sur la protéine N-WASP qui est la forme ubiquitaire de WASP et qui contient un domaine WH2 supplémentaire.

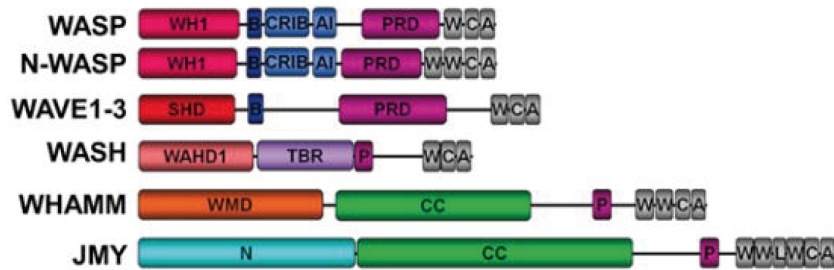


FIGURE 3.1 – Organisation modulaire des NPFs

Modifié de [Campellone and Welch, 2010]. B : basic. CRIB : Cdc42/Rac-Interactive Binding domain. PRD : Proline-rich domain. W : WH2 domain. C : Connecting region. A : Acidic domain.

3.1.1 Rôle cellulaire de N-WASP

La protéine N-WASP est impliquée dans l'endocytose. En effet, la polymérisation de l'actine orchestrée par N-WASP est requise lors de l'étape d'internalisation au cours de l'endocytose dépendante de la clathrine. Cette polymérisation est impliquée dans l'internalisation des puits recouverts de clathrine [Benesch et al., 2005, Merrifield et al., 2004].

N-WASP est également impliquée dans la formation des invadopodes et des podosomes, qui sont des structures riches en actine qui dégradent les matrices [Yamaguchi et al., 2005] facilitant ainsi l'invasion tissulaire. De manière intéressante, la cortactine et la dynamine, deux protéines impliquées dans l'endocytose sont également retrouvées au niveau de ces structures dégradatives.

Certains pathogènes sont capables de détourner la machinerie de polymérisation de l'actine de l'hôte en recrutant N-WASP, permettant ainsi leur internalisation. C'est le cas de la souche pathogène *Escherichia coli* (EHEC, O157 :H7) qui est une souche entérohémorragique. Cette bactérie forme un piedestal d'actine grâce à la protéine EspFu [Sallee et al., 2008]. Cette protéine recrute ensuite la protéine N-WASP de l'hôte et l'active. La polymérisation d'actine débute, et le pathogène est internalisé.

L'actine est présente dans le noyau et joue un rôle sur la régulation de la transcription [Blessing et al., 2004, Bettinger et al., 2004, Pederson and Aebi, 2002]. N-WASP est également observée dans le noyau [Miki et al., 1996, Bear et al., 2001, Suetsugu and Takenawa, 2003, Vetterkind et al., 2002, Wu et al., 2004] et interagit avec le complexe PSF-NonO (polypyrimidine-tract-binding-protein-associated splicing factor-non-Pou-domain octamer-binding protein/p54) [Wu et al., 2006]. Ce complexe est impliqué dans la régulation de la transcription. Ce travail montre que l'interaction entre N-WASP et ce complexe, couple N-WASP et l'ARN polymérase II pour la régulation de la transcription. De plus, ce travail montre que la polymérisation de l'actine nucléaire médiée par N-WASP et par le complexe Arp2/3 joue un rôle important dans cette régulation. En effet, l'inhibition de la polymérisation de l'actine par N-WASP réduit la transcription *in vitro* et *in vivo*. En plus de son rôle dans l'endocytose et la formation des invadopodes, N-WASP possède donc également une fonction nucléaire.

3.1.2 N-WASP forme un complexe stable avec WIP

Au cours de sa purification à partir d'extraits de cerveaux, N-WASP fut copurifiée avec la protéine WIP, un membre cerveau-spécifique de la famille WIP (WAS/WASL interacting protein) [Ho et al., 2001]. Au cours de cette purification, un seul pic fut observé après fractionnement sur gradient de sucrose, indiquant que la majeure partie de la protéine N-WASP dans la cellule est associée à WIP. Ce complexe a ensuite été caractérisé par le calcul du rayon de Stokes et par son coefficient de sédimentation. Ces expériences ont montré que ce complexe était un complexe stable avec une stoechiométrie 1 :1. L'architecture de ce complexe a pu être déduite et montre une interaction entre le domaine N-terminal de N-WASP et le domaine C-terminal de WIP (Figure 3.2) [Martinez-Quiles et al., 2001, Ramesh et al., 1997, Zettl and Way, 2002]. De manière importante, la plupart des mutations non-sens trouvées chez les familles contractant le syndrome Wiskott-Aldrich, sont localisées dans le domaine WH1 de WASP, indiquant l'importance du complexe entre WASP et WIP [Imai et al., 2003, Stewart et al., 1999].

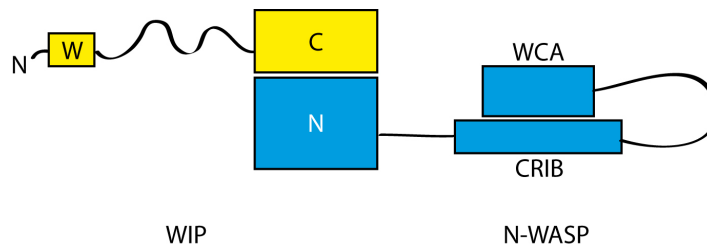


FIGURE 3.2 – Architecture du complexe N-WASP/WIP

Modifié de [Derivery and Gautreau, 2010]. Le domaine C-terminal de WIP interagit avec le domaine WH1 de N-WASP. WIP possède également un domaine N-terminal WH2.

3.1.3 Activation du complexe N-WASP

La protéine N-WASP est auto-inhibée par une interaction intra-moléculaire entre le domaine de liaison aux GTPases situé en position N-terminale (domaine CRIB) et le domaine WCA situé en position C-terminale (Figure 3.3). Cette interaction empêche le domaine WCA de lier et d'activer le complexe Arp2/3 (Figure 3.3). En revanche, la capacité du domaine WCA à interagir avec un monomère d'actine n'est pas affectée [Rohatgi et al., 2000], [Miki et al., 1998a, Rohatgi et al., 1999]. Cette auto-inhibition peut être levée par l'interaction de différents partenaires. En plus d'interagir avec le domaine WCA, le domaine CRIB interagit également avec la petite GTPase Cdc42 associée au GTP. Ces deux interactions sont mutuellement exclusives. La liaison de Cdc42 à la région CRIB permet donc l'abolition de l'interaction intramoléculaire et l'ouverture de la protéine N-WASP (Figure 3.3) [Buck et al., 2001, Kim et al., 2000, Miki et al., 1998a, Rohatgi et al., 2000, Rohatgi et al., 1999]. De plus, l'interaction du PIP2 avec la région basique permet également de lever l'auto-inhibition [Rohatgi et al., 2000]. En fait, Cdc42 et PIP2 agissent de manière synergique pour induire le changement conformationnel nécessaire à l'activation de N-WASP [Papayannopoulos et al., 2005, Prehoda et al., 2000, Rohatgi et al., 1999].

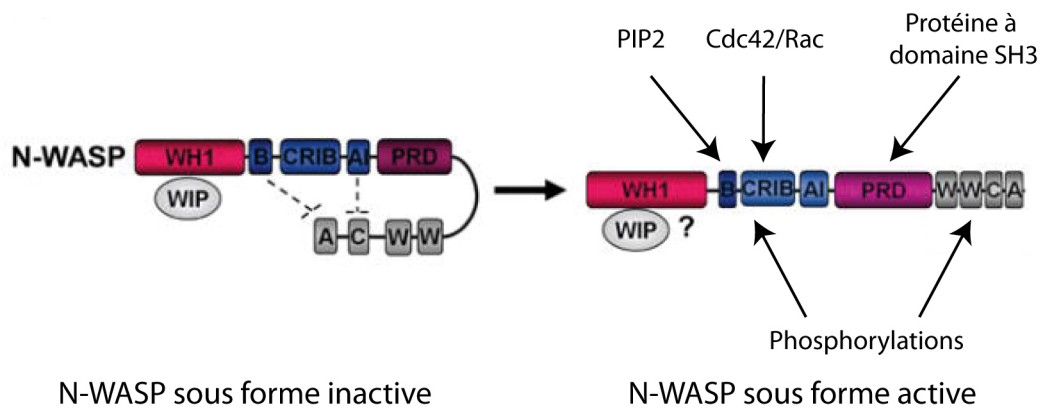


FIGURE 3.3 – Activation de la protéine N-WASP

Modifié de [Campellone and Welch, 2010]. L'auto-inhibition de N-WASP est levée par l'interaction d'un grand nombre de partenaires.

L'interaction intra-moléculaire de N-WASP peut également être levée par l'interaction de protéines à domaine SH3 telles que Nck et Grb2 [Carlier et al., 2000, Rohatgi et al., 2001, Takenawa and Suetsugu, 2007]. Ces protéines interagissent au niveau de la région riche en proline. Cependant, le mécanisme d'activation est moins clair. Outre les mécanismes d'activation que nous venons de voir, N-WASP peut également être activée par différentes phosphorylations. En effet, les kinases de la famille des kinases Src sont capables de phosphoryler des résidus conservés au niveau du domaine CRIB et d'agir en synergie avec Cdc42 pour activer N-WASP [Suetsugu et al., 2002, Torres and K, 2003, Torres and K, 2006]. De plus, la phosphorylation du domaine WCA par des kinases de la famille des caséines augmente l'affinité de N-WASP pour le complexe Arp2/3 [Cory et al., 2003].

3.1.4 Régulation de N-WASP au sein du complexe stable N-WASP/WIP

La liaison de WIP à N-WASP dans le complexe apporte un niveau de régulation supplémentaire. L'autoinhibition de la protéine N-WASP au sein du complexe est plus forte. En effet, l'interaction de Cdc42 sous forme GTP qui permettait de lever l'auto-inhibition de N-WASP, n'est plus suffisante pour activer le complexe natif [Ho et al., 2004]. L'activation du complexe natif par Cdc42 nécessite l'intervention d'une nouvelle protéine appelée TOCA1 (Transducer Of Cdc42 Activity [Ho et al., 2004]). Cette protéine est un effecteur de Cdc42 qui interagit avec la région riche en proline de N-WASP par l'intermédiaire de son domaine SH3. TOCA1 appartient à la famille des protéines à domaine BAR/F-BAR. D'autres membres de cette même famille sont connus pour activer N-WASP [Takenawa and Suetsugu, 2007].

Les protéines à domaines BAR/F-BAR sont des protéines qui dimérisent et qui adoptent la forme d'un croissant [Peter et al., 2004, Shimada et al., 2007] (Figure 3.4). Cette forme leur permet de détecter les courbures et d'interagir avec les membranes chargées négativement, mais aussi de déformer ces mêmes membranes. Cela suggère une capacité pour les protéines à domaine BAR/F-BAR de localiser et d'activer spécifiquement le complexe N-WASP/WIP au niveau de la membrane plasmique. Cette hypothèse a été testée par Takano *et al.*, qui rapportent une activation dépendante de la courbure du complexe N-WASP/WIP à la surface de liposomes [Takano et al., 2008]. De plus, la GTPase Cdc42 amplifie cet effet. Il semble donc que les protéines à domaine BAR/F-BAR soient capable de transduire un signal de la GTPase Cdc42 au

complexe N-WASP/WIP mais aussi à partir de la membrane plasmique. Cette propriété est importante pour le rôle de N-WASP au cours de l'endocytose.

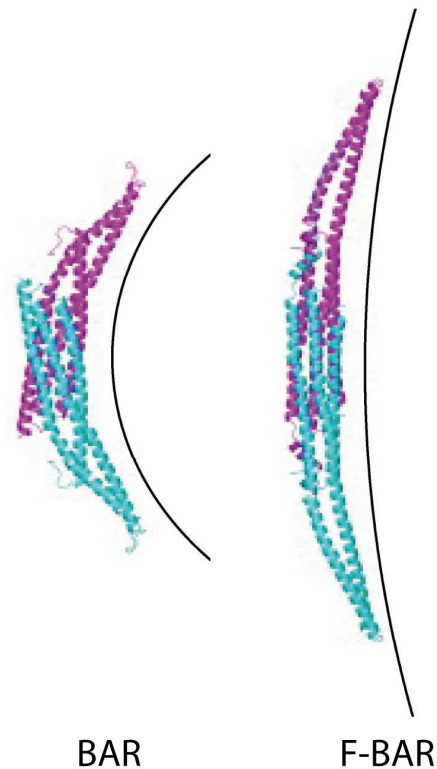


FIGURE 3.4 – Les protéines à domaine BAR sont des senseurs et des inducteurs de courbures qui déforment les membranes

Modifié de [Peter et al., 2004] et de [Shimada et al., 2007]. Structures atomiques de protéines à domaine BAR et F-BAR. Les domaines BAR et F-BAR dimérisent et adoptent la forme d'un croissant. La face concave interagit avec les membranes (lignes noires sur la figure) et les déforme. La courbure des protéines à domaine BAR est plus élevée que celles à domaine F-BAR.

3.2 Polymérisation de l'actine par le complexe WAVE

La protéine WAVE1 (WASP-family Verprolin-homologous protein 1) a été identifiée grâce à l'homologie de son domaine WCA avec celui de la protéine WASP [Miki et al., 1998a]. Son homologue Scar chez *Dictyostelium*, fut identifié la même année [Bear et al., 1998]. L'année suivante, les deux autres homologues de WAVE1, WAVE2 et WAVE3, furent identifiés [Suetsugu et al., 1999]. Chez les mammifères, WAVE2 est ubiquitaire alors que WAVE1 et WAVE3 sont spécifiquement exprimés dans le cerveau.

3.2.1 Rôles cellulaires des protéines WAVE

La fonction principale des protéines WAVE est d'activer le complexe Arp2/3 pour former des lamellipodes. En effet, des cellules fibroblastiques délétées du gène WAVE2 sont incapables de générer des lamellipodes [Yamazaki et al., 2003, Yan et al., 2003]. De plus les protéines WAVE sont localisées à l'extrémité du lamellipode (Figure 3.5) [Hahne et al., 2001, Miki et al., 1998a, Steffen et al., 2004].

Cependant, d'autres études ont rapporté des rôles différents pour les protéines WAVE. En effet, la voie de signalisation Rac/WAVE a été impliquée dans la formation et la maintenance des jonctions cellules/cellules [Nakao et al., 2008, Yamazaki et al., 2007]. De plus, les protéines WAVE ont également été impliquées au cours de la cytokinèse pour faciliter la séparation des cellules filles et pour la répartition symétrique de l'appareil de Golgi [Kondylis et al., 2007]. Enfin, un rôle récent des protéines WAVE a été rapporté dans formation de transporteurs tubulaires au niveau du réseau Golgien [Anitei et al., 2010].

3.2.2 Le complexe WAVE

WAVE fut copurifiée à partir d'extraits de cerveaux avec 4 autres sous-unités, formant ainsi un complexe constitué des 5 sous-unités suivantes : Sra, Nap, WAVE, Abi et Brk1 [Eden et al., 2002]. L'existence de ce complexe pentamérique a ensuite été confirmée par la purification de la protéine WAVE2 au niveau endogène dans les cellules HeLa [Gautreau et al., 2004]. De manière importante, de nombreux homologues de chacune des sous-unités du complexe WAVE sont exprimés. De plus, la sous-unité Abi est connue pour être la cible d'épissages alternatifs [Gautreau et al., 2004]. L'existence de ces homologues

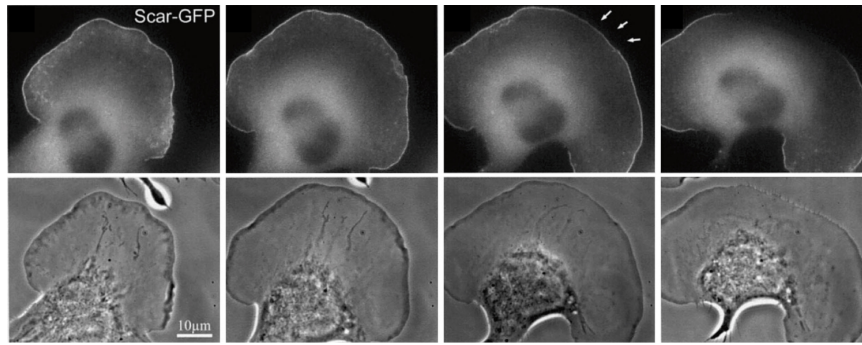


FIGURE 3.5 – Localisation de WAVE au lamellipode

Modifié de [Hahne et al., 2001]. Séquence d'images prises au cours du temps, montrant la localisation de GFP-WAVE1 dans de cellules B16F1. WAVE1 est localisé à l'extrémité du lamellipode et disparaît lorsque la membrane se rétracte (voir flèches blanches).

indiquent une combinatoire d'assemblage complexe pour la formation du complexe WAVE. Cependant, le complexe WAVE canonique est formé des sous-unités suivantes : Sra1, Nap1, Abi1, Brk1 et WAVE2 [Gautreau et al., 2004].

De la même manière que pour N-WASP, WAVE fut détectée dans un seul pic au cours du fractionnement sur gradient de sucrose, indiquant que le complexe WAVE est un complexe stable et que la majeure partie de la protéine WAVE se trouve au sein de ce complexe [Gautreau et al., 2004]. De manière importante, les sous-unités Sra1, Nap1 et Abi1 ont aussi été fractionnées dans ce même pic. Cependant, la sous-unité Brk1 présentait 2 profils d'élution, un premier correspondant à celui du complexe WAVE et le second correspondant à une faible masse moléculaire. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour comprendre le rôle cellulaire de ce réservoir de Brk1.

Certains travaux mettent en cause le fait que les 5 sous-unités du complexe WAVE soient toujours associées les unes aux autres. En effet, l'existence d'un complexe entre la sous-unité Abi1 du complexe WAVE et la protéine N-WASP a été rapportée. Ce complexe aurait un rôle au cours de l'endocytose [Innocenti et al., 2005]. Cependant, le fait qu'Abi1 et WAVE se retrouvent dans la même fraction au cours de la purification indique que Abi1 passe plus de temps en complexe avec WAVE qu'avec N-WASP. Cette interaction doit être transitoire, même si l'affinité est de l'ordre du nanomolaire, et non stable comme dans le complexe WAVE. De plus, certains travaux réalisés chez *Dictyostelium* indiquent que la sous-unité Nap1 possède d'autres rôles qui sont indépendants de son rôle au sein du complexe WAVE. Ces résultats sont à interpréter avec précautions puisqu'ils n'ont pas été rapportés dans d'autres systèmes [Blagg

et al., 2003, Ibarra et al., 2006]. Il serait donc intéressant de savoir si ces rôles sont spécifiques à *Dictyostelium* ou bien à tous les organismes. Finalement, un rôle dans l'inhibition de la traduction a également été rapporté pour la sous-unité Sra1 grâce à une interaction directe avec la protéine FMRP (Fragile Mental Retardation Protein) [Napoli et al., 2008]. Néanmoins, ce travail ne montre pas si ce rôle implique le complexe WAVE en entier ou bien la protéine Sra1 seule.

3.2.3 Le complexe WAVE connecte Rac au complexe Arp2/3

La GTPase Rac contrôle la formation des lamellipodes par l'intermédiaire des protéines WAVE [Miki et al., 1998a]. Cependant, contrairement à la protéine N-WASP, les protéines WAVE ne possèdent pas de domaine d'interaction aux petites GTPases et n'interagissent donc pas directement avec la GTPase Rac. Le lien entre la GTPase Rac et le complexe WAVE apparaissait donc obscur jusqu'à la purification du complexe WAVE. En effet, cette purification a identifié la protéine Sra1 comme membre du complexe WAVE. Or cette protéine était connue pour être un effecteur de Rac [Kobayashi et al., 1998]. La purification du complexe WAVE a donc permis de faire le lien moléculaire entre la GTPase Rac et la formation des lamellipodes générée par le complexe Arp2/3. En accord avec le rôle du complexe WAVE dans la formation des lamellipodes, toutes les sous-unités du complexe WAVE sont localisées à l'extrémité du lamellipode [Hahne et al., 2001, Steffen et al., 2004]. De plus, la déplétion par ARN interférence de chacune des sous-unités du complexe WAVE, entraîne la dégradation des autres sous-unités du complexe [Blagg et al., 2003, Ibarra et al., 2006, Kunda et al., 2003, Steffen et al., 2004] et abolit la formation des lamellipodes induite par Rac [Kunda et al., 2003, Rogers et al., 2003, Steffen et al., 2004]. Chacune des sous-unités du complexe WAVE est donc requise pour la stabilité des autres sous-unités, c'est une propriété commune à différents complexes multi-protéiques stables tels que le complexe Arp2/3 ou le complexe N-WASP/WIP [de la Fuente et al., 2007, Steffen et al., 2006].

3.2.4 Architecture et assemblage du complexe WAVE

3.2.4.1 Architecture du complexe WAVE

L'architecture du complexe WAVE fut tout d'abord déterminée en testant toutes les combinaisons d'interaction par paire entre les sous-unités et en déli-

mitant les domaines d'interaction [Gautreau et al., 2004, Innocenti et al., 2004]. Les sous-unités centrales et périphériques ont été définies en utilisant deux méthodes différentes. La première méthode consistait à reconstruire le complexe en omettant une sous-unité et en regardant comment les sous-unités restantes étaient assemblées [Gautreau et al., 2004]. Dans la deuxième méthode, les complexes étaient séquentiellement construits en ajoutant les sous-unités purifiées à partir de différents systèmes d'expression.

Le complexe WAVE a récemment été reconstitué par co-expression des 5 sous-unités dans des cellules d'insectes en utilisant le système baculovirus [Ismail et al., 2009]. Cette méthode a permis de fournir suffisamment de matériel purifié pour déterminer la masse moléculaire du complexe WAVE par ultra-centrifugation. Cette expérience a montré que la stoechiométrie était de 1 :1 :1 :1 :1 pour le complexe WAVE (Figure 3.6). Le complexe WAVE s'organise autour d'un coeur constitué des protéines Nap et Abi. D'un côté de ce coeur se trouve les protéines Abi/WAVE et Brk1 également appelée HSPC300. Ce sous-complexe nécessite les domaines N-terminaux des protéines Abi et WAVE [Echarri et al., 2004, Gautreau et al., 2004, Leng et al., 2005]. De l'autre côté de ce coeur se trouve la sous-unité Sra qui interagit avec Nap. Le complexe WAVE est donc constitué de deux sous-complexes pouvant se reconstituer de manière autonome et se purifier [Innocenti et al., 2004, Ismail et al., 2009]. Il est intéressant de noter que la formation des complexes stable WAVE et WASP nécessite leurs domaines N-terminaux.

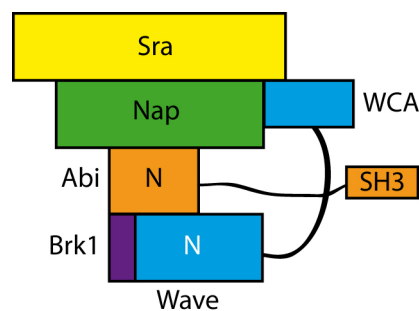


FIGURE 3.6 – Architecture du complexe WAVE

Modifié de [Gautreau et al., 2004].

La résolution récente de la structure du complexe WAVE [Chen et al., 2010] a confirmé, dans les grandes lignes, l'architecture déterminée par les différentes méthodes décrites précédemment et apporté des précisions supplémentaires quant à l'activation du complexe WAVE par la GTPase Rac (Figure 3.7).

En effet, la structure montre que le domaine WCA de WAVE est sequestré par une combinaison d'interactions intra et intermoléculaire à l'intérieur du complexe WAVE. De plus, ces travaux montrent que l'interaction de la GTPase Rac et des phosphorylations semblent déstabiliser un élément du complexe WAVE nécessaire à la séquestration du domaine WCA, suggérant un mécanisme d'activation du complexe Arp2/3 par ces différents signaux. Enfin, la proximité entre la région basique et le site de liaison à la GTPase montre comment la GTPase et les phospholipides pourraient coopérer pour recruter le complexe WAVE à la membrane.

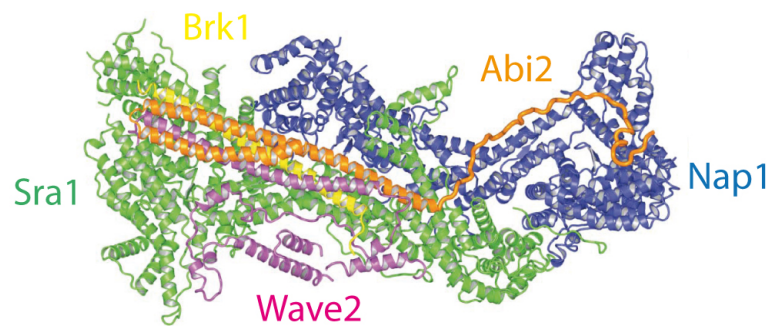


FIGURE 3.7 – Structure du complexe WAVE

Modifié de [Chen et al., 2010].

3.2.4.2 Assemblage *in vivo* du complexe WAVE

Comment le complexe WAVE s'assemble-t-il *in vivo*? Cette question a été récemment résolue par l'identification inattendue d'un précurseur essentiel dans l'assemblage du complexe WAVE, la sous-unité Brk1 [Derivery et al., 2008]. Le fractionnement biochimique des cellules HeLa sur gradients de sucrose montre que les 5 sous-unités du complexe WAVE sont éluées dans un seul et même pic correspondant au complexe WAVE. Cependant, la sous-unité Brk1 est aussi présente sous forme libre [Gautreau et al., 2004]. Cette forme libre est constituée d'homotrimères stables en solution [Linkner et al., 2011]. De plus, la déplétion de Brk1 par ARN interférence provoque la dégradation des autres sous-unités du complexe WAVE [Derivery and Gautreau, 2010]. L'incorporation exogène de monomère de Brk1 dans les complexes WAVE néosynthétisés [[Derivery et al., 2008]] et l'importance de Brk1 pour la stabilité des autres sous-unités montrent que Brk1 est un précurseur dans l'assemblage du complexe WAVE. Des études cristallographiques récentes confirment l'existence trimérique de Brk1 [Linkner et al., 2011].

Ces études suggèrent qu'un réservoir d'homotrimères de Brk1 est maintenu constant pour permettre la formation de monomères qui vont s'associer directement aux sous-unités WAVE et Abi néosynthétisées. Cet hétérotrimère Brk1/Abi/WAVE s'associe ensuite à l'hétérodimère Nap/Sra. En accord avec cette observation, la stabilité des protéines Sra et Nap n'est pas affectée en l'absence de WAVE, Abi et Brk1 *in vivo* et l'hétérodimère Nap/Sra reste stable après coexpression en cellules d'insectes [Chen et al., 2010, Ismail et al., 2009, Ibarra et al., 2006, Pollitt and Insall, 2009]. Cette étude cristallographique montre que Brk1 forme la majeure partie des surfaces de contacts entre l'hétérotrimère Brk1/Abi/WAVE et l'hétérodimère Nap/Sra [Linkner et al., 2011]. Ce résultat suggère donc qu'au cours de l'étape finale de l'assemblage du complexe WAVE, Brk1 joue le rôle d'adaptateur permettant de stabiliser l'assemblage de l'hétérotrimère avec l'hétérodimère pour donner un complexe WAVE mature.

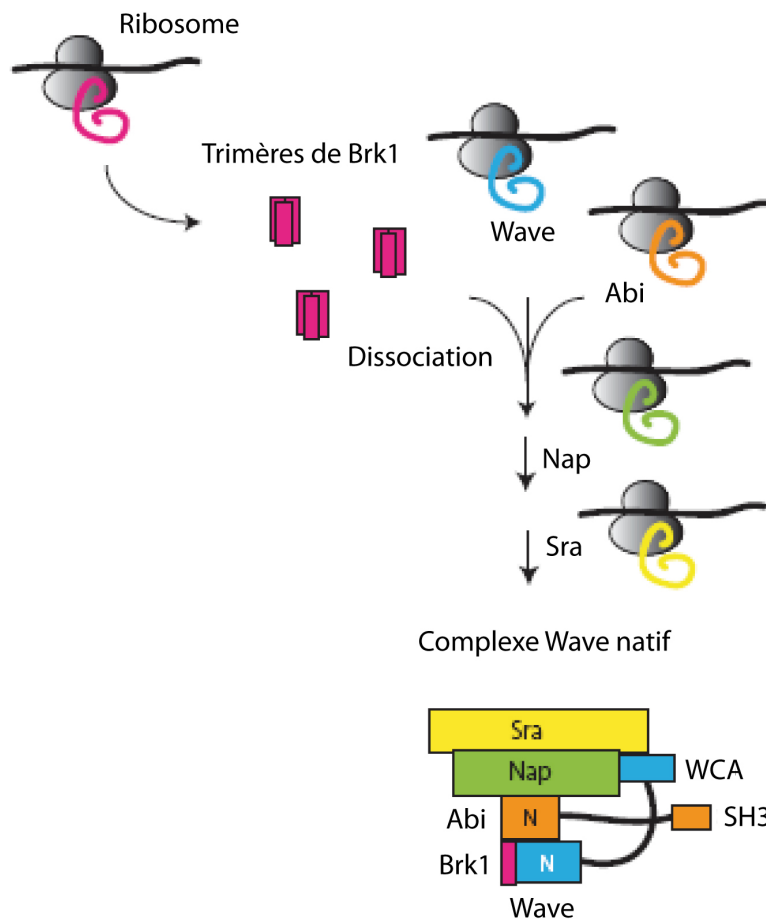


FIGURE 3.8 – Voie d’assemblage du complexe WAVE

Modifié de [Derivery and Gautreau, 2010]. Brk1 existe sous une forme libre trimérique. Brk1 se dissocie pour interagir avec Abi et WAVE. Nap et Sra sont ensuite recrutées pour former le complexe WAVE.

3.2.5 Le complexe WAVE, actif ou inactif ?

L'activation du complexe WAVE a été un sujet d'intenses débats. Contrairement à N-WASP, la protéine WAVE est capable d'activer le complexe Arp2/3 *in vivo* [Eden et al., 2002, Innocenti et al., 2004, Machesky et al., 1999].

Le complexe WAVE1 (contenant la sous-unité WAVE1) a tout d'abord été rapporté comme étant inactif après purification à partir de cerveau [Eden et al., 2002]. Un modèle d'activation a donc été proposé dans le quel le complexe WAVE se dissocie après addition de la GTPase Rac activée. Cette dissociation entraîne la libération de la protéine WAVE qui peut donc activer le complexe Arp2/3 (Figure 3.9).

Ce modèle a ensuite été remis en cause après l'observation de toutes les sous-unités du complexe WAVE au lamellipode [Steffen et al., 2004] et par l'absence de dissociation du complexe WAVE2 après addition de la GTPase Rac [Innocenti et al., 2004]. Dans cette étude, le complexe WAVE2 reconstitué par ajout des sous-unités purifiées, était actif. Cette activité du complexe WAVE a ensuite été confirmée par un autre groupe [Kim et al., 2006]. Ces résultats suggéraient donc un second modèle où l'activité du complexe WAVE était régulée par sa localisation (Figure 3.9).

Cependant, une fraction importante du complexe WAVE est localisée dans le cytosol [Suetsugu et al., 2006b]. Si cette fraction était active, les domaines WCA seraient alors exposés. Or, il est établi que l'expression transitoire de domaines WCA régule négativement le complexe Arp2/3 [Machesky and Insall, 1998]. De plus, cette étude montre que le complexe WAVE purifié à partir d'extraits cytosoliques est inactif alors que le complexe WAVE purifié à partir de fractions membranaires est actif. Ces résultats suggèrent donc un troisième modèle dans lequel le complexe WAVE alterne entre une conformation inactive dans le cytosol et une conformation active à la membrane plasmique (Figure 3.9).

Finalement, ce débat sur l'activité du complexe WAVE a été clos récemment. En effet, plusieurs études montrent que le complexe WAVE est inactif [Derivery et al., 2009, Lebensohn and Kirschner, 2009]. Cependant, lorsque que le complexe est dénaturé il devient actif. Cette observation permet d'expliquer certains résultats obtenus précédemment lorsque que le complexe WAVE était purifié après de longues étapes de purification ou utilisé après avoir été congelé. L'inactivité du complexe a été confirmée en utilisant un complexe WAVE recombinant à partir de cellules d'insectes infectées par des baculovirus [Ismail et al., 2009].

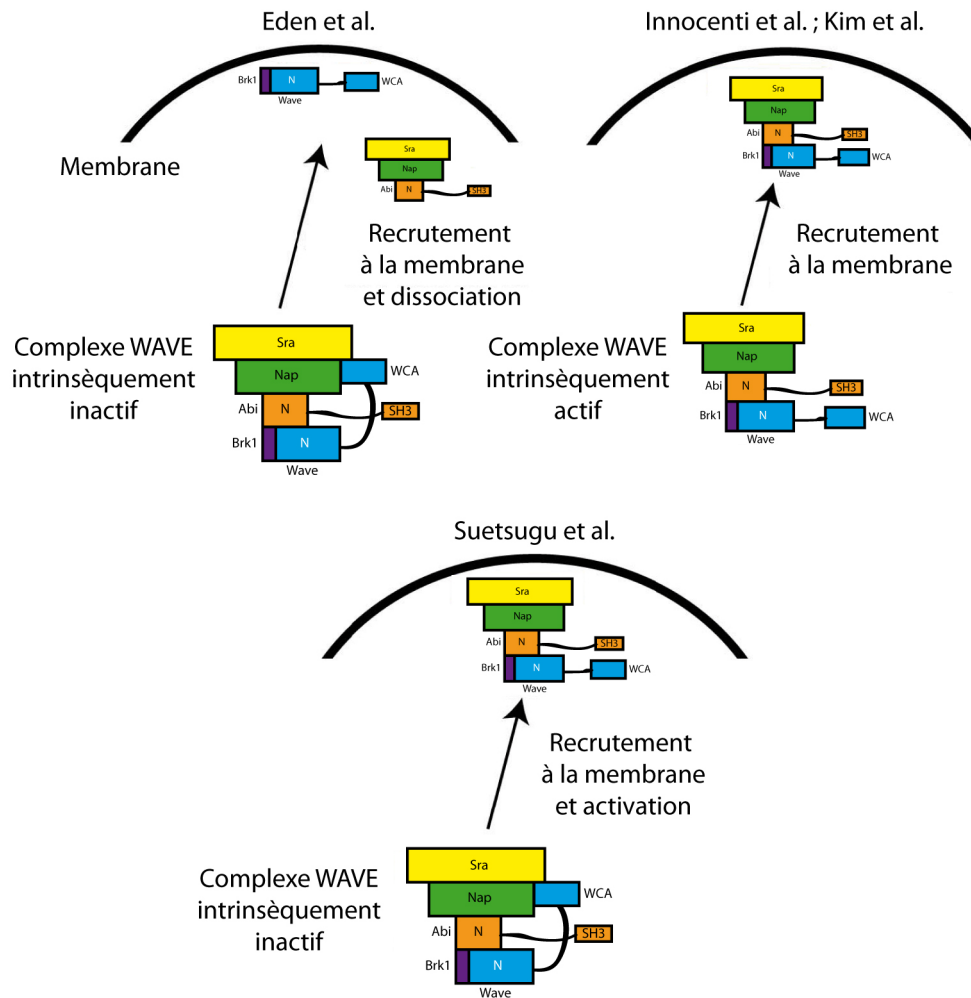


FIGURE 3.9 – Modèles d’activation du complexe WAVE

Modifié de [Eden et al., 2002], [Innocenti et al., 2004], [Kim et al., 2006] et [Suetsugu et al., 2006a]. Les différents modèles sont décrits précisément dans le texte.

3.2.6 Activation du complexe WAVE

Outre la GTPase Rac, d'autres partenaires ont été proposés pour agir en synergie avec la GTPase dans le but d'activer le complexe WAVE. C'est le cas de la protéine IRSp53 (Insulin Receptor Tyrosine Kinase Substrate p53). En effet, cette protéine interagit avec Rac ainsi qu'avec WAVE2 par l'intermédiaire de la région riche en proline [Miki et al., 2000, Suetsugu et al., 2006b]. IRSp53 est impliquée dans le recrutement et l'activation du complexe WAVE à la membrane plasmique *in vivo* [Abou-Kheir et al., 2008, Suetsugu et al., 2006b]. De manière intéressante, IRSp53 peut contribuer elle-même à la projection membranaire puisqu'elle est constituée d'un domaine BAR qui lie les membranes et qui induit des protrusions [Millard et al., 2005, Suetsugu et al., 2006a].

Le phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate (PIP3), qui est le produit de la PI3 kinase, est essentiel à l'activation du complexe WAVE [Lebensohn and Kirschner, 2009]. En effet, WAVE2 interagit directement avec le PIP3 qui est essentiel à la formation du lamellipode et qui est impliqué dans le recrutement de WAVE à la membrane plasmique *in vivo* [Oikawa et al., 2004]. Les trois activateurs, Rac, IRSp53 et PIP3 agissent probablement de manière synergique pour recruter et activer le complexe WAVE [Suetsugu et al., 2006a]. En effet, Rac et PIP3 font partie d'une boucle de régulation positive [Weiner et al., 2002] et IRSp53 lie Rac [Miki et al., 2000].

Comme pour le complexe N-WASP/WIP, les phosphorylations apportent un niveau de régulation supplémentaire du complexe WAVE. La phosphorylation d'une tyrosine par la kinase Abelson (Abl) est essentielle à l'activité de WAVE2 et WAVE3 *in vivo* [Leng et al., 2005, Stuart et al., 2006, Sossey-Alaoui et al., 2007]. Cette phosphorylation a été identifiée sur la tyrosine 150 dans le domaine N-terminal de WAVE [Leng et al., 2005, Stuart et al., 2006]. La kinase est recrutée par le complexe WAVE par l'intermédiaire d'une interaction avec la protéine Abi [Dai and Pendergast, 1995, Shi et al., 1995]. De plus, la kinase Cdk5 (Cyclin dependent kinase 5) et la caséine kinase 2 phosphorylent la région riche en proline de la protéine WAVE1 [Kim et al., 2006] et le domaine WCA de la protéine WAVE2 [Pocha and Cory, 2009] respectivement.

Une étude de reconstitution *in vitro* utilisant des protéines purifiées à permis de confirmer en partie les résultats observés *in vivo*. En effet, ce travail récent montre que l'activation du complexe WAVE requiert des phosphorylations de la sous-unité WAVE2, des interactions simultanées avec la GTPase Rac prénylée et avec des phospholipides acides [Lebensohn and Kirschner, 2009]

(Figure 3.10). Ces signaux permettent une activation complète en induisant un changement allostérique du complexe plutôt qu'un simple recrutement ou une simple dissociation des sous-unités. Ce travail permet donc une meilleure compréhension de la coopération existante entre les différentes protéines impliquées dans l'activation du complexe WAVE. De plus, ce travail confirme également les rôles important de Rac et des phospholipides dans l'activation du complexe WAVE. Cependant, IRSp53 ne semble pas nécessaire pour une activation complète du complexe WAVE *in vitro*, bien que son importance *in vivo* ait été montrée [Miki et al., 2000, Suetsugu et al., 2006a, Tahara et al., 2007]. Ces résultats montrent que même si la dynamique de l'actine a été reconstituée *in vitro*, la complexité du lamellipode, et spécialement la dynamique des membranes, n'est pas encore complètement comprise et loin d'être reconstituée *in vitro*.

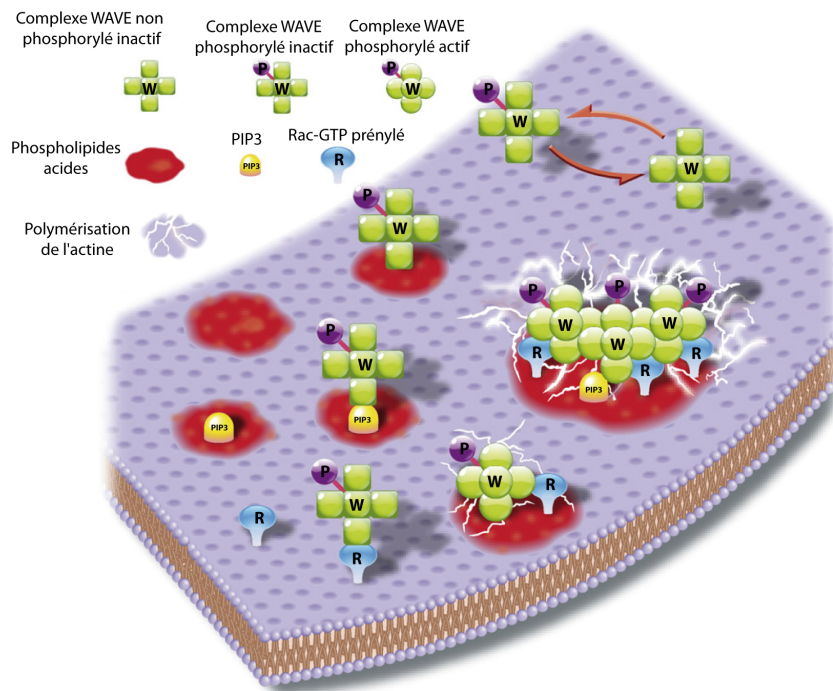


FIGURE 3.10 – Modèle d'activation du complexe WAVE

Adapté de [Lebensohn and Kirschner, 2009]. Le complexe WAVE est intrinsèquement inactif et doit être phosphorylé avant d'être activé. Cependant la phosphorylation n'est pas suffisante. Le complexe WAVE phosphorylé peut se lier aux phospholipides acides incluant PIP3 ou à la GTPase Rac prénylée. Pour être activé le complexe WAVE doit se lier à la fois aux phospholipides et à la GTPase Rac prénylée. Une fois activé, le complexe WAVE peut activer le complexe Arp2/3 et déclencher la polymérisation de l'actine.

3.3 WHAMM et son homologue JMY

WHAMM et son homologue JMY ont été récemment identifiés et semblent n'être présents que chez les vertébrés [Campellone et al., 2008b, Veltman and Insall, 2010, Zuchero et al., 2009]. Ils ont tous les deux l'organisation classique des NPFs, avec un domaine N-terminal spécifique de la famille, une région riche en proline et un domaine WCA. Malgré leur similarité de séquence, WHAMM et JMY semblent avoir des rôles complètement différents.

3.3.1 WHAMM contrôle la morphogénèse de l'appareil de Golgi

WHAMM est localisé au niveau de l'appareil de Golgi (Figure 3.11) et sur des membranes vésiculo-tubulaires se déplaçant grâce à l'actine et aux microtubules [Campellone et al., 2008a]. La surexpression ou la déplétion de WHAMM altère la morphologie de l'appareil de Golgi tout en ralentissant le transport entre le Réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Ces résultats indiquent que la polymérisation de l'actine générée par WHAMM permet le triage et la formation de transporteurs au niveau de l'appareil de Golgi. De plus, la surexpression de WHAMM provoque la formation de longs tubules qui émanent de l'appareil de Golgi. Cela s'explique par la faculté de WHAMM à interagir directement avec le Golgi et les microtubules [Campellone et al., 2008a]. De manière intéressante, N-WASP se localise également au niveau de l'appareil de Golgi et est impliqué dans le transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique [Luna et al., 2002, Matas et al., 2004]. Il semble donc que les deux voies de transport entre l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (anterograde et retrograde) soient régulés par deux NPFs différents.

3.3.2 JMY régule la migration cellulaire

Le rôle cellulaire de JMY est moins évident. En effet, JMY, comme Cordon bleu, possède 3 domaines WH2 en tandem dans son domaine WCA [Zuchero et al., 2009]. Le domaine WCA de JMY nucléer des filaments non branchés en l'absence du complexe Arp2/3 [Zuchero et al., 2009]. JMY se localise dans le noyau (Figure 3.11), cette localisation est en accord avec son identification en tant qu'interactant des régulateurs de la transcription p300 et p53 [Shikama et al., 1999]. Un rôle dans la réparation des dommages de l'ADN a été proposé pour JMY sans que le mécanisme moléculaire ne soit connu. Dans les cellules

en migration, JMY se relocalise à la membrane plasmique (Figure 3.11) où il régule la motilité [Zuchero et al., 2009]. Toutefois, l'activité de JMY au lamellipode reste peu évidente puisque le domaine VCA de JMY n'est pas requis pour l'activation du complexe Arp2/3 [Zuchero et al., 2009]. Les auteurs de ce travail proposent un modèle dans lequel JMY génère le premier filament mère requis pour la formation du réseau dendritique. Cependant, on ne sait pas si JMY est capable de nucléer efficacement des filaments à partir de complexes profiline-actine. Il apparaît donc que la relevance physiologique de JMY et donc de ce modèle nécessite une étude plus avancée.

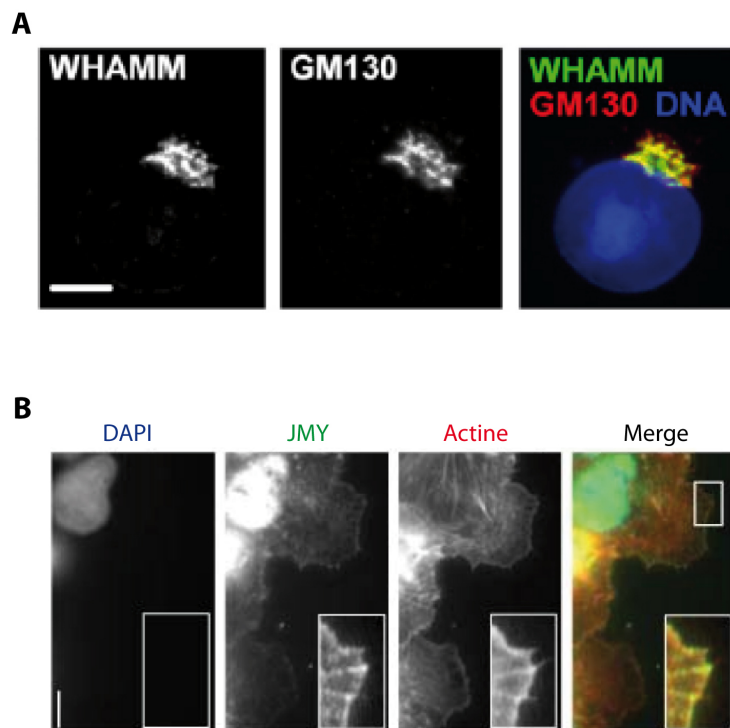


FIGURE 3.11 – Localisation de WHAMM et de JMY

Adapté de [Campellone et al., 2008b] et [Zuchero et al., 2009]. A : WHAMM est localisé au niveau des membranes du cis-Golgi B : JMY est localisé dans le noyau et au lamellipode. La barre d'échelle représente 10 μm .

3.4 WASH

Wash est le dernier NPF identifié [Linardopoulou et al., 2007]. WASH est un NPF *in vitro*. La famille WASH contient un seul gène dans les cellules de drosophiles, *Caenorhabditis elegans* et dans le génome murin, mais différentes paralogues existent chez l'homme [Linardopoulou et al., 2007]. Le gène WASH est essentiel chez la drosophile [Linardopoulou et al., 2007] mais son rôle cellulaire n'était pas compris. Deux études menées en parallèle ont établi le rôle cellulaire de WASH [Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009].

WASH possède un domaine WCA caractéristique de la famille des NPFs. Il possède également une région riche en proline, un domaine N-terminal appelé WAHD1 (WASH homology domain 1) et une région de liaison à la tubuline TBR (Tubulin Binding Region).

3.4.1 Rôle cellulaire de WASH

3.4.1.1 WASH est localisée sur les endosomes

La protéine WASH est localisée préférentiellement sur les endosomes précoces et les endosomes de recyclage [Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009, Duleh and Welch, 2010] (Figure 3.12). De manière importante, WASH est localisée sur des domaines restreints à la surface de ces endosomes [Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009] et le domaine N-terminal de WASH est nécessaire à cette localisation [Gomez and Billadeau, 2009]. De plus, l'utilisation d'un mutant de la protéine Rab5 permettant une fusion homotypique des endosomes montre que ces domaines sont extrêmement dynamiques [Derivery et al., 2009]. Dans leur étude, Gomez *et al.* montre que WASH se localise sur des domaines enrichis en complexe retromère (Figure 3.13). Ce complexe est impliqué dans le transport entre les endosomes et l'appareil de Golgi.

En accord avec sa localisation sur des endosomes de recyclage, WASH est impliquée dans le recyclage de la transferrine [Derivery et al., 2009], dans le transport du récepteur au mannose-6-phosphate [Gomez and Billadeau, 2009] et dans la dégradation du récepteur à l'EGF [Duleh and Welch, 2010].

3.4.1.2 WASH recrute et active le complexe Arp2/3 aux endosomes

WASH est associée à un réseau d'actine branché à la surface des endosomes et colocalise avec le complexe Arp2/3 [Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009, Duleh and Welch, 2010]. Cependant, tout le complexe Arp2/3

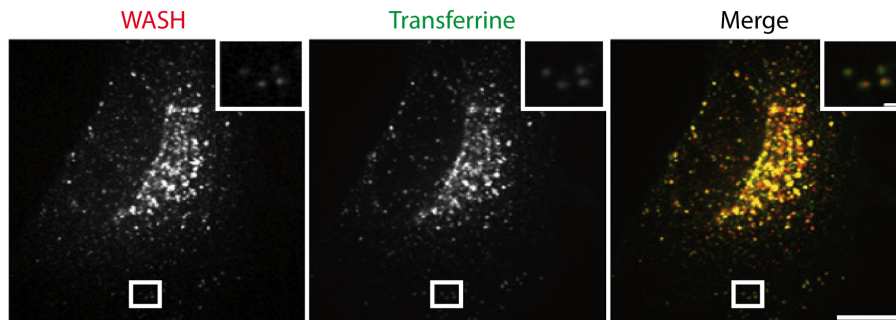


FIGURE 3.12 – WASH est localisée sur les endosomes

Adapté de [Derivery et al., 2009]. Une expérience d'internalisation de transferrine fluorescente a été réalisée sur une lignée stable de fibroblaste de souris exprimant la protéine WASH fusionnée à la GFP. Des images ont ensuite été acquises par microscopie confocale. La protéine WASH colocalise avec la transferrine au niveau des endosomes de tri et de recyclage $10 \mu\text{m}$.

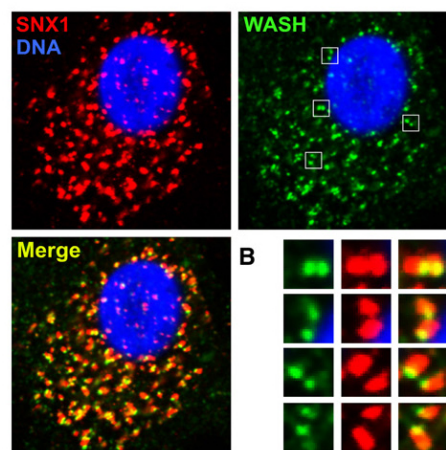


FIGURE 3.13 – WASH se localise avec le retromère sur les endosomes

Adapté de [Gomez and Billadeau, 2009]. Une immunofluorescence sur des cellules U-87MG, WASH est en vert, SNX1 (une sous-unité du rétromère) est en rouge et l'ADN est en bleu.

déecté à la surface des endosomes ne colocalise pas avec WASH. Cela signifie que le complexe Arp2/3 est recruté également par d'autres NPFs tels que WHAMM ou N-WASP dans cette région. La déplétion de WASH par ARN interférence entraîne la disparition du réseau d'actine et du complexe Arp2/3 de la région périnucléaire suggérant ainsi que WASH recrute et active le complexe Arp2/3 dans cette région [Derivery et al., 2009].

De manière intéressante, il semble que le recrutement du complexe Arp2/3 et de l'actine sur ces endosomes requiert l'annexine A2, une protéine de liaison aux lipides ainsi que le domaine WH2 de Spire [Morel et al., 2009]. Cette collaboration entre WASH et Spire est également observée chez la drosophile [Liu et al., 2009]. On peut donc penser que l'annexine A2 est impliquée dans le recrutement de WASH aux endosomes et que Spire coopère au cours de la polymérisation de l'actine. Cependant, des expériences *in vitro* de liaisons aux lipides, montrent que le complexe WASH interagit avec des liposomes [Derivery et al., 2009]. Ces résultats indiquent que la protéine WASH est capable d'interagir directement avec les membranes. Des études supplémentaires semblent requise pour une meilleure compréhension du recrutement de WASH sur les endosomes.

3.4.1.3 WASH contrôle la forme des endosomes

La déplétion de WASH par ARN interférence entraîne également un changement morphologique des endosomes (Figure 3.14) [Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009, Duleh and Welch, 2010], de longs tubules émanent des endosomes. De plus, ces endosomes suivent la même direction que les tubes suggérant un rôle des moteurs microtubulaires et des microtubules dans la formation des tubules et dans leur mouvement [Derivery et al., 2009]. En effet, l'utilisation du nocodazole qui induit une dépolymérisation des microtubules empêche la tubulation des endosomes. De plus, l'utilisation d'un anticorps qui bloque spécifiquement l'activité NPF de WASH en se fixant sur son domaine WCA provoque également la formation des tubules. Ce résultat montre que la tubulation des endosomes est due à une absence de la polymérisation de l'actine déclenchée par WASH.

3.4.1.4 WASH est impliquée dans la scission endosomale

Les endosomes sont des plateformes de tri pour des cargos prenant différentes routes. Cette étape de tri est médiée par des intermédiaires de transports tubulo-vésiculaires [Maxfield and McGraw, 2004]. La tubulation observée dans les cellules déplétées en WASH, suggère donc un défaut de la scission des intermédiaires de transport.

L'inhibition de la GTPase dynamine, induit la formation de longs tubules identiques à ceux observés lorsque WASH est déplétée [Derivery et al., 2009]. Ce résultat suggère donc un défaut dans la scission des endosomes.

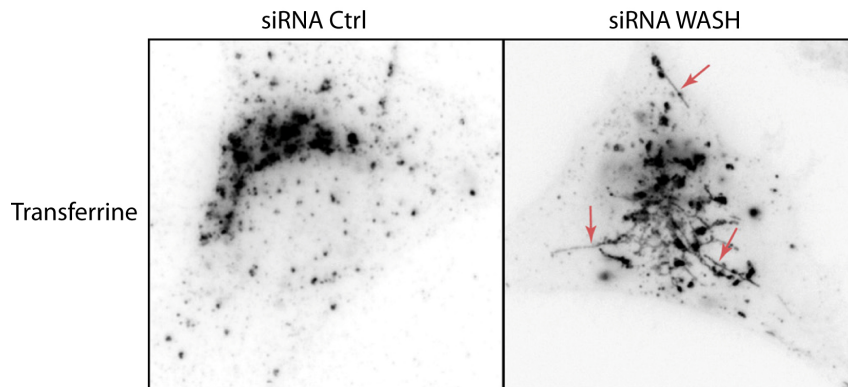


FIGURE 3.14 – La déplétion de WASH induit une tubulation endosomale

Adapté de [Derivery et al., 2009]. Une internalisation de transferrine fluorescente a été réalisée sur des cellules fibroblastiques de souris transfectées avec un siRNA ctrl ou un siRNA ciblant la protéine WASH. Les cellules sont ensuite observées par microscopie à épifluorescence. On remarque la présence de tubules qui émanent des endosomes (Flèches). La barre d'échelle représente 10 μm .

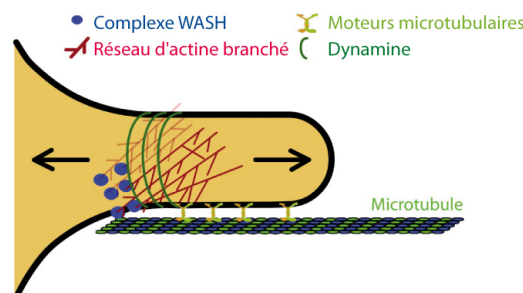


FIGURE 3.15 – Rôle de WASH dans la scission endosomale

Adapté de [Derivery et al., 2009]. Représentation d'un endosome de recyclage ou de tri en train de bourgeonner. Le complexe WASH initie la polymérisation de l'actine et génère un réseau branché de filaments d'actine sur un domaine restreint d'un endosome. Des moteurs microtubulaires commencent à tirer le bourgeon entraînant la formation d'un tube. La dynamine interagit avec le complexe WASH et/ou d'autres composants du réseau branché d'actine et polymérise autour du tube en formation. La tension de membrane générée par les deux forces opposées facilite la fission par la protéine Dynamine. En l'absence de WASH, la fission n'a pas lieu et les moteurs microtubulaires tirent un tube de membrane qui ne sera pas coupé.

En accord avec un rôle possible de WASH dans la scission endosomale, la dynamine coprécipite avec la protéine WASH au niveau endogène. Le modèle suivant a été proposé (Figure 3.15) : le bourgeon est tout d'abord tiré par les moteurs microtubulaires, WASH induit ensuite la polymérisation de l'actine à la base du tubule, puis WASH recrute alors directement ou indirectement la dynamine qui oligomérisse autour de la membrane. Le tubule de membrane est alors sous tension car la force générée par la polymérisation de l'actine s'exerce en sens opposé à celle développée par les moteurs microtubulaires. Cette tension facilite alors la fission du tubule par la dynamine. En l'absence des activités de WASH ou de dynamine, la tubulation est exagérée car la fission ne s'opère pas.

3.4.2 Le complexe WASH

De la même manière que les protéines N-WASP et WAVE, la protéine WASH se trouve au sein d'un complexe multiprotéique [Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009]. Ce complexe est constitué de 7 sous-unités : KIAA1033, KIAA0196, KIAA0592, WASH, les protéines de coiffe α et β et la protéine CCDC53 (Coiled Coil Domain Containing 53). La stoechiométrie de ce complexe est 1 :1 :1 :1 :1 :1 :1. L'originalité de ce complexe provient de la présence des protéines de coiffe α et β . En effet, ces protéines forment un hétérodimère connu pour être libre dans la cellule [Cooper and Sept, 2008]. Cette purification suggère donc deux formes différentes pour cet hétérodimère, une forme libre et une forme présente dans le complexe WASH. Le complexe WASH est donc un super complexe constitué d'un complexe hétérodimérique associé à 5 sous-unités. Comme le complexe WAVE, le complexe WASH est un complexe stable où toutes les sous-unités sont requises pour la stabilité du complexe. En effet, la dégradation d'une des sous-unités du complexe WASH entraîne la dégradation des autres sous-unités [Derivery et al., 2009].

Les protéines de coiffe inhibent la polymérisation de l'actine au bout barbé des filaments. Cette activité est donc antagoniste à l'activité NPF détenu par WASH. Des expériences de polymérisation d'actine *in vitro* montrent que la protéine WASH ainsi que le complexe WASH sont intrinsèquement capables d'activer le complexe Arp2/3 [Derivery et al., 2009]. De plus, ces expériences indiquent que l'activité coiffante du complexe est plus faible que l'activité coiffante des protéines de coiffe sous forme libre. Ces résultats montrent que les constantes de liaison des protéines de coiffe à l'actine sont affectées par leur incorporation dans le complexe WASH [Derivery et al., 2009]. Le complexe

WASH est donc capable de promouvoir efficacement la nucléation des filaments d'actine par le complexe Arp2/3 malgré une activité de coiffe partielle.

Deuxième partie

Résultats

L'activation du complexe WAVE nécessite la coopération de la GTPase Rac activée, de la protéine à domaine BAR IRSp53, et du phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). Comment ces activateurs ont-ils été trouvés ?

Grâce à l'utilisation de mutants constitutivement actifs et de mutants dominants négatifs, il a été démontré que Rac contrôlait la formation des lamellipodes [Ridley et al., 1992]. Miki *et al.* ont ensuite montré, par une approche candidate, que la protéine WAVE était responsable de la formation des lamellipodes sous le contrôle de Rac grâce à l'utilisation de construits dominants négatifs [Miki et al., 1998b].

Il a été montré au début des années 2000, que le PIP2 interagissait avec la région basique de la protéine N-WASP, contrôlant ainsi son activation [Rohatgi et al., 2000]. La protéine WAVE possédant également une région basique, Oikawa *et al.* ont alors cherché à identifier les phospholipides qui interagissaient avec cette région [Oikawa et al., 2004]. Ils ont identifié une liaison préférentielle au PIP3 qui est un composant essentiel d'une boucle de rétro-action positive impliquant Rac [Weiner et al., 2002].

L'importance de ces deux régulateurs du complexe WAVE a été démontrée par des expériences de reconstitution de l'activation du complexe WAVE *in vitro* [Lebensohn and Kirschner, 2009]. Malgré cette reconstitution, l'ensemble de la régulation du complexe WAVE n'est pas comprise. En effet, la protéine IRSp53 a été identifiée par une approche de double hybride en levures, comme une protéine interagissant avec la région riche en proline de la protéine WAVE et comme étant essentielle à la formation des lamellipodes, sous le contrôle de la GTPase Rac *in vivo* [Miki et al., 2000, Suetsugu et al., 2006a]. Cependant, les expériences de reconstitution *in vitro* montrent que Rac et le PIP3 sont suffisants pour activer le complexe WAVE [Lebensohn and Kirschner, 2009].

Dans le but de trouver de nouveaux activateurs du complexe WAVE comme IRSp53, nous avons cherché à réaliser un crible. Deux critères ont été retenus. Tout d'abord, l'activateur du complexe WAVE doit s'associer à ce dernier, et, lorsqu'il est déplété, doit présenter le même phénotype caractéristique associé à la déplétion du complexe WAVE. Nous avons donc réalisé un crible combinant une approche de protéomique et une approche de génomique fonctionnelle en cellule de Drosophiles en culture. Ces approches permettent l'identification d'un grand nombre de protéines et la combinaison de ces deux approches permet de se focaliser sur les candidats les plus pertinents. Le système Drosophile a été retenu, à l'époque, pour la simplicité de la réalisation du crible de génomique fonctionnelle.

Chapitre 4

Gautier *et al.* (2011) *Journal of Cell Science*

Clathrin is required for Scar/Wave mediated lamellipodium formation.

Jérémie J. Gautier, Maria E. Lomakina, Lamia Bouslama-Oueghlani, Emmanuel Derivery, Helen Beilinson, Wolfgang Faigle, Damarys Loew, Daniel Louvard, Arnaud Echard, Antonina Y. Alexandrova, Buzz Baum, and Alexis Gautreau

Accept  pour publication   *Journal of Cell Science*, 2011

Clathrin is required for Scar/Wave mediated lamellipodium formation

Jérémie J. Gautier¹, Maria E. Lomakina², Lamia Bouslama-Oueghlani^{3,4}, Emmanuel Derivery¹, Helen Beilinson¹, Wolfgang Faigle³, Damarys Loew³, Daniel Louvard^{3,4}, Arnaud Echard^{5,6}, Antonina Y. Alexandrova², Buzz Baum⁷, and Alexis Gautreau^{1,3,4,8}

¹ CNRS UPR3082
Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales
Avenue de la Terrasse
91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

² N.N. Blokhin Cancer Research Center of Russian Federation,
Kashirskoe shosse, 24, 115478 Moscow, Russia.

³ Institut Curie, Centre de Recherche
⁴ CNRS UMR144
26 rue d'Ulm,
75248 Paris Cedex 05, France.

⁵ Institut Pasteur, Membrane traffic and cell division laboratory
⁶ CNRS URA 2582
25-28 rue du Dr. Roux
75724 Paris Cedex 15, France.

⁷ MRC Laboratory for Molecular Cell Biology and Dept of Cell and Developmental Biology,
University College London, Gower St
London WC1E 6BT, UK.

⁸ To whom correspondence should be addressed:
e-mail: alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr
tel : 33 1 69 82 35 08
fax : 33 1 69 82 31 29

L. B.-O. present address is: CNRS UMR7102
Université Pierre et Marie Curie
9 Quai Saint Bernard
75005 Paris

Running Title : Clathrin in lamellipodium formation

Keywords : Scar/Wave complex, Arp2/3 complex, actin, clathrin, lamellipodium

SUMMARY

The Scar/Wave complex (SWC) generates lamellipodia through Arp2/3-dependent polymerization of branched actin networks. In order to identify new SWC regulators, we conducted a screen in *Drosophila* cells combining proteomics with functional genomics. This screen identified Clathrin Heavy Chain (CHC) as a protein that binds to the SWC and whose depletion affects lamellipodium formation. This role of CHC in lamellipodium formation can be uncoupled from its role in membrane traffic by several experimental approaches. Furthermore, CHC is detected in lamellipodia in the absence of the adaptor and accessory proteins of endocytosis. We found that CHC overexpression decreased membrane recruitment of the SWC, resulting in reduced velocity of protrusions and reduced cell migration. In contrast, when CHC was targeted to the membrane by fusion to a myristoylation sequence, we observed an increase in membrane recruitment of the SWC, in protrusion velocity and in cell migration. Together these data suggest that CHC brings the SWC to the plasma membrane, thereby controlling lamellipodium formation, in addition to its classical role in membrane traffic.

INTRODUCTION

Lamellipodia are protrusions of the plasma membrane that define a leading edge during cell migration (Abercrombie et al., 1970). The membrane is projected through the force provided by actin polymerization, which can be mainly ascribed to the activity of the Arp2/3 complex that generates branched actin networks (Pollard, 2007). In mammalian cells, the 3 Wave proteins have emerged as the major activators of the Arp2/3 complex at the leading edge (Insall and Machesky, 2009; Machesky and Insall, 1998; Yamazaki et al., 2003). The small GTPase Rac controls lamellipodium formation through Wave proteins (Miki et al., 1998).

Wave proteins are embedded into multiprotein complexes whose purification provided the molecular link between the small GTPase Rac and the Arp2/3 complex (Derivery and Gautreau, 2010; Insall and Machesky, 2009). The canonical Wave complex contains 5 subunits, namely, Sra, Nap, Abi, Brk1 and Wave (Gautreau et al., 2004; Kobayashi et al., 1998; Machesky et al., 1999). However, like Wave proteins, most subunits of the Wave complex are encoded by paralogous genes, which are variably expressed in different cell types, giving rise to a combinatorial complexity of the Wave complexes that can be assembled (Derivery and Gautreau, 2010). The most ubiquitous Wave complex is composed of Sra1, Nap1, Abi1, Brk1 and Wave2 (Gautreau et al., 2004).

Despite this complexity, a core mechanism regulating Wave complex activity has recently emerged. This mechanism involves Rac and phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate (PIP3). PIP3, the product of PI3-kinase, is produced in response to Rac signalling and further activates Rac in a positive feed-back loop (Weiner et al., 2002; Weiner et al., 2006). PIP3 is essential for lamellipodium formation and is involved in recruiting the Wave complex to the plasma membrane through a direct interaction (Oikawa et al., 2004;

Sossey-Alaoui et al., 2005). *In vitro*, the purified Wave complex is inactive (Derivery et al., 2009; Ismail et al., 2009). Addition of GTP-bound Rac at high concentration is sufficient to activate the Wave complex through a conformational exposure of Wave's Arp2/3 activating domain (Ismail et al., 2009). The membrane, however, plays a critical role in Wave complex activation, since liposomes containing PIP3 and prenylated GTP-bound Rac are much more potent activators than soluble Rac alone (Lebensohn and Kirschner, 2009). In addition to this minimal set of activators, BAR domain containing proteins are involved in Wave complex activation and membrane protrusion (Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007).

Here we used *Drosophila* cells to identify regulators of the Scar/Wave Complex (SWC; Wave is referred to as Scar in this organism). In *Drosophila* cells, a single SWC exists, since each subunit of the SWC is encoded by a single gene, and the SWC controls lamellipodium formation, as in mammalian cells (Ismail et al., 2009; Kunda et al., 2003; Rogers et al., 2003). Using a screen combining proteomics with functional genomics, we found Clathrin Heavy Chain (CHC) as a protein that binds to the SWC and that regulates lamellipodium formation. These two properties of CHC are conserved from *Drosophila* to mammalian cells. Importantly, we show here that the new function of CHC in lamellipodium formation depends on its ability to promote the recruitment of the SWC at the plasma membrane, but appears independent from its classical role in membrane traffic.

RESULTS

Identification of CHC as a putative regulator of SWC function in *Drosophila* cells

We reasoned that activators of SWC should both bind to the SWC and produce the characteristic phenotype associated with SWC inactivation. Thus we designed a dual screen in *Drosophila* cells, where the proteins that bind to the SWC are identified through proteomics and where the genes producing the phenotype associated with SWC inactivation are identified upon RNAi mediated inactivation. We raised polyclonal peptide antibodies targeting the subunits of the *Drosophila* SWC (Supplementary Data, Table S1). The antibody targeting the Sra1 subunit was very efficient at immunoprecipitating the SWC from *Drosophila* S2 cells (Fig.1A). A large-scale immunoprecipitation was performed with an excess of lysate so as to saturate the antibody with its specific target and thus to minimize the recovery of cross-reactive proteins. The immunoprecipitate lane was cut in 54 gel slices from top to bottom and each slice was analysed by mass spectrometry (LC-MS/MS). This analysis resulted in the identification of 135 *Drosophila* proteins associated with the SWC (Supplementary Data, Table S2). In parallel, we carried out a genome-wide RNAi screen in S2R+ cells for cell shape defects using an established methodology (Kiger et al., 2003). For this purpose, a library of 21,306 distinct dsRNAs was used. Two immunofluorescences per dsRNA were then individually examined for the morphology of the cell periphery. *Drosophila* cells depleted of the SWC have a characteristic periphery displaying numerous spikes (Kunda et al., 2003; Rogers et al., 2003). Using our genome-wide screen, 35 genes that produced these characteristic spikes upon RNAi mediated inactivation were identified (Fig.1B). As expected, genes encoding Arp2/3 complex subunits and the small GTPases, Rac1, Rac2 and Cdc42 were retrieved (Kunda et al., 2003; Rogers et al., 2003). 28 genes not previously ascribed to

this phenotypic class were identified. These genes include a formin, a SCF ubiquitin ligase complex, proteins previously involved in intracellular traffic, such as clathrin heavy chain (CHC) and dynein light chain, and nuclear factors involved in transcription and RNA metabolism. The other phenotypic classes will be reported elsewhere (Rohn et al., in preparation). Importantly, the intersection between candidates identified through proteomics and functional genomics contained two gene products, Hrb27C and CHC (Fig.1C). Hrb27C contains two RRM domains that bind to RNA molecules. Only ambiguous mammalian orthologs, where the homology does not extend beyond the RRM domains, were identified. In contrast, CHC is a conserved protein with a well-established function as a vesicular coat component. We thus decided to focus on CHC. Interestingly, the Clathrin Light Chain was not identified by either screen. We confirmed the phenotype of CHC depleted cells using S2 cells and an independent non-overlapping dsRNA (Fig.1D). Indeed, CHC depleted cells had a spreading defect with the characteristic spikes associated with SWC inactivation. CHC thus fitted the criteria we had defined for a protein potentially regulating SWC function.

CHC depletion, but not several other ways to impair clathrin mediated traffic, affects lamellipodium formation

To confirm and generalize these results, we turned to human HeLa cells, from which the ubiquitous Wave complex has been purified and characterized (Gautreau et al., 2004). Specific co-immunoprecipitation of CHC was detected upon immunoprecipitation of the whole SWC using two independent polyclonal peptide antibodies recognizing the Abi1 and Wave2 subunits of the SWC (Fig.2A). CHC thus coprecipitates with the SWC in both *Drosophila* and human cell lines. HeLa cells normally form a limited number of lamellipodia. To induce them, transient transfection of active Rac, such as the Q61L mutant that is

defective in GTPase activity, is often used. However, this procedure gives highly inhomogeneous results, precluding accurate quantifications, due to variable individual levels of expression. So we turned to the electroporation of the purified Rac1Q61L protein, an experimental system that we previously characterized for the analysis of a precursor in the assembly of the SWC (Derivery et al., 2008). This method permitted the introduction of a defined dose of protein homogeneously into the cell population. Rac1Q61L was purified and electroporated into HeLa cells in suspension. Cells were then plated in Petri dishes for biochemical analysis or onto coverslips for immunofluorescence. The purified protein indeed enters the cell, as revealed by the increase in total Rac (Fig.2B). A pull-down experiment using the CRIB domain of PAK indicated that Rac1Q61L was indeed GTP-bound. As expected, this procedure induced a 'fried egg' morphology in the vast majority of HeLa cells, with a continuous lamellipodium covering the entire cell periphery (Fig.2C). This lamellipodium, best revealed by the actin branch marker cortactin (Cai et al., 2008), was associated with the development of radial focal adhesions (Fig.S1) and potentiated cell spreading (Fig.2C).

We then depleted Nap1, a subunit of the SWC, or CHC by transfecting HeLa cells with shRNAs encoding plasmids (Fig. 2D). Nap1 depletion resulted in a destabilization of the other subunits, Sra1, Wave2, Abi1 and Brk1, as previously described in several organisms and cell types (Derivery and Gautreau, 2010). As expected, CHC depletion impaired transferrin uptake that depends on clathrin-mediated endocytosis (Fig.2E). We then compared the Rac response of CHC depleted cells to cells depleted of Nap1. In both CHC and Nap1 depleted cells, the lamellipodium induced by active Rac was aberrant (Fig.2C). Instead of being smooth and continuous over the cell periphery, it was frequently interrupted by spikes, which were reminiscent of the spikes observed in *Drosophila* cells, although significantly shorter. Both Nap1 and CHC depleted cells had a reduced area upon Rac electroporation, suggesting that their aberrant lamellipodia are impaired in powering cell spreading (Fig.2C).

Some cells in the population transfected with shRNA targeting CHC managed to spread efficiently and formed continuous lamellipodia. We observed that these cells with normal lamellipodia were usually the ones less efficiently depleted of CHC (Fig.3A). We thus decided to quantify the extent of CHC depletion, surface area and spike formation on a cell-by-cell basis. Indeed, the majority of CHC shRNA transfected cells that exhibited a lower CHC intensity than control cells also displayed a low surface area (Fig.3B, lower left quadrant). Conversely, the majority of cells transfected with control shRNA belonged to the category of high CHC intensity and high cell area (upper right quadrant). The phenotype of spike formation was less penetrant than the reduced cell area, since one third of cells efficiently depleted of CHC formed no spikes. However, the remaining two thirds of CHC depleted cells exhibited 5 or more spikes, a number which is very rarely reached by control cells (upper left quadrant, Fig.3B). These observations indicate an agreement between the level of depletion of CHC and the occurrence of these two phenotypes. Similar results were observed with two unrelated shRNA constructs targeting efficiently CHC (Fig. 3C). Together these results indicate that CHC, like the SWC, is required for lamellipodium formation in human cells, as well as in *Drosophila* cells.

The defect in lamellipodium formation observed upon CHC depletion might be an indirect effect of defective membrane traffic. Indeed, there are numerous ways by which clathrin depletion could affect lamellipodium formation. For example, signalling growth factor receptors, which trigger lamellipodia, are known to be endocytosed in clathrin-coated pits (Scita and Di Fiore, 2010). This was one of the reasons why we used electroporation of active Rac in the experiments described above rather than growth factor stimulation to analyse lamellipodium formation. Even Rac traffics and the intracellular traffic of Rac was shown to be important in order to restrict its signalling to the leading edge of migrating cells (Palamidessi et al., 2008). These findings are likely to explain why the giant lamellipodium

induced by exogenous Rac in our assay is isotropic, i.e. not restricted to a leading edge. To examine whether the classical role of clathrin in membrane traffic has an impact on this new role we describe, lamellipodium formation, we sought to inactivate specifically clathrin's role in traffic.

To generate vesicles, clathrin is recruited through different adaptor proteins at various cellular locations (Robinson, 2004). We first used Brefeldin A (BFA), which blocks recruitment of coats to membranes, including AP-1/clathrin and GGA/clathrin to the TGN and endosomes, and causes disassembly of the Golgi. Treatment of cells with BFA for 20 min resulted in the expected redistribution of the Golgi marker GM130, indicating that the drug treatment was effective (Fig.4A). This BFA treatment however had no effect on lamellipodium formation. We then directly depleted the adaptor complexes AP1 and AP2 using shRNA encoding plasmids (Fig.4B). As expected, AP1 depletion impaired steady state distribution of the mannose 6-phosphate receptor, and AP2 depletion strongly impaired transferrin uptake. The depletion of AP1, unlike CHC depletion, did not induce defective lamellipodia, as evidenced by the number of spikes and the Rac-dependent increase in cell area (Fig.4C). It even had a slightly potentiating effect on the increase of cell area. AP2 depletion had also no detrimental effect on lamellipodium formation, even though AP2 complex is the adaptor complex, which recruits clathrin at the plasma membrane. Altogether these experiments indicate that the effect of clathrin depletion on lamellipodium formation is unlikely to be a secondary consequence of defective traffic.

CHC localizes to the lamellipodium, but does not perform endocytosis at this location

We sought to colocalize CHC with SWC at the lamellipodium. HeLa cells electroporated with active Rac is not the optimal system for this purpose, because the enrichment of the SWC at lamellipodia is very limited (Fig.S1). We thus turned to meningioma cells, which spread very efficiently without exogenous Rac. Simple examination of these cells using epifluorescence microscopy reveals an enrichment of cortactin at the periphery (Fig.S2A). This enrichment is not observed, when a soluble protein, such as RhoGDI, is stained, indicating that enrichment at the periphery is not an artefact due to an increase in membrane thickness in this region. A detectable localisation of the SWC at these lamellipodia was found using Wave2 pAb (Fig.5) or Brk1 mAb (Fig.S2B). Upon depletion of either Wave2 or Brk1, staining of the plasma membrane is lost (Fig.S2B, S2C). X-22 mAb, a well-characterized antibody recognizing CHC, also clearly stained lamellipodia. Using confocal sections, we found that CHC colocalizes with Wave2. A polyclonal antibody targeting CHC displayed the same lamellipodial staining. In addition to the lamellipodial staining, both CHC antibodies displayed the expected punctuated staining at the ventral membrane (Fig.5). As expected, both punctate ventral and peripheral stainings obtained with either antibody disappear upon CHC depletion (Fig.S2D). The CHC punctae at the ventral membrane correspond to classical clathrin coated pits, as indicated by their colocalization with the adaptor complex AP2 and the so-called endocytic accessory proteins, Eps15, CALM, and epsin (Fig.5). The endocytic accessory proteins promote the assembly of the clathrin lattice around endocytic cargoes clustered by AP2. Importantly, none of these endocytic proteins displayed the lamellipodial staining of CHC, suggesting that CHC is unlikely to perform endocytosis at the lamellipodium.

We depleted meningioma cells of the SWC by transfecting siRNAs targeting either Brk1, Nap1 or Wave2 subunits. Each of these transfections induced defective lamellipodia (Fig.6A), indicating that lamellipodia depend on SWC in this cellular system as well. We also

depleted meningioma cells of CHC or AP2. Similarly to Rac electroporated HeLa cells, CHC depletion, but not AP2 depletion, induced defective lamellipodia (Fig.6B). This confirmed that the role of CHC in lamellipodium formation does not rely on its function in endocytosis. Accordingly, AP2 depletion did not impair the peripheral staining of CHC (Fig.6C). This peripheral staining of CHC was also observed by TIRF microscopy, confirming it was associated with flat lamellipodia (Fig.S3). This observation indicates that CHC localization at lamellipodia is independent from AP2, the most established adaptor complex of endocytosis.

CHC controls membrane recruitment of the SWC, lamellipodium protrusion and cell migration

Wave2 was no longer enriched at the plasma membrane of CHC depleted meningioma cells, consistently with their defective lamellipodia (Fig.6C). This observation raised the possibility that CHC controls the cytosol/membrane distribution of the SWC. This possibility was examined using biochemical fractionation of HeLa cells. The procedure we used efficiently separated membranes (both plasma membrane and endomembranes) from the cytosol, as indicated by the respective markers, transferrin receptor, an integral membrane protein, and soluble RhoGDI (Fig.7A). Upon CHC depletion, the membrane pool of Wave2 indeed decreased more than 4-fold (Fig.7B for quantifications, Fig.S4A for western blot).

To test whether CHC is able to bring the SWC to the plasma membrane, we fused CHC with an N-terminal myristoylation sequence. Myr-CHC and CHC as a control were tagged with a Protein C epitope (PC) to detect their expression. As expected, Myr-CHC was almost completely membrane-bound in contrast to endogenous or exogenous CHC, and indeed, the membrane pool of Wave2 increased upon expression of Myr-CHC (Fig.7C for quantifications, Fig.S4B for western blot). Conversely, the overexpression of wild type CHC

decreased significantly the amount of membrane Wave2. This effect of CHC overexpression was unanticipated, but was even more pronounced than the effect of Myr-CHC. In contrast, the overexpression of CHC or of Myr-CHC had no effect on transferrin endocytosis (Fig.7D). Since CHC overexpression decreased the amount of SWC in the membrane fraction, like CHC depletion, we expected a defect in lamellipodia formation. Indeed, Rac1Q61L electroporation induced defective lamellipodia in CHC overexpressing HeLa cells, as evidenced by the increased number of spikes and decreased spreading (Fig.7E). When overexpressed CHC was targeted to the membrane through myristoylation, these defects were not present. Hence, CHC overexpression uncouples the two functions of CHC. Since CHC overexpression impairs the formation of SWC dependent lamellipodia without affecting clathrin mediated endocytosis, we selected this method to assess the role of clathrin in cell migration.

To analyse the role of CHC in migration, we turned to murine fibroblast cells that migrate faster than HeLa cells. Swiss 3T3 cells were transfected with CHC, Myr-CHC or the control plasmid, together with a GFP plasmid to identify transfected cells before time lapse imaging by DIC microscopy (Fig.8A). The leading edge activity of these cells is characterized by cycles of protrusion and retraction (Supplementary Movie S1). Retraction occurs when the lamellipodium tip detaches from the substratum and moves backward forming a membrane ruffle. Kymograph analysis of leading edges in transfected cells revealed that CHC overexpression significantly reduced the velocity of lamellipodia, whereas Myr-CHC significantly increased it (Fig.8B). Myr-CHC expression induced frequent membrane ruffles. In contrast, CHC overexpressing cells generated significantly shorter protrusions followed by reduced ruffles. The ruffles in CHC expressing cells were two-fold less frequent than in Myr-CHC expressing cells. These observations are thus perfectly in line with the respective effects of these constructs on membrane recruitment of the SWC, which is essential for the

generation of a branched actin network that projects the plasma membrane (Derivery and Gautreau, 2010; Suetsugu et al., 2006).

To examine how these defects in lamellipodium protrusion affects cell migration, we used an assay, in which islands of cells are seeded through a microfluidic device perforated with holes of 700 μm in diameter. Swiss 3T3 cells were transfected as above with CHC, Myr-CHC, or a control plasmid in combination with a GFP plasmid. The islands were fixed and examined after seeding or after an incubation of 24 h. GFP expressing cells were then counted. CHC overexpression significantly decreased the number of cells having migrated outside of the initial island compared to the control, whereas Myr-CHC expression significantly increased this number (Fig.8C). The ability of these cells to migrate is thus associated with the velocity of protrusions and the amount of SWC at the membrane.

DISCUSSION

The dual screen we conducted using *Drosophila* cells was aimed at identifying novel regulators of the SWC involved in lamellipodium formation. Surprisingly, this screen identified CHC, a major coat protein involved in membrane traffic. A molecular interaction between the Sra1 subunit of the SWC and CHC was recently reported by Hoflack and colleagues (Anitei et al., 2010). However, in this study, this interaction was shown to play a role in the generation of tubular carriers derived from the TGN, a classical function for clathrin. In contrast, the atypical function of CHC in lamellipodium formation we report here seems to be independent from its well-established role in membrane traffic. The evidence against an indirect effect on lamellipodium formation through defective membrane traffic is three-fold. (i) We were able to uncouple the two functions of CHC, using adaptor depletions or BFA. These experiments impaired traffic, but not lamellipodium formation. (ii) Conversely, overexpression of CHC impaired lamellipodium formation, but not traffic. (iii) CHC was detected in lamellipodia without the adaptor and accessory proteins mediating endocytosis. The two functions associated with the complex formed by CHC and SWC, generation of carriers from the TGN and lamellipodium formation, thus appear distinct, even though they share components. These shared components provide a simple explanation for why AP1 depleted cells spread slightly more than control cells in response to Rac (Fig.4C), since the SWC, which is no longer recruited at the TGN in AP1 depleted cells, can then perform its function at lamellipodia.

The novel function of clathrin in controlling lamellipodia adds to the case for unconventional roles of clathrin. Indeed, clathrin was previously shown to stabilize the mitotic spindle (Royle et al., 2005) and to mediate p53-dependent transcription (Enari et al., 2006). This latter role is also independent of the light chains, as is the role of CHC in

lamellipodium formation we describe here. CHC promotes lamellipodium formation through membrane recruitment of SWC. Indeed, our experiments using Myr-CHC suggest that CHC is able to bring the SWC to the membrane. In line with this idea, CHC depletion, or overexpression, greatly decreases the amount of SWC in the membrane pool. This role of clathrin in the recruitment of the SWC at the plasma membrane might explain the recent finding that clathrin is required for actin polymerization at the immunological synapse (Calabia-Linares et al., 2011), a structure that also depends on SWC activity (Billadeau et al., 2007).

The recent success of reconstituting the activation of purified SWC *in vitro* using prenylated Rac and liposomes containing PIP3 suggest that clathrin is not absolutely required to induce and maintain the active conformation of the SWC (Lebensohn and Kirschner, 2009). The situation is analogous to the one described for BAR domain containing molecules of the IRSp53 family, which are critical *in vivo* to deform the plasma membrane, to recruit and to activate the SWC (Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006; Takenawa and Suetsugu, 2007), but which are similarly dispensable in *in vitro* assays. These results suggest that, even though actin dynamics have been beautifully reconstituted *in vitro*, the complexity of a lamellipodium, especially its membrane dynamics, has not yet been fully understood and recapitulated *in vitro*.

It is striking that a major component of the endocytic machinery such as CHC should also be involved in SWC activation and in the formation of lamellipodia. Protrusion of the plasma membrane through actin polymerization and membrane retrieval through endocytosis are antagonistic. Indeed, biophysical experiments have revealed that either one of these events, but never an unproductive combination of the two, is triggered by the same stimulus, a decrease in membrane tension (Dai et al., 1997; Raucher and Sheetz, 1999; Raucher and

Sheetz, 2000). The interaction between CHC and SWC might thus be involved in this coordination by locally shutting down endocytosis in membrane protrusions.

MATERIALS AND METHODS

Cells and drugs

S2 cells were cultured at 26°C in Schneider's medium containing 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin/streptomycin. When S2 cells were grown in suspension using erlenmeyers under gentle agitation, the medium was supplemented with 1/100th volume of a 10% Pluronic F-68 solution (Invitrogen). Meningioma cells we used (#SF1335) are a surgical isolate from a patient affected by a benign meningioma, a slow-growing tumor arising from arachnoidal cells of the meninges (Rempel et al., 1993). Meningioma, HeLa and 293T cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS and penicillin/streptomycin. Swiss 3T3 cells were incubated in DMEM supplemented with 5% Donor Bovine Serum. Mammalian cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. BFA (Sigma) was used at 5 µg/ml for 20 min.

RNAi and transfections

Details about the genome-wide screen using S2R+ cells will be described in Rohn, et al. (in preparation). For RNAi mediated inactivation, S2 cells were incubated with *in vitro* produced dsRNAs, as previously described (Bousslama-Oueghlani et al., 2007). DsRNAs were produced from genomic amplified fragments using primers CTGTACGTGCTCAAGAAAACG and GCATAGGTTTCGGGTAGTATTGG for Abi (CG9749), or GTGCTTTTCGAGTTTCTGTGC and TATCAAAACCGTGGATACTTCG for CHC (CG9012). These fragments were from an independent library (Echard et al., 2004). DsRNAs treated S2 cells were assayed by spreading on ConcanavalinA coated coverslips as described (Rogers et al., 2003). HeLa and 293T cells were transfected with plasmids using electroporation or calcium phosphate precipitation, respectively. Swiss 3T3 fibroblasts were

transfected using Lipofectamine LTX and the Plus reagent (Invitrogen). Meningioma cells were transfected with 40 nM of On-Target Plus SMART pool (Dharmacon) using lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) and analyzed after 4 days. pSuper-Nap1, pSUPER-CHC, pSUPER-AP1 γ and pSUPER-AP2 μ 2 were previously described (Dugast et al., 2005; Saint-Pol et al., 2004; Steffen et al., 2004). For shRNA mediated RNAi, cells expressed pSUPER plasmids for 3 days. The two additional CHC shRNAs (#2: TAATCCAATTCGAAGACCAAT; #3:AATGGATCTCTTTGAATACGG) were cloned into the psiRNA-h7SKblasti G1 plasmid and compared to the so-called scr control plasmid (Invivogen). For overexpression, cells expressed plasmids for one day.

Plasmid constructions

Full-length human Clathrin Heavy Chain (1-1675) was amplified from the IMAGE:6045540 clone and subcloned into custom made plasmids, pcDNA5 FRT His-PC-TEV plasmid and into pcDNA5 FRT Myr-PC-TEV plasmid between FseI and AscI sites. This resulted in the fusion of CHC with the N-Terminal peptides, MHHHHHHEDQVDPRLIDGKGGGDYDIPTTENLYFQGAMGRP, or MGSNKSKPKDEDGVDPRILIDGKGGGDYDIPTTENLYFQGAMGRP, respectively. All amplified inserts were verified by sequencing.

Antibodies and immunofluorescence

Anti human Sra1, Nap1, Wave2 and Abi1 pAbs were previously described (Gautreau et al., 2004). Anti human Brk1 mAb (clone 231H9) was previously described (Derivery et al., 2008). Anti-tubulin mAb (clone E7) was developed by M. Klymkowsky and obtained from Developmental Studies Hybridoma Bank. Anti-mannose 6 phosphate receptor mAb (22D4) was a kind gift from P. Benaroch. The following Abs were of commercial source : anti-CHC

Abs (for Western Blot, mAb clone 23, BD Biosciences; for immunofluorescence, mAb X-22 and pAb ab21679, Abcam), anti-AP2 μ 2 mAb (for Western Blot, clone 31/AP50, BD Biosciences), anti-AP2 α 2 mAb (for Immunofluorescence clone AC1-M11, Abcam), anti-AP1 γ (clone 100/3, Sigma), anti-Rac1 mAb (clone 102, Transduction laboratories), anti-cortactin mAb (clone 4F11, Millipore), anti-transferrin receptor mAb (clone H68.4, Invitrogen), anti-RhoGDI pAb (A-20, sc-360; Santa Cruz), anti-VASP mAb (clone 43; BD Biosciences), anti-Paxillin mAb (clone 165; BD Biosciences), anti-CALM pAb (C-18, sc-6433; Santa Cruz), anti-Eps15 pAb (K-15, sc-11716; Santa Cruz), anti-Epsin pAb (R-20, sc-8673; Santa Cruz). HRP-conjugated antibodies were from Pierce. Fluorescent phalloidin and Alexa conjugated secondary antibodies were from Molecular Probes. For immunofluorescence, cells were fixed using 3 % paraformaldehyde then permeabilized with 0.5 % Triton X100. They were then processed using standard techniques. None of the reported stainings were seen in control experiments, where the primary antibody was omitted.

Cell fractionation

HeLa cells or transfected 293T cells were lysed by nitrogen cavitation (500 psi for 20 min; Parr Instruments) in XB buffer (20 mM Hepes, 100 mM KCl, 1 mM MgCl₂, pH 7.7) supplemented with Protease Inhibitors Cocktail (Sigma). Debris and nuclei were pelleted by a 10 min centrifugation at 600 x g at 4°C. The supernatant (Total fraction) was then subjected to a 60 min centrifugation at 150,000 x g using a TLA-100.4 rotor. Supernatant was the cytosolic fraction, whereas the membrane pellet was solubilized for 60 min in RIPA (50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40, 0.5% DOC, 0.1% SDS, pH 7.7) supplemented with protease inhibitor cocktail. The membrane fraction was re-centrifuged for 60 min at 150,000 x g to remove insoluble material.

Transferrin uptake

HeLa cells were co-transfected with the plasmid of interest and a GFP-expressing plasmid. Cells were serum starved for 30 min in internalization medium (DMEM, 0.5% BSA, 10 mM Hepes, pH 7.4) at 37°C, washed in PBS and gently detached with trypsin. Cells were then washed with cold internalization medium. Cells were incubated with Alexa-647 conjugated Tf (5 µg/ml) for 1h at 4°C with gentle agitation. After one wash in cold internalization medium, cells were resuspended in warm internalization medium and placed in a 37°C water bath. An aliquot of cells was taken at each time point and quickly placed on ice in an excess of cold Stop medium (PBS, 0.5% BSA). Cells were then acid-washed in (50 mM Glycine, 150 mM NaCl, pH 3) on ice for 3 minutes and acidity was neutralized by an excess of Stop medium. After 2 washes in Stop medium, cells were analyzed by flow cytometry (MoFlo ASTRIOS, Beckman-Coulter). 10⁴ GFP positive cells were analyzed per sample and the geometrical mean fluorescence was determined using Summit software.

Immunoprecipitations

10¹⁰ S2 cells (2.5 L culture, 14 mL cell pellet) were treated for 5 min with 1 mM of the protease inhibitor, di-isopropyl-Fluoro-Phosphate (Sigma), with appropriate safety procedures. HeLa and S2 cells were lysed in RIPA supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (1:1000, Sigma P8340). Extracts were clarified by centrifugation and ultracentrifugation, then incubated with 2 µg of non immune Rabbit IgG or affinity purified peptide antibodies, together with 10 µL of Protein A-affiprep beads (Biorad) for 2 h at 4°C. Beads were then washed four times with RIPA and resuspended in SDS loading buffer. SDS-PAGE was performed with NUPAGE 4-12% Bis-Tris or 3-8% Tris-Acetate gels (Invitrogen). Western blots were revealed using HRP coupled antibodies, Supersignal kit (Pierce) and a Fuji LAS-3000 (Fujifilm). Blots were quantified using ImageJ.

Mass spectrometry

Gel slices were reduced, alkylated and subjected to digestion with trypsin (Roche Diagnostics). Extracted peptides were dried and resolubilised in solvent A (95/5 water/acetonitrile in 0.1% (w/v) formic acid). The total digestion product of a gel slice was used per LC-MS/MS analysis. The extracted peptides were concentrated and separated on a LC-Packings system (Dionex S.A.) coupled to the nano-electrospray II ionization interface of a QSTAR Pulsar I (Applied Biosystems) using a PICOTip (10 μm i.d., New Objectives). Bound peptides were eluted with a gradient of 5-50% of solvent B (20/80:water/acetonitrile in 0.085% (w/v) formic acid). Information-dependent acquisition was used to acquire MS/MS data, with experiments designed such as the two most abundant peptides were subject to collision-induced dissociation, using nitrogen as collision gas, every 5 sec. Data were searched using MASCOT (Matrix Science) software on the NCBI nr *Drosophila melanogaster* database. All data were manually verified in order to minimize errors in protein identification and characterization.

Electroporation of purified Rac protein

For protein electroporation, GST-Rac1Q61L was purified from *E.coli* BL21* (Invitrogen) and Rac1Q61L cleaved off the GST using thrombin (Sigma). Rac1Q61L was stored at -80 °C in (20 mM Hepes, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, pH 7.7). HeLa cells were trypsinized and resuspended at 25×10^6 cells/mL in DMEM containing 10% FCS and 15 mM Hepes pH 7.5. 200 μL of cells were mixed to 50 μL of purified Rac1Q61L (40 μg). Cells were pulsed at 240 V and 950 μF in a 0.4 cm wide cuvette using a BTX ECM630 electroporator (Harvard Apparatus). Cells were then quickly resuspended in the same medium, washed once, and plated for 2 h onto glass coverslips or Petri dishes.

For pull-down of active Rac, GST fused to the CRIB domain of PAK was purified from *E.coli* BL21*. 5×10^6 electroporated cells spread on Petri dishes were lysed with 500 μ L of (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 % TX 100, pH 7.5). 10 μ L of glutathione beads (4B, GE Healthcare), 5 μ g of GST or GST-CRIB and the clarified lysate were incubated for 2 h at 4 °C. Beads were quickly washed 4 times in the lysis buffer and resuspended in SDS loading buffer.

Imaging

HeLa or meningioma cells were plated for 2 h onto glass coverslips coated with 20 μ g/mL of collagen type I (BD Biosciences) or with 50 μ g/mL of fibronectin (Sigma), respectively. Fixed cells were imaged by epifluorescence microscopy on an AxioObserver Z1 microscope (Zeiss) equipped with a 63x NA 1.4 oil immersion objective and an Orca-R² camera (Hamamatsu). When indicated, confocal optical sections were acquired with either of the following custom spinning disc confocal microscopes. The first one is based on a Nikon TE2000-U inverted microscope, a Yokogawa CSU22 spinning disk head, a 100x NA 1.45 oil immersion objective, and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics), operated with Metamorph 7.1.4 (Molecular Devices). The second one is based on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope, a Yokogawa CSU-X1 spinning disk head, a 100x NA 1.40 oil immersion objective, and a Evolve camera (Photometrics), operated with Metamorph 7.4. A maximum intensity z-projection was calculated between 5 consecutive planes separated by 200 nm. The TIRF microscope was based on a Nikon Eclipse Ti inverted microscope, a TIRF 60x NA 1.49 PlanAPO oil immersion objective, 491 nm and 561 nm lasers and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics), operated with Metamorph 7.6. Binning was always set to 1.

For time-lapse microscopy, Swiss 3T3 cells plated onto glass coverslips were placed into chambers for live imaging. Cells were observed with a Nikon Eclipse-Ti microscope

equipped with a Plan-Neofluar 40x NA 1.3 DIC objective at 37°C. Images were acquired with an ORCA-ER camera (Hamamatsu) operated with NIS-Elements AR2.3 software (Nikon). To analyse lamellipodial dynamics at the active cell edge, sequences were acquired for 10 min with 3 s intervals.

For the migration assay, we used a custom made microfluidic device composed of 96 holes of 700 µm diameter (Micronit Microfluidics), which was applied for 1 h onto glass coverslips to seed islands of GFP transfected cells. Then coverslips were either fixed, or incubated for 24 h before fixation. The GFP signal and DAPI staining were acquired with a 10x objective. The proportion of transfected cells having migrated outside of the original circle was then calculated.

Image analysis and statistics

Analyses of images and movies were performed using ImageJ, Adobe Photoshop and Adobe Premiere softwares. Gamma settings were not adjusted. For measurements of CHC intensity, images were acquired with the same settings and the intensity was measured using ImageJ after background subtraction. Cell area was measured after manual thresholding of the cortactin staining using ImageJ. Spikes were counted visually. For all quantifications, a minimum of 50 cells of a representative experiment was analysed in each condition. Variations in cell area in independent experiments precluded the averaging of different experiments, but all experiments were reproduced from 2 to 6 times.

Kymographs were generated along 1-pixel-wide line oriented in the direction of protrusions using Image J. For quantitative analysis, straight lines were drawn on kymographs from the beginning to the end of individual protrusions. Projections along the distance axis and the time axis, gave respectively, the length and the duration of protrusion. The velocity of protrusion is the ratio between this length and duration. Cycles of protrusion followed by

retraction were visually identified. The frequency was calculated by dividing the number of cycles by the duration of acquisition. For each transfection, 7 cells were analysed with 1-3 kymographs per cell. Each kymograph shows several protrusive cycles giving a total of cycles ranging from 38 to 47 in the different conditions.

All statistics were performed using SigmaStat software (SPSS). ANOVA was followed by pairwise comparisons using the Student-Newman-Keuls method, with an α factor set to 0.05. When the requirements of normality or equal variance parameters failed to pass, statistics were performed on Log_{10} transformations, which gave normal data sets with equal variance.

Acknowledgments

We thank Philippe Benaroch, Laurence Goutebroze, Christophe Lamaze, Peter Lowe and Theresia Stradal for providing essential reagents. We thank Vic Small for sharing his unpublished assay of cell migration and Thomas Lecuit for suggesting the myristoylated CHC experiment. We thank Cathy Jackson for critical reading of the manuscript. We acknowledge Developmental Studies Hybridoma Bank developed under the auspices of the NICHD and maintained by the University of Iowa.

JJG and ED are supported by a PhD fellowship from the Ministère de l'Education et de la Recherche. LBO was supported by Ligue Nationale contre le Cancer. AE is supported by Agence Nationale pour la Recherche (ANR-07-JCJC-0089-01). BB is supported by University College of London, the Royal Society and the Ludwig Institute for Cancer Research. AYA is supported by the Russian Foundation for Basic Research (08-04-00452-a). AG is supported by Fondation pour la Recherche Médicale, Association pour la Recherche sur le Cancer, and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08-BLAN-0012-03 and ANR-08-PCVI-0010-03).

References

- Abercrombie, M., Heaysman, J. E. and Pegrum, S. M.** (1970). The locomotion of fibroblasts in culture. I. Movements of the leading edge. *Exp Cell Res* **59**, 393-8.
- Anitei, M., Stange, C., Parshina, I., Baust, T., Schenck, A., Raposo, G., Kirchhausen, T. and Hoflack, B.** (2010). Protein complexes containing CYFIP/Sra/PIR121 coordinate Arf1 and Rac1 signalling during clathrin-AP-1-coated carrier biogenesis at the TGN. *Nat Cell Biol* **12**, 330-40.
- Billadeau, D. D., Nolz, J. C. and Gomez, T. S.** (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat Rev Immunol* **7**, 131-43.
- Bousslama-Oueghlani, L., Echard, A., Louvard, D. and Gautreau, A.** (2007). RNAi depleted Drosophila cell extracts to dissect signaling pathways leading to actin polymerization. *J Biochem Biophys Methods* **70**, 663-9.
- Cai, L., Makhov, A. M., Schafer, D. A. and Bear, J. E.** (2008). Coronin 1B antagonizes cortactin and remodels Arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell* **134**, 828-42.
- Calabia-Linares, C., Robles-Valero, J., de la Fuente, H., Perez-Martinez, M., Martin-Cofreces, N., Alfonso-Perez, M., Gutierrez-Vazquez, C., Mittelbrunn, M., Ibiza, S., Urbano-Olmos, F. R. et al.** (2011). Endosomal clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse. *J Cell Sci* **124**, 820-30.
- Dai, J., Ting-Beall, H. P. and Sheetz, M. P.** (1997). The secretion-coupled endocytosis correlates with membrane tension changes in RBL 2H3 cells. *J Gen Physiol* **110**, 1-10.
- Derivery, E., Fink, J., Martin, D., Houdusse, A., Piel, M., Stradal, T. E., Louvard, D. and Gautreau, A.** (2008). Free Brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex. *PLoS ONE* **3**, e2462.
- Derivery, E. and Gautreau, A.** (2010). Generation of branched actin networks: assembly and regulation of the N-WASP and WAVE molecular machines. *BioEssays* **32**, 119-31.
- Derivery, E., Lombard, B., Loew, D. and Gautreau, A.** (2009). The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 777-90.
- Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C. and Benaroch, P.** (2005). AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes. *J Biol Chem* **280**, 19656-64.
- Echard, A., Hickson, G. R., Foley, E. and O'Farrell, P. H.** (2004). Terminal cytokinesis events uncovered after an RNAi screen. *Curr Biol* **14**, 1685-93.
- Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I. and Taya, Y.** (2006). Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes Dev* **20**, 1087-99.
- Gautreau, A., Ho, H.-y. H., Li, J., Steen, H., Gygi, S. P. and Kirschner, M. W.** (2004). Purification and Architecture of the ubiquitous Wave Complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4279-83.
- Insall, R. H. and Machesky, L. M.** (2009). Actin dynamics at the leading edge: from simple machinery to complex networks. *Dev Cell* **17**, 310-22.
- Ismail, A. M., Padrick, S. B., Chen, B., Umetani, J. and Rosen, M. K.** (2009). The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 561-3.
- Kiger, A. A., Baum, B., Jones, S., Jones, M. R., Coulson, A., Echeverri, C. and Perrimon, N.** (2003). A functional genomic analysis of cell morphology using RNA interference. *J Biol* **2**, 27.

- Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A. and Kaibuchi, K.** (1998). p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. *J Biol Chem* **273**, 291-5.
- Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V. and Baum, B.** (2003). Abi, Sra1, and Kette control the stability and localization of Scar/Wave to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol* **13**, 1867-1875.
- Lebensohn, A. M. and Kirschner, M. W.** (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* **36**, 512-24.
- Machesky, L. M. and Insall, R. H.** (1998). Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol* **8**, 1347-56.
- Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E. and Pollard, T. D.** (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3739-44.
- Miki, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T.** (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* **17**, 6932-41.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S. and Takenawa, T.** (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* **408**, 732-5.
- Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S. and Takenawa, T.** (2004). PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol* **6**, 420-6.
- Palamidessi, A., Frittoli, E., Garre, M., Faretta, M., Mione, M., Testa, I., Diaspro, A., Lanzetti, L., Scita, G. and Di Fiore, P. P.** (2008). Endocytic trafficking of Rac is required for the spatial restriction of signaling in cell migration. *Cell* **134**, 135-47.
- Pollard, T. D.** (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **36**, 451-77.
- Raucher, D. and Sheetz, M. P.** (1999). Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis. *J Cell Biol* **144**, 497-506.
- Raucher, D. and Sheetz, M. P.** (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol* **148**, 127-36.
- Rempel, S. A., Schwechheimer, K., Davis, R. L., Cavenee, W. K. and Rosenblum, M. L.** (1993). Loss of heterozygosity for loci on chromosome 10 is associated with morphologically malignant meningioma progression. *Cancer Res* **53**, 2386-92.
- Robinson, M. S.** (2004). Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends Cell Biol* **14**, 167-74.
- Rogers, S. L., Wiedemann, U., Stuurman, N. and Vale, R. D.** (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in Drosophila S2 cells. *J Cell Biol* **162**, 1079-88.
- Royle, S. J., Bright, N. A. and Lagnado, L.** (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature* **434**, 1152-7.
- Saint-Pol, A., Yelamos, B., Amessou, M., Mills, I. G., Dugast, M., Tenza, D., Schu, P., Antony, C., McMahon, H. T., Lamaze, C. et al.** (2004). Clathrin adaptor epsinR is required for retrograde sorting on early endosomal membranes. *Dev Cell* **6**, 525-38.
- Scita, G. and Di Fiore, P. P.** (2010). The endocytic matrix. *Nature* **463**, 464-73.
- Sossey-Alaoui, K., Li, X., Ranalli, T. A. and Cowell, J. K.** (2005). WAVE3-mediated cell migration and lamellipodia formation are regulated downstream of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **280**, 21748-55.

- Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J. and Stradal, T. E.** (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *Embo J* **23**, 749-59.
- Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A. and Takenawa, T.** (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol* **173**, 571-85.
- Takenawa, T. and Suetsugu, S.** (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 37-48.
- Weiner, O. D., Neilsen, P. O., Prestwich, G. D., Kirschner, M. W., Cantley, L. C. and Bourne, H. R.** (2002). A PtdInsP(3)- and Rho GTPase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol* **4**, 509-13.
- Weiner, O. D., Rentel, M. C., Ott, A., Brown, G. E., Jedrychowski, M., Yaffe, M. B., Gygi, S. P., Cantley, L. C., Bourne, H. R. and Kirschner, M. W.** (2006). Hem-1 complexes are essential for Rac activation, actin polymerization, and myosin regulation during neutrophil chemotaxis. *PLoS Biol* **4**, e38.
- Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S., Fujiwara, T., Yoshida, N. and Takenawa, T.** (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* **424**, 452-6.

Figure legends

Figure 1. Identification of Clathrin Heavy Chain as a protein regulating the SWC. (A) Lysates from *Drosophila* S2 cells were immunoprecipitated with Sra1 antibody or non-immune IgG. The 5 subunits of the SWC were detected upon Coomassie staining. Subunits are indicated on the right of the gel and standards in kDa on the left. The whole Sra1 lane was analysed by mass spectrometry to identify putative partners of the complex. **(B)** Scheme and results of the RNAi screen. DsRNAs targeting 88 % of *Drosophila* genes were used to deplete individual proteins from S2R+ cells. Depleted cells were stained for actin, tubulin and DNA and pictures automatically taken. Genes found to produce the characteristic phenotype associated with depletion of the SWC, i.e. numerous spikes at the cell periphery, are displayed. **(C)** Scheme of the dual screen that identifies Clathrin Heavy Chain (CHC) and Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C (Hrb27C) as common candidates of the two approaches. The number of candidates obtained using each approach is indicated. **(D)** Confirmation of the phenotype using an independent dsRNA targeting CHC and a dsRNA targeting the Abi subunit of the SWC as a positive control. Non-adherent S2 cells were spread on ConcanavalinA coated coverslips for 1h, and then stained with fluorescent phalloidin. Bar: 10 μ m.

Figure 2. CHC associates with the SWC and is required for Rac-dependent formation of lamellipodia in HeLa cells. (A) Co-immunoprecipitation of endogenous CHC with endogenous Wave complex using either Abi1 or Wave2 antibodies. These two antibodies immunoprecipitate the whole SWC as indicated by the retrieval of a third subunit, Sra1. **(B)** Cells were electroporated with purified Rac1Q61L. The upper panel displays the increase of total Rac in the input lanes and a GST pull-down experiment using the CRIB domain of PAK

showing that Rac1Q61L is indeed GTP-bound. **(C)** Cells were depleted of CHC or Nap1, a subunit of the SWC, by shRNA transfection. Nap1 or CHC depleted cells were electroporated in suspension with active Rac, replated on collagen type I coated coverslips, allowed to spread for 2 h and stained with cortactin antibodies. CHC depletion was associated with defective lamellipodia as indicated by spikes interrupting the circular lamellipodia and the decreased area compared to control cells (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P < 0.001$). Bars: 10 μm or 1 μm in the inset. **(D)** Control of depletion by western blot of whole cell lysates. As expected, Nap1 depletion was associated with a decrease in levels of all other subunits of the ubiquitous SWC, namely, Abi1, Wave2, Sra1 and Brk1. Tubulin is a loading control. **(E)** CHC depletion, but not Nap1 depletion, impairs transferrin endocytosis. Mean \pm s.e.m. of 3 independent flow cytometry experiments is plotted.

Figure 3. Defects in lamellipodium formation are associated with the extent of CHC depletion. **(A)** CHC depleted cells electroporated with Rac1Q61L were analysed by Cortactin or CHC immunofluorescence. Only the cell that is efficiently depleted (labelled by a star) displays a low surface area and numerous spikes at its periphery. **(B)** Cell-by-cell analysis of cell area, number of spikes and CHC intensity. The coloured numbers indicate the % of cells of each category in each quadrant. **(C)** Two additional shRNA constructs targeting CHC have a similar effect on cell area and spike formation, analysed as above (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P < 0.001$). Bars: 10 μm .

Figure 4. The role of CHC in lamellipodium formation can be experimentally uncoupled from its role in membrane traffic. **(A)** Treatment of Rac electroporated HeLa cells with BrefeldinA (BFA) for 20 min resulted in the expected redistribution of GM130, but had no effect on lamellipodium formation (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P <$

0.001). Bars: 10 μm . **(B)** Depletion of AP1 and AP2 adaptor proteins from HeLa cells upon shRNA transfection was analysed by western blot of whole cell lysates. AP1 depletion induced the expected redistribution of cation-dependent mannose 6-phosphate receptor. AP2 depletion impaired transferrin endocytosis, as expected (Mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments). **(C)** None of these adaptor depletions impaired lamellipodium formation upon Rac electroporation. AP1 depletion even led to an increase of cell area (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P < 0.001$).

Figure 5. Clathrin, but not its endocytic adaptor and accessory proteins, colocalizes with the SWC in lamellipodia. Meningioma cells were spread on fibronectin-coated coverslips to induce lamellipodia and then stained with the indicated antibodies. A maximum intensity projection of 5 spinning disk confocal sections is displayed. Insets magnify a peripheral region of a single confocal plane to address colocalization. **(A-E)** Both pAb and mAb targeting CHC stained lamellipodia. Lamellipodia were stained by Wave2 antibodies, but not by antibodies targeting the endocytic adaptor, AP2, or the endocytic accessory proteins, Eps15, CALM and epsin. With these endocytic markers, colocalization with CHC was restricted to internal clathrin-coated pits. These results suggest that peripheral CHC is involved in lamellipodium formation, but not in endocytosis. Bars: 10 μm .

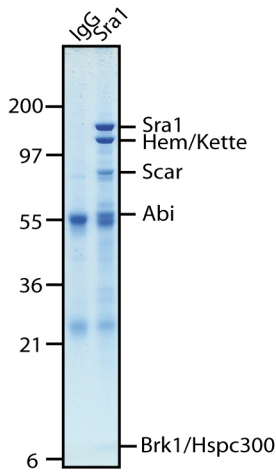
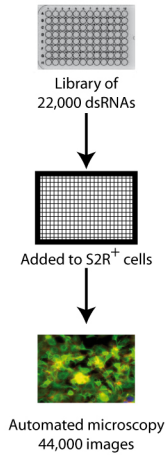
Figure 6. The peripheral pool of clathrin is required for the formation of SWC dependent lamellipodia. **(A)** Meningioma cells were depleted of subunits of the Wave complex (Brk1, Nap1, Wave2), of AP2 or of CHC using transfection of siRNAs. Depleted meningioma cells were spread on fibronectin-coated coverslips to induce lamellipodia, stained with cortactin antibodies and observed by epifluorescence. Defective lamellipodia were induced upon Wave complex depletion, as indicated by reduced cell area and spike

induction (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P < 0.001$). **(B)** CHC depletion, but not AP2 depletion, induces defects in lamellipodium formation (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P < 0.001$). **(C)** Upon AP2 depletion, the peripheral pool of CHC is not affected. Upon CHC depletion, Wave2 is no longer enriched at the plasma membrane. Bars: 10 μm or 1 μm in the inset.

Figure 7. CHC controls membrane recruitment of SWC. **(A)** HeLa cells were fractionated into cytosol and membrane fractions. Cell fractionation was validated using RhoGDI and transferrin receptor (TfR) as markers of cytosol and membrane fractions, respectively. **(B)** CHC depletion decreases the membrane fraction of the SWC (Mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments; * $P < 0.001$). **(C)** Expression and membrane distribution of endogenous CHC, PC-tagged CHC and myristoylated PC-tagged CHC. Transfected cells were fractionated. Myr-CHC is mostly bound to membranes, whereas overexpressed CHC is mostly cytosolic. Overexpressed CHC decreases the membrane pool of the SWC, whereas Myr-CHC increases it (Mean \pm s.e.m. of 3 independent experiments; * $P < 0.001$). **(D)** Overexpression of CHC or Myr-CHC does not affect clathrin-mediated endocytosis, since transferrin uptake is unaffected. **(E)** However, CHC overexpression impairs Rac-dependent lamellipodia, as evidenced by the increased number of spikes within lamellipodia and the decreased cell area (Mean \pm s.e.m., $n > 50$ cells in each condition, * $P < 0.001$). Bar: 10 μm or 1 μm in the inset.

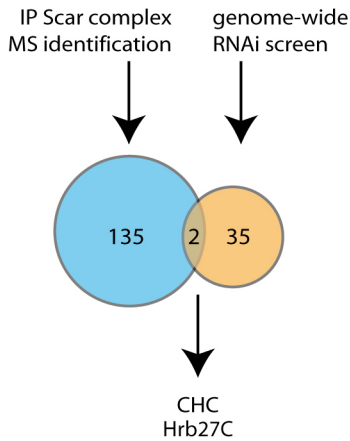
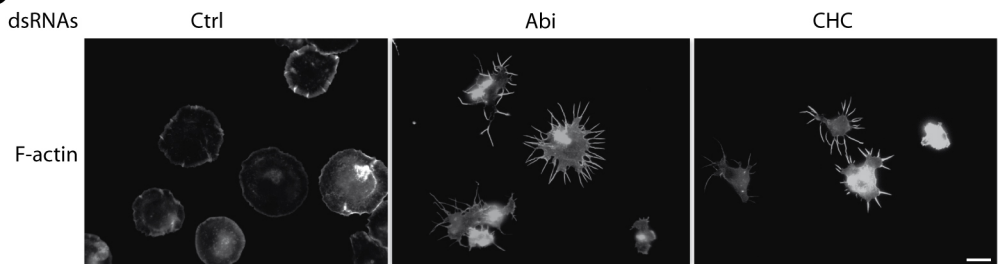
Figure 8. CHC controls the protrusion rate of leading edges and cell migration. **(A)** Swiss 3T3 cells were transfected with CHC, Myr-CHC or control plasmid together with a GFP expressing plasmid. Transfected cells identified by green fluorescence (inset) were observed by DIC microscopy. Bar: 10 μm . **(B)** Kymographs show lamellipodial activity along the line orthogonal to the leading edge depicted in Fig.8A. The beginning and the end of a

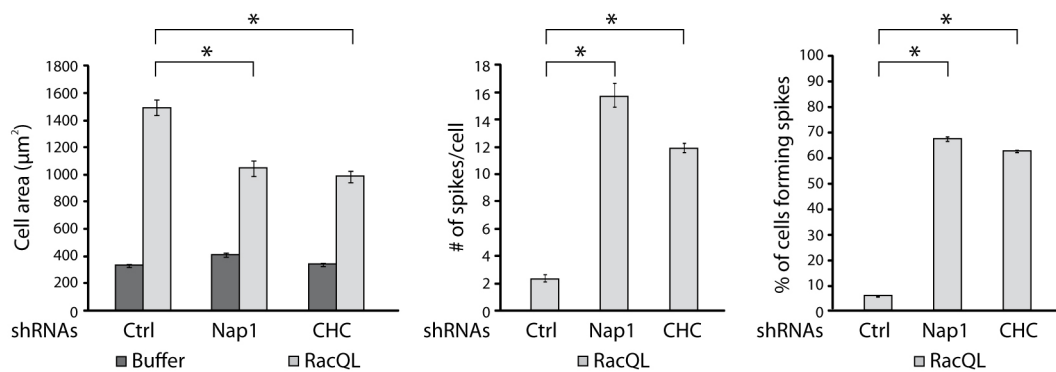
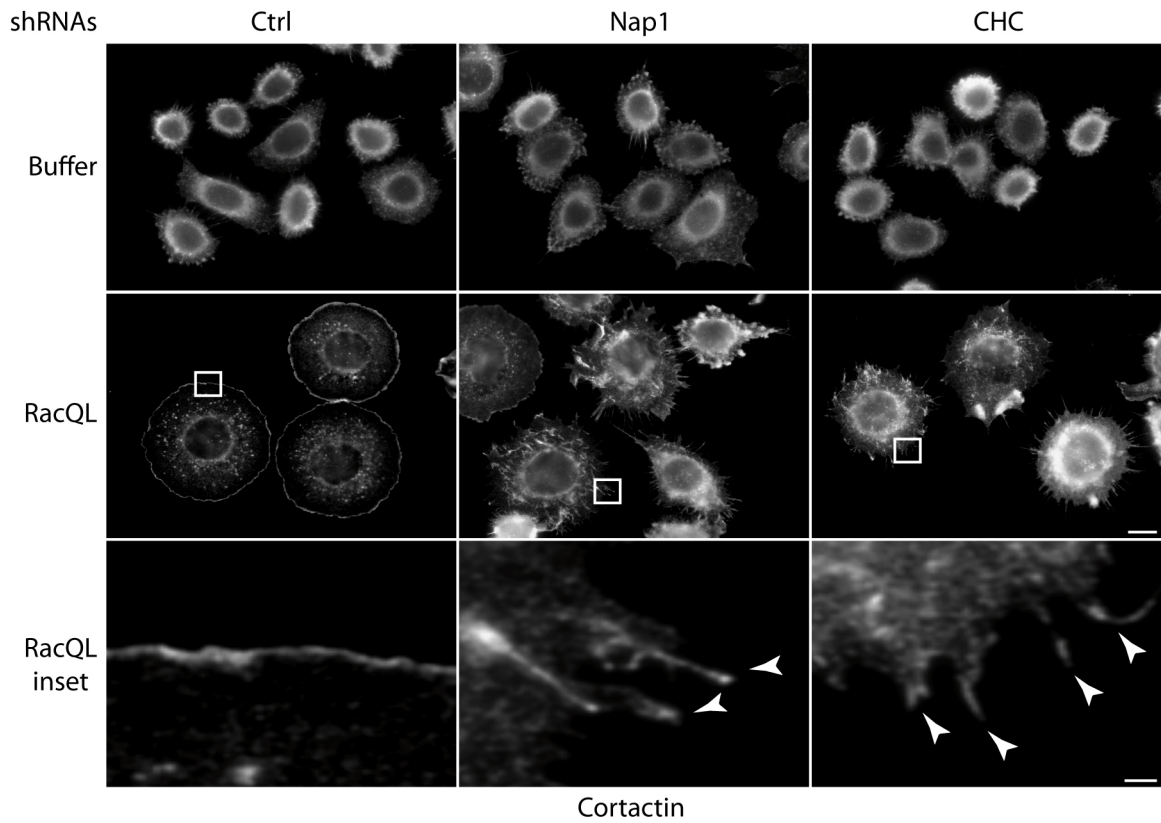
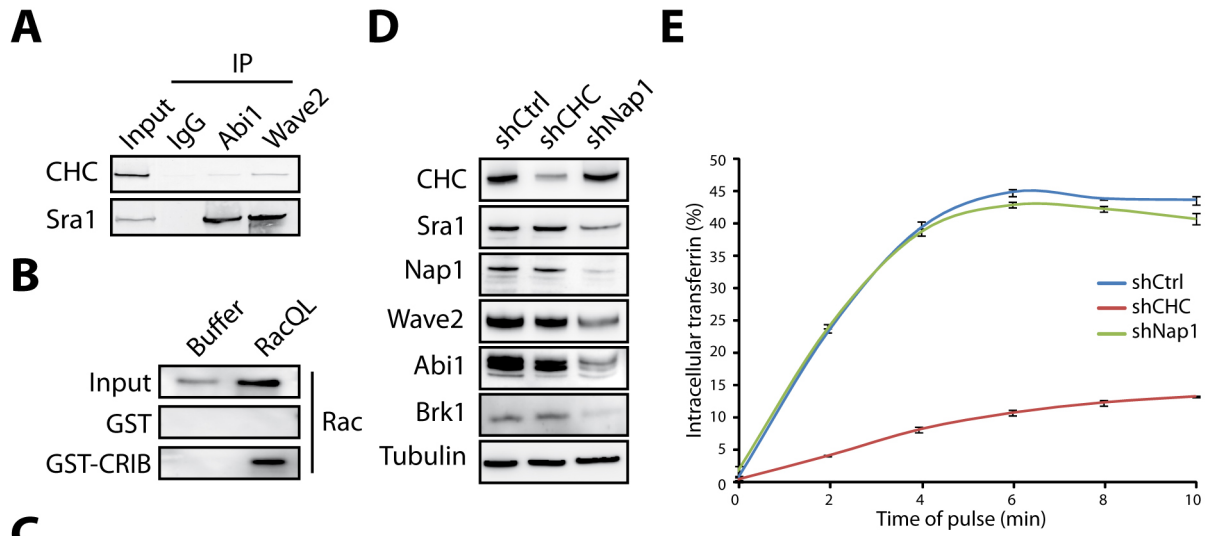
typical cycle of protrusion/retraction are indicated by white arrows. Velocity is calculated during the protrusion phase of each cycle. In CHC expressing cells, the length of protrusions is decreased and lamellipodia protrude at a lower velocity than control cells. In contrast, in Myr-CHC expressing cells, the velocity is increased. Furthermore, the frequency of cycles is also increased (Mean \pm s.e.m., 7 cells analysed per condition, between 1 and 3 kymographs per cell, with several protrusive cycles on each kymograph, giving a total of cycles ranging from 38 to 47; * $P < 0.001$). (C) Swiss 3T3 cells transfected as above were seeded as islands of 700 μm in diameter. The number of GFP positive cells having migrated outside of the initial island was counted after 24 h of incubation. CHC overexpression significantly impairs cell migration, whereas Myr-CHC overexpression potentiates cell migration (Mean \pm s.e.m. of 6 to 19 independent experiments; * $P < 0.001$). Bar: 100 μm .

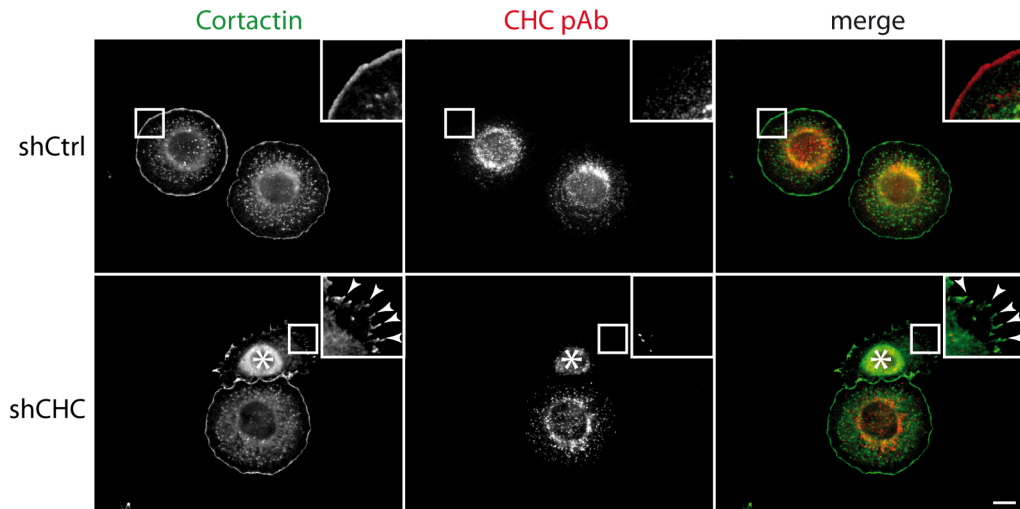
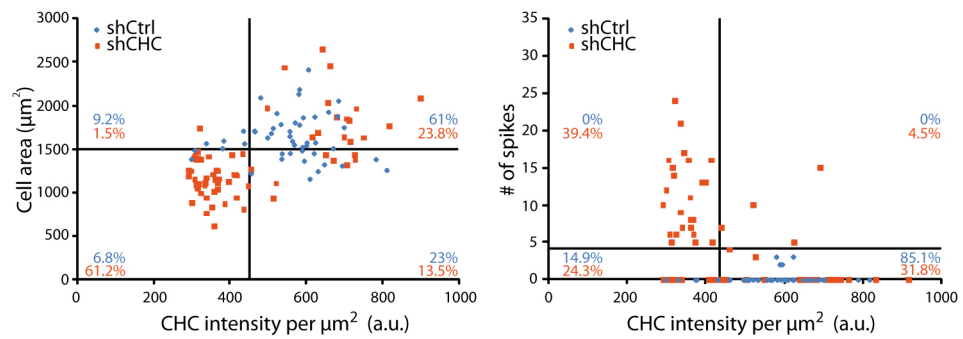
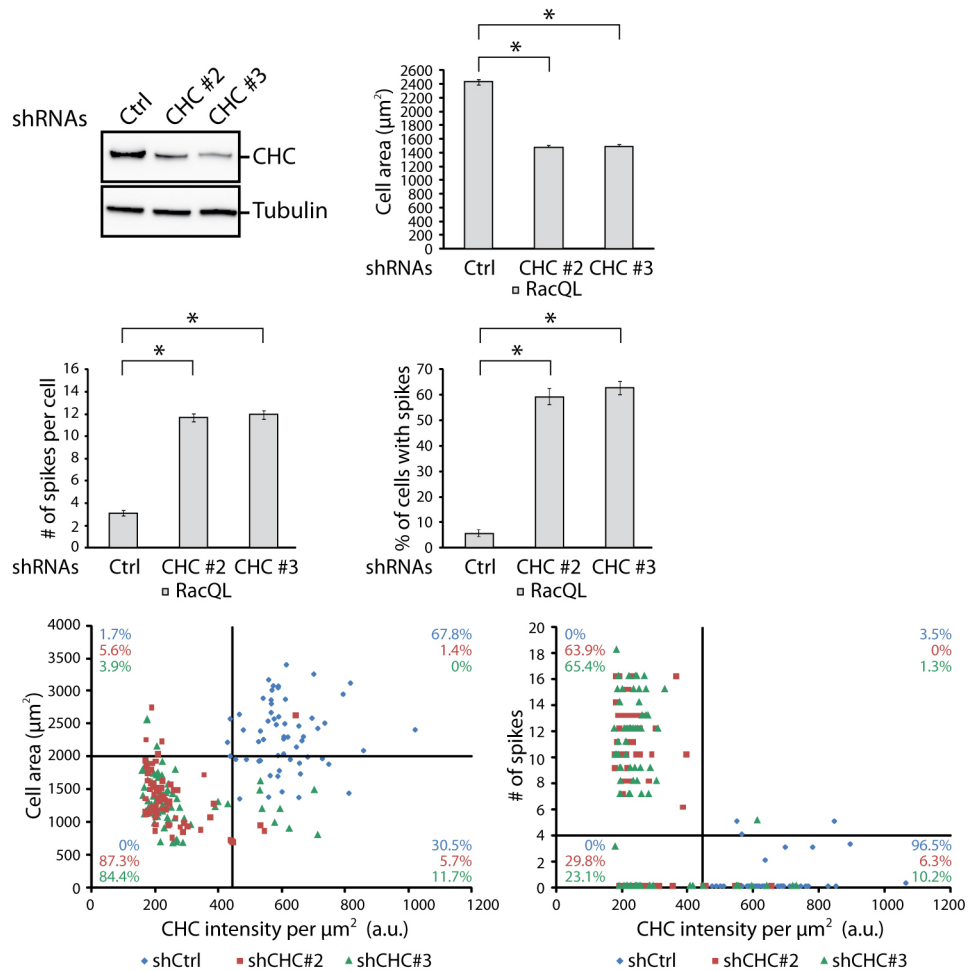
A**B**

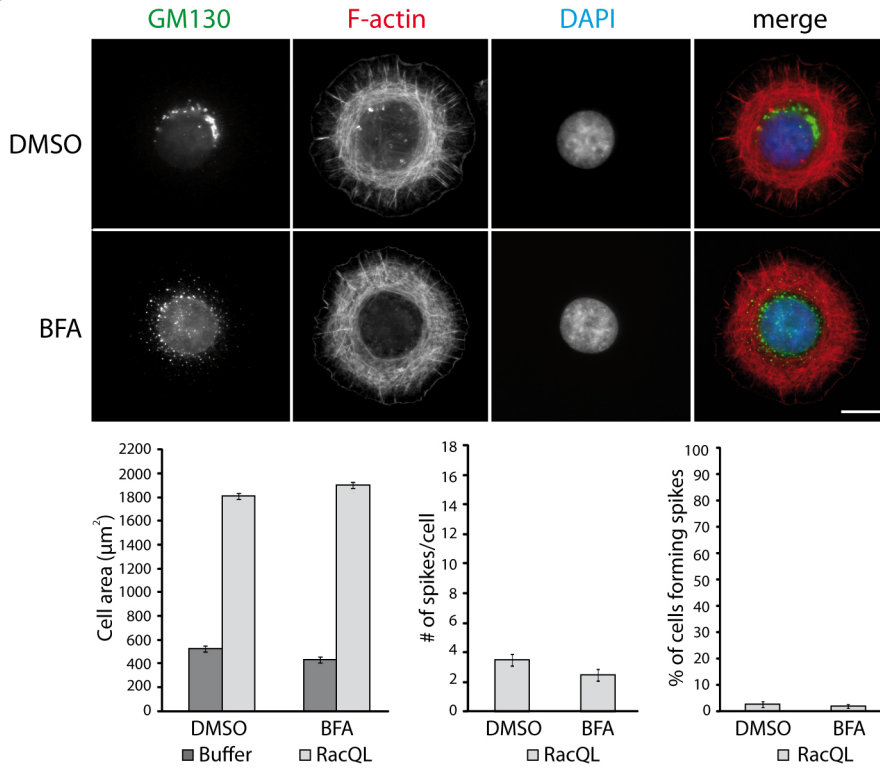
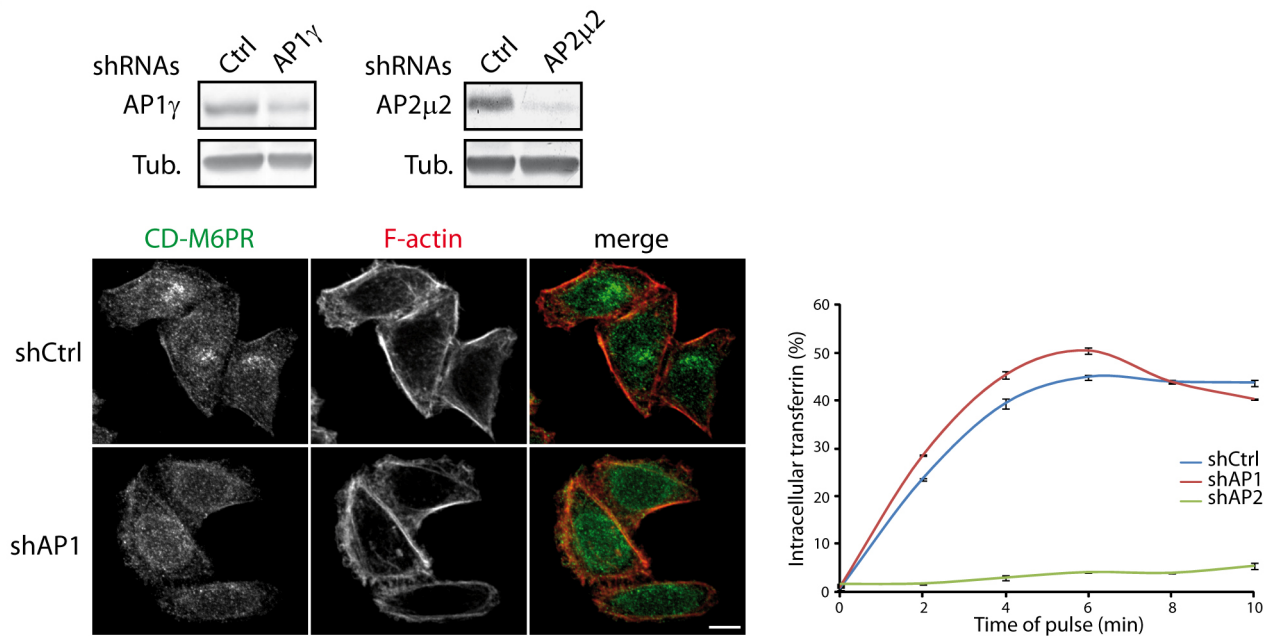
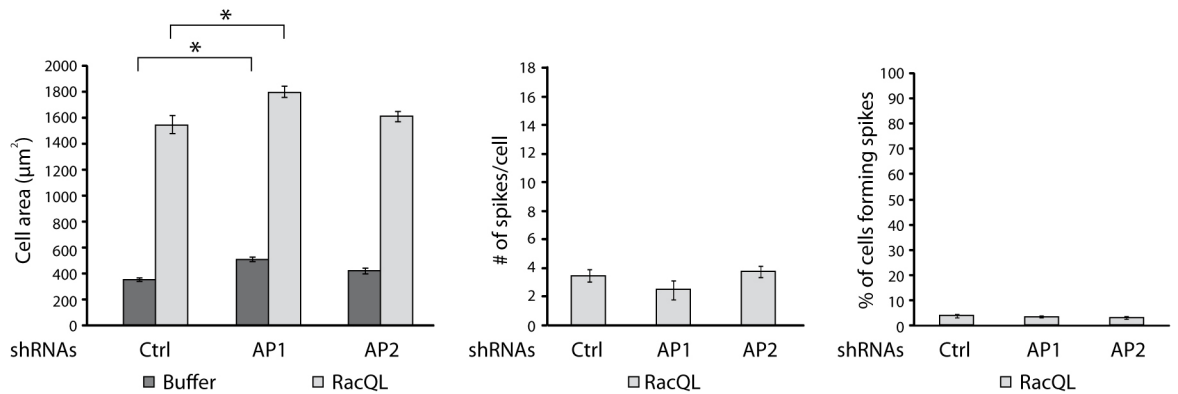
Novel genes producing the Scar phenotype upon RNAi mediated inactivation

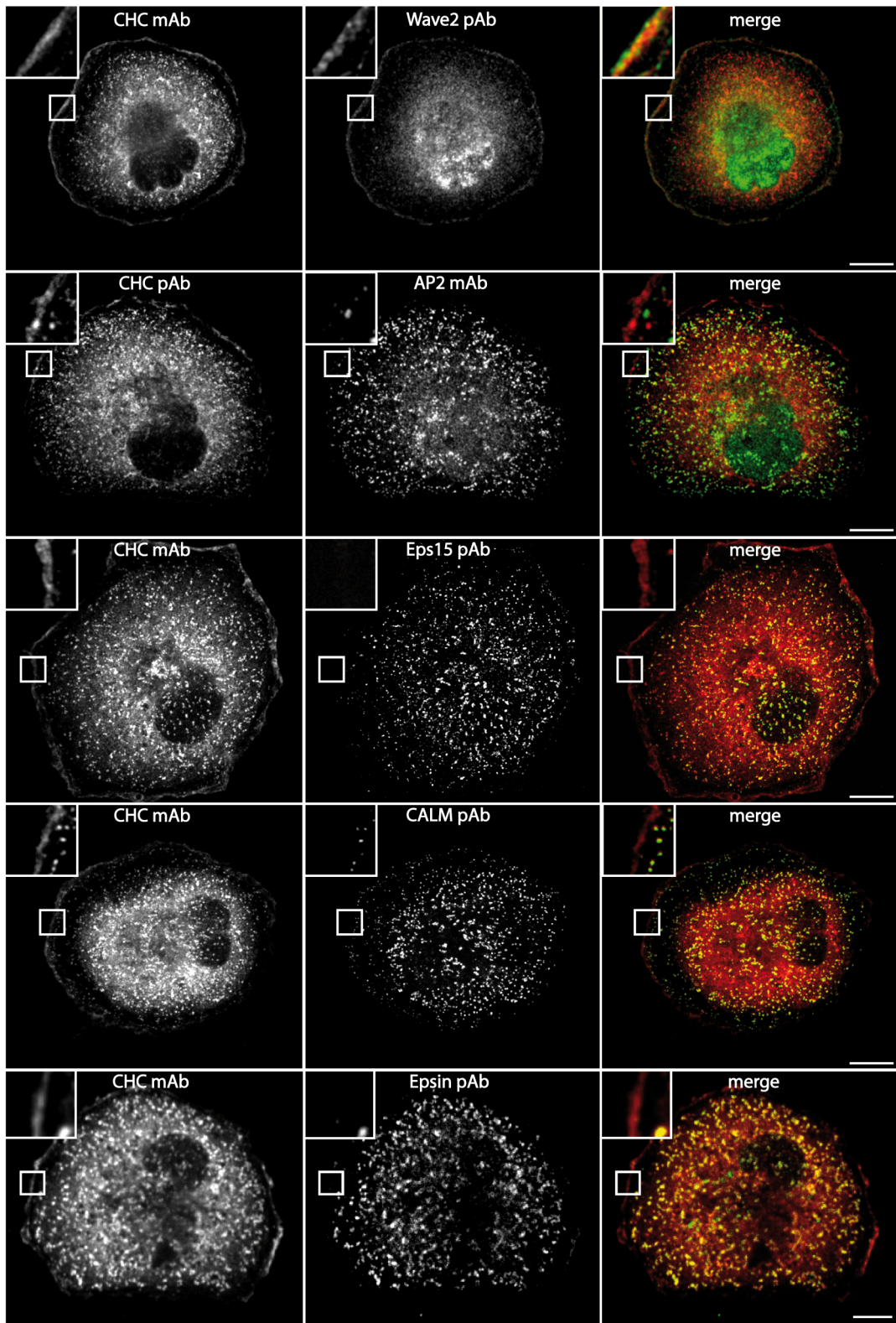
FlyBase #	CG #	Acronym	Name	Putative activity or function
FBgn0010333	CG2248	Rac1		Lamellipodium formation
FBgn0014011	CG8556	Rac2		Lamellipodium formation
FBgn0010341	CG12530	Cdc42		Cell polarity
FBgn0031437	CG9881	p16-ARC	Arp2/3 complex subunit 16 kDa	Arp2/3 complex subunit 16 kDa
FBgn0011742	CG9901	Arp14D	Actin related protein 14D	Arp2/3 complex subunit Arp2
FBgn0011744	CG7558	Arp66B	Actin related protein 66B	Arp2/3 complex subunit Arp3
FBgn0001961	CG8978	Sop2	Suppressor of profilin 2	Arp2/3 complex subunit 41 kDa
FBgn0052138	CG32138	FMN2		Formin
FBgn0016984	CG9985	sktl	skittles	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase
FBgn0024196	CG10751	robl	Roadblock	Dynein Light Chain
FBgn0000319	CG9012	Chc	Clathrin Heavy Chain	Vesicular coat component
FBgn0086899	CG34412	tlk	Tousled-like kinase	Serine threonine protein kinase
FBgn0030205	CG17255	nocte	No circadian temperature entrainment	Circadian clock
FBgn0033926	CG12505	Arc1	Activity-regulated cytoskeleton associated protein 1	Response to starvation
FBgn0038350	CG18516			Oxidoreductase
FBgn0039754	CG9747			Fatty acid desaturase
FBgn0031866	CG13772	neuroigin		Neurexin binding
FBgn0023423	CG3412	slmb	Supernumerary limbs	SCF ubiquitin ligase complex
FBgn0015509	CG1877	lin19	lin19 like	SCF ubiquitin ligase complex
FBgn0035136	CG6905	Roc1b		SCF ubiquitin ligase complex
FBgn0002183	CG1828	dre4		Regulation of chromatin assembly
FBgn0000212	CG5942	brm	Brahma	Brahma complex
FBgn0023395	CG9594	Chd3		DNA helicase
FBgn0003345	CG8544	sd	scalloped	Transcription factor
FBgn0028982	CG12225	Spt6		Transcription factor
FBgn0032512	CG9305			Transcription factor
FBgn0003415	CG9936	skd	skuld	Transcription mediator complex
FBgn0005411	CG9998	U2af50	U2 small nuclear riboprotein auxiliary factor 50	Nuclear mRNA splicing
FBgn0020497	CG13387	emb	embargoed	Nuclear export
FBgn0004838	CG10377	Hrb27C	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein 27C	Nuclear mRNA splicing/RNA binding
FBgn0036467	CG12310			
FBgn0031249	CG11911			
FBgn0026879	CG13364			
FBgn0039832	CG15563			
FBgn0036454	CG17839			

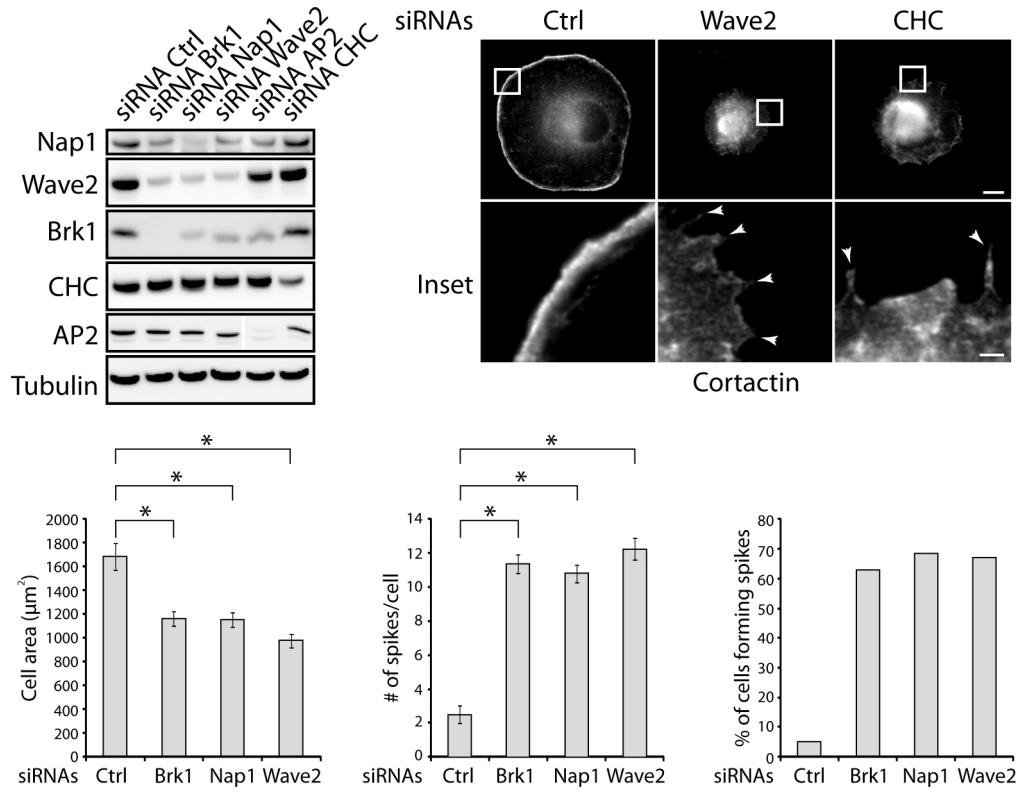
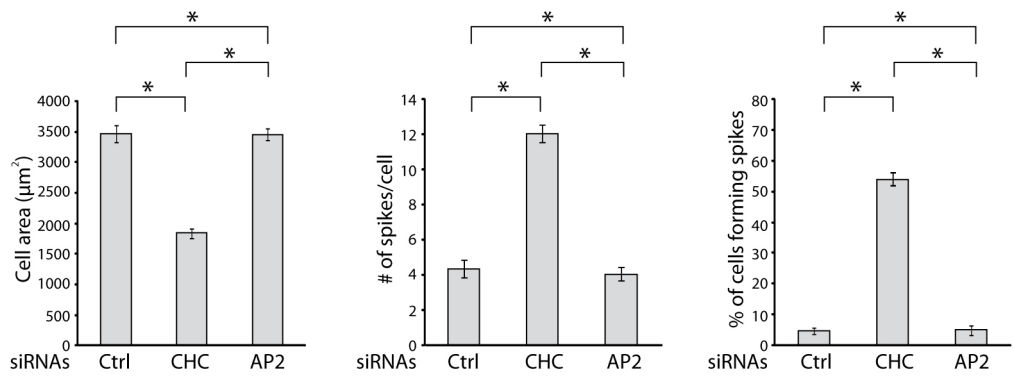
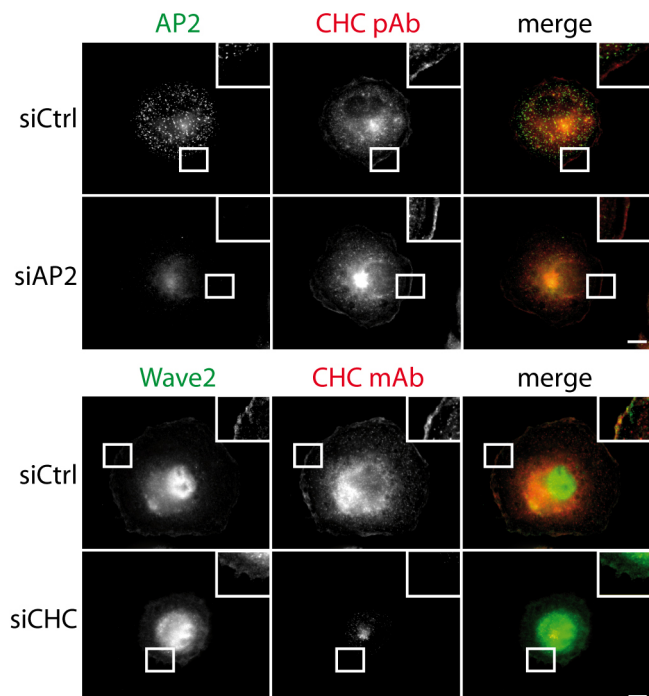
C**D**

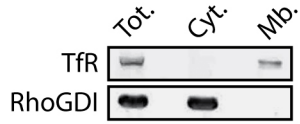
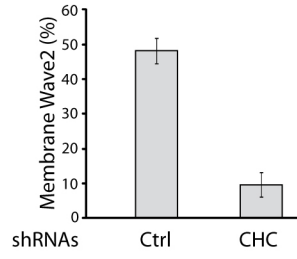
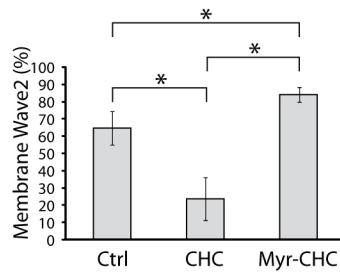
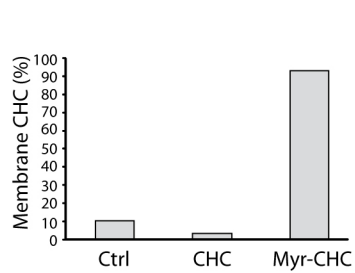
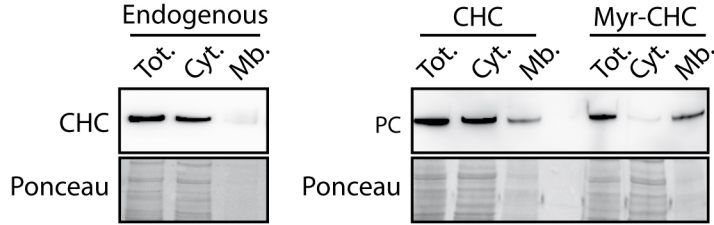
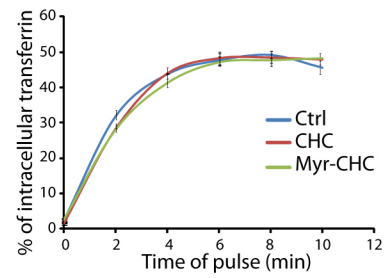
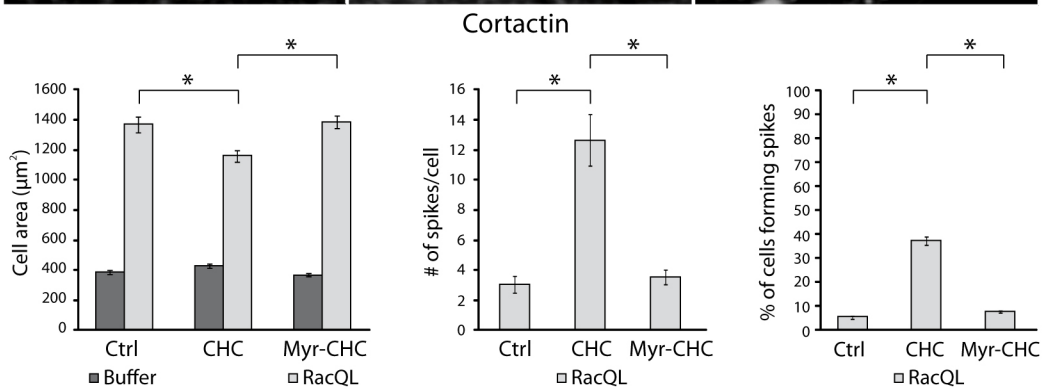
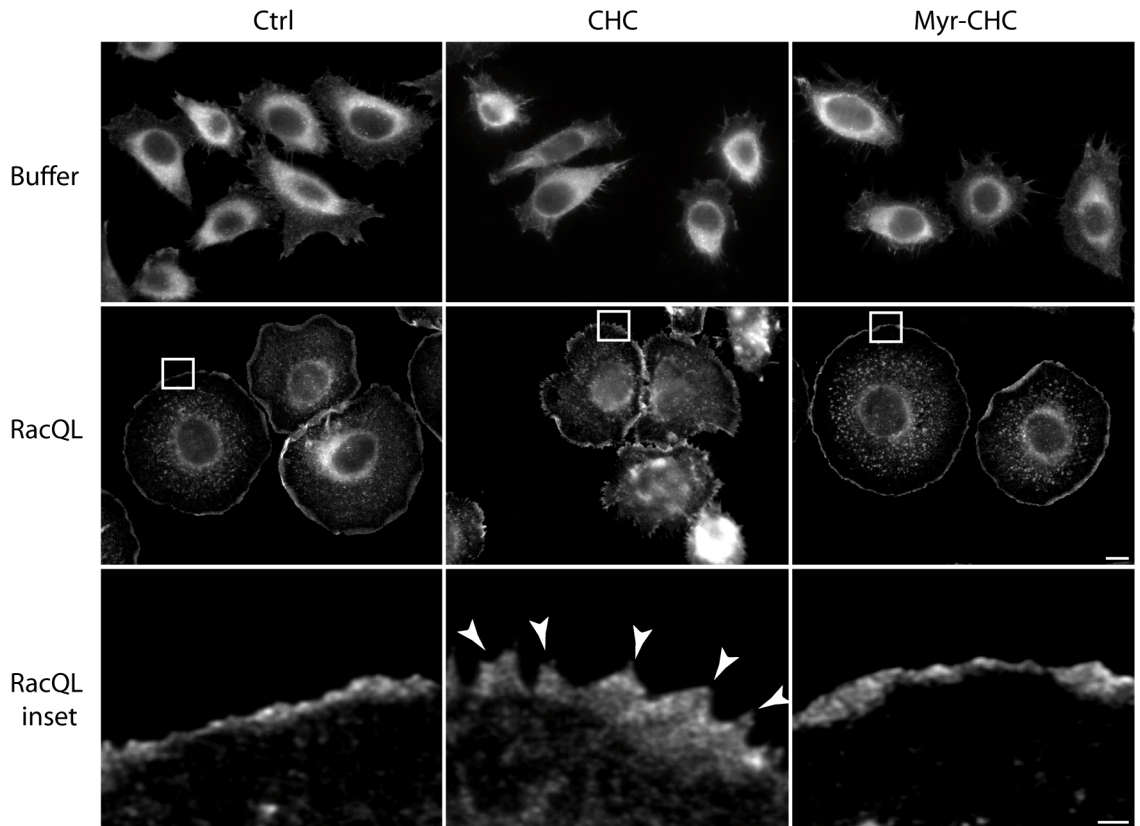


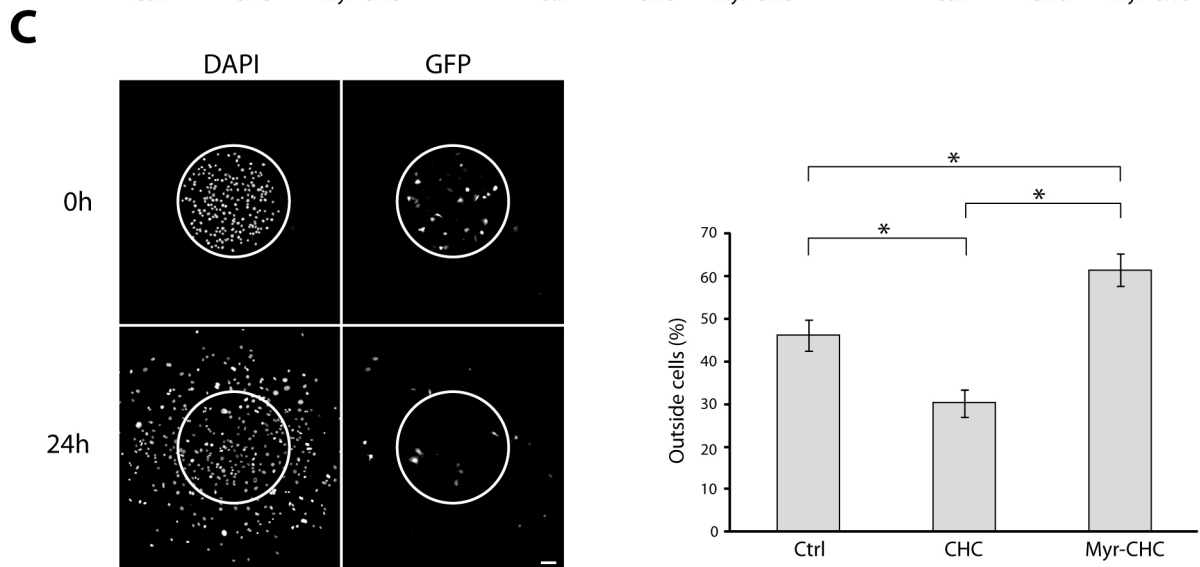
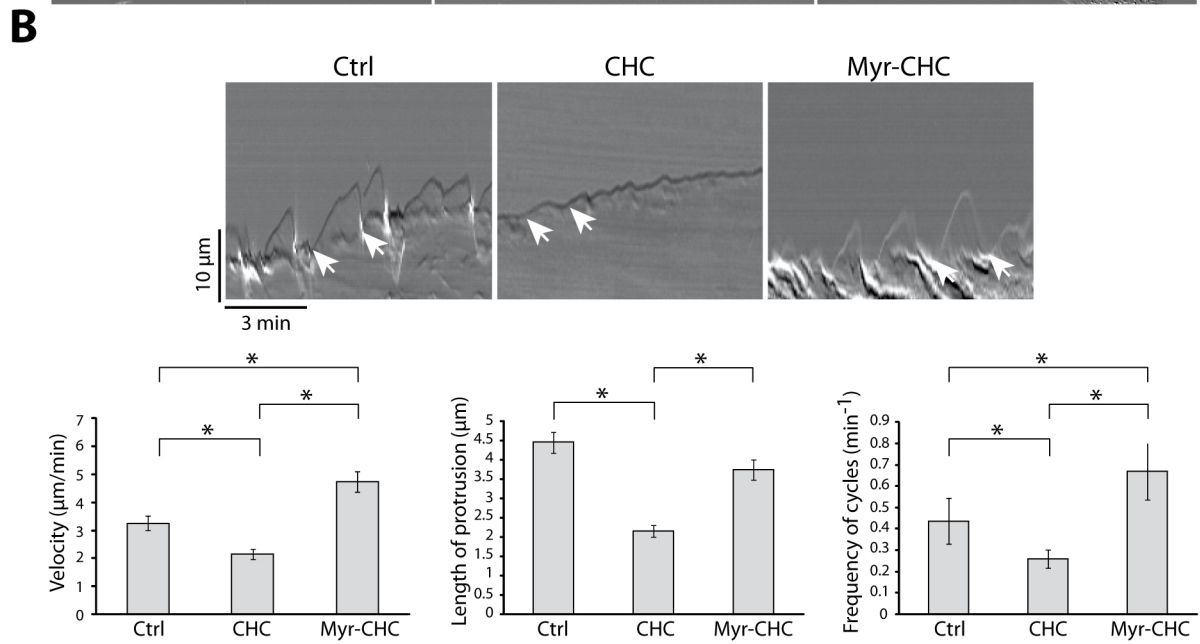
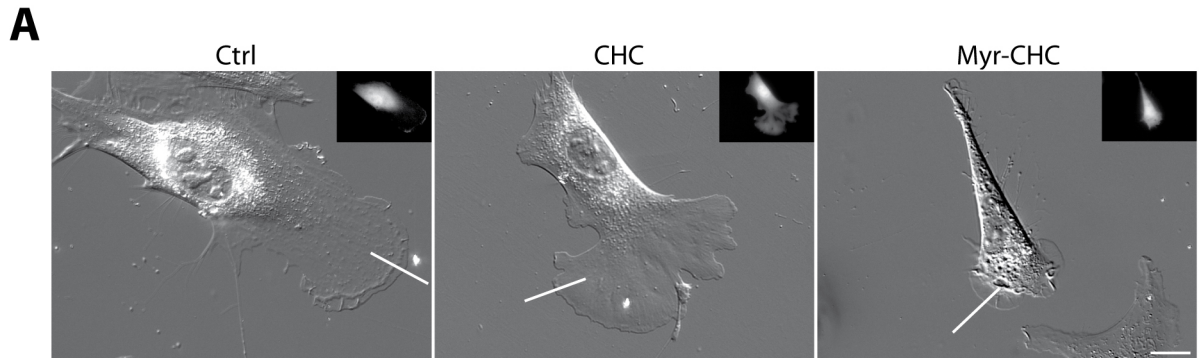
A**B****C**

A**B****C**



A**B****C**

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



SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1. Spreading of HeLa cells upon electroporation of active Rac is associated with the development of lamellipodia and radial focal adhesions. HeLa cells electroporated with Rac1Q61L were stained using indicated antibodies. Wave2 punctae can be detected along the lamellipodium revealed by cortactin staining. The Wave2 complex plays an important role in lamellipodium formation in this system (Fig.2C), even though its enrichment in lamellipodia is not pronounced and the staining discontinuous. Staining of VASP or paxillin reveals focal adhesions associated with spreading. VASP also stains lamellipodia. Bars: 10 μ m.

Figure S2.

(A) Meningioma cells were spread on fibronectin-coated coverslips, fixed and stained with cortactin, a marker of branched actin networks, and RhoGDI, a nuclear and cytosolic protein. The enrichment of cortactin at the plasma membrane observed by epifluorescence is not due to the increased thickness of peripheral ruffles, since immunofluorescence of the soluble RhoGDI hardly stain the periphery of the cell, even when the signal is increased artificially (explaining the saturation of the nuclear staining).

(B, C, D) Meningioma cells were depleted of Wave2, Brk1 or CHC using transfection of siRNAs. Depleted meningioma cells were spread on fibronectin-coated coverslips to induce lamellipodia and observed by epifluorescence. Upon depletion of either of these proteins lamellipodia are impaired. The specificity of Wave2 and Brk1 antibodies is confirmed by the absence of plasma membrane staining when the SWC is depleted (B and C). The specificity of both CHC antibodies is confirmed by the absence of plasma membrane staining when CHC is depleted (D). Bars: 10 μ m

Figure S3.

Meningioma cells were depleted of AP2 using transfection of siRNA. Depleted meningioma cells were spread on fibronectin-coated coverslips to induce lamellipodia, fixed and stained with CHC and AP2. Upon AP2 depletion, meningioma cells lose most clathrin-coated pits, but not the peripheral pool of clathrin. These images were acquired by TIRF microscopy, alleviating concerns about increased thickness of the peripheral region due to ruffling.

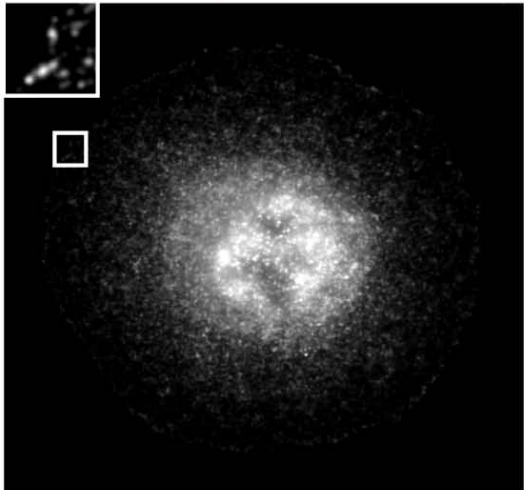
Figure S4.

(A) A representative western blot used to quantify the membrane pool of Wave2 upon depletion of CHC.

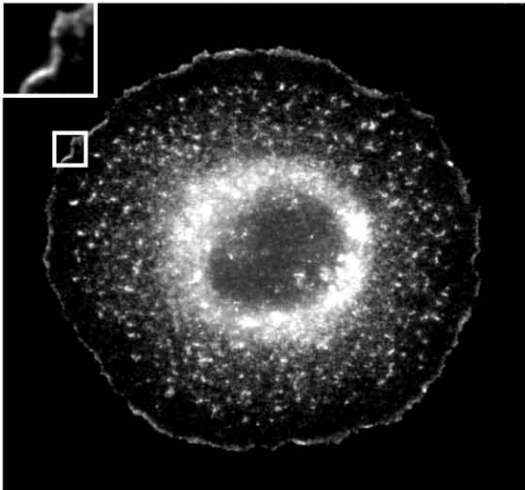
The % of Wave2 in the membrane fraction in Fig. 7 was calculated using the amount remaining in the cytosol after membrane pelleting, because the signal in the membrane fraction does not give a reliable view of membrane amounts, as illustrated here. Upon CHC depletion, the cytosolic pool represents almost the total pool, whereas it is only half in control cells. However, the membrane fraction displayed a higher amount of Wave2 in CHC depleted cells than in control cells. The reason why Wave2 levels in the membrane fraction varied erratically is that the tight membrane pellet is never completely resuspended, even in boiling SDS. Nevertheless, consistent results were obtained when the membrane pool of Wave2 was calculated by densitometry from what was left in the cytosolic fraction after membrane pelleting.

(B) A representative western blot used to quantify the membrane pool of Wave2 upon overexpression of CHC or of Myr-CHC. Quantification was performed using the cytosolic pool, as described in part A.

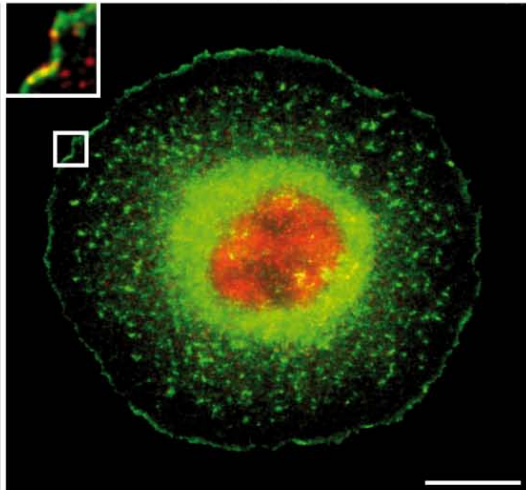
Wave2



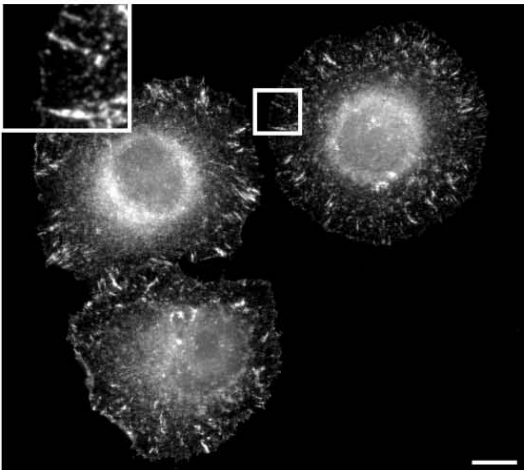
Cortactin



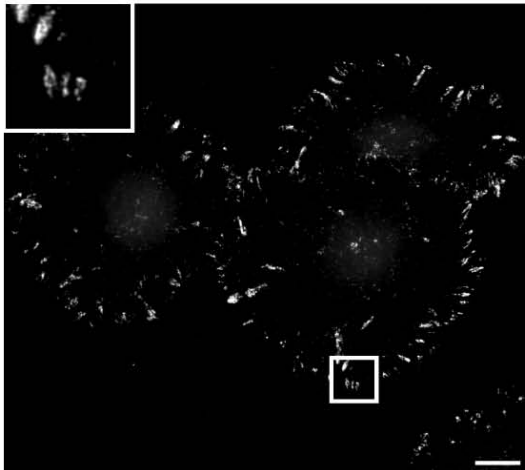
merge

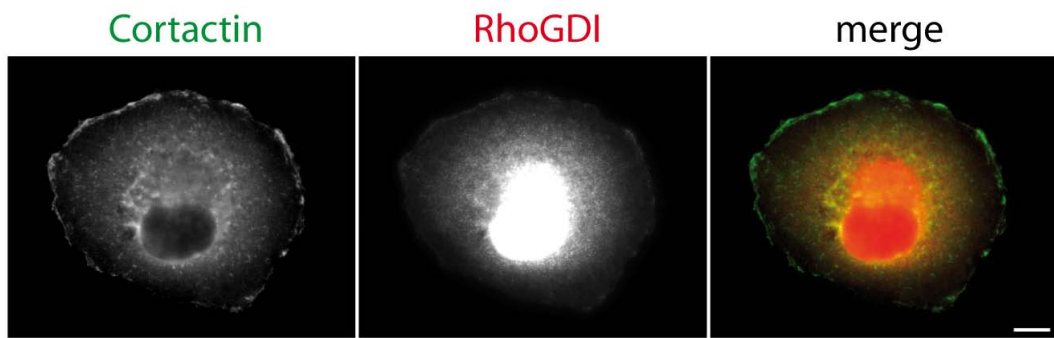
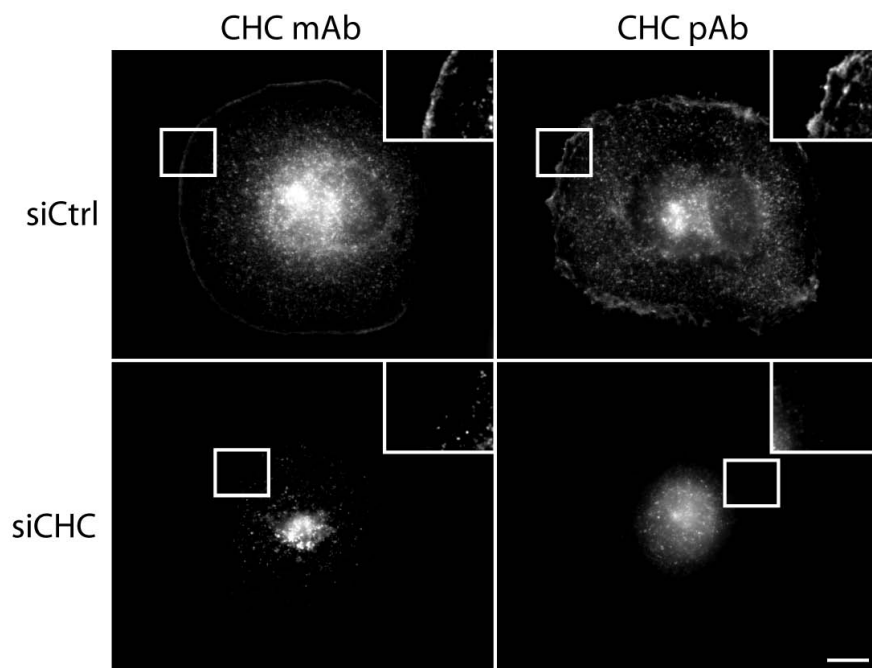


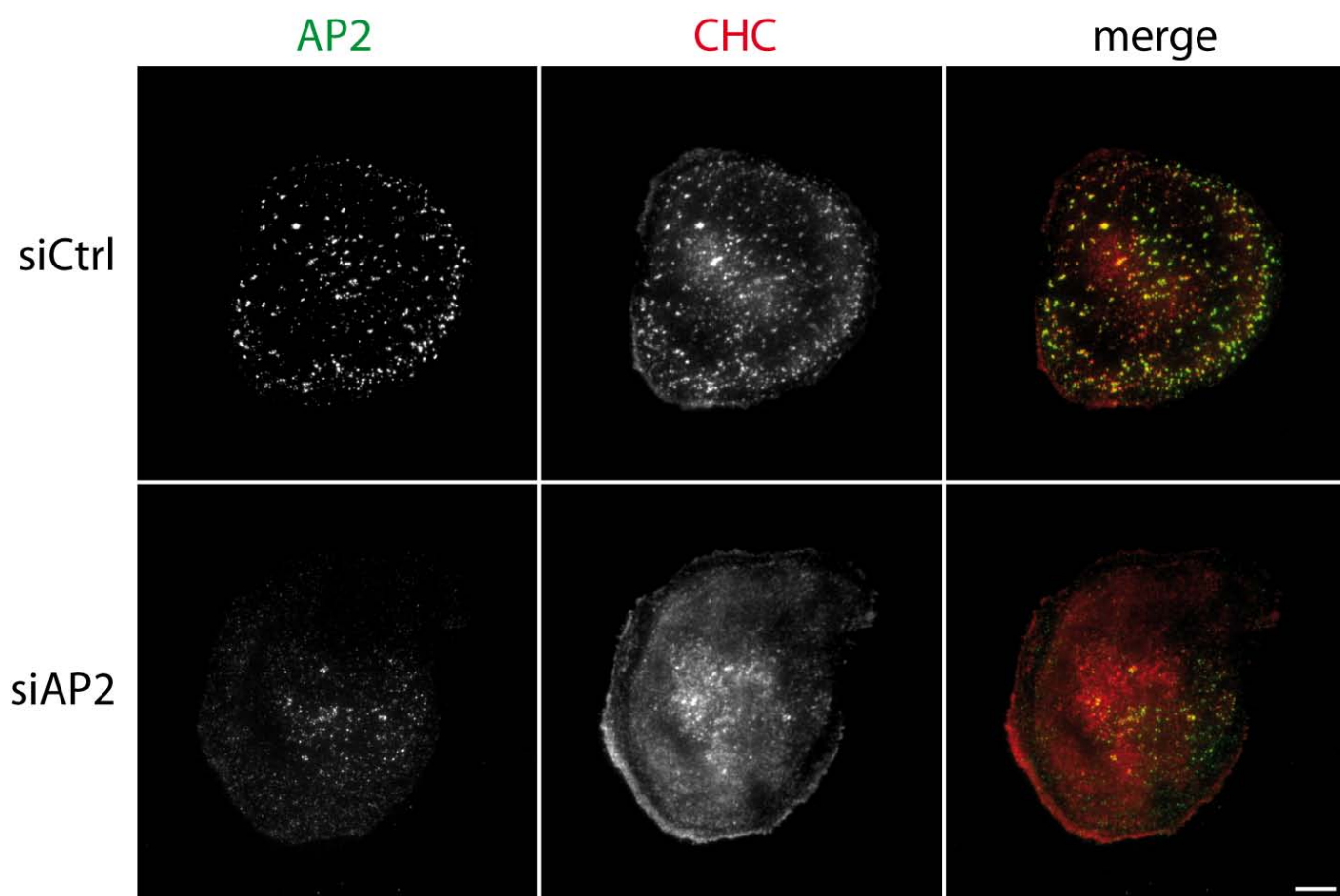
VASP

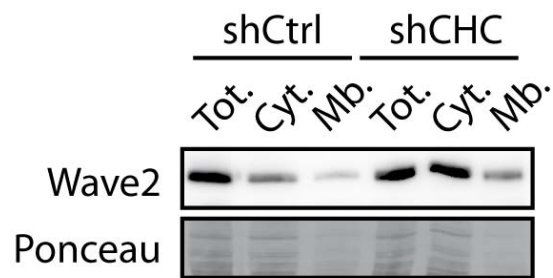
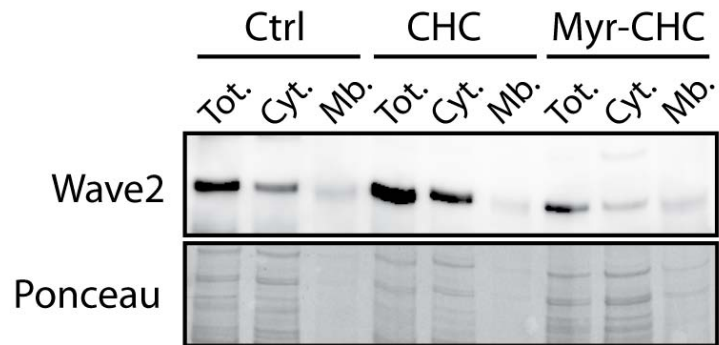


Paxillin



A**B**



A**B**

Troisième partie

Discussion

4.1 Les différents rôles atypiques de la clathrine

Le double crible réalisé en cellules de *Drosophila* a permis l'identification inattendue de la clathrine comme une protéine contrôlant la formation des lamellipodes et la migration cellulaire. De plus, notre travail suggère que ce nouveau rôle de la clathrine est indépendant de son rôle classique dans le transport vésiculaire. Ce rôle surprenant de la clathrine n'est pas un cas isolé. En effet, depuis plusieurs années, des fonctions atypiques de la clathrine ont émergé dans des fonctions cellulaires éloignées du transport vésiculaire telles que la mitose ou encore la régulation de la transcription des gènes.

4.1.1 Rôle de la clathrine dans la mitose

4.1.1.1 La clathrine est localisée au fuseau mitotique

Les premiers indices suggérant un rôle de la clathrine dans la mitose proviennent de travaux datant du milieu des années 1980, où la clathrine fut localisée au niveau du fuseau mitotique dans des cellules embryonnaires murines en développement [Maro et al., 1985]. Cette localisation de la clathrine fut confirmée 15 années plus tard par Okamoto *et al.* grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux différents [Okamoto et al., 2000] (Figure 4.1). Peu après la publication de ce travail, deux études différentes ont également identifié la clathrine comme une protéine localisée au fuseau mitotique. Dans la première étude, un crible de localisation subcellulaire a été réalisé en fusionnant une banque d'ADN complémentaire avec une étiquette rapportrice [Sutherland et al., 2001]. Dans la deuxième étude, la clathrine fut identifiée par spectrométrie de masse comme une protéine associée au fuseau mitotique [Mack and Compton, 2001]. Toutes ces études suggéraient un rôle de la clathrine dans la mitose, mais il a fallu attendre quelques années supplémentaires pour comprendre le rôle joué par la clathrine.

4.1.1.2 La clathrine stabilise les microtubules kinétochoriens

En effet, Royle *et al.* ont montré que la clathrine était requise pour la fonction du fuseau mitotique et plus précisément pour la stabilité des microtubules kinétochoriens [Royle et al., 2005]. Les microtubules kinétochoriens forment un faisceau ou « fibre kinétochorienne » de plusieurs microtubules qui permet de connecter chaque chromosome aux pôles opposés du fuseau. Des

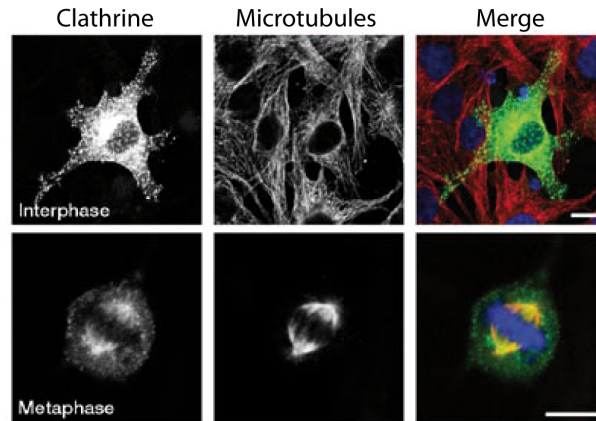


FIGURE 4.1 – La clathrine est présente dans le fuseau mitotique

Modifié de [Royle et al., 2005]. Images confocales montrant la distribution subcellulaire de la clathrine au cours de l'interphase et de la métaphase. La clathrine est marquée en vert (GPF-LCa), la tubuline est en rouge et les acides nucléiques en bleu. La barre d'échelle représente 10 μm .

travaux du même groupe ont ensuite montré que le domaine N-terminal de la clathrine, le domaine globulaire, et le domaine de trimérisation, le domaine C-terminal, étaient essentiels à la localisation et à la fonction de la clathrine au fuseau mitotique [Royle et al., 2005, Royle and Lagnado, 2006]. Ces résultats indiquent que la stabilisation des microtubules kinétochoriens est dépendante de la structure de la clathrine en triskelion.

Afin d'expliquer le rôle de la clathrine dans la stabilisation des microtubules kinétochoriens, l'hypothèse d'un pontage de ces microtubules via le triskelion a été proposée [Royle et al., 2005, Royle and Lagnado, 2006]. Dans cette hypothèse, le domaine N-terminal de la clathrine interagit avec les microtubules, et le domaine de trimérisation s'associe à plusieurs microtubules kinétochoriens. En accord avec cette hypothèse, une étude récente montre que les microtubules kinétochoriens de cellules déplétées en clathrine ne sont pas pontés et que les fibres kinétochoriennes sont constitués de moins de microtubules [Lin et al., 2010] (Figure 4.2). En conséquence, la déplétion de la clathrine empêche un alignement correct des chromosomes sur la plaque métaphasique. Un travail plus récent utilisant la microscopie électronique est venu confirmer l'hypothèse du pontage des microtubules kinétochoriens par la clathrine [Booth et al., 2011]. Les défauts observés dans les cellules déplétées en clathrine prolongent la mitose, à cause de la signalisation continue du point de contrôle du fuseau mitotique. De manière importante, ce rôle de la clathrine dans la stabilisation du fuseau semble indépendant de son rôle classique dans le transport vésicu-

laire puisqu'aucun adaptateur de la clathrine, ni aucune membrane n'est associé au fuseau mitotique [Royle et al., 2005].

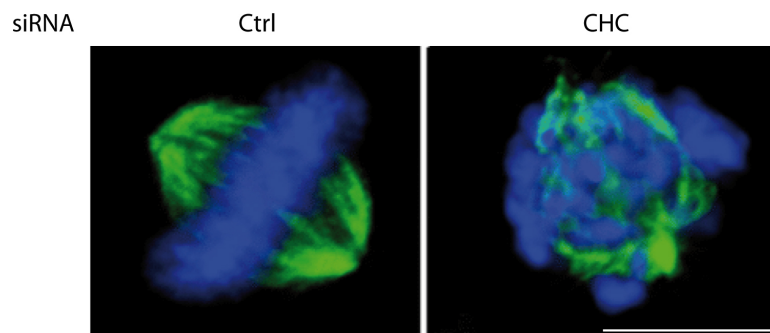


FIGURE 4.2 – La clathrine stabilise le fuseau mitotique

Modifié de [Lin et al., 2010]. Des cellules HeLa ont été transfectées par un siRNA contrôle ou un siRNA ciblant la chaîne lourde de la clathrine. Des images de ces cellules en métaphase sont montrées. Les microtubules sont marqués en vert et les acides nucléiques sont en bleu. Le fuseau est normal dans la cellule contrôle et anormal dans la cellule déplétée pour la clathrine. La barre d'échelle représente 10 μm .

4.1.1.3 Comment la clathrine interagit avec les microtubules ?

Comment la clathrine s'associe-t-elle au fuseau mitotique ? Deux hypothèses simples sont à envisager : soit elle interagit de manière directe avec les microtubules comme initialement suggéré par [Royle et al., 2005, Royle and Lagnado, 2006], soit de manière indirecte par l'intermédiaire d'adaptateurs interagissant directement avec les microtubules. Comme l'interaction directe de la clathrine avec les microtubules n'a jamais été montrée (voir par exemple [Booth et al., 2011]), des protéines adaptrices ont été proposées telles que B-Myb [Yamauchi et al., 2008] et GAK (Cyclin-G associated kinase) [Shimizu et al., 2009, Tanenbaum et al., 2010]. B-Myb est un facteur de transcription, purifié en complexe avec la clathrine et la filamine, nécessaire à la localisation de la clathrine au fuseau mitotique [Yamauchi et al., 2008]. GAK est une protéine impliquée dans le recyclage des vésicules d'endocytose qui contrôle la localisation de la clathrine au fuseau [Tanenbaum et al., 2010]. Bien que les protéines B-Myb et GAK semblent jouer un rôle dans la localisation de la clathrine au fuseau, elles ne font pas partie de la liste de protéines associées au fuseau mitotique identifiées par spectrométrie de masse [Sauer et al., 2005]. L'association de la clathrine au fuseau requiert donc l'intervention d'autres facteurs additionnels.

Une étude récente a permis l'identification de ces facteurs [Booth et al., 2011]. En effet, Booth *et al.* ont purifié un complexe à partir du fuseau mitotique, contenant la clathrine, TACC3 (transforming acidic coiled-coil protein 3) et ch-TOG (colonic, hepatic tumour overexpressed gene), deux protéines connues pour interagir avec les microtubules [Fu et al., 2010]. Des expériences de déplétion par ARN interférence et de surexpression montrent que TACC3 interagit tout d'abord avec les microtubules, que ch-TOG s'associe ensuite à TACC3 et enfin, que la clathrine s'associe à TACC3 et ch-TOG [Booth et al., 2011]. TACC3 et ch-TOG sont donc responsables de la localisation de la clathrine au fuseau. Les rôles de B-Myb et de GAK restent donc à éclaircir.

La phosphorylation de TACC3 par la kinase Aurora-A [Kinoshita et al., 2005, LeRoy et al., 2007] est requise pour l'interaction avec la clathrine [Fu et al., 2010]. Or, le facteur de transcription B-Myb est important pour la régulation de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et notamment celui de la kinase Aurora-A [Knight et al., 2009]. Il semble donc que B-Myb exerce son rôle sur la localisation de la clathrine au fuseau via la régulation de l'expression de cette kinase. La régulation de la localisation de la clathrine au fuseau par GAK n'est quant à elle pas encore bien comprise.

Cette fonction de la clathrine dans la stabilité du fuseau mitotique identifiée chez l'homme semble être robuste puisqu'elle est conservée chez des organismes proches de l'homme tels le rat [Royle et al., 2005], la souris [Yamauchi et al., 2008] mais aussi chez les plantes [Tahara et al., 2007].

4.1.2 Rôle de la clathrine dans la transcription contrôlée par p53

La clathrine est majoritairement localisée dans le cytosol, mais une faible quantité de celle-ci se trouve également dans le noyau [Enari et al., 2006]. Cette fraction nucléaire de la clathrine joue un rôle sur la transactivation des gènes contrôlés par le facteur de transcription p53. En effet, la déplétion de la clathrine par ARN interférence inhibe la transactivation des gènes contrôlés par p53 alors que sa surexpression augmente l'activité transcriptionnelle de p53 [Enari et al., 2006]. De plus, ces travaux montrent que la chaîne lourde de la clathrine se lie aux promoteurs reconnus par p53 *in vivo* et stabilise ainsi l'interaction entre p53 et p300. p300 est une protéine qui relâche et qui ouvre la chromatine grâce à son activité acétyltransférase sur les histones. Cette modification épigénétique permet de recruter la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur cible.

Des travaux plus récents du même groupe montrent que les domaines de trimérisation et d'interaction avec les chaînes légères, ne sont pas nécessaires pour l'activation de p53 [Ohmori et al., 2008]. Il semble donc que, contrairement à l'endocytose et à la mitose, l'oligomérisation de la clathrine ne soit pas requise pour l'activation de p53. La chaîne légère de la clathrine est même en compétition avec p53 pour l'interaction aux chaînes lourdes. De plus, ce même groupe a montré un rôle en retour de p53 sur le rôle classique de la clathrine dans l'endocytose [Endo et al., 2008].

4.1.3 La clathrine contrôle l'activation de NF- κ B

NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) est un facteur de transcription contrôlant la transcription de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques tels que l'immunité adaptative et la prolifération cellulaire [Bassères and Baldwin, 2006, Hayden et al., 2006]. Des travaux montrent que la chaîne lourde de la clathrine est requise pour empêcher la localisation nucléaire constitutive de NF- κ B et son activité [Kim et al., 2011]. L'abolition de l'endocytose par la déplétion du complexe AP2, montrent que ce nouveau rôle de la chaîne lourde de la clathrine est indépendant de son rôle dans le transport vésiculaire [Kim et al., 2011]. Ces résultats indiquent un lien potentiel entre un défaut d'expression de la clathrine et la prolifération cellulaire. Cependant, ce travail ne donne aucune indication quant au mécanisme par lequel la clathrine régule NF- κ B. On ne sait pas par exemple, si NF- κ B interagit directement avec la clathrine comme c'est le cas pour p53. Des études supplémentaires sont donc nécessaires pour valider ce rôle atypique de la clathrine.

Bien que les chaînes lourdes de la clathrine semblent contribuer différemment à la régulation des gènes par p53 et NF- κ B, ces données génèrent une seconde preuve supplémentaire du rôle de la clathrine dans la régulation des gènes.

4.1.4 La clathrine est impliquée dans divers cancers

Probablement en lien avec les résultats précédemment décrits, dans certains cancers, des fusions du gène de la clathrine avec celui de la kinase du lymphome anaplastique ou avec celui du facteur de transcription TFE3 ont été rapportées. Il est intéressant de noter que ces fusions ont lieu au niveau du domaine C-terminal de la clathrine [Bridge et al., 2001, Argani et al., 2003]. Or, certains des travaux décrits précédemment, montrent que le facteur de transcription

p53 s'associe à la clathrine par l'intermédiaire de ce domaine C-terminal. Ces fusions de gènes pourraient donc altérer la fonction de p53 dans la transcription et donc la prolifération cellulaire.

4.1.5 La clathrine contrôle la formation des lamellipodes

Le but de mon travail de thèse était d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans l'activation du complexe WAVE. Notre étude a permis l'identification de la chaîne lourde de la clathrine. De manière similaire au rôle de la clathrine dans le contrôle de la transcription qui dépend de p53, rapporté par Enari *et al.* [Enari et al., 2006], ce rôle de la clathrine est indépendant des chaînes légères. Toutefois, nous ne sommes pas les premiers à avoir rapporté cette interaction entre le complexe WAVE et la clathrine.

En effet, les premiers indices suggérant un dialogue entre la clathrine et le complexe WAVE proviennent d'expériences de protéomique réalisées par le groupe de Bernard Hoflack. Dans ces expériences, des liposomes recouverts du complexe adaptateur AP1 sont incubés avec des extraits de cerveaux [Baust et al., 2006]. L'analyse par spectrométrie de masse des protéines associées aux liposomes a permis d'identifier la clathrine et des membres de la machinerie de polymérisation de l'actine tels le complexe Arp2/3 et le complexe WAVE. Un travail plus récent du même groupe a confirmé l'interaction moléculaire entre la clathrine et la sous-unité Sra1 du complexe WAVE [Anitei et al., 2010].

Ce travail rapporte une localisation de la clathrine et de Sra1 au niveau du réseau trans-Golgien et montre que le recrutement de Sra1 et de la clathrine au réseau trans-Golgien est régulé par la GTPase Arf1 [Anitei et al., 2010]. Ce travail montre que Sra1, N-WASP, Rac1 et son facteur d'échange β -PIX, sont impliqués dans la biogenèse de transporteurs mantelés par la clathrine au niveau du réseau trans-Golgien. La nucléation de l'actine au réseau trans-Golgien serait régulée par Sra1, Rac1 et WASP ou N-WASP, mais pas par WAVE. Ce résultat est surprenant puisque la sous-unité Sra1 fait partie du complexe WAVE [Gautreau et al., 2004]. Cependant, l'existence d'un complexe alternatif constitué de la sous-unité Abi et de la protéine N-WASP a été rapporté mais n'a jamais été purifié. Il s'agit très probablement d'un complexe transitoire.

Au delà de la composition du complexe, le rôle de certaines sous-unités du complexe WAVE est inattendu, puisque le complexe WAVE a toujours été impliqué dans la formation du lamellipode à l'exception d'un autre rôle rapporté dans la division assymétrique du Golgi chez la *Drosophile* [Kondylis

et al., 2007]. En revanche, le rôle rapporté par Anitei *et al.* pour la clathrine n'est pas atypique, puisque la clathrine est connue pour être impliquée dans la biogenèse des transporteurs à partir du Golgi.

Contrairement au travail du groupe de Bernard Hoflack [Anitei et al., 2010], la fonction atypique de la clathrine dans la formation des lamellipodes que nous décrivons ici semble être indépendante de son rôle classique dans le transport vésiculaire. Tout d'abord, la déplétion des protéines adaptrices AP1 et AP2 inhibent le transport vésiculaire sans empêcher la formation des lamellipodes. Ensuite, la surexpression de la clathrine affecte la formation des lamellipodes mais pas le transport. Puis, la clathrine est détectée aux lamellipodes avec le complexe WAVE mais sans les protéines adaptrices et sans les protéines accessoires de l'endocytose. Enfin, la déplétion du complexe AP2, complexe majeur de recrutement de la clathrine à la membrane plasmique, n'affecte pas la localisation de la clathrine au lamellipode. Il semble donc que la clathrine présente aux lamellipodes, ne soit pas impliquée dans l'endocytose.

Nous montrons également que la clathrine régule la formation des lamellipodes en contrôlant le recrutement du complexe WAVE à la membrane plasmique. En effet, la déplétion de la clathrine diminue le niveau du complexe WAVE dans la fraction membranaire. De plus, l'envoi artificiel de la clathrine à la membrane plasmique s'accompagne d'une augmentation du niveau du complexe WAVE dans la fraction membranaire et d'une augmentation de la vitesse des lamellipodes. La surexpression de la clathrine entraîne aussi, comme sa déplétion, un défaut de recrutement du complexe WAVE qui se traduit par une inhibition de la formation des lamellipodes et de la migration cellulaire. Pour expliquer cet effet dominant négatif, on peut imaginer que la clathrine possède un récepteur à la membrane plasmique, et que, dans des conditions normales, la clathrine associée au complexe WAVE interagit avec ce récepteur permettant alors au complexe WAVE d'être activé à la membrane. Lorsque la clathrine est surexprimée, la clathrine pourrait interagir avec le récepteur présent à la membrane et avec le complexe WAVE cytosolique de manière indépendante, cassant ainsi le complexe ternaire. Il y aurait donc moins de complexes WAVE à la membrane ce qui altère la formation des lamellipodes.

Enfin, contrairement au travail rapporté par Anitei et ses collègues, le rôle que nous décrivons implique la clathrine et le complexe WAVE natif constitué de ces 5 sous-unités tel qu'il est caractérisé.

Les deux fonctions associant le complexe WAVE et la clathrine, génération de transporteurs à partir du réseau trans-Golgien et formation des lamellipodes en particulier, apparaissent donc clairement différentes mais pas incompatibles.

Nous avons trouvé un effet potentialisateur de la déplétion d'AP1 sur l'augmentation de l'étalement des cellules qui dépend du complexe WAVE.

4.2 Rôle de la tension membranaire

Le rôle de la clathrine dans la formation des lamellipodes et dans la migration cellulaire est surprenant car la clathrine est avant tout impliquée dans l'endocytose. Or, les protrusions de la membrane plasmique générées par la polymérisation de l'actine et la récupération de la membrane par l'endocytose apparaissent comme deux mécanismes antagonistes. En effet, de nombreux travaux rapportent l'existence d'un paramètre physique commun à la formation des lamellipodes et à l'endocytose : la tension membranaire.

4.2.1 Définition de la tension membranaire

La tension membranaire à laquelle nous nous référerons dans cette section est issue de la somme de la tension proprement dite de la membrane et de la force d'adhérence de la membrane plasmique au cytosquelette d'actine cortical [Sheetz et al., 2006]. La force d'adhérence du cytosquelette à la membrane plasmique de la cellule peut être calculée en utilisant un système de pinces optiques (Figure 4.3). C'est la force qu'il faut exercer pour casser ce lien. Dans cette même expérience, on peut également déterminer la tension intrinsèque de la membrane en tirant sur un nanotube puis en mesurant le déplacement de la bille.

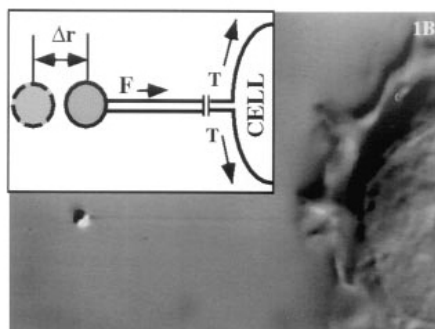


FIGURE 4.3 – Mesure de la force d'adhérence

Modifié de [Dai et al., 1997]. Mesure de la tension membranaire d'une cellule RBL par un système de pinces optiques. Dans le schéma, T représente la tension intrinsèque de la membrane, la force (T) permettant de tirer sur la membrane peut être calculée à partir du déplacement de la bille Δr dans la pince optique.

L'endocytose, la formation des lamellipodes et la réparation de la membrane nécessite une tension membranaire réduite alors que l'exocytose nécessite une tension membranaire élevée. La tension membranaire fournit donc un mécanisme physique simple permettant à la cellule d'assurer l'homéostasie membranaire.

4.2.2 La tension membranaire contrôle l'endocytose

Pour que l'endocytose ait lieu, la machinerie endocytique doit générer une force suffisante pour invaginer la membrane et former une vésicule. Si la résistance de la membrane plasmique est plus forte que la force exercée par la machinerie endocytique, l'invagination de la membrane ne se déroule pas, les puits ne bourgeonnent pas, et l'endocytose n'a pas lieu [Sheetz, 2001].

Dans les cellules de mammifères, l'entrée en mitose s'accompagne d'une inhibition de l'endocytose [Warren, 1993]. Des expériences d'addition sur des cellules en mitose, de composés amphiphiles tels que le déoxycholate, un détergent, à très faible concentration, diminue la tension membranaire et stimule l'endocytose à un niveau comparable aux cellules en interphase [Raucher and Sheetz, 1999]. A l'inverse, lorsque la tension membranaire est augmentée dans des cellules en interphase en utilisant des conditions hypotoniques, l'endocytose est abolie [Dai et al., 1998]. Ces résultats indiquent que l'arrêt de l'endocytose lors de la mitose, n'est pas dû à une inhibition de l'appareil endocytique mais plutôt à une forte augmentation de la tension membranaire. Cette tension membranaire élevée empêche les premières étapes de l'endocytose de se dérouler c'est à dire l'interaction des protéines d'endocytose et la déformation mécanique de la membrane au cours de l'invagination. La tension membranaire est donc un régulateur important de l'endocytose, et la réduction de la tension membranaire est suffisante pour induire l'endocytose au cours de la mitose.

Lorsque les cellules sortent de la mitose, en fin de télophase, la tension membranaire chute et l'endocytose reprend [Raucher and Sheetz, 1999]. La tension membranaire peut donc expliquer la reprise du trafic membranaire en fin de mitose observée par Warren et ses collègues [Warren, 1993].

4.2.3 La tension membranaire contrôle la formation des lamellipodes

La formation des lamellipodes et la migration cellulaire requièrent une extension de la membrane plasmique associée à la polymérisation de l'actine.

Comme pour l'endocytose, l'extension de la membrane plasmique doit surmonter la résistance issue de la tension membranaire. Des travaux montrent que l'addition de composés amphiphiles, qui induit une diminution de la tension membranaire, provoque une augmentation de l'étalement des cellules et de la formation des lamellipodes [Raucher and Sheetz, 2000]. De plus, dans des expériences de motilité stimulées par le facteur de croissance PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), l'augmentation de l'extension de la membrane plasmique est associée à une diminution de la tension membranaire et de l'adhérence entre la membrane et le cytosquelette. Le phénomène d'extension de la membrane est donc, comme l'endocytose, inversement corrélé à la tension membranaire [Raucher and Sheetz, 2000].

Dans certaines conditions, une diminution de la tension membranaire entraîne la formation de structures dépourvues de cytosquelette d'actine appelées blebs [Charras and Paluch, 2008]. Lorsque le complexe WAVE ou le complexe Arp2/3 sont déplétés dans les cellules HeLa, les lamellipodes sont convertis en blebs (Figure 4.4) [Derivery et al., 2008]. De manière intéressante, en utilisant des micropatterns adhérents, Derivery *et al.* montrent que ces blebs sont formés là où les lamellipodes devraient se former. Ces observations sont cohérentes avec une réduction de la tension membranaire comme première étape nécessaire à la formation des lamellipodes.

Le PIP2 joue un rôle très important dans la diminution de la tension membranaire nécessaire à la formation des lamellipodes. En effet, le groupe de Mike Sheetz a montré que l'hydrolyse du PIP2 par les phospholipases C et la séquestration du PIP2 par l'expression du domaine d'homologie à la pleckstrine (domaine PH), diminuaient la force d'adhérence réduisant ainsi la tension membranaire [Raucher et al., 2000]. De plus, l'hydrolyse spécifique du PIP2 à la membrane entraîne une diminution des structures d'actine filamenteuses. Il semble donc que le PIP2 puisse réguler la tension membranaire en contrôlant l'adhérence entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine cortical, probablement via son interaction à de nombreuses protéines de liaison à l'actine.

Nous venons de voir que même si l'endocytose et la formation des lamellipodes nécessitent tout les deux un même stimulus, c'est à dire une diminution de la tension membranaire, ces deux phénomènes ne coexistent pas [Dai et al., 1997, Raucher and Sheetz, 1999, Raucher and Sheetz, 2000]. On observe soit l'endocytose, soit la formation des lamellipodes. Dans ce contexte, le rôle de l'interaction entre la clathrine et le complexe WAVE que nous rapportons semble logique puisque notre travail montre que le lamellipode n'est pas un

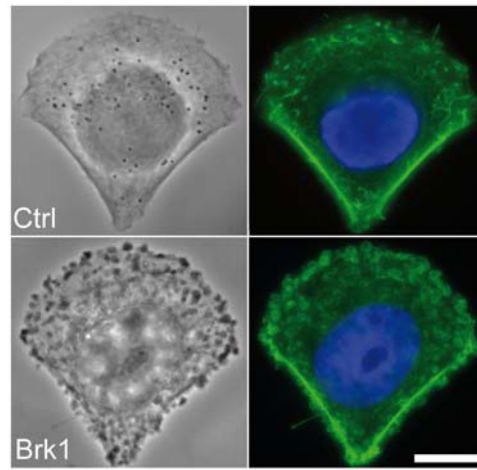


FIGURE 4.4 – La déplétion du complexe WAVE entraîne la formation de blebs

Modifié de [Derivery et al., 2008]. Observation d'images en contraste de phase et en fluorescence, de cellules contrôle ou de cellules déplétées en Brk1 étalées sur des micropatterns adhérents. Les filaments d'actine et les noyaux sont observés par l'utilisation de la phalloïdine fluorescente et du DAPI respectivement.

lieu d'endocytose dépendante de la clathrine. On peut donc imaginer que dans ces conditions, la clathrine coordonne l'abolition de l'endocytose au profit de la formation des lamellipodes.

4.2.4 Contrôle de la tension membranaire par l'apport de membranes

Bien avant qu'on ne comprenne que l'exocytose diminuait la tension membranaire, permettant ainsi la formation des lamellipodes et l'étalement des cellules, Bretscher proposa un modèle au milieu des années 1980, sans pouvoir le démontrer, dans lequel, l'exocytose de membranes était nécessaire à l'étalement et à la migration des cellules [Bretscher, 1984]. Dans ce modèle, des récepteurs sont internalisés à différents endroits de la cellule et sont ensuite exocytés au front de migration. Dans le sens de l'hypothèse pionnière de Bretscher, les vésicules provenant du Golgi sont exocytées au front de migration des fibroblastes [Schmoranzner and Simon, 2003, Schmoranzner et al., 2003] et l'exocytose de l'intégrine $\beta 1$ au lamellipode contrôlée par la cellubrévine, est indispensable à la migration cellulaire [Proux-Gillardeaux et al., 2005]. Il a ensuite été montré que l'exocytose de membranes riches en protéines à ancre GPI, augmentait l'aire de la membrane plasmique au cours de l'étalement des

cellules [Gauthier et al., 2009]. Une étude récente montre que les endosomes de recyclage sont incorporés dans les lamellipodes et sont nécessaires pour une formation efficace des lamellipodes et pour la migration des macrophages [Veale et al., 2010].

Il faut également noter qu'il y aurait une endocytose indépendante de la clathrine au lamellipode (CLICs, Clathrin Independent Carriers) [Howes et al., 2010]. Les CLICs interviennent dans l'internalisation de fluides. Les CLICs sont issus du bourgeonnement de la membrane plasmique, ils mûrissent ensuite en endosomes précoces. Ce travail montre que les CLICs sont localisés au front de migration des cellules et que l'internalisation réalisée par ces transporteurs est nécessaire à la migration cellulaire.

La clathrine n'est pas la seule protéine impliquée dans l'endocytose, qui contrôle la formation des lamellipodes. En effet, un travail récent montre que la protéine à domaine F-BAR PACSIN2, impliquée dans l'endocytose, régule la formation des lamellipodes en contrôlant l'activation de la GTPase Rac [de Kreuk et al., 2011]. Ce travail montre que PACSIN2 internalise Rac à la fin de la signalisation de la GTPase.

En plus de sa fonction régulatrice de la tension membranaire, l'exocytose joue également un rôle dans la réparation des membranes. En effet, il a été montré que l'exocytose de membranes et plus spécifiquement, l'exocytose des lysosomes, était requise pour diminuer la tension membranaire et permettre une réparation efficace de la membrane plasmique [Togo et al., 2000, Reddy et al., 2001, Andrews and Chakrabarti, 2005].

Bibliographie

- [Abercrombie et al., 1970] Abercrombie, M., Heaysman, J. E., and Pegrum, S. M. (1970). The locomotion of fibroblasts in culture. i. movements of the leading edge. *Exp Cell Res*, 59(3) :393–398.
- [Abou-Kheir et al., 2008] Abou-Kheir, W., Isaac, B., Yamaguchi, H., and Cox, D. (2008). Membrane targeting of wave2 is not sufficient for wave2-dependent actin polymerization : a role for irsp53 in mediating the interaction between rac and wave2. *J Cell Sci*, 121(Pt 3) :379–390.
- [Achard et al., 2010] Achard, V., Martiel, J.-L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.-C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A "primer"-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol*, 20(5) :423–428.
- [Aguda et al., 2005] Aguda, A. H., Burtnick, L. D., and Robinson, R. C. (2005). The state of the filament. *EMBO Rep*, 6(3) :220–226.
- [Ahle et al., 1988] Ahle, S., Mann, A., Eichelsbacher, U., and Ungewickell, E. (1988). Structural relationships between clathrin assembly proteins from the golgi and the plasma membrane. *EMBO J*, 7(4) :919–929.
- [Ahuja et al., 2007] Ahuja, R., Pinyol, R., Reichenbach, N., Custer, L., Klingensmith, J., Kessels, M. M., and Qualmann, B. (2007). Cordon-bleu is an actin nucleation factor and controls neuronal morphology. *Cell*, 131(2) :337–350.
- [Alberts, 2001] Alberts, A. S. (2001). Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem*, 276(4) :2824–2830.
- [Amann and Pollard, 2001] Amann, K. J. and Pollard, T. D. (2001). Direct real-time observation of actin filament branching mediated by arp2/3 complex using total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26) :15009–15013.
- [Andrews and Chakrabarti, 2005] Andrews, N. W. and Chakrabarti, S. (2005). There's more to life than neurotransmission : the regulation of exocytosis by synaptotagmin vii. *Trends Cell Biol*, 15(11) :626–631.
- [Andrianantoandro and Pollard, 2006] Andrianantoandro, E. and Pollard, T. D. (2006). Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of adf/cofilin. *Mol Cell*, 24(1) :13–23.
- [Anitei et al., 2010] Anitei, M., Stange, C., Parshina, I., Baust, T., Schenck, A., Raposo, G., Kirchhausen, T., and Hoflack, B. (2010). Protein com-

- plexes containing cyfip/sra/pir121 coordinate arf1 and rac1 signalling during clathrin-ap-1-coated carrier biogenesis at the tgn. *Nat Cell Biol*, 12(4) :330–340.
- [Arber et al., 1998] Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by lim-kinase. *Nature*, 393(6687) :805–809.
- [Argani et al., 2003] Argani, P., Lui, M. Y., Couturier, J., Bouvier, R., Fournet, J.-C., and Ladanyi, M. (2003). A novel cltc-tfe3 gene fusion in pediatric renal adenocarcinoma with t(x;17)(p11.2;q23). *Oncogene*, 22(34) :5374–5378.
- [Bailly et al., 2001] Bailly, M., Ichetovkin, I., Grant, W., Zebda, N., Machesky, L. M., Segall, J. E., and Condeelis, J. (2001). The f-actin side binding activity of the arp2/3 complex is essential for actin nucleation and lamellipod extension. *Curr Biol*, 11(8) :620–625.
- [Bassères and Baldwin, 2006] Bassères, D. S. and Baldwin, A. S. (2006). Nuclear factor-kappab and inhibitor of kappab kinase pathways in oncogenic initiation and progression. *Oncogene*, 25(51) :6817–6830.
- [Baust et al., 2006] Baust, T., Czupalla, C., Krause, E., Bourel-Bonnet, L., and Hoflack, B. (2006). Proteomic analysis of adaptor protein 1a coats selectively assembled on liposomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9) :3159–3164.
- [Bear et al., 2001] Bear, J. E., Krause, M., and Gertler, F. B. (2001). Regulating cellular actin assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 13(2) :158–166.
- [Bear et al., 1998] Bear, J. E., Rawls, J. F., and Saxe, C. L. (1998). Scar, a wasp-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late dictyostelium development. *J Cell Biol*, 142(5) :1325–1335.
- [Beltzner and Pollard, 2008] Beltzner, C. C. and Pollard, T. D. (2008). Pathway of actin filament branch formation by arp2/3 complex. *J Biol Chem*, 283(11) :7135–7144.
- [Benesch et al., 2005] Benesch, S., Polo, S., Lai, F. P. L., Anderson, K. I., Stradal, T. E. B., Wehland, J., and Rottner, K. (2005). N-wasp deficiency impairs egf internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, 118(Pt 14) :3103–3115.
- [Benmerah et al., 1995] Benmerah, A., Gagnon, J., Bègue, B., Mégarbané, B., Dautry-Varsat, A., and Cerf-Bensussan, N. (1995). The tyrosine kinase substrate eps15 is constitutively associated with the plasma membrane adaptor ap-2. *J Cell Biol*, 131(6 Pt 2) :1831–1838.
- [Bentley and Toroian-Raymond, 1986] Bentley, D. and Toroian-Raymond, A. (1986). Disoriented pathfinding by pioneer neurone growth cones deprived of filopodia by cytochalasin treatment. *Nature*, 323(6090) :712–715.
- [Berriman et al., 2005] Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin,

- N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C. M., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., Barron, A. J., Bringaud, F., Brooks, K., Carrington, M., Cherevach, I., Chillingworth, T.-J., Churcher, C., Clark, L. N., Corton, C. H., Cronin, A., Davies, R. M., Doggett, J., Djikeng, A., Feldblyum, T., Field, M. C., Fraser, A., Goodhead, I., Hance, Z., Harper, D., Harris, B. R., Hauser, H., Hostetler, J., Ivens, A., Jagels, K., Johnson, D., Johnson, J., Jones, K., Kerhornou, A. X., Koo, H., Larke, N., Landfear, S., Larkin, C., Leech, V., Line, A., Lord, A., Macleod, A., Mooney, P. J., Moule, S., Martin, D. M. A., Morgan, G. W., Mungall, K., Norbertczak, H., Ormond, D., Pai, G., Peacock, C. S., Peterson, J., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.-A., Reitter, C., Salzberg, S. L., Sanders, M., Schobel, S., Sharp, S., Simmonds, M., Simpson, A. J., Tallon, L., Turner, C. M. R., Tait, A., Tivey, A. R., Aken, S. V., Walker, D., Wanless, D., Wang, S., White, B., White, O., Whitehead, S., Woodward, J., Wortman, J., Adams, M. D., Embley, T. M., Gull, K., Ullu, E., Barry, J. D., Fairlamb, A. H., Opperdoes, F., Barrell, B. G., Donelson, J. E., Hall, N., Fraser, C. M., Melville, S. E., and El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the african trypanosome *trypanosoma brucei*. *Science*, 309(5733) :416–422.
- [Bettinger et al., 2004] Bettinger, B. T., Gilbert, D. M., and Amberg, D. C. (2004). Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(5) :410–415.
- [Blagg et al., 2003] Blagg, S. L., Stewart, M., Sambles, C., and Insall, R. H. (2003). Pir121 regulates pseudopod dynamics and scar activity in dictyostelium. *Curr Biol*, 13(17) :1480–1487.
- [Blanchoin et al., 2000a] Blanchoin, L., Amann, K. J., Higgs, H. N., Marchand, J. B., Kaiser, D. A., and Pollard, T. D. (2000a). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by arp2/3 complex and wasp/scar proteins. *Nature*, 404(6781) :1007–1011.
- [Blanchoin and Pollard, 2002] Blanchoin, L. and Pollard, T. D. (2002). Hydrolysis of atp by polymerized actin depends on the bound divalent cation but not profilin. *Biochemistry*, 41(2) :597–602.
- [Blanchoin et al., 2000b] Blanchoin, L., Pollard, T. D., and Mullins, R. D. (2000b). Interactions of adf/cofilin, arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks. *Curr Biol*, 10(20) :1273–1282.
- [Blessing et al., 2004] Blessing, C. A., Ugrinova, G. T., and Goodson, H. V. (2004). Actin and arps : action in the nucleus. *Trends Cell Biol*, 14(8) :435–442.
- [Boczkowska et al., 2008] Boczkowska, M., Rebowski, G., Petoukhov, M. V., Hayes, D. B., Svergun, D. I., and Dominguez, R. (2008). X-ray scattering study of activated arp2/3 complex with bound actin-wca. *Structure*, 16(5) :695–704.
- [Booth et al., 2011] Booth, D. G., Hood, F. E., Prior, I. A., and Royle, S. J. (2011). A tacc3/ch-tog/clathrin complex stabilises kinetochore fibres by inter-microtubule bridging. *EMBO J*, 30(5) :906–919.

- [Bosch et al., 2007] Bosch, M., Le, K. H. D., Bugyi, B., Correia, J. J., Renault, L., and Carlier, M.-F. (2007). Analysis of the function of spire in actin assembly and its synergy with formin and profilin. *Mol Cell*, 28(4) :555–568.
- [Bretscher, 1984] Bretscher, M. S. (1984). Endocytosis : relation to capping and cell locomotion. *Science*, 224(4650) :681–686.
- [Bridge et al., 2001] Bridge, J. A., Kanamori, M., Ma, Z., Pickering, D., Hill, D. A., Lydiatt, W., Lui, M. Y., Colleoni, G. W., Antonescu, C. R., Ladanyi, M., and Morris, S. W. (2001). Fusion of the alk gene to the clathrin heavy chain gene, cltc, in inflammatory myofibroblastic tumor. *Am J Pathol*, 159(2) :411–415.
- [Brieher et al., 2006] Brieher, W. M., Kueh, H. Y., Ballif, B. A., and Mitchison, T. J. (2006). Rapid actin monomer-insensitive depolymerization of listeria actin comet tails by cofilin, coronin, and aip1. *J Cell Biol*, 175(2) :315–324.
- [Brodsky et al., 2001] Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C., and Wakeham, D. E. (2001). Biological basket weaving : formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 17 :517–568.
- [Buck et al., 2001] Buck, M., Xu, W., and K., M. (2001). Global disruption of the wasp autoinhibited structure on cdc42 binding. ligand displacement as a novel method for monitoring amide hydrogen exchange. *Biochemistry*, 40(47) :14115–14122.
- [Cai et al., 2008] Cai, L., Makhov, A. M., Schafer, D. A., and Bear, J. E. (2008). Coronin 1b antagonizes cortactin and remodels arp2/3-containing actin branches in lamellipodia. *Cell*, 134(5) :828–842.
- [Campellone et al., 2008a] Campellone, K. G., Cheng, H.-C., Robbins, D., Siripala, A. D., McGhie, E. J., Hayward, R. D., Welch, M. D., K, M., Koronakis, V., and Leong, J. M. (2008a). Repetitive n-wasp-binding elements of the enterohemorrhagic escherichia coli effector espf(u) synergistically activate actin assembly. *PLoS Pathog*, 4(10) :e1000191.
- [Campellone et al., 2008b] Campellone, K. G., Webb, N. J., Znameroski, E. A., and Welch, M. D. (2008b). Whamm is an arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in er to golgi transport. *Cell*, 134(1) :148–161.
- [Campellone and Welch, 2010] Campellone, K. G. and Welch, M. D. (2010). A nucleator arms race : cellular control of actin assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(4) :237–251.
- [Carlier et al., 1997] Carlier, M. F., Laurent, V., Santolini, J., Melki, R., Didry, D., Xia, G. X., Hong, Y., Chua, N. H., and Pantaloni, D. (1997). Actin depolymerizing factor (adf/cofilin) enhances the rate of filament turnover : implication in actin-based motility. *J Cell Biol*, 136(6) :1307–1322.
- [Carlier et al., 2000] Carlier, M. F., Nioche, P., Broutin-L’Hermite, I., Boujema, R., Clainche, C. L., Egile, C., Garbay, C., Ducruix, A., Sansonetti, P., and Pantaloni, D. (2000). Grb2 links signaling to actin assembly by enhancing interaction of neural wiskott-aldrich syndrome protein (n-wasp)

- with actin-related protein (arp2/3) complex. *J Biol Chem*, 275(29) :21946–21952.
- [Carter, 1967] Carter, S. B. (1967). Haptotaxis and the mechanism of cell motility. *Nature*, 213(5073) :256–260.
- [Charras and Paluch, 2008] Charras, G. and Paluch, E. (2008). Blebs lead the way : how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(9) :730–736.
- [Chen and Brodsky, 2005] Chen, C.-Y. and Brodsky, F. M. (2005). Huntingtin-interacting protein 1 (hip1) and hip1-related protein (hip1r) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *J Biol Chem*, 280(7) :6109–6117.
- [Chen et al., 2002] Chen, C.-Y., Reese, M. L., Hwang, P. K., Ota, N., Agard, D., and Brodsky, F. M. (2002). Clathrin light and heavy chain interface : alpha-helix binding superhelix loops via critical tryptophans. *EMBO J*, 21(22) :6072–6082.
- [Chen et al., 2010] Chen, Z., Borek, D., Padrick, S. B., Gomez, T. S., Metlagel, Z., Ismail, A. M., Umetani, J., Billadeau, D. D., Otwinowski, Z., and K, M. (2010). Structure and control of the actin regulatory wave complex. *Nature*, 468(7323) :533–538.
- [Chesarone et al., 2010] Chesarone, M. A., DuPage, A. G., and Goode, B. L. (2010). Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(1) :62–74.
- [Clainche et al., 2001] Clainche, C. L., Didry, D., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (2001). Activation of arp2/3 complex by wiskott-aldrich syndrome protein is linked to enhanced binding of atp to arp2. *J Biol Chem*, 276(50) :46689–46692.
- [Clainche et al., 2003] Clainche, C. L., Pantaloni, D., and Carlier, M.-F. (2003). Atp hydrolysis on actin-related protein 2/3 complex causes debranching of dendritic actin arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(11) :6337–6342.
- [Clainche et al., 2007] Clainche, C. L., Pauly, B. S., Zhang, C. X., Engqvist-Goldstein, A. E. Y., Cunningham, K., and Drubin, D. G. (2007). A hip1r-cortactin complex negatively regulates actin assembly associated with endocytosis. *EMBO J*, 26(5) :1199–1210.
- [Co et al., 2007] Co, C., Wong, D. T., Gierke, S., Chang, V., and Taunton, J. (2007). Mechanism of actin network attachment to moving membranes : barbed end capture by n-wasp wh2 domains. *Cell*, 128(5) :901–913.
- [Collins et al., 2011] Collins, A., Warrington, A., Taylor, K. A., and Svitkina, T. (2011). Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*.
- [Collins et al., 2002] Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., and Owen, D. J. (2002). Molecular architecture and functional model of the endocytic ap2 complex. *Cell*, 109(4) :523–535.

- [Cooper and Sept, 2008] Cooper, J. A. and Sept, D. (2008). New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int Rev Cell Mol Biol*, 267 :183–206.
- [Cory et al., 2003] Cory, G. O. C., Cramer, R., Blanchoin, L., and Ridley, A. J. (2003). Phosphorylation of the wasp-vca domain increases its affinity for the arp2/3 complex and enhances actin polymerization by wasp. *Mol Cell*, 11(5) :1229–1239.
- [Crowther and Pearse, 1981] Crowther, R. A. and Pearse, B. M. (1981). Assembly and packing of clathrin into coats. *J Cell Biol*, 91(3 Pt 1) :790–797.
- [Dahlgaard et al., 2007] Dahlgaard, K., Raposo, A. A. S. F., Niccoli, T., and Johnston, D. S. (2007). Capu and spire assemble a cytoplasmic actin mesh that maintains microtubule organization in the drosophila oocyte. *Dev Cell*, 13(4) :539–553.
- [Dai et al., 1998] Dai, J., Sheetz, M. P., Wan, X., and Morris, C. E. (1998). Membrane tension in swelling and shrinking molluscan neurons. *J Neurosci*, 18(17) :6681–6692.
- [Dai et al., 1997] Dai, J., Ting-Beall, H. P., and Sheetz, M. P. (1997). The secretion-coupled endocytosis correlates with membrane tension changes in rbl 2h3 cells. *J Gen Physiol*, 110(1) :1–10.
- [Dai and Pendergast, 1995] Dai, Z. and Pendergast, A. M. (1995). Abi-2, a novel sh3-containing protein interacts with the c-abl tyrosine kinase and modulates c-abl transforming activity. *Genes Dev*, 9(21) :2569–2582.
- [Dayel et al., 2001] Dayel, M. J., Holleran, E. A., and Mullins, R. D. (2001). Arp2/3 complex requires hydrolyzable atp for nucleation of new actin filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(26) :14871–14876.
- [Dayel and Mullins, 2004] Dayel, M. J. and Mullins, R. D. (2004). Activation of arp2/3 complex : addition of the first subunit of the new filament by a wasp protein triggers rapid atp hydrolysis on arp2. *PLoS Biol*, 2(4) :E91.
- [de Heuvel et al., 1997] de Heuvel, E., Bell, A. W., Ramjaun, A. R., Wong, K., Sossin, W. S., and McPherson, P. S. (1997). Identification of the major synaptojanin-binding proteins in brain. *J Biol Chem*, 272(13) :8710–8716.
- [de Kreuk et al., 2011] de Kreuk, B.-J., Nethe, M., Fernandez-Borja, M., Anthony, E. C., Hensbergen, P. J., Deelder, A. M., Plomann, M., and Hordijk, P. L. (2011). The f-bar domain protein pacsin2 associates with rac1 and regulates cell spreading and migration. *J Cell Sci*, 124(Pt 14) :2375–2388.
- [de la Fuente et al., 2007] de la Fuente, M. A., Sasahara, Y., Calamito, M., Antón, I. M., Elkhali, A., Gallego, M. D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H. D., Anderson, K. C., S, F., Geha, R. S., and Ramesh, N. (2007). Wip is a chaperone for wiskott-aldrich syndrome protein (wasp). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3) :926–931.
- [Dell’Angelica et al., 1998] Dell’Angelica, E. C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., and Bonifacino, J. S. (1998). Association of the ap-3 adaptor complex with clathrin. *Science*, 280(5362) :431–434.

- [Dell'Angelica et al., 1999] Dell'Angelica, E. C., Shotelersuk, V., Aguilar, R. C., Gahl, W. A., and Bonifacino, J. S. (1999). Altered trafficking of lysosomal proteins in hermansky-pudlak syndrome due to mutations in the beta 3a subunit of the ap-3 adaptor. *Mol Cell*, 3(1) :11–21.
- [Dent et al., 2003] Dent, E. W., Tang, F., and Kalil, K. (2003). Axon guidance by growth cones and branches : common cytoskeletal and signaling mechanisms. *Neuroscientist*, 9(5) :343–353.
- [Derivery et al., 2008] Derivery, E., Fink, J., Martin, D., Houdusse, A., Piel, M., Stradal, T. E., Louvard, D., and Gautreau, A. (2008). Free brick1 is a trimeric precursor in the assembly of a functional wave complex. *PLoS One*, 3(6) :e2462.
- [Derivery and Gautreau, 2010] Derivery, E. and Gautreau, A. (2010). Generation of branched actin networks : assembly and regulation of the n-wasp and wave molecular machines. *Bioessays*, 32(2) :119–131.
- [Derivery et al., 2009] Derivery, E., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(10) :777–790.
- [Devreotes and Zigmond, 1988] Devreotes, P. N. and Zigmond, S. H. (1988). Chemotaxis in eukaryotic cells : a focus on leukocytes and dictyostelium. *Annu Rev Cell Biol*, 4 :649–686.
- [Duleh and Welch, 2010] Duleh, S. N. and Welch, M. D. (2010). Wash and the arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67(3) :193–206.
- [Echarri et al., 2004] Echarri, A., Lai, M. J., Robinson, M. R., and Pendergast, A. M. (2004). Abl interactor 1 (abi-1) wave-binding and snare domains regulate its nucleocytoplasmic shuttling, lamellipodium localization, and wave-1 levels. *Mol Cell Biol*, 24(11) :4979–4993.
- [Eden et al., 2002] Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of wave1-induced actin nucleation by rac1 and nck. *Nature*, 418(6899) :790–793.
- [Egile et al., 2005] Egile, C., Rouiller, I., Xu, X.-P., Volkmann, N., Li, R., and Hanein, D. (2005). Mechanism of filament nucleation and branch stability revealed by the structure of the arp2/3 complex at actin branch junctions. *PLoS Biol*, 3(11) :e383.
- [Eisenmann et al., 2007] Eisenmann, K. M., Harris, E. S., Kitchen, S. M., Holman, H. A., Higgs, H. N., and Alberts, A. S. (2007). Dia-interacting protein modulates formin-mediated actin assembly at the cell cortex. *Curr Biol*, 17(7) :579–591.
- [Enari et al., 2006] Enari, M., Ohmori, K., Kitabayashi, I., and Taya, Y. (2006). Requirement of clathrin heavy chain for p53-mediated transcription. *Genes Dev*, 20(9) :1087–1099.
- [Endo et al., 2008] Endo, Y., Sugiyama, A., Li, S.-A., Ohmori, K., Ohata, H., Yoshida, Y., Shibuya, M., Takei, K., Enari, M., and Taya, Y. (2008). Regulation of clathrin-mediated endocytosis by p53. *Genes Cells*, 13(4) :375–386.

- [Ford et al., 2002] Ford, M. G. J., Mills, I. G., Peter, B. J., Vallis, Y., Praefcke, G. J. K., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419(6905) :361–366.
- [Fotin et al., 2004] Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S. C., and Kirchhausen, T. (2004). Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature*, 432(7017) :649–653.
- [Fotin et al., 2006] Fotin, A., Kirchhausen, T., Grigorieff, N., Harrison, S. C., Walz, T., and Cheng, Y. (2006). Structure determination of clathrin coats to subnanometer resolution by single particle cryo-electron microscopy. *J Struct Biol*, 156(3) :453–460.
- [Frischknecht and Way, 2001] Frischknecht, F. and Way, M. (2001). Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biol*, 11(1) :30–38.
- [Fu et al., 2010] Fu, W., Tao, W., Zheng, P., Fu, J., Bian, M., Jiang, Q., Clarke, P. R., and Zhang, C. (2010). Clathrin recruits phosphorylated tacc3 to spindle poles for bipolar spindle assembly and chromosome alignment. *J Cell Sci*, 123(Pt 21) :3645–3651.
- [Gaidarov and Keen, 1999] Gaidarov, I. and Keen, J. H. (1999). Phosphoinositide-ap-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, 146(4) :755–764.
- [Galbraith et al., 2007] Galbraith, C. G., Yamada, K. M., and Galbraith, J. A. (2007). Polymerizing actin fibers position integrins primed to probe for adhesion sites. *Science*, 315(5814) :992–995.
- [Gauthier et al., 2009] Gauthier, N. C., Rossier, O. M., Mathur, A., Hone, J. C., and Sheetz, M. P. (2009). Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a gpi-anchored protein compartment. *Mol Biol Cell*, 20(14) :3261–3272.
- [Gautreau et al., 2004] Gautreau, A., yi H Ho, H., Li, J., Steen, H., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(13) :4379–4383.
- [Goley et al., 2004] Goley, E. D., Rodenbusch, S. E., Martin, A. C., and Welch, M. D. (2004). Critical conformational changes in the arp2/3 complex are induced by nucleotide and nucleation promoting factor. *Mol Cell*, 16(2) :269–279.
- [Gomez and Billadeau, 2009] Gomez, T. S. and Billadeau, D. D. (2009). A fam21-containing wash complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell*, 17(5) :699–711.
- [Goode and Eck, 2007] Goode, B. L. and Eck, M. J. (2007). Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem*, 76 :593–627.
- [Greene et al., 2000] Greene, B., Liu, S. H., Wilde, A., and Brodsky, F. M. (2000). Complete reconstitution of clathrin basket formation with recombi-

- nant protein fragments : adaptor control of clathrin self-assembly. *Traffic*, 1(1) :69–75.
- [Gupton and Gertler, 2007] Gupton, S. L. and Gertler, F. B. (2007). Filopodia : the fingers that do the walking. *Sci STKE*, 2007(400) :re5.
- [Haffner et al., 2000] Haffner, C., Paolo, G. D., Rosenthal, J. A., and de Camilli, P. (2000). Direct interaction of the 170 kda isoform of synaptojanin 1 with clathrin and with the clathrin adaptor ap-2. *Curr Biol*, 10(8) :471–474.
- [Hahne et al., 2001] Hahne, P., Sechi, A., Benesch, S., and Small, J. V. (2001). Scar/wave is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett*, 492(3) :215–220.
- [Hall, 1998] Hall, A. (1998). Rho gtpases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279(5350) :509–514.
- [Hayden et al., 2006] Hayden, M. S., West, A. P., and Ghosh, S. (2006). Snapshot : Nf-kappab signaling pathways. *Cell*, 127(6) :1286–1287.
- [Hinshaw and Schmid, 1995] Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L. (1995). Dynamamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature*, 374(6518) :190–192.
- [Hirst et al., 2003] Hirst, J., Motley, A., Harasaki, K., Chew, S. Y. P., and Robinson, M. S. (2003). Epsinr : an enth domain-containing protein that interacts with ap-1. *Mol Biol Cell*, 14(2) :625–641.
- [Ho et al., 2001] Ho, H. Y., Rohatgi, R., Ma, L., and Kirschner, M. W. (2001). Cr16 forms a complex with n-wasp in brain and is a novel member of a conserved proline-rich actin-binding protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(20) :11306–11311.
- [Ho et al., 2004] Ho, H.-Y. H., Rohatgi, R., Lebensohn, A. M., Ma, L., Li, J., Gygi, S. P., and Kirschner, M. W. (2004). Toca-1 mediates cdc42-dependent actin nucleation by activating the n-wasp-wip complex. *Cell*, 118(2) :203–216.
- [Holmes, 2010] Holmes, K. C. (2010). 50 years of fiber diffraction. *J Struct Biol*, 170(2) :184–191.
- [Holmes et al., 1990] Holmes, K. C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature*, 347(6288) :44–49.
- [Howes et al., 2010] Howes, M. T., Kirkham, M., Riches, J., Cortese, K., Walser, P. J., Simpson, F., Hill, M. M., Jones, A., Lundmark, R., Lindsay, M. R., Hernandez-Deviez, D. J., Hadzic, G., McCluskey, A., Bashir, R., Liu, L., Pilch, P., McMahan, H., Robinson, P. J., Hancock, J. F., Mayor, S., and Parton, R. G. (2010). Clathrin-independent carriers form a high capacity endocytic sorting system at the leading edge of migrating cells. *J Cell Biol*, 190(4) :675–691.
- [Hudson and Cooley, 2002] Hudson, A. M. and Cooley, L. (2002). A subset of dynamic actin rearrangements in drosophila requires the arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 156(4) :677–687.

- [Ibarra et al., 2006] Ibarra, N., Blagg, S. L., Vazquez, F., and Insall, R. H. (2006). Nap1 regulates dictyostelium cell motility and adhesion through scar-dependent and -independent pathways. *Curr Biol*, 16(7) :717–722.
- [Imai et al., 2003] Imai, K., Nonoyama, S., and Ochs, H. D. (2003). Wasp (wiskott-aldrich syndrome protein) gene mutations and phenotype. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 3(6) :427–436.
- [Innocenti et al., 2005] Innocenti, M., Gerboth, S., Rottner, K., Lai, F. P. L., Hertzog, M., Stradal, T. E. B., Frittoli, E., Didry, D., Polo, S., Disanza, A., Benesch, S., Fiore, P. P. D., Carlier, M.-F., and Scita, G. (2005). Abi1 regulates the activity of n-wasp and wave in distinct actin-based processes. *Nat Cell Biol*, 7(10) :969–976.
- [Innocenti et al., 2004] Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L. B., Steffen, A., Stradal, T. E. B., Fiore, P. P. D., Carlier, M.-F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a wave2 signalling complex. *Nat Cell Biol*, 6(4) :319–327.
- [Ismail et al., 2009] Ismail, A. M., Padrick, S. B., Chen, B., Umetani, J., and K, M. (2009). The wave regulatory complex is inhibited. *Nat Struct Mol Biol*, 16(5) :561–563.
- [Itoh et al., 2001] Itoh, T., Koshiba, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., Yokoyama, S., and Takenawa, T. (2001). Role of the enth domain in phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate binding and endocytosis. *Science*, 291(5506) :1047–1051.
- [Johannes and Lamaze, 2002] Johannes, L. and Lamaze, C. (2002). Clathrin-dependent or not : is it still the question ? *Traffic*, 3(7) :443–451.
- [Kaksonen et al., 2003] Kaksonen, M., Sun, Y., and Drubin, D. G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell*, 115(4) :475–487.
- [Kaksonen et al., 2005] Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2005). A modular design for the clathrin- and actin-mediated endocytosis machinery. *Cell*, 123(2) :305–320.
- [Kaksonen et al., 2006] Kaksonen, M., Toret, C. P., and Drubin, D. G. (2006). Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(6) :404–414.
- [Kanaseki and Kadota, 1969] Kanaseki, T. and Kadota, K. (1969). The "vesicle in a basket". a morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J Cell Biol*, 42(1) :202–220.
- [Keen et al., 1979] Keen, J. H., Willingham, M. C., and Pastan, I. H. (1979). Clathrin-coated vesicles : isolation, dissociation and factor-dependent reassociation of clathrin baskets. *Cell*, 16(2) :303–312.
- [Kerckhoff, 2006] Kerckhoff, E. (2006). Cellular functions of the spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol*, 16(9) :477–483.

- [Kerkhoff et al., 2001] Kerkhoff, E., Simpson, J. C., Leberfinger, C. B., Otto, I. M., Doerks, T., Bork, P., Rapp, U. R., Raabe, T., and Pepperkok, R. (2001). The spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr Biol*, 11(24) :1963–1968.
- [Kim et al., 2000] Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., and K., M. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the wiskott-aldrich syndrome protein. *Nature*, 404(6774) :151–158.
- [Kim et al., 2011] Kim, M. L., Sorg, I., and Arrieumerlou, C. (2011). Endocytosis-independent function of clathrin heavy chain in the control of basal nf- κ b activation. *PLoS One*, 6(2) :e17158.
- [Kim et al., 2006] Kim, Y., Sung, J. Y., Ceglia, I., Lee, K.-W., Ahn, J.-H., Halford, J. M., Kim, A. M., Kwak, S. P., Park, J. B., Ryu, S. H., Schenck, A., Bardoni, B., Scott, J. D., Nairn, A. C., and Greengard, P. (2006). Phosphorylation of wave1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature*, 442(7104) :814–817.
- [Kinley et al., 2003] Kinley, A. W., Weed, S. A., Weaver, A. M., Karginov, A. V., Bissonette, E., Cooper, J. A., and Parsons, J. T. (2003). Cortactin interacts with wip in regulating arp2/3 activation and membrane protrusion. *Curr Biol*, 13(5) :384–393.
- [Kinoshita et al., 2005] Kinoshita, K., Noetzel, T. L., Pelletier, L., Mechtler, K., Drechsel, D. N., Schwager, A., Lee, M., Raff, J. W., and Hyman, A. A. (2005). Aurora a phosphorylation of tacc3/maskin is required for centrosome-dependent microtubule assembly in mitosis. *J Cell Biol*, 170(7) :1047–1055.
- [Kirchhausen, 2000] Kirchhausen, T. (2000). Clathrin. *Annu Rev Biochem*, 69 :699–727.
- [Kirchhausen and Harrison, 1981] Kirchhausen, T. and Harrison, S. C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell*, 23(3) :755–761.
- [Knight et al., 2009] Knight, A. S., Notaridou, M., and Watson, R. J. (2009). A lin-9 complex is recruited by b-myb to activate transcription of g2/m genes in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 28(15) :1737–1747.
- [Kobayashi et al., 1998] Kobayashi, K., Kuroda, S., Fukata, M., Nakamura, T., Nagase, T., Nomura, N., Matsuura, Y., Yoshida-Kubomura, N., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. (1998). p140sra-1 (specifically rac1-associated protein) is a novel specific target for rac1 small gtpase. *J Biol Chem*, 273(1) :291–295.
- [Kondylis et al., 2007] Kondylis, V., van Nispen tot Pannerden, H. E., Herpers, B., Friggi-Grelin, F., and Rabouille, C. (2007). The golgi comprises a paired stack that is separated at g2 by modulation of the actin cytoskeleton through abi and scar/wave. *Dev Cell*, 12(6) :901–915.
- [Korn et al., 1987] Korn, E. D., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1987). Actin polymerization and atp hydrolysis. *Science*, 238(4827) :638–644.
- [Kunda et al., 2003] Kunda, P., Craig, G., Dominguez, V., and Baum, B. (2003). Abi, sra1, and kette control the stability and localization of

- scar/wave to regulate the formation of actin-based protrusions. *Curr Biol*, 13(21) :1867–1875.
- [Lai et al., 2009] Lai, F. P. L., Szczodrak, M., Oelkers, J. M., Ladwein, M., Acconcia, F., Benesch, S., Auinger, S., Faix, J., Small, J. V., Polo, S., Stradal, T. E. B., and Rottner, K. (2009). Cortactin promotes migration and platelet-derived growth factor-induced actin reorganization by signaling to rho-gtpases. *Mol Biol Cell*, 20(14) :3209–3223.
- [Lamallice et al., 2007] Lamallice, L., Boeuf, F. L., and Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 100(6) :782–794.
- [Lamaze et al., 1997] Lamaze, C., Fujimoto, L. M., Yin, H. L., and Schmid, S. L. (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *J Biol Chem*, 272(33) :20332–20335.
- [Lauffenburger and Horwitz, 1996] Lauffenburger, D. A. and Horwitz, A. F. (1996). Cell migration : a physically integrated molecular process. *Cell*, 84(3) :359–369.
- [Lebensohn and Kirschner, 2009] Lebensohn, A. M. and Kirschner, M. W. (2009). Activation of the wave complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell*, 36(3) :512–524.
- [Lees-Miller et al., 1992] Lees-Miller, J. P., Henry, G., and Helfman, D. M. (1992). Identification of act2, an essential gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that encodes a protein related to actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(1) :80–83.
- [Lemmon, 2001] Lemmon, S. K. (2001). Clathrin uncoating : Auxilin comes to life. *Curr Biol*, 11(2) :R49–R52.
- [Leng et al., 2005] Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M., and Siminovitch, K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes wave2 membrane translocation and abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for wave2 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(4) :1098–1103.
- [LeRoy et al., 2007] LeRoy, P. J., Hunter, J. J., Hoar, K. M., Burke, K. E., Shinde, V., Ruan, J., Bowman, D., Galvin, K., and Ecsedy, J. A. (2007). Localization of human tacc3 to mitotic spindles is mediated by phosphorylation on ser558 by aurora a : a novel pharmacodynamic method for measuring aurora a activity. *Cancer Res*, 67(11) :5362–5370.
- [Lin et al., 2010] Lin, C.-H., Hu, C.-K., and Shih, H.-M. (2010). Clathrin heavy chain mediates tacc3 targeting to mitotic spindles to ensure spindle stability. *J Cell Biol*, 189(7) :1097–1105.
- [Linardopoulou et al., 2007] Linardopoulou, E. V., Parghi, S. S., Friedman, C., Osborn, G. E., Parkhurst, S. M., and Trask, B. J. (2007). Human subtelomeric wash genes encode a new subclass of the wasp family. *PLoS Genet*, 3(12) :e237.
- [Linkner et al., 2011] Linkner, J., Witte, G., Stradal, T., Curth, U., and Faix, J. (2011). High-resolution x-ray structure of the trimeric scar/wave-complex precursor brk1. *PLoS One*, 6(6) :e21327.

- [Littlefield and Fowler, 2002] Littlefield, R. and Fowler, V. M. (2002). A minor actin catastrophe. *Nat Cell Biol*, 4(9) :E209–E211.
- [Liu et al., 2009] Liu, R., Abreu-Blanco, M. T., Barry, K. C., Linardopoulou, E. V., Osborn, G. E., and Parkhurst, S. M. (2009). Wash functions downstream of rho and links linear and branched actin nucleation factors. *Development*, 136(16) :2849–2860.
- [Liu et al., 1995] Liu, S. H., Wong, M. L., Craik, C. S., and Brodsky, F. M. (1995). Regulation of clathrin assembly and trimerization defined using recombinant triskelion hubs. *Cell*, 83(2) :257–267.
- [Loisel et al., 1999] Loisel, T. P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of listeria and shigella using pure proteins. *Nature*, 401(6753) :613–616.
- [Luna et al., 2002] Luna, A., Matas, O. B., Martínez-Menárguez, J. A., Mato, E., Durán, J. M., Ballesta, J., Way, M., and Egea, G. (2002). Regulation of protein transport from the golgi complex to the endoplasmic reticulum by cdc42 and n-wasp. *Mol Biol Cell*, 13(3) :866–879.
- [Luttrell and Lefkowitz, 2002] Luttrell, L. M. and Lefkowitz, R. J. (2002). The role of beta-arrestins in the termination and transduction of g-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci*, 115(Pt 3) :455–465.
- [Machesky et al., 1994] Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from acanthamoeba by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol*, 127(1) :107–115.
- [Machesky and Insall, 1998] Machesky, L. M. and Insall, R. H. (1998). Scar1 and the related wiskott-aldrich syndrome protein, wasp, regulate the actin cytoskeleton through the arp2/3 complex. *Curr Biol*, 8(25) :1347–1356.
- [Machesky et al., 1999] Machesky, L. M., Mullins, R. D., Higgs, H. N., Kaiser, D. A., Blanchoin, L., May, R. C., Hall, M. E., and Pollard, T. D. (1999). Scar, a wasp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7) :3739–3744.
- [Maciver et al., 1991] Maciver, S. K., Wachsstock, D. H., Schwarz, W. H., and Pollard, T. D. (1991). The actin filament severing protein actophorin promotes the formation of rigid bundles of actin filaments crosslinked with alpha-actinin. *J Cell Biol*, 115(6) :1621–1628.
- [Mack and Compton, 2001] Mack, G. J. and Compton, D. A. (2001). Analysis of mitotic microtubule-associated proteins using mass spectrometry identifies astrin, a spindle-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(25) :14434–14439.
- [Marchand et al., 2001] Marchand, J. B., Kaiser, D. A., Pollard, T. D., and Higgs, H. N. (2001). Interaction of wasp/scar proteins with actin and vertebrate arp2/3 complex. *Nat Cell Biol*, 3(1) :76–82.
- [Maro et al., 1985] Maro, B., Johnson, M. H., Pickering, S. J., and Louvard, D. (1985). Changes in the distribution of membranous organelles during mouse early development. *J Embryol Exp Morphol*, 90 :287–309.

- [Martin et al., 2006] Martin, A. C., Welch, M. D., and Drubin, D. G. (2006). Arp2/3 atp hydrolysis-catalysed branch dissociation is critical for endocytic force generation. *Nat Cell Biol*, 8(8) :826–833.
- [Martinez-Quiles et al., 2004] Martinez-Quiles, N., Ho, H.-Y. H., Kirschner, M. W., Ramesh, N., and Geha, R. S. (2004). Erk/src phosphorylation of cortactin acts as a switch on-switch off mechanism that controls its ability to activate n-wasp. *Mol Cell Biol*, 24(12) :5269–5280.
- [Martinez-Quiles et al., 2001] Martinez-Quiles, N., Rohatgi, R., Antón, I. M., Medina, M., Saville, S. P., Miki, H., Yamaguchi, H., Takenawa, T., Hartwig, J. H., Geha, R. S., and Ramesh, N. (2001). Wip regulates n-wasp-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat Cell Biol*, 3(5) :484–491.
- [Matas et al., 2004] Matas, O. B., Martínez-Menárguez, J. A., and Egea, G. (2004). Association of cdc42/n-wasp/arp2/3 signaling pathway with golgi membranes. *Traffic*, 5(11) :838–846.
- [Mathur et al., 2003] Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., and Hülskamp, M. (2003). Mutations in actin-related proteins 2 and 3 affect cell shape development in arabidopsis. *Plant Cell*, 15(7) :1632–1645.
- [Maxfield and McGraw, 2004] Maxfield, F. R. and McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2) :121–132.
- [McCammon, 2011] McCammon, J. A. (2011). Gated diffusion-controlled reactions. *BMC Biophys*, 4 :4.
- [McGough et al., 1997] McGough, A., Pope, B., Chiu, W., and Weeds, A. (1997). Cofilin changes the twist of f-actin : implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol*, 138(4) :771–781.
- [McNiven et al., 2000] McNiven, M. A., Kim, L., Krueger, E. W., Orth, J. D., Cao, H., and Wong, T. W. (2000). Regulated interactions between dynamin and the actin-binding protein cortactin modulate cell shape. *J Cell Biol*, 151(1) :187–198.
- [Merrifield et al., 2002] Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L., and Almers, W. (2002). Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol*, 4(9) :691–698.
- [Merrifield et al., 2005] Merrifield, C. J., Perrais, D., and Zenisek, D. (2005). Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. *Cell*, 121(4) :593–606.
- [Merrifield et al., 2004] Merrifield, C. J., Qualmann, B., Kessels, M. M., and Almers, W. (2004). Neural wiskott aldrich syndrome protein (n-wasp) and the arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 83(1) :13–18.
- [Miki et al., 1996] Miki, H., Miura, K., and Takenawa, T. (1996). N-wasp, a novel actin-depolymerizing protein, regulates the cortical cytoskeletal rearrangement in a pip2-dependent manner downstream of tyrosine kinases. *EMBO J*, 15(19) :5326–5335.

- [Miki et al., 1998a] Miki, H., Sasaki, T., Takai, Y., and Takenawa, T. (1998a). Induction of filopodium formation by a wasp-related actin-depolymerizing protein n-wasp. *Nature*, 391(6662) :93–96.
- [Miki et al., 1998b] Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998b). Wave, a novel wasp-family protein involved in actin reorganization induced by rac. *EMBO J*, 17(23) :6932–6941.
- [Miki et al., 2000] Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). Irs53 is an essential intermediate between rac and wave in the regulation of membrane ruffling. *Nature*, 408(6813) :732–735.
- [Millard et al., 2005] Millard, T. H., Bompard, G., Heung, M. Y., Dafforn, T. R., Scott, D. J., Machesky, L. M., and Fütterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the irsp53/mim homology domain of human irsp53. *EMBO J*, 24(2) :240–250.
- [Mockrin and Korn, 1980] Mockrin, S. C. and Korn, E. D. (1980). Acanthamoeba profilin interacts with g-actin to increase the rate of exchange of actin-bound adenosine 5'-triphosphate. *Biochemistry*, 19(23) :5359–5362.
- [Morel et al., 2009] Morel, E., Parton, R. G., and Gruenberg, J. (2009). Annexin a2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell*, 16(3) :445–457.
- [Morgan et al., 2003] Morgan, J. R., Prasad, K., Jin, S., Augustine, G. J., and Lafer, E. M. (2003). Eps15 homology domain-npf motif interactions regulate clathrin coat assembly during synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*, 278(35) :33583–33592.
- [Morgan et al., 1999] Morgan, J. R., Zhao, X., Womack, M., Prasad, K., Augustine, G. J., and Lafer, E. M. (1999). A role for the clathrin assembly domain of ap180 in synaptic vesicle endocytosis. *J Neurosci*, 19(23) :10201–10212.
- [Mullins et al., 1998] Mullins, R. D., Kelleher, J. F., Xu, J., and Pollard, T. D. (1998). Arp2/3 complex from acanthamoeba binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol Biol Cell*, 9(4) :841–852.
- [Nakao et al., 2008] Nakao, S., Platek, A., Hirano, S., and Takeichi, M. (2008). Contact-dependent promotion of cell migration by the ol-protocadherin-nap1 interaction. *J Cell Biol*, 182(2) :395–410.
- [Napoli et al., 2008] Napoli, I., Mercaldo, V., Boyle, P. P., Eleuteri, B., Zalfa, F., Rubeis, S. D., Marino, D. D., Mohr, E., Massimi, M., Falconi, M., Witke, W., Costa-Mattioli, M., Sonenberg, N., Achsel, T., and Bagni, C. (2008). The fragile x syndrome protein represses activity-dependent translation through cyfip1, a new 4e-bp. *Cell*, 134(6) :1042–1054.
- [Nolen et al., 2004] Nolen, B. J., Littlefield, R. S., and Pollard, T. D. (2004). Crystal structures of actin-related protein 2/3 complex with bound atp or adp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(44) :15627–15632.
- [Ohmori et al., 2008] Ohmori, K., Endo, Y., Yoshida, Y., Ohata, H., Taya, Y., and Enari, M. (2008). Monomeric but not trimeric clathrin heavy chain regulates p53-mediated transcription. *Oncogene*, 27(15) :2215–2227.

- [Oikawa et al., 2004] Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004). Ptdins(3,4,5)p3 binding is necessary for wave2-induced formation of lamellipodia. *Nat Cell Biol*, 6(5) :420–426.
- [Okamoto et al., 2000] Okamoto, C. T., McKinney, J., and Jeng, Y. Y. (2000). Clathrin in mitotic spindles. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279(2) :C369–C374.
- [Otomo et al., 2005a] Otomo, T., Otomo, C., Tomchick, D. R., Machius, M., and K, M. (2005a). Structural basis of rho gtpase-mediated activation of the formin mdia1. *Mol Cell*, 18(3) :273–281.
- [Otomo et al., 2005b] Otomo, T., Tomchick, D. R., Otomo, C., Panchal, S. C., Machius, M., and K, M. (2005b). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature*, 433(7025) :488–494.
- [Owen et al., 2004] Owen, D. J., Collins, B. M., and Evans, P. R. (2004). Adaptors for clathrin coats : structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20 :153–191.
- [Padrick et al., 2011] Padrick, S. B., Doolittle, L. K., Brautigam, C. A., King, D. S., and Rosen, M. K. (2011). Arp2/3 complex is bound and activated by two wasp proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [Pantaloni and Carlier, 1993] Pantaloni, D. and Carlier, M. F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell*, 75(5) :1007–1014.
- [Papayannopoulos et al., 2005] Papayannopoulos, V., Co, C., Prehoda, K. E., Snapper, S., Taunton, J., and Lim, W. A. (2005). A polybasic motif allows n-wasp to act as a sensor of pip(2) density. *Mol Cell*, 17(2) :181–191.
- [Pearse, 1975] Pearse, B. M. (1975). Coated vesicles from pig brain : purification and biochemical characterization. *J Mol Biol*, 97(1) :93–98.
- [Pearse, 1976] Pearse, B. M. (1976). Clathrin : a unique protein associated with intracellular transfer of membrane by coated vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(4) :1255–1259.
- [Pederson and Aebi, 2002] Pederson, T. and Aebi, U. (2002). Actin in the nucleus : what form and what for? *J Struct Biol*, 140(1-3) :3–9.
- [Peter et al., 2004] Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J. G., Evans, P. R., and McMahon, H. T. (2004). Bar domains as sensors of membrane curvature : the amphiphysin bar structure. *Science*, 303(5657) :495–499.
- [Pfender et al., 2011] Pfender, S., Kuznetsov, V., Pleiser, S., Kerkhoff, E., and Schuh, M. (2011). Spire-type actin nucleators cooperate with formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr Biol*, 21(11) :955–960.
- [Pocha and Cory, 2009] Pocha, S. M. and Cory, G. O. (2009). Wave2 is regulated by multiple phosphorylation events within its vca domain. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(1) :36–47.

- [Pollard, 1986] Pollard, T. D. (1986). Rate constants for the reactions of atp- and adp-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol*, 103(6 Pt 2) :2747–2754.
- [Pollard, 2007] Pollard, T. D. (2007). Regulation of actin filament assembly by arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 36 :451–477.
- [Pollard and Cooper, 1984] Pollard, T. D. and Cooper, J. A. (1984). Quantitative analysis of the effect of acanthamoeba profilin on actin filament nucleation and elongation. *Biochemistry*, 23(26) :6631–6641.
- [Pollard and Cooper, 2009] Pollard, T. D. and Cooper, J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science*, 326(5957) :1208–1212.
- [Pollitt and Insall, 2009] Pollitt, A. Y. and Insall, R. H. (2009). Loss of dictyostelium hspc300 causes a scar-like phenotype and loss of scar protein. *BMC Cell Biol*, 10 :13.
- [Poupon et al., 2008] Poupon, V., Girard, M., Legendre-Guillemain, V., Thomas, S., Bourbonniere, L., Philie, J., Bright, N. A., and McPherson, P. S. (2008). Clathrin light chains function in mannose phosphate receptor trafficking via regulation of actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(1) :168–173.
- [Prehoda et al., 2000] Prehoda, K. E., Scott, J. A., Mullins, R. D., and Lim, W. A. (2000). Integration of multiple signals through cooperative regulation of the n-wasp-arp2/3 complex. *Science*, 290(5492) :801–806.
- [Pring et al., 2003] Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., and Zigmond, S. H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry*, 42(2) :486–496.
- [Pring et al., 1992] Pring, M., Weber, A., and Bubb, M. R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry*, 31(6) :1827–1836.
- [Proux-Gillardeaux et al., 2005] Proux-Gillardeaux, V., Gavard, J., Irinopoulou, T., Mège, R.-M., and Galli, T. (2005). Tetanus neurotoxin-mediated cleavage of cellubrevin impairs epithelial cell migration and integrin-dependent cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(18) :6362–6367.
- [Quinlan et al., 2005] Quinlan, M. E., Heuser, J. E., Kerkhoff, E., and Mullins, R. D. (2005). Drosophila spire is an actin nucleation factor. *Nature*, 433(7024) :382–388.
- [Quinlan et al., 2007] Quinlan, M. E., Hilgert, S., Bedrossian, A., Mullins, R. D., and Kerkhoff, E. (2007). Regulatory interactions between two actin nucleators, spire and cappuccino. *J Cell Biol*, 179(1) :117–128.
- [Raiborg et al., 2002] Raiborg, C., Bache, K. G., Gillooly, D. J., Madshus, I. H., Stang, E., and Stenmark, H. (2002). Hrs sorts ubiquitinated proteins into clathrin-coated microdomains of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 4(5) :394–398.
- [Ramesh et al., 1997] Ramesh, N., Antón, I. M., Hartwig, J. H., and Geha, R. S. (1997). Wip, a protein associated with wiskott-aldrich syndrome pro-

- tein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26) :14671–14676.
- [Raucher and Sheetz, 1999] Raucher, D. and Sheetz, M. P. (1999). Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis. *J Cell Biol*, 144(3) :497–506.
- [Raucher and Sheetz, 2000] Raucher, D. and Sheetz, M. P. (2000). Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J Cell Biol*, 148(1) :127–136.
- [Raucher et al., 2000] Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J. D., Sheetz, M. P., and Meyer, T. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell*, 100(2) :221–228.
- [Reddy et al., 2001] Reddy, A., Caler, E. V., and Andrews, N. W. (2001). Plasma membrane repair is mediated by ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes. *Cell*, 106(2) :157–169.
- [Ridley et al., 1992] Ridley, A. J., Paterson, H. F., Johnston, C. L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small gtp-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70(3) :401–410.
- [Robinson and Pearse, 1986] Robinson, M. S. and Pearse, B. M. (1986). Immunofluorescent localization of 100k coated vesicle proteins. *J Cell Biol*, 102(1) :48–54.
- [Rodal et al., 2005] Rodal, A. A., Sokolova, O., Robins, D. B., Daugherty, K. M., Hippenmeyer, S., Riezman, H., Grigorieff, N., and Goode, B. L. (2005). Conformational changes in the arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat Struct Mol Biol*, 12(1) :26–31.
- [Rogers et al., 2003] Rogers, S. L., Wiedemann, U., Stuurman, N., and Vale, R. D. (2003). Molecular requirements for actin-based lamella formation in drosophila s2 cells. *J Cell Biol*, 162(6) :1079–1088.
- [Rohatgi et al., 2000] Rohatgi, R., Ho, H. Y., and Kirschner, M. W. (2000). Mechanism of n-wasp activation by cdc42 and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Cell Biol*, 150(6) :1299–1310.
- [Rohatgi et al., 1999] Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999). The interaction between n-wasp and the arp2/3 complex links cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell*, 97(2) :221–231.
- [Rohatgi et al., 2001] Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the n-wasp-arp2/3 pathway. *J Biol Chem*, 276(28) :26448–26452.
- [ROTH and PORTER, 1964] ROTH, T. F. and PORTER, K. R. (1964). Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito aedes aegypti. I. *J Cell Biol*, 20 :313–332.

- [Rouiller et al., 2008] Rouiller, I., Xu, X.-P., Amann, K. J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T. D., Volkman, N., and Hanein, D. (2008). The structural basis of actin filament branching by the arp2/3 complex. *J Cell Biol*, 180(5) :887–895.
- [Royle et al., 2005] Royle, S. J., Bright, N. A., and Lagnado, L. (2005). Clathrin is required for the function of the mitotic spindle. *Nature*, 434(7037) :1152–1157.
- [Royle and Lagnado, 2006] Royle, S. J. and Lagnado, L. (2006). Trimerisation is important for the function of clathrin at the mitotic spindle. *J Cell Sci*, 119(Pt 19) :4071–4078.
- [Sachse et al., 2002] Sachse, M., Urbé, S., Oorschot, V., Strous, G. J., and Klumperman, J. (2002). Bilayered clathrin coats on endosomal vacuoles are involved in protein sorting toward lysosomes. *Mol Biol Cell*, 13(4) :1313–1328.
- [Salcini et al., 1999] Salcini, A. E., Chen, H., Iannolo, G., Camilli, P. D., and Fiore, P. P. D. (1999). Epidermal growth factor pathway substrate 15, eps15. *Int J Biochem Cell Biol*, 31(8) :805–809.
- [Sallee et al., 2008] Sallee, N. A., Rivera, G. M., Dueber, J. E., Vasilescu, D., Mullins, R. D., Mayer, B. J., and Lim, W. A. (2008). The pathogen protein espf(u) hijacks actin polymerization using mimicry and multivalency. *Nature*, 454(7207) :1005–1008.
- [Sauer et al., 2005] Sauer, G., Körner, R., Hanisch, A., Ries, A., Nigg, E. A., and Silljé, H. H. W. (2005). Proteome analysis of the human mitotic spindle. *Mol Cell Proteomics*, 4(1) :35–43.
- [Schlossman et al., 1984] Schlossman, D. M., Schmid, S. L., Braell, W. A., and Rothman, J. E. (1984). An enzyme that removes clathrin coats : purification of an uncoating atpase. *J Cell Biol*, 99(2) :723–733.
- [Schmoranzer et al., 2003] Schmoranzer, J., Kreitzer, G., and Simon, S. M. (2003). Migrating fibroblasts perform polarized, microtubule-dependent exocytosis towards the leading edge. *J Cell Sci*, 116(Pt 22) :4513–4519.
- [Schmoranzer and Simon, 2003] Schmoranzer, J. and Simon, S. M. (2003). Role of microtubules in fusion of post-golgi vesicles to the plasma membrane. *Mol Biol Cell*, 14(4) :1558–1569.
- [Sheetz, 2001] Sheetz, M. P. (2001). Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(5) :392–396.
- [Sheetz et al., 1999] Sheetz, M. P., Felsenfeld, D., Galbraith, C. G., and Choquet, D. (1999). Cell migration as a five-step cycle. *Biochem Soc Symp*, 65 :233–243.
- [Sheetz et al., 2006] Sheetz, M. P., Sable, J. E., and Döbereiner, H.-G. (2006). Continuous membrane-cytoskeleton adhesion requires continuous accommodation to lipid and cytoskeleton dynamics. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 35 :417–434.

- [Shi et al., 1995] Shi, Y., Alin, K., and Goff, S. P. (1995). Abl-interactor-1, a novel sh3 protein binding to the carboxy-terminal portion of the abl protein, suppresses v-abl transforming activity. *Genes Dev*, 9(21) :2583–2597.
- [Shikama et al., 1999] Shikama, N., Lee, C. W., France, S., Delavaine, L., Lyon, J., Krstic-Demonacos, M., and Thangue, N. B. L. (1999). A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell*, 4(3) :365–376.
- [Shimada et al., 2007] Shimada, A., Niwa, H., Tsujita, K., Suetsugu, S., Nitta, K., Hanawa-Suetsugu, K., Akasaka, R., Nishino, Y., Toyama, M., Chen, L., Liu, Z.-J., Wang, B.-C., Yamamoto, M., Terada, T., Miyazawa, A., Tanaka, A., Sugano, S., Shirouzu, M., Nagayama, K., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2007). Curved efc/f-bar-domain dimers are joined end to end into a filament for membrane invagination in endocytosis. *Cell*, 129(4) :761–772.
- [Shimizu et al., 2009] Shimizu, H., Nagamori, I., Yabuta, N., and Nojima, H. (2009). Gak, a regulator of clathrin-mediated membrane traffic, also controls centrosome integrity and chromosome congression. *J Cell Sci*, 122(Pt 17) :3145–3152.
- [Simpson et al., 1997] Simpson, F., Peden, A. A., Christopoulou, L., and Robinson, M. S. (1997). Characterization of the adaptor-related protein complex, ap-3. *J Cell Biol*, 137(4) :835–845.
- [Sossey-Alaoui et al., 2007] Sossey-Alaoui, K., Li, X., and Cowell, J. K. (2007). c-abl-mediated phosphorylation of wave3 is required for lamellipodia formation and cell migration. *J Biol Chem*, 282(36) :26257–26265.
- [Stamnes, 2002] Stamnes, M. (2002). Regulating the actin cytoskeleton during vesicular transport. *Curr Opin Cell Biol*, 14(4) :428–433.
- [Steffen et al., 2006] Steffen, A., Faix, J., Resch, G. P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J. V., Rottner, K., and Stradal, T. E. B. (2006). Filopodia formation in the absence of functional wave- and arp2/3-complexes. *Mol Biol Cell*, 17(6) :2581–2591.
- [Steffen et al., 2004] Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T. E. B. (2004). Sra-1 and nap1 link rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J*, 23(4) :749–759.
- [Stewart et al., 1999] Stewart, D. M., Tian, L., and Nelson, D. L. (1999). Mutations that cause the wiskott-aldrich syndrome impair the interaction of wiskott-aldrich syndrome protein (wasp) with wasp interacting protein. *J Immunol*, 162(8) :5019–5024.
- [Stuart et al., 2006] Stuart, J. R., Gonzalez, F. H., Kawai, H., and Yuan, Z.-M. (2006). c-abl interacts with the wave2 signaling complex to induce membrane ruffling and cell spreading. *J Biol Chem*, 281(42) :31290–31297.
- [Suetsugu et al., 2002] Suetsugu, S., Hattori, M., Miki, H., Tezuka, T., Yamamoto, T., Mikoshiba, K., and Takenawa, T. (2002). Sustained activation of n-wasp through phosphorylation is essential for neurite extension. *Dev Cell*, 3(5) :645–658.
- [Suetsugu et al., 2006a] Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006a). Optimization of wave2 complex-induced

- actin polymerization by membrane-bound irsp53, pip(3), and rac. *J Cell Biol*, 173(4) :571–585.
- [Suetsugu et al., 1999] Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999). Identification of two human wave/scar homologues as general actin regulatory molecules which associate with the arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 260(1) :296–302.
- [Suetsugu et al., 2006b] Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006b). The rac binding domain/irsp53-mim homology domain of irsp53 induces rac-dependent membrane deformation. *J Biol Chem*, 281(46) :35347–35358.
- [Suetsugu and Takenawa, 2003] Suetsugu, S. and Takenawa, T. (2003). Translocation of n-wasp by nuclear localization and export signals into the nucleus modulates expression of hsp90. *J Biol Chem*, 278(43) :42515–42523.
- [Sutherland et al., 2001] Sutherland, H. G., Mumford, G. K., Newton, K., Ford, L. V., Farrall, R., Dellaire, G., Cáceres, J. F., and Bickmore, W. A. (2001). Large-scale identification of mammalian proteins localized to nuclear sub-compartments. *Hum Mol Genet*, 10(18) :1995–2011.
- [Svitkina and Borisy, 1999] Svitkina, T. M. and Borisy, G. G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol*, 145(5) :1009–1026.
- [Svitkina et al., 2003] Svitkina, T. M., Bulanova, E. A., Chaga, O. Y., Vignjevic, D. M., ichiro Kojima, S., Vasiliev, J. M., and Borisy, G. G. (2003). Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol*, 160(3) :409–421.
- [Tahara et al., 2007] Tahara, H., Yokota, E., Igarashi, H., Orii, H., Yao, M., Sonobe, S., Hashimoto, T., Hussey, P. J., and Shimmen, T. (2007). Clathrin is involved in organization of mitotic spindle and phragmoplast as well as in endocytosis in tobacco cell cultures. *Protoplasma*, 230(1-2) :1–11.
- [Takano et al., 2008] Takano, K., Takano, K., Toyooka, K., and Suetsugu, S. (2008). Efc/f-bar proteins and the n-wasp-wip complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J*, 27(21) :2817–2828.
- [Takenawa and Suetsugu, 2007] Takenawa, T. and Suetsugu, S. (2007). The wasp-wave protein network : connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(1) :37–48.
- [Tanenbaum et al., 2010] Tanenbaum, M. E., Vallenius, T., Geers, E. F., Greene, L., Mäkelä, T. P., and Medema, R. H. (2010). Cyclin g-associated kinase promotes microtubule outgrowth from chromosomes during spindle assembly. *Chromosoma*, 119(4) :415–424.
- [Taylor et al., 2011] Taylor, M. J., Perrais, D., and Merrifield, C. J. (2011). A high precision survey of the molecular dynamics of mammalian clathrin-mediated endocytosis. *PLoS Biol*, 9(3) :e1000604.

- [Thomas D Pollard, 2010] Thomas D Pollard, T. C. E. (2010). *Cell Biology*. ELSEVIER.
- [Ti et al., 2011] Ti, S.-C., Jurgenson, C. T., Nolen, B. J., and Pollard, T. D. (2011). Structural and biochemical characterization of two binding sites for nucleation-promoting factor wasp-vca on arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- [Togo et al., 2000] Togo, T., Krasieva, T. B., and Steinhardt, R. A. (2000). A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Mol Biol Cell*, 11(12) :4339–4346.
- [Torres and K, 2003] Torres, E. and K, M. (2003). Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in wasp. *Mol Cell*, 11(5) :1215–1227.
- [Torres and K, 2006] Torres, E. and K, M. (2006). Protein-tyrosine kinase and gtpase signals cooperate to phosphorylate and activate wiskott-aldrich syndrome protein (wasp)/neuronal wasp. *J Biol Chem*, 281(6) :3513–3520.
- [Ungewickell and Branton, 1981] Ungewickell, E. and Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289(5796) :420–422.
- [Ungewickell et al., 1982] Ungewickell, E., Unanue, E. R., and Branton, D. (1982). Functional and structural studies on clathrin triskelions and baskets. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 46 Pt 2 :723–731.
- [Ungewickell and Ungewickell, 1991] Ungewickell, E. and Ungewickell, H. (1991). Bovine brain clathrin light chains impede heavy chain assembly in vitro. *J Biol Chem*, 266(19) :12710–12714.
- [Ungewickell et al., 1995] Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S. E., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martin, B., Greene, L. E., and Eisenberg, E. (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378(6557) :632–635.
- [Urano et al., 2001] Urano, T., Liu, J., Zhang, P., Yx, F., Egile, C., Li, R., Mueller, S. C., and Zhan, X. (2001). Activation of arp2/3 complex-mediated actin polymerization by cortactin. *Nat Cell Biol*, 3(3) :259–266.
- [Veale et al., 2010] Veale, K. J., Offenhäuser, C., Whittaker, S. P., Estrella, R. P., and Murray, R. Z. (2010). Recycling endosome membrane incorporation into the leading edge regulates lamellipodia formation and macrophage migration. *Traffic*, 11(10) :1370–1379.
- [Veltman and Insall, 2010] Veltman, D. M. and Insall, R. H. (2010). Wasp family proteins : their evolution and its physiological implications. *Mol Biol Cell*, 21(16) :2880–2893.
- [Vetterkind et al., 2002] Vetterkind, S., Miki, H., Takenawa, T., Klawitz, I., Scheidtmann, K.-H., and Preuss, U. (2002). The rat homologue of wiskott-aldrich syndrome protein (wasp)-interacting protein (wip) associates with actin filaments, recruits n-wasp from the nucleus, and mediates mobilization of actin from stress fibers in favor of filopodia formation. *J Biol Chem*, 277(1) :87–95.

- [Vinson et al., 1998] Vinson, V. K., Cruz, E. M. D. L., Higgs, H. N., and Pollard, T. D. (1998). Interactions of acanthamoeba profilin with actin and nucleotides bound to actin. *Biochemistry*, 37(31) :10871–10880.
- [Volkman et al., 2001] Volkman, N., Amann, K. J., Stoilova-McPhie, S., Egile, C., Winter, D. C., Hazelwood, L., Heuser, J. E., Li, R., Pollard, T. D., and Hanein, D. (2001). Structure of arp2/3 complex in its activated state and in actin filament branch junctions. *Science*, 293(5539) :2456–2459.
- [Wang et al., 2006] Wang, J., Wang, Y., and O’Halloran, T. J. (2006). Clathrin light chain : importance of the conserved carboxy terminal domain to function in living cells. *Traffic*, 7(7) :824–832.
- [Wang et al., 2003] Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., and Yin, H. L. (2003). Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor ap-1 complexes to the golgi. *Cell*, 114(3) :299–310.
- [Wang, 1985] Wang, Y. L. (1985). Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts : possible role of treadmilling. *J Cell Biol*, 101(2) :597–602.
- [Warren, 1993] Warren, G. (1993). Membrane partitioning during cell division. *Annu Rev Biochem*, 62 :323–348.
- [Weaver et al., 2002] Weaver, A. M., Heuser, J. E., Karginov, A. V., lih Lee, W., Parsons, J. T., and Cooper, J. A. (2002). Interaction of cortactin and n-wasp with arp2/3 complex. *Curr Biol*, 12(15) :1270–1278.
- [Weaver et al., 2001] Weaver, A. M., Karginov, A. V., Kinley, A. W., Weed, S. A., Li, Y., Parsons, J. T., and Cooper, J. A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol*, 11(5) :370–374.
- [Weiner et al., 2002] Weiner, O. D., Neilsen, P. O., Prestwich, G. D., Kirschner, M. W., Cantley, L. C., and Bourne, H. R. (2002). A ptdinsp(3)- and rho gtpase-mediated positive feedback loop regulates neutrophil polarity. *Nat Cell Biol*, 4(7) :509–513.
- [Welch et al., 1998] Welch, M. D., blatt, J., Skoble, J., Portnoy, D. A., and Mitchison, T. J. (1998). Interaction of human arp2/3 complex and the listeria monocytogenes acta protein in actin filament nucleation. *Science*, 281(5373) :105–108.
- [Welch et al., 1997] Welch, M. D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T. J. (1997). Actin polymerization is induced by arp2/3 protein complex at the surface of listeria monocytogenes. *Nature*, 385(6613) :265–269.
- [Wilbur et al., 2008] Wilbur, J. D., Chen, C.-Y., Manalo, V., Hwang, P. K., Fletterick, R. J., and Brodsky, F. M. (2008). Actin binding by hip1 (huntingtin-interacting protein 1) and hip1r (hip1-related protein) is regulated by clathrin light chain. *J Biol Chem*, 283(47) :32870–32879.
- [Wilbur et al., 2010] Wilbur, J. D., Hwang, P. K., Ybe, J. A., Lane, M., Sellers, B. D., Jacobson, M. P., Fletterick, R. J., and Brodsky, F. M. (2010). Confor-

- mation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Dev Cell*, 18(5) :841–848.
- [Winter et al., 1997] Winter, D., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Li, R. (1997). The complex containing actin-related proteins arp2 and arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Curr Biol*, 7(7) :519–529.
- [Witke et al., 2001] Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M., and Kwiatkowski, D. J. (2001). Profilin i is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(7) :3832–3836.
- [Wu et al., 2004] Wu, X., Suetsugu, S., Cooper, L. A., Takenawa, T., and Guan, J.-L. (2004). Focal adhesion kinase regulation of n-wasp subcellular localization and function. *J Biol Chem*, 279(10) :9565–9576.
- [Wu et al., 2006] Wu, X., Yoo, Y., Okuhama, N. N., Tucker, P. W., Liu, G., and Guan, J.-L. (2006). Regulation of rna-polymerase-ii-dependent transcription by n-wasp and its nuclear-binding partners. *Nat Cell Biol*, 8(7) :756–763.
- [Yamaguchi et al., 2005] Yamaguchi, H., Lorenz, M., Kempiak, S., Sarmiento, C., Coniglio, S., Symons, M., Segall, J., Eddy, R., Miki, H., Takenawa, T., and Condeelis, J. (2005). Molecular mechanisms of invadopodium formation : the role of the n-wasp-arp2/3 complex pathway and cofilin. *J Cell Biol*, 168(3) :441–452.
- [Yamauchi et al., 2008] Yamauchi, T., Ishida, T., Nomura, T., Shinagawa, T., Tanaka, Y., Yonemura, S., and Ishii, S. (2008). A b-myb complex containing clathrin and filamin is required for mitotic spindle function. *EMBO J*, 27(13) :1852–1862.
- [Yamazaki et al., 2007] Yamazaki, D., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2007). Rac-wave-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci*, 120(Pt 1) :86–100.
- [Yamazaki et al., 2003] Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S.-I., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003). Wave2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature*, 424(6947) :452–456.
- [Yan et al., 2003] Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S. B., Kirschner, M. W., Geha, R., S, F., and Alt, F. W. (2003). Wave2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and rac-mediated actin-based motility. *EMBO J*, 22(14) :3602–3612.
- [Ybe et al., 1998] Ybe, J. A., Greene, B., Liu, S. H., Pley, U., Parham, P., and Brodsky, F. M. (1998). Clathrin self-assembly is regulated by three light-chain residues controlling the formation of critical salt bridges. *EMBO J*, 17(5) :1297–1303.
- [Zallen et al., 2002] Zallen, J. A., Cohen, Y., Hudson, A. M., Cooley, L., Wieschaus, E., and Schejter, E. D. (2002). Scar is a primary regulator of arp2/3-dependent morphological events in drosophila. *J Cell Biol*, 156(4) :689–701.

- [Zaremba and Keen, 1983] Zaremba, S. and Keen, J. H. (1983). Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J Cell Biol*, 97(5 Pt 1) :1339–1347.
- [Zettl and Way, 2002] Zettl, M. and Way, M. (2002). The wh1 and evh1 domains of wasp and ena/vasp family members bind distinct sequence motifs. *Curr Biol*, 12(18) :1617–1622.
- [Zhang et al., 1998] Zhang, B., Koh, Y. H., Beckstead, R. B., Budnik, V., Ganetzky, B., and Bellen, H. J. (1998). Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron*, 21(6) :1465–1475.
- [Zuchero et al., 2009] Zuchero, J. B., Coutts, A. S., Quinlan, M. E., Thangue, N. B. L., and Mullins, R. D. (2009). p53-cofactor jmy is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat Cell Biol*, 11(4) :451–459.

Quatrième partie

Annexes

Annexe A

Derivery *et al.* (2009)

Developmental Cell, 17, 712-723

The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex.

Derivery E, Sousa C, **Gautier JJ**, Lombard B, Loew D, Gautreau A.

Developmental Cell, 2009, 17, 712-723.

Au cours de cette étude j'ai purifié différents fragments de la protéine WASH dans le but d'effectuer des tests fonctionnels, mais aussi dans le but de générer un anticorps spécifique de WASH. Nous avons ensuite purifié cet anticorps.

The Arp2/3 Activator WASH Controls the Fission of Endosomes through a Large Multiprotein Complex

Emmanuel Derivery,^{1,2,3} Carla Sousa,³ Jérémie J. Gautier,³ Bérangère Lombard,¹ Damarys Loew,¹ and Alexis Gautreau^{1,2,3,*}

¹Institut Curie, Centre de Recherche

²CNRS UMR144

26 rue d'Ulm, 75248 Paris Cedex 05, France

³CNRS UPR3082, Laboratoire d'Enzymologie et de Biochimie Structurales, Bât. 34 Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

*Correspondence: alexis.gautreau@lebs.cnrs-gif.fr

DOI 10.1016/j.devcel.2009.09.010

SUMMARY

The Arp2/3 complex generates branched actin networks when activated by Nucleation Promoting Factors (NPFs). Recently, the WASH family of NPFs has been identified, but its cellular role is unclear. Here, we show that WASH generates an actin network on a restricted domain of sorting and recycling endosomes. We found that WASH belongs to a multiprotein complex containing seven subunits, including the heterodimer of capping protein (CP). In vitro, the purified WASH complex activates Arp2/3-mediated actin nucleation and binds directly to liposomes. WASH also interacts with dynamin. WASH depletion gives rise to long membrane tubules pulled out from endosomes along microtubules, as does dynamin inhibition. Accordingly, WASH is required for efficient transferrin recycling. Together, these data suggest that the WASH molecular machine, integrating CP with a NPF, controls the fission of endosomes through an interplay between the forces generated by microtubule motors and actin polymerization.

INTRODUCTION

The actin cytoskeleton is a dynamic ensemble of microfilaments that contributes to cell morphogenesis. The polarized assembly of actin filaments often occurs at the surface of membranes, developing forces that cause their deformation or movement. Several classes of actin nucleators initiate these actin-based processes (Pollard, 2007). Among these, the Arp2/3 complex both nucleates and organizes actin filaments, as it associates with a preexisting filament to induce the assembly of a branching filament, thus generating dendritic arrays. The Arp2/3 complex needs to be activated by Nucleation Promoting Factors (NPFs). The most potent NPFs contain a C-terminal VCA domain (Vernpulin homology or WH2-Connector-Acidic) that binds to both actin and the Arp2/3 complex (Pollard, 2007). VCA domain-containing proteins are divided into four families: WASP, WAVE, WHAMM/JMY, and WASH. Whereas the existence of WASP and WAVE families has been known for a decade, WHAMM/

JMY and WASH families were only recently discovered (Campellone et al., 2008; Linardopoulou et al., 2007; Zuchero et al., 2009). A unique amino-terminal domain characterizes each of these families.

The cellular functions of NPFs have been extensively studied (Takenawa and Suetsugu, 2007). WAVE proteins are required for the formation of lamellipodia and membrane ruffles. WASP proteins are required for the formation of podosomes and for the internalization step of endocytosis. Importantly, WASP proteins were also found to propel endosomes in the cytoplasm under certain conditions (Benesch et al., 2002 and references therein). WHAMM is required to maintain Golgi morphology and to facilitate transport along the biosynthetic pathway (Campellone et al., 2008). JMY, despite significant homologies to WHAMM, regulates transcription and cell migration (Zuchero et al., 2009).

WASH is an NPF in vitro, but its role in vivo is unclear. The WASH family comprises a single gene in *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans*, and mouse genomes, but several paralogous genes in the human genome (Linardopoulou et al., 2007). The WASH gene is essential in *Drosophila*, where it controls morphogenesis of the egg chamber (Linardopoulou et al., 2007; Liu et al., 2009). Here, we characterized the role and the regulation of mammalian WASH with a focus on the single mouse protein. We uncovered that WASH nucleates actin on endosomes, and that this branched actin network plays an essential role in controlling fission of these organelles. Moreover, we report the existence of a multiprotein complex containing WASH, which is likely conserved in species possessing WASH proteins.

RESULTS

WASH Localizes to a Restricted Domain of Sorting and Recycling Endosomes

We first examined WASH expression and localization by using a polyclonal antibody we generated against the VCA domain. The affinity-purified antibody recognized a major band in 3T3 cell lysate by western blot (see Figure S1A available online). This band was markedly reduced upon siRNA-mediated depletion of WASH (Figure 1A), whereas the amounts of the other NPFs—WHAMM, N-WASP, and WAVE2—were unaffected (Figure S1B). An analysis of several mouse tissues indicated that WASH expression is ubiquitous (Figure 1B; Figure S1C for full

gel). In 3T3 cells, endogenous WASH was localized by immunofluorescence in numerous cytoplasmic spots in the perinuclear region. These spots were reduced in intensity upon WASH depletion, confirming staining specificity (Figure S1D). Because the WASH antibody targets the VCA domain, which is relatively conserved among NPFs, we verified in addition that the WASH antibody does not immunoprecipitate WHAMM, N-WASP, and WAVE2, in conditions under which WASH was fully depleted from the lysate (Figure S1E). To confirm this localization, we generated a stable 3T3 cell line expressing GFP-WASH. The overexpression of GFP-WASH in this line is moderate compared to endogenous WASH in the control line expressing GFP alone (Figure S1F). GFP-WASH expression was accompanied by a downregulation of endogenous WASH, suggesting that GFP-WASH takes the place of endogenous WASH in this cell line. Indeed, the localization of GFP-WASH was the same as endogenous WASH (Figure S1G). A localization in lamellipodia upon transient overexpression of GFP-WASH was previously reported (Linardopoulou et al., 2007), but we found no evidence of endogenous WASH in lamellipodia of several cell lines (data not shown). WASH was consistently present in cytoplasmic spots.

To characterize these spots, we attempted to colocalize them with a series of well-characterized markers. There was no significant colocalization with the *cis*-Golgi marker GM130 (Figure 1C), nor with the *trans*-Golgi network marker TGN38 (Figure 1D). To label sorting and recycling endosomes, cells were loaded until equilibrium with fluorescent transferrin (Tf) (Figure 1E). Colocalization was extensive in this case. Consistently, colocalization was also extensive with EEA1, a marker of sorting endosomes (also known as Early Endosomes) (Figure 1F). In 3T3 cells, sorting endosomes are relatively clustered in the perinuclear region. To examine endosomal compartments involved in the degradative pathway, we labeled lysosomes with Lamp1 (Figure 1G). Colocalization of Lamp1 with WASH was limited to occasional WASH spots on lysosomes.

To confirm these steady-state findings, we performed kinetic analyses of Tf uptake and recycling (Figure S2). The first structures seen, clathrin-coated pits, were devoid of WASH. However, as early as 2 min later, Tf reached sorting endosomes, in which a high level of colocalization with WASH was observed. Importantly, this colocalization was maintained until the Tf signal decreased because of continued recycling. These results confirm that WASH is associated with both sorting and recycling endosomes. We also followed the LDL cargo, which is sorted toward the degradative pathway (Figure S3). After a 10 min pulse incubation, LDL reached sorting endosomes, in which it clearly colocalized with WASH. When LDL was chased, it appeared in larger organelles, lysosomes, most of which were not labeled by WASH antibodies. These kinetic analyses confirmed that WASH localizes to endosomes, with an enrichment in the recycling pathway compared to the degradative pathway.

WASH localization was further characterized by using Rab GTPases, which coordinate trafficking events and can be used as markers of different compartments (Zerial and McBride, 2001). Recycling pathways were followed by using Rab4 and Rab11, markers of fast and slow recycling, respectively. Colocalization between WASH and Rab11 was evaluated by time-lapse imaging, because the GFP-Rab11 signal blurs upon fixation. Consistent with previous results, WASH colocalized with

both Rab4 and Rab11, although to a higher extent with Rab4 (Figures 1H and 1I; Movies S1 and S2). Rab5 is enriched in newly internalized vesicles and sorting endosomes, where it regulates fusion events. Colocalization between WASH and Rab5 was significant (Figure 1J; Movie S3), confirming the localization of WASH on sorting endosomes. Finally, we examined Rab7, which is a marker of late endosomes in the degradative pathway. WASH was moderately associated with Rab7 compartments (Figure 1K). Together, these results establish that WASH is localized on different populations of endosomes, with an enrichment in the recycling pathway compared to the degradative pathway. This distribution of WASH in the different endosomal compartments is summarized in Figure 1L.

Interestingly, this colocalization analysis revealed that WASH never fully overlaps with any given marker. Even with Tf, WASH appeared juxtaposed rather than superimposed on Tf spots (inset of Figure 1E), as one would expect if WASH was covering Tf-containing endosomes. To better visualize the two signals, we performed a three-dimensional (3D) reconstruction after sectioning of the cell along the z axis (Figure 2A; Movie S4). This confirmed that WASH and Tf fluorescence centroids were not superimposed. Because WASH spots are localized at different positions on endosomes in a single field, it rules out any aberrant translational shift in the acquisition of the two channels. Dual-color time-lapse imaging further confirmed that the two spots were always associated and thus did not correspond to different organelles only transiently associated (Figure 2B; Movie S5). To further prove this point, centroids of fluorescence were tracked over time, and the distance between them was calculated (Figure 2C; Figure S4 for the analysis of multiple endosomes). This distance fluctuates over time, between 0 and 0.3 μm , which is the apparent radius of the Tf-containing vesicle. Importantly, there was no influence of endosome movement on the fluctuation of this distance. This is a strong argument that WASH has a restricted localization on endosomal membranes. Because the size of endosomes is about the resolution of optical microscopy, we enlarged endosomes by expressing the active form of Rab5, which promotes endosomal fusion (Zerial and McBride, 2001). As expected, WASH staining did not cover the periphery of these enlarged endosomes, but displayed rather discrete spots (Figure 2D). A 3D reconstruction unambiguously established that WASH is present on distinct domains at the surface of these large endosomes (Figure 2E; Movie S6). These enlarged endosomes additionally revealed that the WASH domains were highly dynamic at their surface (Movie S7).

WASH Activates Arp2/3-Mediated Actin Polymerization on Endosomes

F-actin, the Arp2/3 complex, and the marker of branched actin networks, cortactin, were previously detected on endosomes (Kaksonen et al., 2000). However, the NPF responsible is not yet known; thus, we examined whether WASH would polymerize actin on endosomes. The vast majority of WASH spots appeared to be associated with small F-actin structures (Figure 3A). Importantly, in dual-color time-lapse imaging, the association between WASH and F-actin was continuous over time (Movie S8). Consistent with the F-actin staining, most WASH spots also contained the Arp2/3 complex (Figure 3B). However, there were more Arp2/3 spots than WASH spots in the perinuclear region, likely

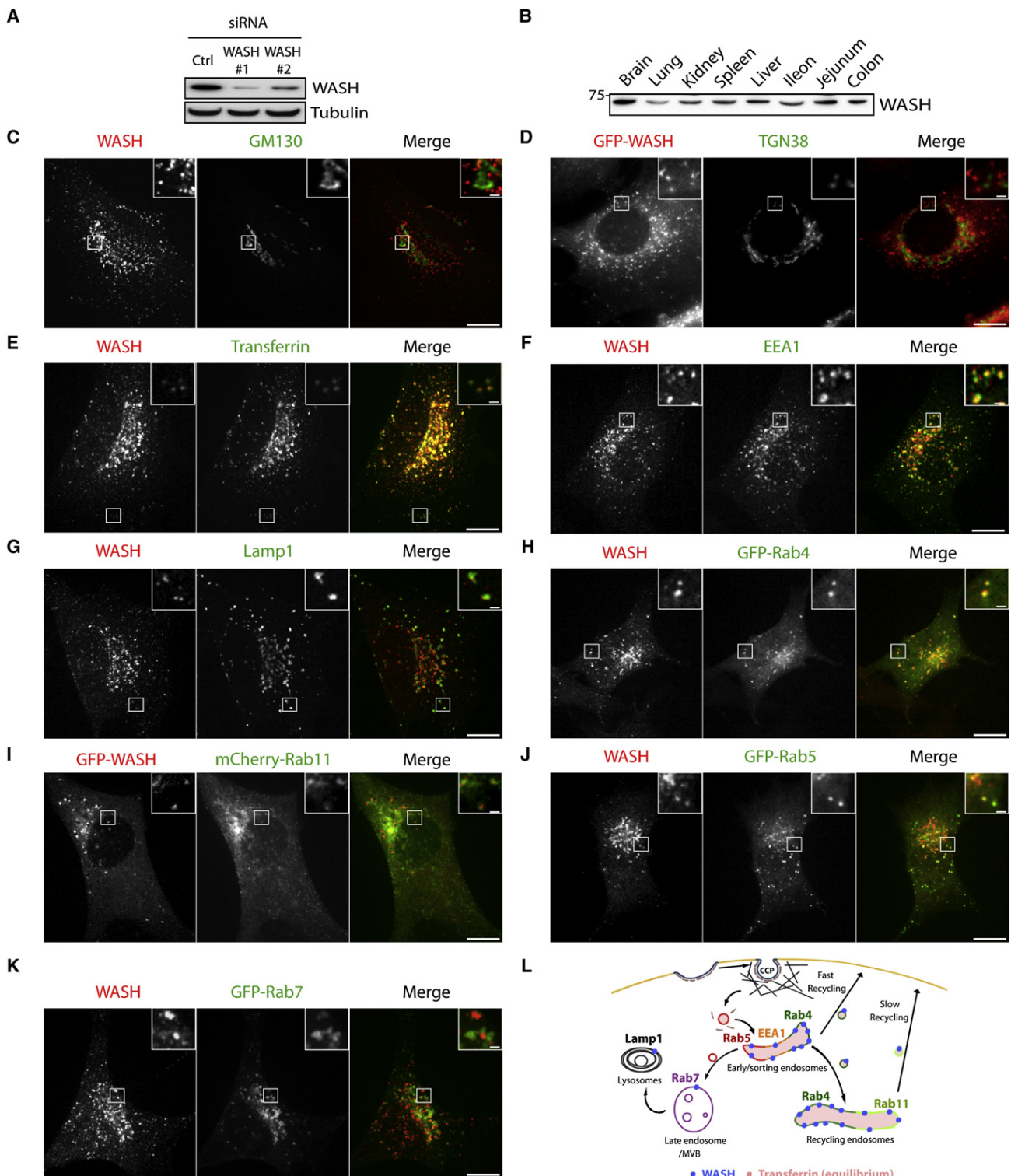


Figure 1. WASH Localizes to Sorting and Recycling Endosomes

(A) Specificity of WASH antibodies is validated by western blot lysates of siRNA-transfected 3T3 cells.

(B) WASH is ubiquitously expressed in mouse tissues.

(C–K) Colocalization of WASH with various endocytic markers. 3T3 cells were processed for immunofluorescence with the indicated antibodies. Rab11-expressing cells were imaged live, and a single image extracted from the movie is shown. A single plane of spinning disk confocal microscopy is shown, except for TGN38 (epifluorescence). A stable 3T3 line expressing GFP-WASH is used when indicated. Fluorescent fusion proteins of Rab 4, 5, 7, and 11

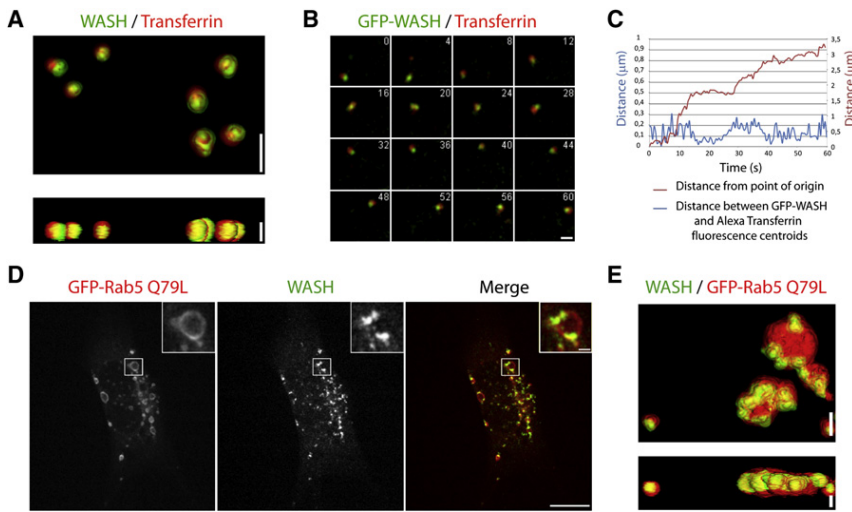


Figure 2. WASH Has a Restricted Localization at the Surface of Endosomes

(A) 3T3 cells were loaded with fluorescent Tf until equilibrium, then processed for immunofluorescence with WASH antibodies. Confocal z sections were acquired and processed for 3D reconstruction. Front and side views are shown. Note the limited overlap between WASH and Tf signals. The scale bar represents 1 μm .

(B) 3T3 cells stably expressing GFP-WASH were loaded with fluorescent Tf until equilibrium, then processed for time-lapse imaging by using spinning disk confocal microscopy. The behavior of a single moving endosome is shown. Elapsed time is in seconds. The scale bar represents 1 μm . WASH and Tf are continuously associated, but do not fully overlap.

(C) Tracking of fluorescence centroids of GFP-WASH and Tf from the endosome displayed in (B) shows that the distance between the two spots is always below the apparent radius of the endosome (0.3 μm), whether or not the endosome moves. The scale bar represents 1 μm .

(D) 3T3 cells were transfected with GFP-Rab5 Q79L to enlarge endosomes and were processed for immunofluorescence with WASH antibodies. Images correspond to a single confocal plane. The scale bar represents 10 μm (1 μm in inserts). WASH localizes to discrete spots at the periphery of the enlarged endosome. (E) Confocal z sections were acquired on a cell treated as in (D) and processed for 3D reconstruction as in (A). The scale bar represents 1 μm .

because Arp2/3 can be recruited by other NPFs such as WHAMM or N-WASP. Interestingly, WASH was absent from the tip of actin comet tails induced by the overexpression of PIP5-kinase (Movie S9), indicating that WASH is not involved in the so-called “endosomal rocketing,” which requires N-WASP (Benesch et al., 2002). Long-range movements of WASH-positive endosomes depended on microtubules (MTs), as revealed by treatment with the MT-depolymerizing drug, nocodazole (Movie S10, to be compared to Movie S5). To prove that WASH was responsible for the actin polymerization on endosomes, transfection of siRNAs was used to deplete WASH from 3T3 cells. Upon WASH depletion, most F-actin spots and a large fraction of Arp2/3 complex spots in the perinuclear region disappeared, indicating that WASH has a major role among the perinuclear NPFs (Figure S5).

The staining of F-actin structures with phalloidin was too crowded to permit an accurate quantification. To quantify Arp2/3 complex and cortactin recruitment on endosomes, we used a mild pre-extraction procedure that allowed us to eliminate specifically the contribution of the cytosolic pool of these proteins (Figure S6A). When cells loaded with fluorescent Tf were examined by immunofluorescence for the localization of the Arp2/3 complex, endosomes were found to associate with the Arp2/3 complex (Figure 3C). Upon WASH depletion, this association was drastically affected (Figure S6 for a second siRNA), even though some perinuclear staining of the Arp2/3 complex was retained, in agreement with the fact that not all perinuclear Arp2/3 complex spots are associated with WASH. Quantifications confirmed that WASH played a major role in recruiting the Arp2/3 complex onto endosomes (Figure 3D).

The same analysis conducted on cortactin recruitment gave similar results (Figures 3E and 3F). To confirm the specificity of this phenotype, we decided to perform rescue experiments in the stable 3T3 cell line expressing GFP-WASH, since transient overexpression of WASH has deleterious effects on Arp2/3-dependent structures (Figure S7B). GFP- or GFP-WASH-expressing cell lines were transfected with a WASH siRNA that recognizes the 3'UTR of WASH, which is absent from the GFP-WASH mRNA. Indeed, endogenous WASH was depleted from GFP-expressing cells, but GFP-WASH was not depleted from GFP-WASH-expressing cells (Figure S7C). Importantly, WASH siRNA transfection induces a loss of Arp2/3 complex (Figure 3G) and cortactin (Figure 3H) recruitment on endosomes in the GFP cell line, but not in the GFP-WASH cell line. This result not only establishes that the lack of Arp2/3 complex and cortactin recruitment on endosomes obtained upon siRNA-mediated depletion of WASH can be rescued, but it also validates that the GFP-WASH fusion protein used in this study is a functional WASH protein.

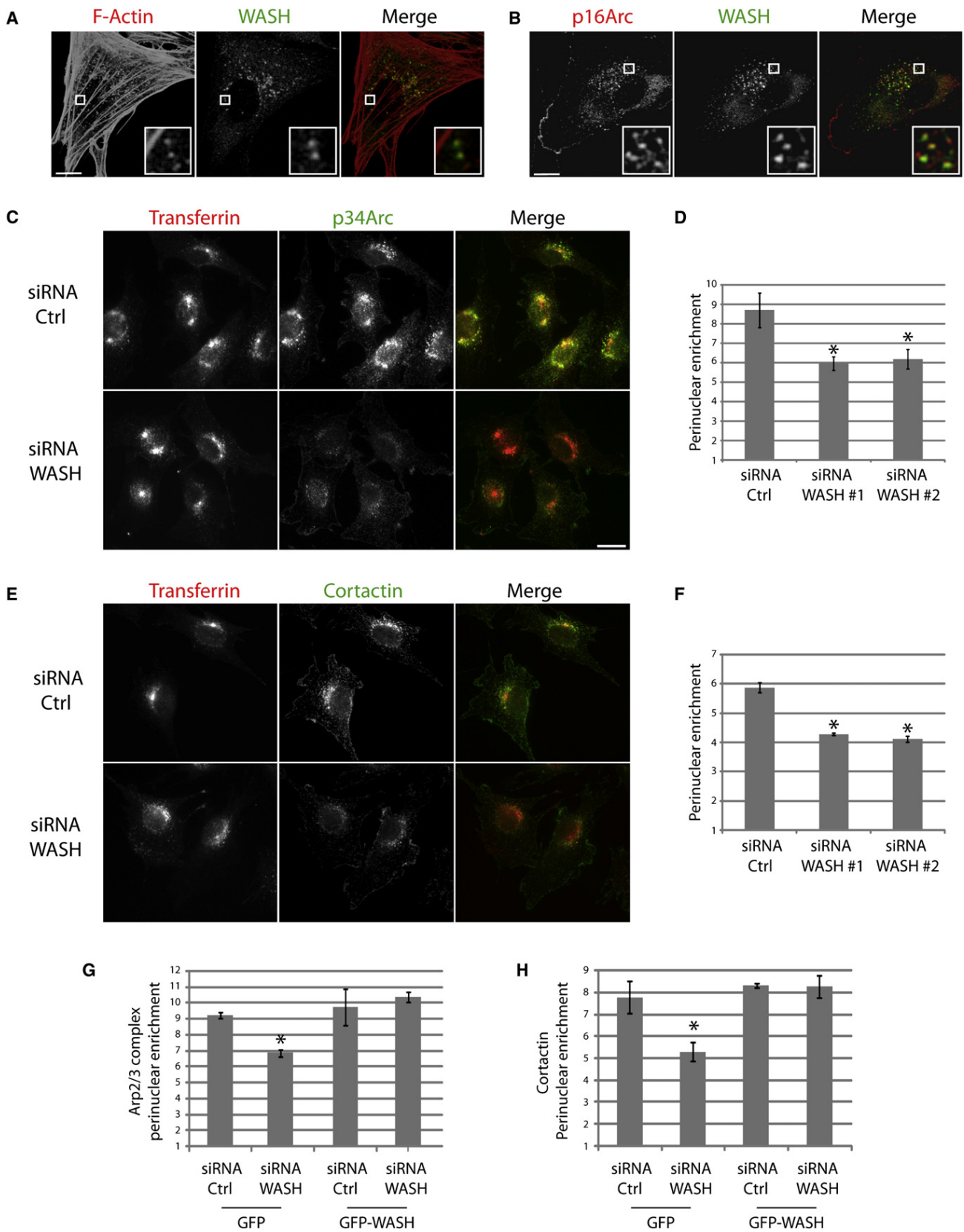
This set of experiments demonstrates that WASH is an active NPF at the surface of endosomes, where it recruits and activates the Arp2/3 complex to induce actin polymerization.

WASH Is Part of a Large Multiprotein Complex Containing CP

An important level of regulation of NPFs is their inclusion in stable multiprotein complexes. N-WASP is associated with WASP-interacting protein (WIP) family proteins, and the WAVE proteins are incorporated into a large complex of five subunits (Takenawa and Suetsugu, 2007). To examine whether WASH is included in

were transiently transfected. When indicated, 3T3 cells were loaded with fluorescent Tf until equilibrium. The scale bars in (C–K) represent 10 μm (1 μm in inserts).

(L) Scheme recapitulating the localization of WASH in the different compartments. CCP, clathrin-coated pit; MVB, multivesicular bodies.



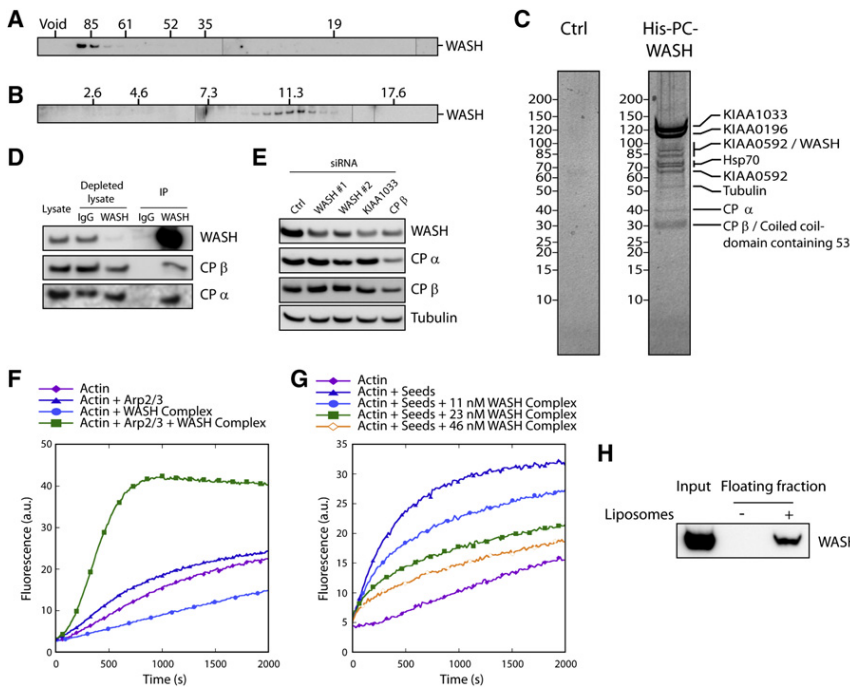


Figure 4. A Multiprotein Complex Containing WASH and Capping Protein Binds to Liposomes and Activates Actin Polymerization In vitro

(A and B) WASH belongs to a high-molecular weight complex. (A) Size-exclusion chromatography of a 3T3 cell lysate. Elution fractions were analyzed by WASH western blot (WB). The Stokes' radius of standards is given in Å. (B) Ultracentrifugation of a 3T3 cell lysate in a sucrose gradient. Fractions were analyzed by WASH WB. The sedimentation coefficient of standards is given in Svedberg (S).

(C) Identification of the WASH complex. 293 cells stably expressing His-PC-WASH or the empty plasmid were lysed and submitted to two steps of affinity chromatography. WASH and its associated proteins were stained by Coomassie blue and identified by mass spectrometry. Molecular weight markers in kDa are indicated on the left of each gel. (D) CP is a bona fide component of the WASH complex. Lysates from 3T3 cells were analyzed by immunoprecipitation with WASH antibodies or nonimmune IgG. Lysates and immunoprecipitates were analyzed by WB with the indicated antibodies. A pool of the CP belongs to the WASH complex.

(E) Depletion of WASH complex subunits downregulates the WASH protein. 3T3 cells were depleted

of KIAA1033, CP β, or WASH by using siRNAs. Amounts of these proteins in total cell lysates were analyzed by WB.

(F) The WASH complex activates Arp2/3-mediated actin nucleation. Conditions: 2.5 μM actin (10% pyrene labeled), 20 nM Arp2/3 complex, and 35 nM WASH complex.

(G) The WASH complex blocks elongation of barbed ends, indicating that the CP contained within the complex is not fully masked. Unlabeled F-actin seeds (1 μM) and the WASH complex were preincubated before addition of G-actin (1.5 μM, 10% pyrene labeled) and initiation of actin polymerization.

(H) The WASH complex binds directly to liposomes. When liposomes made of purified brain lipids, mixed with purified WASH complex, were floated on a sucrose cushion, WASH was brought in the floating fraction, as revealed by WB.

a multiprotein complex, we first estimated its apparent molecular weight by using size-exclusion chromatography. A detergent extract was prepared from 3T3 cells and loaded on a superdex-200 column. A single peak of WASH was detected after the void volume and before the largest marker (thyroglobulin, 669 kDa, 85 Å; Figure 4A). The Stokes' radius of native WASH was estimated at 88 Å. We complemented this analysis by ultracentrifugation. The detergent extract was loaded on top of a linear sucrose gradient. A single peak of WASH was detected

(Figure 4B). WASH sedimented faster than the catalase marker (232 kDa, 11.3 S). The sedimentation coefficient of WASH was estimated at 12.5 S. These values of Stokes' radius and sedimentation coefficient correspond to a molecular weight of ~450 kDa (see Supplemental Data). Because WASH is ~50 kDa, these experiments indicate that WASH is included in a single complex of high molecular weight.

To purify the WASH complex, we selected a stable 293 human cell line expressing WASH dually tagged with (His)₆ and Protein C

Figure 3. WASH Is Required for Arp2/3-Mediated Actin Polymerization on Endosomes

(A and B) WASH is associated with perinuclear structures containing F-actin and the Arp2/3 complex. 3T3 cells were processed for immunofluorescence with WASH antibodies and either (A) fluorescent phalloidin to stain F-actin structures or an (B) antibody recognizing the p16Arc subunit of the Arp2/3 complex. Each image corresponds to a single confocal plane. The scale bar represents 10 μm.

(C) WASH is required for recruitment of the Arp2/3 complex on endosomes. Transfected cells were loaded with fluorescent Tf. Cells were then pre-extracted and processed for immunofluorescence with an antibody recognizing the p34Arc subunit of the Arp2/3 complex. Recruitment of the Arp2/3 complex on endosomes is greatly decreased in WASH-depleted cells. The scale bar represents 10 μm.

(D) Quantification of Arp2/3 complex enrichment on perinuclear endosomes in cells treated as in (C). A perinuclear region of interest is defined by thresholding the Tf signal. This region of interest is then shifted to another region of the cytoplasm. In these two regions with the same area, p34Arc intensities are integrated. Perinuclear enrichment refers to the ratio of these two values. Mean ± standard error of the mean (SEM) of this ratio is plotted (three independent experiments, n > 60 cells in each condition, *p < 0.001 compared with the control).

(E) WASH is required for recruitment of cortactin on endosomes. Cells treated as in (C) were processed for immunofluorescence with a cortactin antibody.

(F) Quantification of cortactin enrichment on perinuclear endosomes in cells treated as described in (E). Quantification as in (D) (three independent experiments, n > 50 cells in each condition, *p < 0.001 compared with the control).

(G and H) Rescue of the recruitment of Arp2/3 and cortactin on endosomes by GFP-WASH expression. Stable 3T3 cell lines expressing either GFP or GFP-WASH were treated and processed as in (C) and (E). GFP-WASH is resistant to the WASH siRNA that targets a region of the 3'UTR, which is absent from the GFP-WASH construct. Arp2/3 (respectively Cortactin) recruitment on Tf-containing endosomes was quantified as in (D) and (F) (mean ± SEM, three independent experiments, n > 40 cells in each condition, *p < 0.001 compared with the control).

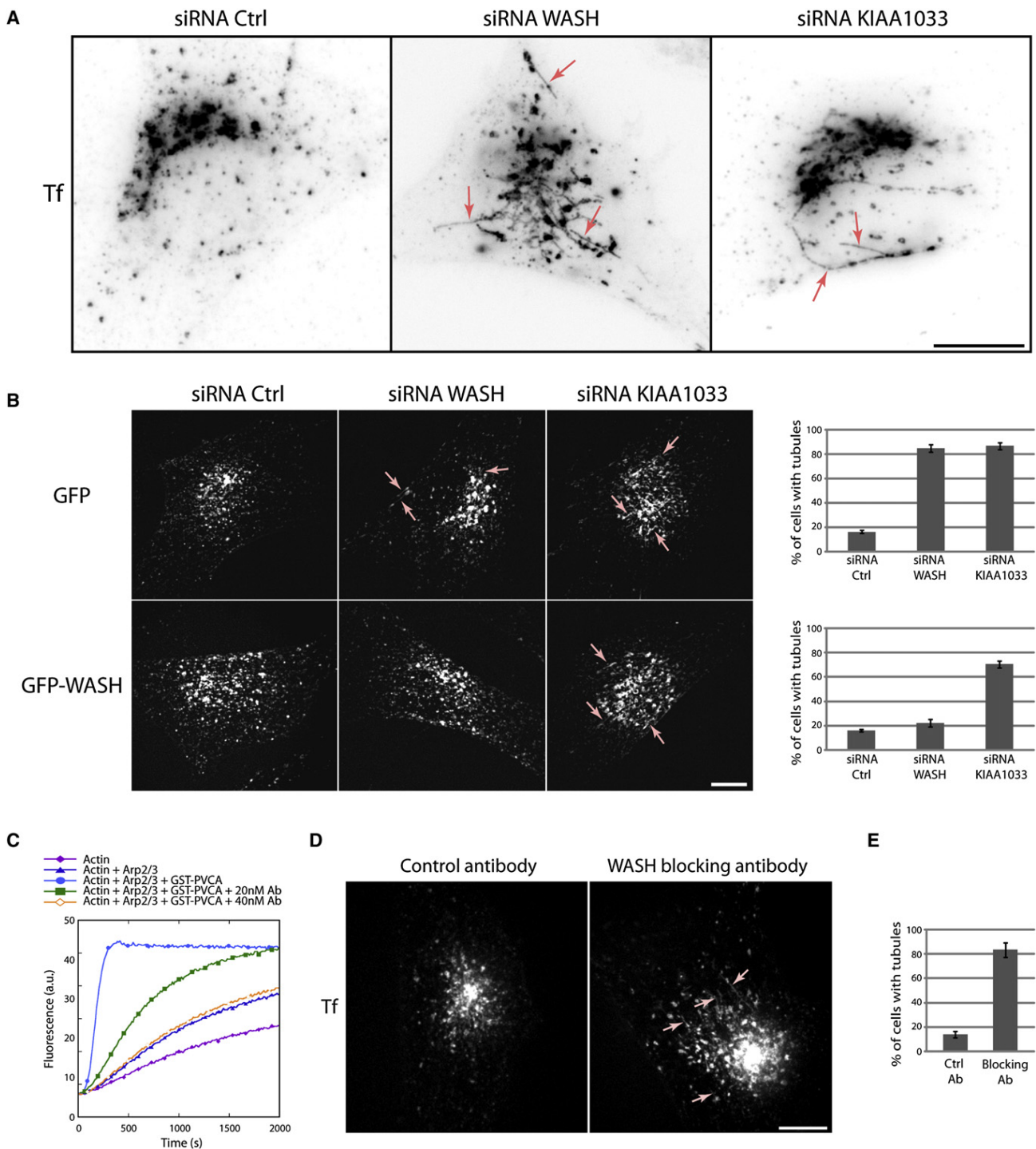


Figure 5. WASH Inhibition Induces Tubulation of Endosomes

(A) WASH was depleted from 3T3 cells by using siRNAs targeting either WASH itself or the KIAA1033 subunit. Cells were loaded with fluorescent Tf until equilibrium, then fixed and observed by epifluorescence microscopy. Numerous long and narrow tubules containing Tf are observed upon WASH depletion (arrows). The scale bar represents 10 μ m.

(B) Rescue of the tubulation phenotype by GFP-WASH expression. Stable 3T3 cell lines expressing either GFP or GFP-WASH were treated with the same siRNAs as in (A). GFP-WASH is resistant to the WASH siRNA that targets the 3'UTR. Cells were imaged by time-lapse spinning disk confocal microscopy in the presence of fluorescent Tf. A single image from the movies is extracted. Arrows indicate tubulated endosomes. siRNA targeting WASH induces tubulation of the GFP cell line, but not of the GFP-WASH cell line, indicating that the tubulation phenotype is specifically due to WASH targeting, and not to an off target. Cells displaying tubules were counted live on the criterion that they exhibited at least one tubule stable for at least 5 s (mean \pm SD of two independent experiments, $n > 82$ cells for each condition). The scale bar represents 10 μ m.

(PC) tags. We then used a Tandem Affinity Purification (TAP) protocol to purify WASH. Upon Coomassie staining, numerous proteins appeared to be associated with WASH, whereas the same experiment conducted with a control line gave no detectable protein (Figure 4C). These proteins were identified by LC-MS/MS (Table S1). Three uncharacterized proteins of high molecular weight, KIAA1033, KIAA0196, and KIAA0592, were associated with WASH. Some Hsp70 proteins were identified, indicating that part of the purified WASH proteins were still in the process of folding. Tubulin was also found to associate with WASH. The two subunits of Capping Protein (CP), α and β , together with the uncharacterized “coiled-coil domain containing 53” protein that comigrates with CP β are WASH partners of lower molecular weight. If the Hsp70 proteins and tubulin are excluded, which are abundant proteins and likely transient interactors, a potential multiprotein complex of seven subunits—KIAA1033, KIAA0196, KIAA0592, WASH, CP α , CP β , and “coiled-coil domain containing 53”—remains. Upon summing the mass of each of these subunits, we obtain a mass of 550 kDa, in relative agreement with the characterization of native WASH given the uncertainty of the Stokes’ radius measurement above the last marker. Because a stoichiometry of one subunit per complex already gives a larger complex than measured, it is likely that we have identified the entire WASH complex.

The presence of CP in the WASH complex was particularly intriguing, because CP is known to exist as a free heterodimer (Cooper and Sept, 2008). To confirm the association of CP with endogenous WASH, we immunoprecipitated WASH efficiently so as to deplete the cell lysate (Figure 4D). The immunoprecipitate contained a pool of both CP α and β . We also found that CP β colocalizes with WASH continuously over time in the perinuclear region (Movie S11). CP β was also found in lamellipodial/ruffling regions of the plasma membrane without WASH, as expected. The WASH immunoprecipitation and the imaging confirmed that at least two distinct pools of CP exist in the cell. A general property of stable multiprotein complexes is that some subunits depend on others for their stability, a phenomenon well described for the WAVE complex (Takenawa and Suetsugu, 2007). We found that WASH was as deeply downregulated in 3T3 cells when KIAA1033 or CP β was targeted as when WASH itself was targeted (Figure 4E). We extended this result in HeLa cells. Transfection of shRNA-encoding plasmids targeting any of the seven proposed subunits destabilized the WASH protein (Figure S8), confirming that these seven proteins are part of the same stable multiprotein complex.

CP inhibits actin dynamics at the barbed end of the filament. It is thus an activity that can oppose the generation of new barbed ends by the active Arp2/3 complex. We tested whether the purified WASH complex was able to promote actin polymerization *in vitro*. We first verified that WASH constructs containing the VCA domain were able to activate Arp2/3-dependent actin polymerization *in vitro* by inducing branches (Figure S9). When the

purified WASH complex was assayed *in vitro*, it was found to enhance the basal Arp2/3 complex activity (Figure 4F), in line with the fact that most WASH spots were associated with F-actin *in vivo*. However, the WASH complex in absence of the Arp2/3 complex slowed down the kinetics of spontaneous actin polymerization (Figure 4F). This effect might be due to sequestration of G-actin by the WH2 domain present in the WASH VCA domain or to the capping activity of CP present in the complex. We ruled out the possibility that this effect might be due to the WH2 domain, because VCA at the same concentration does not display this inhibitory effect (Figure S10B). To directly check whether CP within the WASH complex was active, we specifically monitored elongation at barbed ends by including F-actin seeds. The WASH complex exerted a dose-dependent inhibitory effect (Figure 4G). However, this effect was observed at much higher concentrations than the inhibitory effect obtained with the free heterodimer of CP (Figure S10), indicating that the binding constants of CP to F-actin were significantly affected by its inclusion into the WASH complex. Thus, the WASH complex promotes efficient actin nucleation by the Arp2/3 complex, despite partial activity of its CP component.

We then tested whether the purified WASH complex was able to directly interact with lipids. For this purpose, we generated liposomes from purified bovine brain lipids. When these liposomes were floated on a sucrose cushion by ultracentrifugation, they carried interacting proteins such as the protein IRSp53, containing a RCB/IMD domain (Takenawa and Suetsugu, 2007), but not GST (Figure S11). When these liposomes were mixed with the WASH complex, WASH was detected in the top fraction (Figure 4H). These results indicate that the restricted localization of WASH on endosomal membranes might be due, at least in part, to a direct interaction of the WASH complex with endosomal lipids.

WASH Inactivation Induces Endosome Tubulation

Actin polymerization by the Arp2/3 complex is known to generate a force that pushes or remodels membranes (Takenawa and Suetsugu, 2007). We thus decided to investigate the morphology of endosomes upon WASH inactivation. Fluorescent Tf was loaded until equilibrium in 3T3 cells previously transfected with siRNAs targeting WASH or KIAA1033. Cells depleted of CP β were not analyzed further, because the free pool of CP was depleted together with WASH in this case. Strikingly, in WASH-depleted cells, long and narrow tubules containing Tf were observed (Figure 5A). These tubules were up to 10 μm long and originated from larger round endosomes. Such long tubules were never observed in control cells. We thus sought to confirm these findings by live cell imaging of fluorescent Tf. Indeed, 3T3 cells treated with control siRNAs do not display Tf-positive tubules (Movie S12), whereas many of these were present in WASH-depleted cells (Movie S13). The compartments labeled with the Rab GTPases that colocalized with WASH,

(C) The antibody targeting the VCA domain of WASH blocks the NPF activity of WASH *in vitro*. Conditions: 2.5 μM actin (10% pyrene labeled), 25 nM Arp2/3 complex, and 62.5 nM GST-PVCA.

(D) Microinjection of the WASH antibody induces the tubulation of endosomes. 3T3 cells were microinjected with WASH or control antibodies, loaded with fluorescent Tf until equilibrium, and imaged by time-lapse spinning disk confocal microscopy. The scale bar represents 10 μm .

(E) Quantification as in (B) of the effect seen in (D) (mean \pm SD of three independent experiments, $n > 12$ cells for each condition in duplicate). The difference is statistically relevant ($p < 0.001$, Student’s *t* test).

Rab4, Rab5, Rab7, and Rab11 were all tubulated upon WASH depletion (Figure S12), indicating that this phenotype is not restricted to a subpopulation of endosomes. Time-lapse imaging revealed that Tf-containing tubules were highly dynamic. In many instances, a tubule elongates and the endosome follows on the same track (Figure S13A), suggesting that both endosome tubulation and movement depend on MT and MT motors. Indeed, MT depolymerization with nocodazole prevented endosome tubulation (Figure S13B).

To confirm the specificity of this phenotype, we performed rescue experiments in the stable 3T3 cell lines expressing GFP or GFP-WASH as before. siRNA-transfected cells were then loaded with fluorescent Tf and imaged live by using spinning disk confocal microscopy (Movie S14). Importantly, upon WASH siRNA transfection, many Tf-containing tubules were observed in the GFP cell line, but not in the GFP-WASH cell line (Figure 5B). In addition, transfection of KIAA1033 siRNA induced tubules in both cell lines, indicating that the GFP-WASH-expressing cell line was able to form endosome tubules if the WASH complex was targeted. Tubulation was quantified from real time observation of cells. The reported effects were highly reproducible in two independent experiments. Thus, tubulation of endosomes is specifically associated with the depletion of the WASH complex. However, this complex might have other important functions in addition to polymerizing actin at the surface of endosomes. In order to specifically affect actin polymerization at the surface of endosomes, we utilized the WASH antibody that targets its VCA domain. In pyrene-actin assays, this WASH antibody blocked the ability of WASH fusion proteins containing the VCA domain to activate Arp2/3-mediated nucleation, but did not affect the VCA domains from WAVE2 or N-WASP (Figure 5C; Figure S14A). It also efficiently blocked the activity of the WASH complex toward the Arp2/3 complex (Figure S14B). When microinjected into cells, this antibody induced tubulation of Tf-containing endosomes (Figure 5D; Movie S15, quantification in Figure 5E). Thus, the WASH complex and specifically its ability to activate the Arp2/3 complex are required to maintain the morphology of endosomes and to prevent them from tubulating.

To examine the physiological consequence on trafficking, we turned to well-established assays of Tf recycling in HeLa cells. When Tf internalization was monitored by flow cytometry, WASH-depleted cells contained a higher amount of Tf at all time points (Figure 6A), suggesting that either internalization was increased or recycling was impaired. Given the extensive colocalization of WASH with internal endosomes, we tested specifically whether Tf recycling was affected. We loaded cells with fluorescent Tf and examined the rate of its release. At all time points examined, WASH-depleted cells contained a higher amount of Tf (Figure 6B), indicating that, indeed, Tf recycling is impaired in WASH-depleted cells.

Endosomes are sorting platforms for cargoes taking different routes. This sorting is mediated by vesicular or small tubular transport intermediates (Maxfield and McGraw, 2004). The long tubules and the defect in Tf recycling observed in WASH-depleted cells could be the consequence of a defective fission of transport intermediates. One of the best characterized machineries performing membrane fission is the GTPase dynamin, which can be specifically inhibited by dynasore. We loaded cells with fluorescent Tf and examined the Tf compartment upon

dynasore treatment. Dynasore induced tubulation of endosomes, like WASH depletion (Figure 6C). As in WASH-depleted cells, the compartments labeled with Rab4, Rab5, Rab7, and Rab11 were tubulated upon inhibition of dynamin (Figure S12). Dynasore-induced tubules aligned with MT tracks, as expected (Figure S13C). Importantly, WASH was detected at the level of mother endosomes, but never along the dynasore-induced tubules emerging from them (Figure 6D; Movie S16). This similar phenotype upon WASH inactivation and dynamin inhibition prompted us to examine whether WASH interacts with dynamin. Indeed, immunoprecipitation of endogenous WASH revealed associated endogenous dynamin (Figure 6E). The reverse coimmunoprecipitation was attempted with wild-type (WT) and the inactive K44A mutant of dynamin. WT and mutant dynamin associated to the same extent with endogenous WASH, indicating that the interaction of WASH with dynamin is not regulated by the activity of the latter (Figure 6F). Together, these results suggest that dynamin may play a role downstream of WASH in the fission of transport intermediates from endosomes, in line with a defective recruitment and/or activation of dynamin when WASH is inactivated, giving rise to endosome tubulation.

DISCUSSION

WASH belongs to a multiprotein complex, as has been demonstrated for other well-characterized NPFs. This complex that we have purified contains seven subunits, and it is likely to be a stable multiprotein complex, i.e., a molecular machine, because we have obtained evidence that WASH depends on other subunits for its stability. The WASH complex appears to be constitutively active in its ability to promote Arp2/3-dependent nucleation, in contrast to the WAVE complex, which is intrinsically inactive (Derivery et al., 2009). The identification of CP in the WASH complex was a surprise. CP is already a complex, a heterodimer, that is incorporated into a “supercomplex.” It has previously been shown that the heterodimer of CP is part of the Dynactin complex, which contains a minifilament of actin-related proteins (Schroer, 2004). However, the WASH complex contains both an NPF and a CP, which is known to inhibit actin dynamics at the barbed end of filaments (Cooper and Sept, 2008), and thus represents a potential antagonist of the NPF.

CP has long been recognized as an essential component of force generation by Arp2/3-mediated branched actin networks in vitro (Loisel et al., 1999) and in vivo (Mejillano et al., 2004). Without CP, all filaments in the network can be elongated, generating a “fishbone” appearance of comet tails obtained in biometric assays (Pantaloni et al., 2000). Recent evidence indicated that CP is more tightly associated with the generation of new actin filaments than suspected, because CP promotes Arp2/3-mediated nucleation in vitro (Akin and Mullins, 2008). This role is in line with in vivo observation that CP is enriched at the tip of lamellipodia, where the WAVE NPF is active (Lai et al., 2008; Mejillano et al., 2004), rather than having a homogeneous distribution across the lamellipodia as initially thought. We were able to detect low but significant CP activity within the purified WASH complex. This CP activity might also promote Arp2/3 activation, as proposed for the free heterodimer of CP (Akin and Mullins, 2008). CP and WASH activities might also be sequentially revealed in a molecular cycle of activation. For example,

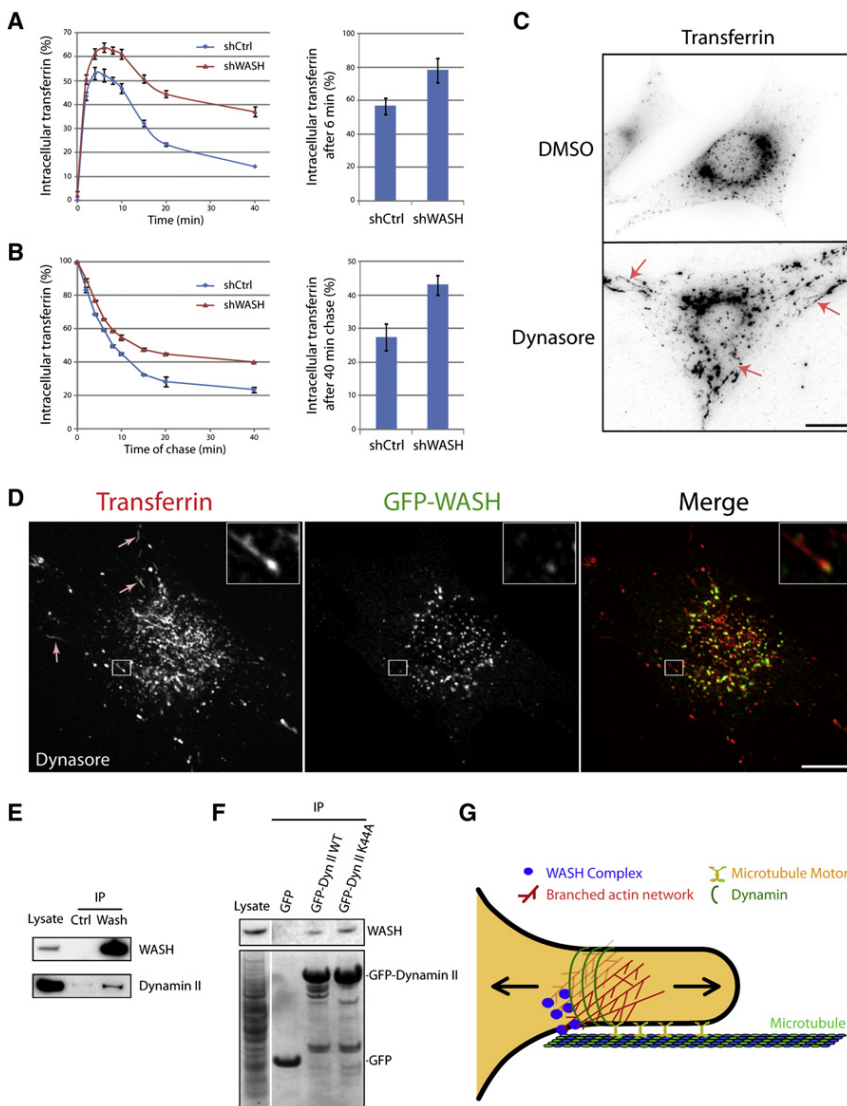


Figure 6. WASH Controls the Fission of Transport Intermediates through an Interaction with Dynamin

(A) HeLa cells transfected with WASH targeting shRNA or control shRNA were incubated with fluorescent Tf at 4°C. After a shift to 37°C for the indicated times, cells were acid washed to remove membrane Tf. Intracellular Tf was then quantified by flow cytometry. Intracellular Tf is expressed as a percentage of prebound Tf. A single representative experiment with duplicate measurements is plotted (mean ± SD). The histogram shows the mean ± SD of three independent experiments. WASH-depleted cells internalize a higher amount of Tf, suggesting that either uptake or recycling to the plasma membrane is affected.

(B) Similarly transfected HeLa cells were loaded with fluorescent Tf for 6 min at 37°C as in (A) and then acid washed at 4°C. After a shift to 37°C for the indicated times, intracellular Tf was quantified by flow cytometry. Intracellular Tf is expressed as a percentage of the initial intracellular Tf. A single representative experiment with duplicate measurements is plotted (mean ± SD). The histogram shows the mean ± SD of two independent experiments. WASH-depleted cells are slower to release internal Tf, indicating that its recycling to the plasma membrane is affected.

(C) Pharmacological inhibition of dynamin mimics WASH depletion. 3T3 cells were loaded with fluorescent Tf until equilibrium, then dynasore (80 μM) was added in the presence of Tf for 30 min. Cells were processed as in Figure 5A. Numerous long and narrow tubules containing Tf are observed (arrows). The scale bars represents 10 μm.

(D) 3T3 cells expressing GFP-WASH treated with dynasore as in (C) were imaged by time-lapse spinning disk confocal microscopy. A single image is extracted from the movie. GFP-WASH does not localize along the tubules, but to the mother endosomes. The scale bars represents 10 μm.

(E) WASH and dynamin II coprecipitate. WASH was immunoprecipitated from a lysate of B16F1 cells. The immunoprecipitates were analyzed with WASH or dynamin II antibodies.

(F) The interaction of dynamin with WASH does not depend on its activity. 293T cells were transiently transfected with plasmids expressing GFP, GFP-dynamin II WT, or its inactive K44A derivative. GFP fusion proteins were precipitated with GFP-trap resin. The upper panel presents the WASH immunoblot, and the lower panel presents Ponceau staining.

(G) A model for WASH function in endosome fission. A sorting or recycling endosome in the process of budding an intermediate of transport is represented. The WASH complex initiates Arp2/3-dependent actin polymerization and generates a branched actin network on a restricted domain of the endosome. How microtubules are recruited to this domain is not known. The affinity of the WASH complex for tubulin might play a role in this capture, and/or molecular motors at the surface of the endosomes might become clustered by the branched actin network. Eventually, molecular motors in this area bind MTs and begin to pull out a membrane tube. Dynamin interacts with the WASH complex and/or other components of the branched actin network like cortactin, and polymerizes in spirals around the nascent tube. The tension of the membrane is generated by the two opposing forces generated by MT motors pulling on the tube and the branched actin networks pushing on the endosome. This tension facilitates fission by dynamin. If WASH is absent, fission is defective and MT motors pull a long tube of membrane out of the endosome.

the low CP activity might be sufficient to target the WASH complex to pre-existing barbed ends, so that Arp2/3 activation takes place in close proximity to the barbed end of an actin filament, hence generating dense branched actin networks. The identification of the WASH complex opens up exciting future investigations on the structural coordination between CP and the NPF, on the particular architecture of branched actin networks resulting from this coordination, and the generation of force at the level of endosomes.

WASH and WHAMM are two NPFs that function at the surface of internal membranes and endosomes and Golgi, respectively. They also share the property of coordinating the actin and MT cytoskeletons in the formation of membrane tubules, because both WASH and WHAMM interact with tubulin. However, there is a significant difference between these two NPFs. Notably, depletion of WASH induces tubulation, whereas overexpression of WHAMM induces tubulation (Campellone et al., 2008). Consistently, the actin network polymerized by the VCA domain

of WHAMM and the direct interaction of its coiled-coil domain with MTs appear to facilitate the elongation of membrane tubules along MT tracks. In the case of WASH, the interaction we found with tubulin cannot play a role in the tubulation phenotype, because tubules are elongated along MT tracks when WASH is missing. This argues for a critical role of molecular motors in the generation of membrane tubules upon WASH inactivation.

Among the genes encoding subunits of the WASH complex, the gene encoding KIAA0196 (SPG8) has been recently reported to be mutated in Hereditary Spastic Paraplegia (HSP) (Valdmanis et al., 2007). Many genes responsible for HSP are involved in membrane traffic and the MT cytoskeleton (Fink, 2006). Spastin (SPG4), a MT-destabilizing protein that interacts with endosomal ESCRT complex components; the kinesin motor KIF5A (SPG10), which moves intracellular organelles; Spartin (SPG20), which regulates EGF receptor trafficking; ZFYVE27 (SPG33), which interacts with Rab11; and WASH might outline a trafficking pathway essential to preserve motor neurons from degeneration. It will be interesting to examine the genes encoding the other subunits of the WASH complex in families affected by HSP, but in which the disease cannot be ascribed to already identified HSP genes.

The role we propose for WASH in mediating the fission of transport intermediates from sorting and recycling endosomes generalizes the role proposed for N-WASP in facilitating fission from the plasma membrane. N-WASP-mediated actin polymerization is required for the internalization of clathrin-coated pits, which occurs shortly after a burst of actin polymerization (Takenawa and Suetsugu, 2007). Actin polymerization mediated by N-WASP is required for dynamin-mediated fission of tubules induced by the overexpression of F-BAR/EFC proteins (Itoh et al., 2005; Tsujita et al., 2006). Importantly, the native complex of N-WASP with WIP is absolutely required for the physiological regulation of N-WASP by F-BAR/EFC proteins (Takano et al., 2008). This is similar to the requirement of the WASH complex in mediating the fission of transport intermediates from sorting and recycling endosomes.

An important difference with fission from the plasma membrane is that fission at endosomes is likely to involve molecular motors moving along MT tracks. MT motors generate a pulling force on the membrane. The WASH-Arp2/3 pathway controlling actin polymerization generates a pushing force on the endosome. These two opposing forces are likely to increase the tension of the membrane that will undergo fission (Figure 6G). Tension of the membrane facilitates dynamin-mediated fission (Roux et al., 2006). Moreover, MT-dependent pulling forces, as well as actin-dependent pushing forces, have been shown to generate lipid sorting, which might have a contribution of its own in fission (Liu and Fletcher, 2006; Liu et al., 2006; Roux et al., 2005). Such a membrane of altered lipid composition and maintained under tension would be the perfect substrate for dynamin to mediate fission.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Information on cells, plasmids, siRNA sequences, antibodies, and additional procedures are included in the Supplemental Experimental Procedures.

Immunocytochemistry and Time-Lapse Imaging

3T3 cells were plated for 2 hr onto glass coverslips coated with 50 μ g/ml fibronectin (Sigma) before each experiment. For immunocytochemistry, cells were

fixed in 3% paraformaldehyde, permeabilized in PBS containing 0.05% saponin, then processed for indirect immunofluorescence by using standard techniques. Fixed cells were imaged by epifluorescence microscopy on a Leica DM6000B microscope equipped with a 100 \times NA 1.4 oil immersion objective and a CoolSnap HQ camera (Photometrics). Confocal optical sections were acquired with a custom spinning disc confocal microscope based on a Nikon TE2000-U inverted microscope, a 100 \times NA 1.45 oil immersion objective, a Yokogawa CSU22 spinning disk head, and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) with a binning set to 1 and operated with Metamorph 7.1.4. This microscope was equipped with a temperature control chamber, The Cube (Life Imaging Services). For Figures 3A and 3B, optical sections were acquired with a Leica TCS SP2 confocal microscope equipped with a 100 \times NA 1.4 oil immersion objective. For time-lapse microscopy, cells were plated onto fibronectin-coated glass plates (IWAKI), cultured for 2 hr at 37 $^{\circ}$ C in DMEM medium without phenol red supplemented with 25 mM HEPES (Invitrogen). Binning was set to 2 in this case, and channels were acquired sequentially. To compensate for the exit of vesicles from the confocal plane, several planes were acquired for each time point and a maximum intensity z projection was calculated.

Image Analysis

Analyses of images and movies were performed with Metamorph, ImageJ (<http://rsb.ingo.nih.gov/ij/>) and Adobe Premiere softwares. The background of images was homogeneously subtracted, and gamma settings were not adjusted. For 3D reconstructions, confocal z sections were performed with an increment of 0.2 μ m, and images were processed with the VolumeJ plugin of ImageJ (Abramoff and Viergever, 2002). For visualization purposes, diffraction, which artificially elongates round vesicles along the z axis, was corrected by modifying the aspect ratio parameter of VolumeJ from (x,y,z) = (1,1,1) to (x,y,z) = (1,1,0.5). GFP-WASH and Tf were tracked over time by using ImageJ plugin MtrackJ created by Eric Meijering. The perinuclear enrichments of the Arp2/3 complex and cortactin were analyzed after a square root transformation using a two-way ANOVA with treatments and independent experiments as parameters (SigmaStat). The pairwise comparisons were performed with the Tukey Test using an α factor of 0.05.

Purification of the WASH Complex

The WASH complex was essentially purified like the WAVE complex (Derivery et al., 2009), with the following modifications. A total of 5×10^9 cells expressing (His)₆-PC-TEV-WASH (3 L of culture, about 10 ml cell pellet) were lysed in 40 ml of 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 1% Triton X-100, 5% glycerol, 5 mM MgCl₂ (pH 7.4). Lysate was incubated with 1 ml of PC beads (Roche) for 4 hr with recirculation at 4 $^{\circ}$ C. PC beads were washed extensively with 50 ml lysis buffer; 50 ml of 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 0.4 M sucrose (pH 7.4); 50 ml of 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 0.4 M sucrose (pH 7.4). Elution was then performed in 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 5 mM EGTA, 0.4 M sucrose (pH 7.4). Elution fractions were pooled and dialyzed against 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.4 M sucrose, 1 mM DTT (pH 7.4) overnight. Eluate was then incubated with 50 μ l Ni Sepharose High Performance (GE Healthcare) for 3 hr at 4 $^{\circ}$ C. Beads were then washed extensively with 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.4 M sucrose, 1 mM DTT (pH 7.4) and analyzed by SDS-PAGE. LC-MS/MS was performed as described (Derivery et al., 2009). For activity assays, the WASH complex eluted after Protein C affinity column was concentrated by using Amicon Ultra (Millipore) and was used within a day.

SUPPLEMENTAL DATA

Supplemental Data include Supplemental Experimental Procedures, fourteen figures, one table, and sixteen movies and can be found with this article online at [http://www.cell.com/developmental-cell/supplemental/S1534-5807\(09\)00392-X](http://www.cell.com/developmental-cell/supplemental/S1534-5807(09)00392-X).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Monique Arpin, Claudia Almeida, Laurent Blanchoin, Susanne Bolte, Beatá Bugyi, Marie-France Carlier, Philippe Chavrier, Dafne Chirivino, Evelyne Coudrier, Edgar Gomes, Maud Hertzog, Cathy Jackson, Ludger Johannes,

Marko Kaksonen, Christophe Lamaze, Pekka Lappalainen, Andres Lebensohn, Daniel Lévy, Daniel Louvard, Stéphanie Miserey-Lenkei, Guillaume Montagnac, Graça Raposo, Erez Raz, Michal Reichman-Fried, Rajat Rohatgi, Winfried Römer, Klemens Rottner, Aurélien Roux, Dorothy Schafer, Giorgio Scita, Guillaume Van Niel, and Matt Welch for support, insights, and reagents. We greatly acknowledge the Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire-Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (PICT-IBiSA) and its staff. This work was supported by Fondation pour la Recherche Médicale (INE20071110919), Centre Nationale de la Recherche Scientifique (PEPS), and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08-BLAN-0012-03 and ANR-08-PCVI-0010-03).

Received: January 15, 2009

Revised: June 9, 2009

Accepted: September 23, 2009

Published: November 16, 2009

REFERENCES

- Abramoff, M.D., and Viergever, M.A. (2002). Computation and visualization of three-dimensional soft tissue motion in the orbit. *IEEE Trans. Med. Imaging* *21*, 296–304.
- Akin, O., and Mullins, R.D. (2008). Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell* *133*, 841–851.
- Benesch, S., Lommel, S., Steffen, A., Stradal, T.E., Scaplehorn, N., Way, M., Wehland, J., and Rottner, K. (2002). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J. Biol. Chem.* *277*, 37771–37776.
- Campellone, K.G., Webb, N.J., Znameroski, E.A., and Welch, M.D. (2008). WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* *134*, 148–161.
- Cooper, J.A., and Sept, D. (2008). New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *267*, 183–206.
- Derivery, E., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Wave complex is intrinsically inactive. *Cell Motil. Cytoskeleton* *66*, 777–790.
- Fink, J.K. (2006). Hereditary spastic paraplegia. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *6*, 65–76.
- Itoh, T., Erdmann, K.S., Roux, A., Habermann, B., Werner, H., and De Camilli, P. (2005). Dynamin and the actin cytoskeleton cooperatively regulate plasma membrane invagination by BAR and F-BAR proteins. *Dev. Cell* *9*, 791–804.
- Kaksonen, M., Peng, H.B., and Rauvala, H. (2000). Association of cortactin with dynamic actin in lamellipodia and on endosomal vesicles. *J. Cell Sci.* *113*, 4421–4426.
- Lai, F.P., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E., Dunn, G.A., Small, J.V., and Rottner, K. (2008). Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J.* *27*, 982–992.
- Linardopoulou, E.V., Parghi, S.S., Friedman, C., Osborn, G.E., Parkhurst, S.M., and Trask, B.J. (2007). Human subtelomeric WASH genes encode a new subclass of the WASP family. *PLoS Genet.* *3*, e237.
- Liu, A.P., and Fletcher, D.A. (2006). Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. *Biophys. J.* *91*, 4064–4070.
- Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D.G., and Oster, G. (2006). Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 10277–10282.
- Liu, R., Abreu-Blanco, M.T., Barry, K.C., Linardopoulou, E.V., Osborn, G.E., and Parkhurst, S.M. (2009). Wash functions downstream of Rho and links linear and branched actin nucleation factors. *Development* *136*, 2849–2860.
- Loisel, T.P., Boujemaa, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1999). Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins. *Nature* *401*, 613–616.
- Maxfield, F.R., and McGraw, T.E. (2004). Endocytic recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 121–132.
- Mejillano, M.R., Kojima, S., Applewhite, D.A., Gertler, F.B., Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (2004). Lamellipodial versus filopodial mode of the actin nanomachinery: pivotal role of the filament barbed end. *Cell* *118*, 363–373.
- Pantaloni, D., Boujemaa, R., Didry, D., Gounon, P., and Carlier, M.F. (2000). The Arp2/3 complex branches filament barbed ends: functional antagonism with capping proteins. *Nat. Cell Biol.* *2*, 385–391.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* *36*, 451–477.
- Roux, A., Cuvelier, D., Nassoy, P., Prost, J., Bassereau, P., and Goud, B. (2005). Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *EMBO J.* *24*, 1537–1545.
- Roux, A., Uyhazi, K., Frost, A., and De Camilli, P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* *441*, 528–531.
- Schroer, T.A. (2004). Dynactin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 759–779.
- Takano, K., Toyooka, K., and Suetsugu, S. (2008). EFC/F-BAR proteins and the N-WASP-WIP complex induce membrane curvature-dependent actin polymerization. *EMBO J.* *27*, 2817–2828.
- Takenawa, T., and Suetsugu, S. (2007). The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 37–48.
- Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T., and Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J. Cell Biol.* *172*, 269–279.
- Valdmanis, P.N., Meijer, I.A., Reynolds, A., Lei, A., MacLeod, P., Schlesinger, D., Zatz, M., Reid, E., Dion, P.A., Drapeau, P., et al. (2007). Mutations in the KIAA0196 gene at the SPG8 locus cause hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* *80*, 152–161.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 107–117.
- Zuchero, J.B., Coutts, A.S., Quinlan, M.E., Thangue, N.B., and Mullins, R.D. (2009). p53-cofactor JMY is a multifunctional actin nucleation factor. *Nat. Cell Biol.* *11*, 451–459.

La clathrine est requise pour la formation des lamellipodes induite par le complexe Scar/WAVE

Le complexe Scar/WAVE génère la formation des lamellipodes par l'intermédiaire du complexe Arp2/3 responsable de la polymérisation de réseaux d'actine branchés. Dans le but d'identifier de nouveaux régulateurs du complexe Scar/WAVE, nous avons conduit un crible en cellules de *Drosophiles* combinant une approche protéomique à une approche de génomique fonctionnelle. La chaîne lourde de la clathrine a été identifiée au cours de ce crible comme une protéine interagissant avec le complexe Scar/WAVE et dont la déplétion affecte la formation des lamellipodes. Ce rôle de la clathrine dans la formation des lamellipodes peut être découplé de son rôle classique dans le transport vésiculaire en utilisant différentes approches. De plus, la clathrine est localisée au lamellipode en l'absence d'adapteurs et des protéines accessoires de l'endocytose. La surexpression de la clathrine affecte le recrutement membranaire du complexe WAVE réduisant ainsi la vélocité des protrusions membranaire et la migration cellulaire. Par opposition, lorsque la clathrine est envoyée artificiellement à la membrane plasmique par une fusion à une séquence myristoylée, on observe une augmentation du recrutement membranaire du complexe Scar/WAVE, de la vélocité des protrusions membranaires et de la migration cellulaire.

L'ensemble de ces résultats montrent que la clathrine envoie le complexe Scar/WAVE à la membrane plasmique et donc contrôle la formation des lamellipodes en plus de son rôle plus classique dans le trafic membranaire.

Mots-clés : Complexe Scar/WAVE, complexe Arp2/3, actine, clathrine, lamellipode.

Clathrin is required for Scar/Wave mediated lamellipodium formation

The Scar/Wave complex (SWC) generates lamellipodia through Arp2/3-dependent polymerization of branched actin networks. In order to identify new SWC regulators, we conducted a screen in *Drosophila* cells combining proteomics with functional genomics. This screen identified Clathrin Heavy Chain (CHC) as a protein that binds to the SWC and whose depletion affects lamellipodium formation. This role of CHC in lamellipodium formation can be uncoupled from its role in membrane traffic by several experimental approaches. Furthermore, CHC is detected in lamellipodia in the absence of the adaptor and accessory proteins of endocytosis. We found that CHC overexpression decreased membrane recruitment of the SWC, resulting in reduced velocity of protrusions and reduced cell migration. In contrast, when CHC was targeted to the membrane by fusion to a myristoylation sequence, we observed an increase in membrane recruitment of the SWC, in protrusion velocity and in cell migration.

Together these data suggest that CHC brings the SWC to the plasma membrane, thereby controlling lamellipodium formation, in addition to its classical role in membrane traffic.

Key words : Scar/Wave complex, Arp2/3 complex, actin, clathrin, lamellipodium.