



HAL
open science

Coordination spatio-temporelle des regulateurs du reseau branche d'actine dans les structures motiles

Mohamed El Amine Mehidi

► **To cite this version:**

Mohamed El Amine Mehidi. Coordination spatio-temporelle des regulateurs du reseau branche d'actine dans les structures motiles. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0385 . tel-02067058v1

HAL Id: tel-02067058

<https://theses.hal.science/tel-02067058v1>

Submitted on 14 Mar 2019 (v1), last revised 20 Mar 2019 (v2)

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ
NEUROSCIENCES

Par Mohamed El Amine MEHIDI

**COORDINATION SPATIO-TEMPORELLE DES REGULATEURS DU
RESEAU BRANCHE D'ACTINE DANS LES STRUCTURES MOTILES**

Sous la direction de : Grégory GIANNONE

Soutenue le Mardi 13 Décembre 2016

Membres du jury :

Isabelle SAGOT
Laurent BLANCHOIN
Stephane BODIN
Klemens ROTTNER
Violaine MOREAU
Olivier ROSSIER

Directeur de recherche (CNRS)
Directeur de recherche (CEA)
Maître de conférences (Université de Montpellier)
Professeur, (Braunschweig University of Technology)
Directeur de recherche, (INSERM)
Chargé de recherche, (INSERM)

Président
rapporteur
rapporteur
Examineur
Examineur
Invité

« On découvre des horizons aussi dans un microscope, pas seulement du haut d'une montagne »

Les poissons ne ferment pas les yeux (2013) - Erri De Luca

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier très chaleureusement les membres du jury, le Dr **Laurent BLANCHOIN** et le Dr **Stephane BODIN** qui m'ont fait l'honneur de lire et d'évaluer mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse. Je tiens aussi à remercier les autres membres du jury le Dr **Klemens ROTTNER** et le Dr **Violaine MOREAU** qui m'ont fait l'honneur de lire mon manuscrit et de participer à mon jury de thèse. Je tiens également à remercier sincèrement le Dr **Isabelle SAGOT** d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie également mon directeur de thèse le Dr **Gregory GIANNONE** pour m'avoir accueilli dans son laboratoire mais aussi pour ses conseils, son aide et de m'avoir donné les moyens de réaliser ce travail de recherche. Ces 4 années passées au laboratoire ont été pour moi très enrichissantes, sur les plans scientifiques et personnels, et j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec toi. Aussi, je te remercie de m'avoir donné ce plaisir et cette passion à faire ce travail.

Je voudrais ensuite remercier **Olivier ROSSIER** pour ses précieux conseils, sa gentillesse, sa simplicité, sa bonne humeur quotidienne et son humour prodigieux dont je ne me lasserai jamais ! Je remercie également **Olivier THOUMINE** pour ses précieux conseils et sa bonne humeur.

J'adresse aussi mes remerciements à l'ensemble des membres de l'équipe, **Zeynep KARATAS** pour ta bonne humeur, ton écoute mais également pour ton travail en biologie moléculaire et biochimie, indispensable à la réalisation de cette thèse.

Un grand merci à mes deux acolytes de bureau, **Thomas ORRE** et **Matthieu LAGARDERE** pour tous les bons moments inoubliables que nous avons partagé.

Je remercie également **Sophie MASSOU**, **Ani José AUGUSTINE**, **Filipe NUNES VICENTE**, **Armand FLOREA** et les anciens **Anaël CHAZEAU**, **Mikael GARCIA** pour leur présence et leur bonne humeur.

Merci à **Camille SAPHY**, **Sandra DUBES**, **Ingrid CHAMMA**, **Mathieu LETELLIER** et **Béatrice TESSIER** pour votre précieuse aide, pour votre soutien et votre enthousiasme tout au long de ces 4 années. Merci à vous tous pour avoir rendu l'ambiance de travail quotidienne si agréable et pour toutes nos pauses et nos éternels fous rires qui vont beaucoup me manquer.

*Et je n'oublie pas tous les gens qui ne font pas partie de l'équipe mais qui ont été d'un soutien et d'une aide incroyable, je pense en particulier aux **Supers Sibaritas** et aux **Petites Grocquettes** ! Je suis très reconnaissant à toutes ces personnes qui sont indispensables à la réalisation de ce travail.*

*Je remercie tous mes amis **Aude, PapyYo, Nassim & Charlotte, Ibrahim, Anrif & Kaïne, Hilma & Ali, Adihamou & Roudjat, Raja & Sofiane, Issam & Wafa**, qui ont joué un rôle invisible mais essentiel au cours de cette thèse, pour leur présence et leur soutien. Un remerciement particulier pour un ami très spécial, **Noufal** pour son soutien et ses encouragements qui auront été pour moi essentiels.*

*Un immense merci à ma famille sans qui, rien n'aurait été possible. A mes **parents** et à ma sœur **Djohar**, pour avoir été toujours présents à mes côtés surtout pour les moments les plus difficiles, votre soutien, vos encouragements et votre écoute m'ont permis d'avancer sereinement.*

*Et je finirai par remercier ma petite femme pour avoir partagé cette aventure avec moi et qui a joué un rôle essentiel durant ses 4 années. Merci pour ton soutien moral, ta patience, et pour ton amour. **Warda**, ta présence à mes côtés a toujours été indispensable et réconfortante.*

Amine

Résumé

La motilité cellulaire est un processus intégré essentiel à de nombreux phénomènes physiologiques tels que la formation du cône de croissance et la plasticité synaptique. Des dérégulations de la motilité cellulaire peuvent être à l'origine de la formation de métastases ou de pathologies neuropsychiatriques comme la schizophrénie et l'autisme. La compréhension des mécanismes régulant la migration cellulaire est donc un enjeu majeur. La motilité cellulaire repose sur la formation de diverses structures constituées de réseaux d'actine branchés telles que le lamellipode. La formation du lamellipode nécessite l'intervention de protéines régulatrices de l'actine telles que Rac1 et les complexes Wave et Arp2/3. Grâce à l'utilisation de suivi de protéine unique, nous avons pu comprendre comment la coordination spatio-temporelle de ces régulateurs contrôle la formation et la morphologie des lamellipodes de cellules migrantes. Nous avons ainsi découvert que l'activation et la localisation du complexe Wave étaient régulées de manière enzymatique mais également mécanique. Dans une première étude, nous avons montré que la RhoGTPase Rac1 active le complexe Wave spécifiquement à l'extrémité du lamellipode. Dans une seconde étude, nous avons révélé que la localisation du complexe Wave est régulée par la dynamique des filaments des réseaux branchés d'actine. Ces données soulignent l'importance du complexe Wave dans la formation du lamellipode et révèlent l'existence d'une régulation mécanique de la localisation du complexe Wave.

Mots clés : Lamellipode ; Actine ; Complexe Wave ; Complexe Arp2/3 ; Rac1 ; RhoA ; Super-résolution, PALM

Abstract

Cell motility is an integrated process involved in critical phenomena such as axonal pathfinding and synaptic plasticity. Dysregulation of cell motility can induce metastasis and abnormal spine shapes observed in neuropsychiatric disorders like autism and schizophrenia. Therefore it is essential to understand how cell motility is regulated. Cell motility requires the formation of branched actin networks propelled by actin polymerization that lead to the formation of membrane protrusions such as the lamellipodium. Several actin regulatory proteins are involved in this process, such as Rac1 and the WAVE and ARP2/3 complexes. Using single protein tracking, we revealed key phenomena concerning the spatio-temporal regulation of lamellipodium formation by actin regulatory proteins. We found that the localization and activation of the WAVE complex was enzymatically regulated, but also mechanically. First, we showed that the Rac1 RhoGTPase activates the WAVE complex specifically at the tip of the lamellipodium. We also showed that WAVE complex localization is regulated by the dynamics of branched-network actin filaments. This study confirms the crucial role of the WAVE complex in lamellipodium formation and reveals the existence of a mechanical regulation of the localization of this complex in the cell.

Keywords: Lamellipodium, Actin, Wave complex, Arp2/3 complex, Rac1, RhoA, Super resolution microscopy, PALM

Publications et communications

Publications:

Fast Rac1 activation cycles at the lamellipodium tip control Wave complex function

Amine Mehidi, Olivier Rossier, Anaël Chazeau, Fabien Binamé, Amanda Remorino, Mathieu Coppey, Zeynep Karatas, Jean-Baptiste Sibarita, Violaine Moreau, Grégory Giannone

En preparation

Mechanical feedback by actin elongation controls WAVE complex dwell time at the lamellipodium tip

Amine Mehidi, Olivier Rossier, Zeynep Karatas, Matthieu Sainlos, Klemens Rottner, Jean-Baptiste Sibarita, Grégory Giannone

(En preparation)

Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion.

Anaël Chazeau, **Amine Mehidi**, Deepak Nair, Jérémie J Gautier, Cécile Leduc, Ingrid Chamma, Frieda Kage, Adel Kechkar, Olivier Thoumine, Klemens Rottner, Daniel Choquet, Alexis Gautreau, Jean-Baptiste Sibarita, Grégory Giannone

2014 - **EMBO J.** 33:2745–64

Autres publications

Habenular CB1 Receptors Control the Expression of Aversive Memories.

Edgar Soria-Gómez, Arnau Busquets-Garcia, Fei Hu, **Amine Mehidi**, Astrid Cannich, Liza Roux, Ines Louit, Lucille Alonso, Theresa Wiesner, Francois Georges, Danièle Verrier, Peggy Vincent, Guillaume Ferreira, Minmin Luo, Giovanni Marsicano

2015 - **Neuron.** 88:306–13.

Recruitment of Perisomatic Inhibition during Spontaneous Hippocampal Activity In Vitro.

Anna Beyeler, Aude Retailleau, Colin Molter, **Amine Mehidi**, Janos Szabadics, Xavier Leinekugel

2013 - **PLoS One.** 8(6):e66509.

Sommaire

Remerciements	5
Résumé	9
Abstract	11
Publications et communications	13
Publications:.....	13
Autres publications	13
Sommaire	15
Index des tableaux	17
Index des figures	17
Abréviations	19
Introduction	21
1. Structure et migration cellulaire	23
1. La cellule	23
2. Le cytosquelette	24
2.1. Les microfilaments	26
2.2. Les microtubules	26
2.3. Les filaments intermédiaires	26
3. Migration cellulaire et pathologies	28
3.1. La migration cellulaire collective	28
3.2. La migration cellulaire individuelle	29
2. Actine et protéines associées	33
1. Actine et filaments d'actine	33
1.1. L'actine monomérique.....	34
1.2. Les filaments d'actine	35
1.3. Polymérisation des filaments d'actine	36
1.4. Les toxines, de précieux outils	38
2. Les protéines associées à l'actine.....	39
2.1. Les protéines de séquestration	39
2.2. Les nucléateurs & élongateurs	40
2.3. Les protéines de segmentation	45
2.4. Les protéines de coiffage.....	46
3. Les structures actine-dépendantes	47
3. Le lamellipode	49
1. Une "Usine" à filaments	49
2. Les modèles de formation du lamellipode.....	50
2.1. Le modèle de nucléation dendritique	50
2.2. Un pavé dans la mare.....	52
3. La vision actuelle de la formation du lamellipode	53
3.1. Le complexe Wave, un NPF sous contrôle !	54
3.2. Rôle des élongateurs	55
3.3. Limitation de la polymérisation et désassemblage du réseau	55
3.4. Protrusion, adhésion cellulaire et contractilité	56
4. Complexe Arp2/3 et NPFs	59
1. Le complexe Arp2/3.....	59
2. Composition du complexe Arp2/3	61
3. Activation du complexe Arp2/3 par les NPFs.....	62

4. N-WASP	67
5. Le Complexe Wave	68
5.1. Composition du complexe Wave	68
5.2. Structure du complexe Wave.....	69
6. Le lien complexe Arp2/3 - NPF	71
5. RhoGTPases et régulation	73
1. La superfamille des Ras ; Une histoire de famille	73
2. La famille des RhoGTPases.....	75
3. Structure des RhoGTPases.....	76
4. Régulation du cycle activation/inactivation.....	78
5. RhoGTPases et migration cellulaire.....	81
5.1. Rac1 et ses effecteurs	81
5.2. RhoA et ses effecteurs.....	82
5.3. Cdc42 et ses effecteurs	84
6. RhoGTPases & formation du lamellipode	85
6. Mécanique du lamellipode	87
1. Mécanique de l'actine	87
1.1. Les bases physiques	87
1.2. Forces générées par la polymérisation d'un filament d'actine.....	88
2. Mécanotransduction des protéines	91
7. Objectifs de la thèse	93
Annexes Méthodes	95
1. La microscopie photonique classique	97
2. La microscopie super- résolutive.....	98
3. PALM	99
4. dSTORM.....	100
5. L'analyse d'image	101
5.1. Localisation	101
5.2. Le suivie de particules uniques	102
Résultats	105
1. Fast Rac1 activation cycles at the lamellipodium tip control Wave complex function	107
1. Contexte et problématique	107
2. Approches utilisées.....	108
3. Principaux résultats	108
2. Mechanical feedback by actin elongation controls WAVE complex dwell time at the lamellipodium tip	141
1. Contexte et problématique	141
2. Approches utilisées.....	142
3. Principaux résultats	142
Discussion & Perspectives	179
Discussion & Perspectives	181
1. La super-résolution	181
2. Localisation et dynamique du complexe Wave.....	182
3. Régulations enzymatiques du complexe Wave	183
4. Régulations mécaniques du complexe Wave	185
4.1. Le flux rétrograde du complexe Wave ?.....	185
4.2. Renouvellement rapide du complexe Wave à l'extrémité du LM.....	185
4.3. Mesure direct de forces	186

Annexes	189
Autres travaux de thèses.....	191
Bibliographie	233

Index des tableaux

Tableau 1. Comparatif des cytosquelettes eucaryote et procaryote.....	25
Tableau 2. Les types de filaments intermédiaires.....	27
Tableau 3 : Toxines et cytosquelette d'actine.....	38
Tableau 4 : Les différentes sous-familles de Ras chez l'humain.....	74
Tableau 5 : Les différents types de polymères biologiques en fonction du rapport L_p / L	88

Index des figures

Figure 1. Cellules observées au microscope par Theodor Schwann en 1839.....	24
Figure 2. Cytosquelette des cellules eucaryotes.....	24
Figure 3. Migration cellulaire collective et individuelle.....	29
Figure 4. La migration mésenchymateuse en 4 étapes.....	31
Figure 5. L'actine, du monomère au filament.....	35
Figure 6 : Polymérisation des filaments d'actine.....	37
Figure 7. L'horloge interne du filament d'actine.....	38
Figure 8. Modèle de fonctionnement des nucléateurs et des élongateurs.....	41
Figure 9. Les formines.....	42
Figure 10. La nucléation branchée par le complexe Arp2/3.....	43
Figure 11. Nucléation induite Spire et la formine cappuccino.....	44
Figure 12. Nucléation induite Colb en présence de protéines BAR.....	44
Figure 13. Les différentes structures d'actine.....	47
Figure 14. Le lamellipode une usine à filaments.....	50

Figure 15. Le modèle de nucléation dendritique et ses 11 étapes	51
Figure 16. Un lamelipode à deux visages	53
Figure 17. L'embrayage moléculaire	57
Figure 18. Filaments mère et fille.....	60
Figure 19. Les 7 sous-unités du complexe Arp2/3.....	61
Figure 20. Activation du complexe Arp2/3 et changement de conformation	63
Figure 21. Modèle d'activation de complexe Arp2/3	64
Figure 22. N-WASP.....	67
Figure 23. Le complexe Wave	69
Figure 24 : Structure et localisation du complexe Wave	71
Figure 25 : Arbre phylogénique des différentes RhoGTPases	75
Figure 26 Les RhoGTPases	77
Figure 27 : Schéma du mécanisme de switch On/Off des RhoGTPases.....	78
Figure 28; le cycle des RhoGTPases et sa régulation	79
Figure 29. Voies d'activation de Rac1 et régulation cytosquelette d'actine.....	82
Figure 30 Les voies d'activation de RhoA et régulation cytosquelette d'actine.....	83
Figure 31. Interconnexions des voies effectrices de Rac Rho et Cdc42	84
Figure 32. Trois types de polymères	88
Figure 33. Mécano-transduction à l'échelle du filament (<i>in vivo</i>)	91
Figure 34. Principe du PALM	99
Figure 35. Descriptif de nos acquisitions PALM.....	100
Figure 36 La fonction d'étalement du point (source : Zeiss)	101
Figure 37. L'analyse de suivie de particule individuelle	103

Abréviations

- A -

Abi: Abelson interactor
Abl: Abelson non-receptor tyrosine kinase
ABP: Actin binding protein
Abp1: actin binding protein 1
ADP: Adénosine Diphosphate
ARP2/3: actin-related-protein 2/3
ATP: Adénosine Triphosphate

- B -

BAR: Bin-Amphiphysin-Rvs161/167
βPIX: β Pak-interacting exchange factor

- C -

Cdc-42: cell division cycle 42
Cobl: Cordon Bleu
CP: Capping Protein
CPI: capping protein interactin

- D -

DAD: Dia autoregulatory domain
DID: Dia inhibitory domain
DN : dominant négatif
dSTORM: direct Stochastic Optical
Reconstruction Microscopy

- E -

EGRF: epidermal growth factor receptor
Eps8: EGRF substrate pathway #8
EVH1/2: ENA/VASP homology 1/2

- F -

FAB: F-actin-binding site
F-BAR: FER-CIP4-homology BAR
Fc: Fragment constant
FH1: Formin Homology 1

FH2: Formin Homology 2
fPALM: fluorescence photoactivation
localization microscopy
FRAP: Fluorescence Recovery after
Photobleaching
FRET: fluorescence resonance energy transfer

- G -

GAB: G-actin-binding site
GBD: GTPase-binding domain
GDP: Guanosine Diphosphate
GEF: guanine nucleotide exchange factor
GPI glycosil phosphatidyle inositol
GSD: ground state depletion
GTP: Guanosine Triphosphate

- H, I, J, K -

I-BAR: inverse BAR
IMD: IRSp53-MIM-homology domain
IQGAP1: IQ motif-containing GTPase-
activating protein 1
IRSp53: Insulin Receptor Substrate p53
JMY: junction-mediating regulatory protein

- L -

LIMK: LIM-Kinase 11

- M -

mDia1: mouse Diaphanous 1
MEC: matrice extracellulaire
MEF: Mouse Embryo Fibroblast
MLC: myosin light chain
MSD: mean square displacement

- N -

Nap1: NCK-associated protein 1
NPF: Nucleating promoting factor

N-WASP: Neural-WASP

-P-

PA-GFP: Photoactivable green fluorescent protein
Pak: p21-activated kinase
PALM: Photoactivated localization microscopy
PDZ: PSD Dlg1 ZO1
PH: pleckstrin homology
Pi: Phosphate inorganique
PIP2: Phosphatidylinositol (4, 5) biphosphate
PIP3: Phosphatidylinositol (3, 4, 5) triphosphate
PRD: proline rich domain

-R-

Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RBD: Rho binding domain
RNA: Ribonucleic acid
RhoA: Ras homologous member A
ROCK: Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase ou Rho kinase.

-S-

SH3: Src homology domain 3
SHD: SCAR homology domain
STP single particle tracking PALM
Sra1: specifically Rac-associated protein 1
SSIM: saturated structured illumination
STED: Stimulated emission depletion microscopy
SWIP: strumpellin and WASH-interacting protein
SynCAM: Synaptic Cell Adhesion Molecule
TIRF: total internal reflection fluorescence
Toca-1: Transducer of Cdc42-dependent actin assembly

-V, W, X, Y, Z-

VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein

WACA, pour Walker A Cytoskeletal ATPase

WASH: WASP and SCAR homologue

WASP: Wiskott-Aldrich syndrome protein

WAVE: WASP-family verprolin homologue

WH1 ou 2: WASP Homology 1 ou 2

WHAMM: WASP homologue associated with actin, membranes and microtubules

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

Introduction

1

Structure et migration cellulaire

La migration cellulaire est le phénomène de déplacement d'une cellule par rapport à son environnement. Elle est régulée de manière complexe et précise, et joue un rôle essentiel dans le développement et le maintien des organismes animaux. La migration cellulaire est ainsi observée du stade embryonnaire au stade adulte et sa perturbation peut être à l'origine de pathologies. Pour migrer, les cellules doivent modifier leur structure et donc réorganiser leur cytosquelette. Dans ce chapitre, nous nous concentrerons sur les mécanismes par lesquels les cellules sont capables de migrer.

1. La cellule

On sait depuis leur découverte au 19^{ème} siècle par Matthias Schleiden et Theodor Schwann, que les cellules sont l'unité structurelle et fonctionnelle des êtres vivants. Que ce soit au sein d'un même individu ou dans l'ensemble du vivant, les cellules revêtent une pléthore d'aspects (**Figure 1**). Pour assurer leur survie, les êtres vivants se doivent d'interagir avec leur environnement et s'adapter à ce dernier. Cette adaptation peut conduire à un recrutement de constituants cellulaires à un endroit donné de la cellule, à une modification de sa structure, ou encore à un déplacement de la cellule. Tous ces phénomènes sont assurés par un composant cellulaire hautement conservé dans le vivant, nommé **cytosquelette**. Cette thèse se focalisera sur le cytosquelette eucaryote ; il est néanmoins intéressant de noter qu'il existe un cytosquelette procaryote (**Encadré 1**).

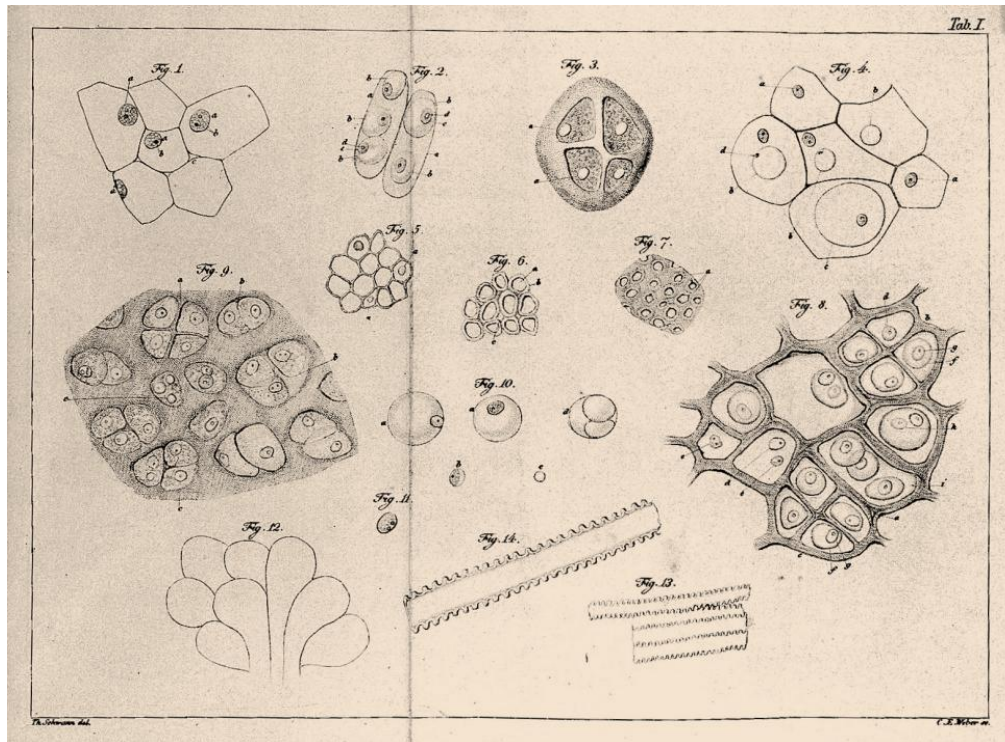


Figure 1. Cellules observées au microscope par Theodor Schwann en 1839.

Planche histologique tirée de "Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Tiere und Pflanzen" Sander, Berlin, 1839, Theodor Schwann.

2. Le cytosquelette

A la différence du squelette présent chez les vertébrés, le cytosquelette est bien plus qu'un simple échafaudage intracellulaire, c'est l'outil essentiel à une multitude de fonctions cellulaires (**Tableau 1**). Le cytosquelette est composé d'un réseau de polymères filamenteux extrêmement dynamique, au sein duquel les filaments s'allongent et rétrécissent, par jeu de polymérisation – dépolymérisation, en fonction des besoins cellulaires. Grâce à leur association à de nombreuses protéines accessoires, ces structures vont permettre l'accomplissement d'une grande variété de fonctions cellulaires à partir d'un nombre limité de types de filaments. Chez les eucaryotes, on compte trois grands types de filaments : les **Microfilaments**, les **Filaments intermédiaires** et les **Microtubules** (**Figure 2**). Bien qu'ils aient été étudiés de manière individuelle, il existe aujourd'hui de nombreuses preuves d'un couplage réciproque entre les différents types de filaments lors de la migration cellulaire (Huber et al., 2015).

Figure 2. Cytosquelette des cellules eucaryotes.

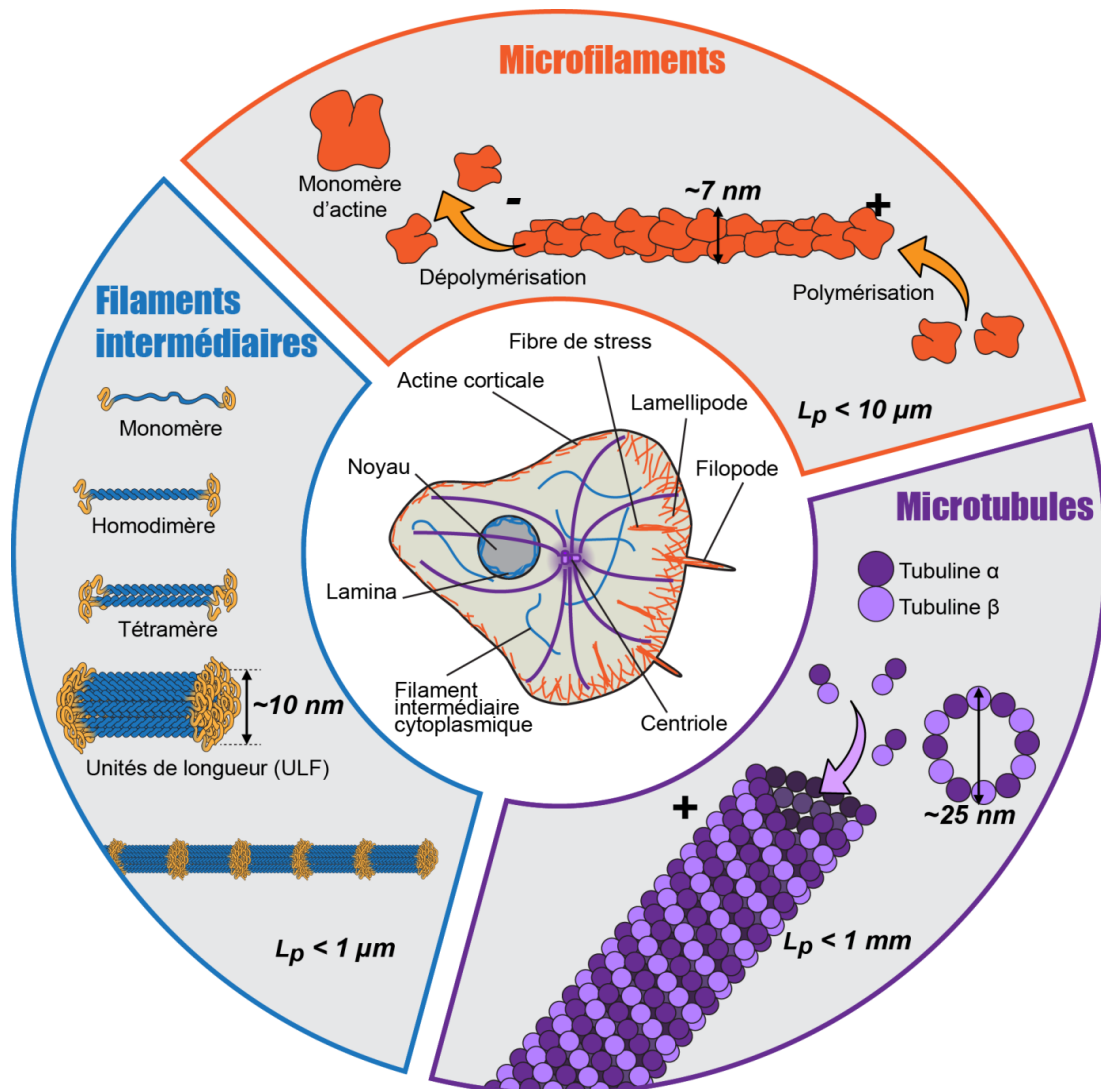
Schéma de l'organisation et de la composition des trois grands types de filaments des cellules eucaryotes: microfilaments, filaments intermédiaires et microtubules. (L_p ; longueur de persistance).

Cytosquelette eucaryote

Cytosquelette procaryote

	Monomères	Fonctions	Monomères	Fonctions
Microfilaments	Actine (α , β et γ)	Motilité cellulaire Structure cellulaire Contraction musculaire Cytokinèse Transport intracellulaire	MreB, ParM, MamK, FtsA AlfA, Alp	Structure cellulaire Ségrégation des plasmides
Filaments intermédiaires	Cf. Tableau 2	Morphologie cellulaire	Crescentine	Structure cellulaire
Microtubules	Tubuline (α et β)	Transport vésiculaire Polarité cellulaire Ségrégation des chromosomes	FtsZ, BtubA, BtubB, TubZ et CetZ	Cytokinèse Contrôle de la structure cellulaire Ségrégation des plasmides
Famille WACA	Pas d'homologue chez les eucaryotes		MinD, ParA, ParF et Soj	Cytokinèse Ségrégation des plasmides

Tableau 1. Comparatif des cytosquelettes eucaryote et procaryote.



2.1. Les microfilaments

Les microfilaments ou filaments d'actine sont impliqués dans la structure cellulaire, la motilité, la contraction musculaire, la cytokinèse et le transport intracellulaire (Chhabra and Higgs, 2007). Ils sont formés par la polymérisation de monomères d'actine sous la forme d'une double hélice polarisée de pas droit, avec un diamètre de 7 nm de diamètre et une longueur de persistance (L_p)¹ d'environ 10 μm (Mochida et al., 2002) (**Figure 2**). Les filaments d'actine peuvent être associés à plus d'une centaine de protéines accessoires différentes (aussi appelées **ABP** pour **Actin Binding Protein**). Ces protéines permettent notamment de contrôler la formation et la réticulation des filaments. Les filaments d'actine peuvent aussi être liés à des moteurs moléculaires de la famille des **myosines**. Les mécanismes de mise en place des filaments d'actine et le rôle des protéines associées seront largement abordés dans le chapitre 2.

2.2. Les microtubules

Les microtubules sont issus de la polymérisation d'hétérodimères Tubuline α / Tubuline β . Les microtubules sont des bio-polymères rigides et polarisés, structurés sous la forme d'un cylindre de 13 protofilaments (**Figure 2**). Ils ont un diamètre de 25 nm et une longueur de persistance de plus d'un millimètre. Les microtubules sont eux aussi associés à des protéines accessoires nommées **MAP** (**Microtubule Associated Protein**) (Gouveia and Akhmanova, 2010; Marchisella et al., 2016), qui interviennent notamment dans la stabilisation des microtubules. Ces derniers sont impliqués dans la polarité cellulaire et dans la séparation des chromosomes lors de la division. Ils servent aussi de rails lors du transport intracellulaire de vésicules liées à des moteurs moléculaires tels que les **dynéines** et les **kinésines**.

2.3. Les filaments intermédiaires

Les filaments intermédiaires sont impliqués dans le maintien de la morphologie et de l'intégrité cellulaire (Coulombe and Wong, 2004). Ils sont constitués d'un assemblage de différentes protéines monomériques. La composition en protéines monomériques peut varier en fonction du type cellulaire (Leduc and Etienne-Manneville, 2015) (**Tableau 2**). Chez l'humain, on compte plus de 70 gènes codant pour ces protéines. Malgré de nombreuses

¹ L_p : Longueur au-delà de laquelle le polymère se déforme spontanément sous l'action de l'agitation thermique

différences, elles présentent néanmoins une structure similaire de type fibrillaire, ces protéines sont composées d'une tige centrale en hélice-alpha très conservée et encadrée côtés N- et C-terminal par deux domaines qui diffèrent en fonction du type de protéine. L'assemblage de ces protéines en filament intermédiaire est identique pour tous les types de filaments intermédiaires : il commence par l'assemblage de deux monomères en homodimères parallèles super-enroulés, qui s'attachent alors en tétramères antiparallèles. Ces tétramères s'associent ensuite par 8 pour former ce que l'on appelle des **unités de longueur** ou **ULF** (pour **Unit-Length Filaments** ; ULFs). Ces ULF qui s'associent ensuite de manière à former des filaments de 8 à 12 nm de diamètre (Herrmann et al., 2009) (**Figure 2**).

Types	sous-unités	Localisation d'expression
I	Kératines (Acide)	<i>Epithéliums</i>
II	Kératines (Basique)	<i>Epithéliums</i>
III	Vimentines	<i>Mésenchymes</i>
	Protéines Glio-Fibrillaire Acides	<i>Astrocytes et glies</i>
	Périphérines	<i>Neurones</i>
	Desmines	<i>Muscles</i>
	Syncoilines	<i>Muscles</i>
IV	Neurofilaments	<i>Neurones</i>
	α-Internexines	<i>Neurone</i>
	Synémines	<i>Neurones, astrocytes, muscles</i>
	Nestines	<i>Cellules souches neuroépithéliales, muscles, endothéliums</i>
V	Lamines	<i>Noyaux cellulaires</i>

Tableau 2. Les types de filaments intermédiaires.

Liste des différents types de filaments intermédiaires et leurs localisations d'expression (adaptée de Leduc & Etienne-Manneville 2015).

Encadré 1

Le cytosquelette procaryote. Après s'être maintenu plusieurs décennies, le dogme voyant le cytosquelette comme l'apanage des eucaryotes prend fin dans les années 90 (Wickstead and Gull, 2011). C'est en effet, à cette période que furent découverts les premiers homologues procaryotes de la tubuline et de l'actine. L'étude du cytosquelette procaryote est un champ à part entière de la biologie cellulaire qui ne sera donc pas développé au cours de cette thèse focalisée sur la migration cellulaire eucaryote. On peut néanmoins noter qu'il existe un type de filament procaryote n'ayant pas d'homologue eucaryote, nommé **WACA**, pour **Walker A Cytoskeletal ATPase** (**Tableau 1**).

3. Migration cellulaire et pathologies

La migration cellulaire est le phénomène de déplacement d'une cellule dans son environnement. Ce phénomène est observé très tôt au cours du développement embryonnaire et se poursuit ensuite chez l'adulte lors des processus de cicatrisation des plaies, de réponses immunitaires ou d'inflammation (Gardel et al., 2010; Pollard and Borisy, 2003). La migration cellulaire est un processus complexe qui met en jeu un ensemble de mécanismes finement régulés. La perturbation de ces mécanismes peut entraîner de nombreux troubles, tels que malformations, retards mentaux, mort *in utero*, syndromes inflammatoires, l'immunodépression ou encore la formation de métastases lors du cancer. **La compréhension des mécanismes permettant la régulation de la migration cellulaire est donc un enjeu majeur de la biologie cellulaire.**

La classification des différents types de migration cellulaire a été initialement réalisée en fonction de la morphologie des cellules en migration. Elle a ensuite été enrichie par l'intégration d'autres paramètres tels que l'organisation du cytosquelette, le type d'interaction avec la matrice extracellulaire et les modifications tissulaires induites par les cellules en migration (Friedl and Wolf, 2009). On peut distinguer deux grands types de migration cellulaire : la migration individuelle et la migration collective, elles-mêmes divisées en sous-types. Ce sont les caractéristiques propres aux cellules et à l'environnement tissulaire qui vont déterminer le type de migration adoptée par la cellule (**Figure 3**). Qu'elle soit individuelle ou collective, la migration nécessite des modifications de la structure du cytosquelette d'actine via une régulation de la signalisation cellulaire médiée par les Rho-GTPases.

3.1. La migration cellulaire collective

Lors de la migration collective, les cellules en mouvement conservent des jonctions cellule-cellule, permises par les cadhérines à leur surface. En fonction du nombre de jonctions cellule-cellule et de leur capacité protéolytique, la migration cellulaire collective s'effectue par formation de feuillets ou de grappes cellulaires. Les migrations en feuillet et en grappe sont observées respectivement lors de la formation des crêtes neurales et de l'angiogenèse (**Figure 3**).

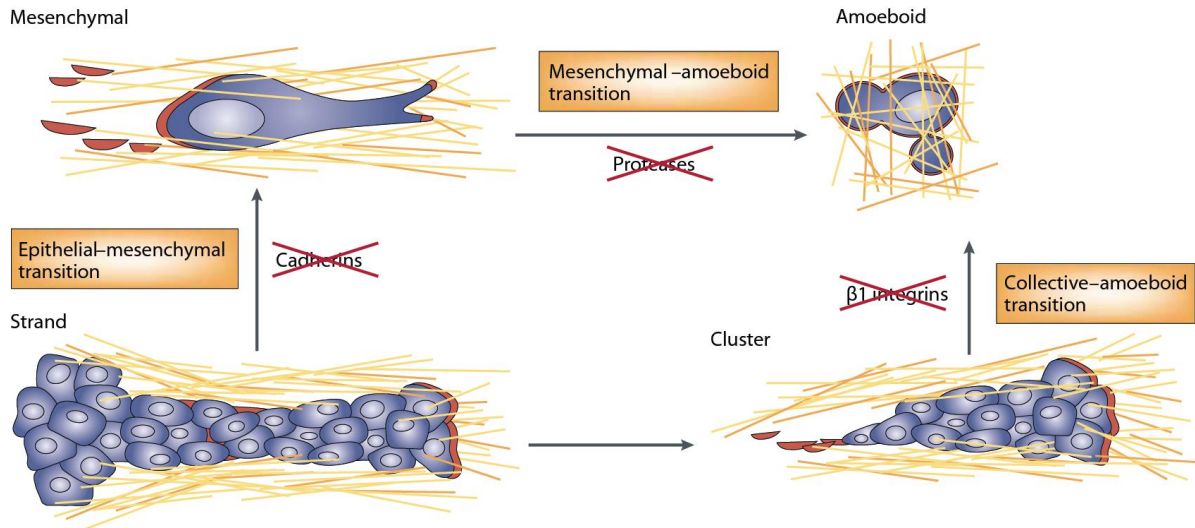


Figure 3. Migration cellulaire collective et individuelle

On peut distinguer deux grands types de migration cellulaire : la migration individuelle et la migration collective, elles mêmes divisées en sous-types. Les migrations cellulaires collectives en feuillet et en grappe et les migrations cellulaires individuelles : amiboïde et mésenchymateuse (d'après Friedl & Wolf 2003)

3.2. La migration cellulaire individuelle

La migration cellulaire individuelle est, comme son nom l'indique, définie par le fait que la cellule va se mouvoir de façon individuelle au sein d'un tissu. Le cytosquelette d'actine peut générer les forces permettant la migration cellulaire de deux manières : en se contractant, ou en polymérisant. En fonction de la modalité favorisée par la cellule, on parle de **migration amiboïde** ou de **migration mésenchymateuse**. Cette vision bipolaire de la migration cellulaire individuelle doit toutefois être nuancée : les cellules peuvent osciller entre les modes amiboïdes et mésenchymateux en fonction de la structure et de la rigidité de la matrice extracellulaire (MEC) (Bergert et al., 2012).

3.2.1. La migration amiboïde

La migration amiboïde est caractérisée par la forme sphérique des cellules en migration. Cette forme arrondie est permise à la fois par le caractère faiblement adhésif des cellules à la MEC et par une contractilité élevée du cortex d'actine lié à la membrane plasmique (Friedl and Wolf, 2009). Lors de la migration amiboïde, les cellules vont se contorsionner dans le maillage de fibres que forme la MEC. La contractilité élevée du cortex d'actine induit une élévation de la pression hydrostatique cytoplasmique, ce qui peut conduire localement à un détachement de la liaison entre la membrane plasmique et le cortex d'actine. Le cytoplasme sous pression va alors induire la formation d'un renflement membranaire nommé **bleb**. Puis le cortex d'actine va se reformer au niveau de ce bleb. La

Introduction

cellule va donc se déplacer en répétant le cycle « formation de bleb / reformation du cortex d'actine » (Maugis et al., 2010). Ce type de migration est notamment observé chez les macrophages.

3.2.2. La migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse a été très largement étudiée et se divise en 4 ou 5 phases selon qu'elle soit observée en deux ou trois dimensions (2D ou 3D). La migration mésenchymateuse se caractérise par des cellules polarisées et de forme longiligne, permise par le cytosquelette d'actine et les liaisons cellule-MEC. La migration mésenchymateuse est observée chez les fibroblastes lors de la cicatrisation des plaies et chez les cellules de la crête neuronale.

Le modèle canonique actuel de migration mésenchymateuse découle de nombreuses études de la migration de fibroblastes en 2D sur lamelles de verre (Giannone et al., 2004; Sheetz et al., 1999; Svitkina and Borisy, 1999). La migration mésenchymateuse commence par la polarisation de la cellule et la formation d'une structure protrusive nommée **lamellipode** (**Figure 4, Etape 1**). Cette structure observée à la périphérie des cellules motiles est constituée d'un réseau d'actine branché. D'un point de vue mécanique, les forces responsables des déformations de la membrane sont dues à la polymérisation des filaments d'actine de ce réseau (Pollard et al., 2000). Cette saillie membranaire est suivie par la formation de sites d'adhésion (**Figure 4, Etape 2**). Ces sites d'adhésion permettent la transmission de forces de traction, *via* des liaisons cytosquelette/MEC médiées par les intégrines, liant à la fois la MEC et les protéines adaptatrices associées aux fibres de stress (Kanchanawong et al., 2010). Ces forces de traction dépendant du système actine-myosine, vont ensuite induire le déplacement du corps cellulaire dans la direction du mouvement (**Figure 4, Etape 3**). Enfin, un détachement des sites d'adhésion à l'arrière de la cellule va avoir lieu. Les intégrines seront alors recyclées de l'arrière vers l'avant de la cellule (**Figure 4, Etape 4**). Si la migration mésenchymateuse a lieu au sein d'un tissu, s'ajoute une 5^{ème} étape de protéolyse de la MEC.

Les microfilaments d'actine sont impliqués dans l'ensemble des mécanismes de migration cellulaire. Ce rôle central de l'actine est en grande partie dû au fait que les structures actine-dépendantes sont très dynamiques. Ces dernières permettent ainsi la mise en place de mécanismes dynamiques à des échelles de temps courtes (de l'ordre de la seconde à la minute) (Letort et al., 2015). Au cours de ma thèse je me suis concentré sur la mise en place des réseaux d'actine, en étudiant en particulier le modèle du lamellipode.

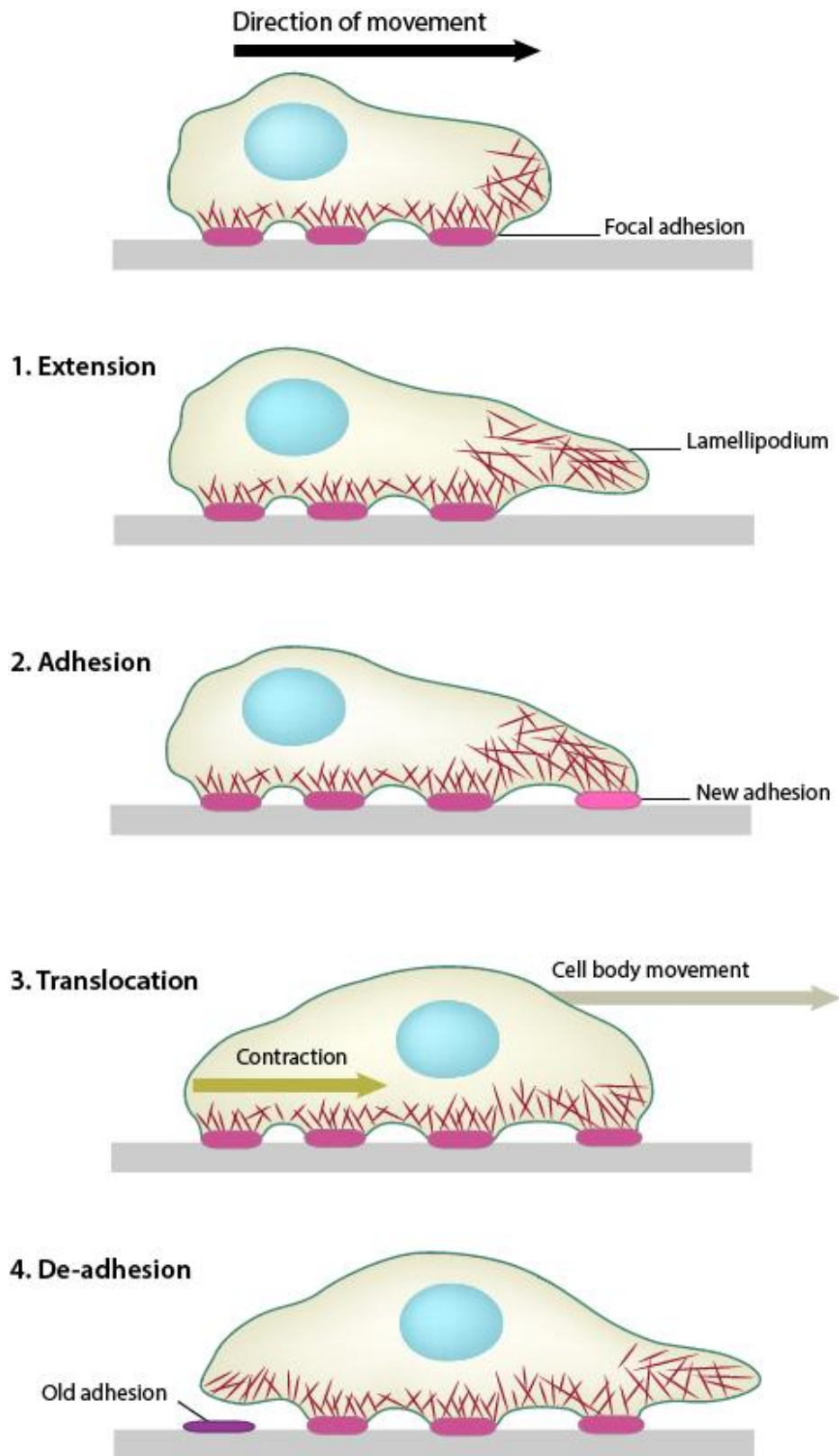


Figure 4. La migration mésenchymateuse en 4 étapes.

1. Formation du lamellipode, 2. Formation de sites d'adhésion, 3. Déplacement du corps cellulaire dans la direction du mouvement, 4. Détachement des sites d'adhésion à l'arrière de la cellule.

(Source : www.mechanobio.info)

Introduction

2.

Actine et protéines associées

L'actine est une protéine globulaire extrêmement conservée au cours de l'évolution et constitue l'une des protéines les plus abondantes sur terre. Chez les eucaryotes, elle peut représenter plus de 20 % des protéines totales des muscles striés squelettiques. L'actine a la capacité de polymériser pour former des filaments, et cette propriété est hautement régulée au sein des cellules par une pléthore de protéines accessoires. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons à la structure des monomères et des filaments d'actine, puis nous étudierons le rôle et le mode d'action des différentes protéines accessoires.

1. Actine et filaments d'actine

L'histoire retiendra le nom de **Brunó Ferenc Straub** (1914-1999) pour deux raisons. La première est qu'il fut le dernier président de la République Populaire de Hongrie, de 1988 à 1989, avant qu'elle ne devienne la République de Hongrie en 1989. La deuxième raison, qui nous intéresse plus, est qu'il fut le découvreur de l'actine (Straub, 1942). L'actine est la brique élémentaire dans la formation des microfilaments. Cette protéine ubiquitaire et hautement conservée lors de l'évolution des organismes eucaryotes est présente dans les cellules sous deux formes : la forme monomérique (**Actine-G**) et la forme filamenteuse (**Actine-F**). La masse de connaissances disponible aujourd'hui sur la structure des monomères et sur la formation des filaments, est le fruit de plus de 80 ans de labeur.

1.1. L'actine monomérique

L'actine est une protéine cytoplasmique globulaire d'environ 43 kDa, mesurant ~67 x 40 x 37 Å (soit environ 7 nm de diamètre) et présente en très grandes quantités dans les cellules (Dos Remedios et al., 2003) (**Figure 5.A**). Chez l'homme, il existe trois grandes classes d'actine : l'**actine α** , présente au niveau des cellules musculaires sous quatre isoformes, et les **actine β** et **γ** , toutes deux présentes au niveau cytoplasmique des cellules non-musculaires (Gunning et al., 2015). L'étude de la structure des monomères d'actine fut extrêmement difficile du fait de sa tendance à polymériser spontanément dans les solvants utilisés pour faire croître les cristaux d'actine (Kabsch et al., 1990; Dos Remedios et al., 2003) (Dos Remedios et al. 2003; Kabsch et al. 1990). Pour contourner ce problème et réaliser la première étude de la structure de l'actine monomérique, une co-cristallisation de l'actine avec la DNase I a été réalisée (Kabsch et al., 1990). Les auteurs ayant déjà résolu la structure de la DNase I (Suck et al., 1984), il leur a ensuite été relativement aisé d'extraire la structure de l'actine à partir du co-cristal actine/DNase I. L'étude par cristallographie a permis de considérablement affiner la vision de la structure de l'actine. En effet, alors qu'auparavant des études de microscopie électronique laissaient penser que l'actine avait une forme de poire avec deux domaines (nommés petit et large), l'étude par cristallographie a révélé qu'elle était en réalité formée de deux domaines de taille identique, séparés par un sillon (**Figure 5.A**). Ces deux domaines sont eux-mêmes divisés en deux sous-domaines numérotés de 1 à 4. Les sous-domaines 1 et 3 sont structurellement très proches et émergent probablement de la duplication d'un même gène ancestral, alors que les sous-domaines 2 et 4 sont vus comme de larges insertions dans les sous-domaines 1 et 3 (Dominguez and Holmes, 2011). Le sillon qui sépare les sous-domaines 2 et 4 renferme des sites de liaison aux cations divalents, calcium (**Ca^{2+}**) ou magnésium (**Mg^{2+}**), ainsi qu'aux nucléotides **ATP** ou **ADP** (pour **Adénosine TriPhosphate** et **Adénosine DiPhosphate**). La nature du nucléotide (ATP ou ADP) lié est à l'origine de légères modifications structurales du monomère d'actine. Ces modifications seraient néanmoins suffisantes pour permettre la sélectivité de certaines ABPs pour une des conformations (Rould et al., 2006; Sablin et al., 2002).

1.2. Les filaments d'actine

Dès 1985, Egelman, E. H. et collaborateurs avaient mis en évidence *via* des approches de microscopie électronique que les filaments d'actine étaient des polymères formés d'une double hélice de pas droit avec 13 molécules d'actine par tour (360 Å) (**Figure 5.B**). En 1990, après avoir élucidé la structure de l'actine monomérique (Kabsch et al., 1990), les auteurs ont affiné par calcul le modèle de la structure des filaments d'actine (Holmes et al., 1990).

Près de 20 ans plus tard, le modèle de la structure des filaments d'actine a été considérablement affiné par l'analyse de diffractométrie de rayons X (Oda et al., 2009) et une approche de cryo-microscopie électronique (Fujii et al., 2010). On sait aujourd'hui que les filaments d'actine sont polarisés avec une extrémité dite barbée et une extrémité dite pointue ; le sillon des monomères d'actine étant dirigé vers l'extrémité pointue (**Encadré 2**). Enfin, il a été montré que les monomères d'actine subissent une modification de conformation lorsqu'ils sont polymérisés ; l'association au filament induit une rotation des sous-domaines 1 et 3 d'environ 20°, conduisant à la fermeture du sillon et à l'aplatissement du monomère d'actine. Ces modifications pourraient permettre le déclenchement de l'activité ATPasique du monomère d'actine (Oda et al., 2009) (**Figure 5.C**).

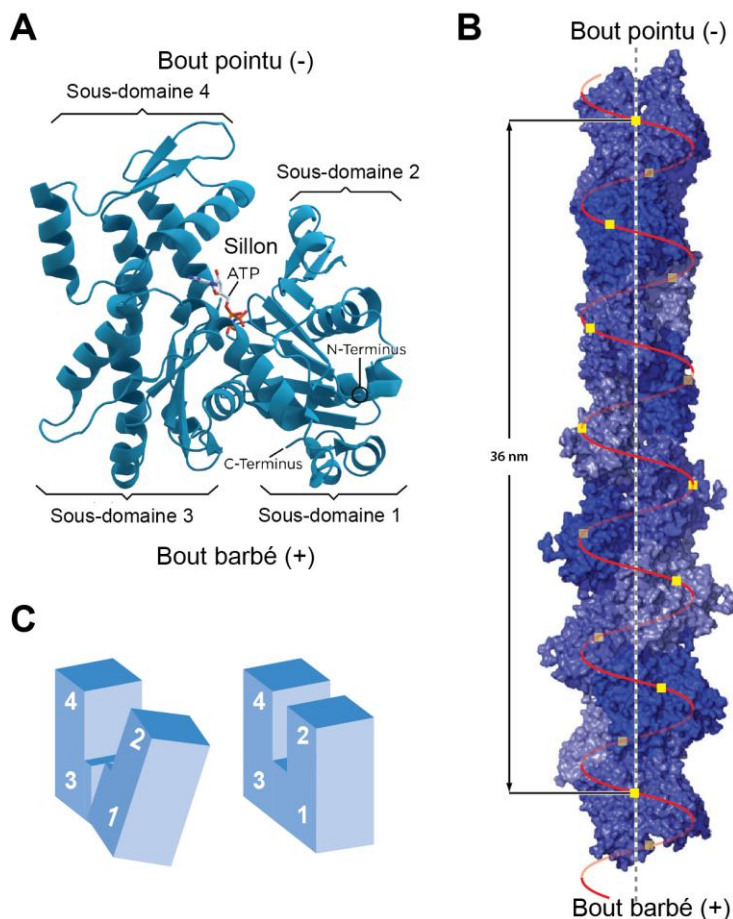


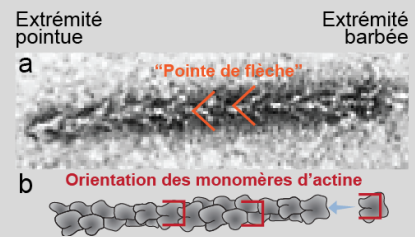
Figure 5. L'actine, du monomère au filament

A. Structure d'un monomère
 B. Structure d'un filament
 C. Rotation des sous-domaines 1 et 3 d'environ 20° un monomère d'actine lorsqu'il polymérise.
 (D'après Dominguez & Holmes 2011)

Encadré 2

Barbée ou pointue ? Les qualificatifs contre-intuitifs de barbée et pointue des deux extrémités au regard de la structure réelle des filaments sont dus à l'apparence en « pointe de flèche » des filaments d'actine lorsqu'ils sont décorés de têtes de myosine I.

a. Cliché de microscopie électronique d'un filament d'actine décoré par des têtes de myosines (Woodrum et al., 1975). b. Schéma d'un filament d'actine basé sur la structure des filaments.



1.3. Polymérisation des filaments d'actine

L'étude de la polymérisation a été rendue possible dès le début des années 80 par l'utilisation d'une sonde fluorescente dont l'intensité de fluorescence est sensible à l'état globulaire ou filamentueux de l'actine : le **pyrène** (N-(1-pyrène)iodoacetamide) (Kouyama and Mihashi, 1981). En effet, cette sonde liée à la cystéine 374 est 25 fois plus fluorescente lorsque le monomère d'actine est lié au filament. Ainsi, ces pionniers ont pu mesurer quantitativement la polymérisation de l'actine au cours du temps. Cette approche a permis de déterminer que les monomères d'actine ont la capacité de polymériser spontanément en suivant trois phases : **phase de nucléation**, **phase d'élongation** et **phase d'équilibre** (Figure 6.B).

1.3.1. La phase de nucléation

La nucléation spontanée est lente et cinétiquement limitante (Figure 6.B); des dimères et des trimères se forment spontanément mais ils sont instables. En effet, alors que les constantes d'association sont quasiment identiques (environ $10 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$), les constantes de dissociation sont respectivement de 10^6 sec^{-1} pour les dimères, 100 sec^{-1} pour les trimères, et 1 sec^{-1} pour les quadrimères (Pollard, 2016). Les oligomères ne deviennent donc stables qu'après l'ajout d'un quatrième monomère. À ce stade la nucléation est terminée, on passe à la phase d'élongation.

1.3.2. La phase d'élongation

Durant la phase d'élongation, le filament d'actine polymérise rapidement ($11,6 \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$) (Pollard, 1986) et spontanément (la concentration d'actine-F augmente). Le filament étant polarisé, les constantes d'association et de dissociation aux extrémités barbée et pointue sont différentes (Figure 6.A) (Pollard, 1986). Ces constantes sont également affectées par la nature du cation (Mg^{2+} , Ca^{2+}) et du nucléotide (ATP, ADP) qui se lie au monomère d'actine. Au niveau du bout barbé, le filament polymérise alors près de 10 fois plus vite qu'au niveau du bout pointu.

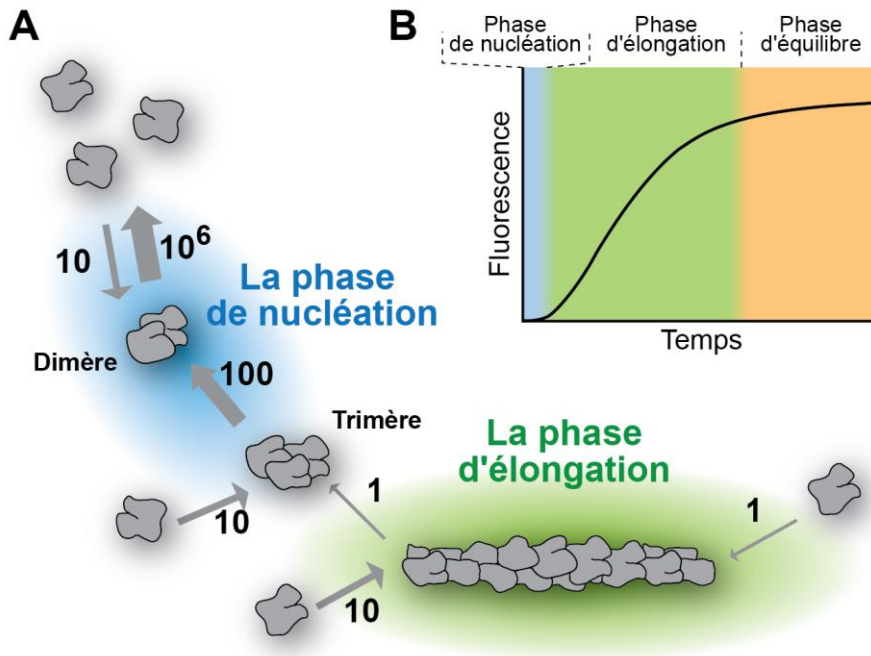


Figure 6 : Polymérisation des filaments d'actine

L'utilisation du pyrène a permis de déterminer que les monomères d'actine ont la capacité de polymériser spontanément en suivant trois phases : phase de nucléation, phase d'élongation et phase d'équilibre

1.3.3. La phase d'équilibre

La phase d'équilibre est atteinte lorsque les concentrations d'actine-F et d'actine-G sont stables. Cette concentration d'actine-G est nommée concentration critique. Durant cette phase, les vitesses de polymérisation et de dépolymérisation sont égales. La dépolymérisation au niveau de l'extrémité pointue est permise par la propriété ATPasique de l'actine-F : le taux d'hydrolyse de l'ATP passe respectivement de $7 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ pour l'actine-G à 0.3 sec^{-1} pour l'actine-F (Mochida et al., 2002; Pollard, 2016). La vitesse de libération du Pi issu de l'hydrolyse de l'ATP en ADP (0.003 sec^{-1}) est plus lente que cette réaction d'hydrolyse. Les filaments sont donc constitués de monomères liant des nucléotides différents en fonction de leur ancienneté dans le filament. Les monomères fraîchement liés aux filaments sont associés à l'ATP, puis ils sont liés à ADP+Pi (phosphate inorganique) et enfin les monomères les plus « anciens » sont liés uniquement à l'ADP. Ce vieillissement des monomères d'actine a une autre conséquence : les monomères d'actine liant l'ADP se dissocient en effet plus vite des extrémités du filament que les monomères d'actine liés à l'ATP. Le « vieillissement » du nucléotide, les différences de vitesses d'association-dissociation de l'actine-G en fonction du nucléotide ainsi que la polarité du filament, entraînent en une évolution dirigée du filament. La combinaison de ces trois paramètres induit en effet une polymérisation des filaments à leur extrémité barbée (ajout d'actine se liant à l'ATP) tandis qu'ils dépolymérisent à leur extrémité pointue (libération d'actine liée à

Introduction

l'ADP). L'évolution globale du filament est ainsi habituellement comparée au mouvement d'un **tapis-roulant** (Figure 7).

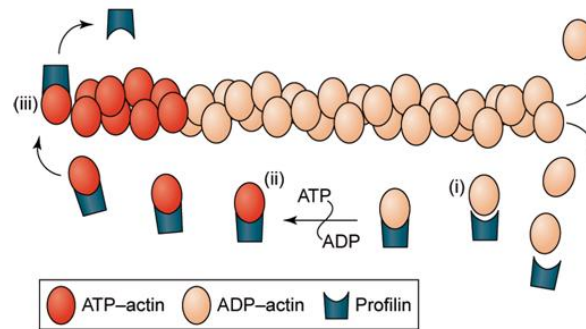


Figure 7. L'horloge interne du filament d'actine

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

1.4. Les toxines, de précieux outils

La lutte pour la survie au sein de la biodiversité peut être sans merci, et certains organismes ont opté pour l'utilisation « d'armes chimiques » : les toxines. Certaines de ces toxines ciblent le cytosquelette d'actine et sont utilisées en recherche pour altérer la dynamique des filaments d'actine. Ces toxines peuvent être classées en deux groupes : les toxines de stabilisation et de polymérisation des filaments d'actine, et les toxines dépolymérisantes (Tableau 3).

	Toxines	Origines	Effets
Toxines de stabilisation et de polymérisation	jasplakinolide	<i>Jaspis johnstoni</i> (Eponge marine)	Polymérisation et stabilisation des filaments d'actine
	Phalloïdine	<i>Amanita phalloides</i> (Champignon)	Stabilisation des filaments d'actine
Toxines dépolymérisantes	Latrunculine (A, B)	(A) <i>Latrunculia magnifica</i> (Eponge marine) (B) <i>Oxyria digyna</i> (Plante)	Séquestration des monomères d'actine dans le cytoplasme qui induit la dépolymérisation des filaments
	Cytochalasine (A, B, C, D, E, H, J)	(A, B) <i>Helminthosporium dematioideum</i> , (C, D) <i>Metarhizium anisopliae</i> (Champignon)	Inhibition de la polymérisation en liant l'extrémité barbée des filaments

Tableau 3 : Toxines et cytosquelette d'actine.

Liste de quelques toxines couramment utilisées en biologie cellulaire lors de l'étude du cytosquelette d'actine (Holzinger and Blaas, 2016)

2. Les protéines associées à l'actine

Le fait que la structure de l'actine ait très peu évolué, est largement compensé par l'extraordinaire diversité des protéines qui lui sont associées. Ces protéines peuvent être classées en 7 grandes familles de protéines en fonction du rôle qu'elles jouent sur les monomères et les filaments d'actine (Pollard, 2016; Dos Remedios et al., 2003). Les protéines associées à l'actine vont donc avoir pour fonction de :

- séquestrer les monomères d'actine (cf. **Protéines de séquestration**),
- induire la nucléation de nouveaux filaments d'actine (cf. **Nucléateurs**) et accélérer leur vitesse de polymérisation (cf. **Elongateurs**),
- stimuler la dépolymérisation des filaments (cf. **Protéines de fragmentation**),
- bloquer la polymérisation (cf. **Protéines de coiffage**),
- stabiliser les filaments d'actine (cf. **Protéines de stabilisation**),
- organiser les filaments en structure complexe (cf. **Protéines de réticulation**),
- appliquer des forces sur les filaments (cf. **Les moteurs moléculaires**).

2.1. Les protéines de séquestration

Les protéines de séquestration ont la capacité de lier les monomères d'actine avec des niveaux d'affinité variables. Ces protéines se lient aux monomères d'actine avec un ratio équimolaire (1:1).

2.1.1. La profiline

La profiline est une petite protéine d'environ 15 kDa (Gutsche-Perelroizen et al., 1999), qui a la capacité de se lier aux monomères d'actine-ATP avec une affinité de 0,1 μM (Pollard, 2016; Dos Remedios et al., 2003). Très abondante (environ 100 μM), la profiline se lie à la majorité des monomères d'actine libre du cytoplasme, au niveau de l'extrémité barbée des monomères (sous-unités 1 et 3) (Schutt et al., 1993). Par sa capacité à catalyser l'échange de l'ADP par l'ATP (Goldschmidt-Clermont et al., 1991), la profiline permet le maintien d'un pool d'actine-ATP cytoplasmique. De plus, *via* sa liaison au bout barbé, la profiline va inhiber la formation spontanée de dimères et trimères d'actine. Elle va ainsi empêcher la formation anarchique de nouveaux filaments tout en permettant l'élongation de filaments préexistants. Enfin, la profiline a la capacité d'accélérer la polymérisation induite par des formines en liant les domaines poly-prolines de ces dernières (Perelroizen et al., 1996; Petrella et al., 1996).

2.1.2. La thymosine- β -4

La thymosine- β -4 est une protéine de 5 kDa peu structurée en solution. Elle se structure néanmoins lorsqu'elle se lie à l'actine (Safer et al., 1997). La thymosine- β -4 lie les monomères d'actine au niveau de la sous-unité 3 (bout barbé), mais elle possède un prolongement qui vient inhiber l'échange nucléotidique en se liant à la sous-unité 2 (bout pointu) (De La Cruz et al., 2000; Xue et al., 2014). La thymosine- β -4 aurait donc pour rôle de séquestrer les monomères d'actine dans le cytoplasme.

2.1.3. La twinfiline

La twinfiline est une protéine ubiquitaire d'environ 40 kDa, qui a été découverte par homologie de séquence avec l'ADF/cofiline (Goode et al., 1998; Dos Remedios et al., 2003). Elle est composée de deux domaines globulaires homologues à l'ADF/cofiline associés par un petit domaine de liaison. D'un point de vue fonctionnel, la twinfiline a la capacité de se lier aux monomères d'actine-G-ADP avec une grande affinité (0,05 μ M) et d'inhiber l'échange de l'ADP en l'ATP (Ojala et al., 2002). La twinfiline permet donc d'inhiber la polymérisation du filament d'actine. Enfin, il semblerait que la twinfiline ait aussi un rôle de coiffage de l'extrémité barbée des filaments d'actine (Helfer et al., 2006).

2.2. Les nucléateurs & élongateurs

Pour fonctionner normalement, la cellule doit pouvoir contrôler la formation et l'élongation des filaments d'actine. Or, comme évoqué précédemment, la profiline tamponne les monomères d'actine libres et inhibe la formation de nouveaux filaments. La nucléation *de novo* est donc permise grâce à une famille de protéines nommées les « nucléateurs ». Il existe trois grands types de nucléateurs : **les formines**, **le complexe Arp2/3**, et **les nucléateurs à domaines WH2**, découverts respectivement en 1990, 1994 et 2005 (Machesky et al., 1994; Quinlan et al., 2005; Woychik et al., 1990). Malgré des modes de fonctionnement différents, ces nucléateurs ont un effet commun : ils forment un noyau d'actine, constitué de trois monomères. Puis ce noyau va, tel une graine, germer et former un nouveau filament par polymérisation (Chesarone and Goode, 2009) (**Figure 8**). Une fois que la nucléation *de novo* a eu lieu, la polymérisation des filaments va être accélérée par les élongateurs comme **les formines** et **VASP**. Les formines ont ainsi une double fonction : la nucléation et l'élongation de filaments.

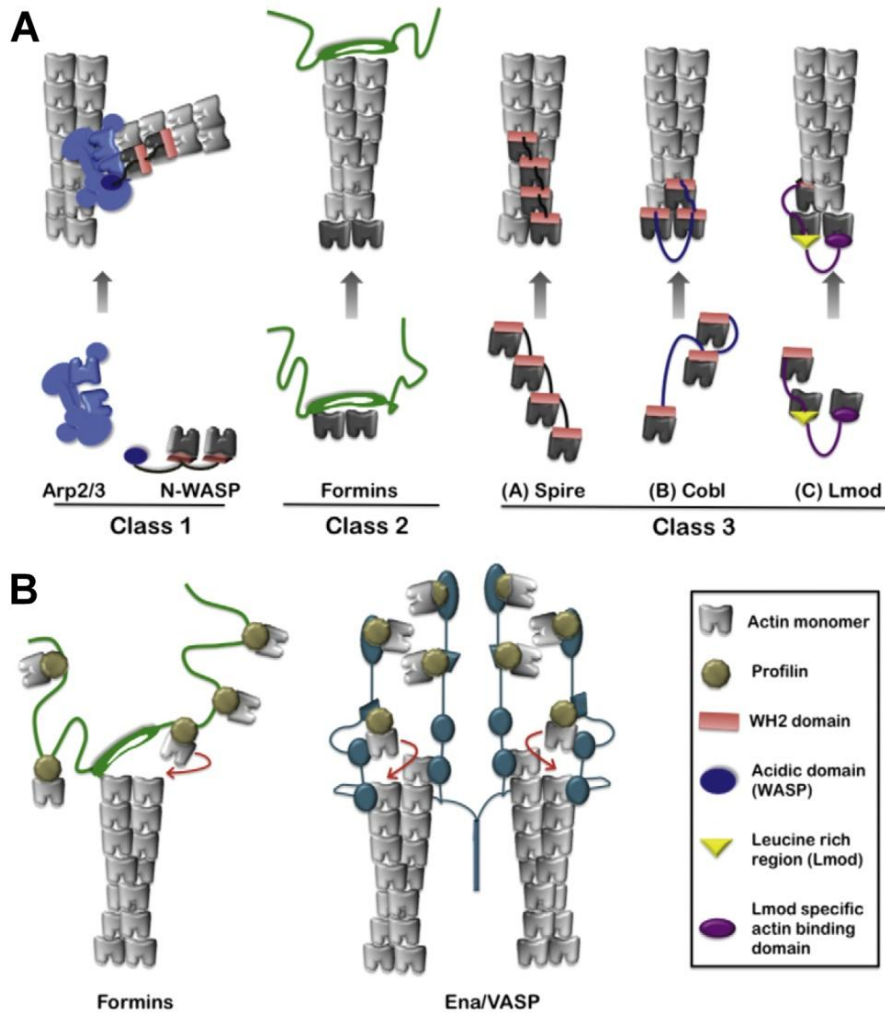


Figure 8. Modèle de fonctionnement des nucléateurs et des élongateurs.

A. Trois classes de nucléateurs d'actine : les formines, le complexe Arp2/3, et les nucléateurs à domaines WH2 (Spire, Cordon bleu et Leiomodine). B. Deux classes d'élongateurs : les formines et VASP. (D'après Chesarone and Goode, 2009)

2.2.1. Les formines

Ce n'est que 12 ans après la découverte des formines (1990), que leur fonction de nucléation de l'actine fut identifiée (2002) (Evangelista et al., 2002; Pruyne, 2002; Sagot et al., 2002a, 2002b). On sait aujourd'hui que les formines sont impliquées dans la formation de nombreuses structures cellulaires actine-dépendantes telles que les faisceaux d'actine, les jonctions adhérentes, les filopodes et le lamellipode (Block et al., 2012; Kobiela et al., 2004; Schirenbeck et al., 2005; Yang et al., 2007).

Les formines sont de longues protéines de 120–220 kDa fonctionnant en dimères. Elles permettent à la fois la nucléation et l'élongation du filament d'actine (Chesarone et al., 2010). Chez les mammifères, il existe 15 types de formines divisés en 8 sous-groupes en

Introduction

fonction de leur homologie de séquence (Kühn and Geyer, 2014; Schönichen and Geyer, 2010). Ces protéines sont divisées en quatre sous-domaines FH1, FH2, FH3 (**FH** pour **Formin Homology**) et **DAD** (pour **Diaphanous Autoregulatory Domain**). Dans le cytosol, les formines s'auto-inhibent par repliement grâce à la liaison du domaine DAD au domaine FH3, aussi appelé **DID** (pour **Diaphanous Inhibitory Domain**) (Li and Higgs, 2003) (**Figure 9.a**). Les formines sont activées par la liaison d'une RhoGTPase au niveau du domaine RBD (pour Rho-Binding Domain). Cette liaison entraîne la séparation des domaines DAD et FH3 et lève ainsi l'auto-inhibition (Kühn and Geyer, 2014).

Une fois activées, les formines vont dimériser, formant ainsi une sorte de doughnut au niveau des domaines FH2 (Otomo et al., 2005; Xu et al., 2004) (**Figure 9.B**) Cet anneau va permettre la nucléation du filament en stabilisant les dimères d'actine (Pring et al., 2003). Après la nucléation, les formines jouent également un rôle d'élongateurs. Elles accélèrent de manière progressive la polymérisation du filament en restant liées à son extrémité barbée (Kovar et al., 2006; Sagot et al., 2002b).

Durant la polymérisation, le domaine poly-proline de FH1 va, en liant les complexes profiline/actine, permettre une augmentation locale de la concentration en actine-G et ainsi accélérer la polymérisation (Romero et al., 2004). La catalyse induite par les formines permet ainsi d'augmenter jusqu'à quinze fois la vitesse de polymérisation des filaments (Kovar et al., 2006).

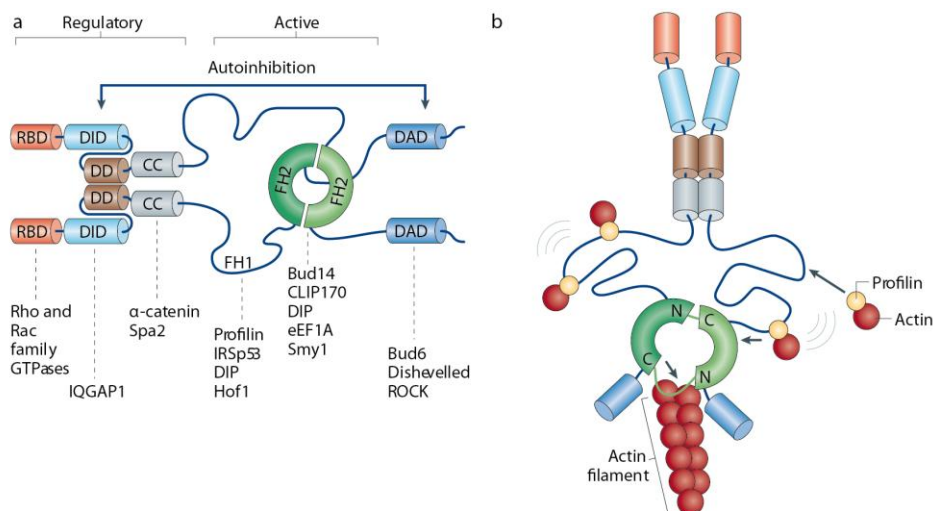


Figure 9. Les formines

a. Schéma des différents domaines des formines et liste des interactants de chaque domaine. B. Modèle de fonctionnement d'un dimère de formines, les domaines FH2 forment un doughnut qui encercle l'extrémité barbée lors de l'élongation du filament alors que les domaines FH1 recrutent les complexes actine-G/profiline (d'après Chesarone et al., 2010).

2.2.2. Le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 fut le premier nucléateur d'actine à avoir été découvert chez les eucaryotes (Machesky et al., 1994). Ce complexe a la capacité unique d'induire la formation de réseaux d'actine branchés et constitue ainsi un acteur clé de la formation du lamellipode. Sa capacité de nucléation est néanmoins intrinsèquement très faible et a ainsi besoin d'être activée par une famille de protéines nommée NPF (pour Nucleation Promoting Factor). Une fois activé, le complexe Arp2/3 initie la nucléation d'un nouveau filament (nommé filament fille) sur un filament préexistant (nommé filament mère) ; on parle alors de nucléation dendritique (Figure 10). La composition, la structure et le mode d'action du complexe Arp2/3 seront développés dans le chapitre 4.

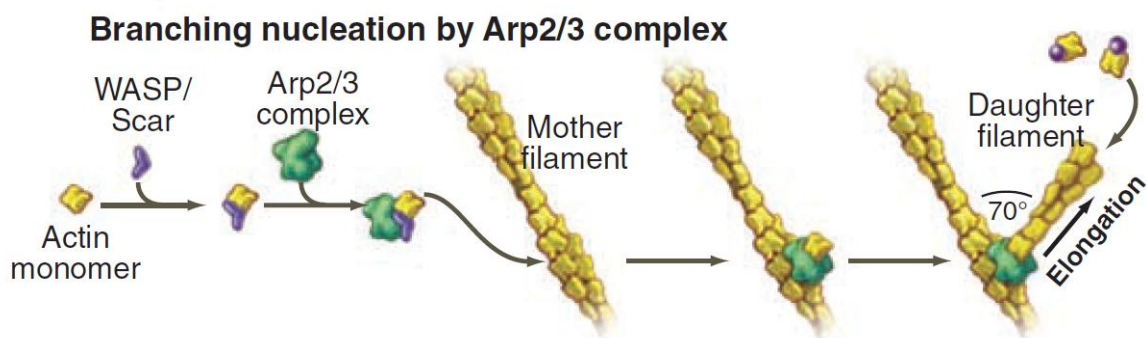


Figure 10. La nucléation branchée par le complexe Arp2/3
Activation de la nucléation branchée par le NPF WASP (d'après Pollard & Cooper 2009).

2.2.3. Les nucléateurs à domaine WH2.

Alors que l'on considérait les formines et le complexe Arp2/3 comme étant les seuls nucléateurs d'actine, une nouvelle famille de nucléateurs fut découverte il y a environ 10 ans. Ces nouveaux nucléateurs se caractérisent par leurs domaines WH2 (pour WASP-Homology 2) se liant aux monomères d'actine (Dominguez, 2016). Le mode d'action des différents nucléateurs à domaine WH2 est actuellement très controversé. Ne pouvant être exhaustif, ne seront exposés ici que les modes d'action de Spire et Cordon Bleu, en omettant volontairement ceux de Leiomodine, VopL/VopF et Sca2.

Spire fut le premier nucléateur à domaine WH2 identifié (Quinlan et al., 2005). Cette protéine cytoplasmique possédant 4 domaines WH2 fut découverte chez la drosophile. Des homologues du gène codant pour Spire chez la drosophile ont ensuite été identifiés chez les mammifères. Ces gènes nommés *Spir-1* et *Spir-2* codant pour deux isoformes de Spire (respectivement Spire-1 et Spire-2) semblent être préférentiellement exprimés au niveau des tissus nerveux (Schumacher et al., 2004). Dans le modèle couramment admis, Spire fonctionne en synergie avec les formines. Spire possède en effet un domaine KIND (pour Kinase Non catalytic C-lobe Domain) pouvant se lier aux domaines C-terminaux des

Introduction

formines. Dans ce modèle, deux protéines Spires s'associeraient pour induire la nucléation et recruter un dimère de formines. Une fois la nucléation induite, les deux spires se détacheraient et le dimère de formines induirait l'élongation du filament (Dominguez, 2016). Le fait que Spire ait essentiellement une fonction de nucléation est aujourd'hui débattu. En effet, deux études présentent Spire comme ayant des capacités d'inhibition de la polymérisation. La première étude montre qu'à forte concentration, Spire aurait tendance à séquestrer les monomères d'actine (Bosch et al., 2007). La deuxième étude montre que Spire viendrait inhiber l'élongation du filament induite par les Formines (Montaville et al., 2014).

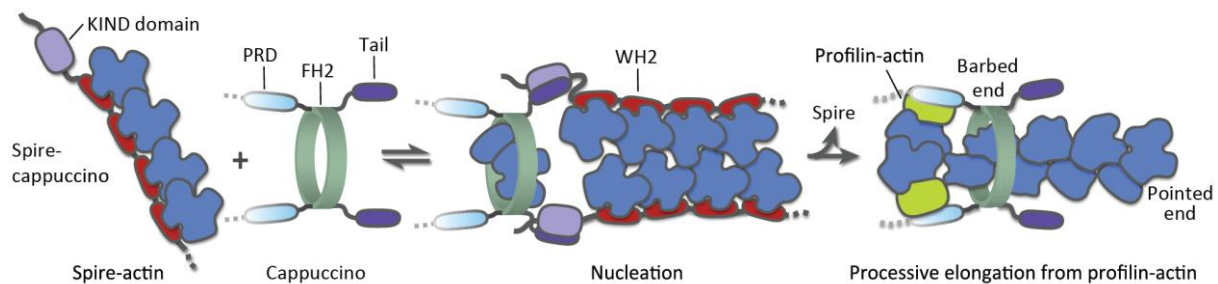


Figure 11. Nucléation induite Spire et la formine cappuccino

Deux Spires s'associent pour induire la nucléation en liant via leurs domaines KINDs les domaines C-terminaux de deux formines cappuccino (d'après Dominguez, 2016).

Cordon bleu (Cobl) est un nucléateur d'actine possédant 3 domaines WH2. Cette protéine semble avoir un rôle important lors de la morphogenèse neuronale et la mise en place d'arborisation dendritique (Ahuja et al., 2007). Dans un premier temps, il a été pensé que Cobl agissait seul et permettait la nucléation de l'actine en stabilisant le trimère d'actine (Ahuja et al., 2007; Campellone and Welch, 2010). Mais une nouvelle hypothèse semble émerger, basée sur le fait que le domaine PRD (pour **P**roline-**R**ich **D**omain) de Cobl ait la capacité de se lier au domaine SH3 de certaines protéines BAR (syndapin, SNX9 et ASAP1) (Dominguez, 2016). Cette hypothèse propose que la nucléation soit initiée par deux protéines Cobl associées à un dimère de protéines BAR.

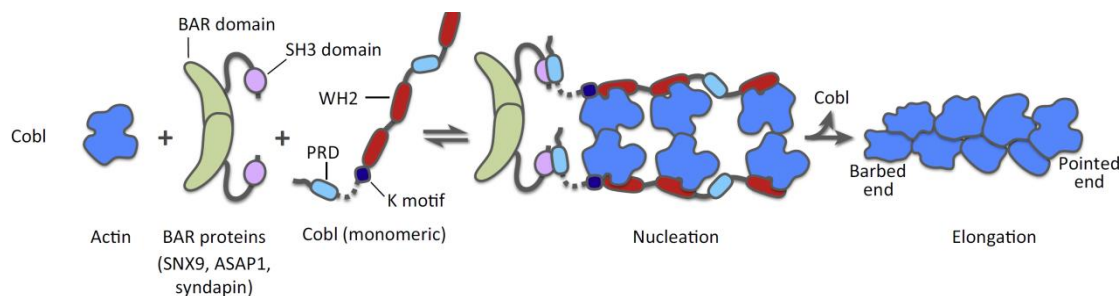


Figure 12. Nucléation induite Colb en présence de protéines BAR

Nucléation initiée par deux protéines Cobl associées à un dimère de protéines BAR (d'après Dominguez, 2016).

2.2.4. Les protéines de type ENA/VASP

Les protéines de type ENA/VASP sont au nombre de trois chez les mammifères ; VASP (**V**asodilator-**S**timulated **P**hosphoprotein), Mena (**M**ammalian **E**nabled) et **EVL** (**E**na-**V**ASP-**L**ike protein). Les protéines de la famille ENA/VASP sont de larges protéines multifonctionnelles. Elles possèdent principalement trois domaines : un domaine riche en proline qui lie la profiline, un domaine "ENA/VASP homology 1" (EVH1) se liant à des motifs riches en proline et un domaine EVH2 nécessaire à la tetramérisation. Le domaine EVH2 possède un domaine de liaison à la G-actine (GAB) présentant des homologies de séquences avec les motifs WH2 et à la F-actine (FAB). Des études de biochimie et de microscopie ont montré que les protéines ENA/VASP avaient la capacité de protéger le bout barbé des filaments d'actine des protéines de coiffe (Barzik et al., 2005; Bear et al., 2002; Pasic et al., 2008). Néanmoins, le rôle des protéines ENA/VASP ne se limiterait pas à un rôle de protection contre les protéines de coiffe. En effet, elles auraient également un rôle d'élongation du filament, qui serait dû à leur capacité à recruter des monomères d'actine par le domaine GAB (Breitsprecher et al., 2008; Ferron et al., 2007).

2.3. Les protéines de segmentation

Il existe deux grands types de protéines de segmentation : les ADF/cofilines et les gelsolines. Ces protéines ont la capacité de cliver les filaments d'actine.

2.3.1. Les ADF/cofilines

Les ADF/cofilines (**A**ctin **D**epolymerizing **F**actor et **C**osediments with **f**ilamentous **a**ctin) sont des protéines de petite taille (15-21 kDa) que l'on retrouve chez tous les eucaryotes (Ono, 2007). Chez les mammifères, il existe trois types d'ADF/cofilines : la **cofiline 1** exprimée aux stades embryonnaire et adulte, la **cofiline 2** exprimée au niveau musculaire et l'**ADF** principalement exprimée au niveau des cellules épithéliales et neuronales (Vartiainen et al., 2002). Les ADF/cofiline possèdent deux sites de liaison à l'actine, l'un au niveau barbé du monomère (Paavilainen et al., 2008) et l'autre au niveau pointu (Galkin et al., 2011). L'ADF/cofiline possède aussi la capacité d'accélérer la libération des Pi des monomères liant ADP+Pi.

Alors qu'initialement on pensait que l'ADF/cofiline dépolymérisait les filaments par accélération de la vitesse de dissociation des monomères de l'extrémité pointue (Carlier et al., 1997), le modèle actuel suppose que l'ADF/cofiline agit en fragmentant l'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Michelot et al., 2007; Pavlov et al., 2007). En effet, grâce à ses deux sites d'adhésion, l'ADF/cofiline se fixe sur les filaments à la jonction entre

Introduction

deux monomères successifs (Lappalainen and Drubin, 1997). Cette fixation induirait à la fois un changement de structure du monomère (Galkin et al., 2011) et la libération du Pi qu'il contient (Blanchoin and Pollard, 1999). La liaison de plusieurs ADF/cofiline sur un même filament induirait un changement local de sa structure en le fragmentant (McCullough et al., 2011). Etant largement composé d'actine-ADP, la dissociation des fragments de filaments en monomères se ferait ensuite de manière spontanée car la constante de dissociation est plus importante que la constante d'association.

2.3.2. La gelsoline

La gelsoline est une protéine 80 kDa qui présente deux états : un état natif et un état lié au calcium. A l'état natif, la gelsoline a une forme globulaire ; lorsqu'elle se lie au calcium, la protéine se déplie pour ensuite se lier au filament d'actine et le fragmenter (Dos Remedios et al., 2003). La gelsoline reste ensuite liée à l'extrémité barbée du filament fractionné et coiffe ce dernier. De cette manière, elle inhibe toute nouvelle polymérisation du filament sectionné (Sun et al., 1999).

2.4. Les protéines de coiffage

Les protéines de coiffage sont une famille de protéines liant les extrémités barbées des filaments et bloquant la polymérisation de ces derniers. Il existe plusieurs types de protéine de coiffage (gelsoline, adducine, twinfiline, Eps8), mais les **CP** (pour capping protein) aussi nommées **CapZ**, sont ubiquitaires (Edwards et al., 2014). Ces protéines forment un hétérodimère composé de CapZ α et CapZ β . Le coiffage des filaments n'est pas un acte anodin car la demi-vie de dissociation est de 30 min (Pollard, 2016). Il y a donc un antagonisme fonctionnel entre les élongateurs et les protéines de coiffage. Il a d'ailleurs été montré, par des approches de suivi de molécules individuelles, que cet antagonisme pouvait donner naissance à des « complexes de décision » (Bombardier et al., 2015). Ces complexes de décision sont caractérisés par l'association simultanée d'une extrémité barbée d'un filament à un élongateur et des protéines de coiffage. Ce complexe conduira ensuite soit au maintien de l'élongateur soit au maintien de la coiffe. D'un point de vue fonctionnel, les protéines de coiffage jouent un rôle clé dans la formation du lamellipode, car leur déplétion induit la disparition des lamellipodes au profit de filopodes (Mejillano et al., 2004).

3. Les structures actine-dépendantes

Nous avons vu dans ce chapitre que l'actine pouvait être associée à une myriade de protéines. De par cette grande diversité d'association elle est retrouvée dans plus d'une dizaine de structures subcellulaires (Chhabra and Higgs, 2007). Ces structures peuvent être classées selon leurs fonctions ou leurs rôles physiologiques (**Figure 13**)

Parmi ces structures, l'une d'entre elles est fondamentale lors de la migration cellulaire mésenchymateuse : le lamellipode. Dans la suite de ce manuscrit, seront donc abordés en détail, la structure du lamellipode, les mécanismes permettant la régulation de sa formation, ainsi que les processus mécano-biologiques qui permettent la protrusion cellulaire.

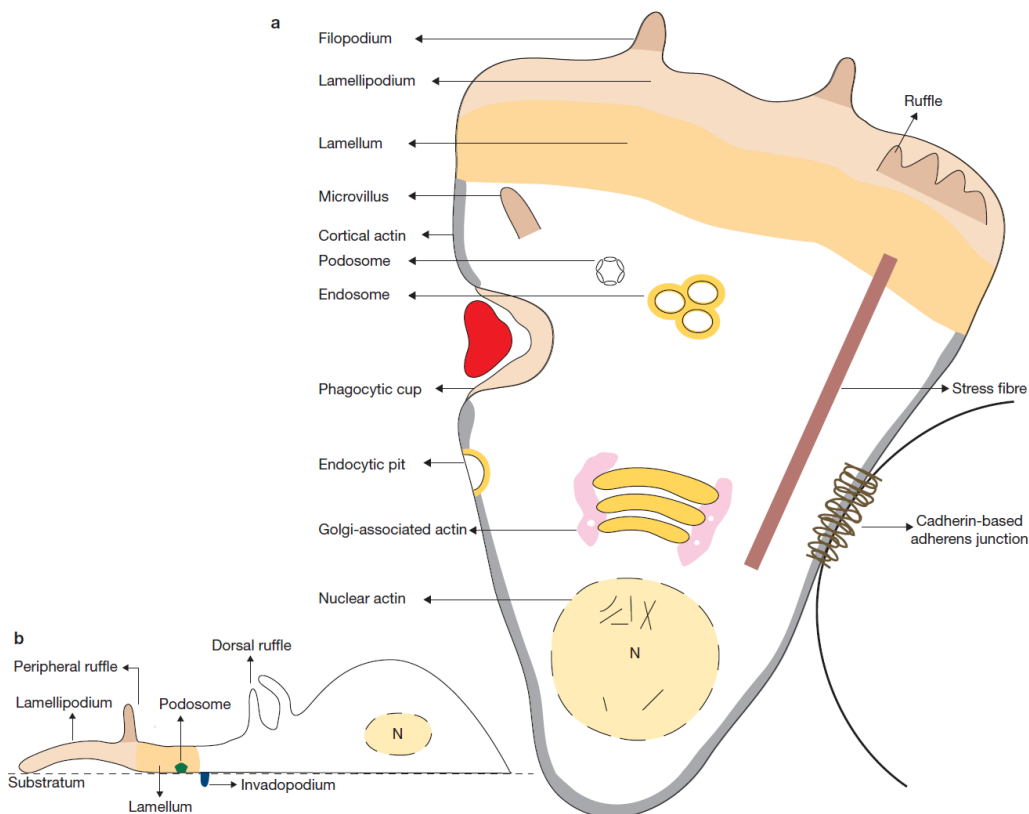


Figure 13. Les différentes structures d'actine

a. Les filaments d'actine s'organisent pour former plus de 15 structures différentes, intervenant dans de nombreux processus : motilité, trafic vésiculaire, endo/exocytose, jonctions intercellulaires. b. Le lamellipode, les podosomes et les invadopodes sont des structures d'actine impliquées dans la migration et l'invasion cellulaire (d'après Chhabra and Higgs, 2007)

Introduction

3.

Le lamellipode

C'est au début des années 70 qu'Abercrombie, Heaysman et Pegrum publièrent une série de papiers nommée « The locomotion of fibroblasts in culture ». Cette étude fut l'une des pierres angulaires dans le domaine de la migration cellulaire, en effet, elle décrivait le modèle de migration cellulaire séquentielle dépendante du lamellipode. Après sa découverte, le lamellipode fut l'objet d'intenses travaux de recherches, je vous propose donc au cours de ce chapitre d'en aborder la substantifique moelle.

1. Une "Usine" à filaments

Comme le disait Victor Small, « le lamellipode est une usine à filaments » (Small et al., 1998) et alors que l'on approche des 50 ans de sa découverte, on sait aujourd'hui que ce lamellipode est une usine extrêmement bien administrée. Le lamellipode est défini comme une large protrusion plate (environ 100 à 200 nm d'épaisseur) localisé à la périphérie des cellules motiles (**Figure 14.A**). En 1999, Svitkina et Borisy découvrirent, par des approches de microscopie électronique, que le lamellipode était composé d'un réseau d'actine branché (Svitkina and Borisy, 1999) (**Figure 14.B**). Cette découverte eut alors deux conséquences majeures. Dans un premier temps, elle mit en exergue le rôle prépondérant du complexe Arp2/3 dans la formation du lamellipode. Puis, elle permit la conceptualisation du modèle phare décrivant le fonctionnement du lamellipode : **le modèle de nucléation dendritique** (Pollard et al., 2000). La vision canonique du lamellipode était alors celle d'un réseau de filaments courts, rigides, branchés, ayant leurs extrémités barbées orientées en direction de la membrane plasmique et distribués de manière non homogène, avec une densité en filament plus importante aux abords de la membrane plasmique qu'à l'arrière du lamellipode

Introduction

(Symons and Mitchison, 1991). Dans ce modèle, les forces permettant la protrusion membranaire trouvent leurs origines dans la polymérisation continue des filaments (Figure 14) (Pollard et al., 2000).

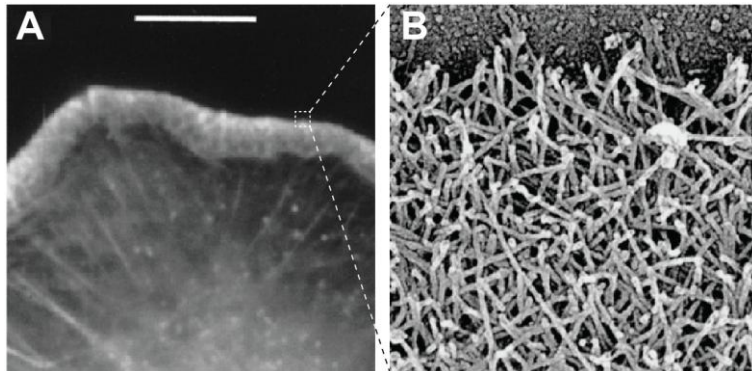


Figure 14. Le lamellipode une usine à filaments.

A. Image de microscopie photonique d'un lamellipode marqué par de l'actine-rhodamine (adaptée de Symons & Mitchison 1991) B. Image du réseau de filaments du lamellipode obtenue par microscopie électronique (adaptée de Pollard et al. 2000)

2. Les modèles de formation du lamellipode

2.1. Le modèle de nucléation dendritique

C'est en associant, l'observation de l'architecture des réseaux branchés du lamellipode aux découvertes portant sur les différentes protéines liées à l'actine (localisation, activité biochimique, régulation), que Pollard et collaborateurs ont pu en l'an 2000 proposer **le modèle de nucléation dendritique**. Ce modèle décrit la formation du lamellipode et le cycle de vie des monomères d'actine au sein de ce dernier de manière séduisante (Pollard et al., 2000). Bien que ce modèle ait été proposé il y a déjà plus de 15 ans, il est encore d'actualité et de nombreuses études publiées jusqu'à aujourd'hui corroborent ce modèle (Lai et al., 2008; Nakagawa et al., 2003).

Dans leur modèle Pollard et al. proposèrent que l'initiation de la nucléation dendritique était due à l'activation d'une RhoGTPases par des stimuli externes. Une fois activée cette RhoGTPases va initier une cascade d'activation. En effet elle va activer un NPF localisé à l'extrémité du lamellipode. Puis, ce NPF va activer des complexes Arp2/3. Une fois actifs, ces complexes Arp2/3 induisent la nucléation de nouvelles branches sur le côté de filaments existants. Ces nouveaux filaments vont ensuite polymériser rapidement grâce à la concentration cytoplasmique élevée en actine monomérique. L'élongation de ces filaments va permettre de pousser la membrane en avant. Puis le coiffage des filaments va stopper leur élongation. Au sein des filaments, l'hydrolyse progressive de l'ATP va conduire au « vieillissement » du filament. L'ADF/cofiline va s'associer à ces filaments ADP et induire leur segmentation. Après la dissociation des filaments, la profiline va se réassocier aux

monomères d'actine et catalyser l'échange ADP/ATP. Les monomères d'actine-ATP pourront ainsi être recyclés aux extrémités barbées.

L'organisation spécifique des acteurs moléculaires permettant la formation du lamellipode fait ainsi apparaître un flux rétrograde du réseau d'actine au sein du lamellipode (Lai et al., 2008; Millius et al., 2012; Watanabe and Mitchison, 2002). L'étude de ces différents régulateurs a aussi révélé qu'ils n'étaient pas statiques, ils présentent une dynamique rapide et des temps d'immobilisation brefs (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008).

L'un des enjeux actuels du domaine est donc d'identifier le rôle de ces différents acteurs moléculaires et d'en déterminer les mécanismes de régulations et ce dans un contexte cellulaire dynamique.

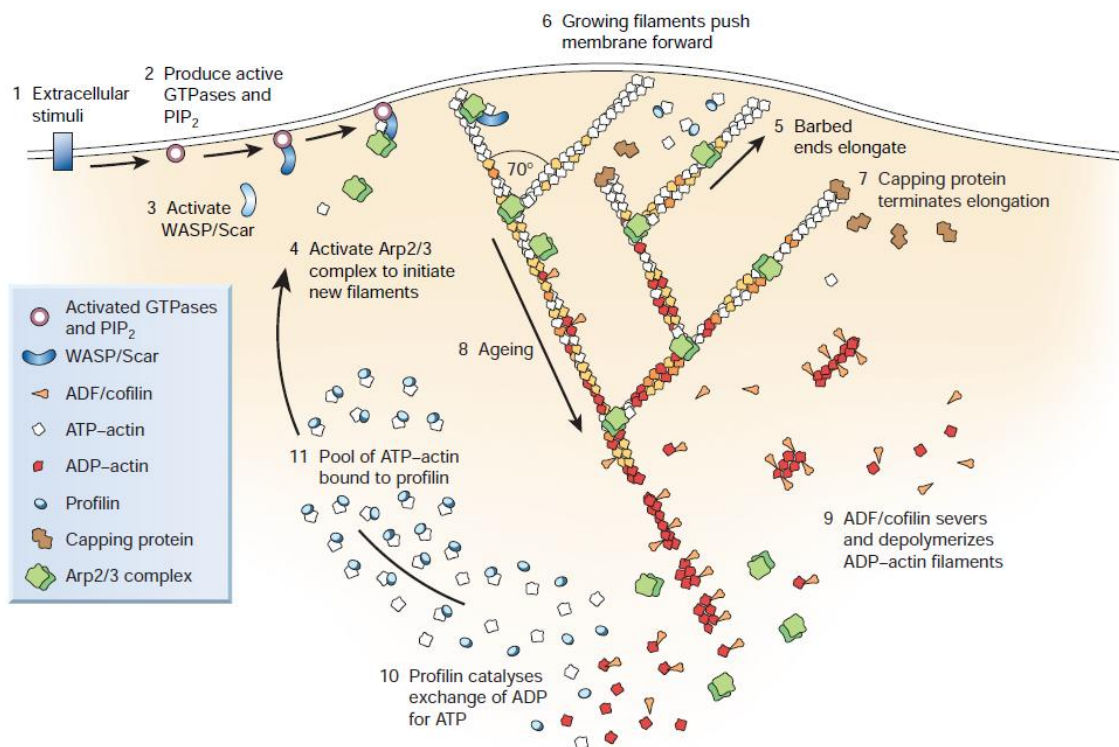


Figure 15. Le modèle de nucléation dendritique et ses 11 étapes

Le modèle de nucléation dendritique est un modèle de formation du lamellipode divisé en 11 étapes. Seules les trois premières étapes correspondent à la nucléation à proprement parlé (d'après Pollard, 2003).

2.2. Un pavé dans la mare

Alors que l'on pouvait penser le modèle de nucléation dendritique comme suffisant pour décrire le fonctionnement du lamellipode, ce dernier fut mis à mal au cours de querelles opposant l'équipe de Tatyana Svitkina, partisane du modèle à celle de Victor Small, le mettant en doute.

Les altercations commencèrent lorsque Victor Small, dans une étude par tomographie électronique, suggéra que le lamellipode était peu branché (Urban et al., 2010). Il expliquait alors que l'apparence branchée du lamellipode observée par Tatyana Svitkina (Svitkina and Borisy, 1999) était due à un chevauchement des filaments. Peu de temps après cette étude, Victor Small signa une cinglante revue où il pointait les limites et les incohérences du modèle de nucléation dendritique (Small, 2010). En substance, Victor Small exposait qu'il était opposé au modèle de réseaux branché de filaments courts, selon lui le lamellipode était formé de filaments longs et très peu branchés.

L'étude Urban et collaborateurs et la revue Victor Small eurent effet d'une déflagration dans le domaine et furent suivies de vives correspondances. Une première correspondance, entre Robert Insall, Henry Higgs et Victor Small, tend à pondérer la remise en cause du modèle dendritique. En effet, Robert Insall rappelle que le modèle de nucléation dendritique ne repose pas que sur des images de microscopie électronique, il est aussi basé sur des données biochimiques (Insall, 2011). Henry Higgs quant à lui rappelle que malgré leurs désaccords les deux camps s'entendent sur certains points, tels que la localisation et le rôle des complexes Arp2/3 et Wave (Higgs, 2011). Enfin, bien que les auteurs s'entendent tous sur le fait que les différences entre les études de Svitkina & Borisy 1999 et Urban et collaborateurs 2010 seraient dues au type de préparation lors de la fixation des échantillons, aucun consensus n'émergera de la correspondance (Higgs, 2011; Insall, 2011; Small, 2011).

La réelle réplique aux allégations de Victor Small et son équipe viendra d'une lettre de Changsong Yang et Tatyana Svitkina, attaquant de façon franche l'étude d'Urban et collaborateurs (Yang and Svitkina, 2011). En effet, dans ce courrier les auteurs ré-analysent des données et montrent que le nombre de branchements observés dans les lamellipodes ré-analysés était bien supérieur à celui proposé par Urban et al. . Small et collaborateurs répondirent à ce courrier en admettant des erreurs dans l'estimation du nombre de branchements (Vinzenz et al., 2012). Ils proposèrent alors un modèle hybride où le lamellipode était formé de filaments longs et branchés (Vinzenz et al., 2012; Yang and Svitkina, 2011).

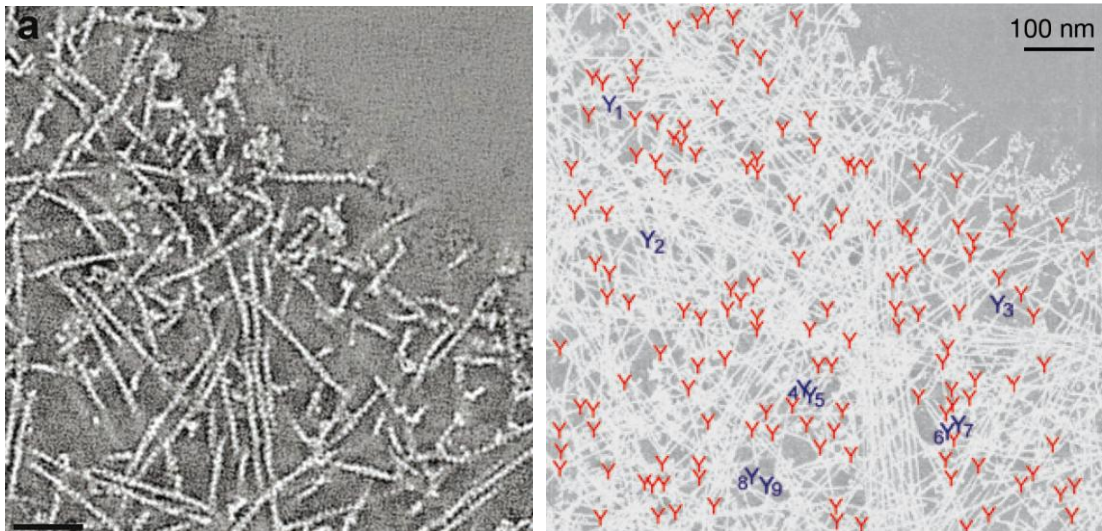


Figure 16. Un lamellipode à deux visages

Analyse d'un même lamellipode par deux approches et deux équipes différentes, (Urban et al., 2010 à gauche; Vinzenz et al., 2012 à droite)

3. La vision actuelle de la formation du lamellipode

Le fonctionnement du lamellipode repose sur un équilibre fin entre polymérisation de filaments branchés à l'avant et segmentation des filaments à l'arrière. C'est donc en jouant principalement sur ces deux facteurs que la migration cellulaire est régulée.

A première vue, le complexe Arp2/3 semble avoir un rôle central dans la formation du lamellipode, car il permet la formation des branchements observés au sein du réseau et sa suppression ou sa séquestration inhibe la formation du lamellipode (Kunda et al., 2003; Machesky and Insall, 1998; Steffen et al., 2006; Wu et al., 2012). Mais cette vision est à nuancer par le fait que le complexe Arp2/3 possède une activité de nucléation faible. Il n'est en réalité que l'étape finale d'un mécanisme complexe de régulation, permis par la simultanéité de plusieurs signaux localisées à la membrane (Lebensohn and Kirschner, 2009).

L'un des premiers enjeux fut de déterminer quel est le NPF responsable de l'activation du complexe Arp2/3 au lamellipode. Le complexe Wave fut ainsi désigné comme étant le candidat logique, puisque localisé à l'extrémité du lamellipode (Hahne et al., 2001), ce NPF y régule la dynamique du cytosquelette (Lai et al., 2008; Steffen et al., 2006) et sa suppression inhibe la formation du lamellipode (Steffen et al., 2006; Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003).

3.1. Le complexe Wave, un NPF sous contrôle !

Après avoir identifié le complexe Wave, il fallut étudier quels étaient ses mécanismes d'activation. Rac1 fut ainsi logiquement désigné comme jouant le rôle d'activateur car cette RhoGTPase avait été à la fois caractérisée comme un activateur du complexe Wave (Steffen et al., 2004) et impliquée dans la formation du lamellipode (Ridley et al., 1992). L'implication de Rac1 dans la formation du lamellipode fut ensuite confirmée par le fait qu'une photoactivation de ce dernier induit la formation d'un lamellipode. Cette caractérisation fut ensuite appuyée par le fait que la photoactivation de Rac1 induit la formation du lamellipode (Wu et al., 2009).

La présence du complexe Wave et son activation par Rac1 n'est toutefois pas suffisante pour induire la formation du lamellipode. En effet, il semblerait qu'une liaison de la protéine I-BAR **IRSp53** au complexe soit nécessaire à l'activation induite par Rac1 (Abou-Kheir et al., 2008; Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006a). Néanmoins des approches *in vitro* semblent dire le contraire, selon cette étude, IRSp53 n'est pas nécessaire à l'activation du complexe Wave (Lebensohn and Kirschner, 2009).

Il a aussi été montré que la localisation à la membrane du complexe Wave était régulée par une composition membranaire enrichie en PIP3 (grâce à la phosphatidylinositol-3-kinase) et la présence d'IRSp53 (Miki et al., 2000; Oikawa et al., 2004; Suetsugu et al., 2006b). De plus, le fait qu'IRSp53 soit enrichi à l'extrémité du lamellipode (Nakagawa et al., 2003), laisse supposer qu'il ne serait pas seulement à l'origine du recrutement membranaire, mais il serait aussi à l'origine de l'enrichissement du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode (Hahne et al., 2001; Lai et al., 2008). La composition, la structure et le mode d'action du complexe Wave seront développés dans le chapitre 4. L'activation du complexe Arp2/3 peut être inhibée par la voie de signalisation d'**Arpin** (pour **Arp inhibition**). En effet, il a été montré que l'activation d'Arpin par Rac1, induisait son recrutement au lamellipode. Arpin va ensuite pouvoir se lier au complexe Arp2/3 et l'inhiber.

3.2. Rôle des élongateurs

La remise en cause du modèle de nucléation dendritique eut pour effet de réactualiser le rôle des élongateurs dans la formation du lamellipode, alors que leur rôle dans la formation du lamellipode avait déjà été sujet à controverse près de 10 ans plus tôt. En effet, alors que la quantité de VASP localisée à l'extrémité du lamellipode est proportionnelle à la vitesse de protrusion (Rottner et al., 1999a), la surexpression ou la déplétion de VASP va respectivement diminuer ou accélérer la vitesse de migration (Bear et al., 2000). Mais une étude de Bear et al. en 2002 permit de résoudre cette controverse grâce à des approches de microscopie électronique. Les auteurs montrèrent ainsi qu'une déplétion de VASP induit la formation d'un réseau de filaments courts et très branchés au niveau du lamellipode, alors qu'une surexpression de VASP conduisait à la formation d'un lamellipode aux filaments longs et peu branchés (Bear et al., 2002; Machesky, 2002). Les auteurs purent alors expliquer que la localisation de VASP au lamellipode nécessitait la présence d'extrémités barbées libres. De ce fait, la corrélation positive entre la quantité VASP et la vitesse de protrusion s'explique par le nombre plus élevé de branchements et donc d'extrémités barbées libres dans les lamellipodes très actifs. L'accélération de la vitesse de migration après la déplétion de VASP serait donc due à une augmentation de la stabilité du lamellipode. Alors que le ralentissement de la vitesse de migration lors d'une surexpression de VASP, serait dû à la formation de lamellipodes aux protrusions rapides mais moins stables (Bear et al., 2002; Krause et al., 2003). Plus tard l'implication similaire d'autres élongateurs tels que mDia2 et FMNL2 dans la formation du lamellipode fut montrée (Block et al., 2012; Yang et al., 2007).

3.3. Limitation de la polymérisation et désassemblage du réseau

Lors de la formation du lamellipode, la longueur des filaments se doit d'être contrôlée, et cette fonction incombe aux protéines de coiffage de famille des CapZs. Le rôle des CapZs est corroboré par le fait qu'elles sont localisées à l'extrémité du lamellipode (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008) et qu'un knockdown de ces dernières induit par l'utilisation d'ARN interférent engendre une formation excessive de filopodes au détriment de lamellipodes (Mejillano et al., 2004). Les protéines de coiffage ciblent, comme les élongateurs, les extrémités barbées des filaments d'actine. Ces deux types de protéines sont donc en compétition et ont donc des effets antagonistes lors de la migration cellulaire (Bear et al., 2002).

Introduction

Bien que l'ADF/cofiline ait pour fonction d'induire une segmentation des filaments d'actine (Andrianantoandro and Pollard, 2006; Michelot et al., 2007; Pavlov et al., 2007), elle n'en est pas moins une protéine clef dans la formation et la dynamique du lamellipode et sa déplétion réduit la vitesse du flux rétrograde d'actine (Iwasa and Mullins, 2007) et affecte la directionnalité de migration (Ghosh et al., 2004). L'ADF/cofiline est distribué sur l'ensemble du lamellipode (Lai et al., 2008) et permet le recyclage des monomères d'actine en morcelant les filaments. Elle a donc deux rôles majeurs, le réapprovisionnement du pool d'actine-G (Bamburg and Bernstein, 2010; Kiuchi et al., 2007; Pantaloni et al., 2001) et la création de nouvelles extrémités barbelées libres pouvant être utilisées en tant que filaments mères pour le complexe Arp2/3 (Ghosh et al., 2004).

3.4. Protrusion, adhésion cellulaire et contractilité

La migration cellulaire est permise par une balance entre la protrusion membranaire, l'adhésion cellulaire et la contractilité myosine-dépendante et il existe par conséquent, des liens étroits en ces trois composantes (Gupton and Waterman-Storer, 2006). L'étude de ces liens a permis la mise en évidence de deux mécanismes clés du fonctionnement du lamellipode.

Ainsi, dans une série d'articles, Giannone et al. ont révélé l'existence de **contractions périodiques** à l'avant du lamellipode, dépendantes de myosines II localisées à l'arrière du lamellipode (Giannone et al., 2004, 2007). Ces contractions périodiques permettraient de sonder la rigidité de la MEC pour déterminer, si besoin, la direction de migration (Lo et al., 2000). Elles semblent aussi être impliquées dans la formation des sites d'adhésion naissants à l'extrémité du lamellipode (Alexandrova et al., 2008; Choi et al., 2008; Giannone et al., 2007).

L'embrayage moléculaire ou "**molecular clutch**" fut initialement proposé il y a déjà près de 30 ans pour décrire la migration cellulaire avec une analogie empruntée au monde automobile, où le flux rétrograde d'actine correspond au moteur et les adhésions aux roues (Bard et al., 2008; Giannone et al., 2009; Mitchison and Kirschner, 1988). Ce concept explique qu'une protrusion efficace est dépendante d'un flux rétrograde connecté au substrat *via* des adhésions. Ainsi, le flux rétrograde seul n'est pas suffisant pour générer une protrusion membranaire, c'est la transmission des forces à la MEC *via* des protéines adaptatrices et des protéines d'adhésion (comme les cadhérines et les intégrines) qui va induire la protrusion membranaire (**Figure 17**). L'engagement de l'embrayage moléculaire va avoir pour effet de diminuer localement le flux rétrograde du réseau d'actine. (Gupton et al., 2007)

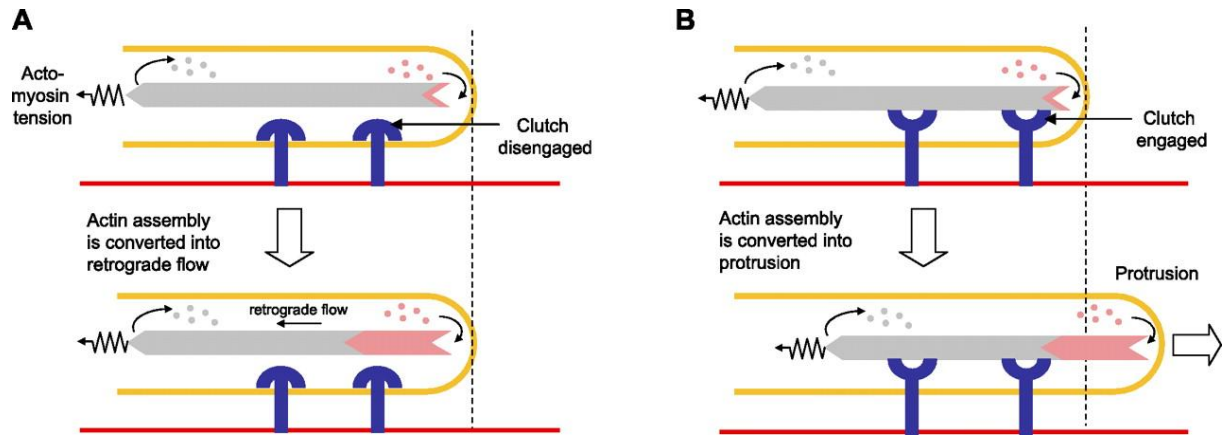


Figure 17. L'embrayage moléculaire

L'adhésion agit comme un «embrayage moléculaire» pour convertir la force générée par l'assemblage des filaments d'actine lors de la protrusion (d'après Le Clainche and Carlier, 2008)

Introduction

4.

Complexe Arp2/3 et NPFs

Comme nous l'avons déjà vu, le complexe Arp2/3 est un élément clé de la formation des réseaux branchés, il convient donc d'en comprendre la structure et les mécanismes de régulation. Dans ce chapitre, nous verrons que le complexe Arp2/3 est sujet à une régulation complexe nécessitant la simultanéité des signaux localisés.

1. Le complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 fut initialement le premier nucléateur d'actine à avoir été identifié en tant que tel (Machesky et al., 1994; Welch et al., 1997). Le complexe Arp2/3, composé de 7 sous-unités, fut purifié pour la première fois en 1994 chez l'amibe *Acanthamoeba castellanii* grâce à son affinité pour la profiline, (Machesky et al., 1994) et on découvrit plus tard ses fonctions de nucléation (Welch et al., 1997) et de réticulation du réseaux d'actine (Mullins et al., 1998). L'utilisation de monomères d'actine marqués à la rhodamine lors d'approches *in vitro*, permet la visualisation directe du fonctionnement du complexe Arp2/3 (Amann and Pollard, 2001; Blanchoin et al., 2000) et on observa pour la première fois que le complexe Arp2/3 induisait la formation d'un nouveau filament (nommé filament fille) en se liant à un filament préexistant (nommé filament mère). Les filaments mère et fille forment alors un angle de 70° (Amann and Pollard, 2001; Blanchoin et al., 2000; Mullins et al., 1998) (**Figure 18**) La découverte du rôle du complexe Arp2/3 tombait à point nommé puisque peu de temps avant, Svitkina et collaborateurs avaient suspecté l'existence de branchement d'actine à l'extrémité du lamellipode de kératinocytes de poisson observé en microscopie électronique (Svitkina and Borisy, 1999). Le paradigme des réseaux branchés d'actine, en particulier au lamellipode, était né (Pollard et al., 2000; Svitkina and Borisy, 1999). On découvrit au même moment que le complexe Arp2/3 avait une activité de nucléation intrinsèque faible (Machesky et al., 1999). On comprit alors que cette nucléation n'avait lieu

Introduction

qu'en présence de filaments d'actines préexistants (Blanchoin et al., 2000) et après une activation préalable du complexe Arp2/3 par une famille d'activateurs nommés facteurs de nucléation ou **NPFs** (pour **N**ucléation **P**romoting **F**actors) (Campellone and Welch, 2010; Machesky et al., 1999).

Ces découvertes furent à l'origine d'un engouement portant sur l'étude du complexe Arp2/3 et des réseaux branchés d'actine. En effet, de nombreuses zones d'ombres existaient encore. Quelle est la composition et la structure du complexe Arp2/3 ? Comment le complexe Arp2/3 est-il activé ? Qui sont ces NPFs ? Est-il régulé par d'autres moyens ? L'engouement pour ces interrogations, fut grandissant lorsque l'on découvrit que le complexe Arp2/3 avait un rôle prépondérant dans une multitude de fonctions biologiques telles que l'endocytose, la phagocytose, l'exocytose, le trafic vésiculaire, la formation de podosomes, l'adhérence cellulaire et bien sûr la migration cellulaire qui nous intéresse ici (Goley and Welch, 2006).

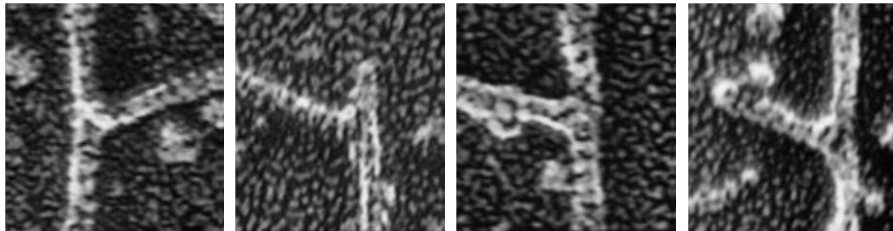


Figure 18. Filaments mère et fille

Image de microscopie électronique montrant que les filaments mère et fille forment un angle de 70° (d'après Mullins et al., 1998).

2. Composition du complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est composé de 7 sous-unités comprenant les protéines **ARP2**, **ARP3** (pour **Actin-Related Protein**) associées à cinq autres petites protéines **ARPC** (pour **Actin-Related Protein Complex**) numérotées de 1 à 5 (**Figure 19**). L'étude de la structure du complexe Arp2/3 a révélé que les sous-unités ARP2, ARP3 présentent une structure très proche de celle de l'actine (Robinson et al., 2001) et ont besoin elles aussi de lier l'ATP pour être fonctionnelles (Martin et al., 2005). Les protéines ARPC1-5 sont quant à elles, vues comme des protéines adaptatrices qui vont permettre la liaison d'ARP2 et d'ARP3 au filament mère.

Cette organisation du complexe Arp2/3 est très bien conservée chez les eucaryotes puisque la plupart des espèces dont le génome a été séquencé possèdent des gènes codants pour ces 7 sous-unités (Goley and Welch, 2006). Les seules exceptions étant observées chez certains parasites : les *Apicomplexa* qui ne possèdent aucun gène pour le complexe Arp2/3 (Gordon and Sibley, 2005), et *Leishmania major* qui possèdent des gènes ne codant que pour certaines sous-unités (Goley and Welch, 2006).

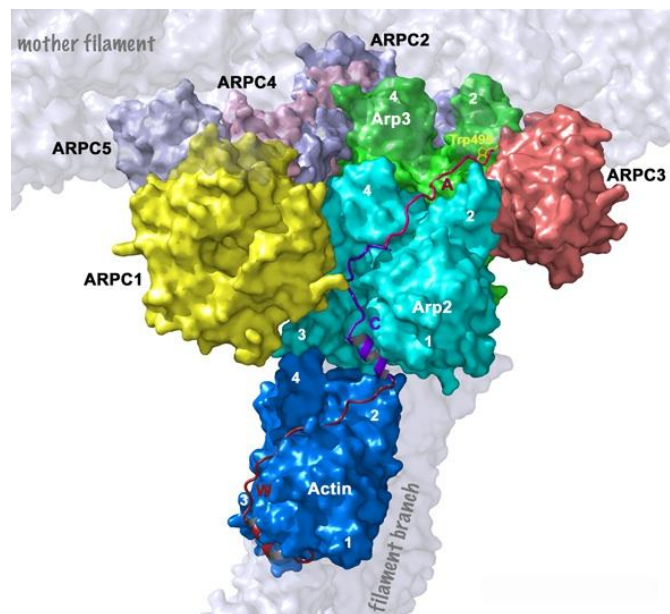


Figure 19. Les 7 sous-unités du complexe Arp2/3

Le complexe Arp2/3 est composé de 7 sous-unités : les protéines ARP2, ARP3 et ARPC1-5 (d'après Insall and Machesky, 2009).

3. Activation du complexe Arp2/3 par les NPFs

L'étude de la structure du complexe Arp2/3 a révélé que les domaines ARP2 et ARP3 sont distants lorsque le complexe Arp2/3 est inactif (**Figure 20**) (Pollard, 2007; Robinson et al., 2001; Rouiller et al., 2008), alors qu'à l'état actif, ils sont rapprochés et forment un noyau sur lequel vont polymériser les monomères d'actine (Rouiller et al., 2008) (Figure 20). Le complexe Arp2/3 est ainsi activé par des changements de conformation (Rouiller et al., 2008), les NPFs vont donc avoir pour fonction d'induire ces changements de conformation. Il semblerait aussi que la phosphorylation du complexe Arp2/3 soit nécessaire à son effet nucléateur (Leclaire et al., 2008).

Les NPFs forment une famille divisée en deux branches : les NPFs de type I et II. Les NPFs de type I sont impliqués dans l'activation du complexe Arp2/3 au sens littéral. Ils sont caractérisés par la présence en C terminal d'un domaine **VCA** ou (**WCA**) composé de trois motifs : le motif **V** ou **W** (pour « Verprolin homology) contenant des domaines WH2 (pour WASP-Homology 2), le motif **C** servant de région connectique (aussi connu sous le nom de cofilin-homology domain) et le motif **A** (pour Acide). Ce domaine VCA va lier les monomères d'actine (via ses domaines WH2 de V), et les complexe Arp2/3 (via ses motifs C & A)(Rotty et al., 2013). Le domaine VCA des NPFs fut très vite identifié comme étant l'élément permettant l'activation du complexe Arp2/3 (Blanchoin et al., 2000; Machesky et al., 1999; Robinson et al., 2001). En effet, il est présent chez tous les NPFs de type I (Goley and Welch, 2006), il est nécessaire et suffisant pour induire l'activation du complexe Arp2/3. Les NPFs de type II, comme la cortactine, ne possèdent pas de domaine VCA. Ils possèdent en revanche des domaines acides permettant la liaison à Arp2/3 et des domaines répétés en tandem permettant la liaison à l'actine ; ces domaines ne confèrent qu'une faible capacité d'activation aux NPFs de type II. Ces derniers seraient plutôt impliqués dans l'inhibition du débranchement du complexe Arp2/3 (Weaver et al., 2001). Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons sur les NPFs de type I et à des fins de simplification, nous utiliserons le terme de NPF pour désigner les NPFs de type I.

Le mode d'activation du complexe Arp2/3 par le VCA fut très débattu. Comme nous l'avons vu plus haut, l'inactivation intrinsèque du complexe Arp2/3 est due à l'éloignement de ARP2, ARP3 (Rouiller et al., 2008). Le modèle initialement accepté voulait que le complexe Arp2/3 soit activé par un seul NPF (via une liaison à ARP3 (Beltzner and Pollard, 2004; Kreishman-Deitrick et al., 2005; Marchand et al., 2001) ou ARP2 (Boczkowska et al., 2008)). Ce dernier, en liant à la fois le complexe Arp2/3 et un monomère d'actine, induit un changement de conformation de l'ensemble des sous-unités permettant le rapprochement

des sous-unités ARP2 et ARP3 et l'ajout d'un premier monomère (Rouiller et al., 2008). Ce modèle simple fut ensuite mis en doute lorsque l'on découvrit que le complexe Arp2/3 a deux sites de liaison au VCA (sur ARP2 et sur ARP3) (Padrick et al., 2011; Ti et al., 2011) et qu'une dimérisation des domaines VCA augmente l'activation du complexe d'Arp2/3 (Padrick et al., 2008). Ces découvertes conduisirent à la mise en place d'un nouveau modèle séquentiel d'activation faisant intervenir deux NPFs et un complexe Arp2/3 dans une configuration pseudo-symétrique (Boczkowska et al., 2014; Dominguez, 2016). Dans un premier temps, deux NPFs se lient à un complexe Arp2/3 *via* les sous-unités ARP2 et ARP3. Puis un premier monomère d'actine est associé à l'extrémité barbée d'ARP2, cet ajout entraîne alors un changement de conformation partiel qui libère l'extrémité barbée d'ARP3. Un second monomère d'actine est alors associé à ARP3, ce deuxième ajout entraîne un second changement de conformation qui permet à la fois le passage du complexe Arp2/3 à l'état activé et la liaison de ce dernier au filament mère.

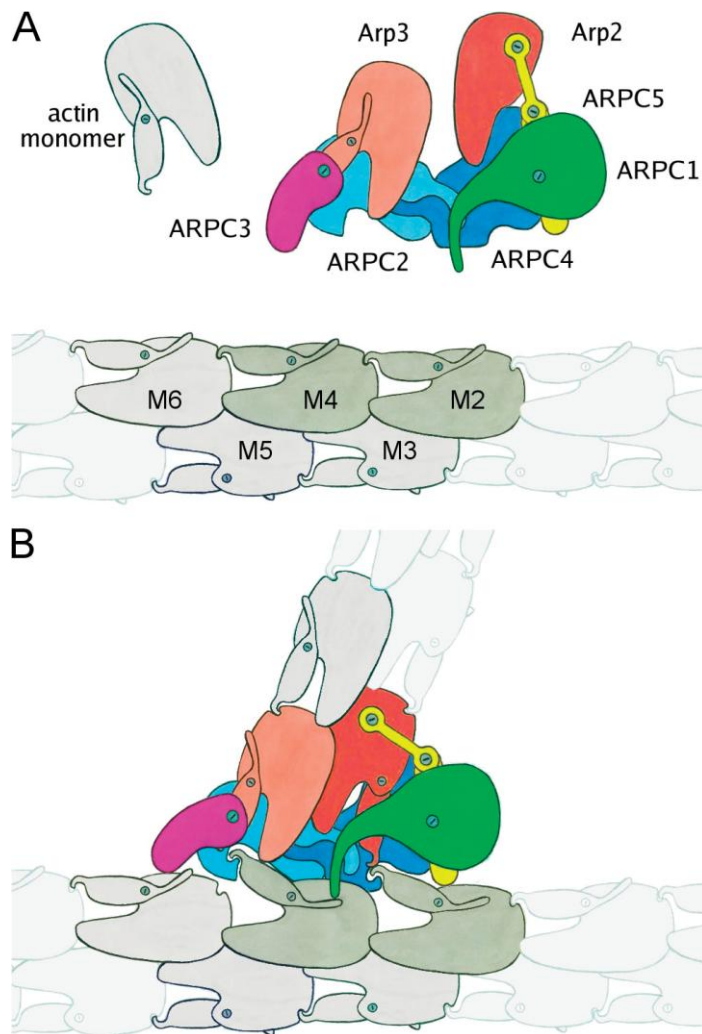


Figure 20. Activation du complexe Arp2/3 et changement de conformation
 A. Schéma de la forme inactive du complexe Arp2/3. B. Schéma de la forme activée du complexe Arp2/3 au sein d'un branchement (d'après Rouiller et al., 2008)

Introduction

Récemment, l'utilisation d'approches de suivi de molécules 3 couleurs, permet ensuite d'affiner ce modèle. En effet, ce type d'approches a l'avantage de permettre la visualisation directe du mécanisme d'activation en suivant 3 types de protéines. Par des approches *in vitro*, Smith et collaborateurs montrèrent que le VCA doit se dissocier du complexe Arp2/3 pour qu'il y ait élongation du filament nouvellement nucléé (Smith et al., 2013). En se basant sur le fait, comme nous le verrons plus loin, que les NPFs sont liés aux membranes, Smith et collaborateurs proposèrent alors un modèle fonctionnel de l'activation du complexe Arp2/3 (**Figure 21**). Selon eux, il y aurait dans un premier temps, la formation d'un trimère composé de 2 NPFs associés à un complexe Arp2/3 au niveau de la membrane. Cette formation en trimère est permise par le fait qu'en l'absence de filament mère, le VCA et le complexe Arp2/3 présentent une forte affinité et des temps de liaison longs. Puis, en présence de filaments mères, des liaisons entre le complexe Arp2/3 et le dit filament se formeraient. Ces liaisons seraient réversibles et dans la plupart des cas, elles seraient rompues, on parle alors de « libération du filament ». Le trimère va alors osciller entre des moments où il est lié au filament mère et d'autres où il est libre. Puis, dans certains cas, la liaison filament mère / complexe Arp2/3 serait plus stable. La polymérisation du filament va alors induire des contraintes mécaniques sur le trimère lié à la membrane. Les VCA vont alors se détacher du complexe Arp2/3, on parle de « libération du VCA ». Le filament fille va alors pouvoir polymériser, un nouveau branchement est alors formé. Ce mécanisme a été décrit *in vitro*, et il est fort possible que les phénomènes de « libération du filament » soient plus rares *in vivo*. En effet, il a été montré que la cortactine accélérerait la libération du VCA du complexe Arp2/3 (Helgeson and Nolen, 2013). Dans leur modèle, Smith et collaborateurs proposent que la dimérisation des NPFs soit due à la forte affinité du VCA pour le complexe Arp2/3. Mais *in vivo*, il est possible que cette dimérisation des NPFs soit plutôt facilitée par leur liaison aux protéines BAR (**Encadre 3**) (Padrick et al., 2008; Rottner et al., 2010)

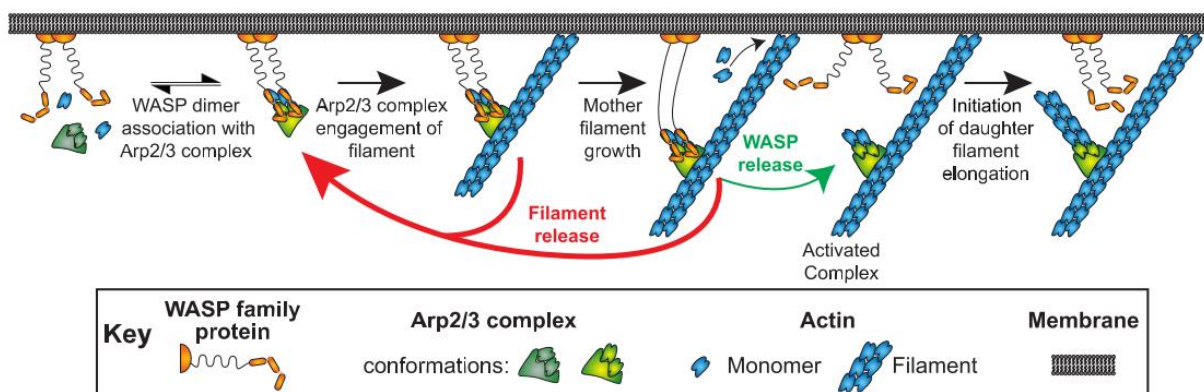


Figure 21. Modèle d'activation de complexe Arp2/3

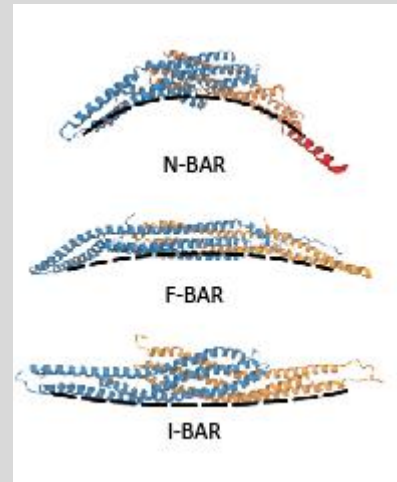
Modèle expliquant qu'une séparation du domaine VCA et du complexe Arp2/3 précède l'activation de ce dernier (d'après Smith et al., 2013).

Encadré 3

Les protéines BAR et déformation membranaire ; l'œuf ou la poule ? Les **BARs** (pour **B**in/ **A**mphiphysin/ **R**vs) sont des protéines liant les membranes grâce à des liaisons principalement électrostatiques. Elles sont divisées en trois catégories en fonction de leur homologie de séquence : les **BAR**, les **F-BAR** (pour **F**es/CIP4 homology-**BAR**) et les **I-BAR** (pour **I**nverse-**BAR**). Les **BAR** et **F-BAR** lient les membranes concaves et sont donc associées aux invaginations membranaires lors du trafic vésiculaire et l'endocytose, alors que les **I-BAR** lient les membranes convexes et sont donc impliquées dans la formation de saies membranaires (lamellipode et filopodes).

Ces protéines ont longtemps été au centre d'un débat ; sont-elles des senseurs des déformations membranaires, ou sont-elles à l'origine de ces déformations ? Le consensus actuel veut qu'elles soient les deux à la fois. A basse concentration, elles auraient un rôle de senseur de déformations. Alors qu'à forte concentration, elles pourraient induire la déformation membranaire. Enfin, il est intéressant de noter que la plupart des **BARs** possèdent un domaine **SH3** au travers duquel elles peuvent lier les domaines riches en proline des **NPFs** et ainsi en réguler la localisation (Simunovic et al., 2015; Suetsugu and Gautreau, 2012)

Structure des dimères de **BAR** d'après Côté and Vuori, 2007.

**3.1.1. Les NPFs de type I : structure et fonction**

Le premier NPF de classe I identifié en tant que tel fut ActA (Kocks et al., 1992). Ce dernier a la particularité d'être exprimé par la fameuse bactérie pathogène *Listeria monocytogenes* (Encadré 5). Puis, cette identification fut suivie l'année d'après par l'identification du premier NPF eucaryote : WASP (raf). WASP avait été découvert 5 ans plus tôt mais sa fonction d'activation du complexe Arp2/3 était encore inconnue. En effet, c'est en voulant identifier quelles étaient les gènes à l'origine du syndrome Wiskott-Aldrich (Encadre 4) que Derry et al. découvrirent **WASP** (pour **W**iskott-**A**ldrich **S**yndrom **P**rotein) (Derry et al., 1994). Puis, entre 1994 et 2009, on découvrit toute une série d'autres NPFs (Miki et al., 1996; Suetsugu et al., 1999) caractérisée par leur domaine **VCA** en C-terminal (décrit plus haut).

La partie N-terminal des NPFs, quant à elle, varie beaucoup entre les différents NPF. Cette variabilité des domaines N terminaux confère des caractéristiques spécifiques à chaque type de NPF. Premièrement, la partie N-terminal permet une régulation temporelle de l'activité catalytique des NPF. En effet, les NPFs sont sujets à une régulation allostérique intramoléculaire ou intermoléculaire *via* un contrôle de l'accessibilité du domaine **VCA**. Deuxièmement, la partie N-terminal permet la régulation spatiale du NPF *via* des interactions avec d'autres protéines. Ainsi, dans un contexte où le complexe Arp2/3 est distribué de

Introduction

façon homogène dans l'ensemble du le cytoplasme, les régulations spatiales et temporelles décrites des NPFs permettent la formation de réseaux branchés localisés.

Les NPFs eucaryotes ont été classés en sous-catégories en fonction de leur partie N terminal et on compte aujourd'hui 6 familles.

- **WASP** et **N-WASP** (pour **Neural-WASP**),
- **WAVE** ou SCAR (pour **WASP family VE**prolin Homologous Protein » aussi connu sous le nom de SCAR),
- **WASH** (pour **WASP and SCAR** homologue),
- **WHAMM** (pour **WASP** Homologue **A**ssociated with actin, **M**embranes and **M**icrotubules),
- **JMY** (pour **J**unction-**M**ediating regulatory protein)
- **WISH/DIP/SPIN90**

Parmi elles, il y a les NPFs dit « classiques » qui ont la capacité d'activer le complexe Arp2/3 sur un filament mère (comme décrit précédemment). Mais récemment, une nouvelle catégorie de NPF a été découverte, les **WISH/DIP/SPIN90**. Ces NPFs ont la capacité d'activer le complexe Arp2/3 sans liaison à un filament mère. Elles permettent donc la nucléation de filaments non ramifiés (Wagner et al., 2013). Ma thèse se focalisant principalement sur la formation du lamellipode, je ne développerai, dans ce chapitre, que les mécanismes d'activation de NWASP et WAVE. En effet, le premier est un cas d'école avec un mécanisme d'action simple, et le second est, comme nous le verrons plus tard, un élément clé de la formation du lamellipode.

Nous avons vu plus haut, comment les NPFs pouvaient, grâce à leur domaine VCA, induire l'activation du complexe Arp2/3. Or, leur fonctionnement intracellulaire est bien plus complexe et il convient de l'étudier pour comprendre comment sont formés les réseaux branchés au sein de la cellule.

Encadré 4

Le syndrome Wiskott-Aldrich est une maladie génétique rare (Prévalence : 1 / 100 000) liée à l'X et touchant principalement les garçons. Cette maladie est caractérisée par une triade clinique : Immunodéficience, Thrombocytopénie et Eczéma. Le seul traitement curatif connu est une greffe de cellules souches hématopoïétiques qui n'assure qu'un taux de survie d'au mieux de 80%. Sans ce traitement, l'espérance de vie n'est que de 10 ans.

Ref : Le portail des maladies rares et des médicaments orphelins (<http://www.orpha.net/>)

Encadré 5

Listeria monocytogenes est une bactérie qui du haut de ses 2 µm fut malgré elle un acteur majeurs que la compensations du lien entre filament d'actine et motilité cellulaire (Mogilner and Oster, 2003; Welch et al., 1998).

4. N-WASP

Le NPF **N-WASP** (pour **N**eural-**WASP**) fut découvert dans le cerveau bovin grâce à sa capacité à lier le domaine SH3 du facteur de croissance GRB2 (pour **G**rowth factor **R**eceptor-**B**ound protein **2**) (Miki et al., 1996). On découvrit ensuite que N-WASP n'est pas seulement exprimé dans les cellules nerveuses et est en réalité ubiquitaire.

D'un point de vue fonctionnel, N-WASP est impliqué dans l'endocytose. En effet, l'activation du complexe Arp2/3 permet la fission de l'endosome. Puis, N-WASP va être impliqué dans la propulsion de l'endosome. Enfin, N-WASP est impliqué dans la migration, en induisant la formation d'invadopodes, de podosomes et de filipode.

N-WASP possède une organisation simple, composé de 4 domaines : [1] un domaine WH1 pour (WASP homologie N-terminal 1), [2] un domaine GBD (pour GTPase-binding domain) composé d'un domaine basique (B), domaine CRIB (pour Cdc42–Rac Interactive Binding) et d'un motif d'auto-inhibition (AI), [3] un domaine riche en proline (PRD) et enfin [4] un domaine VCA. (**Figure 22**) (Campellone and Welch, 2010).

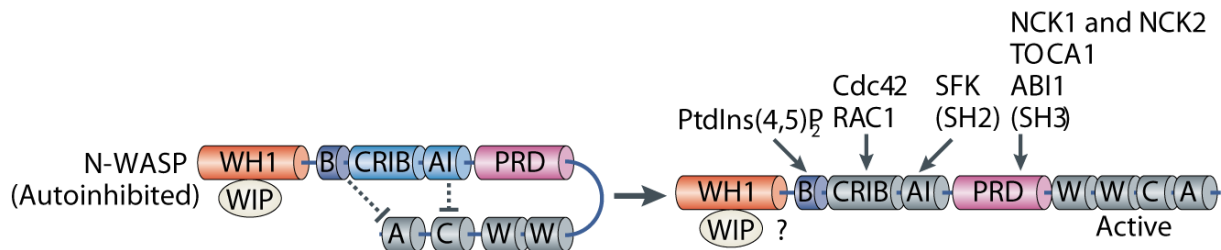


Figure 22. N-WASP

Schéma des différents domaines de N-WASP et liste des interactants de chaque domaine. (D'après Campellone and Welch, 2010).

A l'état basal, N-WASP est auto-inhibé *via* la régulation allostérique intramoléculaire. En effet, il présente une conformation repliée due à l'interaction du domaine VCA sur le domaine GBD, le domaine VCA est donc masqué (Rohatgi et al., 1999) (**Figure 22**). Cette auto-inhibition est ensuite stabilisée par l'interaction de **WIP** (pour **WASP-Interacting Protein**) sur le domaine WH1 (Ho et al., 2004; Martinez-Quiles et al., 2001). L'activation de N-WASP passe par son dépliement grâce à l'interaction de plusieurs protéines. Il a d'abord été montré que la liaison de la RhoGTPase Cdc42 au domaine CRIB permettait la libération du domaine VCA (Rohatgi et al., 2000), cette activation permet aussi la liaison de N-WASP à la membrane par la liaison PIP2 au domaine basique de N-WASP. Enfin, comme nous l'avons vu plus haut, l'activation du complexe Arp2/3 est permise par un dimère de VCA, dans le cas de N-WASP cette dimérisation est facilitée par la F-BAR : **TOCA1** (pour **T**ransducer **O**f

Cdc42 Activity 1), qui a la capacité de lier *via* son domaine SH3 le domaine PRD de N-WAS (Ho et al., 2004). De plus, il est intéressant de noter que TOCA1 est comme N-WASP, un effecteur de Cdc42, on peut donc supposer qu'une fois activée la RhoGTPase Cdc42 pourrait activer ces deux effecteurs et induire l'activation localisée du complexe Arp2/3 (*via* N-WASP) (Watson et al., 2016).

5. Le Complexe Wave

C'est en cherchant des homologues à WAS par alignement de séquences que Miki, Suetsugu, et Takenawa découvrirent **WAVE1** (pour **WASP** family **VE**rprolin Homologous Protein) (Miki et al., 1998). On découvrit la même année que WAVE1 avait une homologue chez l'amibe, cette homologue était appelé SCAR1 pour **S**uppressor of **cAR**, car il était alors décrit comme étant un suppresseur du récepteur mutant de AMPc (cAR) (Bear et al., 1998; Machesky and Insall, 1998). On identifia plus tard d'autres isoformes de WAVE1 : WAVE2 et WAVE3 (Suetsugu et al., 1999). Ces trois isoformes de WAVE présentent des profils d'expression différents, WAVE 2 est ubiquitaire, alors que WAVE1 et WAVE3 sont exprimés principalement au niveau cérébral (Sossey-Alaoui et al., 2003). Ainsi un knockout de WAVE1 chez la souris induit un déficit sensorimoteur, des comportements anormaux et une réduction de la viabilité (Dahl et al., 2003; Soderling et al., 2003), alors que le knockout de WAVE2 est létal (Yamazaki et al., 2003; Yan et al., 2003).

5.1. Composition du complexe Wave

On remarqua vite que WAVE avait un fonctionnement différent de N-WASP. En effet, une fois purifié après recombinaison WAVE est constitutivement actif, et n'est pas auto-inhibé (Campellone and Welch, 2010; Machesky et al., 1999). L'observation de la structure de WAVE permet d'expliquer cette propriété. WAVE possède 4 domaines : [1] un domaine **SHD** pour (pour **SCAR Homology Domain**), [2] un domaine B (basique) (B), [3] un domaine riche en proline (PRD) et enfin [4] un domaine VCA (**Figure 23**) (Campellone and Welch, 2010). WAVE ne possède donc pas de domaine GRB permettant l'auto-inhibition, mais il est en revanche caractérisé par le fait qu'il possède en N terminal un domaine SHD avec lequel il lie des protéines accessoires pour former un complexe nommé : **Complexe Wave** (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Innocenti et al., 2004). La régulation de l'activation catalytique de WAVE passe donc par une régulation allostérique intermoléculaire où certaines protéines accessoires vont masquer le domaine VCA. L'un des premiers enjeux pour comprendre le fonctionnement de WAVE fut donc d'identifier les éléments constitutifs

du complexe Wave. L'étude du complexe Wave permet alors de comprendre qu'il était formé de cinq sous-unités :

- **WAVE1** (ou ses paralogues WAVE2 et WAVE3)
- **Brk1** (aussi connue sous le nom de BRICK1 et HSPC300)
- **Abi1** (pour **Abelson interactor 1** ou ses paralogues Abi2 et Abi3)
- **Nap1** (pour **NCK-associated protein 1** ou son paraglogue Hem1)
- **Sra1** (pour **Specifically Rac-associated protein 1** ou son paraglogue PIR121).

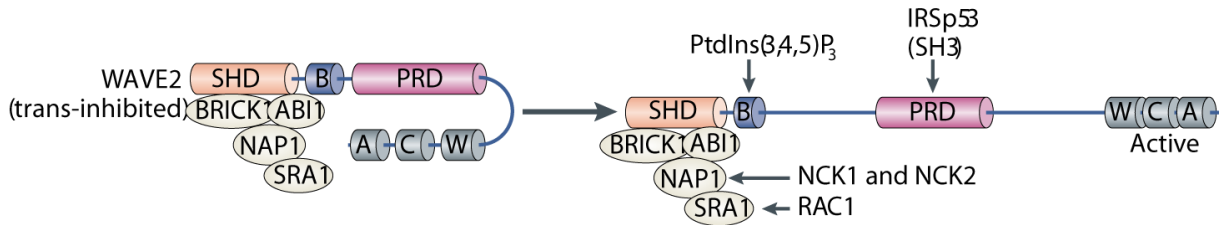


Figure 23. Le complexe Wave

Schéma des différents domaines du complexe Wave et liste des interactants de chaque domaine. (D'après Campellone and Welch, 2010).

5.2. Structure du complexe Wave

L'étude par purification des différentes sous-unités du complexe permet alors de déterminer que ce dernier est un pentamère stable (Gautreau et al., 2004). La stabilité du complexe Wave semble être un point clé de son fonctionnement, en effet, la déplétion d'une de ses sous-unités induit la déstabilisation du complexe et la dégradation des autres sous-unités par le protéasome (Kunda et al., 2003). Seule la sous-unité Brk1 présente un profil de purification différent, elle peut être présente au niveau cellulaire sous une forme trimérique, ces trimères semblent jouer le rôle de précurseur dans la formation du complexe Wave (Derivery et al., 2008). La diversité en paralogues, permet une variabilité de composition du complexe Wave en fonction des tissus, mais la stoechiométrie 1:1:1:1:1 est quant à elle conservée (Derivery and Gautreau, 2010). Parmi cette diversité de composition, il existe néanmoins une composition ubiquitaire formée par **WAVE2/Abi1/Brk1/Sra1/Nap1**.

Comme nous l'avons vu plus haut, l'activation du complexe Wave nécessite la présence simultanée de plusieurs signaux (Lebensohn and Kirschner, 2009). Le fait que WAVE ne possède pas de domaine GRB et donc pas de domaine de liaison au RhoGTPases, complexifia grandement la compréhension de ses mécanismes de régulation. En effet, le lien entre Rac1 et WAVE fut découvert dès 1998 (Miki et al., 1998), mais il fallut attendre que l'on découvre l'existence du complexe Wave (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Innocenti et al., 2004) pour comprendre que Sra1 était à l'origine de ce lien (Kobayashi et al., 1998).

Introduction

C'est en étudiant la structure du complexe Wave que l'on a pu proposer un modèle d'activation du complexe Wave à la membrane plasmique (Chen et al., 2010). On remarqua ainsi qu'une délétion du VCA augmentait l'affinité de Rac1 pour la complexe Wave, cette observation montra que l'inhibition de complexe Wave passait par la séquestration du VCA dans un domaine proche du domaine de liaison de Rac1 sur Sra1. De plus, cette étude a permis de montrer que les résidus chargés positivement été orientés sur une des faces du complexe. Cette disposition oriente le VCA en direction du cytoplasme, facilitant ainsi son effet. Ainsi, dans ce modèle, l'activation de Wave localisée à la membrane est permise par une délocalisation du VCA après la liaison à la RhoGTPase Rac1 activée.

La localisation membranaire du complexe Wave est également favorisée par la liaison des phospholipides PIP3 sur le domaine basique de WAVE (Oikawa et al., 2004) et du domaine SH3 de la protéine IRSp53 sur PRD de WAVE (**Figure 24**) (Abou-Kheir et al., 2008; Davidson and Insall, 2011; Miki et al., 2000; Scita et al., 2008; Suetsugu et al., 2006b).

L'activation du complexe Wave est aussi contrôlée par des mécanismes de phosphorylations (Mendoza, 2013). En effet, la phosphorylation des certains résidus de WAVE (Tyr151, Tyr125, Tyr138) induit une augmentation d'activité du complexe Wave, car ces modifications post-traductionnelles perturbent les sites d'inhibition de Sra1 et libèrent le VCA (Arderm et al., 2006; Miyamoto et al., 2008). Ces phosphorylations sont permises par : la kinases **Src** (Dai and Pendergast, 1995) et **Abl** (pour **Abelson**). La phosphorylation par la kinase Abl est nécessaire à l'activation de WAVE2 et WAVE3 *in vivo*. Elle est recrutée au niveau du complexe Wave *via* la sous-unité Abi1 (Leng et al., 2005; Stuart et al., 2006). D'autres kinases vont quant à elles, inhiber l'activation de WAVE par phosphorylation : la cycline dépendant kinase 5 (Kim et al., 2006) qui phosphoryle le domaine riche en proline de WAVE1 et la caséine Kinase 2 qui phosphoryle le domaine VCA de la protéine WAVE2. Ainsi, ces mécanismes de phosphorylation vont permettre une régulation rapide et localiser au sein de la cellule en fonction des stimuli extérieurs et du type cellulaire (Mendoza, 2013).

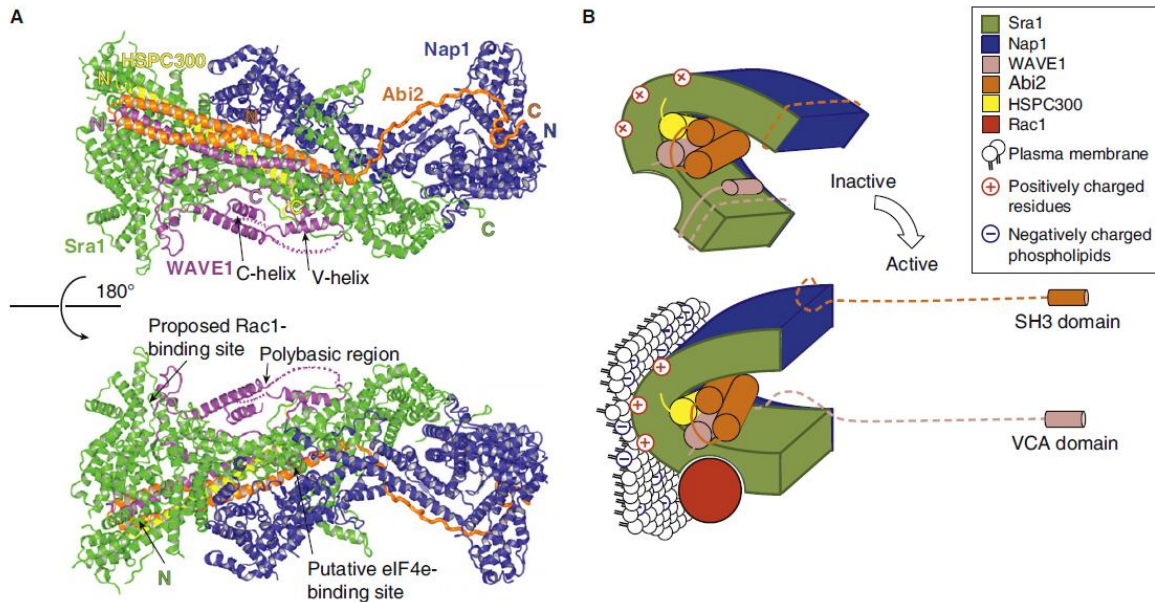


Figure 24 : Structure et localisation du complexe Wave

A. Structure du complexe Wave (d'après Chen et al., 2010). B. Schéma de l'activation du complexe Wave par libération du domaine VCA initialement masqué par Sra1 (d'après Davidson and Insall, 2011).

6. Le lien complexe Arp2/3 - NPF

Des approches récentes de **FRAP** (**F**luorescence **R**ecovery **A**fter **P**hotobleaching) ont permis la mise en évidence d'un comportement inattendu des NPFs. En effet, il est alors enrichi à l'extrémité du lamellipode, il possède tout de même une dynamique rapide révélée par un temps de demi-vie plutôt court (13.6 s pour *Abi1*, 8.6 s pour *Wave2* et 6.4 s pour *Nap1*) (Lai et al., 2008; Weiner et al., 2006). Mais, cette dynamique rapide semble être dépendante du réseau d'actine car une dépolymérisation forcée par la latrunculine inhibe le recouvrement après photoblanchiment (Weiner et al., 2006). L'origine du lien entre la dynamique du complexe Wave et le réseau d'actine fait encore débat. Mais l'utilisation de complexe N-WASPs mutants dont le domaine VCA est tronqué, semble montrer que cette dynamique rapide est liée à sa liaison au complexe Arp2/3 (Weisswange et al., 2009).

En effet, une étude basée sur des approches de microscopies de molécule unique montrant un flux rétrograde de *WAVE2*, propose que la dynamique rapide du complexe Wave soit due à de ce dernier par un flux rétrograde d'actine. Le complexe Wave resterait donc lié au complexe Arp2/3 (Millius et al., 2012).

Introduction

5.

RhoGTPases et régulation

Nous avons vu précédemment que la formation des réseaux d'actine branchés fait intervenir un grand nombre d'acteurs moléculaires qui doivent donc être régulés finement. Dans le cadre de la migration cellulaire, ce rôle de régulateurs incombe à un groupe de protéines nommées les RhoGTPases faisant partie de la superfamille des protéines Ras. Lors de la migration cellulaire, la cellule va donc activer localement ces RhoGTPases, ces dernières vont alors jouer le rôle d'interrupteur moléculaire en activent telle ou telle protéine. Ce chapitre décrira donc comment l'orchestration de ces interrupteurs peut permettre la migration cellulaire.

1. La superfamille des Ras ; Une histoire de famille

Les premiers gènes codants pour des Ras furent découverts dans les années 60, ils étaient alors décrits comme étant à l'origine des propriétés hautement oncogènes de certains virus de la leucémie murine (Cox and Der, 2010; Malumbres and Barbacid, 2003). L'étude de ces gènes viraux révéla qu'ils étaient issus de gènes ancestraux présents dans les génomes murins (Ellis et al., 1981; Scolnick et al., 1973). L'étude des Ras connut ensuite un important essor lorsque l'on découvrit chez l'humain qu'une mutation des Ras était fréquemment observée dans un large éventail de cancers, comprenant trois des quatre cancers les plus mortels (cancer du poumon, du côlon et du pancréas) (Cox and Der, 2010). La recherche systématique des différentes Ras permit alors la découverte d'une myriade de protéines aux caractéristiques similaires et regroupées sous une seule bannière ; **la superfamille des Ras**.

La superfamille des Ras est extrêmement bien conservée avec des orthologues présents sur l'ensemble du vivant (Colicelli, 2004). Chez l'humain, on compte plus de 150 membres répartis dans 5 familles (Wennerberg et al., 2005) (**Tableau 5**). Hormis le fait

Introduction

qu'elles fonctionnent de manière monomérique, les Ras présentent de nombreuses similarités avec les sous unités α des protéines G trimériques ; ce sont de petites protéines globulaires (20 à 30 kDa) ayant la capacité de lier le GTP et de l'hydrolyser en GDP, on parle alors d'**activité GTPasique**. Les Ras peuvent donc être comparées à des interrupteurs moléculaires présents sous deux états, actif lié au GTP et inactif lié GDP. La super famille des Ras forment ainsi avec les sous-unités α des protéines G trimériques le groupe des **GNBPs** (pour **G**uanine **N**ucleotide-**B**inding **P**roteins).

D'un point de vue fonctionnel, la superfamille des Ras régule un large éventail de processus cellulaires fondamentaux (**Tableau 4**). Dans cette thèse, nous nous concentrerons sur l'une des familles de Ras ; les **RhoGTPase**, en effet ces dernières sont impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine, de la forme des cellules, de l'adhésion et de la migration (Ridley, 2015) (**Encadré 6**).

Sous-familles	Nombre de membres	Fonction (Régulation)
RasGTPases (Rat sarcoma)	36 Gènes 39 Isoformes	<ul style="list-style-type: none">- La prolifération cellulaire, différenciation, survie cellulaire et apoptose- Expression génique- Exocytose- Adhésion cellule-cellule et cellule-matrice- Remodelage de l'architecture cellulaire,- Progression du cycle cellulaire.
RhoGTPases (Ras homologous)	20 Gènes 22 Isoformes	<ul style="list-style-type: none">- Dynamique du cytosquelette- Forme, polarité, adhérence et migration cellulaire- Progression du cycle cellulaire- Expression génique
RabGTPases (Ras-like protein in brain)	61 Gènes 63 Isoformes	<ul style="list-style-type: none">- Trafic membranaire et protéique lors de l'endocytose et l'exocytose.
ArfGTPases (ADP- ribosylation factor)	27 Gènes 30 Isoformes	<ul style="list-style-type: none">- Transport vésiculaire lors de l'endocytose et l'exocytose.
RanGTPase (Ras-like nuclear)	1 Gène 1 Isoforme	<ul style="list-style-type: none">- Transport nucléo-cytoplasmique- Organisation du fuseau mitotique

Tableau 4 : Les différentes sous-familles de Ras chez l'humain.

La superfamille des Ras compte aujourd'hui chez l'humain plus de 150 membres répartis dans 5 sous-familles (Colicelli 2004; Wennerberg et al. 2005; Chavan et al. 2014).

2. La famille des RhoGTPases

Les RhoGTPases sont présentes dans toutes les cellules eucaryotes et constituent une famille distincte au sein de la superfamille des Ras. Chez l'humain, les RhoGTPases sont au nombre de 23 (Figure 25), ces dernières peuvent être classées en six sous-familles ; Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB et Miro, auxquelles s'ajoutent trois RhoGTPases isolées RhoD, Rif/RhoF et TTF/RhoH (Grise et al., 2009). Parmi ces RhoGTPases, **RhoA**, **Rac1** et **Cdc42** sont les plus étudiées, car elles sont impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine (Bishop and Hall, 2000). La pléthore des protéines régulatrices des RhoGTPases d'ores et déjà découverte (RhoGEFs, RhoGAPs, RhoGDIs), associée aux autres modes de régulation (prénylation, phosphorylation ...) laisse entrevoir une multitude de voies de régulation dépendantes de nombreux facteurs. Ceci permet une grande adaptabilité de la cellule aux contraintes physiques de l'environnement et aux signaux chimiques qu'elle reçoit.

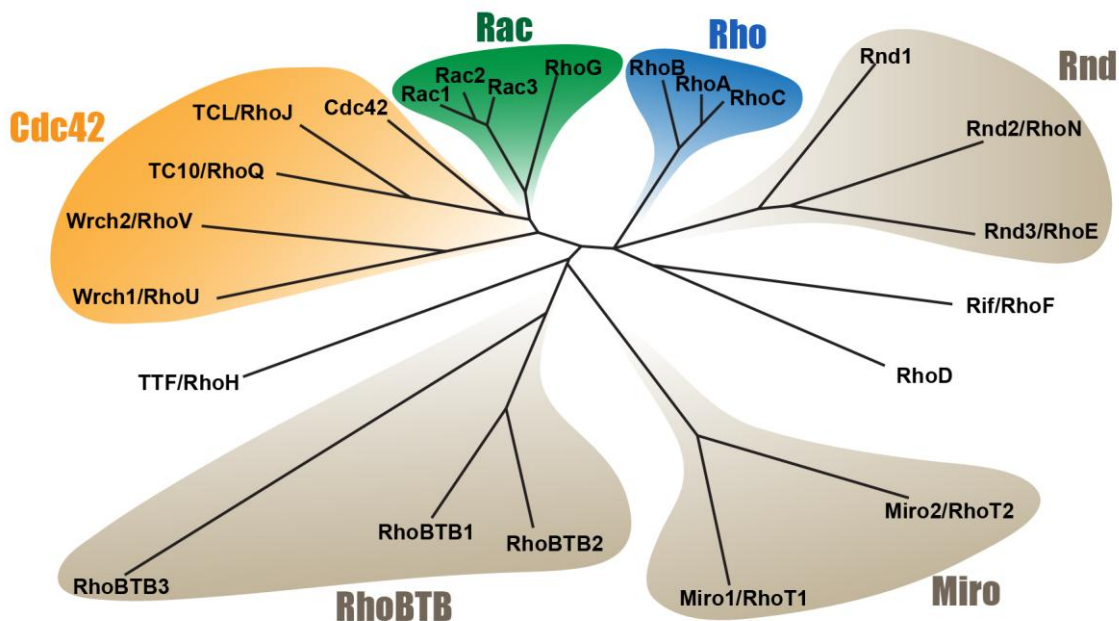


Figure 25 : Arbre phylogénique des différentes RhoGTPases

Les 23 membres de la famille des RhoGTPases sont repartis par alignement de séquence en 6 sous-familles (Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RhoBTB et Miro), adaptée de Grise et al. 2009.

Encadré 6

Nomenclature A des fins de simplification, nous utiliserons les termes de :

- **Ras** : pour désigner la super famille
- **RasGTPase**, RhoGTPase... : pour désigner le sous-groupe

Ainsi, la protéine Rac1 par exemple, fait partie du sous-groupe des RhoGTPase au sein de la super famille des Ras.

Introduction

Le lien entre les RhoGTPases Rac1, RhoA, Cdc42 et la régulation du cytosquelette d'actine fut très rapidement mis en évidence. Dans le reste de ce chapitre, nous nous focaliserons donc sur ces trois RhoGTPases.

La sous-famille des Rac comprend quatre membres ; Rac1, Rac2, Rac3 et RhoG. Toutes ces Rac sont impliquées dans la migration cellulaire *via* leurs rôles dans la formation du lamellipode et des complexes focaux (Ridley et al., 1992; Rottner et al., 1999b). Rac1 est ubiquitaire alors Rac2 et Rac3 sont exprimées respectivement dans les cellules hématopoïétiques et le cerveau (Grise et al., 2009).

La sous-famille des Rho comprend trois membres ; RhoA, RhoB et RhoC. Bien que 85 % de leurs séquences soient identiques, elles ont des fonctions distinctes. RhoA est principalement impliquée dans la régulation de la contractilité cellulaire *via* une régulation de la contractilité actomyosine dépendante (Ridley and Hall, 1992). Alors que RhoB et RhoC sont respectivement impliquées dans la survie et la migration cellulaire (Wheeler and Ridley, 2004).

La sous-famille Cdc42 comprend cinq membres ; Cdc42, TCL/RhoJ, TC10/RhoQ, Wrch1/RhoU et Wrch2/RhoV. Cdc42 est impliquée dans la régulation de formation des filopodes, la migration et la polarité cellulaire (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995). THC et TC10 sont impliqués dans la régulation du trafic membranaire des protéines. Wrch1 est nécessaire à la migration cellulaire au sein des crêtes neurales.

3. Structure des RhoGTPases

Les RhoGTPases ont une structure très similaire aux autres GNBPs. Ce sont des protéines globulaires composées de six feuillets β entourés de cinq hélices α auxquels s'ajoutent des extra-domaines spécifiques à chaque GGBP. Ainsi, par exemple, les RhoGTPases se caractérisent par l'ajout d'une hélice α d'environ 13 acides aminés alors que les ArfGTPases possèdent une extension en N terminale nécessaire à leur liaison à la membrane (Vetter and Wittinghofer, 2001).

La structure RhoGTPases comprend 5 motifs hautement conservés, car ils sont impliqués dans les fonctions de liaison et d'hydrolyse du GTP. Ces motifs nommés G sont numérotés de 1 à 5 (Bourne et al., 1991; Wennerberg et al., 2005) (**Figure 26**) :

- G1 (GXXXXGKS/T) permet la liaison des phosphates α et β du nucléotide.
- G2 (T) lie quant à lui, le phosphate γ du nucléotide.

- G3 (DXXGQ/H/T) possède un acide aspartique liant le Mg^{2+} et une glycine liant le phosphate γ , ce motif sera responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP et connaîtra un important changement de conformation lors de cette dernière.
- G4 (T/NKXD) permet la liaison avec la base du nucléotide.
- G5 (C/SAK/L/T) confère quant à lui, la spécificité à la guanine (Vetter and Wittinghofer, 2001).

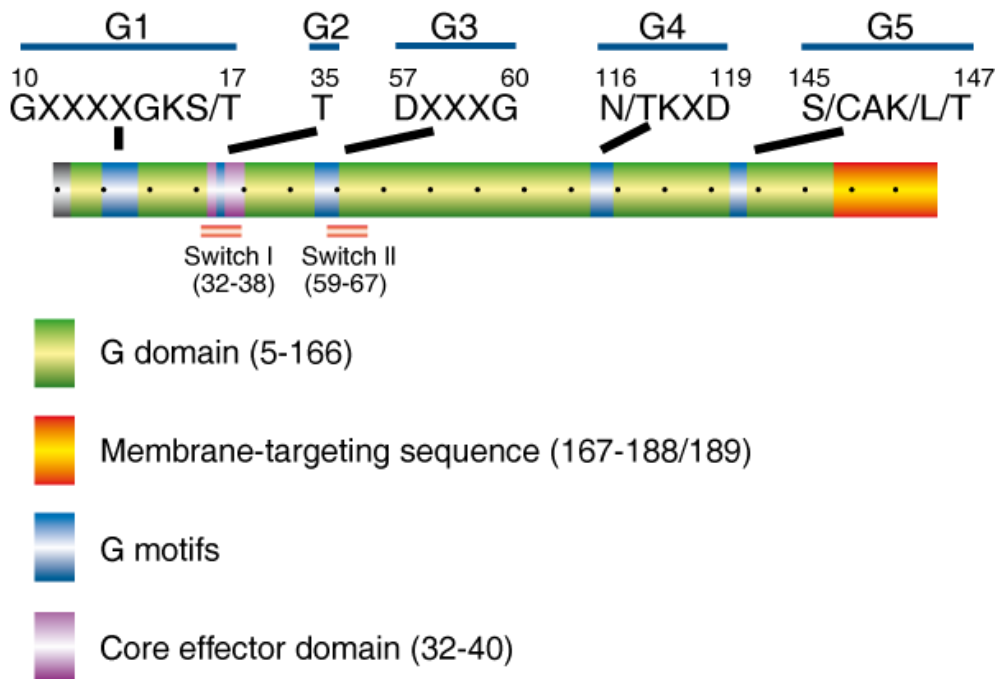


Figure 26 Les RhoGTPases

Schéma des différents domaines des RhoGTPases (D'après Vetter and Wittinghofer, 2001).

Si l'on s'intéresse aux relations structure/fonction ; les RhoGTPases peuvent être schématisées sous la forme d'une pince comprenant avec un domaine globulaire et deux domaines Switch I et Switch II (Figure 27) (Milburn et al., 1990; Vetter and Wittinghofer, 2001). Les domaines Switch permettent la création d'une cavité accueillant le nucléotide, ces domaines vont alors changer de conformation en fonction de l'état du nucléotide. Lorsque la GNBPs lie le GTP, les domaines Switch vont se resserrer au niveau du phosphate γ grâce à deux liaisons hydrogènes permises par une thréonine et une glycine des domaines Switch I et Switch II (Figure 27). Puis, après l'hydrolyse du phosphate γ , ces domaines Switch vont se relâcher. Ces changements de conformation des domaines Switch vont permettre aux protéines régulatrices et aux effecteurs de sonder le statut activé ou inactivé de la GNBPs.

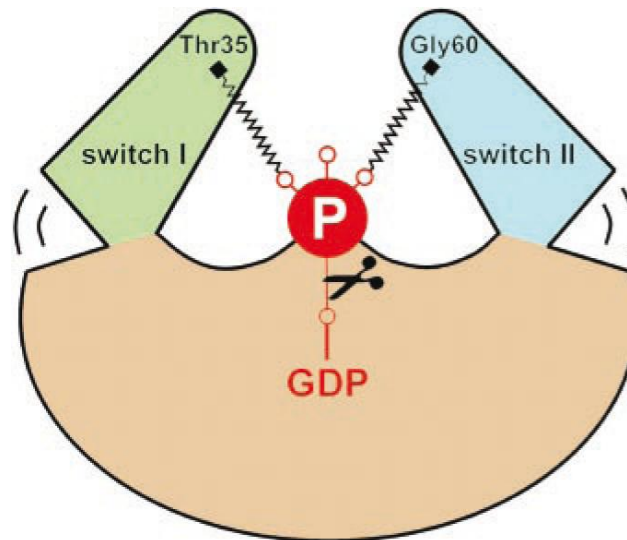


Figure 27 : Schéma du mécanisme de switch On/Off des RhoGTPases
(D'après Vetter and Wittinghofer, 2001)

4. Régulation du cycle activation/inactivation

Comme dit, précédemment les RhoGTPases vont osciller entre deux états, l'état actif lié au GTP et inactif lié au GDP. Cette oscillation entre les états actif et inactif est permise et contrôlée grâce à trois types de protéines accessoires, les **RhoGEFs** (**Rho** Guanine nucleotide **E**xchange **F**actors) qui activent les RhoGTPases en facilitant l'échange GDP en GTP, les **RhoGAPs** (**Rho** GTPase **A**ctivating **P**roteins) qui inactivent les RhoGTPases en catalysant l'hydrolyse du GTP, les **RhoGDIs** (**Rho** Guanine nucleotide **D**issociation **I**nhibitors) qui séquestrent les RhoGTPases dans le cytoplasme (Cherfils and Zeghouf, 2013). Ces protéines accessoires sont bien plus que de simples régulateurs, en effet, la grande diversité de ces dernières va leur permettre d'avoir une fonction dédiée à un mécanisme ou à une voie de signalisation en contrôlant l'activation et/ou la localisation spatiale des RhoGTPases. Ainsi, l'orchestration de ces protéines accessoires va permettre la régulation spatiale et temporelle des RhoGTPases, en conduisant ces dernières vers telle ou telle fonction. Enfin, le cycle d'activation/inactivation des RhoGTPases peut aussi être régulé *via* des modifications post-traductionnelles tel que prénylation, la phosphorylation et l'ubiquitination.

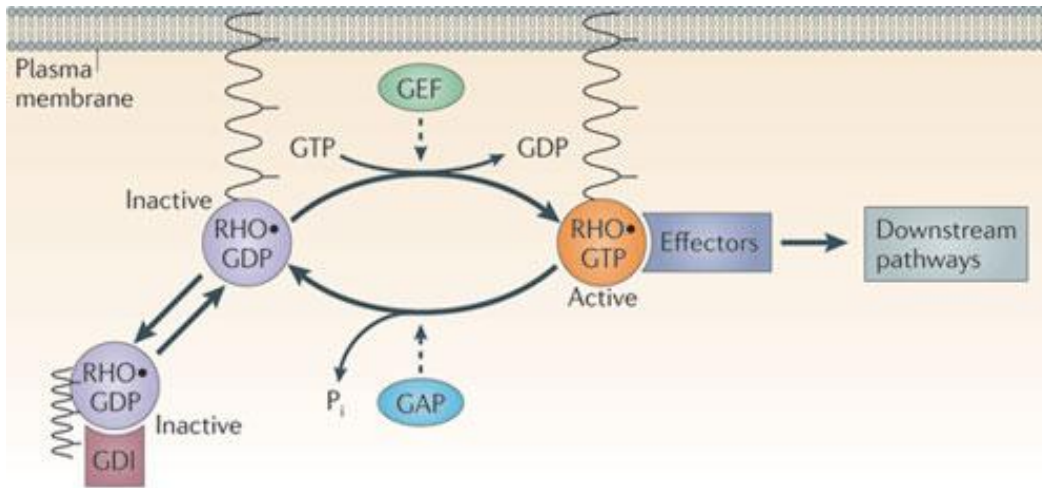


Figure 28; le cycle des RhoGTPases et sa régulation
(D'après Aktories, 2011)

4.1.1. Les RhoGEFs

Les RhoGEFs sont des facteurs permettant d'accélérer de plusieurs ordres de grandeurs, la réaction d'échange du GDP/GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001). D'un point de vue mécanique, une fois liée sur la RhoGTPase, la RhoGEF va induire des modifications structurales qui vont entraîner la libération du GDP et induire la formation d'un intermédiaire de la RhoGTPase non lié à un nucléotide. Puis, la place vacante va être occupée par un nouveau nucléotide, ce nucléotide sera dans la plupart des cas le GTP, car sa concentration cellulaire est dix fois supérieures à celle du GDP (Bos et al., 2007). Il existe chez l'humain approximativement 80 RhoGEFs de Rho, classées en deux catégories ; les Dbl (69 membres) et les DOCK (pour **D**edicator **O**f **C**yto**K**inesis, 11 membres) (Goicoechea et al., 2014). Le fait qu'il y ait quatre fois plus de RhoGEFs que de RhoGTPases, s'explique par le fait qu'une RhoGTPase puisse être activée par plusieurs RhoGEFs. De plus, une même RhoGEFs peut activer différentes RhoGTPases. Le lien entre certaines RhoGEFs et la migration cellulaire a d'ores et déjà été montré (Goicoechea et al., 2014).

4.1.2. Les RhoGAPs

Les RhoGAPs vont inactiver les RhoGTPases en stimulant leur activité hydrolytique, en effet, les RhoGTPases ont une activité hydrolytique très faible qui a besoin d'être accélérée. Les RhoGAPs vont induire leur effet catalytique en se liant au RhoGTPases et en en modifiant leur structure. Il existe environ 70 RhoGAPs (Hall, 2012). Comme pour les RhoGEFs, une RhoGTPases peut être inactivée par plusieurs RhoGAPs et une RhoGAP peut parfois inactiver plusieurs RhoGTPases.

4.1.3. Les RhoGDIs et localisation membranaire

Le contrôle de la localisation membranaire joue un rôle clé dans la régulation de l'activité des RhoGTPases (Moissoglu and Schwartz, 2014). En effet, les RhoGTPases Rac1 sont principalement localisées dans le cytoplasme et seule une faible portion de Rac1 est localisée à la membrane (Das et al., 2015; Moissoglu et al., 2006). Puis, une fois à la membrane, les RhoGTPase ont la capacité de s'en dissocier spontanément (Moissoglu et al., 2006). Enfin récemment, l'utilisation d'approches de suivi de molécules a permis de mettre en évidence le fait que le recrutement membranaire de Rac1 précède son activation (Das et al., 2015). Ainsi, il a été montré que les GEFs de Rac1 : α PIX et β PIX étaient recrutées au niveau des sites d'adhésions directement à partir du cytoplasme, alors que Rac1 était d'abord recruté au niveau de la membrane, puis rejoignait les mêmes sites d'adhésion par diffusion membranaire. Les RhoGTPases doivent donc être localisées à la membrane pour être activées par les RhoGEFs.

La localisation membranaire des RhoGTPases est possible par l'ajout covalent de lipide qui est permis par deux types de modifications post-traductionnelles : la **prénylation** et la **palmitoylation**. La prénylation est irréversible, elle passe par l'ajout d'un lipide sur le domaine CAAX des RhoGTPases, il en existe deux types : la farnésylation (lipide à 15 carbones) ou la géranylgéranoylation (lipide à 20 carbones) grâce aux **farnésyltransférases** et aux **géranylgéranoyltransférases**. L'ajout covalent de ce lipide va permettre un adressage ciblé des RhoGTPases au niveau de la membrane plasmique. Les RhoGDIs permettent donc d'inhiber l'activité des RhoGTPases en les séquestrant dans le cytoplasme *via* une liaison à leur groupement géranylgéranoyl ou farnésyl. Les RhoGDIs possèdent aussi la capacité d'inhiber la transition GDP/GTP et donc de bloquer ces RhoGTPases dans une conformation inactive (Cherfils and Zeghouf, 2013). La palmitoylation quant à elle, est réversible et régule la localisation membranaire des RhoGTPases. En effet, alors que la prénylation permet la liaison de la membrane plasmique, la palmitoylation permettrait de localiser RhoGTPases au sein de micro-domaines membranaires : les radeaux lipidiques ou lipid raft (Moissoglu and Schwartz, 2014; Navarro-Lérida et al., 2012). Ainsi, il a été montré chez Rac1 qu'un défaut de palmitoylation inhibait les effets de Rac1 sur la migration cellulaire (Navarro-Lérida et al., 2012).

5. RhoGTPases et migration cellulaire

Dès leurs découvertes au début des années 90, les RhoGTPases ; Rac1, RhoA et Cdc42 furent considérées comme des régulateurs du cytosquelette d'actine et donc de la migration cellulaire avec des rôles précis et limités. En effet, Rac1, RhoA et Cdc42 étaient respectivement associés à la formation : du lamellipode, des fibres de stress, des sites d'adhésion et des filopodes. Très vite, cette délimitation franche s'est effacée pour laisser place à un modèle plus complexe qui voit l'implication de chacune de ces RhoGTPases dans toutes les structures liées à la migration cellulaire. Ainsi les trois RhoGTPases seraient liées entre elles *via* des voies complexes d'activation et d'inhibition (Burrige and Wennerberg, 2004).

5.1. Rac1 et ses effecteurs

La RhoGTPase Rac1 fut purifiée et séquencée en 1989, elle était alors décrite comme étant un substrat à une ADP-ribosylation induite par la toxine *Clostridium botulinum* C3, d'où son nom Rac1 pour **R**as-related **C**3 botulinum toxin substrate **1** (Malpica et al., 1997). Plus tard, les auteurs se rendront compte que leur préparation était contaminée par Rho, le réel substrat de toxine *Clostridium botulinum* C3 (Ridley and Hall, 2004). Rac1 fut très vite caractérisée comme étant la RhoGTPase essentielle à la formation du lamellipode et des replis membranaires. En effet, le laboratoire d'Alan Hall put démontrer que Rac1 était au centre d'une voie de signalisation permettant la formation de lamellipode après une stimulation par le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF pour Platelet-Derived Growth Factor) (Nobes and Hall, 1995; Ridley, 1995; Ridley et al., 1992).

Une fois active, Rac1 va induire la formation de lamellipode en agissant de manière directe et indirecte. La voie de signalisation directe est, comme nous l'avons vu plus haut, due à l'activation du complexe Wave par Rac1 (Miki et al., 1998). La voie de signalisation indirecte passe par l'activation de kinase PAK (pour **P**21 **A**ctivated **K**inase 1). En effet, une fois activée, la PAK va permettre une stabilisation des filaments d'actine en inhibant la ADF/cofiline par phosphorylation *via* la LIM kinase (Arber et al., 1998; Zhao et al., 1998). La PAK va aussi stimuler le maintien d'une migration effective en activant la filamine, connue pour être un stabilisateur des filaments d'actine (Vadlamudi et al., 2002) (**Figure 29**). A l'heure actuelle, plusieurs GEFs ont été identifiées comme étant impliquées de l'activation de Rac1 lors de la formation de lamellipode : Tiam1, β -PIX et DOCK180, mais il n'existe aucun

Introduction

consensus sur la (ou les) GEF(s) induisant la formation du lamellipode. Rac 1 a aussi été décrite comme étant à l'origine de la formation de complexes focaux non liés à l'activation de RhoA, ces complexes focaux peuvent ensuite mûrir en site d'adhésion sous l'action de la Rho kinase activée par RhoA (Rottner et al., 1999b).

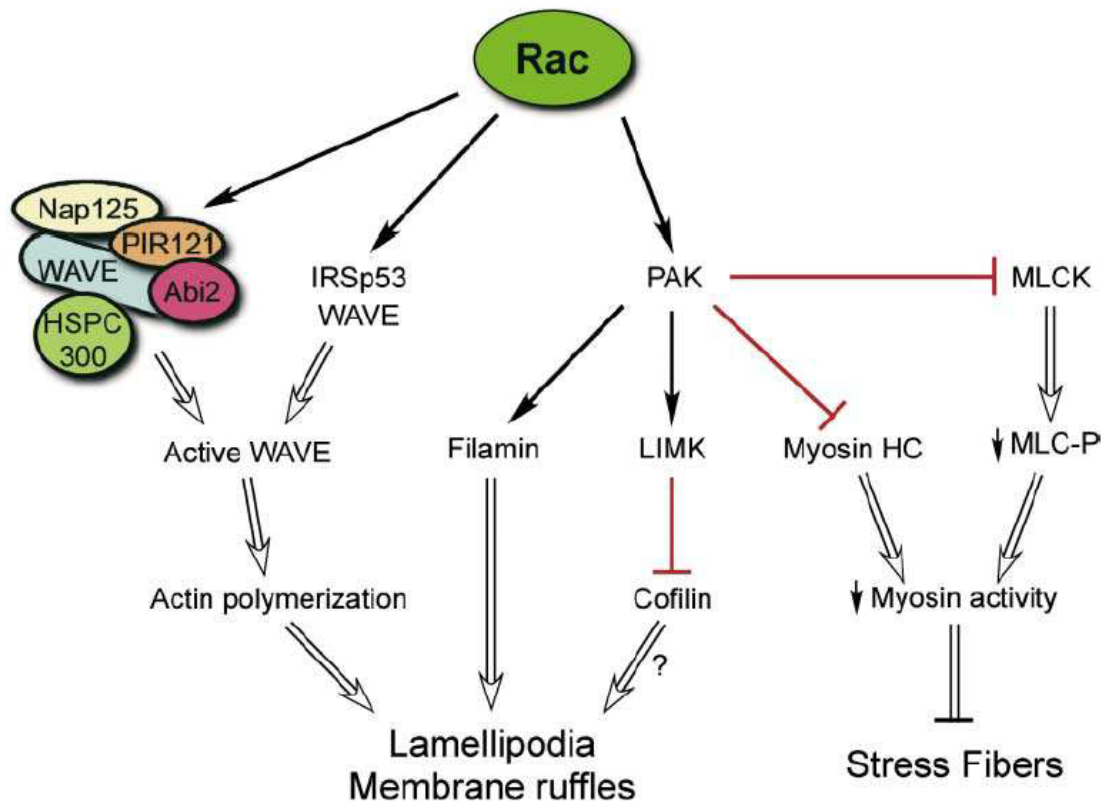


Figure 29. Voies d'activation de Rac1 et régulation cytosquelette d'actine.
(D'après Burridge and Wennerberg, 2004)

5.2. RhoA et ses effecteurs

Les Rho furent découvertes par hasard en 1985 chez l'aplysie (Madaule and Axel, 1985; Ridley and Hall, 2004). RhoA (pour **R**as **h**omologous member **A**), le membre le plus étudié de cette famille, fut caractérisé comme étant impliqué dans la formation des sites d'adhésion et des fibres de stress (Nobes and Hall, 1995; Ridley, 1995; Ridley and Hall, 1992) *via* une augmentation de la contractilité des myosines (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). En effet, une fois active, RhoA va induire la formation de sites d'adhésion et des fibres de stress *via* des voies d'activations directe et indirecte. Ainsi, il a été montré que RhoA va activer la Rho-kinase. Une fois activée, la Rho-kinase va activer directement les chaînes légères de myosines (MLC pour **M**ynosin **L**ight **C**hain) par phosphorylation (Amano et al., 1996). La Rho-kinase va ensuite préserver cette activation des myosines en inhibant la

déphosphorylation des MLCs. En effet, Rho-kinase va inactiver la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP pour **M**yo**s**in **L**ight **C**hain **P**hosphatase) par phosphorylation (Kimura et al., 1996) (**Figure 30**). RhoA va aussi stimuler directement la formation des fibres de stress, en activant la formine mDia par (Watanabe et al., 1999) (**Figure 30**). Les fibres de stress vont ensuite être préservées de la dépolymérisation par la Rho-kinase *via* la chaîne de phosphorylation Rho-kinase-LIM-Kinase-l'ADF/cofiline figure (Maekawa et al., 1999). RhoA est aussi impliquée dans la migration de type amiboïde. En effet, RhoA va, *via* la voie Rho-kinase/MLC, augmenter la contractilité cellulaire et induire la formation de blebs.

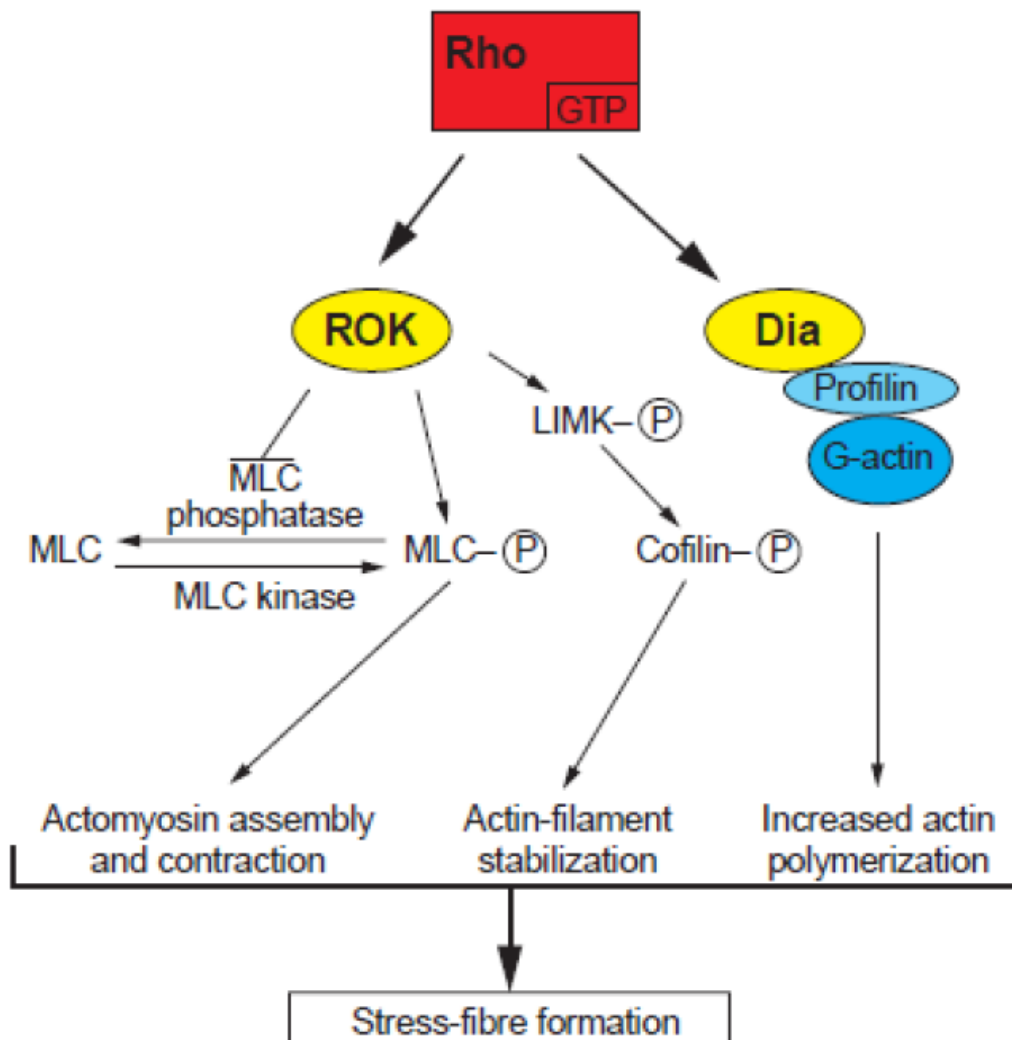


Figure 30 Les voies d'activation de RhoA et régulation cytosquelette d'actine.

(D'après Burridge and Wennerberg, 2004)

5.3. Cdc42 et ses effecteurs

Cdc42 (pour **C**ell **d**ivision **c**ycle **42**) fut découverte 1990. Elle fut ensuite caractérisée comme étant impliquée dans le contrôle de la polarité cellulaire et à la formation de filopode (Kozma et al., 1995; Nobes and Hall, 1995). Cdc42 va stimuler la formation de filopode *via* l'activation de WASP ou N-WASP (Rohatgi et al., 1999). En effet, bien qu'ils soient formés de filaments d'actine parallèles, les filopodes émergent de réseaux branchés (Yang and Svitkina, 2011) et il a été montré que la délocalisation du complexe Arp2/3 inhibait la formation des filopodes dans les macrophages (Machesky and Insall, 1998). Plus récemment, l'implication de Cdc42 dans la formation des filopodes a été nuancée par plusieurs des études ont montré que la formation de filopodes était possible malgré la déplétion de Cdc42 (Pellegrin and Mellor, 2005) ou l'inhibition de N-WASP. Cette formation de filopode pourrait s'expliquer par un mécanisme de la formation spontanée à partir du lamellipode, *via* une activation d'Arp2/3 par le complexe Wave (**Figure 31**).

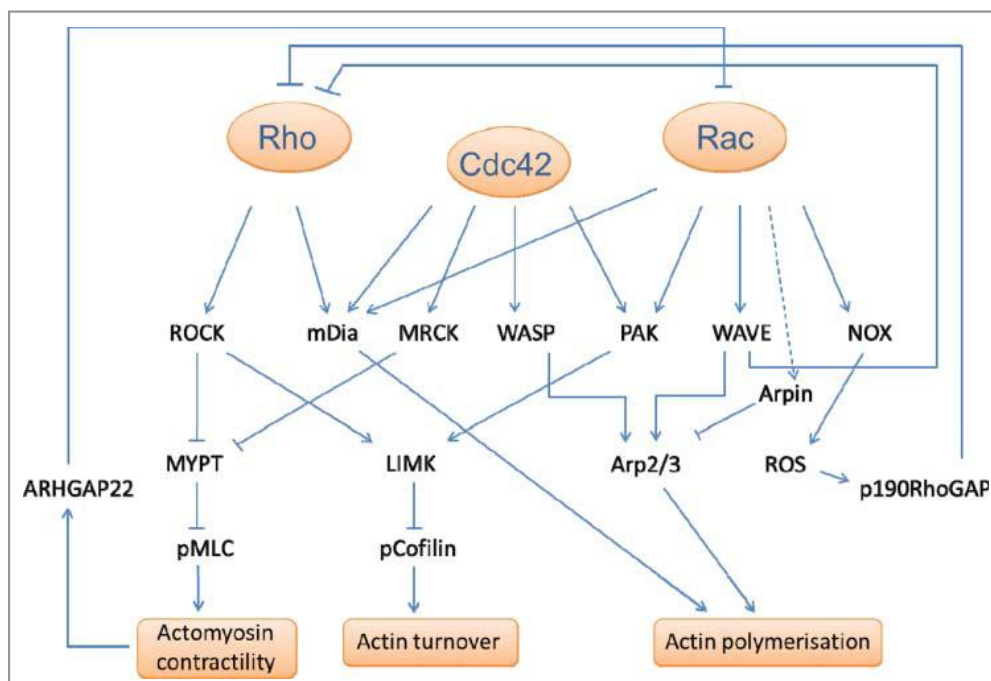


Figure 31. Interconnexions des voies effectrices de Rac Rho et Cdc42 (D'après Sadok and Marshall, 2016)

6. RhoGTPases & formation du lamellipode

Grâce au développement de bio-senseurs basés sur le phénomène de **FRET** (pour **A** **F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer), Il est aujourd'hui possible d'observer l'état d'activation d'une protéine par vidéomicroscopie. Cette approche a été utilisée afin d'observer l'état de l'activation des RhoGTPases Rac1, RhoA et Cdc42 lors de la formation du lamellipode (Del Pozo et al. 2002; Pertz et al. 2006; Machacek et al. 2009). Dans une étude publiée en 2009, Machacek et collaborateurs ont observé l'orchestration de l'activité des RhoGTPases Rac1, RhoA et Cdc42 lors des différentes phases de protrusions et rétractions du lamellipode. Ainsi, ils ont montré que l'activation que Rac1 et Cdc42 sont activées à l'arrière du front de migration et de manière non synchronisée avec les protrusions du lamellipode, alors que l'activation de RhoA est localisée à l'extrémité du lamellipode et de manière synchronisée avec la protrusion. Ces résultats sont en contradiction avec le modèle, communément admis, où la formation du lamellipode est permise par l'activation de Wave par Rac1 (Ismail et al., 2009; Kobayashi et al., 1998; Steffen et al., 2004). Machacek et collaborateurs expliquent leurs résultats en proposant un modèle où la formation du lamellipode est due à la nucléation de filaments *via* une activation des formines par RhoA.

Sachant que de nouvelles approches de microscopie super-résolutive permettent l'accès à la dynamique rapide des protéines, il serait intéressant de comparer les dynamiques de RhoA et de Rac1.

Introduction

6.

Mécanique du lamellipode

Pour comprendre le fonctionnement du lamellipode, il faut comprendre le fonctionnement de sa mécanique. C'est la polymérisation des filaments d'actine qui permet la protrusion du lamellipode. Ce chapitre aura donc pour but de vous décrire : quelles sont les caractéristiques des filaments d'actine ? Comment peuvent-ils appliquer des forces à l'extrémité du lamellipode ? Quelles sont les modèles alternatifs pour expliquer la production des forces ?

1. Mécanique de l'actine

1.1. Les bases physiques

Les propriétés mécaniques d'un polymère sont déterminées par deux caractéristiques : sa longueur de persistance (L_p) et sa longueur physiologique (L) (Figure 32). La longueur de persistance caractérise la rigidité du polymère, elle est définie comme la longueur en deçà de laquelle l'agitation thermique n'altère pas la linéarité du polymère. La longueur physiologique est quant à elle, la longueur typique du polymère au sein de la cellule. La comparaison de ces deux caractéristiques permet de définir le type de filament (Tableau 5).

Les filaments d'actine ont une longueur de persistance d'environ $15 \mu\text{m}$ pour les filaments composés principalement d'actine-ATP ou d'actine-ADP+Pi et de $9 \mu\text{m}$ pour les filaments composés d'actine-ADP (Isambert et al., 1995). Cette longueur de persistance est du même ordre de grandeur que la longueur physiologique des filaments, ces derniers présentent donc les caractéristiques propres aux polymères semi-flexibles. A partir de la longueur de persistance des filaments, il est possible de déterminer la force de flambage

Introduction

caractérisant la force nécessaire pour faire flamber le filament, pour un filament d'actine de $1\mu\text{m}$ cette force de flambage est de l'ordre de 1pN (Romet-Lemonne and Jégou, 2013).

La génération de forces de poussée efficaces à partir de ces filaments d'actine semi-flexible, n'est permise que par un agencement spécifique des filaments comme l'utilisation de filaments courts et branchés au niveau du lamellipode ou long et empaqueté au niveau des filopodes.

Sous-famille	Rapport L_p / L
Polymère flexible	$L \gg L_p$
Polymère semi-flexible	$L \approx L_p$
Polymère rigide	$L \ll L_p$

Tableau 5 : Les différents types de polymères biologiques en fonction du rapport L_p / L

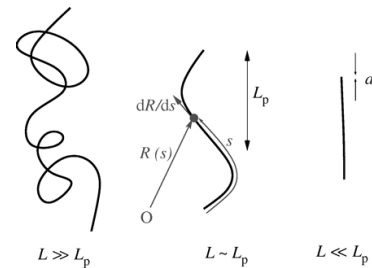


Figure 32. Trois types de polymères

1.2. Forces générées par la polymérisation d'un filament d'actine

Comme nous l'avons vu précédemment, le lamellipode est une structure très dynamique et cette polymérisation ininterrompue au niveau des extrémités barbées des filaments d'actine est à l'origine des forces permettant la protrusion membranaire. La compréhension des mécanismes permettant la genèse de force *via* la polymérisation est donc un prérequis à une compréhension globale du mode de fonctionnement du lamellipode. Depuis près de 40 ans, l'étude des forces générées par la polymérisation de filaments d'actine a été menée de concert par des approches théoriques et expérimentales.

1.2.1. Les approches théoriques

L'idée que la polymérisation des filaments pouvait générer les forces nécessaires à la protrusion du lamellipode fut initialement proposée au début des années 80 (Hill, 1981). En effet, à cette époque, on pensait que les forces présentes au niveau du lamellipodes étaient principalement dues aux myosines. Hill proposa au contraire que l'énergie chimique libérée lors de la liaison d'un nouveau monomère d'actine permettrait d'induire une force suffisante pour permettre la protrusion du lamellipode. Cette hypothèse fut confirmée plus tard par l'utilisation de systèmes biomimétiques montrant que la présence de myosines n'était pas nécessaire lors de la migration de pathogènes (*Listeria* et *Shigella*) *via* des comètes d'actine (Loisel et al., 1999).

La théorie de Hill fut ensuite formalisée d'un point de vue physique dans le "Brownian Ratchet Model" ou modèle du cliquet thermique (Peskin et al., 1993). Lorsque l'extrémité barbée d'un filament d'actine est en contact direct avec un obstacle, l'ajout de nouveaux monomères semble être impossible. Cependant, le "Brownian Ratchet Model" explique que l'agitation thermique de l'obstacle peut suffisamment éloigner ce dernier de l'extrémité barbée pour qu'un nouveau monomère s'ajoute au filament. L'obstacle ne pourra alors pas retourner à sa position d'origine, d'où le terme de cliquet. Le mouvement de l'obstacle ne pourra donc se faire que dans une direction et l'ajout successif de monomères viendra bloquer son retour. C'est ainsi que le "Brownian Ratchet Model" décrit comment la polymérisation de l'actine peut induire le mouvement dirigé d'un objet, ou la protrusion de la membrane au niveau du lamellipode.

Le "Brownian Ratchet Model" fut ensuite amélioré à deux reprises Alexander Mogilner et George Oster en 1996 et 2003 (Mogilner and Oster, 1996, 2003). En 1996, les auteurs mirent en doute le "Brownian Ratchet Model" car selon eux, ce modèle est limité par le fait que les filaments doivent être transversaux à l'obstacle et, la vitesse de l'obstacle est dépendante de sa taille car elle est due à son agitation thermique. Cependant, des études ont montré que les filaments d'actine du lamellipode pouvaient être quasiment orthogonaux à la membrane (Small et al., 1995) et les parasites *Listeria* et *Shigella* migrent à la même vitesse malgré des tailles différentes (Goldberg and Theriot, 1995). Alexander Mogilner et George Oster proposèrent donc un nouveau modèle nommé "l'Elastic Brownian Ratchet Model" ou modèle du cliquet thermique élastique, ce dernier néglige l'agitation thermique de l'obstacle au profit de l'agitation thermique du filament actine étant donné qu'il est semi-flexible. Dans ce modèle, la probabilité d'ajout de nouveaux monomères ne dépend donc pas de la taille de l'obstacle mais plutôt de l'angle formé par le filament d'actine et sa longueur de persistance.

En 2003, Alexander Mogilner et George Oster durent mettre à jour leur modèle car plusieurs études mettaient en doute leur précédent modèle. Ces études montraient que le réseau de filaments pouvait être attaché à l'obstacle *via* des liaisons entre le NPF ActA et le complexe Arp2/3 lors de la migration de parasites (Mogilner and Oster, 2003), alors que "**l'Elastic Brownian Ratchet Model**" ne prévoyait pas cette éventualité. Les auteurs ont donc proposé "l'Elastic Ratchet and Tethered Filaments Model" ou modèle du cliquet thermique élastique attaché (Mogilner, 2006). Ce modèle propose qu'il y ait à tout moment deux types de filaments : les filaments liés au NPF et donc liés à l'obstacle et les filaments libres aussi nommés "working filament" produisant des forces sur l'obstacle en polymérisant. Les filaments oscilleraient donc entre les phases libres et liées. Ces modèles bien que théoriques, ont été constamment mis à jour en fonction des données expérimentales.

1.2.2. Les approches expérimentales

Bien qu'indispensable à la compréhension du fonctionnement des structures protrusives, la mesure des forces générées par l'allongement d'un filament d'actine est restée longtemps théorique. Ainsi, la force maximale générée par la polymérisation fut assez vite estimée de manière théorique à 9 pN, mais une mesure directe de cette force restait essentielle (Dmitrieff and Nédélec, 2016; Hill, 1981).

Une des premières mesures de la force générée par l'allongement d'un filament fut réalisée par une astucieuse approche *in vitro* (Kovar and Pollard, 2004). Après avoir attaché l'extrémité pointue des filaments à une lamelle de verre grâce à des myosines inactives, les auteurs ont catalysé la polymérisation grâce à des formines elles aussi liées à la lamelle. Etant contraint aux deux extrémités, les filaments vont se courber lors de la polymérisation (**Figure 33. B**). Or la force nécessaire pour flamber le filament provient de la force induite par la polymérisation du filament et est inversement proportionnelle à la distance entre les deux points d'ancrage liant le filament à la lamelle. Dans ces conditions, la force maximale générée par l'allongement d'un filament fut évaluée à 1,3 pN (Kovar and Pollard, 2004).

Plus tard, une seconde étude a mesuré la force générée par l'allongement de plusieurs filaments d'actine provenant d'acrosomes greffés à des billes et bloqués par un obstacle (**Figure 33. A**). Les auteurs ont alors sondé la force de polymérisation du faisceau de filament d'actine grâce à une pince optique, ils ont ainsi montré que cette force de polymérisation était d'environ 1 pN. En découvrant que la force de polymérisation mesurée au niveau du faisceau de filament (comptant environ 8 filaments) est environ égale à la force théorique attendue pour un filament seul, les auteurs purent montrer qu'il n'y a pas d'effet coopératif des filaments, seul le filament le plus long du faisceau exerce une force sur l'obstacle.

D'autres théories existent quant à la production des forces à l'extrémité du lamellipode. Ces dernières voient le lamellipode non pas comme un réseau de filaments mais plutôt comme un gel (Sykes and Plastino, 2010). Dans ce modèle, le flux d'actine serait généré par la création de nouveaux réseaux d'actine exerçant une force sur des réseaux formés précédemment. En revanche, dans ce modèle, les filaments d'actine peuvent être orientés transversalement à l'extrémité du lamellipode. Des données de microscopie électronique ont d'ores et déjà montré l'existence au sein du lamellipode (Koestler et al., 2013).

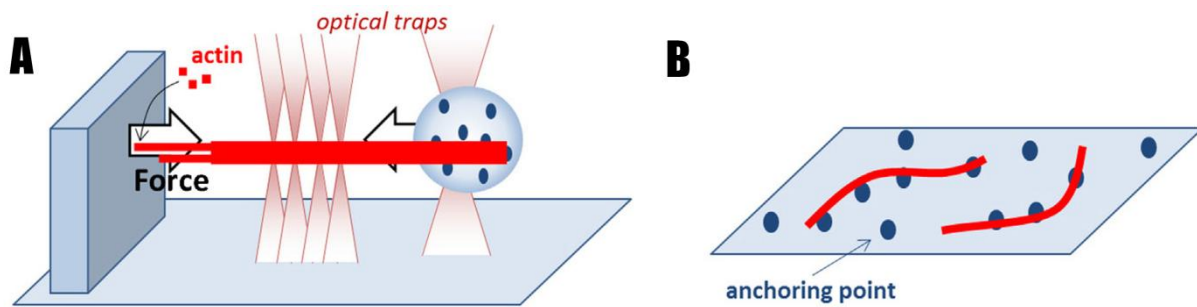


Figure 33. Mécano-transduction à l'échelle du filament (*in vivo*)
(D'après Romet-Lemonne and Jégou, 2013)

2. Mécanotransduction des protéines

Comme nous l'avons vu précédemment, la polymérisation des filaments est à l'origine de forces permettant la protrusion du lamellipode. Ce dernier est donc le siège d'une intense activité mécanique, or depuis peu, de nombreuses études tendent à montrer que les forces exercées sur les cellules peuvent être considérées comme de véritables signaux de régulation du comportement cellulaire impliqué dans de nombreux processus physiologiques : embryogenèse (Keller et al., 2003), différenciation et migration cellulaire (Engler et al., 2006; Lo et al., 2000). Une dérégulation ou un défaut de mécanotransduction peut être à l'origine de pathologie : formation de métastases (Paszek et al., 2014), surdité, ostéoporose et troubles développementaux (DuFort et al., 2011). Alors que la mécanotransduction semble être essentielle au fonctionnement des cellules, elle est mal connue, et la compréhension des mécanismes moléculaires la contrôlant reste à améliorer.

Le fait que les intégrines transmettent les forces de la cellule à MEC et de la MEC à la cellule indique qu'elles sont évidemment impliquées dans la mécanotransduction. L'une des premières communautés à s'intéresser aux bases moléculaires de la mécanotransduction fut donc la communauté des spécialistes de l'adhésion cellulaire. Les biologistes s'intéressant à la mécanotransduction cherchent donc à savoir qu'elles sont les effets de l'application de force sur le comportement de protéine. Ces effets peuvent être parfois contre intuitifs.

En mécanotransduction, les liens protéiques sont caractérisés par la nature de leur réponse à l'application de force de traction suffisante, on différencie les liaisons glissantes et les liaisons accrocheuses. Dans la plupart des cas, le lien entre deux protéines casse lorsque l'on applique une force de traction suffisante, on dit alors que les liaisons glissantes ("**slip bonds**" en anglais). Ce cas est observé lorsque l'on retient, grâce à une pince optique et à une force de 2 pN, des intégrines liés au flux l'actine *via* une unique taline (Jiang et al.,

Introduction

2003). Mais dans d'autres cas, l'application de force de traction à un lien entre protéine peut avoir des effets opposés et contre intuitif. Une étude a ainsi montré qu'une traction de 10-30 pN pouvait augmenter le temps de vie de la liaison entre l'intégrines $\alpha 5\beta 1$ et la fibronectine. On parle alors de liaisons accrocheuses ("**catch bonds**" en anglais) car elles se renforcent avec sous l'application d'une force.

Les effets de l'application de force de traction ne sont pas cantonnés qu'aux liaisons protéine-protéine, en effet ces forces peuvent aussi augmenter l'affinité de certains sites de liaison existants ou d'exposer des sites de liaison qui étaient initialement masqués. Ces effets sur les sites de liaison peuvent conduire à l'accumulation de ligands ou à des modifications post-traductionnelles. Il a ainsi été montré que l'étirement des talines révélait des sites de liaison à la vinculine et induisait une acumination de cette dernière au niveau des sites d'adhésion (del Rio et al., 2009). Une autre étude a révélé que lors d'expériences d'étirement de cellule pouvait augmenter le niveau de phosphorylation p130Cas et donc induire l'activation de certaines protéine-G (Sawada et al., 2006).

Sachant que le lamellipode est aussi de siège de nombreuses forces appliquées, il serait donc intéressant de voir si des phénomènes de manique de transduction existent en son sein.

7.

Objectifs de la thèse

Le but de cette thèse était d'améliorer la compréhension de la coordination spatio-temporelle des régulateurs d'actine au sein du lamellipode lors de la migration cellulaire.

Le lamellipode est formé d'un réseau branché d'actine qui ne peut pas s'auto-assembler car en effet, la formation de chaque nouvelle branche nécessite l'activation d'un complexe Arp2/3. La formation du lamellipode est donc régulée *via* l'activation du complexe Arp2/3. Comme nous l'avons vu, l'activation du complexe Arp2/3 au niveau du lamellipode, est induite par le complexe Wave. Il a été montré *in vitro* que l'activation du complexe Wave nécessite des interactions simultanées de plusieurs activateurs (Rac1, IRSp53, PIP3, etc), mais l'orchestration de ces régulateurs au sein du lamellipode est encore débattue car elle était difficilement observable. Mais aujourd'hui, l'utilisation d'approches de microscopie super-résolutive permet l'observation directe de molécule unique à l'échelle nanométrique.

Nous avons donc utilisé l'approche super-résolutive de PALM et SPT afin d'étudier l'organisation spatiale et temporelle du complexe Wave et ses régulateurs au sein du lamellipode.

Introduction

Annexes

Méthodes

Durant plus d'un siècle, l'horizon de la microscopie photonique fut matérialisé par la barrière physique de la limite de diffraction. Cette limite cantonnait l'étude des structures de taille inférieure à 200nm à des approches de microscopie électronique sur échantillons fixés. Mais au début du XXI^{ème} siècle, de nouvelles approches de microscopie photonique, regroupées sous le terme de microscopies super-résolutives ont pu s'affranchir de cette limite. Ces nouvelles approches permirent aux biologistes de fouler une nouvelle *terra-incognita* à savoir l'étude de la dynamique de structures subcellulaires à l'échelle de la molécule unique.

1. La microscopie photonique classique

Une grande partie de nos savoirs concernant les processus biologiques cellulaires et subcellulaires qui ont été acquis par une visualisation directe, la microscopie est donc un des outils clef du biologiste. La microscopie est une science hautement interdisciplinaire en constante évolution qui pousse biologistes, chimistes, physiciens, et informaticiens à l'améliorer. Les grandes avancées en microscopie tendent alors à améliorer les résolutions spatiales et temporelles et le marquage de protéines. Alors que la résolution temporelle en vidéomicroscopie a pu être optimisée par l'amélioration des technologies d'acquisitions, et que le marquage de protéines a été révolutionné par la découverte des protéines fluorescentes et l'utilisation de fluorophores organiques, la résolution spatiale a quant à elle, été limitée par une barrière physique. En effet, la microscopie optique est limitée par la diffraction de la lumière, et on sait depuis 1873 et les travaux d'Ernst Abbe que cette limite est fixée à environ 200 nm en (x,y). Or les structures subcellulaires ont une taille inférieure à cette limite, il a donc fallu faire preuve d'ingéniosité pour s'affranchir de cette limite. L'une des premières solutions proposées fut la microscopie électronique avec une résolution pouvant aller en deçà du nanomètre. Cependant, elle nécessite la fixation des échantillons et ne donne pas accès à la dynamique des protéines. Mais depuis plus d'une dizaine d'années, le domaine de la microscopie a été révolutionné par l'apparition d'une nouvelle série d'approches regroupées sous le qualificatif de **microscopie super-résolution**, et récompensé par un prix Nobel de chimie en 2014 (décerné à Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner).

2. La microscopie super-résolutive

La microscopie super-résolution est un ensemble de méthodes d'imagerie photonique permettant une résolution spatiale inférieure à la limite de diffraction. Ces nouvelles méthodes ont permis d'ores et déjà l'étude de processus moléculaires avec plus de détails que pour la microscopie classique (Chazeau et al., 2014; Nair et al., 2013; Rossier et al., 2012).

Ces méthodes sont nées d'un constat simple, si deux fluorophores sont situés à une distance inférieure à la limite de diffraction de la lumière, ils ne peuvent être résolus à moins de 200nm car ils apparaîtront sous la forme d'un seul fluorophore. L'astuce est donc d'avoir un seul des deux fluorophores qui émet et d'en calculer le centroïde (avec une précision de pointée d'environ 30nm). Ces méthodes de microscopie ont donc pour but de contrôler le nombre de molécules émettrices dans un volume à imager donné. Les méthodes de microscopie super-résolutives vont donc être divisées en trois catégories (Godin et al., 2014) :

- Les méthodes basées sur un volume d'émission de fluorescence très localisé ;
- Les méthodes basées sur une illumination structurée ;
- les méthodes basées sur les localisations de molécules individualisées.

catégories	Méthodes
Volume d'émission de fluorescence localisé	<i>STED (STimulated Emission Depletion microscopy)</i> (Hell and Wichmann, 1994) <i>GSD (Ground State Depletion)</i> (Hell and Kroug, 1995)(Hell and Kroug, 1995),
Illumination structurée	<i>SSIM (Saturated Structured IlluMination)</i> (Gustafsson, 2000) <i>RESOLFT (Reversible Saturable Optical Fluorescence Transition)</i>
Localisations de molécules individualisées	<i>PALM (PhotoActivated Localisation Microscopy)</i> (Betzig et al., 2006) <i>fPALM (fluorescence PhotoActivated Localisation Microscopy)</i> (Hess et al., 2006) <i>(STORM)et Stochastic Optical REconstruction Microscopy</i>

Dans la suite de cette partie, comme au cours de ma thèse, je me concentrerai sur les méthodes basées sur les localisations de molécules individualisées utilisées au laboratoire, le PALM, le SPT, le dSTORM. Le principe de base de ces techniques de localisation de molécules individualisées est d'activer de manière itérative d'un petit nombre de fluorophores au sein d'une population dense de fluorophores inactivés.

3. PALM

Les PALM et SPT n'ont pu voir le jour avec la découverte des protéines photoactivables et photoconvertibles. Les protéines photoactivables ont la capacité de passer d'un état non fluorescent à un état fluorescent lorsqu'on les illumine (**Dronpa** et PA-GFP pour **PhotoActivable- Green Fluorescent Protein**). Les protéines photoconvertibles ont la capacité de passer d'un état fluorescent à un autre état fluorescent lorsqu'on les illumine (**mEos2**, **Dendra2**) (Encadré 7). Ces modifications spectrales induites par l'illumination sont dues à des modifications structurales.

Le principe du PALM et du SPT est d'illuminer faiblement l'échantillon ainsi seul une très petite portion de fluorophores vont être photoactivés ou photoconvertis. Ils seront alors isolés sur un fond noir et donc aisément localisables avant de photoblanchir. Au cours du temps les différents fluorophores vont donc stochastiquement s'illuminer puis photoblanchir (**Figure 34**). L'enregistrement vidéo de ces différents événements d'illuminations va ensuite être analysé. Une image super-résolue de la densité de protéines dans une région donnée va pouvoir être reconstruite après y avoir reporté toutes les localisations, on parle alors de PALM. Le SPT va quant à lui, s'intéresser aux mouvements de protéines fluorescentes. Cette approche est réalisée uniquement sur cellules vivantes, les protéines vont continuer à diffuser pendant leur période d'émission. On va alors pouvoir relier les différentes localisations d'une même protéine, et retracer sa trajectoire. Les trajectoires seront ensuite analysées.

Les approches de PALM et SPT sont toutefois **limitées** par l'utilisation de protéines exogènes, ce qui empêche l'étude des protéines endogènes dans leur environnement natif. Mais ces approches présentent l'**avantage** de ne pas être limité à l'étude de protéines transmembranaires, ce qui en fait un outil de choix pour l'étude de protéines liées au cytosquelette qui sont pour la plupart cytoplasmiques ou localisées sur la membrane interne. Le PALM peut aussi être réalisé en deux couleurs en utilisant un couple de fluorophores marquant deux protéines différentes.

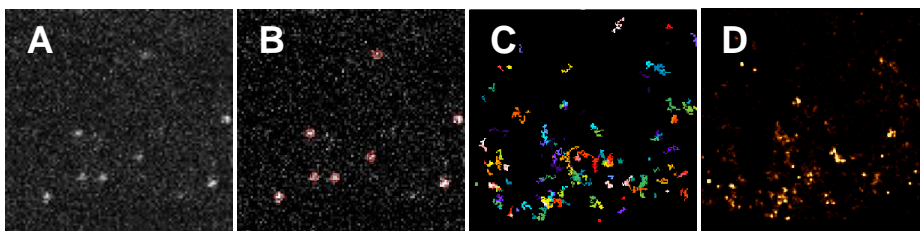


Figure 34. Principe du PALM

Annexes Méthodes

En pratique, lors des expériences de PALM et SPT, les protéines d'intérêts ont été fusionnées à la mEos2. Puis ces plasmides ont été respectivement co-électroporés dans les fibroblastes. Puis le comportement de plus d'un millier de fluorophores par cellule a pu être obtenu en acquérant plusieurs images (7500 pour les fibroblastes) à des fréquences élevées (50 ou 333 Hz) (Figure 35).

Acquisition step

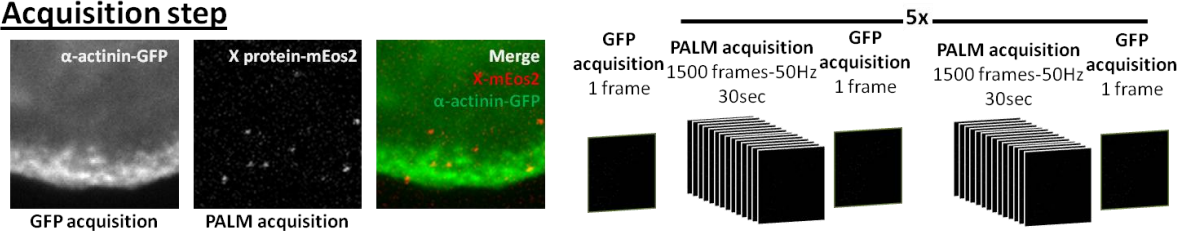
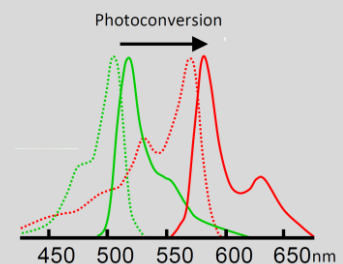


Figure 35. Descriptif de nos acquisitions PALM

Encadré 7

La mEos2 : A l'état natif la mEos2 présente un état dit vert avec un pic d'absorbance maximum à 506 nm et un pic d'émission dans le vert à 519 nm. La photoconversion via l'illumination avec un laser à 405 nm va permettre de la faire passer de l'état vert à un état rouge, où le pic d'absorbance passe à 573 nm et le pic d'émission passe à 584 nm. Lors de l'illumination au 405 nm seul un petit nombre de fluorophores va passer de l'état vert à l'état rouge.



4. dSTORM

Le STORM et dSTORM sont deux approches de microscopie assez similaires au PALM mais utilisant des sondes fluorescentes synthétiques couplées à des anticorps.

Le principe du dSTORM est d'utiliser les propriétés de certains fluorophores synthétiques (comme l'AlexaFluor 647) à passer dans un état métastable non fluorescent nommé « état triplet » (Folling et al., 2008). Ce passage est permis par l'utilisation de fortes puissances lasers (de l'ordre du kW.cm^{-2}). Puis, les sondes fluorescentes vont avoir tendance à cycler entre l'état triplet et l'état fluorescent de manière stochastique, on a donc quelques molécules qui fluorescent sur un fond noir, la localisation super-résolutive est donc possible. Puis, après un certain temps, les molécules vont photoblanchir. Comme pour le PALM, le dSTORM permet l'activation de manière itérative d'un petit nombre de fluorophores au sein d'une population dense de fluorophores inactivés.

Cette méthode a l'**avantage** de pouvoir imager des protéines endogènes (s'il existe un anticorps spécifique). Mais cette approche est limitée par le fait qu'elle nécessite la fixation des échantillons car elle doit se faire dans des conditions pauvres en oxygène (glucose + glucose oxydase) en présence de thiols aliphatiques. Cependant, ce problème à su être contourné par certaines équipes (Wombacher et al., 2010).

5. L'analyse d'image

Les différentes étapes d'analyses d'image ont d'ores et déjà été décrites de façon remarquable dans les thèses Chazeau 2012 et Garcia 2013 réalisées au laboratoire, cette partie s'appuiera donc sur ces dernières.

5.1. Localisation

La localisation des protéines est une étape clé de l'analyse des données obtenues par PALM et dSTORM. Elle consiste à localiser le centre de la "**point spread function**" (**PSF**) de chacune des molécules (Figure 36). Les approches classiques utilisent une régression *via* une fonction gaussienne à deux dimensions, mais ces méthodes nécessitent un temps de calcul extrêmement long (Abraham et al., 2009). Cependant, d'autres techniques de localisation existent, et l'une d'entre-elles est basée sur la segmentation en ondelette qui a été développée au laboratoire par l'équipe de Jean-Baptiste Sibarita en collaboration avec l'équipe de Maxime Dahan (Paris) (Izeddin et al., 2012). L'approche de segmentation en ondelette ("wavelet"), est basée sur une première étape de segmentation suivie d'une seconde étape de calcul du centroïde des particules détectées. Cette approche permet une précision de pointée de 50 nm, qui peut cependant varier en fonction du rapport signal sur bruit de notre échantillon. L'ensemble des détections seront ensuite sommées sur une image sous-pixélisée afin de générer l'image super-résolue.

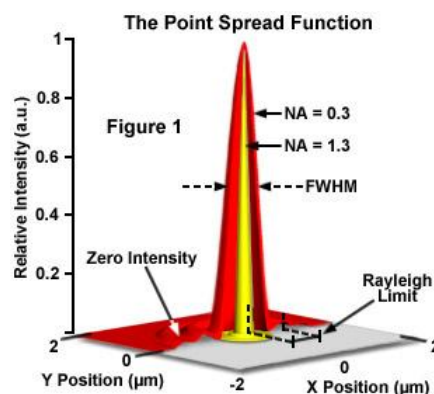


Figure 36 La fonction d'étalement du point (source : Zeiss)

5.2. Le suivi de particules uniques

Lorsque les acquisitions suivies de particules sont réalisées sur cellules vivantes, les molécules uniques vont se déplacer. Il est donc alors possible de survivre au cours du temps les trajectoires empruntées par l'ensemble des particules avec une précision de 50nm. En pratique, deux détections seront reliées, si la molécule unique à un déplacement inférieur à une valeur seuil entre deux images successives (3 pixels soit 480 nm dans notre étude). Ainsi, d'un plan à l'autre plusieurs points seront reliés afin de former une trajectoire (**Figure 37. A**). Les trajectoires prennent alors fin lorsque le fluorophore photoblanchit, "blink" ou lorsque le fluorophore quitte le plan d'illumination TIRF. L'ensemble des trajectoires seront ensuite représentées sur une image sous-pixelisée afin de générer l'image super-résolue (**Figure 34.D**).

L'étude du comportement des protéines est permise par le calcul du déplacement quadratique moyen (ou **MSD** pour **M**ean **S**quare **D**isplacement). Le MSD est représenté en calculant la somme des pas au carré (axe y) au cours du temps (axe x) (**Figure 37.A**).

Le MSD est représenté en calculant la somme des pas au carré (axe des ordonnées) au cours du temps (axe des abscisses) (**Figure 37. B et C**). Le MSD est calculé pour un pas de 1 intervalle de temps (traits et points rouges), puis pour un pas de 2 (traits et points verts), un pas de trois (traits et points bleus) et ainsi de suite (**Figure 37. A et B**). La courbure du MSD ainsi tracée, va nous renseigner sur le type de mouvement de la trajectoire. Si le MSD est parabolique, la trajectoire observée est dirigée, s'il est linéaire, alors la trajectoire est Brownienne, et enfin si elle atteint un plateau, la trajectoire est confinée. Ainsi, nous avons sélectionné les trajectoires de plus de 13 points et appliqué l'équation suivante :

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

Puis, le coefficient de diffusion instantané (D) est calculé en mesurant la pente de la droite passant par les quatre premiers points de la courbe MSD (**Figure 37. C**). La représentation, de la distribution de trajectoire pour une population de protéines donnée en fonction du logarithme décimal du coefficient de diffusion FIG, permet de comparer le comportement de différentes protéines. Ainsi, Rossier et collaborateurs ont comparé le comportement d'une protéine immobile (l'intégrine- β 3-WT) à celui de protéines diffusives membranaire ou transmembranaire.

Une protéine est alors considérée comme immobile si sa surface d'exploration, pendant l'intervalle de temps utilisé pour calculer le coefficient de diffusion instantané, est inférieure à la précision de pointée.

En utilisant ces approches de PALM et SPT, nous avons pu accéder à la localisation et à la dynamique de différents régulateurs de l'actine au sein du lamellipode.

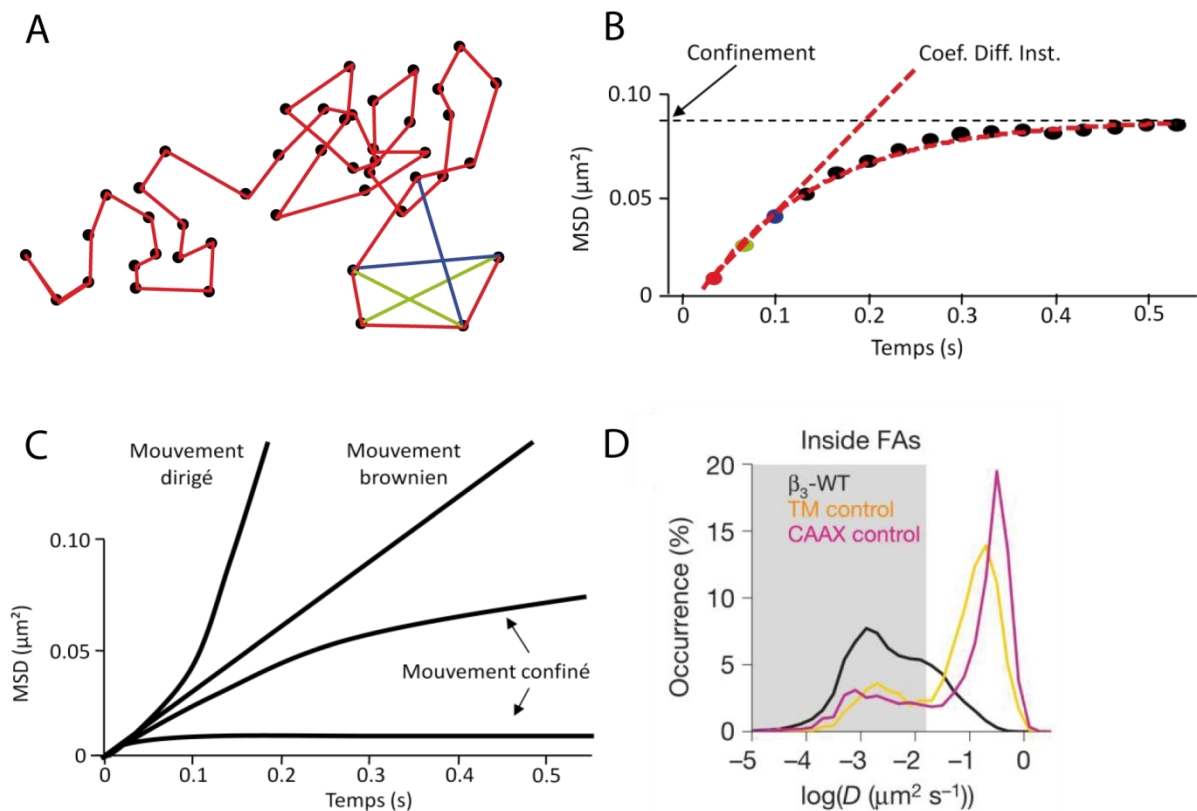


Figure 37. L'analyse de suivi de particule individuelle

A) Trajectoire fictive de 45 points. Trait rouge : pas de 1 entre les points de la trajectoire ; trait vert : pas de 2 ; trait bleu : pas de 3. B) Calcul du MSD. La somme des pas au carré (axe y) en fonction du temps (axe x). Point rouge : MSD pour un pas de 1 ; point vert : MSD pour un pas de 2 ; point bleu : MSD pour un pas de 3. Le coefficient de diffusion instantané (Coef. Diff. Inst.) est la pente des quatre premiers point de la courbe MSD. C) Différents comportements de la courbe MSD. La trajectoire peut être immobile ou confiné (mouvement immobile), diffusive (mouvement brownien), dirigée (mouvement dirigé). D) Histogramme du logarithme décimal des coefficients de diffusion instantané pour une protéine aux mouvements (β_3 -intégrine-mEOS2 sauvage dans des sites d'adhésions), une protéine transmembranaire et membranaire diffusant librement dans les sites d'adhésions (TM-mEOS2 et CAAX-mEOS2). (D'après Chazeau, 2012; Garcia, 2013; Rossier et al., 2012).

Résultats

Résultats

1

Fast Rac1 activation cycles at the lamellipodium tip control Wave complex function

Amine Mehidi, Olivier Rossier, Anaël Chazeau, Fabien Binamé, Amanda Remorino, Mathieu Coppey, Zeynep Karatas, Jean-Baptiste Sibarita, Violaine Moreau, Grégory Giannone

1. Contexte et problématique

Le rôle des RhoGTPases Rac1 et RhoA lors de la formation du lamellipode, est sujet à controverse. En effet, il est admis que le complexe Wave est localisé à l'extrémité du lamellipode (Hahne et al., 2001; Lai et al., 2008), et permet l'activation du complexe Arp2/3 lors de la formation du lamellipode (Chen et al., 2010; Miki et al., 2000) en présence d'IRSp53 (Nakagawa et al., 2003). Il est aussi reconnu que le complexe Wave est activé par Rac1 (Chen et al., 2010; Miki et al., 1998, 2000). Cependant, des études basées sur l'utilisation de bio-senseurs révélant l'état d'activation des RhoGTPases Rac1, RhoA et Cdc42 ont montré que RhoA est activée au niveau du front de migration au début de la protrusion, alors que Rac1 et Cdc42 sont activées à l'arrière du front de migration, et de manière non synchronisée avec les protrusions du lamellipode (Machacek et al., 2009; Pertz et al., 2006). Ces résultats suggèrent que RhoA serait *via* l'activation des formines, à l'origine de la formation du lamellipode. Il y a donc deux écoles : la première, propose que la formation du lamellipode soit due à l'activation du complexe Wave par Rac1. La seconde propose que la formation du lamellipode soit due à l'activation des formines par RhoA. **Grâce à l'utilisation d'approches de suivi de particules individuelles et d'optogénétiques, nous avons alors tenté de déterminer : Quelle voie d'activation permet la formation du lamellipode ?**

2. Approches utilisées

En utilisant des approches de PALM et SPT et l'utilisation de mutants constitutivement actifs ou inactifs des RhoGTPases Rac1 et RhoA, nous avons pu aborder le comportement de diffusion de chacun des mutants. Puis, nous avons combiné ces approches de PALM et SPT à une approche d'optogénétique afin d'induire une activation localisée de Rac1 par le GEF Tiam1.

3. Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons confirmé la localisation du complexe Wave et d'IRSp53 à l'extrémité du lamellipode. Les localisations du complexe Wave et d'IRSp53 sont permises grâce à un mécanisme de diffusion/piégeage.

Dans un second temps, nous avons découvert l'existence d'une corrélation entre l'état d'activation de Rac1 et son immobilisation à l'extrémité du lamellipode. Cette corrélation n'est pas retrouvée chez RhoA. Ces données révèlent l'existence d'un effecteur de Rac1 à l'extrémité du lamellipode.

Dans un troisième temps, nous avons observé une augmentation de la fraction immobile de Rac1 constitutivement actif à l'extrémité du lamellipode après augmentation de la fréquence d'acquisition. Cette donnée révèle que l'immobilisation de Rac1 activée à l'extrémité du lamellipode, est transitoire.

Enfin, nous avons, par optogénétique, induit l'enrichissement Tiam1 à l'extrémité du lamellipode et ainsi stimulé la protrusion de ce dernier. Nous avons alors observé que cette stimulation n'augmente pas l'enrichissement de Rac1-WT à l'extrémité du lamellipode. Nous avons ainsi conclu que l'activation de Rac1-WT par Tiam1 est très transitoire.

L'ensemble de ces données confirment un modèle où Rac1 est activée transitoirement à l'extrémité du lamellipode. Cette activation transitoire permettrait le contrôle local et rapide de l'activité de Rac1. De plus, cette étude appuie l'implication de la voie Rac1-complexe Wave dans la formation du lamellipode.

Fast Rac1 activation cycles at the lamellipodium tip control Wave complex function

Amine Mehidi^{1,2}, Olivier Rossier^{1,2}, Anaël Chazeau³, Fabien Binamé^{4,5}, Amanda Remorino⁶, Mathieu Coppey⁶, Zeynep Karatas^{1,2}, Jean-Baptiste Sibarita^{1,2}, Violaine Moreau^{4,5}, Grégory Giannone^{1,2,†}

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

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

³Present address: Cell Biology, Faculty of Science, Utrecht University, Padualaan 8 3584 CH Utrecht, the Netherlands

⁴Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale, U1053, Bordeaux F-33076, France.

⁵Universite de Bordeaux, Bordeaux F-33076, France.

⁶Laboratoire Physico-Chimie, Institut Curie, Centre National de la Recherche Scientifique UMR168, Paris-Science Lettres, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris, France.

†Corresponding author: gregory.giannone@u-bordeaux2.fr

Condensed title: Fast Rac1 activation cycles at the lamellipodium tip

Abstract

The spatiotemporal coordination of actin regulators in the lamellipodium (LM) determines the dynamics and architecture of branched F-actin networks during cell migration. The WAVE complex, effector of Rac1 during cell protrusion, is concentrated at the LM tip. Yet, correlation of Rho GTPases activation with cycles of membrane protrusions, suggested that Rac1 activation is not synchronized with membrane protrusion and occurs behind the LM tip. However, RhoA activation is maximal at the cell edge and synchronized with edge progression. Combining single protein tracking (SPT) and super-resolution imaging with loss- or gain-of-function of Rho GTPases mutants, we demonstrated that Rac1 immobilizations at the LM tip were correlated with Rac1 activation, contrary to RhoA. We showed that Rac1 effector WAVE and regulator IRSp53 accumulated at the LM tip by membrane free-diffusion and trapping. Nevertheless, wild-type Rac1, which directly interacts with WAVE and IRSp53, only displayed slower diffusion at the LM tip, suggesting fast local activation/inactivation cycles. Coupling tracking with optogenetic activation of Rac1, triggered by Tiam1 membrane recruitment, demonstrated that Rac1-WT diffusive properties were unchanged despite enhanced LM protrusion. Taken together, our results support a model where Rac1 is rapidly switching between activation and inhibition at the LM tip, ensuring a local and fast control of Rac1 actions on its targets.

Abbreviations:

Arp2/3: actin related proteins 2/3

D: diffusion coefficient

F-actin: actin filaments

FMNL2: formin-like protein-2

IRSp53: insulin receptor tyrosine kinase substrate p53

PALM: photoactivation localization microscopy

PSD: post synaptic density

rconf: confinement radius

spt: single protein tracking

VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein

WAVE: WASP-family verprolin homologue

Key Words: Cell migration / lamellipodium / branched F-actin regulators / Rho GTPases / single protein tracking / super-resolution microscopy

Introduction

Cell motility is an integrated process involved in critical physiological phenomenon such as embryogenesis, immunological response, wound healing, and growth cone path finding (Pollard and Cooper, 2009). Dysregulation of cell motility, which has a precise hierarchical spatial and temporal organization, contributes to pathologies including tumor formation and metastasis (Bravo-Cordero et al., 2012). At the cellular (Sheetz et al., 1999), sub-cellular (Giannone et al., 2004, 2007), and molecular (Pollard and Cooper, 2009; Rossier et al., 2012) levels, migration proceeds through cycles lasting from minutes to seconds. During those cycles, macromolecules undergo motions and transient interactions that are essential to their function, and this is particularly true during cell migration where nanomachine-like protein complexes involved in adhesion and actin polymerization must be at a specific location at a precise time (Krause and Gautreau, 2014; Rossier and Giannone, 2015).

The first step in cell motility is the forward protrusion of the lamellipodium (LM) which is a thin sheet of membrane-enclosed F-actin networks propelled by actin polymerization (Blanchoin et al., 2014; Krause and Gautreau, 2014). Rho GTPases are acting as molecular switches to control cytoskeletal rearrangements during cell growth, adhesion and motility (Heasman and Ridley, 2008). Among them, Rac1 activation is the major signal driving LM formation (Ridley et al., 1992; Steffen et al., 2013; Wu et al., 2009). Once active, Rac1 is targeted to the plasma membrane where it can bind and activate the WAVE complex, a nucleating promoting factor (NPF) that stimulates the Arp2/3 complex and thus nucleation of branched F-actin (Chen et al., 2010; Miki et al., 2000). F-actin length is then controlled by elongation factors including VASP and Formin-Like protein (FMNL2) (Block et al., 2012; Breitsprecher et al., 2008) and capping proteins (Mejillano et al., 2004). Finally, F-actin turnover is driven by severing proteins such as ADF/cofilin (Ghosh et al., 2004; Lai et al., 2008) or myosin motors (Reymann et al., 2012; Wilson et al., 2010). The actions of actin regulators in the LM are highly compartmentalized (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008). Actin nucleation, branching and elongation occur at the LM tip membrane (Blanchoin et al., 2014), myosin II generates forces at the back of the LM (Giannone et al., 2007), ADF/cofilin ensures F-actin severing within the entire LM (Lai et al., 2008). From the complex spatiotemporal coordination of actin regulators at the nanometer scale could emerge the micron-scale periodic phenomenon driving lamellipodium protrusion (Giannone 2004, Ponti 2004).

Biochemical approaches and model systems, using purified proteins, have dramatically improved our understanding of F-actin networks, from their initiation to their dynamics and mechanical properties (Blanchoin et al., 2014). Biochemical experiments suggested that coincident signals, i.e. simultaneous interactions and biochemical reactions, are required to trigger actin nucleation (Chen et al., 2010; Lebensohn and Kirschner, 2009). *In vitro* model systems reconstituted from purified proteins described the coordination of actin regulators necessary for the efficient formation and remodeling of actin networks (Blanchoin et al., 2000; Lee et al., 2010; Loisel et al., 1999; Reymann et al., 2012). While identification of this plethora of binding partners and characterization of their functions *in vitro* was crucial, the next challenge is to understand their spatiotemporal orchestration in cells and how it impacts on F-actin architecture and dynamics. Nevertheless, the spatial resolution of conventional fluorescent microscopy is insufficient to faithfully decrypt the sequence of molecular events controlling actin network dynamics within protrusive structures.

The development of super-resolution microscopy techniques has revolutionized biomolecular imaging in cells (Hell, 2007; Huang et al., 2009). The direct observation of biomolecules at the single molecule level has enabled their localization and tracking at the nanometer scale (Betzig et al., 2006; Manley et al., 2008). Super-resolution microscopies based on single molecule localization have been used to study sub-cellular structures including, integrin-based adhesion sites (Case et al., 2015; Kanchanawong et al., 2010; Rossier et al.), neuronal axons (Xu et al., 2013) and dendritic spines (Chazeau et al., 2014; Dani et al., 2010). Those studies unraveled that proteins, which seem co-localized using conventional light microscopy, are spatially segregated at the nanoscale level into distinct functional layers.

The LM is also a polarized structure organized in functional domains, the tip, the core and the back. The localization of most actin binding proteins and regulators in the LM, obtained using conventional fluorescent microscopy, are in good agreement with their functions (Giannone et al., 2007; Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008; Rottner et al., 1999). Nevertheless, the sites of action of signaling proteins are often difficult to pinpoint. For more than a decade, Rac1 was associated with LM formation (Ridley et al., 1992; Steffen et al., 2013; Wu et al., 2009). Since WAVE is concentrated at the LM tip (Lai et al., 2008; Suetsugu et al., 2003), activated Rac1 should work at this location to stimulate WAVE. However, FRET-based experiments, which correlated Rac1 and RhoA activities with cycles of membrane protrusions, suggested that Rac1 is activated 2 μm away from the LM tip (Machacek et al., 2009). Thus, Rac1 activation seemed not synchronized with membrane protrusion on the contrary to RhoA activation which is located at the cell edge (Pertz et al., 2006) and synchronized with edge progression (Machacek et al., 2009). To investigate this apparent conundrum we used single protein tracking (SPT) and super-resolution microscopy which give us molecular resolution on the localization of Rac1 and RhoA inside and outside the LM.

Results

The Rac1 effector WAVE and regulator IRSp53 are recruited at the lamellipodium tip by membrane free-diffusion.

Nucleation of F-actin branches requires the coordination in space and time of different signals involving GTP-bound Rac1, the WAVE and Arp2/3 complexes, IRSp53 and acidic phospholipids (PIP3) (Chen et al., 2010; Lebensohn and Kirschner, 2009; Miki et al., 2000). However, understanding their coordination within the LM implies knowledge of their molecular dynamics. To determine the sequence of molecular events leading to Rac1-dependent WAVE activation, we performed high-frequency sptPALM acquisition (50 Hz) to characterize the diffusive properties of actin regulators in the LM of mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Chazeau et al., 2014; Rossier et al., 2012). MEFs co-transfected with mEOS2-fused proteins and α -actinin-GFP, as a lamellipodium reporter, were spread on glass coverslips coated with fibronectin (FN). To limit the variability of our experiments, we performed our acquisitions during early spreading where cells display isotropic spreading powered by lamellipodia devoid of filopodia or mature focal adhesions (Dubin-Thaler et al., 2004; Giannone et al., 2004, 2007). Since Rac1 is also activated by growth factors (Ridley et al., 1992), we performed all experiments in the absence of serum to study only integrin-dependent Rac1 activation (Kiosses et al., 2001; Del Pozo et al., 2002). Sequence of sptPALM where acquired (30 s at 50 Hz) in between α -actinin-GFP images to visualize LM displacements. We reconstructed and analyzed thousands of mEOS2-fused proteins trajectories, sorted between the LM tip and the region outside of the LM (Fig. 1, see methods). For trajectories lasting more than 260 ms (> 13 points), we computed the mean squared displacement (MSD), which describes the diffusion properties of a molecule. We sorted trajectories according to their diffusion modes (immobile, confined, free-diffusive; Fig. 1) and extracted their diffusion coefficients (D) (Fig. 1, see methods) (Chazeau et al., 2014; Rossier et al., 2012). Within the spatial resolution of our experiments (~ 59 nm), all molecules with a D inferior to $0.011 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ are classified as immobile.

To characterize the diffusive behavior of a control protein anchored to the inner leaflet of the plasma membrane we used mEOS2-CAAX, which displayed fast free diffusion and low fraction of immobilization both at the LM tip ($64 \pm 2 \%$; $D_{\text{diff}} = 0.678 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) and at the membrane outside the LM ($66 \pm 1 \%$; $D_{\text{diff}} = 0.721 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) (Fig. 1C, D-F, Supplementary Table S1). From sptPALM sequences we generated single-molecule-based super-resolution intensity images (Betzig et al., 2006; Shroff et al., 2008), showing no selective immobilizations of mEOS2-CAAX at the LM tip (Fig. 1C). Nucleation events driven by the WAVE complex are localized at the plasma membrane of the LM tip (Innocenti et al., 2004; Miki et al., 2000; Steffen et al., 2004). The WAVE complex is stable and composed of five subunits: Wave2, Abi1, Nap1, Brick and Sra (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004). We used mEOS2-Abi1 to determine the diffusive behavior of the WAVE complex. mEOS2-Abi1 displayed a large fraction of membrane diffusion, as demonstrated by the predominant fraction of free diffusion outside the LM tip (1A, D-F, Supplementary Table S1). The fraction of immobilization increased at the LM tip (tip: $58 \pm 2 \%$; outside: $44 \pm 2 \%$) with the loss of membrane diffusion (tip: $22 \pm 2 \%$; outside: $34 \pm 2 \%$). Those immobilization zones corresponded to locations where repetitive mEOS2 fluorescence signals were detected and visualized in super-resolution intensity images (Fig. 1A). Thus our results suggest that the WAVE complex is recruited to the LM tip by a diffusion trapping mechanism, in line with a previous study using SPT in *Xenopus* tissue culture (XTC) cells (Millius et al., 2012). Those selective immobilizations are not mediated by protein crowding or membrane

curvature, since the diffusive behavior of mEOS2-CAAX is identical inside and outside the LM tip, but probably reflect specific interactions with proteins at the LM tip. We next examined the behavior of a I-BAR domain protein, IRSp53, which drives negative membrane curvature (Scita et al., 2008) and has been involved in Rac signaling to WAVE (Connolly et al., 2005; Miki et al., 2000; Nakagawa et al., 2003; Suetsugu et al., 2006). The diffusive behavior of mEOS2-IRSp53 is similar to mEOS2-Abi1, exhibiting membrane free-diffusion out of the LM and specific immobilization at the LM tip (Fig. 1B, D-F, Supplementary Table S1). Thus like WAVE, IRSp53 is recruited at the LM tip by a diffusion-trapping mechanism.

Rac1 immobilization at the lamellipodium tip is correlated to its activation state.

Many studies demonstrated that the WAVE complex is a critical downstream target of Rac1 triggering cell edge protrusion (Ridley et al., 1992; Steffen et al., 2013; Wu et al., 2009). To test if selective immobilizations of the WAVE complex were triggered by interactions with Rac1 bound to the LM tip we performed sptPALM acquisition on Rac1 wild type (WT). The molecular dynamics of mEOS2-Rac1-WT was largely dominated by membrane free-diffusion at the LM tip and at the membrane outside the LM (tip: 58 ± 2 %; outside: 62 ± 1 %) (Fig. 2A, D-F, Supplementary Table S1). Although the fraction of free-diffusion was only slightly decreased at the LM tip compared to CAAX-mEOS2 (Rac1: 62 ± 1 %; CAAX: 66 ± 1 %) (Fig. 2E), the mean coefficient of free-diffusion (D_{diff}) was significantly decreased (Rac1: $D_{diff} = 0.482 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; CAAX: $D_{diff} = 0.678 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 2F), suggesting that Rac1 transiently interacts with biomolecules at the LM tip slowing down its movements. These results demonstrated that Rac1 is not responsible for the selective immobilization of WAVE at the LM tip.

A correlation between Rac1 activation and its immobilization was demonstrated in adhesive structures including focal adhesion and dendritic spines (Chazeau et al., 2014; Shibata et al., 2013). To determine whether Rac1 activation state controls its localization and diffusive behavior in the LM, we performed sptPALM experiments on well characterized Rac1 mutants. The constitutively active Rac1 mutant (Rac1-Q61L) is locked in its GTP-bound state which is the conformation binding and activating Rac1 targets. Strikingly, super-resolution intensity images demonstrated the selective immobilization of mEOS2-Rac1-Q61L at the LM tip (Fig. 2B, D-F). Distributions of D were shifted towards slower diffusion (tip: $D_{diff} = 0.401 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; outside: $D_{diff} = 0.483 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$), fractions of immobilization were increased (tip: 29 ± 3 %; outside: 20 ± 2 %), but did not reached the level of immobilization measured for the WAVE complex (tip: 58 ± 2 %; outside: 44 ± 2 %). These results suggested that Rac1-Q61L immobilization at the LM tip are transient events and could explain why classical fluorescence microscopy could not reveal enrichment of active Rac1 at the LM tip (Del Pozo et al., 2002). In agreement with increased interactions of Rac1-WT with its targets, D_{diff} are also significantly decreased at the LM tip (tip: $D_{diff} = 0.482 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; outside: $D_{diff} = 0.511 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 2F). Interestingly, mEOS2-Rac1-F28L fast cycling mutant, which rapidly switches between activated (GTP-bound) and inactivated (GDP-bound) states, exhibited fraction of immobilization and diffusive behavior (D_{diff}) closer to mEOS2-Rac1-WT than to mEOS2-Rac1-Q61L (Fig. 2E-F, Supplementary Fig. S1), indicating that Rac1-WT is either rarely active or also cycles rapidly between activation and inactivation via the action of GAPs and GEFs (Cherfils and Zeghouf, 2013). The constitutively inactive Rac1 mutant (Rac1-T17N) is locked in its GDP-bound state which is the inactive conformation unable to bind and activate targets. Like the mEOS2-CAAX membrane control, mEOS2-Rac1-T17N is dominated by fast free-diffusion and does not display selective immobilization at the LM tip or

decreased D_{diff} (tip: $D_{diff} = 0.797 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; outside: $D_{diff} = 0.786 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) such as WT and active mutants of Rac1 (Fig. 2C, D-F). Our results demonstrated a correlation between Rac1 activation and its selective immobilization at the LM tip where the WAVE complex, its main target driving Arp2/3 complex activation and membrane protrusion, is located.

RhoA does not display selective immobilization at the lamellipodium tip

FRET-based sensors were used to study the spatiotemporal pattern of Rho GTPases (Rac1, RhoA, cdc42) activation in the LM (Machacek et al., 2009; Pertz et al., 2006; Del Pozo et al., 2002), in conjunction with periods of LM protrusions and retractions (Machacek et al., 2009). The latter study showed that Rac1 activation is strongest at the back of the LM and that maximal Rac1 activation is not synchronized with the onset of LM protrusion. Instead, RhoA strongest activation was localized in a $x \mu\text{m}$ region encompassing the LM tip (Pertz et al., 2006), and the activation pic was correlated with the onset of LM protrusion (Machacek et al., 2009). To investigate if RhoA was selectively immobilized at the LM tip we performed sptPALM experiments using mEOS2-RhoA-WT. Like Rac1-WT, RhoA-WT dynamic behavior was dominated by membrane free diffusion (tip: $58 \pm 4 \%$; outside: $59 \pm 3 \%$) (Fig. 3A, D-F, Supplementary Table S1). The fraction of immobilization at the LM tip and outside the LM were not significantly different (tip: $16 \pm 3 \%$; outside: $16 \pm 3 \%$) (Fig. 3E).

Next we tested, if like Rac1, the activation state of RhoA was correlated with its selective immobilization in distinct regions of the LM. We applied the same strategy, using constitutively active (RhoA-Q63L) and inactive (RhoA-G17A) RhoA. Alone, mEOS2-RhoA-Q63L transfection enhances cell contractility and inhibits cell spreading. So to stimulate lamellipodium formation the cells were co-transfected with Cerulean-Rac1-Q61L. On the contrary to Rac1-Q61L, active mEOS2-RhoA-Q63L did not display selective immobilization (tip: $22 \pm 3 \%$; outside: $27 \pm 4 \%$) or decreased free diffusion at the LM tip compared to outside the LM (tip: $D_{diff} = 0.279 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; outside: $D_{diff} = 0.309 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) (Fig. 3B, D-F). This lack of selective immobilization of active RhoA at the LM tip was further reinforced by results obtained with inactive mEOS2-RhoA-G17A which displayed the same behavior as active RhoA-Q63L (Fig. 3C, D-F). The immobilization fractions of active and inactive RhoA were comparable to RhoA-WT (Fig. 3 D-F, Supplementary Table S1). Even though, active and inactive RhoA mutants displayed slower free diffusion both at the LM tip and outside (Fig. E,F), which suggested that they may interact more with GAPs or GEFs (Cherfils and Zeghouf, 2013). Thus, in sharp contrast with Rac1, the activation state of RhoA does not dictate its immobilization at the LM tip or outside the LM.

Rac1 display fast cycles of activation and inactivation close to the lamellipodium tip

The small fraction of WT Rac1 immobilization at the LM tip compared to activated Rac1-Q61L indicated either that Rac1 activations are sporadic events or that the dwell time of interactions between activated Rac1 and WAVE are shorter than the acquisition frequency. To differentiate those two possibilities, we increased the acquisition frequency of sptPALM experiments to capture more efficiently transient Rac1-WT immobilization. We switched from 50 Hz acquisition frequency using EMCCD to 333 Hz using sCMOS camera (Huang et al., 2013). The strong correlation between Rac1 activation and its selective immobilization at the LM tip was still observed at 333 Hz (Fig. 4, Supplementary Table S1). Moreover, increasing the acquisition frequency enhanced the differential

between WT and active Rac1 mutants (Rac1-Q61L and Rac1-F28L) (Fig. 4, Supplementary Fig. S2). Although, we could observe seldom diffusion-trapping events of Rac1-WT at the LM tip, this frequency was not sufficient to readily acquire the majority of Rac1-WT immobilizations that were transient, suggesting that Rac1 interactions with the WAVE complex are lasting less than 10 ms.

To definitely prove the passing nature of those interactions, we forced Rac1-WT activation independently from the use of constitutively active mutants. We combined optogenetic activation of Rac1-WT with simultaneous tracking of Rac1-WT (Fig. 5). The light induce interaction of the Cryptochrome CRY2 to its membrane-anchored CIBN partner, was used to control spatially and temporally the membrane recruitment of cytosolic Rho GTPases GEFs (Valon et al., 2015). We applied the same strategy for Tiam1, a Rac1 GEF which also interacts with IRSp53 to promote WAVE activation (Connolly et al., 2005). We used an optogenetic system composed of CIBN-GFP-CAAX localized at the cell membrane and CRY2PHR-Tiam-iRFP (Tiam-CRY2) which is initially cytoplasmic (Fig. 5A). Sequence of mEOS2-Rac1-WT sptPALM (30 s, 50 Hz)(Fig. 5D) were acquired in between blue light illumination of active LM to trigger membrane recruitment of Tiam1 (Fig. 5B,C) and ensuing Rac1-WT activation. Membrane re-localization of Tiam-CRY2-iRFP, immediately increased the speed of membrane protrusion (Fig. 5C), accounting for the local enhanced activation of Rac1-WT. Nevertheless, diffusive properties of Rac1-WT inside and outside the region of optogenetic activation were identical (Fig. 5D-G). This was true wherever these regions were encompassing the LM tip or at the back of the LM. Altogether, these results suggested that Rac1 activation events, which are associated with Rac1 immobilizations, are transient and local events.

Discussion

Combining SPT with loss- or gain-of-function of Rho GTPases mutants, we linked the nanoscale dynamic localization of Rac1 to its activation and site of action within the LM. We showed that Rac1 effector WAVE and regulator IRSp53 accumulate at the LM tip by membrane free-diffusion and trapping. We demonstrated a strong correlation between Rac1 activation state and its immobilization at the LM tip. In contrast, RhoA activation state is not correlated with increased immobilizations within specific regions of the LM. Those results suggest that Rac1 action during LM formation occur primarily at the LM tip. Despite direct interactions with WAVE and IRSp53 (Suetsugu et al., 2006), Rac1-WT only displays a decreased diffusion at the LM tip, suggesting fast and local activation/inactivation cycles. Indeed, coupling sptPALM with optogenetic activation of Rac1, triggered by Tiam1 membrane recruitment, demonstrates that Rac1-WT diffusive properties are unchanged despite enhanced LM protrusion. Taken together, our results support a model where Rac1 is rapidly switching between activation and inhibition at the proximity of its targets, ensuring a local and fast control over Rac1 actions.

The site of Rac1 activation could differ from its site of action.

The tight spatiotemporal regulation of actin regulatory proteins give rise to complex periodic patterns of LM protrusions and retractions (Giannone et al., 2004; Ponti et al., 2004). In the signaling model, based on measurements of signaling protein activities, the formation of those periodic patterns result from complex interplay between signaling events (Machacek et al., 2009; Tkachenko et al., 2011). In the mechanical model, based on forces generated by the LM, LM buckling and abrupt spatiotemporal events such as lateral contraction waves, it is the periodic regeneration of the LM itself that creates at precise mechanical clock driving periodic contractions (Dobereiner et al., 2006; Giannone et al., 2004, 2007; Wolfenson et al., 2016). The use of Rho GTPases FRET sensors timed on periods of cell edge protrusions and retractions, enabled to correlate their signaling activities with the start or end of cell edge movements. Using this strategy, the zone of maximal Rac1 activation was located at the LM back and found to climax un-synchronously with the onset of edge protrusion (Machacek et al., 2009). On the contrary, the zone of RhoA activation was closer to the cell edge and synchronized with the onset of protrusion (Danuser, 2009; Pertz et al., 2006). These results suggest that RhoA, potential via formins (mDia2) (Campellone and Welch, 2010; Yang et al., 2007) could trigger LM formation, while Rac1 is not the primary signal triggering edge protrusion but could be involved in the stabilization of newly expanded protrusions.

Nevertheless, activation of a protein is not the substitute for its localization of action. Signaling events are also meant to propagate within a cell, enabling a local signal to have long range consequences. In addition, these conclusions were based on conventional fluorescence microscopy heat maps of Rho GTPases activation that could be distinct from their locations of action. In fact, the Rac1 area of activation, though not maximal at the LM tip, is still elevated at this location and could trigger WAVE activation (Machacek et al., 2009; Del Pozo et al., 2002). The broad area of RhoA activation encompasses entirely the LM (Machacek et al., 2009; Pertz et al., 2006), thus it is still difficult to conclude on whether RhoA is acting at the LM tip or back. In agreement with a crucial role of Rac1 during cell edge protrusion, PDGF-evoked fast membrane protrusions are associated with shut down of RhoA activity at the cell periphery, while Rac1 activity concentrates at the cell periphery (Martin et al., 2016).

Correlation between Rac1 activation and immobilization

All proteins are part of interaction hubs, implying that their functions depend on binding events with member of this hub. Thus, interactions should translate into changes in their molecular dynamics. This assumption is valid both for structural and signaling proteins, but of course changes are more drastic for structural proteins often involved in stable binding to slow or immobile macromolecular complexes. Using sptPALM we demonstrated that integrin activation events are correlated with their immobilization triggered by interactions with intracellular activators or/and extracellular ligands (Paszek et al., 2014; Rossier et al.). However, in the case of signaling proteins the corollary could be more difficult to prove experimentally, especially if the interactions occur at time-scales well below the temporal resolution or if the binding pair moves with the behavior of the individual proteins (Wilmes et al., 2015). This is particularly relevant for Rho GTPases that are enrolled in complex signaling networks composed of myriads of GEFs, GAPs, regulators and effectors (Cherfils and Zeghouf, 2013). The use of loss- or gain-of-function mutants could prolong the interaction times with effectors or regulators above the temporal resolution, enabling to capture more easily binding events associated with protein function. Using this strategy, previous studies demonstrated that Rac1 activation is correlated with immobilization in integrin-dependent focal adhesions (Shibata et al., 2013) or neuronal dendritic spines (Chazeau et al., 2014). Using conventional fluorescence microscopy, constitutively active V12-Rac1 GFP fusion proteins displayed a homogeneous distribution without clear specific localization within the LM (Del Pozo et al., 2002). SPT and super-resolution microscopy enabled us to demonstrate that active Rac1 is specifically immobilized at the LM tip, like the WAVE complex and IRSp53. Thus, the use of SPT to measure the nanoscale molecular dynamics of proteins could reveal the sites of action of proteins, despite the lack of visible protein accumulations when conventional fluorescence microscopy is used. Despite the potential role of RhoA in triggering the onset of membrane protrusions (Machacek et al., 2009) through formin-dependent F-actin nucleation and elongation (Campellone and Welch, 2010; Gupton et al., 2007), no specific immobilization zones were detected in the LM. Integrins could induce local Rac activation and binding with its effectors by directing Rac membrane recruitment through dissociation from Rho-GDI (del Pozo et al., 2000; Del Pozo et al., 2002). In addition, Rac1-WT and constitutively active Rac1 are immobilized specifically in mature adhesive structures (Shibata et al., 2013). Thus, active Rac1 recruitment at the LM tip could be mediated by recruitment to early adhesive structures in the LM. Nevertheless, early adhesive structures are not initiated exactly at the LM tip, but ~400 nm back from it (Giannone et al., 2007). In addition, early adhesion sites do not form a continuous thin rim (Giannone et al., 2007; Kiosses et al., 2001) as observed for active Rac1 using super-resolution imaging (Fig. 2, 4). Thus, active Rac1 probably interacts with protein of the LM tip such as WAVE, IRSp53 or Tiam-1 (Chen et al., 2010; Connolly et al., 2005; Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006).

Long range or short range of Rac1 action

The efficiency of Rac1 action on its targets after activation, i.e. GTP loading, is timed by the rate of GTP hydrolysis, but also by the relative distance between sites of Rac1 activation and the location of these targets. This implies that the rate of Rac1 diffusion in the cytosol or at the plasma membrane is a crucial parameter in defining the radius of Rac1 action. A recent study using SPT showed that Rac1 membrane recruitment precede GTP loading (Das et al., 2015). This first step is regulated by Rho GDI which sequesters Rho GTPases in the cytosol by shedding prenylated and palmitoylated CAAX tails from the membrane (Navarro-Lérida et al., 2012). This suggests that membrane diffusion

might be the last event before Rac1 reaches its target and not its cytosolic diffusion. Our study demonstrated that the activation state of Rac1 will determine its diffusive properties at the LM tip, but also at the plasma membrane outside the LM. Thus the spatial control of Rac1 signaling will be determined by its level of activation.

The WAVE complex could be activated at the LM back and then diffuse at the tip to activate the Arp2/3 complex. This model would be consistent with an elevated Rac1 activation at the LM back (Machacek et al., 2009). Nevertheless, this premature release of the VCA domain would be counterproductive since it could induce binding of the WAVE complex to Arp2/3 already incorporated in the flowing branched actin network (Siton et al., 2011; Smith et al., 2013) or uncontrolled activation of Arp2/3 away from the protrusion front, leading to unproductive F-actin elongation events. This model is also inconsistent with the predominant immobilizations of WAVE at the LM tip. Thus, Rac1 is probably meeting WAVE at the LM tip.

WAVE activation at the LM tip could be triggered by Rac1 activated at the back of the LM, or locale Rac1 activation at the LM tip. In the long range model, Rac1 activation is remote from its location of action, thus activated GTP-bound Rac1 must travel microns to reach its target. Since the distance to cross the LM is around 2 μm and the mean free-diffusion of Rac1-Q61L is $0.2 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, Rac1-WT must remain active for few seconds to enable half of the activated Rac1 to reach the LM tip, well above our acquisition frequency (50-333 Hz). If this was the case we should have observed, for Rac1-WT, increased fraction of immobilization and shift towards lower values of D_{diff} , as observed for Rac1-Q61L. Instead, all our results are supporting the short range model, where fast Rac1 activation/inactivation cycles occur at its location of action the LM tip. First, the diffusive behavior of Rac1-WT is similar to the fast cycling mutant Rac1-F28L. Second, forcing Rac1-WT activation using optogenetic activation at the LM tip did not increase the fraction of immobilization or decrease the D_{diff} towards the levels reached by constitutively active Rac1-Q61L. In this model, the spatial control could be mediated by the specific localization of Rac1 GEFs close to the localization of targets at the LM tip, like suggested for Tiam1 (Connolly et al., 2005).

Materials and Methods

Cell culture and spreading Assays

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were cultured in DMEM (Gibco and Eurobio) with 10% FBS. Transient transfections of plasmids were performed 2 days before experiments using Amaxa nucleoporator (Lonza). The cells were detached with trypsin/EDTA (0.05% for 2 min), the trypsin was inactivated using soybean trypsin inhibitor (1 mg/ml in DMEM), and the cells were washed and suspended in serum-free Ringer, and incubated for 30 min before spreading on human FN (Roche)-coated glass surface (FN 10 μ g/ml)(Giannone et al., 2004, 2007).

DNA constructs

mEOS2-Abi1, mEOS2-CAAX, mEOS2-Rac1, mEOS2-Rac1-Q61L, mEOS2-Rac1-T17N, mEOS2-VASP were generated by PCR of the Coding DNA sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAm-FRT-PC-mESO2 blue at the Fse1/Asc1 site. GFP-Abi1 was generated by PCR of the coding DNA sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAm-FRT-PC-GFP blue at the Fse1/Asc1 site. Cerulean-Rac1-Q61L was generated by PCR of Rac1-Q61L, which was inserted in pEGFP-C1 (Clontech) at the BglII/Kpn1 sites, then GFP was replaced by cerulean at NheI/BglII sites. Actin-mEOS2 construct was generated as described before (Rossier et al, 2012). The fidelity of all constructs was verified by sequencing.

SptPALM acquisitions

Cells were imaged at 37°C in a Ludin chamber (Life Imaging Services) with an inverted motorized microscope (Nikon Ti) equipped with a CFI Apo TIRF 100x oil, NA 1.49 objective and a perfect focus system, allowing long acquisition in TIRF illumination mode. For photoactivation localization microscopy, cells expressing mEOS2 tagged constructs were photoactivated using a 405 nm laser (Omicron) and the resulting photoconverted single molecule fluorescence was excited with a 561 nm laser (Cobolt Jive™). Both lasers illuminated the sample simultaneously. Their respective power was adjusted to keep the number of the stochastically activated molecules constant and well separated during the acquisition. Fluorescence was collected by the combination of a dichroic and emission filters (D101-R561 and F39-617 respectively, Chroma) and a sensitive EMCCD (electron-multiplying charge-coupled device, Evolve, Photometric) for 50 Hz acquisitions or an sCMOS (Orca Flash4, Hamamatsu) for 333 Hz acquisitions. The acquisition was steered by Metamorph software (Molecular Devices) in streaming mode. α -actinin-GFP was imaged using a conventional GFP filter cube (ET470/40, T495LPXR, ET525/50, Chroma). Using this filter cube does not allow to separate spectrally the unconverted pool of mEOS2 from the GFP fluorescent signal. However, with all the constructs used, whether the mEOS2 signal was highly or poorly enriched in LM, we were still able to detect LMs with α -actinin-GFP.

Single molecule segmentation and tracking

A typical sptPALM experiment leads to a set of 7500 images per cell analysed in order to extract molecule localization and dynamics. Single molecule fluorescent spots were localized and tracked over time using a combination of wavelet segmentation and simulated annealing algorithms (Izeddin et al., 2012; Racine et al., 2006, 2007). Under the experimental conditions described above, the

resolution of the system was quantified to 59 nm (50 Hz, EMCCD), 49 nm (333 Hz, sCMOS) (Full Width at Half Maximum, FWHM). This spatial resolution depends on the image signal to noise ratio and the segmentation algorithm (Cheezum et al., 2001) and was determined using fixed mEOS2 samples. We analysed 2D distributions of single molecule positions belonging to long trajectories (>50 frames) by bi-dimensional Gaussian fitting, the resolution being determined as $2.3s_{xy}$, where s_{xy} is the pointing accuracy.

For the trajectory analysis, LM tip were identified by thresholding the fluorescence signal of α -actinin-GFP images acquired in between sptPALM sequences (1500 images). The cell edge for each α -actinin-GFP images were detected, and expanded by 3 pixels (480 nm) in and out of the cell to enclose the LM tip. This allowed to keep the protruding LM tip in the region of interests during sptPAM sequences. The region outside the LM was defined as the region 25 pixels (4 μ m) inward from the LM tip. The corresponding binary masks were used to sort single particle data analyses to specific regions, LM tip, outside the LM. We analyzed trajectories lasting at least 13 points (≥ 260 ms, 50 Hz ; ≥ 39 ms, 333 Hz) with a custom routine written for Matlab using the mean squared displacement MSD computed as (Eq. 1):

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

where x_i and y_i are the coordinates of the label position at time $i \cdot \Delta t$. We defined the measured diffusion coefficient D as the slope of the affine regression line fitted to the $n = 1$ to 4 values of the $MSD(n \cdot \Delta t)$. The MSD was computed then fitted on a duration equal to 80% (minimum of 10 points, 200 ms (50 Hz), 30 ms (333 Hz)) of the whole stretch by (Eq 2):

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

where r_{conf} is the measured confinement radius and τ the time constant ($\tau = r_{conf}^2/3D_{conf}$). To reduce the inaccuracy of the MSD fit due to down sampling for larger time intervals, we used a weighted fit. Trajectories were sorted in 3 groups: immobile, confined diffusion and free-diffusion. Immobile trajectories were defined as trajectories with $D < 0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (50 Hz), $D < 0.052 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (333 Hz), corresponding to molecules which explored an area inferior to the one defined by the image spatial resolution $\sim (0.059 \mu\text{m})^2 \sim (0.049 \mu\text{m})^2$ during the time used to fit the initial slope of the MSD (Rossier et al., 2012). For the EMCCD experiments performed at 50 Hz, 4 points, 80 ms: $D_{\text{threshold}} = (0.059 \mu\text{m})^2 / (4 \times 4 \times 0.02 \text{ s}) \sim 0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. For the sCMOS experiments performed at 333 Hz, 4 points, 12 ms: $D_{\text{threshold}} = (0.059 \mu\text{m})^2 / (4 \times 4 \times 0.003 \text{ s}) \sim 0.052 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. To separate trajectories displaying free-diffusion from confined diffusion, we used the time constant τ calculated for each trajectory. Confined and free-diffusing trajectories were defined as trajectories with a time constant τ respectively inferior and superior to half the time interval used to compute the MSD (100 ms (50 Hz); 15 ms (333 Hz)).

Optogenetic activation of Rac1 using Tiam1 membrane recruitment

MEFs were co-transfected with CIBN-GFP-CAAX, CRY2PHR-Tiam-iRFP and mEOS2-Rac1-WT. TIRF images of spreading MEFs were acquired using an azimuthal TIRF module (ilas2; Roper Scientific, Tucson, AZ) and laser power and exposure time were chosen to limit phototoxicity which could stop

cell edge protrusion. To photo-activate CRY2, we used a fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) head (Roper Scientific) to illuminate with a low 488 nm laser power (5–10%) defined regions of interest. After a base line of CRY2PHR-Tiam-iRFP images (5 images at 0.05Hz), we sequentially photo-activated CRY2, imaged CRY2PHR-Tiam-iRFP, and performed sptPALM sequence of mEOS2-Rac1-WT (500 images, 50 Hz). This sequence was repeated for at least x times.

References

- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642–1645.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404, 1007–1011.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* 94, 235–263.
- Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., et al. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* 22, 1005–1012.
- Bravo-Cordero, J.J., Hodgson, L., and Condeelis, J. (2012). Directed cell invasion and migration during metastasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 24, 277–283.
- Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., Linkner, J., Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J* 27, 2943–2954.
- Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 237–251.
- Case, L.B., Baird, M. a., Shtengel, G., Campbell, S.L., Hess, H.F., Davidson, M.W., and Waterman, C.M. (2015). Molecular mechanism of vinculin activation and nanoscale spatial organization in focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 17.
- Chazeau, A., Mehidi, A., Nair, D., Gautier, J.J., Leduc, C., Chamma, I., Kage, F., Kechkar, A., Thoumine, O., Rottner, K., et al. (2014). Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J.* 33, 2745–2764.
- Cheezum, M.K., Walker, W.F., and Guilford, W.H. (2001). Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys J* 81, 2378–2388.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B., Gomez, T.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M., Umetani, J., Billadeau, D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468, 533–538.
- Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 93, 269–309.
- Connolly, B.A., Rice, J., Feig, L.A., and Buchsbaum, R.J. (2005). Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Mol. Cell. Biol.* 25, 4602–4614.
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., and Zhuang, X. (2010). Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron* 68, 843–856.
- Danuser, G. (2009). Testing the lamella hypothesis: the next steps on the agenda. *J. Cell Sci.* 122, 1959–1962.
- Das, S., Yin, T., Yang, Q., Zhang, J., Wu, Y.I., and Yu, J. (2015). Single-molecule tracking of small

GTPase Rac1 uncovers spatial regulation of membrane translocation and mechanism for polarized signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Dobereiner, H.G., Dubin-Thaler, B.J., Hofman, J.M., Xenias, H.S., Sims, T.N., Giannone, G., Dustin, M.L., Wiggins, C.H., Sheetz, M.P., and Döbereiner, H.-G. (2006). Lateral membrane waves constitute a universal dynamic pattern of motile cells. *Phys Rev Lett* *97*, 38102.

Dubin-Thaler, B.J., Giannone, G., Döbereiner, H.-G., Sheetz, M.P., and Dobereiner, H.G. (2004). Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys. J.* *86*, 1794–1806.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V, Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790–793.

Gautreau, A., Ho, H.Y.H.Y., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 4379–4383.

Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* *304*, 743–746.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.-G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* *116*, 431–443.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B., and Rossier, O. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* *128*, 561–575.

Gupton, S.L., Eisenmann, K., Alberts, A.S., and Waterman-Storer, C.M. (2007). mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration. *J Cell Sci* *120*, 3475–3487.

Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690–701.

Hell, S.W. (2007). Far-field optical nanoscopy. *Science* (80-.). *316*, 1153–1158.

Huang, B., Bates, M., and Zhuang, X. (2009). Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem* *78*, 993–1016.

Huang, F., Hartwich, T.M.P., Rivera-Molina, F.E., Lin, Y., Duim, W.C., Long, J.J., Uchil, P.D., Myers, J.R., Baird, M.A., Mothes, W., et al. (2013). Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nat. Methods* *10*, 653–658.

Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E., Di Fiore, P.P., Carlier, M.F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* *6*, 319–327.

Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr. Biol.* *17*, 395–406.

Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, C.G., Kechkar, A., Nair, D., Triller, A., Choquet, D., Dahan, M., and Sibarita, J.B. (2012). Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express* *20*, 2081–2095.

Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* *468*, 580–584.

- Kiosses, W.B., Shattil, S.J., Pampori, N., and Schwartz, M.A. (2001). Rac recruits high-affinity integrin α v β 3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol* 3, 316–320.
- Krause, M., and Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 577–590.
- Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., 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.
- Lebensohn, A.M., and Kirschner, M.W. (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol. Cell* 36, 512–524.
- Lee, K., Gallop, J.L., Rambani, K., and Kirschner, M.W. (2010). Self-assembly of filopodia-like structures on supported lipid bilayers. *Science* 329, 1341–1345.
- 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.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99–103.
- Manley, S., Gillette, J.M., Patterson, G.H., Shroff, H., Hess, H.F., Betzig, E., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* 5, 155.
- Martin, K., Reimann, A., Fritz, R.D., Ryu, H., Jeon, N.L., and Pertz, O. (2016). Spatio-temporal coordination of RhoA, Rac1 and Cdc42 activation during prototypical edge protrusion and retraction dynamics. *Sci. Rep.* 6, 21901.
- 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.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408, 732–735.
- Millius, A., Watanabe, N., and Weiner, O.D. (2012). Diffusion, capture and recycling of SCAR/WAVE and Arp2/3 complexes observed in cells by single-molecule imaging. *J. Cell Sci.* 125, 1165–1176.
- Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J.V. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* 116, 2577–2583.
- Navarro-Lérida, I., Sánchez-Perales, S., Calvo, M., Rentero, C., Zheng, Y., Enrich, C., and Del Pozo, M.A. (2012). A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *EMBO J.* 31, 534–551.
- Paszek, M.J., DuFort, C.C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J.K., Godula, K., Hudak, J.E., Lakins, J.N., Wijekoon, A.C., Cassereau, L., et al. (2014). The cancer glycocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* 511, 319–325.
- Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069–1072.

- Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326, 1208–1212.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 305, 1782–1786.
- del Pozo, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D., and Schwartz, M.A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J* 19, 2008–2014.
- Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M., and Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 4, 232–239.
- Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C., and Sibarita, J.B. (2006). Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. *IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging* 1020–1023.
- Racine, V., Sachse, M., Salamero, J., Fraissier, V., Trubuil, A., and Sibarita, J.B. (2007). Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells. *J Microsc* 225, 214–228.
- Reymann, A.-C., Boujemaa-Paterski, R., Martiel, J.-L., Guérin, C., Cao, W., Chin, H.F., De La Cruz, E.M., Théry, M., and Blanchoin, L. (2012). Actin network architecture can determine myosin motor activity. *Science* 336, 1310–1314.
- 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, 401–410.
- Rossier, O., and Giannone, G. (2015). The journey of integrins and partners in a complex interactions landscape studied by super-resolution microscopy and single protein tracking. *Exp. Cell Res.*
- Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J.B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Tampe, R., et al. Integrins beta1 and beta3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* 14, 1057–1067.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1, 321–322.
- Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol.* 18, 52–60.
- 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.
- Shibata, A.C.E., Chen, L.H., Nagai, R., Ishidate, F., Chadda, R., Miwa, Y., Naruse, K., Shirai, Y.M., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2013). Rac1 recruitment to the archipelago structure of the focal adhesion through the fluid membrane as revealed by single-molecule analysis. *Cytoskeleton (Hoboken)*. 177, 161–177.
- Shroff, H., Galbraith, C.G., Galbraith, J.A., and Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods* 5, 417–423.
- Siton, O., Ideses, Y., Albeck, S., Unger, T., Bershadsky, A.D., Gov, N.S., and Bernheim-Groswasser, A.

(2011). Cortactin releases the brakes in actin- based motility by enhancing WASP-VCA detachment from Arp2/3 branches. *Curr. Biol.* *21*, 2092–2097.

Smith, B. a, Padrick, S.B., Doolittle, L.K., Daugherty-Clarke, K., Corrêa, I.R., Xu, M.-Q., Goode, B.L., Rosen, M.K., and Gelles, J. (2013). Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *Elife* *2*, e01008.

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*, 749–759.

Steffen, A., Ladwein, M., Dimchev, G. a, Hein, A., Schwenkmezger, L., Arens, S., Ladwein, K.I., Margit Holleboom, J., Schur, F., Victor Small, J., et al. (2013). Rac function is crucial for cell migration but is not required for spreading and focal adhesion formation. *J. Cell Sci.* *126*, 4572–4588.

Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell* *5*, 595–609.

Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol* *173*, 571–585.

Tkachenko, E., Sabouri-Ghomi, M., Pertz, O., Kim, C., Gutierrez, E., Machacek, M., Groisman, A., Danuser, G., and Ginsberg, M.H. (2011). Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol* *13*, 660–667.

Valon, L., Etoc, F., Remorino, A., di Pietro, F., Morin, X., Dahan, M., and Coppey, M. (2015). Predictive Spatiotemporal Manipulation of Signaling Perturbations Using Optogenetics. *Biophys. J.* *109*, 1785–1797.

Wilmes, S., Beutel, O., Li, Z., Francois-Newton, V., Richter, C.P., Janning, D., Kroll, C., Hanhart, P., Hötte, K., You, C., et al. (2015). Receptor dimerization dynamics as a regulatory valve for plasticity of type I interferon signaling. *J. Cell Biol.* *209*, 579–593.

Wilson, C.A., Tsuchida, M.A., Allen, G.M., Barnhart, E.L., Applegate, K.T., Yam, P.T., Ji, L., Keren, K., Danuser, G., and Theriot, J.A. (2010). Myosin II contributes to cell-scale actin network treadmill through network disassembly. *Nature* *465*, 373–377.

Wolfenson, H., Meacci, G., Liu, S., Stachowiak, M.R., Iskratsch, T., Ghassemi, S., Roca-Cusachs, P., O’Shaughnessy, B., Hone, J., and Sheetz, M.P. (2016). Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices. *Nat. Cell Biol.* *18*, 33–42.

Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* *461*, 104–108.

Xu, K., Zhong, G., and Zhuang, X. (2013). Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science* *339*, 452–456.

Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007). Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells. *PLoS Biol.* *5*, e317.

Acknowledgments:

We thank B. Tessier, R. Sterling for technical assistance; M. Garcia, A. Gautreau, M. Lagardère, T. Oré for helpful discussions. C. Poujol, S. Marais (Bordeaux Imaging Center, BIC) for technical help. We acknowledge financial support from the French Ministry of Research and CNRS, ANR grant Integractome (GG), ANR grant FastNano (GG), Ligue Contre le Cancer (AM), Conseil Régional Aquitaine (AM), Fondation pour la Recherche Médicale (GG, AM).

Figure legends

Figure 1.

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Abi1 in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left) (50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-IRSp53. **(C)** Same as A for mEOS2-CAAX. **(D)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Abi1 (orange), mEOS2-ArpC5A (blue), and mEOS-CAAX (gray) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The grey areas including D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(E)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(G)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): Abi1 (13/8,982), IRSp53 (10/11,589) and CAAX (9/29,938), also see Supplementary Table S1. Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t-test for fractions of immobilization (E) or non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test for diffusion coefficient (F). For LM tip and outside the LM, the different conditions were compared (a black line indicates which conditions were compared). For each condition fractions of immobilization (E) and diffusion coefficient (F) at LM tip and outside the LM were compared (P-values were indicated by a colored information). The resulting P-values are indicated as follows: ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 2.

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Rac1-WT in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left) (50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-Rac1-Q61L. **(C)** Same as A for mEOS2-Rac1-T17N. **(D)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Rac1-WT (yellow), mEOS2-Rac1-Q61L (green), mEOS2-Rac1-T17N (red), and mEOS-CAAX (gray) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The grey areas including D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(E)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. mEOS2-Rac1-WT (yellow), mEOS2-Rac1-Q61L (green), mEOS2-Rac1-T17N (red), mEOS2-Rac1-F28L (violet), and mEOS-CAAX (gray). **(G)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): Rac1-WT (9/28,852), Rac1-Q61L (9/23,068), Rac1-T17N (6/23,950), and Rac1-F28L (7/18,406), also see Supplementary Table S1. Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t-test for fractions of immobilization (E) or non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test for diffusion coefficient (F). For LM tip and outside the LM, the different conditions were compared with the respective Rac1-WT condition (a black line indicates which conditions were compared). For each condition fractions of immobilization (E) and diffusion coefficient (F) at LM tip and outside the LM were compared (P-values were indicated by a colored

information). The resulting P-values are indicated as follows: ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 3.

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-RhoA-WT in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left)(50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-RhoA-Q63L. **(C)** Same as A for mEOS2-RhoA-G17A. **(D)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-RhoA-WT (yellow), mEOS2-RhoA-Q63L (green), mEOS2-RhoA-G17A (red), and mEOS-CAAX (gray) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The grey areas including D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(E)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(G)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): RhoA-WT (7/14,817), RhoA-Q63L (10/23,167) and RhoA-G17A (12/34,069) also see Supplementary Table S1. Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t-test for fractions of immobilization (E) or non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test for diffusion coefficient (F). For LM tip and outside the LM, the different conditions were compared with the respective RhoA-WT condition (a black line indicates which conditions were compared). For each condition fractions of immobilization (E) and diffusion coefficient (F) at LM tip and outside the LM were compared (P-values were indicated by a colored information). The resulting P-values are indicated as follows: ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 4.

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Rac1-WT in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left)(333 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-Rac1-Q61L. **(C)** Same as A for mEOS2-Rac1-T17N. **(D)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Rac1-WT (yellow), mEOS2-Rac1-Q61L (green), mEOS2-Rac1-T17N (red), and mEOS-CAAX (gray) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The grey areas including D values inferior to $0.052 \mu\text{m}^2.\text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(E)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. mEOS2-Rac1-WT (yellow), mEOS2-Rac1-Q61L (green), mEOS2-Rac1-T17N (red), mEOS2-Rac1-F28L (violet), and mEOS-CAAX (gray). **(G)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories). CAAX (8/1,943), Rac1-WT (16/9,933), Rac1-Q61L (14/10,059), Rac1-T17N (5/2,147), and Rac1-F28L (11/3,466), also see Supplementary Table S1. Where indicated,

statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t-test for fractions of immobilization (E) or non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test for diffusion coefficient (F). For LM tip and outside the LM, the different conditions were compared with the respective Rac1-WT condition (a black line indicates which conditions were compared). For each condition fractions of immobilization (E) and diffusion coefficient (F) at LM tip and outside the LM were compared (P-values were indicated by a colored information). The resulting P-values are indicated as follows: ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 5.

(A) Schematic description of Rac1 optogenetic activation using CIBN-GFP-CAAX localized at the cell membrane, cytosolic CRY2PHR-Tiam-iRFP (Tiam-CRY2). Local photoactivation using a 488 nm laser induces CRY2PHR-Tiam-iRFP membrane recruitment triggering Rac1 enhanced activation. **(B)** Normalized fold increase of CRY2PHR-Tiam-iRFP fluorescence, acquired in the TIRF mode, in the photo-activated region (blue) or outside (gray). **(C)** TIRF images of CRY2PHR-Tiam-iRFP before photocativation (left), after photoactivation (middle), and of CIBN-GFP-CAAX after phtoactivation (right). **(D)** Super–resolution intensity image obtained from a sptPALM sequence of mEOS2-Rac1-WT in the LM of a spreading MEF after optogenetic membrane recruitment of CRY2PHR-Tiam-iRFP (left)(50 Hz, duration: 10 s). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(E)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Rac1-WT inside (blue) and outside (gray) the photoactivated region of interest. The grey areas including D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. **(F)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations inside (blue) and outside (gray) the photoactivated region of interest. **(G)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories inside (blue) and outside (gray) the photoactivated region of interest were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories).

Supplementary Figure 1

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Rac1-F28L in a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left) (50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(B)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Rac1-F28L (violet), mEOS2-Rac1-WT (yellow), and mEOS-CAAX (gray) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The grey areas including D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories.

Supplementary Figure 2

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Rac1-F28L in a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left) (333 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red) (right). Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-CAAX. **(C)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Rac1-F28L (violet), mEOS2-Rac1-WT (yellow), and mEOS-CAAX (gray) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The grey areas including D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories.

Supplementary Table S1:

	mEOS2-Abi1 ¹		mEOS2-IRSp53 ¹		mEOS2-CAAX ¹	
cells/trajectories	13/8982		10/11589		7/29938	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile LM tip	58 ± 2	< 11	50 ± 3	< 11	8 ± 2	< 11
confined LM tip	20 ± 2	72 ± 4	24 ± 1	73 ± 3	28 ± 2	484 ± 13
diffusive LM tip	22 ± 2	136 ± 6	26 ± 2	172 ± 5	64 ± 2	678 ± 11
immobile outside	44 ± 2	< 11	44 ± 4	< 11	10 ± 1	< 11
confined outside	22 ± 1	72 ± 2	22 ± 1	90 ± 2	24 ± 1	494 ± 5
diffusive outside	34 ± 1	122 ± 2	34 ± 3	170 ± 2	66 ± 1	721 ± 4
r _{conf} tip (nm)	133 ± 3		138 ± 2		317 ± 4	
r _{conf} outside (nm)	137 ± 1		151 ± 1		315 ± 2	

	mEOS2-Rac1-WT ¹		mEOS2-Rac1-Q61L ¹		mEOS2-Rac1-T17N ¹		mEOS2-Rac1- F28L ¹	
cells/trajectories	9/28852		9/23068		6/23950		7/18406	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile LM tip	13 ± 2	< 11	29 ± 3	< 11	5 ± 1	< 11	16 ± 3	< 11
confined LM tip	29 ± 1	336 ± 10	24 ± 2	239 ± 9	28 ± 3	588 ± 15	24 ± 1	344 ± 12
diffusive LM tip	58 ± 2	482 ± 8	48 ± 3	401 ± 7	67 ± 2	797 ± 10	60 ± 3	487 ± 9
immobile outside	13 ± 1	< 11	20 ± 2	< 11	9 ± 1	< 11	14 ± 2	< 11
confined outside	26 ± 1	314 ± 4	22 ± 1	302 ± 5	24 ± 1	544 ± 6	24 ± 1	397 ± 7
diffusive outside	62 ± 1	511 ± 3	58 ± 1	483 ± 4	67 ± 2	786 ± 4	62 ± 2	612 ± 5
r _{conf} tip (nm)	265 ± 4		221 ± 4		345 ± 5		260 ± 5	
r _{conf} outside (nm)	253 ± 2		245 ± 2		327 ± 2		277 ± 2	

	mEOS2-RhoA-WT ¹		mEOS2-RhoA-Q63L ¹		mEOS2-RhoA-G17A ¹	
cells/trajectories	7/14817		10/23167		12/34069	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile LM tip	16 ± 3	< 11	22 ± 3	< 11	22 ± 3	< 11
confined LM tip	26 ± 1	389 ± 19	28 ± 1	190 ± 9	29 ± 1	188 ± 6
diffusive LM tip	58 ± 4	551 ± 15	50 ± 2	279 ± 8	50 ± 2	320 ± 7
immobile outside	16 ± 3	< 11	27 ± 4	< 11	24 ± 2	< 11
confined outside	25 ± 1	325 ± 5	24 ± 1	190 ± 3	26 ± 2	190 ± 2
diffusive outside	59 ± 3	485 ± 4	49 ± 3	309 ± 2	50 ± 1	347 ± 2
r _{conf} tip (nm)	278 ± 7		201 ± 4		207 ± 3	
r _{conf} outside (nm)	252 ± 2		195 ± 1		199 ± 1	

	mEOS2-CAAX ²		mEOS2-Rac1-WT ²		mEOS2-Rac1-Q61L ²		mEOS2-Rac1-T17N ²		mEOS2-Rac1- F28L ²	
cells/trajectories	8/1943		16/9933		14/10059		5/2147		11/3466	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile LM tip	10 ± 1	< 52	16 ± 2	< 52	40 ± 1	< 52	12 ± 5	< 52	24 ± 2	< 52
confined LM tip	28 ± 1	847 ± 48	35 ± 1	623 ± 17	27 ± 1	363 ± 10	30 ± 3	812 ± 31	37 ± 2	448 ± 19
diffusive LM tip	62 ± 1	1 102 ± 43	50 ± 2	964 ± 19	33 ± 1	619 ± 13	58 ± 5	1 149 ± 26	39 ± 3	792 ± 26
immobile outside	8 ± 1	< 52	9 ± 2	< 52	21 ± 1	< 52	13 ± 4	< 52	18 ± 3	< 52
confined outside	36 ± 3	783 ± 26	33 ± 1	695 ± 11	30 ± 1	443 ± 8	30 ± 3	760 ± 26	32 ± 2	502 ± 21
diffusive outside	56 ± 4	1 131 ± 23	58 ± 2	1 006 ± 11	49 ± 1	680 ± 9	57 ± 5	1 047 ± 23	50 ± 3	785 ± 23
r _{conf} tip (nm)	176 ± 4		162 ± 2		124 ± 1		180 ± 3		139 ± 2	
r _{conf} outside (nm)	170 ± 2		165 ± 1		134 ± 1		176 ± 3		145 ± 2	

Values correspond to Mean ± SEM; ¹ sptPALM sequence at 50 Hz ; ² sptPALM sequence at 333 Hz

Figure 1

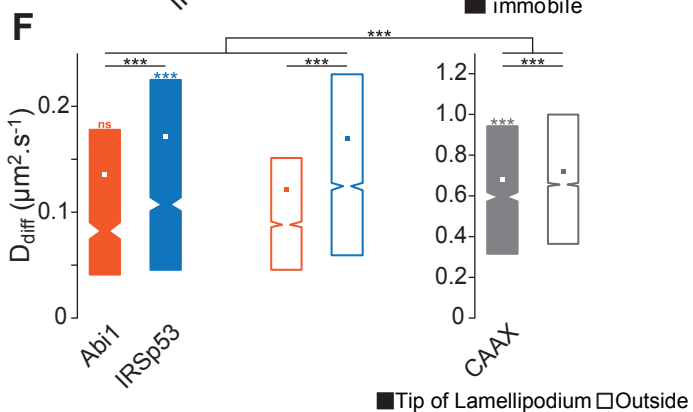
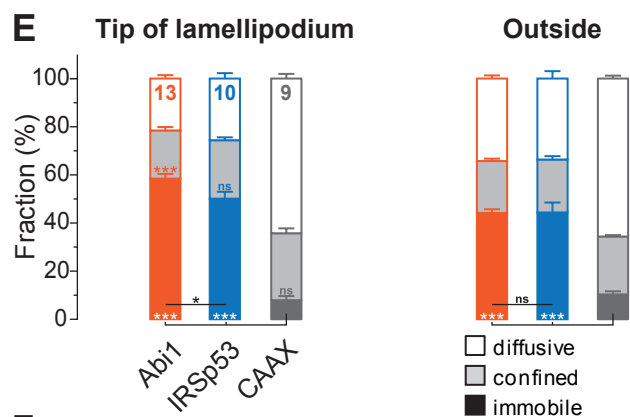
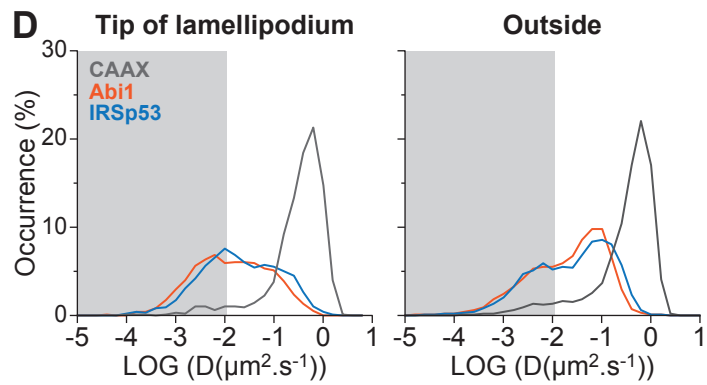
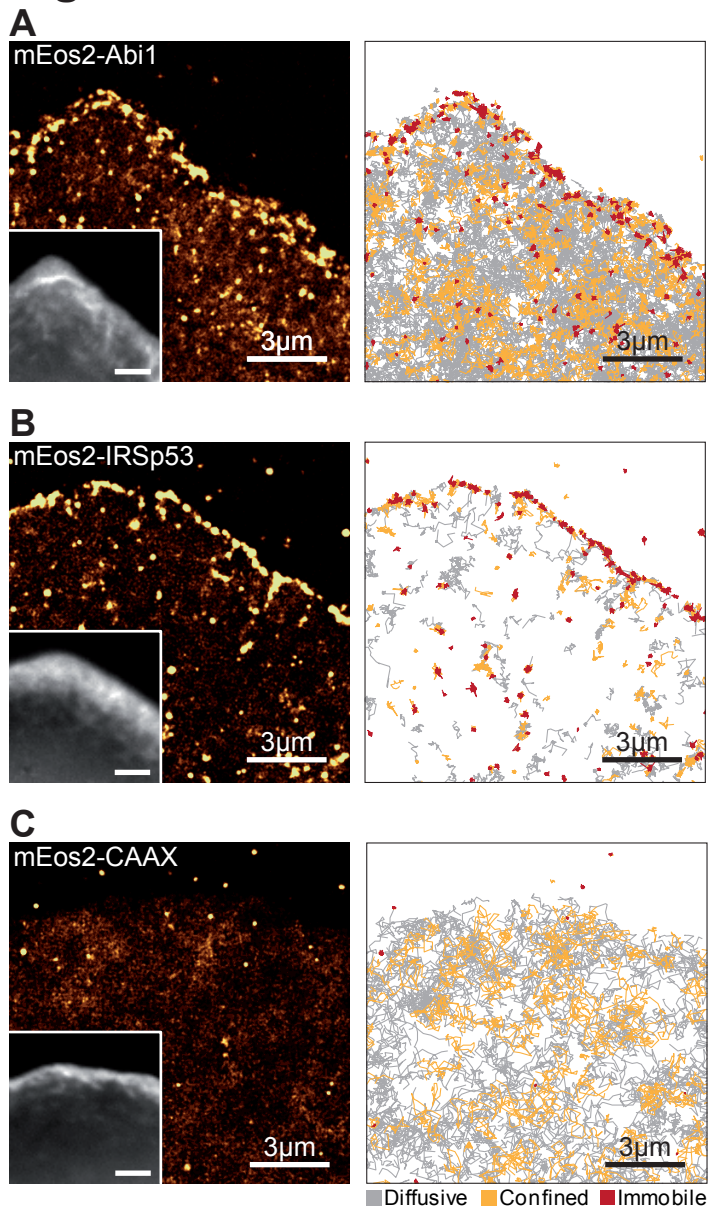


Figure 2

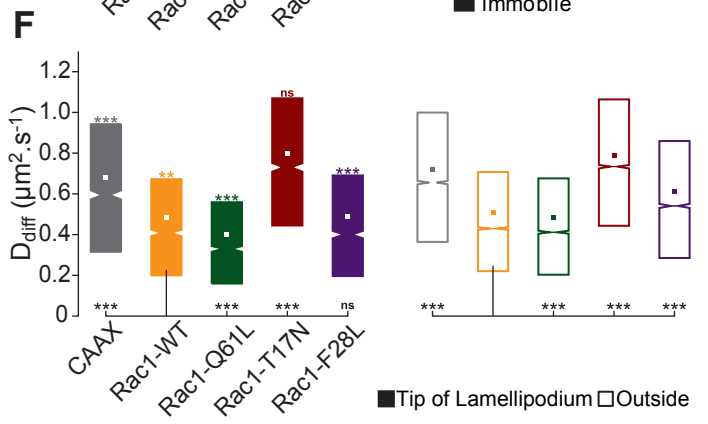
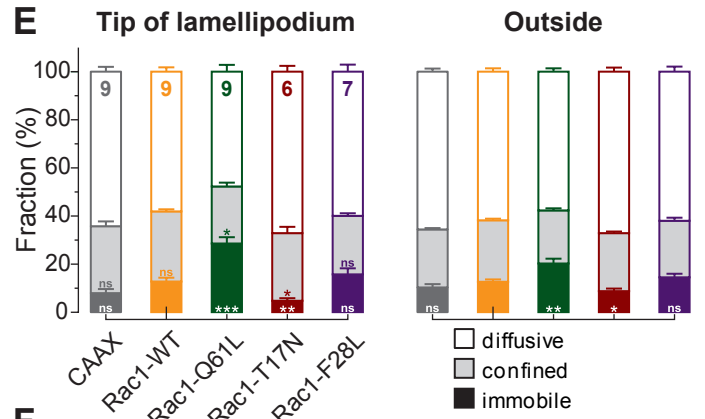
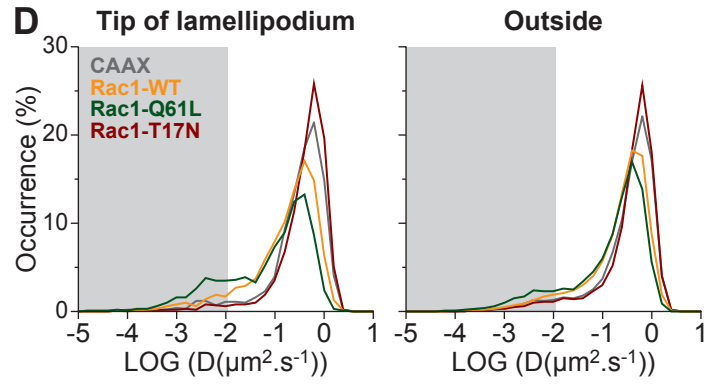
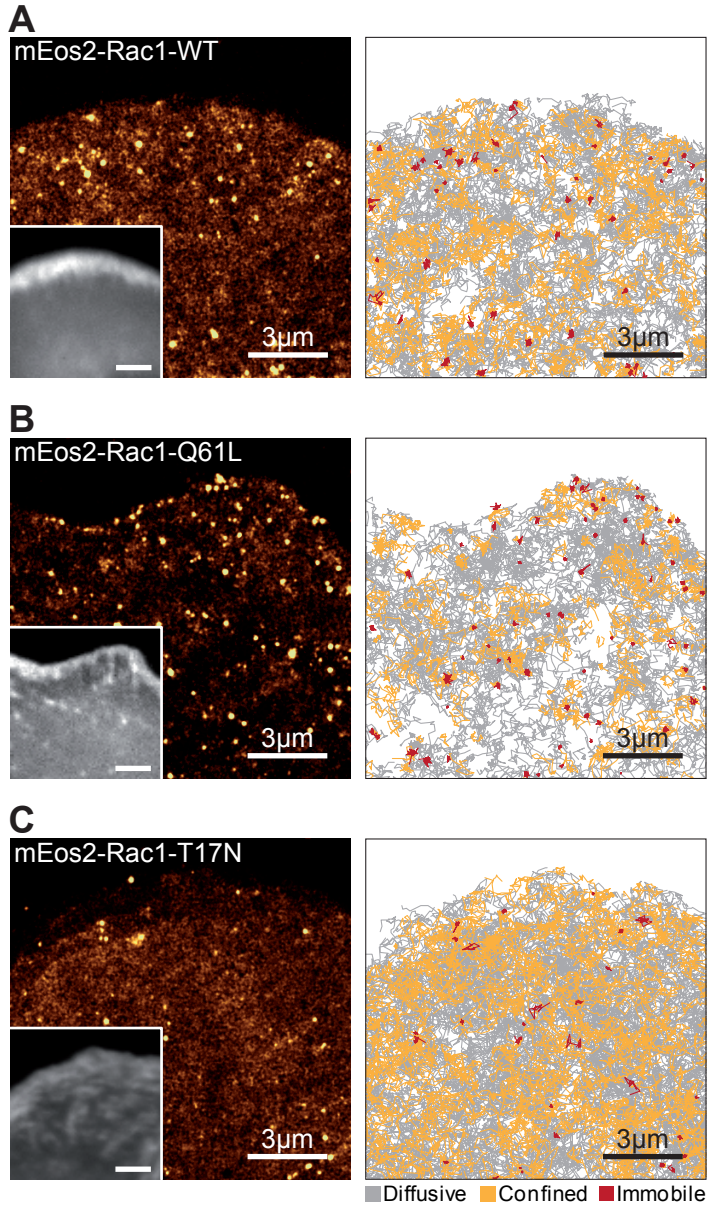


Figure 3

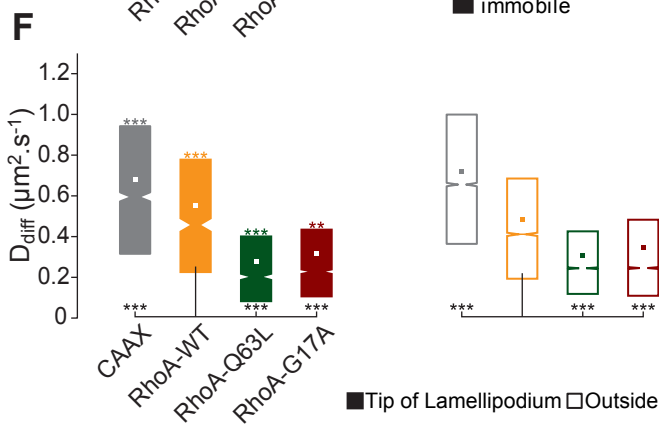
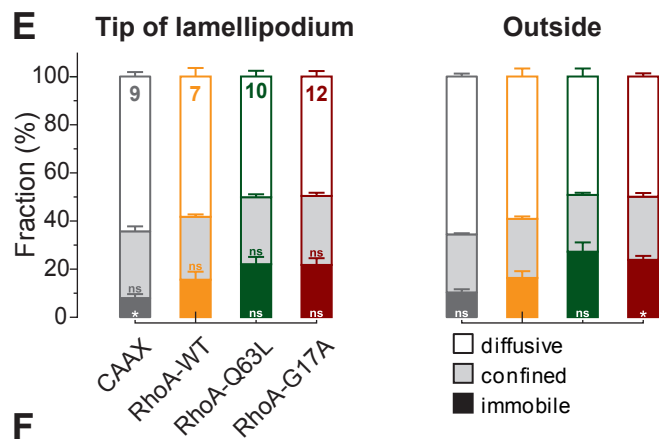
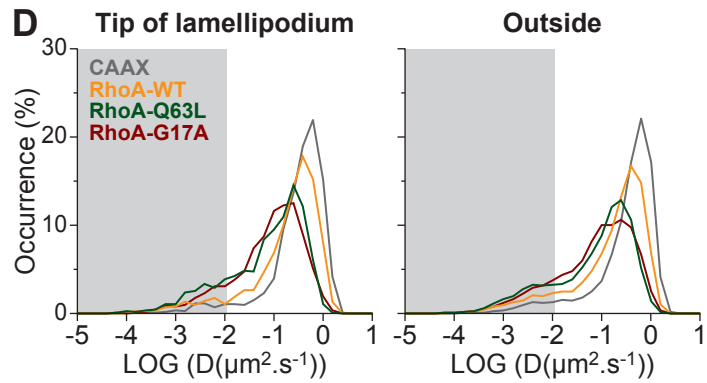
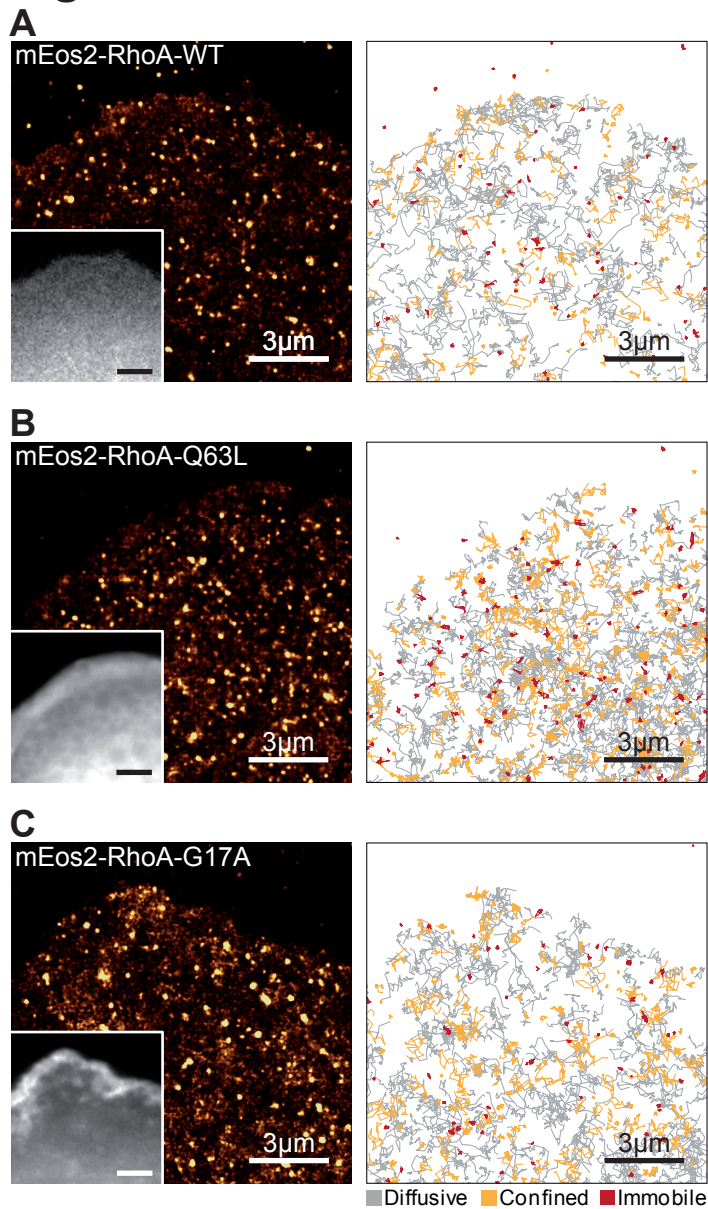


Figure 4

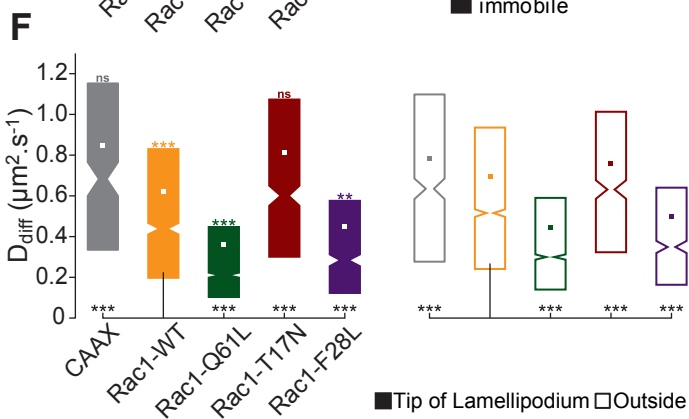
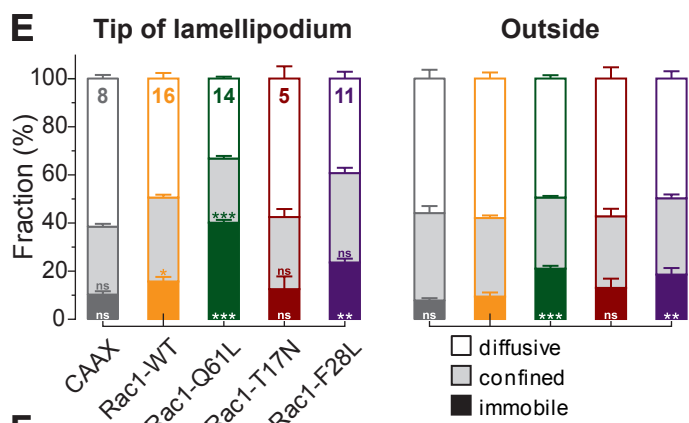
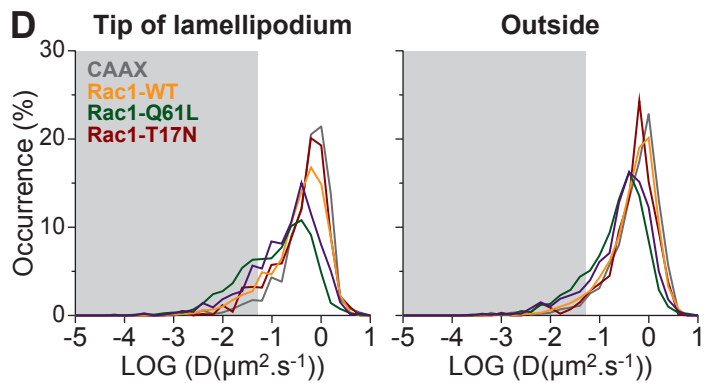
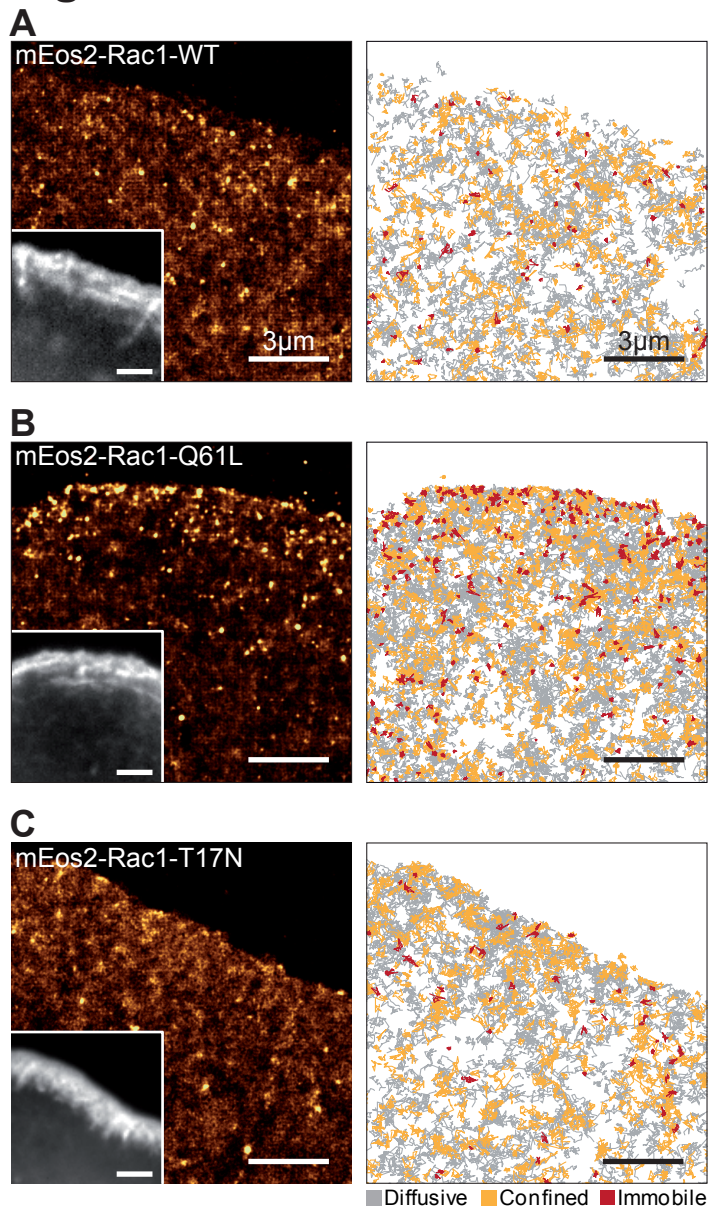
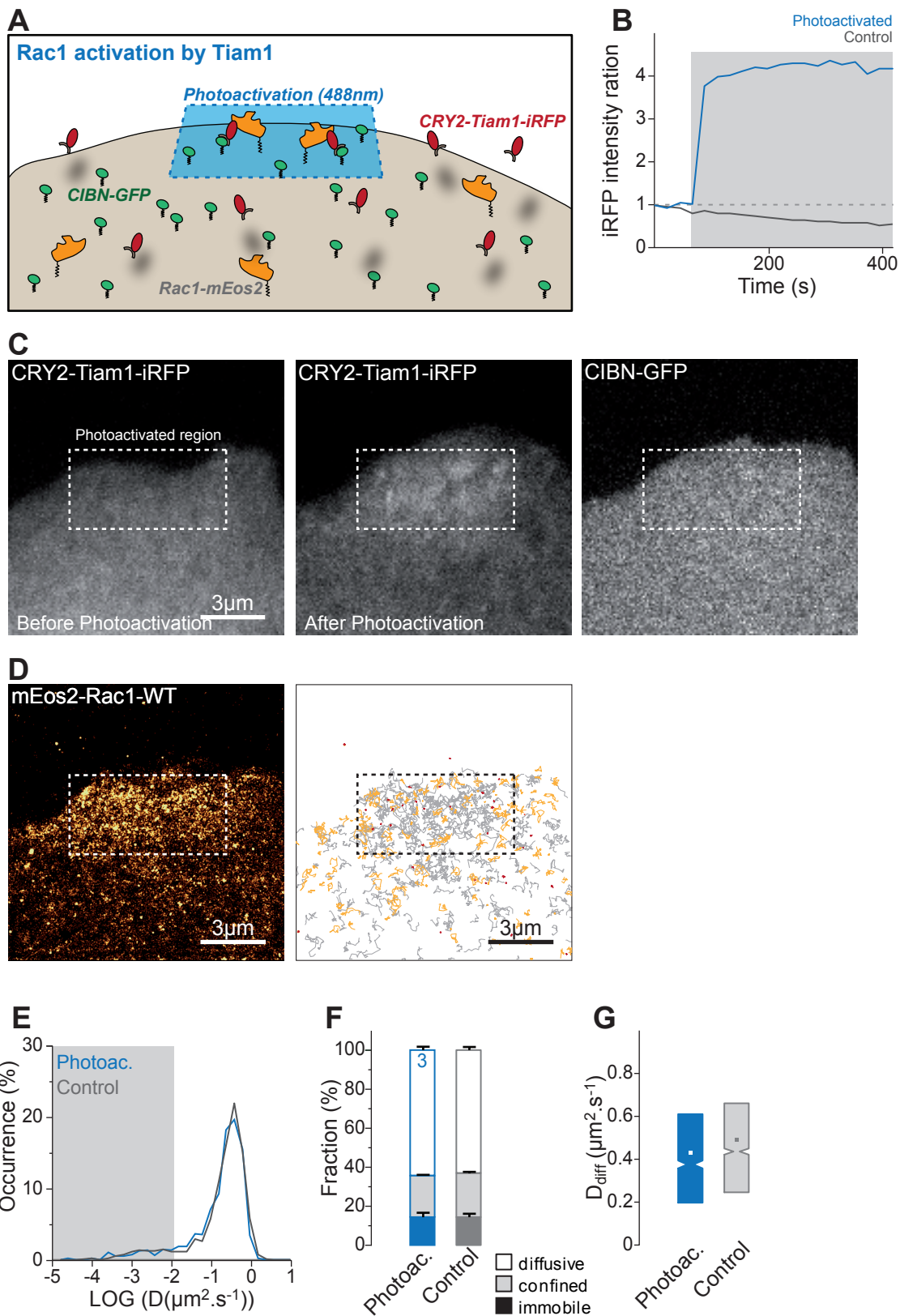
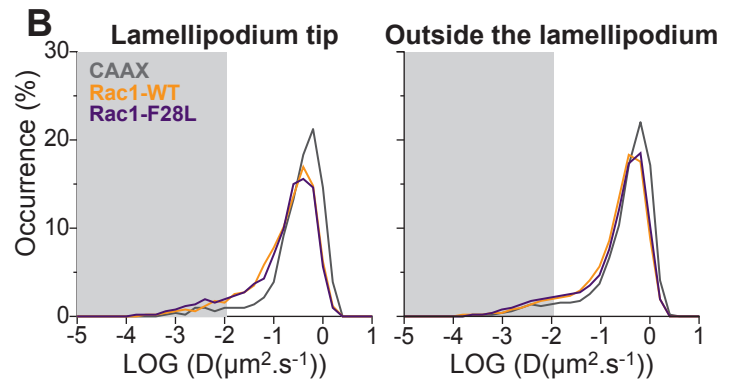
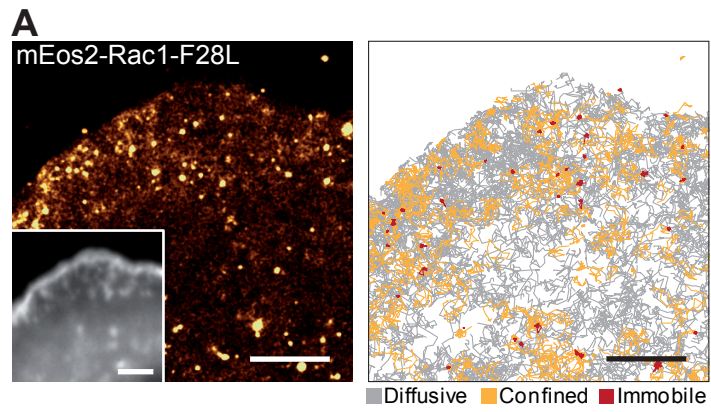


Figure 5

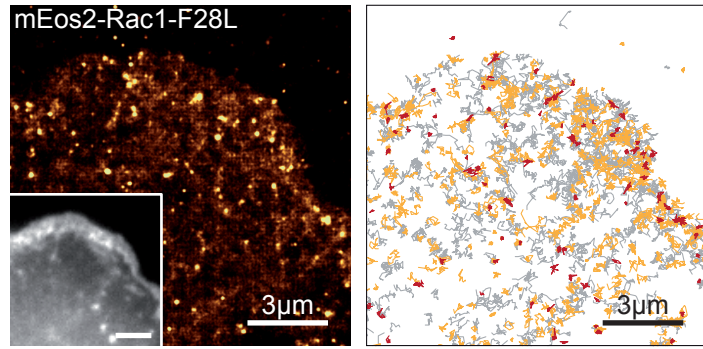


Supplementary Figure 1

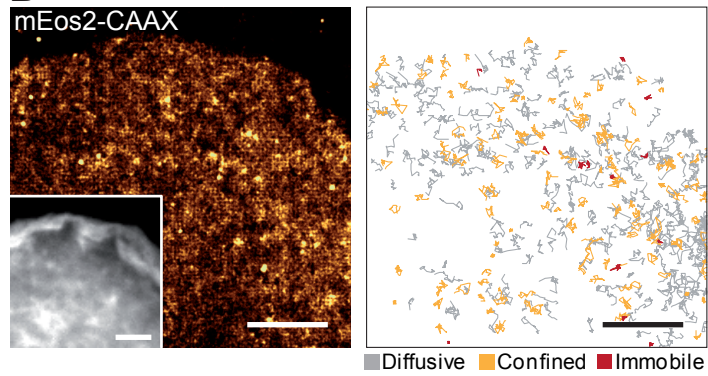


Supplementary Figure 2

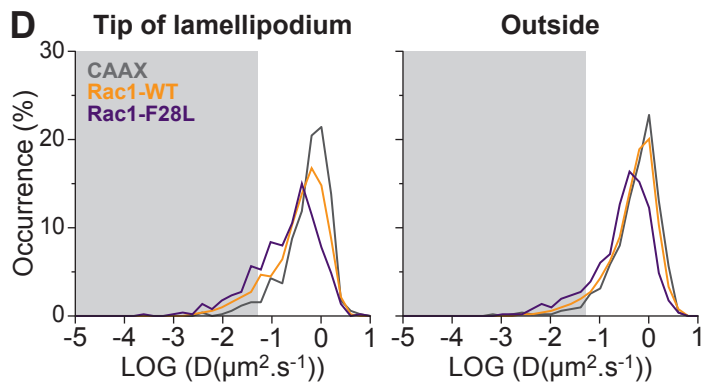
A



B



D



2

Mechanical feedback by actin elongation controls WAVE complex dwell time at the lamellipodium tip

Amine Mehidi, Olivier Rossier, Zeynep Karatas, Matthieu Sainlos, Klemens Rottner, Jean-Baptiste Sibarita, Grégory Giannone

1. Contexte et problématique

La migration cellulaire est régulée par une multitude de protéines qui restreignent l'activation du complexe Arp2/3 à l'extrémité du lamellipode (Lai et al., 2008; Lebensohn and Kirschner, 2009; Miki et al., 2000). L'enrichissement des régulateurs à l'extrémité du lamellipode permet la localisation ciblée des forces de protrusions (Mogilner, 2006), c'est à dire l'orientation des bouts barbés à l'extrémité du lamellipode. Cependant, cette localisation a un revers, elle expose ces régulateurs à des forces générées par les filaments d'actine. Mais la compréhension des effets de ces forces à l'échelle du nanomètre est encore sujet à débat. Ainsi, les dissociations des complexes Wave et Arp2/3 ont été décrites différemment *in vitro* et *in vivo* (Millius et al., 2012; Smith et al., 2013) : Millius propose que le complexe Wave se détache de l'extrémité du lamellipode avec le flux rétrograde du complexe Arp2/3 alors que Smith explique que la dissociation des complexes Arp et Wave est un préalable. Ces données révèlent que la dynamique du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode peut être due à des contraintes mécaniques.

Grâce à l'utilisation d'approches de suivi de particules individuelles et de pinces optiques, nous avons alors tenté de déterminer : Quelle étaient les mécanismes de régulation de la localisation de Wave à l'extrémité lamellipode ?

2. Approches utilisées

Afin de déterminer la dynamique de ces régulateurs, les complexes Arp et Wave ont tous les deux été observés à l'échelle nanométrique en utilisant des approches de suivis de particules individuelles au niveau du lamellipode. Puis, afin de sonder les contraintes mécaniques appliquées au complexe Wave, nous avons utilisé une protéine chimérique de Nap1 possédant un domaine transmembranaire couplé des approches de pinces optiques.

3. Principaux résultats

Dans un premier temps, nous avons alors confirmé que l'immobilisation du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode était due à des mécanismes de diffusion/piégeages. Dans un second temps, nous avons montré que le renouvellement rapide du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode était dû à la polymérisation de filaments transversaux. Enfin, nous avons montré que les forces de liaisons de Wave à l'extrémité du lamellipode sont supérieures aux forces de liaison des complexes Arp2/3 et Wave du lamellipode. Grâce à ces approches, nous avons pu sonder la mécanique du lamellipode. En effet, nous avons régulé l'existence une possible voie de rétrocontrôle mécanique de la dynamique du lamellipode.

Mechanical feedback by actin elongation controls WAVE complex dwell time at the lamellipodium tip

Amine Mehidi^{1,2}, Olivier Rossier^{1,2}, Zeynep Karatas^{1,2}, Matthieu Sainlos^{1,2}, Klemens Rottner^{3,4}, Jean-Baptiste Sibarita^{1,2}, Grégory Giannone^{1,2,†}.

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

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

³ Division of Molecular Cell Biology, Zoological Institute, Technical University Braunschweig, Spielmannstrasse 7, 38106 Braunschweig

⁴ Helmholtz Centre for Infection Research, Inhoffenstrasse 7, 38124 Braunschweig

†Corresponding author: gregory.giannone@u-bordeaux2.fr

Condensed title: biomechanical control of actin regulators

Abstract

Cell migration depends on a tight biochemical control of actin regulators in protrusive structures such as the lamellipodium (LM). Those biochemical events funnel to the LM tip, to activate or inhibit the Arp2/3 complex which nucleates the branched actin network. Yet, the LM is the archetype of a force-generating machine. Thus, force generated by individual actin filaments at the LM tip could foster biomechanical events to tune the function of actin regulatory protein. To test this model, we used single protein tracking (SPT) and optical trapping to study the movements and mechanical responses of individual actin regulators at the LM tip. We demonstrated that WAVE turnover at the LM tip is correlated with WAVE and FMNL2 lateral movements, driven by actin elongation. Using a chimeric Nap subunit bearing a transmembrane domain and an extracellular handle enabled us to generate and measure forces exerted on WAVE in living cells. We demonstrated that WAVE release from the LM tip was driven by forces larger than 4 pN, while its release from the flowing branched actin network occurred at lower forces. Our results demonstrate that forces generated by actin elongation at the LM tip, mechanically control the function of actin regulatory proteins. The existence of this mechanical negative feedback loop enables actin assembly to control its own assembly rate.

Abbreviations:

Abi1: Abelson interactor 1
Arp2/3: actin related proteins 2/3
BSA: Bovine Serum Albumin
D: diffusion coefficient
F-actin: actin filaments
FMNL2: formin-like protein-2
IRSp53: insulin receptor tyrosine kinase substrate p53
MEFs: mouse embryonic fibroblasts
Nap1: NCK-associated protein 1
PALM: photoactivation localization microscopy
 r_{conf} : confinement radius
SPT: single protein tracking
Sra: specifically Rac-associated protein 1
TET 1.3%: 20mM Tris, 1mM EDTA, 1.3% Triton x100
VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein
WAVE: WASP-family verprolin homologue complex
Wave: WASP-family verprolin homologue complex protein

Key Words: branched F-actin network / mechano-transduction / lamellipodium / WAVE complex / Arp2/3 complex / single protein tracking / optical tweezers

Introduction

Cell migration is powered by membrane protrusions that form as a result of forces exerted by the assembly of actin filaments (F-actin) against the membrane. Thus, mechanisms controlling the rate and direction of cell migration all converge to the tunable assembly and disassembly of F-actin networks (Blanchoin et al., 2014). The lamellipodium (LM) provides a paradigm for subcellular protrusive structures. The LM is essentially composed of branched actin networks initiated by activation of a unique actin nucleator, the Arp2/3 complex (Blanchoin et al., 2000; Mullins et al., 1998; Svitkina and Borisy, 1999). Activation of the Arp2/3 complex is the final step of coincident signals occurring at the plasma membrane (Lebensohn and Kirschner, 2009). Crucially, most direct and indirect Arp2/3 regulators converge to a specific location, the curved membrane of the LM tip. Thus, incorporation of actin monomers, Arp2/3 complex, actin branch formation specifically occur at the LM tip (Lai et al., 2008).

A node of regulation is the nucleation-promoting factor (NPF), the WAVE complex, Arp2/3 activator in the LM (Miki et al., 2000; Yamazaki et al., 2003). WAVE is a stable complex assembled from five subunits: Wave(1, 2), Abi, Nap, Brick and Sra (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Lebensohn and Kirschner, 2009). The WAVE2 complex, which is responsible for LM formation, is located at the LM tip, while WAVE1 is involved in dorsal ruffles formation (Suetsugu et al., 2003). The WAVE complex is activated by the Rho-family GTPase Rac1 and potentially the membrane-associated I-BAR protein IRSp53 (Miki et al., 2000). Both activated Rac1 (Mehidi et al., in preparation) and IRSp53 (Nakagawa et al., 2003) are concentrated at the LM tip. WAVE phosphorylation events are probably coordinated with Rac1 interaction to ensure a tight spatial and temporal regulation of WAVE activity at the membrane surface (Chen et al., 2010; Lebensohn and Kirschner, 2009). Arpin, an Arp2/3 inhibitor, is also recruited and activated by Rac1 signaling at the LM tip (Dang et al., 2013), illustrating the complex biochemical circuitry controlling Arp2/3 activation rates at this location.

In addition to biochemical events, growing evidences demonstrated that protein functions are regulated by mechanical forces (Hoffman et al., 2011; Iskratsch et al., 2014; Moore et al., 2010), i.e. mechano-transduction. The general consensus is that mechano-transduction is based on force-dependent protein deformations and reorganizations. Consistent with this model, forces exerted on mechano-sensitive proteins control enzymatic activities (Wang et al., 2005), channel opening (Coste et al., 2012), stabilize and destabilize interactions (Giannone et al., 2003; Jiang et al., 2003), reveal domains of interactions and post-translational modifications (del Rio et al., 2009; Sawada et al., 2006). All cytoskeletal structures, microtubules (Akiyoshi et al., 2010; Dumont et al., 2012), actin (Iskratsch et al., 2014) and intermediate filaments (Herrmann et al., 2007; Leduc and Etienne-Manneville, 2015), are involved in mechano-transduction events since their assembly/disassembly and associated motors generate pulling and pushing forces.

In vitro experiments using purified proteins were used to test and reveal important principle of mechano-transduction. Forces generated *in vitro* on individual microtubules or actin filaments using microfluidic devices demonstrated that mechanical events control tubulin self-repair (Schaedel et al., 2015) or the activity of actin binding proteins such as formin (Jégou et al., 2013). The dynamic response of proteins under mechanical force was also demonstrated in reconstituted protein assemblies (Ciobanasu et al., 2014; Mizuno et al., 2007), including Arp2/3-dependent branched actin networks which adapt their branching density and stiffness to force exerted on them (Mullins Cell 2016). However, to what extent such adaptive mechanisms operate in the LM during cell migration is

still unclear. Yet, the LM is the archetype of a force-generating molecular assembly. The ensemble dynamics of F-actin networks can produce complex pattern of pushing and pulling forces (Giannone et al., 2004; Ponti et al., 2004), which are controlled by the stiffness of the substrate (Giannone et al., 2004, 2007; Ponti et al., 2004; Wolfenson et al., 2016). Nevertheless, considering the LM as a force-sensitive structure may have been overlooked. Formation of actin branches is coupled to F-actin elongation achieved by elongators such as VASP and formins also located at the LM tip (Block et al., 2012; Rottner et al., 1999). Each individual growing actin filament is a force-generating unit used to push the cell membrane forward. Thus, the local and immediate force generated by an individual actin filament at the LM tip could also foster mechano-transduction events and tune the function of actin binding and regulatory protein.

To test this hypothesis directly, we used single protein tracking (SPT) and optical trapping to study the movements and mechanical responses of individual actin regulators at the LM tip. Using SPT we demonstrated that the WAVE complex is recruited to the LM tip by a membrane diffusion/trapping mechanism, while the Arp2/3 complex is recruited directly from the cytosol to the LM tip. Conversely to Arp2/3, WAVE did not move with the rearward flow of F-actin network. Instead, SPT revealed that WAVE is submitted to lateral movements at the LM tip, tangential to the leading edge and independent from any interaction with Arp2/3. Inhibition of F-actin elongation abrogated WAVE lateral movements, which became stationary and displayed increased dwell time at the LM tip. These results supported a model where tangential F-actin elongation at the LM tip, visualized by lateral displacements of elongators such as FMNL2, generate pushing forces to trigger WAVE dissociation from the LM tip. Creating a chimeric Nap subunit bearing a transmembrane domain and an extracellular handle enabled us to generate and measure forces exerted on the WAVE complex in living cells. The mechanical forces required to unhook WAVE from the LM tip were on the order of 4 pN. Conversely, individual slip bonds formed between WAVE and the flowing F-actin network were ruptured by forces below 4 pN. Thus forces generated by actin elongation at the LM tip could mechanically control the function of actin regulatory proteins. This mechanical feedback on WAVE dwell time could be an efficient mechanism to control the rate of actin assembly.

Results

Membrane diffusion/trapping of the WAVE complex at the lamellipodium tip but cytosolic recruitment of the Arp2/3 complex.

Assembly of a branched actin network requires activation of the Arp2/3 complex by a direct interaction with the WAVE complex. Encounters between those two complexes need to be tightly regulated both spatially and temporally to prevent uncontrolled assembly. To determine how WAVE and Arp2/3 meet in the LM, we used Single Protein Tracking (SPT) PALM (Fig. 1)(Mehidi et al., submitted)(Chazeau et al., 2014; Millius et al., 2012; Rossier et al.). We used mouse embryonic fibroblasts (MEFs) spreading isotropically on fibronectin (FN) (Dubin-Thaler et al., 2004; Giannone et al., 2004). In those conditions MEFs form lamellipodia devoid of filopodia, avoiding bias in our conclusions since WAVE also localizes at their tip (Nakagawa et al., 2003). We performed high-frequency sptPALM acquisition (50 Hz) on MEFs co-transfected with mEOS2-fused proteins and α -actinin-GFP, as a lamellipodium reporter. We sorted trajectories evolving at the LM tip (LM tip) versus the back of the LM (outside LM)(Fig. 1, Supplementary Fig. S1).

The WAVE complex is a stable complex composed of five subunits: Wave (1, 2), Abi, Nap, Brick and Sra (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Lebensohn and Kirschner, 2009). mEOS2-Nap1 exhibited a large fraction of membrane diffusion, as demonstrated by the predominant fraction of free diffusion outside the LM tip (Fig. 1A, D-F). The fraction of free-diffusion decreased at the expense of immobilizations at the LM tip (Fig. 1A, D-F). Generation of single-molecule-based super-resolution intensity images (Betzig et al., 2006; Shroff et al., 2008), demonstrated the selective concentration of mEOS2-Nap1 immobilizations at the LM tip compared to outside (Fig. 1A). Thus our results suggest that the WAVE complex is recruited to the lamellipodium tip by a diffusion trapping mechanism, in line with a previous study using SPT in *Xenopus* tissue culture (XTC) cells (Millius et al., 2012).

To characterize the diffusive behavior of protein anchored to the inner leaflet membrane in the LM we used mEOS2-CAAX (Fig. 1C, D-F). mEOS-CAAX displayed fast free diffusion, low fraction of immobilization, and no selective immobilizations both at the LM tip and at the membrane outside the LM (Fig. 1C, D-F). Thus, mEOS2-Nap1 immobilizations at the LM tip are not mediated by protein crowding or membrane curvature, but reflect specific interactions with proteins at the LM tip. Quantifications for other subunits of the WAVE complex (Wave2, Abi, Sra1) yielded almost identical results (Supplementary Fig. S1).

Importantly, the Arp2/3 complex evolved differently compare to the WAVE complex, unlike the results found previously (Millius et al., 2012). Like mEOS2-actin, mEOS2-ArcC5A displayed a large immobilization fraction (Fig. 1B, D-F), but almost no membrane free-diffusion as showed by experiments with bare mEOS2 (Supplementary Fig. S1). Those results suggest that the Arp2/3 complex is recruited in the LM directly from the cytosol, without any period of membrane diffusion to find WAVE .

The WAVE complex is surfing laterally on the lamellipodium tip.

To trigger membrane protrusion, forces generated by F-actin assembly must be transmitted to the LM tip. But if those forces are weaker than the restraining force of the membrane, flow of F-actin perpendicular to the leading edge will occur in the LM (Giannone et al., 2009). We measured the slow motion of mEOS2-fused proteins in the LM from sptPALM super-resolution time-lapse images (Chazeau et al., 2014; Rossier et al., 2012). This analysis strategy enables to quantify the slow motions of individual proteins in subcellular structures including focal adhesions, neuronal dendritic spines and growth cone (Chazeau et al., 2014; Frost et al., 2010; Rossier et al., 2012). mEOS2-ArpC5A was flowing perpendicular to the leading edge with the same rate of actin as described previously for these MEFs ($26 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$, Fig. 2A, C-F) (Giannone et al., 2004). Next we tested whether the WAVE complex, which in the Arp2/3 activation cycle is physically connected to the branched F-actin network (Smith et al., 2013), also exhibited flow perpendicularly to the leading edge, as previously described (Millius et al., 2012). Despite WAVE enrichment at the LM tip, we observed no rearward movements as fast as Arp2/3 for mEOS2-Abi1 (Fig. 2B, C-F). Surprisingly, mEOS2-Abi1 displayed directed movements at the tip of the LM not normal but tangential to the leading edge of the cell (Fig. 2G). Those lateral movements, with no preferred left or right directions, had a mean rate of $28 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ and could persist for more than 500 nm in one direction (Fig. 2G,I). Cell fixation completely inhibited mEOS2-Abi1 sideways movements (Fig. 2H). The dwell time in fixed conditions (mean 23 s), which is also a measure of the bleaching time, was above the dwell time of mEOS2-Abi1 in live conditions (mean 6.5 s)(Fig. 2I).

Actin elongation drives WAVE lateral movements at the lamellipodium tip.

To determine if WAVE lateral movements were powered by actin dynamics in the LM, we used Latrunculin A (LatA), which by sequestering actin monomers inhibits F-actin elongation and induces F-actin disassembly. To preserve WAVE localization at the membrane tip independently from the LM, we acutely treated with LatA spreading MEFs with active LM. LatA induced a complete LM disassembly as demonstrated by the loss of α -actinin-GFP signal (Fig. 3A). Despite the complete loss of F-actin in the LM, the WAVE subunits mEOS2-Abi1 and mEOS2-Nap1 remained localized at the LM tip. Nevertheless, this treatment almost fully inhibited mEOS2-Abi1 lateral movements (Fig. 3B,D). Control experiments performed with mEOS2-CAAX showed that the large fraction of fast free-diffusion for mEOS2-CAAX was unaffected by LatA treatment (Supplementary Fig. S2), proving that the use of LatA did not disrupt the integrity of the plasma membrane. Importantly, despite WAVE association with the plasma membrane (Fig. 1), our results demonstrated that, in the absence of F-actin, WAVE is stationary and unable to diffuse when located at the membrane tip (Fig. 3B, Supplementary Fig. S2). These results suggested that the WAVE complex is strongly hooked by an unknown binding partner at the membrane tip. Fitting with this hypothesis, LatA treatment increased mEOS2-Abi1 dwell time at the membrane tip (Fig. 3B,C). Dynamics of F-actin networks was previously involved in NPFs turnover at zones of F-actin nucleation and elongation, such as the tips of virus-induced actin tails for N-WASP (Weisswange et al., 2009) and the LM tip for WAVE (Weiner et al., 2007). Nevertheless, the molecular mechanisms controlling the dwell time of WAVE association with the LM tip remained unknown. Our results demonstrate that increased WAVE turnover at the LM tip is correlated with WAVE lateral movements. Deciphering the origin of those sideways movements could unveil fundamental molecular mechanisms used to govern actin regulator functions at the LM tip.

WAVE lateral movements could indirectly reflect displacements of the Arp2/3-dependent branched network, since WAVE binds Arp2/3 to achieve its function (Goley and Welch, 2006; Smith et al., 2013). Or WAVE lateral movement could result from barbed-end F-actin elongation that will push laterally the WAVE complex hooked to the LM tip. To rule out that WAVE lateral movements were triggered by interactions with the Arp2/3 complex, we performed experiments with Wave2 deleted from its VCA domain (Wave2- Δ VCA), which directly interacts with the Arp2/3 complex and actin monomer during Arp2/3 mediated nucleation (Goley and Welch, 2006; Smith et al., 2013). Not only mEOS2-Wave2- Δ VCA diffusive properties are similar to classical WAVE subunits (Supplementary Fig. S2), supporting its normal incorporation in the complex, but mEOS2-Wave2- Δ VCA displayed lateral movements comparable to Abi1, which were inhibited by LatA treatment (Fig. 3E-H).

Electron microscopy of actin in the LM revealed a population of F-actin running parallel or at shallow angle compare to the leading edge (Koestler et al., 2008). Thus, we next tested if actin elongations could occur tangentially to the LM tip. Formin-like proteins-2 (FMNL2) are concentrated at the LM tip and could act in coordination with the Arp2/3 complex by elongating branched F-actin (Block et al., 2012). We first assessed the diffusive behavior of FMNL2-mEOS2 using fast acquisition (50 Hz) sptPALM. Like the WAVE complex, FMNL2-mEOS2 displayed periods of membrane free-diffusion and immobilization both at the LM tip and outside the LM (Supplementary Fig. S2). FMNL2-mEOS2 also exhibited period of fast directed motions ($0.5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) (Supplementary Fig. S3), that probably correspond to processive movements along the growing plus-ends of F-actin (Higashida et al., 2004). Importantly, those fast directional movements were also occurring tangentially to the LM tip, demonstrating that actin elongation could run sideways along the LM tip (Supplementary Fig. S3). In addition, like the WAVE complex, FMNL2-mEOS2 also moved laterally with slower speed, as demonstrated by super-resolution time-lapse images (Fig. 3I,L). FMNL2-mEOS2 lateral movements were abrogated by LatA treatment, demonstrating that they were powered by actin elongation (Fig. 3J,L). Thus, our results suggest that WAVE lateral movements at the LM tip could be driven by actin elongation events tangential to the leading edge.

4 pN mechanical forces are required to dissociate the WAVE complex from the LM tip.

Overall our results converge towards a model where mechanical forces generated by F-actin elongation control WAVE dwell time at the LM tip. Next we wanted to prove that forces exerted on the WAVE complex promote its dissociation from the LM tip. Optical tweezers is the ideal method to generate and probe small forces applied on specific proteins (Giannone et al., 2003; Jiang et al., 2003; Moffitt et al., 2008). Nevertheless, this method, based on a micron-scale bead bound to the protein of interest, is restricted to transmembrane or in vitro purified proteins. Intracellular binding of micron-scale beads on WAVE within the LM is impossible. To circumvent this major technical barrier, we designed a strategy enabling to specifically generate and measure forces exerted on an intracellular protein from the extracellular space (Fig. 4).

To create this extracellular handle on the WAVE complex, we fused the Nap1 subunit to a transmembrane domain (TM) ending with an extracellular specific ligand. We fused mEOS2-Nap1 to N-cadherin TM domain bearing an extracellular GFP (TM-Nap1) (Fig. 4A). Because of the poor expression level of TM-Nap1, we generated a MEFs cell line with stable expression of TM-Nap1 enabling microscopic and biochemical analysis. The localization at the LM tip and diffusive behavior of TM-Nap1 was identical to mEOS2-Nap1 as assessed using sptPALM (Fig. 4B-D). To further confirm

the normal function of TM-Nap1, we tested its incorporation in the WAVE complex (Eden et al., 2002; Gautreau et al., 2004; Lebensohn and Kirschner, 2009). We performed immunoprecipitation from a MEFs cell line with stable TM-Nap1 expression using an anti-GFP antibody, and demonstrated that TM-Nap1 was associated with the Wave2 protein (Fig. 4E).

Using the same TM-Nap1 cell line, we performed optical tweezers experiments on active LM with 1.3 μm silica beads coated with mono-biotinylated anti-GFP Nanobody and diluted with BSA-biotin. The use of identical coupling strategy, biotin, for the Nanobody and BSA enabled us to control the percentage of Nanobody on beads. The binding specificity of Nanobody-beads was demonstrated using binding assays on MEFs transfected with $\beta 3$ -integrins bearing an extracellular GFP tag (GFP- $\beta 3$ -integrins) and on MEFs expressing TM-Nap1 (Fig. 5A, B). According to the Poisson distribution, to obtain high probability (<80 %) of single binding events between a GFP-fused protein and a Nanobody-bead, binding rate between 30-40 % should be obtained (Jiang et al., 2003). This level of binding was verified for each experimental condition and depends on the biotinylation efficiency of Nanobody-AP and TM-Nap1 expression.

Like demonstrated for the WAVE complex using sptPALM (Fig. 2), tracked Nanobody-beads bound to TM-Nap1 underwent both cycles of free-diffusion and immobilizations at the LM tip (Fig. 5C), and once at the LM tip lateral movements (Fig. 5D). To determine the force required to dissociate the WAVE complex from the LM tip we conducted pulling assays on Nanobody-beads immobilized at the LM tip. The optical trap was positioned on immobilized Nanobody-beads and moved towards the cell center with a loading rate ranging from 1 to 3 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Fig. 5E). The percentage of pulling events was calculated for different laser trap stiffness (see methods, Supplementary Fig. S4). The force magnitude required to obtain 50 % of pulling events was on the order of 4 pN (Fig. 5F), close to forces generated by elongation of an individual actin filament, 2 pN (Berro et al., 2007; Dmitrieff and Nédélec, 2016; Footer et al., 2007; Kovar and Pollard, 2004). Thus elongation of an individual actin filament could drag and dislodge the WAVE complex from the LM tip, providing an immediate and local control of actin assembly over itself.

The pointing accuracy of micrometric bead tracking using DIC (2 nm) is one order of magnitude higher than sptPALM (25 nm). Using this ability, we tested if we could detect the nanometer scale displacements triggered by transient mechanical connections of WAVE with the flowing branched actin network. Nanobody-beads held by the laser trap on the LM of MEFs expressing TM-Nap1 occasionally moved rearward at the speed of the flowing actin network (Fig. 5G), these connections could not be observed in control MEFs. Using beads coated with low density of Nanobody, enabled us to study the force response of these minimal connections with the branched actin network. We could observe breaking events (Jiang et al., 2003), i.e. abrupt recoil of the flowing bead towards the trap center (Fig. 5G), that corresponded to molecular slip bonds that broke repeatedly each time the weakest force of the WAVE-cytoskeleton connection was reached. The weakest individual linkages were broken by forces in the range of 2-4 pN (Fig. 5H), below the force required to efficiently remove the WAVE complex for the LM tip (Fig. 5F). Our results suggested that an individual WAVE complex hooked at the LM tip is not released primarily by forces exerted by its *repetitive* connections with the flowing branched actin network.

Discussion

The current study shows that actin elongation creates a force feedback on the function of actin regulators located at the LM tip, the membrane surface driving branched actin nucleation and elongation during cell motility. Visualization of individual actin regulator movements, demonstrates that WAVE turnover at the LM tip is correlated with WAVE and FMNL2 lateral movements, driven by actin elongation. Direct measurement of WAVE binding forces with the LM tip, demonstrates that WAVE release is driven by forces larger than 4 pN. Whereas breaking WAVE association with the flowing branched actin network required smaller forces. Thus, pushing forces generated by actin elongation could trigger WAVE dissociation from the LM tip more efficiently than pulling forces of the actin rearward flow. This biomechanical signal constitutes a local and fast control of actin regulators at the LM tip and participates, with well-described biochemical signals, in the regulation of membrane protrusion during cell migration.

Tuning NPF dwell-time at the lamellipodium tip to control branched actin nucleation

There is an accurate regulation of the Arp2/3 complex activation state at the LM tip of migrating cells. Past studies focused mainly on biochemical events involving activators and inhibitors such as respectively the WAVE complex (Miki et al., 1998) and Arpin (Dang et al., 2013), both enrolled in complex signaling networks (Krause and Gautreau, 2014). Biochemical regulators of the WAVE complex such as Rac1 will control the release of the cryptic Arp2/3-activating VCA domain (Chen et al., 2010; Miki et al., 2000), i.e. its catalytic activity. But once the VCA is exposed, what other mechanisms will regulate WAVE activity? The WAVE complex is enriched at the LM tip, yet FRAP experiments demonstrated that it is extremely dynamic (half-times of fluorescence recovery ($t_{1/2}$) ~ 10 s) (Lai et al., 2008), faster than the life-time of this sub-cellular structure (~ 30 s) (Giannone et al., 2007; Lai et al., 2008). Thus controlling WAVE dwell-time and dynamics at the LM tip is a control mechanism over Arp2/3 activation and consequently the speed of membrane protrusion and migration.

Actin network assembly in the LM was involved in WAVE rapid turnover at the LM tip, since LatA treatment decreased this turnover (Weiner et al., 2007). Likewise, the ability of N-WASP to stimulate Arp2/3-complex-mediated actin polymerization and virus motility depends on an increased N-WASP turnover beneath the virus (Weisswange et al., 2009). Again, inhibiting actin elongation using Cytochalasin D greatly decreased N-WASP turnover. Importantly, release of NPFs from Arp2/3 is a prerequisite to ensure elongation of the daughter filaments (Smith et al., 2013), and to increase the number of branching cycles per NPFs molecule (Siton et al., 2011). But the molecular mechanisms leading to dissociation of the Arp2/3 - WAVE intermediate in cells is still unknown. Our results suggest that pushing forces generated by actin elongation and pulling forces exerted by the actin flow, possibly via binding to Arp2/3, could both regulate WAVE dwell time at the LM tip. Nevertheless, Wave2- Δ VCA displays lateral movements powered by actin elongation and its dwell time is increased by LatA treatment. Thus specific interactions with Arp2/3 are not required for the biomechanical regulation of WAVE at the LM tip, supporting the pushing mechanism. Importantly, accumulation of VASP at the LM tip is also triggered by acute cytochalasin D treatment (Small and Rottner, Actin Based motility, 2010). Thus, forces generated by actin elongation could be a general mechanism to regulate the turnover of actin regulators at the LM tip.

Organization of actin filaments at the LM tip

Although, in the actin dendritic-nucleation model F-actin barbed ends point towards the LM tip with 55° angles (Schaus et al., 2007; Weichsel and Schwarz, 2010), the genuine organization of the branched actin network in the LM is still debated (Koestler et al., 2008; Sykes and Plastino, 2010; Weichsel and Schwarz, 2010). The branched actin network could be considered solely like an active gel growing against the plasma membrane and powering membrane protrusion. In that model F-actin elongation could occur away or oblique with respect to the surface bearing the NPFs, as demonstrated experimentally *in vitro* using reconstituted system (Achard et al., 2010; Sykes and Plastino, 2010). Yet, the concentration at the LM tip of WAVE and F-actin barbed ends binding proteins (Blanchoin et al., 2014), rather supports a model where each F-actin barbed ends, oriented preferentially towards the TM tip, will participate actively and locally in force generation and yet unknown processes. Nevertheless, membrane and F-actin fluctuations might lead to a wide distribution of F-actin orientations that could tune differently the rate of membrane protrusion (Bear et al., 2002; Dmitrieff and Nédélec, 2016; Schaus et al., 2007; Weichsel and Schwarz, 2010). The force generated by polymerization of an individual actin filament is multifactorial and will depend at least on G-actin concentration, the length of the actin filaments, and the angle between the membrane and the growing F-actin (Berro et al., 2007; Dmitrieff and Nédélec, 2016). *In vitro* experiments using optical traps or F-actin buckling showed that polymerization of an individual actin filament generates 1-2 pN forces (Footer et al., 2007; Kovar and Pollard, 2004). Theoretically, at cellular G-actin concentration, the maximal polymerization force is ~9 pN, but could be amplified at the expense of displacement if the angle with the membrane deviate from 90°, e.g. double to ~18 pN with an angle of 30° (Berro et al., 2007; Dmitrieff and Nédélec, 2016). Nevertheless, the competition between F-actin buckling and pushing forces implies a minimal length enabling F-actin to generate a given force. According to our results, WAVE and FMNL2 can travel tangentially at the LM tip for about 500 nm (Fig. 2, 3). In agreement with the force required to release WAVE from the LM tip ~4 pN (Fig. 5), an individual actin filaments of 500 nm could still generate forces as large as 10 pN (Berro et al., 2007). Thus, elongation of a single actin filament could generate enough force to trigger WAVE release from the LM tip.

Pulling versus pushing

Firm association of WAVE with the LM tip is independent from interactions with the actin network as demonstrated by sptPALM experiments after LatA treatment. Two mechanisms could foster WAVE mechanical dissociation from the LM tip, pulling forces generated by the rearward moving flow (Millius et al., 2012; Smith et al., 2013) or pushing forces triggered by actin elongation as suggested by our results. The predominance of one mechanism over the other will depend on who win the tug of war for WAVE, the LM tip or the Arp2/3 complex. If the mechanical stability of WAVE interaction with the LM tip is stronger than the one with Arp2/3, WAVE will remain at the LM tip until pushing forces will dislodge it from this location. Our laser trap experiments demonstrated that the force required to remove WAVE from the LM tip (~4 pN) were stronger than the weakest force needed to disrupt WAVE - Arp2/3 interaction (< ~2 pN). This scenario, where firm binding of WAVE to the LM tip enables its release from the flowing Arp2/3 complex, is in agreement with *in vitro* experiments showing that NPFs such N-WASP form a pre-nucleation complex with Arp2/3 that will lead to filament elongation only after their dissociation (Smith et al., 2013). In addition, this release could also be assisted biochemically by cortactin (Siton et al., 2011). Thus stronger interaction between

WAVE and the LM tip and weaker interaction with Arp2/3 will ensure an efficient growth of the actin network through rounds of Arp2/3 activation before WAVE release. However, this growth will be limited if WAVE is released from the tip by its first interaction with Arp2/3.

Biochemical versus biomechanical signals

Biochemical signaling is a powerful way to control cellular functions, and in most cases those regulation schemes rely on activation inhibition cycles working at different time scale, from milliseconds, seconds, minutes to hours. Actin assembly in the LM is clearly governed by complex biochemical signals including Rho GTPases (Machacek et al., 2009), PKA (Tkachenko et al., 2011) and Abl (Chen et al., 2010; Leng et al., 2005). Advantages of biochemical signaling are their ability to act at long range by propagation within the cell, to synchronize protein actions, and to integrate complex inputs into the final node of a signaling cascade. Nevertheless, this could come with delay and inertia of action, unwanted signal spreading, the need for a constant balance between activation and inhibition, and high energy cost. On the contrary, because biomechanical signaling acts immediately and locally, they represent an efficient alternative way to control protein activity, such as channel opening (Coste et al., 2012), enzymatic activities (Wang et al., 2005), posttranslational modifications (Sawada et al., 2006) and protein interactions (Rio et al., 2009). For instance, periodic contractions of the LM are precisely timed by the mechanical connections that lamellipodial actin periodically creates between myosin activity and adhesion-site formation (Giannone et al., 2004, 2007). In vitro experiments demonstrated that formin-driven elongation are increased by pulling forces exerted on actin filaments (Jégou et al., 2013). Our results revealed that forces generated by actin elongation at the LM tip not only drive membrane protrusions, but also actively control the function of actin regulatory protein at the LM tip, namely WAVE complex inactivation.

Positive or negative feedback on membrane protrusion?

What could be the gain of controlling WAVE density at the LM tip? Changing WAVE density should tune Arp2/3 activation, and thus alter the density of Arp2/3-dependent branches in the growing actin network. In vitro experiments using NFPs micro-patterned on glass, to create *physical boundary conditions* mimicking local assembly at LM tip, demonstrated that increased NFPs density does not scale up with growth rate of branched actin networks, but enhanced its mechanical stability (L. Blanchoin, personal communication). Besides, applying a load on a growing branched actin network, using atomic force microscopy, triggered an adaptation to force characterized by a denser and stiffer network producing an increased power output (Bieling et al., 2016). Thus a denser branched actin network should not lead to faster protrusion in the absence of retraining forces applied to it. However, a denser branched actin network will produce more force and resist more efficiently on counteracting forces from the membrane or the extracellular environment. Increased counteracting forces of the membrane could lead to shallower angle of actin filaments (Bieling et al., 2016; Koestler et al., 2008) and by reaction could increase the forces generated by growing actin filament on proteins at the LM tip (Dmitrieff and Nédélec, 2016). According to our results this will increase the probability to remove WAVE from the tip and thus will constitute a negative feedback mechanism on Arp2/3 activation. Removing NFPs from the LM tip will provide a safeguard mechanism limiting the uncontrolled growth of a stiffer and stiffer LM. Thus not only the LM is a force-generating machine, but also a force-sensitive machine able to respond to the membrane load or tension by tuning the density of actin regulators at the LM tip, and accordingly membrane protrusion.

Materials and Methods

Cell culture and spreading Assays

Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were cultured in DMEM (Gibco and Eurobio) with 10% FBS. Transient transfections of plasmids were performed 2 days before experiments using Amaxa nucleoporator (Lonza). The cells were detached with trypsin/EDTA (0.05% for 2 min), the trypsin was inactivated using soybean trypsin inhibitor (1 mg/ml in DMEM), and the cells were washed and suspended in serum-free Ringer, and incubated for 30 min before spreading on human FN (Roche)-coated glass surface (FN 10 μ g/ml)(Giannone et al., 2004, 2007). Latrunculin A (LatA, 1 μ M) was purchased from Tocris.

DNA constructs

mEOS2-Abi1, mEOS2-Nap1, Sra1-mEOS2, mEOS2-ArpC5A, Wave2-mEOS2, mEOS2-CAAX were generated by PCR of the Coding DNA sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAm-FRT-PC-mESO2 blue at the Fse1/Asc1 site. GFP-ArpC5A, GFP-Abi1 were generated by PCR of the coding DNA sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAm-FRT-PC-GFP blue at the Fse1/Asc1 site. The human FMNL2-mEOS2 construct was generated by replacing the GFP of the FMNL2-GFP (pEGFP-N1) (Block et al, 2012) by mEOS2 at the AgeI/NotI sites, mEOS2 fragment was obtained by PCR on PrSet-A mEOS2 (Addgene). Actin-mEOS2 construct was generated as described before (Rossier et al, 2012). The fidelity of all constructs was verified by sequencing.

Generation of the stable TM-Nap1 cell line

The Piggybac 'TET-ON' system was used to create the stable cell line. Transposon vector was obtained by sub-cloning the AP-SEP-Ncadherin-mEos2-Nap1 (pcDNAm) into the Piggybac inducible vector. Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) were co-transfected by electroporation with the AP-SEP-Ncadherin-mEos2-Nap1 transposon vector and transposase vector (ratio 5:2). Transposase vector recognize a specific sequence located on both ends of the transposon vector and integrates the gene of interest into cells genome. Geneticin was used for cell selection and added (1 mg.ml⁻¹) every 3-4 days into the MEFs culture medium. Doxycycline was added (2 μ g.ml⁻¹) into the medium every 3-4 days, to induce protein synthesis enabling increased expression for biochemical analysis (Fig. 4) and microscopic observations (Fig. 5).

Immuno Precipitation and Western Blotting

TM-Nap1 MEFs were scraped off in TET 1.3% lysis buffer containing protease inhibitors (1/1000 Calbiochem, ref: 539134). Protein-G-coated magnetic beads were incubated with anti-GFP antibody (ref) to immunoprecipitated TM-Nap1 from this lysate. Pre-clearing of the lysate was done to reduce non-specific binding, prior addition of the anti-GFP beads. Beads were heated 10 min at 95 $^{\circ}$ c with a denaturing detergent to recover proteins from magnetic beads. Samples were loaded on SDS-PAGE gels to separate proteins according to their molecular weight, transferred to nitrocellulose membrane and processed for immunoblotting using GFP, Wave2 antibodies. Positive control lysates were used to demonstrate that the antibodies recognize specifically the target protein. Immunoreactive bands were revealed by chemiluminescence.

SptPALM acquisitions

Cells were imaged at 37°C in a Ludin chamber (Life Imaging Services) with an inverted motorized microscope (Nikon Ti) equipped with a CFI Apo TIRF 100x oil, NA 1.49 objective and a perfect focus system, allowing long acquisition in TIRF illumination mode. For photoactivation localization microscopy, cells expressing mEOS2 tagged constructs were photoactivated using a 405 nm laser (Omicron) and the resulting photoconverted single molecule fluorescence was excited with a 561 nm laser (Cobolt Jive™). Both lasers illuminated the sample simultaneously. Their respective power was adjusted to keep the number of the stochastically activated molecules constant and well separated during the acquisition. Fluorescence was collected by the combination of a dichroic and emission filters (D101-R561 and F39-617 respectively, Chroma) and a sensitive EMCCD (electron-multiplying charge-coupled device, Evolve, Photometric). The acquisition was steered by Metamorph software (Molecular Devices) in streaming mode at 50 Hz. α -actinin-GFP was imaged using a conventional GFP filter cube (ET470/40, T495LPXR, ET525/50, Chroma). Using this filter cube does not allow to separate spectrally the unconverted pool of mEOS2 from the GFP fluorescent signal. However, with all the constructs used, whether the mEOS2 signal was highly or poorly enriched in LM, we were still able to detect LMs with α -actinin-GFP.

Single molecule segmentation and tracking

A typical sptPALM experiment leads to a set of 7500 images per cell analysed in order to extract molecule localization and dynamics. Single molecule fluorescent spots were localized and tracked over time using a combination of wavelet segmentation and simulated annealing algorithms (Izeddin et al., 2012; Racine et al., 2006, 2007). Under the experimental conditions described above, the resolution of the system was quantified to 59 nm (Full Width at Half Maximum, FWHM). This spatial resolution depends on the image signal to noise ratio and the segmentation algorithm (Cheezum et al., 2001) and was determined using fixed mEOS2 samples. We analysed 130 2D distributions of single molecule positions belonging to long trajectories (>50 frames) by bi-dimensional Gaussian fitting, the resolution being determined as $2.3s_{xy}$, where s_{xy} is the pointing accuracy.

For the trajectory analysis, LM tip were identified by thresholding the fluorescence signal of α -actinin-GFP images acquired in between sptPALM sequences (1500 images). The cell edge for each α -actinin-GFP images were detected, and expanded by 3 pixels (480 nm) in and out of the cell to enclose the LM tip. This allowed to keep the protruding LM tip in the region of interests during sptPALM sequences. The region outside the LM was defined as the region 25 pixels (4 μ m) inward from the LM tip. The corresponding binary masks were used to sort single particle data analyses to specific regions, LM tip, outside the LM. We analyzed trajectories lasting at least 13 points (≥ 260 ms) with a custom routine written for Matlab using the mean squared displacement MSD computed as (Eq. 1):

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

where x_i and y_i are the coordinates of the label position at time $i \cdot \Delta t$. We defined the measured diffusion coefficient D as the slope of the affine regression line fitted to the $n = 1$ to 4 values of the $MSD(n \cdot \Delta t)$. The MSD was computed then fitted on a duration equal to 80% (minimum of 10 points, 200 ms) of the whole stretch by (Eq 2):

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

where r_{conf} is the measured confinement radius and τ the time constant ($\tau = r_{conf}^2/3D_{conf}$). To reduce the inaccuracy of the MSD fit due to down sampling for larger time intervals, we used a weighted fit. Trajectories were sorted in 3 groups: immobile, confined diffusion and free-diffusion. Immobile trajectories were defined as trajectories with $D < 0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, corresponding to molecules which explored an area inferior to the one defined by the image spatial resolution $\sim (0.05\mu\text{m})^2$ during the time used to fit the initial slope of the MSD (Rossier et al., 2012) (4 points, 80 ms): $D_{\text{threshold}} = (0.059 \mu\text{m})^2 / (4 \times 4 \times 0.02\text{s}) \sim 0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. To separate trajectories displaying free-diffusion from confined diffusion, we used the time constant τ calculated for each trajectory. Confined and free-diffusing trajectories were defined as trajectories with a time constant τ respectively inferior and superior to half the time interval used to compute the MSD (100 ms). The result of this sorting procedure is illustrated in Fig. 1c,d which shows the variation of the MSD over the time interval for each population: flat for immobile trajectories (red), reaching a plateau for confined trajectories (green), and linear for diffusive trajectories (purple).

Kymographs generation and analysis

We first generated sptPALM acquisitions using fast acquisition frequency (50 Hz; 7500 frames). Fluorescent single molecules were localized as described above. We generated super-resolution time-lapse sequences (frame rate 0.5 s, 25 images) from which high-density zones corresponded to immobile and slowly mobile mEOS2 (Chazeau et al., 2014; Rossier et al., 2012). Kymographs were produced and analyzed using an ImageJ plugin, Kymo ToolBox (F. Cordelières). Kymo ToolBox was used to generate the kymographs from lines of interest (LOI) draw on sptPALM time-lapses. Then, lines were manually generated on kymographs, and Kymo ToolBox extracted the speed, direction and dwell-time of displacements.

Laser Trap Experiments

Cells were seeded on poly-L-Lysin coated cover-glass and visualized using an inverted motorized microscope (Nikon Ti) with a Plan Apo 100x oil, NA 1.45 objective and equipped with differential interference contrast optics (Nikon) and a sCMOS camera (Orca Flash4 Hamamatsu). Nanobody-coated beads were sequentially held and displaced on active LM of spreading cells using an optical-gradient laser trap setup operated by galvanometric mirrors and coupled to telecentric optics to prevent astigmatism associated with laser trap displacements in the field of view (name, ERROL). The galvanometric mirrors and laser power were controlled by a homemade plugin steered by MetaMorph software (Molecular Devices). The trap stiffness at different laser power were measured using the Stokes' drag force generated on $1.3 \mu\text{m}$ beads by the viscosity of the fluid. The sample was moved at a constant velocity using a piezoelectric motor (ref of the motor). By using the Stokes Law, we calculated the viscous drag force exerted on the microsphere at a given velocity as: $F = 6\pi r\eta v$, where η is the dynamic viscosity of the fluid ($8.90 \times 10^{-4} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$), r is the radius of the bead ($1.3 \mu\text{m}$) and v is the velocity of the particle (Supplementary Fig. S5). We measured the displacement x from the laser center caused by this viscous drag force F , and model the laser trap as a spring with a trap stiffness, k given by: $k = F/x$ (Supplementary Fig. S5).

For bead binding assays, beads were held for 3 s on the cell surface 0.2– 0.5 μm from the leading edge using a $14 \text{ pN}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ laser trap. Beads were scored as attached if they remained in focus in the plane of the membrane for 10 s after inactivating the trap.

For pulling essays, forces induced by the laser trap (defined stiffness) were applied only to beads that were immobilized at the LM tip. The laser trap was moved towards the center of the cell with loading rate ranging from 1 to 3 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Beads were scored as pulled if they detached from the LM tip and moved with the laser trap.

For DIC beads tracking, x and y coordinates were determined from 50 ms time-lapses video micrographs using a single particle tracking plugin steered by MetaMorph software (Molecular Devices).

References

- Achard, V., Martiel, J.-L.L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.-C.C., Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., and Guerin, C. (2010). A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr. Biol.* *20*, 423–428.
- Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J.A., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2010). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* *468*, 576–579.
- Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I. V, Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* *109*, 509–521.
- Berro, J., Michelot, A., Blanchoin, L., Kovar, D.R., and Martiel, J.-L. (2007). Attachment conditions control actin filament buckling and the production of forces. *Biophys. J.* *92*, 2546–2558.
- Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* *313*, 1642–1645.
- Bieling, P., Li, T. De, Weichsel, J., McGorty, R., Jreij, P., Huang, B., Fletcher, D.A., and Mullins, R.D. (2016). Force Feedback Controls Motor Activity and Mechanical Properties of Self-Assembling Branched Actin Networks. *Cell* *164*, 115–127.
- Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin complex and WASP / Scar proteins. *Nature* *171*, 1007–1011.
- Blanchoin, L., Boujemaa-Paterski, R., Sykes, C., and Plastino, J. (2014). Actin dynamics, architecture, and mechanics in cell motility. *Physiol. Rev.* *94*, 235–263.
- Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., et al. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* *22*, 1005–1012.
- Chazeau, A., Mehidi, A., Nair, D., Gautier, J.J., Leduc, C., Chamma, I., Kage, F., Kechkar, A., Thoumine, O., Rottner, K., et al. (2014). Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J.* *33*, 2745–2764.
- Cheezum, M.K., Walker, W.F., and Guilford, W.H. (2001). Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys J* *81*, 2378–2388.
- Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B., Gomez, T.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M., Umetani, J., Billadeau, D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* *468*, 533–538.
- Ciobanaru, C., Faivre, B., and Le Clairche, C. (2014). Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring. *Nat. Commun.* *5*, 3095.
- Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., et al. (2012). Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature* *483*, 176–181.
- Dang, I., Gorelik, R., Sousa-Blin, C., Derivery, E., Guérin, C., Linkner, J., Nemethova, M., Dumortier, J.G., Giger, F. a., Chipysheva, T. a., et al. (2013). Inhibitory signalling to the Arp2/3 complex steers cell

migration. *Nature* 503, 281–284.

Dmitrieff, S., and Nédélec, F. (2016). Amplification of actin polymerization forces. *J. Cell Biol.* 212, 763–766.

Dubin-Thaler, B.J., Giannone, G., Döbereiner, H.-G., Sheetz, M.P., and Döbereiner, H.G. (2004). Nanometer analysis of cell spreading on matrix-coated surfaces reveals two distinct cell states and STEPs. *Biophys. J.* 86, 1794–1806.

Dumont, S., Salmon, E.D., and Mitchison, T.J. (2012). Deformations within moving kinetochores reveal different sites of active and passive force generation. *Science* 337, 355–358.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V, Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790–793.

Footer, M.J., Kerssemakers, J.W.J., Theriot, J. a, and Dogterom, M. (2007). Direct measurement of force generation by actin filament polymerization using an optical trap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 2181–2186.

Frost, N. a, Shroff, H., Kong, H., Betzig, E., Blanpied, T.A., and S, S.F. (2010). Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* 67, 86–99.

Gautreau, A., Ho, H.Y.H.Y., Li, J., Steen, H., Gygi, S.P., and Kirschner, M.W. (2004). Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4379–4383.

Giannone, G., Jiang, G., Sutton, D.H., Critchley, D.R., and Sheetz, M.P. (2003). Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *J Cell Biol* 163, 409–419.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.-G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* 116, 431–443.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B., and Rossier, O. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561–575.

Giannone, G., Mege, R.M., and Thoumine, O. (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol* 19, 475–486.

Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 713–726.

Herrmann, H., Bär, H., Kreplak, L., Strelkov, S. V, and Aebi, U. (2007). Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 562–573.

Higashida, C., Miyoshi, T., Fujita, A., Ocegüera-Yanez, F., Monypenny, J., Andou, Y., Narumiya, S., and Watanabe, N. (2004). Actin polymerization-driven molecular movement of mDia1 in living cells. *Science* 303, 2007–2010.

Hoffman, B.D., Grashoff, C., and Schwartz, M.A. (2011). Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 316–323.

Iskratsch, T., Wolfenson, H., and Sheetz, M.P. (2014). Appreciating force and shape — the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 825–833.

Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, C.G., Kechkar, A., Nair, D., Triller, A., Choquet, D., Dahan,

- M., and Sibarita, J.B. (2012). Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express* 20, 2081–2095.
- Jégou, A., Carlier, M.-F., and Romet-Lemonne, G. (2013). Formin mDia1 senses and generates mechanical forces on actin filaments. *Nat. Commun.* 4, 1883.
- Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D.R., Fukumoto, E., and Sheetz, M.P. (2003). Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* 424, 334–337.
- Koestler, S. a, Auinger, S., Vinzenz, M., Rottner, K., and Small, J.V. (2008). Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat. Cell Biol.* 10, 306–313.
- Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 14725–14730.
- Krause, M., and Gautreau, A. (2014). Steering cell migration: lamellipodium dynamics and the regulation of directional persistence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 577–590.
- 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.
- Lebensohn, A.M., and Kirschner, M.W. (2009). Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol. Cell* 36, 512–524.
- Leduc, C., and Etienne-Manneville, S. (2015). Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 102–112.
- Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M., and Siminovitch, K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1098–1103.
- Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99–103.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J* 17, 6932–6941.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408, 732–735.
- Millius, A., Watanabe, N., and Weiner, O.D. (2012). Diffusion, capture and recycling of SCAR/WAVE and Arp2/3 complexes observed in cells by single-molecule imaging. *J. Cell Sci.* 125, 1165–1176.
- Mizuno, D., Tardin, C., Schmidt, C.F., and Mackintosh, F.C. (2007). Nonequilibrium mechanics of active cytoskeletal networks. *Science* 315, 370–373.
- Moffitt, J.R., Chemla, Y.R., Smith, S.B., and Bustamante, C. (2008). Recent advances in optical tweezers. *Annu. Rev. Biochem.* 77, 205–228.
- Moore, S.W., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M.P. (2010). Stretchy Proteins on Stretchy Substrates: The Important Elements of Integrin-Mediated Rigidity Sensing. *Dev. Cell* 19, 194–206.

- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6181–6186.
- Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J.V. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* *116*, 2577–2583.
- Ponti, A., Machacek, M., Gupton, S.L., Waterman-Storer, C.M., and Danuser, G. (2004). Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* *305*, 1782–1786.
- Racine, V., Hertzog, A., Jouanneau, J., Salamero, J., Kervrann, C., and Sibarita, J.B. (2006). Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. *IEEE Int. Symp. Biomed. Imaging* 1020–1023.
- Racine, V., Sachse, M., Salamero, J., Fraissier, V., Trubuil, A., and Sibarita, J.B. (2007). Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells. *J Microsc* *225*, 214–228.
- del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding. *Science* *323*, 638–641.
- Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J.B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albiges-Rizo, C., Tampe, R., et al. Integrins beta1 and beta3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* *14*, 1057–1067.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J. V, and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.* *1*, 321–322.
- Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* *127*, 1015–1026.
- Schaedel, L., John, K., Gaillard, J., Nachury, M. V, Blanchoin, L., and Théry, M. (2015). Microtubules self-repair in response to mechanical stress. *Nat. Mater.* *14*, 1156–1163.
- Schaus, T.E., Taylor, E.W., and Borisy, G.G. (2007). Self-organization of actin filament orientation in the dendritic-nucleation/array-treadmilling model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 7086–7091.
- Shroff, H., Galbraith, C.G., Galbraith, J.A., and Betzig, E. (2008). Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods* *5*, 417–423.
- Siton, O., Ideses, Y., Albeck, S., Unger, T., Bershadsky, A.D., Gov, N.S., and Bernheim-Groswasser, A. (2011). Cortactin releases the brakes in actin- based motility by enhancing WASP-VCA detachment from Arp2/3 branches. *Curr. Biol.* *21*, 2092–2097.
- Smith, B. a, Padrick, S.B., Doolittle, L.K., Daugherty-Clarke, K., Corrêa, I.R., Xu, M.-Q., Goode, B.L., Rosen, M.K., and Gelles, J. (2013). Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *Elife* *2*, e01008.
- Suetsugu, S., Yamazaki, D., Kurisu, S., and Takenawa, T. (2003). Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell* *5*, 595–609.
- Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* *145*, 1009–

1026.

Sykes, C., and Plastino, J. (2010). Cell biology: actin filaments up against a wall. *Nature* *464*, 365–366.

Tkachenko, E., Sabouri-Ghomi, M., Pertz, O., Kim, C., Gutierrez, E., Machacek, M., Groisman, A., Danuser, G., and Ginsberg, M.H. (2011). Protein kinase A governs a RhoA-RhoGDI protrusion-retraction pacemaker in migrating cells. *Nat Cell Biol* *13*, 660–667.

Wang, Y., Botvinick, E.L., Zhao, Y., Berns, M.W., Usami, S., Tsien, R.Y., and Chien, S. (2005). Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* *434*, 1040–1045.

Weichsel, J., and Schwarz, U.S. (2010). Two competing orientation patterns explain experimentally observed anomalies in growing actin networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 6304–6309.

Weiner, O.D., Marganski, W. a, Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Kirschner, M.W. (2007). An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol* *5*, e221.

Weisswange, I., Newsome, T.P., Schleich, S., and Way, M. (2009). The rate of N-WASP exchange limits the extent of ARP2/3-complex-dependent actin-based motility. *Nature* *458*, 87–91.

Wolfenson, H., Meacci, G., Liu, S., Stachowiak, M.R., Iskratsch, T., Ghassemi, S., Roca-Cusachs, P., O’Shaughnessy, B., Hone, J., and Sheetz, M.P. (2016). Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices. *Nat. Cell Biol.* *18*, 33–42.

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*, 452–456.

Acknowledgements

We thank B. Tessier, R. Sterling for technical assistance; M. Garcia, A. Gautreau, M. Lagardère, T. Oré for helpful discussions. C. Poujol, S. Marais (Bordeaux Imaging Center, BIC) for technical help; F. Cordelières. (BIC) for support in kymographs analysis (Kymo Tool Box). We thank J. B. Sibarita (IINS, Bordeaux, France) for support in sptPALM analysis. We thank B. Wehrle-Haller (University of Geneva, Switzerland) for providing GFP- β 3-integrin construct. We acknowledge financial support from the French Ministry of Research and CNRS, ANR grant Integractome (GG), ANR grant FastNano (GG), Ligue Contre le Cancer (AM), Conseil Régional Aquitaine (AM), Fondation pour la Recherche Médicale (GG, AM), and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KR).

Figure legends

Figure 1.

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Nap1 in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left) (50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red). (right) Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-ArpC5A. **(C)** Same as A for mEOS-CAAX. **(D)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Nap1 (green), mEOS2-ArpC5A (orange), actin-mEOS2 (red), and mEOS-CAAX (blue) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The dotted line separates D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, which correspond to immobile trajectories. **(E)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(F)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories).

Figure 2.

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-ArpC5A density in the LM of a spreading MEF (lower left) labeled with α -actinin-GFP (upper left) obtained from a sptPALM sequence (duration: 150 s). Scale bar, 2 μm . Kymographs (right), perpendicular to the cell edge (dashed lines), generated from a sptPALM time-lapse {Shroff, 2008 #494} (frame rate 0.5 s). The horizontal axis represents spatial dimension (1 μm) and the vertical axis represents time (10 s). Kymographs allow the measurement of motions slower than the fast diffusion characterized in Fig. 1. mEOS2-ArpC5A motions are highlighted by dashed white lines with the corresponding velocity in nm/s. **(B)** Same as A but for mEOS2-Abi1. **(C)** Distribution of perpendicular movements dwell time for mEOS2-ArpC5A (red) and mEOS2-Abi1 (green). **(D)** Distribution of perpendicular movements speed for mEOS2-ArpC5A (red) and mEOS2-Abi1 (green). **(E)** Super-resolution intensity image of mEOS2-Abi1 density in the LM of a spreading MEF (lower left) labeled with α -actinin-GFP (upper left) obtained from a sptPALM sequence (duration: 150 s). Scale bar, 2 μm . Kymograph (right), along the length of the LM tip (dashed line), generated from a sptPALM time-lapse. mEOS2-Abi1 motions are highlighted by dashed white lines with the corresponding velocity in nm/s. **(F)** Distribution of lateral movements dwell time for mEOS2-Abi1 (green) and mEOS2-Abi1 in fixed cells (gray). **(G)** Distribution of lateral movements speed for mEOS2-Abi1 (green) and mEOS2-Abi1 in fixed cells (gray).

Figure 3.

(A) α -actinin-GFP fluorescent images obtained from the time-lapse of a spreading MEF treated with 1 μM of Latrunculin A. **(B)** Super-resolution intensity image of mEOS2-Abi1 density in the LM of a spreading MEF treated with LatA (lower left) labeled with α -actinin-GFP (upper left) obtained from a sptPALM sequence (duration: 150 s). Scale bar, 2 μm . Kymographs (right), along the length of the LM tip (dashed line), generated from a sptPALM time-lapse. mEOS2-Abi1 motions are highlighted by dashed white lines with the corresponding velocity in nm/s. **(C)** Distribution of lateral movements dwell time for mEOS2-Abi1 (green) and mEOS2-Abi1 in LatA treated cells (dark green). **(D)** Distribution of lateral movements speed for mEOS2-Abi1 (green) and mEOS2-Abi1 in fixed cells (dark

green). **(E)** Same as A but for mEOS2-Wave2- Δ VCA. **(F)** Same as A but for mEOS2-Wave2- Δ VCA in LatA treated cells. **(G)** Distribution of lateral movements dwell time for mEOS2-Wave2- Δ VCA (gray) and for mEOS2-Wave2- Δ VCA in LatA treated cells (dark gray). **(H)** Distribution of lateral movements speed for mEOS2-Wave2- Δ VCA (gray) and for mEOS2-Wave2- Δ VCA in LatA treated cells (dark gray). **(I)** Same as A but for mEOS2-FMNL2. **(J)** Same as A but for mEOS2-FMNL2 in LatA treated cells. **(K)** Distribution of lateral movements dwell time for mEOS2-FMNL2 (pink) and for mEOS2-FMNL2 in LatA treated cells (violet). **(L)** Distribution of lateral movements speed for mEOS2-FMNL2 (pink) and for mEOS2-FMNL2 in LatA treated cells (violet).

Figure 4.

(A) Schematic representation of the chimeric transmembrane Nap1 subunit composed of an intracellular mEOS2-Nap1 fused to N-cadherin TM domain bearing an extracellular GFP (pHluorin) plus the peptide sequence of β 3-integrin. **(B)** Super-resolution intensity image of mEOS2-TM-Nap1 in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left)(50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μ m. Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red). (right) Scale bars, 3 μ m. **(C)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Nap1 (green) and mEOS2-TM-Nap1 (violet) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The dotted line separates D values inferior to 0.011 μ m².s⁻¹, which correspond to immobile trajectories. **(D)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(E)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). **(F)** Immuno-precipitation of TM-Nap1 from MEFs cell line with stable TM-Nap1 expression using an anti-GFP antibody. Western blotting using an antibody against GFP (up) or an antibody against Wave2 (bottom). Loading order was the following (left to right): Molecular Weight; starting material control MEF; starting material TM-Nap1 cell line; Immuno-precipitation with ??? control MEF; Immuno-precipitation with ??? TM-Nap1 cell line; Immuno-precipitation with anti-GFP control MEF; Immuno-precipitation with anti-GFP TM-Nap1 cell line.

Figure 5.

(A) Schematic representation of the optical tweezer binding assay. Beads were held for 3 s on the cell surface 0.2– 0.5 μ m from the leading edge using a 3.8 mW (14 pN. μ m⁻¹) laser trap. Beads were scored as attached if they remained in focus in the plane of the membrane for 10 s after inactivation of the trap. **(B)** Binding fraction as function of the percentage of Nanobody on beads for GFP- β 3-integrin (blue) and TM-Nap1 (violet). **(C)** Representative laser trap experiment illustrating the diffusion/trapping at the LM tip of a Nanobody-bead bound on a TM-Nap1. Trajectory (right) super imposed on the DIC image of Nanobody-bead (left). **(D)** Representative laser trap experiment illustrating the lateral movements of a Nanobody-bead bound on a TM-Nap1 at the LM tip. Trajectory (right) super imposed on the DIC image of Nanobody-bead (left). **(E)** Schematic representation of the optical tweezer pulling assay. Forces induced by the laser trap (defined stiffness) were applied only to beads that were immobilized at the LM tip. The laser trap was moved towards the center of the cell with loading rate ranging from 1 to 3 μ m.s⁻¹. Beads were scored as pulled if they detached from the LM tip and moved with the laser trap. **(F)** Pulling fraction as function of the laser trap maximal escapement force determined for a defined trap stiffness. **(G)** Plot of the

displacement from the trap center against time of a Nanobody-Bead bound to TM-Nap1 in the LM (left). The outlined area in the left panel is shown at a higher magnification in the right panel, to highlight bead movements and the breaking events. From the laser trap stiffness ($98 \text{ pN } \mu\text{m}^{-1}$) could be computed the breaking forces. **(H)** Distributions of the breaking event forces for Nanobody-beads on MEFs with stable TM-Nap1 expression.

Supplementary Figure 1

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-actin in the LM of a spreading MEF obtained from a sptPALM sequence (left) (50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red). (right) Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-Abi1. **(C)** Same as A for mEOS2-Sra1. **(D)** Same as A for mEOS2-Wave2. **(E)** Same as A for mEOS2-Cyto. **(F)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Abi1 (green), mEOS2-Sra1 (blue), mEOS2-Wave2 (yellow), and mEOS2-Cyto (dark blue) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The dotted line separates D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, which correspond to immobile trajectories. **(G)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(H)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%).

Supplementary Figure 2

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Nap1 in the LM of a spreading MEF treated with 1 μM of Latrunculin A obtained from a sptPALM sequence (left) (50 Hz, duration: 150 s; inset: fluorescence image of α -actinin-GFP). Scale bars, 3 μm . Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (gray), confined (yellow) and immobile (red). (right) Scale bars, 3 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-Abi1 in LatA treated cells. **(C)** Same as A for mEOS2-CAAX in LatA treated cells. **(D)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Nap1 in LatA treated cells (dark green), mEOS2-Abi1 in LatA treated cells (green), and mEOS2-CAAX in LatA treated cells (blue) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The dotted line separates D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, which correspond to immobile trajectories. **(E)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(F)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). **(G)** Same as A for mEOS2-Wave2- ΔVCA . **(H)** Same as A for mEOS2-FMNL2. **(I)** Distribution of LOG(D) for mEOS2-Wave2- ΔVCA (gray) and mEOS2-FMNL2 (pink) at the LM tip (left) and outside the LM (right; mean for cells). The dotted line separates D values inferior to $0.011 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$, which correspond to immobile trajectories. **(J)** Fraction of diffusive, confined and immobile populations at the LM tip (left) and outside the LM (right), mean \pm SEM for cells. **(K)** Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories at the LM tip (left) and outside the LM (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%).

Supplementary Figure 3

(A) Fluorescence image of α -actinin-GFP in a spreading MEF (left). mEOS2-FMNL2 trajectories corresponding to the outlined area outside the LM in the left panel are shown at a higher magnification in the middle panel. Kymograph along the dashed line in the middle panel (right). mEOS2-FMNL2 processive motion with the corresponding velocity in nm/s. **(B)** Fluorescence image of α -actinin-GFP in a spreading MEF (left). mEOS2-FMNL2 trajectories corresponding to the outlined area at the LM tip in the left panel are shown at a higher magnification in the middle panel. Kymograph along the dashed line in the middle panel (right). mEOS2-FMNL2 processive motion with the corresponding velocity in nm/s.

Supplementary Figure 4

(A) Bead displacement from the laser center as function of the viscous drag force exerted by moving the sample at a constant velocity using a piezoelectric motor. Trap stiffness were calculated for different laser power, and corresponded to the slope of displacement versus drag force. **(B)** Trap stiffness as function of laser power.

Figure 1

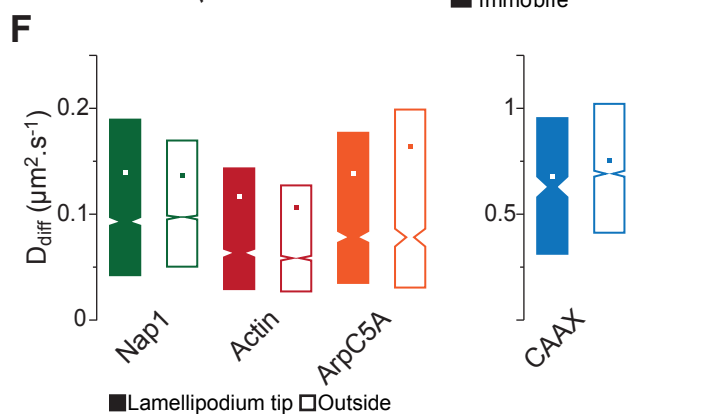
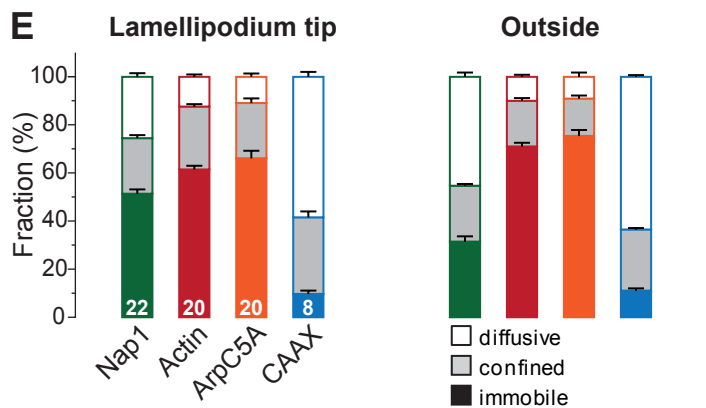
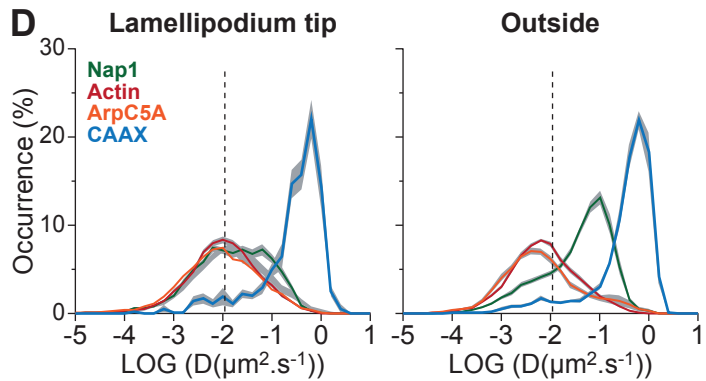
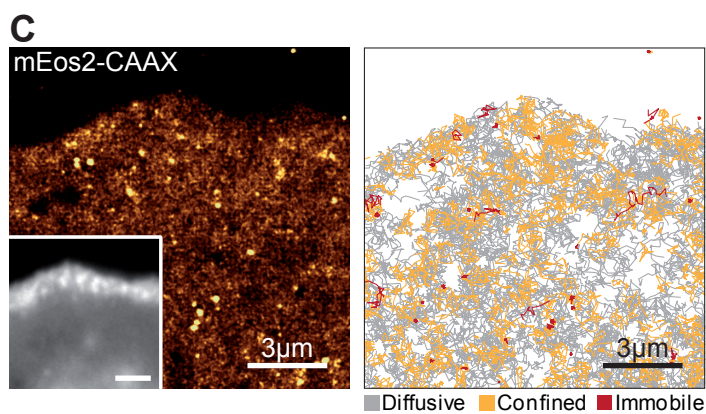
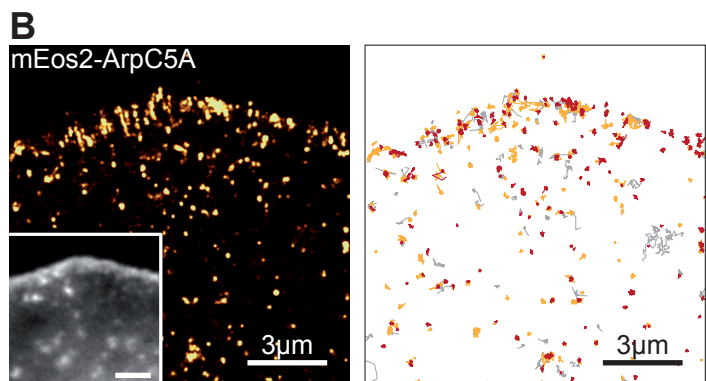
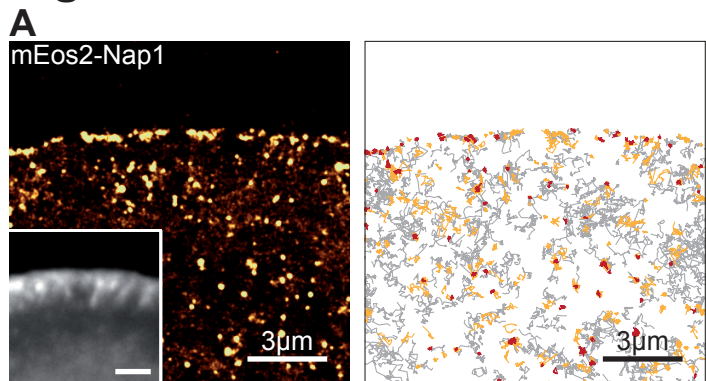


Figure 2

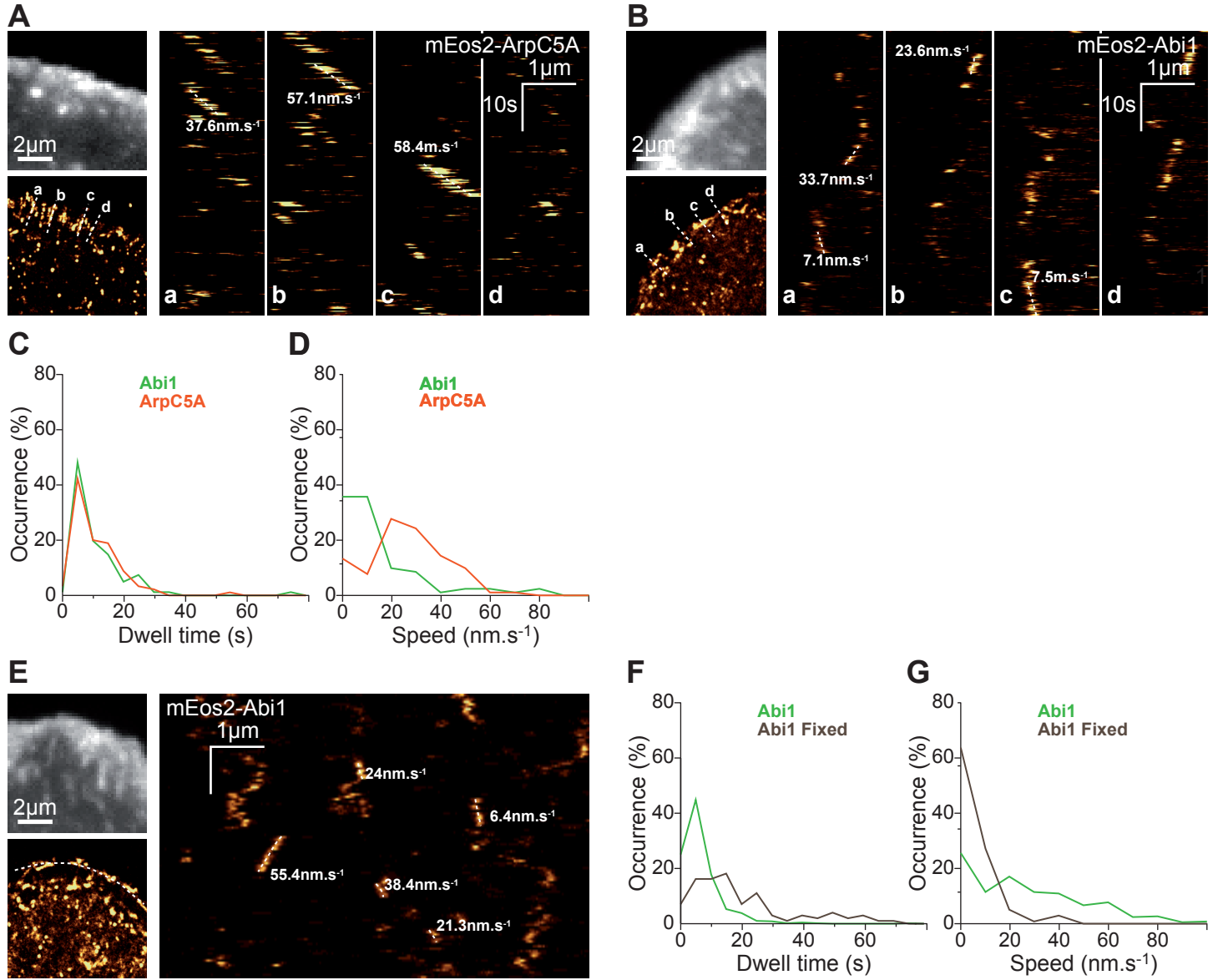
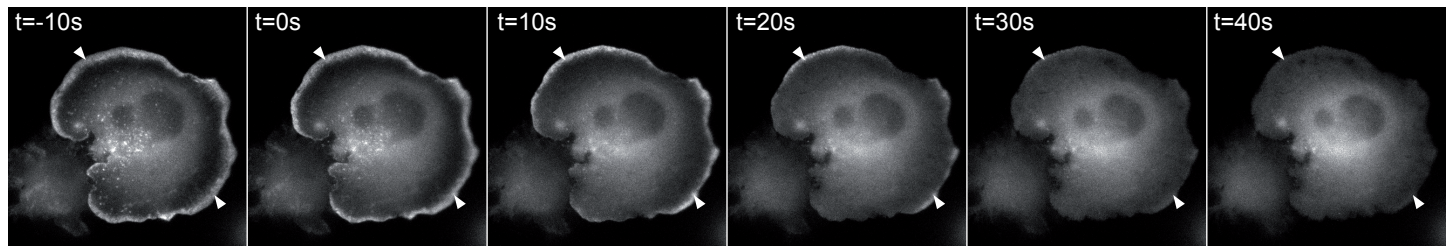


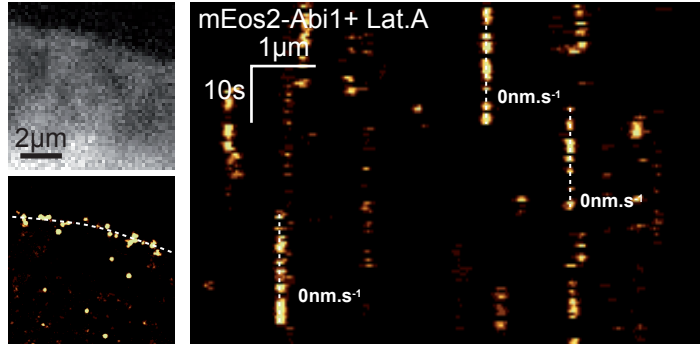
Figure 3

A

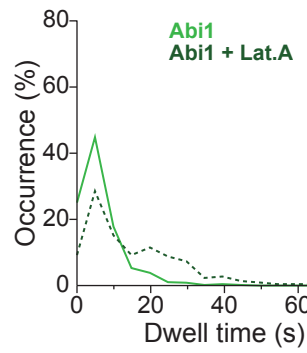


Latrunculin A (1 μ M)

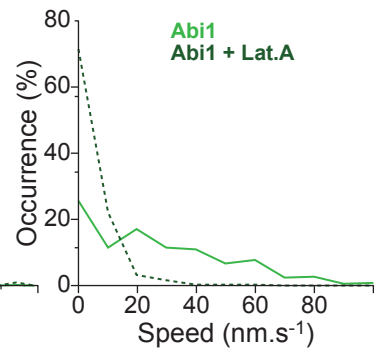
B



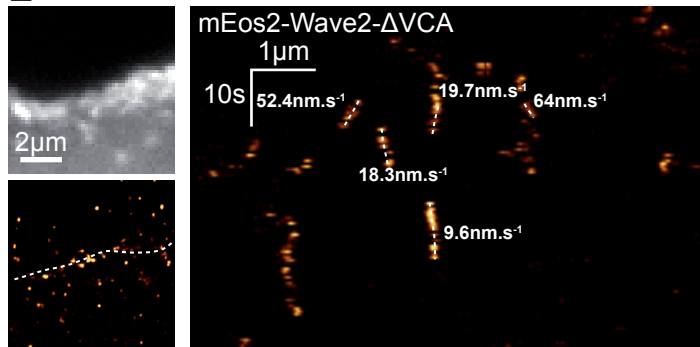
C



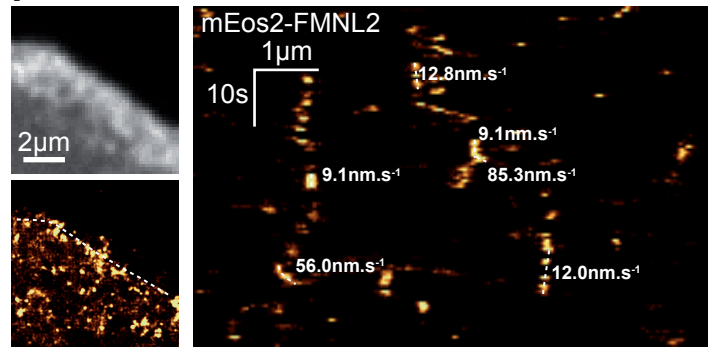
D



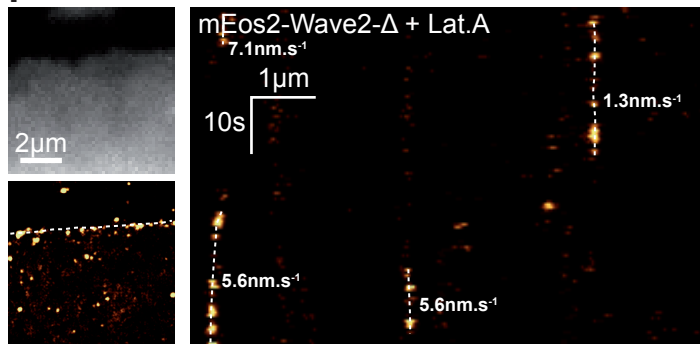
E



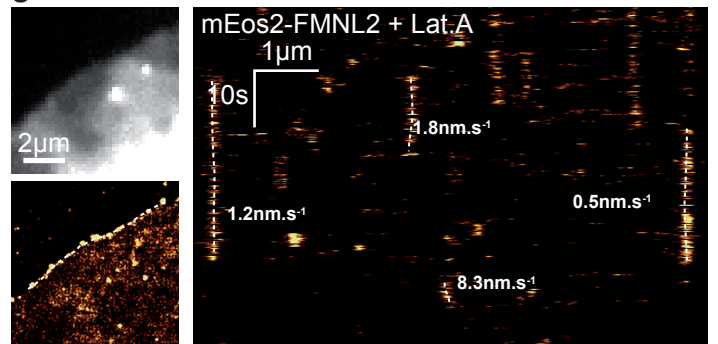
I



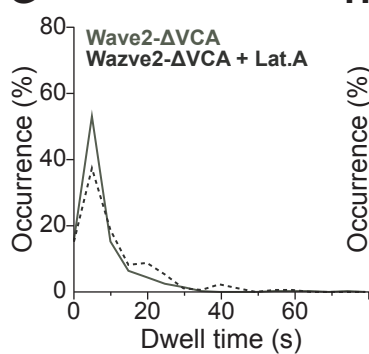
F



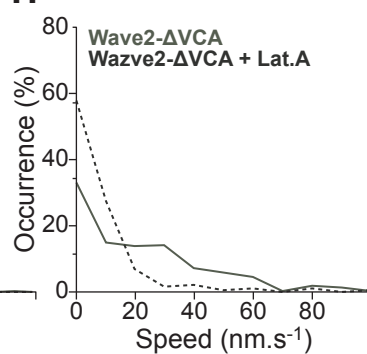
J



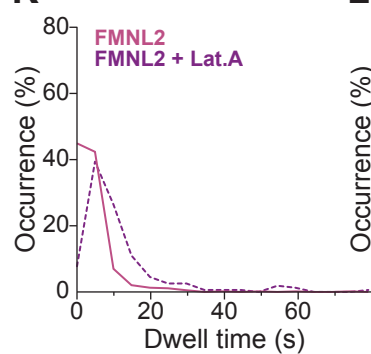
G



H



K



L

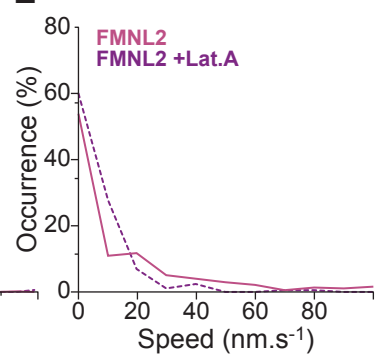
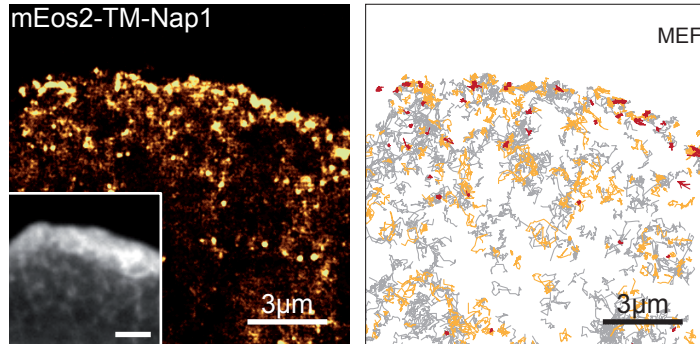


Figure 4

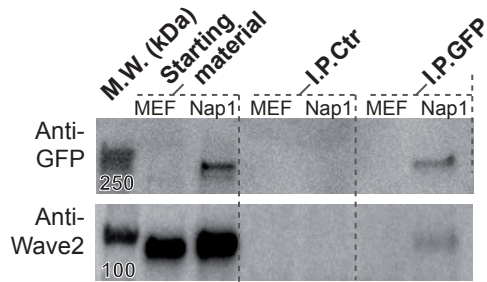
A



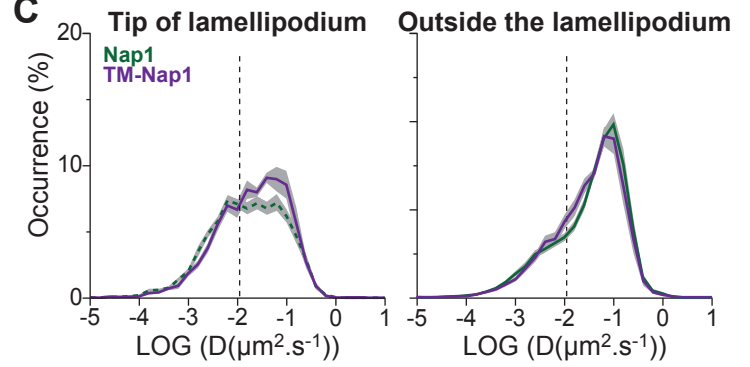
B



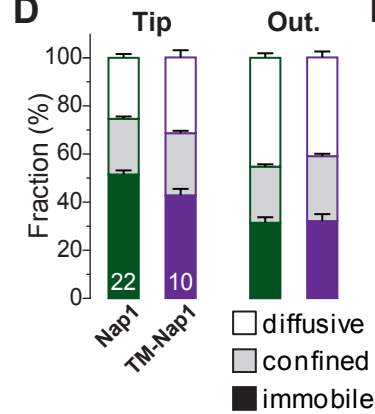
F



C



D



E

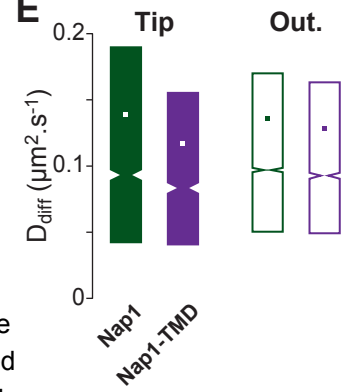
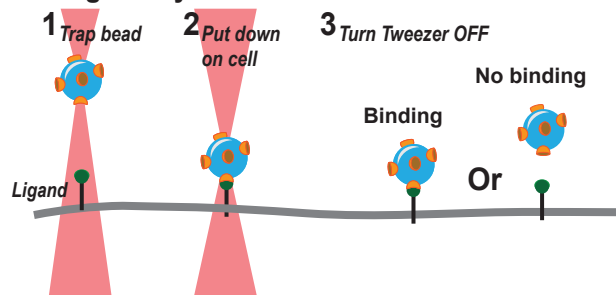
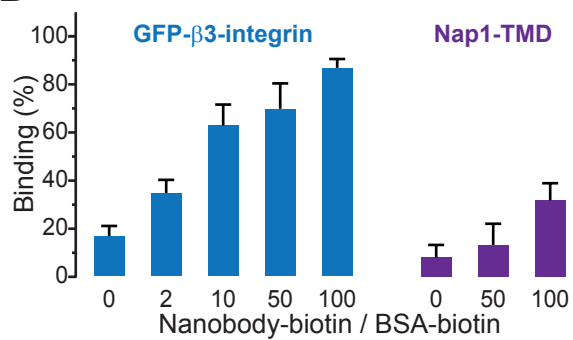


Figure 5

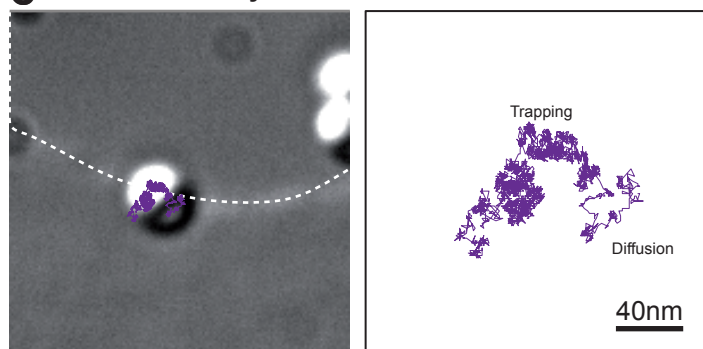
A Binding-Assay



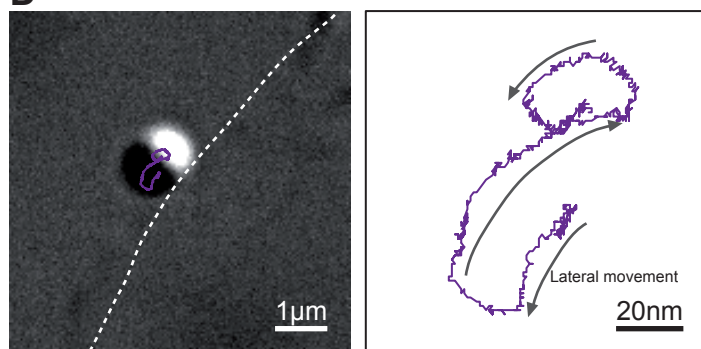
B Binding-Assay



C Diffusion-Assay

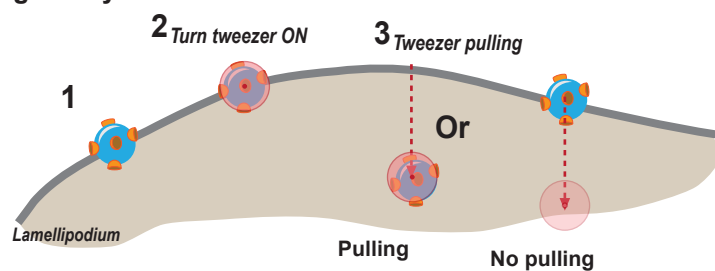


D



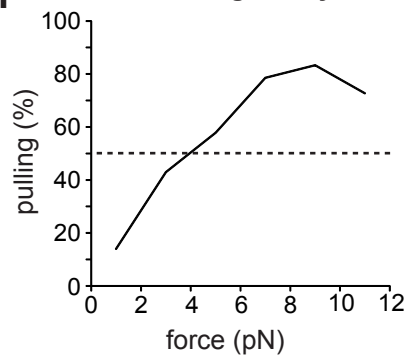
E

Pulling-Assay



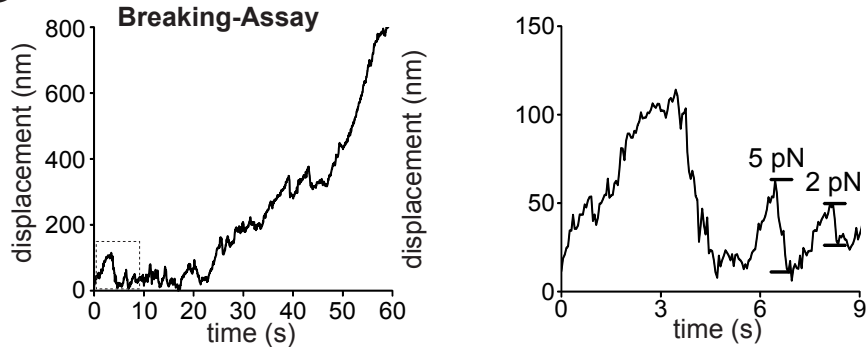
F

Pulling-Assay



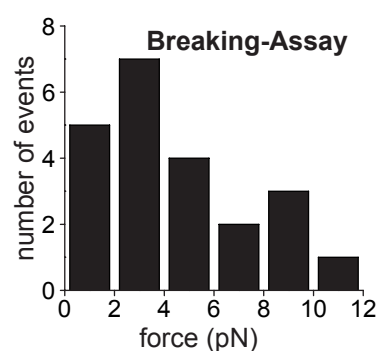
G

Breaking-Assay

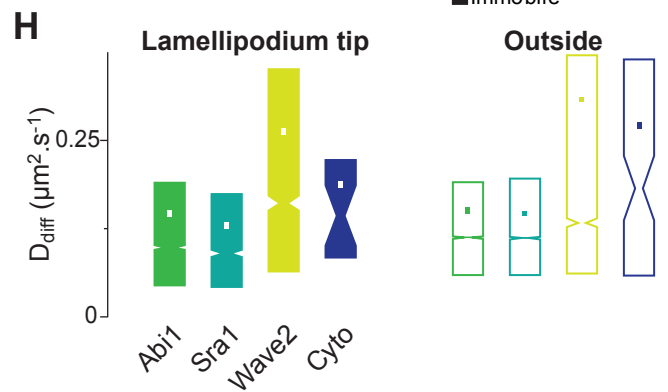
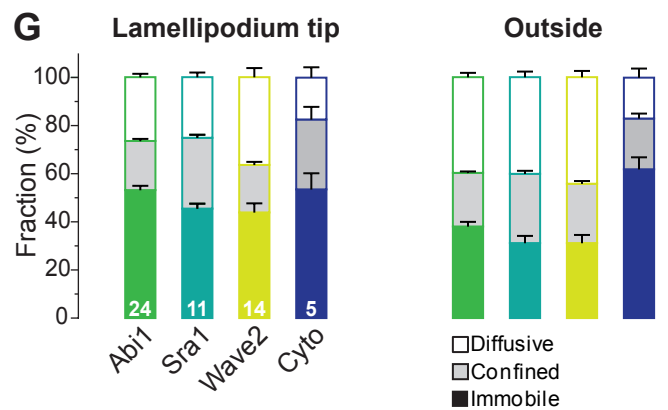
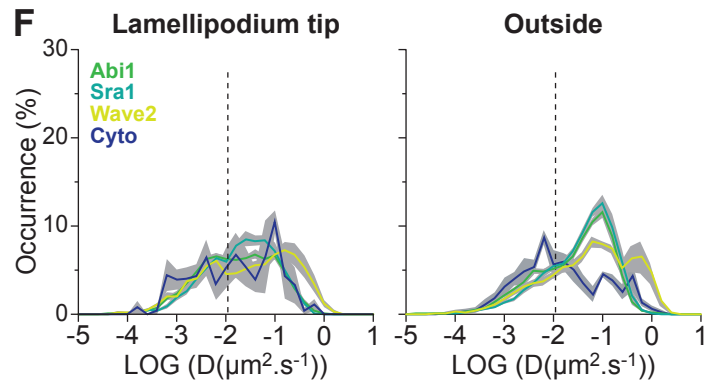
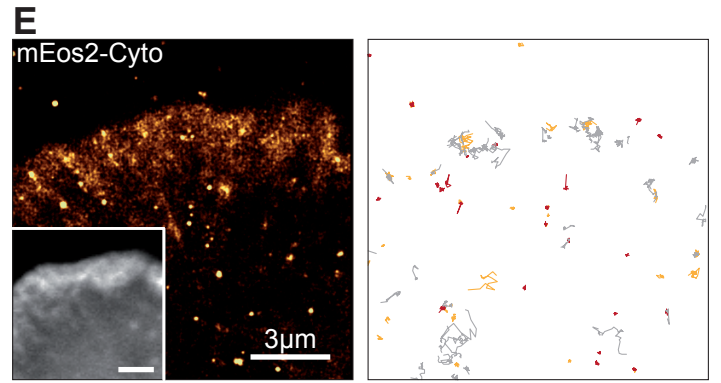
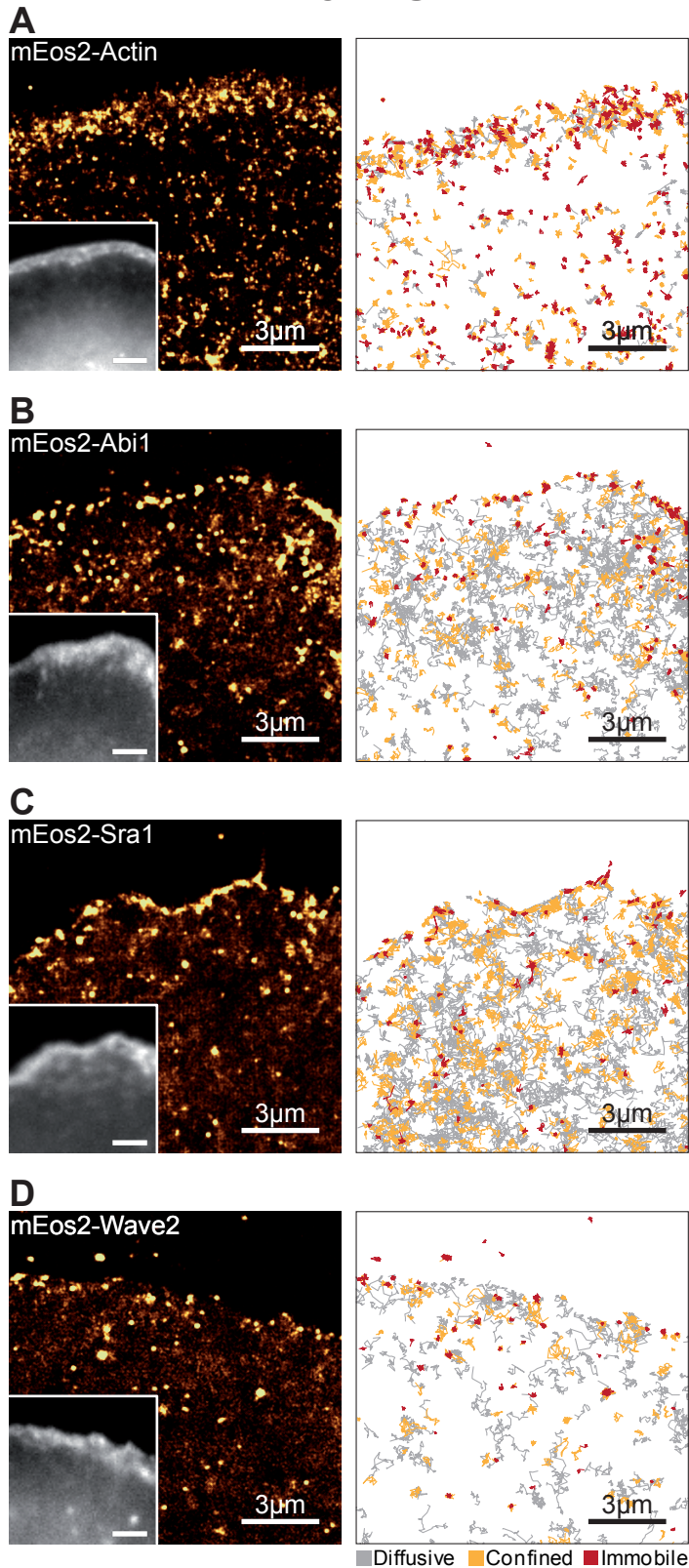


H

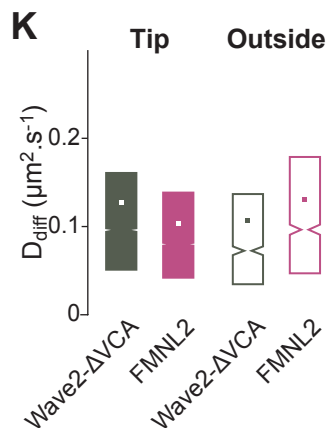
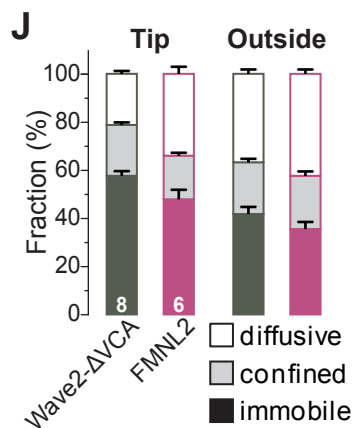
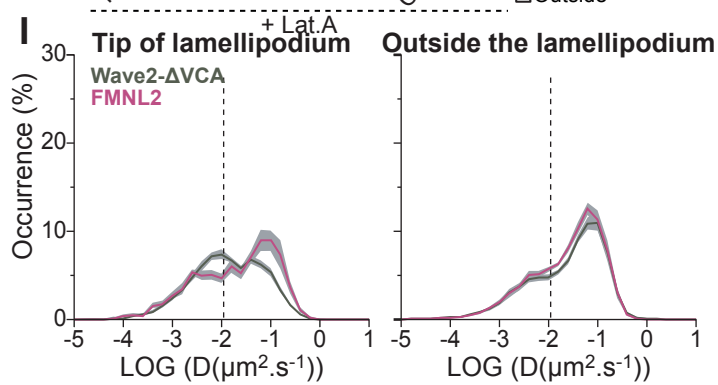
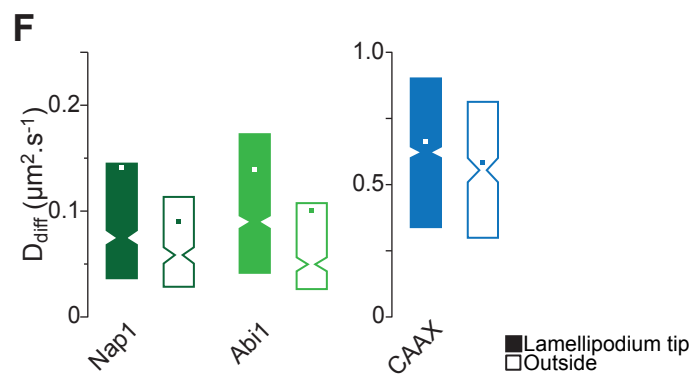
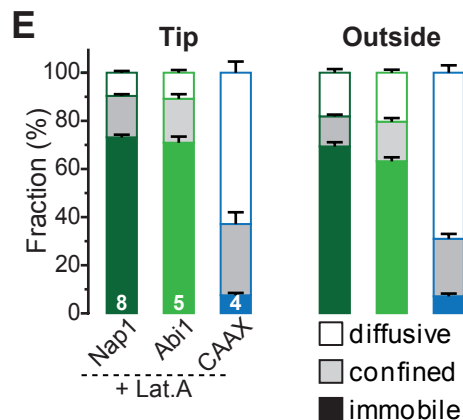
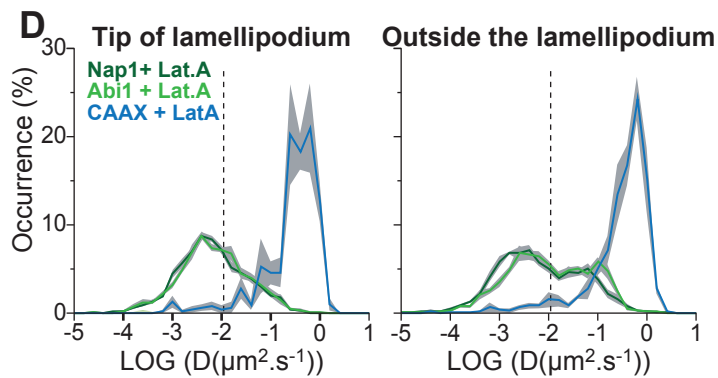
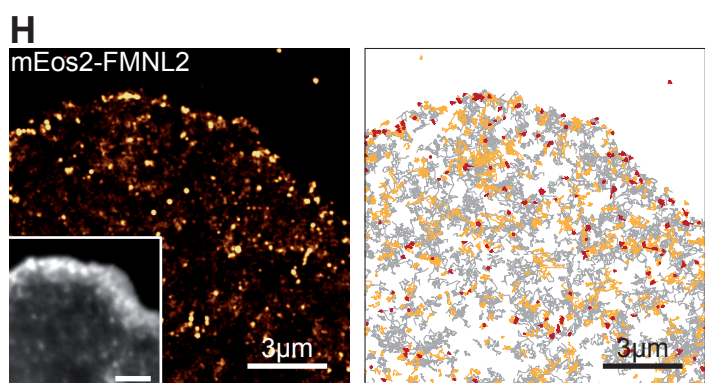
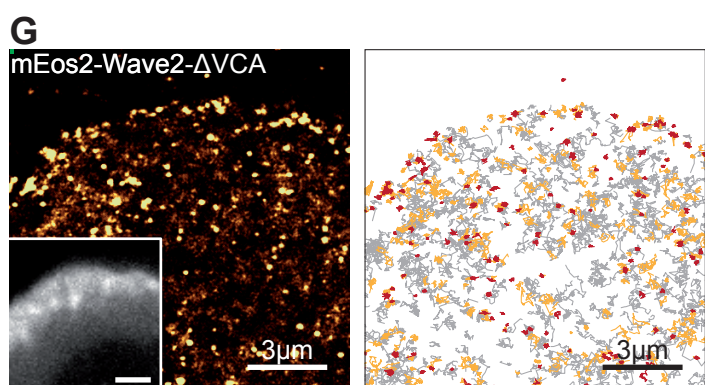
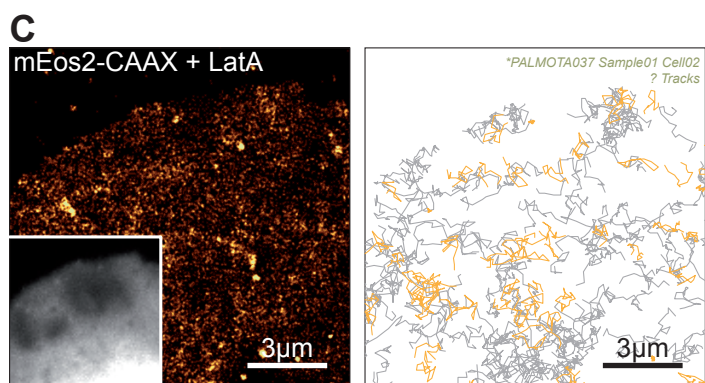
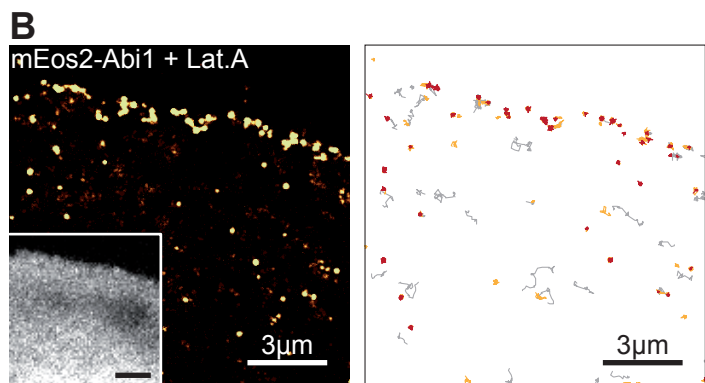
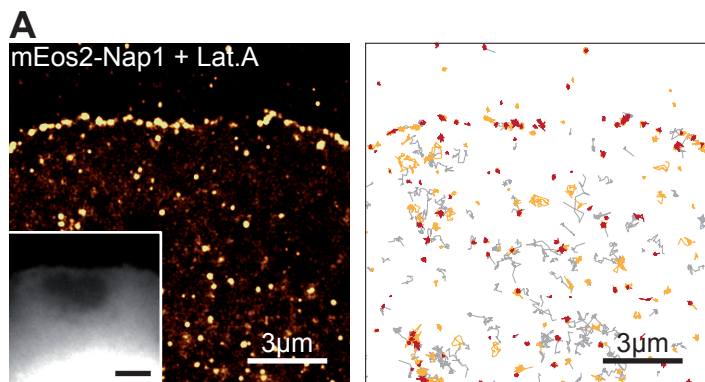
Breaking-Assay



Supplementary Figure 1

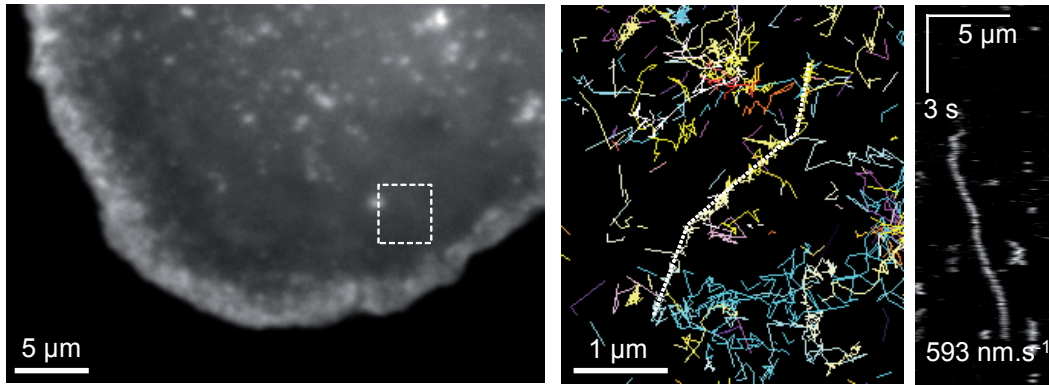


Supplementary Figure 2

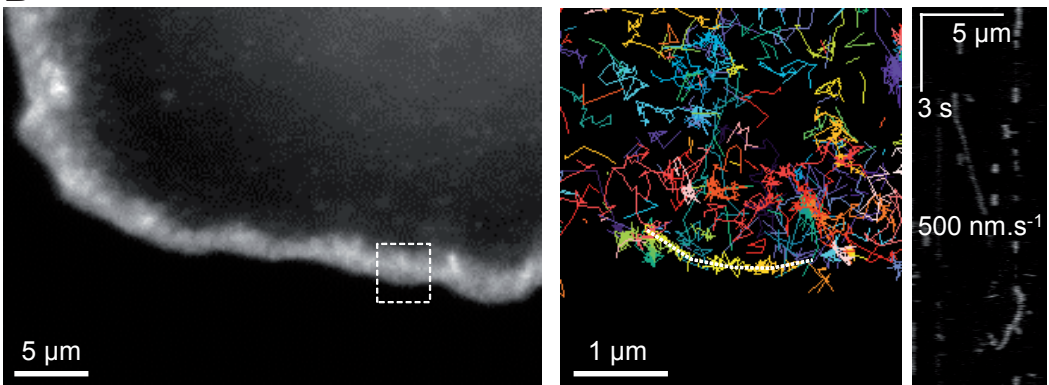


Supplementary Figure 3

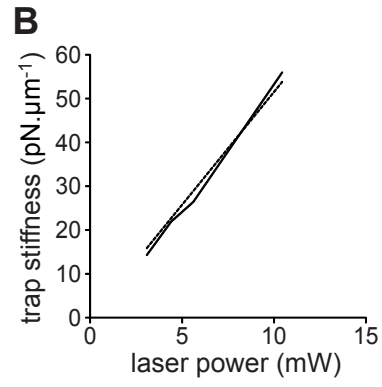
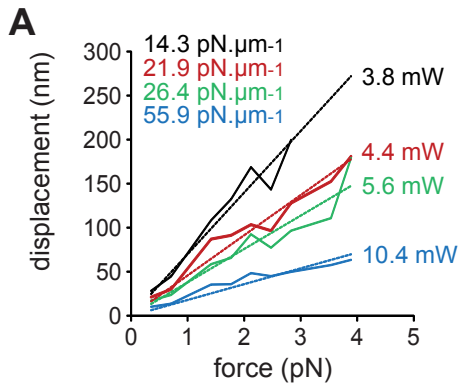
A



B



Supplementary Figure 4



Résultats

Discussion & Perspectives

Discussion & Perspectives

Le but de cette thèse était d'améliorer la compréhension de la coordination spatio-temporelle des régulateurs d'actine au sein du lamellipode lors de la migration cellulaire. Nous avons donc utilisé les avancées majeures permises par la microscopie super résolutive pour avoir accès à l'orchestration à l'échelle nanométrique de ces régulateurs. En effet, l'utilisation de ces approches innovantes de microscopies associée à l'utilisation d'autres méthodes (optogénétique et pince optique), permet de montrer que l'activité du complexe Wave est régulée par des voies enzymatiques et mécaniques. Ainsi, nous avons montré que la localisation du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode peut être régulée par des contraintes mécaniques, cette localisation permet ensuite une activation du complexe de Wave par Rac1. En effet, nous avons aussi montré qu'il y avait une corrélation entre l'état d'activation de Rac1 et son immobilisation à l'extrémité du lamellipode. Le caractère transitoire de ces immobilisations les rendrait indétectables par les approches de microscopies photoniques classiques. Cependant, certains points de ces études doivent être discutés afin de déterminer les futurs axes de recherches qui permettront la levée des questions encore en suspens.

1. La super-résolution

Les approches de microscopies super-résolutives, en particulier le PALM et le SPT utilisés dans ces études donnent accès à la dynamique individuelle des protéines au sein même de la cellule à l'échelle nanométrique. Notre étude a ainsi confirmé que l'accès à la dynamique individuelle est un avantage majeur qu'a le SPT sur la microscopie à fluorescence conventionnelle. En effet, comme nous l'avons vu plus haut, la forme constitutivement active de Rac1 présente une distribution homogène en microscopie à fluorescence conventionnelle (Del Pozo et al., 2002), alors que des phénomènes d'immobilisation à l'extrémité du lamellipode sont observables en SPT.

2. Localisation et dynamique du complexe Wave

Les différentes études portant sur la localisation des acteurs moléculaires impliqués dans la formation du lamellipode ont permis l'obtention de deux informations sur la localisation du complexe Wave pouvant sembler contradictoires : il est localisé principalement à l'extrémité du lamellipode (Hahne et al., 2001; Lai et al., 2008) et comme toutes les protéines impliquées dans la formation du lamellipode, il a une dynamique rapide (Iwasa and Mullins, 2007; Lai et al., 2008). On peut donc se demander comment Wave peut-il être à la fois localisé et dynamique ?

Grace à l'utilisation d'approches de PALM et SPT, nous avons pu accéder à la dynamique à l'échelle nanométrique du complexe Wave. Nous avons observé qu'il possède une population membranaire et cette dernière est divisée en deux portions :

- une portion diffuse et homogène sur l'ensemble de la membrane,
- une portion immobile (à 50Hz) à l'extrémité du lamellipode.

Nous pouvons donc en confirmer que le complexe Wave va diffuser à la membrane avant de s'immobiliser à l'extrémité du lamellipode par un mécanisme de diffusion/piégeage (Millius et al., 2012). Ce mécanisme de diffusion/piégeage a aussi été observé chez les intégrines dans les sites d'adhésions (Rossier et al., 2012) et chez les récepteurs AMPA au niveau des épines dendritiques (Nair et al., 2013) .

Le mécanisme de diffusion/piégeage du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode présente encore certaines zones d'ombre. En effet, l'élément permettant la localisation spécifique du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode n'a pas encore clairement été identifié. A l'heure actuelle, nous connaissons trois acteurs potentiels : IRSp53, la lamellipodine et les clathrines. **IRSp53** est un bon candidat puisqu'il est localisé à l'extrémité du lamellipode (Nakagawa et al., 2003) et il est capable *via* son domaine SH3 de lier les domaines PRD du complexe Wave localisés sur Wave2 et Abi1 (Chen et al., 2010; Miki et al., 2000). De plus, la présence d'IRSp53 semble nécessaire à l'activation de Arp2/3 (Abou-Kheir et al., 2008; Miki et al., 2000; Suetsugu et al., 2006a). Enfin, le fait qu'IRSp53 forme des homodimères, pourrait permettre la formation des dimères de VCA nécessaire à l'activation du complexe Arp2/3 (Boczkowska et al., 2014; Dominguez, 2016; Padrick et al., 2011). Cependant, des résultats préliminaires montrent qu'après un ajout de latrunculine, IRSp53 ne semble pas s'immobiliser à l'extrémité du lamellipode alors que le complexe Wave voit, quant à lui, son temps d'immobilisation augmenté. Enfin, la chaîne lourde des **clathrines** semble être aussi impliquée dans la formation du lamellipode. Elle permettrait le recrutement du complexe WAVE à la membrane plasmique *via* son interaction avec Sra1

(Anitei et al., 2010; Gautier et al., 2011). De plus, elle est aussi enrichie à l'extrémité du lamellipode et sa déplétion altère la vitesse de migration (Gautier et al., 2011). Néanmoins, des expériences préliminaires de PALM et STP réalisées sur la chaîne lourde des clathrines, ne montrent pas d'enrichissement localisé à l'extrémité du lamellipode. La **lamellipodine** peut elle aussi permettre la localisation spécifique du complexe Wave car elle est enrichie à l'extrémité du lamellipode (Law et al., 2013). Elle est capable de lier le complexe Wave *via* une liaison à Abi1 (McShea et al., 2013; Stavoe et al., 2012; Xu and Quinn, 2012) et son knockdown altère la formation du lamellipode (Michael et al., 2010). Il serait donc intéressant de lever le voile sur la protéine à l'origine de la localisation de Wave à l'extrémité du lamellipode, en testant les approches de SPT sur la lamellipodine.

3. Régulations enzymatiques du complexe Wave

Dans notre première étude, nous avons alors tenté de déterminer quelle est la voie d'activation à l'origine de la formation du lamellipode. En effet, comme nous l'avons vu, il existe un débat concernant cette voie d'activation où deux écoles s'opposent : la première propose que la formation du lamellipode soit due à l'activation du complexe Wave par Rac1, alors que la seconde propose que la formation du lamellipode soit due à l'activation des formines par RhoA. En partant du constat que « activation d'une protéine » ne veut pas nécessairement dire « action d'une protéine », car les zones d'activation et d'action peuvent être distantes. Nous avons donc, grâce à l'utilisation d'approches de PALM et SPT, cherché à déterminer quel était le comportement diffusif Rac1 et RhoA en fonction de leur état d'activation.

Dans un premier temps, nous avons montré qu'il existait une corrélation entre l'activation de Rac1 et son immobilisation à l'extrémité du lamellipode. Cette corrélation suggère qu'il y aurait un effecteur de Rac1 à l'extrémité du lamellipode. Or, comme nous l'avons vu plus haut, le complexe Wave est localisé à l'extrémité du lamellipode. Cette immobilisation localisée de Rac1 pourrait donc s'expliquer par l'activation du complexe Wave par Rac1. L'observation de RhoA, n'a, quant à elle, montré aucune corrélation entre l'immobilisation RhoA à l'extrémité du lamellipode et son état d'activation.

Le couplage du suivi de particules individuelles de Rac1, associé à l'activation par optogénétique de cette même Rac1 par Tiam1 a permis de montrer que le comportement

Discussion & Perspectives

diffusif de Rac1 reste inchangé bien qu'il y ait une augmentation de la protrusion membranaire. Ces données laissent suggérer que l'état d'activation de Rac1 est très transitoire. On peut donc supposer que l'activation de Rac1 doit se faire à l'extrémité du lamellipode et que l'état activé de Rac1 serait très transitoire. Le caractère très transitoire de ces phénomènes d'activation, expliquerait pourquoi ils ne sont pas visibles sur les approches de FRET (Machacek et al., 2009). Nous pouvons ainsi proposer un modèle où la formation du lamellipode serait due à la cascade d'activation : Rac1 - Complexe Wave - Arp2/3, localisée à l'extrémité du lamellipode.

Il reste néanmoins des zones d'ombres. En effet, il serait intéressant de déterminer quelle est la voie d'activation de Rac1, car il n'y a pas de caractérisation formelle de la GEF à l'origine de la formation du lamellipode. Dans un premier temps, il serait donc intéressant d'utiliser les mêmes approches suivies de particules individuelles sur le Tiam1 afin d'en observer le comportement diffusif et de localiser ses différents sites d'immobilisation. Cette étude permettrait de déterminer si Tiam1 est bien la GEF à l'origine de la formation du lamellipode (Connolly et al., 2005).

Dans un second temps, il serait intéressant d'observer la présence de GAP à l'extrémité du lamellipode. En effet, l'activité de ces dernières pourrait expliquer la désactivation rapide de Rac1 que laisse supposer nos résultats. L'un des premiers candidats à envisager serait srGAP1, en effet, il a été montré que cette GAP régule l'activité de Rac1 au lamellipode (Yamazaki et al., 2013).

Enfin, il serait donc intéressant d'observer par ces mêmes approches, le comportement du mutant Rac1-P29S. En effet, il a été montré que ce mutant serait impliqué dans la formation de certains mélanomes (Davis et al., 2013). Les mutants Rac1-P29S et Rac1-F28L ont été décrits comme étant des mutants à cycle rapide. Or, dans notre étude Rac1-F28L présente un comportement proche de celui de Rac1-WT, cette mutation ne semble donc pas être associée à une augmentation de l'immobilisation à l'extrémité du lamellipode. Il serait donc intéressant de déterminer si le mutant Rac1-P29S présente un profil de diffusion proche de Rac1-Wt ou Rac1-Q61L.

4. Régulations mécaniques du complexe Wave

4.1. Le flux rétrograde du complexe Wave ?

Deux études de suivi de particules individuelles ont d'ores et déjà été menées précédemment sur les NPFs. En effet, Millius et collaborateurs ont observé qu'au niveau du lamellipode, le complexe Wave flue de façon rétrograde avec le réseau d'actine (Millius et al., 2012). Alors que Smith et collaborateurs ont montré, par des approches *in vitro*, que le VCA de WASP doit se dissocier du complexe Arp2/3 pour qu'il y ait élongation du filament nouvellement nucléé (Smith et al., 2013). Afin de déterminer où avait lieu la dissociation des complexes Wave et Arp2/3, nous avons utilisé le suivi de particules individuelles sur cellules motiles. Par ces approches de PALM et SPT, nous étions à même d'observer le comportement du complexe Wave au lamellipode à l'échelle nanométrique.

Contrairement aux événements de flux rétrograde observés par Millius et collaborateurs, nos images super-résolues (de SPT) du complexe Wave montrent que ce dernier est enrichi à l'extrémité du lamellipode sans aucun flux rétrograde visible, alors que le flux de Arp2/3 est quant à lui clairement visible.

Cette donnée suggère donc que l'hypothèse d'un décrochage du VCA précédant l'élongation est plus appropriée pour décrire l'interaction des complexes Wave et Arp2/3. Dans nos expériences, il semblerait donc que le décrochage des complexes Wave et Arp2/3 ait lieu à l'extrémité du lamellipode. Les mouvements rétrogrades du complexe Wave observés par Millius et collaborateurs pourraient être dus à la liaison des complexes Arp2/3 et Wave à un filament mère sans qu'il ait polymérisation du filament fille.

4.2. Renouveau rapide du complexe Wave à l'extrémité du LM

Deux études basées sur des approches de FRAP ont montré que la dynamique rapide du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode et au niveau de virus pathogène est due à la présence du réseau d'actine (Weiner et al., 2007; Weisswange et al., 2009). L'hypothèse actuelle veut que cette dynamique rapide actine-dépendante s'explique par le décrochage du complexe Wave par le flux rétrograde (Millius et al., 2012). Mais comme nous l'avons vu plus haut, nous n'observons pas de flux rétrograde de Wave, cette hypothèse ne fonctionne donc pas dans notre modèle.

Cependant, l'observation à l'échelle nanométrique des données de suivis de particules individuelles a permis la découverte d'un comportement protéique nouveau à

Discussion & Perspectives

savoir des mouvements latéraux du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode. Ces mouvements disparaissent après l'ajout de latrunculine A, ce qui confirme qu'ils sont dus à la présence du réseau d'actine.

Ce mécanisme pourrait s'expliquer sous le paradigme du gel d'actine proposé par Sykes et Plastino (Achard et al., 2010; Sykes and Plastino, 2010). Dans ce modèle, le lamellipode serait formé d'un réseau d'actine branché et les filaments ne seraient pas nécessairement orientés perpendiculairement à l'extrémité du lamellipode (Koestler et al., 2008). Ainsi, la polymérisation de filaments transversaux aux abords de l'extrémité du lamellipode crée des contraintes mécaniques. Pour le dire simplement, en polymérisant transversalement, les filaments viendraient pousser de façon aspécifique les protéines localisées à l'extrémité du lamellipode. Cette hypothèse est confirmée par le fait que l'on observe des mouvements latéraux de la formine FMNL2 et qu'ils disparaissent après ajout de latrunculine. L'observation et l'étude des mouvements latéraux de FMNL2 permet de confirmer l'existence de filaments polymérisent transversalement à l'extrémité du lamellipode. Enfin, la présence de mouvements latéraux chez Wave- Δ VCA, confirme que ces mouvements seraient liés à des contraintes mécaniques aspécifiques et non à une liaison avec le complexe Arp2/3.

Néanmoins, la caractérisation de ces mouvements latéraux n'est pas complète, il serait intéressant de vérifier s'il y a une corrélation entre ces mouvements latéraux et la vitesse de protrusion du lamellipode en stimulant la protrusion grâce aux approches d'optogénétiques utilisées dans la première étude.

4.3. Mesure direct de forces

Les résultats précédents suggèrent l'existence de contraintes mécaniques appliquées au complexe Wave, afin de les caractériser, il nous fallait donc les sonder. Cependant, l'approche classiquement utilisée en biologie pour mesurer des forces, à savoir le couple pince optique/bille, ne pouvait pas être utilisée dans notre modèle. Nous étions face à un mur, un mur de 4 nm d'épaisseur : la membrane plasmique. En effet, l'ensemble des études réalisées *in vivo* par des pinces optiques portaient sur des protéines transmembranaires, car la liaison pince optique/protéine d'intérêt est nécessaire (Jiang et al., 2003). Dans notre cas, c'est normalement impossible car le complexe Wave n'est pas transmembranaire. Afin de sonder les contraintes mécaniques appliquées au complexe Wave, nous avons alors placé un domaine transmembranaire, associé à une GFP au niveau de la sous-unité Nap1 du complexe Wave (TM-Nap1). Grâce à cette protéine chimérique et à l'utilisation de pinces

optiques, nous sommes désormais capables de sonder les forces appliquées au complexe Wave au niveau cellulaire.

Les données obtenues par cette approche ne sont encore que préliminaires et doivent donc être répétées afin de confirmer les effets obtenus. On peut toutefois émettre des hypothèses concernant la nature des forces appliquées sur le complexe Wave. Il semblerait que Wave soit lié à l'extrémité du lamellipode avec une probabilité forte de décrochage supérieure à 4 pN alors que la force de minimale de rupture des complexes Wave et Arp2/3 semble être inférieure 2 pN. Ainsi, dans nos expériences, la force de liaison entre les complexes Arp2/3 et Wave ne serait pas suffisante pour détacher le complexe Wave de l'extrémité du lamellipode.

Des expériences similaires portant sur la même protéine chimérique mais déléetée pour le domaine Nap1, sont d'ores et déjà prévues. Ces dernières permettront de confirmer que les forces mesurées sur le complexe Wave sont bien dues à des liaisons spécifiques.

De plus, nous allons réaliser d'autres expériences de traction du complexe Wave sous d'autres configurations. Dans un premier temps, nous allons réaliser ces mêmes expériences de traction du complexe Wave en présence de latrunculine. Ces expériences permettront de mesurer les forces de liaison du complexe Wave à l'extrémité du lamellipode en étant sûr de ne pas avoir de composante liée au réseau d'actine. Puis dans un second temps, nous allons réaliser des expériences de traction du complexe Wave de manière transversale à l'extrémité du lamellipode afin de mimer les forces supposément appliquées par les filaments d'actine polymérisant transversalement (Krause et al., 2003).

Annexes

Autres travaux de thèses

Au cours de ma thèse j'ai aussi été amené à participer à une l'étude portant sur l'observation des régulateurs d'actine au niveau des épines dendritiques. Dans cette étude, nous avons utilisé la microscopie super-résolutive (PALM et dSTORM) et le suivi de protéines individuelles (SPT) pour observer l'organisation dynamique des protéines à l'origine des réseaux d'actine branchés dans les épines. Nous avons ainsi caractérisé la localisation et la dynamique de l'actine, du complexe Arp2/3, du complexe WAVE, d'IRSp53, de VASP et de Rac1. Nous avons montré que, contrairement aux structures motiles classiques telle que le lamellipode, le réseau d'actine branché dans les épines n'est pas formé aux extrémités protrusives puis incorporé dans un flux rétrograde d'actine. Ce réseau est initié à la PSD puis croît vers l'extérieur afin de générer les protrusions membranaires responsables des changements morphologiques de l'épine. Nos résultats montrent également qu'un contrôle strict de l'activité de Rac-1 est nécessaire au maintien de la morphologie des épines dendritiques et de l'architecture du réseau d'actine branché

Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion

Anaël Chazeau^{1,2,†}, Amine Mehidi^{1,2}, Deepak Nair^{1,2}, Jérémie J Gautier³, Cécile Leduc^{4,5}, Ingrid Chamma^{1,2}, Frieda Kage⁶, Adel Kechkar^{1,2}, Olivier Thoumine^{1,2}, Klemens Rottner^{6,7}, Daniel Choquet^{1,2}, Alexis Gautreau³, Jean-Baptiste Sibarita^{1,2} & Grégory Giannone^{1,2,*}

Abstract

Actin dynamics drive morphological remodeling of neuronal dendritic spines and changes in synaptic transmission. Yet, the spatiotemporal coordination of actin regulators in spines is unknown. Using single protein tracking and super-resolution imaging, we revealed the nanoscale organization and dynamics of branched F-actin regulators in spines. Branched F-actin nucleation occurs at the PSD vicinity, while elongation occurs at the tip of finger-like protrusions. This spatial segregation differs from lamellipodia where both branched F-actin nucleation and elongation occur at protrusion tips. The PSD is a persistent confinement zone for IRSp53 and the WAVE complex, an activator of the Arp2/3 complex. In contrast, filament elongators like VASP and formin-like protein-2 move outwards from the PSD with protrusion tips. Accordingly, Arp2/3 complexes associated with F-actin are immobile and surround the PSD. Arp2/3 and Rac1 GTPase converge to the PSD, respectively, by cytosolic and free-diffusion on the membrane. Enhanced Rac1 activation and Shank3 over-expression, both associated with spine enlargement, induce delocalization of the WAVE complex from the PSD. Thus, the specific localization of branched F-actin regulators in spines might be reorganized during spine morphological remodeling often associated with synaptic plasticity.

Keywords Branched F-actin regulators; dendritic spine; postsynaptic density; single protein tracking; super-resolution microscopy

Subject Category Neuroscience

DOI 10.15252/emboj.201488837 | Received 28 April 2014 | Revised 13 August 2014 | Accepted 25 August 2014

Introduction

In the brain, most excitatory postsynapses are located in small membrane extensions called dendritic spines. The morphological remodeling of spines is coupled to changes in synaptic transmission. This constitutes a structural plasticity often associated with learning and memory (Cingolani & Goda, 2008). Indeed, long-term potentiation and depression are correlated with spine head enlargement and shrinkage, respectively (Matsuzaki *et al*, 2004; Okamoto *et al*, 2004; Zhou *et al*, 2004). Spines are genuine motile structures both in neuronal cultures and in intact brains (Fischer *et al*, 1998; Dunaevsky *et al*, 1999; Lendvai *et al*, 2000; Berning *et al*, 2012). Those movements and morphological remodeling rely on the assembly, stabilization and disassembly of F-actin networks concentrated in spines (Okamoto *et al*, 2004; Cingolani & Goda, 2008; Honkura *et al*, 2008; Bosch *et al*, 2014).

Essential F-actin regulators are located in spines (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). Among them, regulators of branched F-actin networks critically control spinogenesis, spine morphology, synaptic transmission, synaptic plasticity and cognitive functions. These include not only the Rho-family GTPase Rac1 (Tashiro & Yuste, 2004; Xie *et al*, 2007; Haditsch *et al*, 2009; Fortin *et al*, 2010), the membrane-associated I-BAR protein IRSp53 (Bockmann *et al*, 2002; Choi *et al*, 2005), but also their downstream targets, the WAVE complex (Kim *et al*, 2006; Soderling *et al*, 2007), a nucleation promoting factor, leading to Arp2/3 complex activation and nucleation of branched F-actin networks (Hotulainen *et al*, 2009; Korobova & Svitkina, 2010; Kim *et al*, 2013). Control of F-actin length in spines is then ensured by elongation factors such as VASP and formins (Hotulainen *et al*, 2009; Lin *et al*, 2010) and by capping proteins (Korobova & Svitkina, 2010; Fan *et al*, 2011), while F-actin turnover depends on severing proteins such as ADF/cofilin

1 Interdisciplinary Institute for Neuroscience, University Bordeaux, UMR 5297, Bordeaux, France

2 CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience, UMR 5297, Bordeaux, France

3 CNRS UPR3082, Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales, Gif-sur-Yvette Cedex, France

4 University Bordeaux, LP2N, Talence, France

5 CNRS & Institut d'Optique, LP2N, Talence, France

6 Division of Molecular Cell Biology, Zoological Institute, Technical University Braunschweig, Braunschweig, Germany

7 Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

*Corresponding author. Tel: +33 5 57 57 57 44; E-mail: gregory.giannone@u-bordeaux2.fr

†Present address: Cell Biology, Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

(Gu *et al*, 2010; Rust *et al*, 2010; Bosch *et al*, 2014). Consistent with a critical role of branched F-actin regulators during synaptic transmission, neurological disorders associated with abnormal spine morphologies are triggered by genetic deregulation of proteins, such as Shank3 and FMRP, which directly interact with subunits of the WAVE and Arp2/3 complexes (Schenck *et al*, 2003; Durand *et al*, 2012; De Rubeis *et al*, 2013; Han *et al*, 2013).

Those F-actin regulators also control the formation of membrane protrusions such as the lamellipodium (Hotulainen & Hoogenraad, 2010), suggesting that assembly and disassembly of branched F-actin networks in spines use similar mechanisms. The spatiotemporal coordination of F-actin regulators in the lamellipodium determines the polarity, architecture and movements of branched F-actin networks (Pollard & Cooper, 2009). Nucleation events driven by the WAVE complex and elongation events driven by VASP and formin-like proteins-2 (FMNL2) are all localized at protrusion tips (Rottner *et al*, 1999; Miki *et al*, 2000; Breitsprecher *et al*, 2011; Block *et al*, 2012). Consequently, Arp2/3 complexes and actin monomers are incorporated into branched F-actin networks growing against the lamellipodium tip, while ADF/cofilin associates with the entire network inducing F-actin severing (Iwasa & Mullins, 2007; Lai *et al*, 2008). This organization leads to a concerted retrograde flow of branched F-actin networks (Pollard & Cooper, 2009). However, within micron-size spines, conventional fluorescent microscopy cannot achieve the spatial resolution required to unveil the mechanism of branched F-actin network formation.

Recent studies used super-resolution light microscopy to describe the nanoscale organization of post-synaptic scaffolds and neurotransmitter receptors (Dani *et al*, 2010; Fukata *et al*, 2013; MacGillavry *et al*, 2013; Maglione & Sigrist, 2013; Nair *et al*, 2013). In this study, we used single protein tracking (SPT) and super-resolution microscopy (Betzig *et al*, 2006; Manley *et al*, 2008; Van de Linde *et al*, 2011; Rossier *et al*, 2012) to decipher the nanoscale organization and dynamics of branched F-actin regulators within mature spines. Here, we asked whether distinct regulators of branched F-actin are compartmentalized in dendritic spines and how their spatiotemporal coordination determines the formation and movements of branched F-actin networks. We found that the PSD is the convergence zone where proteins involved in branched F-actin nucleation meet with highest probability. In contrast, proteins triggering F-actin elongation are concentrated at the tips of transient membrane protrusions moving away from the PSD. We also demonstrated that this specific organization of F-actin regulators could be modified in concert with changes in spine morphology. Thus, the nanoscale reorganization of branched F-actin regulators could be the basis of spine morphological remodeling driven by F-actin polymerization during structural plasticity and neurological disorders.

Results

F-actin and the Arp2/3 complex are not exhibiting concerted rearward flow in spines

In classical protrusive structures, including lamellipodia of motile cells and neuronal growth cones, F-actin movements are highly polarized rearward, fast and driven by F-actin growth against the

tip of membrane protrusions (Ponti *et al*, 2004; Medeiros *et al*, 2006; Giannone *et al*, 2007; Lai *et al*, 2008). Strong evidence that F-actin rearward movements in spines are powered by the same mechanism is lacking. Previous studies reported that the velocity of the bulk rearward F-actin flow is slow (Honkura *et al*, 2008; Frost *et al*, 2010). In addition, tracking of individual F-actin revealed both slow rearward and forward movements (Tatavarty *et al*, 2009, 2012) and faster rearward movements (Frost *et al*, 2010). Therefore, the exact organization, polarity and dynamics of F-actin networks in spines are still unclear. The Arp2/3 complex is involved in dendritic spine formation, suggesting that the continual nucleation of branched F-actin networks maintains the globular shape of the spine head (Hotulainen *et al*, 2009; Korobova & Svitkina, 2010; Lippi *et al*, 2011; Kim *et al*, 2013). In order to specifically determine the dynamics of branched F-actin networks, we compared F-actin and Arp2/3 movements in mature spines and growth cones of primary rat hippocampal neurons. We used actin and the ArpC5A subunit of the Arp2/3 complex fused to a photo-switchable mEOS2 fluorescent protein. We performed single protein tracking of Arp2/3 and actin after mEOS2 photoactivation (sptPALM) (Manley *et al*, 2008). To measure only the slow mEOS2 movements, we used low-frequency and long-exposure acquisition (2 Hz, 250 ms) as previously described (Tatavarty *et al*, 2009; Frost *et al*, 2010). We analyzed trajectories longer than 4 s and measured start-to-end velocities (resolution > 6 nm s⁻¹, see Materials and Methods). In the growth cone, actin-mEOS2 and mEOS2-ArpC5A movements were fast and highly polarized rearward (Fig 1A, B and D; actin 52 nm s⁻¹, ArpC5A 55 nm s⁻¹). This fast flow of F-actin was drastically decreased by Cytochalasin D treatment (CD) (Fig 1D; actin 21 nm s⁻¹). These results confirmed that F-actin movements in growth cones are largely powered by actin polymerization against the tip of membrane protrusions. In contrast, actin-mEOS2 and mEOS2-ArpC5A movements in spines were slow and not polarized rearwards (Fig 1A, B and D; actin 21 nm s⁻¹, ArpC5A 22 nm s⁻¹). Those results were not a bias of the experimental spatial and temporal resolutions. Indeed, F-actin movements in small spine precursors, dendritic filopodia, were polarized rearward and faster than in spines (Fig 1C and D; actin 34 nm s⁻¹). In addition, CD treatment, which stops membrane protrusions in spines (Fischer *et al*, 1998; Dunaevsky *et al*, 1999), decreased the velocity of F-actin movements to the level measured in fixed cells (Fig 1C and D; actin 14 nm s⁻¹). Altogether, those results suggest that in spines, the slow and none polarized motions of branched F-actin networks may not be primarily driven by F-actin growth against protrusion tips.

Spine motility is supported by finger-like protrusions

There is an inverse relationship between the rate of F-actin flow and membrane protrusion (Giannone *et al*, 2004). Thus, the slow rate of F-actin and Arp2/3 complex movement implies that F-actin elongation will lead to efficient pushing forces triggering membrane protrusions and spine motility (Fischer *et al*, 1998; Dunaevsky *et al*, 1999; Lendvai *et al*, 2000; Berning *et al*, 2012). To determine the shape of membrane protrusions in spines, we acquired single-molecule-based super-resolution intensity images in live neurons using PALM (Betzig *et al*, 2006; Shroff *et al*, 2008). We used stronger laser illumination and fast acquisition frequency (100 Hz) to

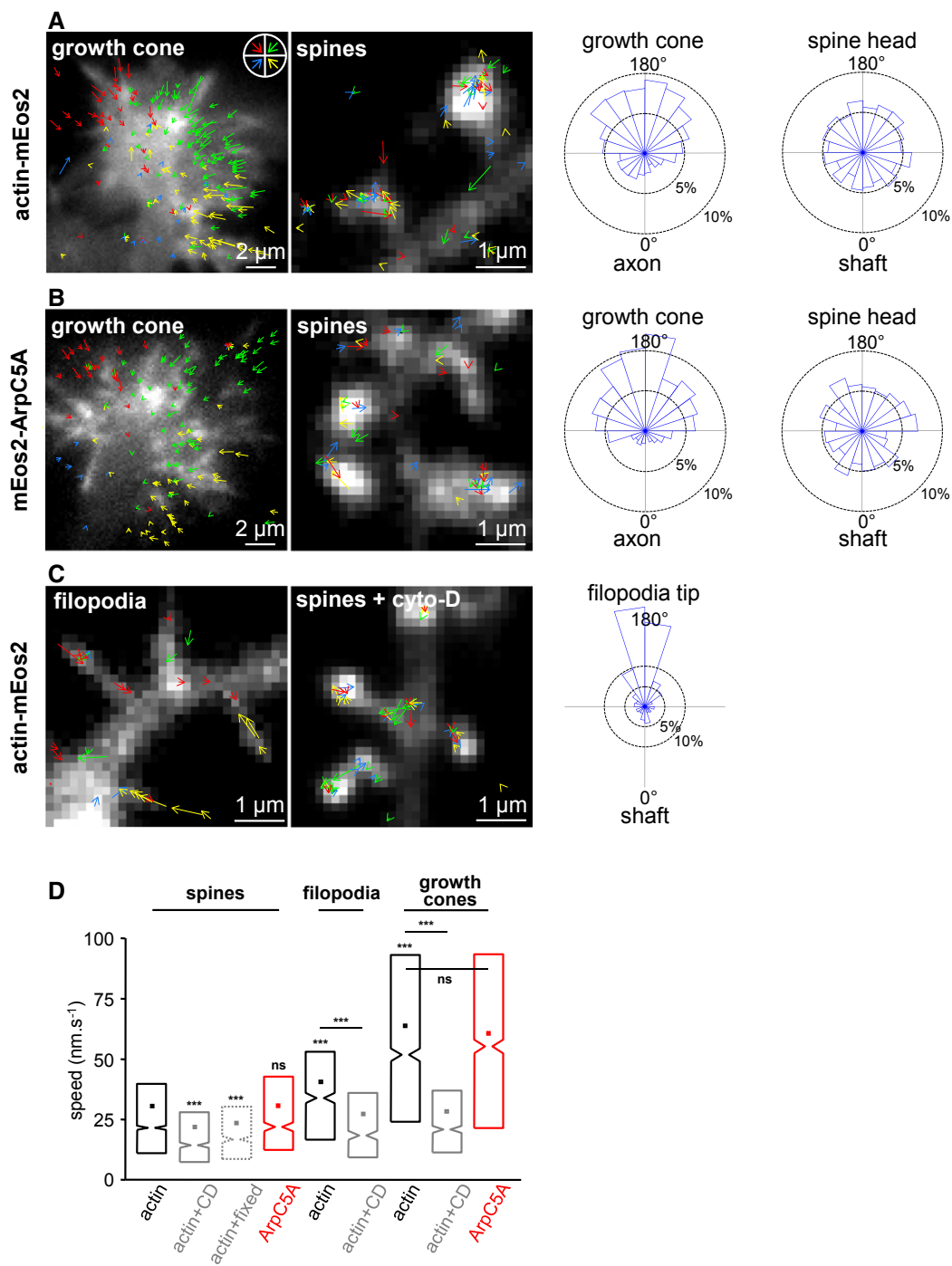


Figure 1. Arp2/3 complex and F-actin movements are not polarized in spines.

A Left panels: actin-mEOS2 trajectories acquired using low-frequency (2 Hz) sptPALM sequence in a growth cone (3–4 DIV) (left) and in spines (17–21 DIV) (right). Trajectories are represented by arrowheads starting at the beginning and finishing at the end of tracks. Arrowheads are color-coded to show their directions and superimposed on actin-mEOS2 low-resolution fluorescent image (gray scale). Scale bars, 2 μ m (left), 1 μ m (right). Right panels: polar histograms of the angular distribution of trajectories in growth cones (left) and dendritic spines (right).

B Same as (A) for mEOS2-ArpC5A.

C Left panels: same as (A) for actin-mEOS2 in dendritic filopodia (9–11 DIV) (left) and in spines (17–21 DIV) treated with CD (right). Scale bars, 1 μ m. Right panel: polar histogram of the angular distribution of trajectories in dendritic filopodia.

D Box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25–75%) of speed distributions. All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments. Spines: actin (19 cells/2,665 trajectories), actin + CD (7/841), actin fixed (5/699), ArpC5A (4/665); filopodia: actin (7/730), actin + CD (6/512); growth cone: actin (11/1,699), actin + CD (4/780), ArpC5A (16/1,565). Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed, non-parametric Mann–Whitney rank sum test. The different conditions were compared with the spine actin condition. Otherwise, a black line indicates which conditions were compared. The resulting *P*-values are indicated as follows: ns, *P* > 0.05; ****P* < 0.001.

increase the rate of mEOS2 photobleaching and the frequency of localization. This protocol allowed localizing most mEOS2 molecules more rapidly (~80 s). Fast-moving mEOS2 outlined the spine shape, while confined and immobile mEOS2 accumulated in sub-spine domains (Fig 2). We used cytosolic mEOS2 as a volume reporter and actin-mEOS2 to localize the entire F-actin network (Fig 2A and Supplementary Fig S1A). Strikingly, ~70% of spines (141/203) that appeared globular or cup shaped when imaged at low resolution are in fact more complex structures composed of several finger-like extensions when imaged using super-resolution.

To determine whether those membrane extensions corresponded to protrusions powered by F-actin polymerization, we imaged F-actin elongators. VASP and FMNL2 elongate F-actin barbed ends and localize at the tips of plasma membrane protrusions including lamellipodia and filopodia (Rottner *et al*, 1999; Bear *et al*, 2002; Breitsprecher *et al*, 2011; Block *et al*, 2012). VASP is located in spines and regulates spine morphology and enlargement (Ackermann & Matus, 2003; Lin *et al*, 2010), and FMNL2 is strongly expressed in neurons (Gardberg *et al*, 2010). Live super-resolution intensity images showed that mEOS2-VASP and FMNL2-mEOS2 accumulated at the tips of the finger-like extensions in spines (Fig 2B and C). Time-lapse recordings demonstrated that those extensions corresponded to protrusions, lost after CD treatment, and moving forward with velocities close to the ones measured for lamellipodia and filopodia (~60 nm s⁻¹; 22 protrusions) (Svitkina *et al*, 2003; Giannone *et al*, 2004) (Supplementary Fig S2). We used direct stochastic optical reconstruction microscopy (dSTORM) (Van de Linde *et al*, 2011) and demonstrated that endogenous VASP and FMNL2 were also enriched at the tips of finger-like protrusions in spines (Supplementary Fig S1B and C). Thus, spine motility is supported by multiple finger-like protrusions driven by the polarized elongation of F-actin barbed ends.

F-actin elongators delocalize outwards from the PSD while nucleation factors localize at the PSD

To examine the distribution of F-actin elongators relative to the PSD, we performed sequential dual-color super-resolution microscopy using PALM for mEOS2-VASP and dSTORM for endogenous PSD-95 (Fig 3A). We quantified the scattering of PSD-95 within spines by measuring the distances of each detection from the centroid of all detections (see Materials and Methods). PSD-95 detections displayed low scattering within the spines (185 nm) and were mainly grouped into a single domain (long/short axis, 269/114 nm; see Materials and Methods) (Fig 3D and E). Consistent with live experiments, mEOS2-VASP invariably formed nano-domains (111/66 nm) at the tip of the finger-like protrusions (Fig 3A and D). Distances of mEOS2-VASP detections from the centroid of PSD-95 showed that VASP was mainly localized away from the PSD-95 domain (383 nm; Fig 3E). Thus, VASP-mediated elongation of F-actin barbed ends is frequently directed outwards from the PSD.

Working hypotheses on F-actin dynamics in spines were built in analogy with the lamellipodium (Hotulainen & Hoogenraad, 2010). In this structure, the WAVE complex that activates Arp2/3-mediated nucleation is localized, like VASP and FMNL2, at the tip of membrane protrusions (Miki *et al*, 2000; Innocenti *et al*, 2004; Steffen *et al*, 2004). The same organization in dendritic spines would imply that the WAVE complex is also localized at the tip of

membrane protrusions. The WAVE complex is stable and composed of five proteins: WAVE, Abi, Nap, Brick and Sra (Gautreau *et al*, 2004; Lebensohn & Kirschner, 2009). WAVE and Abi1 are located in spines (Proepper *et al*, 2007; Soderling *et al*, 2007), consistent with the involvement of the WAVE complex in shaping dendritic spine morphology, synaptic plasticity and behavior (Soderling *et al*, 2003, 2007; Kim *et al*, 2006). We used mEOS2-Abi1 to determine the sub-spine localization of the WAVE complex. Surprisingly, dual-color PALM/dSTORM experiments demonstrated that mEOS2-Abi1 detections formed a domain having the same size (248/112 nm) and overlapping with the PSD-95 domain (Fig 3B, D and E). Likewise, live super-resolution intensity images showed that mEOS2-Abi1 was not localized at protruding tips, but clustered into a single domain (Supplementary Fig S3A and D). Since Abi1 could also be part of other protein complexes (Proepper *et al*, 2007), we performed experiments using Nap1, another subunit of the WAVE complex, to further support the nanoscale organization of the WAVE complex. Live super-resolution intensity images and dual-color PALM/dSTORM experiments demonstrated that mEOS2-Nap1, like mEOS2-Abi1, was not localized at protruding tips, but also clustered into a single central domain having the same size and overlapping with PSD-95 (Fig 3D and E, Supplementary Figs S3 and S5). Endogenous WAVE proteins, imaged using dSTORM, also displayed clusterization within the spine (Supplementary Fig S4A).

IRSp53, which binds and regulates the WAVE complex, also localizes at the tip of lamellipodia and filopodia (Miki *et al*, 2000; Nakagawa *et al*, 2003; Suetsugu *et al*, 2006). This membrane and F-actin binding protein encompasses an I-BAR domain binding to outwardly curved membrane protrusions (Scita *et al*, 2008). IRSp53 is concentrated in spines and regulates spine morphology (Bockmann *et al*, 2002; Choi *et al*, 2005). Live super-resolution intensity images and dual-color PALM/dSTORM experiments demonstrated that mEOS2-IRSp53 also formed a single domain co-localizing with PSD-95 (Supplementary Fig S6). These results suggest that a membrane domain apposed to the PSD is targeted by IRSp53 and the WAVE complex and is involved in the initiation of branched F-actin networks.

In lamellipodia, the Arp2/3 complex is incorporated in F-actin networks at the tip of membrane protrusions and flows inward from the tip (Iwasa & Mullins, 2007; Lai *et al*, 2008). The co-localization of PSD-95, the WAVE complex and IRSp53 at the center of the spine, together with the slow and unpolarized motions of branched F-actin networks (Fig 1), suggested that Arp2/3 nucleation is not occurring at protrusion tips in spines. Indeed, experiments performed with mEOS2-ArpC5A showed that Arp2/3 is forming multiple nano-domains (97/63 nm) partially over-lapping with PSD-95 (Fig 3C-E, Supplementary Figs S3 and S4). Altogether, our data support a model where branched F-actin networks are nucleated at or close to the PSD, providing barbed ends that are then elongated outwards from the PSD. This segregation clearly differs from the lamellipodium, where branched actin network nucleation and elongation both occur at the protrusion tip.

Cytosolic, freely diffusing Arp2/3 complexes become immobilized in F-actin networks within spines

The nucleation of F-actin branches requires the coordination in space and time of different signals involving the Arp2/3 complex,

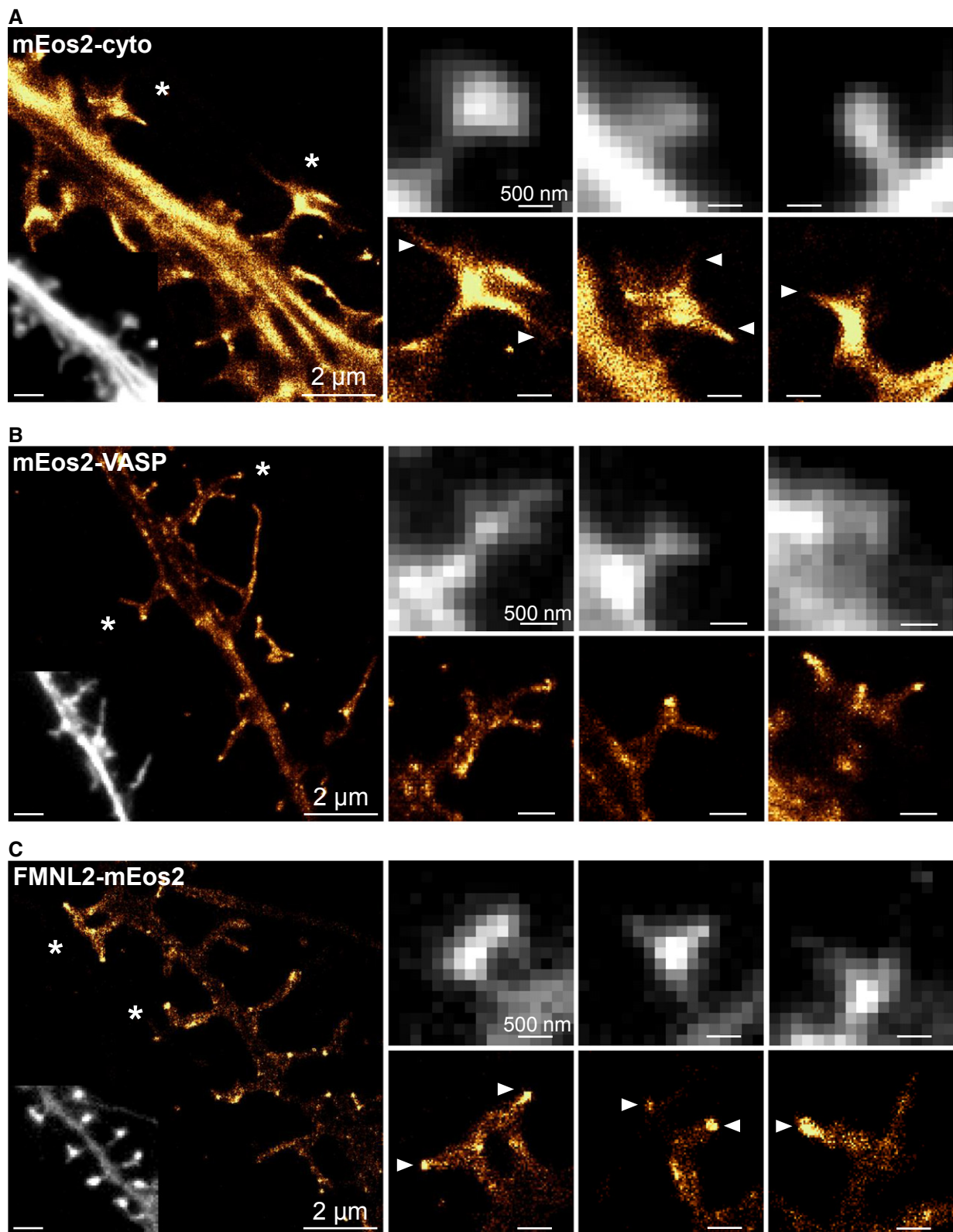


Figure 2. F-actin elongators localize at the tips of finger-like protrusions in spines.

A Super-resolution intensity image of cytosolic mEos2 in a live neuron (17–21 DIV) obtained from a sptPALM sequence at high frequency (100 Hz) (inset: fluorescence image of mEos2-cyto). Scale bars, 2 μ m. Spines highlighted with a star (left) are shown on the right together with a spine belonging to another neuron. Scale bars, 500 nm. Arrowheads indicate examples of finger-like protrusions.

B Same as (A) for mEos2-VASP. Arrowheads indicate VASP accumulations at protrusion tips.

C Same as (A) for FMNL2-mEos2. Arrowheads indicate FMNL2 accumulations at protrusion tips.

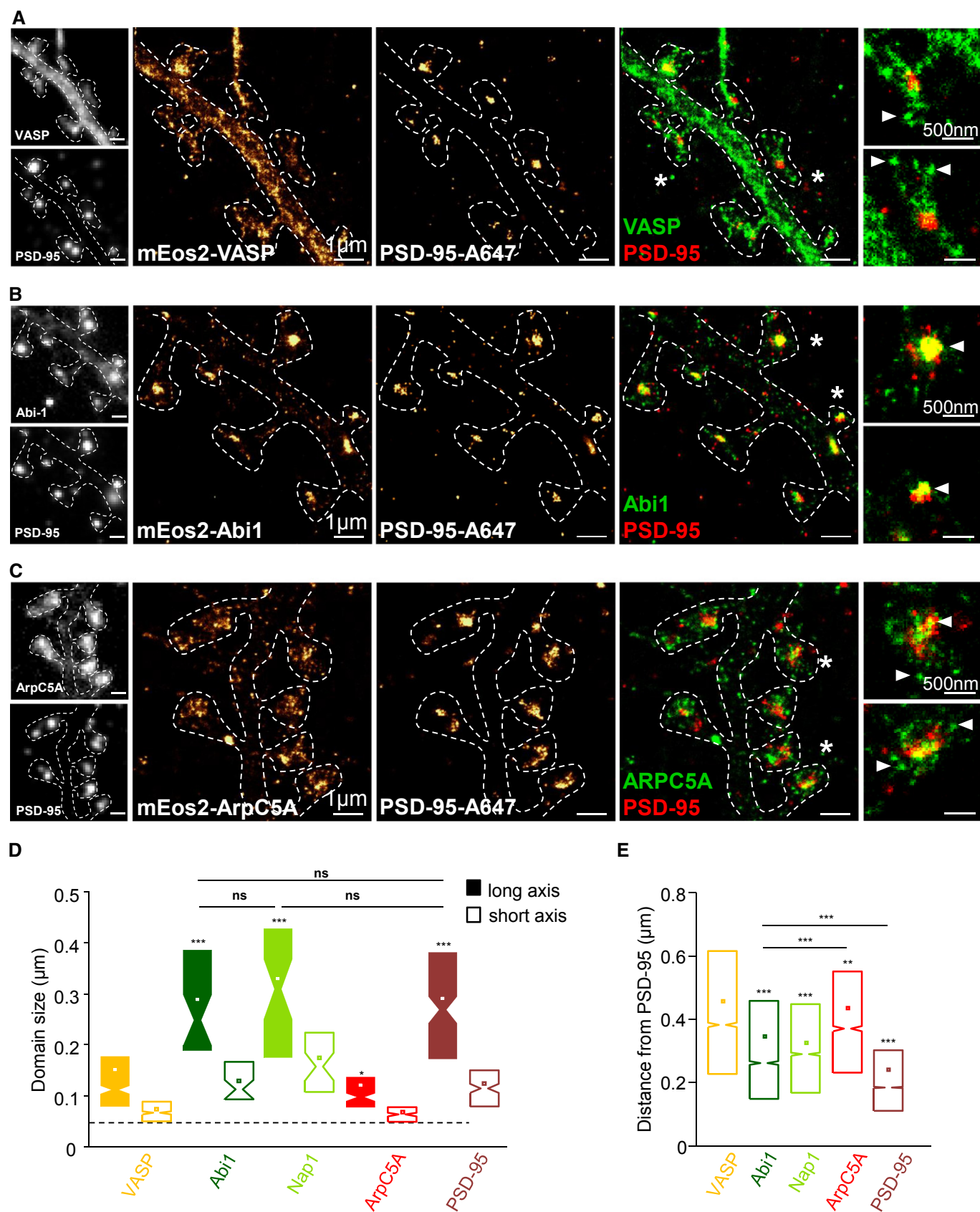


Figure 3.

the WAVE complex, IRSp53, acidic phospholipids (PIP3) and prenylated, GTP-bound Rac (Miki *et al*, 2000; Lebensohn & Kirschner, 2009; Chen *et al*, 2010). While super-resolution imaging allowed us to reveal the nanoscale organization of actin regulators, studying fast molecular dynamics is required to understand their coordination within spines. To determine the sequence of molecular events leading to Arp2/3 activation, we performed high-frequency sptPALM acquisition (20 Hz) to characterize the diffusive properties of actin regulators (Rossier *et al*, 2012). We reconstructed and analyzed thousands of trajectories of mEOS2-fused proteins in dendritic spines and shafts (Fig 4). For trajectories lasting more than 650 ms (> 13 points), we computed the mean-squared displacement (MSD), which describes the diffusion properties of a molecule. We sorted trajectories according to their diffusion modes (immobile, confined, free-diffusive; Fig 4B and H) and extracted the diffusion coefficients (D) (Fig 4G and I, Supplementary Table S1, see Materials and Methods) (Rossier *et al*, 2012). Within the spatial resolution of our experiments (~55 nm), all molecules with a D inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ are classified as immobile.

The distribution of D showed that mEOS2-ArpC5A molecules were mainly immobile in spines (Fig 4G and H, $57 \pm 3\%$), the remaining ones displaying either free-diffusion (Fig 4H and I, $19 \pm 1\%$; $D_{\text{diff}} = 0.056 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$) or confined diffusion (Fig 4H, $24 \pm 2\%$; $D_{\text{conf}} = 0.027 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, Supplementary Table S1). The distribution of D for actin-mEOS2 was similar to that of Arp2/3 complex (Fig 4C, D and G), displaying a large fraction of immobilization in spines ($56 \pm 2\%$) (Fig 4H). These immobilization events correspond to fluorescent signals acquired using low-frequency acquisition (2 Hz) (Fig 1) and to nano-domains of Arp2/3 located on and around the PSD (Fig 3). Disruption of F-actin using Latrunculin A (LatA) induced loss of actin-GFP and GFP-ArpC5A accumulation in spines without disassembly of Homer1C-DsRed, used as a PSD reporter (Supplementary Fig S7A and B). LatA treatment induced a redistribution of D toward faster diffusions and lowered the fractions of immobilization for Arp2/3 complex and actin (Fig 4G-I and Supplementary Fig S8). Diffusion properties in LatA conditions tended toward values measured for cytosolic mEOS2 (Fig 4E-I and Supplementary Table S1), but did not reach the fast free-diffusion and low fraction of immobilization measured for mEOS2 anchored to the inner leaflet of the plasma membrane

(mEOS2-CAAX; Fig 5E-I and Supplementary Table S1). Thus, in spines, Arp2/3 complexes are mainly incorporated into the F-actin network or freely diffusing in the cytosol as a dynamic pool readily available for new nucleation events. Our data show that Arp2/3 reaches the WAVE complex directly from the cytosol and not from the membrane as suggested for the lamellipodium of *Xenopus* XTC cells (Millius *et al*, 2012).

Abi1, Nap1 and IRSp53 are associated with confined components of the PSD

Association of the WAVE complex and IRSp53 with the plasma membrane coincides with Arp2/3 complex activation (Miki *et al*, 2000; Scita *et al*, 2008; Padrick & Rosen, 2010). To study the diffusion properties of WAVE complex subunits in spines, we performed sptPALM experiments using mEOS2-Abi1 and mEOS2-Nap1 (Fig 5A and B; Supplementary Fig S5C and D; Supplementary Table S1). Distributions of D were shifted toward faster diffusion compared to F-actin and Arp2/3 (Fig 5G; Supplementary Fig S5E; Supplementary Table S1). Both in shafts and in spines, the fractions of immobilized mEOS2-Abi1 and mEOS2-Nap1 were lower, and the fractions of confined and free-diffusion were larger (Fig 5H; Supplementary Fig S5F; Supplementary Table S1). In contrast to Arp2/3, which displayed transient immobilizations continually relocating in the spine, many confined and immobile mEOS2-Abi1 trajectories were detected in the same area (Fig 5B, Supplementary Fig S9A and B). Thus, those results suggest that the WAVE complex is retained in a confinement zone forming a long-lasting domain overlapping with the PSD.

In spines, IRSp53 displayed almost the same dynamics and subspine localization than WAVE complex subunits. Many confined trajectories formed a long-lasting domain of IRSp53 co-localizing with the PSD (Supplementary Figs S6 and S9C). In addition, mEOS2-IRSp53 displayed diffusion properties similar to mEOS2-Abi1 and mEOS2-Nap1 (Fig 5G-I, Supplementary Fig S5E-G), indicating that IRSp53 is confined in the same membrane domain. LatA treatment did not induce loss of Abi1 or IRSp53 accumulation in spines, which remained associated with the PSD (Supplementary Fig S7C and D), demonstrating that their recruitment in spines is not mediated by interactions with F-actin networks.

Figure 3. Actin nucleation and elongation factors are segregated within spines.

- A Dual-color super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of, respectively, mEOS2-VASP (left) and endogenous PSD-95 labeled with Alexa647 (PSD-95-A647; middle) in a fixed neuron. Merge (right). Scale bars, 1 μm . Left insets: fluorescence image of mEOS2-VASP (upper panel) and PSD-95-A647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines highlighted by stars in the merged image. Scale bars (insets), 500 nm. Arrowheads indicate VASP accumulations at protrusion tips. Dotted lines were manually added to distinguish spine outlines and shafts.
- B Same as (A) for dual-color mEOS2-Abi1 and PSD-95-A647. Arrowheads indicate Abi1 domain.
- C Same as (A) for dual-color mEOS2-ArpC5A and PSD-95-A647. Arrowheads indicate examples of Arp2/3 nano-domains.
- D Box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25–75%) of domain size for mEOS2-VASP (yellow, 5 cells, 53 spines, 402 domains), mEOS2-Abi1 (dark green, 4 cells, 36 spines, 39 domains), mEOS2-Nap1 (green, 4 cells, 46 spines, 46 domains), mEOS2-ArpC5A (red, 3 cells, 25 spines, 156 domains) and PSD-95-A647 (dark red, 16 cells, 145 spines, 157 domains). Long axis (solid box), short axis (open box). The dotted line corresponds to the size of isolated mEOS2 measured using Gaussian fitting (see Materials and Methods). Where indicated, statistical significance was obtained using non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test; the different conditions were compared with the long axis of VASP condition. Otherwise, a black line indicates which conditions were compared. The resulting *P*-values are indicated as follows: ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.
- E Box plots displaying the median and mean of distance distribution from the PSD-95 centroid for mEOS2-VASP (yellow, 5 cells, 42 spines, 6,653 detections), mEOS2-Abi1 (dark green, 4 cells, 44 spines, 6,749 detections), mEOS2-Nap1 (green, 4 cells, 61 spines, 7,377 detections), mEOS2-ArpC5A (red, 3 cells, 25 spines, 3,922 detections) and PSD-95-A647 (dark red, 16 cells, 162 spines, 20,249 detections). Where indicated, statistical significance was obtained using non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test; the different conditions were compared with the VASP condition. Otherwise, black lines indicate which conditions were compared. The resulting *P*-values are indicated as follows: ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

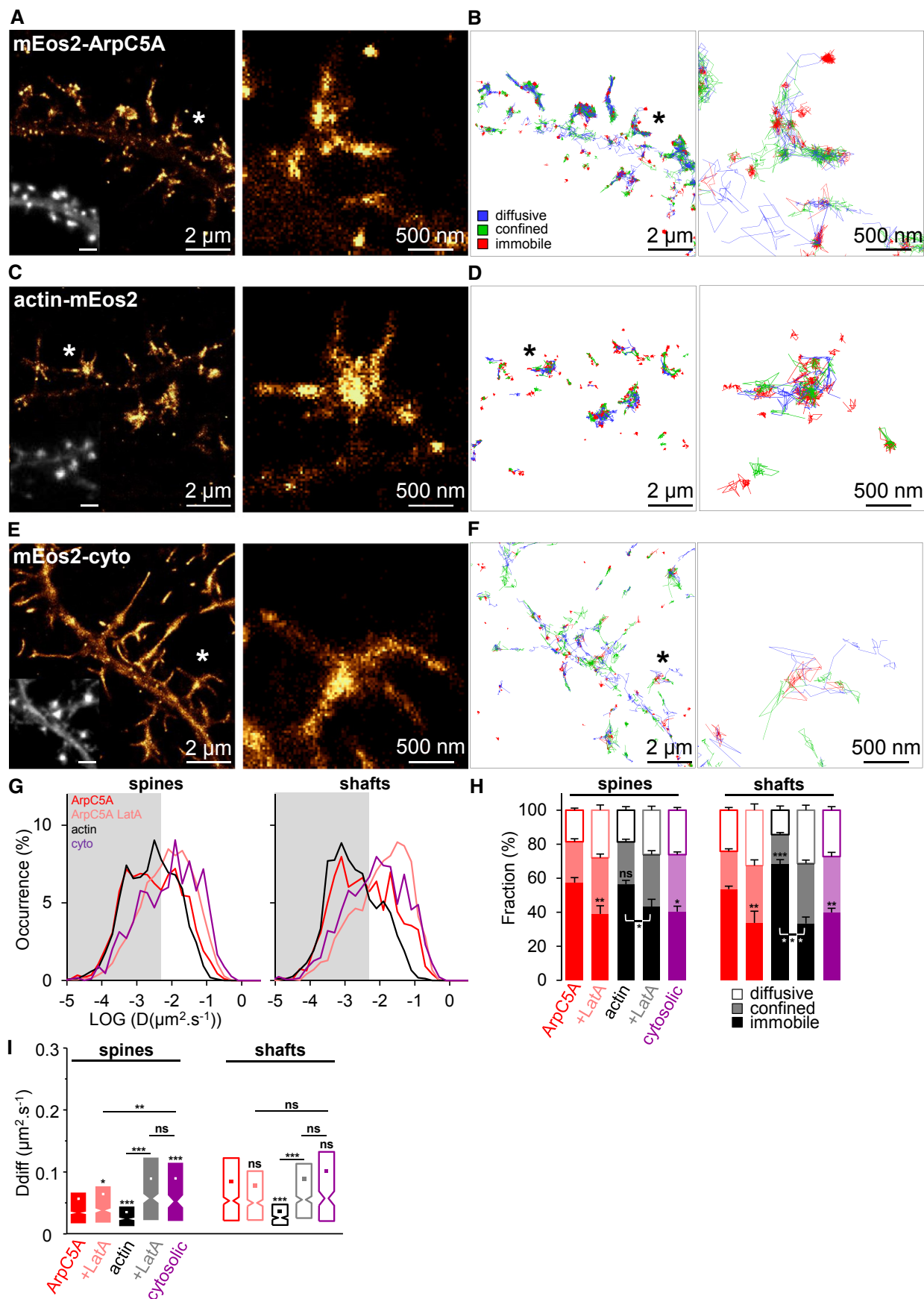


Figure 4.

Figure 4. Arp2/3 complex diffuses in the cytosol and becomes immobilized in F-actin networks.

- A Super-resolution intensity image of mEOS2-ArpC5A in a neuron obtained from a sptPALM sequence (20 Hz, duration: 600 s; inset: fluorescence image of mEOS2-ArpC5A). Scale bars, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm.
- B Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red). Scale bars, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm.
- C, D Same as (A) and (B) for actin-mEOS2.
- E, F Same as (A) and (B) for mEOS2-Cyto.
- G Distribution of LOG(D) for mEOS2-ArpC5A (red), mEOS2-ArpC5A + LatA (pink), actin-mEOS2 (black) and mEOS2-cyto (purple) in spines (left) and shafts (right; mean for cells). The gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories.
- H, I Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right), mean \pm SEM for cells (H). Diffusion coefficients (D) for free-diffusive trajectories in spines (left) and shafts (right) were represented by box plots (I) displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25–75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): ArpC5A (11/11,097), ArpC5A + LatA (6/4,464), actin (4/6,113), actin + LatA (4/3,807) and cytosolic (3/1,700). Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired *t*-test for fractions of immobilization (H) or non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test for diffusion coefficient (I). For spines and shafts, the different conditions were compared with the respective ArpC5A condition. Otherwise, a black line indicates which conditions were compared. The resulting *P*-values are indicated as follows: ns, *P* > 0.05; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001.

PSD-95 recruitment and nanoscale organization at the PSD also requires its association with the membrane through palmitoylation (Craven *et al*, 1999; Sturgill *et al*, 2009; Fukata *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014). The diffusive properties of mEOS2-PSD-95 in spines were similar to Abi1, Nap1 and IRSp53 (Fig 5C, D, G–I), being also dominated by a long-lasting domain of confined and immobile trajectories (Supplementary Fig S9D), suggesting that those proteins are sequestered in the same membrane domain. Glutamate AMPA receptors (GluA) are recruited to the PSD by a diffusion/immobilization mechanisms (Bats *et al*, 2007). However, in contrast to Abi1, Nap1, IRSp53 and PSD-95, GluA receptors form long-lasting nanodomains composed of only immobilized receptors partially overlapping with PSD-95 (Nair *et al*, 2013). Thus, the membrane apposed to the PSD, like the lamellipodium tip, could be a domain where IRSp53 and the WAVE complex are confined, regulating or mediating Arp2/3 activation.

Rac1 reaches the PSD by membrane free-diffusion

In agreement with the involvement of Arp2/3 in determining the shape of dendritic spines, gain and loss of the Rac1 GTPase activity induce, respectively, spine growth and shrinkage and are also correlated with enhanced and decreased motility (Tashiro & Yuste, 2004). Rac1 is targeted to the plasma membrane where it activates the WAVE complex and consequently Arp2/3-dependent nucleation (Lebensohn & Kirschner, 2009; Chen *et al*, 2010). Accordingly, the diffusive properties of mEOS2-Rac1 in spines and shafts were almost identical to mEOS2-CAAX (Fig 6A, B, G–I and Supplementary Table S1), showing that Rac1 was freely diffusing at the membrane. The higher fraction of free-diffusion and faster free-diffusion of mEOS2-Rac1 in spines compared to WAVE complex subunits and IRSp53 is surprising given their direct interactions (Suetsugu *et al*, 2006). Those results suggested either that Rac1 binding to the WAVE complex is faster than our acquisition frequency or that such events are infrequent. To increase Rac1 activation, we used a constitutively active mutant, mEOS2-Rac1-Q61L, which is locked in the GTP-bound state. Strikingly, mEOS2-Rac1-Q61L was strongly immobilized both in spines and in shafts (Fig 6C and D). Distributions of D were shifted toward slower diffusion, fractions of immobilization were increased close to values measured for F-actin and Arp2/3 complex, and free-diffusions were drastically slowed down (Fig 6G–I). Thus, Rac1 activation is correlated with Rac1 membrane

immobilization, only detectable in our experimental conditions when Rac1 is locked in its active state. A dominant-negative mutant, mEOS2-Rac1-T17N, exhibited the same diffusive properties as wild-type Rac1 (Fig 6E–I). Nevertheless, expression of mEOS2-Rac1-T17N induced the transformation of spines into filopodia-like structures (Fig 6E), indicating that even transient Rac1 immobilizations and activations are critical to maintain the globular spine shape. Thus, these results indicate that Rac1 reaches the membrane apposed to the PSD through membrane free-diffusion to transiently bind its targets such as the WAVE complex.

Dendritic spine enlargement is associated with delocalization of Abi1 from the PSD

Spine morphological remodeling is triggered by changes in F-actin polymerization (Okamoto *et al*, 2004) and may thus be associated with reorganization of F-actin regulators within spines (Park *et al*, 2012; Bosch *et al*, 2014). To test this hypothesis, we induced spine enlargement by enhancing Rac1 or Shank3 functions. We co-transfected constitutively active Rac1-Q61L with proteins fused to mEOS2, and performed sequential dual-color PALM/dSTORM experiments. Over-expression of cerulean-Rac1-Q61L induced profound morphological alterations of spines, being either transformed into large spines (Fig 7A) (Tashiro & Yuste, 2004) or merged into lamellipodia-like extensions (Supplementary Fig S10). Strikingly, mEOS2-Abi1 was still present in spines but delocalized from the PSD-95 (Fig 7A and C). In lamellipodia-like structures, mEOS2-Abi1 and mEOS2-VASP localized to the tip of membrane extensions, matching their organization in lamellipodia (Supplementary Fig S10). Shank3 is a PSD scaffold that directly interacts with a Rac1 activator and subunits of the Arp2/3 and WAVE complexes (Han *et al*, 2013). Its over-expression in neurons induces spine enlargement and enhanced F-actin content in spines (Sala *et al*, 2001; Durand *et al*, 2012; Han *et al*, 2013). We found that Shank3-GFP over-expression also triggered redistribution of mEOS2-Abi1 away from the PSD-95 (Fig 7B and C). Thus, our data suggest that in resting conditions, a critical upstream activator of Arp2/3, the WAVE complex, is sequestered close to the PSD preventing the formation of large protrusions (Fig 8). However, transient or long-lasting delocalization of the WAVE complex from the PSD could promote Arp2/3 activation and F-actin elongation throughout the spine, thereby triggering morphological remodeling.

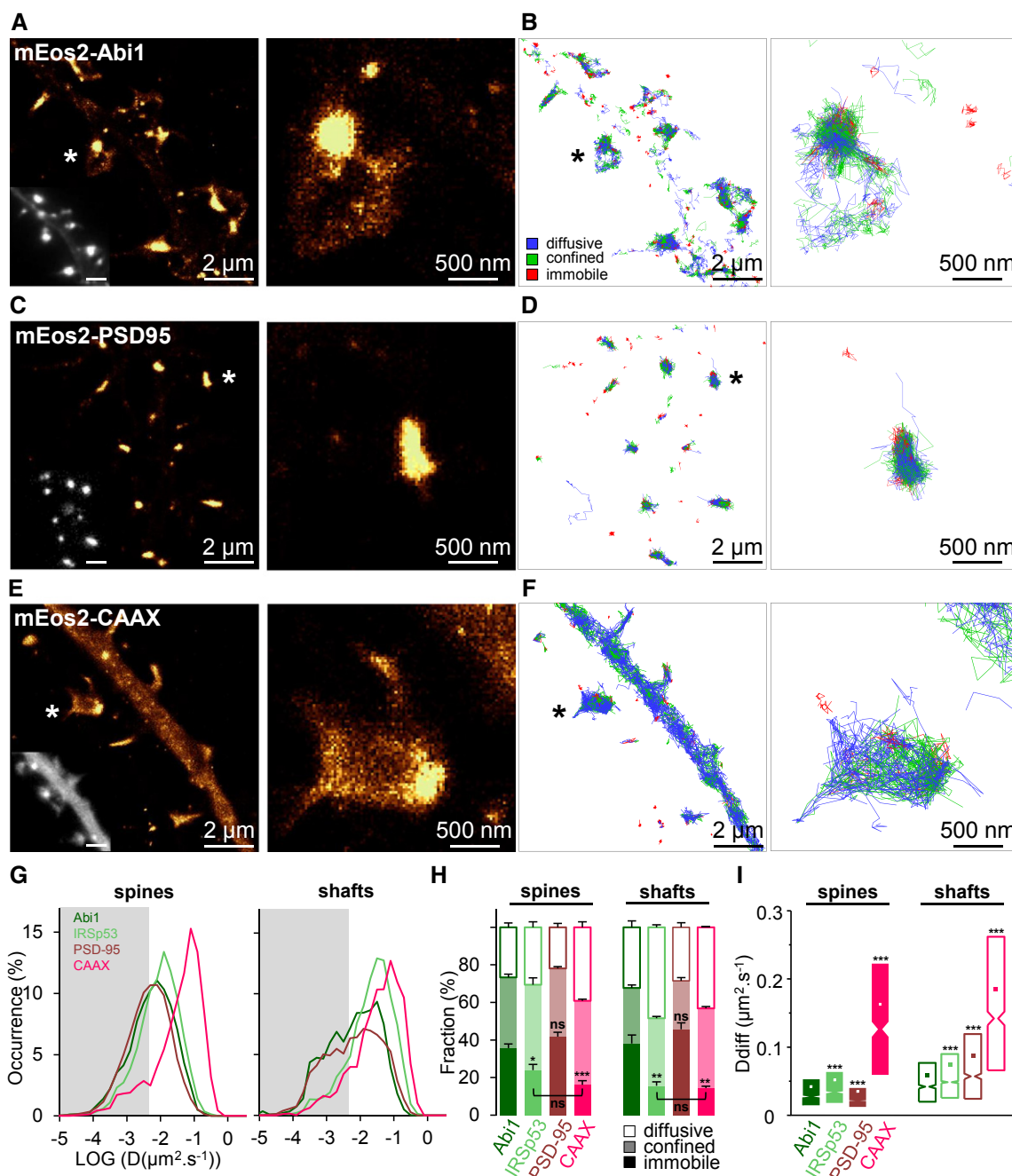


Figure 5. Abi1, IRSp53 and PSD-95 are confined at the PSD.

A Super-resolution intensity image of mEos2-Abi1 in a neuron obtained from a sptPALM sequence (20 Hz, duration: 600 s; inset: fluorescence image of mEos2-Abi1). Scale bars, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm.

B Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red). Scale bars, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm.

C, D Same as (A) and (B) for mEos2-PSD95.

E, F Same as (A) and (B) for mEos2-CAAX.

G Distribution of LOG(D) for mEos2-Abi1 (dark green), mEos2-IRSp53 (light green), mEos2-PSD95 (dark red) and mEos2-CAAX (magenta) in spines (left) and shafts (right), mean for cells. The gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories.

H, I Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right), mean \pm SEM for cells (H). Diffusion coefficients (D) for free-diffusive trajectories in spines (left) and shafts (right) were represented by box plots (I) displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25–75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): Abi1 (7/11,885), IRSp53 (5/17,974), PSD-95 (8/33,963) and CAAX (3/3,549). Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t-test for fractions of immobilization (H) or non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test for diffusion coefficient (I). For spines and shafts, the different conditions were compared with the respective Abi1 condition. Otherwise, a black line indicates which conditions were compared. The resulting *P*-values are indicated as follows: ns, $P > 0.05$; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

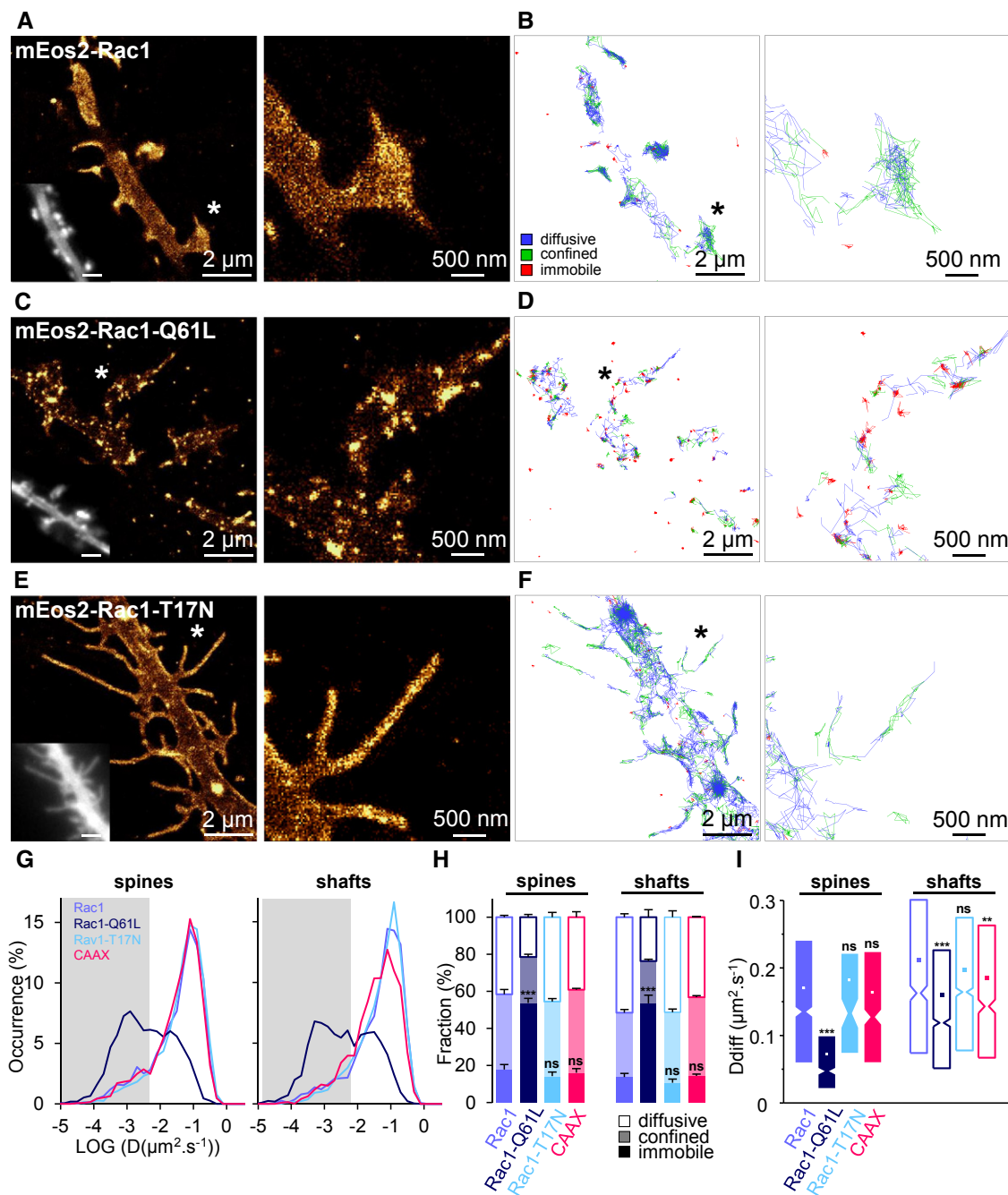


Figure 6. Rac1 activation is correlated with its membrane immobilization.

A Super-resolution intensity image of mEos2-Rac1 in a neuron obtained from a sptPALM sequence (20 Hz, duration: 600 s; inset: fluorescence image of mEos2-Rac1). Scale bars, 2 μm. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm.

B Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red). Scale bars, 2 μm. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bars, 500 nm.

C, D Same as (A) and (B) for mEos2-Rac1-Q61L.

E, F Same as (A) and (B) for mEos2-Rac1-T17N.

G Distribution of LOG(D) for mEos2-Rac1 (blue), mEos2-Rac1-Q61L (dark blue), mEos2-Rac1-T17N (light blue) and mEos2-CAAX (magenta) in spines (left) and shafts (right), mean for cells. The gray areas including D values inferior to 0.004 μm² s⁻¹ correspond to immobile trajectories.

H, I Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right), mean ± SEM for cells (H). Diffusion coefficients (D) for free-diffusive trajectories in spines (left) and shafts (right) were represented by box plots (I) displaying the median (notch) and mean (square) ± percentile (25–75%). For comparison, the CAAX data from Fig 5G–I are shown again. All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): Rac1 (4/5,896), Rac1-Q61L (5/5,514) and Rac1-T17N (6/8,759). Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t-test for fractions of immobilization (H) or non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test for diffusion coefficient (I). For spines and shafts, the different conditions were compared with the respective Rac1 condition. The resulting P-values are indicated as follows: ns, P > 0.05; ***P < 0.01; ****P < 0.001.

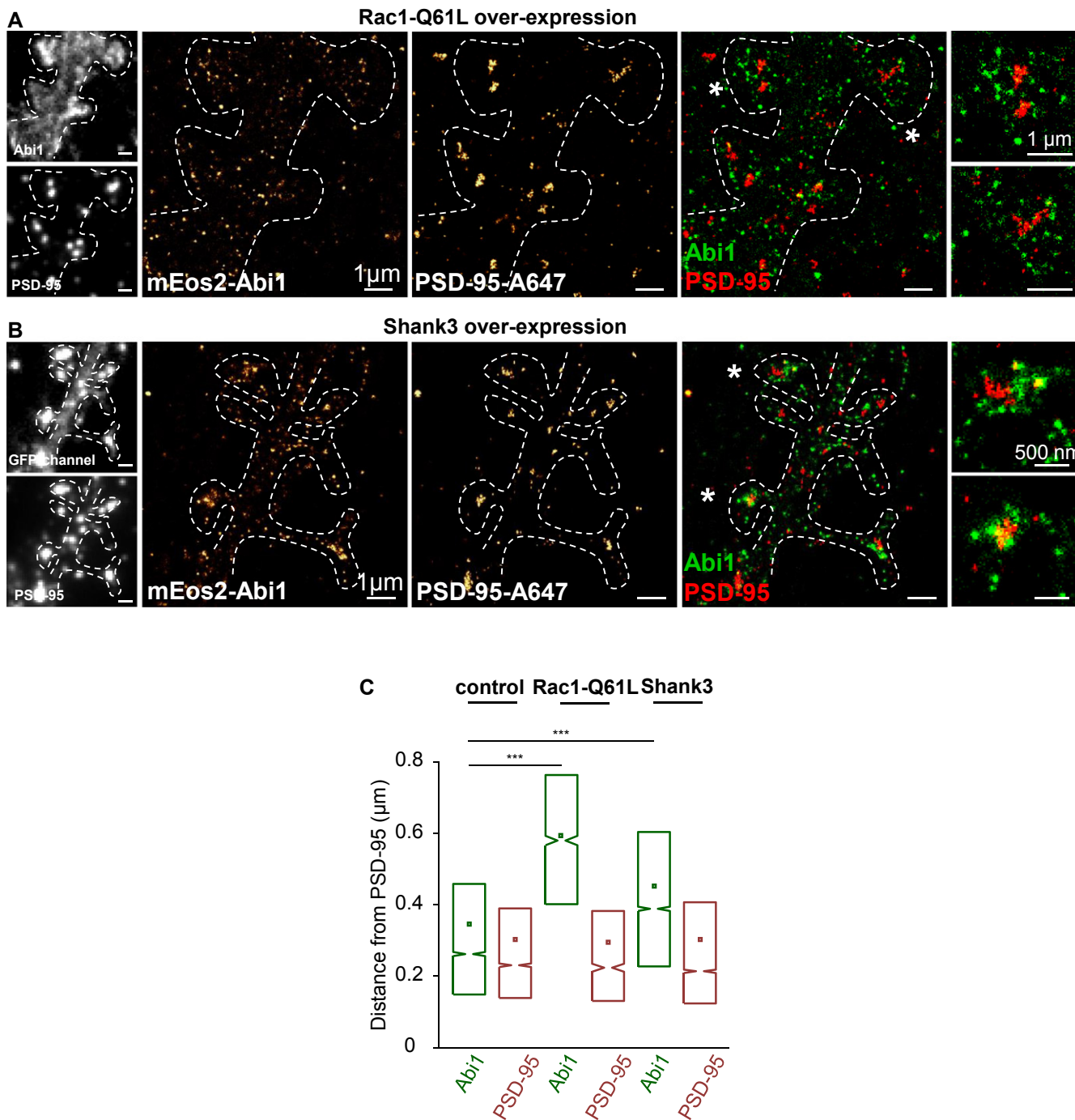


Figure 7. Rac1 enhanced activity and Shank3 over-expression delocalizes Abi1 from the PSD.

A Dual-color super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of, respectively, mEos2-Abi1 (left) and endogenous PSD-95 labeled with Alexa647 (middle) in a fixed neuron expressing cerulean-Rac1-Q61L. Merge (right). Scale bars, 1 μ m. Left insets: fluorescence image of mEos2-Abi1 (upper panel) and PSD-95-A647. Right insets: merge PALM/dSTORM of spines marked by stars in the merged image. Scale bars (insets), 1 μ m. Dotted lines were manually added to distinguish spine outlines and shafts.

B Same as (A) for a neuron expressing Shank3-GFP. Merge (right). Scale bars, 1 μ m. Left insets: fluorescence image of mEos2-Abi1 and Shank3-GFP (upper panel) and PSD-95-A647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of spines marked by stars in the merged image. Scale bars (insets), 500 nm. Dotted lines were manually added to distinguish spine outlines and shafts.

C Box plots displaying the median and mean of distance from the PSD-95 centroid for mEos2-Abi1 and PSD95-A647 in control cells (4 cells, 44 spines, 6,749 detections for Abi1 and 6,183 detections for PSD95), in cells expressing cerulean-Rac1-Q61L (2 cells, 12 spines, 1,866 detections for Abi1 and 1,275 detections for PSD95) and in cells expressing Shank3-GFP (green, 6 cells, 62 spines, 9,101 detections for Abi1 and 9,469 detections for PSD95). For comparison, the mEos2-Abi1 data from Fig 3E are shown again. Black lines indicate which conditions were compared; statistical significances were obtained using non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test. The resulting P -values are indicated as follows: *** $P < 0.001$.

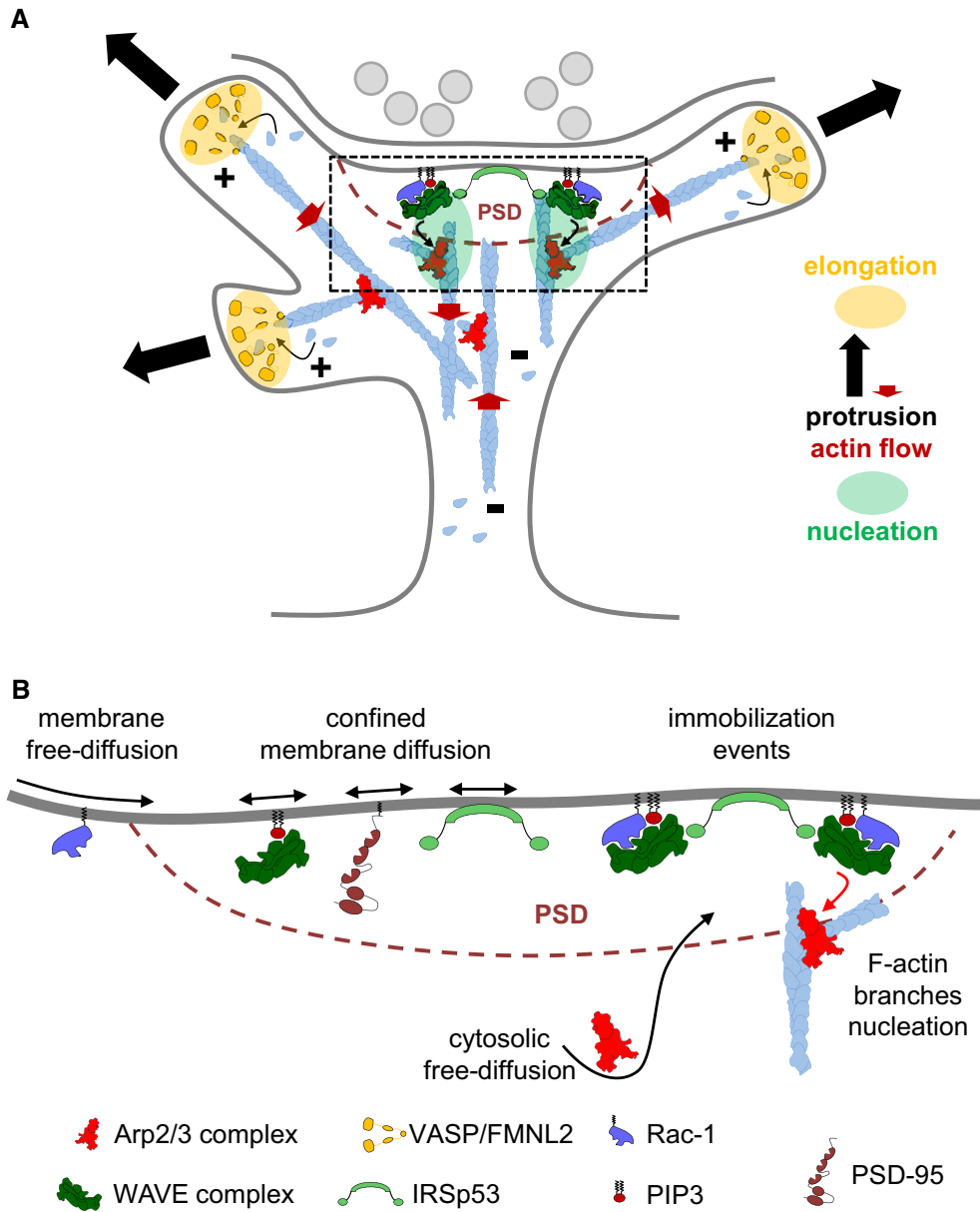


Figure 8. The dynamic nanoscale segregation of branched F-actin nucleation and elongation determines dendritic spine shape.

Schematic representation of the dynamic nanoscale organization of branched F-actin regulators in spines.

A Nucleation and elongation are not colocalized in dendritic spines. Nucleation of branched F-actin networks occurs close to the PSD, which is consistent with Arp2/3 complex immobilizations distributed around the PSD, and the co-localization of WAVE complex subunits and IRSp53 with PSD-95. However, growing F-actin barbed ends (+) are located at the tips of membrane protrusions, where elongation of F-actin is catalyzed by VASP and FMNL2. In this model, elongation from immobile Arp2/3 close to the PSD will not generate a concerted fast rearward flow of Arp2/3 complex and F-actin in spines.

B The PSD is the convergence zone where proteins triggering branched F-actin nucleation meet with the highest probability. The PSD is a persistent confinement zone for the WAVE complex and IRSp53. Rac1 GTPase reaches the PSD by membrane free-diffusion, its immobilization being correlated with its activation. Arp2/3 reaches the vicinity of the PSD by cytosolic free-diffusing where it becomes immobilized in F-actin networks.

Discussion

We present evidence to support a precise spatial segregation between regulators triggering nucleation and elongation of branched F-actin networks within dendritic spines. We also demonstrate that this nanoscale organization of F-actin regulators could be modulated in concert with changes in spine morphology. Our results identify

the PSD as a critical organizing center of branched F-actin regulators in spines. Thus, the spatiotemporal control of interaction between PSD components and F-actin regulators might be at the basis of actin remodeling often associated with synaptic plasticity and abnormal spine morphologies in neurological disorders.

The architecture and polarity of F-actin networks in spines are still undefined. First, ensemble measurement using fluorescence

recovery after photobleaching or photoactivation showed that F-actin in spines is composed of dynamic and stable pools (Star *et al*, 2002; Honkura *et al*, 2008). Therefore, a unique polarity is probably unlikely. Second, electron microscopy (EM) micrographs, based on thin spine sectioning, gave an incomplete picture of F-actin networks. Those studies often focused on F-actin and actin binding proteins localized in the spine cytoplasm between the PSD and the shaft (Rácz *et al*, 2013). Within this region, early EM studies showed that F-actin barbed ends could contact the PSD, implying that pointed ends are directed toward the shaft (Fifkova & Delay, 1982). This orientation is consistent with F-actin movements directed from the PSD toward the shaft (Frost *et al*, 2010). However, EM micrographs also demonstrated the existence of thin protrusions emerging from the spine head named spinules (Spacek & Harris, 2004) that could correspond to F-actin membrane protrusions (Edwards, 1998; Fischer *et al*, 1998; Izeddin *et al*, 2011; Berning *et al*, 2012; Ueda & Hayashi, 2013). Our data reveal that finger-like protrusions responsible for spine motility are powered by the polarized elongation of F-actin barbed ends away from the PSD. Increased or decreased Rac1 activity induced the conversion of spines into non-motile or lamellipodia-like structures, respectively, supporting the hypothesis that spine protrusions are emerging from elongation of branched F-actin networks.

Nucleation and elongation of F-actin are co-localized at the lamellipodium tip, triggering an inward growth of branched F-actin networks. The location of the WAVE complex, IRSp53, VASP, FMNL2 and fast-growing F-actin barbed ends at protrusion tips supports that model (Lanier *et al*, 1999; Rottner *et al*, 1999; Nakagawa *et al*, 2003; Iwasa & Mullins, 2007; Lai *et al*, 2008; Block *et al*, 2012). Our results provide evidence that in spines, elongation and nucleation zones are not co-localized (Fig 8A). The tips of actin-driven membrane protrusions are enriched in VASP and FMNL2, indicating that they contain fast-growing F-actin barbed ends. However, the WAVE complex subunits Abi1 and Nap1 along with IRSp53 are retained close to the PSD. In addition, Arp2/3 complex immobilizations on F-actin networks are partially co-localizing with the PSD. Consistent with retention close to the PSD, Abi1, IRSp53 and Arp2/3 are directly and indirectly binding to PSD components, including CAMKII, Shank1, Shank3 and PSD-95 (Bockmann *et al*, 2002; Hering & Sheng, 2003; Choi *et al*, 2005; Proepper *et al*, 2007; Park *et al*, 2012; Han *et al*, 2013). Elongation from immobile Arp2/3 close to the PSD will not generate a concerted, fast rearward flow of Arp2/3 complex and F-actin, consistent with our results and previous studies on actin dynamics (Tatavarty *et al*, 2009, 2012). Nevertheless, this is not in disagreement with studies describing slow rearward movements of F-actin in spines (Honkura *et al*, 2008; Frost *et al*, 2010). Indeed, those backward movements might result either from F-actin severed from protrusions that could be recycled at the spine center to prime new nucleation events (Achard *et al*, 2010) or from protrusions ruffling back to the spine center (Berning *et al*, 2012). Consistent with the absence of a fast, concerted F-actin flow, a significant fraction of F-actin photoactivated at the spine apex remained at its initial position tens of seconds after photoactivation (Honkura *et al*, 2008), as opposed to similar experiments performed in the lamellipodium (Lai *et al*, 2008). This opposite organization compared to classical protrusive structures might rely on specific biophysical properties of the PSD.

In contrast to nucleation zones moving with protrusion tips, the membrane juxtaposed to the PSD could represent a stationary nucleation zone, held in place by synaptic components such as scaffolding and adhesion proteins (Sheng & Hoogenraad, 2007). The demonstration of a direct interaction between the synaptic adhesion proteins Neuroligins and the WAVE complex reinforces our model (Chen *et al*, 2014). Furthermore, the densely packed PSD architecture (Sheng & Hoogenraad, 2007) could be a physical barrier forcing F-actin barbed ends to grow away. Consistent with this hypothesis, an *in vitro* reconstituted system demonstrated that F-actin branched networks could elongate with barbed ends growing away from a nucleating surface (Achard *et al*, 2010). Thus, we propose that in spines, branched F-actin networks are nucleated close to the PSD and elongate away from the PSD (Fig 8A).

Activation of the Arp2/3 complex is the final step of synchronized events occurring at the membrane and involving prenylated Rac-GTP, PIP3, the WAVE complex and IRSp53 (Miki *et al*, 2000; Lebensohn & Kirschner, 2009; Chen *et al*, 2010). Our study demonstrates that the zone of highest convergence between major effectors of Arp2/3 activation is the membrane juxtaposed to the PSD (Fig 8B). Several results suggest that IRSp53 and the WAVE complex are confined in the same membrane domain in spines. On the contrary to Arp2/3 that is immobilized in nano domains, IRSp53 and the WAVE complex subunits Abi1 and Nap1 are concentrated in a stable domain overlapping with PSD-95 and display a large fraction of confined diffusion. These diffusive properties are shared by PSD-95, which directly interacts with IRSp53 and also requires membrane targeting to fulfill its functions (Craven *et al*, 1999; Choi *et al*, 2005; Scita *et al*, 2008; Sturgill *et al*, 2009; Padrick & Rosen, 2010; Fukata *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2014). Furthermore, Abi1 and IRSp53 are retained at the PSD after F-actin network disruption. Free-diffusion on the membrane was reported for WAVE2 and Arp2/3 in the lamellipodium of *Xenopus* XTC cells, which could increase the probability of their association (Millius *et al*, 2012). However, our results support the view that in neurons, Arp2/3 is reaching the PSD domain directly by free-diffusion from the cytosol. Since WAVE complex and IRSp53 oligomerization were proposed to increase Arp2/3-dependent nucleation (Padrick & Rosen, 2010), their concentration at the PSD could constitute a docking site for efficient Arp2/3 activation. Experiments using constitutively active Rac1-Q61L showed that Rac1 activation is correlated with its immobilization, in agreement with a recent study performed on adhesion sites of motile cells (Shibata *et al*, 2013). The large fraction of fast membrane free-diffusion for Rac1 wild-type compared to Abi1 and Nap1 suggests that Rac1 interacts only transiently with the WAVE complex, consistent with their low binding affinity (Chen *et al*, 2010; Koronakis *et al*, 2011). Therefore, Rac1 could diffuse in the membrane apposed to the PSD to transiently bind and activate stationary or confined WAVE complexes. Altogether, our results indicate that in spines, the PSD behaves as an organizing center of branched F-actin nucleation.

Changes in spine shape occur at different timescales, from the long-lasting morphologies acquired during developmental spine maturation (Govek *et al*, 2005; Charrier *et al*, 2012) to the acute remodeling that occur during synaptic plasticity (Matsuzaki *et al*, 2004). Importantly, abnormal spine maturation and morphologies are often associated with neurological disorders and genetic

deregulation of proteins impacting on the branched F-actin network. These include proteins signaling to the WAVE and Arp2/3 complexes, like Rac1 GAPs and GEFs, or proteins such as Shank3 and FMRP which directly interact with subunits of those complexes (Schenck *et al*, 2003; Govek *et al*, 2005; Penzes *et al*, 2011; Durand *et al*, 2012; Han *et al*, 2013; De Rubeis *et al*, 2013). Our results show that long-lasting enhancement of Rac1 or Shank3 functions, which trigger spine enlargement, is correlated with delocalization of the WAVE complex from the PSD. However, acute activation of F-actin regulatory proteins is also necessary to trigger and maintain spine enlargement during structural synaptic plasticity (Okamoto *et al*, 2009; Bosch *et al*, 2014). Rho GTPases including RhoA, Cdc42 and Rac1 are at the convergence of various signaling pathways triggered by CAMKII following enhanced synaptic activity (Murakoshi *et al*, 2011). Our results show that WAVE complex subunits and IRSp53, which operate in Rac1 signaling to Arp2/3, are sequestered close to the PSD where they are ideally located to be efficiently modulated by changes in synaptic activity. Accordingly, in resting conditions, CAMKII interacts with Abi1 resulting in a mutual inhibition. Active CAMKII phosphorylates and releases Abi1, which as part of the WAVE complex is then available to potentially activate Arp2/3 (Park *et al*, 2012). In addition, inactive CAMKII bundles and stabilizes F-actin, while its activation disrupts their association, allowing enhanced F-actin remodeling (Okamoto *et al*, 2007; Lin & Redmond, 2008). Importantly, increased recruitment and transient activation of cofilin occur in spines during the first phase of LTP, allowing a short time window for F-actin remodeling (Bosch *et al*, 2014). Thus, it is plausible that alteration of spine morphology could rely on the long-lasting or transient nanoscale relocation of branched F-actin regulators, for example, the WAVE complex, leading to remodeling of the entire dendritic spine structure. Yet, the precise sequence of molecular events leading to reorganization of F-actin regulators within spines during synaptic plasticity or neurological disorders remains an open question. Nevertheless, our findings on the dynamic organization of branched F-actin regulators provide a framework to unravel the molecular mechanisms triggering remodeling of F-actin architecture during changes of spine morphology.

Materials and Methods

Cell culture

Preparation of cultured neurons was performed as previously described (Mondin *et al*, 2011). Dissociated hippocampal neurons from 18-day-old rat (Sprague Dawley) embryos were cultured on glass coverslips following the Banker protocol. The experimental ethical committee of Bordeaux examined and validated our protocol (N° 330110002-A). Neurons were transfected using Effectene (Qiagen) at 7 days *in vitro* (DIV) for spines and for filopodia experiments. For experiments performed on growth cones, neurons were transfected by nucleofection at the time of plating (Nucleofector™ II Device, Lonza Cologne GmbH, Germany). Experiments were performed at 17–21 DIV for mature dendritic spines, 9–11 DIV for dendritic filopodia and 3–4 DIV for growth cones. mEOS2-Abi1, mEOS2-Nap1, mEOS2-ArpC5A, mEOS2-CAAX, mEOS2-IRSp53,

mEOS2-Rac1, mEOS2-Rac1-Q61L, mEOS2-Rac1-T17N and mEOS2-VASP were generated by PCR of the coding DNA sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAM-FRT-PC-mESO2 blue at the FseI/AscI site. GFP-ArpC5A and GFP-Abi1 were generated by PCR of the coding DNA sequence of the corresponding protein and inserted in the pcDNAM-FRT-PC-GFP blue at the FseI/AscI site. The human FMNL2-mEOS2 construct was generated by replacing the GFP of the FMNL2-GFP (pEGFP-N1) (Block *et al*, 2012) by mEOS2 at the AgeI/NotI sites, and mEOS2 fragment was obtained by PCR on PrSet-A mEOS2 (Addgene). Cerulean-Rac1-Q61L was generated by PCR of Rac1-Q61L, which was inserted in pEGFP-C1 (Clontech) at the BglII/KpnI sites, and then GFP was replaced by cerulean at NheI/BglII sites. Actin-mEOS2 construct was generated as described before (Rossier *et al*, 2012). mEOS2-PSD-95 and Homer-1c-DsRed were, respectively, subcloned from PSD95-EGFP and Homer1c:GFP as described previously (Mondin *et al*, 2011). GFP-VASP (Rottner *et al*, 1999) was provided by Juergen Wehland (German Research Center for Biotechnology, Germany). Shank3-GFP was a gift from Nathalie Sans (Neurocentre Magendie, Bordeaux, France). The fidelity of all constructs was verified by sequencing.

Immunostaining

Neurons transfected with the appropriate construct were fixed for 10 min in warm 4% paraformaldehyde and 4% sucrose in PBS. Remaining active sites were saturated with 50 mM NH₄Cl in PBS for 15 min. For intracellular labeling, neurons were permeabilized 5 min with 0.1% of Triton X-100 (Sigma-Aldrich), washed with PBS and incubated with PBS containing 1% BSA for 30 min. For endogenous labeling of PSD95, neurons were incubated with mouse anti-PSD95 antibody (MA1-046, Thermo Fisher Scientific, USA, used at 2 μg ml⁻¹) for 30 min at room temperature and washed with PBS containing 1% BSA. For endogenous labeling of actin regulators, neurons were incubated over night at 4°C and washed with PBS containing 1% BSA. Antibodies used for those immunostainings are ArpC5 (Synaptic System, 323H3), FMNL2 (abcam, ab57963), WAVE1 (NeuroMab; 75-048) and WAVE2 kindly provided by Giorgio Scita (IFOM, Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Milan, Italy) and polyclonal VASP kindly provided by Theresia Stradal (Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany) (Jenzora *et al*, 2005). The primary antibodies were then revealed by incubating Alexa647-coupled anti-mouse or anti-rabbit IgG secondary antibody (Invitrogen, donkey, used at 1 μg ml⁻¹) for 30 min/1 h at room temperature.

sptPALM acquisitions

Neurons were imaged at 37°C in a Ludin chamber (Life Imaging Services) with an inverted motorized microscope (Nikon Ti) equipped with a 100x1.45 NA PL-APO objective and a perfect focus system, allowing long acquisition in oblique illumination mode. For photoactivation localization microscopy, neurons expressing mEOS2 tagged constructs were photoactivated using a 405 nm laser (Omicron) and the resulting photoconverted single-molecule fluorescence was excited with a 561 nm laser (Cobolt Jive™). Both lasers illuminated the sample simultaneously. Their respective power was adjusted to keep the number of the stochastically activated

molecules constant and well separated during the acquisition. Fluorescence was collected by the combination of dichroic and emission filters (F38-561 and F39-617 respectively, Semrock, Rochester, USA) and a sensitive EMCCD camera (Evolve, Photometrics). The acquisition was steered by MetaMorph software (Molecular Devices). Trajectory analyses of proteins fused to mEOS2 were performed at 20 Hz streaming acquisitions, with 561 nm low-power laser illumination (3–4 kw cm⁻²) (Figs 4–6 and Supplementary Figs S5, S6, S8 and S9). For high-frequency localization of mEOS2 fused proteins, we used 561 nm higher-power laser illumination (7–8 kw cm⁻²) and 100 Hz streaming acquisition (Fig 2 and Supplementary Figs S1A, S2 and S3). Quantification of actin-mEOS2 and mEOS2-ArpC5A flow were performed at low-frequency acquisition (2 Hz) with long-exposure time (250 ms) and low power 561 nm laser illumination (1.5 kw cm⁻²) to only capture mEOS2 slow movements (Fig 1). To test the phototoxicity of sptPALM acquisitions, we verified that spine motility was preserved at the end of experiments. Diffraction-limited fluorescence images of mEOS2 and GFP constructs were imaged using a conventional GFP filter cube (ET470/40, T495LPXR, ET525/50, Chroma). We used multicolor fluorescent 100-nm beads (Tetraspeck, Invitrogen) as fiducial markers to register long-term acquisitions and correct for lateral drifts.

Single-molecule localization and tracking

sptPALM experiments lead to sets of 8,000–20,000 images per cell, analyzed by dedicated custom-made image analysis software in order to extract molecule localization and dynamics. Fluorescent single molecules were localized and tracked over time using a combination of wavelet segmentation and simulated annealing algorithms (Racine *et al*, 2006, 2007; Izeddin *et al*, 2012; Rossier *et al*, 2012; Kechkar *et al*, 2013) operating as a plug-in inside MetaMorph software (Molecular Devices). Under the experimental conditions described above, the resolution of the system was quantified to ~55 nm (full width at half maximum, FWHM). This spatial resolution depends on the molecule's signal to noise ratio and the segmentation algorithm (Cheezum *et al*, 2001) and was determined using fixed mEOS2 samples. We analyzed hundreds of two-dimensional distributions of single-molecule positions belonging to long trajectories (> 30 frames) by bi-dimensional Gaussian fitting, the resolution being determined as 2.3σ_{xy}, where σ_{xy} is the pointing accuracy. For the trajectory analysis, spines and shafts were identified manually in the corresponding super-resolution intensity images. The corresponding regions of interest were used to sort single particle data analyses to specific regions.

We analyzed trajectories lasting at least 13 points (> 650 ms) with a custom routine (Matlab, Matworks) using the mean-squared displacement (MSD) computed as (equation 1):

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

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

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

where r_{conf} is the measured confinement radius and τ the time constant ($\tau = r_{\text{conf}}^2 / 3D_{\text{conf}}$). To reduce the inaccuracy of the MSD fit due to down sampling for larger time intervals, we used a weighted fit. Trajectories were sorted in three groups: immobile, confined diffusion and free-diffusion. Immobile trajectories were defined as trajectories with $D < 0.004 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$, corresponding to molecules that explored an area inferior to the one defined by the image spatial resolution $\sim (0.055 \mu\text{m})^2$ during the time used to fit the initial slope of the MSD (Rossier *et al*, 2012) (four points, 80 ms):

$$D_{\text{threshold}} = (0.055 \mu\text{m})^2 / (4 \times 4 \times 0.05 \text{ s}) \sim 0.004 \mu\text{m}^2 \text{s}^{-1}$$

To separate trajectories displaying free-diffusion from confined diffusion, we used the time constant τ calculated for each trajectory. Confined and free-diffusing trajectories were defined as trajectories with a time constant τ , respectively, inferior and superior to half the time interval used to compute the MSD (250 ms).

Note that with the acquisition frequency and oblique illumination used in our experiments, it is impossible to reconnect trajectories lasting at least 650 ms (> 13 points) for a protein freely diffusing in 3D within the cytosol. In the case of a mEOS2 alone, trajectories that can be reconstructed correspond mainly to a low fraction of mEOS2 non-specifically interacting with membrane components. Therefore, counter intuitively, a mEOS2 alone freely diffusing in the cytosol will result in a distribution of D further shifted toward slower D compared to a protein freely diffusing on the membrane: compare Fig 4G–I (cyto, purple) and Fig 5G–I (CAAX, magenta).

For flow measurements of actin-mEOS2 and mEOS2-ArpC5A in spines, filopodia and growth cones, localization and tracking were performed as described above for streaming acquisition. We analyzed trajectories longer than eight points (4 s), giving a minimal resolution of 6 nm s⁻¹ (55 nm/2.3/4 s). A custom routine (Matlab, Matworks) calculated the start to end distance (nm), the duration (sec) and the corresponding speed (nm s⁻¹) of trajectories.

Dual-color sequential dSTORM/PALM

Fixed and stained neurons were imaged at room temperature in a closed Ludin chamber (Life Imaging Services) mounted on an inverted motorized microscope (Nikon Ti) equipped with a 100x1.45NA PL-APO objective and a perfect focus system, allowing long acquisition in oblique illumination mode. Imaging was performed in a solution (water, glucose, glycerol) containing reducing (aliphatic thiols) and oxygen scavengers (glucose oxydase). For dSTORM, ensemble fluorescence of Alexa647 was first converted into dark state using a 640 nm laser at 30–50 kw cm⁻² intensity. Once the ensemble fluorescence converted into the desired density of single molecules per image, the laser power was reduced to 7–15 kw cm⁻² and streaming acquisition was performed at 50–100 Hz for 20,000 frames. The density of single molecules per frame was controlled by using a 405 nm laser (Omicron, Germany). The laser powers were adjusted to keep a specific optimal level of stochastically activated molecules which were well separated during the acquisition using an automatic feedback control (Kechkar *et al*, 2013).

PALM streaming sequences of the mEOS2 construct (50–100 Hz for 20,000 frames) was performed right after the dSTORM sequence using a 561 nm laser at 7–15 kW cm⁻². Both the ensemble and single-molecule fluorescence were collected by the combination of dichroic (F73-866 (Alexa647) and F38-561 (mEOS2), Semrock) and emission filter (F37-692 (Alexa647) and F39-617 (mEOS2), Semrock). The fluorescence was collected using a sensitive EMCCD camera (Evolve, Photometric). The acquisition sequence was driven by MetaMorph software (Molecular Devices). We used multicolor fluorescent microbeads (Tetraspeck, Invitrogen) as fiducial markers to register long-term acquisitions and correct for lateral drifts and chromatic shifts. Single-molecule localization and super-resolution image generation were performed as described in the single-molecule localization method section.

Dispersion analysis

We first generated sptPALM acquisitions using fast acquisition frequency (100 Hz; 8,000–12,000 frames; 80–120 s). Fluorescent single molecules were localized as described above. We generated a super-resolution time-lapse sequence (frame rate 5 s, 500 images) from which high-density zones of localizations were identified using wavelet-based segmentation method (Racine *et al.*, 2006, 2007; Izeddin *et al.*, 2012; Rossier *et al.*, 2012; Kechkar *et al.*, 2013). High-density zones correspond to locations where repetitive mEOS2 fluorescence was detected. This analysis allowed to reject fast diffusing molecules and to select specifically zones of immobilized or slowly mobile molecules. For each spine, we quantified the distances of each zone compared to the centroid of all detected zones. For each condition, we used box plots displaying the median and mean of distance distribution from the centroid of all zones (Supplementary Fig S3D). Dual-color PALM/dSTORM experiments were analyzed similarly, except that we measured the distances between mEOS2 high-density zones with respect to the centroid of PSD-95-A647 zones (Figs 3E and 7C, and Supplementary Fig S6C).

Domain size analysis

ArpC5A, Abi1, VASP, IRSp53 and PSD95 domains were identified from super-resolution images by custom software written as a plug-in running inside MetaMorph software. Single-molecule-based super-resolution images were reconstructed from the 20,000 frames before being analyzed. Domains, which corresponded to clusters of high-density zones, were first identified by wavelet segmentation. Domain dimensions were then computed by two-dimensional anisotropic Gaussian fitting, from which the long and the short axes were extracted as $2.3\sigma_{long}$ and $2.3\sigma_{short}$, respectively. The long and the short axes of each domain were exported to calculate their respective distribution, median and mean (Fig 3D and Supplementary Fig S6B).

Statistical analysis

D'Agostino and Pearson omnibus test was used to test whether values in each sample came from a Gaussian distribution (normality test). Non-Gaussian distributions of speeds (Fig 1D), distances (Figs 3E and 7C, and Supplementary S6C), domain sizes (Fig 3D and Supplementary Fig S6B) and diffusion coefficient (Figs 4I, 5I

and 6I) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25–75%) and compared two by two using non-parametric, two-tailed Mann–Whitney rank sum test. Small samples, such as fractions of immobilization (Figs 4H, 5H and 6H), were represented as mean \pm SEM and compared using two-tailed unpaired *t*-test.

Supplementary information for this article is available online: <http://emboj.embopress.org>

Acknowledgements

We thank B. Tessier, F. Neca, C. Breillat, A. Frouin, D. Bouchet, P. Gonzales and R. Sterling for technical assistance; M. Garcia, J. Petersen, O. Rossier, M. Mondin and N. Sans for helpful discussions; O. Rossier and L. Blanchoin for critical reading of the manuscript; and M. Mondin, P. Legros and C. Pujol of the Bordeaux Imaging Center. We thank N. Sans for providing Shank3-GFP construct, Giorgio Scita for the WAVE-2 antibody and Theresia Stradal for the VASP antibody. We acknowledge financial support from the French Ministry of Research and CNRS, ANR grant Nanomotility (GG), LabEx BRAIN, Conseil Régional Aquitaine, Fondation pour la Recherche Médicale, the ERC Program no. 232942 Nano-Dyn-Syn (DC) and no. 235552 Glutraf (DN) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (KR).

Author contributions

GG conceived and coordinated the study. AC and GG conceptualized the experiments. AC performed most of the experiments. AM performed the experiments on Nap1 and endogenous WAVE. AC, AM and IC performed control chemical LTP experiments. JG, FK, KR and AG designed and generated new protein constructs. DN, AK and JBS developed the sptPALM and dSTORM setup. AK and JBS developed the analytical tools for sptPALM, PALM and dSTORM. CL developed the analytical tools in Matlab used for single protein tracking, flow measurement and representation. AC, AM and GG analyzed the data. JBS, AG, KR, DC and OT contributed scientifically. AC and GG wrote the manuscript and supplement. All authors discussed the results and commented on the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Achard V, Martiel J-LL, Michelot A, Guérin C, Reymann A-CC, Blanchoin L, Boujemaa-Paterski R, Guerin C (2010) A “primer”-based mechanism underlies branched actin filament network formation and motility. *Curr Biol* 20: 423–428
- Ackermann M, Matus A (2003) Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci* 6: 1194–1200
- Bats C, Groc L, Choquet D (2007) The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron* 53: 719–734
- Bear JE, Svitkina TM, Krause M, Schafer DA, Loureiro JJ, Strasser GA, Maly IV, Chaga OY, Cooper JA, Borisy GG, Gertler FB (2002) Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109: 509–521
- Berning S, Willig KI, Steffens H, Dibaj P, Hell SW (2012) Nanoscopy in a living mouse brain. *Science* 335: 551

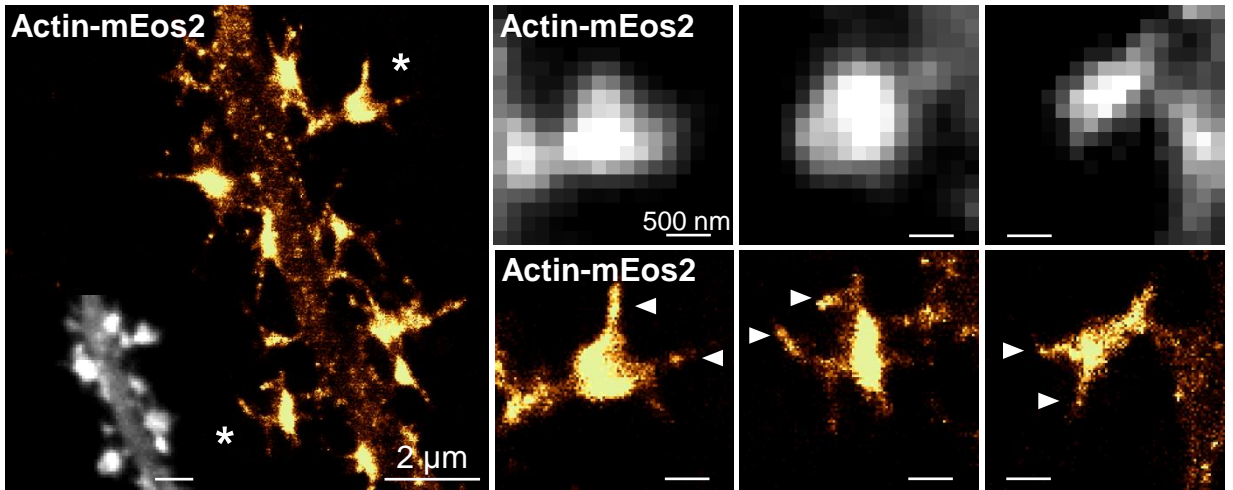
- Betzig E, Patterson GH, Sougrat R, Lindwasser OW, Olenych S, Bonifacino JS, Davidson MW, Lippincott-Schwartz J, Hess HF (2006) Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313: 1642–1645
- Block J, Breitsprecher D, Kühn S, Winterhoff M, Kage F, Geffers R, Duwe P, Rohn JL, Baum B, Brakebusch C, Kuhn S, Geyer M, Stradal TEB, Faix J, Rottner K (2012) FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr Biol* 22: 1005–1012
- Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Bockers TM (2002) ProSAP/Shank postsynaptic density proteins interact with insulin receptor tyrosine kinase substrate IRSp53. *J Neurochem* 83: 1013–1017
- Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y (2014) Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* 82: 444–459
- Breitsprecher D, Kiesewetter AK, Linkner J, Vinzenz M, Stradal TEB, Small JV, Curth U, Dickinson RB, Faix J (2011) Molecular mechanism of Ena/VASP-mediated actin-filament elongation. *EMBO J* 30: 456–467
- Charrier C, Joshi K, Coutinho-Budd J, Kim J-E, Lambert N, de Marchena J, Jin W-L, Vanderhaeghen P, Ghosh A, Sassa T, Polleux F (2012) Inhibition of SRGAP2 function by its human-specific paralogs induces neoteny during spine maturation. *Cell* 149: 923–935
- Cheezum MK, Walker WF, Guilford WH (2001) Quantitative comparison of algorithms for tracking single fluorescent particles. *Biophys J* 81: 2378–2388
- Chen Z, Borek D, Padrick SB, Gomez TS, Metlagel Z, Ismail AM, Umetani J, Billadeau DD, Otwinowski Z, Rosen MK (2010) Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468: 533–538
- Chen B, Brinkmann K, Chen Z, Pak CW, Liao Y, Shi S, Henry L, Grishin NV, Bogdan S, Rosen MK (2014) The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. *Cell* 156: 195–207
- Choi J, Ko J, Racz B, Burette A, Lee J-RR, Kim S, Na M, Lee HW, Kim K, Weinberg RJ, Kim E (2005) Regulation of dendritic spine morphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci* 25: 869–879
- Cingolani LA, Goda Y (2008) Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat Rev Neurosci* 9: 344–356
- Craven SE, El-Husseini AE, Brecht DS (1999) Synaptic targeting of the postsynaptic density protein PSD-95 mediated by lipid and protein motifs. *Neuron* 22: 497–509
- Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C, Zhuang X (2010) Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron* 68: 843–856
- De Rubeis S, Pasciuto E, Li KW, Fernández E, Di Marino D, Buzzi A, Ostroff LE, Klann E, Zwartkruis FJT, Komiyama NH, Grant SGN, Poujol C, Choquet D, Achsel T, Posthuma D, Smit AB, Bagni C (2013) CYFIP1 coordinates mRNA translation and cytoskeleton remodeling to ensure proper dendritic spine formation. *Neuron* 79: 1169–1182
- Dunaevsky A, Tashiro A, Majewska A, Mason C, Yuste R (1999) Developmental regulation of spine motility in the mammalian central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 13438–13443
- Durand CM, Perroy J, Loll F, Perrais D, Fagni L, Bourgeron T, Montcouquiol M, Sans N (2012) SHANK3 mutations identified in autism lead to modification of dendritic spine morphology via an actin-dependent mechanism. *Mol Psychiatry* 17: 71–84
- Edwards FA (1998) Dancing dendrites. *Nature* 394: 129–130
- Fan Y, Tang X, Vitriol E, Chen G, Zheng JQ (2011) Actin capping protein is required for dendritic spine development and synapse formation. *J Neurosci* 31: 10228–10233
- Fifkova E, Delay RJ (1982) Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity. *J Cell Biol* 95: 345–350
- Fischer M, Kaech S, Knutti D, Matus A (1998) Rapid actin-based plasticity in dendritic spines. *Neuron* 20: 847–854
- Fortin DA, Davare MA, Srivastava T, Brady JD, Nygaard S, Derkach VA, Soderling TR (2010) Long-term potentiation-dependent spine enlargement requires synaptic Ca²⁺-permeable AMPA receptors recruited by CaM-kinase I. *J Neurosci* 30: 11565–11575
- Frost NA, Shroff H, Kong H, Betzig E, Blanpied TA (2010) Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron* 67: 86–99
- Fukata Y, Dimitrov A, Boncompain G, Vielemeyer O, Perez F, Fukata M (2013) Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *J Cell Biol* 202: 145–161
- Gardberg M, Talvinen K, Kaipio K, Iljin K, Kampf C, Uhlen M, Carpén O (2010) Characterization of Diaphanous-related formin FMNL2 in human tissues. *BMC Cell Biol* 11: 55
- Gautreau A, Ho HYHY, Li J, Steen H, Gygi SP, Kirschner MW (2004) Purification and architecture of the ubiquitous Wave complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4379–4383
- Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Döbereiner H-G, Kieffer N, Bresnick AR, Sheetz MP (2004) Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* 116: 431–443
- Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G, Beaver W, Döbereiner H-G, Freund Y, Borisy G, Sheetz MP (2007) Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128: 561–575
- Govek E-E, Newey SE, Van Aelst L (2005) The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* 19: 1–49
- Gu J, Lee CW, Fan Y, Komlos D, Tang X, Sun C, Yu K, Hartzell HC, Chen G, Bamburg JR, Zheng JQ (2010) ADF/cofilin-mediated actin dynamics regulate AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 13: 1208–1215
- Haditsch U, Leone DP, Farinelli M, Chrostek-Grashoff A, Brakebusch C, Mansuy IM, McConnell SK, Palmer TD (2009) A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Mol Cell Neurosci* 41: 409–419
- Han K, Holder JL, Schaaf CP, Lu H, Chen H, Kang H, Tang J, Wu Z, Hao S, Cheung SW, Yu P, Sun H, Breman AM, Patel A, Lu H-C, Zoghbi HY (2013) SHANK3 overexpression causes manic-like behaviour with unique pharmacogenetic properties. *Nature* 503: 72–77
- Hering H, Sheng M (2003) Activity-dependent redistribution and essential role of cortactin in dendritic spine morphogenesis. *J Neurosci* 23: 11759–11769
- Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GCR, Kasai H (2008) The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57: 719–729
- Hotulainen P, Llano O, Smirnov S, Tanhuanpää K, Faix J, Rivera C, Lappalainen P, Tanhuanpää K (2009) Defining mechanisms of actin polymerization and depolymerization during dendritic spine morphogenesis. *J Cell Biol* 185: 323–339
- Hotulainen P, Hoogenraad CC (2010) Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol* 189: 619–629
- Innocenti M, Zucconi A, Disanza A, Frittoli E, Arecas LB, Steffen A, Stradal TEB, Di Fiore PP, Carlier M-F, Scita G (2004) Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol* 6: 319–327
- Iwasa JH, Mullins RD (2007) Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol* 17: 395–406

- Izeddin I, Specht CG, Lelek M, Darzacq X, Triller A, Zimmer C, Dahan M (2011) Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS ONE* 6: e15611
- Izeddin I, Boulanger J, Racine V, Specht CG, Kechkar A, Nair D, Triller A, Choquet D, Dahan M, Sibarita JB (2012) Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt Express* 20: 2081–2095
- Jenzora A, Behrendt B, Small JV, Wehland J, Stradal TEB (2005) PREL1 provides a link from Ras signalling to the actin cytoskeleton via Ena/VASP proteins. *FEBS Lett* 579: 455–463
- Kechkar A, Nair D, Heilemann M, Choquet D, Sibarita J-B (2013) Real-time analysis and visualization for single-molecule based super-resolution microscopy. *PLoS ONE* 8: e62918
- Kim Y, Sung JY, Ceglia I, Lee K-W, Ahn J-H, Halford JM, Kim AM, Kwak SP, Park JB, Ho Ryu S, Schenck A, Bardoni B, Scott JD, Nairn AC, Greengard P (2006) Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* 442: 814–817
- Kim IH, Racz B, Wang H, Burianek L, Weinberg R, Yasuda R, Wetsel WC, Soderling SH (2013) Disruption of Arp2/3 results in asymmetric structural plasticity of dendritic spines and progressive synaptic and behavioral abnormalities. *J Neurosci* 33: 6081–6092
- Korobova F, Svitkina T (2010) Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell* 21: 165–176
- Koronakis V, Hume PJ, Humphreys D, Liu T, Hørning O, Jensen ON, McGhie EJ (2011) WAVE regulatory complex activation by cooperating GTPases Arf and Rac1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 14449–14454
- Lai FPL, Szczodrak M, Block J, Faix J, Breitsprecher D, Mannherz HG, Stradal TEB, Dunn GA, Small JV, Rottner K (2008) Arp2/3 complex interactions and actin network turnover in lamellipodia. *EMBO J* 27: 982–992
- Lanier LM, Gates MA, Witke W, Menzies AS, Wehman AM, Macklis JD, Kwiatkowski D, Soriano P, Gertler FB (1999) Mena is required for neurulation and commissure formation. *Neuron* 22: 313–325
- Lebensohn AM, Kirschner MW (2009) Activation of the WAVE complex by coincident signals controls actin assembly. *Mol Cell* 36: 512–524
- Lendvai B, Stern EA, Chen B, Svoboda K (2000) Experience-dependent plasticity of dendritic spines in the developing rat barrel cortex in vivo. *Nature* 404: 876–881
- Lin Y-C, Redmond L (2008) CaMKII β binding to stable F-actin in vivo regulates F-actin filament stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15791–15796
- Lin WH, Nebhan CA, Anderson BR, Webb DJ (2010) Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) induces actin assembly in dendritic spines to promote their development and potentiate synaptic strength. *J Biol Chem* 285: 36010–36020
- Lippi G, Steinert JR, Marczylo EL, D'Oro S, Fiore R, Forsythe ID, Schratt G, Zoli M, Nicotera P, Young KW (2011) Targeting of the Arp3 actin nucleation factor by miR-29a/b regulates dendritic spine morphology. *J Cell Biol* 194: 889–904
- MacGillavry HD, Song Y, Raghavachari S, Blanpied TA (2013) Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic AMPA receptors. *Neuron* 78: 615–622
- Maglione M, Sigrist SJ (2013) Seeing the forest tree by tree: super-resolution light microscopy meets the neurosciences. *Nat Neurosci* 16: 790–797
- Manley S, Gillette JM, Patterson GH, Shroff H, Hess HF, Betzig E, Lippincott-Schwartz J (2008) High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nat Methods* 5: 155
- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H (2004) Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429: 761–766
- Medeiros NA, Burnette DT, Forscher P (2006) Myosin II functions in actin-bundle turnover in neuronal growth cones. *Nat Cell Biol* 8: 215–226
- Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T (2000) IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* 408: 732–735
- Millius A, Watanabe N, Weiner OD (2012) Diffusion, capture and recycling of SCAR/WAVE and Arp2/3 complexes observed in cells by single-molecule imaging. *J Cell Sci* 125: 1165–1176
- Mondin M, Labrousse V, Hosy E, Heine M, Tessier B, Levet F, Poujol C, Blanchet C, Choquet D, Thoumine O (2011) Neurexin-neuroigin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J Neurosci* 31: 13500–13515
- Murakoshi H, Wang H, Yasuda R (2011) Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature* 472: 100–104
- Nair D, Hosy E, Petersen JD, Constals A, Giannone G, Choquet D, Sibarita J-B (2013) Super-resolution imaging reveals that AMPA receptors inside synapses are dynamically organized in nanodomains regulated by PSD95. *J Neurosci* 33: 13204–13224
- Nakagawa H, Miki H, Nozumi M, Takenawa T, Miyamoto S, Wehland J, Small JV (2003) IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J Cell Sci* 116: 2577–2583
- Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y (2004) Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci* 7: 1104–1112
- Okamoto K-I, Narayanan R, Lee SH, Murata K, Hayashi Y (2007) The role of CaMKII as an F-actin-bundling protein crucial for maintenance of dendritic spine structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 6418–6423
- Okamoto K, Bosch M, Hayashi Y (2009) The roles of CaMKII and F-actin in the structural plasticity of dendritic spines: a potential molecular identity of a synaptic tag? *Physiology* 24: 357–366
- Padrick SB, Rosen MK (2010) Physical mechanisms of signal integration by WASP family proteins. *Annu Rev Biochem* 79: 707–735
- Park E, Chi S, Park D (2012) Activity-dependent modulation of the interaction between CaMKII α and Abi1 and its involvement in spine maturation. *J Neurosci* 32: 13177–13188
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen J-E, Woolfrey KM (2011) Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 14: 285–293
- Pollard TD, Cooper JA (2009) Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* 326: 1208–1212
- Ponti A, Machacek M, Gupton SL, Waterman-Storer CM, Danuser G (2004) Two distinct actin networks drive the protrusion of migrating cells. *Science* 305: 1782–1786
- Proepper C, Johannsen S, Liebau S, Dahl J, Vaida B, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED, Boeckers TM (2007) Abelson interacting protein 1 (Abi-1) is essential for dendrite morphogenesis and synapse formation. *EMBO J* 26: 1397–1409
- Racine V, Hertzog A, Jouanneau J, Salamero J, Kervrann C, Sibarita JB (2006) Multiple-target tracking of 3D fluorescent objects based on simulated annealing. *3rd IEEE Int Symp Biomed Imaging*. 1020–1023
- Racine V, Sachse M, Salamero J, Fraiser V, Trubuil A, Sibarita JB (2007) Visualization and quantification of vesicle trafficking on a three-dimensional cytoskeleton network in living cells. *J Microsc* 225: 214–228
- Rácz B, Weinberg RJ, Racz B (2013) Microdomains in forebrain spines: an ultrastructural perspective. *Mol Neurobiol* 47: 77–89

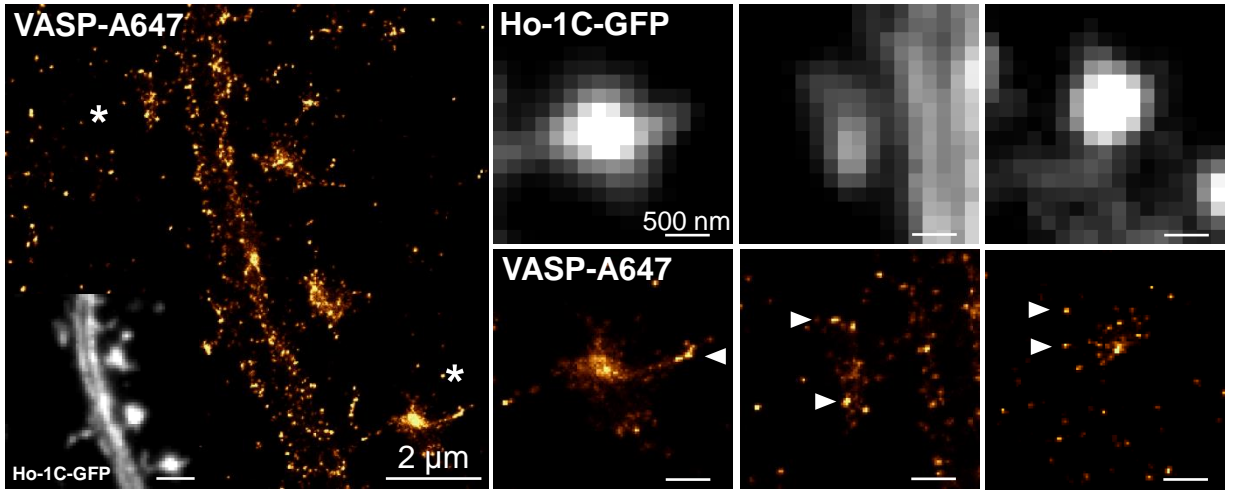
- Rossier O, Oceau V, Sibarita J-BB, Leduc C, Tessier B, Nair D, Gatterdam V, Destaing O, Albiges-Rizo C, Tampe R, Cognet L, Choquet D, Lounis B, Giannone G (2012) Integrins beta(1) and beta(3) exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat Cell Biol* 14: 1057–1067
- Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J (1999) VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1: 321–322
- Rust MB, Gurniak CB, Renner M, Vara H, Morando L, Görlich A, Sassoè-Pognetto M, Bancaabouchi MA, Giustetto M, Triller A, Choquet D, Witke W (2010) Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J* 29: 1889–1902
- Sala C, Piëch V, Wilson NR, Passafaro M, Liu G, Sheng M (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer. *Neuron* 31: 115–130
- Schenck A, Bardoni B, Langmann C, Harden N, Mandel JL, Giangrande A (2003) CYFIP/Sra-1 controls neuronal connectivity in *Drosophila* and links the Rac1 GTPase pathway to the fragile X protein. *Neuron* 38: 887–898
- Scita G, Confalonieri S, Lappalainen P, Suetsugu S (2008) IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol* 18: 52–60
- Sheng M, Hoogenraad CC (2007) The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu Rev Biochem* 76: 823–847
- Shibata ACE, Chen LH, Nagai R, Ishidate F, Chadda R, Miwa Y, Naruse K, Shirai YM, Fujiwara TK, Kusumi A (2013) Rac1 recruitment to the archipelago structure of the focal adhesion through the fluid membrane as revealed by single-molecule analysis. *Cytoskeleton (Hoboken)* 177: 161–177
- Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, Betzig E (2008) Live-cell photoactivated localization microscopy of nanoscale adhesion dynamics. *Nat Methods* 5: 417–423
- Soderling SH, Langeberg LK, Soderling JA, Davee SM, Simerly R, Raber J, Scott JD (2003) Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1723–1728
- Soderling SH, Guire ES, Kaech S, White J, Zhang F, Schutz K, Langeberg LK, Banker G, Raber J, Scott JD (2007) A WAVE-1 and WRP signaling complex regulates spine density, synaptic plasticity, and memory. *J Neurosci* 27: 355–365
- Spacek J, Harris KM (2004) Trans-endocytosis via spinules in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 24: 4233–4241
- Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN (2002) Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci* 5: 239–246
- Steffen A, Rottner K, Ehinger J, Innocenti M, Scita G, Wehland J, Stradal TEB (2004) Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J* 23: 749–759
- Sturgill JF, Steiner P, Czervionke BL, Sabatini BL (2009) Distinct domains within PSD-95 mediate synaptic incorporation, stabilization, and activity-dependent trafficking. *J Neurosci* 29: 12845–12854
- Suetsugu S, Kurisu S, Oikawa T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T (2006) Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol* 173: 571–585
- Svitkina TM, Bulanova EA, Chaga OY, Vignjevic DM, Kojima S, Vasiliev JM, Borisy GG (2003) Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* 160: 409–421
- Tashiro A, Yuste R (2004) Regulation of dendritic spine motility and stability by Rac1 and Rho kinase: evidence for two forms of spine motility. *Mol Cell Neurosci* 26: 429–440
- Tatavarty V, Kim E-J, Rodionov V, Yu J (2009) Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS ONE* 4: e7724
- Tatavarty V, Das S, Yu J (2012) Polarization of actin cytoskeleton is reduced in dendritic protrusions during early spine development in hippocampal neuron. *Mol Biol Cell* 23: 3167–3177
- Ueda Y, Hayashi Y (2013) PIP3 regulates spinule formation in dendritic spines during structural long-term potentiation. *J Neurosci* 33: 11040–11047
- Van de Linde S, Loschberger A, Klein T, Heidbreder M, Wolter S, Heilemann M, Sauer M (2011) Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nat Protoc* 6: 991–1009
- Xie Z, Srivastava DP, Photowala H, Kai L, Cahill ME, Woolfrey KM, Shum CY, Surmeier DJ, Penzes P (2007) Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* 56: 640–656
- Zhang Y, Matt L, Patriarchi T, Malik ZA, Chowdhury D, Park DK, Renieri A, Ames JB, Hell JW (2014) Capping of the N-terminus of PSD-95 by calmodulin triggers its postsynaptic release. *EMBO J* 33: 1–13
- Zhou Q, Homma KJ, Poo MM (2004) Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron* 44: 749–757

Figure S1 - Giannone

A



B



C

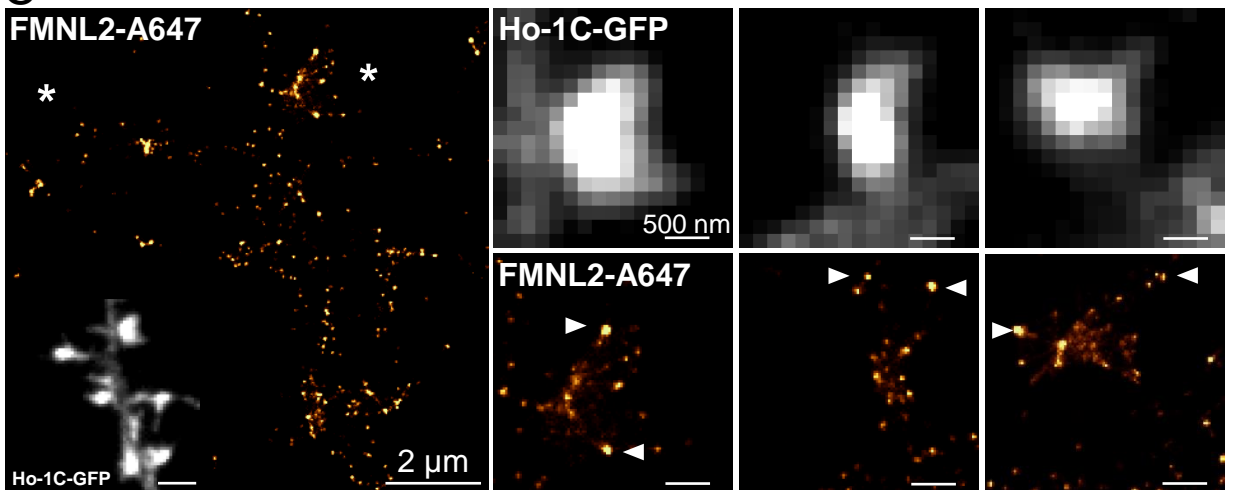
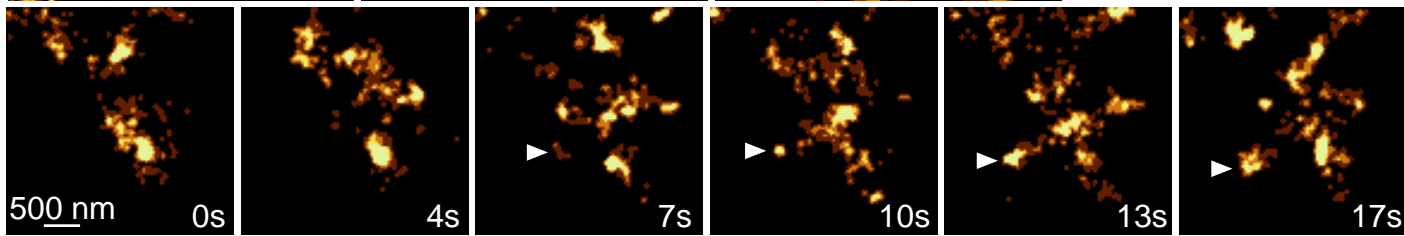
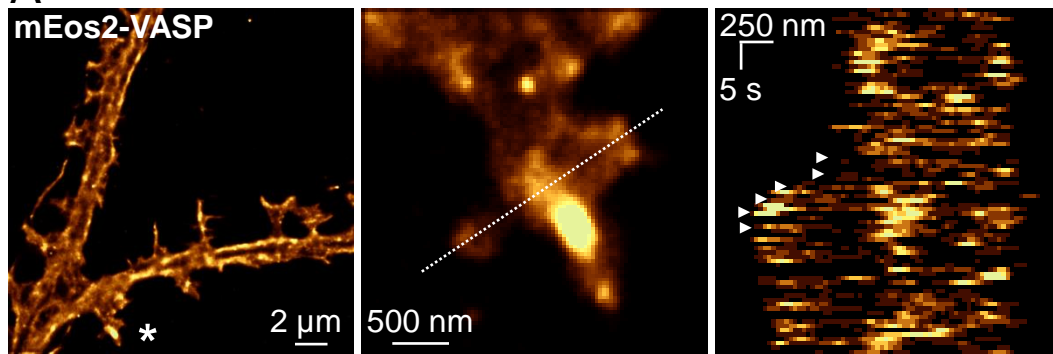
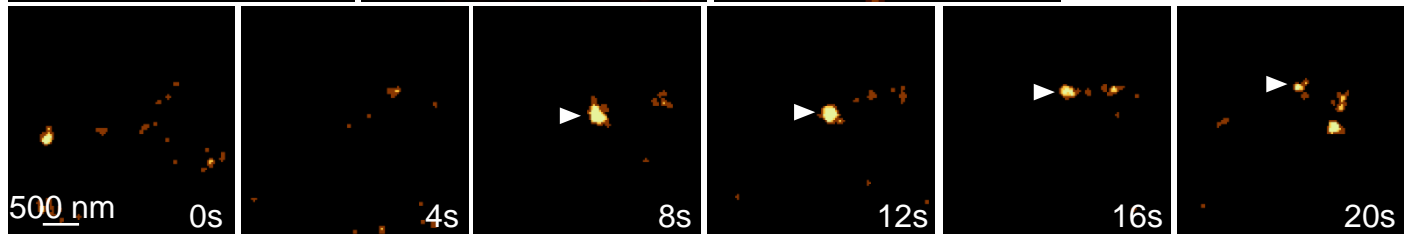
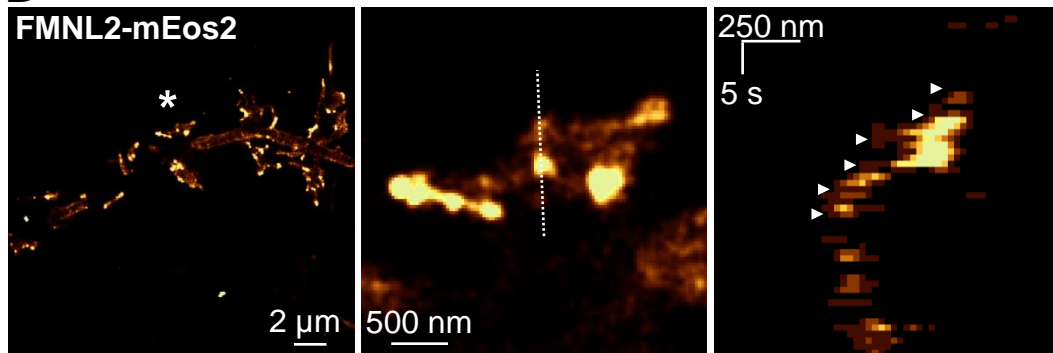


Figure S2 - Giannone

A



B



C

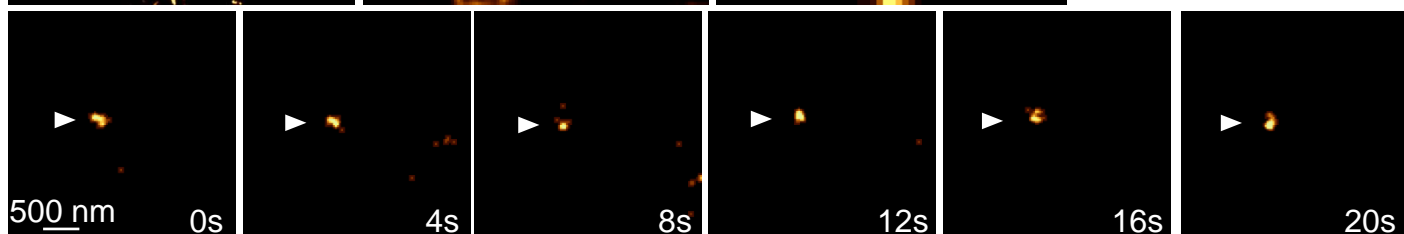
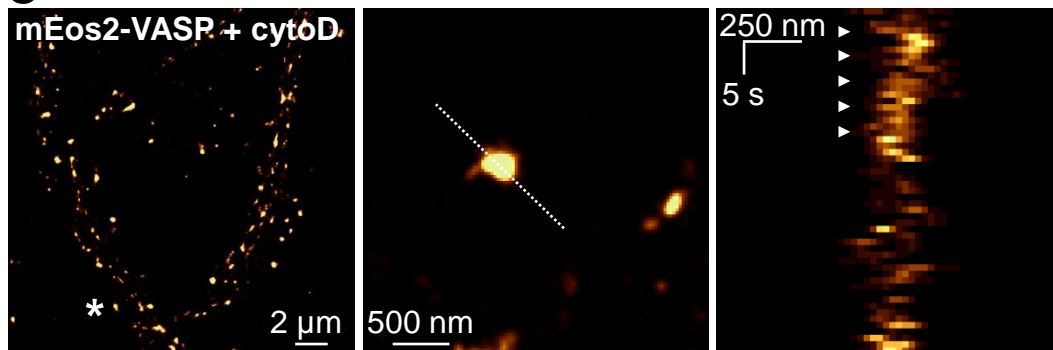
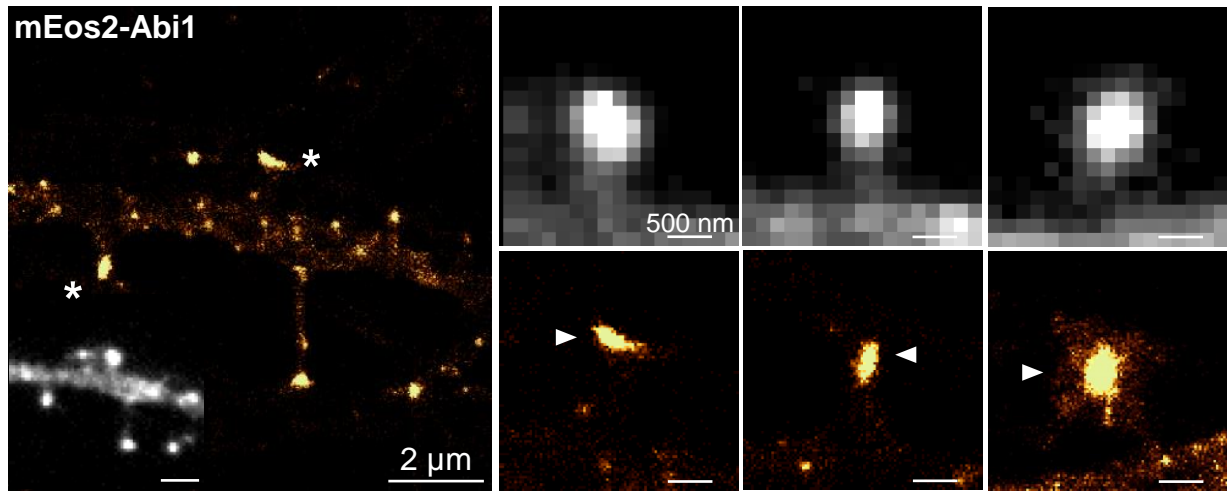
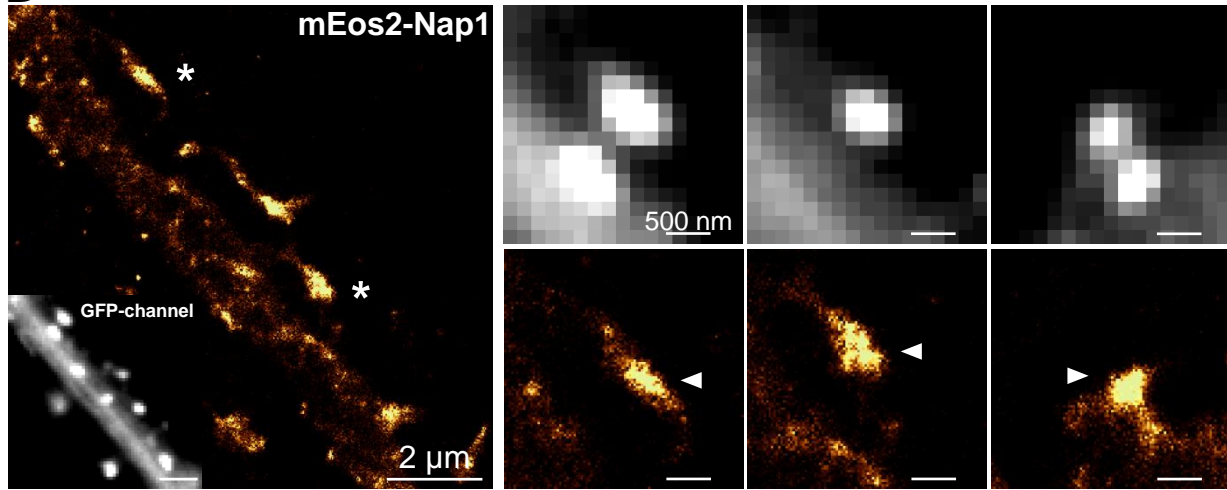


Figure S3 - Giannone

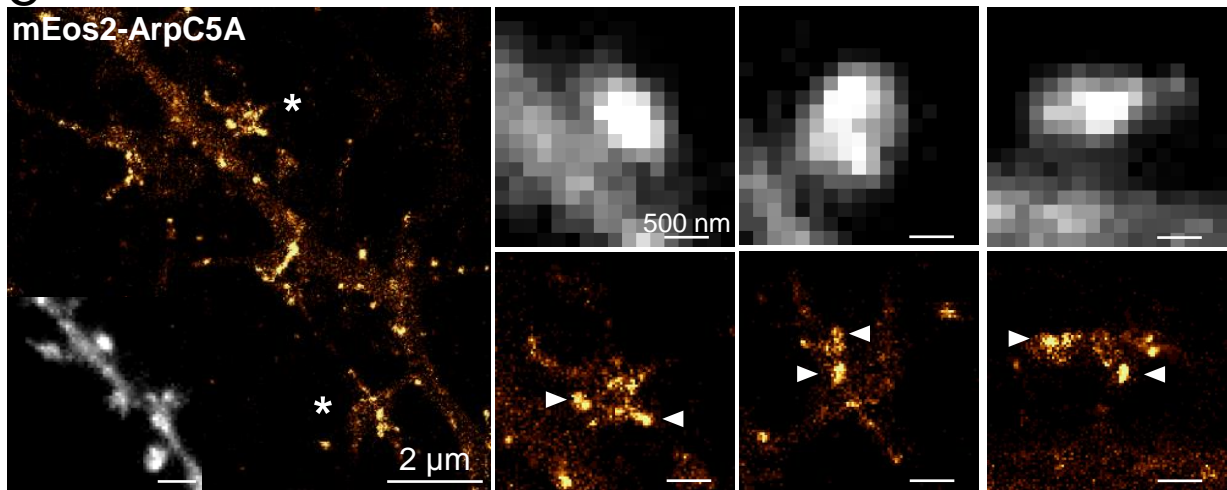
A



B



C



D

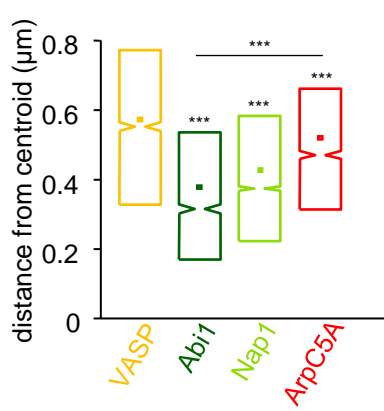
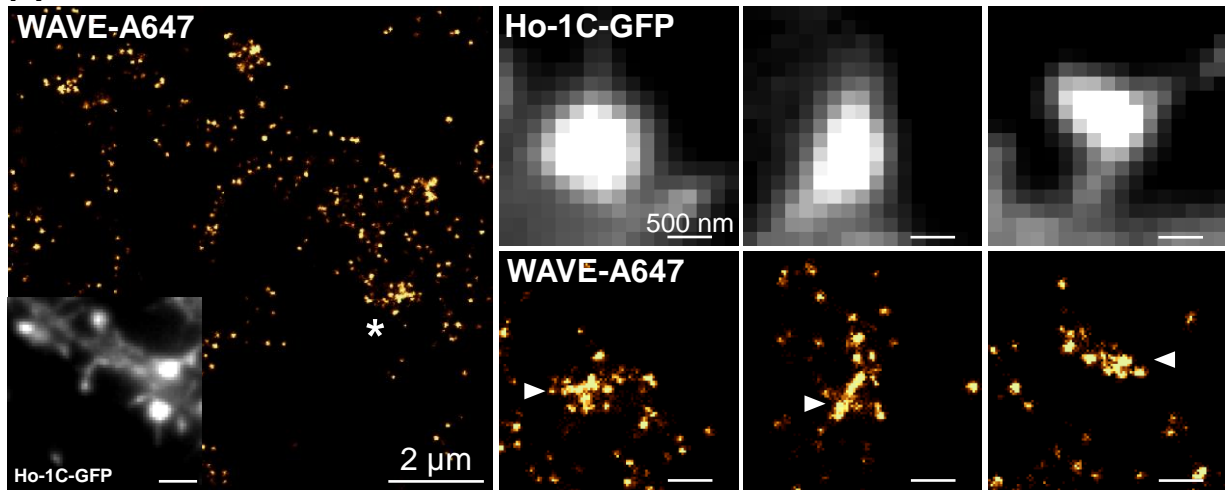


Figure S4 - Giannone

A



B

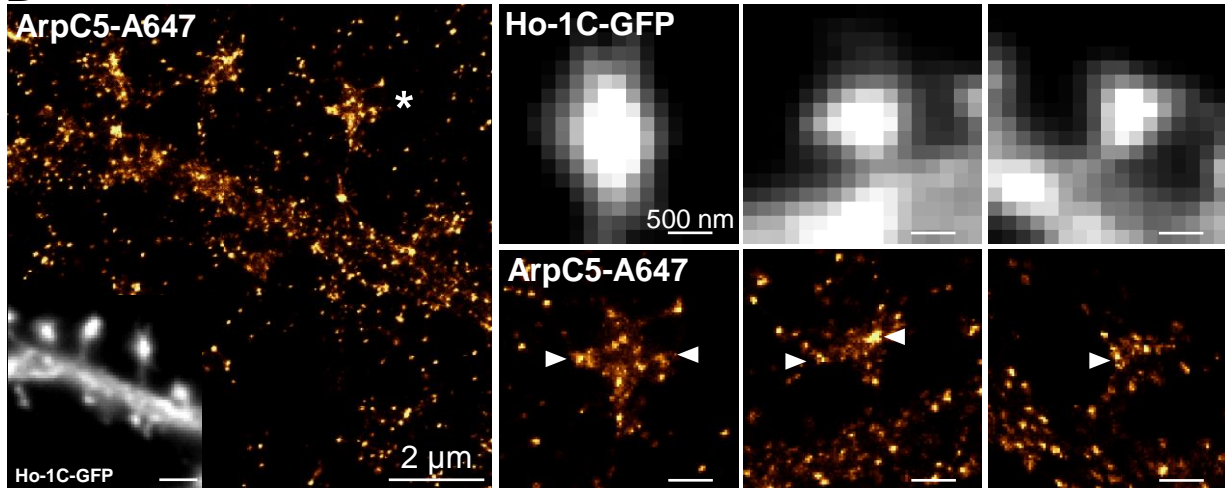


Figure S5 - Giannone

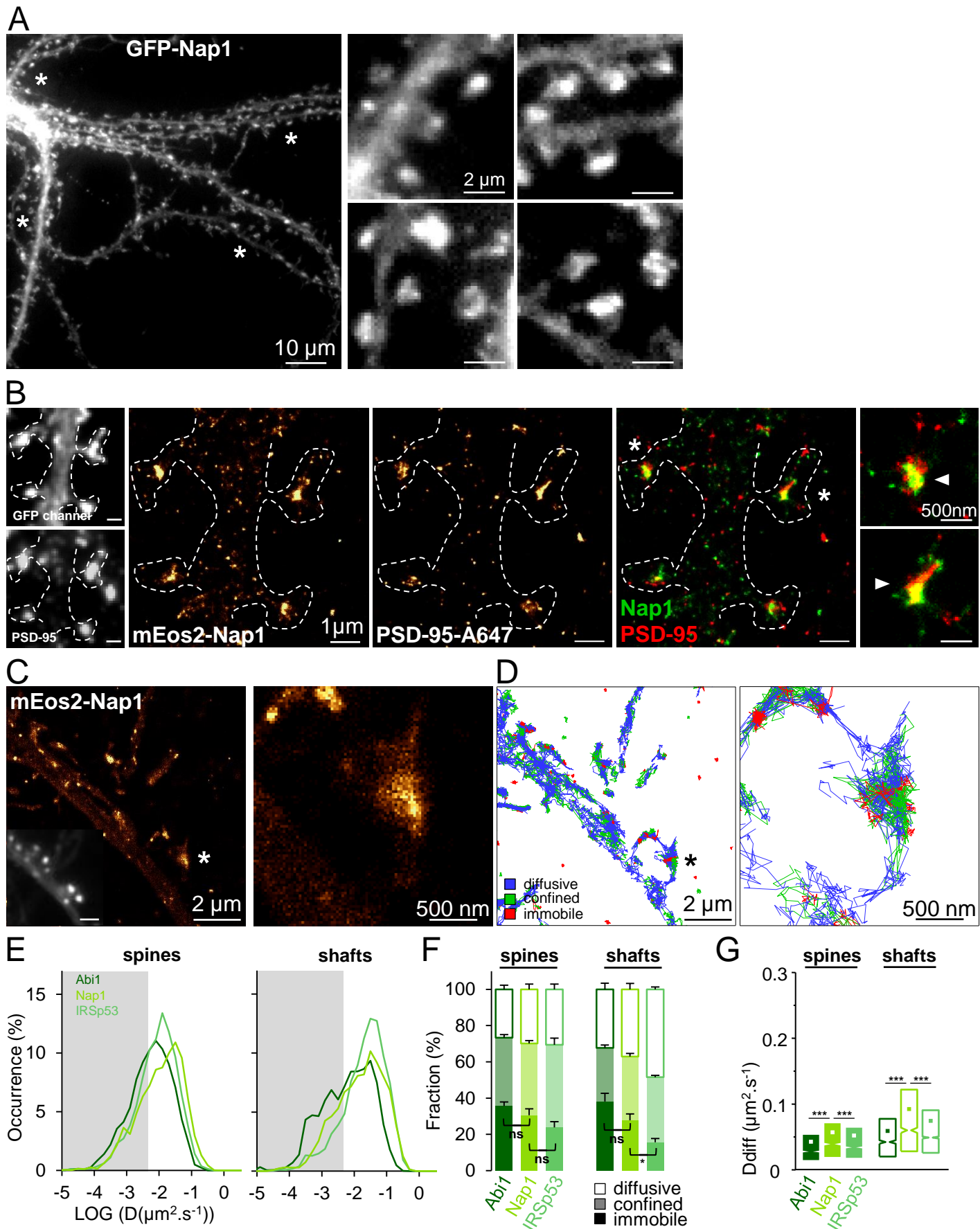


Figure S6 - Giannone

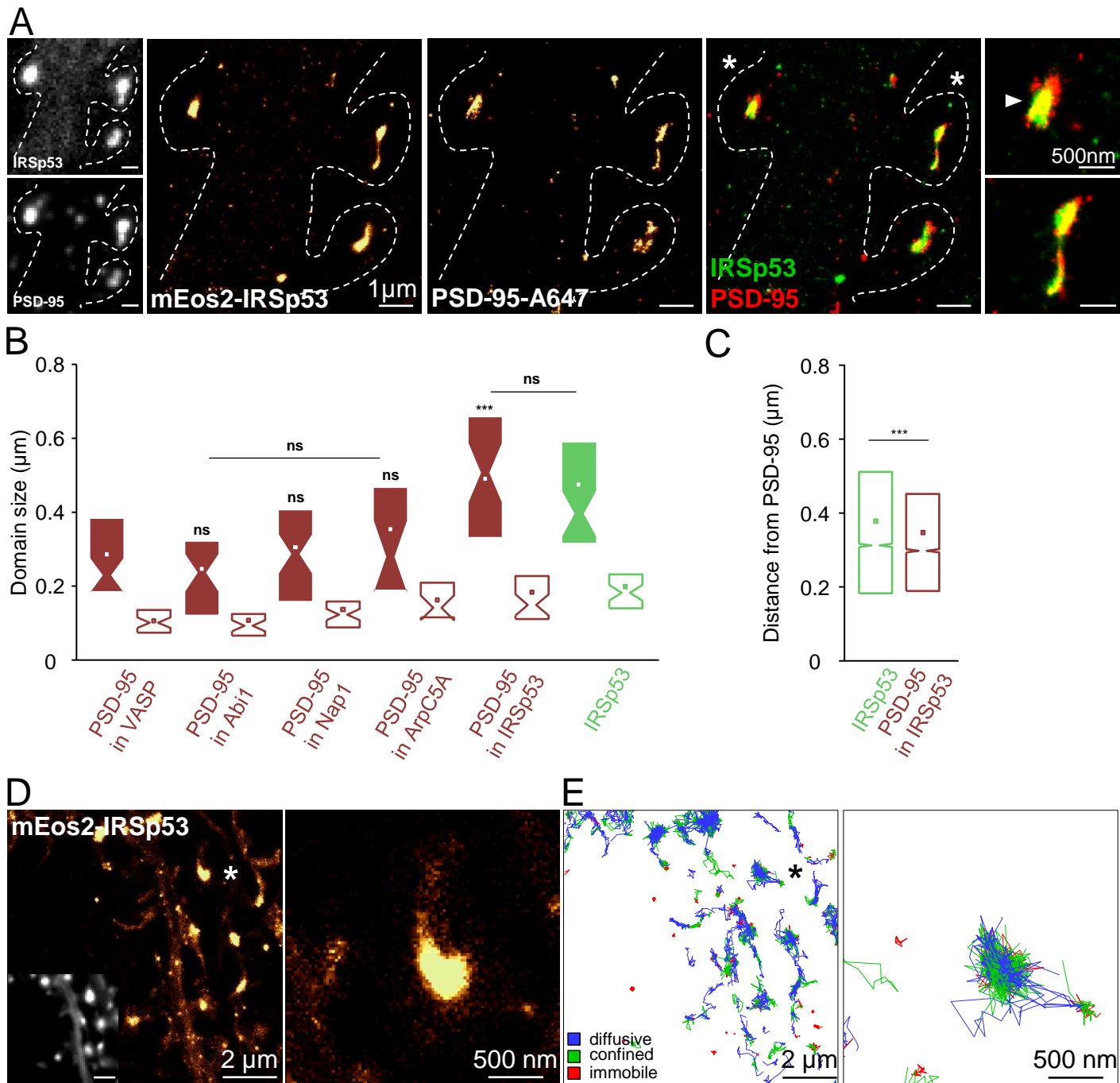


Figure S7 - Giannone

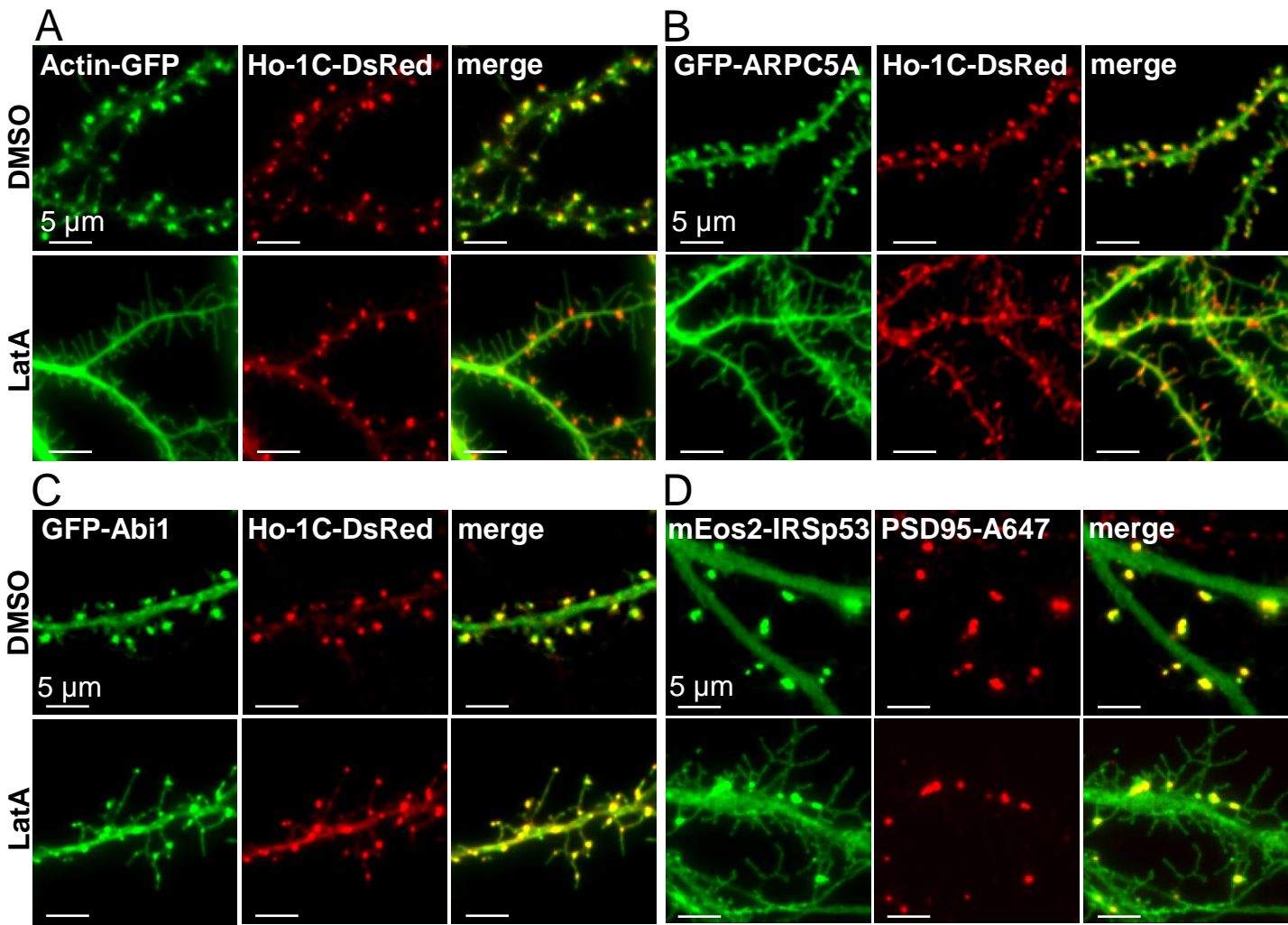


Figure S8 - Giannone

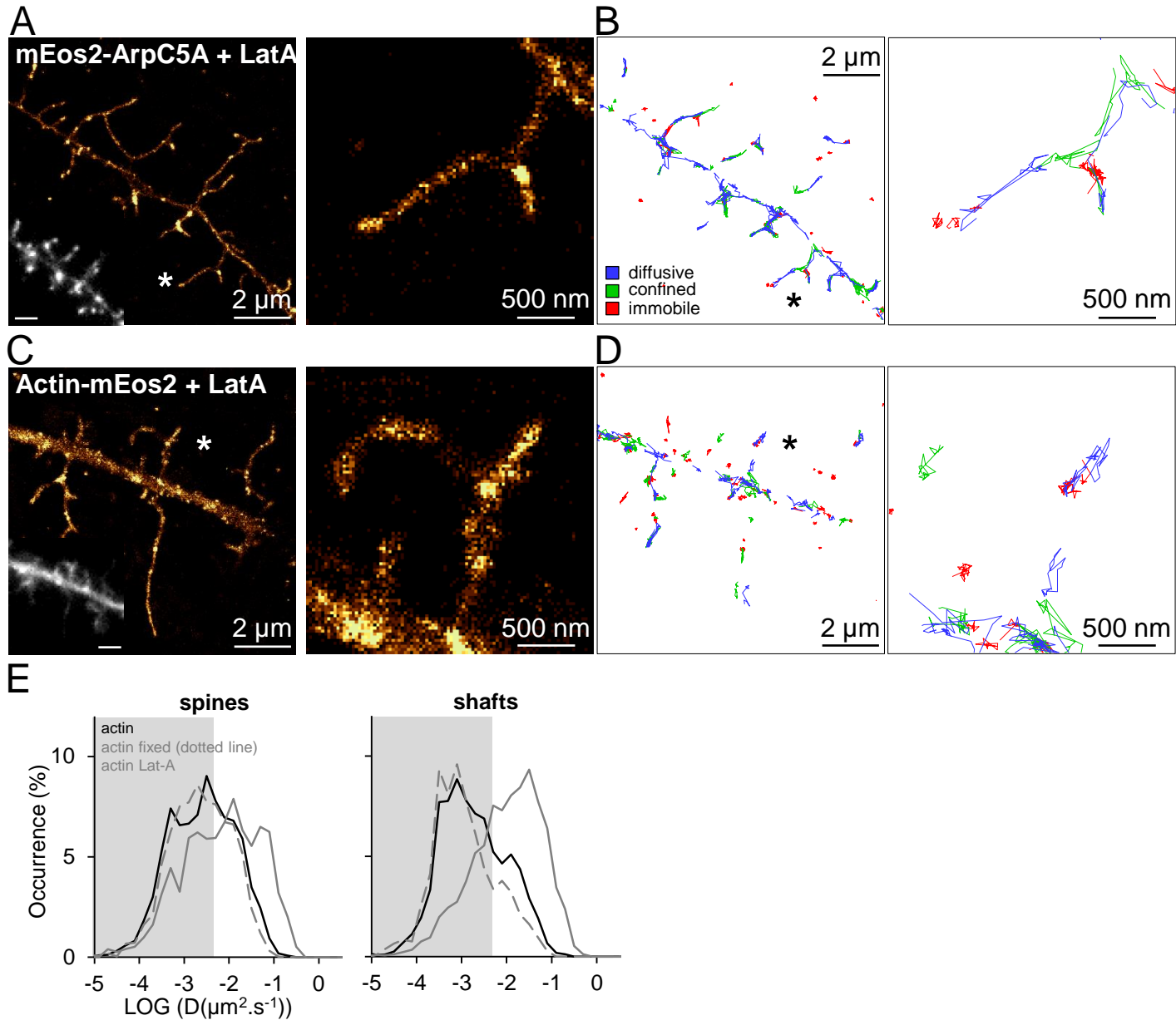
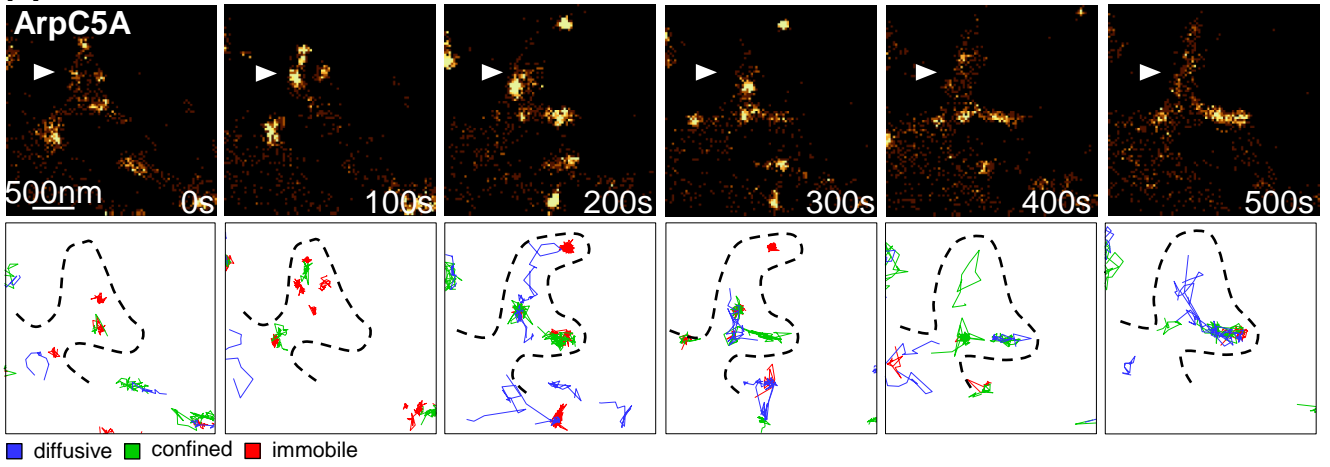
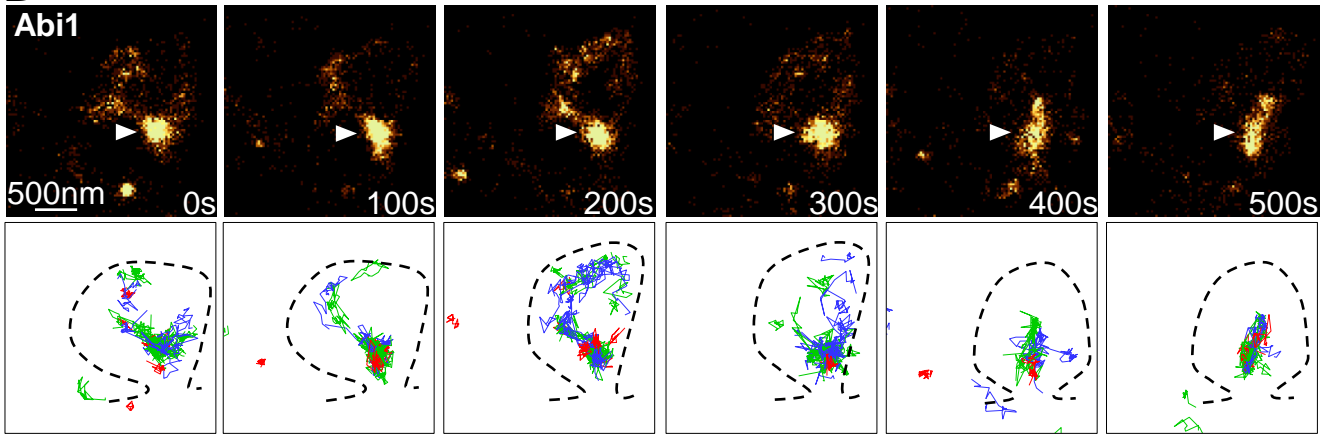


Figure S9 - Giannone

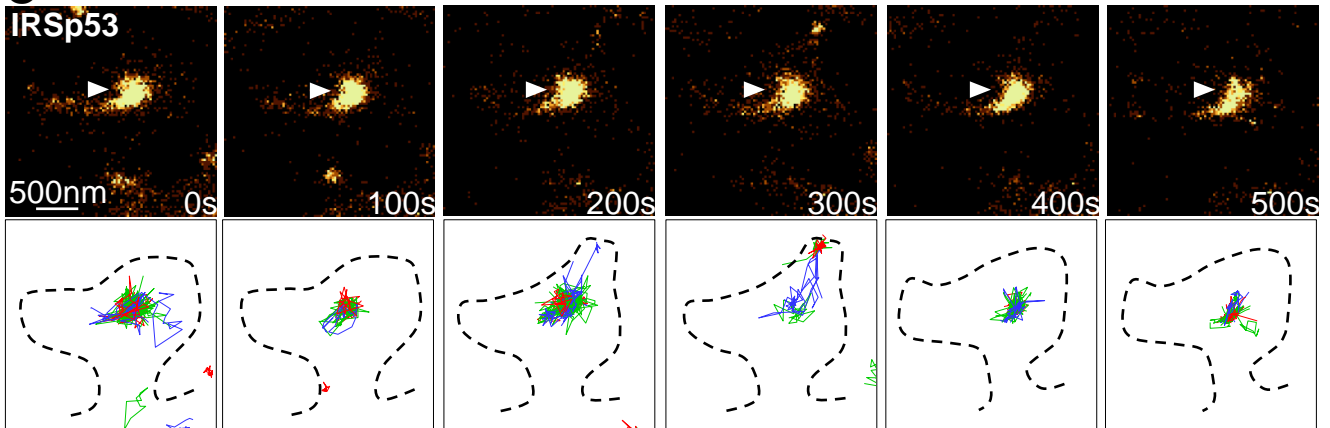
A



B



C



D

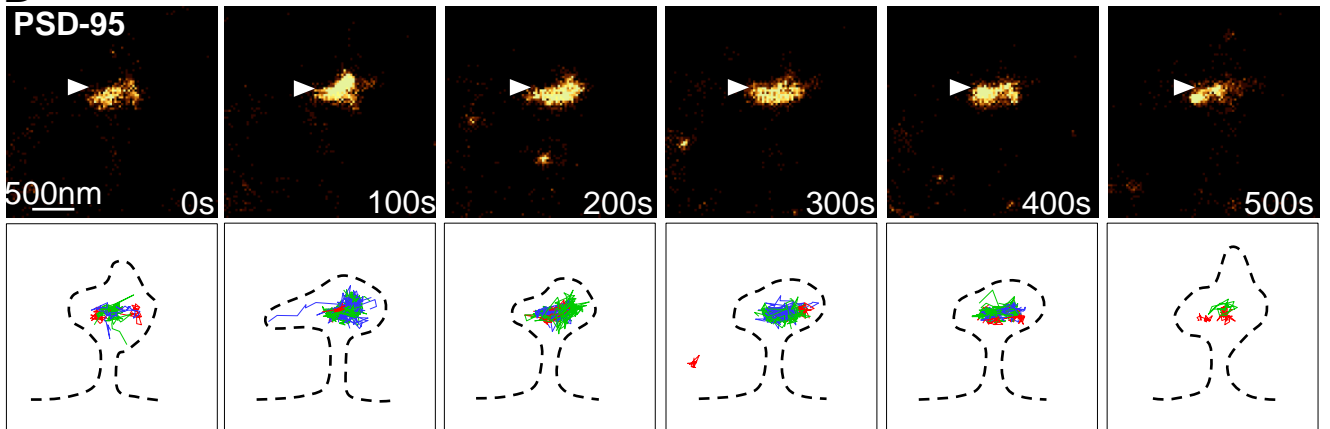
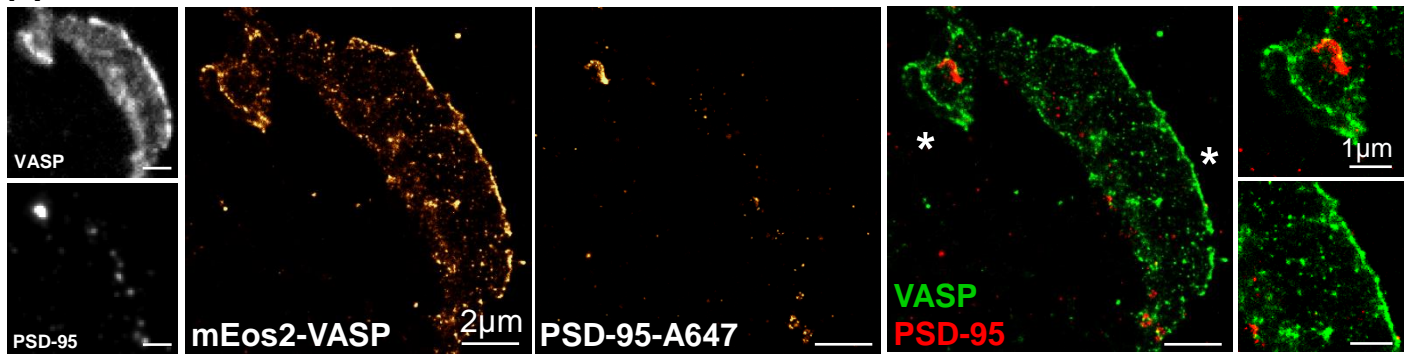
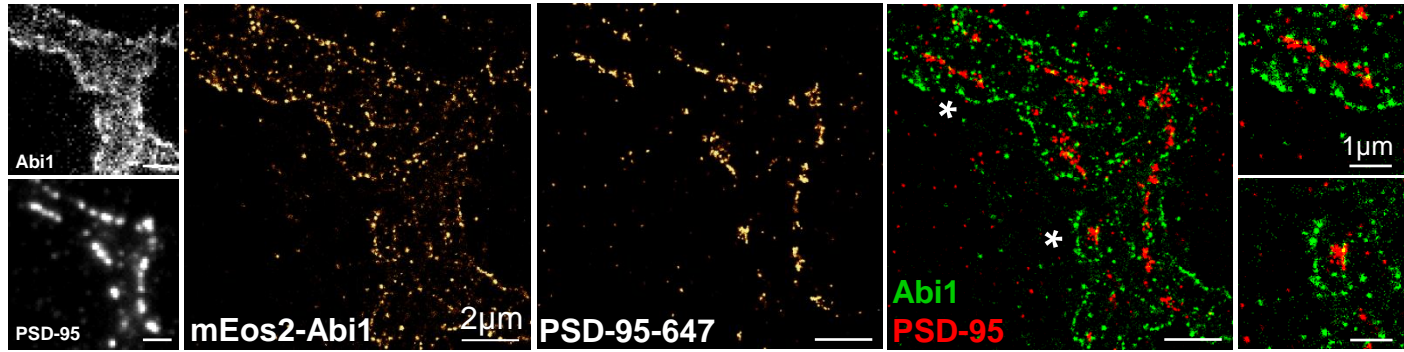


Figure S10 - Giannone

A



B



Supplementary Information

Supplementary figure legends

Figure S1. Endogenous VASP and FMNL2 localize at the tips of finger-like protrusions.

(A) Super-resolution intensity image of actin-mEOS2 in a live neuron (17-21 DIV) obtained from a sptPALM sequence at high frequency (100 Hz) (inset: fluorescence image of mEOS2-cyto). Scale bars, 2 μm . Spines highlighted with a star (left) are shown on the right together with a spine belonging to another neuron. Scale bars, 500 nm. Arrowheads indicate examples of finger-like protrusions. (B) Super-resolution intensity image of endogenous VASP labeled with Alexa647 (VASP-A647) in a fixed neuron (17-21 DIV) obtained from a dSTORM sequence at high frequency (100 Hz) (inset: fluorescence image of Ho-1C-GFP). Scale bars, 2 μm . Spines highlighted with a star (left) are shown on the right together with a spine belonging to another neuron. Scale bars, 500 nm. Arrowheads indicate VASP accumulations at protrusion tips. (C) Same as B for endogenous FMNL2 labeled with Alexa647 (FMNL2-A647). Arrowheads indicate FMNL2 accumulations at protrusion tips.

Figure S2. VASP and FMNL2 move forwards at protrusion tips in spines.

(A) (Upper panels) High frequency (100 Hz) intensity images of mEOS2-VASP in a live neuron. Scale bar, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown in the middle. Scale bar, 500 nm. Kymograph (right) generated from the high frequency sptPALM time-lapse along the length of the dashed line displayed in the middle image. Arrowheads correspond to the acquisition time of images displayed underneath. Scale bars, 250 nm, 5 s. (Lower panels) Super-resolution intensity image time-lapse recording of mEOS2-VASP in the same spine. Scale bar, 500 nm. Arrowheads indicate VASP accumulations moving forwards with the tips of protrusions. (B) Same as A for FMNL2-mEOS2. (C) Same as A for mEOS2-VASP 15 min after addition of 1 μM of cytochalasin-D. Arrowheads indicate VASP accumulation remaining stationary at the center of the spine.

Figure S3. WAVE complex subunits are clustered into a single domain while Arp2/3 forms multiple nano-domains

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-Abi1 in a live neuron (17-21 DIV) obtained from a sptPALM sequence at high frequency (100 Hz) (inset: fluorescence image of mEOS2-Abi1). Scale bars, 2 μ m. Spines highlighted with a star (left) are shown on the right together with a spine belonging to another neuron. Scale bars, 500 nm. Arrowheads indicate Abi1 domain. (B) Same as A for mEOS2-Nap1 (inset: fluorescence image of mEOS2-Nap1 and Homer-1C-GFP). Arrowheads indicate Nap1 domain. (C) Same as A for mEOS2-ArpC5A. Arrowheads indicate Arp2/3 nano-domains. (D) Box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%) of distance distribution from the centroid of detections for: mEOS2-VASP (yellow, 3 cells, 23 spines, 2972 detections), mEOS2-Abi1 (dark green, 5 cells, 31 spines, 1904 detections), mEOS2-Nap1 (green, 5 cells, 38 spines, 8060 detections) and mEOS2-ArpC5A (red, 5 cells, 31 spines, 2173 detections). Where indicated, statistical significance was obtained using non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test; the different conditions were compared with the VASP condition. Otherwise, black lines indicate which conditions were compared. The resulting *P* values are indicated as follows *** for $P < 0.001$.

Figure S4. Localization of endogenous WAVE and Arp2/3 complex in spines.

(A) Super-resolution intensity image of endogenous WAVE-1 and WAVE-2 co-labeled with Alexa647 (WAVE-A647) in a fixed neuron (17-21 DIV) obtained from a dSTORM sequence at high frequency (100 Hz) (inset: fluorescence image of Ho-1C-GFP). Scale bars, 2 μ m. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right together with spines belonging to another neuron. Scale bars, 500 nm. Arrowheads indicate WAVE domain. (B) Same as A for endogenous ArpC5 labeled with Alexa647 (ArpC5-A647). Arrowheads indicate Arp2/3 nano-domains.

Figure S5. Nap1 is clustered into a single domain co-localizing with PSD-95.

(A) Hippocampal cultured neuron expressing GFP-Nap1 (16 DIV). Scale bar, 10 μm . Regions highlighted with a star (left) are shown on the right. Scale bars, 2 μm . (B) Dual color super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively mEOS2-Nap1 (left) and endogenous PSD-95 labeled with Alexa647 (middle) in a fixed neuron. Merge (right). Scale bars, 1 μm . Left insets: fluorescence image of mEOS2-Nap1 together with Homer-1C-GFP (upper panel) and PSD-95-A647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines marked by stars in the merged image. Scale bars, 500 nm. Arrowhead indicate Nap1 domain. Dotted lines were manually added to distinguish spine outlines and shafts. (C) Super-resolution intensity image of mEOS2-Nap1 obtained from a sptPALM sequence (20 Hz, duration: 600s; inset: fluorescence image of mEOS2-Nap1). Scale bars, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm. (D) Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red). Scale bars, 2 μm . Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm. The resulting P values are indicated as follows: ns for $P > 0.05$; *** for $P < 0.001$. (E) Distribution of LOG(D) for mEOS2-Abi1 (dark green), mEOS2-Nap1 (green) and mEOS2-IRSp53 (light green) in spines (left) and shafts (right), mean for cells. The gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. (F) Fraction of diffusive, confined and immobile populations in spines (left) and shafts (right), mean \pm SEM for cells. (G) Diffusion coefficient (D) for free diffusive trajectories in spines (left) and shafts (right) were represented by box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%). All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): Abi1 (7/11885), Nap1 (6/9026) and IRSp53 (5/17974). Abi1 and IRSp53 values from Fig 5G-I are displayed for comparison. Where indicated, statistical significance was obtained using two-tailed unpaired t test for fractions of immobilization (F) or non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test for diffusion coefficient (G). The resulting P values are indicated as follows: ns for $P > 0.05$; * for $0.01 < P < 0.05$; ** for $0.001 < P < 0.01$; *** for $P < 0.001$.

Figure S6. IRSp53 is clustered into a single domain co-localizing with PSD-95.

(A) Dual color super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of respectively mEOS2-IRSp53 (left) and endogenous PSD-95 labeled with Alexa647 (middle) in a fixed neuron. Merge (right). Scale bars, 1 μ m. Left insets: fluorescence image of mEOS2-IRSp53 (upper panel) and PSD-95-A647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of the spines marked by stars in the merged image. Scale bars, 500 nm. Arrowhead indicate IRSp53 domain. Dotted lines were manually added to distinguish spine outlines and shafts. (B) Box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%) of domain size for PSD-95-A647 in different conditions: mEOS2-VASP expressing neurons (dark red, 5 cells, 44 spines, 45 domains), mEOS2-Abi1 expressing neurons (dark red, 4 cells, 34 spines, 38 domains), mEOS2-Nap1 expressing neurons (dark red, 4 cells, 54 spines, 54 domains), mEOS2-ARPC5A expressing neurons (dark red, 3 cells, 20 spines, 20 domains) and mEOS2-IRSp53 expressing neurons (dark red, 3 cells, 32 spines, 41 domains), plus the domain size of mEOS2-IRSp53 (light green, 3 cells, 39 spines, 48 domains). Note that over-expression of mEOS2-IRSp53 increases the PSD size while there are no significant differences between the other conditions. Where indicated, statistical significance was obtained using non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test. The different conditions were compared with the long axis of PSD-95-A647 in mEOS2-VASP expressing neurons. Otherwise, a black line indicates which conditions were compared. (C) Box plots displaying the median (notch) and mean (square) \pm percentile (25-75%) of distance distribution from the PSD-95 centroid for mEOS2-IRSp53 (light green, 3 cells, 35 spines, 12617 detections) and PSD-95-A647 (dark red, 3 cells, 35 spines, 8677 detections) in mEOS2-IRSp53 expressing neurons. Statistical significances were obtained using non-parametric, two-tailed Mann-Whitney rank sum test. (D) Super-resolution intensity image of mEOS2-IRSp53 obtained from a sptPALM sequence (20 Hz, duration: 600s; inset: fluorescence image of mEOS2-IRSp53). Scale bars, 2 μ m. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm. (E) Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red). Scale bars, 2 μ m. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm. The resulting *P* values are indicated as follows: ns for $P > 0.05$; *** for $P < 0.001$.

Figure S7. Effect of F-actin depolymerization using Latrunculin A on the localization of branched F-actin regulators in spines.

(A) Fluorescence images of neurons transfected with actin-GFP (green, left) and Homer-1C-DsRed (red, middle) in control (upper panels) and LatA (1 μ M) treated neurons (lower panels). Scale bars, 5 μ m. Merge (right). (B) Same as A for GFP-ArpC5A. (C) Fluorescence images of neurons transfected with GFP-Abi1 (green, left) and Homer-1C-DsRed (red, middle) in control (upper panels) and LatA treated neurons (lower panels). Scale bars, 5 μ m. Merge (right). (D) Fluorescence images of mEOS2-IRSp53 (green, left) and endogenous PSD-95 labeled with Alexa647 (red, middle) in control (upper panels) and LatA treated neurons (lower panels). Merge (right). Scale bars, 5 μ m.

Figure S8. F-actin depolymerization increases actin and Arp2/3 free-diffusion

(A) Super-resolution intensity image of mEOS2-ArpC5A in a neuron treated with LatA obtained from a sptPALM sequence (20 Hz, duration: 600s; inset: fluorescence image of mEOS2-ArpC5A). Scale bars, 2 μ m. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm. (B) Corresponding trajectories are color-coded to show their diffusion modes: diffusive (blue), confined (green) and immobile (red). Scale bars, 2 μ m. Spine highlighted with a star (left) is shown on the right. Scale bar, 500 nm. (C and D) Same as A and B for LatA actin-mEOS2. (E) Distribution of LOG(D) for mEOS2-actin in live cells (black), mEOS2-actin in fixed cells (dotted grey) and mEOS2-actin + Lat-A (grey) in spines (left) and shafts (right; mean for cells). The gray areas including D values inferior to $0.004 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ correspond to immobile trajectories. All results for each condition correspond to pooled data from several independent experiments (cells/trajectories): actin (4/6113), actin fixed (5/4849) and actin + Lat-A (4/3807). For comparison, the mEOS2-actin data from Fig 4G are shown again.

Figure S9. Immobilization zones are transient for Arp2/3, while confinement zones are persistent for Abi1, IRSp53 and PSD-95.

(A) Super-resolution intensity image time-lapse of mEOS2-ArpC5A in a spine (upper panels), corresponding sptPALM trajectories (lower panels). Scale bars, 500 nm. Transient zones of Arp2/3 immobilization (arrowhead) continually relocate within spines. (B) Same as A for mEOS2-Abi1. (C) Same as A for mEOS2-IRSp53. (D) Same as A for mEOS2-PSD95. (B, C

and D) The long-lasting domain (arrowheads) corresponds to immobile and confined trajectories. Dotted lines were manually added to distinguish spine outlines.

Figure S10. VASP and Abi localize at the tips of lamellipodia-like structures induced by constitutively active Rac1.

(A) Dual color super-resolution images using sequential PALM and dSTORM of mEOS2-VASP (left) and endogenous PSD-95, labeled with Alexa647 (middle), respectively, in a fixed neuron expressing cerulean-Rac1-Q61L. Merge (right). Scale bars, 2 μm . Left insets: fluorescence image of mEOS2-VASP (upper panel) and PSD-95-A647 (lower panel). Right insets: merge PALM/dSTORM of structures marked by stars in the merged image. Scale bars, 1 μm . **(B)** Same as A for mEOS2-Abi1.

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

	mEOS2-ArpC5A		actin-mEOS2		actin-mEOS2 fixed	
trajectories, cells	11097, 11		6113, 4		4849, 5	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	58 ± 3	<4	56 ± 2	<4	62 ± 5	<4
confined spines	24 ± 2	27 ± 1	25 ± 2	17 ± 1	23 ± 3	16 ± 1
free-diffusive spines	18 ± 1	56 ± 2	19 ± 2	35 ± 1	15 ± 2	29 ± 1
immobile shafts	54 ± 2	<4	68 ± 3	<4	80 ± 5	<4
confined shafts	22 ± 1	36 ± 2	18 ± 1	16 ± 1	12 ± 3	15 ± 1
free-diffusive shafts	24 ± 2	84 ± 3	14 ± 2	36 ± 2	8 ± 2	30 ± 2
r _{conf} spines (nm)	111 ± 1		96 ± 2		99 ± 1	
r _{conf} shafts (nm)	123 ± 3		91 ± 2		93 ± 3	
	mEOS2-ArpC5ALatA		actin-mEOS2 LatA		mEOS2 cytosolic	
trajectories, cells	4464, 6		3807, 4		1700, 3	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	39 ± 5	<4	43 ± 4	<4	40 ± 3	<4
confined spines	33 ± 2	34 ± 2	31 ± 2	46 ± 2	34 ± 2	60 ± 5
free-diffusive spines	28 ± 3	64 ± 3	26 ± 2	89 ± 4	26 ± 2	89 ± 7
immobile shafts	34 ± 7	<4	34 ± 4	<4	40 ± 3	<4
confined shafts	34 ± 3	48 ± 3	35 ± 2	43 ± 2	33 ± 2	55 ± 5
free-diffusive shafts	32 ± 4	78 ± 3	31 ± 3	88 ± 4	27 ± 2	101 ± 8
r _{conf} spines (nm)	131 ± 2		137 ± 4		166 ± 6	
r _{conf} shafts (nm)	154 ± 3		155 ± 3		161 ± 6	

	mEOS2-CAAX		mEOS2-Abi1		mEOS2-Nap1	
trajectories, cells	3549, 3		11885, 7		9026, 6	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	16 ± 2	<4	35 ± 2	<4	31 ± 3	<4
confined spines	45 ± 1	105 ± 4	38 ± 2	21 ± 1	40 ± 2	37 ± 1
free-diffusive spines	39 ± 3	163 ± 6	27 ± 2	42 ± 1	30 ± 3	56 ± 1
immobile shafts	14 ± 1	<4	38 ± 4	<4	28 ± 4	<4
confined shafts	43 ± 1	92 ± 3	30 ± 2	30 ± 1	35 ± 2	49 ± 2
free-diffusive shafts	43 ± 1	184 ± 5	32 ± 3	58 ± 2	37 ± 3	91 ± 2
r _{conf} spines (nm)	230 ± 4		110 ± 1		145 ± 1	
r _{conf} shafts (nm)	219 ± 4		118 ± 2		161 ± 3	

	mEOS2-IRSp53		mEOS2-PSD95		mEOS2-Rac1	
trajectories, cells	17974, 5		33963, 8		5896, 4	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	24 ± 3	<4	42 ± 2	<4	18 ± 3	<4
confined spines	45 ± 4	27 ± 1	36 ± 1	18 ± 1	41 ± 3	109 ± 3
free-diffusive spines	31 ± 3	51 ± 1	22 ± 2	34 ± 1	41 ± 1	169 ± 4
immobile shafts	16 ± 2	<4	46 ± 3	<4	14 ± 2	<4
confined shafts	36 ± 1	45 ± 1	26 ± 2	38 ± 2	35 ± 2	123 ± 5
free-diffusive shafts	48 ± 1	74 ± 1	28 ± 2	87 ± 2	51 ± 2	211 ± 6
r _{conf} spines (nm)	131 ± 1		108 ± 1		233 ± 3	
r _{conf} shafts (nm)	150 ± 1		127 ± 2		239 ± 5	

	mEOS2-Rac1-Q61L		mEOS2-Rac1-T17N		mEOS2-VASP	
trajectories, cells	5514, 5		8759, 6		13785, 7	
	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)	%	Dx10 ³ (μm ² /s)
immobile spines	54 ± 2	<4	14 ± 2	<4	15 ± 2	<4
confined spines	25 ± 1	34 ± 2	40 ± 2	116 ± 3	40 ± 2	52 ± 1
free-diffusive spines	21 ± 1	71 ± 3	46 ± 3	188 ± 3	45 ± 2	82 ± 2
immobile shafts	54 ± 4	<4	11 ± 2	<4	14 ± 3	<4
confined shafts	23 ± 1	33 ± 2	38 ± 2	122 ± 3	36 ± 1	58 ± 1
free-diffusive shafts	23 ± 4	75 ± 3	51 ± 4	196 ± 3	52 ± 3	96 ± 1
r _{conf} spines (nm)	123 ± 3		222 ± 3		160 ± 2	
r _{conf} shafts (nm)	120 ± 3		236 ± 3		174 ± 2	

Values correspond to mean ± SEM

Bibliographie

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, 379–390.

Abraham, A. V., Ram, S., Chao, J., Ward, E.S., and Ober, R.J. (2009). Quantitative study of single molecule location estimation techniques. *Opt. Express* 17, 23352–23373.

Achard, V., Martiel, J.L., Michelot, A., Guérin, C., Reymann, A.C., Blanchoin, L., and Boujemaa-Paterski, R. (2010). A “Primer”-Based Mechanism Underlies Branched Actin Filament Network Formation and Motility. *Curr. Biol.* 20, 423–428.

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, 337–350.

Aktories, K. (2011). Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 487–498.

Alexandrova, A.Y., Arnold, K., Schaub, S., Vasiliev, J.M., Meister, J.J., Bershadsky, A.D., and Verkhovsky, A.B. (2008). Comparative dynamics of retrograde actin flow and focal adhesions: Formation of nascent adhesions triggers transition from fast to slow flow. *PLoS One* 3, e3234.

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.* 98, 15009–15013.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246–20249.

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, 13–23.

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, 330–340.

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, 805–809.

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

Bamburg, J.R., and Bernstein, B.W. (2010). Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond. *Biol. Reports* 23410, 62–2.

Bard, L., Boscher, C., Lambert, M., Mege, R.-M., Choquet, D., and Thoumine, O. (2008). A Molecular Clutch between the Actin Flow and N-Cadherin Adhesions Drives Growth Cone Migration. *J. Neurosci.* 28, 5879–5890.

Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and

Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 28653–28662.

Bear, J.E., 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, 1325–1335.

Bear, J.E., Loureiro, J.J., Libova, I., Fässler, R., Wehland, J., and Gertler, F.B. (2000). Negative regulation of fibroblast motility by Ena/VASP proteins. *Cell* 101, 717–728.

Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I. V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., et al. (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509–521.

Beltzner, C.C., and Pollard, T.D. (2004). Identification of Functionally Important Residues of Arp2/3 Complex by Analysis of Homology Models from Diverse Species. *J. Mol. Biol.* 336, 551–565.

Bergert, M., Chandradoss, S.D., Desai, R. a, and Paluch, E. (2012). Cell mechanics control rapid transitions between blebs and lamellipodia during migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14434–14439.

Betzig, E., Patterson, G.H., Sougrat, R., Lindwasser, O.W., Olenych, S., Bonifacino, J.S., Davidson, M.W., Lippincott-Schwartz, J., and Hess, H.F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* 313, 1642–1645.

Bishop, A.L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* 348, 241–255.

Blanchoin, L., and Pollard, T.D. (1999). PROTEIN CHEMISTRY AND STRUCTURE : Mechanism of Interaction of Acanthamoeba Mechanism of Interaction of Acanthamoeba Actophorin (ADF / Cofilin) with Actin Filaments *. *J. Biol. Chem.* 274, 15538–15546.

Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.-B.B., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins. *Nature* 404, 1007–1011.

Block, J., Breitsprecher, D., Kühn, S., Winterhoff, M., Kage, F., Geffers, R., Duwe, P., Rohn, J.L., Baum, B., Brakebusch, C., et al. (2012). FMNL2 drives actin-based protrusion and migration downstream of Cdc42. *Curr. Biol.* 22, 1005–1012.

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, 695–704.

Boczkowska, M., Rebowski, G., Kast, D.J., and Dominguez, R. (2014). Structural analysis of the transitional state of Arp2/3 complex activation by two actin-bound WCAs. *Nat. Commun.* 5, 3308.

Bombardier, J.P., Eskin, J.A., Jaiswal, R., Corrêa, I.R., Xu, M.-Q., Goode, B.L., and Gelles, J. (2015). Single-molecule visualization of a formin-capping protein “decision complex” at the actin filament barbed end. *Nat. Commun.* 6, 8707.

Bos, J., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 865–877.

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, 555–568.

Bourne, H.R., Sanders, D.A., and McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117–127.

Breitsprecher, D., Kieseewetter, A.K., Linkner, J., Urbanke, C., Resch, G.P., Small, J.V., and Faix, J. (2008). Clustering of VASP actively drives processive, WH2 domain-mediated actin filament elongation. *EMBO J.* 27, 2943–2954.

Burrige, K., and Wennerberg, K. (2004). Rho and Rac Take Center Stage. *Cell* 116, 167–179.

Campellone, K.G., and Welch, M.D. (2010). A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 237–251.

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, 1307–1322.

Chazeau, A. (2012). Rôle de l'organisation du cytosquelette d'actine branché et des adhésions N-cadhérine dans la dynamique des épines dendritiques.

Chazeau, A., Mehidi, A., Nair, D., Gautier, J.J., Leduc, C., Chamma, I., Kage, F., Kechkar, A., Thoumine, O., Rottner, K., et al. (2014). Nanoscale segregation of actin nucleation and elongation factors determines dendritic spine protrusion. *EMBO J.* 33, 2745–2764.

Chen, Z., Borek, D., Padrick, S.B.B., Gomez, T.S.S., Metlagel, Z., Ismail, A.M.M., Umetani, J., Billadeau, D.D.D., Otwinowski, Z., and Rosen, M.K.K. (2010). Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature* 468, 533–538.

Cherfils, J., and Zeghouf, M. (2013). Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol. Rev.* 93, 269–309.

Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 28–37.

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, 62–74.

Chhabra, E.S., and Higgs, H.N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat. Cell Biol.* 9, 1110–1121.

Choi, C.K., Vicente-Manzanares, M., Zareno, J., Whitmore, L.A., Mogilner, A., and Horwitz, A.R. (2008). Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat. Cell Biol.* 10, 1039–1050.

Chrzanowska-Wodnicka, M., and Burrige, K. (1996). Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J. Cell Biol.* 133, 1403–1415.

Le Clainche, C., and Carlier, M.-F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol. Rev.* 88, 489–513.

Colicelli, J. (2004). Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci.*

STKE 2004, RE13.

Connolly, B.A., Rice, J., Feig, L.A., and Buchsbaum, R.J. (2005). Tiam1-IRSp53 complex formation directs specificity of rac-mediated actin cytoskeleton regulation. *Mol. Cell Biol.* 25, 4602–4614.

Côté, J.F., and Vuori, K. (2007). GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol.* 17, 383–393.

Coulombe, P. a, and Wong, P. (2004). Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multipurpose scaffolds. *Nat. Cell Biol.* 6, 699–706.

Cox, A.D., and Der, C.J. (2010). Ras history. *Small GTPases* 1, 2–27.

Dahl, J.P., Wang-Dunlop, J., Gonzales, C., Goad, M.E.P., Mark, R.J., and Kwak, S.P. (2003). Characterization of the WAVE1 knock-out mouse: implications for CNS development. *J. Neurosci.* 23, 3343–3352.

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, 2569–2582.

Das, S., Yin, T., Yang, Q., Zhang, J., Wu, Y.I., and Yu, J. (2015). Single-molecule tracking of small GTPase Rac1 uncovers spatial regulation of membrane translocation and mechanism for polarized signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E267–E276.

Davidson, A.J., and Insall, R.H. (2011). Actin-Based Motility: WAVE Regulatory Complex Structure Reopens Old SCARs. *Curr. Biol.* 21, R66–R68.

Davis, M.J., Hak, B., Holman, E.C., Halaban, R., Schlessinger, J., Boggon, T.J., and Ha, B.H. (2013). RAC1P29S is a spontaneously activating cancer-associated GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 912–917.

Derivery, E., and Gautreau, A. (2010). Evolutionary conservation of the WASH complex, an actin polymerization machine involved in endosomal fission. *Commun. Integr. Biol.* 3, 227–230.

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.

Derry, J.M., Ochs, H.D., and Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell* 78, 635–644.

Dmitrieff, S., and Nédélec, F. (2016). Amplification of actin polymerization forces. *J. Cell Biol.* 212, 763–766.

Dominguez, R. (2016). The WH2 Domain and Actin Nucleation: Necessary but Insufficient. *Trends Biochem. Sci.* 41, 478–490.

Dominguez, R., and Holmes, K.C. (2011). Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 40, 169–186.

DuFort, C.C., Paszek, M.J., and Weaver, V.M. (2011). Balancing forces: architectural control of mechanotransduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 308–319.

Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V, Mann, M., and Kirschner, M.W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* 418, 790–793.

Edwards, M., Zwolak, A., Schafer, D.A., Sept, D., Dominguez, R., and Cooper, J.A. (2014). Capping protein regulators fine-tune actin assembly dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 677–689.

Ellis, R.W., Defeo, D., Shih, T.Y., Gonda, M.A., Young, H.A., Tsuchida, N., Lowy, D.R., and Scolnick, E.M. (1981). The p21 src genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292, 506–511.

Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.

Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D.C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* 4, 260–269.

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

Folling, J., Bossi, M., Bock, H., Medda, R., Wurm, C.A., Hein, B., Jakobs, S., Eggeling, C., and Hell, S.W. (2008). Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nat Meth* 5, 943–945.

Friedl, P., and Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 3, 362–374.

Friedl, P., and Wolf, K. (2009). Plasticity of cell migration: a multiscale tuning model. *J. Cell Biol.* 188, 11–19.

Fujii, T., Iwane, A.H., Yanagida, T., and Namba, K. (2010). Direct visualization of secondary structures of F-actin by electron cryomicroscopy. *Nature* 467, 724–728.

Galkin, V.E., Orlova, A., Kudryashov, D.S., Solodukhin, A., Reisler, E., Schroder, G.F., and Egelman, E.H. (2011). Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20568–20572.

Garcia, M. (2013). Rôle du couplage N-cadhérine / actine dans les mécanismes de motilité et de différenciation synaptique dans les neurones.

Gardel, M.L., Schneider, I.C., Yvonne Aratyn-Schaus, Waterman, C.M., Aratyn-Schaus, Y., Waterman, C.M., Aratyn-Schaus, Y., and Waterman, C.M. (2010). Mechanical Integration of Actin and Adhesion Dynamics in Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 315–333.

Gautier, J.J., Lomakina, M.E., Bouzlama-Oueghlani, L., Derivery, E., Beilinson, H., Faigle, W., Loew, D., Louvard, D., Echard, A., Alexandrova, A.Y., et al. (2011). Clathrin is required for Scar/Wave-mediated lamellipodium formation. *J. Cell Sci.* 124, 3414–3427.

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.* 101, 4379–4383.

Ghosh, M., Song, X., Mouneimne, G., Sidani, M., Lawrence, D.S., and Condeelis, J.S. (2004). Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* 304, 743–746.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J., Döbereiner, H.G., Kieffer, N., Bresnick, A.R., and Sheetz, M.P. (2004). Periodic lamellipodial contractions correlate with rearward actin waves. *Cell* 116, 431–443.

Giannone, G., Dubin-Thaler, B.J.B.J.B.J.B., Rossier, O., Cai, Y., Chaga, O., Jiang, G., Beaver, W., Döbereiner, H.G., Freund, Y., Borisy, G., et al. (2007). Lamellipodial actin mechanically links myosin activity with adhesion-site formation. *Cell* 128, 561–575.

Giannone, G., Mège, R.M., Thoumine, O., Mege, R.M., and Thoumine, O. (2009). Multi-level molecular clutches in motile cell processes. *Trends Cell Biol.* 19, 475–486.

Godin, A.G., Lounis, B., and Cognet, L. (2014). Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging. *Biophys. J.* 107, 1777–1784.

Goicoechea, S.M., Awadia, S., and Garcia-Mata, R. (2014). I'm coming to GEF you: Regulation of RhoGEFs during cell migration. *Cell Adhes. Migr.* 8, 535–549.

Goldberg, M.B., and Theriot, J.A. (1995). *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6572–6576.

Goldschmidt-Clermont, P.J., Machesky, L.M., Doberstein, S.K., and Pollard, T.D. (1991). Mechanism of the interaction of human platelet profilin with actin. *J. Cell Biol.* 113, 1081–1089.

Goley, E.D., and Welch, M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 713–726.

Goode, B.L., Drubin, D.G., and Lappalainen, P. (1998). Regulation of the cortical actin cytoskeleton in budding yeast by twinfilin, a ubiquitous actin monomer-sequestering protein. *J. Cell Biol.* 142, 723–733.

Gordon, J.L., and Sibley, L.D. (2005). Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* 6, 179.

Gouveia, S.M., and Akhmanova, A. (2010). Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins. *End binding proteins and their partners* (Elsevier Inc.).

Grise, F., Bidaud, A., and Moreau, V. (2009). Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1795, 137–151.

Gunning, P.W., Ghoshdastider, U., Whitaker, S., Popp, D., and Robinson, R.C. (2015). The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J. Cell Sci.* 128, 2009–2019.

Gupton, S.L., and Waterman-Storer, C.M. (2006). Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration. *Cell* 125, 1361–1374.

Gupton, S.L., Eisenmann, K., Alberts, A.S., and Waterman-Storer, C.M. (2007). mDia2 regulates actin and focal adhesion dynamics and organization in the lamella for efficient epithelial cell migration. *J Cell Sci* 120, 3475–3487.

Gutsche-Perelroizen, I., Lepault, J., Ott, A., and Carlier, M.F. (1999). Filament assembly from profilin-actin. *J. Biol. Chem.* *274*, 6234–6243.

Hahne, P., Sechi, A., Benesch, S., and Small, J.V. (2001). Scar/WAVE is localised at the tips of protruding lamellipodia in living cells. *FEBS Lett.* *492*, 215–220.

Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 1378–1382.

Helfer, E., Nevalainen, E.M., Naumanen, P., Romero, S., Didry, D., Pantaloni, D., Lappalainen, P., and Carlier, M.-F. (2006). Mammalian twinfilin sequesters ADP-G-actin and caps filament barbed ends: implications in motility. *EMBO J.* *25*, 1184–1195.

Helgeson, L.A., and Nolen, B.J. (2013). Mechanism of synergistic activation of Arp2/3 complex by cortactin and N-WASP. *Elife* *2013*, 1–26.

Hell, S.W., and Kroug, M. (1995). Ground-state-depletion fluorescence microscopy: A concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl. Phys. B Lasers Opt.* *60*, 495–497.

Hell, S.W., and Wichmann, J. (1994). Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.* *19*, 780.

Herrmann, H., Strelkov, S. V., Burkhard, P., and Aebi, U. (2009). Intermediate filaments: Primary determinants of cell architecture and plasticity. *J. Clin. Invest.* *119*, 1772–1783.

Higgs, H.N. (2011). Discussing the morphology of actin filaments in lamellipodia. *Trends Cell Biol.* *21*, 2–4.

Hill, T.L. (1981). Microfilament or microtubule assembly or disassembly against a force. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *78*, 5613–5617.

Ho, H.Y.H., Rohatgi, R., Lebensohn, A.M., Le Ma, 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*, 203–216.

Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* *347*, 44–49.

Holzinger, A., and Blaas, K. (2016). Actin-Dynamics in Plant Cells: The Function of Actin-Perturbing Substances: Jasplakinolide, Chondramides, Phalloidin, Cytochalasins, and Latrunculin. *Methods Mol. Biol.* *1365*, 243–261.

Huber, F., Boire, A., López, M.P., and Koenderink, G.H. (2015). Cytoskeletal crosstalk: when three different personalities team up. *Curr. Opin. Cell Biol.* *32*, 39–47.

Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E.B., Di Fiore, P.P., Carlier, M.-F.F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* *6*, 319–327.

Insall, R.H. (2011). Dogma bites back - the evidence for branched actin. *Trends Cell Biol.* *21*, 2.

Insall, R.H., and Machesky, L.M. (2009). Actin Dynamics at the Leading Edge: From Simple Machinery to Complex Networks. *Dev. Cell* *17*, 310–322.

- Isambert, H., Venier, P., Maggs, A.C., Fattoum, A., Kassab, R., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (1995). Flexibility of actin filaments derived from thermal fluctuations. Effect of bound nucleotide, phalloidin, and muscle regulatory proteins. *J. Biol. Chem.* *270*, 11437–11444.
- Ismail, A.M., Padrick, S.B., Chen, B., Umetani, J., and Rosen, M.K. (2009). The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 561–563.
- Iwasa, J.H., and Mullins, R.D. (2007). Spatial and Temporal Relationships between Actin-Filament Nucleation, Capping, and Disassembly. *Curr. Biol.* *17*, 395–406.
- Izeddin, I., Boulanger, J., Racine, V., Specht, C.G., Kechkar, a, Nair, D., Triller, a, Choquet, D., Dahan, M., and Sibarita, J.B. (2012). Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Opt. Express* *20*, 2081–2095.
- Jiang, G., Giannone, G., Critchley, D.R., Fukumoto, E., and Sheetz, M.P. (2003). Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin. *Nature* *424*, 334–337.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. (1990). Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* *347*, 37–44.
- Kanchanawong, P., Shtengel, G., Pasapera, A.M., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Hess, H.F., and Waterman, C.M. (2010). Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* *468*, 580–584.
- Keller, R., Davidson, L.A., and Shook, D.R. (2003). How we are shaped: The biomechanics of gastrulation. *Differentiation* *71*, 171–205.
- Kim, Y., Sung, J.Y., Ceglia, I., Lee, K.-W., Ahn, J.-H., Halford, J.M., Kim, A.M., Kwak, S.P., Park, J.B., Ho Ryu, S., et al. (2006). Phosphorylation of WAVE1 regulates actin polymerization and dendritic spine morphology. *Nature* *442*, 814–817.
- Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., et al. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* *273*, 245–248.
- Kiuchi, T., Ohashi, K., Kurita, S., and Mizuno, K. (2007). Cofilin promotes stimulus-induced lamellipodium formation by generating an abundant supply of actin monomers. *J. Cell Biol.* *177*, 465–476.
- 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*, 291–295.
- Kobielak, A., Pasolli, H.A., and Fuchs, E. (2004). Mammalian formin-1 participates in adherens junctions and polymerization of linear actin cables. *Nat. Cell Biol.* *6*, 21–30.
- Kocks, C., Guin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* *68*, 521–531.
- Koestler, S. a, Auinger, S., Vinzenz, M., Rottner, K., and Small, J.V. (2008). Differentially oriented populations of actin filaments generated in lamellipodia collaborate in pushing and pausing at the cell front. *Nat. Cell Biol.* *10*, 306–313.

Koestler, S. a, Steffen, A., Nemethova, M., Winterhoff, M., Luo, N., Holleboom, J.M., Krupp, J., Jacob, S., Vinzenz, M., Schur, F., et al. (2013). Arp2/3 complex is essential for actin network treadmilling as well as for targeting of capping protein and cofilin. *Mol. Biol. Cell* *24*, 2861–2875.

Kouyama, T., and Mihashi, K. (1981). Fluorimetry study of N-(1-pyrenyl)iodoacetamide-labelled F-actin. Local structural change of actin protomer both on polymerization and on binding of heavy meromyosin. *Eur J Biochem* *114*, 33–38.

Kovar, D.R., and Pollard, T.D. (2004). Insertional assembly of actin filament barbed ends in association with formins produces piconewton forces. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 14725–14730.

Kovar, D.R., Harris, E.S., Mahaffy, R., Higgs, H.N., and Pollard, T.D. (2006). Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin. *Cell* *124*, 423–435.

Kozma, R., Ahmed, S., Best, A., and Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 1942–1952.

Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003). E N/A/VASP P ROTEINS: Regulators of the Actin Cytoskeleton and Cell Migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 541–564.

Kreishman-Deitrick, M., Goley, E.D., Burdine, L., Denison, C., Egile, C., Li, R., Murali, N., Kodadek, T.J., Welch, M.D., and Rosen, M.K. (2005). NMR analyses of the activation of the Arp2/3 complex by neuronal Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Biochemistry* *44*, 15247–15256.

Kühn, S., and Geyer, M. (2014). Formins as effector proteins of Rho GTPases. *Small GTPases* *5*, e29513.

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.

De La Cruz, E.M., Ostap, E.M., Brundage, R.A., Reddy, K.S., Sweeney, H.L., and Safer, D. (2000). Thymosin- β 4 Changes the Conformation and Dynamics of Actin Monomers. *Biophys. J.* *78*, 2516–2527.

Lai, F.P.L., Szczodrak, M., Block, J., Faix, J., Breitsprecher, D., Mannherz, H.G., Stradal, T.E.B., 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.

Lappalainen, P., and Drubin, D.G. (1997). Cofilin promotes rapid actin filament turnover in vivo. *Nature* *388*, 78–82.

Law, A.L., Vehlow, A., Kotini, M., Dodgson, L., Soong, D., Theveneau, E., Bodo, C., Taylor, E., Navarro, C., Perera, U., et al. (2013). Lamellipodin and the Scar/WAVE complex cooperate to promote cell migration in vivo. *J. Cell Biol.* *203*, 673–689.

Lebensohn, A.M., and Kirschner, M.W. (2009). Activation of the WAVE Complex by Coincident Signals Controls Actin Assembly. *Mol. Cell* *36*, 512–524.

Leclaire, L.L., Baumgartner, M., Iwasa, J.H., Mullins, R.D., and Barber, D.L. (2008). Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filaments. *J. Cell Biol.*

182, 647–654.

Leduc, C., and Etienne-Manneville, S. (2015). Intermediate filaments in cell migration and invasion: the unusual suspects. *Curr. Opin. Cell Biol.* 32, 102–112.

Leng, Y., Zhang, J., Badour, K., Arpaia, E., Freeman, S., Cheung, P., Siu, M., and Siminovitch, K. (2005). Abelson-interactor-1 promotes WAVE2 membrane translocation and Abelson-mediated tyrosine phosphorylation required for WAVE2 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 1098–1103.

Letort, G., Ennomani, H., Gressin, L., Théry, M., and Blanchoin, L. (2015). Dynamic reorganization of the actin cytoskeleton. *F1000Research* 4, 1–11.

Li, F., and Higgs, H.N. (2003). The Mouse Formin mDia1 Is a Potent Actin Nucleation Factor Regulated by Autoinhibition. *Curr. Biol.* 13, 1335–1340.

Lo, C.M., Wang, H.B., Dembo, M., and Wang, Y.L. (2000). Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79, 144–152.

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.

Machacek, M., Hodgson, L., Welch, C., Elliott, H., Pertz, O., Nalbant, P., Abell, A., Johnson, G.L., Hahn, K.M., and Danuser, G. (2009). Coordination of Rho GTPase activities during cell protrusion. *Nature* 461, 99–103.

Machesky, L.M. (2002). Sharks' teeth and dunes. *Nature* 417, 494–497.

Machesky, L.M., and Insall, R.H. (1998). Scar1 and the related Wiskott–Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr. Biol.* 8, 1347–1356.

Machesky, L.M., Atkinson, S.J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D. (1994). Purification of a Cortical Complex Containing 2 Unconventional Actins from *Acanthamoeba* by Affinity-Chromatography on Profilin-Agarose. *J. Cell Biol.* 127, 107–115.

Machesky, L.M., Mullins, R.D., Higgs, H.N., Kaiser, D. a, Blanchoin, L., May, R.C., Hall, M.E., and Pollard, T.D. (1999). Scar, a WASP-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3739–3744.

Madaule, P., and Axel, R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell* 41, 31–40.

Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, a, Iwamatsu, a, Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* (80-.). 285, 895–898.

Malpica, N., De Solrzano, C.O., Vaquero, J.J., Santos, A., Vallcorba, I., Garc??a-Sagredo, J.M., and Del Pozo, F. (1997). Applying watershed algorithms to the segmentation of clustered nuclei. *Cytometry* 28, 289–297.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.

Marchand, J.B., Kaiser, D. a, Pollard, T.D., and Higgs, H.N. (2001). Interaction of WASP/Scar proteins with actin and vertebrate Arp2/3 complex. *Nat. Cell Biol.* 3, 76–82.

Marchisella, F., Coffey, E.T., and Hollos, P. (2016). Microtubule and microtubule associated protein anomalies in psychiatric disease. *Cytoskeleton* 73, 596–611.

Martin, A.C., Xu, X.P., Rouiller, I., Kaksonen, M., Sun, Y., Belmont, L., Volkman, N., Hanein, D., Welch, M., and Drubin, D.G. (2005). Effects of Arp2 and Arp3 nucleotide-binding pocket mutations on Arp2/3 complex function. *J. Cell Biol.* 168, 315–328.

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., et al. (2001). WIP regulates N-WASP-mediated actin polymerization and filopodium formation. *Nat. Cell Biol.* 3, 484–491.

Maugis, B., Brugues, J., Nassoy, P., Guillen, N., Sens, P., and Amblard, F. (2010). Dynamic instability of the intracellular pressure drives bleb-based motility. *J. Cell Sci.* 123, 3884–3892.

McCullough, B.R., Grintsevich, E.E., Chen, C.K., Kang, H., Hutchison, A.L., Henn, A., Cao, W., Suarez, C., Martiel, J.L., Blanchoin, L., et al. (2011). Cofilin-linked changes in actin filament flexibility promote severing. *Biophys. J.* 101, 151–159.

McShea, M.A., Schmidt, K.L., Dubuke, M.L., Baldiga, C.E., Sullender, M.E., Reis, A.L., Zhang, S., O'Toole, S.M., Jeffers, M.C., Warden, R.M., et al. (2013). Abelson interactor-1 (ABI-1) interacts with MRL adaptor protein MIG-10 and is required in guided cell migrations and process outgrowth in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 373, 1–13.

Mejillano, M.R., Kojima, S.I., 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.

Mendoza, M.C. (2013). Phosphoregulation of the WAVE regulatory complex and signal integration. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24, 272–279.

Michael, M., Vehlow, A., Navarro, C., and Krause, M. (2010). c-Abl, Lamellipodin, and Ena/VASP Proteins Cooperate in Dorsal Ruffling of Fibroblasts and Axonal Morphogenesis. *Curr. Biol.* 20, 783–791.

Michelot, A., Berro, J., Guérin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., Martiel, J.L., Blanchoin, L., Guerin, C., Boujemaa-Paterski, R., Staiger, C.J., et al. (2007). Actin-Filament Stochastic Dynamics Mediated by ADF/Cofilin. *Curr. Biol.* 17, 825–833.

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

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

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

Milburn, M. V., Tong, L., DeVos, A.M., Brünger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S., and Kim, S.H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* (80-.). 247, 939–945.

Millius, A., Watanabe, N., and Weiner, O.D. (2012). Diffusion, capture and recycling of SCAR/WAVE and Arp2/3 complexes observed in cells by single-molecule imaging. *J. Cell*

Sci. 125, 1165–1176.

Mitchison, T., and Kirschner, M. (1988). Cytoskeletal dynamics and nerve growth. *Neuron* 1, 761–772.

Miyamoto, Y., Yamauchi, J., and Tanoue, A. (2008). Cdk5 Phosphorylation of WAVE2 Regulates Oligodendrocyte Precursor Cell Migration through Nonreceptor Tyrosine Kinase Fyn. *J. Neurosci.* 28, 8326–8337.

Mochida, J., Yamamoto, T., Fujimura-Kamada, K., and Tanaka, K. (2002). The novel adaptor protein, Mti1p, and Vrp1p, a homolog of Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP), may antagonistically regulate type I myosins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 160, 923–934.

Mogilner, A. (2006). On the edge: Modeling protrusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 32–39.

Mogilner, a, and Oster, G. (1996). Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71, 3030–3045.

Mogilner, A., and Oster, G. (2003). Force Generation by Actin Polymerization II: The Elastic Ratchet and Tethered Filaments. *Biophys. J.* 84, 1591–1605.

Moissoglu, K., and Schwartz, M.A. (2014). Spatial and temporal control of Rho GTPase functions. *Cell. Logist.* 4, e943618.

Moissoglu, K., Slepchenko, B.M., Meller, N., Horwitz, A.F., and Schwartz, M.A. (2006). In vivo dynamics of Rac-membrane interactions. *Mol. Biol. Cell* 17, 2770–2779.

Montaville, P., Jégou, A., Pernier, J., Compper, C., Guichard, B., Mogessie, B., Schuh, M., Romet-Lemonne, G., and Carlier, M.F. (2014). Spire and Formin 2 Synergize and Antagonize in Regulating Actin Assembly in Meiosis by a Ping-Pong Mechanism. *PLoS Biol.* 12, 1–20.

Mullins, R.D., Heuser, J. a, and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6181–6186.

Nair, D., Hosy, E., Petersen, J.D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., and Sibarita, J.-B. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *J. Neurosci.* 33, 13204–13224.

Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J.V. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J. Cell Sci.* 116, 2577–2583.

Navarro-Lérida, I., Sánchez-Perales, S., Calvo, M., Rentero, C., Zheng, Y., Enrich, C., and Del Pozo, M.A. (2012). A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *EMBO J.* 31, 534–551.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53–62.

Oda, T., Iwasa, M., Aihara, T., Maéda, Y., and Narita, A. (2009). The nature of the

globular- to fibrous-actin transition. *Nature* 457, 441–445.

Oikawa, T., Yamaguchi, H., Itoh, T., Kato, M., Ijuin, T., Yamazaki, D., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2004). PtdIns(3,4,5)P₃ binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* 6, 420–426.

Ojala, P.J., Paavilainen, V.O., Vartiainen, M.K., Tuma, R., Weeds, A.G., and Lappalainen, P. (2002). The two ADF-H domains of twinfilin play functionally distinct roles in interactions with actin monomers. *Mol. Biol. Cell* 13, 3811–3821.

Ono, S. (2007). Mechanism of Depolymerization and Severing of Actin Filaments and Its Significance in Cytoskeletal Dynamics. *Int. Rev. Cytol.* 258, 1–82.

Otomo, T., Tomchick, D.R., Otomo, C., Panchal, S.C., Machius, M., and Rosen, M.K. (2005). Structural basis of actin filament nucleation and processive capping by a formin homology 2 domain. *Nature* 433, 488–494.

Paavilainen, V.O., Oksanen, E., Goldman, A., and Lappalainen, P. (2008). Structure of the actin-depolymerizing factor homology domain in complex with actin. *J. Cell Biol.* 182, 51–59.

Padrick, S.B., Cheng, H.C., Ismail, A.M., Panchal, S.C., Doolittle, L.K., Kim, S., Skehan, B.M., Umetani, J., Brautigam, C.A., Leong, J.M., et al. (2008). Hierarchical Regulation of WASP/WAVE Proteins. *Mol. Cell* 32, 426–438.

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.* 108, E472–E479.

Pantaloni, D., Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* (80-.). 292, 1502–1506.

Pasic, L., Kotova, T., and Schafer, D.A. (2008). Ena/VASP proteins capture actin filament barbed ends. *J. Biol. Chem.* 283, 9814–9819.

Paszek, M.J., DuFort, C.C., Rossier, O., Bainer, R., Mouw, J.K., Godula, K., Hudak, J.E., Lakins, J.N., Wijekoon, A.C., Cassereau, L., et al. (2014). The cancer glyocalyx mechanically primes integrin-mediated growth and survival. *Nature* 511, 319–325.

Pavlov, D., Muhlrad, A., Cooper, J., Wear, M., and Reisler, E. (2007). Actin Filament Severing by Cofilin. *J. Mol. Biol.* 365, 1350–1358.

Pellegrin, S., and Mellor, H. (2005). The Rho Family GTPase Rif Induces Filopodia through mDia2. *Curr. Biol.* 15, 129–133.

Perelroizen, I., Didry, D., Christensen, H., Chua, N.-H., and Carlier, M.-F. (1996). Role of Nucleotide Exchange and Hydrolysis in the Function of Profilin in Actin Assembly. *J. Biol. Chem.* 271, 12302–12309.

Pertz, O., Hodgson, L., Klemke, R.L., and Hahn, K.M. (2006). Spatiotemporal dynamics of RhoA activity in migrating cells. *Nature* 440, 1069–1072.

Peskin, C.S., Odell, G.M., and Oster, G.F. (1993). Cellular motions and thermal fluctuations: the Brownian ratchet. *Biophys. J.* 65, 316–324.

Petrella, E.C., Machesky, L.M., Kaiser, D.A., and Pollard, T.D. (1996). Structural

requirements and thermodynamics of the interaction of proline peptides with profilin. *Biochemistry* 35, 16535–16543.

Pollard, T.D. (1986). Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J. Cell Biol.* 103, 2747.

Pollard, T.D. (2003). The cytoskeleton, cellular motility and the reductionist agenda. *Nature* 422, 741–745.

Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 36, 451–477.

Pollard, T.D. (2016). Actin and Actin-Binding Proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–18.

Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments. *Cell* 112, 453–465.

Pollard, T.D., and Cooper, J.A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* (80-.). 326, 1208–1212.

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

Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M., and Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat Cell Biol* 4, 232–239.

Pring, M., Evangelista, M., Boone, C., Yang, C., and Zigmond, S.H. (2003). Mechanism of formin-induced nucleation of actin filaments. *Biochemistry* 42, 486–496.

Pruyne, D. (2002). Role of Formins in Actin Assembly: Nucleation and Barbed-End Association. *Science* (80-.). 297, 612–615.

Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerckhoff, E., and Mullins, R.D. (2005). *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature* 433, 382–388.

Dos Remedios, C.G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V, Tsubakihara, M., Berry, D. a, and Nosworthy, N.J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol. Rev.* 83, 433–473.

Ridley, A.J. (1995). Microinjection of Rho and Rac into quiescent Swiss 3T3 cells. *Methods Enzymol.* 256, 313–320.

Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 36, 103–112.

Ridley, A.J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389–399.

Ridley, A.J., and Hall, A. (2004). Snails, Swiss, and serum: the solution for Rac “n” Rho. *Cell* 116, S23–S25, 2 p following S25.

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, 401–410.

del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., and Sheetz, M.P. (2009). Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science* (80-). 323, 638–641.

Robinson, R.C., Turbedsky, K., Kaiser, D.A., Marchand, J.B., Higgs, H.N., Choe, S., and Pollard, T.D. (2001). Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* (80-). 294, 1679–1684.

Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221–231.

Rohatgi, R., Ho, H.Y.H., and Kirschner, M.W. (2000). Mechanism of N-WASP activation by CDC42 and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J. Cell Biol.* 150, 1299–1309.

Romero, S., Le Clainche, C., Didry, D., Egile, C., Pantaloni, D., and Carlier, M.F. (2004). Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis. *Cell* 119, 419–429.

Romet-Lemonne, G., and Jégou, A. (2013). Mechanotransduction down to individual actin filaments. *Eur. J. Cell Biol.* 92, 333–338.

Rossier, O., Oceau, V., Sibarita, J.-B.B., Leduc, C., Tessier, B., Nair, D., Gatterdam, V., Destaing, O., Albigès-Rizo, C., Tampé, R., et al. (2012). Integrins β 1 and β 3 exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nat. Cell Biol.* 14, 1057–1067.

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

Rottner, K., Hall, A., and Small, J. V. (1999b). Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics. *Curr. Biol.* 9, 640–648.

Rottner, K., Hänisch, J., and Campellone, K.G. (2010). WASH, WHAMM and JMY: Regulation of Arp2/3 complex and beyond. *Trends Cell Biol.* 20, 650–661.

Rotty, J.D., Wu, C., and Bear, J.E. (2013). New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 7–12.

Rouiller, I., Xu, X.P., Amann, K.J., Egile, C., Nickell, S., Nicastro, D., Li, R., Pollard, T.D., Volkman, N., and Hanein, D. (2008). The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* 180, 887–895.

Rould, M.A., Wan, Q., Joel, P.B., Lowey, S., and Trybus, K.M. (2006). Crystal structures of expressed non-polymerizable monomeric actin in the ADP and ATP states. *J. Biol. Chem.* 281, 31909–31919.

Sablin, E.P., Dawson, J.F., VanLoock, M.S., Spudich, J.A., Egelman, E.H., and Fletterick, R.J. (2002). How does ATP hydrolysis control actin's associations? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 10945–10947.

Sadok, A., and Marshall, C.J. (2016). Rho GTPases. *Small GTPases* 5, 1–7.

Safer, D., Sosnick, T.R., and Elzinga, M. (1997). Thymosin beta 4 binds actin in an extended conformation and contacts both the barbed and pointed ends. *Biochemistry* 36, 5806–5816.

Sagot, I., Klee, S.K., and Pellman, D. (2002a). Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat. Cell Biol.* 4, 42–50.

Sagot, I., Rodal, A. a, Moseley, J., Goode, B.L., and Pellman, D. (2002b). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4, 626–631.

Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., and Sheetz, M.P. (2006). Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell* 127, 1015–1026.

Schirenbeck, A., Bretschneider, T., Arasada, R., Schleicher, M., and Faix, J. (2005). The Diaphanous-related formin dDia2 is required for the formation and maintenance of filopodia. *Nat. Cell Biol.* 7, 619–625.

Schönichen, A., and Geyer, M. (2010). Fifteen formins for an actin filament: A molecular view on the regulation of human formins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1803, 152–163.

Schumacher, N., Borawski, J.M., Leberfinger, C.B., Gessler, M., and Kerkhoff, E. (2004). Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene Expr. Patterns* 4, 249–255.

Schutt, C.E., Myslik, J.C., Rozycki, M.D., Goonesekere, N.C.W., and Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin- β -actin. *Nature* 365, 810–816.

Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol.* 18, 52–60.

Scolnick, E.M., Rands, E., Williams, D., and Parks, W.P. (1973). Studies on the nucleic acid sequences of Kirsten sarcoma virus: a model for formation of a mammalian RNA-containing sarcoma virus. *J. Virol.* 12, 458–463.

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.

Simunovic, M., Voth, G.A., Callan-Jones, A., and Bassereau, P. (2015). When Physics Takes Over: BAR Proteins and Membrane Curvature. *Trends Cell Biol.* 25, 780–792.

Small, J.V. (2010). Dicing with dogma: De-branching the lamellipodium. *Trends Cell Biol.* 20, 628–633.

Small, J.V. (2011). Actin networking in lamellipodia and beyond. *Trends Cell Biol.* 21, 4–5.

Small, J.V., Herzog, M., and Anderson, K. (1995). Actin filament organization in the fish keratocyte lamellipodium. *J. Cell Biol.* 129, 1275–1286.

Small, J.V., Rottner, K., Kaverina, I., and Anderson, K.I. (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1404, 271–281.

Smith, B.A., Padrick, S.B., Doolittle, L.K., Daugherty-Clarke, K., Corr??a, I.R., Xu, M.Q., Goode, B.L., Rosen, M.K., and Gelles, J. (2013). Three-color single molecule imaging shows WASP detachment from Arp2/3 complex triggers actin filament branch formation. *Elife* 2013, 1–25.

Soderling, S.H., Langeberg, L.K., Soderling, J. a, Davee, S.M., Simerly, R., Raber, J., and Scott, J.D. (2003). Loss of WAVE-1 causes sensorimotor retardation and reduced learning and memory in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1723–1728.

Sossey-Alaoui, K., Head, K., Nowak, N., and Cowell, J.K. (2003). Genomic organization and expression profile of the human and mouse WAVE gene family. *Mamm. Genome* 14, 314–322.

Stavoe, A.K.H., Nelson, J.C., Martínez-Velázquez, L.A., Klein, M., Samuel, A.D.T., and Colón-Ramos, D.A. (2012). Synaptic vesicle clustering requires a distinct MIG-10/lamellipodin isoform and ABI-1 downstream from Netrin. *Genes Dev.* 26, 2206–2221.

Steffen, A., Rottner, K., Ehinger, J., Innocenti, M., Scita, G., Wehland, J., and Stradal, T.E.B. (2004). Sra-1 and Nap1 link Rac to actin assembly driving lamellipodia formation. *EMBO J.* 23, 749–759.

Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E.B. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Mol. Biol. Cell* 17, 2581–2591.

Straub, F. (1942). Actin. *Stud. from Inst. Med. Chem. Univ. Szeged* 2, 1–15.

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, 31290–31297.

Suck, D., Oefner, C., and Kabsch, W. (1984). Three-dimensional structure of bovine pancreatic DNase I at 2.5 Å resolution. *EMBO J.* 3, 2423–2430.

Suetsugu, S., and Gautreau, A. (2012). Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling. *Trends Cell Biol.* 22, 141–150.

Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1999). Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with the Arp2/3 complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 296–302.

Suetsugu, S., Murayama, K., Sakamoto, A., Hanawa-Suetsugu, K., Seto, A., Oikawa, T., Mishima, C., Shirouzu, M., Takenawa, T., and Yokoyama, S. (2006a). The RAC binding domain/IRSp53-MIM homology domain of IRSp53 induces RAC-dependent membrane deformation. *J. Biol. Chem.* 281, 35347–35358.

Suetsugu, S., Kurisu, S., Oikawa, T., Yamazaki, D., Oda, A., and Takenawa, T. (2006b). Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J. Cell Biol.* 173, 571–585.

Sun, H.Q., Yamamoto, M., Mejillano, M., and Yin, H.L. (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 274, 33179–33182.

Svitkina, T.M., and Borisy, G.G. (1999). Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J. Cell Biol.* 145, 1009–1026.

Sykes, C., and Plastino, J. (2010). Cell biology: Actin filaments up against a wall. *Nature* 464, 365–366.

Symons, M.H., and Mitchison, T.J. (1991). Control of actin polymerization in live and permeabilized fibroblasts. *J. Cell Biol.* 114, 503–513.

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.* 108, E463–E471.

Urban, E., Jacob, S., Nemethova, M., Resch, G.P., and Small, J.V. (2010). Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat. Cell Biol.* 12, 429–435.

Vadlamudi, R.K., Li, F., Adam, L., Nguyen, D., Ohta, Y., Stossel, T.P., and Kumar, R. (2002). Filamin is essential in actin cytoskeletal assembly mediated by p21-activated kinase 1. *Nat. Cell Biol.* 4, 681–690.

Vartiainen, M.K., Mustonen, T., Mattila, P.K., Ojala, P.J., Thesleff, I., Partanen, J., and Lappalainen, P. (2002). The Three Mouse Actin-depolymerizing Factor / Cofilins Evolved to Fulfill Cell-Type – specific Requirements for Actin Dynamics. *Mol. Biol. Cell* 13, 183–194.

Vetter, I.R., and Wittinghofer, a (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* (80-). 294, 1299–1304.

Vinzenz, M., Nemethova, M., Schur, F., Mueller, J., Narita, A., Urban, E., Winkler, C., Schmeiser, C., Koestler, S.A., Rottner, K., et al. (2012). Actin branching in the initiation and maintenance of lamellipodia. *J Cell Sci* 125, 2775–2785.

Wagner, A.R., Luan, Q., Liu, S.L., and Nolen, B.J. (2013). Dip1 defines a class of Arp2/3 complex activators that function without preformed actin filaments. *Curr. Biol.* 23, 1990–1998.

Watanabe, N., and Mitchison, T.J. (2002). Single-Molecule Speckle Analysis of Actin Filament Turnover in Lamellipodia. *Science* (80-). 295, 1083–1086.

Watanabe, N., Kato, T., Fujita, A., Ishizaki, T., and Narumiya, S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136–143.

Watson, J.R., Fox, H.M., Nietlispach, D., Gallop, J.L., Owen, D., and Mott, H.R. (2016). Investigation of the interaction between Cdc42 and its effector TOCA1: Handover of Cdc42 to the actin regulator N-WASP is facilitated by differential binding affinities. *J. Biol. Chem.* 291, 13875–13890.

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, 370–374.

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.

Weiner, O.D., Marganski, W.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J., and Kirschner, M.W. (2007). An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol.* 5, 2053–2063.

Weisswange, I., Newsome, T.P., Schleich, S., and Way, M. (2009). The rate of N-WASP exchange limits the extent of ARP2/3-complex-dependent actin-based motility. *Nature* 458, 87–91.

Welch, M.D., Iwamatsu, A., and Mitchison, T.J. (1997). Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature* 385, 265–269.

Welch, M.D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., and Mitchison, T.J. (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation. *Science* 281, 105–108.

Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci.* 118, 843–846.

Wheeler, A.P., and Ridley, A.J. (2004). Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* 301, 43–49.

Wickstead, B., and Gull, K. (2011). The evolution of the cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 194, 513–525.

Wombacher, R., Heidbreder, M., van de Linde, S., Sheetz, M.P., Heilemann, M., Cornish, V.W., and Sauer, M. (2010). Live-cell super-resolution imaging with trimethoprim conjugates. *Nat Meth* 7, 717–719.

Woodrum, D.T., Rich, S.A., and Pollard, T.D. (1975). Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method. *J. Cell Biol.* 67, 231–237.

Woychik, R.P., Maas, R.L., Zeller, R., Vogt, T.F., and Leder, P. (1990). “Formins”: proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Lett. To Nat.* 346, 183–187.

Wu, C., Asokan, S.B., Berginski, M.E., Haynes, E.M., Sharpless, N.E., Griffith, J.D., Gomez, S.M., and Bear, J.E. (2012). Arp2/3 is critical for lamellipodia and response to extracellular matrix cues but is dispensable for chemotaxis. *Cell* 148, 973–987.

Wu, Y.I., Frey, D., Lungu, O.I., Jaehrig, A., Schlichting, I., Kuhlman, B., and Hahn, K.M. (2009). A genetically encoded photoactivatable Rac controls the motility of living cells. *Nature* 461, 104–108.

Xu, Y., and Quinn, C.C. (2012). MIG-10 Functions with ABI-1 to Mediate the UNC-6 and SLT-1 Axon Guidance Signaling Pathways. *PLoS Genet.* 8.

Xu, Y., Moseley, J.B., Sagot, I., Poy, F., Pellman, D., Goode, B.L., and Eck, M.J. (2004). Crystal structures of a formin homology-2 domain reveal a tethered dimer architecture. *Cell* 116, 711–723.

Xue, B., Leyrat, C., Grimes, J.M., and Robinson, R.C. (2014). Structural basis of thymosin- β 4/profilin exchange leading to actin filament polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, E4596–E4605.

Yamazaki, D., Suetsugu, S., Miki, H., Kataoka, Y., Nishikawa, S.-I., Fujiwara, T., Yoshida, N., and Takenawa, T. (2003). WAVE2 is required for directed cell migration and cardiovascular development. *Nature* 424, 452–456.

Yamazaki, D., Itoh, T., Miki, H., and Takenawa, T. (2013). srGAP1 regulates lamellipodial dynamics and cell migratory behavior by modulating Rac1 activity. *Mol. Biol. Cell* 24, 3393–3405.

Yan, C., Martinez-Quiles, N., Eden, S., Shibata, T., Takeshima, F., Shinkura, R., Fujiwara, Y., Bronson, R., Snapper, S.B., Kirschner, M.W., et al. (2003). WAVE2 deficiency reveals distinct roles in embryogenesis and Rac-mediated actin-based motility. *EMBO J.* 22, 3602–3612.

Yang, C., and Svitkina, T. (2011). Visualizing branched actin filaments in lamellipodia by electron tomography. *Nat. Cell Biol.* 13, 1012–1013; author reply 1013–1014.

Yang, C., Czech, L., Gerboth, S., Kojima, S., Scita, G., and Svitkina, T. (2007). Novel Roles of Formin mDia2 in Lamellipodia and Filopodia Formation in Motile Cells. 5.

Zhao, Z.S., Manser, E., Chen, X.Q., Chong, C., Leung, T., and Lim, L. (1998). A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2153–2163.

Résumé : La motilité cellulaire est un processus intégré essentiel à de nombreux phénomènes physiologiques tels que la formation du cône de croissance et la plasticité synaptique. Des dérégulations de la motilité cellulaire peuvent être à l'origine de la formation de métastases ou de pathologies neuropsychiatriques comme la schizophrénie et l'autisme. La compréhension des mécanismes régulant la migration cellulaire est donc un enjeu majeur. La motilité cellulaire repose sur la formation de diverses structures constituées de réseaux d'actine branchés telles que le lamellipode. La formation du lamellipode nécessite l'intervention de protéines régulatrices de l'actine telles que Rac1 et les complexes Wave et Arp2/3. Grâce à l'utilisation de suivi de protéine unique, nous avons pu comprendre comment la coordination spatio-temporelle de ces régulateurs contrôle la formation et la morphologie des lamellipodes de cellules migrantes. Nous avons ainsi découvert que l'activation et la localisation du complexe Wave étaient régulées de manière enzymatique mais également mécanique. Dans une première étude, nous avons montré que la RhoGTPase Rac1 active le complexe Wave spécifiquement à l'extrémité du lamellipode. Dans une seconde étude, nous avons révélé que la localisation du complexe Wave est régulée par la dynamique des filaments des réseaux branchés d'actine. Ces données soulignent l'importance du complexe Wave dans la formation du lamellipode et révèlent l'existence d'une régulation mécanique de la localisation du complexe Wave.

Mots clés : Lamellipode ; Actine ; Complexe Wave ; Complexe Arp2/3 ; Rac1 ; RhoA ; Super-résolution, PALM

Abstract : Cell motility is an integrated process involved in critical phenomena such as axonal pathfinding and synaptic plasticity. Dysregulation of cell motility can induce metastasis and abnormal spine shapes observed in neuropsychiatric disorders like autism and schizophrenia. Therefore it is essential to understand how cell motility is regulated. Cell motility requires the formation of branched actin networks propelled by actin polymerization that lead to the formation of membrane protrusions such as the lamellipodium. Several actin regulatory proteins are involved in this process, such as Rac1 and the WAVE and ARP2/3 complexes. Using single protein tracking, we revealed key phenomena concerning the spatio-temporal regulation of lamellipodium formation by actin regulatory proteins. We found that the localization and activation of the WAVE complex was enzymatically regulated, but also mechanically. First, we showed that the Rac1 RhoGTPase activates the WAVE complex specifically at the tip of the lamellipodium. We also showed that WAVE complex localization is regulated by the dynamics of branched-network actin filaments. This study confirms the crucial role of the WAVE complex in lamellipodium formation and reveals the existence of a mechanical regulation of the localization of this complex in the cell.

Keywords: Lamellipodium, Actin, Wave complex, Arp2/3 complex, Rac1, RhoA, Super resolution microscopy, PALM

**CNRS UMR 5297 - Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS)
Université Bordeaux**

146, rue Léo-Saignat 33077 Bordeaux cédex