



Dynamique et mécanismes moléculaires de la plasticité structurale des neurones du noyau Accumbens en réponse à la cocaïne

Marc dos Santos

► To cite this version:

Marc dos Santos. Dynamique et mécanismes moléculaires de la plasticité structurale des neurones du noyau Accumbens en réponse à la cocaïne. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. [⟨NNT : 2016PA066378⟩](#). [⟨tel-01611509⟩](#)

HAL Id: tel-01611509

<https://theses.hal.science/tel-01611509v1>

Submitted on 6 Oct 2017

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.



HAL Authorization

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité : Neurosciences
Ecole doctorale : Cerveau Cognition et Comportement

Présentée par
Marc Dos Santos

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

**Dynamique et mécanismes moléculaires de la plasticité
structurale des neurones du noyau Accumbens
en réponse à la cocaïne**

Thèse soutenue le 4 octobre 2016 devant le jury composé de :

Dr. Jean-Antoine GIRAULT	Président du jury
Dr. Camilla BELLONE	Rapportrice
Dr. Christophe MULLE	Rapporteur
Dr. Etienne HERZOG	Examineur
Dr. Nicolas GERVASI	Examineur
Dr. Jocelyne CABOCHE	Directrice de thèse
Dr. Nicolas HECK	Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier infiniment Camilla Bellone et Christophe Mulle d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et d'avoir donné de leur précieux temps pour évaluer mon manuscrit et mon travail.

Je remercie sincèrement Nicolas Gervasi et Etienne Herzog pour avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse, pour leur présence et le temps qu'ils m'ont accordé.

Je remercie Jean-Antoine Girault d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse, c'est un grand plaisir et honneur de vous avoir comme président de mon jury.

Je tenais ensuite à remercier Jocelyne Caboche et Peter Vanhoutte pour m'avoir chaleureusement accueilli dans leur équipe en M2 et permis de réaliser ce projet qui m'a passionné à chaque instant.

Je te remercie Jocelyne de m'avoir fait grandir scientifiquement durant ces 5 années au sein de ton équipe. J'ai pu apprendre comment voir plus loin que les évidences et cet enseignement me sera précieux, j'en suis sûr, tout au long de ma carrière. Merci pour le temps que tu m'as accordé et de m'avoir donné la chance d'exprimer scientifiquement mes idées tout en m'aiguillant vers le chemin le plus adéquat et le plus straight forward dans l'élaboration de mon projet.

Je te remercie Nicolas , le roi des épines, de m'avoir consacré un temps énorme, de m'avoir transmis une partie de ton savoir et de ta passion pour les neurosciences (et le comptage d'épines). Merci de m'avoir fait confiance durant ce projet que tu as initié et pour lequel notre collaboration a été un moment inoubliable.

Merci Peter, pour nos nombreuses discussions qui ont pu me guider vers un projet qui, grâce à ta culture impressionnante, nous a aiguillé vers des résultats qui ne seraient pas ce qu'ils sont sans ton expérience.

Cette thèse est à la croisée des enseignements que chacun de vous, Jocelyne, Nicolas et Pete , a pu me donner durant ces 5 années. Merci.

De plus, je tiens à remercier chaleureusement Etienne Herzog et Kätlin Silm pour leur accueil en M1 durant un stage qui m'a donné la passion de la recherche, sans lequel, je ne serai peut-être pas en train d'écrire ces quelques lignes.

Je tiens à adresser un remerciement tout particulier aux membres de la plateforme d'imagerie de l'institut Paris Seine : Susanne Bolte, Richard Schwartzmann, Jean-François Gilles et France Lam, qui ont pu suivre, pour certains, mon parcours depuis le M1 (et oui déjà 6 ans...) et sans qui mes images ne seraient peut-être qu'un amas de pixels saturés et sous-échantillonnés. Merci pour toutes les calibrations, pour les conseils, les collaborations que nous avons pu établir et surtout votre bonne humeur, tout ce mélange m'insuffla une vraie passion pour la microscopie. Merci. Je remercie aussi le Dr. Thomas Boudier pour son aide précieuse en analyse d'image.

Je remercie les personnes de l'institut qui ont pu croiser ma route durant cette thèse : les amis du A3 Nicolas , Daniel, Arnaud, , Lydie, Anne-Charlotte, Carlos, Mélody, nos anciens voisins du B6 : Caroline, Coralie, les Isabelles, Laura, Benjamin, Josquin, Marie-Pierre, Vidji, qui ont dû subir le bruit désagréable du gene gun par ma faute sans m'en tenir rigueur.

Je tenais à remercier énormément tous les membres de l'équipe SNRG avec qui j'ai eu l'honneur de partager cette thèse. Lara que je remercie pour nos discussions de politique et de biologie moléculaire qui ont permis de combler une partie de mes lacunes importantes dans ces domaines. Emma pour nos discussions et la passion des neurosciences que tu as su m'insuffler.

Merci Antoine pour ton énergie débordante donnant envie de se dépasser chaque jour. Merci Alexandra pour ton aide durant les dernières expériences de mon projet. Merci à Sandrine, Radhia, Christiane, Vincent, Enejda, pour votre présence permettant de vivre chaque jour de cette thèse dans la bonne humeur. Merci à Andry pour nos discussions scientifiques et ta passion rare des neurosciences, qui je suis sûr, te servira à chaque instant de ta thèse pour laquelle je te souhaite toute la réussite possible.

Et bien sûr merci Marine : reine des chats et de la protéine Arc, avec qui nous avons pu élaborer une fabuleuse collaboration pleine de difficultés, d'images et de pages de macros mais aussi pleine de rire et de bons moments.

Je voudrai aussi remercier les nombreux stagiaires qui ont pu travailler dans l'équipe, si leur présence n'est souvent qu'éphémère, les souvenirs des bons moments resteront eux gravés dans ma mémoire.

Je remercie énormément les amis de master avec qui tout a commencé.

Merci, Adel et Rémi pour votre soutien moral et votre avis d'expert sur mes oeuvres artistico-scientifiques.

Merci Eleonora pour ton soutien inconditionnel à chaque instant.

Je remercie ma famille pour leur amour inconditionnel et leur soutien permanent.

C'est chargé d'émotions que j'écris ces quelques lignes ne suffisant pas à témoigner toute ma gratitude envers ceux qui ont permis me faire grandir, scientifiquement et humainement durant cette thèse.

Table des matières

Abréviations :	1
Résumé	3
Abstract	4
INTRODUCTION GENERALE	5
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	8
Chapitre I : Influences neuronales et comportementales des drogues d'abus	9
I-1) Les drogues d'abus et le détournement de la récompense	9
I-1-a) L'apprentissage régulé par la récompense	9
I-1-b) Le détournement de la récompense par les drogues d'abus	10
I-2) Effets de la cocaïne	12
I-2-a) Mode d'action de la cocaïne.....	12
I-2-b) Similarités de mode d'action de la cocaïne sur la libération de dopamine chez l'humain et le modèle rongeur	13
I-2-c) Adaptations comportementales à la cocaïne dans le modèle rongeur	15
Chapitre II : Les circuits neuronaux détournés par les drogues d'abus	17
II-1) Les ganglions de la base et ses grandes fonctions	17
II-1-a) Fonctions physiologiques.....	17
II-1-b) Boucles de régulation des ganglions de la base	17
II-1-c) La micro-circuiterie striatale	18
II-1-d) Les neurones striataux de projection intégrateurs des signaux dopaminergiques et glutamatergiques	20
II-1-e) La dichotomie des neurones striataux de projection et les voies directe et indirecte.....	22
II-1-f) Les rôles des deux voies de projections des neurones striataux	23
II-1-g) Des voies directe et indirecte discutables dans le NAc.....	24
II-2) Influence des drogues d'abus sur les ganglions de la base	25
II-2-a) Effet des drogues d'abus sur les deux grands types de neurones striataux	25
II-2-b) Différentes régions du striatum pour différents rôles dans les réponses aux drogues d'abus	27
II-2-c) De la consommation récréationnelle à l'addiction : un transfert de plasticité neuronale du striatum ventral au dorsal	28
Chapitre III : Les épines dendritiques et la plasticité structurale	29
III-1) La synapse	29
III-1-a) La synapse glutamatergique	29
III-1-b) Lien entre morphologie et activité de l'épine.....	30

III-1-c) Le squelette de l'épine : l'actine et la densité post synaptique	32
III-1-d) Les récepteurs glutamatergiques au cœur de l'activité de la synapse excitatrice	35
III-1-e) La compartimentation au sein de l'épine	36
III-2) La plasticité structurale.....	38
III-2-a) La plasticité morphologique	38
III-2-b) Modification de la morphologie des épines.....	39
III-2-c) La formation de nouvelles épines et mécanismes moléculaires impliqués.....	41
III-2-d) Les épines dendritiques à l'interface entre dynamique et stabilité	46
III-2-e) Mode de formation des nouvelles synapses : durant le développement et à l'âge adulte.	48
III-2-f) La plasticité structurale adulte et son rôle dans le comportement.....	50
Chapitre IV : Plasticité des neurones striataux de projection induite par la cocaïne	53
IV-1) Différentes formes de plasticité neuronales des neurones striataux en réponse à la cocaïne	53
IV-1-a) Plasticité neuronale et adaptations comportementales par un dialogue entre les récepteurs D1 et NMDA.....	53
IV-1-b) Altérations neuronales induites par la cocaïne : aspects électrophysiologiques	55
IV-1-c) Les rôles de la voie ERK dans les altérations neuronales et comportementales induites par la cocaïne.....	57
IV-2) Plasticité structurale striatale : le détournement du rôle de la neuromodulation dopaminergique par les drogues d'abus.....	59
IV-2-a) Rôle de la neuromodulation dopaminergique des signaux glutamatergiques dans la formation du réseau synaptique striatal.....	59
IV-2-b) Drogues d'abus et spinogénèse	61
IV-3) Plasticité structurale induite par la cocaïne.....	62
IV-3-a) Les traitements chroniques à la cocaïne induisent une formation de synapses dans le NAc	62
IV-3-b) Influence de la première exposition à la cocaïne sur la plasticité structurale dans certaines régions limbiques	64
IV-3-c) La plasticité structurale induite par la cocaïne diverge entre les SPN-D1 et D2.....	64
IV-3-d) Mécanismes moléculaires de la plasticité structurale induite par la cocaïne	65
OBJECTIFS ET HYPOTHESES	67
RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	69
1. Article 1	70
1.1 Introduction article 1 :	70
1.2 Résultats résumés et conclusion	109
2. Article 2	110
2.1 Introduction article 2 :	110

2.2 Résultats résumés et conclusions.....	170
<i>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</i>	173
I) Aspects méthodologiques	174
I-1) Détection des contacts pré-post synaptiques	174
I-2) Méthodes alternatives d'analyse des contacts synaptiques	175
I-3) Limites du modèle d'étude dynamique de la formation des synapses.....	176
II) Mode de formation des synapses au sein des SPN par la cocaïne	178
II-1) Formation de la synapse <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	178
II-2) Réflexions sur le mode de formation des synapses	179
III) ERK : une voie à multiples facettes dans la réponse aiguë à la cocaïne	180
III-1) Un dialogue entre ERK et la synthèse protéique	180
III-2) Les signatures moléculaires de la phase de pousse de maintien des nouvelles épines	181
III-2-a) Hypothèse du mode d'action de ERK1/2 sur la phase de pousse rapide des nouvelles épines.....	182
III-2-b) Hypothèse du mode d'action de ERK1/2 et MNK-1 sur la phase de maintien des nouvelles épines : réflexions sur les candidats synthétisés par MNK-1	183
III-2-c) Hypothèse du mode d'action de ERK1/2 et MNK-1 sur la synaptogénèse	184
IV) Le rôle des nouvelles épines formées rapidement par la cocaïne sur le comportement	185
V) Modèle hypothétique de plasticité structurale rapide adulte en réponse à la cocaïne ...	185
V-1) La co-stimulation du NMDAR et D1DR induit un pic d'activité de ERK responsable d'une pousse d'épines.....	185
V-2) La pousse d'épine induite par ERK1/2 présente un mode de formation non stochastique .	186
V-3) La traduction dépendante de ERK comme point de contrôle critique pour la survie de l'épine	187
Références bibliographiques.....	190
<i>ANNEXES</i>	204

ABRÉVIATIONS

4E-BP : eiF4E-binding protein
Abi1 : Abelson interacting protein 1
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
Arc : activity-regulated cytoskeleton-associated protein
ARP2/3 : Actin related protein 2/3
ATV : aire tegmentale ventrale
BDNF : Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BLA : amygdale baso-latérale
CA3 : corne d'Ammon 3
CaMK : Calcium-Camodulin dependent Kinase
Cdc42 : Cell division control protein 42
Chol : cholinergique
ChR2 : canal rhodopsine 2
CI-DAT : cocaine-insensitive DAT
CPF : cortex pré frontal
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
CYFIP : cytoplasmic FMR1-interacting protein-1
D1DR : récepteur D1 de la dopamine
D2DR : récepteur D2 de la dopamine
DARPP-32 : Phosphrotein of Mr 32 KDa
DAT : transporteur de la dopamine
EEAT : excitatory amino acid transporter
eiF4E : facteur d'initiation eukaryote 4^E
ERK : extracellular signal regulating kinase page 25
F-actine : actine filamenteuse
FMRP : protéine de retard mental de l'X fragile
FRET : transfert d'énergie de rayonnement de Förster
FS : Fast-spiking
GABA : Acide γ -aminobutyrique
G-actine : actine globulaire
GEF : facteur d'échange de guanine
GFP : protéine fluorescente verte
GPe : Globus Pallidus externe
GPi: Globus Pallidus interne
GRF1: guanine nucleotide releasing factor
HPCv : hippocampe ventral
KO : mutation perte de fonction ou *knock-out*
LIMK : LIM-kinase
LTD : long term depression

LTP : Long term potentiation
 M1,2,3,4 : récepteurs muscariniques de l'acétylcholine de types 1,2,3 ou 4
 MAPK : mitogen-associated protein kinases
 MEK : MAPK-ERK Kinase
 mGluR : récepteurs métabotropiques du glutamate
 MNK-1 : MAPK interacting Kinase-1
 MSK-1 : mitogen and stress activated kinase-1
 MSN : neurones épineux de taille moyenne
 mTOR : major target of rapamycin
 NAc : Noyau Accumbens
 NCAM : molécules d'adhésion cellulaires neuronales
 NET : transporteur de la noradrénaline
 NMDA : acide *N*-méthyl-D-aspartique
 nNOS : oxide nitreux neuronale synthase
 NPF : facteurs de promotions de la nucléation
 NST : noyau sous-thalamique
 PABP : poly-A binding protein
 PAK : P21-activated kinase
 Pa-Rac1 : Rac1 photoactivable
 PDZ : PSD95 Dlg1 zo-1
 PKA : Protéine kinase A
 PP1 : protéine phosphatase-1
 PPC : préférence de place conditionnée
 PPTA : préprotakinine
 PSD: Densité post-synaptique
 PSD-95 : postsynaptic density protein 95
 ROCK : Rho-associated protein Kinase
 SERT : transporteur de la sérotonine
 sLTP : spine-LTP
 SNc : Substance noire compacte
 SNr : Substance noire réticulée
 SPN : neurones striataux de projection
 SPN-D1 : SPN exprimant le récepteur D1
 SPN-D2 : SPN exprimant le récepteur D2
 SRE : serum response element
 TTX : tétrodotoxine
 VGLUT 1, 2, 3 : transporteurs vésiculaires du glutamate de type 1, 2 ou 3
 WASP : protéines du syndrome d'Aldrich
 WAVE : WASP-family verprolin-homologous protein (WAVE)

Résumé

Les événements vécus, même s'ils sont brefs, peuvent laisser une trace durable au niveau des réseaux cérébraux. Ces réseaux sont constitués de neurones connectés par des synapses, dont l'efficacité de transmission est régulée sur le plan structural et fonctionnel. Ainsi la plasticité structurale peut impliquer des modifications morphologiques, la formation ou l'élimination des synapses et représente un possible substrat cellulaire de l'apprentissage. Les drogues d'abus, en augmentant le taux extracellulaire de dopamine, détournent les circuits neuronaux impliqués dans l'apprentissage régulé par la récompense. Au sein de ces circuits, les neurones striataux de projection (SPN) de la région ventrale du striatum, le noyau Accumbens (NAc), jouent des rôles clefs en intégrant les signaux récompensants et contextuels, interprétés au niveau moléculaire par l'activation de la voie de signalisation Extracellular Regulated Kinase (ERK). La cocaïne est connue pour augmenter la densité en épines dendritiques -qui sont les protrusions portant l'élément post-synaptique glutamatergique- au sein des SPN, un effet dépendant de la voie ERK.

L'objectif de ma thèse était d'étudier l'impact de l'exposition répétée ou unique à la cocaïne sur le mode formation des synapses des SPN du NAc et d'élucider les rôles précis de la voie ERK dans ce phénomène. J'ai participé à la mise en place d'une nouvelle méthode d'observation et d'analyse des contacts synaptiques qui a permis de montrer, dans un premier temps, que les injections répétées de cocaïne chez la souris induisaient la formation de synapses glutamatergiques au sein des SPN *in vivo*. J'ai ensuite pu montrer qu'une exposition unique à la cocaïne induisait des effets similaires, visibles dès une heure et persistants une semaine après le traitement. De plus, mes résultats mettent en évidence le mode de formation des synapses, par lequel les nouvelles épines contactent des boutons pré-synaptiques préexistants. Par des expériences d'imagerie en temps-réel par microscopie bi-photonique sur des tranches striatales, j'ai pu dissocier les phases de pousse et de stabilisation de nouvelles épines dendritiques. J'ai pu mettre en évidence que la voie ERK jouait un rôle prépondérant dans ces deux phases, via des processus moléculaires distincts. Ainsi, la phase de pousse des épines est régulée par ERK indépendamment de la traduction protéique. En revanche, le maintien de ces épines néoformées dépend de la synthèse protéique locale, indépendamment de la transcription, et de MNK-1, une kinase cytoplasmique en aval de ERK. En conclusion, mon travail de thèse montre qu'une exposition unique à la cocaïne induit une augmentation persistante de la connectivité glutamatergique des SPN du NAc. Il apporte des données nouvelles sur le mode de formation de ces synapses et des mécanismes moléculaires associés.

Abstract

Brief life occurrences can leave durable changes at the level of neuronal networks. These networks consist of neurons connected by synapses, which transmission efficacy is regulated at the functional and structural levels. Structural plasticity implies morphological changes, formation or elimination of synapses, and represents a possible cellular substrate for learning and memory. Drugs of abuse, by elevating extracellular dopamine levels, hijack neuronal circuits involved in reward-driven learning. Within these circuits, striatal neurons of projection (SPN) from ventral striatum –nucleus Accumbens (NAc)- play key roles through their ability to integrate converging reward and context-related signals, which drive the activation of the Extracellular Regulated Kinase (ERK) pathway at the molecular level and the subsequent development of chronic behavioral alterations. Cocaine is known to induce an increase in the density of dendritic spines –protrusions which host the glutamatergic post-synaptic element- of SPN, an effect that relies on the ERK pathway.

The goal of my thesis work was to study the consequences of chronic and acute exposure to cocaine on the mode of synapse formation in SPN from the NAc and to decipher the precise roles of ERK pathway in this phenomenon. I contributed to the establishment of a new method for the observation and analysis of synaptic contacts, and could demonstrate that chronic cocaine induced the formation of glutamatergic synapses in SPN *in vivo*. Then I could show that a single administration of cocaine induced similar effects, which were observed as soon as one hour and persisted at least one week after injection. Furthermore, my results identify the mode of formation of synapses, with new spines contacting preexisting pre-synaptic boutons. Time-lapse imaging with two-photon microscopy in acute striatal slices allowed me to dissociate the phases of growth and stabilization of the new dendritic spines. I could indeed demonstrate a key role for ERK in those two phases, although through distinct molecular mechanisms. Firstly the growth phase is dependent on ERK, independently of protein synthesis. Secondly the stabilization of newly grown spines is controlled by local translation controlled by MNK-1, a cytosolic kinase downstream ERK, which takes place independently of transcription. In conclusion, my thesis work shows that a single administration of cocaine is able to induce a persistent increase of glutamatergic connectivity in SPN of the NAc. It brings new results on the mode synapse formation as well as on the associated molecular mechanisms.

INTRODUCTION GENERALE

Une des plus extraordinaires capacités des neurones est de pouvoir s'adapter durablement en réponse aux événements vécus par l'individu, qu'ils soient récurrents ou bien très brefs. L'étude de cette propriété que l'on appelle plasticité neuronale représente probablement une des clefs dans la compréhension de l'apprentissage et de la mémoire.

Le comportement d'un individu est en permanence influencé par des phénomènes d'apprentissage, tels que l'apprentissage régulé par la récompense, souvent essentiel à notre survie. Les récompenses naturelles sont codées dans le cerveau par une augmentation ponctuelle de la concentration en dopamine dans des régions cibles des neurones dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale (ATV) telles que le noyau Accumbens (NAc) ou le cortex préfrontal (Schultz et al., 1997) .

Les drogues toxicomanogènes augmentent pharmacologiquement et de façon exagérée la concentration striatale en dopamine. En conséquence, la prise de ces substances dites « addictives » sera obligatoirement associée à une valeur élevée de récompense et laissera une forte empreinte neuronale et comportementale chez l'Homme. Ainsi, l'addiction, qui se définit par une prise compulsive d'une substance, en dépit des conséquences néfastes engendrées pourrait être conçue comme une pathologie d'origine cérébrale, associée à une exacerbation des processus d'apprentissage de la récompense.

Au sein des circuits neuronaux de la récompense, le NAc joue un rôle clé dans l'intégration du contexte et de la récompense. La population neuronale majoritaire est constituée de neurones striataux de projection (SPN), de type GABAergiques, qui reçoivent des afférences glutamatergiques provenant de l'hippocampe ventral, de l'amygdale basolatérale, du cortex pré-frontal et du thalamus d'une part, informatrices des émotions et du contexte, et d'autre part des afférences dopaminergiques de l'ATV codant pour la valeur de récompense. Cette connectivité particulière fait de ces neurones de parfaits détecteurs de coïncidence entre les signaux contextuels et de récompense. Ils représentent donc des cibles privilégiées des substances addictives en général, psychoactives de façon plus spécifique. A cet égard, des remaniements synaptiques, morphologiques et électrophysiologiques importants des SPN du NAc ont été décrits en réponse à l'exposition prolongée aux drogues.

Toutes ces formes de plasticité permettent de maintenir une trace mnésique durable et les changements structuraux des SPN pourraient représenter un des substrats cellulaires les plus stables de la mémoire ([pour revue, Kasai et al., 2010](#)). Nombreux sont les exemples de formation ou de perte d'épines suivant des tâches comportementales ou des traitements pharmacologiques. Ces petites protrusions dendritiques sont à l'interface entre maintien et stabilité, certaines se maintiennent des mois, alors que d'autres plus labiles peuvent se former et disparaître en quelques heures ([Knott et al., 2006](#)). Cet équilibre entre spinogénèse, maintien et raffinement des synapses semble être en analogie avec les phases classiques de la mémoire : formation, consolidation et oubli.

La formation de nouvelles épines a été largement étudiée depuis plus d'une dizaine d'années dans l'étude des effets des drogues d'abus. C'est en 1997 que Robinson et ses collaborateurs ont observé pour la première fois cette plasticité structurale au sein des SPN en réponse à des traitements chroniques à l'amphétamine chez le rongeur ([Robinson et Kolb, 1997](#)). Depuis ces premiers travaux, des résultats similaires ont été obtenus avec la grande majorité des drogues d'abus et notamment la cocaïne. Comme évoqué plus haut, les substances d'abus, la cocaïne notamment, détournent le rôle physiologique exercé par la dopamine et modifient les réseaux neuronaux au sein du striatum, en activant une phase d'importante de plasticité structurale associée à des modifications des propriétés électrophysiologiques de ces neurones ([pour revues, Bellone et Lüscher, 2012; Dong et Nestler, 2014; Russo et al., 2010](#)). Ces différentes formes de plasticité présentent des mécanismes moléculaires communs, dont l'activation de la voie des MAPK (Mitogen activated protein Kinase) de type ERK (*Extracellular signal regulating Kinase*). Cette voie a été montrée comme essentielle aux altérations comportementales induite par la cocaïne injectée de façon chronique chez la souris ([pour revue, Cahill et al., 2014a](#)). Elle est également impliquée dans des réponses plus rapides à la drogue puisqu'une injection unique de cocaïne est suffisante pour permettre une sensibilisation de la réponse comportementale obtenue lors d'une deuxième injection chez la souris. Cette adaptation comportementale est dépendante d'une potentialisation à long terme des SPN du Nacc liée à l'activation de la voie des ERK ([Pascoli et al., 2012](#)). Cette première exposition est de plus responsable de formation d'épines dans différentes structures du circuit de la récompense telles que l'aire tegmentale ventrale ainsi que le cortex préfrontal.

Comme évoqué plus haut, de nombreuses études de la littérature se sont attachées à décrire la plasticité structurale des SPN du NAc, après des expositions chroniques à la

cocaïne, plasticité caractérisée par la formation de nouvelles épines dendritiques au sein de ces neurones. Néanmoins, il n'était pas connu si ces nouvelles épines formaient des synapses avec les afférences glutamatergiques. L'hypothèse de mon laboratoire d'accueil, qui a fait **l'objet de ma première période de thèse, était que la plasticité structurale induite par des injections répétées de cocaïne s'accompagnait d'une augmentation de la connectivité glutamatergique au sein du SPN du NAc** chez la souris. Pour aborder ce point, des méthodes d'analyse ont été mises au point et développées au sein du laboratoire qui ont permis d'étudier les contacts synaptiques formés par des boutons glutamatergiques exprimant le transporteur vésiculaire VGLUT1, et les épines des SPN du NAc. J'ai participé à cette étude, basée sur des images acquises en microscopie confocale conventionnelle, en étudiant les contacts synaptiques sur des épines néo-formées après traitement chronique à la cocaïne.

Ces travaux publiés en 2015 ([Heck et al., 2015](#)) ont débouché sur **une deuxième période de ma thèse, au cours de laquelle je me suis intéressé à la spinogénèse induite par une injection unique de cocaïne, plus particulièrement à la dynamique et au mode de formation des nouvelles épines et synapses glutamatergiques dans les SPN du NAc**. Ce projet s'est appuyé sur l'expérience et les méthodes acquises pour le premier article. Je l'ai complété par des études de la synaptogénèse en temps réel sur un modèle *ex vivo* de tranches de striatum. Ce modèle m'a permis de disséquer les signatures moléculaires de la formation des épines dendritiques. J'ai ainsi pu montrer le rôle important de la voie de signalisation ERK dans différentes phases de pousse et de maintien des épines néo-formées. Mon travail met en évidence le rôle original d'une protéine kinase en aval de ERK, MNK-1 (*MAPK-interacting Kinase MNK-1*) et de la synthèse protéique, indépendamment de la transcription, dans le maintien des épines néoformées.

Dans l'ensemble, ces résultats ont permis de mettre en évidence la pharmacodynamique de la plasticité structurale des SPN du NAc en réponse à une injection unique de cocaïne. Nous émettons l'hypothèse que cette plasticité structurale rapide ne suffit pas à rendre l'individu dépendant, mais participe vraisemblablement une modification précoce des réseaux neuronaux et à leur sensibilisation aux expositions suivantes.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : Influences neuronales et comportementales des drogues d'abus

I-1) Les drogues d'abus et le détournement de la récompense

I-1-a) L'apprentissage régulé par la récompense

Un grand nombre des comportements acquis tout au long notre vie a pour but commun de favoriser notre survie. Ces comportements adaptés aux changements de l'environnement sont souvent associés à des phénomènes d'apprentissage régulés par les récompenses naturelles. Les modèles animaux ont permis une meilleure compréhension des processus cellulaires et moléculaires menant à cette mémoire particulière étroitement liée au contexte et à l'état émotionnel de l'individu (pour revue, Robbins, Ersche, et Everitt 2008). Ceci peut être expliqué du fait des structures cérébrales mises en jeu dans ces processus reposant majoritairement sur la plasticité du réseau mésocorticolimbique dans lequel le noyau Accumbens (NAc) va intégrer des signaux contextuels et émotionnels glutamatergiques des aires hippocampo-amygdalo-corticales et les variations de libération de dopamine des voies mésolimbiques (de l'aire tegmentale ventrale : ATV) (Britt et al. 2012 ; MacAskill, Cassel et Carter 2014). L'augmentation de la libération de dopamine est essentielle à cet apprentissage puisqu'elle représente un signal de récompense qui est associé aux signaux contextuels, sensoriels et émotionnels codés par le glutamate pour ainsi optimiser et ajuster le comportement (pour revues, Cahill et al. 2014, Girault et al. 2007).

C'est dans les années 1950 que la notion de circuit de la récompense a été introduite par les expériences de Olds et Milner (Olds et Milner, 1954). Ils implantèrent des électrodes dans l'aire septale du cerveau d'un rat, et observèrent que l'animal pouvait stimuler lui-même cette région du cerveau en appuyant sur un levier. Une fois que le rat a découvert comment s'administrer cette sensation de « plaisir », il peut s'auto-stimuler sans arrêt, en oubliant même ses besoins fondamentaux. Ces résultats érigèrent les prémices du rôle des neurones dopaminergiques dans la régulation de la récompense et de la motivation.

Les rôles physiologiques de la dopamine dans l'intégration de la récompense furent ensuite élucidés grâce aux expériences du Dr Wolfram Schultz (Schultz et al., 1997). Les

neurones dopaminergiques de l'ATV ont deux modes principaux de décharge des potentiels d'action : un mode tonique à environ 1-8 Hz qui peut être considéré comme le niveau basal et un mode phasique à >15 Hz, caractérisé par des décharges en bouffées de potentiels d'actions induisant une libération importante de dopamine (Grace, 1988), ces bouffées ont lieu préférentiellement lors de l'attribution d'une récompense. Cette activité des neurones dopaminergiques de l'ATV d'un singe a été suivie en temps réel durant une tâche associant un stimulus visuel et une récompense. Cette dernière, une boisson sucrée, représentant le stimulus non conditionné est précédée du stimulus sensoriel (stimulus conditionné). Au premier stade de l'expérience, l'animal n'a pas connaissance que le stimulus visuel sera suivi d'une récompense, les neurones présentent alors une augmentation de la fréquence de décharge lors de la consommation de la boisson sucrée. Une fois cette phase d'apprentissage associatif terminée, l'élévation de la fréquence apparaît alors durant la présentation du stimulus sensoriel et pas lors de la présentation de la récompense. Enfin, lorsque la récompense n'est plus présentée, la fréquence de décharge des neurones de l'ATV devient plus basse que le niveau basal (Schultz et al., 1997).

Ces résultats mettaient en évidence trois rôles de la dopamine lors de cet apprentissage. Premièrement, elle annonce l'aspect récompensant d'un événement afin d'adapter un comportement optimisant sa future obtention. Une fois cette phase d'apprentissage terminée, la dopamine est libérée avant l'arrivée de la récompense, en relation avec les paramètres contextuels qui ont été associés précédemment. Et enfin, une fois l'apprentissage accompli, la dopamine joue un rôle de prédiction d'erreur de récompense (pour revue, Montague et al., 2004), en comparant la valeur obtenue à celle attendue. Dans des conditions physiologiques, les systèmes dopaminergiques sont donc finement régulés avec une activation se décalant progressivement du moment de l'obtention de la récompense vers les signaux contextuels annonciateurs de son arrivée. La consommation de la récompense naturelle en elle-même n'induit plus de signal dopaminergique une fois que le comportement dans le but de l'obtenir est acquis, pouvant limiter ainsi la prise compulsive.

I-1-b) Le détournement de la récompense par les drogues d'abus

Certains agents pharmacologiques, tels que les drogues d'abus, peuvent détourner ces systèmes d'intégration des récompenses et induire ces comportements pathologiques de recherche et de consommation compulsive et excessive. Elles ont comme point commun d'augmenter de façon chimique la concentration extracellulaire en dopamine dans les régions

cibles des neurones de l'ATV tels que le cortex pré frontal (CPF) et le NAc représentant des structures cérébrales clefs du réseau mésocorticolimbique (Di Chiara et Imperato, 1988). Ces drogues sont connues pour induire une plasticité aberrante de ce circuit neuronal *via* des processus de plasticité synaptique tels que la potentialisation à long terme (LTP) ou la dépression à long terme (LTD) (pour revues Kauer et Malenka, 2007; Lüscher et Malenka, 2011), ainsi que par des régulations géniques et épigénétiques (pour revues, Nestler, 2001; Robison et Nestler, 2011) et des remaniements structuraux des synapses (pour revue Russo et al., 2010, Robinson et Kolb, 1999).

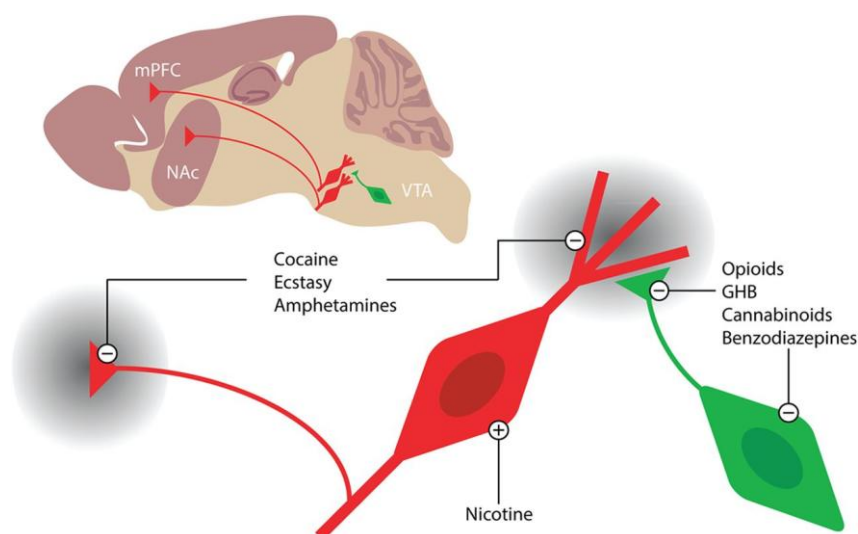


Figure 1. Mécanisme d'action des drogues d'abus sur le système mésocorticolimbique. Représentation schématique résumant les différents modes d'actions de certaines drogues d'abus sur le système dopaminergique. Les neurones dopaminergiques de l'ATV sont en rouge et les interneurons GABAergiques de cette structure en vert. (d'après Lüscher 2013).

Les drogues d'abus détournent littéralement le système mésocorticolimbique puisque leur consommation induit obligatoirement une élévation importante de dopamine striatale et corticale notamment. Même si ces substances mènent à un effet final similaire, leurs modes d'action diffèrent cependant selon leurs types. Certaines activent directement les neurones dopaminergiques de l'ATV, comme la nicotine qui active les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine situés sur les neurones dopaminergiques et augmente ainsi leur fréquence d'émission de potentiel d'action. D'autres drogues, telles que les cannabinoïdes, agissent par désinhibition des neurones dopaminergiques de l'ATV, augmentant ainsi indirectement leur fréquence de décharge. Durant cette thèse nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la cocaïne, une des drogues psychostimulantes (**Figure 1**). Celles-ci augmentent la concentration en dopamine directement dans les structures cibles des neurones dopaminergiques en inhibant la recapture de ce neuromodulateur dans le cas de la cocaïne ou

bien en augmentant la libération de dopamine via l'inversion de son transporteur comme le fait l'amphétamine (pour revues, [Lüscher, 2013](#), [Lüscher et Malenka, 2011](#)).

Lors des prises répétées de drogues d'abus, la phase d'apprentissage durant laquelle le pic de dopamine se décale vers le stimulus conditionné n'existe donc plus. Il y aura toujours une importante élévation de la dopamine due à l'effet pharmacologique de la drogue, provoquant une sensibilisation de la valeur incitative attribuée aux stimuli associés à la drogue (pour revue, [Robinson et Berridge, 2001](#)) contrairement aux récompenses naturelles pour lesquels ce pic n'apparaît plus lors de la consommation (pour revue, [Keiflin et Janak, 2015](#)). C'est en quelque sorte comme si la prise de drogues d'abus était en permanence « une récompense naturelle inattendue », ce qui peut participer à une consommation de plus en plus fréquente. Cette incohérence induit une distorsion des systèmes dopaminergiques, qui lorsque le terrain génétique et contextuel de l'individu sont défavorables, par exemple un environnement stressant associé ou non à des prédispositions génétiques, peut mener à la pathologie de l'addiction (pour revues, [Heilig et al., 2016](#), [Mineur et Picciotto, 2008](#)). Celle-ci se définit par une prise incontrôlée de la substance en dépit des conséquences néfastes, avec des phases de manque et de rechute. Les drogues d'abus laissent donc une empreinte très forte et durable sur le comportement dépendant principalement d'une plasticité du réseau neuronal mésocorticolimbique.

I-2) Effets de la cocaïne

I-2-a) Mode d'action de la cocaïne

La cocaïne est une drogue psychostimulante ayant une forte affinité pour le transporteur de la dopamine (DAT). Le DAT permet la recapture de la dopamine principalement, mais aussi, dans une moindre mesure, celle d'autres mono amines tels que la sérotonine et la noradrénaline. Ces mono amines sont recapturés de façon beaucoup plus efficace par leur transporteurs propres : le transporteur de la sérotonine (SERT) et de la noradrénaline (NET) respectivement ([Ritz et al., 1992](#); [Torres et al., 2003](#)). La liaison de la cocaïne sur le transporteur DAT va inhiber son activité de recapture au niveau des afférences dopaminergiques qui sont particulièrement denses au sein du striatum et du CPF. Le blocage

du DAT par la cocaïne va ainsi augmenter de façon très importante la concentration extracellulaire en dopamine au niveau de ces structures.

Un aspect reste mystérieux quant au mode d'action de la cocaïne sur la recapture de la dopamine. En effet, un modèle de souris mutante perte de fonction (que nous résumerons par *Knock-Out* : KO) pour le DAT a été mis au point à la fin des années 1990 dans le laboratoire du Dr M. Caron. Ces souris KO-DAT contre toute attente, présentaient tout de même un comportement d'auto-administration de la cocaïne (Rocha et al., 1998). Le rôle de la dopamine dans les comportements de réponse à cette drogue était alors remis en question. Néanmoins, ce modèle a quelques limites importantes, notamment une hyperdopaminergie constitutive. Une hypothèse admise est que le système mésocorticolimbique de ces souris serait alors altéré de façon constitutive et en quelque sorte présensibilisé.

Quelques années plus tard un modèle mutant de souris plus subtile a été créé, présentant une mutation sur le gène du *DAT* qui rend le transporteur insensible à la cocaïne (*cocaine-insensitive DAT mice* : CI-DAT) mais continuant remplir sa fonction physiologique de recapture. Ce modèle a permis de montrer que l'inhibition du DAT par la cocaïne est effectivement un élément essentiel aux effets comportementaux de la cocaïne puisque l'injection de cette substance n'induit pas de sensibilisation locomotrice chez ces mutants (Chen et al., 2006). De façon intéressante mais intrigante, les mêmes auteurs ont poursuivi ces travaux en montrant que la réintroduction par injection d'adénovirus associé (AAV) du gène sauvage dans le striatum ventral ou dorso-médian ne permet pas de sauver le phénotype comportemental. En revanche la même infection dans le striatum dorso-latéral permet ce sauvetage. En plus du comportement, la formation d'épines dendritiques en réponse à la cocaïne chez ces souris CI-DAT est elle aussi altérée (Martin et al., 2011).

I-2-b) Similarités de mode d'action de la cocaïne sur la libération de dopamine chez l'humain et le modèle rongeur

Le suivi en temps réel de la variation de dopamine dans le NAc a permis de mieux comprendre la cinétique du mode d'action des psychostimulants. Celui-ci fut initialement réalisé par la méthode de microdialyse dans le NAc chez des rats injectés avec de la cocaïne (Di Chiara et Imperato, 1988). Lors de l'injection aiguë de cocaïne, la concentration en dopamine augmente rapidement, en une dizaine de minutes, pour ensuite retomber progressivement 1 heure environ après l'injection. Ces résultats furent d'ailleurs observés

pour de multiples drogues et pas seulement les psychostimulants. Ce pic transitoire de dopamine est d'ailleurs corrélé temporellement avec l'hyperlocomotion induite par la cocaïne chez les rongeurs. Il est intéressant de noter que la concentration en glutamate lors cette injection n'augmente pas. (**Figure 2**).

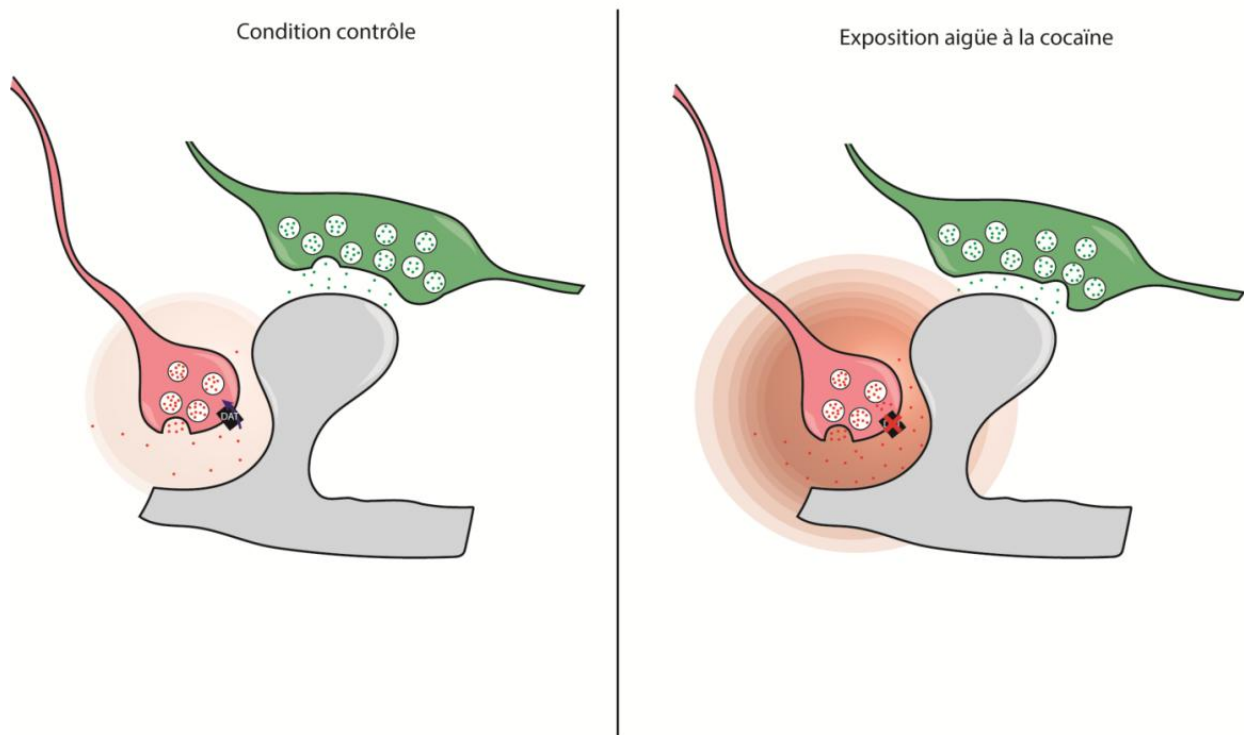


Figure 2. Influence de l'exposition aiguë à la cocaïne au niveau d'une synapse excitatrice du striatum. Représentation de l'effet de la cocaïne sur les synapses glutamatergiques du striatum. Une exposition aiguë à cette drogue induit une augmentation importante de la dopamine extracellulaire sans modifier la libération de glutamate (en rouge : les afférences dopaminergiques et en vert le bouton présynaptique glutamatergique).

La cocaïne a donc un effet d'augmentation de la dopamine striatale chez le rongeur. L'exploitation et l'application de ces résultats à la pathologie humaine ont été possibles dès le milieu des années 1990, avec l'essor de l'imagerie des systèmes dopaminergiques en temps réel chez l'Homme. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'action des drogues d'abus a été possible grâce aux techniques de tomographie par émission de position et de tomographie par émission monophotonique. Ces techniques permettent en effet de suivre de façon indirecte les variations de la concentration en dopamine dans le cerveau *via* l'utilisation d'agonistes radiomarqués des récepteurs D2 et D3 de la dopamine. Ces récepteurs sont majoritairement situés dans les régions striatales et lorsque la dopamine endogène est libérée on peut observer

une diminution de l'occupation de ces marqueurs radioactifs ([pour revue, Nutt et al., 2015](#)). Cette méthode a permis de mettre en évidence que l'augmentation de dopamine observée dans ces régions striatales par microdialyse, après une administration de cocaïne chez le rongeur, était également observée chez l'humain, dans des cinétiques similaires.

I-2-c) Adaptations comportementales à la cocaïne dans le modèle rongeur

Les modèles rongeurs ont permis une meilleure compréhension des mécanismes neuronaux menant à l'addiction. En effet, les rongeurs récapitulent les caractéristiques globales des réponses comportementales aiguës et chroniques aux drogues d'abus observées chez l'homme. Les expériences d'auto-administration de ces substances en sont de parfaits exemples. Dans ces études, l'animal peut s'administrer de façon orale, intraveineuse (dans le cas de la cocaïne) ou bien encore intra cérébrale la substance étudiée, permettant ainsi de mesurer le caractère renforçant de la drogue ([pour revue, Lüscher, 2013](#)). L'auto-administration modélise l'aspect motivationnel et récompensant de la drogue. Pour rendre ce modèle plus proche de la pathologie humaine encore, des variations existent, tels les modèles d'escalade, dans lesquels l'animal doit réaliser la tâche responsable de l'injection de plus en plus de fois pour recevoir la même dose de drogue, ou les modèles aversifs où il peut être exposé à un choc électrique durant l'injection ([pour revue, O'Connor et al., 2011](#)). Enfin le groupe du Dr Serge Ahmed a développé une autre variante de l'auto-administration de drogue durant laquelle le rongeur a le choix entre de la cocaïne et du sucrose, qui a aussi un effet extrêmement récompensant. Cette expérience montre que seulement 20 % environ des rongeurs choisissent finalement la cocaïne après la phase d'apprentissage contrairement à la quasi-totalité des animaux lorsqu'aucune autre récompense n'est présentée en opposition ([pour revue, Ahmed et al., 2013; Lenoir et al., 2007](#)). Cette proportion de 20 % est en accord avec le pourcentage d'individus passant d'un usage récréationnel à une consommation régulière et incontrôlée des drogues d'abus. L'auto-administration permet donc de modéliser certains aspects de la consommation de drogues chez l'humain. En revanche, elle reste difficile à mettre en œuvre, notamment chez la souris.

D'autres tests comportementaux existent durant lesquels l'expérimentateur injecte lui-même la drogue à l'animal. Ces protocoles, dits non opérants, induisent eux aussi des adaptations comportementales importantes telles que la sensibilisation locomotrice : l'animal présente une activité locomotrice de plus en plus importante après chaque injection

journalière. L'injection de cocaïne peut de plus induire un comportement de préférence de place conditionnée (PPC), ou l'animal apprend à associer la drogue à l'environnement. Ainsi, dans ce test, l'animal reçoit de façon quotidienne et alternative, soit la drogue soit une solution témoin (saline), injectées dans deux compartiments différents. A la fin du test, l'animal a le choix entre ces deux compartiments et « choisit » de rester plus de temps dans le compartiment associé à la cocaïne après la phase d'apprentissage. La PPC est donc étroitement liée au contexte environnemental constitué par les différences entre les compartiments. Néanmoins, il est important aussi dans le cas de la sensibilisation locomotrice puisque ce comportement est amplifié lorsque l'animal reçoit la drogue dans un nouvel environnement (Badiani et al., 1995).

Outre l'aspect chronique de l'addiction, il est intéressant de noter que la cocaïne modifie rapidement et durablement les comportements de PPC et de sensibilisation locomotrice. En effet, une seule injection peut altérer le comportement des rongeurs à ces deux tests plusieurs jours après l'exposition (Valjent et al., 2010). Un autre aspect pouvant facilement être modélisé dans ces protocoles est la réexposition à la drogue après une période de sevrage, cette dernière exposition est appelée l'injection *challenge* et elle réactive les processus de plasticité neuronale et les adaptations comportementales (Chen et al. 1996). Le principal désavantage de ces deux derniers protocoles est évidemment que l'injection est réalisée par l'expérimentateur et est en conflit avec la recherche volontaire de drogues chez l'humain.

La recherche volontaire de drogue peut néanmoins être modélisée dans les expériences d'auto-administration chez le rongeur en associant le comportement opérant à un signal sensoriel informant de la présentation de la récompense. Après la phase d'apprentissage, le simple fait de présenter le signal suffit à induire un comportement de recherche de drogue chez l'animal, caractérisé par un comportement opérant, même si celui-ci n'apporte pas récompense (De Wit et Stewart, 1981; Shaham et al., 2003).

Quels que ce soient les paradigmes expérimentaux choisis, que l'administration nécessite un comportement opérant ou non, les altérations comportementales induites par la cocaïne reposent toutes sur des adaptations de réseaux neuronaux impliquant les aires corticales, striatales et dopaminergiques. Cet ensemble de structures cérébrales forme les ganglions de la base et le circuit mesocorticolimbique, un réseau cérébral crucial dans le traitement neuronal de la récompense et les adaptations pathologiques à la cocaïne.

Chapitre II : Les circuits neuronaux détournés par les drogues d'abus

II-1) Les ganglions de la base et ses grandes fonctions

II-1-a) Fonctions physiologiques

Les ganglions de la base forment un réseau cérébral de noyaux sous-corticaux interconnectés en boucles complexes. Ils jouent un rôle fondamental dans l'exécution optimale de programmes moteurs en réponse à l'environnement. Des pathologies de ce système, telles que la maladie de Parkinson ou de Huntington par exemple, ont des conséquences très handicapantes sur la mobilité des patients (pour revue, Nelson et Kreitzer, 2014). Comme présenté précédemment, en plus de cette fonction motrice, les ganglions de la base sont aussi fortement impliqués dans la régulation des comportements liés à la récompense, ce qui en fait une des principales cibles des drogues d'abus. Cette partie de thèse présentera et discutera les bases anatomiques du réseau des ganglions de la base pouvant expliquer ces différentes fonctions.

II-1-b) Boucles de régulation des ganglions de la base

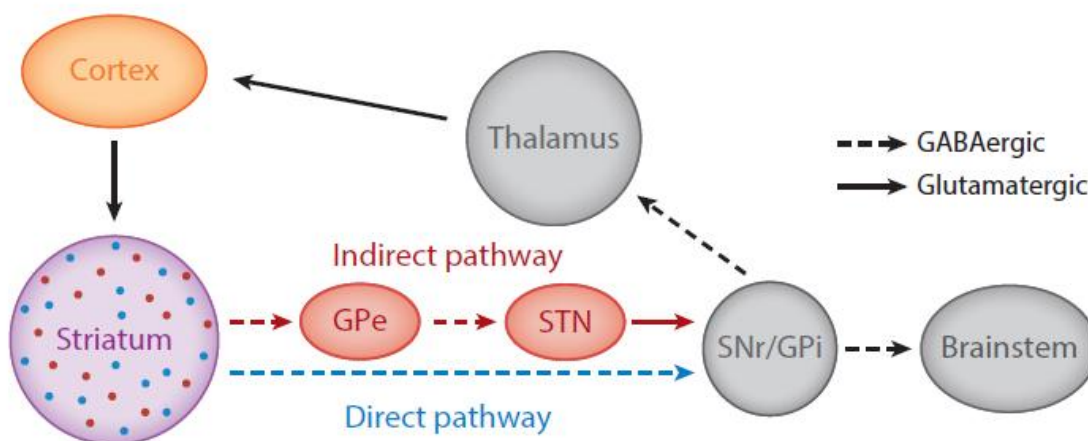


Figure 3. Représentation schématique simplifiée du fonctionnement du réseau des ganglions de la base (d'après Nelson et Kreitzer, 2014).

Les ganglions de la base sont constitués du striatum (parties dorsale ou ventrale) des noyaux sous-thalamiques, du Globus Pallidus (interne et externe : GPi et GPe) et de la

substance noire (compacte : SNc et réticulée : SNr) et de l'aire tegmentale ventrale (ATV) (pour revue, Nelson et Kreitzer, 2014). Ce réseau reçoit une importante innervation glutamatergique issue de nombreuses aires corticales (limbiques et motrices) et thalamiques d'origine glutamatergique. Les informations fournies par ces afférences, de type contextuelle, sont modulées par les signaux dopaminergiques issues du mésencéphale, SNc pour le striatum dorsal et de l'ATV pour le striatum ventral.

Les ganglions de la base s'articulent en deux grandes voies : les voies directes et indirectes, se séparant dès la sortie du striatum pour converger *al fine* sur la SNr (**Figure 3**). Ces deux voies jouent des rôles opposés dans l'établissement du mouvement. Si l'on devait illustrer très simplement leur fonctionnement il faut s'imaginer la SNr comme un « frein mouvement », cette structure projetant vers le tronc cérébral et les aires corticales motrices (pour revue, Nelson et Kreitzer, 2014). Au sein de la voie directe, les neurones de projection striataux (Striatal Projection Neuron, SPN) de type GABAergiques (Acide γ -aminobutyrique), exercent un rôle inhibiteur sur l'activité des neurones de la SNr et du GPi, eux-mêmes GABAergiques, exerçant ainsi un rôle désinhibiteur sur les voies de sortie de ces structures. Ceci résulte en une levée de frein au mouvement.. La voie indirecte, quant à elle présente un effet opposé puisque des relais supplémentaires, au niveau du GPe puis du noyau sous-thalamique, résultent en une activation des neurones de la SNr. L'activation de la voie indirecte accentue l'activation de la SNR et donc l'inhibition du mouvement.

L'exécution fine d'un mouvement résulte donc d'une balance entre les voies directe et indirecte. Toute altération de cette balance, comme c'est le cas dans l'addiction, résulte en une modification comportementale.

II-1-c) La micro-circuiterie striatale

Le striatum constitue la principale structure d'entrée des ganglions de la base et joue le rôle de détecteur de coïncidence entre les afférences glutamatergiques sensorielles et motrices et les afférences dopaminergiques. Il peut être séparé en trois sous-structures chez le rongeur : le striatum dorso-median, dorso-latéral et le striatum ventral appelé aussi le NAc. Chacune de ces régions régule des mécanismes et comportements différents, la partie dorso-latérale étant préférentiellement impliquée dans la régulation motrice alors que le NAc et le striatum dorso-median sont essentiellement impliqués dans l'intégration de la récompense et les aspects motivationnels (pour revue, Kreitzer et Malenka, 2008).

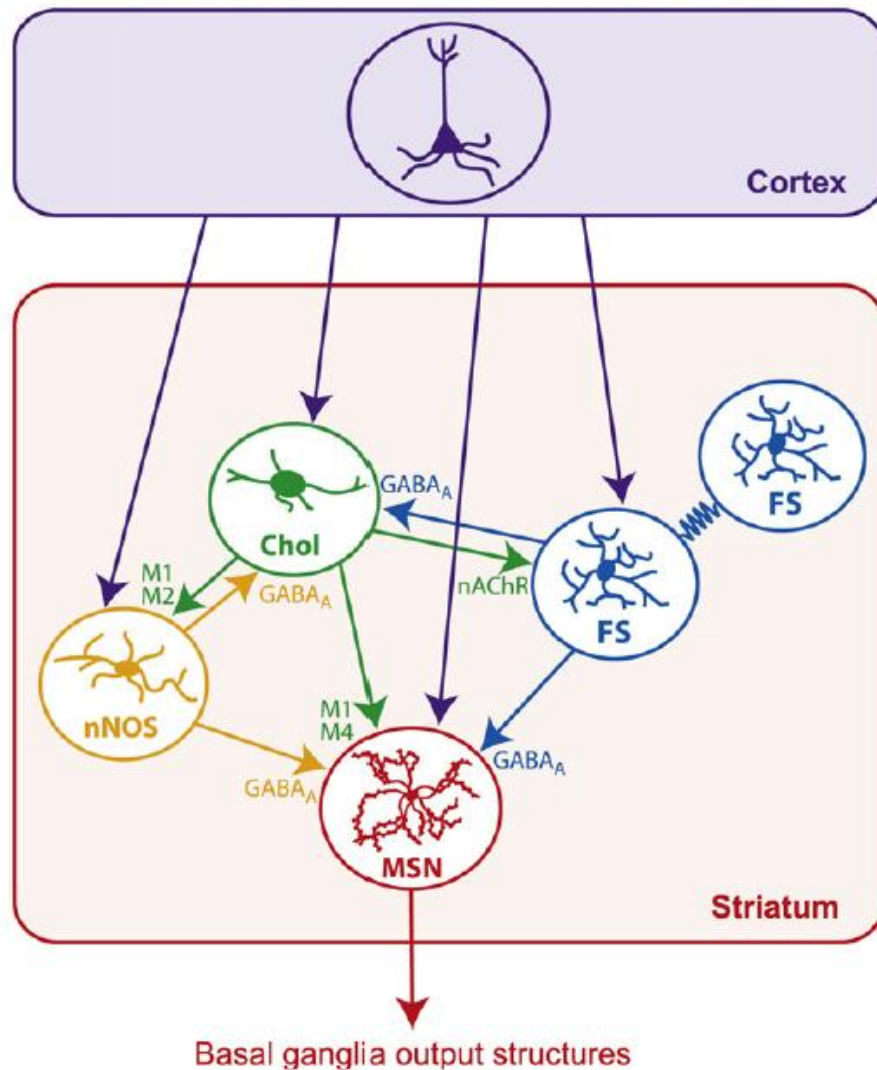


Figure 4. La micro-circuiterie striatale. Les différentes régions striatales présentent une micro-circuiterie similaire avec 90/95% de SPN et le reste est composé des interneurones cholinergiques (Chol), GABAergiques à parvalbumine (*fast spiking* : FS) et les interneurones produisant l'oxyde nitreux neuronal (interneurones nNOS). Tous ces neurones reçoivent des afférences glutamatergiques corticales mais seuls les SPN (notés MSN) projettent vers les sorties de sortie du striatum. (d'après Fino et Venance, 2011)

Toutes les régions du striatum présentent une micro-circuiterie similaire avec environ 90/95% de SPN. Les 5% de neurones restants étant les interneurones cholinergiques, les interneurones GABAergiques à parvalbumine (*fast spiking* : FS) et les interneurones exprimant l'oxyde nitreux neuronal (interneurones nNOS). L'ensemble de ces interneurones innerve et module l'activité globale du striatum. Les interneurones cholinergiques intègrent notamment les signaux dopaminergiques et glutamatergiques et vont ainsi permettre d'équilibrer l'activité des SPN (par l'activation de récepteurs muscariniques M1 et M4). Ces interneurones cholinergiques influencent aussi les interneurones FS (via le récepteur nicotinique à l'acétylcholine) et nNOS (par les récepteurs M1 et M2), ces deux types

d'interneurones modulant à leur tour l'activité des SPN par des projections GABAergiques (**Figure 4**) (pour revue, Fino et Venance, 2011). Même s'ils sont minoritaires les interneurones, de par leur degré important d'innervation de l'ensemble des neurones striataux, influencent fortement l'activité globale du réseau des ganglions de la base. Des dérégulations de l'activité de quelques pourcents d'interneurones cholinergiques peuvent par exemple suffire à l'établissement de pathologies neuronales et comportementales telles qu'une sensibilité accrue à la cocaïne par exemple (Sakae et al., 2015).

II-1-d) Les neurones striataux de projection intégrateurs des signaux dopaminergiques et glutamatergiques

Les SPN sont les neurones striataux auxquels je me suis principalement intéressé au cours de mon travail de thèse. Il s'agit de neurones GABAergiques qui ont un corps cellulaire de taille moyenne (environ 10 μm de diamètre), ainsi que des dendrites comportant une densité importante en épines : plus de 1 épine par μm (pour revue, Kreitzer, 2009).

Au niveau de la partie dorsale du striatum, les SPN reçoivent de nombreuses afférences glutamatergiques des aires corticales et thalamiques. Ces différentes afférences peuvent être distinguées grâce à leurs transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT) qui diffèrent selon les structures de projection. Les neurones corticaux projetant vers le striatum sont ceux de la couche 5 qui expriment le transporteur vésiculaire du glutamate de type 1 (VGLUT1), alors que les neurones thalamiques expriment VGLUT2. Des études en microscopie électronique ont permis de montrer que les synapses glutamatergiques se forment au niveau de la tête des épines dendritiques. Cependant, 30% des boutons thalamiques forment aussi des synapses sur l'arbre dendritique des SPN (**Figure 5**) (Doig et al., 2010).

Cette connectivité glutamatergique des SPN est différente dans la partie ventrale du striatum puisque, dans cette région, les SPN intègrent une « triade glutamatergique » composée du CPF, de l'hippocampe ventral (HPCv) et de l'amygdale baso-latérale (BLA) exprimant VGLUT1 (Britt et al., 2012), ainsi que les afférences VGLUT2 positives thalamiques.

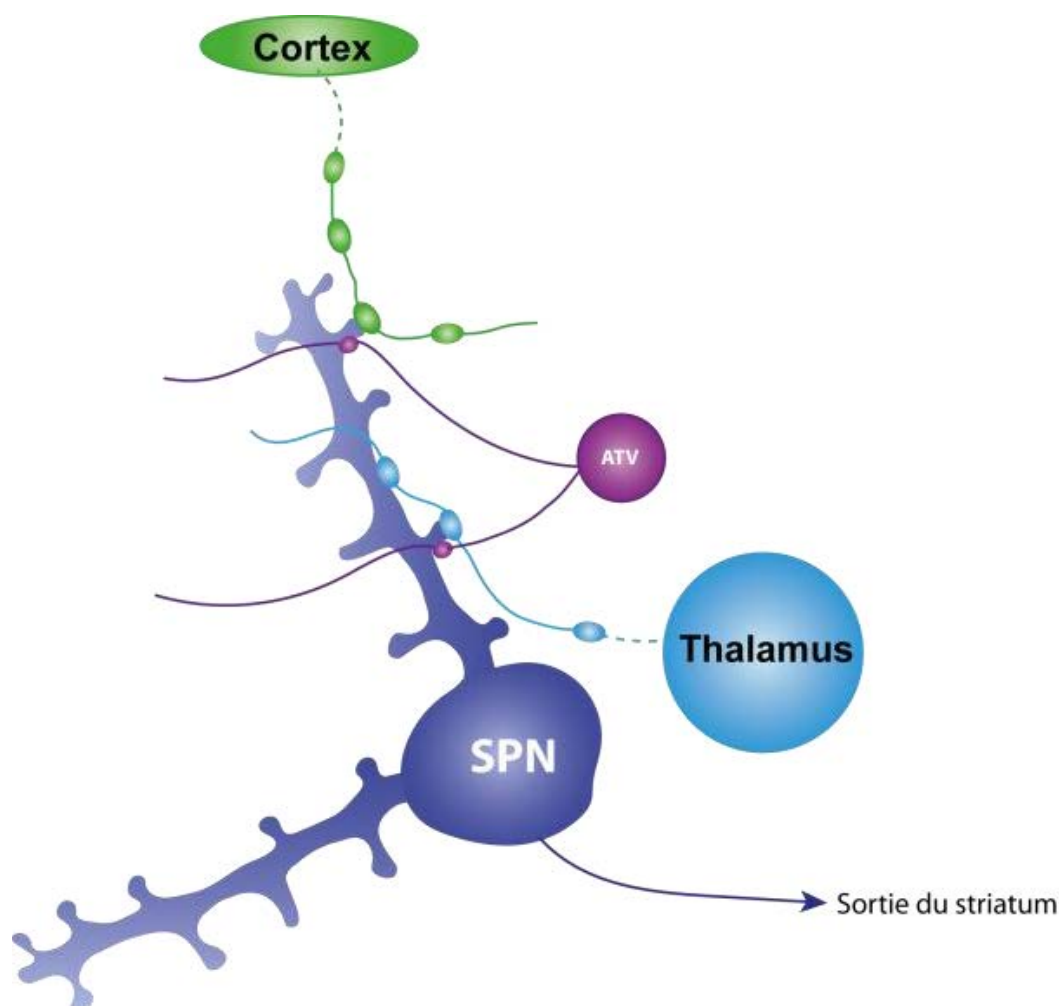


Figure 5. Schéma de l'intégration des afférences dopaminergiques et glutamatergiques par les neurones striataux de projection. Les SPN intègrent au niveau de leurs épines les afférences corticales et thalamiques glutamatergiques, 30% des afférences thalamiques sont situées sur l'arbre dendritique. Ces signaux sont modulés par les afférences dopaminergiques de l'ATV contactant environ 20% des cous des épines.

En plus de ces différences d'innervations glutamatergiques, les SPN du NAc ou du striatum dorsal se différencient par les afférences dopaminergiques reçues. Les axones dopaminergiques de l'ATV innervent en effet le striatum dorso-médian et le NAc alors que ceux de la SNc projettent quant à eux majoritairement sur la région dorso-latérale du striatum. Les boutons dopaminergiques forment des contacts préférentiellement sur le cou de 20% des épines dendritiques et la moitié d'entre-deux forment une synapse. Cependant, même si une faible proportion de boutons dopaminergiques forme des synapses, les autres boutons sont situés à moins de 1µm d'une épine, ce qui permet tout de même une transmission volumique de la dopamine sur la majorité des synapses (Moss et Bolam, 2008).

Les caractéristiques électrophysiologiques des SPN font que l'activité de ces neurones est étroitement liée aux afférences glutamatergiques et dopaminergiques reçues. Ils présentent

une résistance membranaire faible, ce qui a pour conséquence de réduire l'amplitude des potentiels synaptiques. De plus leur potentiel de repos est bas : environ -85 mV. Le déclenchement d'un potentiel d'action nécessite en conséquence une grande synchronisation dans la libération de glutamate par les afférences corticales ([pour revue, Mahon et al., 2004](#)) et/ou une augmentation de la dopamine extracellulaire. Cela induit un passage de l'état « down » des SPN, durant lequel le potentiel de membrane est bas à un état « up », favorable au déclenchement des potentiels d'actions ([pour revue, Lobo et Nestler, 2011](#))

II-1-e) La dichotomie des neurones striaux de projection et les voies directe et indirecte

Les SPN sont généralement séparés en 2 sous-catégories : les SPN-D1, exprimant le récepteur D1 à la dopamine (D1DR) et le neuropeptide substance-P qui appartiennent à la voie directe, et ceux exprimant le récepteur D2 (D2DR) ainsi que le neuropeptide enképhaline (SPN-D2) de la voie indirecte (**Figure 6**). Ces deux récepteurs de la dopamine sont métabotropiques à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G (GPCR). D1DR étant couplé à la protéine G_{olf} et son activation par la dopamine induit une activation de l'adénylate cyclase et donc une augmentation de la concentration intracellulaire en adénosine monophosphate cyclique (AMPc), alors que le D2DR est quant à lui couplé à G_q ce qui à l'inverse conduit à une diminution de l'AMPc ([pour revue, Nishi et al., 2011; Zhuang et al., 2000](#)). D2DR possède de plus une plus grande affinité pour la dopamine que le D1DR. La libération de dopamine aura donc des effets divergents selon que le SPN exprime le récepteur D1 ou D2. En effet dans les SPN-D1 une augmentation de la dopamine aura tendance à favoriser l'état « up », et inversement pour les SPN-D2. Il est intéressant de noter que certains neurones (environ 5% des SPN dans le striatum dorsal et 17% dans le Shell du NAc) expriment les deux types de récepteurs à la dopamine, mais leurs rôles restent encore aujourd'hui à mettre en évidence ([Bertran-Gonzalez et al., 2008; pour revue, Valjent et al., 2009](#)).

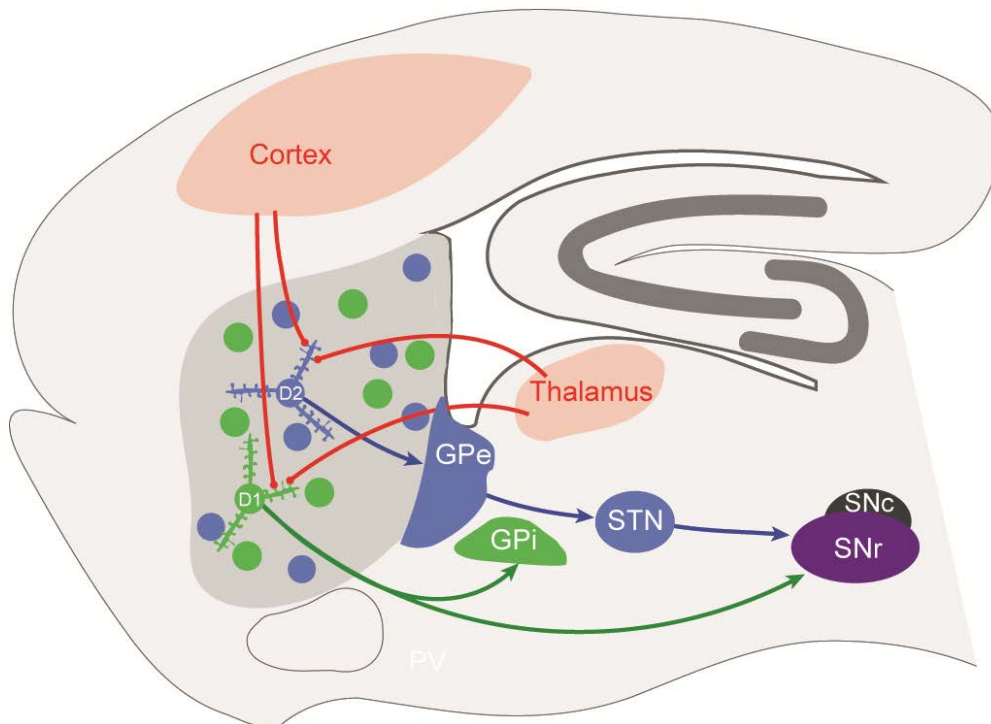


Figure 6. Anatomie des voies directes et indirectes des ganglions de la base. Les deux grands sous-types de SPN et leur projection sont en bleu et vert pour les neurones D2 et D1, respectivement.

II-1-f) Les rôles des deux voies de projections des neurones striataux

L'une des hypothèses largement décrite dans la littérature concernant le rôle des voies directe et indirecte est que leur mise en jeu favorise la sélection d'un plan moteur et permet son ajustement fin en fonction du contexte et de l'environnement. L'activation de la voie directe permet d'initier les mouvements alors que les mouvements « parasites » néfastes sont inhibés par la mise en jeu de la voie indirecte ([pour revue, Jahanshahi et al., 2015](#)).

Ce rôle a été démontré dans une élégante expérience réalisée dans l'équipe du Dr Anatol Kreitzer qui a relié le rôle hypothétique de ces voies avec le comportement des rongeurs. En effet, à l'aide d'une expression du canal rhodopsine spécifiquement dans les SPN-D1 ou les SPN-D2, il a pu montrer que l'activation par la lumière de l'un ou l'autre de ces sous types neuronaux avait des effets opposés sur la locomotion, activateur lorsque les SPN-D1 sont activés, inhibiteur lorsque les SPN-D2 le sont ([Kravitz et al., 2010](#)).

Ces résultats doivent néanmoins être pris avec précaution, car il est maintenant bien admis que les stimulations optogénétiques, qui permettent un ciblage précis de populations

neuronales, produisent des activités neuronales beaucoup plus élevées que celles observées dans des conditions physiologiques.

II-1-g) Des voies directe et indirecte discutables dans le NAc

Le striatum ventral, ou NAc, même s'il présente des bases anatomiques relativement similaires à la région dorsale, n'en reste pas moins très différent de par les afférences qu'il reçoit ainsi que par les régions sur lesquelles il projette.

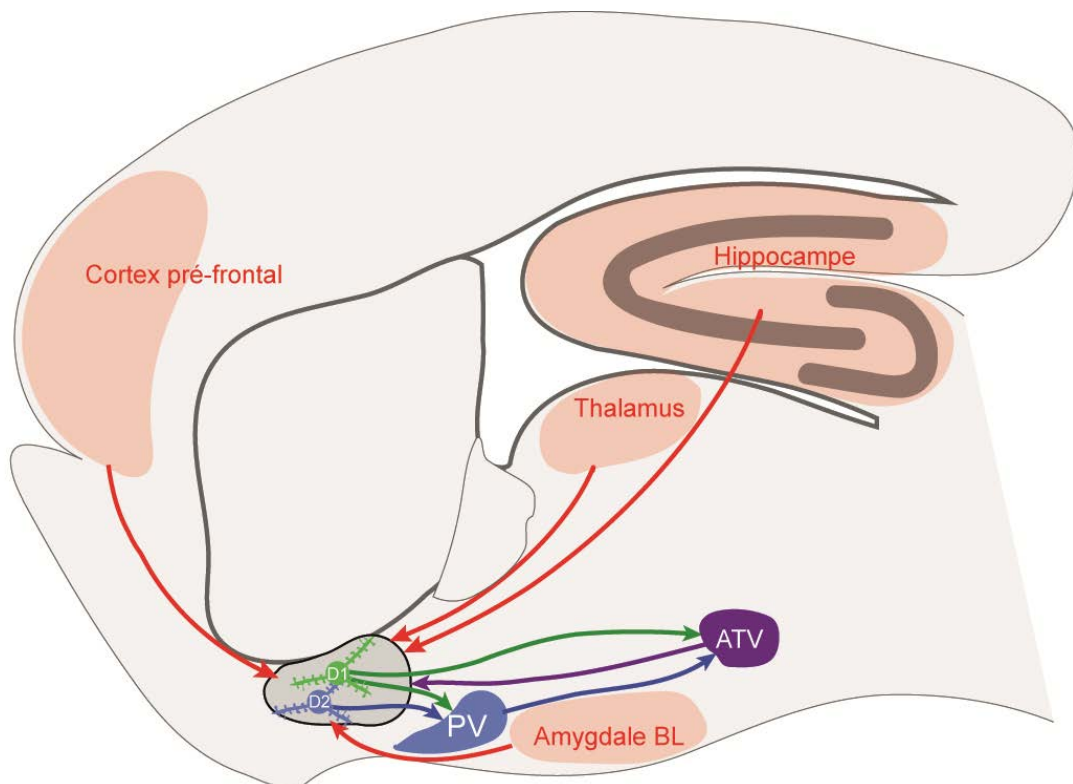


Figure 7. Représentation schématique des afférences et projections des SPN-D1 et D2 du NAc : Le NAc reçoit des afférences glutamatergiques du cortex-préfrontal, du thalamus, de l'amygdale baso-latérale (BLA) et de l'hippocampe ventral. Les deux voies de sortie du NAc ne sont pas aussi bien ségréguées que dans la partie dorsale, en effet les neurones exprimant D1DR ou D2DR ont une voie de projection commune : le Pallidum Ventral (PV).

Depuis le milieu des années 1990, des indices sur la faible ségrégation des voies de projection des SPN-D1 et D2 du striatum ventral étaient déjà mis en évidence (Lu et al., 1997). En effet l'association du marquage rétrograde par fluorogold et de l'hybridation *in situ* montre que la moitié des SPN projetant vers le pallidum ventral exprime l'ARNm de la beta préprotakinine (PPTA) codant la substance-P et spécifique des neurones D1. De plus, cette même étude de Lu et al. 1998 dans l'équipe du Dr P. Kalivas, montre que 50% des SPN

projetant sur le pallidum ventral expriment des ARNm spécifiques des SPN-D2 (enképhaline et D2). Ces résultats sont étonnants puisque la vision classique était que les SPN-D2 du NAc, uniquement, projetaient vers le pallidum ventral, qui lui-même projette vers les voies de sortie des ganglions de la base, ce qui constituait la voie indirecte du striatum ventral. En revanche, ces voies sont bien séparées en ce qui concerne la projection vers l'ATV puisque seuls les SPN-D1 projettent sur cette structure (Lu et al., 1997). Par la suite, Bertran-Gonzalez et al. ont montré que, dans le Shell du NAc, le nombre de neurones co-exprimant D1DR et D2DR était de 17%, contre 5% dans le reste du striatum, ajoutant un degré de complexité supplémentaire dans la ségrégation des voies (Bertran-Gonzalez et al., 2008; pour revue, Bertran-Gonzalez et al. 2010).

Ainsi, la ségrégation des voies directes et indirectes est remise en question au sein du NAc depuis plusieurs années. Cette remise en question a été fortement amplifiée par les travaux récents du groupe du Dr Peter Kalivas qui a montré que plus de la moitié des SPN-D1 projetaient effectivement vers le pallidum ventral (Smith et al., 2013), et que ces projections étaient fonctionnelles puisqu'elles contrôlaient l'activité des neurones pallidaux (Kupchik et al., 2015) (Figure 7).

Malgré ces convergences évidentes des SPN-D1 et SPN-D2 au sein du striatum ventral, Kreitzer et ses collaborateurs ont observé que la stimulation optogénétique des SPN-D1 du NAc induisait un effet de renforcement positif similaire à celui que ferait une récompense, alors que la stimulation des SPN-D2 a un effet aversif. Cela montre que les deux populations de SPN jouent des rôles fondamentalement différents, même si leurs projections ne sont pas aussi ségréguées que ne le sont les SPN du striatum dorsal (Kravitz et al., 2012). Le rôle des SPN-D2 dans les aspects motivationnels fait néanmoins débat. En effet, des résultats récents indiquent que l'absence de D2DR perturbe la motivation des souris à une tâche opérante basée sur une récompense, alors que la surexpression de ce récepteur dans le NAc augmente la motivation des animaux dans cette tâche (Trifilieff et al., 2013).

II-2) Influence des drogues d'abus sur les ganglions de la base

II-2-a) Effet des drogues d'abus sur les deux grands types de neurones striataux

Il existe donc deux grands types de SPN et leur réponse aux drogues d'abus sont très différentes. De grandes avancées dans la compréhension des réponses neuronales des SPN-D1

et D2 ont été réalisées notamment grâce à la mise au point de souris génétiquement modifiées exprimant la eGFP (eGFP : *enhanced Green Fluorescent Protein*) dans ces deux sous populations (pour revue Valjent et al., 2009). L'augmentation rapide et importante de la dopamine induite par la cocaïne a pour effet global d'inhiber les SPN-D2 et activer les SPN-D1. Il a été montré dans que les récepteurs de la dopamine interagissent avec les récepteurs du glutamate, les interactions entre le récepteur D1 et les sous-unités GluN2B et GluN1 potentialisent l'entrée de calcium NMDAR-dépendante (Pascoli et al., 2011a ; Cahill et al., 2014a) alors que l'interaction D2-GluN2B à l'inverse la diminue (Liu et al., 2006). Cette entrée de calcium est responsable de l'activation de nombreuses voies de signalisation dont la voie des MAPK ERK1/2 dans les neurones D1 (Valjent et al., 2000; Bertran-Gonzalez et al., 2008). Celle-ci induit dans les SPN-D1 des altérations géniques (Cahill et al., 2014b pour revue), électrophysiologiques (Pascoli et al., 2011b) et structurales (Ren et al., 2010) essentielles aux adaptations comportementales à la cocaïne.

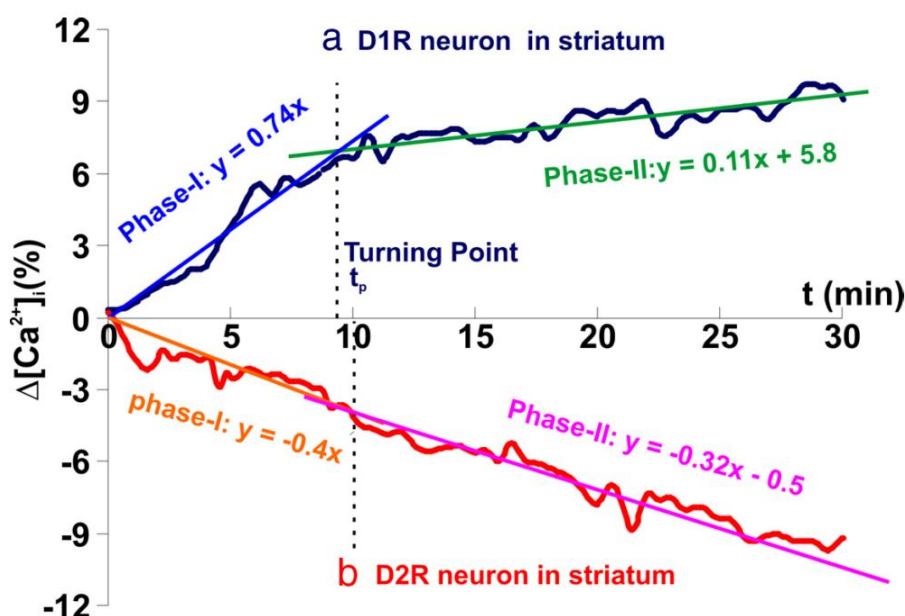


Figure 8. L'injection aigüe de cocaïne induit une augmentation de l'entrée de calcium dans les SPN exprimant D1DR et à l'inverse une diminution dans les SPN-D2. Les courbes représentées ici sont les tracés moyens des variation de l'intensité lumineuse du senseur calcique (Rhod₂) dans les SPN du striatum dorsal de souris D1-eGFP ou D2-eGFP. (d'après Luo et al., 2011).

L'imagerie calcique dans les deux sous-types de SPN a permis de démontrer *in vivo* l'effet divergent de la cocaïne sur l'activation neuronale à l'aide de fibres optiques implantées dans le striatum de souris DRD1-eGFP ou DRD2-eGFP. Ce dispositif a permis à Luo et ses collaborateurs de montrer que l'injection aigüe de cocaïne induit bien une augmentation du

calcium intracellulaire dans les SPN-D1 et une diminution dans les D2 (**Figure 8**) (Luo et al., 2011). En ce sens, l'imagerie de l'activité de ERK ou de la PKA par transfert d'énergie de Förster (FRET) dans les neurones D1 et D2 *in vivo* montre que l'activité de ces deux kinases est augmentée par la cocaïne en aiguë dans les SPN-D1 et inhibée dans les D2 (Goto et al., 2015).

II-2-b) Différentes régions du striatum pour différents rôles dans les réponses aux drogues d'abus

Comme je l'ai mentionné précédemment, les différentes régions striatales présentent des fonctions relativement spécifiques. Ces fonctions peuvent être le reflet des différentes afférences glutamatergiques existant au niveau du striatum ventral et le dorsal. Ainsi, le striatum dorso-latéral reçoit majoritairement des afférences issues des cortex moteurs, ce qui explique pourquoi cette sous-région striatale joue un rôle important dans la régulation des plans moteur ainsi que dans l'exécution de tâches habituelles (pour revues, Balleine et al., 2009; Yin et Knowlton, 2006).

Le NAc se distingue par une plus grande complexité dans les afférences glutamatergiques qu'il reçoit, en effet, elles proviennent de l'HPCv, de la BLA (structures impliquées dans le stress et les émotions) et du PFC (impliqué dans les prises de décision, la planification et la sillance) (Britt et al., 2012; pour revue Jasinska et al., 2014; Stuber et al., 2011). Cette connectivité différente du striatum dorso-latéral ainsi que la perte partielle de la dichotomie des voies directes et indirectes corrélient parfaitement avec le rôle régulateur du NAc dans les processus complexes que sont la motivation ou l'intégration de la récompense.

Néanmoins, le striatum dorsal, dans sa partie médiane régule lui aussi des phénomènes de réponses aux drogues durant les premières phases d'exposition. Les SPN de cette sous-région répondent en effet très bien aux injections aiguës de cocaïne, comme le démontrent les élévations de phosphorylation de ERK notamment (Salery et al., 2016; Valjent et al., 2000). Cela peut s'expliquer par le fait que d'importantes afférences du cortex orbito-frontal et de l'ATV projettent vers cette zone, ce qui présente de grandes similitudes avec les afférences que reçoit le NAc.

II-2-c) De la consommation récréationnelle à l'addiction : un transfert de plasticité neuronale du striatum ventral au dorsal

L'addiction, comme nous l'avons vu précédemment, peut être considérée comme une pathologie chronique des systèmes de la récompense. Cette pathologie n'a pas lieu à la première consommation d'une drogue d'abus mais représente en quelque sorte le stade final d'une suite de perturbations progressives des circuits neuronaux de la récompense (Anthony et al., 1994).

D'un point de vue anatomique, plusieurs travaux chez le rongeur mettent en évidence un transfert progressif de la plasticité neuronale du striatum ventral dans les premières phases de l'auto-administration de drogues, vers le striatum dorsal une fois que l'entraînement a été acquis (pour revue Everitt et Robbins, 2013). Ainsi, durant la première phase, l'inhibition dopaminergique du NAc par blocage des récepteurs (Robledo et al., 1992) ou lésion de l'ATV (Roberts et Koob, 1982), abolit l'apprentissage de la tâche d'auto-administration chez le rongeur. Une fois l'animal surentraîné, ce même blocage des récepteurs dopaminergiques du NAc n'induit pas d'altération. En revanche, l'injection locale de ces antagonistes dans le striatum dorso-latéral, une structure associée aux comportements habituels (Vanderschuren et al., 2005), bloque le comportement d'auto-administration. Au cours de cette dernière phase une hypoactivité corticale est également observée, qui peut expliquer la perte de contrôle dans l'addiction (pour revue Everitt et Robbins, 2013).

Ce transfert de plasticité au sein de ces structures anatomiques illustre le passage de la consommation volontaire récompensante à la prise habituelle incontrôlée (Figure 9).

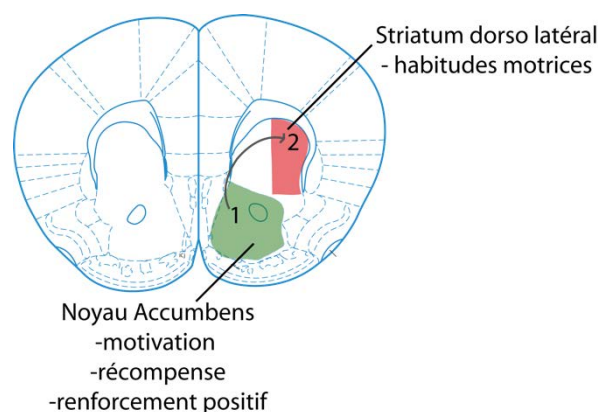


Figure 9. Représentation schématique du transfert anatomique de plasticité neuronale du passage des premières expériences de consommation de drogues à l'addiction.

Chapitre III : Les épines dendritiques et la plasticité structurale

Nous avons abordé lors de ces deux premiers chapitres l'effet global des drogues d'abus sur le réseau mésocorticolimbique. La cocaïne induit une plasticité synaptique importante des neurones striataux, incluant des remaniements structuraux des épines dendritiques qui pourraient jouer un rôle clef dans les adaptations comportementales à la drogue. Mais avant d'étudier cette plasticité au sein des SPN, nous allons nous intéresser à ces modifications morphologiques dans les autres types neuronaux : corticaux et hippocampiques dans lesquels elle a été mise en évidence initialement.

III-1) La synapse

III-1-a) La synapse glutamatergique

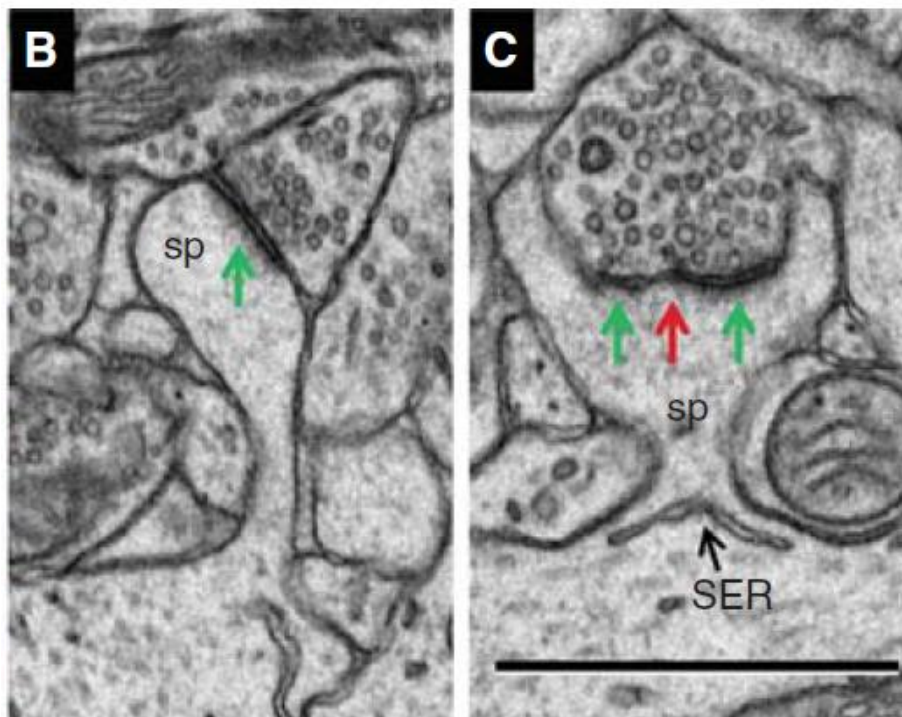


Figure 10. La synapse glutamatergique, observée en microscopie électronique. Images représentatives de synapses glutamatergiques de neurones CA3 en microscopie électronique à transmission. L'épine, notée « sp », présente ici une densité post-synaptique. Cette zone fait face au bouton synaptique dans lequel les vésicules sont clairement visibles. Notons la présence de réticulum endoplasmique permettant la synthèse de protéines proche de l'épine (C, noté SER) (d'après Harris et Weinberg, 2012).

Les neurones sont organisés en réseaux complexes interconnectés au niveau de structures que l'on appelle synapses (pour revue, Harris et Weinberg 2012). Les synapses peuvent être de deux grands types : excitatrices libérant et intégrant le glutamate, qui sera détaillée ici et la synapse inhibitrice libérant et intégrant le GABA. Cette balance entre excitation et inhibition est un des points fondamentaux du fonctionnement des réseaux neuronaux. Une perturbation, même subtile de cet équilibre est souvent la base de nombreuses pathologies psychiatriques telles que l'autisme, l'addiction (Gipson et al., 2013; pour revue, Kalivas, 2009; Mameli et al., 2009; pour revue, Quintero, 2013) ou bien encore la dépression.

Les synapses excitatrices se forment majoritairement au niveau de l'épine dendritique (l'élément post-synaptique). Cette synapse est aussi appelée synapse asymétrique, une appellation due à la présence d'une zone dense observée en microscopie électronique sous la membrane post-synaptique apposée et connectée au bouton présynaptique qui libère le glutamate (pour revue, Harris et Weinberg, 2012) (**Figure 10**). Celui-ci contient des vésicules synaptiques se remplissant de glutamate grâce aux transporteurs vésiculaires du glutamate (VGLUT), qui peuvent être de trois types : le type 1 (VGLUT1) pour les neurones corticaux, hippocampiques et amygdaliens, 2 (VGLUT2) pour les neurones thalamiques et (VGLUT3) pour les interneurones cholinergiques striataux (Herzog et al., 2001; pour revue, El Mestikawy et al., 2011). La majorité des épines forment une synapse avec un seul bouton, mais certains boutons peuvent former des synapses avec plusieurs épines. Enfin une minorité d'épines dans le cerveau adulte ne forme pas de synapses (Harris and Weinberg, 2012; Knott et al., 2006, Shepherd et al., 1998). Le signal glutamatergique est intégré par les différents récepteurs du glutamate situés sur l'épine. Le glutamate est rapidement recapturé par les transporteurs neuronaux (EEAT : *excitatory amino acid transporter*) et astrocytaires du glutamate (GLT-1 et GLAST). Même s'il existe, le débordement du glutamate de la synapse est un phénomène relativement rare mais pouvant participer au guidage des nouvelles épines lors de leur pousse (Richards et al., 2005).

III-1-b) Lien entre morphologie et activité de l'épine

Les épines existent dans des formes et tailles très variées (**Figure 11**) et leur fonction fait l'objet de nombreuses spéculations depuis la fin du 19^{ème} siècle et les observations de Jamon y Cajal.

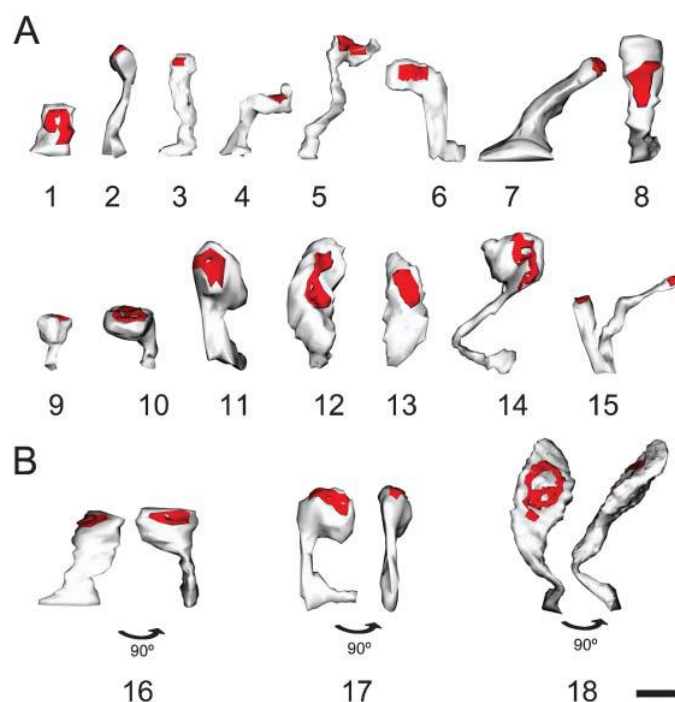


Figure 11. Les épines, des structures à la morphologie extrêmement variable. Reconstruction 3D d'épines dendritiques de neurones observés en microscopie électronique à transmission, la densité post-synaptique est colorée en rouge (D'après Arellano et al. 2007).

La variété de formes des épines a mené Peters et Kaiserman-Abramof à créer une classification simplifiée des épines en : *thin* (épines longues et fines, qualifiées d'immatures), *mushroom* (épines plutôt courtes avec une tête de grande taille, épines matures) et *stubby* (épines très courtes avec une tête très peu développée) (Peters et Kaiserman-Abramof, 1970). Cette classification, même si elle est en partie correcte et est encore aujourd'hui une référence doit être considérée avec précaution. En effet, elle ne peut s'appliquer à tous les types neuronaux, des travaux de Wilson et al. de microscopie électronique montraient par exemple que les SPN ne présentaient pas ces trois formes d'épine (Wilson et al., 1983). De même, les neurones du bulbe olfactif ont des cous très longs et une tête de grande taille, ne correspondant pas non plus à ces stéréotypes (Daroles et al., 2015). La taille et la longueur des épines forment souvent un continuum, il n'existe pas forcément dans leur distribution de frontière claire permettant de séparer les épines en trois catégories (Wilson et al., 1983). Cette représentation reste néanmoins très pratique puisqu'elle permet de résumer simplement la grande variété des morphologies spinales. Les récentes avancées en imagerie neuronale ont permis de mettre en évidence que la morphologie des épines n'est pas un facteur aléatoire, mais serait en réalité le reflet de leur activité électrique.

En effet, 90 années après les hypothèses de Cajal, Harris et ses collaborateurs ont mis en évidence dans les neurones pyramidaux CA3 chez le rat, une intéressante corrélation entre la taille de la densité post-synaptique (PSD) et le volume de l'épine (Harris et Stevens, 1989). Ce résultat était un premier pas dans le lien entre morphologie et activité puisque la PSD est probablement la zone principale de l'activité de l'épine dû à sa grande concentration de récepteurs et de molécules de voies de signalisation. En parallèle de ce résultat, il a été montré que le volume de la tête de l'épine est proportionnel au nombre de vésicules arrimées à la membrane du bouton présynaptique (Schikorski et Stevens, 1999). Enfin, la taille de la PSD est elle-même corrélée avec la quantité en récepteurs AMPA de l'épine donc à la sensibilité au glutamate (Matsuzaki et al., 2001). En revanche, même si la PSD corrèle aussi avec le diamètre du cou de l'épine, cette relation n'existe, *a priori*, pas entre la PSD et la longueur du cou (Arellano et al., 2007). Ce paramètre semblerait être impliqué plutôt dans l'isolation de la tête de l'épine avec le reste de la dendrite, appelée aussi la compartimentation (pour revue, Adrian et al., 2014).

III-1-c) Le squelette de l'épine : l'actine et la densité post synaptique

L'épine est donc le premier élément intégrant la libération de glutamate du neurone présynaptique. L'efficacité de cette intégration est étroitement liée à la composition en protéines, récepteurs et à la forme de l'épine.

La morphologie particulière de l'épine est maintenue à l'aide d'un réseau dense d'actine filamenteuse (F-actine) (pour revue, Chazeau and Giannone, 2016), formant de nombreux embranchements (**Figure 12**), (Frotscher et al., 2014; Honkura et al., 2008; Hotulainen et Hoogenraad, 2010; MacGillavry et Hoogenraad, 2015; Shirao et González-Billault, 2013). Notons que quelques études ont pu montrer la présence dynamique de microtubules entrant et sortant de l'épine dendritique (pour revue, Hotulainen et Hoogenraad, 2010; Jaworski et al., 2009). Au niveau des points de jonction des filaments se trouvent le complexe Arp2/3 (*Actin related protein 2/3*) permettant de lier deux filaments avec un angle de 70°. Arp2/3 est ancré au niveau de la PSD grâce à son interaction avec les protéines de la famille Shank. Le niveau basal d'activité de Arp2/3 est trop faible pour jouer seul son rôle. Ainsi il nécessite d'être activé par les protéines du syndrome d'Aldrich (WASP) telles que les WAVE (*WASP-family verprolin-homologous protein*), cette sous-famille est enrichie dans le cerveau (pour revues Campellone et Welch, 2010; Schubert et Dotti, 2007). La CaMKII

(*Calcium-Calmodulin dependent Kinase II*) sous sa forme non phosphorylée joue elle aussi un rôle structural en se liant aux filaments du réseau d'actine et maintenant ainsi l'intégrité de la forme de l'épine en limitant les variations du cytosquelette. Lors de l'entrée de calcium dans l'épine la CaMKII se dissocie temporairement du réseau d'actine afin de permettre les remaniements structuraux (pour revue, Bosch et Hayashi, 2012; Kim et al., 2015).

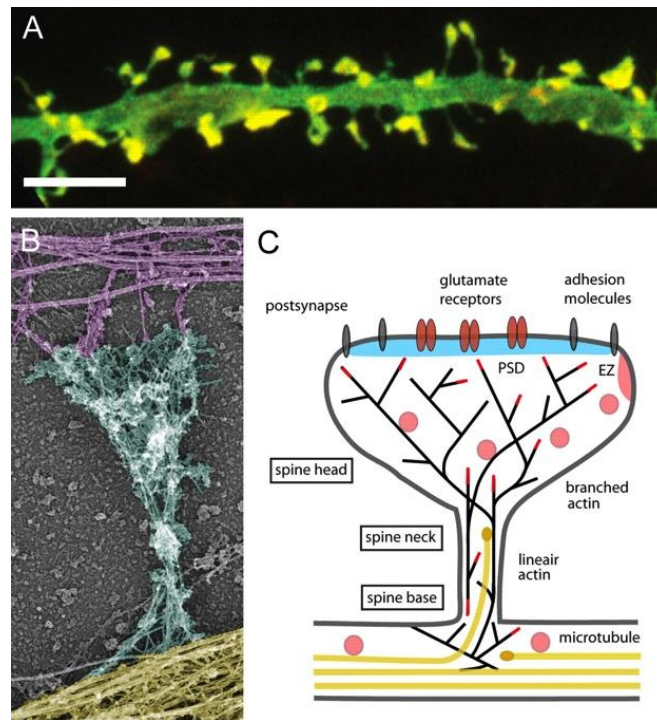


Figure 12. Organisation du cytosquelette d'actine dans l'épine dendritique.. A. La tête d'épine est remplie en actine filamenteuse, visualisée en rouge. B. Exemple représentatif du réseau d'actine au sein de l'épine observée en microscopie électronique. C. Schéma de l'épine avec les embranchements d'actine ainsi que les microtubules dynamiques pouvant passer par le cou (d'après Hotuleinen et Hoogenraad, 2010).

L'actine filamenteuse (F-actine) est en équilibre permanent entre polymérisation et dépolymérisation (sous forme d'actine globulaire : G-actine), ce qui permet une dynamique des réseaux de filament. Cette dynamique a été montrée comme essentielle aux changements structuraux et de l'épine (Okamoto et al., 2004), ainsi qu'à la formation des nouvelles protrusions. Un des partenaires importants dans ce rôle est la formine qui permet une polymérisation du filament à partir de l'actine globulaire (Lei et al., 2016). Les protéines à activité GTPase ont été montrées comme essentielles à cet équilibre dynamique : Rho notamment (en recrutant ROCK) va déstabiliser l'actine, cette déstabilisation est aussi réalisée par la protéine Rap. A l'inverse d'autres protéines de cette famille telles que Rac activée par la kalirine (en activant la Lim Kinase ou LIMK, PAK ou bien encore WAVE-1), Cdc42 (*Cell division control protein 42*) ou Ras vont plutôt permettre une stabilisation du cytosquelette

(pour revue, Penzes et Rafalovich, 2012). La LIMK remplit ses fonctions de stabilisateur en inhibant l'activité de la cofiline, cette dernière augmentant la dépolymérisation du réseau. L'actine va donc jouer un rôle de squelette dynamique de l'épine mais elle va aussi participer au mouvement des protéines synaptiques, ce réseau est notamment essentiel à l'internalisation des récepteurs AMPA, modifiant ainsi la force de la synapse (pour revue, Henley et al., 2011).

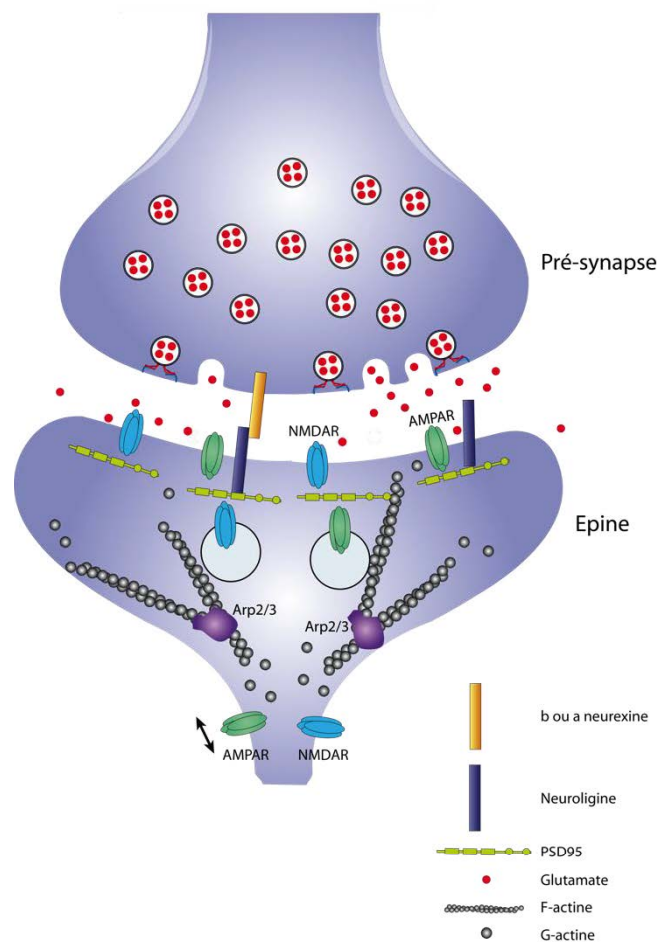


Figure 13. Schéma des rôles fonctionnels et structuraux majeurs de l'actine et de PSD-95 dans la synapse. La forme particulière et la dynamique de l'épine est maintenue par un réseau d'actine branchées grâce à Arp2/3. PSD95 grâce à ses domaines PDZ permet la stabilisation des récepteurs AMPA et NMDA dans la densité post synaptique, elle permet de plus l'ancrage de la neurologine essentiel à la connexion synaptique.

L'actine joue donc d'importants rôles dans l'activité et la forme de l'épine. La présence d'une PSD est l'autre élément essentiel à ces fonctions. Celle-ci représente un critère important dans l'évaluation de la maturité de l'épine. En effet, elle contient une très forte concentration de récepteurs du glutamate, tels que les récepteurs AMPA et NMDA, ancrés à la membrane grâce aux domaines d'interaction PDZ (pour *PSD95, Dlg1, Zo-1*) de la protéine

d'échafaudage majeure de la densité post-synaptique : PSD-95. Ces récepteurs sont mobiles à la membrane et PSD-95 via son interaction directe entre le domaine PDZ et la sous-unité GluN2A du NMDAR et indirecte avec le AMPAR (PDZ interagit avec la protéine stargazine elle-même liée au récepteur AMPA) va limiter la mobilité des récepteurs et donc accroître leur concentration au niveau de la PSD (pour revues, Kim et Sheng, 2004; Zhu et al., 2016). Egalement grâce à ses domaines PDZ, PSD-95 rapproche les récepteurs du glutamate avec de nombreuses protéines de signalisation : tels que la kalirine 7, impliquée dans la plasticité structurale des épines (Kiraly et al., 2010; Penzes et Jones, 2008). Elle crée donc un lien essentiel dans l'intégration complète des signaux glutamatergiques, de l'activation des récepteurs jusqu'à la signalisation. PSD95 interagit de plus avec les molécules d'adhésion telles que la neuroligine essentielle à la formation des synapses (Krueger et al., 2012)

Parmi les autres protéines d'échafaudages essentielles avec ce même domaine PDZ, il existe la famille des Shank qui joue un rôle majeur dans la PSD en promouvant la maturation spinale via son interaction avec la protéine Homer qui stabilise les mGluR à la synapse ainsi que l'actine filamenteuse, la cortactine (augmentant la polymérisation de l'actine), ou bien encore avec ABP1 (*F-actin-binding protein*) (pour revue Kim et Sheng, 2004). Les mutations des protéines synaptiques associées à la PSD ou l'actine sont souvent extrêmement délétères comme l'illustrent les mutations des trois gènes Shank1, Shank2 et Shank3 fortement liés chez l'humain à des troubles autistiques et des retards mentaux. En ce sens, ces mutations chez le modèle souris induisent des problèmes d'interaction sociale et de mémorisation, de plus, au niveau synaptique des défauts de maturité des synapses sont effectivement observés chez ces souris (pour revue Sala et al., 2015).

III-1-d) Les récepteurs glutamatergiques au cœur de l'activité de la synapse excitatrice

L'épine est donc une microstructure dont le squelette va aider au maintien des protéines essentielles à l'activité synaptique. Ces protéines sont bien évidemment les récepteurs du glutamate pouvant être séparés en 2 grands sous-types : les récepteurs métabotropiques et ionotropiques, dont les structures et mécanismes d'action diffèrent radicalement. Ces premiers sont couplés à une protéine G et comprennent 3 groupes, le groupe I (qui comprend les récepteurs mGlu1 et mGlu5), le groupe II (qui comprend les récepteurs mGlu2 et mGlu3) et le groupe III (qui comprend les récepteurs mGlu4, mGlu6, mGlu7 et mGlu8) (pour revue, Pin et al., 1999).

Les récepteurs ionotropiques, quant à eux sont de deux types, les récepteurs du AMPA/Kaïnate et ceux du NMDA. Ces deux récepteurs sont composés de quatre sous-unités formant un canal ionique. Les NMDAR possèdent obligatoirement la sous-unité GluN1, s'associant aux sous-unités GluN2 (de A à D), ou GluN3 (A ou B) (pour revue, Paoletti et al., 2013). Les neurones striataux de projection expriment une quantité importante de sous-unité GluN2B, peu de GluN2A et pas de C ou D (Dunah et Standaert, 2003). Les AMPAR quant à eux sont constitués des sous-unités GluA1,2,3 ou 4 exprimés de façon ubiquitaire. Les différentes combinaisons de sous-unités modifient les caractéristiques des récepteurs. Par exemple, l'absence de la sous-unité GluA2 du AMPAR le rend perméable au calcium. (Henley et Wilkinson, 2016).

Il est intéressant de noter que certaines épines contiennent des récepteurs NMDA mais pas de récepteurs AMPA. Ces synapses sont alors dites silencieuses puisqu'elles n'engendreront pas d'entrée de sodium nécessaire à la dépolarisation du neurone (Kerchner et Nicoll, 2008). La fonction de ces synapses silencieuses est encore débattue. Une des théories concernant ces synapses est qu'elles pourraient servir de réserve de plasticité, c'est la théorie de la « métaplasticité » (Abraham, 2008). Ce terme désigne la capacité des synapses à changer leurs propriétés dans le but d'induire une plasticité future.

III-1-e) La compartimentation au sein de l'épine

La notion de compartimentation de l'épine est née suite aux travaux précurseurs de Svoboda et al. en 1996 dans lesquels ils suivirent le déplacement d'une GFP (*protéine fluorescente verte*) via la méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment au sein des épines de tranches organotypiques d'hippocampe (Svoboda et al. 1996). D'autres études ont complété ces résultats via la photoactivation d'une GFP photoactivable dans de multiples épines unitaires et pu observer que les échanges étaient différents d'une épine à l'autre. Ainsi, il en existe même qui semblent être totalement découplées du reste de la dendrite avec le fluorochrome immobile dans l'épine (Bloodgood et Sabatini, 2005). Ainsi est né le concept de compartimentation de l'épine aujourd'hui reconnu comme une des fonctions majeures de l'épine. Cependant, les épines ne sont pas totalement isolées les unes des autres ou de la dendrite. De manière intéressante, il a été montré *in vivo* que PSD-95 peut se déplacer d'épines à épines d'une même dendrite (Cane et al., 2014; Gray et al., 2006).

En parallèle de ces résultats, l'arrivée de la microscopie à 2 photons appliquée aux neurosciences permet aussi d'étudier la compartimentation du calcium entre autre. Yuste et Denk ont suivi l'entrée de calcium dans les épines de neurones remplis avec un senseur calcique en tranche et ont mis en évidence des augmentations de ce second messenger dans des épines unitaires (Yuste et Denk 1995). La compartimentation du calcium est tout de même à considérer avec précaution puisque celui-ci se lie aux calmodulines notamment ce qui peut modifier sa diffusion, ainsi il est difficile d'affirmer que c'est bien le calcium à l'état ionique qui est compartimenté (pour revue, Adrian et al., 2014).

Ce calcium spinal n'en reste pas moins un résultat exceptionnel puisque sa compartimentation permet de maintenir une concentration élevée et cela peut avoir de grandes implications sur l'activation de nombreuses voies de signalisation sensibles au calcium. Assez logiquement, des études ultérieures se sont intéressées à la compartimentation de certaines protéines jouant des rôles importants dans la plasticité structurale, telles que la CaMKII, Rho et Ras. Ces études ont été réalisées majoritairement à l'aide de senseurs de l'activité (par sondes FRET) de ces protéines et des versions de ces mêmes protéines couplées à un fluorophore photoactivable afin de suivre leur déplacement. Ces différentes techniques associées à la libération de glutamate par décageage en 2 photons ont permis de mettre en évidence que les protéines de signalisations présentaient des patrons de diffusions et d'activité propres. Alors que la CamKII se désactive très rapidement et reste confinée dans l'épine, Ras et Rho à l'inverse ont une activité longue et diffusent dans la dendrite. Enfin Cdc42 est un cas intermédiaire avec une activité longue mais une diffusion limitée. Ces résultats montrent que la compartimentation a des implications importantes sur la régulation des voies de signalisations essentielles à la plasticité des épines dendritiques (pour revue Adrian et al., 2014).

Les épines dendritiques peuvent changer de forme selon l'activité synaptique et cela amène à la question de l'implication de ces changements morphologiques sur la compartimentation. La microscopie photonique classique ne permettait pas de traiter cette question de façon optimale du fait de sa limitation en résolution, notamment pour l'étude du cou de l'épine. Le développement de la microscopie à super résolution, principalement le STED (déplétion par émission stimulée) à 2 photons, a permis d'étudier correctement ces changements de morphologie et leur fonctions. Initialement, l'implication de la forme de l'épine dans la compartimentation électrique de l'épine était étudiée par modélisation basée sur les images 3D reconstruites de microscopie électronique. Le groupe du Dr Valentin

Nägerl ainsi que celui du Dr Bernardo Sabatini ont pu montrer la même année grâce à du STED en tranches que le découplage électrique crée par le cou de l'épine existe comme le modèle l'affirmait, mais il est relativement faible. Ces travaux mettent de plus en évidence que le cou de l'épine augmente de taille après stimulation comme le fait la tête. Cette modification a un impact sur la diffusion des protéines, en effet plus le cou sera large et plus la diffusion des protéines sera rapide (Takasaki et Sabatini, 2014; Tønnesen et al., 2014).

Ainsi, chaque épine peut être considérée comme un élément distinct de l'intégration neuronale, ce qui ajoute une grande complexité au traitement de l'information. Dans un contexte physiologique, *in vivo*, il a d'ailleurs été montré que certaines épines des neurones du cortex visuel s'activent préférentiellement pour une direction de mouvement des bandes sur l'écran présentées au rongeur, avec un influx calcique restreint à ces épines unitaires (Chen et al., 2013a). Tout comme l'on parle d'engramme neuronal (pour revue, Tonegawa et al., 2015), une étude récente démontre la notion d'« engramme spinal » de la mémoire. En effet les travaux réalisés dans le groupe du Dr Kasai montrent que l'inhibition spécifique des épines activées lors d'une tâche comportementale peut effacer spécifiquement l'apprentissage de celle-ci (Hayashi-Takagi et al., 2015). Ces résultats semblent valider les hypothèses selon lesquelles les épines jouent le rôle de compartiment cellulaire microscopique de la mémoire.

Les épines sont donc des structures d'une grande complexité pouvant intégrer indépendamment ou en synergie les stimulations présynaptiques. Les stimulations focalisées de glutamate montrent, en plus de la compartimentation, que les épines sont des compartiments très dynamiques, pouvant changer de forme et même apparaître à l'échelle de la minute.

III-2) La plasticité structurale

III-2-a) La plasticité morphologique

Nombreuses sont les altérations neuronales en réponse à l'apprentissage ou à certaines pathologies, mais il en existe une particulière en ce sens qu'elle est en théorie une des altérations les plus durables dans le temps. Celle-ci est la plasticité structurale ou le changement de morphologie du neurone en réponse à des modifications de l'activité (Bosch et Hayashi, 2012; Bosch et al., 2014; Guegan et al., 2013; Honkura, 2004). Elle peut prendre plusieurs formes : un changement de la longueur ou du volume des épines, de la densité en épines ou bien encore de la longueur et de la complexité de l'arbre dendritique, avec une

combinaison possible de ces modifications (**Figure 14**). Ces altérations structurales engendrent des remaniements synaptiques pouvant modifier les futures réponses du neurone à son environnement.

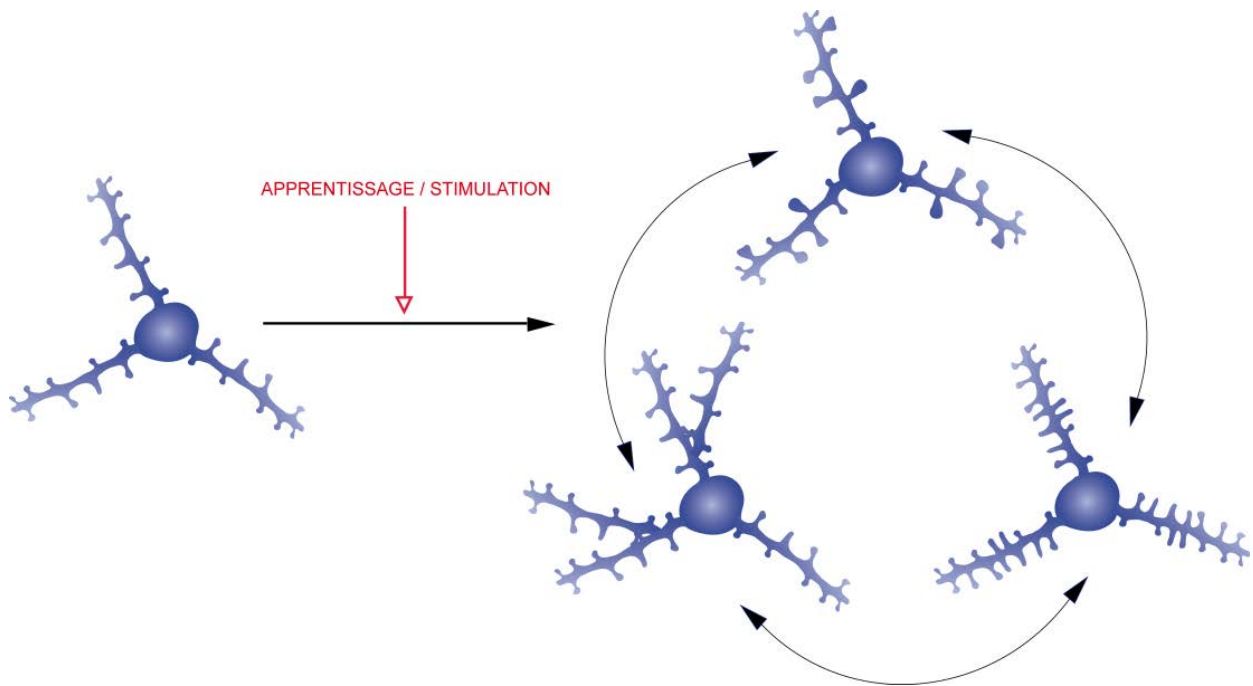


Figure 14. La plasticité structurale : un apprentissage, une stimulation synaptique ou bien encore des lésions cérébrales peuvent induire des modifications de morphologie neuronales diverses telles que des changements de taille ou de nombres des synapses ainsi que des altérations de l'arbre dendritique. Des combinaisons de ces formes de plasticité sont possibles.

III-2-b) Modification de la morphologie des épines

Une des grandes limitations dans l'étude de la plasticité structurale était de pouvoir identifier les épines activées ou nouvellement formées durant la stimulation. Néanmoins dès le début des années 1980, les études de microscopie électronique montraient déjà un rôle possible de la LTP dans les modifications morphologiques des synapses ([Fifková et Anderson, 1981](#)). Par la suite, l'arrivée de la microscopie à 2 photons dans le domaine des neurosciences permettant le suivi en temps réel des épines, ainsi que la libération de glutamate focalisée (*via* le « décaage » du glutamate-MNI par photolyse) devant une épine ont permis au groupe du Dr Kasai de montrer pour la première fois une augmentation de la taille de la tête de l'épine lorsque le glutamate est décaé devant celle-ci ([Matsuzaki et al. 2004](#)). Les

changements de la taille de la tête d'épines sont finement régulés par l'activité synaptique avec une LTP souvent en faveur d'une augmentation de la taille de la tête et à l'inverse une LTD en faveur d'une diminution (Zhou et al., 2004).

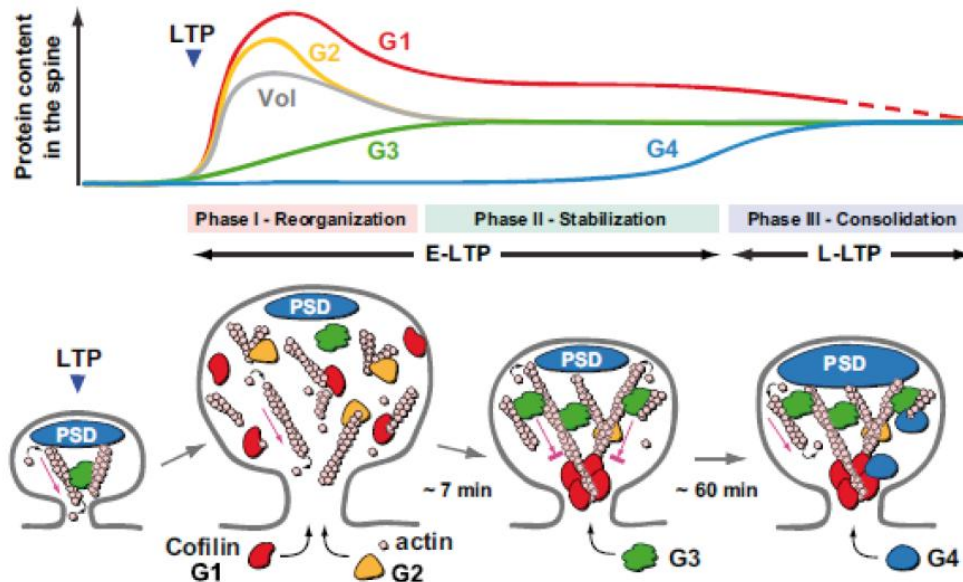


Figure 15. Différentes signatures moléculaires de l'élargissement de la tête d'une épine dendritique. La stimulation focalisée d'une épine induisant son LTP induit une phase rapide de réorganisation de l'actine via l'entrée de cofiline suivie d'une stabilisation de cette nouvelle structure et enfin une consolidation via la synthèse de protéines de la densité post-synaptique (D'après Bosch et al 2015).

L'élargissement de la tête des épines existantes, qualifiée souvent de *spine-LTP* (sLTP) se déroule en plusieurs étapes avec des mécanismes moléculaires distincts. Le groupe du Dr Hayashi montre trois phases majeures dans l'augmentation de la taille de la tête d'épine en réponse à une stimulation, 1) une phase rapide de réorganisation (environ 5 minutes après la stimulation) durant laquelle l'actine se réorganise massivement suite à l'entrée de cofiline et à la dissociation de la CaMKII des filaments, le réseau devient alors labile et capable de s'étendre. 2) Puis vient la phase de stabilisation, la CaMKII se réassocie aux filaments d'actine, permettant au nouveau réseau de se stabiliser et enfin 3) une phase de consolidation, durant laquelle la PSD augmente de taille, suite à la traduction des protéines d'échafaudage la constituant, telles que la protéine Homer (Bosch et al., 2015) (Figure 15). Les changements de structure des épines semblent donc être des phénomènes séquentiels présentant de multiples phases avec chacune des signatures moléculaires propres.

III-2-c) La formation de nouvelles épines et mécanismes moléculaires impliqués

Les stimulations glutamatergiques ont la capacité de modifier la morphologie des épines existantes et aussi d'induire la formation des épines dendritiques (Desmond et Levy, 1986a, 1986b ; Chang et Greenough, 1984). Tout comme la modification de la tête de l'épine, la LTP semble dans de nombreuses études augmenter la densité en épines (Engert et Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Medvedev et al., 2012) menant à un schéma très retrouvé dans la littérature d'une corrélation entre l'activité synaptique glutamatergique et la spinogénèse. Une étude très élégante du groupe du Dr. Sabatini montra que lorsque le glutamate est décafé à proximité de l'arbre dendritique de neurones corticaux en tranches en absence de magnésium, il induit la formation d'une épine en moins d'une minute. Cette plasticité est dépendante de la voie des MAPK/ERK. De plus, ces nouvelles épines sont rapidement fonctionnelles puisqu'elles présentent bien une entrée de calcium lorsqu'elles sont stimulées (Kwon et Sabatini, 2011). Ces résultats sont en accord avec les précédents travaux du Dr. Zito dans lesquels avaient été mis en évidence que la majorité des nouvelles épines formées dans des neurones hippocampiques présentaient des courants AMPA similaires à ceux des épines préexistantes. Néanmoins, une faible proportion de ces nouvelles synapses présentent peu de ces courants, indiquant que ces nouvelles synapses peuvent être silencieuses (Zito et al., 2010).

Ces résultats vont à l'encontre de la théorie de la formation de nouvelles épines via le modèle filopode. En effet de nombreuses études ont mis en évidence que les épines en formation, avant de devenir mature avec tout le matériel nécessaire à leur activité, passent par un stade de filopode extrêmement dynamique recherchant un partenaire présynaptique afin de devenir une épine mature. Cela fut initialement observé en cultures primaires de neurones (Ziv et Smith, 1996). Le filopode est une protrusion dendritique sans tête remplie principalement de filaments d'actine et ne présentant pas, *a priori*, d'activité synaptique. Lorsque celui-ci rencontre un élément présynaptique, le contact des molécules d'adhésion enclenche des voies de signalisation afin de former la tête et la PSD (Dailey et Smith, 1996; Fiala et al., 1998). Ce modèle a été maintes fois mis en évidence en imagerie en temps réel ainsi qu'en microscopie électronique, mais il ne saurait résumer à lui seul comment une nouvelle épine naît et s'intègre dans le réseau. Ce mode de formation semble être en partie lié à l'état juvénile des neurones puisqu'il est relativement important avant l'âge d'un mois chez la souris, avec environ 12% des nouvelles épines sous forme de filopode à ce stade, contre

seulement 2% à l'âge adulte (Grutzendler et al., 2002 ;Dailey et Smith, 1996). Ces résultats posent la question de la fonction de la formation d'un filopode chez le jeune mammifère. La grande longueur que peut prendre un filopode (de 2 μm à 20 μm) et sa mobilité auraient pour rôle d'optimiser la recherche du contact synaptique dans un réseau en plein développement dont on sait que la formation et le raffinement des synapses sont nombreux et essentiels. Par la suite, à l'âge adulte, la formation d'épines devient un phénomène rare créé par des conditions spécifiques d'apprentissage ou de pathologies (pour revue, Caroni et al., 2012). Il devient probablement plus intéressant de limiter cette optimisation de la recherche du contact synaptique au profit d'une épine active plus rapidement. En revanche, dans le striatum ou le cortex, même à des stades précoces, certaines études ne montrent pas de formation d'épines via un passage par un stade de filopode (Kozorovitskiy et al., 2012; Kwon et Sabatini, 2011). L'hypothèse de l'âge ne peut donc pas totalement expliquer pourquoi certains neurones présentent ou non des filopodes.

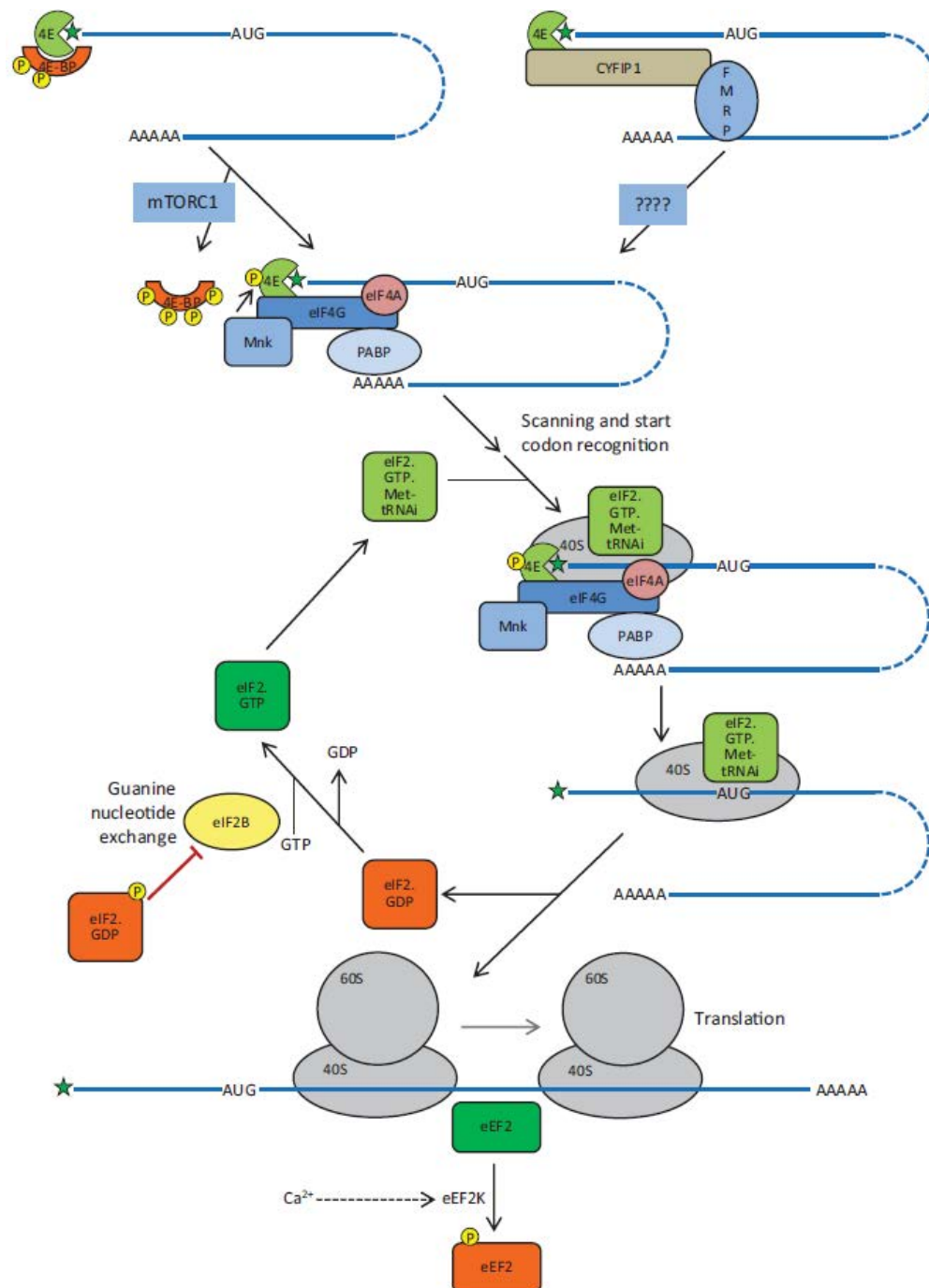
Au niveau des mécanismes moléculaires responsables de la formation d'épines, l'implication de la MAPK/ERK a été de nombreuses fois montrée dans la littérature (pour revue, Sweatt, 2004). Nous avons cité tout d'abord Kwon et Sabatini dans la formation rapide en tranche en réponse au glutamate puisque cette expérience illustre bien le rôle de ERK dans la phase de pousse. Nous avons vu que la formation d'épines est étroitement liée à l'activité électrophysiologique du neurone (Engert et Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic et al., 1999; Medvedev et al., 2012) et ERK est une kinase jouant un rôle majeur dans la régulation de la LTP notamment (Davis et al. 2000). De plus, son activation a pu être observée au sein du compartiment dendritique de neurones hippocampiques (Martin et al., 1997; Winder et al., 1999). Par conséquent, son rôle dans la plasticité structurale était fortement envisageable. Quelques années après les études montrant le lien entre LTP et nouvelles épines, Wu et al. ont pu mettre en évidence que l'exposition de cultures primaires hippocampiques à du U0126, un composé pharmacologique inhibiteur de la phosphorylation de ERK par sa kinase : *MAPK-ERK Kinase* (MEK), limitait la formation de nouveaux filopodes induits par l'incubation avec de la tétradotoxine (TTX) (Wu et al., 2001). Par la suite, dans un même modèle biologique, Godin et Segal ont pu montrer que la voie ERK ainsi que la synthèse protéique étaient toutes deux essentielles à la formation de nouvelles épines suite à la stimulation des récepteurs NMDA (Goldin et Segal, 2003). Un an plus tard, dans un modèle de culture organotypique d'hippocampe, la voie ERK a été encore une fois mise en évidence dans la formation d'épines en réponse au BDNF (Alonso et al., 2004).

Outre ces aspects assez fondamentaux dans des modèles *ex vivo* et *in vitro*, ERK est aussi essentielle à la plasticité structurale *in vivo*. Une étude parue en 2010 montre que cette kinase est essentielle à la formation d'épines dans le NAc en réponse à des injections répétées de cocaïne (Ren et al., 2010). Cette année-là est parue une autre étude montrant un rôle similaire dans le cortex de souris femelles traitées à l'estradiol, cette plasticité est aussi dépendante de la voie mTOR (pour *major target of rapamycin*), montrant encore une fois un rôle de la synthèse protéique possiblement locale dans ces processus (Tuscher et al., 2016).

En parcourant la littérature liant ERK et les épines nous pouvons voir que la synthèse protéique semble être aussi un mécanisme associé à la plasticité structurale. C'était d'ailleurs aussi le cas pour le maintien de l'élargissement de la tête des épines activées comme nous l'avons décrit dans le paragraphe précédent. Nous nous sommes demandé durant cette thèse s'il existait une voie pouvant réconcilier l'activation de ERK et la synthèse protéique dans le striatum. Notre attention s'est assez naturellement tournée vers un candidat encore assez peu étudié dans les neurones : la *MAPK interacting Kinase-1* (MNK-1). MNK-1 est une kinase directement phosphorylée par ERK (Ueda et al., 2004) dans les compartiments dendritiques de tranches hippocampiques stimulées à l'aide d'un agoniste des mGluR1 (Banko et al., 2006). Par la suite, son rôle dans la LTP induite par des stimulations à haute fréquence dans l'hippocampe de rat fut mis en évidence dans le groupe du Dr Clive R. Bramham dans deux travaux récents dans lesquels l'infusion avec un inhibiteur de l'activité de MNK-1 : le CGP57380 bloquait totalement cette forme de plasticité (Panja et al., 2009, 2014).

MNK-1 régule la synthèse de protéines en phosphorylant le facteur d'initiation eucaryote 4E (eIF4E) qui est le premier déclencheur de la traduction puisqu'il va être le premier contact entre le complexe de traduction et l'Acide Ribonucléique messager (ARNm). eIF4E forme un complexe avec eIF4A et se lie à eIF4G qui est une protéine d'échafaudage permettant le recrutement d'une protéine se liant à la queue poly-A (PABP) de l'ARNm. Ce complexe ainsi formé va s'associer à la partie 5' de l'ARN et PABP se liant à la partie terminale 3' permet une circularisation de l'ARN pour ainsi augmenter sa traduction. eIF4G se lie de plus au factor eIF3 qui lui-même recrute la sous-unité ribosomale 40S. En plus de cette voie de régulation de la traduction, eIF4E peut interagir avec les protéines 4E-BP (*eIF4e-binding proteins*), qui peuvent être phosphorylée par mTOR, limitant ainsi l'affinité des 4E-BP pour eIF4E, ce qui libère cette dernière et permet de former le complexe d'initiation de la traduction. Enfin eIF4E peut aussi se lier à CYFIP (*Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1*) qui s'associe avec la protéine de retard mental de l'X fragile (FMRP).

Figure 16. Schéma des différentes étapes de la traduction des ARNm implication eIF4E. eIF4E se lie en premier avec l'ARNm, sa phosphorylation par MNK-1 permet notamment la formation du complexe d'initiation de la traduction (d'après Gal-Ben-Ari et al., 2012).



Même si le rôle de MNK-1 dans la LTP a été plusieurs fois décrit, son implication dans la plasticité structurale était inconnue jusqu'à l'arrivée de résultats récents montrant en cultures primaires de neurones hippocampiques que son inhibition par le CGP bloquait l'augmentation de la densité en épines dendritiques suite à l'ajout de leucine dans un milieu de culture déplété en acides aminés (Shih et Hsueh, 2016).

III-2-d) Pousse d'une protrusion dendritique : la théorie de la nucléation de l'actine

Les épines dendritiques possèdent des caractéristiques proches des lamellipodes, notamment en ce qui concerne leur squelette d'actine, tout en ayant une plus grande stabilité. La formation de l'évagination membranaire fine serait liée à un phénomène appelé la nucléation de l'actine permettant de créer une force nécessaire à la formation et au maintien de la structure (**Figure 17**). Un des acteurs principaux serait le complexe protéique Arp2/3 qui se fixe sur un filament d'actine existant permettant le recrutement d'un autre filament formant ainsi un embranchement de 70° d'angle. Arp2/3 seul ne permet pas une nucléation efficace puisque son activité basale est faible, pour jouer son rôle il est assisté de facteurs de promotion de la nucléation (les NPF) qui en interagissant avec Arp2/3 vont augmenter son activité. Ce mécanisme, décrit de façon simplifiée, permet d'activer la nucléation de Arp2/3 au niveau de la membrane et ainsi engendrer une force protrusive permettant la formation de la future épine dendritique. Il existe plusieurs types de NPF, mais nous allons nous concentrer sur la famille des WAVE et notamment WAVE1 et WAVE2, toutes deux enrichies dans le cerveau de mammifères et dont le KO respectif entraîne des anomalies de formation cérébrale (pour revue, Campellone et Welch, 2010). Il a été montré que WAVE2 forme un complexe avec Abi1 et la dysbindine1 régulant la structure des épines de neurones primaires de cultures primaires hippocampiques, le KO dysbindine-1 présentant des épines longues et immatures (Ito et al., 2010). En plus de leurs rôles fonctionnels, la localisation de ces NPF est elle-aussi intéressante dans l'étude de la plasticité synaptique, puisqu'ils sont situés à l'intérieur ou à proximité de la PSD (pour revue, Chazeau et Giannone, 2016), permettant ainsi de créer un réseau branché dense au niveau de la tête d'épine et d'aider au maintien de cette morphologie particulière. De plus, WAVE-2 possède un site de phosphorylation par ERK augmentant la formation et la mobilité de lamellipodes en modèles de lignées cellulaires (Mendoza et al., 2011), ce qui en fait des protéines de grand intérêt dans la réflexion de ma thèse. Enfin dans les neurones, ERK peut être situé dans la synapse et donc à proximité de WAVE (Boggio et al., 2007).

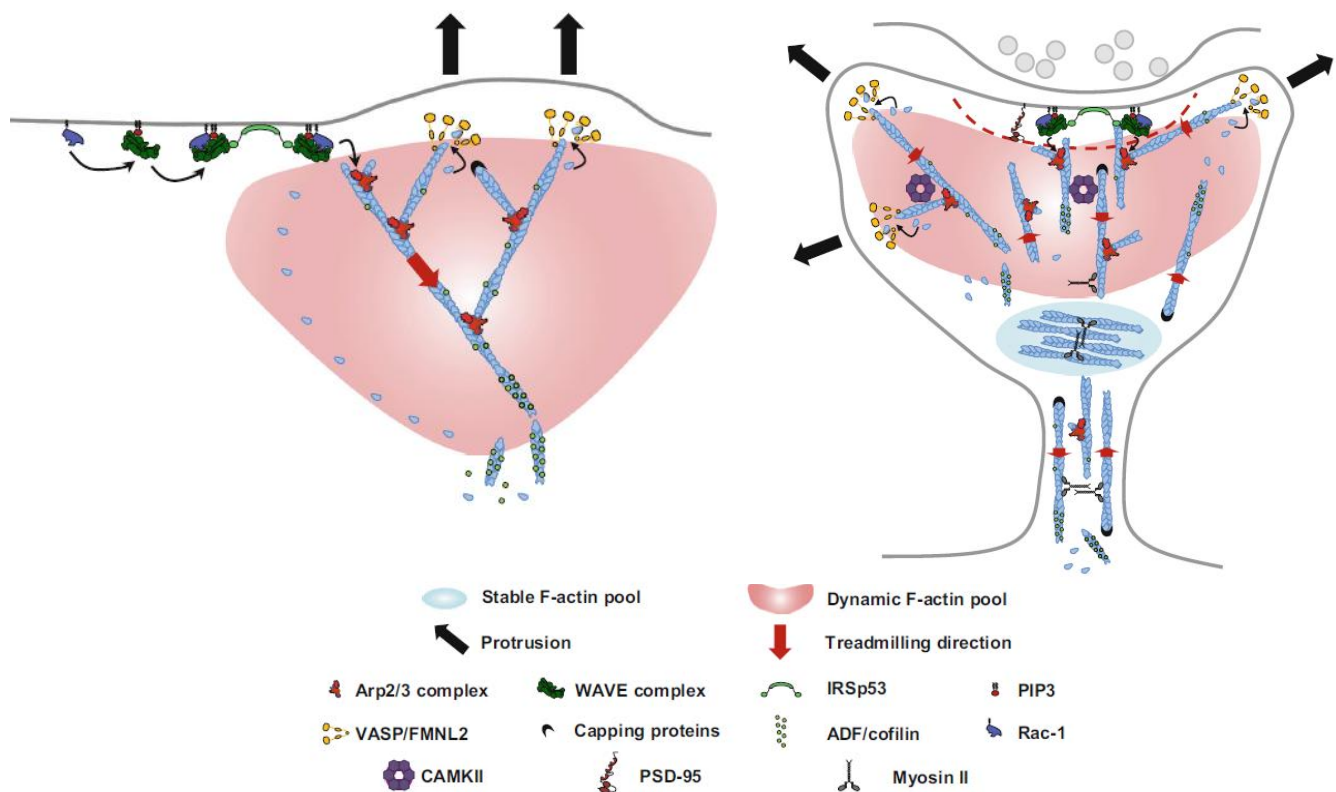


Figure 17. Représentation schématique du phénomène de nucléation de l'actine dans la formation du lamellipode à gauche et les changements de morphologie de l'épine à droite (modifié de Chazeau et Giannone, 2016).

III-2-d) Les épines dendritiques à l'interface entre dynamique et stabilité

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre montre la grande plasticité des épines dendritiques, celles-ci semblant jouer un rôle de substrat cellulaire de la mémoire (Hayashi-Takagi et al., 2015; Liston et al., 2013; Moczulska et al., 2013; Segal, 2005). Mais pour assurer ces fonctions elles doivent nécessairement être stables. Cela illustre bien le grand paradoxe des épines dendritiques, à l'interface entre dynamique et stabilité. Les travaux de Knott et ses collaborateurs montrent la grande diversité de stabilité entre les différentes épines grâce à une fenêtre d'observation réalisée dans le crâne du rongeur afin de suivre en microscopie à 2 photons les épines dendritiques dans le cortex somatosensoriel de rats chez lesquels les vibrisses ont été coupées. A la fin de l'expérience (un mois), les cerveaux sont fixés, observés en microscopie électronique à transmission afin d'observer l'ultrastructure des

épines et de définir si elles sont connectées à un élément présynaptique (Knott et al., 2006). Ces travaux ont pu mettre en évidence plusieurs catégories d'épines dendritiques selon leur stabilité : les épines nouvelles, se formant durant la phase d'acquisition des images, une catégorie d'épines stables, dont certaines peuvent se maintenir durant toute la durée de l'expérience, et enfin des épines instables, éliminées. Ces travaux rares de suivi en temps réel chez l'animal adulte et la caractérisation de l'ultrastructure des épines nouvellement formées corroborent les travaux du groupe du Dr. Gan, dans lesquels il a été observé également des différences de stabilité des épines. Ce processus est de plus lié au stade de développement de la souris, plus la souris est jeune et plus le système est labile avec presque 30% d'épines instables observées à 4 semaines pour se stabiliser presque totalement à l'âge de 10 mois (Grutzendler et al., 2002).

L'ensemble de ces résultats montrent donc globalement une grande stabilité des épines dans les systèmes d'étude *in vivo*. Ceci corrobore la théorie selon laquelle les épines peuvent représenter un réservoir mnésique de longue durée. Néanmoins, des études montrent une demi-vie des protéines synaptiques beaucoup plus faibles que leur durée de vie moyenne : de l'ordre de quelques jours (Ehlers et al. 2003). Cela pose la question de la stabilité de l'épine dans un système en constant renouvellement protéique. Une des réponses à ce paradoxe pourrait être la PSD-95, qui, même si elle est en permanent échange entre les épines, pourrait permettre une stabilisation de la taille et de la force synaptique au cours du temps (pour revues, Holtmaat et Svoboda, 2009; Keith et El-Husseini, 2008). Le lien entre PSD-95 et stabilité de l'épine a été mis en évidence dans des expériences de suivi *in vivo* en temps réel des épines et de leur contenu en PSD-95. En effet, quelques heures avant la disparition d'une épine l'intensité du marquage PSD95-GFP diminue (Cane et al., 2014). Le mouvement de PSD-95 a été montré comme régulé positivement par l'activité de ERK *via* la phosphorylation de Ephrine 3B (Hruska et al., 2015). Une mobilité accrue de la PSD-95 pendant l'activation neuronale permettrait une redistribution de la PSD dans les nouvelles épines afin de les stabiliser.

Enfin la stabilité d'une épine, en plus d'être dépendante de l'âge de l'individu est finement régulée par son interaction avec le bouton présynaptique. En ce sens, une étude de Becker et al. a montré qu'une LTD de l'élément présynaptique a tendance à augmenter la chance de disparition du bouton et en conséquence celle de l'épine dendritique (Becker et al., 2008). En complément de cette étude, les travaux de Hill et ses collaborateurs ont pu montrer que les nouvelles épines stimulées par un décaageage de glutamate présentaient une stabilité

plus importante que celles non stimulées. Etant donné que ce décageage modélise une activité synaptique excitatrice intense, ces résultats semblent confirmer l'idée selon laquelle les synapses se forment et se maintiennent préférentiellement sur des éléments présynaptiques actifs (Hill et Zito, 2013).

III-2-e) Mode de formation des nouvelles synapses : durant le développement et à l'âge adulte

La formation de nouvelles connexions synaptiques est un processus dépendant du stade auquel il est étudié. En effet dans des réseaux neuronaux en développement, les règles seront différentes de ce qu'elles peuvent être dans un cerveau adulte dans lequel ce réseau est déjà établi. Selon le stade de développement, les fonctions de la formation de nouvelles synapses restent en elle-même très différentes : durant le développement cette plasticité apparaît naturellement pour former le réseau neuronal en interaction avec l'environnement, à l'âge adulte cette plasticité reste plus rare, puisqu'elle intervient principalement après une lésion cérébrale, un apprentissage ou bien encore l'exposition à des agents pharmacologiques (pour revue, Holtmaat et Svoboda, 2009). Les travaux étudiant la synaptogénèse utilisent bien souvent des modèles très variés, tels que la tranche organotypique ou aigüe, la culture primaire neuronale ou bien encore l'imagerie *in vivo*, chez l'animal jeune ou adulte. Cette variété de modèles pourrait expliquer les grandes controverses existant encore aujourd'hui sur le mode de formation des synapses pour lequel il existe plusieurs modèles hypothétiques.

De nombreux modèles de synaptogénèse existent, mais par souci de clarté nous n'en présenteront que deux. Un premier modèle de formation est celui dans lequel l'épine connecte physiquement un axone, cette connexion, via la signalisation intracellulaire induite par les molécules d'adhésions va induire une formation du bouton ainsi qu'une maturation de l'épine dendritique. Ce modèle est très intéressant d'un point de vue développemental puisque le réseau à ce moment n'est pas encore formé (pour revue, Holtmaat et Svoboda, 2009).

L'autre grand modèle de synaptogénèse est celui d'une connexion des nouvelles épines sur un bouton présynaptique préexistant enclenchant la maturation de l'épine et la formation d'une nouvelle zone active sur le bouton démontrés *in vivo* et *ex vivo*. Des études *in vivo* (Knott et al., 2006; Medvedev et al., 2012) et en tranches (Nagerl et al., 2007) réalisées en microscopie corrélative indiquent que le deuxième modèle semble valide.

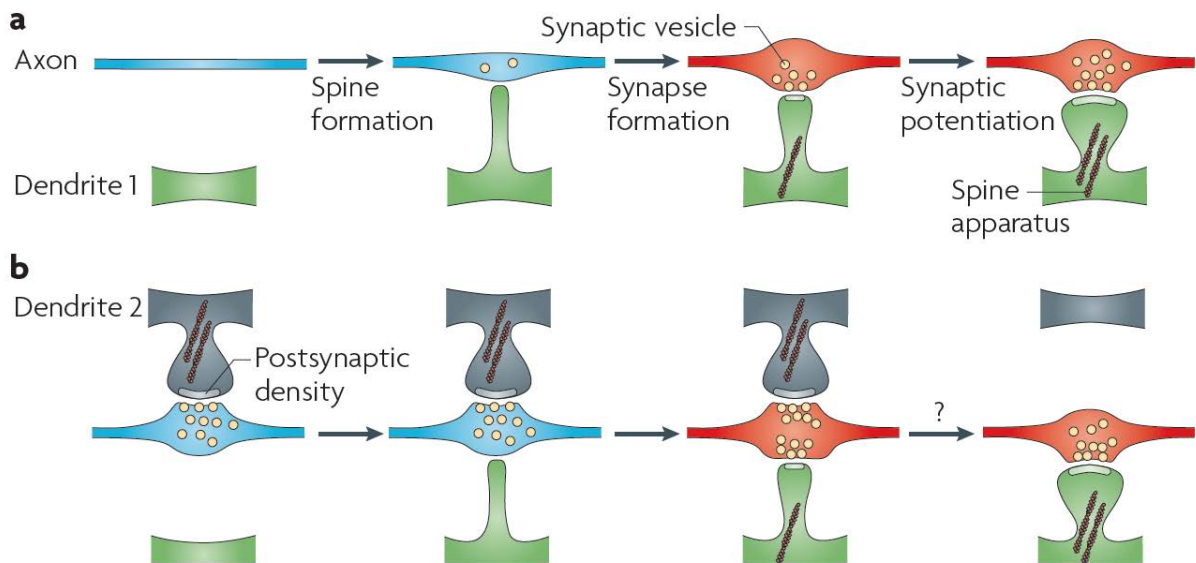


Figure 18. Deux modèles possibles de la formation de nouvelles synapses. a. La nouvelle épine (élément vert) se forme et vient contacter l'axone, induisant une cascade d'événements moléculaires menant à la formation concomitante du bouton présynaptique et de la maturation de l'épine dendritique. b. L'épine nouvellement formée vient se connecter à un bouton présynaptique préexistant, menant à la maturation de l'épine et la formation d'une deuxième zone active sur le bouton. Cet état de bouton multi synaptique peut être transitoire et une seule des épines ne va rester connectée après une phase de raffinement (d'après la revue de Holtmaat et Svoboda, 2009).

Un des critères essentiels à la synapse excitatrice est la présence d'une PSD. Dans l'étude de Knott et al. présentée précédemment, les nouvelles épines présentent une densité post synaptique en moyenne 4 jours après leur formation, montrant que la maturation *in vivo* peut-être lente et se terminer plusieurs jours après la naissance de l'épine. Le processus de maturation de la connexion synaptique a cependant été montré dans certains systèmes neuronaux comme beaucoup plus rapide : certaines études témoignent en effet d'une maturation ou d'une activité synaptique de l'épine autour des 15 heures après formation de l'épine, voire même à un temps inférieur à 1 heure (Nagerl et al., 2007; Zito et al., 2010).

Enfin un élément essentiel à la formation de la synapse une fois que l'épine a poussé est le contact des molécules d'adhésion cellulaires neuronales (que nous appellerons NCAM). Ces protéines de la famille des immunoglobulines ont d'abord été considérées seulement pour leur rôle de maintien physique entre les éléments pré et post synaptiques. C'est au début des années 2000 qu'a émergé leur rôle d'élément déclencheur de la formation de la synapse. Le contact, de part et d'autre de la synapse induit des voies de signalisation intracellulaires nécessaires à cette maturation. Certains travaux semblent montrer que c'est au niveau pré-

synaptique que cet effet est le plus rapide. Ces études montrent en effet que, rapidement après le contact entre l'épine et le bouton, de nombreuses protéines constituant la zone active se déplacent le long de l'axone pour atteindre cette région essentielle à l'activité de la présynapse. De façon intéressante, la seule présence de certaines molécules d'adhésions sur des cellules non neuronales permet la formation de l'élément présynaptique. Parmi ces NCAM, nous nous intéresserons plus particulièrement aux SynCAM, Neuroligine et α/β Neurexine et aux intégrines (pour revue, Washbourne et al., 2004).

Les neuroligines sont situées au niveau de la tête d'épines et liées, via leur domaine PDZ, à la PSD-95. Elles interagissent de façon hétérophile avec les α ou β - Neurexines situées à la membrane du bouton. Les neuroligines constituent un lien direct avec la synaptogénèse, puisque leur expression dans des cellules non neuronales induit une formation de présynapse comme mentionné précédemment. En ce sens, une surexpression des neuroligines dans les neurones a tendance à accroître la densité protéique en Homer et PSD-95 dans la PSD. Et à l'inverse une diminution de leur expression induit une diminution du nombre de synapses. Les synCAM sont, tout comme les NCAM, suffisantes à la formation d'une présynapse. Ces CAM interagissent de manière homophile et sont impliquées notamment dans les réponses comportementale et la morphologie des épines en réponse à la cocaïne (Giza et al., 2012). Enfin les NCAM peuvent en plus jouer des rôles directs dans la signalisation intracellulaire lors de la connexion synaptiques, c'est le cas notamment des intégrines. Ces NCAM jouent aussi un rôle dans la réponse comportementale à la cocaïne, en effet, elles interagissent avec Arg (Abelson-related gene) qui phosphoryle ensuite RhoGAP ayant pour conséquence d'inhiber la GTPase RhoA et déstabiliser les synapses. La souris KO pour le gène Arg présentent ainsi une hypersensibilité à la cocaïne (pour revue, Gourley et al., 2011).

III-2-f) La plasticité structurale adulte et son rôle dans le comportement

Les études montrant des corrélations entre les tâches comportementales et la formation de nouvelles épines sont légions, pour cette raison nous n'allons aborder seulement deux études aux caractéristiques originales dans lesquelles la spinogénèse n'est pas aléatoire et suit des patrons particuliers suivant les tâches accomplies.

La première que nous allons aborder est l'expérience de Fu et al., emblématique puisqu'elle est l'une des rares études à présenter une formation d'épines en *clusters* après une

tâche comportementale répétée. Les auteurs ont suivi *in vivo* et jour après jour la formation de nouvelles épines dans la couche 5 du cortex moteur de souris à la suite de tâches motrices impliquant les pattes antérieures d'une souris. L'originalité de l'étude est que ces *clusters* ne se forment que si une même tâche est répétée alors que l'association de plusieurs tâches différentes successives induit quant à elle une pousse aléatoire des épines. Cette étude met en évidence un lien fort entre l'apprentissage moteur et la formation non stochastique de nouvelles épines pouvant donc favoriser cette mémorisation (Fu et al., 2012).

En ce sens, une autre étude du groupe du Dr Gan par Yang et ses collaborateurs présente le rôle du sommeil dans la consolidation de la formation d'épines suivant une tâche motrice de rotarod. Cette étude montre que durant le sommeil ayant lieu le jour de cette tâche, de nouvelles épines se forment et celles-ci n'apparaissent pas de façon aléatoires mais sur certaines branches de l'arbre dendritiques spécifiquement (Yang et al., 2014).

Ces études sont impressionnantes mais elles ne permettent pas d'établir une relation causale entre le phénomène de plasticité structurale et la formation de nouvelles synapses qui représente en quelque sorte le graal de la discipline. Ceci est principalement dû au fait qu'il est très difficile de cibler uniquement les épines nouvellement formées ou activées sans pour autant altérer les épines préexistantes ou les voies de signalisations essentielles à d'autres processus liés à la plasticité neuronale. De plus, la recherche d'un marqueur protéique spécifique des nouvelles épines semble être une tâche très difficile à accomplir. En conséquence très peu d'études ont pu montrer une relation de causalité directe entre les changements de morphologie des épines et les altérations comportementales. Un outil développé récemment dans l'équipe du Dr Kasai a néanmoins permis de montrer cette relation. Celui-ci est une construction génétique permettant l'expression d'une version photoactivable de Rac1 (Pa-Rac1), une petite GTPase qui lorsqu'elle est activée de façon prolongée induit un affaissement de l'épine (Hayashi-Takagi et al., 2015). Cette protéine est couplée à une version tronquée de la PSD-95, qui ne se lie pas aux protéines interagissant avec le domaine PDZ. Cette construction est sous le contrôle du promoteur de Arc (*activity-regulated cytoskeleton-associated protein*), un gène immédiat précoce très rapidement et fortement exprimé lors de l'activation neuronale. Ainsi la Pa-Rac1 nouvellement exprimée lors d'une tâche comportementale ira se loger préférentiellement vers les synapses activées. Ils ont pu montrer que l'activation de cette Rac1 par la lumière induit un rapetissement voir une disparition des épines activées durant la tâche du rotarod et de manière très intéressante cela altère les performances de la souris. Cet effet est de plus spécifique d'une tâche donnée,

puisque si une tâche différente est réalisée un jour plus tard, la disparition des épines activées lors de la tâche précédente n'a alors pas d'impact sur l'apprentissage de la nouvelle tâche.

D'autres outils sont en cours de développement, notamment dans le *Max Planck Institute* (Allemagne), permettant, avec des stratégies globalement similaires, de cibler et faire disparaître spécifiquement les épines nouvellement formées, en évitant de faire disparaître les épines préexistantes, et ainsi étudier leur impact sur le comportement.

Chapitre IV : Plasticité des neurones striataux de projection induite par la cocaïne

Nous avons décrit précédemment le mode d'action général de la cocaïne sur le circuit mésocorticolimbique et ensuite discuté certaines altérations structurales que peuvent subir le neurone lors de stimulations ou de tâches comportementales. Nous discuterons finalement dans ce dernier chapitre comment la cocaïne peut induire cette plasticité particulière au sein des SPN.

IV-1) Différentes formes de plasticité neuronales des neurones striataux en réponse à la cocaïne

IV-1-a) Plasticité neuronale et adaptations comportementales par un dialogue entre les récepteurs D1 et NMDA

Les SPN sont des neurones intégrateurs du contexte codé par le glutamate et de la récompense signalée par une augmentation de la concentration extracellulaire en dopamine (pour revue, Girault et al., 2007). La plasticité neuronale des SPN est étroitement liée à la concentration de ces neurotransmetteurs et comme nous l'avons vu précédemment, la cocaïne, en augmentant la concentration striatale de dopamine, peut induire des modifications durables des propriétés ces neurones (pour revue, Cahill et al., 2014a).

Comme brièvement décrit dans le chapitre II, la cocaïne n'agit pas de façon identique sur les SPN exprimant les récepteurs D1 ou D2 à la dopamine. En effet de nombreuses études ont montré que les premières expositions à cette drogue induisent une plasticité majoritairement dans les neurones exprimant D1DR. Ces récepteurs GPCR sont couplés positivement à la production d'AMPc et l'activation de la PKA contrairement aux D2DR qui sont couplés négativement à cette voie AMPc. Un prétraitement avec le SCH23390, un inhibiteur du D1DR est suffisant pour bloquer totalement la sensibilisation locomotrice en deux injections séparées d'une semaine ainsi que la sensibilisation locomotrice induite par des injections quotidiennes de cocaïne durant 5 jours (Fontana et al., 1993, White et al. 1998), un effet qui n'est pas produit par l'inhibition du D2DR. Les résultats de l'équipe ont montré de l'implication du NMDAR dans ces adaptations comportementales (Valjent et al., 2000). Ces résultats semblent donc corroborer le rôle de la synergie entre les signaux dopaminergiques et glutamatergiques dans les altérations des SPN en réponse à la cocaïne.

L'augmentation brutale de la concentration en dopamine induite par la cocaïne active le récepteur D1DR qui est responsable d'une augmentation de la concentration en AMPc et de l'activation de la voie PKA (protéine kinase A) dans les SPN-D1. La PKA phosphoryle DARPP-32 (*Phosphoprotéine of Mr 32 kDa*) qui est un puissant inhibiteur de la Protéine Phosphatase-1 (PP1), qui elle-même déphosphoryle ERK1/2 ainsi que les Histones H3. DARPP-32 joue donc des rôles importants dans la réponse nucléosomale. DARPP-32 lorsqu'elle est mutée (mutation KO), diminue l'hyperlocomotion induite par la cocaïne (Hiroi et al., 1999). D'autres expériences de mutation ponctuelle de DARPP-32 ont pu montrer que la mutation Ser97Ala altérerait la sensibilisation locomotrice en 2 injections ainsi que la préférence de place conditionnée induite par la cocaïne (Stipanovich et al., 2008). Cette voie de signalisation est donc cruciale dans la régulation des adaptations comportementales à la cocaïne.

En parallèle de cette voie, l'activation du D1DR dans les SPN par la cocaïne est responsable d'une potentialisation des courants calciques dépendants du NMDAR indépendante de la production d'AMPc. Des résultats, obtenus précédemment dans d'autres types neuronaux (Wittmann et al., 2005) indiquaient que la stimulation des D1DR pouvait activer une kinase de la famille des Src (SFK), elle même responsable de la phosphorylation du récepteur NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Plus récemment, le Dr. Vincent Pascoli au sein de l'équipe d'accueil, a pu montrer que cette relation était essentielle à la réponse à la cocaïne *in vivo* chez la souris. En effet la kinase Fyn : membre des SFK, phosphoryle GluN2B sur son résidu Tyr¹⁴⁷² et cette synergie entre l'activation de D1DR et NMDA, indépendante de la production d'AMPc, est essentielle aux adaptations neuronales et comportementales induites par la cocaïne,. De manière intéressante, la potentialisation des courants calciques dépendants du NMDAR par l'activation du D1DR est responsable de l'activation de la voie des MAPK/ERK, une voie essentielle à la plasticité synaptique des SPN (Pascoli et al., 2011).

Le dialogue entre D1DR et NMDAR en réponse à la cocaïne a également été montré au sein de l'équipe comme dépendante d'une interaction physique entre D1DR et la sous-unité GluN1 du NMDAR. Le contact physique entre ces deux récepteurs est augmenté lors d'une co-stimulation des récepteurs D1 et NMDA et son blocage dans le NAc par un peptide interférant inhibe *in vivo* la phosphorylation de ERK ainsi que la sensibilisation locomotrice induite par la cocaïne chez la souris (Cahill et al., 2014b).

IV-1-b) Altérations neuronales induites par la cocaïne : aspects électrophysiologiques

La cocaïne induit des altérations synaptiques des SPN pouvant prendre la forme d'une LTP ou d'une LTD, selon le moment où sont faites les mesures après la dernière injection de cocaïne et selon le type de traitement. Comme nous allons le voir dans ce chapitre ces données sont encore controversées.

Thomas et al. en 2001 ont montré une diminution du rapport des courants AMPA/NMDA dans les SPN du Shell du NAc de souris injectées de façon chronique avec de la cocaïne suivie de 14 jours de sevrage (Thomas et al., 2001). Les courants AMPA étant considérés comme dictant la force de la synapse, ces résultats allaient plutôt dans le sens d'une LTD, d'autant plus que ces mêmes neurones présentaient une occlusion de la LTD. D'ailleurs, la surexpression de la sous-unité GluA1 du récepteur AMPA permet de diminuer la recherche de drogues durant le sevrage ce qui va dans le sens des résultats précédents. Les récepteurs AMPA sont connus pour être internalisés plus rapidement et facilement que les récepteurs NMDA (pour revue, Hyman et al., 2006). Ces mécanismes d'endocytose pourraient expliquer les changements de rapports AMPA/NMDA. En ce sens, une diminution de la quantité en protéines essentielles à l'échafaudage des récepteurs (PSD-95 et Homer) est observée lors d'injections chroniques aux drogues d'abus, ce qui pourrait-êtr e expliquer également la diminution du rapport AMPA/NMDA (Berke et al., 1998; Yao et al., 2004) .

La vision d'une LTD induite par des traitements chroniques à la cocaïne est longtemps restée un concept non discuté dans la littérature. Néanmoins de récents résultats du Dr. Vincent Pascoli dans l'équipe du Dr. Lüscher montrent que les SPN-D1, une semaine ou un mois après une injection unique de cocaïne, présentent une occlusion de la LTP, des résultats allant dans le sens inverse des résultats précédents. Cette LTP est dépendante de la voie ERK et est essentielle à la sensibilisation locomotrice (Pascoli et al., 2012).

Par la suite, le Dr Vincent Pascoli a poursuivi son étude du lien entre la plasticité synaptique des SPN et la cocaïne de façon plus précise et étudié les altérations ayant lieu au sein de chacune des synapses de la triade glutamatergique projetant vers le NAc (BLA, HPCv et PFC) chez des souris s'auto-administrant de la cocaïne. Ces résultats ont été obtenus en exprimant le canal rhodopsine dans les neurones de chacune de ces régions cérébrales. Par la suite, l'illumination du NAc en tranches a permis d'analyser les réponses de chacun de ses types de synapses séparément et de montrer que les synapses provenant de ces sous-structures

présentent des adaptations propres et très différentes. Notamment, les synapses NAc-PFC montrent une diminution du rapport AMPA/NMDA, en accord avec les premiers résultats de Thomas et al. de 2001. Mais de façon étonnante, les synapses HPCv-NAc présentent quant à elles une augmentation de ce rapport (Pascoli et al., 2014a). Ces résultats pourraient expliquer les différents résultats obtenus dans la littérature, et basés sur des sommes de réponses différentes en fonction des synapses. , d'autant plus si l'on ajoute en plus les SPN-D1 et D2 dans l'étude.

En plus de ces différences de rapport AMPA/NMDA, la cocaïne semble induire un « rajeunissement synaptique » sous la forme d'une augmentation de la quantité en synapses silencieuses. Ces synapses ne présentent pas de courant AMPA, et ne permettent pas de dépolariser suffisamment l'épine pour que les courants NMDA puissent s'établir. Ces synapses silencieuses sont en général retrouvées majoritairement à des stades développementaux et plusieurs hypothèses peuvent expliquer leur formation en réponse à la cocaïne. La première s'appuie sur la plus grande facilité d'internalisation des récepteurs AMPA. L'autre grande hypothèse est une formation de synapses par insertion de récepteurs NMDA, la synapse est directement silencieuse lors de sa formation. Des résultats récents montrent que la cocaïne injectée de façon chronique induit une formation de synapses silencieuses ne passant pas par l'internalisation des AMPAR. contrairement à la morphine (Graziane et al., 2016). Il est intéressant de noter que l'inhibition de CREB ou de Δ FosB, deux voies impliquées dans les aspects plutôt transcriptionnels de la réponse à la cocaïne, inhibent la formation de ces synapses silencieuses (pour revue, Dong et Nestler, 2014).

Une question se pose néanmoins quant à la fonction de ces synapses sans activité dans la réponse à la cocaïne. Une des hypothèses émises dans la littérature est qu'elles joueraient un rôle efficace dans la « métaplasticité » : c'est-à-dire qu'elles seraient une réserve cellulaire pouvant s'activer très rapidement suite à de nouveaux traitements. En effet, les récepteurs AMPA s'internalisent mais aussi s'insèrent très rapidement à la membrane (pour revue, Lee et Dong, 2011). Enfin il n'est pas à exclure qu'il existerait deux types d'épines formées sous cocaïne, une de type silencieuse et « immature » et une autre tout à fait active.

IV-1-c) Les rôles de la voie ERK dans les altérations neuronales et comportementales induites par la cocaïne

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la voie ERK est responsable d'une partie des altérations synaptiques et comportementales induites par la cocaïne (Pascoli et al., 2012). Nous allons maintenant aborder son mode d'activation par la cocaïne et les conséquences de son activation.

La voie ERK est une des voies majeures de réponses aux stimulations dans les neurones synaptiques. Elle est responsable de nombreux phénomènes de plasticité. ERK 1 et 2, toutes deux présentes dans les SPN-D1 et D2 sont phosphorylées par la kinase MEK, elle-même phosphorylée par la kinase Raf, activée par la petite protéine G : Ras-GRF1 (pour *guanine nucleotide releasing factor*) (Fasano et al., 2009) après l'entrée de calcium dépendante du NMDAR (Fig 19). ERK possède de multiples cibles cytoplasmiques et nucléaires. Cette kinase phosphoryle entre autres la kinase MNK-1 (Banko et al., 2004), qui phosphoryle le complexe d'initiation de la traduction eIF4E, un processus essentiel à la LTP induite par une stimulation à haute fréquence dans l'hippocampe de rat (Panja et al., 2009, 2014). En revanche, l'implication de MNK-1 dans la réponse des SPN aux drogues n'était pas connu.

ERK1/2, une fois phosphorylée transloque au noyau où elle phosphoryle Elk-1 : un facteur de transcription régulant l'activité des gènes portant un site de réponse au serum (SRE) et MSK-1 (pour *Mitogen and stress activated Kinase*): une kinase des Histones H3 et du facteur de transcription CREB. Ces deux protéines, dont l'activité est directement contrôlée par ERK1/2, jouent des rôles importants dans la réponse à la cocaïne, notamment. Les souris KO pour le gène *msk-1* présentent une inhibition de la sensibilisation locomotrice mais pas de la PPC, en régulant notamment l'expression du gène immédiat précoce cFos (Brami-Cherrier et al., 2005). Le rôle transcriptionnel de la voie ERK sur le contrôle de la PPC pourrait passer par Elk-1 puisque l'inhibition de sa phosphorylation inhibe ce comportement, ainsi que la sensibilisation locomotrice (Besnard et al., 2011).

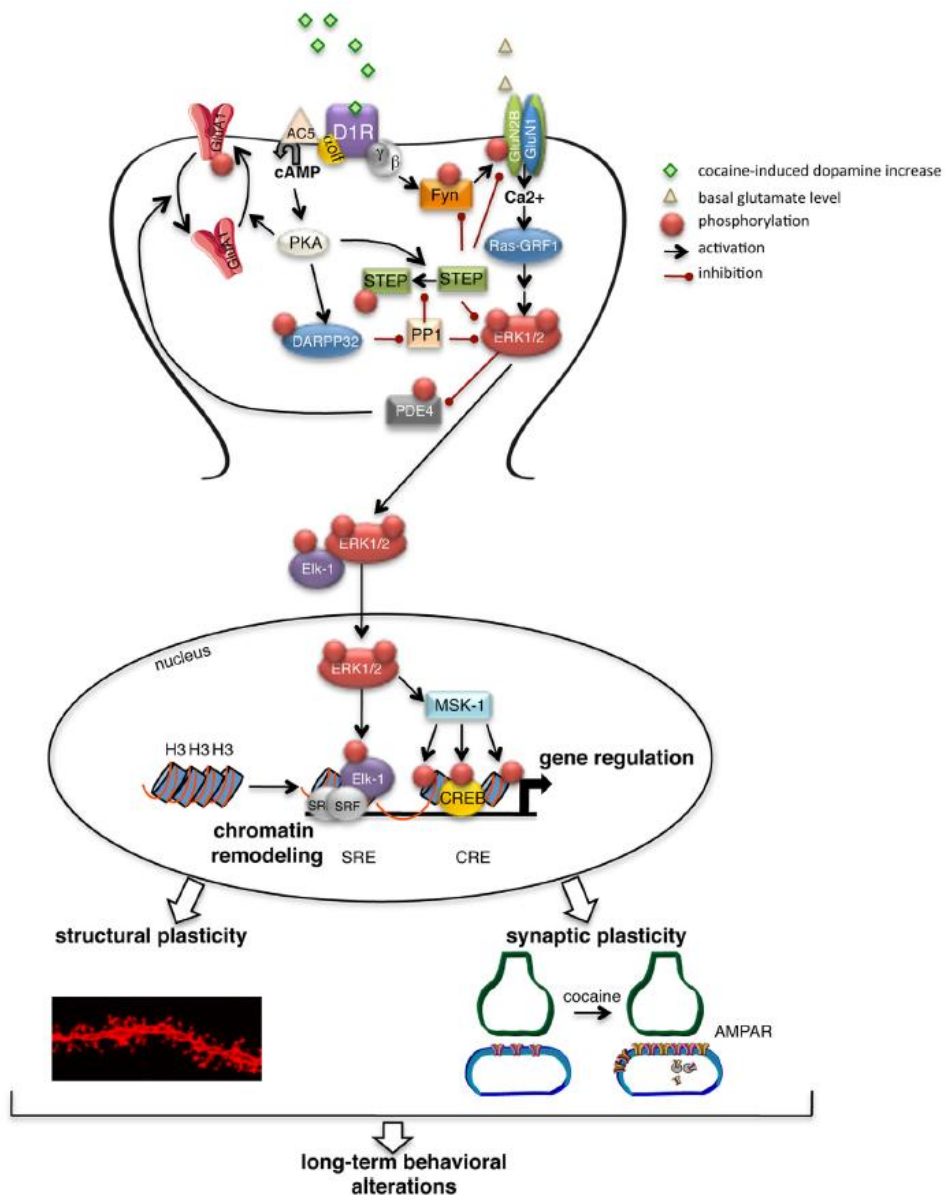


Figure 19. La synergie entre l'activation du récepteur D1 de la dopamine et le récepteur NMDA est responsable de l'activation de voies de signalisation au sein des SPN : DARPP32, PKA , MAPK ERK notamment.

L'activation de ERK a été montrée comme une caractéristique commune à un grand nombre de drogues d'abus dans les circuits de la récompense (Valjent et al., 2001). Le Dr Emmanuel Valjent dans l'équipe a mis en évidence que cette activation de ERK par la cocaïne chez la souris était inhibée par un inhibiteur du D1DR : le SCH23390 et du NMDAR (Valjent et al., 2000). ERK jouerait donc un rôle clef de détecteur de coïncidence entre les signaux dopaminergiques de la récompense et contextuels et émotionnels codés par le glutamate au sein des SPN (pour revue, Girault et al., 2007). L'inhibition du D1DR ou du NMDAR empêche l'établissement des adaptations comportementales à la cocaïne, et cet effet pourrait passer par l'activation de la voie ERK. En ce sens l'inhibition de ERK via l'injection de

SL327 (un inhibiteur de MEK) dans la sensibilisation locomotrice et la PPC ([Valjent et al. , 2000 ; 2006](#)).

L'ensemble de ces résultats montre que ERK est capable de réguler de nombreux mécanismes lors de la consommation de cocaïne. De plus, on sait que ERK contrôle aussi les processus de formation de nouvelles épines dans le cortex en réponse au glutamate ([Kwon et Sabatini, 2011](#)) et dans le striatum ventral en réponse à la cocaïne ([Besnard et al., 2011](#); [Ren et al., 2010](#)).

IV – 2) Plasticité structurale striatale : le détournement du rôle de la neuromodulation dopaminergique par les drogues d'abus

Comme nous l'avons discuté dans le chapitre III, la formation de nouvelles épines est un phénomène lié à l'activité neuronale et notamment l'activation des récepteurs glutamatergiques. Dans les SPN l'activité de ces récepteurs est finement régulée par la neuromodulation dopaminergique. Nous allons décrire dans un premier temps comment la dopamine peut induire des remaniements synaptiques, puis comment la cocaïne détourne ces processus.

IV-2-a) Rôle de la neuromodulation dopaminergique des signaux glutamatergiques dans la formation du réseau synaptique striatal

Un résultat de 1995 montrait que la déplétion en dopamine striatale par lésion des neurones dopaminergiques *via* l'utilisation de la 6-hydroxy dopamine chez le rat induisait une diminution significative de la densité en épines dendritiques dans les différentes régions striatales ([Meredith et al., 1995](#)).

Tout comme les neurones corticaux et hippocampiques, les neurones striataux présentent une plasticité structurale étroitement liée à l'activité glutamatergique. En 2003, le Dr. Menahem Segal et ses collaborateurs montrèrent que les SPN en culture primaires présentaient plus de synapses s'ils étaient co-cultivés avec des neurones corticaux ([Segal et al., 2003](#)). Cet effet est aussi retrouvé en cultures « microfluidiques » dans lesquels les neurones corticaux et striataux sont situés dans deux compartiments séparés de microcanaux permettant le passage des axones corticaux vers les SPN ([Peyrin et al., 2011](#)). Cette

spinogénèse semble effectivement liée à l'activité du réseau, puisque l'ajout de TTX dans le milieu inhibe ce phénomène.

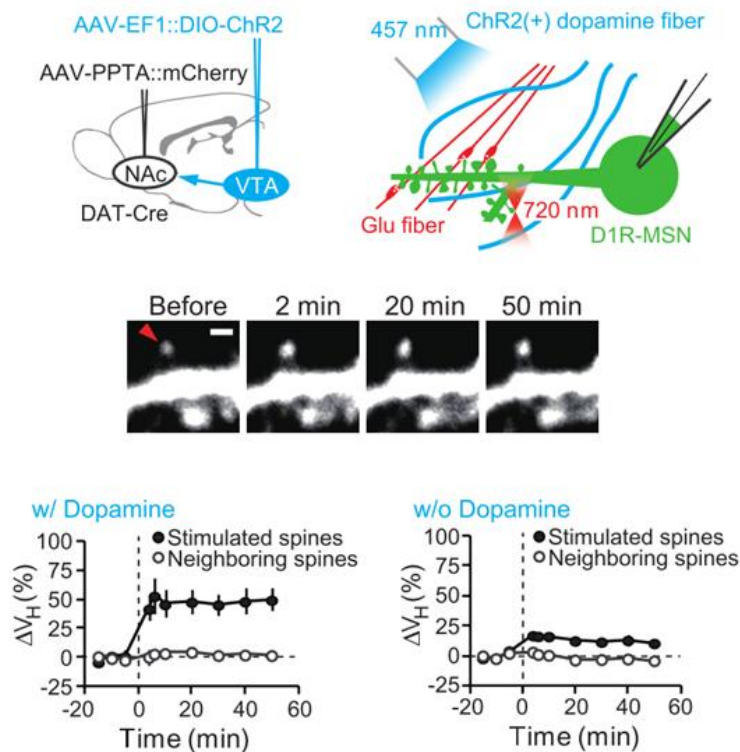


Figure 20. La dopamine ouvre une courte période critique permettant au glutamate de jouer son rôle d'élargissement de la tête des épines au sein des SPN-D1 du NAc : Un AAV exprimant la ChR2 est injecté dans le NAc et un AAV marquant les neurones D1 (AAV-PPTA ::mCherry) est injecté quant à lui dans le NAc des souris. L'illumination à 457 nm des tranches de NAc permet ainsi une libération de dopamine, qui lorsqu'elle est réalisée de 0,3 sec à 2 sec avant le décaage de glutamate induit une sLTP (Modifié de Yagishita et al. 2014).

Une hypothèse permettant de donner une explication cellulaire aux expériences d'association du contexte et de la récompense est que la dopamine permet de débloquent la plasticité structurale des épines des SPN lorsque sa libération corrèle temporellement avec l'activation des récepteurs glutamatergiques. Cette hypothèse de verrou a été démontrée dans les travaux de Yagishita et al. dans lesquels les auteurs ont infecté les neurones de l'ATV avec un AAV exprimant le canal rhodopsine (ChR2). Ainsi *via* une stimulation lumineuse au niveau du NAc, ils ont pu activer les fibres dopaminergiques et pu créer sur tranche de NAc, une libération temporaire et importante de dopamine. Les auteurs montrent que le glutamate décaé en face d'une épine de SPN-D1 augmente faiblement la taille de celle-ci. En revanche, ce phénomène est largement amplifié lorsque les fibres dopaminergiques sont activées dans une brève fenêtre temporelle (entre 0,3 et 2 secondes) après le décaage de glutamate

(Yagishita et al., 2014). Le dialogue dopamine-glutamate, qui est essentiel aux adaptations comportementales à la cocaïne, est donc primordial également pour la plasticité structurale des épines dendritiques au niveau du NAc.

Le rôle crucial de la neuromodulation dopaminergique striatale a été observé aussi au niveau de la formation de nouvelles épines de SPN en culture primaires dans l'étude de Fasano et al. en 2012. Les auteurs ont observé que la présence de dopamine dans le milieu de mono cultures striatales augmente le nombre de protrusions dendritiques. Il est intéressant de noter qu'en co-cultures cortex-striatum, l'inhibition des récepteurs dopaminergiques diminue la densité spinale. La dopamine semble donc être un élément très important pour la formation du réseau synaptique au niveau du striatum au cours du développement (Fasano et al. 2012).

Des résultats récents du Dr Yevgenia Kozorovitzkiy et al. appuient cette idée de coopération entre les systèmes dopaminergiques et glutamatergiques dans la formation *in vivo* du réseau cortico-striatal durant le développement. Ils ont montré que l'injection d'un agoniste des récepteurs D1 dans le striatum dorsal suffit à l'établissement de nouvelles synapses actives en quelques heures chez la souris âgée de 10 jours. De plus l'activation *in vitro* de la sous-unité $G_{\alpha s}$ dans les SPN permet de mimer cette spinogénèse après le décageage du glutamate (Kozorovitzkiy et al. 2015).

L'ensemble de ces résultats démontrent un rôle physiologique de la modulation dopaminergique sur la formation du réseau synaptique au niveau du striatum en développement. Les drogues d'abus détournent ce rôle de la dopamine, probablement en réouvrant une période critique de plasticité observée normalement durant le développement, en analogie avec le « rajeunissement électrophysiologique » des synapses que nous avons décrit précédemment (pour revue, Bellone et Lüscher, 2012; Dong et Nestler, 2014).

IV-2-b) Drogues d'abus et spinogénèse

La plasticité structurale en réponse aux drogues d'abus est un phénomène très étudié depuis près d'une vingtaine d'année, notamment par Robinson et Kolb (Robinson et Kolb, 1997, 1999) qui ont observé que des injections répétées de psychostimulants, amphétamine et cocaïne, étaient responsables d'une augmentation de la densité en épines dendritiques du NAc chez le rat.

Depuis ces résultats initiaux, de nombreux laboratoires ont observé que la grande majorité des drogues d'abus altéraient la densité en épines dans les structures limbiques : telles que les psychostimulants (Robinson et Kolb, 1997, 1999), l'éthanol (Wang et al., 2015; Zhou et al., 2007) ou bien encore les opiacées (pour revue, Russo et al., 2010).

Les stimulants et les opiacées agissent d'ailleurs de façon opposée sur cette forme de plasticité : les psychostimulants, comme dit précédemment augmentent la densité en épines dans le NAc, le CPF et la VTA notamment, alors que les opiacées, (ie. la morphine : l'opiacée la plus étudiée) ont plutôt tendance à diminuer la densité en synapse dans le mPFC, le NAc et l'hippocampe ventral (pour revue, Russo et al., 2010).

IV-3) Plasticité structurale induite par la cocaïne

IV-3-a) Les traitements chroniques à la cocaïne induisent une formation de synapses dans le NAc

Brain Area - Stimulants	Drug regimen	Structural change	Molecular mediators
NAc medium spiny neuron	EA chronic cocaine (2-4 hr w.d.)	↑ Thin spines	NFκB, deltaFosB, G9A
	EA or SA chronic cocaine (24 hr-months w.d.)	↑ Mushroom spines; dendrite complexity	CDK5, MEK2
	EA chronic cocaine 3 week w.d. + challenge dose (24 hr w.d.)	↑ Thin spines	
VTA dopamine neuron	EA acute cocaine (2-4 hr w.d.)	↑ Spine density	NA
Hippocampus pyramidal neuron	NA	NA	NA
mPFC pyramidal neuron	EA or SA chronic cocaine (24 hr-months w.d.)	↑ Spine density; dendrite complexity	NA
oPFC pyramidal neuron	EA or SA chronic cocaine (24 hr-months w.d.)	↑ Spine density; dendrite complexity	NA

Figure 21. Tableau récapitulatif de différents traitements à la cocaïne sur la plasticité structurale dans le NAc, l'hippocampe ou le PFC (d'après Russo et al. 2010).

L'étude de la plasticité structurale par la cocaïne a été poursuivie dans de nombreux paradigmes d'exposition aux drogues d'abus chez le rongeur. Le Dr. Terry Robinson et ses collaborateurs ont montré que l'auto-administration de cocaïne chez le rat induisait une augmentation de la densité en épines dans le NAc mais aussi au niveau des neurones du CPF (Robinson et al. 2001).

D'autres variations ont ensuite été étudiées, notamment l'impact d'une période de sevrage, souvent utilisée dans les modèles d'injection de cocaïne chez le rongeur (Figure 21).

Dans un protocole d'injections chroniques de cocaïne par l'expérimentateur suivi d'une période de sevrage de 3 semaines réalisé par Shen et al., en 2009, les épines du NAc ne sont pas plus nombreuses entre les conditions saline ou cocaïne. En revanche le diamètre des épines, quant à lui, est plus important. Lorsque la souris reçoit une injection *challenge*, celle-ci induit une double plasticité avec une augmentation en taille et en nombre des épines (Shen et al., 2009a). La période de sevrage semble donc laisser une empreinte importante sur la plasticité des SPN. Par la suite les travaux de Dumitriu et al. se sont intéressés à cette phase de sevrage en étudiant les épines 4h, 24h et 28 jours après la dernière injection dans le Core ou le Shell du NAc. Ils montrent ainsi que ces deux sous-régions ne répondent pas de la même façon aux différentes périodes de sevrage : ils observent de façon surprenante à une diminution du nombre d'épines dans le Core 24 h après la dernière injection de cocaïne alors que celle-ci est bien augmentée dans le Shell. 28 jours plus tard, l'augmentation en densité d'épines a disparu dans le Shell mais la diminution dans le Core s'est maintenue (Dumitriu et al., 2012).

Les adaptations aux drogues d'abus sont étroitement liées au contexte environnemental de l'individu. Cet aspect se retrouve aussi au niveau de la plasticité structurale comme le montrent les travaux de Stankeviciute et al. dans lesquels les rats après une phase d'auto-administration sont réintroduits dans le contexte de la tâche plusieurs jours de sevrage plus tard (Stankeviciute et al., 2013). Ceci a pour effet d'induire en 15 minutes seulement un élargissement de la tête des épines du Core du NAc montrant une certaine potentialisation des synapses réactivées uniquement par le contexte environnemental. Cette potentialisation peut être une explication morphologique aux phénomènes de rechute.

La cocaïne altère donc effectivement la densité en épines des SPN du NAc. Mais il était intéressant de savoir si ces épines nouvellement formées pouvaient ou non engendrer des synapses, et si oui, de quel type. Dans une élégante étude (MacAskill et al., 2014), la cocaïne a été injectée de façon quotidienne et chronique (5 injections suivies de 24 heures de sevrage) et produit une formation d'épines dendritiques dans les SPN du Shell du NAc. Des stimulations optogénétiques de différentes afférences glutamatergiques (provenant du CPF, BLA ou vHPC) ont ensuite été réalisées avec le suivi en temps réel de l'activité des épines via un capteur calcique remplissant les SPN en tranche aigüe. Grâce à ce dispositif, ils ont observé qu'après photostimulation des afférences en provenance de l'amygdale, plus d'épines présentaient un pic calcique au niveau des SPN-D1 du NAc. A l'inverse, l'inhibition de ces

afférences permet le blocage total de l'augmentation en densité d'épines sur ces neurones. Ainsi ces résultats indiquent que l'augmentation d'épines dans le NAc s'accompagne d'une augmentation en contacts synaptiques en provenance de l'amygdale.

IV-3-b) Influence de la première exposition à la cocaïne sur la plasticité structurale dans certaines régions limbiques

Ainsi, la cocaïne produit une forte empreinte sur la structure synaptique des SPN après des injections répétées. Elle peut également produire des effets à long terme sur le comportement et la plasticité électrophysiologique des neurones après une injection unique. En ce sens, quelques études montrent que cette unique injection de cocaïne induit des formations d'épines dans trois régions majeures du réseau limbique : le PFC, NAc et l'ATV.

Ainsi, 2h après une première injection de cocaïne, de nouvelles épines se forment dans une sous-population des neurones de l'ATV (Sarti et al., 2007). Quelques années plus tard, l'équipe du Dr. Kalivas a montré que des rats recevant pour la première fois de la cocaïne présentait cette forme de plasticité structurale aussi le Core du NAc 6 heures après l'injection (Shen et al., 2009b). Un résultat similaire de réponse à une injection aiguë a aussi été mise en évidence dans le CPF de souris (Muñoz-Cuevas et al., 2013).

IV-3-c) La plasticité structurale induite par la cocaïne diverge entre les SPN-D1 et D2

Les SPN peuvent être séparés en deux sous-catégories : les SPN-D1 et les SPN-D2 (cf chapitre 2). Même si des résultats récents indiquent que la présence de ces deux sous-types est nécessaire aux rôles motivationnels (Trifilieff et al., 2013), le phénomène de plasticité structurale semble cependant presque restreint aux SPN-D1 (Dobi et al., 2011; Kim et al., 2011a; MacAskill et al., 2014). Dans une étude cependant, une formation d'épines dans les SPN-D2 a été observée après l'administration chronique d'une dose journalière très élevée de cocaïne (30 mg/kg de souris contre 20 mg/kg généralement) durant une longue période (un mois contre 5 jours en général). Dans ces conditions expérimentales particulières, cet effet sur les SPN-D2 pourrait résulter d'adaptations homéostatiques à long terme du réseau synaptique, et l'inhibition récurrente des SPN-D2 engendrerait ainsi la formation de nouvelles épines (Lee et al., 2006). Cependant les auteurs de cet article montrent que cette plasticité n'est pas identique dans les deux grands types de SPN puisque les épines formées dans les D2 ne

semblent pas se maintenir dans le temps et ne sont plus présents après 30 jours de sevrage contrairement à ce qui est observé dans les SPN-D1.

IV-3-d) Mécanismes moléculaires de la plasticité structurale induite par la cocaïne

Pour rappel, les SPN-D1 présentent une phosphorylation de la kinase ERK une dizaine de minutes environ après exposition à la cocaïne et cette kinase est étroitement liée aux phénomènes de plasticité neuronale et plus précisément de formation de pousses d'épines. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2 de cette thèse, ERK1/2 est essentielle à la pousse rapide des épines après décaageage de glutamate à proximité de l'arbre dendritique (Kwon et Sabatini, 2011).

La voie ERK régule aussi le réseau synaptique à plus long terme puisqu'elle bloque l'augmentation de la densité en épines dans le NAc induite par des injections répétées de cocaïne (Ren et al., 2010). Ces effets à long terme pourraient passer par les régulations transcriptionnelles dont ERK est responsable. Des travaux réalisés dans l'équipe ont permis de mettre en évidence ce rôle durant l'étude de la phosphorylation du facteur de transcription Elk-1 dans le cadre d'un traitement chronique à la cocaïne (Besnard et al., 2011). Le blocage de cette phosphorylation bloque complètement l'augmentation de la densité en épines observée après des traitements journaliers de cocaïne. De plus, ERK pourrait jouer sur la plasticité structurale à long terme via la régulation de la phosphorylation de CREB via la kinase nucléaire MSK-1, en aval de ERK. En réponse à des traitements chroniques à la cocaïne, CREB est impliqué dans la formation des épines et leur changements de forme (Pignataro et al., 2015) ainsi que dans les processus de formation de synapses silencieuses en réponse à des traitements chroniques à la cocaïne (Huang et al., 2008). Enfin, ERK peut contrôler, dans le NAc, l'expression de Δ FosB, un facteur de transcription qui s'accumule après injections répétées de cocaïne (Nestler et al., 2001) et dont on sait qu'il est fortement impliqué dans les phénomènes de plasticité structurale (pour revue, Russo et al., 2010).

Bien évidemment, ERK, bien qu'essentielle, n'est pas la seule voie de régulation de la formation des épines dendritiques en réponse à la cocaïne. Une part importante des remaniements du réseau d'actine sont réalisés par les petites protéines G (à activité GTPase) : telles que Rho, Rac, Ras ou bien encore Cdc42 comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent. Ces protéines sont activées par les facteurs d'échange de guanine (GEFs). Une des

GEFs : la Kalirin 7 a d'ailleurs été montrée comme régulant la plasticité structurale (Penzes et Jones, 2008), et même la réponse comportementale et cette plasticité induite par la cocaïne (Kiraly et al., 2010). De même, le rôle de Ras-GRF1 (contrôlant entre autre l'activité de ERK) a aussi été mis en évidence comme jouant un rôle dans les adaptations comportementales à la cocaïne (Fasano et al., 2009). Rac1 a aussi été impliquée dans les réponses à cette drogue d'abus, en effet les traitements répétés de cocaïne régulent négativement la forme active de Rac1, et la diminution par injection d'un AAV exprimant un dominant négatif de Rac1 dans le NAc augmente la densité en épines, de façon similaire à la cocaïne (Dietz et al., 2012). Enfin très récemment, la GEF neuronale Rap1 a été mise en évidence dans la plasticité des épines en réponse à la cocaïne (Cahill et al., 2016).

Nous avons pu discuter du rôle de la synthèse protéique sur l'élargissement de la tête d'épine dans le chapitre 3 de cette thèse (Bosch et al., 2014). Ce mécanisme cellulaire est aussi fondamental dans la plasticité neuronale en réponse à la cocaïne. En effet, les travaux du groupe du Dr Florence Noble montrent que si l'anisomycine (un inhibiteur de la synthèse protéique), est infusée dans le Nac des souris 4 heures après le conditionnement durant une tâche de PPC en réponse à la cocaïne, cette tâche n'est pas apprise et les SPN ne présentent plus d'augmentation de la densité en épines (Marie et al., 2012).

Il est intéressant de mettre en regard un résultat (présenté dans le chapitre II) obtenu en cultures primaires de neurones corticaux dans lequel l'inhibition de MNK-1 permet d'inhiber l'augmentation en épines induite par une supplémentation en leucine du milieu. Or MNK-1 est un partenaire direct de ERK, et peut contrôler la synthèse protéique. Cette branche de la voie ERK pourrait donc intervenir dans les réponses neuronales et comportementales aux drogues d'abus (Shih et Hsueh, 2016).

OBJECTIFS ET HYPOTHESES

La cocaïne injectée de façon chronique induit des altérations comportementales liées à une plasticité du réseau mésocorticolimbique dont une des fonctions physiologiques est la régulation des processus d'apprentissage régulés par la récompense. Une des formes de plasticité très étudiée en réponse à la cocaïne, chez les rongeurs, est la formation de nouvelles épines dendritiques au sein SPN du NAc. Cette plasticité morphologique est dépendante de la voie ERK et est inhibée par des antagonistes des récepteurs D1 ou NMDA ([pour revue, Cahill et al., 2014a](#)). D'autre part, cette voie de signalisation ERK régule la plasticité synaptique et les adaptations comportementales induites par l'exposition prolongée à la cocaïne. Bien qu'abondamment documentée, la littérature concernant les mécanismes de formation des épines par la cocaïne ne permettaient pas de faire un lien entre spinogénèse des SPN du NAc, et connexion avec les boutons présynaptiques en provenance des régions afférentes au NAc : HPCv, CPF et BLA.

Ainsi une première partie de mon projet de thèse a consisté à mettre en place une méthode permettant d'étudier cette **synaptogénèse induite par la cocaïne dans le NAc**. Pour cela, une nouvelle méthode d'observation des éléments pré et post-synaptiques a été mise en place qui m'a permis d'analyser la formation de synapses glutamatergiques au niveau des SPN du NAc, en réponse à des injections répétées de cocaïne (Article 1).

Dans une deuxième partie du travail, je me suis intéressé à la pharmaco-cinétique de cette plasticité morphologique. L'équipe d'accueil avait émis l'hypothèse que **des synapses glutamatergiques pouvaient se former de façon rapide et stable après une seule exposition à la cocaïne**. Cette hypothèse s'appuyait notamment sur les travaux du groupe du Dr Lüscher qui avait montré qu'une seule injection de cocaïne pouvait induire une LTP des SPN, dépendante de la voie ERK, et essentielle à la sensibilisation locomotrice induite après une deuxième injection de cocaïne ([Pascoli et al., 2012](#)). Il était donc possible que cette plasticité synaptique s'appuie sur une plasticité structurale. En utilisant les souris VGLUT1^{venus} et la méthode de reconstruction 3D des synapses cortico-striatales décrite au préalable, j'ai étudié cette spinogénèse, et mis en évidence qu'elle apparaissait dès une heure après l'injection unique de cocaïne, et était relativement stable puisqu'elle perdure au moins une semaine.

Afin de mieux comprendre les mécanismes intimes qui président la plasticité des réseaux neuronaux en réponse à la cocaïne, je me suis attaché à la « **signature moléculaire** » **de la spinogénèse induite par une première exposition de cocaïne**. J'ai pour cela utilisé de multiples échelles d'études : *in vivo* sur tissus fixés et *ex vivo* en imagerie biphotonique en temps réel. Cette pluralité d'approches m'a permis de mettre en évidence un rôle essentiel de la voie ERK sur la plasticité structurale des SPN, pousse puis maintien des nouvelles synapses glutamatergiques striatales, en réponse à une injection unique de cocaïne. De façon originale, j'ai pu mettre en évidence que MNK-1, une cible cytoplasmique de ERK impliquée dans la synthèse protéique, était impliquée de façon critique dans le maintien des épines néoformées.

RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. Article 1

1.1 Introduction article 1 :

L'addiction est caractérisée par une série d'adaptations neuronales des réseaux mésocorticolimbiques. Au sein de ces circuits, la plasticité synaptique des SPN du NAc joue un rôle essentiel dans les altérations comportementales induites par les drogues. Une des plasticités largement décrite dans la littérature est la formation de nouvelles épines dendritiques, sièges majoritaires des synapses excitatrices au sein des SPN. Ce mécanisme est largement décrit dans la littérature après des expositions chroniques aux psychostimulants, à la cocaïne plus particulièrement ([pour revue, Russo et al., 2010](#)). Néanmoins, le « destin synaptique » de ces nouvelles épines demeurerait incertain dans la grande majorité de ces études. Plus particulièrement, il n'était pas connu si les épines néoformées pouvaient former un contact synaptique avec les boutons présynaptiques glutamatergiques, ainsi que le mode formation de ces synapses.

Nous avons étudié cet aspect essentiel des remaniements structuraux synaptiques induits par la cocaïne, au sein des réseaux cortico-striataux exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT1. Les éléments pré-synaptiques ont été étudiés chez les souris Knock-In VGLUT1^{venus} qui expriment ce transporteur vésiculaire fusionné au fluorochrome Venus ([Herzog et al., 2011](#)). Ces souris permettent d'observer en microscopie confocale les boutons présynaptiques prenant la forme d'éléments pseudo-ellipsoïdes fluorescents. En complément, les neurones ont été marqués à l'aide d'un fluorochrome membranaire, le DiI permettant l'observation des épines. Les méthodes d'analyse automatique qui permettent d'étudier les contacts entre les têtes d'épines et les boutons pré-synaptiques en 3 dimensions avaient été développées, à mon arrivée au laboratoire, par le Dr Nicolas Heck en collaboration avec le Dr Thomas Boudier. J'ai participé à ce travail en tant qu'étudiant M2 et en début de thèse, en étudiant par cette méthode la synaptogénèse induite par des répétitions chroniques de cocaïne.

A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment *in vivo*

Brain Structure and Function

Received: 1 April 2014 / Accepted: 30 June 2014

September 2015, Volume 220, Issue 5, pp 2953–2966

Nicolas Heck^{123*}, Marc Dos Santos¹²³, Brahim Amairi¹²³, Marine Salery¹²³, Antoine Besnard¹²³⁴, Etienne Herzog⁵⁶, Thomas Boudier³, Peter Vanhoutte¹²³, Jocelyne Caboche¹²³

* Correspondence should be addressed to Nicolas Heck

nicolas.heck@snv.jussieu.fr Tél : (33)+1 44 27 53 26 / Fax : (33)+1 44 27 25 08

1 INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

2 CNRS, UMR 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

3 Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR-S 8246, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France

4 Center for Regenerative Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA

5 Université Bordeaux, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

6 CNRS, Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

Abstract

Addiction can be considered as a form of neuronal adaptation within the reward circuitry. Upon psychostimulant administration, long-term behavioral adaptations are associated with synaptic plasticity and morphological changes of medium spiny neurons (MSN) from the striatum. Increased spine density onto MSN in response to chronic cocaine exposure in mice has been described for more than a decade, but no evidence indicates that these newly formed spines establish connections. We developed a method for labeling, automated detection and morphological analysis of synaptic contacts. Individual labeling of neurons in mice that express the Vesicular GLUamate Transporter-1 fused to Venus allows visualization of both dendritic spines and axonal boutons. Automated three-dimensional segmentation and morphometric analysis retrieve information on thousands of synapses at high resolution. We used this method to demonstrate that new cortico-striatal connections are formed in the striatum upon chronic cocaine. We also show that the cortical input weight is preserved over other cerebral inputs and that the newly formed spines contact pre-existing axonal boutons. Our results pave the way for other studies, since our method can be applied to any other neuronal type as demonstrated herein for glutamatergic connections on pyramidal neurons and Purkinje cells.

Key words: cocaine, striatum, dendritic spine, axonal bouton, 3D segmentation, VGLUT1

INTRODUCTION

The striatum, the entry structure of the basal ganglia, plays a key role in action selection and execution of movements as well as motivation. These diverse functions of the striatum require the processing of glutamate inputs arising from the entire cerebral cortex and thalamus together with dopamine (DA) signals, which converge onto the medium-sized spiny neurons (MSNs), the major population of striatal neurons (Hyman et al., 2006; Sesack and Grace, 2010). Drugs of abuse mimic a reward-related learning signal by artificially increasing extracellular DA in the striatum. This results in abnormal, chemically-driven “learning” of drug consumption, which can escape any control whatever deleterious the consequences may be, thus corresponding to the definition of addiction. It is now well established that these behavioural adaptations rely on long-term adaptation of MSN.

Upon psychostimulant, and more specifically cocaine administration, cortico-striatal synapses undergo long-term plasticity (Lüscher and Malenka, 2011) and the control of glutamate level at this site is the focus of therapeutic strategies (Kalivas and Volkow, 2011). Recently, evidence for a causal link between cortico-striatal plasticity and cocaine-induced long-term behavioural alteration has been established in the protocol of locomotor sensitization, (Pascoli et al., 2011). Furthermore, chronic administration of cocaine is known, for more than a decade, to increase dendritic spine density onto MSNs (Robinson and Kolb, 1999). Nevertheless, an issue that was never addressed so far is whether this increase in dendritic spines, corresponds to increases in cortico-striatal connectivity and thus contributes to long-term adaptations and plasticity of MSNs. In particular, it has not been determined whether the cortical input weight is preserved or changed over inputs from other brain structures. Furthermore, the mode of new synapses formation in the adult brain, which is under debate, remains to be determined. To address these important questions, it is required to visualize both the dendritic spine and the cortical inputs that connect on them. Since it is assumed that

plastic changes associated with learning or addiction imply increase in connectivity, there is indeed a need for techniques that would allow the analysis of both pre and postsynaptic structures (Hübener and Bonhoeffer, 2010; Russo et al., 2010; DeFelipe, 2010; Osten and Margrie, 2013). Here, we developed a method that allows precise three-dimensional (3D) automated morphological analysis of synaptic connections. We use this method to address the questions related to the formation of new connections upon cocaine administration. We demonstrate that new cortico-striatal connections are formed upon chronic cocaine administration and characterize the mode of formation of the synapses. We propose that this method can be adapted to multiple model systems of neuronal plasticity in the brain.

MATERIAL AND METHODS

Slice preparation

Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC), and the experiments were approved by the local ethic committee. Mice were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital and perfused intracardially with 30 ml of paraformaldehyde (PFA) at 1.5% for morphological analysis and 4% for immunofluorescence in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 at 4°C. The brain was removed from the skull and placed for 1 h at 4°C into 1.5 or 4% PFA. Sections of 150µm thickness were cut in the frontal plane using a vibratome (Leica).

Diolistic labeling

50 mg of tungsten beads (1.3 µm diameter, Biorad) were mixed with 3 mg of solid DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Molecular Probes) dissolved

in methylene chloride. DiI-coated beads were resuspended in 3.5 ml water and sonicated to prevent beads aggregation. The beads were coated on the inner surface of a PolyVinylPyrrolidone (Sigma-Adrich) pre-treated teflon tube from which cartridges were cut. Beads were delivered through a 3 μ m pore size filter (Isopore polycarbonate, Millipore) on brain slices using helium gas pressure (150 psi) through the genegun device (BioRad) (Gan et al., 2000). After labeling, slices were kept in buffer at room temperature (RT) for at least 2 hours and mounted in MOWIOL 4-88.

Confocal microscopy image acquisition and deconvolution

Principles for image acquisition and deconvolution have been extensively described in Heck et al., 2012. Image stacks were acquired in 16-bits using a Confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica) equipped with galvo-electric stage placed in a temperature-controlled room. Images were taken with a 1.4 NA objective (oil immersion, 63x, Leica) with pinhole aperture set to 1 Airy Unit, pixel size of 60 nm and z-step of 200 nm. Excitation wavelength was 514 nm and 561 nm, and emission range was 525-540 and 570-620 nm for Venus and red fluorochromes, respectively. Laser intensity and Photomultiplier Tube (PMT) gain was set so the image occupy the full dynamic range of the detector. Metrology measurements were regularly performed on fluorescent beads to confirm proper alignment of lasers, laser powers and field homogeneity, using MetroloJ plugin (<http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:metroloj:start>). Deconvolution with experimental PSF from fluorescent beads using Maximum Likelihood Estimation algorithm was performed with Huygens 3.7 software (Scientific Volume Imaging). 150 iterations were applied in classical mode, background intensity was averaged from the voxels with lowest intensity and signal to noise ratio values were set to a value of 15 for Venus and 20 for DiI.

Segmentation procedure

Image segmentation and analysis was performed in ImageJ (Schneider et al., 2012). The segmentation procedure functions has been implemented in the 3D ImageJ Suite plugins (http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:stacks:3d_ij_suite:start) (Ollion et al., 2013), and automatized in macros. First, local maxima are computed within a radius of 4 voxels in xy axis and 3 voxels in z axis. We determined that an intensity threshold of 5000 was adequate to eliminate all local maxima belonging to background. The segmentation procedure is based on region growing using local maxima as seeds. First a 3D watershed is computed to specify zones dedicated to each object. In each zone, radial distribution centered on the seed is computed. For this, concentric spheres centered on local maxima define layers in which mean intensity is measured. The results are plotted and a gaussian fit is performed. The standard deviation of the gaussian curve is used to define the local threshold applied to the object. Here, the threshold used corresponds to a range of 4 times the value of the standard deviation, which allows a complete and precise extraction of the object. Once the local threshold is defined, the segmentation process uses the local maximum as a seed and examines the 26 neighbouring voxels; the selected voxels are then used as new centers around which neighbouring voxels are further examined. The criteria for adding voxels belonging to the objects were as following: first, voxels with intensity above the local threshold, second: voxel with intensity lower than intensity of the previously selected neighbouring voxel, third: voxels are not added individually but as block only if all neighboring voxels verify previous criteria. The second criteria prevented the selection of voxels from adjacent objects, even if watershed is primarily performed. The third criteria proved to be important to avoid filamentous extensions on extracted objects.

For dendritic spine segmentation, the software Neuronstudio (version 0.9.92) (Rodriguez et al., 2008) was used to reconstruct the dendrite and detect dendritic spines. Neuronstudio uses

isodata segmentation for spines extraction, coupled to a specific layer-based voxel clustering, and reliably identifies the center of mass of the head spines. Manual correction was required for a minority of spines, in this case the headspine center of mass was user-defined. Data generated by Neuronstudio are saved in text file format, which is imported into ImageJ. The local maximum in the vicinity of the center of mass of each head spine is found. The segmentation process described above is then performed to accurately segment spine heads. For each striatal neuron, a dendritic segment of 50 to 70 μm in length and distant from at least 50 μm from the soma or after the first branching point was considered. No type classification (thin/mushroom) was used since it is not applicable to MSNs (Wilson et al., 1983).

Synapse identification and morphological analysis

Measurements were performed in the three dimensions with 3D Roi Manager from 3D ImageJ Suite. The 3D smallest border - to - border distance in between each head spine and all VGLUT1 objects are computed and the VGLUT1 objects found at a distance below a user-defined threshold is selected. Here the threshold value was set to 0, meaning that the two objects must overlap. Length of the spine was estimated by measuring the distance between the geometrical center of the head spine segmented by our method and the surface of the vertices from the dendrite model reconstructed in Neuronstudio and imported in ImageJ. Dendrite diameter was estimated as the mean diameter of the vertices calculated for each dendrite. 3D surface rendering was obtained with 3D viewer plugin.

Immunofluorescence and analysis

Brain slices were treated for 30 min with 0.1% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Mouse monoclonal antibody directed against synaptophysin (1/1000, SVP-38, Sigma-Aldrich) or bassoon (1/1000, SAP7F407, Stressgene) was incubated in 0.01X Triton

overnight at 4°C. Sections were washed in PBS and incubated with the secondary antibody coupled to Alexa561 (anti-mouse 1/500, Invitrogen) 2 hours at RT.

Western Blot

Mice were sacrificed and the brain immediately frozen in liquid nitrogen. The frozen brains were cut on a microtome until the region of interest appeared and striata were punched and stored in individual tubes at -80°C until they were homogenized by sonication in a 1% SDS (v/v) solution in water at 100°C containing 1 mM sodium orthovanadate, placed for 5 min at 100°C and stored at -80°C. Protein concentrations were determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL) and equal amounts of protein (8 µg per lane) were separated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Membranes were blocked 1 h at RT in blocking solution (Rockland) half diluted in PBS with 1% Tween-20. Membranes were then incubated in same blocking solution overnight at 4°C with goat polyclonal anti-VGLUT1 (1/5000, a kind gift from Dr. El Mestikawy) and mouse monoclonal anti-β-tubulin (1/5000, Sigma Aldrich). Membranes were rinsed three times in TBS-tween and then incubated for 1 h at RT with 700 nm fluorochrome coupled anti-goat (1/5000, Rockland) and 800 nm fluorochrome-coupled anti-mouse (1/5000, Rockland) antibodies and immunoreactive bands were visualized with Odyssey scanner (Li-Cor). The densitometry of the relevant immunoreactive bands was quantified using ImageJ and normalized to the intensity of the corresponding tubulin signal, which serves as a loading control.

Cocaine treatment

Locomotor activity was measured by using rectangular activity boxes (20 x 15 x 25 cm) (Immetronic) located in a soundproof testing room with low luminosity. Locomotor activity was counted as travels detected by interruption of photocell beams located across the long axis 15 mm above the floor. Each box was connected to an electronic interface for data collection. Locomotor sensitization was evaluated as a recording of locomotor activity 30 min before and 30 min after the saline or cocaine injection. Mice were treated with saline and placed in the activity box for 60 min during 3 consecutive days for habituation before the actual experiments were performed. Mice were then repeatedly treated with saline or cocaine (20 mg/kg, i.p., every day) for 5 consecutive days, and sacrificed on the 6th day for morphological analysis. Cocaine hydrochloride (Sigma-Aldrich) was dissolved in a 0.9% NaCl (w/v) aqueous solution (saline).

Statistical analysis

Data generated were imported in GraphPad Prism for statistical analysis. Values and histograms are means $\pm$ S.E.M. Box plots display median, interquartile distances and 10-90 percentiles. Student t-test, Mann-Whitney test or analysis of variance were used. Significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

A new 3D automated method allows the morphological analysis of dendritic spines and VGLUT1-positive pre-synapses

We aimed at determining whether spine growth upon cocaine treatment corresponds to an increase in cortico-striatal connectivity. To this end, we developed a method to visualize

dendritic spines connected to cortical boutons and analyze the synaptic contacts. Neurons were labeled with DiI in VGLUT1^{venus} knock-in mice. These mice express the Vesicular GLUamate Transporter 1 (VGLUT1), fused to the fluorescent protein Venus under VGLUT1 endogenous promoter (Herzog et al., 2011). VGLUT1 is a transmembrane protein of the presynaptic vesicles that uptake glutamate into vesicles. Hence all glutamatergic, VGLUT1 positive, boutons can be observed at any depth of the tissue. Moreover, the high brightness of Venus ensures proper imaging without need for enhancement by antibodies (Shaner et al., 2005). Hence, diolistic labeling of individual neurons with red DiI allows the observation of dendrites bearing spines within a tissue volume where all VGLUT1-positive presynapses can be seen (Fig. 1).

The fusion protein VGLUT1^{venus} is replacing VGLUT1 through homologous recombination at the endogenous *vglut1* locus. VGLUT1^{venus} expression and function are perfectly matching those of the wild type littermates (Herzog et al., 2011). Since our method relies on the observation of the presynapses in knock-in mice, we further characterized the identity of the VGLUT1^{venus} objects in the striatum. The identity of the VGLUT1 objects was confirmed by immunostaining directed against pre-synaptic markers. Immunostaining for both synaptophysin and bassoon in slices from VGLUT1^{venus} mice showed extensive colocalization (Fig. 2a, b). 72% (n = 500 synaptophysin-positive out of 694 VGLUT1 objects from 3 mice) and 82% (n = 1619 bassoon-positive out of 1970 VGLUT1 objects from 3 mice) of VGLUT1 objects were found to be synaptophysin-positive and bassoon-positive, respectively. Complete objects colocalization percentage was not found since immunostaining cannot ensure the labeling of all elements, leading to highly variable number of false negatives. Synaptophysin is localized in the synaptic vesicle membrane, while bassoon is found in the active zone that is facing the postsynaptic density. Observations (Fig. 2c, d) and measurements (Fig. 2e) were in accordance with these subcellular localizations. Center to center distance from VGLUT1

objects to synaptophysin objects was below spatial resolution of the optical system, which indicates a perfect colocalization. A shift corresponding to the gap between the synaptic vesicle cluster and the active zone centers was observed between bassoon- and VGLUT1^{venus}-positive objects. Moreover, the size of VGLUT1 objects after segmentation (Fig. 2f) is consistent with the size reported in studies conducted with serial electron microscopy (Doig et al., 2010). The diolistic labeling allowed for the observation of axons, although axonal labeling is a rarer event than dendritic labeling. When cortical axons were labeled, the VGLUT1^{venus} signal was located within varicosities of the axon (Fig. 2g, h), which further confirmed that VGLUT1 objects corresponds to axonal boutons.

In order to obtain a precise three-dimensional analysis of synaptic contacts, we setup an automated method for pre and postsynapses segmentation followed by detection of contacts. Since VGLUT1 pre-synaptic elements vary in size and intensity, classical intensity thresholding was not effective (Meijering, 2012). Hence a segmentation workflow was established, which allows for the detection of all objects and precise identification of voxels belonging to each object (Fig. 3a-i and see Methods section). Object shape is extracted in 3D by exploring the intensity levels around the local maximum to determine a local threshold specific to each object, then the voxels belonging to the objects are iteratively selected according to criteria that ensure separation of adjacent objects and faithfully delineate objects shape. Dendritic spines detection was performed with Neuronstudio software (Fig. 3j), and the coordinates of the center of mass of each spine head were imported in ImageJ. Local maximum in the vicinity of the center of mass identified, and segmentation was then carried out according to the same procedure as for VGLUT1 objects (Fig. 3k). The result of our segmentation protocol is a precise extraction of the head of the spines. This method allowed the automated segmentation of all VGLUT1 axonal boutons (Fig. 4b) and head spines (Fig. 4c) from confocal images despite the high density of objects (Fig. 4a), which renders manual

detection unachievable. After segmentation, the border - to - border distance between each head spines and each VGLUT1 objects is computed and pairs of pre and post-synapses are identified when the distance is below a user-defined threshold. Here we considered synapses when there was no gap between VGLUT1 and head spines (Wouterlood et al., 2007). An image is then generated, which contains the selected VGLUT1s and spine heads along with the dendritic path (Fig. 4d). Beside the image, 3D quantitative morphological information is computed on each object.

Observation of synaptic contacts on striatal neurons and comparison to hippocampal pyramidal and cerebellar Purkinje cells

MSNs receive afferences from VGLUT1-positive neurons of the neocortex and from VGLUT2-positive neurons of the thalamus. It should however be mentioned that neurons from basolateral nucleus of the amygdala as well as from the hippocampus express VGLUT1 and project to the striatum (Herzog et al., 2001; Fremeau et al., 2001; Britt et al., 2012; MacAskill et al., 2012). Nevertheless, the afferents from neocortex represent the vast majority of VGLUT1 inputs on MSNs (Groenewegen et al., 1999). On the other hand, glutamatergic neurons from thalamus projecting to the striatum exclusively express VGLUT2 (Fremeau et al., 2004), and as such are excluded from our study. Finally, the VGLUT1 boutons form synapses exclusively on heads of dendritic spines of the MSNs (Doig et al., 2010; Huerta-Ocampo et al., 2013). Altogether, the results brought by our automated method, which identifies VGLUT1-positive synaptic contacts on the heads of half of the dendritic spines (Fig. 4d), correspond to those expected from the literature.

As a matter of fact, the percentage of spines connected with VGLUT1 objects was 54% +/- 1.6, which fits exactly with the data from serial electron microscopy (Fig. 5a) (Doig et al.,

2010; Huerta-Ocampo et al., 2013), where half of the spines contact VGLUT1 positive cortical presynapses, while the other half contacts VGLUT2 positive thalamic afferences. To further confirm the specificity of the association of VGLUT1 boutons with spine heads, the method was applied on other cell types for which the awaited percentage is closer to 100%. Analysis of biocytin-filled Purkinje cell from the cerebellum (Fig. 5b) and diolistically labeled pyramidal neuron from CA1 region of the hippocampus (Fig. 5c) retrieved percentage of spines in contact with VGLUT1 objects of $95.9\% \pm 1.2$ and $90.9\% \pm 2.7$, respectively. These results argue for the specificity of our automated method, since such percentages are in agreement with the current knowledge on the anatomy of the VGLUT1 afferences on these neuronal types.

Cocaine-induced locomotor sensitization is associated with corticostriatal synapse formation

We then applied this 3D automated method to DiI-labeled MSN from VGLUT1^{venus} mice chronically treated or not with cocaine. To characterize a potential increase of cortico-striatal connectivity by cocaine, we injected VGLUT1^{venus} mice daily with a fixed dose of cocaine for 5 days, or saline as negative controls, a procedure that induces a long-lasting behavioral adaptation to cocaine called locomotor sensitization (Fig. 6a). Synapses of MSNs from nucleus accumbens in the core region were then analyzed on striatal sections on the 6th day, therefore corresponding to a withdrawal period of 24 hours. (Fig. 6b).

Our 3D automated method allowed the analysis of 5978 synaptic contacts among 11222 observed spines. In accordance with previous studies (Robinson and Kolb, 1999; Shen et al., 2009; Dumitriu et al., 2012; Alcantara et al., 2011), an increase in spine density was observed (Fig. 6c). Furthermore, an increase in cortico-striatal connections was measured as well (Fig.

6d), which confirmed that new cortico-striatal synapses were generated by repeated cocaine administration. Importantly, the percentage of spines connected to VGLUT1 remained constant between saline and cocaine conditions (Fig. 6e), indicating that the stoichiometry of the two main inputs onto MSN, which originate from the cortex and thalamus, is preserved when connectivity increases upon cocaine administration. Further analysis showed that dendrite diameter, spines volumes and length after cocaine treatment were similar to controls (Fig. 6f-j). Analysis of spine length distribution showed that there were no filopodia, suggesting that the new spines were mature (Fig. 6h, j). In addition, dendritic spines connected to cortical VGLUT1 presynapses were larger than others in both saline and cocaine conditions (Fig. 6k).

We measured VGLUT1 objects density and VGLUT1 protein expression level in the nucleus accumbens from mice exposed to chronic cocaine injections. The density in the tissue remained constant (Fig. 7a). Moreover, the expression level of VGLUT1 protein measured by western blot remained unchanged (Fig. 7b). Altogether, these results indicate that new spines contact pre-existing presynaptic elements. If this were to be the case, the occurrence of VGLUT1 objects in connection with two spines, which has been reported in electron microscopy studies (Doig et al., 2010), should be higher on dendrites from cocaine treated animals. In agreement with this hypothesis, the percentage of spines in contact with a common VGLUT1 was indeed increased in cocaine-treated groups for both experiments (Fig. 7c). It is likely that the frequency of those events is underestimated; since a single neuron was labeled, it was not possible to detect if presynapses also contacted spines of a dendrite from neighbouring neuron. Taken together, these results support a model in which the new spines establish contacts with axonal boutons that are already in place (Fig. 7d).

DISCUSSION

A new versatile method for the detection and morphological study of VGLUT1-positive synapses

We established a new method for 3D automated morphological analysis of connected glutamatergic pre and postsynaptic elements. Since VGLUT1 positive presynapses are specifically labeled, a defined set of glutamatergic synapses can be analyzed. One strength of our method is that the knock-in strategy enables the labeling of all VGLUT1 presynapses at all depth in the tissue. This is essential because imaging dendrites often imply to image over consequent depth in the tissue, which is the case for MSNs which dendritic tree occupy large volume (van Dongen et al., 2008). Moreover, labeling of postsynaptic neuron can be achieved by any method (e.g. diolistic, intracellular filling, transfection). Hence technical requirements for labeling are easy to meet, and the method can be applied to various neuronal types from different brain regions.

It is noteworthy that our method is by no mean an application of Peter's rule, which proposes to localize synapses based on axon-dendrite proximity (Stepanyants and Chklovskii, 2005). Peter's rule does not retrieve reliable results (Mishchenko et al., 2010) and specific labeling is required for proper detection of synapses (Wickersham and Feinberg, 2012). This is achieved by our approach that accurately detects contacts between identified presynaptic elements and the heads of dendritic spines. Since all VGLUT1 presynapses are labeled with the knock-in strategy, the ones connected to the dendritic spines need to be properly selected. The percentage of connections that we found on the different neuronal types were found to match with electron microscopy studies, which brings confirmation of the reliability of the association of pre and postsynaptic elements automatically performed by our method.

To our knowledge there is no other method that allows the morphological analysis of both pre and postsynaptic elements along the whole dendritic path *in vivo*. Previous attempts were made to study dynamics of pre and postsynaptic structures by intracellular filling of connected neurons, but restricted the experiment to slices, while very sparse colabeling of connections was obtained (Becker et al., 2008). Immunolabeling of the presynaptic elements combined with postsynaptic neuronal labeling has been used (Spiga et al., 2011; Rotterman et al., 2014), but one important drawback of this technique is that it may have a high rate of false positive, since antibody penetration can be a limiting factor while the use of thick sections is required to image whole dendrites. Recently, *in vivo* viral transfection in the thalamus allowed the observation of thalamic axonal boutons on spines of cortical neurons (Schoonover et al., 2014). However, it is difficult to estimate whether viral transfection ensures the labeling of all synapses along one dendrite. Tracing with modified rabies viruses permits the labeling of pre and postsynaptic neurons but an in-depth analysis of pre and post synapses has never been achieved with this method (Wickersham et al., 2013). Another approach called GRASP has been developed for the detection of synapses (Kim et al., 2011), in which truncated green fluorescent protein in fusion with pre and postsynaptic proteins acquire fluorescence when both proteins interact. However, fluorescent spots indicate synapses without any information about their morphology. Recently, a viral-based method allowed for labeling of axons and postsynaptic neurons in *Drosophila* (Chen et al., 2014), the extension of this method to rodents remains to be developed. These methods are complementary to ours, but require careful *in vivo* viral transfections. In the case of the GRASP method, cotransfection should be carefully avoided. It is noteworthy that if those methods would be improved so pre and postsynaptic labeling would be achieved, our automated method for the segmentation and detection of synaptic contacts could be applied and would allow complete 3D analysis. The only method allowing complete morphological analysis of synapses is electron microscopy,

but it restricts the observation to small portions of dendrite unless performed on very specific serial electron microscopes (Helmstaedter and Briggman, 2008).

In conclusion, our method allows detailed 3D morphological analysis on thousands of synapses, ensuring large scale and high sampling analysis, while being easily applicable to various neuronal types.

Formation of cortico-striatal synapses under cocaine-induced locomotor sensitization

Since the pioneer study from Robinson and Kolb (1999), it is known that psychostimulants administration leads to an increase in spine density on MSNs in the ventral striatum. This increase has been documented for several cocaine administration protocols (Shen et al., 2009; Dumitriu et al., 2012). However critical questions remain, and whether the increase of spine density corresponds to an enhancement of connectivity has so far been left aside, with the exception of one electron microscopy study that showed a global increase of not identified synapses (Alcantara et al., 2011). Here, we bring evidence that not only spine density but also the density of cortico-striatal synapses is increased 24 hours after a chronic cocaine treatment that induce locomotor sensitization. The analysis of head spines volumes and spine lengths shows that the newly formed spines have mature morphologies, and are associated with VGLUT1 positive axonal boutons. Recent studies have shown that behavioural adaptation induced by cocaine rely on long-term plasticity at synapses formed by neurons of the prefrontal cortex and the ventral hippocampus projecting onto MSNs from nucleus accumbens (Pascoli et al., 2011 ; Britt et al., 2012 ; Pascoli et al., 2014). Occlusion of plasticity at cortico-striatal and hippocampo-striatal synapses, with optogenetic tools, abolishes the behavioural output induced by cocaine. The increase in density of VGLUT1 synaptic contacts that we observed indicates an increase of connections of MSNs, which could be part of the mechanism of the synaptic plasticity implied. Nevertheless, metaplasticity has to be

considered, especially the synaptic content of glutamate receptors subtypes, since chronic cocaine induces the generation of silent synapses (Huang et al., 2009 ; Lee et Dong, 2011).

Another important result arising from our analysis is that the stoichiometry of the two main inputs on MSNs is preserved when connectivity increases upon cocaine administration. Indeed, the percentage of dendritic spines connected to VGLUT1 presynapses was similar in both saline and cocaine conditions. Hence, in both naïve and cocaine-treated mice, half of the head spines receive VGLUT1-positive cortical afferents while the other half receives VGLUT2-containing thalamic afferents (Doig et al., 2010). This implies that VGLUT2-containing thalamic afferents increase their synaptic connections on MSNs under cocaine similarly to the VGLUT1-positive cortical and hippocampal afferents.

Mode of synapse formation

Two models have been proposed to explain the mode of synapse formation in the adult brain (Holtmaat and Svoboda, 2009). On the one hand, the growing spine could instruct the formation of a new presynaptic element from the axon; on the other hand the newly formed spines could contact already existing presynaptic elements. If the first model were to be right, an increase in VGLUT1 objects density would have been observed along with the spine density increase. Our data are not compatible with the first model and support the second one (Fig 7d). Moreover, the occurrence of multiple spines connecting a common VGLUT1-positive presynapse was higher under cocaine treatment. It is likely that the frequency of those events is underestimated, since a single dendrite was labeled, thus it was not possible to identify presynapses contacted by spines from adjacent dendrites. However, the increase in percentage of spines converging to a common presynapse brings strong support to the second

model of synapse formation. So far, only one *in vivo* study directly analyzed the mode of synapse formation in the adult mouse brain. Correlative electron microscopy following fluorescent microscopy of spines from somatosensory cortex allowed Knott et al. 2006 to observe that new spines contact presynaptic elements connected to another spine, thus concluding to a similar mode of synapse formation. Such a mechanism would favor synchronization, which is critical for the integration of cortical inputs by MSNs leading to firing (Mahon et al., 2007).

Taken together, our results show that new cortico-striatal synapses are generated in correlation with locomotor sensitization induced by cocaine. Furthermore, the mode of synapse formation seems to correspond to a spine growth leading to contact and stabilization with pre-existing axonal boutons. We propose that our data showing formation of new cortico-striatal connections in response to chronic cocaine should be considered in the design of therapeutic approaches in addiction.

REFERENCES

- Alcantara AA, Lim HY, Floyd CE, Garces J, Mendenhall JM, Lyons CL, Berlanga ML (2011) Cocaine- and morphine-induced synaptic plasticity in the nucleus accumbens. *Synapse* 65(4):309-320.
- Becker N, Wierenga CJ, Fonseca R, Bonhoeffer T, Nägerl UV (2008) LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron* 60(4):590-597.
- Britt JP, Benaliouad F, McDevitt RA, Stuber GD, Wise RA, Bonci A (2012) Synaptic and behavioral profile of multiple glutamatergic inputs to the nucleus accumbens. *Neuron* 76(4):790-803.
- Chen Y, Akin O, Nern A, Tsui CY, Pecot MY, Zipursky SL (2014) Cell-type-specific labeling of synapses in vivo through synaptic tagging with recombination. *Neuron* 81(2):280-293.
- DeFelipe J (2010) From the connectome to the synaptome: an epic love story. *Science* 330(6008):1198-1201.
- Doig NM, Moss J, Bolam JP (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30(44):14610-14618.
- Dumitriu D, Laplant Q, Grossman YS, Dias C, Janssen WG, Russo SJ, Morrison JH, Nestler EJ (2012) Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *J Neurosci* 32(20):6957-6966.
- Freneau RT Jr, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ, Bellocchio EE, Fortin D, Storm-Mathisen J, Edwards RH (2001) The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 31(2):247-60.

Freneau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH (2004) VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci* 27(2):98-103.

Gan WB, Grutzendler J, Wong WT, Wong RO, Lichtman JW (2000) Multicolor "DiOlistic" labeling of the nervous system using lipophilic dye combinations. *Neuron* 27(2):219-225.

Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P (1999) Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci* 877:49-63.

Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct* 217(2):421-434.

Helmstaedter M, Briggman KL, Denk W (2008) 3D structural imaging of the brain with photons and electrons. *Curr Opin Neurobiol* 18(6):633-641.

Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2001) The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *Jneurosci* 21(22):RC181

Herzog E, Nadrigny F, Silm K, Biesemann C, Helling I, Bersot T, Steffens H, Schwartzmann R, Nägerl UV, El Mestikawy S, Rhee J, Kirchhoff F, Brose N (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *Jneurosci* 31(43):15544-15559.

Holtmaat A, Svoboda K (2009) Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10(9):647-58.

Huang YH, Lin Y, Mu P, Lee BR, Brown TE, Wayman G, Marie H, Liu W, Yan Z, Sorg BA, Schlüter OM, Zukin RS, Dong Y (2009) In vivo cocaine experience generates silent synapses. *Neuron* 63(1):40-47.

Hübener M, Bonhoeffer T (2010) Searching for engrams. *Neuron* 67(3):363-371.

Huerta-Ocampo I, Mena-Segovia J, Bolam JP (2013) Convergence of cortical and thalamic input to direct and indirect pathway medium spiny neurons in the striatum. *Brain Struct Funct*. 2013 Jul 6. DOI 10.1007/s00429-013-0601-z

Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29:565-598.

Kalivas PW, Volkow ND (2011) New medications for drug addiction hiding in glutamatergic neuroplasticity. *Mol Psychiatry* 16(10):974-986.

Kim J, Zhao T, Petralia RS, Yu Y, Peng H, Myers E, Magee JC (2011) mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat Methods* 9(1):96-102.

Knott GW, Holtmaat A, Wilbrecht L, Welker E, Svoboda K (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9(9):1117-1124.

Lee BR, Dong Y (2011) Cocaine-induced metaplasticity in the nucleus accumbens: silent synapse and beyond. *Neuropharmacology* 61(7):1060-1069.

Lüscher C, Malenka RC (2011) Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69(4):650-663.

MacAskill AF, Little JP, Cassel JM, Carter AG (2012) Subcellular connectivity underlies pathway-specific signaling in the nucleus accumbens. *Nat Neurosci* 15(12):1624-6.

Mahon S, Deniau JM, Charpier S (2007) Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends in Neurosci* 27(8):460-467.

Meijering M (2012) Cell segmentation: 50 years down the road. *Signal Process Mag IEEE* 29(5): 140–145.

Mishchenko Y, Hu T, Spacek J, Mendenhall J, Harris KM, Chklovskii DB (2010) Ultrastructural analysis of hippocampal neuropil from the connectomics perspective. *Neuron* 67(6):1009–1020.

Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T (2013) TANGO: A Generic Tool for High-throughput 3D Image Analysis for Studying Nuclear Organization. *Bioinformatics* 29(14):1840-1841.

Osten P, Margrie TW (2013) Mapping brain circuitry with a light microscope. *Nat Methods* 10(6):515-523.

Pascoli V, Turiault M, Lüscher C (2011) Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481(7379):71-75.

Pascoli V, Terrier J, Espallergues J, Valjent E, O'Connor EC, Lüscher C (2014) Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature*. 509(7501):459-464.

Robinson TE, Kolb B (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11(5):1598-1604.

Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL (2008) Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One* 3(4):e1997.

Rotterman TM, Nardelli P, Cope TC, Alvarez FJ (2014) Normal distribution of VGLUT1 synapses on spinal motoneuron dendrites and their reorganization after nerve injury. *J Neurosci* 34(10):3475-392.

Russo SJ, Dietz DM, Dumitriu D, Morrison JH, Malenka RC, Nestler EJ (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 33(6):267-276.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW(2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9(7):671-675.

Schoonover CE, Tapia JC, Schilling VC, Wimmer V, Blazeski R, Zhang W, Mason CA, Bruno RM (2014) Comparative Strength and Dendritic Organization of Thalamocortical and Corticocortical Synapses onto Excitatory Layer 4 Neurons. *J Neurosci* 34(20):6746-58.

Sesack SR, Grace AA (2010) Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology* 35(1):27-47.

Shaner NC, Steinbach PA, Tsien RY (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* (12):905-909

Shen HW, Toda S, Moussawi K, Bouknight A, Zahm DS, Kalivas PW (2009) Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J Neurosci* 29(9):2876-2884.

Spiga S, Acquas E, Puddu MC, Mulas G, Lintas A, Diana M (2011) Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using confocal microscopy. *Brain Struct Funct* 216(3):171-182.

Stepanyants A, Chklovskii DB (2005) Neurogeometry and potential synaptic connectivity. *Trends Neurosci* 28(7):387-394.

van Dongen YC, Mailly P, Thierry AM, Groenewegen HJ, Deniau JM (2008) Three-dimensional organization of dendrites and local axon collaterals of shell and core medium-sized spiny projection neurons of the rat nucleus accumbens. *Brain Struct Funct* 213(1-2):129-147.

Wickersham IR, Feinberg EH (2012) New technologies for imaging synaptic partners. *Curr Opin Neurobiol* 22(1):121-127.

Wickersham IR, Sullivan HA, Seung HS (2013) Axonal and subcellular labelling using modified rabies viral vectors. *Nat Commun* 4:2332.

Wilson CJ, Groves P-M, Kitai S-T, Linder J-C (1983) Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J Neurosci*. 3(2):383-388.

Wouterlood FG, Boekel AJ, Meijer GA, Beliën JA (2007) Computer-assisted estimation in the CNS of 3D multimarker 'overlap' or 'touch' at the level of individual nerve endings: a confocal laser scanning microscope application. *J Neurosci Res* 85(6):1215-1228.

AKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Pierre and Marie Curie (UPMC), Agence Nationale pour la Recherche (ANR, ANR-08-BLAN-0287) and Fondation Jérôme Lejeune and the Labex Bio-Psy cluster of excellence. We wish to thank Dr. Susanne Bolte and Richard Schwartzmann from the Cellular Imaging facility of the IBPS (Institut de Biologie Paris-Seine) for expert assistance on microscopy and metrological analysis of the setup. We thank Dr. Kätlin Slim for the care of the VGLUT1^{venus} mouse line and Dr. Ann Lohof for intracellular filling of Purkinje cells. All authors report no biomedical financial interests or potential conflicts of interest.

Competing Financial Interests Statement

The authors declare no competing financial interests

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Labeling of dendrite and spines in VGLUT1^{venus} mouse allows the observation of pre and post-synapses

Montage of the stack of images from confocal microscopy, which appears in 3D view at the top left. Each image is separated by a z-step of 0,2  montage of the stack of images from confocal microscopy, which appears in 3D view at the top left. Each image is separated by a z-step of 0,2 conflicts of in

Fig. 2 VGLUT1 objects are presynaptic elements

Immunostaining for (a) synaptophysin (red) or (b) bassoon (red) in ventral striatum from VGLUT1^{venus} (green) mice shows extensive colocalization. **c-d:** Close-up from (a) and (b) confirms that synaptophysin (a) and bassoon (b) colocalize with VGLUT1^{venus} objects. **a-d**

are single planes from the 3D confocal image. **e**: 3D measurements of the distance between the centers of the objects confirm observations shown in (c) and (d). Center to center distance between synaptophysin and VGLUT1 is lower than microscope resolution, indicating perfect colocalization (n = 988 distances from 3 mice, median = 0.164 μm). Center to center distance between bassoon and VGLUT1 is higher, since bassoon is localized in the active zone (n = 1045 distances from 3 mice, median = 0.301 μm). **f**: 3D measurements of volumes from segmented VGLUT1^{venus} objects (n = 2175 objects from 4 mice, median = 0.166 μm^3). **g**: DiI labeled axon (red) was traced with neuronstudio software and VGLUT1 objects (green) colocalizing with the axon were detected. The image is the maximum intensity projection from the 3D confocal image containing the traced axon and the colocalizing VGLUT1 objects. **h**: Close-ups from **g**. The line profile plot gives intensities measurements along the line in both DiI and Venus channels for a single plane from 3D confocal image. The graphic highlights the plasma membrane localization of the lipophilic DiI and the localization of Venus signal within the axonal bouton. Scale bars a, b, h = 1 μm c, d = 300 nm g = 5 μm .

Fig.3: Automated 3D segmentation of VGLUT1 objects and head spines

The method for segmentation is illustrated with one single plane from 3D image stack, but all algorithms used work in 3D. **a**: Original single plane from 3D confocal image showing two adjacent VGLUT1 objects. **b**: Voxels corresponding to intensity local maxima are identified in each object. **c**: Watershed algorithm defines zones in the image. Each zone contains one object. **d**: Local maxima are shown on the original image (black voxel). False colors in the original image indicate voxels intensities. **e**: Surface plot quantifying the voxel intensities in the single confocal plane to illustrate the difference in intensity of the objects. Hence, a specific threshold value needs to be determined for each object in order to reliably segment

them. **f:** To determine local threshold specific to each object, 3D radial distribution of voxel mean intensities measured between concentric spheres centered on the local maximum is computed. The results for the two VGLUT1 objects are plotted (black line). A gauss curve is fitted on the plot (red dotted line) and the standard deviation computed (red horizontal line). The intensity threshold (green horizontal line) is defined for the gauss curve level which width is 4 times the standard deviation value. This procedure allows the determination of a specific threshold for each object (green values). **g:** Starting from local maximum, voxels belonging to the object are iteratively identified. The criteria used are described in Methods section and include local threshold value as defined in f. This procedure allows the accurate extraction of objects despite their difference in intensity. **h:** Original image in false colors with green outlines that show the outer border of the segmented objects. Note that the algorithm of object extraction allows an accurate separation of both objects. **i:** 3D view of the original objects (green) and mesh surface rendering of the segmented objects (red, white). **j:** Original single plane from confocal 3D image showing two dendritic spines. Neuronstudio software allows the modeling of the dendritic path as a series of vertices (green circles), detection of spines (red circles) and identification of the center of mass of head spines (red dots in circles). **k:** The localization of the local maximum in the neighborhood of the head spines center of mass is computed. Local maximum are shown on the original image (black voxel). False colors in the original image indicate voxels intensities. Starting from the local maximum, the segmentation algorithm reliably identifies the voxels belonging to the headspine. 3D view confirms that segmented head spines fit the 3D original image.

Fig. 4: 3D detection and morphological analysis of contacted axonal boutons and dendritic headspines

a: 3D rendering of a close-up from confocal microscopy images showing a striatal dendritic segment with spines labeled by DiI (red) within VGLUT1^{venus} (green). All VGLUT1 positive presynapses can be observed. Some presynaptic elements are seen in contact with dendritic spines. **b:** Each VGLUT1 presynapse from the tissue volume are segmented and identified through our custom segmentation workflow. A different color has been attributed to each object. **c:** The heads of every dendritic spine are detected and accurately segmented. The result (pink) is shown merged with the original image (red). **d:** The smallest border – to – border distances between each headspine and VGLUT1 presynapse are computed, and associated pre and postsynaptic elements are detected. An image including the dendrite and the associated presynapse is generated. The close-up illustrates the position for VGLUT1 presynapses on the head of the spines. Not all spines are connected since MSNs are also innervated by VGLUT2-positive thalamic afferents. Scale bar = 1 μ m.

Fig. 5: The percentage of dendritic spines connected with VGLUT1 objects is in accordance with neuroanatomical studies and confirms the specificity of the automated 3D detection

a: Medium spiny neuron (MSN) from dorsomedial striatum labeled with diolistic method. Close-up shows a dendritic segment with the VGLUT1 presynapses (green) connected to the dendritic spines (red). The 3D automated detection reveals that about half the spines are in contact with VGLUT1 boutons. **b:** Purkinje cell from the cerebellum stained by intracellular filling in slice. Close-up shows a dendritic segment with the VGLUT1 presynapses connected to the dendritic spines. **c:** Pyramidal neuron from the CA1 region of the hippocampus labeled with the diolistic method. Close-up shows a dendritic segment with the VGLUT1 presynapses

connected to the dendritic spines. For both pyramidal neuron and purkinje cell, all dendritic spines are contacted by a VGLUT1 bouton. Scale bar = 20 μ m

Figure 6: Chronic cocaine induce cortico-striatal synapses formation by contact of new spines on pre-existing VGLUT1 boutons

a: Locomotor sensitization upon repeated administration cocaine (20 mg/kg) in VGLUT1^{venus} mice. Note the progressive increase in locomotor activity upon repeated injection of the same dose of cocaine. **b:** The formation of new cortico-striatal connections was assessed on day 6 at the end of this paradigm of locomotor sensitization. Dendritic segments (red) from saline (upper panel) and cocaine (lower panel) treated mice, with the VGLUT1 boutons (green) connected to the dendritic spines of MSNs from the core of the nucleus accumbens. **c:** Spine density was measured using the automated detection and showed an increase in cocaine-treated mice when compared to saline (t-test $p < 0.0001$). **d:** The density of spines connected to VGLUT1 presynapses is increased in cocaine compared to saline treated-mice (t-test $p = 0.0038$). **e:** The percentage of spines connected to a VGLUT1 bouton is similar between saline- and cocaine- treated mice (t-test $p = 0.6284$).

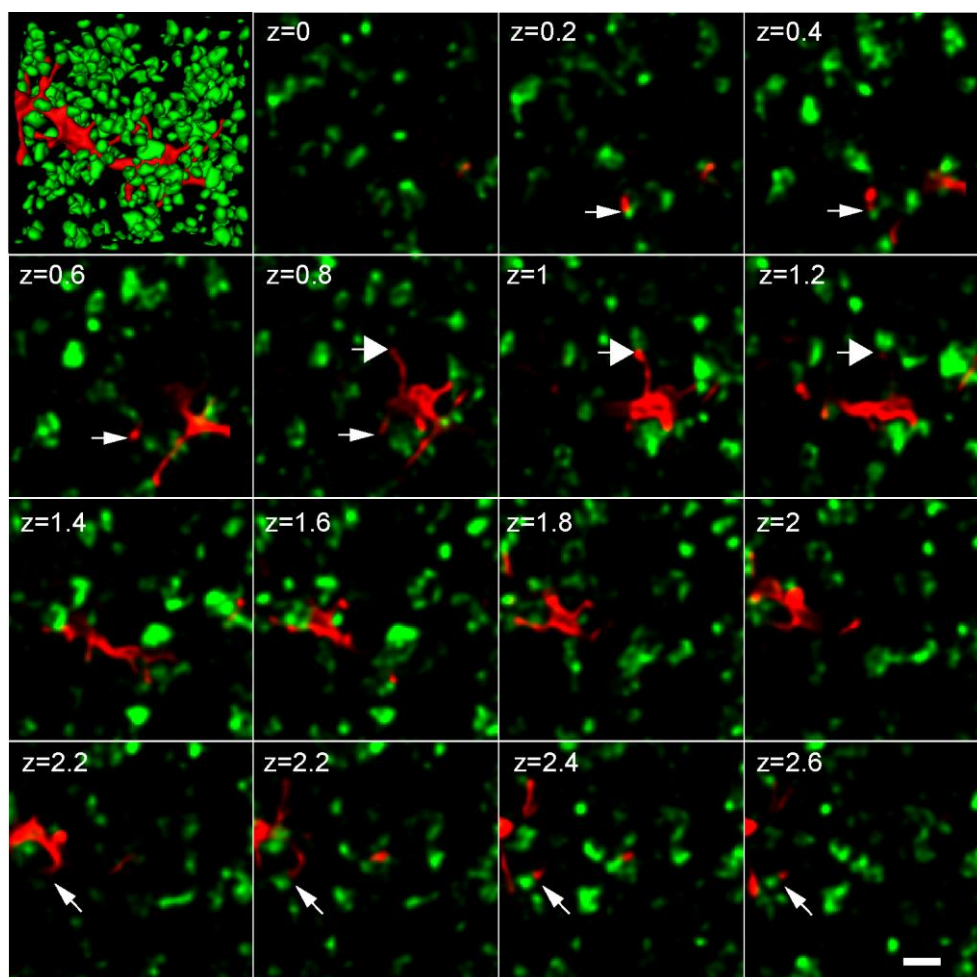
f: Dendritic diameter is similar in saline and cocaine treated mice (Mann-Withney $p = 0.5691$). **g:** Headspine volumes from all dendritic spines from saline and cocaine treated mice are similar (Mann-Withney $p = 0.0967$). **h:** Spine length from all dendritic spines from saline and cocaine treated mice are similar (Mann-Withney $p=0.0012$, but median difference is 40nm, which is lower than resolution limit of the optical system). **i:** Headspine volumes from dendritic spines connected to VGLUT1 boutons from saline and cocaine treated mice are similar (Mann-Withney $p = 0.1210$). **j:** Spine length from dendritic spines connected to VGLUT1 boutons from saline and cocaine treated mice are similar (Mann Withney $p =$

0.0522). **k:** Volumes of cortico-striatal head spines contacted by VGLUT1 boutons (black saline, red cocaine) have bigger volumes than other head spines (blue saline, green cocaine) in both saline ($p < 0.001$) and cocaine ($p < 0.001$) conditions (Non parametric ANOVA followed by Dunn's test). Analysis performed on $N = 5978$ synapses of 11222 spines of 114 neurons from 12 mice. Scale bar = 2 μm .

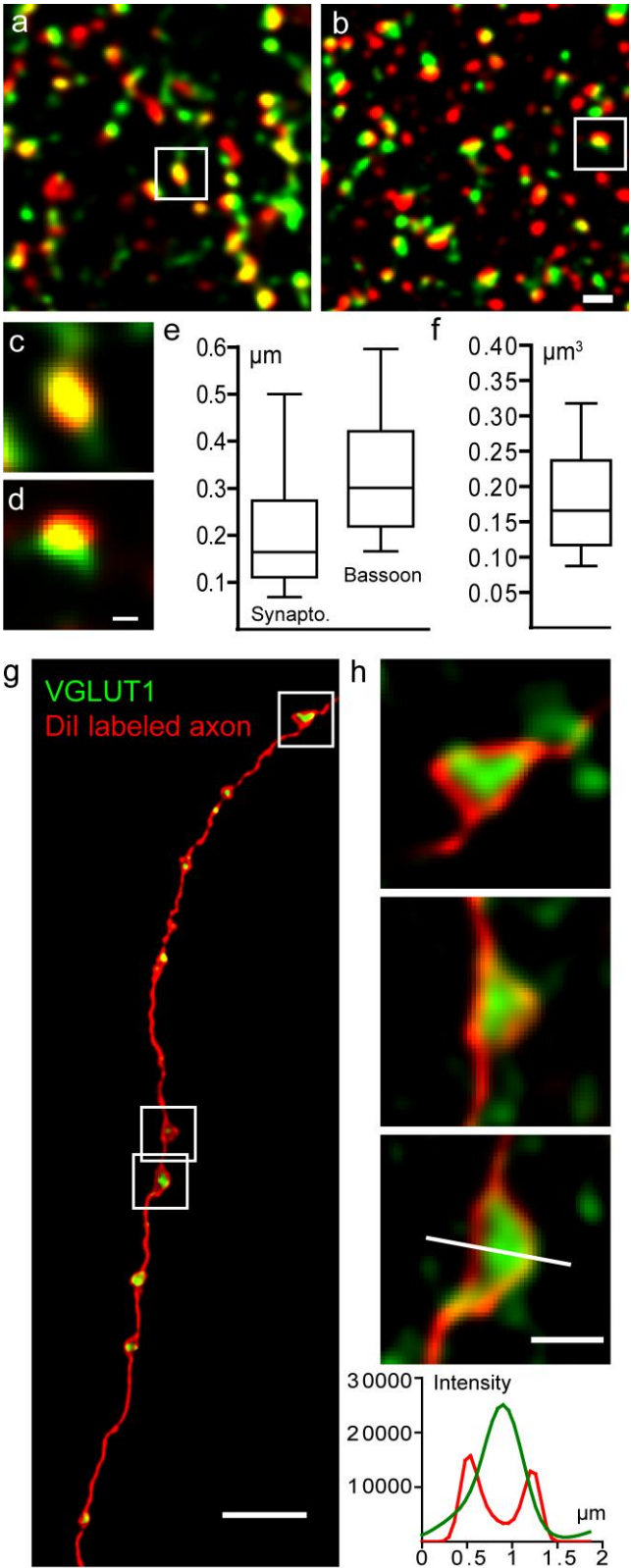
Fig. 7 : Mode of formation of synapses

a: Single planes from the 3D confocal images of VGLUT1^{venus}. Graphic shows the density of VGLUT1 objects. Numbers of VGLUT1 objects were counted in 3D images and normalized so the density is the number of objects in a square of 10 μm side. The density of VGLUT1 objects in the tissue volume is similar in both saline and cocaine treated mice (t-test $p = 0.5597$). **b:** Western blot analysis shows that the protein expression level of VGLUT1 is similar in both saline and cocaine treated groups. Graphic shows quantifications of the density of VGLUT1-positive bands normalized to tubulin ($n = 6$ independent lanes from 6 mice, t-test $p = 0.5257$). **c:** Some VGLUT1 presynapses were found to be connected with two dendritic spines. The percentage of spines associated with a multi-connected VGLUT1 presynapse is increased upon cocaine treatment (Mann-Whitney test $p = 0.0388$). **d:** Diagram depicting the model of cortico-striatal synapses formation induced by repeated exposure to cocaine (see main text for details). Left panel: before cocaine, right panel: after cocaine. New spines are noted in yellow. Scale bar = 2 μm . Analysis performed on $n = 5978$ synapses of 11222 spines of 114 neurons from 12 mice.

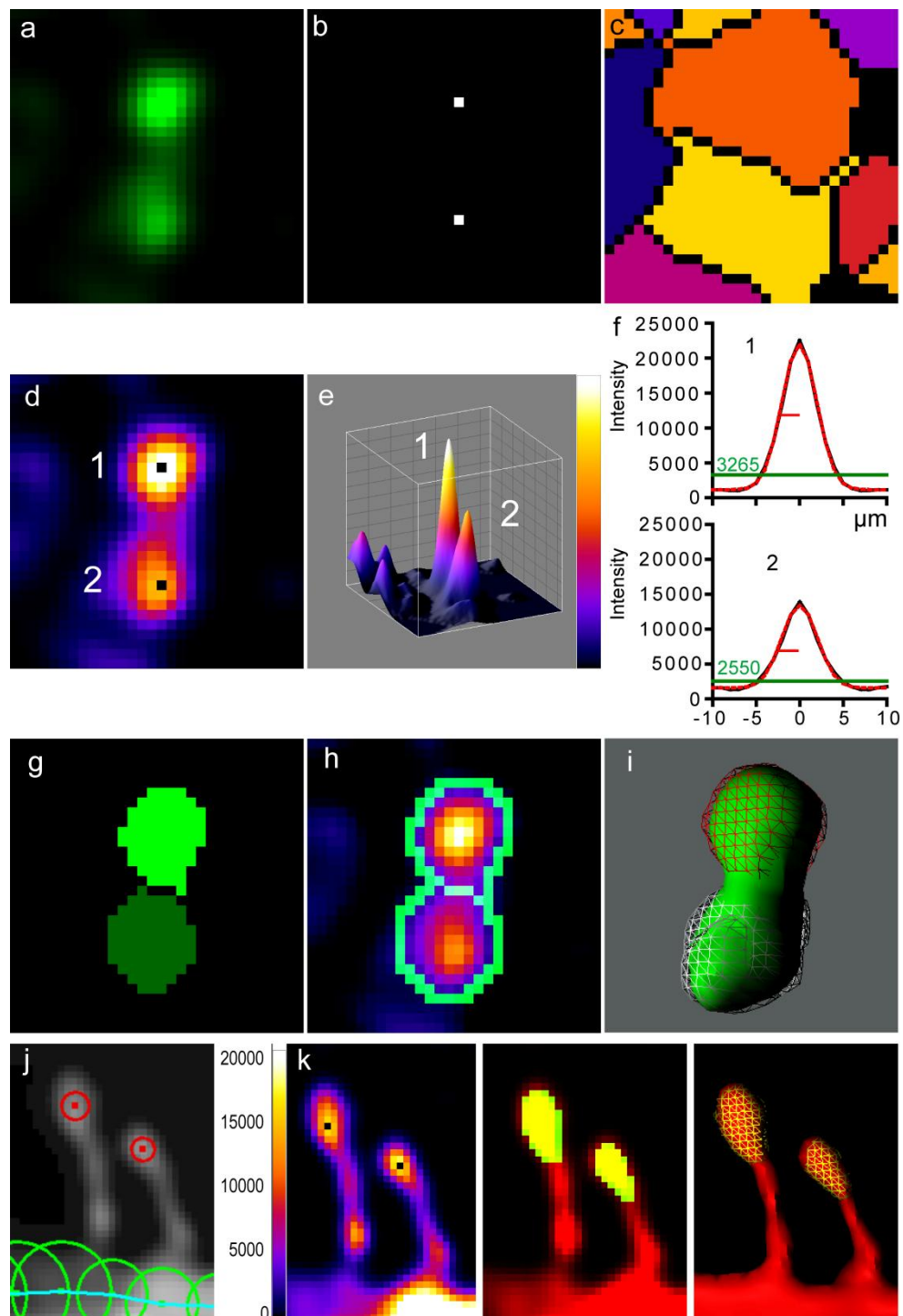
Heck et al. 2015 Figure 1



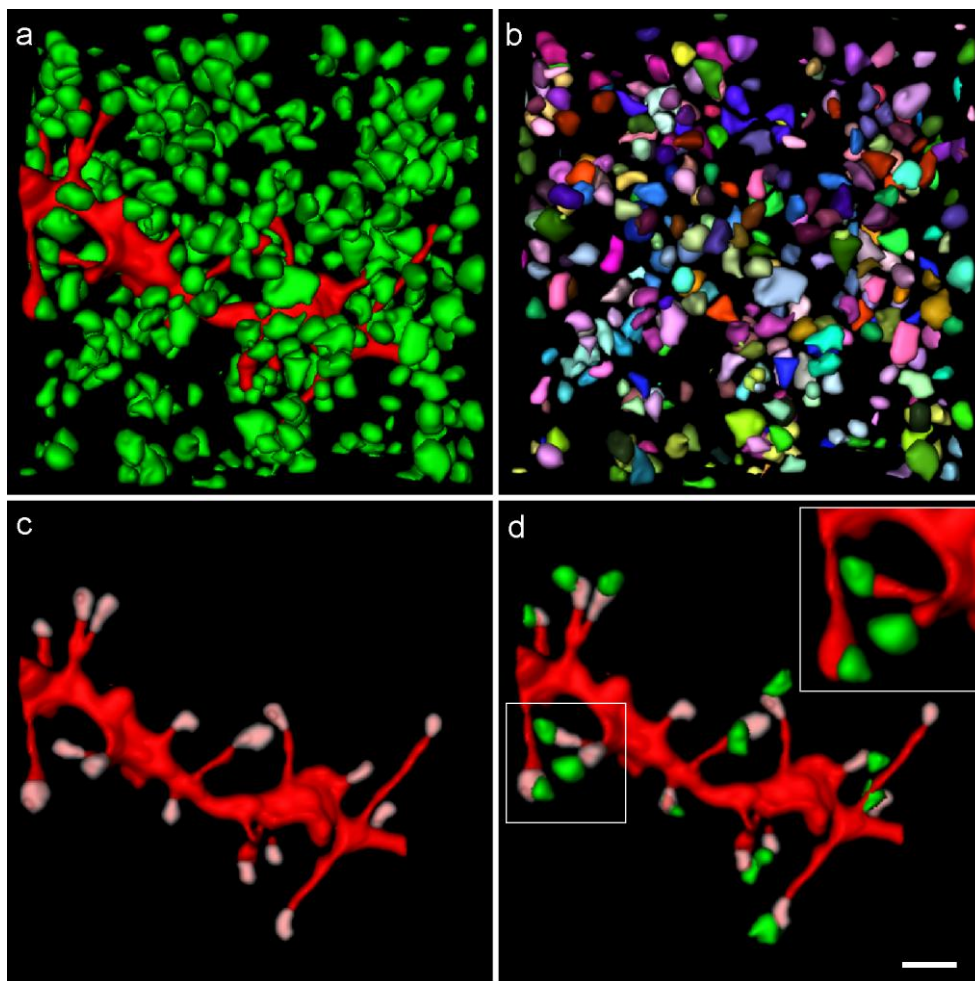
Heck et al. 2015 Figure 2



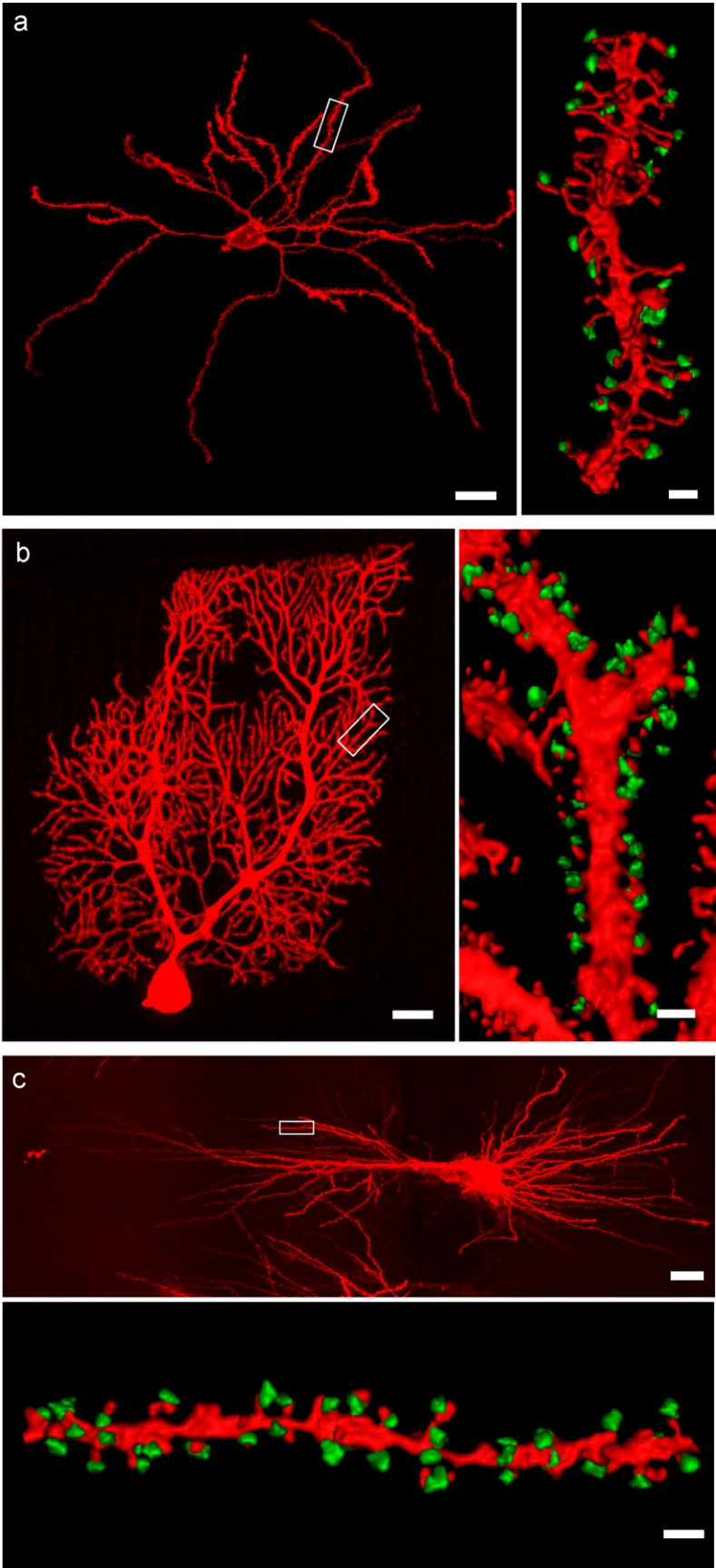
Heck et al. 2015 Figure 3



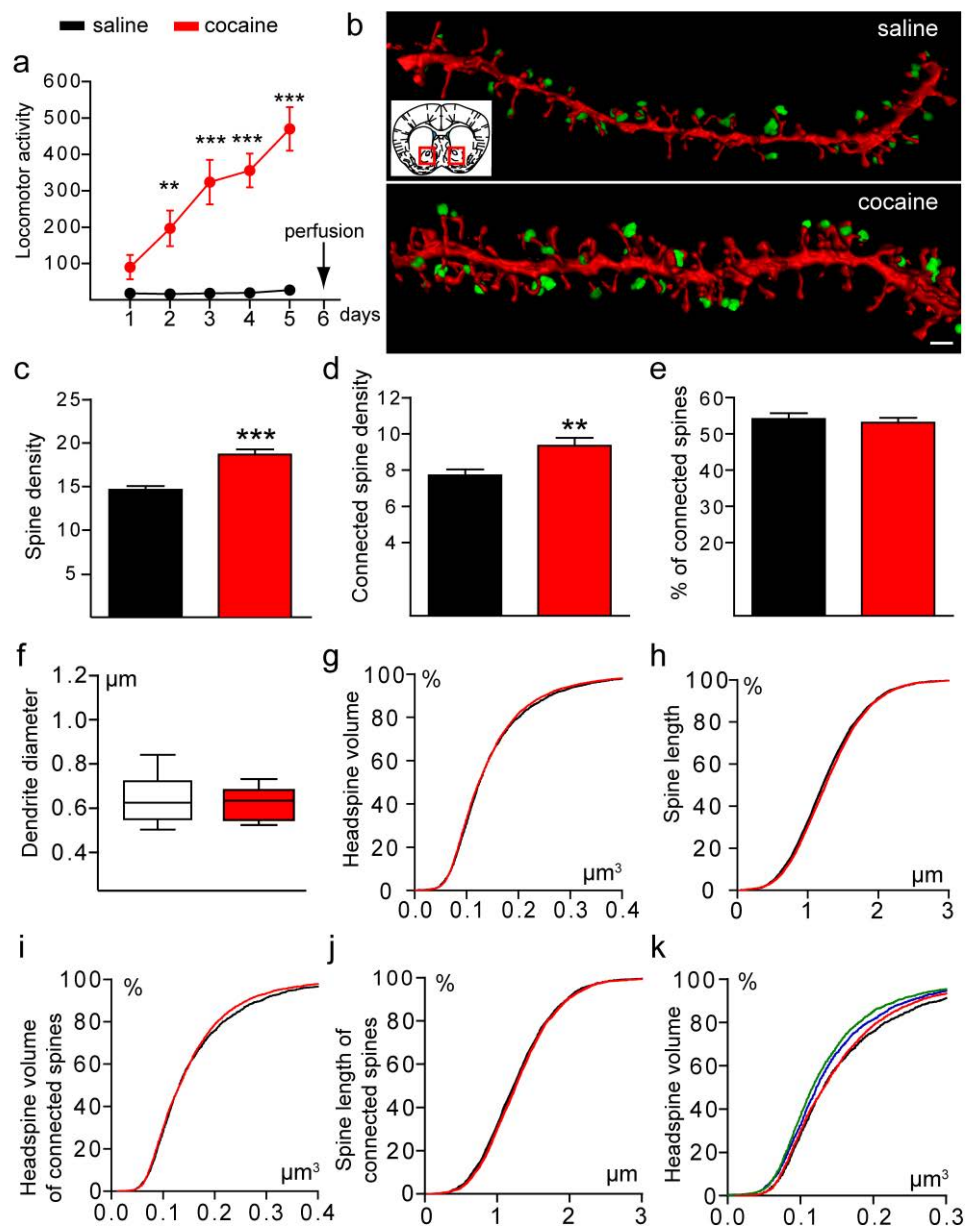
Heck et al. 2015 Figure 4

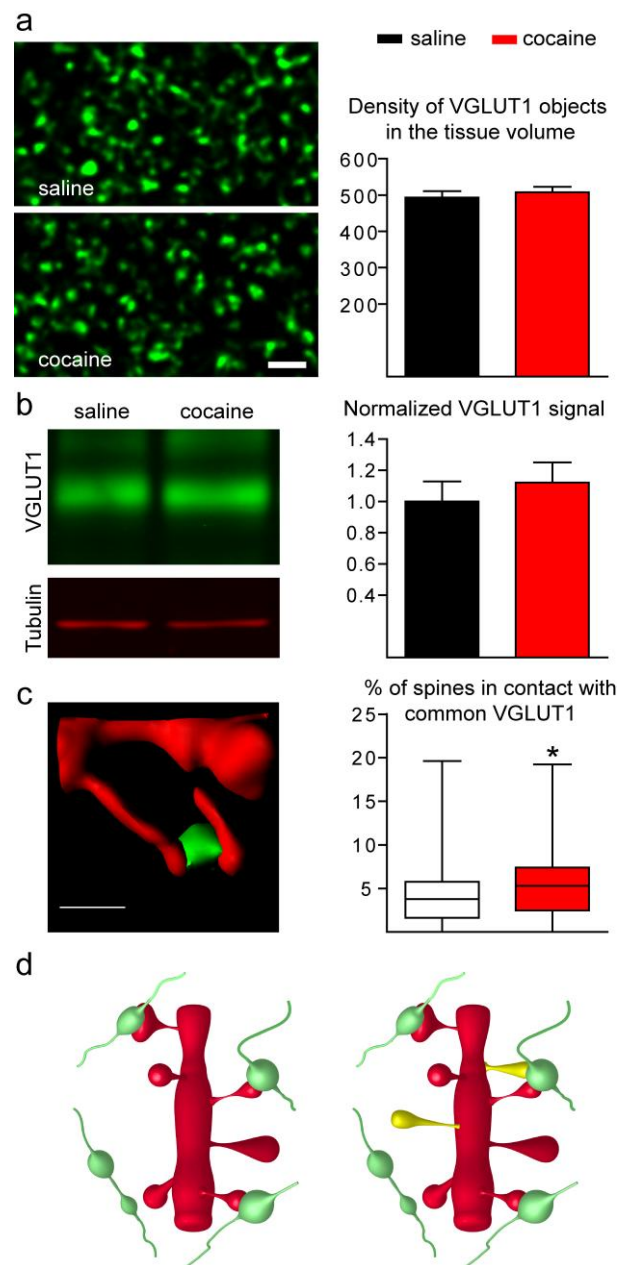


Heck et al. 2015 Figure 5



Heck et al. 2015 Figure 6





1.2 Résultats résumés et conclusion

Nous avons tout d'abord vérifié que les marquages Venus obtenus chez les souris VGLUT1^{venus} knock-in correspondaient bien à des éléments présynaptiques au sein du NAc. Nous avons réalisé des immunomarquages à l'aide d'anticorps spécifiques des marqueurs Bassoon (une protéine de la zone active présynaptique) et Synaptophysine (protéine vésiculaire présynaptique). Comme attendu ([Herzog et al., 2011](#)), le signal Venus et l'immunomarquage de ces protéines présentent un très fort degré de co-localisation. Les sphères VGLUT1^{venus} peuvent donc être considérées, à raison, comme des éléments présynaptiques. De plus, nous montrons, conformément aux données de microscopie électronique de la littérature ([Doig et al., 2014](#)), qu'environ la moitié des épines des SPN sont connectées à un bouton VGLUT1^{venus}. L'autre moitié des connections correspondent vraisemblablement à un élément VGLUT2-positif provenant du thalamus ([Doig et al., 2014](#)).

Ayant validé l'utilisation des souris VGLUT1^{venus} pour l'étude des éléments présynaptiques VGLUT1, et leur contact avec des épines du SPN, nous avons étudié la spinogénèse induite par à des administrations répétées de cocaïne. Les souris ont été injectées (ip, 20mg/kg) de façon quotidienne pendant 5 jours. Nous avons vérifié que les souris mutantes présentaient une sensibilisation locomotrice en réponse à ces administrations chroniques de cocaïne. Comme décrit dans la littérature ([pour revue, Golden et Russo, 2012](#)), cette adaptation comportementale s'accompagne également d'une augmentation de la densité en épines dendritiques dans le Core du NAc.

L'analyse des contacts entre les épines et les éléments VGLUT1 positifs montre une augmentation de ces connexions après traitement chronique à la cocaïne, sans altérations morphologiques des épines, que ce soit en volume ou bien en longueur. La spinogénèse induite par la cocaïne ne s'accompagne pas de formation de nouveaux boutons VGLUT1^{venus}, ni d'une synthèse accrue de ce transporteur. Nous montrons, de plus, une augmentation du nombre de boutons pré-synaptiques connectant deux épines d'un même SPN.

Dans l'ensemble, ces résultats indiquent que l'administration chronique de cocaïne induit une augmentation de la densité en synapses glutamatergiques en provenance des régions corticales sur les SPNs du NAc. Nous suggérons que la connexion des épines néoformées a lieu avec des éléments présynaptiques VGLUT1 pré-existants, un mécanisme qui pourrait être à l'origine d'une augmentation de la synchronicité des réponses synaptiques.

2. Article 2

2.1 Introduction article 2 :

La première partie des résultats obtenus au cours de ma thèse (article 1) a permis de montrer que les injections répétées de cocaïne chez la souris VGLUT1^{venus} induisaient une augmentation de la densité en synapses VGLUT1-positives dans le NAc associée à la sensibilisation locomotrice. D'après les résultats de Ren et al. (Ren et al., 2010) cette spinogénèse est dépendante de la voie des ERK et est bloquée par les inhibiteurs des récepteurs D1 ou NMDA. Ces mécanismes cellulaires et moléculaires avaient été montrés dans la littérature et au sein du laboratoire comme essentiels aux adaptations comportementales et neuronales à la cocaïne (Cahill et al., 2014a; Girault et al., 2007; Pascoli et al., 2014b).

Au début de mon M2 est parue une élégante étude de Pascoli et al. montrant qu'une seule injection de cocaïne induisait une LTP des SPN cruciale dans le développement de la sensibilisation locomotrice en deux injections, elle-aussi dépendante de ERK. L'équipe d'accueil avait observé, peu de temps avant mon arrivée, qu'une seule injection de cocaïne induisait une pousse d'épines dans les SPN du NAc en seulement une heure.

Deux questions importantes se sont alors posées : 1) ces épines néoformées en réponse à une injection unique de cocaïne forment-elles des connexions avec des boutons pré-synaptiques ? 2) ces épines sont-elles stables dans le temps ?

Enfin, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires qui présidaient la formation rapide d'épines au sein des SPN du NAc. La pharmacodynamique de la pousse et du maintien des épines sur les D1-SPN a été étudiée sur des tranches de striatum stimulées par des traitements mimant, *ex vivo*, les effets de la cocaïne *in vivo*. Nous avons attaché une attention particulière aux voies de signalisation ERK et mTOR qui régulent la formation des épines en réponse à des traitements chroniques à la cocaïne (Cahill et al., 2016; Ren et al., 2010), ainsi qu'aux mécanismes cellulaires dépendants de la transcription et de la traduction protéique. La spinogénèse a été étudiée en microscopie biphotonique afin d'élucider en temps réel les signatures moléculaires impliquées dans les phases rapides de formation et de maintien des épines. Les modes de régulations de la spinogénèse, établis sur ce modèle, ont été vérifiés *in vivo* après administration aiguë de cocaïne chez la souris. Ils nous ont permis de

mettre en évidence, de façon originale, le rôle essentiel de MNK-1, une cible cytoplasmique de ERK impliquée dans la synthèse protéique et la formation d'épines, indépendamment de la transcription.

**Extracellular Signal-regulated Kinase exerts a dual role on
dendritic spine growth and stabilization of glutamatergic
clustered-synaptogenesis induced by cocaine**

Marc Dos Santos¹, Marine Salery¹, Benoit Forget¹, Maria Alexandra Garcia Perez¹, Thomas Boudier^{2,3}, Peter Vanhoutte¹, Nicolas Heck^{1,*,+} & Jocelyne Caboche^{1,*,#}

¹Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IPAL, CNRS, 75005 Paris France

³Bioinformatics Institute, Agency for science, technology and research (A*STAR), Singapore

* Those authors contributed equally

+ Corresponding author: nicolas.heck@upmc.fr; phone : +33 1 44 27 53 26; fax : +33 44 27 25 08.

Lead contact: jocelyne.caboche@upmc.fr; phone : +33 1 44 27 53 52; fax : +33 44 27 25 08

Key words: Cocaine, dendritic spine, synaptogenesis, MAP Kinase Interacting Kinase (MNK), striatum, Extracellular-signal Regulated Kinase (ERK), addiction.

Summary

Brief experience-driven events induce long-term changes at the level of neuronal networks. A single administration of cocaine induces reward-driven learning and leads to stable behavioral adaptations. Using a new method for 3D morphometric analysis of both presynaptic boutons and dendritic spines, we show that acute cocaine induces rapid synaptogenesis and persistent increase in striatal connectivity. We observe that new spines grow in clusters and form synapses by contacting preexisting glutamatergic boutons. Using two-photon imaging on slices, we further unravel that spine growth and stabilization are driven by different molecular mechanisms downstream the Extracellular signal-Regulated Kinase pathway (ERK). Spine growth is dissociated from stabilization, which is regulated by transcription-independent protein synthesis regulated by MAP Kinase Interacting Kinase-1 (MNK-1). Finally, we show that MNK-1 activity induced after a single exposure of cocaine, is implicated in long-term increase of dendritic spine density *in vivo*.

Introduction

In the adult brain, the neuronal network offers adaptive properties, and experience-induced synaptic plasticity occurs at both functional and structural levels, with persistent reorganization of synaptic connections and modulation of synaptic strength (Holtmaat and Svoboda, 2009; Hübener and Bonhoeffer, 2010). It is now admitted that structural plasticity is implicated in long-term adaptations that underlie psychiatric disorders, including drug addiction (Bernardinelli et al., 2014; Russo et al., 2010). Addiction induces long-lasting changes in behaviors that rely on neuronal plasticity and morphological changes in neurons of the brain's reward circuitry, more specifically in the ventral part of the striatum (nucleus accumbens, NAc) (Hyman et al., 2006). Within the NAc, striatal projection neurons (SPN) receive on the one hand glutamatergic inputs, which bring contextual information, and dopaminergic (DA) inputs that code for reward signals. Those inputs converge onto the dendritic spines of SPN, which are key cellular elements for the integration of reward and sensory cues, and are likely involved in the mechanisms that sustain mnemonic processes (Pascoli et al., 2014; Cahill et al., 2014a). In this way, it was recently shown that DA gates spine enlargement induced by glutamate in SPN, providing a mechanism for reward-driven learning at the level of the dendritic spine (Yagishita et al., 2014). Classically, long lasting changes in neuronal plasticity and spine formation induced by cocaine have been associated with alterations in gene transcription, via several transcription factors and epigenetic mechanisms in SPN expressing the DA receptor of type 1 (D1-SPN) (Robison and Nestler, 2011). Those events depend on the MAPkinase/ERK (Extracellular-signal Regulated) pathway, which is activated upon synergistic interaction between D1R and NMDA glutamatergic receptor (Cahill et al., 2014b). Similarly, chronic administration of cocaine induces spine enlargement and spine formation in the D1-SPN (Shen et al., 2009; Dobi et al., 2011), which has been shown to rely on the activation of the ERK pathway (Ren et al., 2010).

Those studies focused on the observation of dendritic spines, but in-depth understanding of synaptogenesis and connectivity changes requires the analysis of both pre and postsynaptic elements (Schoonover et al., 2014, Wierenga et al., 2008). In this way, we have recently established a new method, which allows for 3D automated morphological analysis of synaptic connections and confirmed that the increase in spine density upon chronic cocaine indeed corresponds to connectivity changes (Heck et al., 2015). As stated above, most studies have focused on the association between transcription and new spine formation induced by chronic cocaine administration. Since a single injection of cocaine is sufficient to cause long-term synaptic plasticity and behavioral adaptations to a second administration (Pascoli et al., 2011a), we hypothesized that a single injection of cocaine could modify striatal connectivity. We bring evidence that acute administration of cocaine is able to induce stable synaptogenesis in the NAc. We unravel the mode of formation of glutamatergic synapses and present evidence that ERK activation is involved in a multi-step process for this rapid synaptogenesis in D1-SPN.

Results

A single cocaine exposure induces a rapid and stable connectivity change in the NAc

We hypothesized that connectivity changes could occur rapidly after a single cocaine injection. Dendritic spine density of SPN was increased in the NAc one hour after a single injection of cocaine (20 mg/kg)(Figures 1A-C). A similar increase was observed at a lower dose (10mg/kg, Figure S1A), while no change was observed in the dorsal part of the striatum (20 mg/kg, Figure S1B). Upon acute administration, cocaine activates intracellular signaling pathways and induces the expression of Immediate Early Genes, including c-Fos, in D1-SPN (Bertrand-Gonzales et al., 2008). We therefore measured spine density in SPN expressing c-

Fos and found a larger increase when compared to randomly picked SPN (Figures 1A-C). Following a custom 3D procedure for headspine segmentation (Figure S2A), the measurements of headspines volumes and spine lengths showed an increase, which was better revealed in c-Fos positive neurons (Figures S2B and S2C). The rapidity of this phenomenon prompted us to assess whether the increase in spine density could correspond to an increase in connectivity. To address this issue, dendritic labeling was performed in VGLUT1^{venus} mice, which express the vesicular transporter of glutamate (VGLUT1), a presynaptic protein expressed in afferents from cortices (neocortex, hippocampus and amygdala), fused to the fluorescent protein venus (Herzog et al., 2011). Following an automated 3D method that we recently set up (Heck et al., 2015), all single VGLUT1-positive boutons were segmented, and synaptic contacts were identified by measurement of the 3D contacts between headspines and boutons. We detected that 60% of spines were connected to VGLUT1-positive boutons in saline conditions (Figures 1A and 1E), a result in agreement with electron microscopic studies showing that half of SPN spines make synapse with VGLUT1-positive boutons, while the other half contact VGLUT2 afferences (Doig et al., 2010). One hour after cocaine administration the number of spines in contact with a VGLUT1 bouton was increased (Figures 1A and 1D), which indicates that the glutamatergic connectivity is rapidly modified in the ventral striatum *in vivo*. Of note, the percentage of spines connected to VGLUT1 boutons remained unchanged (Figure 1E). We next assessed whether the rapid increase in connectivity was stable over time. One week after a single injection of cocaine, a spine density increase was still observed when compared to the saline group (Figures 1F-G). Headspine volume, but not spine length, was still larger in cocaine-treated mice as compared to saline controls (Figures S2D and S2E). The detection of spines in contact with a VGLUT1 bouton confirmed that the connectivity increase rapidly induced by a single cocaine exposure was maintained over one week (Figure 1H), with an equal percentage of VGLUT1-positive

synapses along the dendrite in both saline and cocaine conditions (Figure 1I). Altogether, these results show that a single injection of cocaine induces a rapid synaptogenesis leading to a persistent increase in striatal connectivity, while keeping the stoichiometry of the VGLUT1 afferents onto SPN.

Synapse formation occurs in clusters with spines connecting pre-existing presynaptic boutons

The total density of VGLUT1-positive boutons in the NAc was not increased either one hour or one week after cocaine administration (Figures 2A and 2B, left panels). Since glutamatergic synaptogenesis occurred (see Figures 1D and 1H), we hypothesized that synapse formation corresponded to a mode by which new spines contact pre-existing presynaptic boutons. Accordingly, the occurrence of spines connected to a common VGLUT1-positive presynapse was increased one hour and one week after cocaine injection (Figures 2A and 2B, right panels). In order to further test our hypothesis on the mode of synapse formation, we used live imaging on acute striatal slices by two-photon microscopy. We first set up the model system using stimulation with low doses of glutamate together with a D1R agonist, a co-stimulation known to mimic cocaine effects in primary cultures of SPN (Pascoli et al., 2011b). As expected, the co-stimulation, but not the application of each agonist independently, induced ERK activation in SPN from the NAc (Figures S3A-C), a hallmark of cocaine-induced SPN plasticity (Pascoli et al., 2014). The co-stimulation induced an increase in spine density and spines that contacted VGLUT1 boutons (Figures S3E-S3G), as observed *in vivo* after cocaine administration (see Figures 1A-1E). Time-lapse experiments were performed on D1-SPN specifically labeled by combining a virus expressing Cre recombinase under the promoter of preprotachykinin A (PPTA) gene and a virus carrying tdTomato sequence flanked by loxP sites (Yagishita et al., 2014)(Figure S4A). The specificity of the

viral expression was confirmed by immunodetection of the D1R (Figure S4B). Two-photon microscopy stack images allowed the visualization of dendritic spines growth, which was observed as soon as ten minutes after the beginning of the co-stimulation and continued thirty minutes after the onset of stimulation (Figures 2C and 2D). The increase in spine density measured in slice one hour after the co-stimulation exhibited a similar amplitude to what measured *in vivo* (Figure 2E). Finally, the spine growth was absent when the selective D1R antagonist SCH23390 was bath applied (Figure S4C). In acute slices from VGLUT1^{venus} mice 62.8% of spines induced by the co-stimulation in D1-SPN expressing tdTomato were in contact with a VGLUT1-positive bouton (N = 5 mice, n = 35 spines). When considering the newly generated spines that ended in contact with a VGLUT1 presynapse, we observed that, in all of cases, the bouton was present before spine growth (N = 5 mice, n = 22 spines) (Figure 2F). Taken together, our results obtained both *in vivo* on fixed striatal tissue and in time-lapse on striatal slices indicate that synaptogenesis occurs via a mode of formation by which new spines contact pre-existing VGLUT1 boutons. This raised the question as to whether synaptogenesis could be driven by a stochastic spine growth. We generated a model to examine whether spine growth at random positions combined with synapse formation by contact with preexisting boutons could account for the experimental results. Images taken from saline conditions containing the dendrite with headspines and all VGLUT1 boutons were used as a frame for the model. Virtual spines grew from random position at the dendrite surface until they either contacted a VGLUT1 bouton or reached a maximum distance from the dendrite, whilst avoiding crossing headspines (Figure 3A). The modeling of random spine growth yielded an increase in synapse density, which was lower than the measurements from experimental data (Figure 3B). The discrepancy between the experimental results and the model could result from a non-random distribution of the location of spinogenesis along the dendrite. The spine distribution was thus quantified on dendrites imaged *in vivo* by

measurement of the shortest border-border distance in between headspines. This revealed a bimodal distribution with a strong proportion of adjacent headspines, which was increased after cocaine exposure (Figures 3C and 3D). Contrasting with this observation, the *in silico* model retrieved a decrease in the percentage of adjacent spines (Figure 3D), which indicates that the increase of the occurrence of adjacent spines *in vivo* was not a simple consequence of the increase in spine density. In conclusion, a model of uniform spine growth along the dendrite did reproduce neither the enhancement of synapse density, nor the increased proportion of adjacent spines observed *in vivo* following acute cocaine. Hence, this model suggests that spine growth does not occur randomly but at locations where synapses clusters will be generated.

Dendritic spine growth and stabilization are regulated by ERK and MNK-1

We next investigated the signaling pathways involved in spine formation induced in striatal slices one hour after the co-stimulation. It is well established that cocaine activates the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in D1-SPN (Valjent et al., 2000; Bertran-Gonzales et al., 2008), which controls spine density increase in the case of chronic cocaine administrations (Ren et al., 2010). The involvement of the ERK pathway in spinogenesis was thus assessed using U0126, a selective inhibitor of MEK, the kinase upstream of ERK. Pretreatment with U0126 abolished the increase in spine density induced by the co-stimulation (Figure 4A), indicating that the activation of the ERK pathway is necessary for spinogenesis. Recently, the Akt and mammalian Target of Rapamycin (mTOR) pathway was shown to be involved in spine density increase induced by chronic cocaine injections (Cahill et al., 2016). We tested the implication of this pathway using rapamycin and found that it completely blocked the increase in spine density induced by co-stimulation in slices (Figure

4B). Since both ERK and mTOR pathways were mandatory for spinogenesis, we turned towards possible common molecular mechanisms activated downstream these pathways. The ERK and mTOR pathways indeed converge on the control of protein translation (Figure 4C), via the Eukaryotic Initiation Factors complex. In this way ERK-dependent activation of MAP Kinase Interacting Kinase-1 (MNK-1) activates this complex and regulates its binding to mRNA (Bkhar et al., 2012). We thus hypothesized that MNK-1 could be involved in spine formation. We first assessed the activation of MNK-1 using immunodetection of its phosphorylated form (pMNK-1). Twenty minutes after co-stimulation, an increase in pMNK-1 positive cells was detected in the NAc (Figure 4D). Slices were then pre-treated with CGP 57380, a specific inhibitor of MNK-1 activation, which totally inhibited the increase in spine density induced by the co-stimulation (Figure 4E). We next reasoned that the abolishment of the stimulation-induced increase in spine density by ERK or MNK-1 inhibition could result from either inhibition of spine growth or lack of their stabilization (Figure 5A). In order to gain insights into these two possibilities, we used time-lapse imaging of spine growth and maintenance from D1-SPN dendrites (Figure 5B) labeled *in vivo* using intra-NAc infection with AAV PPTA::Cre/AAV TdTomato (see Figure S4). Spine growth was absent in the presence of U0126, the inhibitor of the ERK pathway (Figure 5C), indicating that ERK activation is mandatory for the formation of new spines. In contrast, CGP 57380 did not modify growth rate, clearly indicating that MNK-1 is not required for spine growth (Figures 5B and 5C). However, it strongly impacted the maintenance of the newly formed spines, with only 9% of the newly formed spines remaining 90 minutes after growth, while 67% were stable at that later time point in control conditions (Figures 5B and 5D). The requirement of MNK-1 for stabilization was observed 30 minutes after spine growth, since 59.1% of the spines were lost at this time point under conditions of MNK-1 inhibition. Noteworthy, the inhibition of MNK-1 activation did not affect the stability of spines before stimulation (Figure

S5). Hence these data show for the first time that MNK-1 is mandatory for stabilization but not formation of spines upon stimulation. Since MNK-1 regulates protein synthesis, we interrogated the respective role of global transcription and translation for spine growth and maintenance. Inhibition of protein synthesis with anisomycin did not modify spine growth, but reduced spine stabilization, with identical kinetics to that observed with the MNK-1 inhibitor (Figures 5B-5D). Moreover, bath application of the transcription inhibitor actinomycin D did alter neither growth nor stabilization of new spines (Figures 5B-5D). Therefore, time-lapse analysis unraveled sequential ERK-dependent steps for spinogenesis. Upon stimulation, ERK is essential for both spine growth and maintenance, whilst ERK-induced MNK-1 phosphorylation and protein synthesis specifically control spine stabilization independently of transcription.

Parsing the role of MNK-1 in spine formation *in vivo*

Finally, we analyzed the impact of MNK-1 activation on long-lasting spinogenesis *in vivo*. An increase in pMNK-1-positive cells was observed in the NAc 10 minutes after a single cocaine administration, and the inhibition of ERK activation by SL327 completely abolished this increase (Figure 6A and 6B). The dendritic localization of pMNK-1 in D1-SPN was confirmed by combining immunodetection of pMNK-1 and labeling of dendrites with the PPTA-Cre and fl/fl tdTomato-AAV viruses. pMNK-1 positive punctates were detected in the dendritic shaft and in dendritic spines from D1-SPN (Figure 6C). In agreement with the results from acute slices, inhibition of ERK as well as protein synthesis abolished spine formation one hour after cocaine administration (Figures S6A and S6B). The activation of MNK-1 was inhibited locally by intracranial injection of CGP in the NAc prior to either saline or cocaine single administration (Figure 6D). The inhibition of MNK-1 did not affect basal

spine density of SPN, but abolished the spine density increase observed 1 and 24 hours after cocaine administration (Figure 6E). Taken together, these results identify MNK-1 as a new downstream target of ERK activated by cocaine and posit MNK-1 and protein synthesis as essential for striatal structural plasticity *in vivo*.

Discussion

Our data show that a single administration of cocaine is sufficient to trigger an ERK-dependent long-lasting increase in glutamatergic connectivity in the NAc. Onto SPN new spines grow in clusters and contact presynaptic boutons that are already in place. Using bi-photon imaging in slices, we unravel the sequence of signaling events specifically involved in spine growth or stabilization. We show a mandatory role of the ERK signaling pathway in these two critical steps. We further demonstrate that spine stabilization, but not growth, is dependent on ERK-mediated activation of MNK-1 and protein synthesis, independently of transcription. Finally, we show that cocaine-induced MNK-1 activity *in vivo* is involved in long term increase of new spines.

Acute cocaine induces long lasting connectivity changes

While striatal structural plasticity induced by prolonged cocaine exposure has long been described, whether a single exposure to cocaine could change striatal connectivity remained unexplored. We show here that acute cocaine induces a rapid growth of dendritic spines that contact preexisting VGLUT1-positive glutamatergic boutons. The resulting increase in glutamatergic striatal connectivity is persistent for at least one week. Our results fit with

electrophysiological recordings performed after acute exposure to cocaine, showing an increase in the frequency of miniature currents in c-Fos positive SPN (Koya et al., 2012), and synaptic potentiation (Pascoli et al., 2011a). In line with our results, it was previously observed that acute cocaine induces an increase in spine density in dopaminergic neurons (Sarti et al., 2007) and in the prefrontal cortex (Muñoz-Cuevas et al., 2013), although those studies did not assess the connectivity of the dendritic spines. Spinogenesis (Kozorovitskiy et al., 2015) and spine enlargement (Vastagh et al., 2012) are regulated by dopamine in the developing and adult striatum, respectively. Recently, Kasai and colleagues demonstrated that dopamine, by acting on D1R, gates the glutamatergic induction of spine enlargement in SPN through a precise temporal contingency between the two neurotransmitters (Yagishita et al., 2014). Along these lines, we have previously demonstrated that cocaine effects rely on the synergy between D1R and NMDA-R, showing that D1R gates NMDAR-mediated ERK activation (Pascoli et al., 2011b; Cahill et al., 2014b). Here we observed that a co-stimulation with both a D1R agonist and Glu, but not by the compounds used alone, induced ERK-dependent synaptogenesis in SPN downstream from D1R. Finally, a single administration of cocaine provoked the occlusion of ERK-dependent synaptic potentiation on SPN of the NAc, and optogenetic inhibition of cocaine-induced plasticity prevented the behavioral adaptations induced by cocaine (Pascoli et al., 2011a). Altogether, these data support that ERK-induced rapid synaptogenesis is a critical cellular mechanism involved in the induction of long-term striatal plasticity and in the development of behavioral alterations induced by cocaine.

Synaptogenesis occurs through clustered spine growth and contact on preexisting boutons

We observed that spine growth and contact with presynaptic boutons occurred rapidly both *in vivo* and in striatal slices. Although rapid functional maturation of nascent spines was already

demonstrated in slices (Zito et al., 2009; Kwon et al., 2011), it is not in itself a proof for the occurrence of a mature synapse. Nevertheless, we propose that a single administration of cocaine is capable to induce long-lasting changes in synaptic connectivity, which implies that subsequent cocaine action will operate on a modified network. The mode of formation of synapses in the adult brain is matter of debate, with two opposite views. On the one hand, the grown spine would instruct formation of a presynaptic bouton in the axon, on the other hand, the spine would make contact with pre-existing boutons (Holtmaat and Svoboda, 2009). Studies using correlative microscopy have shown that new spines are in contact with boutons that make synapses with more than one spine, and favored the hypothesis of synapse formation on pre-existing boutons (Knott et al., 2006; Nagerl et al., 2007; Medvedev et al., 2014). Our *in vivo* results as well as our time-lapse observations in slices extend this mode of formation to striatal neurons (Figure 7). It is noteworthy that electron microscopy studies support our conclusion, as boutons making synapses with two spines from SPN have been observed (Doig et al., 2010). If spines contact preexisting boutons, it consequently imposes a constraint on the location of spine growth. We observed the occurrence of adjacent spines along the dendrite, which was increased upon cocaine-induced synaptogenesis. Importantly, the increase in clustered spines was not a simple consequence of increased spine density, as our *in silico* model showed that spine growth from random location on the dendrite did not account for the experimental data. Clusters of dendritic spines (Chen et al., 2012, De Roo et al., 2008) and synapses (Druckmann et al., 2014) have been recently described in the adult neocortex and hippocampus, and a motor learning task was associated with clustered spine growth (Fu et al., 2012). We observed *in vivo* spine clusters in contact with a single bouton, a phenomenon previously reported in hippocampal slices (Toni et al., 1999). The occurrence of such multiple boutons was increased after cocaine exposure, accounting for nearly 5% of the spines, which implies a temporal and spatial synchrony of the glutamatergic inputs on these spines.

ERK paves the way to synaptogenesis through distinct mechanisms for spine growth and stabilization

Studies on structural remodeling of spines have outlined sequential events involving rapid molecular reorganization followed by protein synthesis-dependent stabilization in association with presynaptic element enlargement (Bosch et al., 2014; Meyer et al., 2014). Importantly, the time frames of these events correlated with the different steps defined for functional synaptic plasticity (Redondo and Morris, 2011). Our study indicates that synaptogenesis can as well be divided in different phases, with distinct molecular mechanisms downstream ERK pathway. As indicated by time-lapse analysis, while spine growth depends on ERK activation independently of MNK-1 and protein synthesis, the stabilization of these newly formed spines is strictly dependent on ERK-induced MNK-1 activation and translation, independently of transcription (Figure 7). To the best of our knowledge, these data are the first demonstration of a functional role of cocaine-induced ERK activation in the striatum occurring through the targeting of a cytoplasmic substrate independently of nuclear targets.

Previous studies have shown that ERK activity and its upstream activator Ras are essential for spine morphogenesis (Kwon et al., 2011, Wu et al., 2001). Our study unexpectedly revealed a transcription and translation-independent role of ERK in the initiation of spine formation. One possible mechanism to account for this effect is the phosphorylation of pre-existing proteins, such as spinophilin, since the expression of spinophilin carrying a phosphomimetic aminoacid at the site of ERK phosphorylation induced increased spine protrusion density in hippocampal neurons (Futter et al., 2005). Our study reveals also a new, unexpected role of ERK-dependent activation of MNK-1 and protein synthesis in stabilization of newly formed spines but not their growth. The long-term maintenance of LTP has been linked to ERK activation and phosphorylation of eIF4E (Kellherer et al., 2004) and it is now clearly established that MNK-1 phosphorylates initiation factors essentials for the onset of translation of specific sets

of messengers that are required for long-term plasticity (Costa-Matioli et al., 2009). Similarly to anisomycin, the inhibitor of protein synthesis, MNK-1 inhibition produced a lack of spine stabilization. Since the inhibition of transcription did not reproduce these data, MNK-1-induced spine stabilization is likely to rely on messengers present before the stimulation. Several messengers are locally translated in dendrites (Genheden et al., 2015) and could be involved in the stability of newly formed spines. The local translation of Arc mRNA transcripts is controlled by MNK-1 (Panja et al., 2014) and Arc proteins are involved in actin cytoskeleton dynamics along with spine density and morphology (Peebles et al., 2010). Furthermore, the expression of Arc is induced in dendrites by acute cocaine administration (Salery et al., 2016). PSD-95 is another candidate. It is locally translated in response to intra-NAc injection of a D1R agonist (Beckley et al., 2016), and its presence correlates with their stabilization (Cane et al., 2014; Meyer et al., 2014). Another tempting hypothesis would be that spine stabilization also depends on proper interaction between the pre and post synaptic elements. Neuroligin mRNA is locally translated in dendrites (Cajigas et al., 2012) via activation of eIF4E (Gkogkas et al., 2013), the activation of which depends on MNK-1. Given the role of this trans-synaptic protein in synaptogenesis (Kwon et al., 2012), it represents a possible trans-synaptic mechanism for spine stabilization. Translation of CAP-protected messengers is controlled by the convergence of MNK-1 and mTOR pathways. It was shown that chronic cocaine administration leads to the activation of mTOR and formation of dendritic spines in the NAc (Cahill et al., 2016). Moreover, synaptic plasticity depended on translation independently of transcription in slices from rats subjected to cocaine administration (Sheyer et al., 2014). Our data reinforce the idea that mTOR plays a pivotal role in striatal plasticity, and further reveals a critical role for MNK-1 in local translation for stabilization of newly formed spines. Our time-lapse experiments revealed that spine growth and stabilization did not require transcription, which is in accordance with a study on spine

growth in the neocortex *in vivo* (Liston et al., 2013). Nevertheless, it does not exclude the possible implication of transcription for long-term maintenance of the dendritic spines. The ERK pathway instructs gene expression through nuclear targets (Pascoli et al., 2014; Cahill et al., 2014a), including the transcription factor Elk-1. We have shown that the specific inhibition of Elk-1 phosphorylation downstream ERK inhibits the increase in spine density induced by chronic cocaine administration (Besnard et al., 2011). Therefore, despite the fact that transcription is not required for spine formation at the time-scale analyzed in the present study, gene expression is likely to impact connectivity changes on a long-term basis. In conclusion, our data support the view that ERK instructs the different phases of spine formation through distinct molecular mechanisms. In this model, ERK first instructs spine growth, probably through phosphorylation of pre-existing cytoplasmic targets, second ERK activates local translation through MNK-1 for spine stabilization. Importantly, the implication of spine stabilization through MNK-1 for long-term spine density changes was unraveled *in vivo*. Following a single administration of cocaine, MNK-1 was rapidly activated downstream ERK, and pMNK-1 was found in dendrites of SPN. The specific inhibition of MNK-1 *in vivo* lead to loss of spine density increase 1 hour after cocaine administration, and a similar result was obtained when protein synthesis was inhibited. The inhibition of MNK-1 *in vivo* prior to cocaine administration also abolished the spine density increase observed 24 hours after the cocaine administration. Therefore, the stabilization of newly-formed spines via MNK-1, independently of transcriptional-dependent events, is essential for long-term changes in glutamatergic striatal connectivity.

Experimental Procedures

***In vivo* treatments, tissue preparation, dendrite labeling, immunohistochemistry.** When indicated anisomycin (100 mg/kg in 0.9% saline) or SL327 (50mg/kg diluted in 5% DMSO, 5% Tween-20, 15% PEG-400, 75% H₂O) were injected intraperitoneally 30 min and 60 min, respectively, prior to cocaine (20 mg/kg dissolved in 0.9% saline) treatment. For intra-cranial injection of CGP 57380, cannulae were implanted in anesthetized 7-8 weeks-old mice. One week later, bilateral injections of 10mM CGP 57380 in ipsilateral and vehicle in contralateral hemispheres were performed followed, 15 min later, by intraperitoneal injection of cocaine (20 mg/kg). Mice brains were fixed by intracardiac perfusion of paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4, and coronal sections were cut with a vibratome (Leica). Concentration of PFA and sections thickness were 1.5% and 250 μ m; 4% and 30 μ m, for dendrite labeling and immunofluorescence, respectively. Dendrites from SPN were labeled with DiI using diolistic method. Immunohistochemistry was performed on permeabilized sections or slices incubated overnight at 4°C with the primary antibody.

Dendritic spine analysis, segmentation of presynaptic boutons and detection of synaptic contacts from confocal images.

Dendritic spine detection was performed by using the Neuronstudio software and data were imported into ImageJ for custom 3D automated headspine segmentation. Segmentation of VGLUT1 objects and detection of synaptic contacts were performed in 3D as described in Heck et al. (2015). Border to border distance between each headspine and all VGLUT1 objects was computed and the synaptic contact was decided for a distance of zero, meaning that the two objects overlap.

Viral infections, preparations of acute slices, two-photon microscopy. The viral construct AAVrh9-PPTA-Cre contains an expression cassette consisting of the Cre recombinase driven by the promoter of PPTA gene (substance P), which is specifically expressed in SPN expressing D1R (Yagishita et al., 2014). The virus was injected in combination with the AAVrh9-pCAG-flex-tdTomato-WRPE (Upenn) in the NAc of 3 to 4-week-old mice. Coronal slices of 200-250 μ m thickness of brains from 6 to 8 week-old mice were cut on a vibratome (Leica 1200 vts) and maintained in equilibrated ACSF. Slices were stimulated with glutamate 3 μ M (Sigma, France) and (R)-(+)-SKF-38393 10 μ M (Sigma, France) in ACSF for 20 min, followed by 40 min in ACSF alone. Pharmacological inhibitors were applied 30 min before co-stimulation and washed 30 min after the end of the co-stimulation. The cell-penetrating peptides TDE or its scrambled version were applied at 10 μ M, 60 min before co-stimulation. Slices were either imaged in time-lapse or fixed with PFA 4% at RT for 60 min, processed for DiI dendrite labelling or immunofluorescence. For time lapse studies, slices imaging was performed in ACSF with two-photon upright microscope (SP5 MPIL, Leica) equipped with water-immersion objective (25x, NA 0.95, Leica) and images were acquired with hybrid detector equipped with avalanche gain and GaAsP photocathode (Leica). Image stacks were sampled with voxels size of 100 nm in xy axis and z-step of 500 nm.

Synaptogenesis modeling. Original stack images from saline conditions are used as a template for simulation of synaptogenesis. The number of virtual spines generated in each image corresponded to the spine density increase observed one hour after cocaine exposure. A virtual spine is modeled as a set of spheres attached to one other and growing in a specified direction in the 3D space of an original image from saline conditions. The original image is decomposed in different zones (“birth”, “life”, “end”, forbidden”). Virtual spines initiate growth from the “birth” zone, which corresponds to the contour of the dendritic shaft. The

location of birth is chosen randomly, so the distribution of birth location is uniform along the dendrite. The “forbidden” zones are the inside of the dendrite, the existing headspines and previously grown virtual spines. Virtual spines grow in the “life” zone while avoiding the “forbidden” zones. The “end” zones, on which virtual spines will potentially contact, is defined by the voxels belonging to VGLUT1 presynaptic objects. The growth is terminated if one of the two following criteria is met: either the distance between the sphere centroid to the contour of the dendrite reach a maximum value, or 20% of the voxels from the sphere overlap with the “end” zone. In the last case, the spine is considered connected to a VGLUT1 presynaptic object.

See Supplemental information for fully detailed experimental procedures

Author contributions

Conceptualization, M.D.S., N.H., P.V., J.C.; Methodology M.D.S., N.H.; Software M.D.S., N.H., T.B.; Investigation M.D.S., N.H., M.S., B.F., M.A.G.P.; Writing – Original Draft, M.D.S., N.H., J.C.; Funding Acquisition, J.C.; Supervision N.H., J.C., P.V.

Acknowledgements

We would like to thank Jean-Antoine Girault (INSERM, Paris, France) for critical reading of the manuscript. We wish to thank Dr. Haruo Kasai (Tokyo University, Japan) for providing the plasmid coding PPTA-Cre and Alexis Bemelmans (Molecular Imaging Research Center, CEA, France) for producing the AAV virus. The tdTomato expressing virus was made

available by Dr. Hongkui Zeng, of the Allen Institute for Brain Science. We wish to thank the Cellular Imaging facility of the IBPS (Institut de Biologie Paris-Seine) for expert assistance on microscopy and metrological control of the setup. This work was supported by Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Pierre and Marie Curie (UPMC), Fondation Jérôme Lejeune and the Labex Bio-Psy cluster of excellence. M.D.S. was a recipient of a fellowship from French Ministry of Research and Labex Bio-Psy.

References

- Beckley, J.T., Laguesse, S., Phamluong, K., Morisot, N., Wegner, S.A., Ron, D. (2016) The first alcohol drink triggers mTORC1-dependent synaptic plasticity in nucleus accumbens dopamine D1 receptor neurons. *J Neurosci* 36, 701-713.
- Besnard, A., Bouveyron, N., Kappes, V., Pascoli, V., Pagès, C., Heck, N., Vanhoutte, P., Caboche, J. (2011) Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci* 31, 14296-14307.
- Bernardinelli, Y., Nikonenko, I., Muller, D. (2014) Structural plasticity: mechanisms and contribution to developmental psychiatric disorders. *Front Neuroanat* 8, 123.
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Hervé, D., Valjent, E., Girault, J.A. (2008) Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J Neurosci* 28, 5671-5685.
- Bhakar, A.L., Dölen, G., Bear, M.F. (2012) The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu Rev Neurosci* 35, 417-443.
- 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.
- Cajigas, I.J., Tushev, G., Will, T.J., Dieck, S., Fuerst, N., Schuman, E.M. (2012) The local transcriptome in the synaptic neuropil revealed by deep sequencing and high-resolution imaging. *Neuron* 74, 453-466.
- Cahill, E., Salery, M., Vanhoutte, P., Caboche, J. (2014a) Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front Pharmacol* 4, 172.
- Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., Vanhoutte, P. (2014b) D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19, 1295-1304.
- Cahill et al. (2016) Structural plasticity after chronic cocaine administration occurs through Rap1 Small GTPase signaling. *Neuron* 89, 566-582.
- Cane, M., Maco, B., Knott, G., Holtmaat, A. (2014) The relationship between PSD-95 clustering and spine stability in vivo. *J Neurosci* 34, 2075-2086.
- Chen, J.L., Villa, K.L., Cha, J.W., So, P.T., Kubota, Y., Nedivi, E. (2012) Clustered dynamics of inhibitory synapses and dendritic spines in the adult neocortex. *Neuron* 74, 361-373.

- Costa-Mattioli, M., Sossin, W.S., Klann, E., Sonenberg, N. (2009) Translational control of long-lasting synaptic plasticity and memory. *Neuron* 61, 10-26.
- De Roo, M., Klauser, P., Muller, D. (2008) LTP promotes a selective long-term stabilization and clustering of dendritic spines. *PLoS Biol* 6, e219.
- Dobi, A., Seabold, G.K., Christensen, C.H., Bock, R., Alvarez, V.A. (2011) Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J Neurosci.* 31, 1895-1904.
- Doig, N.M., Moss, J., Bolam, J.P. (2010) Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J Neurosci* 30, 14610-14618.
- Druckmann, S., Feng, L., Lee, B., Yook, C., Zhao, T., Magee, J.C., Kim, J. (2014) Structured synaptic connectivity between hippocampal regions. *Neuron* 81, 629-640.
- Fu, M., Yu, X., Lu, J., Zuo, Y. (2012) Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature* 483, 92-95.
- Futter, M., Uematsu, K., Bullock, S.A., Kim, Y., Hemmings, H.C. Jr, Nishi, A., Greengard, P., Nairn, A.C. (2005) Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5). *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3489-3494.
- Genheden, M., Kenney, J.W., Johnston, H.E., Manousopoulou, A., Garbis, S.D., Proud, C.G. (2015) BDNF stimulation of protein synthesis in cortical neurons requires the MAP kinase-interacting kinase MNK1. *J Neurosci* 35, 972-984.
- Gkogkas et al. (2013) Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493, 371-377.
- Heck, N., Dos Santos, M., Amairi, B., Salery, M., Besnard, A., Herzog, E., Boudier, T., Vanhoutte, P., Caboche, J. (2015) A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. *Brain Struct Funct* 220, 2953-2966.
- Herzog et al. (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J Neurosci* 31, 15544-15559.
- Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci* 10, 647-658.
- Hübener, M., and Bonhoeffer, T. (2010) Searching for engrams. *Neuron* 67, 363-371.
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., Nestler, E.J. (2006) Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 29, 565-598.
- Kelleher, R.J. 3rd, Govindarajan, A., Jung, H.Y., Kang, H., Tonegawa, S. (2004) Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* 116, 467-479.

Knott, G.W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., Svoboda, K. (2006) Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat Neurosci* 9, 1117-1124.

Koya, E., Cruz, F.C., Ator, R., Golden, S.A., Hoffman, A.F., Lupica, C.R., Hope, B.T. (2012) Silent synapses in selectively activated nucleus accumbens neurons following cocaine sensitization. *Nat Neurosci* 15, 1556-1562.

Kozorovitskiy, Y., Peixoto, R., Wang, W., Saunders, A., Sabatini, B.L. (2015) Neuromodulation of excitatory synaptogenesis in striatal development. *Elife* 4. pii:e10111.

Kwon, H.B., Sabatini, B.L. (2011) Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* 474, 100-104.

Kwon, H.B., Kozorovitskiy, Y., Oh, W.J., Peixoto, R.T., Akhtar, N., Saulnier, J.L., Gu, C., Sabatini, B.L. (2012) Neuroligin-1-dependent competition regulates cortical synaptogenesis and synapse number. *Nat Neurosci* 15, 1667-1674.

Liston, C., Cichon, J.M., Jeanneteau, F., Jia, Z., Chao, M.V., Gan, W.B. (2013) Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nat Neurosci* 16, 698-705.

Medvedev, N.I., Dallérac, G., Popov, V.I., Rodriguez Arellano, J.J., Davies, H.A., Kraev, I.V., Doyère, V., Stewart, M.G. (2014) Multiple spine boutons are formed after long-lasting LTP in the awake rat. *Brain Struct Funct* 219, 407-414.

Meyer, D., Bonhoeffer, T., Scheuss, V. (2014) Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* 82, 430-443.

Muñoz-Cuevas, F.J., Athilingam, J., Piscopo, D., Wilbrecht, L. (2013) Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat Neurosci* 16, 1367-1369.

Nägerl, U.V., Köstinger, G., Anderson, J.C., Martin, K.A., Bonhoeffer, T. (2007) Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 27, 8149-8156.

Panja et al. (2014) Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK. *Cell Rep* 9, 1430-1445.

Pascoli, V., Turiault, M., Lüscher, C. (2011a) Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* 481, 71-75.

Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.A., Caboche, J., Vanhoutte, P. (2011b) Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* 69, 218-227.

Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., Vanhoutte, P. (2014) Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal toward pathological adaptation. *Biol Psychiatry* 76, 917-926.

Peebles, C.L., Yoo, J., Thwin, M.T., Palop, J.J., Noebels, J.L., Finkbeiner, S. (2010) Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 18173-18178.

Redondo, R.L., Morris, R.G. (2011) Making memories last: the synaptic tagging and capture hypothesis. *Nat Rev Neurosci* 12, 17-30.

Ren, Z., Sun, W.L., Jiao, H., Zhang, D., Kong, H., Wang, X., Xu, M. (2010) Dopamine D1 and N-methyl-D-aspartate receptors and extracellular signal-regulated kinase mediate neuronal morphological changes induced by repeated cocaine administration. *Neuroscience* 168, 48-60.

Robinson, T.E., Kolb, B. (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46.

Robison, A.J., Nestler, E.J. (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neurosci* 12, 623-637.

Russo, S.J., Dietz, D.M., Dumitriu, D., Morrison, J.H., Malenka, R.C., Nestler, E.J. (2010) The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 33, 267-276.

Salery, M., Dos Santos, M., Saint-Jour, E., Moumné, L., Pagès, C., Kappès, V., Parnaudeau, S., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2016) Activity-regulated cytoskeleton-associated protein accumulates in the nucleus in response to cocaine and acts as a brake on chromatin remodeling and long-term behavioral alterations. *Biol Psychiatry* doi:10.1016/j.biopsych.2016.05.025.

Sarti, F., Borgland, S.L., Kharazia, V.N., Bonci, A. (2007) Acute cocaine exposure alters spine density and long-term potentiation in the ventral tegmental area. *Eur J Neurosci* 26, 749-756.

Schoonover, C.E., Tapia, J.C., Schilling, V.C., Wimmer, V., Blazeski, R., Zhang, W., Mason, C.A., Bruno, R.M. (2014) Comparative strength and dendritic organization of halamocortical and corticocortical synapses onto excitatory layer 4 neurons. *J Neurosci* 34, 6746-6758.

Scheyer, A.F., Wolf, M.E., Tseng, K.Y. (2014) A protein synthesis-dependent mechanism sustains calcium-permeable AMPA receptor transmission in nucleus accumbens synapses during withdrawal from cocaine self-administration. *J Neurosci* 34, 3095-3100.

Shen, H.W., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Zahm, D.S., Kalivas, P.W. (2009) Altered dendritic spine plasticity in cocaine-withdrawn rats. *J Neurosci* 29, 2876-2884.

Toni, N., Buchs, P.A., Nikonenko, I., Bron, C.R., Muller, D. (1999) LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite. *Nature* 402, 421-425.

Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., Besson, M.J., Maldonado, R., Caboche, J. (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J Neurosci* 20, 8701-8709.

Vastagh, C., Gardoni, F., Bagetta, V., Stanic, J., Zianni, E., Giampà, C., Picconi, B., Calabresi, P., Di Luca, M. (2012) N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor composition modulates dendritic spine morphology in striatal medium spiny neurons. *J Biol Chem* 287, 18103-18114.

Wierenga, C.J., Becker, N., Bonhoeffer, T. (2008) GABAergic synapses are formed without the involvement of dendritic protrusions. *Nat Neurosci* 11, 1044-1052.

Wu, G.Y., Deisseroth, K., Tsien, R.W. (2001) Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. *Nat Neurosci* 4, 151-158.

Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H. (2014) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616-1620.

Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., Svoboda, K. (2009) Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron* 61, 247-258.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. A single administration of cocaine induces the rapid formation of stable glutamatergic synapses in the NAc

(A) Upper panel: time-course of the experiment. Following three days of habituation, VGLUT1^{venus} mice were injected with either saline or cocaine (ip, 20mg/kg) and perfused one hour later. Lower panel: 3D surface rendering of dendritic segments labeled by DII (red) with the VGLUT1 boutons (green) in contact with spines. Headspines were segmented and the associated boutons automatically selected using a 3D custom procedure implemented in ImageJ.

(B) Immunostaining for c-Fos following diolistic labeling of striatal neurons allowed the identification of SPN that responded to cocaine.

(C) Spine density of SPN from the NAc was measured one hour after a single exposure to saline or cocaine. Spine density was measured in randomly chosen SPN from saline and cocaine-treated mice and in c-Fos positive SPN from cocaine-treated mice.

(D) Synapse density defined as the density of spines in contact with VGLUT1 boutons is increased by acute cocaine.

(E) Percentage of spines connected to a VGLUT1 bouton is not altered by cocaine.

(F) Spine density from saline and cocaine-treated mice was measured one week after a single cocaine injection preceded by three days of habituation. Images illustrate the result of the 3D automated analysis of synaptic contacts.

(G) Measurements of spine density one week after a single exposure to cocaine.

(H) VGLUT1-positive synapse density one week after a single injection of cocaine shows that the rapid synaptogenesis lead to a persistent connectivity change.

(I) The percentage of VGLUT1-positive synapses remains constant one week after cocaine administration.

Scalebar in A and F = 5microns, B = 10microns. Histograms represent mean $\pm$ SEM with n=number of neurons analyzed from N = 4-5 mice in each condition. C-E: One-way ANOVA and Bonferroni post-test. G-I: T-test . *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$. See supplemental figure S1 and S2.

Figure 2. Synapse formation through contact with pre-existing presynaptic boutons

(A-B) Density of VGLUT1^{venus} boutons measured in NAc, in a volume corresponding to a cube of 10 microns side. A single plane from confocal image stacks is shown (left panels). The density is similar in saline and cocaine-treated mice one hour (A) and one week (B) after cocaine injection (Mean $\pm$ SEM, t-test). Right panels : Density of spines connected to a common VGLUT1 bouton (Median $\pm$ Interquartiles, Mann Whitney test). N mice and n neurons are identical to figure 1.

(C) Maximum intensity projection of a dendritic segment from D1-SPN imaged in acute striatal slice with two-photon microscopy. D1-SPN were specifically labeled by in vivo co-infection with an AAV9 expressing Cre recombinase under PPTA promoter and an AAV9 carrying “flex”-tdTomato. Green arrows indicate locations of spine growth.

(D) Cumulative curve of spine growth represents the percentage of new spines using the number of spines present before the co-stimulation as reference. Slices are stimulated with SKF38393 (10 μ M) and glutamate (3 μ M) for 20 minutes then washed with control ACSF.

The increase in spine growth becomes significant between control and stimulated SPN 25 minutes after the beginning of the stimulation. Two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

(E) Comparison of spine density between 0 and 60 minutes time points confirms an increase in stimulated condition similar to *in vivo* conditions (see fig. 1). Data are expressed as mean $\pm$ SEM, $n = 6$ neurons from $N = 4$ mice for each condition. T-test.

(F) Time-lapse analysis of synaptogenesis shows that new spines contact pre-existing VGLUT1-positive boutons. Single plane from 3D two-photon microscopy images.

Scalebar in A,B = 5microns, C = 4microns, F = 1micron. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. See supplemental figures S3 and S4.

Figure 3. In silico model reveals that synaptogenesis does not occur uniformly along the dendrite

(A) 3D surface rendering the output of the in silico model of synaptogenesis. Right panels are close-up from left panel. The dendrite (grey) with headspine (red) and VGLUT1 boutons (green) has been imaged *in vivo* in saline conditions. Within the image, virtual spines (white) grow from random location at the surface of the dendrite until they either into contact with a VGLUT1 bouton, or reach a maximum distance to the dendrite. The VGLUT1 boutons connected with virtual spines are shown in blue. The model runs in an image that contains all VGLUT1 boutons, but only those connected to the spines are shown here.

(B) Measurements of VGLUT1-positive synapse density increase between saline and cocaine conditions from *in vivo* experimental data and in between saline and in silico model. Wilcoxon signed rank test, $p < 0.05$.

(C) Distribution of minimum border-to-border distance in between headspines from images of spines in *in vivo* conditions. A bimodal distribution is observed with a strong proportion of adjacent spines (arrow on graphic), which is increased one hour after cocaine exposure. The image shows an example of two adjacent headspines.

(D) Measurements of the changes in occurrence of adjacent spines between saline and cocaine conditions from *in vivo* experimental data and in between saline and *in silico* model. Wilcoxon signed rank test, $p < 0.0001$.

Figure 4. Molecular mechanisms involved in spine density increase

Measurements of spine density from SPN in striatal slices co-stimulated with low doses of glutamate and D1R agonist. The co-stimulation induces an increase in spine density.

(A) Inhibition of ERK pathway by U0126 (10 μ M) abolishes the spine density increase.

(B) Blockade of mTOR pathway with rapamycin (25 nM) in acute slices totally inhibited the increase in spine density elicited by co-stimulation.

(C) Scheme of the involved pathways showing the inhibitors used in the study. Both MNK-1 and mTOR activation are essential for the onset of translation.

(D) Measurement of the density of pMNK-1 positive cells in acute slice after co-stimulation.

(E) The inhibitor of MNK-1 activation, CGP57380 (10 μ M), cancels the increase in spine density induced by co-stimulation of SPN from striatal slices.

Histograms show mean $\pm$ SEM with n=number of neurons analyzed from N = 3-5 mice for each condition. A-D and G: Two-way ANOVA and Bonferroni post-test; F: T-test; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Scalebar in F = 30microns, G= 10 microns.

Figure 5. Time lapse imaging and molecular dissociation of spine growth and stabilization

(A) Schematic representation of the experiment. Green arrows show new spines forming during the hour following the co-stimulation, the red arrow indicates when these new spines are not stabilized.

(B) Maximum intensity projection of two-photon image stacks from D1-SPN in NAc acute slices. Time-lapse observations reveal spine growth and stabilization of the new spines upon co-stimulation. Also shown are slices pre-treated with the inhibitor of MNK-1 (CGP 57380), protein synthesis (anisomycin) and transcription (actinomycin D).

(C) Cumulative curves of spine growth following co-stimulation. In the presence of the ERK inhibitor (U0126, 10 μ M), the spine growth is absent, remaining at levels identical to vehicle condition. Note that spine growth kinetics and amplitude induced by co-stimulation are not altered by CGP 57380 (10 μ M), anisomycin (25 μ M) or actinomycin D (25 μ M). Two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

(D) Survival curve showing the maintenance of newly formed spines through time. Spines formed in the presence of CGP 57380 or anisomycin show a marked loss of stability. Actinomycin D does not alter spine maintenance in this time window. Log rank test.

N = 5-7 neurons from N = 3-4 mice, with 27-44 spines formed in each condition. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Scalebar = 2 microns.

Figure 6. MNK-1 is activated after acute cocaine injection and is necessary for structural plasticity *in vivo*

(A) Immunolabeling for pMNK-1 on sections from mice perfused ten minutes after either saline or cocaine injection. Single planes of confocal image stacks from the shell part of the NAc.

(B) The density increase in pMNK-1 positive cells induced by a single administration of cocaine is abolished by ERK inhibitor SL327 injected *in vivo* prior to cocaine. Mean $\pm$ SEM, N = 3 mice for each condition. One-way ANOVA and Bonferroni post-test.

(C) Immunostaining for pMNK-1 in D1-SPN labeled with tdTomato reveal dendritic localization of pMNK-1. Upper panel shows single planes from confocal stack with arrows indicating pMNK-1 spots in the dendrite. Lower panel shows 3D volume rendering of the co-localization of pMNK-1 in a dendrite.

(D) The MNK-1 inhibitor CGP 57380 was injected into the NAc prior cocaine administration.

(E) *In vivo* dendritic spine analysis following injection in the NAc of the inhibitor CGP 57380 prior a single administration of cocaine. 3D surface rendering of confocal images from different conditions. The inhibition of MNK-1 blocks the increase in spine density induced by cocaine. Histograms show mean $\pm$ SEM with n = number of neurons analyzed from N = 3-5 mice for each condition, Two-way ANOVA and Bonferroni post-test.

Scalebar in A = 50 microns, C-E = 1 micron. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Figure 7. Proposed model for synaptogenesis in the adult striatum

Dopamine, which level is elevated under cocaine condition, facilitates NMDAR functions and triggers ERK activation and spinogenesis. Synapse formation occurs through clustered spine growth and contact with pre-existing presynaptic boutons. ERK pathway regulates distinct steps of spine formation through different signaling modules. Firstly, spine growth is controlled by ERK. Secondly, stabilization of the spine is controlled by ERK-induced MNK-1 dependant protein synthesis in a transcription independent manner. Importantly, MNK-1 and protein synthesis are not involved in spine growth, so spine growth and stabilization involve different signaling molecules downstream ERK.

Figure 1 ; Dos Santos et al.

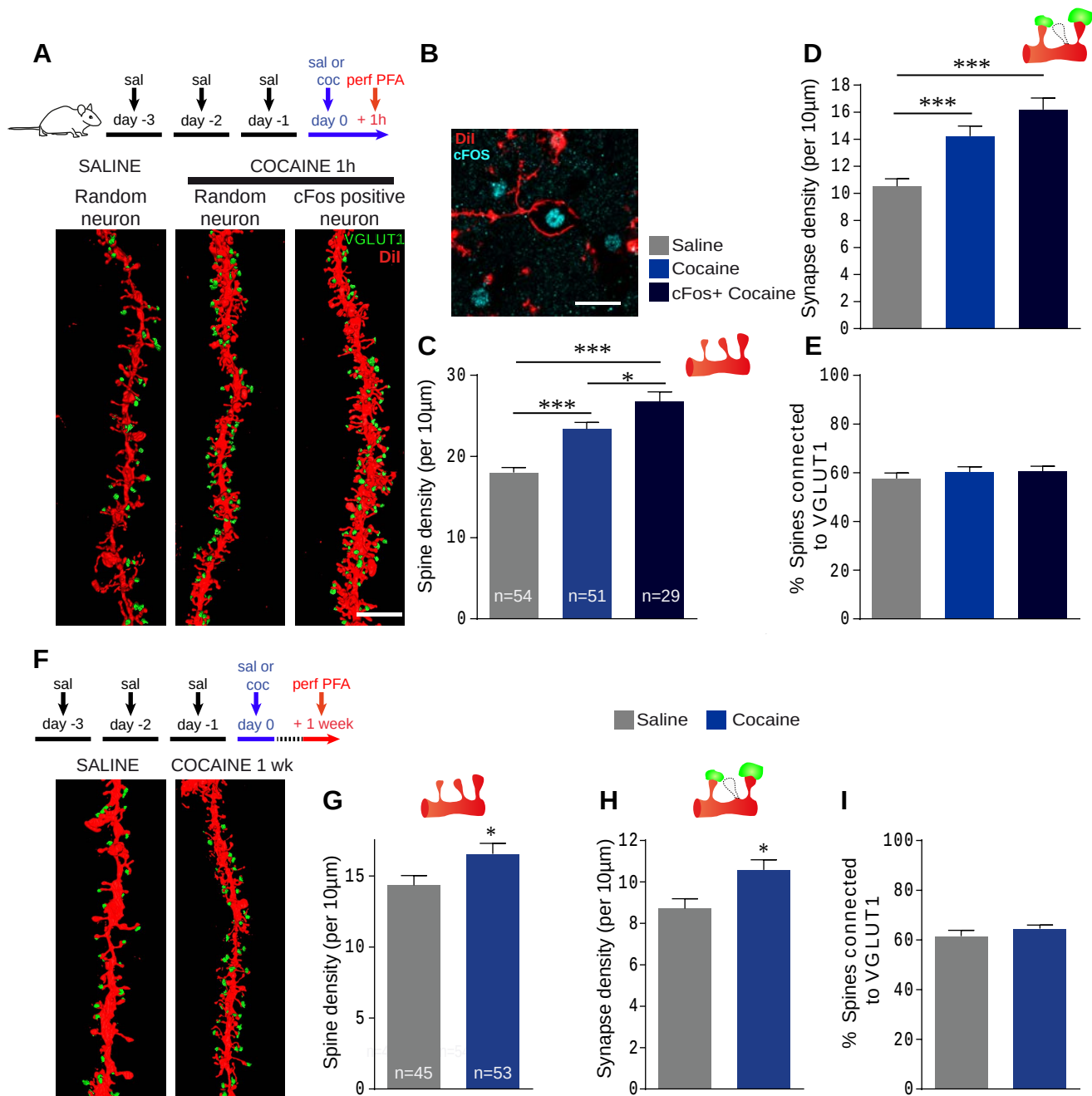


Figure 2 ; Dos Santos et al.

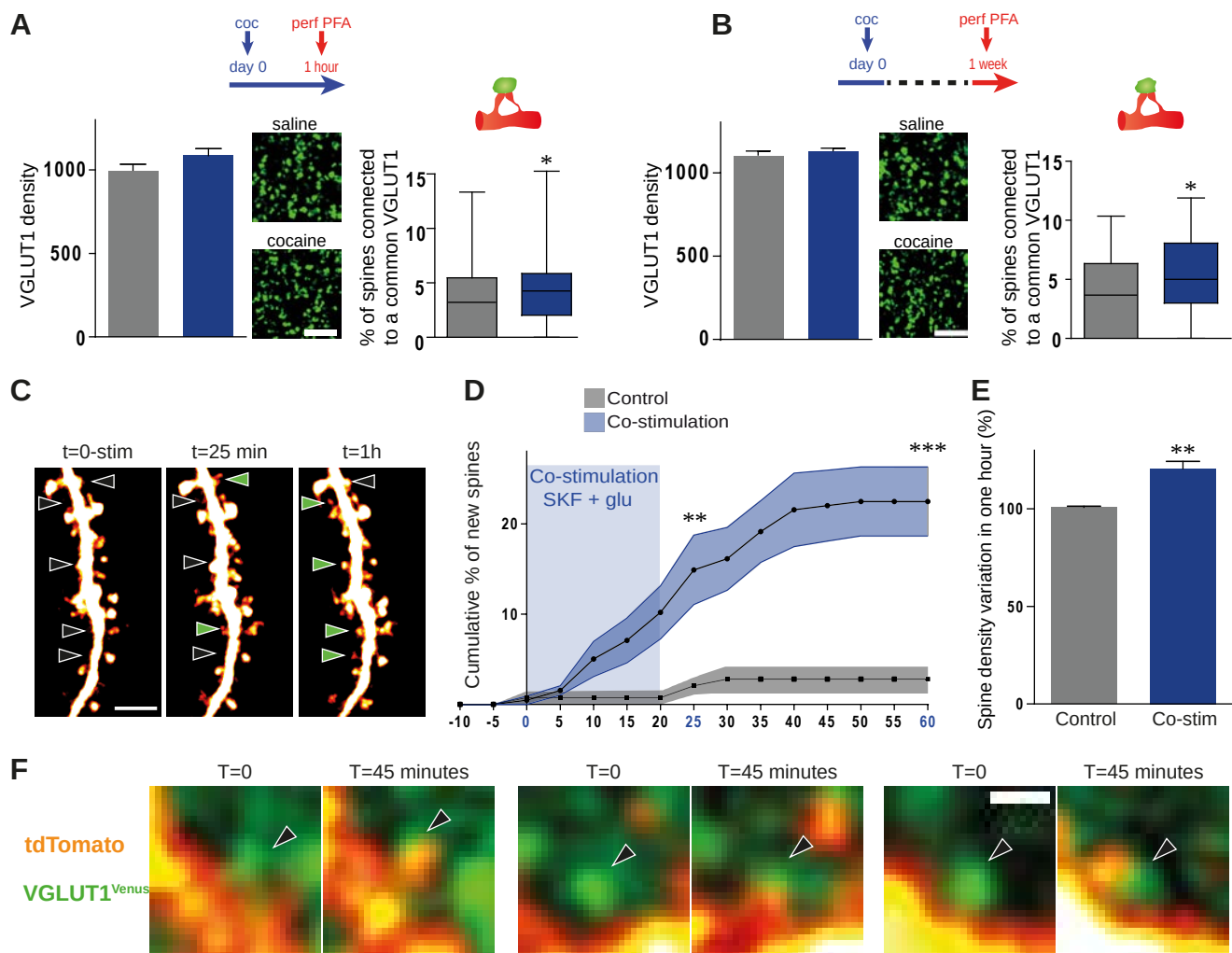
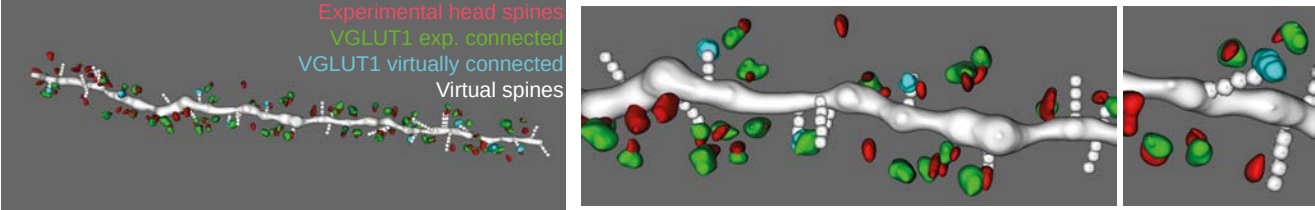
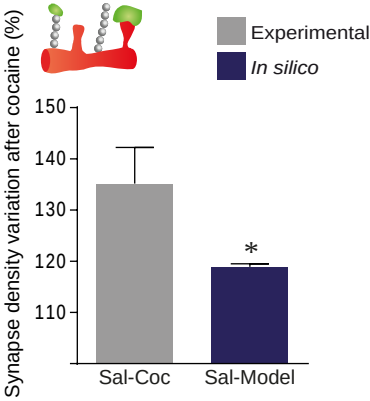


Figure 3 ; Dos Santos et al.

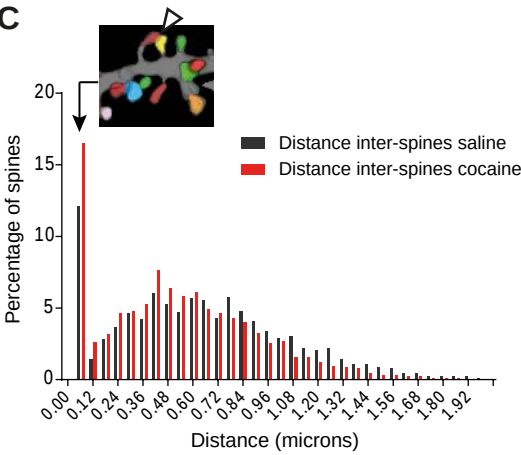
A



B



C



D

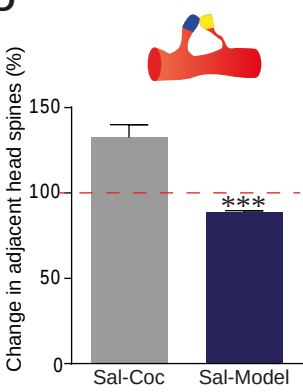


Figure 4 ; Dos Santos et al.

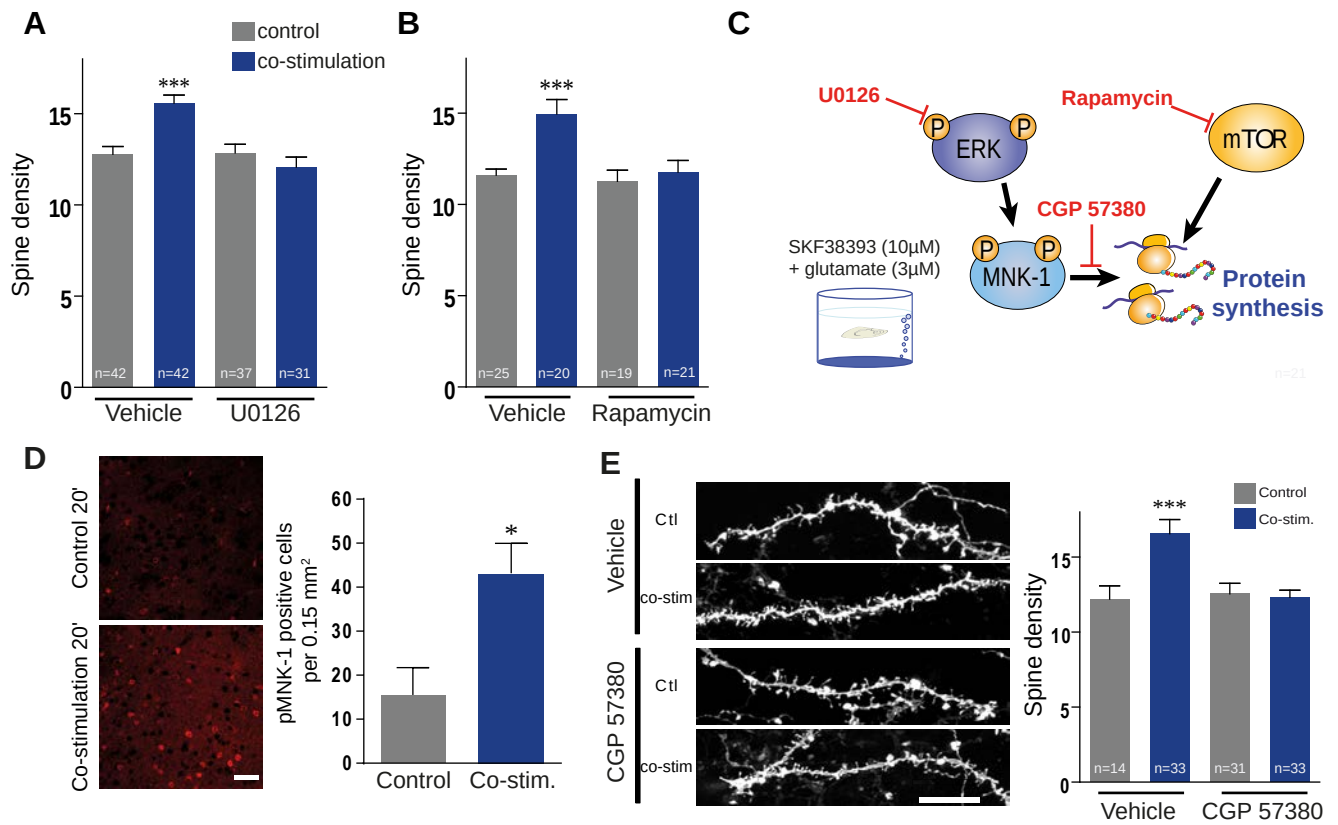


Figure 5 ; Dos Santos et al.

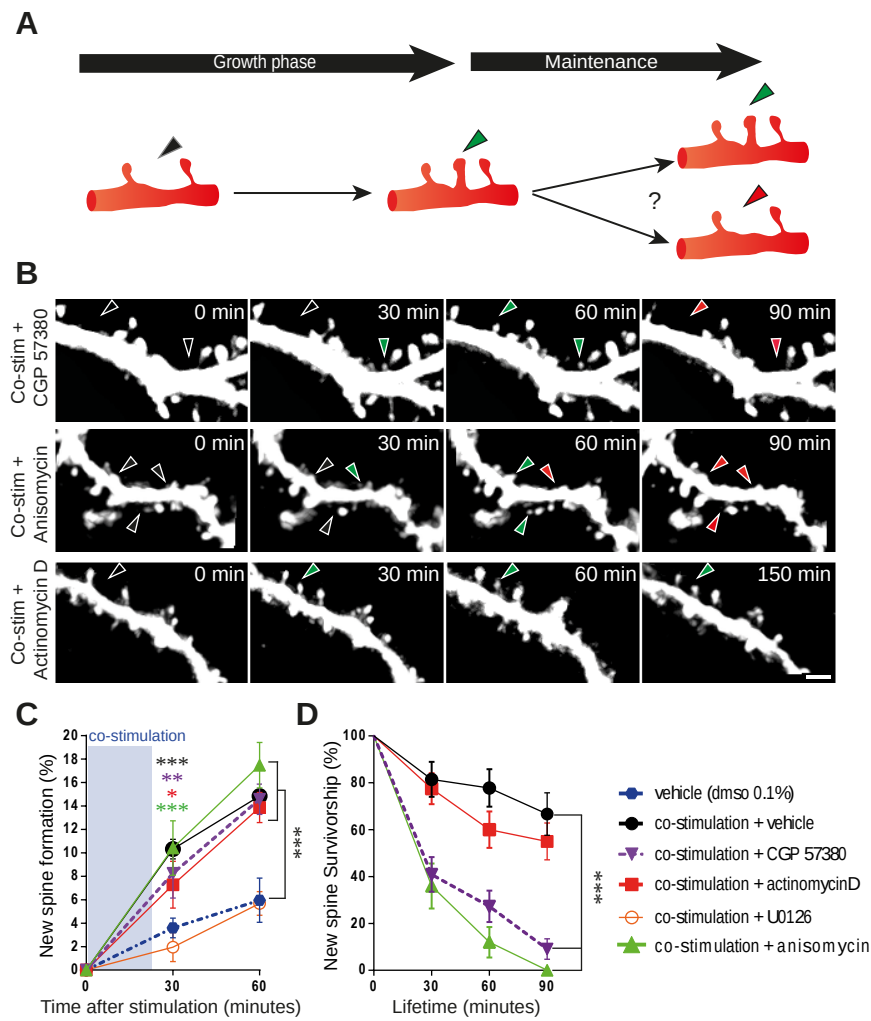


Figure 6 ; Dos Santos et al.

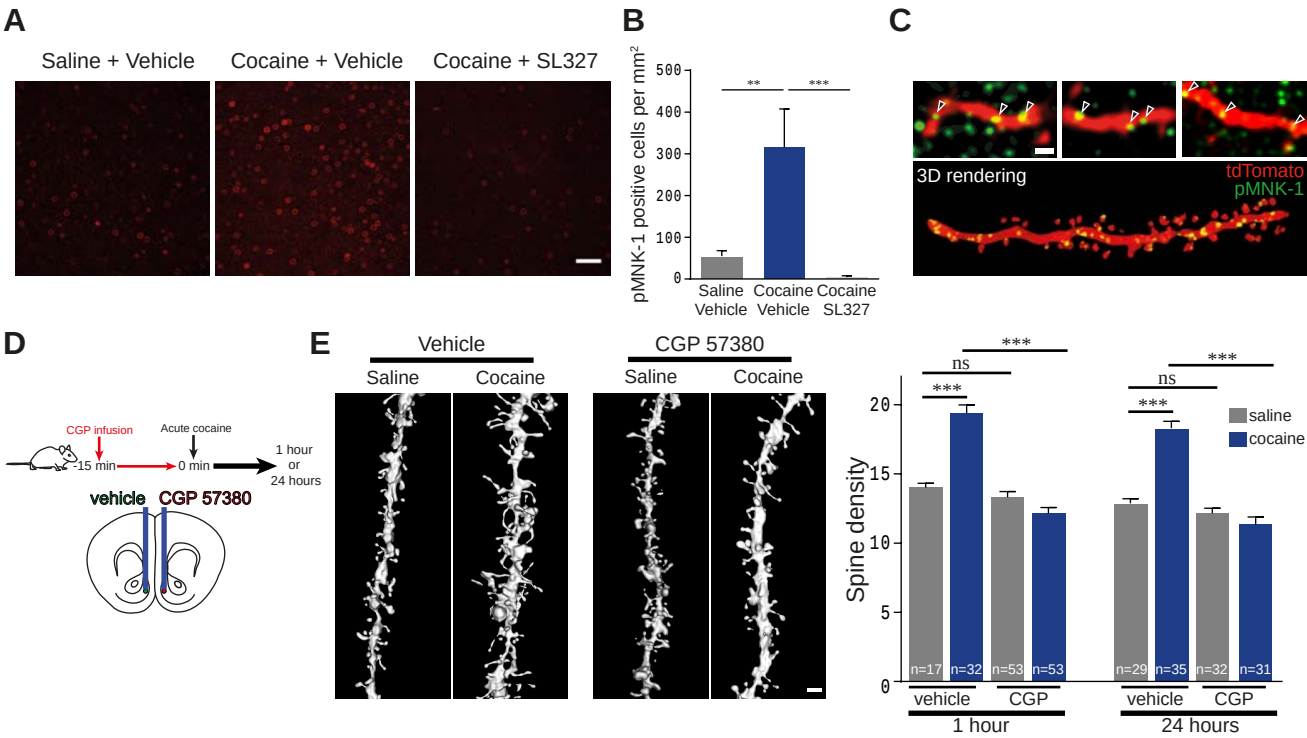
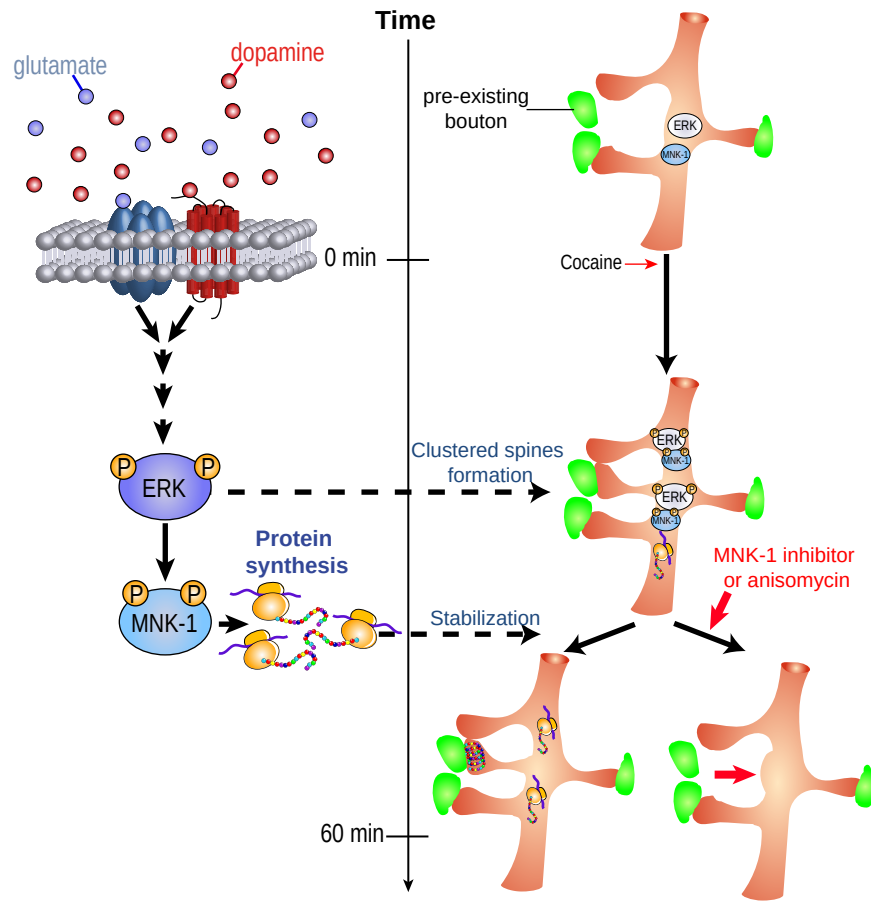


Figure 7 ; Dos Santos et al.



Supplemental Figure Legends

Figure S1. Spine formation is induced in ventral striatum by 10mg/kg acute cocaine but is not observed in the dorsal part of the striatum after 20mg/kg acute cocaine exposure

(A) Quantification of spine density in the shell of the NAc from mice injected acutely with 10 mg/kg of cocaine and sacrificed one hour later.

(B) Quantification of spine density in the dorso-medial part of the striatum one hour after administration of 20 mg/kg of cocaine.

Histograms shown are mean $\pm$ SEM with n = number of neurons analyzed from N = 2-4 mice in each condition. T-test, *: $p < 0.05$.

Figure S2. Effect of a single cocaine exposure on spine morphology of SPN from NAc-shell

(A) Results of the custom 3D segmentation of headspines implemented in ImageJ software.

A1: 3D volume rendering of a dendrite. A2: 3D volume rendering of the headspines extracted with a custom procedure implemented in ImageJ, merged with 3D surface rendering of the dendrite. A3: 3D volume rendering of segmented headspine merged with 3D surface rendering of the original dendrite image.

(B-C) Cumulative frequency distribution of headspine volumes (B) and length (C) measured in neurons from mice perfused one hour after treatment with either saline or cocaine. When indicated (Cocaine c-Fos+) spines were quantified from neurons identified as SPN expressing c-Fos. Note that one hour after cocaine injection spines have a bigger head (B) and are longer (C) than in saline controls.

(D-E) Cumulative frequency distribution of headspine volumes (D) and length (E) measured in neurons from mice perfused one week after single injection of either saline or cocaine. One

week after cocaine the headspines volume (D) remained increased upon cocaine but spine length (E) was identical to saline controls.

3900 to 6200 spines analyzed in $n = 29$ to 59 neurons from $N = 4$ mice in each condition.

Kolmogorov-smirnov test of distribution. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Figure S3. A co-stimulation with a D1R agonist and a low dose of glutamate in striatal slices recapitulates cocaine-induced ERK activation and increase of synaptogenesis in the NAc

(A) Western blot illustrating the kinetics of induction of ERK phosphorylation (pERK) upon co-stimulation with glutamate ($3 \mu\text{M}$) and SKF38393 ($10 \mu\text{M}$).

(B) Example of western blot obtained with lysate harvested 20 min after co-stimulation. Right panel shows the quantification of the pERK band intensity normalized with total ERK ($n=3$ slices from $N=3$ mice in each condition, t-test, * $p < 0.05$).

(C) Immunostaining for pERK illustrating the translocation of pERK to the cell nucleus after co-stimulation.

(D) Immunostaining of pERK (left panel : single plane from confocal stack in false colors) and quantification of pERK positive cell density (right panel) in striatal slices, exposed 20 min to glutamate ($3 \mu\text{M}$) or SKF38393 ($10 \mu\text{M}$) alone, when compared to a co-stimulation. ($n = 4-6$ slices per condition from $N = 7$ mice, one-way ANOVA and Bonferroni post-test, ***: $p < 0.001$).

(E) 3D volume rendering of dendritic segments (red) contacted by VGLUT1 boutons (green) from acute slices in saline (control) or co-stimulation conditions.

(F-G) Co-stimulation of striatal slices induces an increase of spine (F) as well as synapse density (G) on SPN in the shell part of the NAc, one hour after the beginning of the 20 min co-stimulation. Note that the fold increases for spine (F) and synapse (G) density are similar

than in response to cocaine *in vivo* (+28.7% in slices, +29% *in vivo* see Figure 1D and +30.7% in slices, +35% *in vivo* see figure 1E, respectively) (n = 25-32 neurons analyzed from N = 4 mice for each condition, T-test, ***: p < 0.001)

Histograms show mean ± SEM. Scalebar in C = 10 microns, D = 30microns, E = 2microns.

Figure S4. Sparse labeling of D1-SPN and D1R-dependent spine growth

(A) Maximum intensity projection of a broad view from the shell part of the NAc in a section from mouse perfused 2 weeks after *in vivo* injection in the NAc of AAV expressing Cre recombinase under the PPTA promoter and AAV carrying “flex”-tdTomato. For morphological analysis of single dendrites, sparse labeling is achieved by a 1:1000 ratio of AAV “flex”-tdTomato and AAV-PPTA-Cre.

(B) SPN labeled after the viral co-infection do express D1R. The specificity of the tdTomato labeling was controlled by immunostaining of the D1R. Single planes from confocal image stacks show neurons labeled with tdTomato and immunolabeled for D1R (green) in the NAc. Lower panel: numbered arrows indicate neurons for which a close-up is presented.

(C) Co-stimulation on acute slices is not able to induce spine growth in the presence of the D1R antagonist SCH 23390 (10 μM)(n = 4 neurons, two-way ANOVA and Bonferroni post-test, p > 0.05). Co-stimulation+vehicle and Control vehicle conditions are identical to Figure 5.

Scalebar in A = 40microns, B upper panel = 30microns, B lower panel = 10microns.

Figure S5. Maintenance of spines present before stimulation

Analysis of the stability of spines present before the co-stimulation. The graphic shows the cumulative percentage of spines that are not maintained through time-lapse experiment. The inhibitors were superfused 30 min before co-stimulation which starts at 0 time point. Both vehicle and stimulation conditions exhibit similar loss of pre-existing spines at 90 min (around 6%). Inhibition of transcription (actinomycin D, 25 μ M) but not MNK-1 (CGP 57380, 10 μ M) alters stability of pre-existing spines.

N = 5-7 neurons from N = 3-4 mice in each condition. Log rank test, **: $p < 0.01$.

Figure S6 : ERK pathway and protein synthesis are essential for the increase in spine density induced by acute cocaine *in vivo*

(A) In vivo pretreatment with the protein synthesis inhibitor anisomycin (100 mg/kg) completely blocks the spine density increase induced by cocaine.

(B) Inhibition of ERK activation by SL327 (50 mg/kg) totally inhibits cocaine-driven spine density increase.

Histograms show mean $\pm$ SEM with n = number of neurons analyzed from N = 3-5 mice for each condition, Two-way ANOVA and Bonferroni post-test. ***: $p < 0.001$.

Figure S1

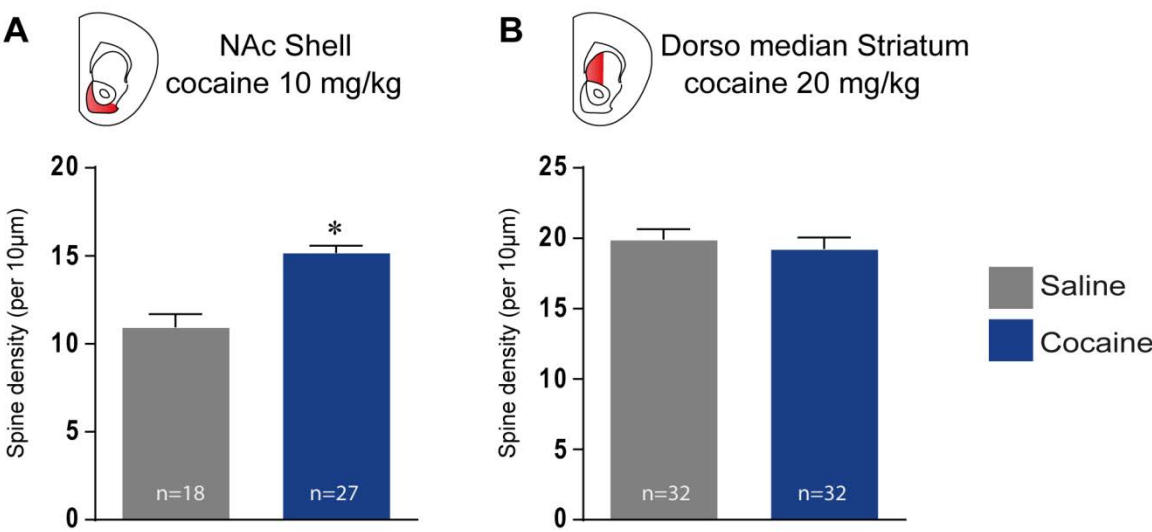


Figure S2

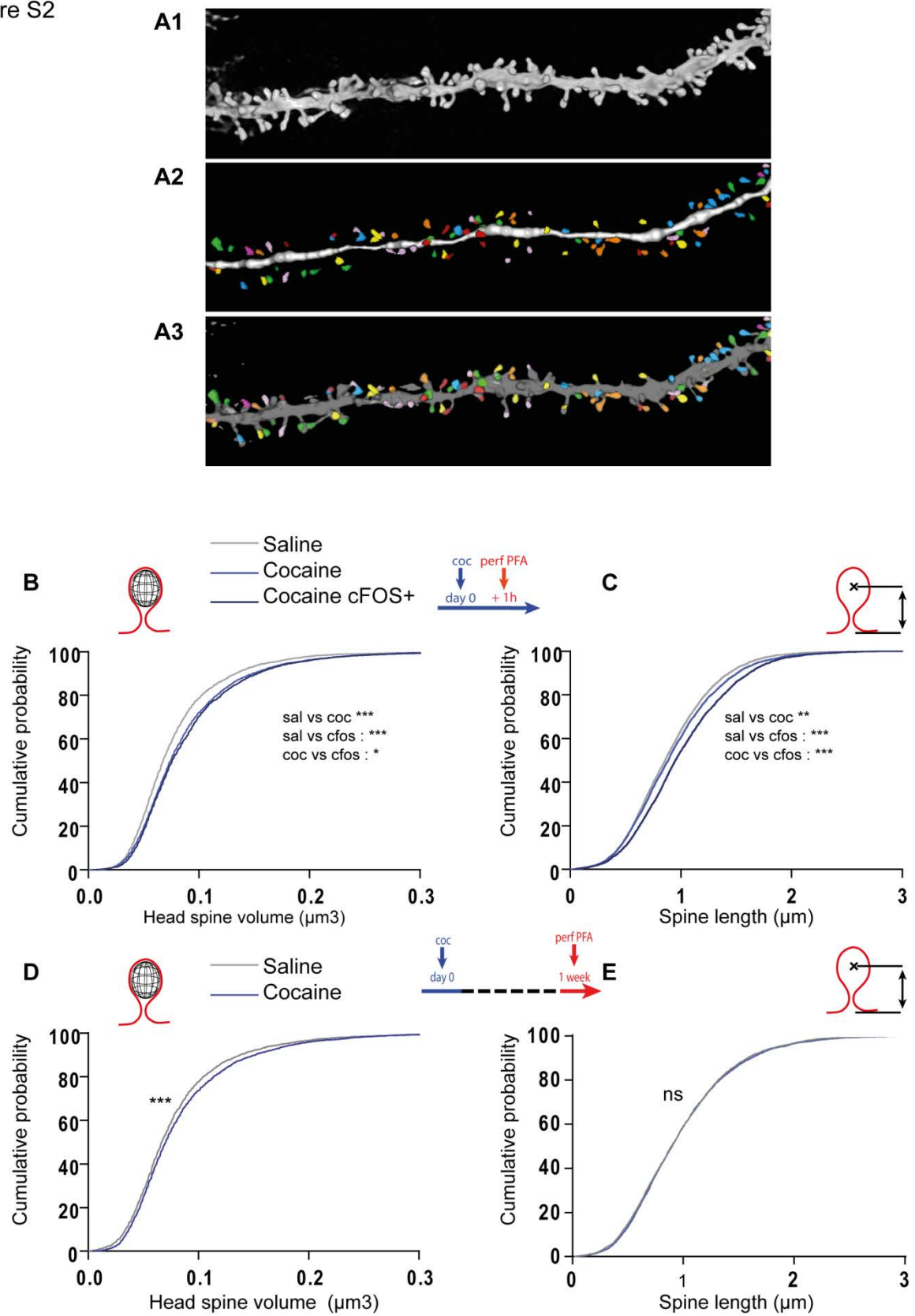


Figure S3

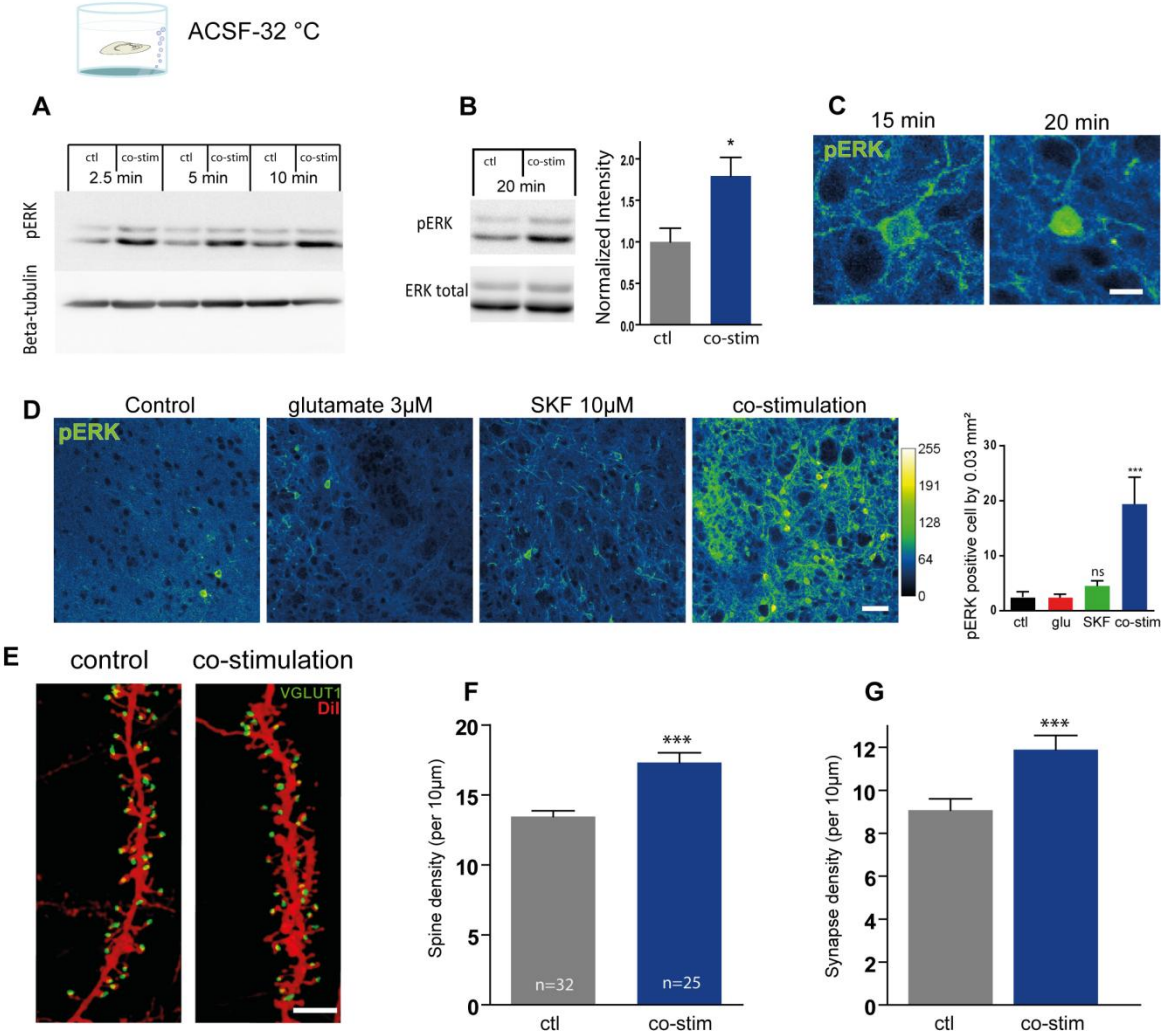
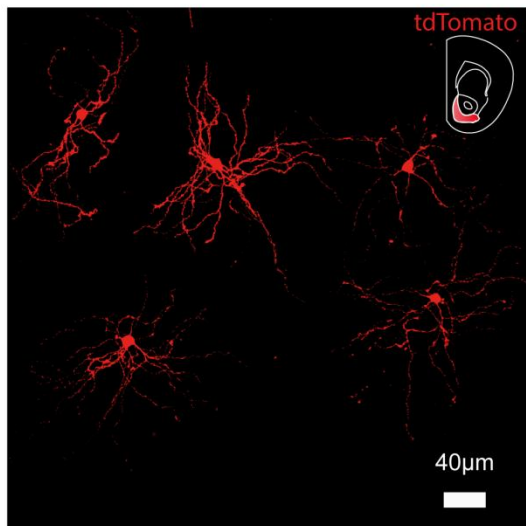


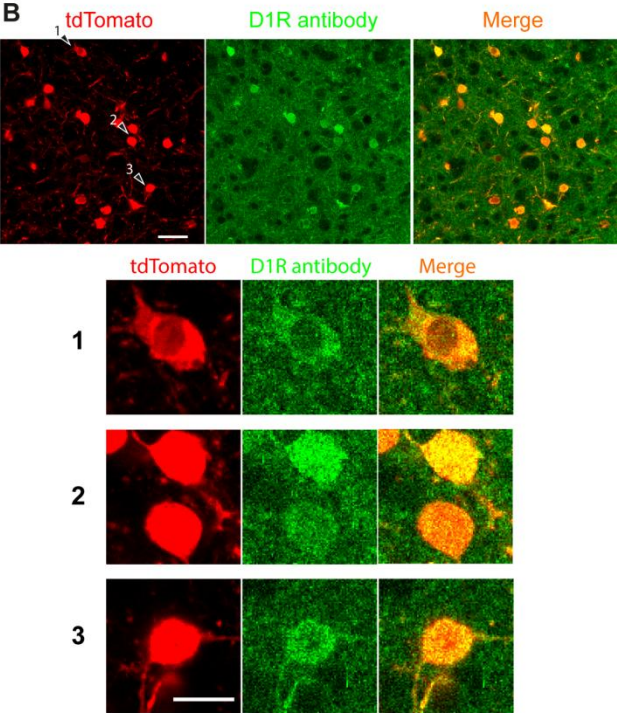
Figure S4

A

Sparse labeling :
Diluted AAV PPTA::Cre / AAV Flex-TdTomato



B



C

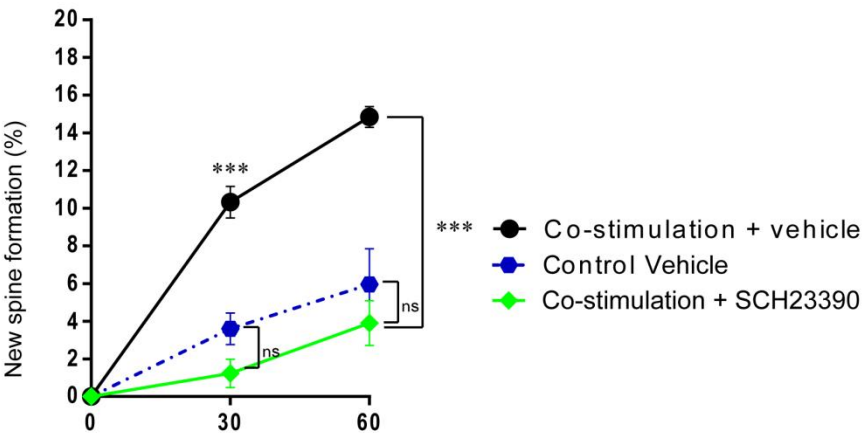


Figure S5

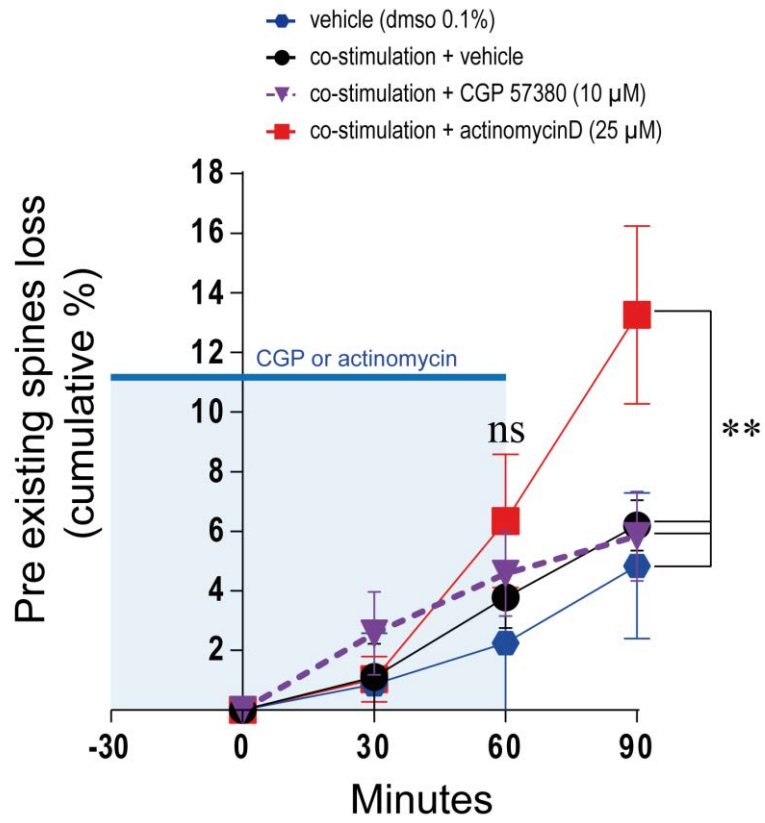
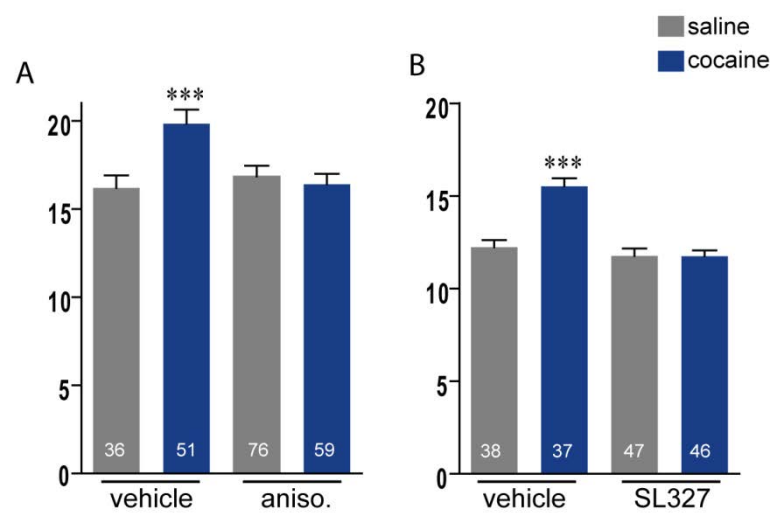


Figure S6



Supplemental Experimental Procedures

Animals's care. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC), and the experiments were approved by the local ethic committee. Male mice weighing 22-24 gm were housed 5 per cage and acclimatized to the laboratory conditions (12 hr light/dark cycle, 21 $\pm$ 1°C room temperature) with *ad libitum* access to food and water. C57BL/6 were purchased from Janvier (Le Genest-St.-Isle, France). VGLUT1-venus knock-in mice express the Vesicular GLUamate Transporter 1 (VGLUT1) fused to the fluorescent protein Venus under VGLUT1 endogenous promoter (Herzog et al. 2011).

In vivo treatments and tissue preparation. Three days before the experiments, mice received daily injection of 0.9% NaCl saline solution. When indicated anisomycin (100 mg/kg in 0.9% saline) or SL327 (50 mg/kg diluted in 5% DMSO, 5% Tween-20, 15% PEG-400, 75% H₂O) were injected intraperitoneally 30 min and 60 min, respectively, prior to cocaine (20 mg/kg dissolved in 0.9% saline) treatment.

For intra-cranial injection of CGP 57380, 7-8 weeks-old mice were first anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (1.5%)/xylazine (0.05%) and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Bilateral brain microcannula guides (26 gauge, 1 mm between the guides; Plastic One) fitted with an occluder to restrict the entry of foreign material were positioned bilaterally to terminate 2 mm above the histological boundary of the shell of the nucleus accumbens (ShNAcc) and anchored with dental acrylic cement. The coordinates used to target the ShNAcc, relative to Bregma, were AP +1.4 mm, L $\pm$ 0.5 mm, and DV 2.5 mm, according to the atlas of Franklin and Paxinos, 2001. The mice were allowed to recover for one week before the brain infusions. After the recovery period

and 3 days of handling and saline intraperitoneal injections for habituation, the bilateral injection cannulae, cut to reach 2 mm beyond the guides (to reach coordinate + 4.5 mm), were coupled to two 5 µl Hamilton Syringe by a Vinyl tubing (inner diameter 0.58 mm) filled with CGP 57380 solution (10 mM) in one side and the vehicle (Phosphate buffer and 0.1% DMSO) in the other side. The injection cannulae were then inserted into the guide cannula after removing the occluder. We injected 1 µl of the CGP 57380 solution on the left side of the brain and vehicle on the other side over the course of two minute driven by a microinfusion pump. After the infusion, 2 min was allowed for diffusion, the microinjectors were removed, and occluders were replaced. 15 min after the start of the brain infusion, the mice received an intraperitoneal injection of cocaine (20 mg/kg) or saline.

For dendrite labeling, mice brains were fixed by intracardiac perfusion of 1.5 % paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (phosphate buffer), pH 7.4 delivered with a peristaltic pump at 30 ml/min for 2 min. Brains were and post-fixed in the same fixative solution for 1 h at 4 °C. Sections (150 µm) were cut in the frontal plane using a vibratome (Leica, Nussloch, Germany). For immunocytochemistry, the same protocol was applied for intracardiac perfusion using 4% PFA and an overnight post-fixation step. The sections of 30 µm in thickness were cut.

Confocal image acquisition and deconvolution. Images stacks were taken with a Confocal Laser Scanning Microscope (SP5, Leica) equipped with a 1.4 NA objective (oil immersion, Leica) with pinhole aperture set to 1 Airy Unit, pixel size of 60 nm and z-step of 200 nm. Excitation wavelength and emission range were as follows: DiI, tdTomato ex. 561, em.570-630, alexa-488 ex. 488 em. 500-550, Venus ex. 514 em. 525-540, cy5 ex. 633 em. 650-750 nm. Laser intensity was set so that each image occupies the full dynamic range of the detector.

Images were acquired with a low noise Hybrid detector combining avalanche gain and GaAsP detection (HyD Leica). Metrology measurements were regularly performed on fluorescent beads to confirm proper alignment of lasers, laser powers and field homogeneity, using ImageJ-based MetroloJ plugin. Deconvolution with experimental PSF from fluorescent beads using Maximum Likelihood Estimation algorithm was performed with Huygens software (Scientific Volume Imaging). 150 iterations were applied in classical mode, background intensity was averaged from the voxels with lowest intensity, and signal to noise ratio values were set to a value of 20.

Segmentation of presynaptic boutons from confocal images. Segmentation of VGLUT1 objects was performed in 3D using the procedure based on image analysis tools developed in the plugin 3DImageSuite as described in Heck et al. 2015. First local maxima were detected. Histogram analysis and image inspection allowed the definition of a threshold intensity so that only local maxima from presynaptic objects were retained. The local maxima were then used as seeds around which 3D intensity distribution was fitted to a Gaussian curve. The intensity value which defines 95% of the area of the gauss curve was chosen as threshold for the border of the object. Buttons of similar size but different intensity are thus extracted as object of similar size. The border of the object was determined following the so-called block algorithm; starting around the local maxima, voxels which followed three criteria were included in the object (intensity above the threshold, intensity lower than previously included voxel, and the inclusion is validated if neighboring voxels are included as well).

Dendrite labeling, dendritic spine analysis and detection of synaptic contacts from confocal images. The labeling method and deconvolution methods have been extensively

described in Heck et al. (2012). Briefly, 50 mg of tungsten beads (Biorad) was mixed with 3 mg of solid green DiI (3,3'-Diocetadecyloxacarbocyanine Perchlorate, Molecular Probes) dissolved in methylene chloride. DiI-coated beads were coated on the inner surface of a PolyVinylPyrrolidone (Sigma-Adrich) pretreated Teflon tube. Helium gas pressure (150 psi) applied through the genegun eject the beads out of the cartridge onto the brain slice. Beads were delivered through a 3- μ m pore-size filter (Isopore polycarbonate, Millipore) to avoid clusters. After labeling, slices were kept in PBS at RT for at least 2 h and mounted in Prolong Gold. For dendritic spine segmentation, the software Neuronstudio (version 0.9.92) (Rodriguez et al. 2008) was used to reconstruct the dendrite and detect dendritic spines. Neuronstudio uses isodata segmentation for spines extraction, coupled to a specific layer-based voxel clustering, and reliably identifies the center of mass of the head spines. Manual correction was required for a minority of spines; in this case, the head spine center of mass was user-defined. Data generated by Neuronstudio are saved in text file format, which is imported into ImageJ. The local maximum at the vicinity of the center of mass of each head spine is found. The segmentation process described above is then performed to accurately segment spine heads. For each striatal neuron, a dendritic segment of 50–70 μ m in length and distant from at least 50 μ m from the soma or after the first branching point was considered. No type classification (thin/mushroom) was used since it is not applicable to SPN (Wilson et al. 1983). Length of the spine was estimated by measuring the 3D distance between the geometrical center of the head spine segmented with our method and the surface of the vertices from the dendrite model reconstructed in Neuronstudio and imported in ImageJ. Detection of synaptic contacts was performed through a 3D automated procedure implemented in ImageJ (Heck 2015). Border to border distance between each headspine and all VGLUT1 objects was computed and the synaptic contact was decided for a distance of zero, meaning the two objects overlap.

Immunocytochemical labeling *in vivo*. Sections were permeabilized for 15 min in 0.2% Triton X-100, 50 mM NaF in TBS, blocked for one hour at RT in TBS containing 4% Bovine Serum Albumin (BSA, v/v) and 50 mM NaF. The sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody in TBS (Anti-PMNK1: 1/500, Cell Signaling, anti-D1R: 1/500, Sigma) with 1% Bovine Serum Albumin (BSA, v/v) and 50 mM NaF. . After washing, sections were incubated for 90 min at RT in TBS with goat anti-rabbit Cy3-conjugated secondary antibody. Sections were rinsed before mounting in Vectashield (Vector Laboratories).

To couple immunostaining with DiI labelling, sections were permeabilized for 7 min with 0.1% Triton X-100. Rabbit polyclonal antibody directed against c-Fos (Santa-Cruz 1/1000) was incubated in 0.01% Triton 3% BSA in PBS overnight at 4 °C. Sections were washed in PBS and incubated with the secondary antibody coupled to Cy5 (anti-rabbit 1/500, Invitrogen) 2 h at RT in 0.01% Triton 3% BSA in PBS. Sections were washed in PBS and mounted in Prolong Gold (Invitrogen).

Viral infections. The viral construct AAVrh9-PPTA-Cre contains an expression cassette consisting of the Cre recombinase driven by the promoter of PPTA gene (substance P), which is specifically expressed in SPN expressing D1R (Yagishita et al., 2014). The virus was injected in combination with the AAVrh9-pCAG-flex-tdTomato-WRPE (Upenn) expressing “flexed” tdTomato under the CMV/actin hybrid promoter (CAG). The stereotaxic injections of AAVrh10 vectors in the ventral striatum were performed in 3 to 4-week-old mice. The animals were first anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine-xylazine and placed in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). The stereotaxic coordinates were: 1.7 mm rostral to the bregma, 0.95 mm lateral to midline and 4.8 mm

ventral to the skull surface. The rate of injection was 0.2 $\mu\text{l}/\text{min}$ with a total volume of 0.5 μl per hemisphere with 2×10^9 and 1.5×10^{12} (GC/ml) titers for AAVrh9-PPTA-Cre and AAVrh9-pCAG-flex-tdTomato-WRPE respectively.

Preparation of acute slices and two-photon imaging. Brains were rapidly excised from 6 to 8 week-old male C57bl6 mice and chilled for 2 min in calcium-free ice-cold ACSF consisting in (in mM): 126 NaCl, 25 sucrose, 26 NaHCO₃, 1.25 NaH₂PO₄, 5.9 MgCl₂, 2.5 KCl, 2.5 glucose and 1.5 kynurenic acid, equilibrated with 95% O₂/5% CO₂ (pH 7.4). Coronal slices of 200-250 μm thickness were cut on a vibratome (Leica 1200 vts) and transferred to an incubation chamber filled with equilibrated ACSF consisting of (in mM) 119 NaCl, 26.2 NaHCO₃, 1 NaH₂PO₄, 1.3 MgCl₂ (6H₂O), 2.5 KCl, 2.5 CaCl₂ and 11 glucose at 32 °C, pH=7.4 in which they recovered for at least 1 h before imaging. Slices were stimulated with glutamate 3 μM (Sigma) and (R)-(+)-SKF-38393 10 μM (Sigma) in ACSF for 20 min, followed by 40 min in ACSF alone. Pharmacological inhibitors were applied 30 min before co-stimulation and washed 30 min after the end of the co-stimulation. The inhibitors used in 0.1% DMSO were: CGP 577380 10 μM , U0126 10 μM , rapamycin 25 nM, SCH 23390 10 μM , anisomycin 25 μM from Sigma, actinomycin-D 25 μM from Tocris. Slices were either imaged in time-lapse or fixed with PFA 4% at RT for 60 min, processed for DiI dendrite labelling or immunofluorescence. For time lapse studies, slices were laid on the glass bottom of a submerged-type chamber, which was placed on a microscope stage and continuously superfused with standard ACSF gassed with 95% O₂/5% CO₂ (32°C, pH 7.4) at a rate of 2 ml/min. Imaging was performed with two-photon upright microscope (SP5 MPE, Leica) equipped with water-immersion objective (25x, NA 0.95, Leica). Venus and tdTomato fluorochromes were both excited with laser at 950 nm and 35 mW (Ti Sapphire, Coherent). The emitted light was filtered using band-pass filter (500-550 nm for venus, 564-604 nm for

tdTomato) and images were acquired with hybrid detector equipped with avalanche gain and GaAsP photocathode (Leica). Image stacks were sampled with voxels size of 100 nm in xy axis and z-step of 500 nm. Deconvolution with theoretical PSF using Maximum Likelihood Estimation algorithm was performed with Huygens software (Scientific Volume Imaging). 150 iterations were applied in classical mode, background intensity was averaged from the voxels with lowest intensity, and signal to noise ratio values were set to a value of 7.

Synaptogenesis modeling. Original stack images from saline conditions are used as a template for simulation of synaptogenesis. The original image is decomposed in different zones (“birth”, “life”, “end”, forbidden”) where the simulated spines will have distinct growing properties. Virtual spines can only initiate growth from “birth” zone, which corresponds to the contour of the dendritic shaft. The “end” zones, on which virtual spines will potentially contact, is defined by the voxels belonging to VGLUT1 presynaptic objects. The voxels inside of the dendrite, the already existing headspines and previously grown virtual spines define “forbidden” zones where virtual spine cannot go. All other voxels in the image constitute the “life” zone, in which virtual spines can grow. A virtual spine is modeled as a set of spheres attached to one other and growing in a specified direction in the 3D space of the image. The sphere have a diameter of 6 voxels (360 nm), which corresponds to the average size of headspines observed in our experiments. The first sphere has its centroid placed in the “birth” zone at a randomly selected location, hence the virtual spines are distributed in a uniform manner along the dendrite. Then 1000 potential spheres connected to this first sphere are generated, and the second sphere is selected among them for being the furthest away from the dendritic shaft while not overlapping with a “forbidden” zone. The growth direction is computed as the direction from the first to the second sphere. The next spheres follow a growing process in which a new sphere is added along the original growth

direction, until an «end» zone is reached. Note that the spine, though designed in the continuous 3D space, will live in the discrete 3D space of the image in the “life” zone. If the sphere overlaps with the “forbidden” zone, a new direction, selected randomly within a range of $\pm 10^\circ$, is computed so the virtual spine can avoid existing spines. The growth is terminated if one of the two following criteria is met: either the distance between the sphere centroid to the contour of the dendrite reach a maximum value of 1.2 microns (which corresponds to the spine length distribution observed in our data), or 20% of the voxels from the sphere overlap with the “end” zone. In the last case, the spine is considered connected to a VGLUT1 presynaptic object.

Western blot. Acute slices were lysed in a boiling lysis solution (1% SDS (v/v) containing 1 mM sodium orthovanadate) followed by sonication, placed for 5 min at 100°C and stored at -80°C. Proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10%), before electrophoretic transfer onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked 1 h at room temperature (RT) in Tris buffered saline (TBS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.5) with 5% non-fat dry milk. Membranes were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in the blocking solution with 0.1% tween-20: total ERK1/2 and phospho-(Thr202-Tyr204)-ERK1/2 (both 1/5000, Cell Signaling Technology), beta-tubulin (1/50000, Sigma). Membranes were rinsed three times in TBS-tween and then incubated for 1 h at RT with anti-rabbit (1/5000, GE Healthcare) antibodies coupled to horseradish peroxidase (HRP). Immunoreactive bands were revealed by enhanced chemoluminescent detection (ECL kit, GE Healthcare) and acquired using the ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science). The densitometry of the relevant immunoreactive bands was quantified using ImageJ and normalized by the intensity of the loading control bands.

Immunofluorescence on acute slices. Slices were permeabilized for 4 h with 0.5 % Triton X-100 then blocked 1 h with 3% bovine serum albumin (BSA) in TBS. Rabbit/mouse poly/monoclonal antibodies directed against phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (1/1000, Cell Signaling Technology), Phospho-MNK-1 Thr197/202 (1/1000, Cell Signaling Technology) were incubated in 0.01% Triton 1% BSA in TBS overnight at 4°C. Sections were washed in PBS and incubated with the secondary antibody coupled to Alexa488/561 (1/1000, Invitrogen) 2 h at RT in TBS. Sections were washed in TBS and mounted in Prolong Gold (Invitrogen).

References for supplementary material

Heck, N., Betuing, S., Vanhoutte, P., Caboche, J. (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct* 217, 421-434.

Heck, N., Dos Santos, M., Amairi, B., Salery, M., Besnard, A., Herzog, E., Boudier, T., Vanhoutte, P., Caboche, J. (2015) A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. *Brain Struct Funct* 220, 2953-2966.

Herzog et al. (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J Neurosci* 31, 15544-15559.

Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego

Rodriguez, A., Ehlenberger, D.B., Dickstein, D.L., Hof, P.R., Wearne, S.L. (2008) Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One* 3,e1997.

Wilson, C.J., Groves, P.M., Kitai, S.T., Linder, J.C. (1983) Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J Neurosci* 3, 383-388.

Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G.C., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H. (2014) A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* 345, 1616-1620.

2.2 Résultats résumés et conclusions

Nous montrons dans cet article que la première exposition à la cocaïne induit bien une augmentation de la densité en épines au sein des SPN du Shell du NAc s'accompagnant d'une augmentation de la densité en contacts synaptiques glutamatergiques. Cet effet est d'autant plus fort lorsque l'on sélectionne les neurones activés par la cocaïne à l'aide d'un immunomarquage de cFos, montrant indirectement un effet préférentiel dans les SPN activés par la cocaïne, et exprimant les D1R (Bertran-Gonzalez et al., 2008). Ces remaniements synaptiques semblent stables puisque l'effet est visible même une semaine après l'injection de cocaïne. Cette plasticité est spécifique du NAc puisqu'elle n'a pas été retrouvée dans le striatum dorso-médian.

De façon similaire à ce que nous avons observé après des administrations chroniques de cocaïne, ces expériences montrent que la densité en boutons présynaptiques VGLUT1^{venus} n'est pas altérée par une injection aiguë de cocaïne, et que le nombre de boutons connectés à deux épines dendritiques est augmenté. Ainsi le mode de formation de ces nouvelles synapses correspond à des épines néoformées connectant des boutons présynaptiques préexistants.

Afin d'observer la formation de ces épines en temps réel, j'ai mis en place et optimisé un modèle de tranches de striatum stimulées *ex vivo* par des agents permettant de reproduire les effets de la cocaïne *in vivo*. J'ai choisi pour cela une co-stimulation pharmacologique à l'aide d'un agoniste des récepteurs D1 (le SKF 38393) et d'une faible dose de glutamate qui avait été mise au point au laboratoire sur culture primaire de neurones striataux (Pascoli et al., 2011). J'ai vérifié que cette co-stimulation permettait de reproduire sur les SPN du NAc 1) l'activation de la voie des ERK ; 2) la formation d'épines dendritiques, une heure après la stimulation.

Ayant validé le modèle, l'étude a été poursuivie en temps réel en microscopie à deux photons. Pour cela, il nous fallait réaliser un marquage des SPN-D1 *in vivo*, avant la réalisation des tranches. Nous avons choisi des infections virales intra-NAc, à l'aide d'une forte dose d'AAV exprimant la td-Tomato « flex » et un faible titre d'AAV exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de la substance-P, spécifique des SPN-D1 (Yagishita et al., 2014). La co-stimulation SKF-glutamate induit effectivement une augmentation de la fréquence de formation des épines sur les D1-SPN, dès 25 minutes après le début de la stimulation. Chez les souris VGLUT1^{venus}, cette co-stimulation permet

d'observer la formation de contacts des boutons présynaptiques avec les épines néoformées. En accord avec les résultats obtenus *in vivo*, ce contact existe pour 60% des nouvelles épines, et correspond à des boutons pré-synaptiques pré-existants.

Un des objectifs de cette thèse était d'élucider des signatures moléculaires des différentes phases de formation des épines par la cocaïne : la pousse et le maintien. Les études pharmacologiques ont tout d'abord été réalisées sur des tranches *ex vivo* fixées 1 heure après le début de la co-stimulation SKF-Glu. L'inhibition pharmacologique des voies ERK (U0126) et mTOR (rapamycine) bloque totalement les épines néo-formées une heure après la co-stimulation. Une cible cellulaire commune des voies ERK et mTOR pouvait être les voies de synthèse protéique dépendantes du complexe *Eukaryotic Initiation Factors* (eiFs). L'initiation de la traduction protéique requiert l'association de ce complexe à l'ARNm, par des processus nécessitant des phosphorylations dépendantes des kinases mTOR et MNK-1 (MAP Kinase Interacting Kinase) une cible cytoplasmique de ERK (Bhakar et al., 2012).

Par immunocytochimie, nous montrons que MNK-1 est activée *ex vivo*, phosphorylée, dans le NAc après co-stimulation. L'inhibition de l'activité de MNK-1 par le CGP 57380 bloque totalement la formation de nouvelles épines induites par la co-stimulation.

Ces résultats nous ont amené à étudier les rôles respectifs de ERK1/2, MNK-1, ainsi que de la traduction locale et la transcription dans les différentes phases de spinogénèse. Pour cela, nous avons utilisé les tranches stimulées *ex vivo*, et suivi la formation des épines sur les SPN-D1 en microscopie à 2 photons, jusqu'à 1h30 après leur apparition. En présence de l'inhibiteur pharmacologique de la voie ERK1/2 (U0126), nous montrons une absence totale de pousse d'épine. De tels résultats ne sont pas observés avec les inhibiteurs de MNK-1 (CGP 57380), de la traduction (anisomycine), ou de la transcription (actinomycine). L'analyse détaillée de la durée de vie des épines néoformées met en évidence des données originales, puisque l'inhibiteur de MNK-1, perturbe de façon importante la stabilité de ces épines au cours du temps. L'inhibition globale de la traduction, et non de la transcription, produit le même effet.

Ainsi, dans l'ensemble, ces résultats permettent de conclure que la voie des ERK joue un rôle fondamental et complexe dans la régulation de la plasticité structurale des SPN-D1 du NAc en 1) initiant la pousse des épines via l'activité de ERK1/2 et 2) en stabilisant ces épines nouvellement formées via une synthèse de nouvelles protéines initiée par l'activité de MNK1.

Enfin, nous avons validé l'ensemble de ces données, *in vivo*, chez la souris. L'inhibiteur de MNK-1, infusé par voie stéréotaxique dans le NAc avant l'administration aiguë de cocaïne, bloque totalement la spinogénèse induite après une heure et son maintien à 24H.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de valider un mode de formation des nouvelles synapses glutamatergiques induite par une injection unique de cocaïne, dépendant de contacts avec des boutons pré-synaptiques pré-existants. Ils mettent en évidence le rôle crucial et les mécanismes d'action de la voie ERK dans cette plasticité structurale.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I) Aspects méthodologiques

I-1) Détection des contacts pré-post synaptiques

Comme détaillé dans la partie méthode de cette thèse et dans la première publication (Heck et al. 2015), nous avons choisi une méthode de détection des nouvelles synapses glutamatergiques au sein des SPN, et basée sur les contacts synaptiques observés en imagerie confocale 3D. Celle-ci a pour avantage de fournir un échantillonnage inégalé, avec plus de 10000 épines analysées par expérience ainsi qu'une méthode de marquage très simple. Les souris sont directement marquées pour VGLUT1 ce qui permet d'éviter de passer par un immunomarquage dont on sait qu'il peut donner des marquages non spécifiques et incomplets lorsque l'on observe les coupes en profondeur (Herzog et al., 2011). De plus, ces souris VGLUT1^{venus} permettent de visualiser dans le NAc seulement les afférences du CPF, de la BLA et du HPCv qui sont les structures essentielles aux aspects émotionnels, de planification et de saillance, de première importance pour la compréhension des réponses aux drogues d'abus. Afin d'avoir accès à la connectivité globale glutamatergique, c'est-à-dire incluant les afférences glutamatergiques issues du thalamus, et exprimant le transporteur vésiculaire du glutamate de type 2, VGLUT2, il pourrait être intéressant de réaliser cette étude chez une souris double KI VGLUT1^{venus} et VGLUT2^{CFP}. Une alternative possible pourrait être d'utiliser chez des souris KI VGLUT1^{venus} une injection d'AAV exprimant la CFP dans le noyau thalamique projetant sur le NAc.

Notre méthode est basée sur un contact observé en image 3D reconstruite, qui ne présente pas l'aspect fonctionnel offert par exemple par les méthodes de microscopie électronique qui permettent d'observer la PSD. Notre méthode pourrait par erreur être assimilée à la loi de Peter qui stipulait que la densité en synapses correspond, dans une structure donnée, au nombre de boutons passant à moins d'un micron de l'arbre dendritique (Kasthuri et al., 2015). Cette loi a été controversée par les études en imagerie électronique montrant qu'un nombre important des boutons apposés aux structures dendritiques ne forment pas de synapses. Mais ce nombre important de faux positifs peut être dû au traitement des coupes nécessaires à la microscopie électronique. Ces divers traitements diminuent la taille globale de la structure ainsi que l'espace de la matrice extracellulaire. D'après Korogod et al., cela pourrait expliquer ces artefacts (Korogod et al., 2015). La méthode d'analyse des contacts que nous avons utilisé ne se rapporte pas totalement à la loi de Peter puisque nous

prenons en compte le contact physique entre les épines et les boutons. Notre méthode est similaire à celle utilisée par Schoonover et ses collaborateurs en 2014 ([Schoonover et al., 2014](#)). Dans cette publication, les auteurs ont étudié les contacts cortico-corticaux et cortico-thalamiques par une méthode d'imagerie confocale en deux couleurs et identifié les éléments pré et post synaptiques. Leur étude est accompagnée de la microscopie corrélative, les synapses observées en imagerie photonique le sont ensuite en microscopie électronique à transmission. Leur étude montre que la méthode de détection des contacts par microscopie photonique donne des résultats proches de la microscopie électronique avec un pourcentage de faux positifs et négatifs relativement faibles. Dans le même ordre d'idée nous avons comparé les pourcentages de connexion de notre étude avec ceux observés en microscopie électronique et obtenu des résultats comparables à ceux obtenus par Doig et al. dans le striatum ([Doig et al., 2010](#)). Enfin ces pourcentages d'épines connectées à un bouton VGLUT1^{venus} positif ne sont pas identiques selon les structures, environ la moitié des épines des SPN sont connectées alors que quasiment la totalité des épines hippocampiques le sont.

L'ensemble de ces observations montre que notre méthode d'analyse des contacts synaptiques, si elle ne permet pas de connaître la fonctionnalité des synapses, est une méthode efficace pour élucider les mécanismes de synaptogénèse.

I-2) Méthodes alternatives d'analyse des contacts synaptiques

Il existe d'autres méthodes d'analyse des contacts synaptiques, l'une des plus courantes étant la microscopie électronique sériée permettant d'observer l'ultrastructure de la synapse et ainsi être certain de la présence de la synapse via la PSD apposée au bouton synaptique. Bien qu'extrêmement précise, cette technique présente de grandes difficultés pour obtenir un échantillonnage sur un grand nombre de neurones et de synapses. Suivant cette méthode, de nombreuses études doivent se restreindre à l'analyse de quelques neurones seulement, ce qui aurait présenté un désavantage pour l'étude des réponses des SPN du NAc à la cocaïne, qui présentent de grandes variabilités de réponse puisque seulement une sous-population des SPN (les SPN-D1 activés, cf [article2](#)) présentent a priori une formation d'épine. Cela nécessiterait de tout d'abord sélectionné les SPN cFos-positifs puis traiter les coupes pour la microscopie électronique, ajoutant une complexité supplémentaire.

Une autre méthode possible qui est apparue récemment est la méthode de GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) ([Feinberg et al., 2008](#); [Kim et al., 2011b](#)), qui

consiste en l'expression de deux régions complémentaires de la GFP, associées chacune à une molécule d'adhésion. Ainsi lorsque ces deux protéines se contactent physiquement lors de l'établissement d'une synapse, la GFP redevient complète et fluorescente. GRASP associe donc les avantages de la microscopie photonique avec l'identification réelle de la synapse. Ainsi l'utilisation de cette technique aurait pu être utilisée au cours de mon étude. Néanmoins certains aspects seraient perdus avec cette technique, en effet elle ne donne pas la présence des boutons synaptiques en elle-même, ainsi notre modèle de formation des synapses au sein du striatum aurait été incomplet puisque nous ne saurions pas si le bouton synaptique était présent ou non avant la formation de la nouvelle épine. Ce problème peut être contourné en réalisant un contre marquage fluorescent des éléments présynaptiques, permettant d'avoir les boutons axonaux fluorescents ainsi que la présence des synapses avec la méthode mGRASP, comme réalisé par Kim et ses collaborateurs en 2011.

Enfin nous pouvons envisager l'étude de l'activité synaptique au sein des nouvelles épines via l'utilisation d'un senseur calcique (de type GCaMP6) (Chen et al., 2013b). La stimulation de ces épines pourrait être réalisée, en fin d'expérience, par la méthode du décaageage de glutamate, suivie de l'observation d'un signal calcique, témoin de l'activité synaptique. De façon plus élégante il serait possible également d'étudier l'activité du couple épine-présynapse, en infectant les neurones glutamatergiques à l'aide d'un virus exprimant le canal rhodopsine ainsi qu'une YFP. Ainsi une fois les contacts formés nous pourrions observer si l'illumination du bouton à l'aide du laser à 2 photons induit bien une activité calcique de la nouvelle épine.

I-3) Limites du modèle d'étude dynamique de la formation des synapses

Une des originalités de l'étude présentée dans le 2^{ème} article de cette thèse est son aspect dynamique en tranche très peu abordé dans le domaine de l'étude de la cocaïne. A l'heure actuelle, il n'est pas encore possible de réaliser une étude dynamique *in vivo* des épines au niveau du striatum ventral qui est une des structures situées le plus profondément sous la surface dorsale du cerveau (plus de 4 mm de profondeur chez la souris). par comparaison, la région cérébrale dans laquelle la dynamique des épines a été étudiée *in vivo* le plus profondément est l'hippocampe dorsal. A cette profondeur, l'installation de microtubes de verre, plus larges que des fibres optiques, a été nécessaire afin de limiter la perte de résolution. Mon expérience en microscopie à deux photons sur tranches est que les épines sont

des structures relativement difficiles à observer même à seulement plusieurs dizaines de micromètres sous la surface de coupe. Leur petit volume et par conséquent la faible quantité de fluorochrome par tête d'épine peut expliquer la difficulté de leur observation *in vivo* à l'aide de fibres optiques. Une alternative pour observer la dynamique des épines est la culture primaire de neurones qui nécessite, pour les neurones striataux, des co-cultures avec des neurones corticaux, afin que les SPN forment des synapses excitatrices. De plus, les neurones en culture sont relativement immatures, même après plusieurs jours de différenciation *in vitro*, et l'on ne peut pas être certain qu'ils répondront exactement comme des neurones adultes. Afin d'avoir un réseau synaptique proche du réseau neuronal adulte et réaliser ainsi des études dynamiques de la formation d'épines nous avons finalement choisi le modèle de la tranche aigüe de cerveau adulte.

Dans le but de mimer les effets de la cocaïne *in vivo*, nous avons réalisé une stimulation pharmacologique dans le bain d'ASCF à l'aide d'une faible dose de glutamate et d'un agoniste du D1DR. Les concentrations respectives ont été choisies afin de reproduire l'activation de ERK dans les SPN en présence de la co-stimulation uniquement, comme décrit dans Pascoli et al., 2011. Une alternative à cette stimulation dans le bain aurait été d'ajouter directement la cocaïne dans l'ACSF, une méthode quelquefois utilisée en électrophysiologie (Shoji et al., 1998). Cette méthode présente néanmoins le désavantage d'un manque de contrôle de l'activité des terminaisons axonales provenant de l'ATV, qui ont été coupées lors de la confection des tranches. Il est ainsi difficile d'affirmer que la cocaïne va reproduire sur tranches, l'activité de la cocaïne *in vivo*, puisqu'il existe perte des décharges toniques et phasiques des neurones dopaminergiques. Cette limite est un inconvénient immuable à la tranche. Un moyen de palier à cela serait de réaliser des plans de coupe présentant un angle adapté afin de maintenir dans le même plan de coupe, les neurones de l'ATV et le NAc. Une telle technique d'angle de coupe a été développée dans le laboratoire du Pr Jean Michel Deniau et Laurent Venance pour maintenir les corps cellulaires des neurones corticaux projetant vers le striatum dorsal en tranche. En revanche il semble impossible de trouver un plan de coupe pouvant maintenir sur une même tranche à la fois les afférences provenant de la BLA, du PFC, l'HPCv et de l'ATV sur le NAc.

Une autre possibilité de stimulation mimant l'effet de la cocaïne pourrait être d'exprimer le canal rhodopsine dans l'ATV en injectant un AAV exprimant cette protéine de façon analogue à l'étude réalisée dans l'équipe du Dr. Kasai (Yagishita et al., 2014). Ainsi l'hyperdopaminergie aurait pu être mimée par illumination du NAc induisant une activation

des fibres dopaminergiques. La même technique peut être appliquée afin de stimuler la libération de glutamate.

Enfin une dernière limitation de ce modèle de tranche aigüe adulte est le temps de survie des neurones limité à quelques heures ne permettant pas l'étude de la stabilité des synapses sur plusieurs jours comme l'autorise l'étude *in vivo* (Knott et al., 2006).

II) Mode de formation des synapses au sein des SPN par la cocaïne

II-1) Formation de la synapse *in vivo* et *ex vivo*

Comme j'ai pu le présenter dans le chapitre IV, de nombreuses études s'intéressent à la formation des épines dendritiques mais il en existe peu qui présentent un lien avec la formation des contacts synaptiques glutamatergiques de ces nouvelles épines. Nous avons vu dans le premier article qu'il n'existe pas d'augmentation de la densité en boutons synaptiques VGLUT1 positifs dans le NAc après des injections répétées de cocaïne. Nous avons émis alors l'hypothèse que les épines néoformées connectaient des boutons pré-existants. L'étude en temps réel a permis de valider cette hypothèse, puisque j'ai pu observer qu'une épine néoformée se connecte systématiquement avec un élément présynaptique présent avant cette pousse. La formation des nouvelles synapses dans le NAc de souris adulte semble donc suivre le deuxième modèle présenté en figure 18, chapitre III, (pour revue, Holtmaat et Svoboda, 2009) et est en accord avec les résultats de Knott et ses collaborateurs montrant que la formation des boutons précède celle des épines *in vivo* dans le cortex adulte. (Knott et al., 2006).

Ces résultats de mode de synaptogénèse nous ont amenés à nous demander si le système de connexion des nouvelles épines était un phénomène stochastique. Pour tenter de répondre à cette question nous avons modélisé *in silico* une pousse d'épines similaire en pourcentage à celle induite par la cocaïne *in vivo* et nous avons étudié leurs connexions aux boutons présynaptiques présents. Cela nous a permis de montrer que la formation de nouvelles connexions synaptiques observée *in vivo*, n'est pas le fruit du hasard et dépend probablement de processus biologiques. Un des mécanismes régulateurs permettant d'augmenter la probabilité de rencontre d'une nouvelle épine avec un bouton synaptique pourrait être la formation d'épines en *clusters*. En effet, nous avons observé un pourcentage

important d'épines accolées (environ 15%), un pourcentage qui tend à augmenter après traitement à la cocaïne alors même que la modélisation *in silico* aléatoire n'a pas permis de créer cette augmentation. Les nouvelles épines poussent donc préférentiellement à proximité des anciennes et probablement ces épines sont celles les plus activées par la cocaïne. Au niveau moléculaire cela pourrait s'expliquer par une activation locale de voies de signalisation telle que ERK ou la voie PKA autour des épines activées sur la dendrite, induisant une formation d'épine préférentiellement dans cette zone.

Un autre point à noter est la quasi absence de filopodes dans l'ensemble de nos expériences *in vivo*, aussi bien en condition contrôle que sous cocaïne, corroborant les résultats en tranches striatales de Kozorovitzkiy et al. (Kozorovitskiy et al., 2015) ainsi que ceux de Knott et al. (Knott et al., 2006) *in vivo* dans le cortex. De la même façon, les expériences d'imagerie en temps réel de la pousse d'épines indiquent que les épines néoformées après la stimulation n'ont jamais de caractéristiques filopodiennes. Elles présentent dès leur formation une tête et une longueur similaire aux épines pré existantes, les rendant indiscernables seulement par des critères morphologiques.

II-2) Réflexions sur le mode de formation des synapses

La figure 4 du premier article de cette thèse démontre bien la grande densité de boutons synaptiques dans le NAc (de 500 à 1000 éléments par carré de 10 μm d'arrête). Cette densité importante pourrait expliquer pourquoi l'épine néoformée n'a pas de nécessité à passer par un stade filopode. En effet, compte tenu de l'abondance des boutons synaptiques dans le NAc, il paraît inutile que l'épine mesure une dizaine de microns pour trouver un partenaire synaptique. Un des avantages à ne pas passer par un stade filopode est un gain de temps non négligeable. En effet le bouton étant déjà actif, il suffirait de créer une zone active lors du contact synaptique, aidé par le contact des molécules d'adhésions et ensuite de maturer l'épine avec l'arrivée d'une PSD, de récepteurs, de molécules de voies de signalisation etc. Nous avons vu que l'activité présynaptique était souvent nécessaire à la stabilité des épines (Becker et al., 2008; Hill et Zito, 2013) et par conséquent le fait que le bouton soit déjà formé représente un avantage indéniable.

Un autre effet direct de l'absence de formation de nouveaux boutons est une augmentation de la synchronicité de la connectivité excitatrice du NAc. Mathématiquement, s'il y a plus d'épines mais un nombre de boutons identique, cela signifie directement que le nombre de boutons connectés à deux épines augmente lui aussi. Nous avons observé cet effet

au sein d'épines d'une même dendrite, mais il peut aussi avoir lieu entre épines de deux neurones différents. D'un point de vue fonctionnel lorsqu'un bouton synaptique va libérer du glutamate, les deux épines connectées à ce bouton recevront ce signal, d'où l'augmentation de la synchronicité. C'est un avantage pour les SPN, qui comme nous l'avons mentionné dans le chapitre II ont besoin d'une grande synchronisation des afférences glutamatergiques afin d'être activés. Au sein d'une même dendrite, l'augmentation d'épines connectées à un bouton commun augmente, mais cette augmentation est de seulement quelques pourcents. Néanmoins, une étude basée sur le décageage de glutamate montre que seulement 3 à 7 épines activées en simultanée suffisent à engendrer une activation longue de ERK au noyau dans des neurones glutamatergiques (Zhai et al., 2013). La faible augmentation observée pourrait donc tout de même influencer sur l'activité neuronale des SPN.

Une information nous manquant néanmoins dans l'étude de ces modes de synaptogénèse est l'identité précise des synapses formées. En effet, le NAc reçoit trois types d'afférences VGLUT1-positives provenant de la BLA, du PFC et de l'HPCv et comme nous l'avons abordé dans le 4^{ème} chapitre, les travaux de Pascoli et al. et de MacAskill et al. montrent bien que ces afférences peuvent présenter des plasticités différentes en réponse à la cocaïne (MacAskill et al., 2012; Pascoli et al., 2014a). Une des méthodes que j'ai pu tester lors d'expériences préliminaires est l'injection d'un AAV exprimant la tdTomato au sein de la BLA, de l'HPCv ou du PFC dans le cerveau de souris VGLUT1^{venus}. Nous avons obtenu ainsi des boutons Venus-positifs, marqués de plus avec la tdTomato provenant d'une de ces trois structures. Ainsi il serait possible d'étudier le pourcentage d'augmentation en contacts synaptiques provenant de ces trois régions cérébrales après les injections aiguës ou chroniques à la cocaïne.

III) ERK : une voie à multiples facettes dans la réponse aiguë à la cocaïne

III-1) Un dialogue entre ERK et la synthèse protéique

Nous avons pu mettre en évidence un rôle essentiel de la voie ERK et mTOR, ainsi que de la synthèse protéique dans la formation de nouvelles épines au sein des SPN en réponse à la cocaïne aiguë. En revanche l'inhibition de la transcription n'a pas permis d'inhiber cette plasticité structurale rapide. Ces résultats corroborent et complètent les données de la littérature concernant l'implication de ces voies de signalisation intracellulaires,

ainsi que de la synthèse protéique dans la formation d'épines dendritiques au sein du NAc, en réponse à des traitements chroniques à la cocaïne.

Afin de trouver un lien possible entre ces voies de signalisation et la traduction, nous nous sommes intéressés à la protéine MNK-1. La voie des ERK1/2 possède de nombreux substrats intracellulaires, de la synapse au noyau. MNK-1 est une protéine kinase cytoplasmique, activée directement par ERK1/2, et contrôlant la synthèse locale de protéines. Cette kinase a été montrée comme essentielle aussi bien pour la LTP hippocampique ([Panja et al., 2009, 2014](#)) que pour la formation de nouvelles épines en cultures primaires de neurones d'hippocampe ([Shih et Hsueh, 2016](#)). En collaboration avec le Dr Marine Salery dans l'équipe nous avons montré que MNK-1 est phosphorylée rapidement après une seule injection de cocaïne. L'ensemble de ces éléments était en faveur d'un rôle de la voie ERK dans la régulation de la traduction de nouvelles protéines nécessaires à la plasticité structurale.

Nous avons vérifié cette hypothèse en utilisant l'inhibiteur spécifique de MNK-1, le CGP57380, qui bloque totalement l'augmentation en densité spinale induite en une heure par la co-stimulation avec du glutamate et l'agoniste du D1DR en tranches aigües fixées. La synthèse protéique étant un processus relativement lent par comparaison aux cinétiques d'activation de ERK1/2 (de l'ordre de la minute), nous nous sommes posés la question de savoir quel était le rôle respectif des deux protéines kinases, ERK1/2 et MNK-1 dans les différentes phases de la plasticité structurale ?

III-2) Les signatures moléculaires de la phase de pousse de maintien des nouvelles épines

Les expériences de suivi en temps réel de formation des épines nous ont permis de répondre à cette question. Lors de ces expériences nous avons pu observer que l'inhibition de ERK par le U1026 bloquait effectivement la phase de pousse des épines, un résultat en accord avec les résultats de Kwon et Sabatini ([Kwon et Sabatini, 2011](#)). De façon intéressante, l'inhibition de MNK-1 n'empêche pas la formation de nouvelles épines, une observation qui semblait en désaccord avec les résultats que nous avons obtenus sur tranches fixées avec cet inhibiteur alors que celui-ci est effectivement introduit dans le bain d'ACSF 30 minutes avant la stimulation.

En poursuivant l'analyse, nous avons observé que même si la pousse n'était pas touchée par l'inhibition de MNK-1, la stabilité des nouvelles épines était quant à elle extrêmement perturbée, expliquant les résultats contradictoires par rapport à nos résultats obtenus en tranche fixée 1 heure après la co-stimulation. Nous nous sommes assurés que l'inhibition de la traduction par l'anisomycine avait le même effet que le CGP, ce qui fut le cas. L'ensemble de ces résultats est en faveur d'un rôle de la synthèse protéique dépendante de ERK dans la stabilité des nouvelles épines formées par la cocaïne.

Le fait que nous observions une pousse d'épines malgré une inhibition de la synthèse protéique pourrait paraître étonnant de prime abord. Néanmoins on peut voir dans la littérature des records de pousse d'épines se formant 20 secondes seulement après la photolyse du glutamate (Kwon and Sabatini, 2011), des cinétiques qui semblent incompatibles avec celles correspondant à des néosynthèses protéiques. En ce sens, même si ce n'est significatif qu'à 25 minutes, nous observons des épines poussant quelques minutes après le début de la stimulation, corroborant ces résultats de la littérature.

Dans l'ensemble, les résultats obtenus au cours de ma thèse ouvrent de nouvelles questions sur le rôle de ERK1/2 dans les différentes phases de formation et maintien de nouvelles épines dendritiques, mais aussi sur l'établissement de nouvelles synapses avec des boutons pré-existants. Dans les paragraphes suivants, je tenterai d'apporter des éléments de réponse à ces différentes questions.

III-2-a) Hypothèse du mode d'action de ERK1/2 sur la phase de pousse rapide des nouvelles épines

Les données de la littérature permettent d'éclairer le rôle possible de substrats de ERK1/2 dans la formation rapide, indépendante de la synthèse protéique, des épines. Des partenaires directs de ERK1/2 peuvent jouer un rôle sur la structure du réseau d'actine. Ainsi, WAVE-2, qui est enrichie dans le cerveau avec WAVE-1, est directement phosphorylée par ERK1/2 dans des modèles de lignées cellulaires (Mendoza et al., 2011). L'inhibition de ERK1/2 inhibe la phosphorylation de WAVE-2 sur plusieurs résidus induisant une diminution de la mobilité cellulaire de fibroblastes ainsi qu'un blocage de la formation et de la mobilité

des lamellipodes de cellules Cos-7 en passant vraisemblablement par une activation de Arp2/3 permettant la nucléation de l'actine. De plus, des études montrent les rôles de WAVE-2, en s'associant à la dysbindine et *abi-1*, le rôle de ERK dans l'activation de WAVE-2 dans les neurones n'a cependant pas encore été mis en évidence. Les WAVE représentent donc des candidats très intéressants pour comprendre le rôle de ERK1/2 sur la pousse d'épines en réponse à la cocaïne. Cette hypothèse représente une partie des futurs travaux découlant de mon projet de thèse. Il n'existe pas, *a priori*, d'inhibiteurs spécifiques de ces protéines. Une des stratégies possibles serait de produire des AAV exprimant un ARN interférant afin de réduire l'expression de WAVE-2 ou d'utiliser des dominants négatifs présentant des mutations rendant les résidus spécifiques non phosphorylables par ERK et exprimés dans le NAc ([Mendoza et al., 2011](#)) et ainsi étudier l'impact de cette inhibition sur la plasticité des SPN.

Une autre protéine phosphorylée par ERK1/2 qui pourrait intervenir en parallèle dans la pousse rapide des épines est la spinophiline. Celle-ci interagit avec l'actine et possède plusieurs sites de phosphorylation par ERK2. Des travaux montrent son rôle dans la plasticité structurale et notamment dans la régulation de la morphologie des épines ([Futter et al., 2005](#)). De plus les traitements chroniques à la dopamine dans les SPN en culture induisent une augmentation de l'expression de la spinophiline ([Fasano et al., 2012](#)).

II-2-b) Hypothèse du mode d'action de ERK1/2 et MNK-1 sur la phase de maintien des nouvelles épines : réflexions sur les candidats synthétisés par MNK-1

L'autre grande question que ce projet amène au niveau moléculaire est : quels sont les protéines synthétisées suite à l'activation de MNK-1 permettant la stabilisation des nouvelles épines ?

Un premier élément de réponse se trouve dans l'étude de Panja et al. de 2009 dans lesquels l'inhibition de MNK-1 bloque l'expression de Arc induite par une stimulation à haute fréquence de l'hippocampe. Arc joue des rôles importants dans la dynamique de l'actine et dans les réponses neuronales et cellulaires à la cocaïne, il pourrait représenter un très bon candidat ([Salery et al., 2016](#)). Un aspect reste énigmatique, puisque Arc interagit avec la coffiline, qui elle-même a plutôt tendance à diminuer la stabilité du cytosquelette d'actine. Cette déstabilisation pourrait permettre une meilleure dynamique de la tête d'épine afin

qu'elle puisse prendre sa forme finale, équilibrée par d'autres protéines traduites permettant une stabilisation de la structure.

L'étude de Bosch et al. de 2015 présentée dans le 3^{ème} chapitre des rappels bibliographiques nous donne de précieux candidats pour le maintien des nouvelles épines : CaMKII et Homer. En effet, Homer est connue pour ses rôles dans la formation de la PSD et de façon très intéressante, son expression est diminuée en culture de neurones corticaux lorsque MNK-1 est inhibé. Dans la même étude, l'expression de la sous-unité alpha de la CaMKII est aussi perturbée par la diminution d'activité ou d'expression de MNK-1 (Genheden et al., 2015). Il serait intéressant d'étudier l'impact du CGP 57380 sur la traduction dendritique de CaMKII α dans les SPN en tranches co-stimulées avec du glutamate et l'agoniste du récepteur D1 grâce à une construction permettant d'avoir les régions non codantes partie 5' et 3'UTR de la CaMKII (permettant de reproduire la régulation traductionnelle et l'adressage des ARNm aux dendrites de façon identique à CaMKII) et exprimant la GFP comme rapporteur (Aakalu et al. 2001). Mon hypothèse est que la CaMKII jouerait, tout comme dans l'étude de Bosch et al., deux rôles possibles dans la formation de nouvelles épines. En condition basale, elle serait liée au réseau d'actine pour le maintenir. Une fois activé par la cocaïne, l'entrée de calcium au niveau des SPN permettrait d'activer la CaMKII qui se décrocherait du réseau d'actine et permettrait ainsi une labilité du réseau. Une fois l'épine formée, la synthèse de CaMKII permet de remplir l'épine et de stabiliser le réseau une fois le pic de calcium passé.

Enfin un autre candidat pouvant participer à la stabilité synaptique serait PSD-95 dont on sait que sa traduction peut être rapide, dendritique (Cajigas et al., 2012) et dépendante de l'activation du récepteur D1 dans les SPN (Beckley et al., 2016). Une augmentation des niveaux de PSD95 dans les dendrites est corrélée à leur stabilisation (Cane et al., 2014; Meyer et al., 2014).

II-2-c) Hypothèse du mode d'action de ERK1/2 et MNK-1 sur la synaptogénèse

Les études de time-lapse ont montré que les épines néoformées contactaient des boutons synaptiques sans délai. Il serait intéressant de savoir si la stabilisation des épines dépend également de ces contacts établis rapidement (Meyer et al., 2014). La neurotrophine est une molécule d'adhésion traduite localement dans les dendrites (Cajigas et al., 2012) (via

l'activation d'eIF4E ([Gkogkas et al., 2013](#)), dont l'activation dépend de MNK-1. Etant donné le rôle clé de cette protéine trans-synaptique dans les processus de synaptogénèse, il serait intéressant d'en étudier le rôle dans la stabilité des protéines.

IV) Le rôle des nouvelles épines formées rapidement par la cocaïne sur le comportement

Nous ne nous sommes pas intéressés au rôle des nouvelles épines et de l'activation de MNK-1 sur les adaptations comportementales à la cocaïne. Je considère néanmoins cet aspect comme fondamental et une des expériences à réaliser serait d'inhiber MNK-1 avec l'infusion intra-NAc de CGP 57380 lors de la première injection de cocaïne et de regarder l'impact de cette inhibition sur la sensibilisation locomotrice et la préférence de place conditionnée 7 jours plus tard.

En complément de cette étude et de façon plus élégante, nous pourrions utiliser un système similaire au groupe du Dr Kasai pour affaiblir les épines activées lors de la première exposition à la cocaïne afin d'étudier si elles représentent effectivement un substrat de l'apprentissage cellulaire de l'apprentissage régulé par la récompense ([Hayashi-Takagi et al., 2015](#)).

V) Modèle hypothétique de plasticité structurale rapide adulte en réponse à la cocaïne

L'ensemble des résultats expérimentaux et les données de la littérature nous permettent de discuter un modèle hypothétique de plasticité structurale en réponse à la cocaïne (**Figure 22**).

V-1) La co-stimulation du NMDAR et D1DR induit un pic d'activité de ERK responsable d'une pousse d'épines

Dans un premier temps, l'augmentation de la concentration en dopamine extracellulaire striatale par la cocaïne aiguë induit une potentialisation des courants NMDA-R en se basant sur les travaux précédents de l'équipe ([Cahill et al., 2014b](#); [Pascoli et al., 2011](#)) via l'activation de la kinase Fyn et la formation d'oligomères D1DR-NMDAR, sans influencer

sur la libération du glutamate. Cette co-stimulation, que nous avons validée en tranche, nécessite l'activation des deux récepteurs afin d'activer la voie des ERK, en accord avec les travaux de Pascoli et al. (2011) et de Valjent et al. (2000). Cette activation de ERK permet une pousse d'épines, corroborant les travaux de Kwon et Sabatini. Nous n'avons pas mis en évidence le partenaire de ERK1/2 responsable de cette phase de pousse. De nombreux indices portent à croire qu'il pourrait s'agir de la protéine WAVE-2, directement phosphorylée par ERK1/2 et responsable de la formation des lamellipodes en lignées cellulaires ainsi que dans la plasticité structurale en association avec Abi1 et la dysbindine.

Même si nous ne les avons pas étudiés, il ne faut pas négliger les rôles possibles des voies PKA et CaMKII. La CaMKII, après entrée de calcium se détache du réseau d'actine afin de permettre les remaniements du réseau selon Bosch et al. (Bosch et al., 2014). Il est probable que ce mécanisme ait aussi lieu au niveau de la dendrite du SPN activé par la cocaïne permettant ainsi une labilité du cytosquelette autorisant la formation de la protrusion initiale. La PKA aussi peut jouer un rôle clef selon Kozorovitskiy et al. (Kozorovitskiy et al., 2015) et les travaux de Bosch et al. (Bosch et al., 2014). L'inhibition de la CaMKII ou de la PKA pourrait ainsi inhiber les phénomènes de formation de nouvelles épines que nous observons. D'ailleurs, c'est intéressant car la voie des ERK présente un point de convergence des voies de signalisation PKA et CAMKII (pour revue, Lynch, 2004).

V-2) La pousse d'épine induite par ERK1/2 présente un mode de formation non stochastique

ERK permet donc la pousse des épines et nous avons pu observer que celle-ci n'était pas modélisable informatiquement de façon totalement aléatoire. En effet les connexions observées réellement sous cocaïne sont plus élevées que celles observées informatiquement. Ceci peut avoir deux explications : dans un premier temps les épines semblent démarrer leur pousse à proximité des épines existantes, l'activation des voies de signalisation à proximité de ces épines activées pourrait expliquer ce phénomène. Ensuite les têtes d'épines ont tendance à être accolées et former des *clusters*, de façon là aussi non aléatoire. Ces amas pourraient résulter d'un guidage des nouvelles épines vers les boutons pré synaptiques eux aussi pré existants. Est-ce que le léger *spill over* de glutamate autour du bouton peut être une explication plausible ? Certaines données dans la littérature semblent avancer cette théorie. La vérification expérimentale en tranche reste assez difficile à mettre en œuvre.

Un des effets de cette pousse possiblement guidée que nous observons est une augmentation du nombre de boutons innervant plusieurs épines. Cela a pour conséquence d'augmenter la synchronicité du système, ces boutons pouvant alors décharger en simultané sur deux épines du même neurone.

Une fois le contact physique formé entre les éléments pré et post-synaptiques, les molécules d'adhésion telles que les synCAM ou bien encore les neuroligine/neurexines vont participer à la formation de la zone active et aider à la maturation de la tête d'épine ([pour revue, Washbourne et al., 2004](#)).

V-3) La traduction dépendante de ERK comme point de contrôle critique pour la survie de l'épine

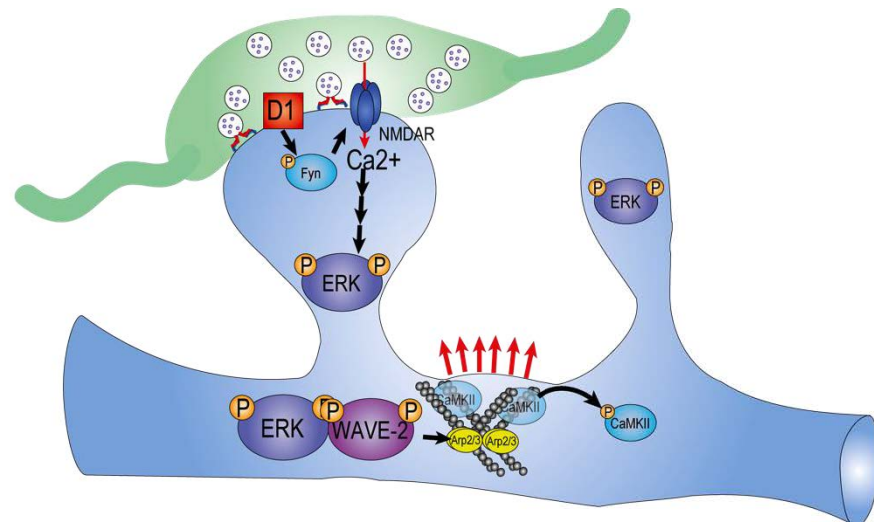
Une fois l'épine formée et connectée ou non à un bouton synaptique, vient une phase de consolidation précoce essentielle pour sa survie lors de laquelle a lieu une néo-synthèse protéique dépendante de la voie ERK via l'activation de MNK-1 ainsi que de l'activation de mTOR, activée par Akt elle-même activée par la cocaïne. D'un point de vue physiologique, que pourrait bien signifier cette traduction ? Mon hypothèse est que ce mécanisme est le témoin direct que l'épine est potentiellement un élément actif. La nouvelle synapse est activée par l'environnement lors de l'apprentissage d'une nouvelle tâche, prouvé par la présence de synthèse protéique, et représente donc potentiellement une trace mnésique intéressante à maintenir.

MNK-1 a été montrée comme responsable de la synthèse de Homer et de Arc dans les neurones. Ces deux protéines sont de grand intérêt puisqu'elles sont étroitement liées à la plasticité structurale en interagissant notamment avec le cytosquelette d'actine. Dans le cas d'Homer, son rôle dans la stabilité de la PSD est connu. En revanche Arc, en interagissant avec la cofiline va plutôt diminuer la stabilité du réseau neuronal. Il est possible que l'épine ait besoin d'une phase de déstabilisation du réseau d'actine afin de permettre les remaniements nécessaires afin de former la tête. Un peu comme lors de l'élargissement de la tête de l'épine avec une phase durant laquelle le réseau d'actine doit être labile.

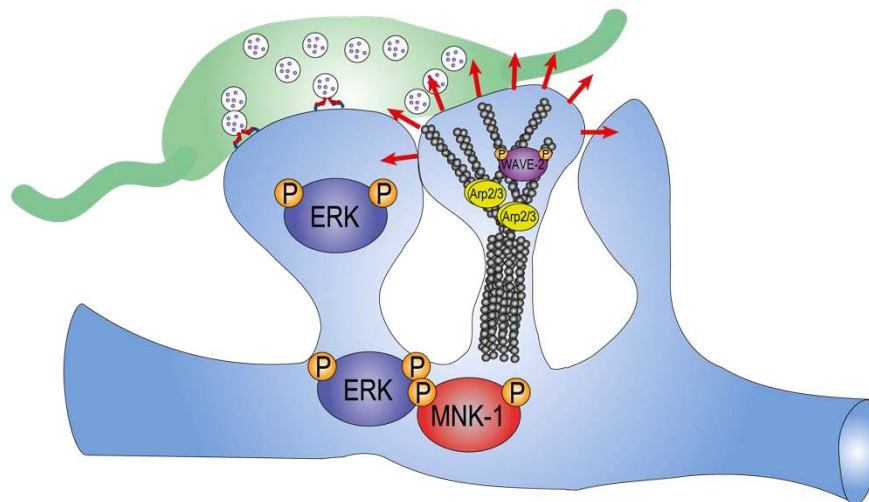
3) Maintien des épines à plus long terme et rôle de la transcription

Enfin ERK peut jouer à plus long terme un rôle stabilisateur des nouvelles épines via les mécanismes transcriptionnels induits notamment par l'activation de Elk-1 et MSK-1.

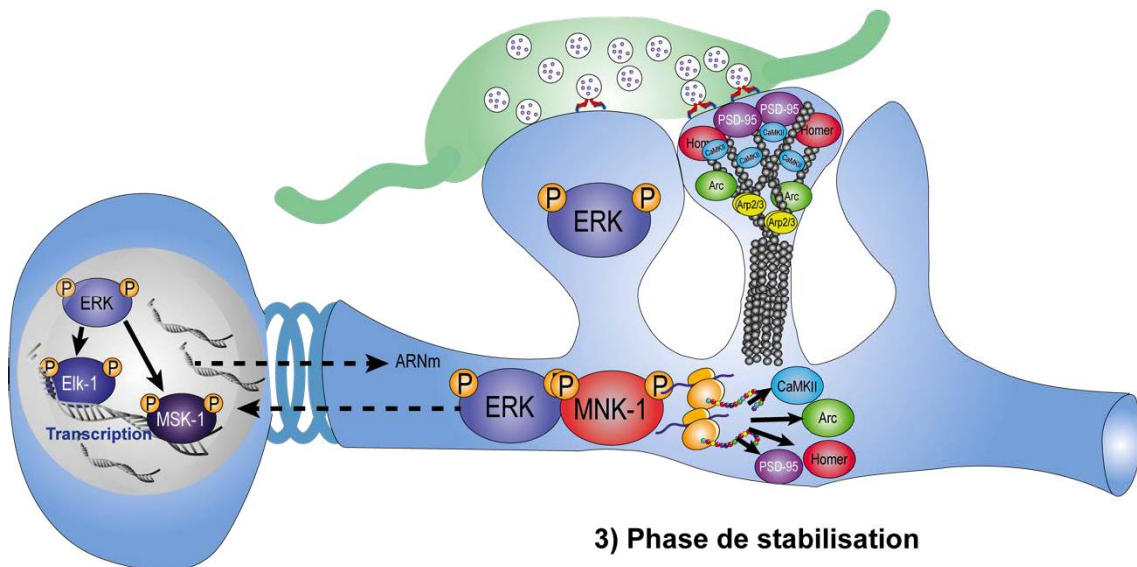
L'inhibition de la transcription n'a pas induit d'effet immédiat total sur l'augmentation en densité d'épine ou leur stabilité comme le fait l'inhibition de la synthèse de protéines. Nous émettons l'hypothèse que les effets transcriptionnels de ERK sont visibles plus tard, probablement 24 heures plus tard. En accord avec l'inhibition de la plasticité structurale induite par le blocage de Elk-1 lors de traitements chroniques à la cocaïne, l'analyse des épines ayant eu lieu 24 heures après la dernière injection ([Besnard et al., 2011](#)). Nous pouvons postuler qu'une pousse a lieu chaque jour de l'injection indépendamment de la transcription, mais que la transcription est indispensable pour maintenir les épines à long terme.



1) Activation de ERK et début de la phase de pousse d'épine



2) Fin de phase de pousse



3) Phase de stabilisation

Figure 22 : schéma récapitulatif hypothétique de la formation de nouvelles synapses lors de la première exposition à la cocaïne chez la souris.

Références bibliographiques

- Abraham, W.C. (2008). Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 387.
- Adrian, M., Kusters, R., Wierenga, C.J., Storm, C., Hoogenraad, C.C., and Kapitein, L.C. (2014). Barriers in the brain: resolving dendritic spine morphology and compartmentalization. *Front. Neuroanat.* 8, 142.
- Ahmed, S.H., Lenoir, M., and Guillem, K. (2013). Neurobiology of addiction versus drug use driven by lack of choice. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1–7.
- Aakalu, G., Smith, W.B., Nguyen, N., Jiang, C., and Schuman, E.M. (2001). Dynamic Visualization of Local Protein Synthesis in Hippocampal Neurons. *30*, 1–14.
- Alonso, M., Medina, J.H., and Pozzo-miller, L. (2004). ERK1 / 2 Activation Is Necessary for BDNF to Increase Dendritic Spine Density in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. 172–178.
- Anthony, J.C., Warner, L.A., Kessler, R.C., 1994. Comparative epidemiology of dependence on tobacco, alcohol, controlled substances, and inhalants. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* 2, 244
- Arellano, J.I., Benavides-piccione, R., Defelipe, J., and Yuste, R. (2007). Ultrastructure of dendritic spines : correlation between synaptic and spine morphologies. 1.
- Badiani A, Anagnostaras SG, Robinson TE (1995) The development of sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine is enhanced in a novel environment. *Psychopharmacology (Berl)* 117:443–452.
- Balleine, B.W., Liljeholm, M., and Ostlund, S.B. (2009). The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav. Brain Res.* 199, 43–52.
- Banko, J.L., Hou, L., and Klann, E. (2004). NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *J. Neurochem.* 91, 462–470.
- Banko, J.L., Hou, L., Poulin, F., Sonenberg, N., and Klann, E. (2006). Regulation of eukaryotic initiation factor 4E by converging signaling pathways during metabotropic glutamate receptor-dependent long-term depression. *J. Neurosci.* 26, 2167–2173.
- Becker, N., Wierenga, C.J., Fonseca, R., Bonhoeffer, T., and Nägerl, U.V. (2008). LTD induction causes morphological changes of presynaptic boutons and reduces their contacts with spines. *Neuron* 60, 590–597.
- Beckley, J.T., Laguesse, S., Phamluong, K., Morisot, N., Wegner, S. a., and Ron, D. (2016). The First Alcohol Drink Triggers mTORC1-Dependent Synaptic Plasticity in Nucleus Accumbens Dopamine D1 Receptor Neurons. *J. Neurosci.* 36, 701–713.
- Bellone, C., and Lüscher, C. (2012). Drug-evoked plasticity: do addictive drugs reopen a critical period of postnatal synaptic development? *Front. Mol. Neurosci.* 5, 75.
- Berke, J., Paletzki, R., Aronson, G.J., and Hyman, S. (1998). A Complex Program of Striatal Gene Expression Induced by Dopaminergic Stimulation. *J. Neurosci.* 18, 5301–5310.
- Bertran-Gonzalez, J., Bosch, C., Maroteaux, M., Matamalas, M., Hervé, D., Valjent, E., and Girault, J.-A. (2008). Opposing patterns of signaling activation in dopamine D1 and D2 receptor-expressing striatal neurons in response to cocaine and haloperidol. *J. Neurosci.* 28, 5671–5685.
- Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Girault, J.-A., and Valjent, E. (2010). What is the Degree of Segregation between Striatonigral and Striatopallidal Projections? *Front. Neuroanat.* 4, 1–9.
- Besnard, A., Bouveyron, N., Kappes, V., Pascoli, V., Pagès, C., Heck, N., Vanhoutte, P., and Caboche, J.

- (2011). Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J. Neurosci.* 31, 14296–14307.
- Bhakar, A.L., Dölen, G., and Bear, M.F. (2012). The pathophysiology of fragile X (and what it teaches us about synapses). *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 417–443.
- Bloodgood, B.L., Sabatini, B.L. (2005). Neuronal Activity Regulates Diffusion Across the Neck of Dendritic Spines. *Science* (80-.). 310, 866–869.
- Boggio, E.M., Putignano, E., Sassoè-Pognetto, M., Pizzorusso, T., and Giustetto, M. (2007). Visual stimulation activates ERK in synaptic and somatic compartments of rat cortical neurons with parallel kinetics. *PLoS One* 2, e604.
- Bosch, M., and Hayashi, Y. (2012). Structural plasticity of dendritic spines. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 383–388.
- Bosch, C., Martínez, A., Masachs, N., Teixeira, C.M., Feraud, I., Ulloa, F., Pérez-Martínez, E., Lois, C., Comella, J.X., DeFelipe, J., et al. (2015). FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Front. Neuroanat.* 9.
- Bosch, M., Castro, J., Saneyoshi, T., Matsuno, H., Sur, M., and Hayashi, Y. (2014). Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron* 82, 444–459.
- Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Hervé, D., Darragh, J., Corvol, J.-C., Pages, C., Simon, A.J., Girault, J.-A., and Caboche, J. (2005). Parsing Molecular and Behavioral Effects of Cocaine in Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase-1-Deficient Mice. *J. Neurosci.* 25, 11444–11454.
- Britt, J.P., Benaliouad, F., McDevitt, R.A., Stuber, G.D., Wise, R.A., and Bonci, A. (2012). Synaptic and Behavioral Profile of Multiple Glutamatergic Inputs to the Nucleus Accumbens. *Neuron* 76, 790–803.
- Cahill, E., Salery, M., Vanhoutte, P., and Caboche, J. (2014a). Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse. *Front. Pharmacol.* 4, 172.
- Cahill, E., Pascoli, V., Trifilieff, P., Savoldi, D., Kappès, V., Lüscher, C., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2014b). D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signalling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol. Psychiatry* 1–10.
- Cahill, M.E., Bagot, R.C., Gancarz, A.M., Walker, D.M., Sun, H.S., Wang, Z.J., Heller, E. a., Feng, J., Kennedy, P.J., Koo, J.W., et al. (2016). Bidirectional Synaptic Structural Plasticity after Chronic Cocaine Administration Occurs through Rap1 Small GTPase Signaling. *Neuron* 89, 566–582.
- Cajigas, I.J., Tushev, G., Will, T.J., Tom Dieck, S., Fuerst, N., and Schuman, E.M. (2012). The Local Transcriptome in the Synaptic Neuropil Revealed by Deep Sequencing and High-Resolution Imaging. *Neuron* 74, 453–466.
- 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.
- Cane, M., Maco, B., Knott, G., and Holtmaat, a. (2014). The Relationship between PSD-95 Clustering and Spine Stability In Vivo. *J. Neurosci.* 34, 2075–2086.
- Caroni, P., Donato, F., and Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 478–490.
- Chazeau, A., and Giannone, G. (2016). Organization and dynamics of the actin cytoskeleton during dendritic spine morphological remodeling. *Cell. Mol. Life Sci.* 3053–3073.
- Chen, Q., Xiong, X., Lee, T.H., Liu, Y., Wetsel, W.C., and Zhang, X. (2008). Neural plasticity and addiction: Integrin-linked kinase and cocaine behavioral sensitization. *J. Neurochem.* 107, 679–689.

- Chen, R., Tilley, M.R., Wei, H., Zhou, F., Zhou, F., Ching, S., Quan, N., Stephens, R.L., Hill, E.R., Nottoli, T., et al. (2006). Abolished cocaine reward in mice with a cocaine-insensitive dopamine transporter.
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R. a, Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013a). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.
- Chen, T.-W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R. a, Orger, M.B., Jayaraman, V., et al. (2013b). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295–300.
- Dailey, M.E., and Smith, S.J. (1996). The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J. Neurosci.* 16, 2983–2994.
- Daroles, L., Gribaudo, S., Doulazmi, M., Scotto-Lomassese, S., Dubacq, C., Mandairon, N., Greer, C.A., Didier, A., Trembleau, A., and Caillé, I. (2015). Fragile X Mental Retardation Protein and Dendritic Local Translation of the Alpha Subunit of the Calcium/Calmodulin-Dependent Kinase II Messenger RNA Are Required for the Structural Plasticity Underlying Olfactory Learning. *Biol. Psychiatry* 80, 149–159.
- Davis, S., Vanhoutte, P., Pagès, C., Caboche, J., and Laroche, S. (2000) The MAPK/ERK cascade targets both Elk-1 and CREB to control LTP-dependent gene expression in the dentate gyrus in vivo. *J. Neurosci.* 20, 4563–4572.
- Desmond NL, Levy WB. Changes in the numerical density of synaptic contacts with long-term potentiation in the hippocampal dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986 Nov 22;253(4):466–75.
- Desmond NL, Levy WB. Changes in the postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986 Nov 22;253(4):476–82.
- Dietz, D.M., Sun, H., Lobo, M.K., Cahill, M.E., Chadwick, B., Gao, V., Koo, J.W., Mazei-Robison, M.S., Dias, C., Maze, I., et al. (2012). Rac1 is essential in cocaine-induced structural plasticity of nucleus accumbens neurons. *Nat. Neurosci.* 15, 891–896.
- Dobi, A., Seabold, G.K., Christensen, C.H., Bock, R., and Alvarez, V. a (2011). Cocaine-induced plasticity in the nucleus accumbens is cell specific and develops without prolonged withdrawal. *J. Neurosci.* 31, 1895–1904.
- Doig, N.M., Moss, J., and Bolam, J.P. (2010). Cortical and thalamic innervation of direct and indirect pathway medium-sized spiny neurons in mouse striatum. *J. Neurosci.* 30, 14610–14618.
- Doig, N.M., Magill, P.J., Apicella, P., Bolam, J.P., and Sharott, A. (2014). Cortical and thalamic excitation mediate the multiphasic responses of striatal cholinergic interneurons to motivationally salient stimuli. *J. Neurosci.* 34, 3101–3117.
- Dong, Y., and Nestler, E.J. (2014). The neural rejuvenation hypothesis of cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.* 35, 374–383.
- Dumitriu, D., Laplant, Q., Grossman, Y.S., Dias, C., Janssen, W.G., Russo, S.J., Morrison, J.H., and Nestler, E.J. (2012). Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 32, 6957–6966.
- Dunah, A.W., and Standaert, D.G. (2003). Subcellular segregation of distinct heteromeric NMDA glutamate receptors in the striatum. *J. Neurochem.* 85, 935–943.
- Engert, F., and Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399, 66–70.
- Everitt, B.J., and Robbins, T.W. (2013). From the ventral to the dorsal striatum: Devolving views of

their roles in drug addiction. *Neurosci. Biobehav. Rev.*

Fasano, C., Bourque, M.-J., Lapointe, G., Leo, D., Thibault, D., Haber, M., Kortleven, C., Desgroseillers, L., Murai, K.K., and Trudeau, L.-É. (2012). Dopamine facilitates dendritic spine formation by cultured striatal medium spiny neurons through both D1 and D2 dopamine receptors. *Neuropharmacology* 67C, 432–443.

Fasano, S., D'Antoni, A., Orban, P.C., Valjent, E., Putignano, E., Vara, H., Pizzorusso, T., Giustetto, M., Yoon, B., Soloway, P., et al. (2009). Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) controls activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling in the striatum and long-term behavioral responses to cocaine. *Biol. Psychiatry* 66, 758–768.

Feinberg, E.H., VanHoven, M.K., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, R.D., Shen, K., and Bargmann, C.I. (2008). GFP Reconstitution Across Synaptic Partners (GRASP) Defines Cell Contacts and Synapses in Living Nervous Systems. *Neuron* 57, 353–363.

Fiala, J.C., Feinberg, M., Popov, V., and Harris, K.M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18, 8900–8911.

Fifková, E., and Anderson, C.L. (1981). Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Exp. Neurol.* 74, 621–627.

Fino, E., and Venance, L. (2011). Spike-timing dependent plasticity in striatal interneurons. *Neuropharmacology* 60, 780–788.

Fontana, D., Post, R. M., Weiss, S. R. B., and Pert, A. (1993). The role of D1- and D2-dopamine receptors in the acquisition and expression of cocaine-induced conditioned increases in locomotor behavior. *Behav. Pharmacol.* 4, 375–387.

Frotscher, M., Studer, D., Graber, W., Chai, X., Nestel, S., and Zhao, S. (2014). Fine structure of synapses on dendritic spines. *Front. Neuroanat.* 8, 94.

Fu, M., Yu, X., Lu, J., and Zuo, Y. (2012). Repetitive motor learning induces coordinated formation of clustered dendritic spines in vivo. *Nature* 483, 92–95.

Futter, M., Uematsu, K., Bullock, S. a, Kim, Y., Hemmings, H.C., Nishi, A., Greengard, P., and Nairn, A.C. (2005). Phosphorylation of spinophilin by ERK and cyclin-dependent PK 5 (Cdk5). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 3489–3494.

Gal-Ben-Ari, S., Kenney, J.W., Ounalla-Saad, H., Taha, E., David, O., Levitan, D., Gildish, I., Panja, D., Pai, B., Wibrand, K., et al. (2012). Consolidation and translation regulation. *Learn. Mem.* 19, 410–422.

Genheden, M., Kenney, J.W., Johnston, H.E., Manousopoulou, A., Garbis, S.D., and Proud, C.G. (2015). BDNF stimulation of protein synthesis in cortical neurons requires the MAP kinase-interacting kinase MNK1. *J. Neurosci.* 35, 972–984.

Gipson, C.D., Reissner, K.J., Kupchik, Y.M., Smith, A.C.W., Stankeviciute, N., Hensley-simon, M.E., and Kalivas, P.W. (2013). Reinstatement of nicotine seeking is mediated by glutamatergic plasticity. 10–15.

Girault, J., Valjent, E., Caboche, J., and Herve, D. (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr. Opin. Pharmacol.* 7, 77–85.

Giza, J.I., Jung, Y., Jeffrey, R.A., Neugebauer, N.M., Picciotto, M.R., and Biederer, T. (2012). The Synaptic Adhesion Molecule SynCAM 1 Contributes to Cocaine Effects on Synapse Structure and Psychostimulant Behavior. *Neuropsychopharmacology*.

Gkogkas, C.G., Khoutorsky, A., Ran, I., Rampakakis, E., Nevarko, T., Weatherill, D.B., Vasuta, C., Yee, S., Truitt, M., Dallaire, P., et al. (2013). Autism-related deficits via dysregulated eIF4E-dependent translational control. *Nature* 493, 371–377.

Goldin, M., and Segal, M. (2003). Protein kinase C and ERK involvement in dendritic spine plasticity in cultured rodent hippocampal neurons. *Eur. J. Neurosci.* *17*, 2529–2539.

Golden SA, Russo SJ. Mechanisms of psychostimulant-induced structural plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Oct 1;2(10).

Goto, A., Nakahara, I., Yamaguchi, T., Kamioka, Y., Sumiyama, K., Matsuda, M., Nakanishi, S., and Funabiki, K. (2015). Circuit-dependent striatal PKA and ERK signaling underlies rapid behavioral shift in mating reaction of male mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6718–6723.

Gourley, S.L., Taylor, J.R., and Koleske, A.J. (2011). Cell adhesion signaling pathways: First responders to cocaine exposure? *Commun. Integr. Biol.* *4*, 30–33.

Grace AA. In vivo and in vitro intracellular recordings from rat midbrain dopamine neurons. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;537:51-76

Gray, N.W., Weimer, R.M., Bureau, I., and Svoboda, K. (2006). Rapid redistribution of synaptic PSD-95 in the neocortex in vivo. *PLoS Biol.* *4*, e370.

Graziane, N.M., Sun, S., Wright, W.J., Jang, D., Liu, Z., Huang, Y.H., Nestler, E.J., Wang, Y.T., Schlüter, O.M., and Dong, Y. (2016). Opposing mechanisms mediate morphine- and cocaine-induced generation of silent synapses. *Nat. Neurosci.* *19*.

Grutzendler, J., Kasthuri, N., and Gan, W. (2002). Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *420*.

Guegan, T., Cutando, L., Ayuso, E., Santini, E., Fisone, G., Bosch, F., Martinez, A., Valjent, E., Maldonado, R., and Martin, M. (2013). Operant behavior to obtain palatable food modifies neuronal plasticity in the brain reward circuit. *Eur. Neuropsychopharmacol.* *23*, 146–159.

Harris, K.M., and Stevens, J.K. (1989). Dendritic spines of CA 1 pyramidal cells in the rat hippocampus: serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *J. Neurosci.* *9*, 2982–2997.

Harris, K.M., and Weinberg, R.J. (2012). Ultrastructure of synapses in the mammalian brain. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*.

Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y.I., Loshbaugh, A.L., Kuhlman, B., Hahn, K.M., and Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature* *525*, 333–338.

Heilig, M., Epstein, D.H., Nader, M.A., and Shaham, Y. (2016). Time to connect: bringing social context into addiction neuroscience. *Nat Rev Neurosci* *advance on*.

Henley, J.M., and Wilkinson, K. a (2016). Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *advance on*, 337–350.

Henley, J.M., Barker, E. a., and Glebov, O.O. (2011). Routes, destinations and delays: Recent advances in AMPA receptor trafficking. *Trends Neurosci.* *34*, 258–268.

Herzog, E., Bellenchi, G.C., Gras, C., Bernard, V., Ravassard, P., Bedet, C., Gasnier, B., Giros, B., and El Mestikawy, S. (2001). The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* *21*, RC181.

Herzog, E., Nadrigny, F., Silm, K., Biesemann, C., Helling, I., Bersot, T., Steffens, H., Schwartzmann, R., Nägerl, U.V., El Mestikawy, S., et al. (2011). In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J. Neurosci.* *31*, 15544–15559.

Hill, T.C., and Zito, K. (2013). LTP-Induced Long-Term Stabilization of Individual Nascent Dendritic Spines. *J. Neurosci.* *33*, 678–686.

- Hiroi N, Fienberg AA, Haile CN, Alburges M, Hanson GR, Greengard P, Nestler EJ. Neuronal and behavioural abnormalities in striatal function in DARPP-32-mutant mice. *Eur J Neurosci.* 1999 Mar;11(3):1114-8.
- Holtmaat, A., and Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 647–658.
- Honkura, N. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. 429.
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G.C.R., and Kasai, H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron* 57, 719–729.
- Hotulainen, P., and Hoogenraad, C.C. (2010). Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J. Cell Biol.* 189, 619–629.
- Hruska, M., Henderson, N.T., Xia, N.L., Le Marchand, S.J., and Dalva, M.B. (2015). Anchoring and synaptic stability of PSD-95 is driven by ephrin-B3. *Nat. Neurosci.* 18, 1594–1605.
- Huang, Y.H., Lin, Y., Brown, T.E., Han, M.H., Saal, D.B., Neve, R.L., Zukin, R.S., Sorg, B. a., Nestler, E.J., Malenka, R.C., et al. (2008). CREB modulates the functional output of nucleus accumbens neurons: A critical role of N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDAR) receptors. *J. Biol. Chem.* 283, 2751–2760.
- Hyman, S.E., Malenka, R.C., and Nestler, E.J. (2006). Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annu. Rev. Neurosci.* 29, 565–598.
- Imperato, A. (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. 85, 5274–5278.
- Ito, H., Morishita, R., Shinoda, T., Iwamoto, I., Sudo, K., Okamoto, K., and Nagata, K. (2010). Dysbindin-1, WAVE2 and Abi-1 form a complex that regulates dendritic spine formation. *Mol. Psychiatry* 15, 976–986.
- Jahanshahi, M., Obeso, I., Rothwell, J.C., and Obeso, J. a (2015). A fronto-striato-subthalamic-pallidal network for goal-directed and habitual inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 719–732.
- Jasinska, A.J., Chen, B.T., Bonci, A., and Stein, E. a (2014). Dorsal medial prefrontal cortex (MPFC) circuitry in rodent models of cocaine use: implications for drug addiction therapies. *Addict. Biol.*
- Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S. a., Di Stefano, P., Demmers, J., et al. (2009). Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* 61, 85–100.
- Kalivas, P.W. (2009). The glutamate homeostasis hypothesis of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 561–572.
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., and Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends Neurosci.* 33, 121–129.
- Kasthuri, N., Hayworth, K.J., Berger, D.R., Schalek, R.L., Conchello, J.A., Knowles-Barley, S., Lee, D., Vázquez-Reina, A., Kaynig, V., Jones, T.R., et al. (2015). Saturated Reconstruction of a Volume of Neocortex. *Cell* 162, 648–661.
- Kauer, J. a, and Malenka, R.C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 844–858.
- Keiflin, R., and Janak, P.H. (2015). Dopamine Prediction Errors in Reward Learning and Addiction: From Theory to Neural Circuitry. *Neuron* 88, 247–263.
- Keith, D., and El-Husseini, A. (2008). Excitation Control: Balancing PSD-95 Function at the Synapse. *Front. Mol. Neurosci.* 1, 4.

- Kerchner, G. a, and Nicoll, R. a (2008). Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 813–825.
- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 771–781.
- Kim, J., Park, B.-H., Lee, J.H., Park, S.K., and Kim, J.-H. (2011a). Cell type-specific alterations in the nucleus accumbens by repeated exposures to cocaine. *Biol. Psychiatry* 69, 1026–1034.
- Kim, J., Zhao, T., Petralia, R.S., Yu, Y., Peng, H., Myers, E., and Magee, J.C. (2011b). mGRASP enables mapping mammalian synaptic connectivity with light microscopy. *Nat. Methods* 9, 96–102.
- Kim, K., Lakhanpal, G., Lu, H.E., Khan, M., Suzuki, A., Kato-Hayashi, M., Narayanan, R., Luyben, T.T., Matsuda, T., Nagai, T., et al. (2015). A Temporary Gating of Actin Remodeling during Synaptic Plasticity Consists of the Interplay between the Kinase and Structural Functions of CaMKII. *Neuron* 87, 813–826.
- Kiraly, D.D., Ma, X.-M., Mazzone, C.M., Xin, X., Mains, R.E., and Eipper, B. a (2010). Behavioral and morphological responses to cocaine require kalirin7. *Biol. Psychiatry* 68, 249–255.
- Knott, G.W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., and Svoboda, K. (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nat. Neurosci.* 9, 1117–1124.
- Korogod, N., Petersen, C.C.H., and Knott, G.W. (2015). Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. *Elife* 4, 1–17.
- Kozorovitskiy, Y., Saunders, A., Johnson, C. a, Lowell, B.B., and Sabatini, B.L. (2012). Recurrent network activity drives striatal synaptogenesis. *Nature* 485, 646–650.
- Kozorovitskiy, Y., Peixoto, R., Wang, W., Saunders, A., and Sabatini, B.L. (2015). Neuromodulation of excitatory synaptogenesis in striatal development. *Elife* 4, 1–18.
- Kravitz, A. V. (2010). Regulation of Parkinsonian motor behaviors by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature* 466, 622–626.
- Kravitz, A. V, Tye, L.D., and Kreitzer, A.C. (2012). Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat. Neurosci.* 15, 816–818.
- Kreitzer, a C. (2009). Physiology and pharmacology of striatal neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 127–147.
- Kreitzer, A.C., and Malenka, R.C. (2008). Striatal Plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* 60, 543–554.
- Krueger, D.D., Tuffy, L.P., Papadopoulos, T., and Brose, N. (2012). The role of neurexins and neuroligins in the formation, maturation, and function of vertebrate synapses. *Curr. Opin. Neurobiol.* 22, 412–422.
- Kupchik, Y.M., Brown, R.M., Heinsbroek, J. a, Lobo, M.K., Schwartz, D.J., and Kalivas, P.W. (2015). Coding the direct/indirect pathways by D1 and D2 receptors is not valid for accumbens projections. *Nat. Neurosci.* 18, 1230–1232.
- Kwon, H.-B., and Sabatini, B.L. (2011). Glutamate induces de novo growth of functional spines in developing cortex. *Nature* 474, 100–104.
- Lee, B.R., and Dong, Y. (2011). Cocaine-induced metaplasticity in the nucleus accumbens: silent synapse and beyond. *Neuropharmacology* 61, 1060–1069.
- Lee, K.-W., Kim, Y., Kim, A.M., Helmin, K., Nairn, A.C., and Greengard, P. (2006). Cocaine-induced dendritic spine formation in D1 and D2 dopamine receptor-containing medium spiny neurons in nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3399–3404.
- Lei, W., Omotade, O.F., Myers, K.R., and Zheng, J.Q. (2016). Actin cytoskeleton in dendritic spine development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 39, 86–92.

- Lenoir, M., Serre, F., Cantin, L., and Ahmed, S.H. (2007). Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One* 2, e698.
- Liston, C., Cichon, J.M., Jeanneteau, F., Jia, Z., Chao, M. V, and Gan, W.-B. (2013). Circadian glucocorticoid oscillations promote learning-dependent synapse formation and maintenance. *Nat. Neurosci.* 16, 698–705.
- Liu, X.Y., Chu, X.P., Mao, L.M., Wang, M., Lan, H.X., Li, M.H., Zhang, G.C., Parelkar, N.K., Fibuch, E.E., Haines, M., et al. (2006). Modulation of D2R-NR2B Interactions in Response to Cocaine. *Neuron* 52, 897–909.
- Lobo, M.K., and Nestler, E.J. (2011). The striatal balancing act in drug addiction: distinct roles of direct and indirect pathway medium spiny neurons. *Front. Neuroanat.* 5, 41.
- Lu, X.Y., Ghasemzadeh, M.B., and Kalivas, P.W. (1997). Expression of D1 receptor, D2 receptor, substance P and enkephalin messenger RNAs in the neurons projecting from the nucleus accumbens. *Neuroscience* 82, 767–780.
- Luo, Z., Volkow, N.D., Heintz, N., Pan, Y., and Du, C. (2011). Acute cocaine induces fast activation of D1 receptor and progressive deactivation of D2 receptor striatal neurons: in vivo optical microprobe [Ca²⁺]_i imaging. *J. Neurosci.* 31, 13180–13190.
- Lüscher, C. (2013). Drug-evoked synaptic plasticity causing addictive behavior. *J. Neurosci.* 33, 17641–17646.
- Lüscher, C., and Malenka, R.C. (2011). Drug-evoked synaptic plasticity in addiction: from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69, 650–663.
- Lynch, M. a (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol. Rev.* 84, 87–136.
- MacAskill, A.F., Little, J.P., Cassel, J.M., and Carter, A.G. (2012). Subcellular connectivity underlies pathway-specific signaling in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 15, 1624–1626.
- MacAskill, A.F., Cassel, J.M., and Carter, A.G. (2014). Cocaine exposure reorganizes cell type- and input-specific connectivity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.* 17, 1198–1207.
- MacGillavry, H.D., and Hoogenraad, C.C. (2015). The internal architecture of dendritic spines revealed by super-resolution imaging: What did we learn so far? *Exp. Cell Res.* 1–7.
- Mahon, S., Deniau, J.M., and Charpier, S. (2004). Corticostriatal plasticity: Life after the depression. *Trends Neurosci.* 27, 460–467.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., and Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science* 283, 1923–1927.
- Mameli, M., Halbout, B., Creton, C., Engblom, D., Parkitna, J.R., Spanagel, R., and Lüscher, C. (2009). Cocaine-evoked synaptic plasticity: persistence in the VTA triggers adaptations in the NAc. *Nat. Neurosci.* 12, 1036–1041.
- Marie, N., Canestrelli, C., and Noble, F. (2012). Transfer of neuroplasticity from nucleus accumbens core to shell is required for cocaine reward. *PLoS One* 7, e30241.
- Martin, B.J., Naughton, B.J., Thirtamara-Rajamani, K., Yoon, D.J., Han, D.D., Devries, a C., and Gu, H.H. (2011). Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. *Synapse* 65, 490–496.
- Martin, K.C., Michael, D., Rose, J.C., Barad, M., Casadio, A., Zhu, H., and Kandel, E.R. (1997). MAP Kinase Translocates into the Nucleus of the Presynaptic Cell and Is Required for Long-Term Facilitation in Aplysia. 18, 899–912.
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat. Neurosci.* 4, 1086–1092.

- Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 2004 Jun 17;429(6993):761-6.
- Medvedev, N.I., Dallérac, G., Popov, V.I., Rodriguez Arellano, J.J., Davies, H. a, Kraev, I. V, Doyère, V., and Stewart, M.G. (2012). Multiple spine boutons are formed after long-lasting LTP in the awake rat. *Brain Struct. Funct.*
- Mendoza, M.C., Er, E.E., Zhang, W., Ballif, B. a, Elliott, H.L., Danuser, G., and Blenis, J. (2011). ERK-MAPK drives lamellipodia protrusion by activating the WAVE2 regulatory complex. *Mol. Cell* 41, 661–671.
- Meredith, G.E., Ypma, P., and Zahm, D.S. (1995). Effects of dopamine depletion on the morphology of medium spiny neurons in the shell and core of the rat nucleus accumbens. *J. Neurosci.* 15, 3808–3820.
- El Mestikawy, S., Wallen-Mackenzie, A., Fortin, G.M., Descarries, L., and Trudeau, L.E. (2011). From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12, 204–216.
- Meyer, D., Bonhoeffer, T., and Scheuss, V. (2014). Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron* 82, 430–443.
- Mineur, Y.S., and Picciotto, M.R. (2008). Genetics of nicotinic acetylcholine receptors: Relevance to nicotine addiction. *Biochem. Pharmacol.* 75, 323–333.
- Moczulska, K.E., Tinter-Thiede, J., Peter, M., Ushakova, L., Wernle, T., Bathellier, B., and Rumpel, S. (2013). Dynamics of dendritic spines in the mouse auditory cortex during memory formation and memory recall. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 18315–18320.
- Montague, P.R., Hyman, S.E., and Cohen, J.D. (2004). Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431, 760–767.
- Moss, J., and Bolam, J.P. (2008). A dopaminergic axon lattice in the striatum and its relationship with cortical and thalamic terminals. *J. Neurosci.* 28, 11221–11230.
- Muñoz-Cuevas, F.J., Athilingam, J., Piscopo, D., and Wilbrecht, L. (2013). Cocaine-induced structural plasticity in frontal cortex correlates with conditioned place preference. *Nat. Neurosci.*
- Nagerl, U. V., Kostinger, G., Anderson, J.C., Martin, K. a. C., and Bonhoeffer, T. (2007). Protracted Synaptogenesis after Activity-Dependent Spinogenesis in Hippocampal Neurons. *J. Neurosci.* 27, 8149–8156.
- Nelson, A.B., and Kreitzer, A.C. (2014). Reassessing models of Basal Ganglia function and dysfunction. *Annu. Rev. Neurosci.* 37, 117–135.
- Nestler, E.J. (2001). Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 119–128.
- Nestler, E.J., Barrot, M., and Self, D.W. (2001). DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 11042–11046.
- Nishi, A., Kuroiwa, M., and Shuto, T. (2011). Mechanisms for the modulation of dopamine d(1) receptor signaling in striatal neurons. *Front. Neuroanat.* 5, 43.
- Nutt, D.J., Lingford-Hughes, A., Erritzoe, D., and Stokes, P.R. a (2015). The dopamine theory of addiction: 40 years of highs and lows. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 305–312.
- O'Connor, E.C., Chapman, K., Butler, P., and Mead, A.N. (2011). The predictive validity of the rat self-administration model for abuse liability. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 912–938.
- Okamoto, K.-I., Nagai, T., Miyawaki, A., and Hayashi, Y. (2004). Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat. Neurosci.* 7, 1104–1112.

- Panja, D., Dagyte, G., Bidinosti, M., Wibrand, K., Kristiansen, A.-M., Sonenberg, N., and Bramham, C.R. (2009). Novel translational control in Arc-dependent long term potentiation consolidation in vivo. *J. Biol. Chem.* **284**, 31498–31511.
- Panja, D., Kenney, J.W., D'Andrea, L., Zalfa, F., Vedeler, A., Wibrand, K., Fukunaga, R., Bagni, C., Proud, C.G., and Bramham, C.R. (2014). Two-Stage Translational Control of Dentate Gyrus LTP Consolidation Is Mediated by Sustained BDNF-TrkB Signaling to MNK. *Cell Rep.* **9**, 1430–1445.
- Paoletti, P., Bellone, C., and Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 383–400.
- Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J.-A., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2011). Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol. Psychiatry* **69**, 218–227.
- Pascoli, V., Turiault, M., and Lüscher, C. (2012). Reversal of cocaine-evoked synaptic potentiation resets drug-induced adaptive behaviour. *Nature* **481**, 71–75.
- Pascoli, V., Terrier, J., Espallergues, J., Valjent, E., O'Connor, E.C., and Lüscher, C. (2014a). Contrasting forms of cocaine-evoked plasticity control components of relapse. *Nature* **509**, 459–464.
- Pascoli, V., Cahill, E., Bellivier, F., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2014b). Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: A signal toward pathological adaptation. *Biol. Psychiatry* **76**, 917–926.
- Penzes, P., and Jones, K. a (2008). Dendritic spine dynamics--a key role for kalirin-7. *Trends Neurosci.* **31**, 419–427.
- Penzes, P., and Rafaloviche, I. (2012). Regulation of the actin cytoskeleton in dendritic spines. *Adv Exp Med Biol.* **970**, 81–95.
- Peters, a, and Kaiserman-Abramof, I.R. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am. J. Anat.* **127**, 321–355.
- Peyrin, J.-M., Deleglise, B., Saias, L., Vignes, M., Gougis, P., Magnifico, S., Betuing, S., Pietri, M., Caboche, J., Vanhoutte, P., et al. (2011). Axon diodes for the reconstruction of oriented neuronal networks in microfluidic chambers. *Lab Chip* **11**, 3663–3673.
- Pignataro, A., Borreca, A., Ammassari-Teule, M., and Middei, S. (2015). CREB Regulates Experience-Dependent Spine Formation and Enlargement in Mouse Barrel Cortex. *Neural Plast.* **2015**.
- Pin, J.P., De Colle, C., Bessis, a S., and Acher, F. (1999). New perspectives for the development of selective metabotropic glutamate receptor ligands. *Eur. J. Pharmacol.* **375**, 277–294.
- Quintero, G.C. (2013). Role of nucleus accumbens glutamatergic plasticity in drug addiction. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **9**, 1499–1512.
- Ren, Z., Sun, W.L., Jiao, H., Zhang, D., Kong, H., Wang, X., and Xu, M. (2010). Dopamine D1 and N-methyl-D-aspartate receptors and extracellular signal-regulated kinase mediate neuronal morphological changes induced by repeated cocaine administration. *Neuroscience* **168**, 48–60.
- Richards, D.A., Mateos, J.M., Hugel, S., de Paola, V., Caroni, P., Gähwiler, B.H., and McKinney, R.A. (2005). Glutamate induces the rapid formation of spine head protrusions in hippocampal slice cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 6166–6171.
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., and Kuhar, M.J. (1992). Cocaine Receptors on Dopamine Transporters Are Related to Self-Administration of Cocaine. *07208*.
- Robbins, T.W., Ersche, K.D., and Everitt, B.J. (2008). Drug addiction and the memory systems of the brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1141**, 1–21.

Roberts DC, Koob GF. Disruption of cocaine self-administration following 6-hydroxydopamine lesions of the ventral tegmental area in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982 Nov;17(5):901-4.

Robinson TE, Gorny G, Mitton E, Kolb B. Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse.* 2001 Mar 1;39(3):257-66.

Robinson, T.E., and Berridge, K.C. (2001). Incentive-sensitization and addiction. *Addiction* 96, 103–114.

Robinson, T.E., and Kolb, B. (1997). Persistent Structural Modifications in Nucleus Accumbens and Prefrontal Cortex Neurons Produced by Previous Experience with Amphetamine. *17*, 8491–8497.

Robinson, T.E., and Kolb, B. (1999). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur. J. Neurosci.* 11, 1598–1604.

Robison, A.J., and Nestler, E.J. (2011). Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.* 12, 623–637.

Robledo P, Maldonado-Lopez R, Koob GF. Role of dopamine receptors in the nucleus accumbens in the rewarding properties of cocaine. *Ann N Y Acad Sci.* 1992 Jun 28;654:509-12.

Rocha, B.A., Fumagalli, F., Gainetdinov, R.R., Jones, S.R., Ator, R., Giros, B., Miller, G.W., Caron, M.G., Address, P., and Inseem, U. (1998). Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *1*.

Russo, S.J., Dietz, D.M., Dumitriu, D., Morrison, J.H., Malenka, R.C., and Nestler, E.J. (2010). The addicted synapse: mechanisms of synaptic and structural plasticity in nucleus accumbens. *Trends Neurosci.* 33, 267–276.

Sakae, D.Y., Marti, F., Lecca, S., Vorspan, F., Martín-García, E., Morel, L.J., Henrion, a, Gutiérrez-Cuesta, J., Besnard, a, Heck, N., et al. (2015). The absence of VGLUT3 predisposes to cocaine abuse by increasing dopamine and glutamate signaling in the nucleus accumbens. *Mol. Psychiatry* 20, 1448–1459.

Sala, C., Vicidomini, C., Bigi, I., Mossa, A., and Verpelli, C. (2015). Shank synaptic scaffold proteins: keys to understanding the pathogenesis of autism and other synaptic disorders. *J. Neurochem.* 135, 849–858.

Salery, M., Dos Santos, M., Saint-Jour, E., Moumné, L., Pagès, C., Kappès, V., Parnaudeau, S., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2016a). Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein Accumulates in the Nucleus in Response to Cocaine and Acts as a Brake on Chromatin Remodeling and Long-Term Behavioral Alterations. *Biol. Psychiatry.*

Salery, M., Dos Santos, M., Saint-Jour, E., Moumné, L., Pagès, C., Kappès, V., Parnaudeau, S., Caboche, J., and Vanhoutte, P. (2016b). Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein Accumulates in the Nucleus in Response to Cocaine and Acts as a Brake on Chromatin Remodeling and Long-Term Behavioral Alterations. *Biol. Psychiatry.*

Sarti, F., Borgland, S.L., Kharazia, V.N., and Bonci, A. (2007). Acute cocaine exposure alters spine density and long-term potentiation in the ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci.* 26, 749–756.

Schikorski, T., and Stevens, C.F. (1999). Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Neurobiology* 96, 4107–4112.

Schoonover, C.E., Tapia, J.-C., Schilling, V.C., Wimmer, V., Blazeski, R., Zhang, W., Mason, C. a., and Bruno, R.M. (2014). Comparative Strength and Dendritic Organization of Thalamocortical and

- Corticocortical Synapses onto Excitatory Layer 4 Neurons. *J. Neurosci.* **34**, 6746–6758.
- Schubert, V., and Dotti, C.G. (2007). Transmitting on actin: synaptic control of dendritic architecture. *J. Cell Sci.* **120**, 205–212.
- Schultz, W., Dayan, P., and Montague, P.R. (1997). A Neural Substrate of Prediction and Reward. **275**.
- Segal, M. (2005). Dendritic spines and long-term plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 277–284.
- Segal, M., Greenberger, V., and Korkotian, E. (2003). Formation of dendritic spines in cultured striatal neurons depends on excitatory afferent activity. *Eur. J. Neurosci.* **17**, 2573–2585.
- Shaham, Y., Shalev, U., Lu, L., De Wit, H., and Stewart, J. (2003). The reinstatement model of drug relapse: History, methodology and major findings. *Psychopharmacology (Berl)*. **168**, 3–20.
- Shen, H., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, A., Daniel, S., and Kalivas, P.W. (2009a). NIH Public Access. **29**, 2876–2884.
- Shepherd GM, Harris KM. Three-dimensional structure and composition of CA3→CA1 axons in rat hippocampal slices: implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. *J Neurosci.* 1998 Oct 15;18(20):8300-10.
- Shen, H. -w., Toda, S., Moussawi, K., Bouknight, a., Zahm, D.S., and Kalivas, P.W. (2009b). Altered Dendritic Spine Plasticity in Cocaine-Withdrawn Rats. *J. Neurosci.* **29**, 2876–2884.
- Shih, Y.-T., and Hsueh, Y.-P. (2016). VCP and ATL1 regulate endoplasmic reticulum and protein synthesis for dendritic spine formation. *Nat. Commun.* **7**, 11020.
- Shirao, T., and González-Billault, C. (2013). Actin filaments and microtubules in dendritic spines. *J. Neurochem.*
- Shoji, S., Simms, D., Yamada, K., and Gallagher, J.P. (1998). Cocaine administered in vitro to brain slices from rats treated with cocaine chronically in vivo results in a gamma-aminobutyric acid receptor-mediated hyperpolarization recorded from the dorsolateral septum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**, 509–518.
- Smith, R.J., Lobo, M.K., Spencer, S., and Kalivas, P.W. (2013). Cocaine-induced adaptations in D1 and D2 accumbens projection neurons (a dichotomy not necessarily synonymous with direct and indirect pathways). *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 546–552.
- Stankeviciute, N.M., Scofield, M.D., Kalivas, P.W., and Gipson, C.D. (2013). Rapid, transient potentiation of dendritic spines in context-induced relapse to cocaine seeking. *Addict. Biol.* **1–3**.
- Stipanovich, A., Valjent, E., Matamalas, M., Nishi, A., Ahn, J.-H., Maroteaux, M., Bertran-Gonzalez, J., Bami-Cherrier, K., Enslen, H., Corbillé, A.-G., et al. (2008). A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature* **453**, 879–884.
- Stuber, G.D., Sparta, D.R., Stamatakis, A.M., van Leeuwen, W. a, Hardjoprajitno, J.E., Cho, S., Tye, K.M., Kempadoo, K. a, Zhang, F., Deisseroth, K., et al. (2011). Excitatory transmission from the amygdala to nucleus accumbens facilitates reward seeking. *Nature* **475**, 377–380.
- Sweatt, J.D. (2004). Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**, 311–317.
- Takasaki, K., and Sabatini, B.L. (2014). Super-resolution 2-photon microscopy reveals that the morphology of each dendritic spine correlates with diffusive but not synaptic properties. *Front. Neuroanat.* **8**, 29.
- Thomas, M.J., Beurrier, C., Bonci, a, and Malenka, R.C. (2001). Long-term depression in the nucleus accumbens: a neural correlate of behavioral sensitization to cocaine. *Nat. Neurosci.* **4**, 1217–1223.
- Tonegawa, S., Pignatelli, M., Roy, D.S., and Ryan, T.J. (2015). Memory engram storage and retrieval.

Curr. Opin. Neurobiol. 35, 101–109.

Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., and Nägerl, U.V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat. Neurosci.* 17, 678–685.

Torres, G.E., Gainetdinov, R.R., and Caron, M.G. (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 13–25.

Trifilieff, P., Feng, B., Urizar, E., Winiger, V., Ward, R.D., Taylor, K.M., Martinez, D., Moore, H., Balsam, P.D., Simpson, E.H., et al. (2013). Increasing dopamine D2 receptor expression in the adult nucleus accumbens enhances motivation. *Mol Psychiatry* 18, 1025–1033.

Tuscher, J.J., Luine, V., Frankfurt, M., and Frick, K.M. (2016). Estradiol-Mediated Spine Changes in the Dorsal Hippocampus and Medial Prefrontal Cortex of Ovariectomized Female Mice Depend on ERK and mTOR Activation in the Dorsal Hippocampus. *J. Neurosci.* 36, 1483–1489.

Ueda, T., Watanabe-fukunaga, R., and Fukuyama, H. (2004). Mnk2 and Mnk1 Are Essential for Constitutive and Inducible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4E but Not for Cell Growth or Development Mnk2 and Mnk1 Are Essential for Constitutive and Inducible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor. *Mol Cell Biol* 24, 6539–6549.

Valjent, E., Corvol, J.C., Pages, C., Besson, M.J., Maldonado, R., and Caboche, J. (2000). Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *J. Neurosci.* 20, 8701–8709.

Valjent, E., Pagès, C., Rogard, M., Besson, M.J., Maldonado, R., and Caboche, J. (2001). Delta9-tetrahydrocannabinol-induced MAPK/ERK and Elk-1 activation in vivo depends on dopaminergic transmission. *Eur. J. Neurosci.* 14, 342–352.

Valjent, E., Pascoli, V., Svenningsson, P., Paul, S., Enslen, H., Corvol, J.C., Stipanovich, A., Caboche, J., Lombroso, P.J., Nairn, A.C., et al. (2005). Regulation of a protein phosphatase cascade allows convergent dopamine and glutamate signals to activate ERK in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 491–496.

Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Hervé, D., Fisone, G., and Girault, J.-A. (2009). Looking BAC at striatal signaling: cell-specific analysis in new transgenic mice. *Trends Neurosci.* 32, 538–547.

Valjent, E., Bertran-Gonzalez, J., Aubier, B., Greengard, P., Hervé, D., and Girault, J.-A. (2010). Mechanisms of locomotor sensitization to drugs of abuse in a two-injection protocol. *Neuropsychopharmacology* 35, 401–415.

Vanderschuren, L.J.M.J., Di Ciano, P., and Everitt, B.J. (2005). Involvement of the dorsal striatum in cue-controlled cocaine seeking. *J. Neurosci.* 25, 8665–8670.

Wang, J., Cheng, Y., Wang, X., Roltsch Hellard, E., Ma, T., Gil, H., Ben Hamida, S., and Ron, D. (2015). Alcohol Elicits Functional and Structural Plasticity Selectively in Dopamine D1 Receptor-Expressing Neurons of the Dorsomedial Striatum. *J. Neurosci.* 35, 11634–11643.

Washbourne, P., Dityatev, A., Scheiffele, P., Biederer, T., Weiner, J.A., Christopherson, K.S., and El-Husseini, A. (2004). Cell Adhesion Molecules in Synapse Formation. *J. Neurosci.* 24, 9244–9249.

White, F. J., Joshi, A., Koeltzow, T. E., and Hu, X. T. (1998). Dopamine receptor antagonists fail to prevent induction of cocaine sensitization. *Neuropsychopharmacology* 18, 26–40.

Wilson, C.J., Groves, P.M., Kitai, S.T., and Linder, J.C. (1983). Three-dimensional structure of dendritic spines in the rat neostriatum. *J. Neurosci.* 3, 383–388.

Winder, D.G., Martin, K.C., Muzzio, I.A., Rohrer, D., Chruscinski, A., Kobilka, B., Kandel, E.R., and Hughes, H. (1999). ERK Plays a Regulatory Role in Induction of LTP by Theta Frequency Stimulation and Its Modulation by α_1 -Adrenergic Receptors. 24, 715–726.

- Wissman, A.M., McCollum, A.F., Huang, G.-Z., Nikrodhanond, A. a, and Woolley, C.S. (2011). Sex differences and effects of cocaine on excitatory synapses in the nucleus accumbens. *Neuropharmacology* 61, 217–227.
- Wittmann, M., Marino, M.J., Henze, D. a, Seabrook, G.R., and Conn, P.J. (2005). Clozapine Potentiation of N -Methyl- D -aspartate Receptor Currents in the Nucleus Accumbens : Role of NR2B and Protein Kinase A / Src Kinases. 313, 594–603.
- Wu, G., Deisseroth, K., and Tsien, R.W. (2001). Spaced stimuli stabilize MAPK pathway activation and its effects on dendritic morphology. 151–158.
- Yagishita, S., Hayashi-Takagi, a., Ellis-Davies, G.C.R., Urakubo, H., Ishii, S., and Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science* (80- .). 345, 1616–1620.
- Yang, G., Lai, C.S.W., Cichon, J., Ma, L., Li, W., and Gan, W.-B. (2014). Sleep promotes branch-specific formation of dendritic spines after learning. *Science* 344, 1173–1178.
- Yao, W.D., Gainetdinov, R.R., Arbuckle, M.I., Sotnikova, T.D., Cyr, M., Beaulieu, J.M., Torres, G.E., Grant, S.G.N., and Caron, M.G. (2004). Identification of PSD-95 as a Regulator of Dopamine-Mediated Synaptic and Behavioral Plasticity. *Neuron* 41, 625–638.
- Yin, H.H., and Knowlton, B.B.J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 464–476.
- Zhai, S., Ark, E.D., Parra-Bueno, P., and Yasuda, R. (2013). Long-distance integration of nuclear ERK signaling triggered by activation of a few dendritic spines. *Science* 342, 1107–1111.
- Zhou, F.C., Anthony, B., Dunn, K.W., Lindquist, W.B., Xu, Z.C., and Deng, P. (2007). Chronic alcohol drinking alters neuronal dendritic spines in the brain reward center nucleus accumbens. *Brain Res.* 1134, 148–161.
- Zhou, Q., Homma, K.J., and Poo, M. (2004). Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. 44, 749–757.
- Zhu, J., Shang, Y., and Zhang, M. (2016). Mechanistic basis of MAGUK-organized complexes in synaptic development and signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 209–223.
- Zhuang, X., Belluscio, L., and Hen, R. (2000). G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. *J. Neurosci.* 20, RC91.
- Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., and Svoboda, K. (2010). Rapid functional maturation of nascent dendritic spines Karen. 61, 247–258.
- Ziv, N.E., and Smith, S.J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91–102.

ANNEXES

DiAna, an ImageJ tool for object-based 3D co-localization and distance analysis

Jean-François Gilles¹, Marc Dos Santos², Thomas Boudier^{3,4}, Susanne Bolte^{1,*}, Nicolas Heck^{2,*}

* Those authors equally contributed to his work

Affiliations

¹Sorbonne Universités, UPMC University Paris 06, CNRS, Core Facility - Institut de Biologie Paris Seine (IBPS) 75005, Paris, France.

²Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, Neurosciences Paris Seine - Institut de Biologie Paris Seine (NPS - IBPS), 75005 Paris, France

³Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, IPAL, CNRS, 75005 Paris France

⁴Bioinformatics Institute, Agency for science, technology and research (A*STAR), Singapore

Corresponding author

Nicolas Heck, Neuroscience Paris Seine, 7 quai Saint-Bernard, Building A 3rd floor, 75005 Paris, France.

Email: nicolas.heck@upmc.fr

Abstract

With the advance of optical microscopy, three-dimensional image analysis has become a major issue for biological studies. We present a new plugin for ImageJ called DiAna, for Distance Analysis, which comes with a user-friendly interface. Firstly, DiAna proposes robust and accurate 3D segmentation for object extraction. Secondly, the plugin performs automated object-based colocalization and distance analysis. DiAna offers an in-depth analysis of co-localization between objects and retrieves 3D measurements including co-localizing volumes and surface of contact. It also computes the distribution of distances between objects in 3D. With DiAna, we furthermore introduce an original method, which allows for estimating the statistical significance of object co-localization. DiAna offers a complete and intuitive 3D image analysis tool for biologists.

Keywords

Image segmentation, image co-localization, fluorescence microscopy, deconvolution, spatial analysis, 3D imaging

1 Introduction

Many biological and physiological studies depend on the analysis of the distribution and spatial relationship between biomarkers in a cell or tissue. Various methods, from immunodetection to transgene-driven expression of fluorescent proteins, allow to observe positive cells in whole specimen or tissue sections at the histological level, or to detect protein sub-cellular localization at the cellular level. The 3D-organization and relationship of these biomarkers can be investigated using fluorescence microscopy techniques that allow optical sectioning, such as confocal microscopy or multiphoton microscopy, and should be combined with appropriate image analysis methods. Biologists often seek at associating the spatial overlap of pairs of biomolecules in a cell or in a sub-cellular compartment by the means of co-localization analysis, which is an indispensable tool before inferring biological interaction and drawing functional conclusions.

Co-localization analysis has become an extensive field of research and can be carried out using two different, complementary methods: a pixel based approach [1][2] or an object-based approach [3][4][5], as well as a combination of the two approaches [6]. Detailed reviews of these methods have been carried out [5][7][8].

In the pixel-based approach, the linear relationship between a pair of biomolecules is calculated statistically between two fluorescent channels [2][9] without taking into account the positional information. Statistical significance of this correlation coefficient may be ensured by computing co-localization after scrambling pixel coordinates [10] or by shifting images pixelwise [11]. Pixel-based approaches are included in most commercially available image analysis softwares because they are easy to implement. However, co-localization analysis by pixel-based approaches is affected by the inherent noise of fluorescent images and thus not always applicable [5][8]. Furthermore, pixel-based approaches do not give information about the spatial relationship between objects.

In the object-based approach, spatial information is used to quantify the degree of co-localisation between objects in the image. It is thus indispensable to perform segmentation prior to co-localization analysis in order to identify and delineate the objects of interest. Intensity thresholding is a simple method, but its easiness comes with limitations as the threshold is globally applied to the whole image. Recently, more sophisticated 3D, local, segmentation methods have been developed [12][13], including spot segmentation and iterative thresholding which we describe in this study.

The segmentation allows determining the volume that the object occupies in the 3D space as well as the localisation of the geometrical centroid or centre of mass of the object. The degree of co-localization can then be calculated in different ways, depending on the optical resolution limit and the size of objects investigated. In one approach co-localization is detected if the distance between the centres of the objects in two fluorescent channels is lower than image resolution. In another approach, co-localization can be inferred if the centre of one object falls into the volume occupied by the other object. These two paradigms are used in the JACOP plugin from ImageJ [5]. More recently some authors published a review and implemented some object-based colocalization algorithm in a plugin called Colocalisation studio implemented in the software Icy [8][14]. In this approach, a spherical region is computed around the object centre, and co-localization is deduced if the centre of another object falls into this spherical region.

Several drawbacks are inherent to the aforementioned approaches. Firstly, the object position determined by its centroid or center of mass is not sufficient to fully represent the object. Secondly, no information, neither on the extent of colocalization between each object nor on the property of the co-localizing objects (such as intensity or volume) can be obtained.

Here, we first summarize the critical steps for optimized image acquisition and present a new plugin, DiAna -for Distance Analysis. This plugin allows, firstly to segment the objects, secondly to perform in-depth analysis of co-localization and distance analysis in between objects. The applicability of the various tools provided by DiAna is illustrated with images of neuronal synaptic markers, since they are objects with known colocalisations patterns. The analysis of those pre and post-synaptic elements that form a synapse are representative of the sub-cellular co-localisation analysis which can be performed with DiAna and can be transferred to any kind of biological structures.

2 Material and methods

2.1 Animal care

Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals

86/609/EEC), and the experiments were approved by the local ethic committee. Male mice weighing 22-24 gm were housed 5 per cage and acclimatized to laboratory conditions (12hr light/dark cycle, 21 $\pm$ 1°C room temperature) with *ad libitum* access to food and water. VGLUT1-venus knock-in mice express the Vesicular GLUamate Transporter 1 (VGLUT1) fused to the fluorescent protein Venus under VGLUT1 endogenous promoter [15].

2.2 Sample preparation

Mice brains were fixed by intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in 0.1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (phosphate buffer), pH 7.4. Brains were dissected and post-fixed overnight at 4 °C. Coronal sections of 50 μm thickness were cut with a vibratome (Leica).

2.3 Immunofluorescence

Sections were permeabilized for 30 min in phosphate buffer containing 0.1% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin (BSA). The sections were incubated with the primary antibody in PBS with 3% BSA overnight at 4°C. The antibodies used were mouse monoclonal directed against synaptophysin (1/1000, Sigma), mouse monoclonal directed against bassoon (1/1000, Stressgene), rabbit polyclonal directed against tyrosine hydroxylase (1/1000, Sigma). Following three washing steps of 15 minutes with PBS, secondary antibody conjugated with the fluorochrome alexa-561 or alexa-488 directed against either mouse or rabbit (1/500, Invitrogen) was incubated in PBS with 3% BSA for 2 hours at room temperature. After washing, sections were rinsed before mounting in Prolong Gold.

2.4 Confocal image acquisition and deconvolution

Images stacks were taken with a Confocal Laser Scanning Microscope (TCS SP5, Leica Microsystems, Germany) equipped with a 1.4 NA objective (oil immersion, Leica) with pinhole aperture set to 1 Airy Unit, pixel size of 60 nm and z-step of 200 nm. Excitation wavelength was 514 and 561, and emission range was 525-540 and 570-620 nm, respectively. Laser intensity and photomultiplier tube gain were set so the image occupies the full dynamic range of the detector. Deconvolution was performed using an experimental Point Spread Function obtained from fluorescent beads and Maximum Likelihood Estimation algorithm (Huygens software, Scientific Volume Imaging,

Netherlands). 150 iterations were applied in classical mode, background intensity was averaged from the voxels with lowest intensity, and signal to noise ratio values were set to a value of 15.

2.5 Segmentation

Three segmentation procedures are implemented in the plugin. The first one is based on a global thresholding of the image. The second one is based on spot segmentation [16]. Firstly, local maxima are computed in the image, and a user-defined threshold allows selecting the local maxima belonging to objects. Then the 3D radial distribution of the voxel intensities around each local maximum is computed and a threshold is estimated for the border of each object. When the border threshold has been found, the voxels around the local maximum are examined and successively included in the segmented object through the following algorithm: each 3D neighbour voxel is examined and included in the object if 1: their intensity is above the threshold 2: if their intensity is lower than the voxel previously added to the object 3: if the other neighbours would be added to the object as well. The third segmentation procedure is based on an iterative thresholding process, it is a simplified version of the algorithm published by Gul-Mohammed et al [17], and is based on the idea of max-trees and MSER technique [18][19]. Firstly, an interval of volumes is fixed and the image will undergo thresholding at each possible threshold and segmented objects having a volume in the defined range will be extracted from the image. The extracted objects are then organized into a hierarchy, a same object can be extracted with different thresholds, will be stored in a branch of the hierarchy. In case a object will split into two objects at higher threshold, a branch division will be created. Then on all final branches, corresponding to higher thresholds, the thresholds yielding to most stable objects, in term of volume, will be computed and the corresponding object will be displayed as the best object on this branch, all other instances of this object will then be discarded.

For the images presented in this study, segmentation was performed in 3D using the spot segmentation procedure using the following parameters: Maxima detection: radius in xy-axis=4, in z-axis=3, noise parameter set to zero; Threshold for maxima selection was set to 5000; Parameters for Gaussian fit and threshold calculation were Radius maximum=10, S.D. value=1.5.

2.6 Distance analysis

Distance analyses are based on classical euclidean distance computation. We implemented center-to-center distances, centre-to-edge distances and edge-to-edge distances. In order to be computationally efficient the objects are defined as the list of the voxels comprising the object. For edge-to-edge distance analysis, the list of contour voxels are extracted and put into a KD-tree for efficient distance computation [20]. The edge-to-edge distance is hence the smallest distance between the two objects, and will be equal to 0 if the two objects intersect. Closest objects are also computed using a KD-tree approach for efficiency.

2.7 Co-localization and contact surface analysis

The computation of co-localized voxels is based on the analysis of the corresponding labeled images of the objects [21]. The object 1 is labeled with values 1 in the first image and the object 2 with values 2 in the second image, the two images are then summed. The number of voxels having a value 3 will hence correspond to the number of co-localized voxels between the two objects. From two non-co-localized objects we implemented a contact surface computation. We define a minimum distance between the borders of the two objects and compute the number of border voxels from one object having border voxels from the other object below the defined distance.

2.8 Statistical computation

In order to compute robust co-localization analysis, we need to assess the statistical significance of the co-localization. Based on the idea of the randomization of pixels described by Costes, we carry out a randomization of objects position. A new position is randomly assigned to the objects, while ensuring the objects remain in the surrounding structure and do not intersect with other objects. Based on this randomization we used the framework defined by Andrey et al [22] to define an index describing the statistical significance of the co-localization. We first compute the cumulated distribution function (cdf) of all distances between the centre of objects of the first channel to the centre of the closest object in the second channel for the observed data, we then compute the same cdf for n randomized data and rank the observed data among the n randomized data. For a 5% interval, if the observed data falls into the first or last 2.5% of the randomized data, we can then reject the hypothesis than the colocalization is only due to chance, as this may happen in high density objects populations.

3 Results and discussion

3.1 Image acquisition

It is essential to control for image resolution, which represents the minimal distance required to separate two objects in an image, in order to avoid co-localization artefacts. We would therefore like to recall how to set resolution and sampling, even if the preparation of the sample and image acquisition have been extensively discussed elsewhere [5][23][24][25]. The limit of resolution, which defines the separating power for distinguishing two objects can be calculated by the laws of Abbe and is given by the formula $0.6 \lambda / \text{NA}$ (Numerical Aperture of the objective). In confocal microscopy, the introduction of a confocal pinhole into the optical system results in an improvement by approximately 40% of this lateral resolution because out-of-focus light is eliminated from the detector [26]. When collecting light with a confocal microscope at 500nm, an objective with 1.4 NA has a lateral separation power of 220 nm, in other words two objects distant by less than 143 nm will appear as co-localizing on the image. To properly collect information, sampling should follow Nyquist criteria [23][27], which stipulates that recording should be done at a frequency 2.3 times higher than the frequency of interest. For our example, with a resolution of 143 nm, the optimal pixel size is 95 nm. It should be noted that the resolution in z-axis is estimated with the formula $1.4 \lambda / \text{NA}^2$ and thus attains a theoretical value of 357 nm in our example, which is much lower than the lateral resolution. This has to be taken into account for co-localization analysis. However, real axial resolution is much lower in practice, the loss of axial resolution is accentuated when going deeper into the sample because of spherical aberration due to refractive index mismatches [28] This loss of axial resolution can be reduced by refractive index matching [29] and by deconvolution [30][31].

3.2 Deconvolution of confocal images

In microscopy, the diffraction of light causes an optical blur and optical aberrations leading to the distortion of the image. The image of a single fluorescent point observed through a microscope thus becomes a diffraction pattern called the point spread function (PSF). The lateral PSF resembles to a spot surrounded by several discs, whereas the axial PSF has an hourglass shape [32]. Confocal imaging excludes the blur due to out-of-focus emission light to a certain extent with the aid of a pinhole

but does not cancel diffraction and aberrations [33]. The optical blur, which is inherent to the optical system is physical and reproducible and can thus be measured and used for image restoration. Deconvolution counteracts image distortion and restores the image by reassigning pixel intensities to their right place in the image. Image restoration by deconvolution is a well-established procedure for wide-field microscopy [32]. Deconvolution also improves resolution and signal to noise ratio of confocal images [23][34][35] [36], and it has been shown that it provides a benefit to co-localization analysis [37][38][39]. The image restoration in the z-axis is especially relevant for co-localization analysis since the extension of the object in depth due to optical limitations can account for false positive co-localization results. Figure 1 shows the benefits of deconvolution with two main effects: the increase of the signal to noise ratio, and the increase in axial resolution. It is noteworthy that the number of iterations needed for proper z-blur correction is higher than that needed to optimal correction in the xy-axis [35], thus images must be examined through orthogonal views when evaluating deconvolution (Figure 1C,D).

Proper image acquisition and post-treatment facilitates subsequent object extraction by image segmentation for reliable analysis. DiAna comprises of two ImageJ plugins, the first will perform segmentation of the input images. The second will perform the various analyses. In the next parts we first describe the segmentation procedures and then object analyses performed by our ImageJ-based plugin DiAna.

3.3 Segmentation: Determination of the objects in the image

Segmentation is a process that allows the identification of objects in digital images. Binarization assigns a value of either 0 or 1 to each pixel. Pixels belonging to objects have a value 1, background pixels have a value of 0. In a second step, the objects are labelled, which means that all neighbouring pixels with a value of 1 are grouped to define an object. Segmentation is thus a process by which a gray-scale image becomes a space in which objects are located. In the most classical segmentation procedure, an intensity threshold is used to binarize the image. Before thresholding, smoothing of the image with an appropriate filter can be useful, unless the image has been deconvoluted and noise filtered. Noise filtering and global thresholding are implemented in DiAna, so objects can be extracted before analysis. The major problem with intensity thresholding lies in the fact that this is a global approach. If the image contains bright and faint objects, the application of a single threshold to the

image will end with the bright objects being too big or the faint objects being too small. Hence a local approach for segmentation is often more useful. Therefore we included two 3D segmentation procedures in the DiAna plugin, which allow for segmentation of image containing objects with different sizes and intensities (Figure 2). The “spot segmentation” procedure is based on detection of objects with local maxima and 3D analysis of the intensity distribution around the maxima [16] (Figure 2A,B). This procedure brings the advantage that objects with different intensities will be properly segmented. It should, however, be noted that each local maximum is a seed that mark an object, it is thus advised to deconvolute or apply noise filters before maxima detection, and to carefully set the intensity threshold for maxima selection. Finally, it is noteworthy that the method is best suited for spot-like objects since in case of irregular objects several local maxima may be found within the same object which would then be split. The “iterative segmentation” procedure extracts each object by examining the output of thresholding at different intensity values [17] (Figure 2C). The iterative method is quite powerful and can deal with objects of different sizes and intensities. However, since all thresholds are tested, this method may require significant computing time, especially for images with high dynamic range. A complete version of these segmentation procedures with more options can be found in the 3D Image Suite [40][41]. The algorithms executed in both spot and iterative segmentation procedures have been chosen so they are generally applicable to most biological images with good robustness. However, users are advised to test several values for the parameters and validate the segmentation by visual inspection of the segmentation result. It is a general rule that only the biologist can properly estimate whether the segmented objects corresponds to what he/she considers as biological objects. It should be mentioned that the robustness of the segmentation procedures proposed in DiAna comes with a drawback, which is that big objects may be split into two or more smaller objects. Therefore, we introduced a tool in the ROI manager for manually selecting and merging pairs of objects when necessary. Images of similar biological objects often contain variable intensities. This may due to differences in the efficacy of fluorescent labelling from one experiment to another, or from lack of stability of the excitation and detection system of the microscope. Therefore the values determined for the parameters of the segmentation may not be applicable to two different set of images. A way to circumvent this problem is to normalize the mean intensity of the whole image [23] before defining the segmentation parameters and reliably applying them to all images of the study.

3.4 Three-dimensional measurements for object analysis

Following the application of segmentation procedure described in section 3.3, DiAna offers precise 3D measurements for co-localization and distance analysis. Of note, users can segment their images with any other method of their choice and directly use the analysis tools of DiAna. The plugin quantifies several parameters for pairs of objects (Figure 3). It also introduces measurement of surface of contact for distant and co-localizing objects, which requires a user-defined edge-to-edge distance (Figure 3E). Those parameters are used for co-localization and distance analysis as described in sections 3.5 and 3.6. Moreover, DiAna performs measurements of several parameters such as volume, mean intensities, surface area, feret's diameter, coordinates of center of mass and centroid for all objects of the image.

3.5 Co-localization analysis with DiAna

Co-localization is determined by the detection of overlapping objects. Moreover, DiAna computes distances between co-localizing objects (Figure 3A-C) as well as measurements of co-localizing object's volume for each pair of objects (Figure 3D). Those measurements allow for precise quantification of the co-localization. Figure 4 shows two biological examples where images of synaptic markers with known differences in co-localization were analysed with DiAna. The co-localization of the vesicular transporter VGLUT1 with synaptophysin (Fig. 4A) and with Bassoon (Fig. 4B) was analysed by determining center-to-center distances and the percentage of the co-localization volume (Fig. 4C,D). Both parameters reveal a difference in the extent of co-localization. Interestingly, the percentage of the co-localizing object's volume allows using a cut-off to discard false positives, which could appear because the blur in z-axis can lead to small overlap between objects (Figure 4E). Finally, in addition to co-localization measurements, DiAna retrieves tables with quantifications such as volume and mean intensity for each object of both images. Each object is identified in the co-localization and measurement's tables, ensuring correlation between chosen criteria can be drawn.

3.6. Distance analysis with DiAna

DiAna also offers a distance analysis for either co-localized objects or for all objects from the two images. For each object from one image, the centre to centre distances with all objects of the other

image are computed in 3D. By default, the plugin identifies the closest, non co-localizing, object. The user can also select the rank of the objects to be included in the result table (first closest only, first and second closest, first to fifth etc.). Note that in this case the co-localizing objects will be included in the results as the first closest objects. The distances measured can be used to plot a histogram of distances between neighbouring objects for spatial distribution analysis, and correlation between quantified parameters from the object pair can be assessed. Figure 5 shows the spatial analysis in a biological example where the distances of two synaptic markers, the vesicular transporter VGLUT1 and tyrosine hydroxylase were analysed with DiAna. The analysis of the distances to the first closest object allows showing that objects from the red channel are preferentially localized in the vicinity of objects from the green channel, since 50% of all red objects are found in a distance below 1 micron to a green object. The distance analysis can furthermore be used to assess co-localization in case the objects are represented as single voxels. DiAna can be used to estimate co-localization from images of the centre of the objects. The centre-to-centre distance given by the distance analysis allows determining which objects do co-localize (Figure 6). The measured distances can be ranked to set a threshold value which will define which single-voxel objects co-localize. Co-localization can be decided if the distance is smaller than the optical resolution. In this case the threshold distance can be either set to zero or more, depending on the resolution of the image (Figure 6A-C). Alternatively, the co-localization can be decided if the distance value is lower than a threshold distance estimated on the basis of the knowledge of minimal size of the objects (Figure 6A,D). It is noteworthy that this method can be applied for co-localization analysis in images of single particles, in which objects are represented as single voxels, often identified as the peak of the Gaussian distribution of objects intensity.

3.7. Assessing statistical robustness in object based co-localisation analysis

In pixel-based co-localization analysis, statistical significance of co-localization may be estimated by comparing co-localization measurements before and after randomization of pixels. Costes et al. [10] confronted the Pearson coefficient of an image pair with correlation coefficients obtained between the green channel and randomized images of the red channel. To do so, they shuffled pixel blocks of one fluorescent channel in a randomized fashion and measured the Pearson coefficient after each randomization round. They obtained a Gaussian distribution of PC after randomization and deduced

that the Pearson coefficient obtained for the original image pair would be statistically significant if it is not included in the area of the Gaussian curve. With the DiAna plugin, we introduce a similar method applied to object-based co-localization (Figure 7). Firstly, objects from one image are randomly redistributed. The shuffle function allows to either redistribute the objects in a uniform manner within the image, or to import a binary image which defines regions in which redistribution is constrained (Figure 7A-C). Shuffled images are generated, and for each of these images the centre-to-centre distances between objects of the randomized channel to the closest object in the second channel from the original image are computed. The cumulative distribution of the distances is plotted, and represented as the mean (Fig. 7D, red curves) flanked by 95% confidence intervals of the results (Fig. 7D, green curves). In parallel, observed centre-to-centre distances between objects from the non-randomised original images are measured and plotted on the same graphic (Fig. 7D, blue curves). Statistical significance is assessed by the null hypothesis that the experimental data are due to randomness. If the distribution of the distances from experimental images falls outside the confidence interval of the distance distribution obtained for shuffled images in which objects locations are random, one concludes that there is less than 5% chance ($p < 0.05$) that the observed distribution is random and thus the co-localization is considered as statistically significant. In addition, the plugin calculates the rank of the observed distribution within the n distributions obtained from shuffled images. A rank lower than 0.025 or higher than 0.975 indicates that the probability that the observed distribution is random is inferior to 5 % and the co-localization is considered significant. Note that this methodology for assessing statistical robustness using a randomization procedure is quite generic and can be applied to other functions for co-localisation analysis and generally to many other problems.

4 Conclusion

We have developed an ImageJ-based tool named DiAna, allowing for spatial analysis in the three dimensions. In this tool we implemented two methods of 3D-segmentation, which show faithful, and robust object extraction despite high variability of object size and intensity within the image. Furthermore, the tool allows executing extended object-based co-localization and distance analysis between objects in 3D. After co-localization or distance analysis, quantifications for each object are possible. Finally, we introduce a new method for the estimation of statistical significance of object-

based co-localization. The algorithms we developed are implemented in a user-friendly plugin, which allows for complete but intuitive 3D image analysis applicable to a large variety of biological objects.

The plugin with instructions for use can be found at [\[http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:distance_analysis_diana_2d_3d:start\]](http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:analysis:distance_analysis_diana_2d_3d:start).

Declaration of interest

The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors. TB's international mobility was partly funded by the programme "Investissements d'avenir" ANR-11-IDEX-0004-02.

References

- [1] Q. Li, A. Lau, T.J. Morris, L. Guo, C.B. Fordyce, E.F. Stanley, A syntaxin 1, Galphao, and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4070–4081.
- [2] E. Manders, J. Stap, G. Brakenhoff, R. Van Driel, J. Aten, Dynamics of three-dimensional replication patterns during the S-phase, analysed by double labelling of DNA and confocal microscopy, *J. Cell Sci.* 103 (1992) 857–862.
- [3] E. Lachmanovich, D. E Shvartsman, Y. Malka, C. Botvin, Y.I. Henis, A.M. Weiss, Co-localization analysis of complex formation among membrane proteins by computerized fluorescence microscopy: application to immunofluorescence co-patching studies, *J. Microsc.* 212 (2003) 122–131.
- [4] B. Obara, A. Jabeen, N. Fernandez, P.P. Laissue, A novel method for quantified, superresolved, three-dimensional colocalisation of isotropic, fluorescent particles, *Histochem Cell Biol* 139 (2013) 391–402.
- [5] S. Bolte and F.P. Cordelières, A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy, *J. Microsc.* 224 (2006) 213–232.
- [6] F. Jaskolski, C. Mulle, O.J. Manzoni, An automated method to quantify and visualize colocalized fluorescent signals, *J. Neurosci. Meth.* 146 (2006) 42–49.
- [7] F.P. Cordelières, S. Bolte, Experimenters' guide to co-localization studies: finding a way through indicators and quantifiers, in practice, *Methods in Cell Biology* 123 (2014) ISSN 0091-679X, chapter 21.

- [8] T. Lagache, N. Sauvonnnet, L. Danglot, J.C. Olivo-Marin, Statistical analysis of molecule colocalization in bioimaging, *Cytometry A* 87 (2015) 568-579.
- [9] E. Manders, A. Visser, A. Koppen, W. De Leeuw, R. Van Liere, G. Brakenhoff, R. Van Driel, Four-dimensional imaging of chromatin dynamics during the assembly of the interphase nucleus, *Chromosome Res* 11 (2003) 537-547.
- [10] S.V. Costes, D. Daelemans, E.H. Cho, Z. Dobbin, G. Pavlakis, S. Lockett, Automatic and quantitative measurement of protein-protein colocalization in live cells, *Biophys. J.* 86 (2004) 3993-4003.
- [11] B. Van Steensel, E. Van Binnendijk, C. Hornsby, H. Van Der Voort, Z. Krozowski, E. De Kloet, R. Van Driel, Partial colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in discrete compartments in nuclei of rat hippocampus neurons, *J. Cell Sci.* 109 (1996) 787-792.
- [12] E. Meijering, Cell segmentation: 50 years down the road, *IEEE Signal Processing Magazine* 29 (2012) 140-145.
- [13] V. Wiesmann, D. Franz, C. Held, C. Münzenmayer, R. Palmisano, T. Wittenberg T, Review of free software tools for image analysis of fluorescence cell micrographs, *J Microsc.* 257 (2015) 39-53.
- [14] T. Lagache, V. Meas-Yedid, J.C. Olivo-Marin, A statistical analysis of spatial colocalization using ripley's k function, *IEEE International Symposium on Biomedical Imaging ISBI*, San Francisco, 2013. pp 896-901.
- [15] E. Herzog, F. Nadrigny, K. Silm, C. Biesemann, I. Helling, T. Bersot, H. Steffens, R. Schwartzmann, U.V. Nägerl, S. El Mestikawy, J. Rhee, F. Kirchhoff, N. Brose, In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice, *J Neurosci* 26 (2011) 15544-15559.
- [16] N. Heck, M. Dos Santos, B. Amairi, M. Salery, A. Besnard, E. Herzog, T. Boudier, P. Vanhoutte, J. Caboche, A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo, *Brain Struct Funct* 220(2015) 2953-2966.
- [17] J. Gul-Mohammed, I. Arganda-Carreras, P. Andrey, V. Galy, T. Boudier, A generic classification-based method for segmentation of nuclei in 3D images of early embryos, *BMC Bioinformatics* 14 (2014) 15-19.
- [18] J. Matas, O. Chum, M. Urban, T. Pajdla, Robust wide-baseline stereo from maximally stable extremal regions, *Image and vision computing* 22 (2004) 761-767
- [19] L.A. Tavares, R.M. Souza, L. Rittner, R.C. Machado, R.A. Lotufo, Interactive max-tree visualization tool image processing and analysis, *Image Processing Theory, Tools and Applications* (2015) Conference article 119-124.
- [20] J.L. Bentley, Multidimensional binary search tree used for associative searching, *Communications of the ACM* 18 (1975) 509-517.
- [21] D.A. Randell, G. Landini, A. Galton, Discrete Mereotopology for spatial reasoning in automated histological image analysis, *IEEE Trans Patt Rec Mach Intell* 35(2013) 568-581.
- [22] Andrey P, Kiêu K, Kress C, Lehmann G, Tirichine L, Liu Z, Biot E, Adenot PG, Hue-Beauvais C, Houba-Hérin N, Duranthon V, Devinoy E, Beaujean N, Gaudin V, Maurin Y, Debey P. Statistical analysis of 3D images detects regular spatial distributions of centromeres and chromocenters in animal and plant nuclei. *PLoS Comput Biol.* 2010 Jul 8;6(7):e1000853.
- [23] O. Ronneberger, D. Baddeley, F. Scheipl, P.J. Verveer, H. Burkhardt, C. Cremer, L. Fahrmeir, T. Cremer, B. Joffe, Spatial quantitative analysis of fluorescently labeled nuclear structures: problems, methods, pitfalls, *Chromosome Res* 16 (2008) 523-562.

- [24] A.J. North, Seeing is believing? A beginners' guide to practical pitfalls in image acquisition, *J Cell Biol.* 172 (2006) 9-18.
- [25] J.W. Lichtman, J.A. Conchello, Fluorescence microscopy, *Nat Methods* 12 (2005) 910-919.
- [26] J.A. Conchello, J.W. Lichtman, Optical sectioning microscopy, *Nat Methods* 12 (2005) 920-931.
- [27] J. Pawley Points, pixels, and gray levels: digitizing image data. In: J.B. Pawley (ed) *Handbook of biological confocal microscopy*, 3rd edn. Springer, New York, 2006, 59–79.
- [28] S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, K. Stelzer, Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index, *J Microscopy* 169 (1993) 391-405.
- [29] C. Fouquet, J.F. Gilles, N. Heck, M. Dos Santos, R. Schwartzmann, V. Cannaya, M.P. Morel, R.S. Davidson, A. Trembleau, S. Bolte, Improving axial resolution in confocal microscopy with new high refractive index mounting media, *PLoS One*, 10 (2015):e0121096.
- [30] J.G. McNally, T. Karpova, J. Cooper, J.A. Conchello, Threedimensional imaging by deconvolution microscopy, *Methods* 19 (1999) 373–385.
- [31] P. Sarder, A. Nehorai, Deconvolution methods for 3-D fluorescence microscopy images, *IEEE Signal Process. Mag* 23 (2006) 32–45.
- [32] W. Wallace, L. Schaefer, J. Swedlow, A workingperson's guide to deconvolution in light microscopy, *BioTechniques* 31 (2001) 1076-1097.
- [33] P. Shaw, D. Rawlins, The point-spread function of a confocal microscope: its measurement and use in deconvolution of 3-D data. *J Microsc* 163(1991) 151–165.
- [34] P. Shaw, Deconvolution in 3-D optical microscopy, *Histochem J* 26 (1994) 687–694.
- [35] N. Heck, S. Betuing, P. Vanhoutte, J. Caboche, A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease, *Brain Struct Funct* 217(2012) 421-434.
- [36] F. Lam, D. Cladière, C. Guillaume, K. Wassmann, S. Bolte, Superresolution for the poor: An image processing workflow to obtain 3D-SIM-like images in thick samples with a standard confocal microscope, Submitted after invitation for this special issue in *Methods*.
- [37] L. Landmann, P. Marbet, Colocalization analysis yields superior results after image restoration, *Microsc Res Tech* 64 (2004) 103-112.
- [38] L. Landmann, Deconvolution improves colocalization analysis of multiple fluorochromes in 3D confocal data sets more than filtering techniques, *J Microsc* 208(2002) 134-147.
- [39] T. Abraham, S.E. Allan, M.K. Levings, Deconvolution and chromatic aberration corrections in quantifying colocalization of a transcription factor in three-dimensional cellular space, *Micron.* 41(2010) 633-640.
- [40] J. Ollion, J. Cochenne, F. Loll, C. Escudé, T. Boudier, TANGO: A Generic Tool for High-throughput 3D Image Analysis for Studying Nuclear Organization. *Bioinformatics* 29 (2013) 1840-1841.
- [41] http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:stacks:3d_ij_suite:start

Figure legends

Figure 1. Proper image acquisition followed by deconvolution ensure reliable co-localization analysis

A. The comparison of the original and deconvoluted images illustrates the outcome of deconvolution which restores the image through an iterative procedure coupled to noise filtering.

B. Close-ups from the images shown in A, same plane ($Z=0$) and adjacent plane ($Z=+1$). The arrow indicates an object for which the signal extends over the adjacent plane in the original image. After deconvolution the blur along the z-axis is reduced by reassigning voxel intensities to the right confocal plane.

C. Orthogonal views of the object indicated by the arrow in B illustrate that the blur due to low resolution in z-axis can be partially restored with deconvolution.

D. Fluorescence intensity profile along the line shown in C, demonstrating that deconvolution increases both resolution and signal to noise ratio.

Images of immunostaining for neuronal protein synaptophysin in mouse brain sections. Single planes from a confocal stack are shown. Scale bars in A: 3 microns, B-C: 1 micron.

Figure 2. Principles of the segmentation procedures performed by the plugin DiAna

A. Detection of local maxima for segmentation of the objects with the spot segmentation procedure.

A1. In noisy images, the “noise” parameter allows to discard local maxima outside the objects. For the radius parameter, a low radius (2x2) retrieves several maxima within the same object. A bigger radius (3x3) ensures minimal distance between local maxima and avoids this problem. An example is encircled in red.

A2. The maxima detection is more robust in deconvoluted or properly noise-filtered images.

A3. Prior segmentation, a user-defined threshold intensity value allows selecting the maxima belonging to the objects.

A4. Result of the spot segmentation further explained in B.

B. Workflow of the spot segmentation procedure. B1. Maxima are detected as shown in A. B2. 3D radial distribution of the intensity centred to the maxima is computed. The user should define a maximum value in voxel for the radius of the largest sphere. It is advised that it is bigger than the

largest object expected in the image. B3. The distribution is plotted and fitted to a Gaussian curve. The user defines a factor applied to the standard deviation of the Gaussian curve, which sets the size of a horizontal line placed to cover the area defined by the Gaussian curve (i.e. the size of the object). Factors of 1.5 and 2 will cover 86.6 and 95.4% of the Gaussian curve, respectively. The corresponding intensity value on y-axis of the graphic is the threshold used for segmentation of the object. B4. The procedure allows finding a specific threshold for objects of different intensities. Voxels around the maxima are successively included in the segmented object through an algorithm with three criteria of acceptance: The first criterion is that the voxel intensity should be higher than the defined threshold. B5. The second criterion is that their intensity should be lower than the intensity of the voxels previously included in the objects, which avoids merging of adjacent objects. The intensity distribution illustrates that without this criteria, two adjacent objects are merged. B6. The third criterion is that the voxel is included at the condition that neighbouring voxels are included as well, which avoids creation of filamentous structures extruding from the object.

C. Workflow of the iterative segmentation method. C1. The image is segmented with different intensity thresholds. From low to high intensity thresholds, the objects become isolated and decrease in size. The segmented objects which fall in the volume interval defined by the user are stored in a hierarchy. C2. The selected objects are classified in a hierarchy showing the object separation and decrease in size along increasing threshold values. When an object becomes isolated it is stored in a new branch in the hierarchy. The final branches contain most disconnected objects, still having their volume in the specified interval. The best thresholds within the last branches are found with the maximum stable volume algorithm. The difference in the object volume between each threshold is computed and the threshold corresponding to the minimum difference is retained. C3. The iterative method determines a threshold specific to each object and reconstructs the segmented image.

Figure 3. Measurements performed in DiAna plugin

A-C. Distance analysis measurements performed by DiAna are centre-to-centre (A), edge-to-edge (B), centre-to-edge (C).

D. Percentage of co-localizing volumes normalized to the volume of either one or both objects are computed by DiAna.

E. Contact surface measurements for overlapping and distant objects. The user-defined maximum distance between objects (blue arrows) set the extent of the object contour for which the contact is defined.

Figure 4. Detailed co-localization measurements using the plugin DiAna

A-B. Close-ups of single sections from deconvoluted and segmented image stacks showing two fluorescent channels. Images were obtained from brain sections immunolabeled for synaptic proteins (green: vesicular transporter VGLUT1, red in A: bassoon, red in B: synaptophysin). Electron microscopy and biochemistry predicts co-localization but a different extent in overlap between VGLUT1/synaptophysin and VGLUT1/bassoon.

C. Distance measurements between centres of co-localizing objects reveal that the co-localized objects from image B are closer to each other than the co-localized objects from image A.

D. Measurements of the percentage of the co-localizing volume for each object's pair reveal that the co-localizing volume is bigger for the objects from image B than for the objects from image A.

E. 3D volume rendering from image stack showing an example of co-localization artefact due to optical smear. The percentage co-localization volume is lower than 5% and a cut-off can be defined to avoid such false positives.

Images were segmented using spot segmentation protocol. Co-localization analysis was performed on image stacks containing more than 5000 objects in each channel. Scale bars in A-B: 1 micron.

Figure 5. Distance analysis of paired of non co-localizing objects with the plugin DiAna

A. Close-up of a single slice from deconvoluted and segmented image stack showing both channels. Images were obtained from brain sections immunolabeled for proteins expressed in different, hence non co-localizing, synaptic structures (green: vesicular transporter VGLUT1, red: tyrosine hydroxylase).

B. Distance analysis retrieves center-to-center distance in between all objects from green channel and their closest neighbour in red channel. The histogram of distance distribution shows that 50% of the objects from the red channel are localized at less than 1 micron from objects of green channel.

Distance analysis was performed on image stacks containing more than 3000 objects in each channel. Scale bars in A-B: 1 micron.

Figure 6. Co-localization analysis based on localization of object's centres with the plugin DiAna

A. Distance measurements between all points from two images allows the analysis of the distance distribution of objects. The coloured bars in the histogram illustrate threshold values, which can be used to define co-localization according to criteria defined in B-D.

B. Co-localization can be defined for either a zero distance or a distance equal to voxel size.

C. Co-localization can be defined for distances which are lower than the resolution of the imaging system.

D. In case the minimal size of the biological objects are known, co-localization can be defined for distances which are lower than the sum of the minimum radii of objects A and B.

Scale bars in B-D: 300 nm. Pixel size: 60 nm.

Figure 7. Statistical significance of the object based co-localization

A. DiAna can perform randomization of objects localization within a selected region in the image. 3D surfacing rendering of objects segmented within a mask. Each spot corresponds to an object and the mask volume appears in grey.

B. View of the same objects as in A following the application of a shuffle procedure. The positions of the objects are randomly redistributed within the corresponding mask volume.

C. 3D surface rendering of segmented objects from two images. Images were obtained from brain sections immunolabeled for synaptic proteins (green: vesicular transporter VGLUT1, red: synaptophysin). In the shuffled image, red objects are randomly redistributed. The co-localizing volumes appear in white. Note that their occurrence is lower after shuffling. Lower panels shows close-ups from the regions of the upper panel. The objects have an average diameter of 600 nm.

D. The DiAna plugin provides a graphic, which represents the cumulative distribution of the minimum centre-to-centre distances between objects from two images. The blue curve shows the distribution for the experimental images shown in B. The red curve shows the mean distribution of distances between objects from the experimental green images and from 100 red images obtained by the shuffle procedure. The green curve represents the 2.5 and 97.5% confidence intervals around the mean. The experimental curve (in blue) is localized outside the 95% confidence interval (in green) of the distance analysis done after randomization, the co-localization is thus considered as statistically significant.

Figure 1;Gilles et al.

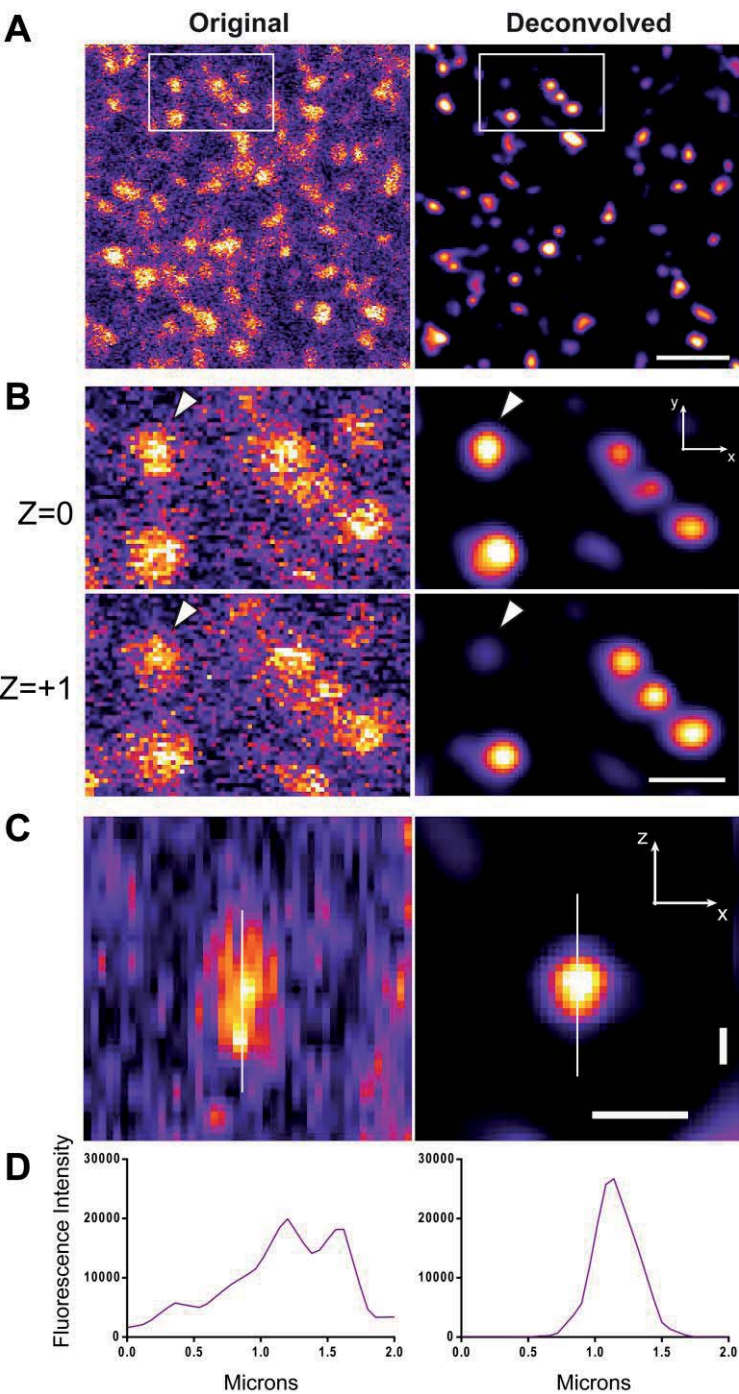


Figure 2; Gilles et al.

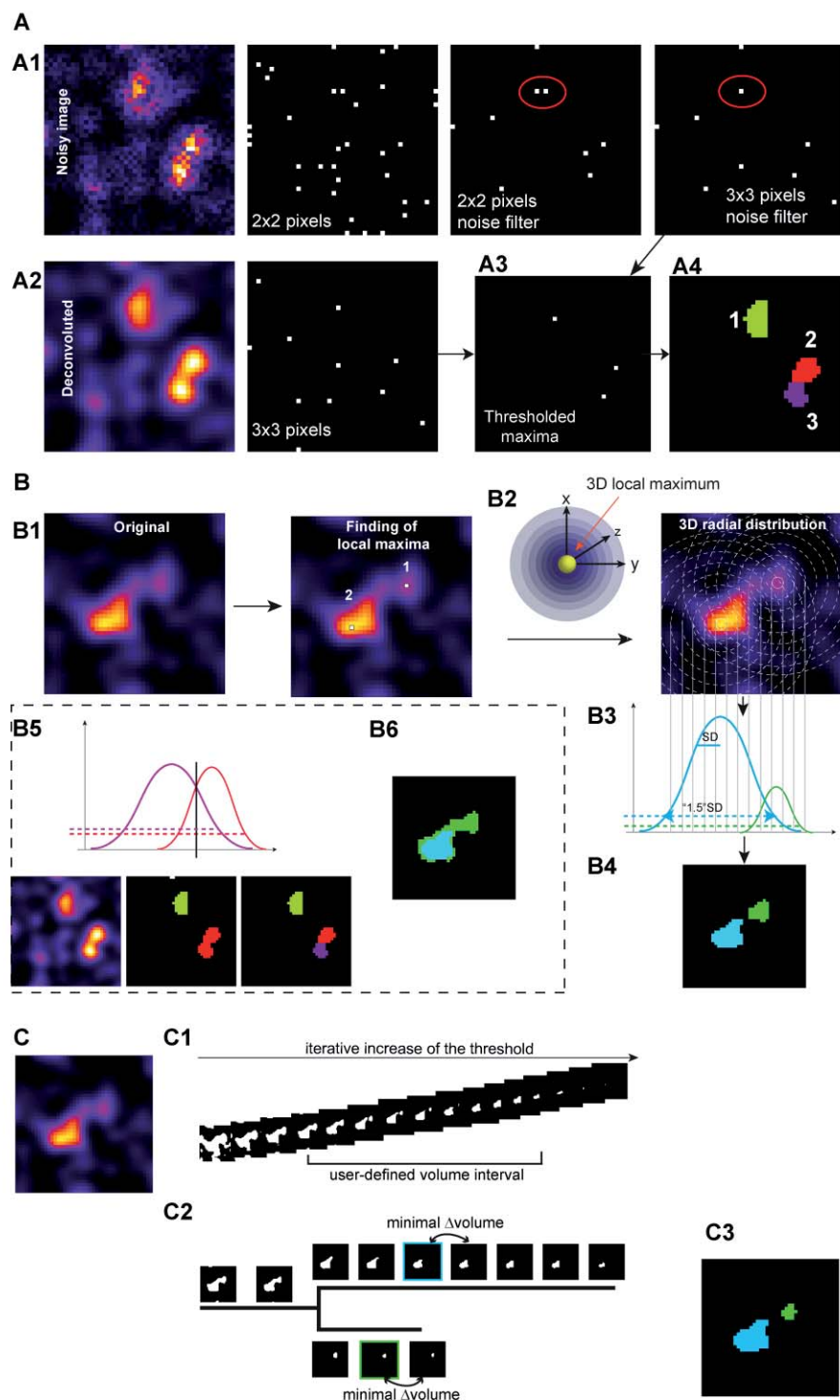


Figure 3; Gilles et al.

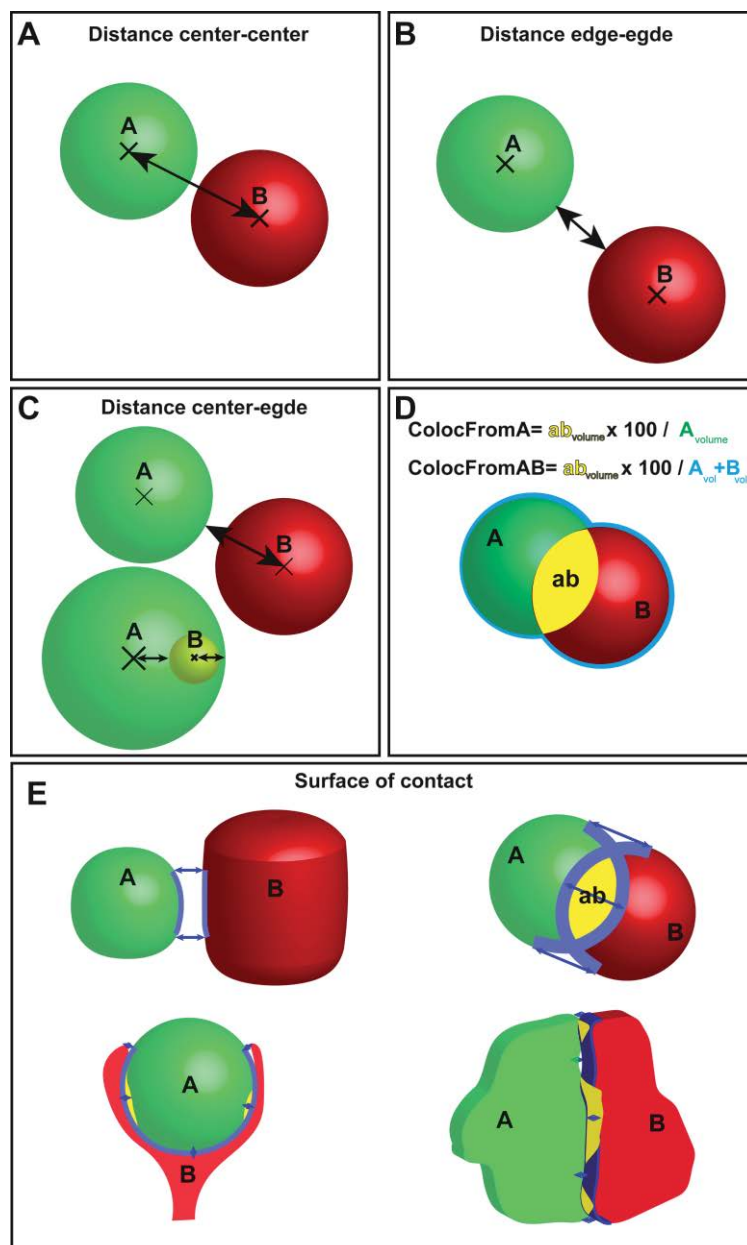


Figure 4;Gilles et al.

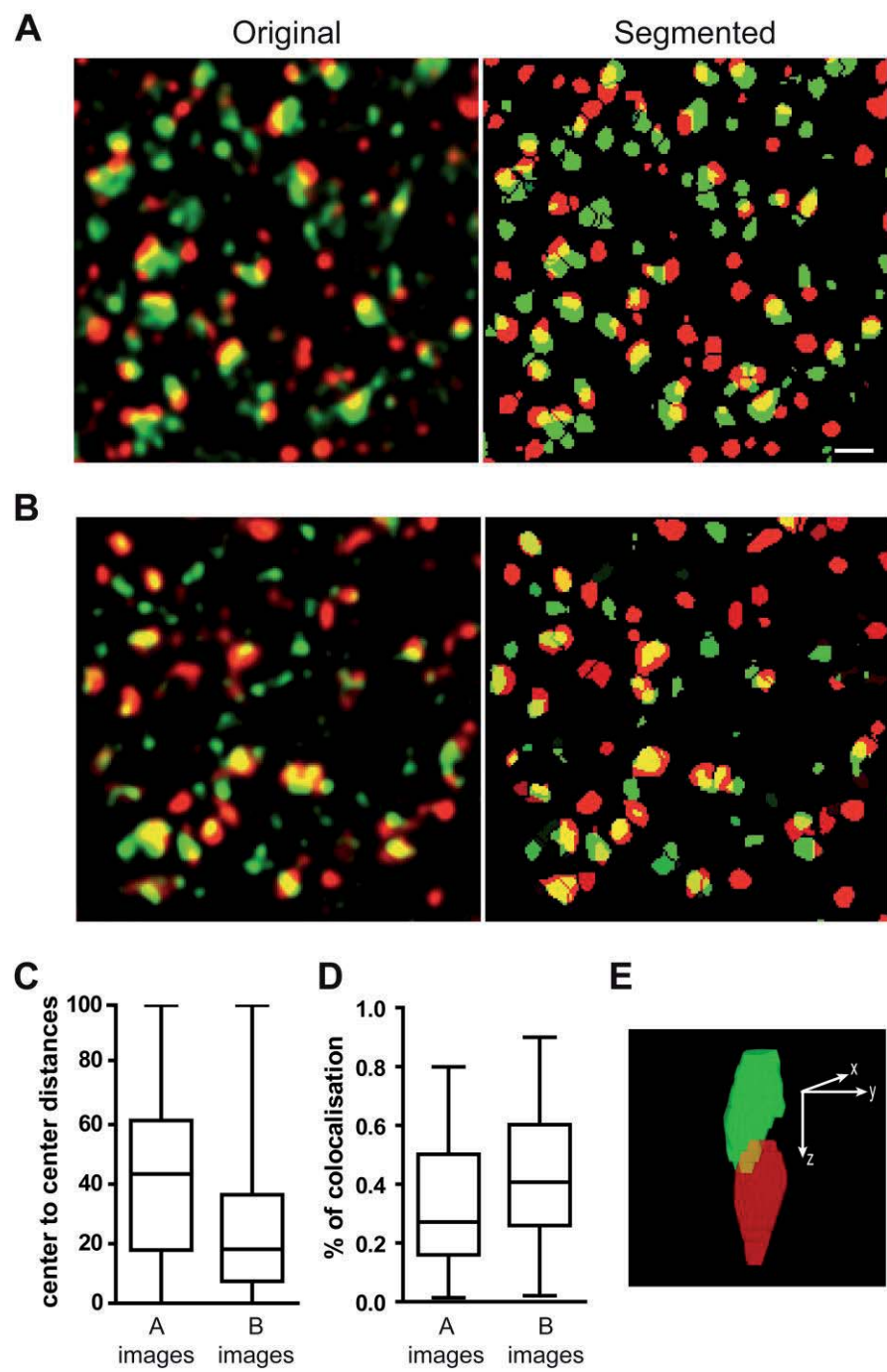


Figure 5;Gilles et al.

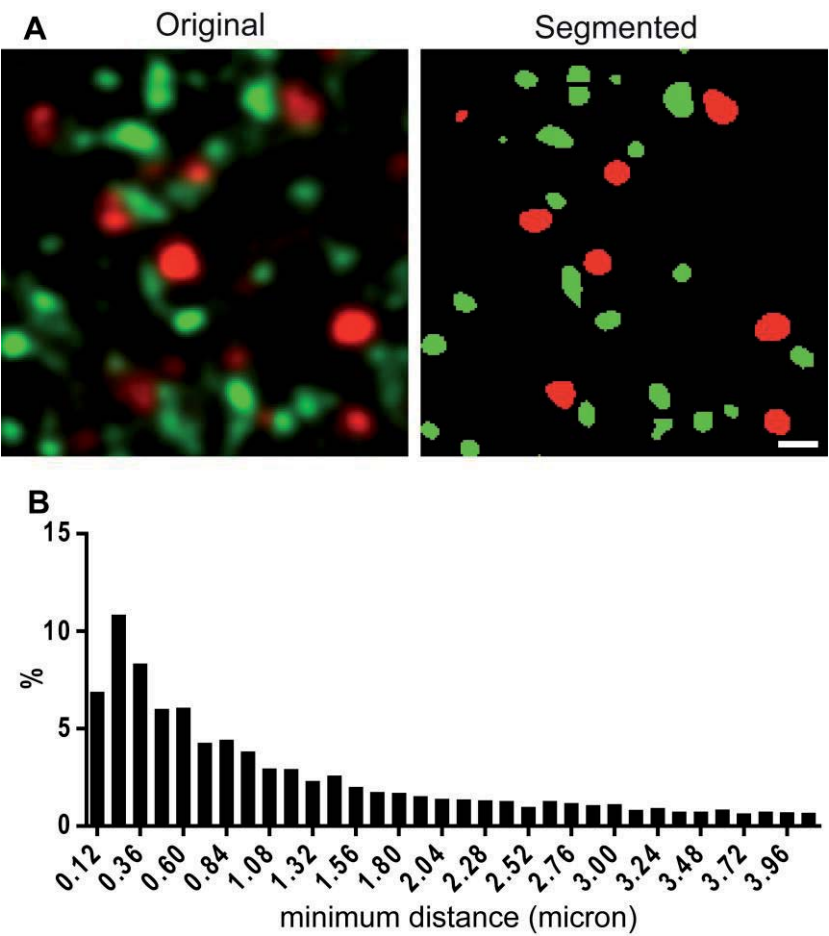


Figure 6;Gilles et al.

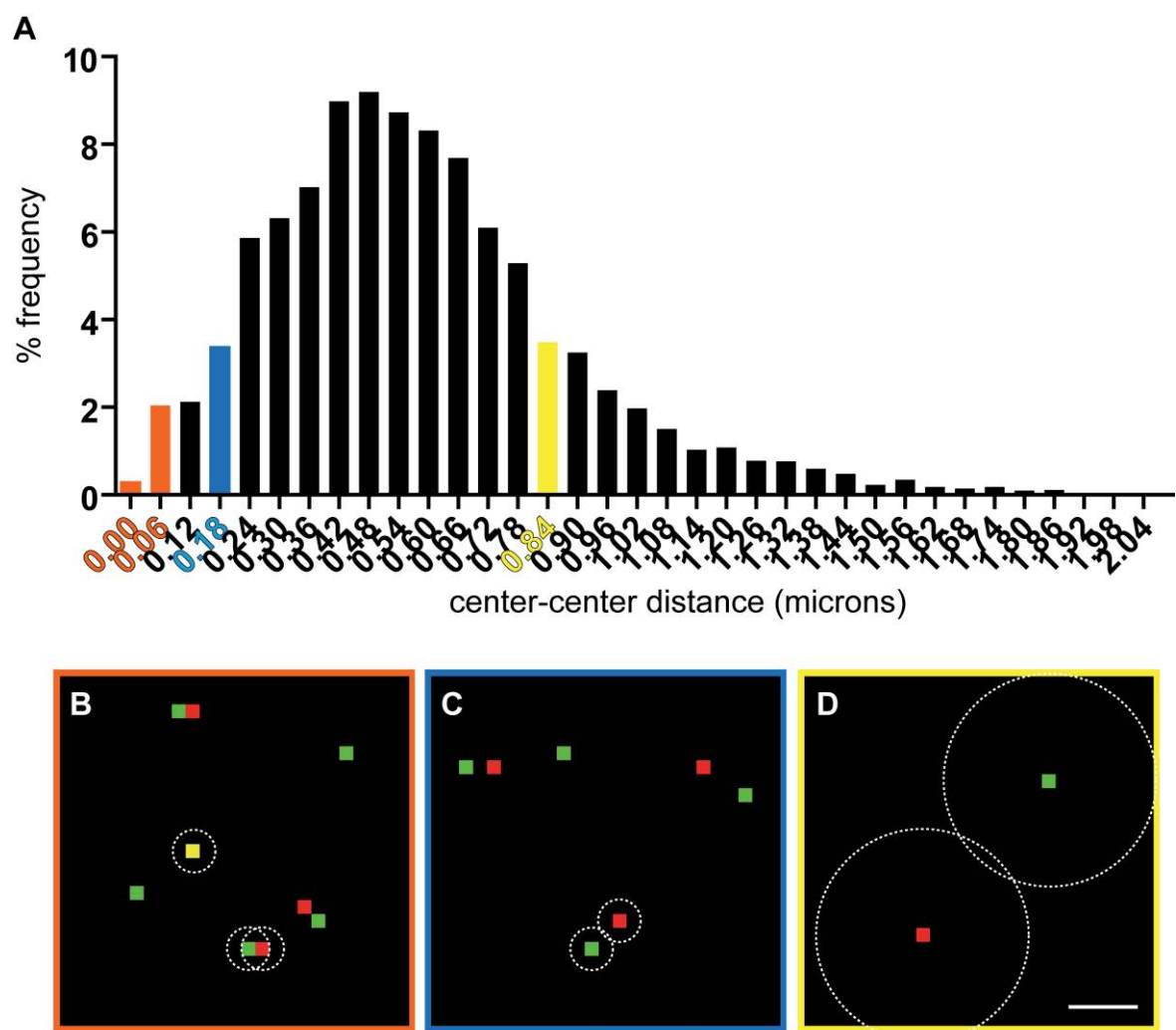
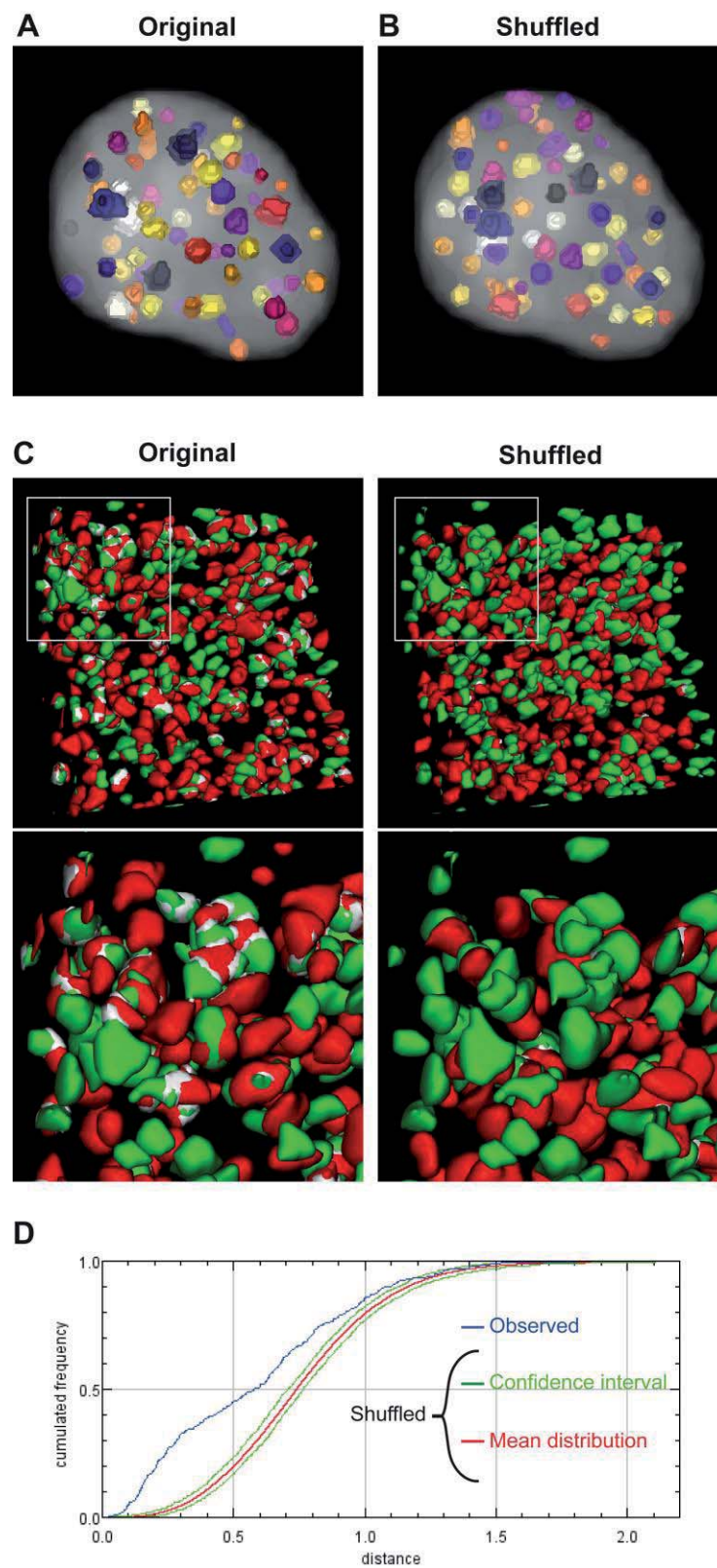


Figure 7; Gilles et al.



Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein Accumulates in the Nucleus in Response to Cocaine and Acts as a Brake on Chromatin Remodeling and Long-Term Behavioral Alterations

Marine Salery, Marc Dos Santos, Estefani Saint-Jour, Lara Moumné, Christiane Pagès, Vincent Kappès, Sébastien Parnaudeau, Jocelyne Caboche, and Peter Vanhoutte

BACKGROUND: Addiction relies on persistent alterations of neuronal properties, which depends on gene regulation. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) is an immediate early gene that modulates neuronal plasticity underlying learning and memory. Its role in cocaine-induced neuronal and behavioral adaptations remains elusive.

METHODS: Acute cocaine-treated mice were used for quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction, immunocytochemistry, and confocal imaging from striatum. Live imaging and transfection assays for Arc overexpression were performed from primary cultures. Molecular and behavioral adaptations to cocaine were studied from Arc-deficient mice and their wild-type littermates.

RESULTS: Arc messenger RNA and proteins are rapidly induced in the striatum after acute cocaine administration, via an extracellular-signal regulated kinase-dependent de novo protein synthesis. Although detected in dendrites, Arc accumulates in the nucleus in active zones of transcription, where it colocalizes with phosphorylated histone-H3, an important component of nucleosomal response. In vitro, Arc overexpression downregulates phosphorylated histone-H3 without modifying extracellular-signal regulated kinase phosphorylation in the nucleus. In vivo, Arc-deficient mice display decreased heterochromatin domains, a high RNA-polymerase II activity and enhanced c-Fos expression. These mice presented an exacerbated psychomotor sensitization and conditioned place preference induced by low doses of cocaine.

CONCLUSIONS: Cocaine induces the rapid induction of Arc and its nuclear accumulation in striatal neurons. Locally, it alters the nucleosomal response, and acts as a brake on chromatin remodeling and gene regulation. These original observations posit Arc as a major homeostatic modulator of molecular and behavioral responses to cocaine. Thus, modulating Arc levels may provide promising therapeutic approaches in drug addiction.

Keywords: Addiction, Arc, Cocaine, Extracellular-signal regulated kinase, ERK, Signaling, Striatum

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.05.025>

Long-term behavioral alterations induced by drugs of abuse rely on molecular adaptations within specific brain areas that belong to the reward circuitry (1). Within these structures, early changes in gene expression occur soon after cocaine exposure and set the stage for long-lasting modifications of neuronal activity and behavior (2). This early transcription is characterized by the induction of immediate early genes (IEGs), which encode either transcription factors, including c-Fos, and Zif268, regulating a second wave of genes, or effector proteins acting directly on cellular functions and homeostasis. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc), which belongs to this second category of IEGs, is rapidly induced by cocaine in cortical and striatal regions and cocaine-associated stimuli (3–9). However, the role of striatal

Arc in the development of neuronal and behavioral adaptations to cocaine is not known.

In the hippocampus, Arc is highly regulated by changes in neuronal activity, including high-frequency stimulation of the perforant path or electroconvulsive shock (10–12), thus positioning Arc as a reliable index of activity-dependent synaptic modifications. Because of its characteristic dendritic localization, where it controls glutamate alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor (AMPA) trafficking, synaptic strength, and long-term neuronal plasticity (13–17), much attention has been paid on Arc's functions at synapses. However recent studies indicate that it accumulates within the nucleus (18–20), where its functions remain controversial with some evidence in favor of its positive

impact on transcription (20), although others support a negative role of Arc on transcription (19).

Herein, we identified unexpected functions of Arc in response to cocaine. By studying the dendritic versus nuclear localization of Arc, we made the original observation that cocaine dramatically increases the expression of the protein in the nucleus of medium-sized spiny neurons (MSN), where it is localized within active zones of transcription. Using either overexpression of Arc *in vitro*, or its knockout *in vivo*, we show that Arc acts as a brake on gene regulation and long-term behavioral adaptations induced by cocaine. We conclude that the rapid and transient induction of Arc within the nucleus contributes to the dynamic of chromatin remodeling, and modulates behavioral responses to cocaine. This new facet of Arc's functions in the nucleus is likely to contribute to its homeostatic role within neurons.

METHODS AND MATERIALS

Animals and Behavior

Experiments were carried out on 8-week-old C57BL/6 mice, green fluorescent protein (GFP)-Arc knockin (KI) mice, and their wild-type (WT) littermates in accordance with the European Community guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals (86/609/EEC). Experiments were approved by the local ethic committee C2EA-05. Locomotor activity was measured as the number of interruptions by the mice of two adjacent beams in a circular corridor (Imetronic, Pessac, France) containing four infrared beams placed at every 90°. After 3 days of habituation, mice were subjected to the psychomotor sensitization protocol consisting of two cocaine injections separated by a one-week interval. Spontaneous activity was recorded for 60 min before the first cocaine injection and locomotor activity was measured for 1 hour. One week later, a second session was performed as described for the first cocaine injection. The conditioned place preference (CPP) was evaluated in a Plexiglas Y-Shaped apparatus (Imetronic) consisting of two compartments distinguished by different patterns on floors and walls, separated by a small neutral area. After a preconditioning during which mice were placed in the neutral area and allowed to explore both chambers, mice were treated for 6 days consecutively with alternate injections of cocaine (2.5 mg/kg) or saline during the so-called conditioning phase. The postconditioning phase was conducted exactly as the preconditioning phase with free access to both chambers. The CPP score was calculated as the difference between the time spent in cocaine-paired chamber during postconditioning minus preconditioning. See the [Supplement](#) for details on behavioral tests.

For measurements of messenger RNA (mRNA) levels, mice were sacrificed at the indicated time after cocaine or saline injections, and dissected striata were snap-frozen before being processed for quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction. For immunohistochemistry, mice were anesthetized and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde. See the [Supplement](#) for details.

Image Acquisition and Analysis

Immunoreactive cells were quantified in the dorsomedial striatum (DM) and nucleus accumbens shell (ShNAcc). Confocal images

(SP5; Leica, Wetzlar, Germany) were acquired bilaterally with a 40× oil immersion objective. Quantifications were performed using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD), taking into account the cells with immunofluorescence above a fixed threshold.

Nucleus Versus Neuropil Fluorescence Intensity Assessment.

Images were acquired as described above. Image analyses were performed in ImageJ using custom-built procedures. Nuclei are segmented by a binarization of the Hoechst signal. The fluorescence was measured inside and outside the nuclei masks to discriminate protein levels in neuropile or in the nucleus. The percent of positive nuclei represents the percent of nuclei above a threshold defined by user relative to the total number of nuclei.

Arc and Phospho-H3 Colocalization Within the Nucleus.

Confocal images were acquired in the DM bilaterally and images were taken with a 63× oil immersion objective, Zoom 4, pixel size: $x = 0.06 \mu\text{m}$, $y = 0.06 \mu\text{m}$, $z = 0.21 \mu\text{m}$. A deconvolution step was performed using the maximum likelihood estimation algorithm with Huygens 3.6 Software (Scientific Volume Imaging, Wetzlar, Germany) as described in Heck *et al.* (21). This treatment aims at limiting light diffraction, which increases the accuracy of colocalization analyzes. Three-dimensional segmentation of intranuclear Arc and phosphorylated histone-H3 (pH3) spots at high resolution has been computed thanks to the 3D ImageJ Suite plugins (22) as already described in Heck *et al.* (23). The local maxima inside the nucleus are detected and defined as seeds of the spots. Then an adaptive threshold is automatically calculated for each object based on their intensity by measuring the signal in concentric spheres created around the seeds. This allows detecting the contour in three dimensions automatically without a user-defined threshold (23). Colocalization of Arc and pH3 spots is automatically analyzed using the same plugins, and two spots with overlapping voxels are considered as colocalizing.

RESULTS

Cocaine-Induced Arc Expression in the Striatum Relies on Extracellular-Signal Regulated Kinase-Dependent Transcription and De Novo Protein Synthesis

To study the role of Arc in cocaine-induced cellular and molecular adaptations, we first established a precise time-window of its expression by acute cocaine in mice. Both Arc mRNA and protein were transiently induced by cocaine in the DM and the ShNAcc (Figure 1A) and core (not shown) with a peak from 30 to 60 minutes and a return to basal levels at 2 hours (Supplemental Figure S1A–D). This induction occurred downstream from both D_1 ($D1R$) and N -methyl-D-aspartate glutamate receptors (NMDAR) in MSN expressing c-Fos (Supplemental Figure S1E–G).

The signaling pathways that regulate Arc expression in the striatum in response to cocaine remain to be established. A protein synthesis inhibitor (anisomycin) was administered 30

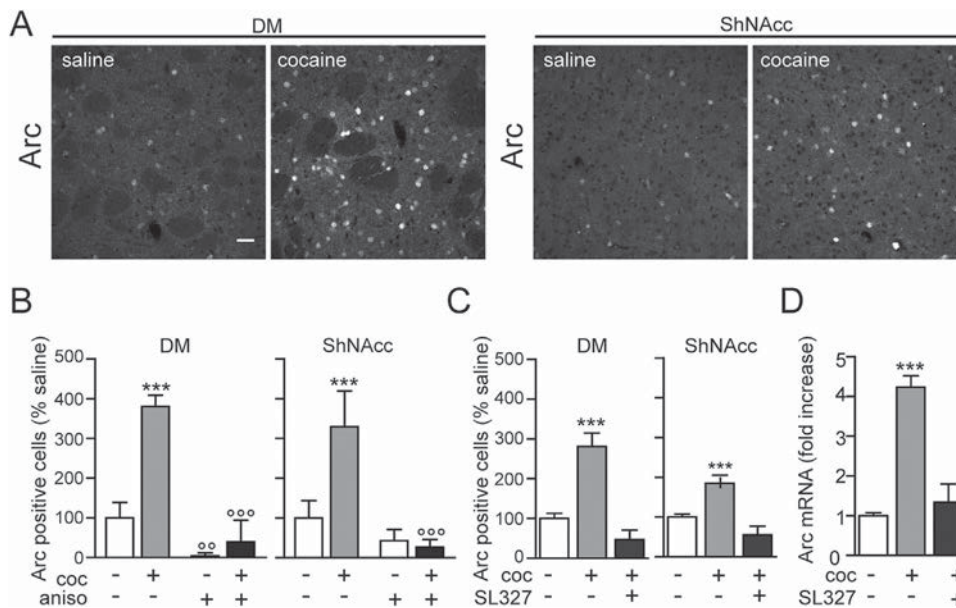


Figure 1. Cocaine-induced activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) expression in the striatum relies on extracellular-signal regulated kinase-dependent transcription and de novo protein synthesis. **(A)** Illustrative confocal images of the Arc staining in the dorsomedial striatum (DM) (left) and nucleus accumbens shell (ShNAcc) (right) from the areas delineated in Supplemental Figure S1B. Scale bar = 30 μ m. **(B)** Quantifications of Arc-positive cells in the DM and ShNAcc from mice treated with saline or cocaine (coc) for 1 hour with or without a 30-min pretreatment with 100 mg/kg of anisomycin (aniso); $n = 4$ –5 mice per group; two-way analysis of variance (ANOVA): interaction between treatment and pretreatment, $F_{1,12} = 45.47$, $p < .001$; effect of treatment, $F_{1,12} = 74.46$, $p < .001$; effect of pretreatment, $F_{1,12} = 142.64$, $p < .001$; followed by post hoc comparisons (Bonferroni's test). *** $p < .001$, cocaine group vs. saline group; °°° $p < .01$, °°° $p < .001$, vehicle vs. anisomycin pretreated animals. **(C)** Impact of a pretreatment with SL327 (50 mg/kg) on cocaine-induced Arc protein: $n = 8$ mice per group; one-way ANOVA in the DM: $F_{2,21} = 23.54$, $p < .001$; and in the ShNAcc, $F_{2,16} = 13.67$, $p < .001$; followed by post hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < .001$, saline or SL327 pretreated cocaine groups vs. saline pretreated saline group. **(D)** Arc messenger RNA: $n = 5$ mice per group; one-way ANOVA: $F_{2,12} = 32.47$, $p < .001$, followed by post hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < .001$, saline or SL327 pretreated cocaine groups vs. saline pretreated saline group and at 45 or 60 min cocaine postinjection, respectively.

minutes before cocaine and mice sacrificed 1 hour later. Cocaine-induced Arc expression was abolished by anisomycin in both the DM and ShNAcc (Figure 1B). Of note, Arc immunoreactivity was also strongly reduced by anisomycin in saline-treated mice, which is consistent with the short half-life of this IEG. A major pathway involved in cocaine-mediated long-term cellular adaptations is the extracellular-signal regulated kinase (ERK) cascade, which behaves as an integrator of D1R and NMDAR signaling (24–27). The administration of SL327, a selective inhibitor of the ERK pathway, before cocaine abolished the induction of Arc mRNA and proteins (Figure 1C, D). Altogether, these data show that Arc mRNA and proteins are transiently induced by acute cocaine in the striatum via an ERK-dependent de novo protein synthesis downstream from both D1R and NMDAR.

Cocaine Preferentially Increases Arc Expression in the Nucleus of Striatal Neurons

There are accumulating evidences that Arc induction in the dendritic compartment plays a key role in neuronal plasticity (13). However, whether it is induced locally in dendrites in response to cocaine remains unknown. Confocal imaging was performed to determine the impact of cocaine on the cellular localization of Arc. One hour after cocaine, Dil labeling of the dendritic shaft and spines (21) coupled to Arc staining showed that Arc-positive puncta were present in the dendrites and spines (Figure 2A). Nevertheless, a strong immunolabeling was also visible in the nucleus (visualized by Hoechst staining) of striatal neurons (Figure 2B). Arc cellular distribution within the nucleus and outside of it, in the soma and dendritic tree (referred to as neuropile; see Figure 2C), was analyzed using a

computer-based routine that was set up from confocal images of Arc and Hoechst costaining. The Arc signal that colocalized with Hoechst was subtracted from total Arc staining to obtain the neuropile staining (neuropile in Figure 2C). By contrast, the signal colocalized with Hoechst allowed the determination of Arc-positive nuclei (nuclei in Figure 2C). In the DM, total Arc (Figure 2D) and neuropile (Figure 2E) fluorescence intensity significantly increased 60 minutes postcocaine, and then returned to basal levels. Cocaine appeared to have a stronger effect on the nuclear expression of Arc (Figure 2F), which was increased as soon as 30 minutes postcocaine and further augmented at 60 minutes to return to basal levels within 2 hours. Of interest, in the ShNAcc, cocaine only increased the nuclear pool of Arc albeit fewer Arc positive cells were detected than in the DM (Supplemental Figure S2A–D). This indicates that Arc proteins accumulate earlier and preferentially in the nucleus when compared with soma and neuropile in response to cocaine.

Arc Is Localized at the Vicinity of Active Chromatin Markers in the Nucleus

We studied the precise localization of Arc within the nucleus at high magnification and observed a perfect exclusion of Arc from heterochromatin, which is characterized by puncta with a bright Hoechst staining (Figure 3A). Heterochromatin corresponds to inactive zone of transcription where DNA is highly packed into chromatin, a DNA/protein complex comprising histones and components of the transcriptional machinery. Activity-dependent remodeling of chromatin towards a permissive state for transcription involves posttranslational modifications of histones, also called nucleosomal response.

Ser10-Histone pH3 labeling, a marker of nucleosomal response is rapidly (30 minutes) activated downstream ERK and mitogen and stress-activated kinase 1 (MSK-1) in response to cocaine (28). The distribution of pH3 and Arc puncta was analyzed in 3D within the nuclei. At 30 minutes

postcocaine, Arc and pH3 strongly colocalized, with 70% of Arc-positive puncta colocalized with pH3 (Figure 3B, C). One hour postcocaine, these Arc/pH3 positive puncta were significantly reduced, with only 50% of colocalization (Figure 3D, E). Consistently, the comparative kinetics of these markers showed that both signals were detectable at 30 minutes postcocaine in the same cells (Figure 3F, left panel), whereas pH3 was decreased at 1 hour meanwhile Arc was maintained (Figure 3F, right panel), in accordance with the decrease of Arc/pH3- colocalization.

Unraveling the Role of Nuclear Arc in Striatal Neurons In Vitro

Because our data indicated that cocaine-induced Arc accumulation in the nucleus preferentially occurred within active zones of transcription in striatal neurons, we hypothesized that Arc could be a regulator of chromatin remodeling. To test this, we used striatal cultured neurons treated with glutamate (10 μ M), which induces increases in pH3 levels downstream from ERK-MSK-1 activation (29,30). The impact of Arc expression on these cellular events was studied after transfection of a complementary DNA encoding Arc fused to GFP, followed by live imaging. Under basal conditions, the GFP-Arc signal was detectable in all cellular compartments, with higher

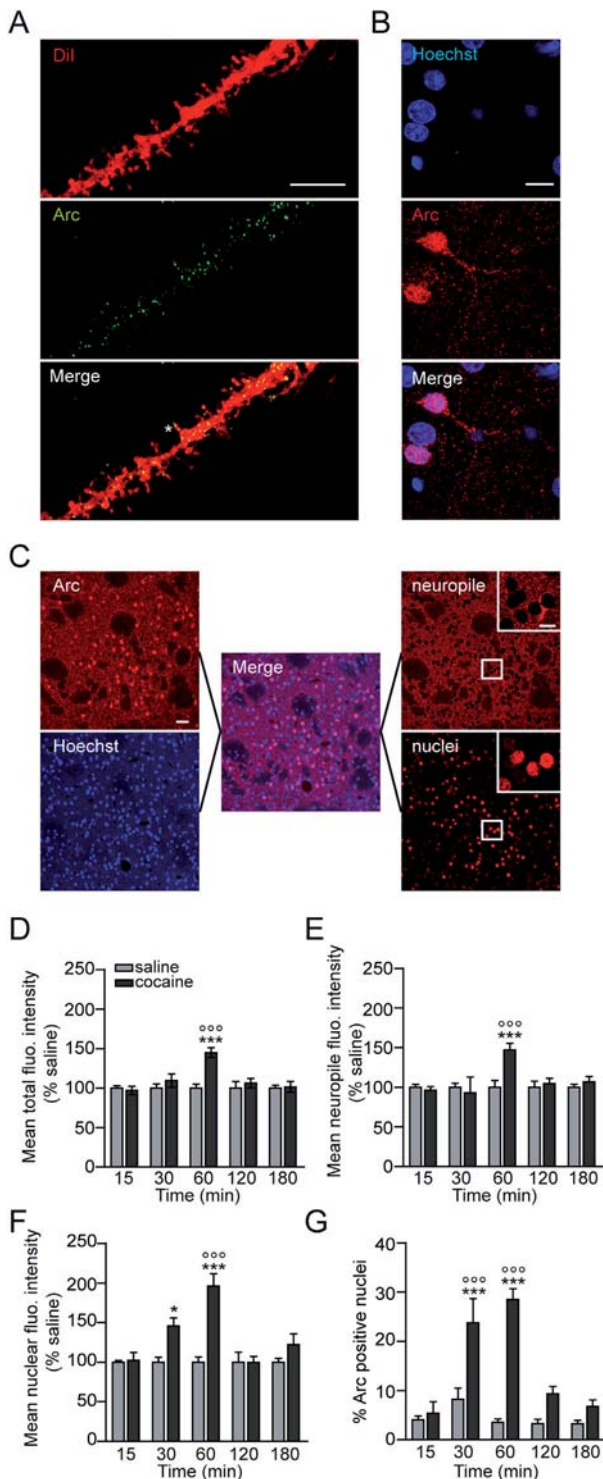


Figure 2. Cocaine induces a preferential increase of activity-related cytoskeleton-associated protein (Arc) in the nucleus of striatal neurons. **(A)** Maximum z projection of a stack of confocal images of a dendritic fragment visualized from a medium-sized spiny neurons stained with Dil (red) and the corresponding Arc labeling (green) detected 1 hour after cocaine administration. The merge of the two signals illustrates that Arc is expressed in the dendritic shaft and in dendritic spines (*) as expected. Scale bar = 10 μ m. **(B)** Single confocal plan from a striatal slice prepared 1 hour after a cocaine administration. Nuclei are counterstained with Hoechst (blue) and Arc is detected in red. The merge shows that Arc is expressed in somatic, dendritic, and nuclear compartments. Scale bar = 10 μ m. **(C)** Diagram summarizing the principle of the custom routine used to separate the Arc signal outside and within nuclei. A single confocal plan of Arc (red) and Hoechst (blue) signals is acquired after double staining from the same striatal slice (left panel). Scale bar = 30 μ m. After automatic detection of the nuclei, the corresponding signal is subtracted from the image acquired in the red channel. The resulting image corresponds to the Arc signal in all subcellular compartments except the nucleus (neuropile) as illustrated in the insert. Scale bar = 10 μ m. To isolate the Arc signal in the nucleus, the signal corresponding to the nucleus (detected in the blue channel) is kept in the red image. Based on this automated approach the mean intensity of the **(D)** total, **(E)** neuropile, and **(F)** nuclear Arc signals were measured in the dorsomedial striatum and expressed as percentage of increase relative to the corresponding saline condition at each time point. $n = 6-8$ mice per group; two-way analysis of variance (ANOVA): for total Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{5,54} = 3.56$, $p < .01$; effect of treatment, $F_{1,54} = 6.88$, $p < .05$; effect of time, $F_{5,54} = 4.65$, $p < .01$, for non-nuclear Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{5,55} = 3.18$, $p < .05$; effect of treatment, $F_{1,55} = 10.25$, $p < .01$; effect of time, $F_{5,55} = 3.18$, $p < .05$; for nuclear Arc signal: effect of interaction $F_{5,55} = 6.072$, $p < .001$; effect of treatment, $F_{1,55} = 20.25$, $p < .001$; effect of time, $F_{5,55} = 6.072$, $p < .001$ followed by post hoc Bonferroni comparisons. *** $p < .001$, * $p < .05$ cocaine group vs. saline group; $^{\circ\circ\circ}p < .001$, each time point vs. 15-min group. **(G)** The percentage of Arc-positive nuclei (i.e., above a fixed intensity threshold) has been calculated at each time point after saline or cocaine administration. $n = 6-8$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and time $F_{4,48} = 5.95$, $p < .001$; effect of treatment, $F_{1,48} = 34.01$, $p < .001$; effect of time, $F_{4,48} = 12.66$, $p < .001$, followed by post hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < .001$, cocaine group vs. saline group; $^{\circ\circ\circ}p < .001$, each time point vs. 15-min group.

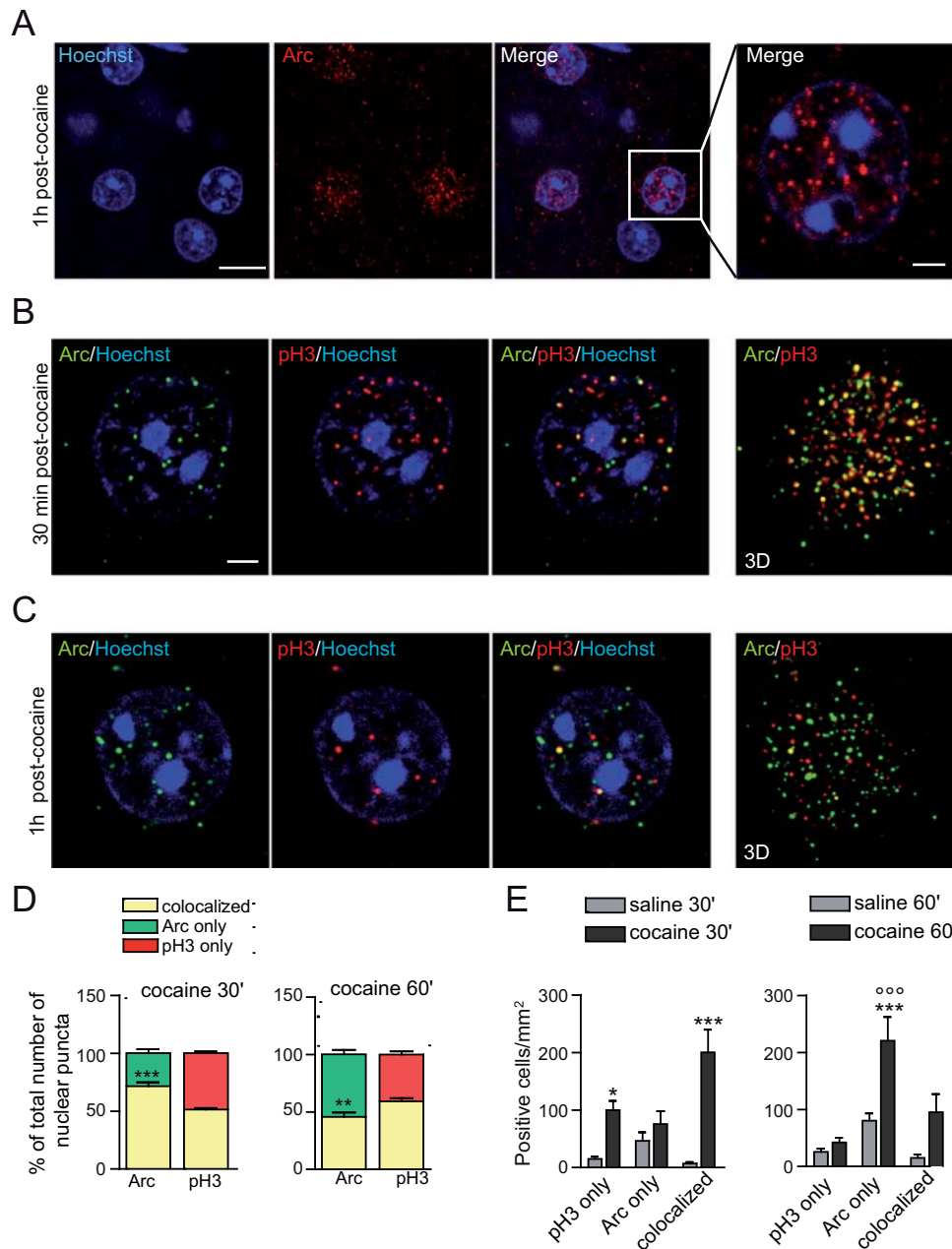


Figure 3. Within the nucleus activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) is excluded from heterochromatin and localized at the vicinity of an active chromatin marker. **(A)** Representative confocal images obtained from a striatal slice prepared from a mouse that has been sacrificed 1 hour postcocaine injection. Nuclei were counterstained with Hoechst (blue) and Arc is labeled in red. Scale bar = 10 μ m. Right panel is a close-up of the nucleus with double labeling. Scale bar = 2 μ m. The fusion of the two channels illustrates the exclusion of Arc puncta from nuclear domains with dense Hoechst labeling that corresponds to inactive zones of transcription (referred to as heterochromatin). Mice were sacrificed 30 min **(B)** or 1 hour **(C)** after saline or cocaine administration and confocal sections were acquired from slices counterstained with Hoechst (blue), Arc (green) and phospho-Ser¹⁰ histone H3 (pH3) (red). Scale bar = 2 μ m. Right panels are three-dimensional (3D) views of a pile of confocal Arc and pH3 images at these two time points postcocaine. **(D)** The proximity of Arc and pH3 was analyzed in 3D at 30 min postcocaine 5 (left graph); $n = 17$ nuclei per group; unpaired t test. $***p < .001$, Arc colocalized with pH3 vs. pH3 colocalized with Arc. **(E)** The number of cells that are immunoreactive for pH3 or Arc only and the ones that are positive for both Arc and pH3 was assessed by immunohistochemistry from mice that have been sacrificed 30 min (left) or 1 hour (right) after cocaine administration. $n = 4-5$ mice per group; unpaired t test for each marker. $**p < .01$, $*p < .05$, cocaine group vs. saline group.

levels in the soma (Figure 4A, left panel). Incubation with glutamate triggered a progressive accumulation of GFP-Arc in the nucleus (Figure 4A, B), thus rendering this in vitro model

ideally suited to evaluate the potential impact of Arc on glutamate-mediated increase in pH3. In response to glutamate, striatal neurons transfected with GFP alone displayed

increased pH3 labeling (Figure 4C [upper panel], D). This response was decreased in neurons expressing GFP-Arc (Figure 4C [lower panel], D), thus indicating that Arc overexpression alters the nucleosomal response and inhibits pH3. This effect was not due to an attenuation of glutamate-induced neuronal activity, as neither ERK1/2 phosphorylation nor its nuclear translocation was altered in the presence of GFP-Arc (Figure 4E, F).

Deletion of Arc Alters Heterochromatin Domains In Vivo

Our results support that Arc is a potential modulator of chromatin remodeling. To test this in vivo, we took advantage of the GFP-Arc KI mice in which the coding sequence of Arc has been replaced by the GFP gene (31). In homozygous KI mice, Arc is absent and GFP serves as a reporter of Arc promoter's activity. One hour postinjection, WT mice presented an induction of Arc in the DM (Supplemental Figure S3A, B) with no detectable levels of GFP (Supplemental Figure S3C, D). The mirror image was observed in homozygous GFP-Arc KI mice in which cocaine increased GFP but not Arc expression. To study the role of Arc on cocaine-induced chromatin remodeling, we focused on heterochromatin domains that can be detected through Hoechst staining (32). In WT mice, cocaine reduced the number of Hoechst-positive puncta in MSN (Figure 5A–C), along with the area occupied by these puncta in Arc-positive nuclei (Figure 5D, E), thus illustrating that cocaine induces DNA decompaction. In Arc-GFP KI mice a significant reduction of the number (Figure 5A–C) and size (Figure 5D, E) of Hoechst positive puncta were found in saline mice. The number of punctate was even further decreased after cocaine treatment (Figure 5B). This indicates that the removal of Arc alters the basal organization of chromatin, reduces DNA compaction and hence potentially sensitizes neuronal cells to favor transcription.

RNA polymerase II (RNA-Pol II) is a central player of the transcriptional machinery, which activity is influenced by chromatin organization (33). To evaluate the role of cocaine on RNA-Pol II activity, we used an antibody that recognizes the phosphorylated form of RNA-Pol II on its c-terminal domain (34). In WT mice, cocaine triggered a strong increase of RNA-Pol II phosphorylation (Figure 5F, G), which is consistent with the wide spectrum of activity-dependent gene induced by cocaine (2). By contrast, KI mice showed a constitutively high level of RNA-Pol II activity with no further increase detectable upon cocaine exposure (Figure 5F, G). This indicates that Arc has an unexpected broad inhibitory effect on chromatin remodeling and RNA-Pol II-mediated transcription.

Arc Deficiency Favors the Development of Cocaine-Induced Long-Term Behavioral Alterations

Chromatin remodeling is critical for behavior alterations induced by drugs of abuse (2). Hence, we studied the role of Arc in the development of long-lasting adaptations at the behavioral level in GFP-Arc mice. We first measured the basal locomotor activity of these mice and found that KI mice

displayed a significantly lower spontaneous locomotion than WT littermates (Figure 6A, B). Mice were then subjected to a protocol of psychomotor sensitization induced by two injections of cocaine at 15 mg/kg with a 1-week interval, which triggers a robust psychomotor sensitization in WT mice (25) (Figure 6C). After the first administration of cocaine (15 mg/kg), the acute locomotor response increased in both genotypes with a higher response in KI mice (Figure 6D). After the second injection, both groups of mice showed a behavioral sensitization with a significantly higher locomotion measured in KI mice (Figure 6D). We then used a lower dose of cocaine (7.5 mg/kg), which triggers a moderate behavioral sensitization in WT mice and may unmask a facilitating effect of Arc deficiency on the development of psychomotor sensitization. In these conditions, KI mice displayed an acute response that was undistinguishable from WT mice, but their sensitized response to the second injection was significantly greater than in WT mice (Figure 6E). These data indicate that the absence of Arc favors the development of psychomotor sensitization. At this low dose of cocaine, pH3 immunoreactivity was not significantly increased, whatever the genotypes (Supplemental Figure S3F). However, the expression of c-Fos, which is known to facilitate psychomotor sensitization (34), was sensitized at this dose, with a stronger increase in KI when compared with WT mice (Figure 6F). This may be due to the observed decrease of DNA compaction in these KI mice, which is further decrease upon exposure to 7.5 mg/kg of cocaine (Figure 6G). The impact of Arc deficiency on behavioral alteration induced by cocaine, was further assessed in the CPP paradigm, which measures the ability of mice to associate the rewarding properties of the drug with environmental cues. With a low dose of 2.5 mg/kg of cocaine, which does not trigger CPP in WT mice, KI mice displayed a clear preference for cocaine-paired chamber in KI mice (Figure 6H, I). Altogether, these data demonstrate that Arc deficiency exacerbates molecular and behavioral alterations induced by cocaine.

DISCUSSION

The present work demonstrates a nuclear accumulation of Arc in MSN in response to cocaine. Arc was restricted to active zones of transcription where it colocalized with pH3. In vitro, Arc overexpression in cultured striatal neurons altered glutamate-induced pH3, while sparing activation of ERK. In vivo, mice deficient for Arc showed a decrease of heterochromatin domains associated to a high RNA-Pol II activity. These mice showed an exacerbated psychomotor sensitization and CPP induced by low doses of cocaine.

With regard to signaling cascades driving Arc expression, a D1R antagonist was previously shown to abolish Arc induction by acute cocaine (3). Herein, we confirm this observation and further demonstrate that Arc induction also strictly depends on NMDAR stimulation. Cocaine-mediated expression of Arc is thus at the crossroad of dopamine and glutamate inputs converging onto MSN. Consistently, Arc transcription and translation occurred downstream from ERK activity, which behaves as a key integrator of D1R and NMDAR signaling in response to cocaine (24–27,36). The promoter of Arc comprises

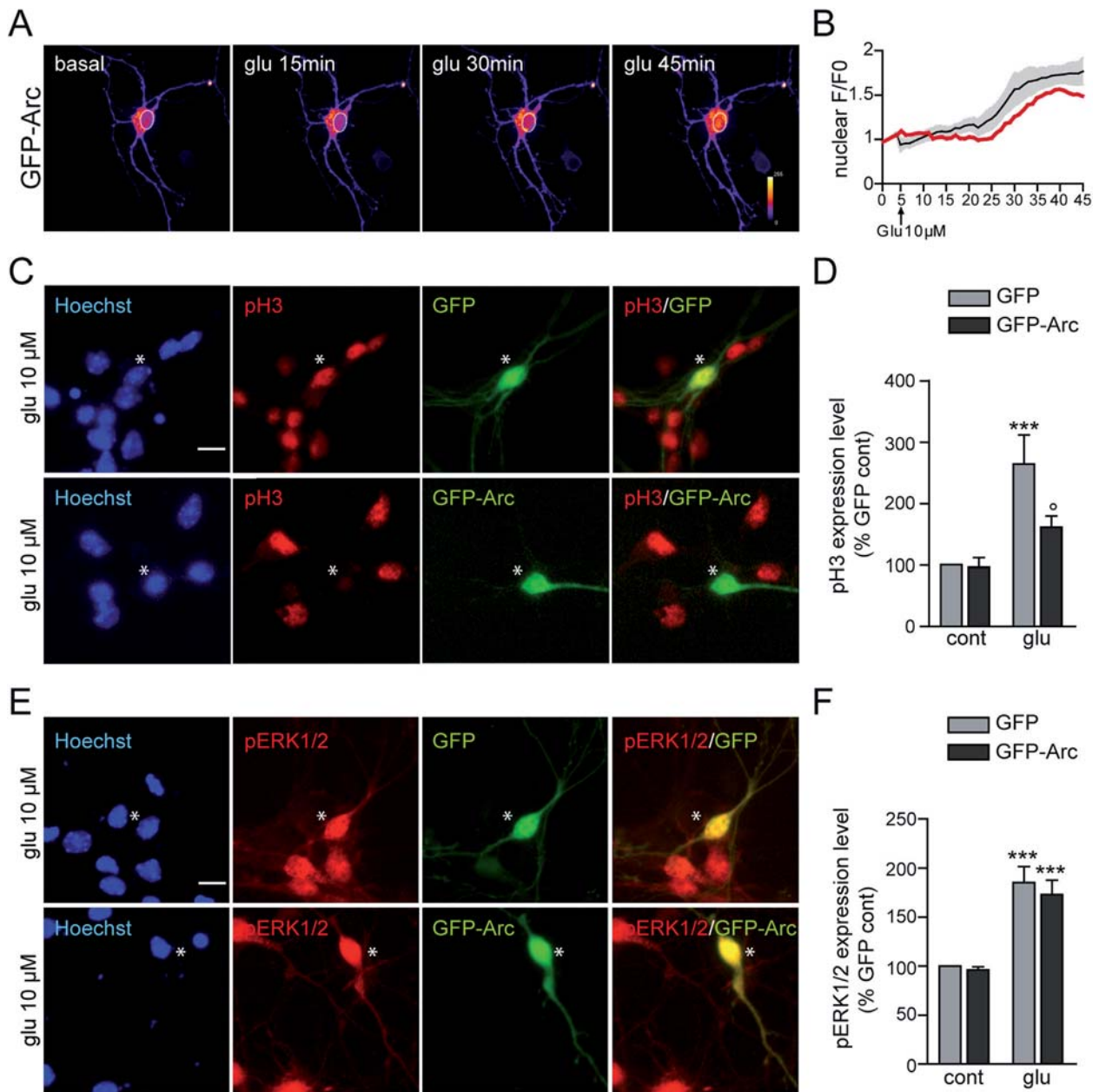
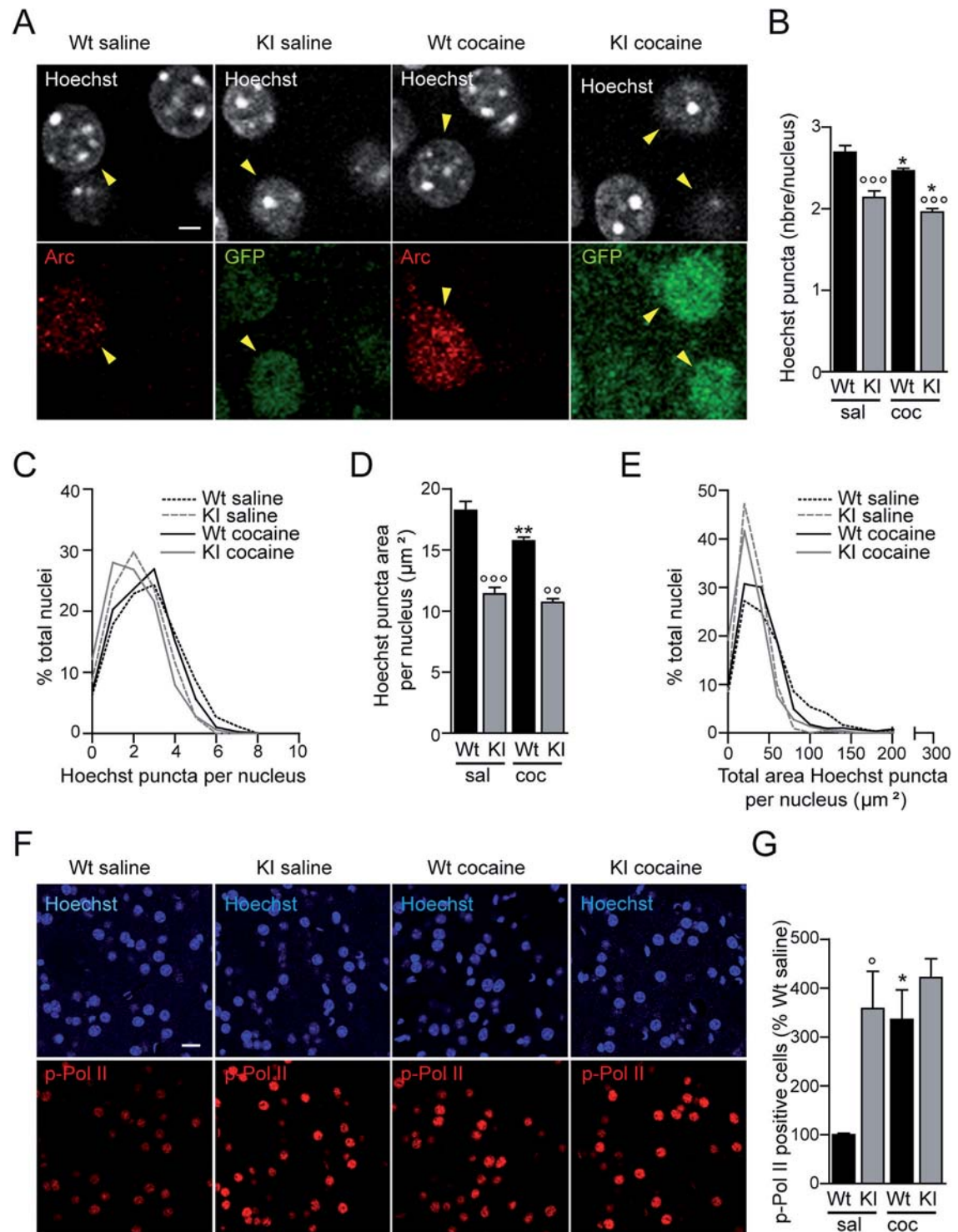


Figure 4. Overexpression of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) alters histone H3, but not extracellular-signal regulated kinase (ERK) 1/2, phosphorylation in vitro. **(A)** Cultured striatal neurons were transfected with complementary DNA encoding Arc fused to green fluorescent protein (GFP). Live imaging was performed and images were acquired before (basal) and at the indicated time point after application of glutamate 10 μ M. **(B)** Quantifications of the nuclear GFP-Arc fluorescence profile overtime (F/F0; error bars are SEM) within the nucleus (white dotted line). The black curve is the average intensity of the nuclear GFP-Arc from 4 transfected neurons including the one shown in **(A)**, represented by the red curve. Note the progressive nuclear accumulation of the GFP-Arc signal in response to glutamate. **(C)** Shown are representative pictures of neurons transfected with GFP (top panels) or GFP-Arc (bottom panels), treated with glutamate (glu) (10 μ M) for 30 minutes to induce histone Ser¹⁰-H3 phosphorylation (pH3). Nuclei are counterstained with Hoechst (blue), pH3 is red, GFP in green and the merge of pH3 and GFP is shown on the right panels. Scale bar = 10 μ m. **(D)** Quantifications of the intensity of the pH3 labeling in transfected cells stimulated or not with glutamate. Results are expressed as percentage increase when compared with control neurons transfected with GFP. $n = 3-4$ independent experiments per group; two-way analysis of variance (ANOVA): interaction between treatment and transfection, $F_{1,16} = 3.48$, not significant (ns); effect of treatment, $F_{1,16} = 18.54$, $p < .001$; effect of transfection, $F_{1,16} = 4.01$, ns; followed by post hoc comparisons (Bonferroni). $***p < .001$, control group (cont) vs. glu group; $^{\circ}p < .05$, GFP vs. GFP-Arc plasmid. **(E)** Illustrations of neurons transfected as described in **(B)** and treated with glu for 10 min to induce the phosphorylation of ERK1/2 (pERK1/2) (red). Scale bar = 10 μ m. **(F)** Analyses of the intensity of the pERK1/2 labeling in transfected cells stimulated or not with glutamate. $n = 3-4$ independent experiments per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and transfection, $F_{1,12} = 0.15$, ns; effect of treatment, $F_{1,12} = 54.94$, $p < .001$; effect of transfection, $F_{1,12} = 0.52$, ns; followed by post hoc comparisons (Bonferroni). $***p < .001$, cont group vs. glu group.



two serum response element (SRE) DNA regulatory elements that binds a ternary complex formed by the transcription factor Elk-1 and two molecules of serum response factor. Mutation of one of these SRE sites blunted the late phase of cerebellar long-term depression (37), indicating that SRE-dependent transcription of Arc is critical for neuronal plasticity. We previously showed that the phosphorylation of Elk-1 by ERK, which is necessary and sufficient to trigger SRE-dependent transcription (38), was involved in cocaine-mediated Arc induction (39). Our data thus support that cocaine-mediated Arc transcription critically relies on the ERK/Elk-1 signaling module.

Herein, we demonstrated that Arc accumulates in the nucleus of MSN in vivo in response to cocaine. Arc has been detected in the nucleus of cultured hippocampal neurons (18) where it translocates in an activity-dependent manner (19). Accordingly, we also observed an activity-dependent nuclear accumulation of Arc by live imaging of cultured MSN. The role of this nuclear pool of Arc remained controversial and emerged only recently, although its functions at synaptic sites have been extensively explored. Initial observations indicated that changes in neuronal activity increased Arc in both nuclei and soma, but Arc was enriched in dendrites where it coprecipitates with F-actin (40,41). Since then, most of its functions in neuronal plasticity have been described at the level of synapses and involve regulation of cytoskeleton dynamics, AMPAR trafficking and synaptic strength (14–17). Although cocaine increases dendritic Arc expression in the DM, we surprisingly found that the major impact of cocaine on Arc expression occurred in the nucleus. This was even clearer in the ShNacc where nuclear Arc expression was increased in the absence of change in dendrites. With respect to its biochemical properties and a lack of DNA interaction consensus sequence, Arc is not likely to bind DNA or act as a transcription factor in the nucleus (40). What is known so far is that Arc binds to nuclear spectrin and promyelocytic leukemia (PML) bodies (19). PML bodies regulate transcription, notably by controlling the availability and histone acetyl transferase activity of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein (CREB)-binding protein (CBP) and p300 (42). In cultured hippocampal neurons, increased neuronal activity triggers a nuclear localization of Arc within PML bodies, which decreases CBP-mediated transcription of GluA1 AMPAR subunit (19). By contrast, by interacting with the histone acetyl transferase Tip60 at PML bodies Arc increases the acetylation of H4K12 (20), a histone mark associated with increased transcription and learning and memory. We report here that Arc colocalizes with pH3, within active zones of transcription in the nucleus of MSN after exposure to cocaine. In MSN, this phosphorylation event involves the nuclear kinase MSK-1

downstream from ERK and is critical for gene regulation at specific loci (28,29). Cocaine-induced PH3 in vivo also results from DARPP32-induced inhibition of phosphatases (43). Arc overexpression in cultured MSN significantly decreased glutamate-induced pH3, thus supporting that Arc plays a negative retrocontrol on transcription. This negative feedback is unlikely, due to an effect of Arc overexpression on AMPAR trafficking because ERK activation and nuclear translocation, which involve glutamate-induced endocytosis of AMPAR (44), were preserved. By contrast, Arc slightly inhibited glutamate-induced MSK-1 activation in the nucleus (Supplemental Figure S2E). However, this inhibitory effect was weaker than the decrease of pH3 itself, and independent on DARPP32 phosphorylation and nuclear translocation (data not shown) supporting that additional mechanisms are engaged by Arc to alter pH3. Given the tight relation between Arc and actin dynamics in the cytoplasm (41), a tentative explanation could be that Arc also interacts with nuclear actin and as such controls the cytoarchitecture of the nucleus and hence chromatin remodeling. Such mechanisms could also account for the altered accessibility of MSK-1 to ERK-mediated phosphorylation in the nucleus.

In vivo, acute cocaine triggered a decrease in heterochromatin domains in the nucleus of WT MSN. Persistent decreases in heterochromatin also occur after repeated cocaine, which suggests a potential role of heterochromatin organization in the long-term effects of cocaine (32). The decompaction of DNA induced by cocaine in WT mice was associated with an increased RNA-Pol II activity, which is in agreement with the boost of activity-dependent transcription induced by cocaine (1,2). In both saline- and cocaine-treated KI mice, we found a significant decrease of heterochromatin domains, thereby indicating a relaxing of chromatin in the absence of Arc. Upon cocaine administration, the constitutive decrease of heterochromatin was combined with high levels of RNA-Pol II activity, an intracellular event that favors transcription. Altogether, these data support that Arc exerts a negative retro-control on transcription, by limiting chromatin decompaction and RNA-Pol II activity. Such impact of Arc on these nuclear events may have important implications for its well-known homeostatic functions.

Arc expression is correlated to neuronal processing underlying learning and memory storage (45,46) and Arc-deficient mice have severe deficit in the consolidation of long-term synaptic plasticity and memory (47). In the striatum, Arc induction is associated with early phase of learning as well as inversion phase during reversal learning, suggesting a role in striatal plasticity underlying learning acquisition (48,49). In the context of addiction, Arc is increased by cocaine (3–5) or upon re-exposure to a context previously associated with the

Figure 5. Deletion of activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) alters heterochromatin domains and promotes the phosphorylation of polymerase II in vivo. (A) Homozygous knockin green fluorescent protein (GFP)-Arc (KI) and corresponding wild-type (WT) mice were treated with saline (sal) or cocaine (coc) (20 mg/kg) and sacrificed 1 hour postinjection. Shown are representative confocal images acquired in the dorsomedial striatum of nuclei counterstained with Hoechst and immunolabeling of Arc or GFP performed from WT and KI mice, respectively. Arrowheads indicate the nuclei that were used for subsequent analyses in which low (saline-treated mice) or high (cocaine-treated mice) levels of Arc or GFP were detectable. Scale bar = 2 μ m. The number of Hoechst-positive puncta per nuclei was analyzed (B) as well as the distribution (C) of the different categories of nuclei according to the number of Hoechst puncta they display. $n = 800$ – 1000 neurons per group; Mann-Whitney U test between each group. $^{*}p < .05$, saline group vs. cocaine group; $^{***}p < .001$, WT vs. KI. The total area corresponding to Hoechst-positive puncta within nuclei (in μ m²) was measured (D) as well as the distribution of nuclei (E) depending on the area occupied by heterochromatin domains. 800–1000 neurons per group; Mann-Whitney U test between each group. $^{**}p < .01$, saline group vs. cocaine group; $^{***}p < .001$, $^{**}p < .01$, WT vs. KI. (F) WT and KI mice were treated with saline or cocaine and sacrificed 1 hour later to study the phosphorylation of the polymerase II on the Ser² of its C-terminal domain (p-Pol II) by immunohistochemistry. Scale bar = 15 μ m. (G) Quantifications p-Pol II positive cells; $n = 3$ – 4 mice per group; two-way analysis of variance: interaction between treatment and genotype, $F_{1,11} = 2.27$, not significant; effect of treatment, $F_{1,11} = 6.88$, $p < .05$; effect of genotype, $F_{1,11} = 9.12$, $p < .05$; followed by post hoc comparisons (Bonferroni). $^{*}p < .05$, saline group vs. cocaine group; $^{*}p < .05$, WT vs. KI.

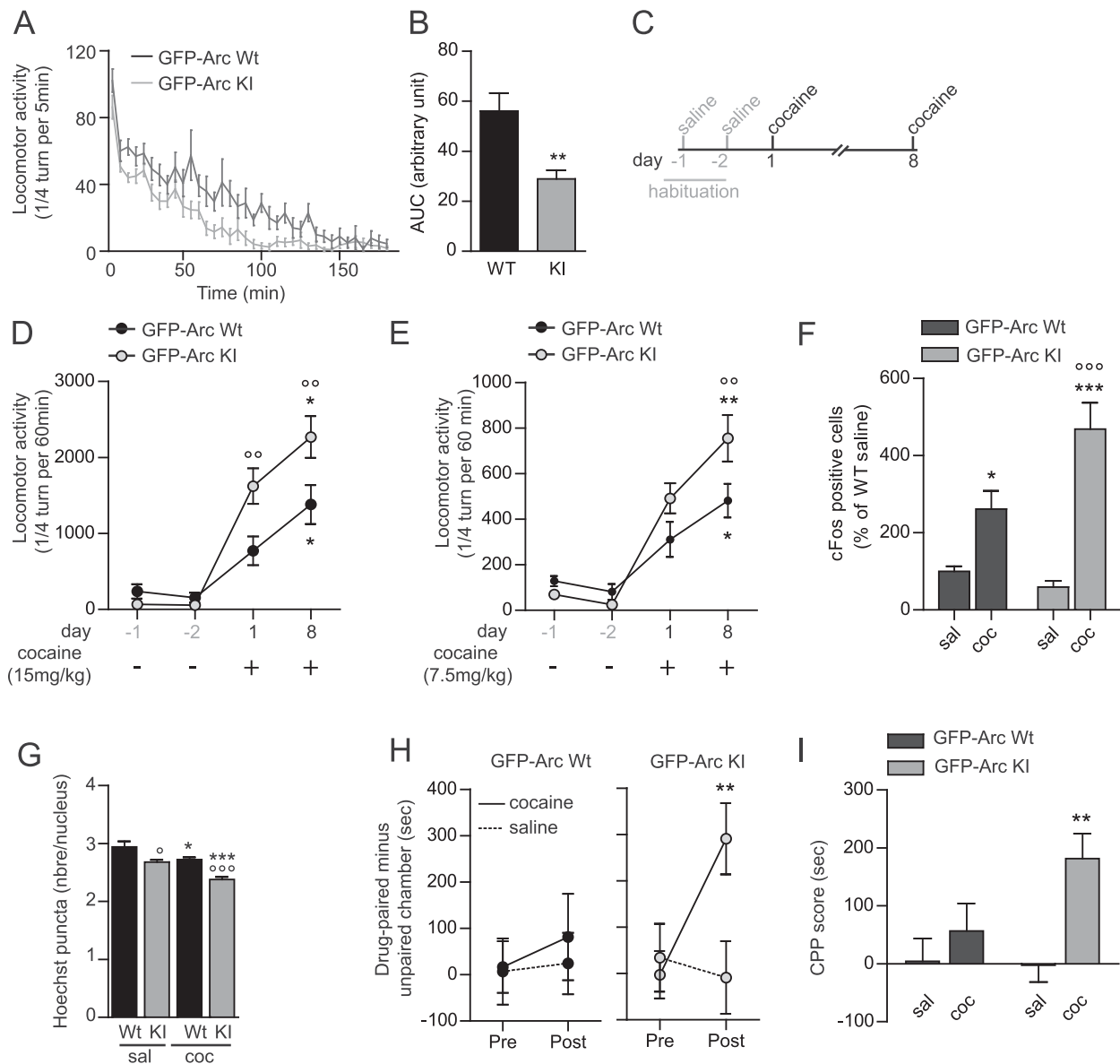


Figure 6. Activity-regulated cytoskeleton-associated protein (Arc) deficiency augments behavioral sensitization to low doses of cocaine. **(A)** Time course of basal locomotor activity of green fluorescent protein (GFP)-Arc wild-type (WT) (black), and homozygous knock-out (KI) (gray) mice and **(B)** corresponding area under the curve (AUC) in arbitrary unit. $n = 11$ mice per group; unpaired t test. $^{**}p < .01$, WT vs. KI. **(C)** Diagram depicting the psychomotor sensitization protocol induced by two injections in which mice received a first injection of cocaine after a period of habituation and a second injection a week later of the same dose of cocaine. Mice of the two genotypes have been subjected to a protocol of psychomotor sensitization induced by two injections of cocaine at 15 mg/kg **(D)** or 7.5 mg/kg **(E)**. $n = 11$ mice per group; two-way analysis of variance (ANOVA) (repeated measure over time for matching data): for 15 mg/kg: interaction between genotype and time, $F_{3,54} = 6.76$, $p < .001$; effect of genotype, $F_{1,54} = 5.62$, $p < .05$; effect of time, $F_{3,54} = 56.25$, $p < .001$; for 7.5 mg/kg: interaction between genotype and time, $F_{3,54} = 5.53$, $p < .01$; effect of genotype, $F_{1,54} = 2.29$, not significant (ns); effect of time, $F_{3,54} = 54.94$, $p < .01$ followed by post hoc Bonferroni comparisons. $^{*}p < .05$; $^{**}p < .01$, day 1 vs. day 8 cocaine injection; $^{***}p < .001$, WT vs. KI. **(F)** Homozygous KI mice and corresponding WT littermates treated with saline (sal) or cocaine (coc) (7.5 mg/kg) were sacrificed 30 minutes postinjection and the number of c-Fos positive cells were analyzed in the striatum. Data expressed as percent of the mean of the WT saline group. $n = 4-5$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and genotype, $F_{1,14} = 8.97$, $p < .01$; effect of treatment, $F_{1,14} = 47.59$, $p < .001$; effect of genotype, $F_{1,14} = 4.03$, ns; followed by post hoc comparisons (Bonferroni). $^{*}p < .05$; $^{***}p < .001$, saline vs. cocaine-treated group; $^{***}p < .001$, WT vs. KI. **(G)** DNA compaction state was assessed in these animals by analyzing the number of Hoechst-positive puncta per nuclei according to the number of Hoechst puncta they display. $n = 800-1000$ neurons per group; Mann-Whitney U test between each group. $^{*}p < .05$, $^{***}p < .001$, saline group vs. cocaine-treated group; $^{*}p < .05$; $^{***}p < .001$, WT vs. KI. **(H, I)** Conditioned place preference (CPP) induced by cocaine ($n = 11$ mice per group) was performed from WT or homozygous KI mice in a three-pairing CPP paradigm. **(H)** Initial preference during preconditioning session (pre) and place preference on the test session (post) in WT and homozygous KI mice were analyzed using two-way ANOVA (repeated measure over time for matching data): for WT mice: interaction between genotype and time, $F_{1,44} = 0.11$, ns; effect of time, $F_{1,44} = 0.21$, ns; effect of treatment, $F_{1,44} = 0.32$, ns; for KI mice: interaction between genotype and time, $F_{1,42} = 5.72$, $p < .05$; effect of time, $F_{1,42} = 3.49$, ns; effect of treatment, $F_{1,42} = 3.18$, ns; followed by post hoc comparison (Bonferroni). $^{**}p < .01$, cocaine vs. saline group. **(I)** The CPP score (time spent in cocaine-paired chamber during postconditioning minus preconditioning) was analyzed using two-way ANOVA (repeated measure over time for matching data): interaction between genotype and time, $F_{1,43} = 2.59$, ns; effect of time, $F_{1,43} = 2.09$, ns; effect of treatment, $F_{1,43} = 8.33$, $p < .01$; followed by post hoc comparison (Bonferroni). $^{**}p < .01$, cocaine vs. saline group.

drug (6,7). In rats trained to self-administer cocaine, the local inhibition of Arc in the dorsolateral part of the striatum did not affect cocaine seeking but blocked extinction of this behavior (9), a result in agreement with the increased Arc expression during reversal learning and changes of rules (49).

To the best of our knowledge, no causal link has been established between Arc expression and the development of long-term behavioral alterations to cocaine. Arc induction has been correlated to the level of psychomotor sensitization and the rate of cocaine delivery (50). With regard to self-administration, individuals considered as vulnerable showed lower Arc mRNA expression in the DM, whereas resilient rats displayed higher levels (51). Accordingly, we showed here that psychomotor sensitization by low doses of cocaine was higher in KI mice when compared with their WT littermate, revealing a presensitization to the drug in the absence of Arc. This effect was unlikely due to global changes in excitability since KI mice did not show any increase in striatal GluA1 mRNA (Supplemental Figure S3E). By contrast, the expression of c-Fos that facilitates for psychomotor sensitization (35), was significantly higher in KI mice when compared with WT littermate at these low doses of cocaine. Furthermore, at doses of cocaine that did not induce CPP in WT animals, KI mice displayed a clear preference for the cocaine-paired chamber. Altogether these data are in agreement with an inhibitory role of Arc on chromatin decompaction and RNA-Pol II activity at specific loci. These observations strongly support that, upon cocaine administration, the rapid induction of Arc acts as a brake on chromatin remodeling and could contribute to the behavioral homeostatic response to cocaine by limiting activity-dependent transcription of genes. These new facets of Arc's functions suggest that modulating levels of Arc may provide interesting therapeutic approaches in drug addiction.

ACKNOWLEDGMENTS AND DISCLOSURES

This work was supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Pierre et Marie Curie Paris VI (UPMC), Agence Nationale pour la Recherche (ANR), Fondation Jérôme Lejeune, Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Bio-Psy labex cluster of excellence and the Ecole des Neurosciences de Paris (ENP). MS and MDS were the recipients of a four-year fellowship from the labex Bio-Psy. ESJ was the recipient of fellowship from the ENP network. LM had a postdoctoral fellowship from the Association Française contre la Myopathie (AFM).

We wish to thank the imaging and animal house facilities of the Institute of Biology Paris Seine as well as Dr. Nicolas Heck for his helpful advice on confocal imaging and Dr. Antoine Besnard for instrumental comments on immunohistochemistry experiments. Authors are also grateful to present and past members of the laboratory for their technical help with the primary cultures, for helpful discussions and critical reading of the manuscript. We also warmly thank CP for all these years spent handling brain slices for all the members of the laboratory with a lot of dexterity and achievement.

The authors report no biomedical financial interests or conflicts of interest.

ARTICLE INFORMATION

From the INSERM, UMR-S 1130, Neuroscience Paris Seine, Institute of Biology Paris Seine; and Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UM CR18, Neuroscience Paris Seine, Paris, France.

JC and PV contributed equally to this work.

Address correspondence to Peter Vanhoutte, Ph.D., Université Pierre et Marie Curie Paris VI, CNRS/UMR 8246, INSERM/UMR-S 1130, Paris, 75005 France; E-mail: peter.vanhoutte@upmc.fr.

Received Dec 21, 2015; revised May 17, 2016; accepted May 31, 2016.

Supplementary material cited in this article is available online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2016.05.025>.

REFERENCES

1. Lüscher C, Malenka RC (2011): Drug-evoked synaptic plasticity in addiction : from molecular changes to circuit remodeling. *Neuron* 69: 650–663.
2. Robison AJ, Nestler EJ (2011): Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat Rev Neuroscience* 12:623–637.
3. Fosnaugh JS, Bhat RV, Yamagata K, Worley PF, Baraban JM (1995): Activation of arc, a putative “effector” immediate early gene, by cocaine in rat brain. *J Neurochem* 64:2377–2380.
4. Fumagalli F, Bedogni F, Frasca A, Di Pasquale L, Racagni G, *et al.* (2006): Cortico-striatal up-regulation of activity-regulated cytoskeletal-associated protein expression after repeated exposure to cocaine. *Mol Pharmacol* 70:1726–1734.
5. Fumagalli F, Franchi C, Caffino L, Racagni G, Riva MA, Cervo L (2009): Single session of cocaine intravenous self-administration shapes goal-oriented behaviours and up-regulates Arc mRNA levels in rat medial prefrontal cortex. *Int J Neuropsychopharmacol* 12:423–429.
6. Hearing MC, See RE, McGinty JF (2008): Relapse to cocaine-seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the striatum and cerebral cortex of rats following short or long periods of abstinence. *Brain Struct Funct* 213:215–227.
7. Hearing MC, Miller SW, See RE, McGinty JF (2008): Relapse to cocaine seeking increases activity-regulated gene expression differentially in the prefrontal cortex of abstinent rats. *Psychopharmacology (Berl)* 198:77–91.
8. Zavala AR, Osredkar T, Joyce JN, Neiswander JL (2008): Upregulation of Arc mRNA expression in the prefrontal cortex following cue-induced reinstatement of extinguished cocaine-seeking behavior. *Synapse* 62:421–431.
9. Hearing MC, Schwendt M, McGinty JF (2011): Suppression of activity-regulated cytoskeleton-associated gene expression in the dorsal striatum attenuates extinction of cocaine-seeking. *Int J Neuropsychopharmacol* 14:784–795.
10. Link W, Konietzko U, Kauselmann G, Krug M, Schwanke B, Frey U, *et al.* (1995): Somatodendritic expression of an immediate early gene is regulated by synaptic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:573–578.
11. Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF (1998): Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron* 21: 741–751.
12. Larsen MH, Olesen M, Woldbye DP, Hay-Schmidt A, Hansen HH, Ronn LC, *et al.* (2005): Regulation of activity-regulated cytoskeleton protein (Arc) mRNA after acute and chronic electroconvulsive stimulation in the rat. *Brain Res* 1064:161–165.
13. Bramham CR, Alme MN, Bittins M, Kuipers SD, Nair RR, Pai B, *et al.* (2010): The Arc of synaptic memory. *Exp Brain Res* 200:125–140.
14. Chowdhury S, Shepherd JD, Okuno H, Lyford G, Petralia RS, Plath N, *et al.* (2006): Arc/Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron* 52:445–459.
15. Shepherd JD, Rumbaugh G, Wu J, Chowdhury S, Plath N, Kuhl D, *et al.* (2006): Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron* 52:475–484.
16. Guzowski F, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, *et al.* (2000): Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993–4001.
17. Waung MW, Pfeiffer BE, Nosyreva ED, Ronesi JA, Huber KM (2008): Rapid translation of Arc/Arg3.1 selectively mediates mGluR-dependent LTD through persistent increases in AMPAR endocytosis rate. *Neuron* 59:84–97.

18. Bloomer WA, VanDongen HM, VanDongen AM (2007): Activity-regulated cytoskeleton-associated protein Arc/Arg3.1 binds to spectrin and associates with nuclear promyelocytic leukemia (PML) bodies. *Brain Res* 1153:20–33.
19. Korb E, Wilkinson CL, Delgado RN, Lovero KL, Finkbeiner S (2013): Arc in the nucleus regulates PML-dependent GluA1 transcription and homeostatic plasticity. *Nat Neurosci* 16:874–883.
20. Wee CI, Teo S, Oey NE, Wright GD, VanDongen HMA, *et al.* (2014): Nuclear Arc interacts with histone acetyltransferase tip60 to modify H4K12 acetylation. *eNeuro* <http://dx.doi.org/10.1523/ENEURO.0019-14.2014>.
21. Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012): A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines, application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct* 217:421–434.
22. Ollion J, Cochenne J, Loll F, Escudé C, Boudier T (2013): TANGO: A generic tool for high-throughput 3D Image analysis for studying nuclear organization. *Bioinformatics* 29:1840–1841.
23. Heck N, Dos Santos M, Amairi B, Salery M, Besnard A, Herzog E, *et al.* (2014): A new automated 3D detection of synaptic contacts reveals the formation of cortico-striatal synapses upon cocaine treatment in vivo. *Brain Struct Funct* 220:2953–2956.
24. Pascoli V, Besnard A, Hervé D, Pagès C, Heck N, Girault JA, *et al.* (2011): Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry* 69:325–336.
25. Cahill E, Pascoli V, Trifilieff P, Savoldi D, Kappès V, Lüscher C, *et al.* (2014): D1R/GluN1 complexes in the striatum integrate dopamine and glutamate signaling to control synaptic plasticity and cocaine-induced responses. *Mol Psychiatry* 19:1295–1304.
26. Pascoli V, Cahill E, Bellivier F, Caboche J, Vanhoutte P (2014): Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 activation by addictive drugs: a signal towards pathological adaptation. *Biol Psychiatry* 76:917–926.
27. Cahill E, Salery M, Vanhoutte P, Caboche J (2014): Convergence of dopamine and glutamate signaling onto striatal ERK activation in response to drugs of abuse.
28. Bami-Cherrier K, Valjent E, Hervé D, Darragh J, Corvol JC, Pagès C, *et al.* (2005): Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1 deficient mice. *J Neurosci* 25:11444–11454.
29. Bami-Cherrier K, Lavour J, Pagès C, Arthur JS, Caboche J (2007): Glutamate induces histone H3 phosphorylation but not acetylation in striatal neurons: role of mitogen- and stress-activated kinase-1. *J Neurochem* 101:697–708.
30. Lavour J, Bernard F, Trifilieff P, Pascoli V, Kappès V, *et al.* (2007): A TAT-DEF-Elk-1 peptide regulates the cytonuclear trafficking of Elk-1 and controls cytoskeleton dynamics. *J Neurosci* 27:14448–14458.
31. Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, *et al.* (2006): In vivo two-photon reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126:389–402.
32. Maze I, Feng J, Wilkinson MB, Sun H, Shen L, Nestler EJ (2011): Cocaine dynamically regulates heterochromatin and repetitive element unsilencing in the nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:3035–3040.
33. Sims RJ 3rd, Mandal SS, Reinberg D (2004): Recent highlights of RNA-polymerase-II-mediated transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16:263–271.
34. Meinhart A, Kamenski T, Hoepfner S, Baumli S, Cramer P (2005): A structural perspective of CTD function. *Genes Dev* 19:1401–14015.
35. Zhang J, Zhang L, Jiao H, Zhang Q, Zhang D, Lou D, *et al.* (2006): c-Fos facilitate the acquisition and extinction of cocaine-induced persistent changes. *J. Neurosci.* 26:13287–13296.
36. Girault JA, Valjent E, Caboche J, Hervé D (2007): ERK2: a logical and gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol* 7:77–85.
37. Smith-Hicks C, Xiao B, Deng R, Ji Y, Zhao X, Shepherd JD, *et al.* (2010): SRF binding to SRE 6.9 in the Arc promoter is essential for LTD in cultured Purkinje cells. *Nat Neurosci* 13:1082–1089.
38. Besnard A, Galan-Rodriguez B, Vanhoutte P, Caboche J (2011): Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci* 5:35.
39. Besnard A, Bouveyron N, Kappès V, Pascoli V, Pagès C, Heck N, *et al.* (2011): Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci* 31:14296–14307.
40. Lyford GL, Yamagata K, Kaufmann WE, Barnes CA, Sanders LK, Copeland NG, *et al.* (1995): Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron* 14:433–445.
41. Messaoudi E, Kanhema T, Soulé J, Tiron A, Dagyte G, da Silva B, *et al.* (2007): Sustained Arc/Arg3.1 synthesis controls long-term potentiation consolidation through regulation of local actin polymerization in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci* 27:10445–10455.
42. Boisvert FM, Kruhlak MJ, Box AK, Hendel MJ, Bazett-Jones DP (2001): The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the promyelocytic leukemia nuclear body. *J Cell Biol* 152:1099–1106.
43. Stipanovich A, Valjent E, Matamalas M, Nishi A, Ahn JH, Maroteux M, *et al.* (2008): A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosome response. *Nature* 453:879–884.
44. Trifilieff P, Lavour J, Pascoli V, Kappès V, Bami-Cherrier K, Pagès C, *et al.* (2009): Endocytosis controls glutamate-induced nuclear accumulation of ERK. *Mol Cell Neurosci* 41:325–336.
45. Guzowski JF, McNaughton BL, Barnes CA, Worley PF (1999): Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nat Neurosci* 2:1120–1124.
46. Guzowski JF, Setlow B, Wagner EK, McGaugh JL (2001): Experience-dependent gene expression in the rat hippocampus after spatial learning: a comparison of the immediate-early genes Arc, c-fos, and Zif 268. *J Neurosci* 21:5089–5098.
47. Plath N, Ohana O, Dammernann B, Errington ML, Schmitz D, Gross C, *et al.* (2006): Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron* 52:437–444.
48. Kelly MP, Deadwyler SA (2003): Experience-dependent regulation of the immediate-early gene Arc differs across brain regions. *J Neurosci* 23:6443–6451.
49. Daberkow DP, Reidy MD, Kesner RP, Keefe KA (2007): Arc mRNA induction in striatal efferent neurons associated with response learning. *Eur J Neurosci* 26:228–241.
50. Samaha AN, Mallet N, Ferguson SM, Gonon F, Robinson TE (2004): The rate of cocaine administration alters gene regulation and behavioral plasticity: implications for addiction. *J Neurosci* 24:6362–6370.
51. Quinn RK, Brown AL, Goldie BJ, Levi EM, Dickson PW, Smith DW, *et al.* (2015): Distinct miRNA expression in dorsal striatal subregions is associated with risk for addiction in rats. *Transl Psychiatry* 5:e503.

Activity-Regulated Cytoskeleton-Associated Protein Accumulates in the Nucleus in Response to Cocaine and Acts as a Brake on Chromatin Remodeling and Long-Term Behavioral Alterations

Supplemental Information

SUPPLEMENTARY METHODS AND MATERIALS

Animal and Drugs

C57BL/6 mice were purchased from Janvier (Le Genest, St. Isle, France). Eight-week-old males were maintained in a 12h light/dark cycle in stable conditions of temperature (22°C) and humidity (60%) with access to food and water *ad libidum*. Animals were allowed to habituate to the animal facility for one week prior to the experiments. Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85-23, revised 1985 and European Community Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals (86/609/EEC)). The experiments were approved by the local ethic committee “Comité d’Ethique en Experimentation Animale Charles Darwin C2EA-05”. Adult Arc-GFP knock-in mice generated in C57BL/6 background (1) were purchased from Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA). Arc homozygous knock-in (KI), and wild-type (Wt) control mice were obtained by breeding Arc-GFP heterozygous. All experiments were conducted with 8 to 12 week-old adult males.

All drugs were administered intraperitoneally in a volume of 10 ml/kg. Cocaine hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) dissolved in a 0.9% NaCl (w/v) aqueous solution (saline) was administered at the indicated doses. NMDA receptor antagonist (MK801; 0.1 mg/kg), dopaminergic D1 receptor antagonist (SCH23390; 0.2 mg/kg), anisomycin (100 mg/kg) or the MEK inhibitor (SL327; 50 mg/kg) from Sigma Aldrich were administered 30 min prior to saline or cocaine injection.

Tissue Preparation and Immunohistochemistry

At the indicated times after drug treatments (see *figure legends*), mice were rapidly anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (50 mg/kg; Sanofi-Aventis, Paris, France) and perfused transcardially with a fixative solution containing 4% paraformaldehyde (PFA) (w/v) in 0.1 M Na₂HPO₄/ Na₂HPO₄, pH 7.5 at 4°C delivered with a peristaltic pump at 20 ml/min for 5 min. The brain was removed from the skull, post-fixed overnight in 4% PFA, and stored at 4°C. Sections of 30 µm thickness were cut in the frontal plane with a vibratome (Leica, Nussloch, Germany) and kept at -20°C in a solution containing 30% ethylene glycol (v/v), 30% glycerol (v/v) and 0.1 M phosphate buffer. Sections were then processed for immunohistochemistry as follows. On *day 1*, for all proteins except c-Fos, free-floating sections were rinsed three times for 10 min in Tris-buffered saline (TBS; 25 mM Tris-HCl and 0.5 M NaCl, pH 7.5) followed by a permeabilization step of 15 min in 0.2% Triton X-100 (Sigma Aldrich) in TBS. For the detection of all phosphorylated proteins, 50 mM NaF was added in buffers and incubation solutions as described previously (2). For Arc and GFP, an additional blocking step was performed and after three rinses in TBS, sections were incubated for one hour at RT with a blocking buffer (3% bovine serum albumin (BSA; w/v) in TBS). After three rinses in TBS, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (see *Primary antibodies* section) in TBS or TBS containing 1% BSA (w/v) for Arc and GFP. For p3 detection 0.01% Tween-20 (Sigma Aldrich) was added to the incubation solution. For c-Fos detection, day 1 protocol was slightly modified as follows. Sections were rinsed three times in PBS and treated one hour at RT with a blocking buffer (10% fetal calf serum (FCS; v/v)) in a solution in 0.5% Triton X-100 in PBS. After three rinses in PBS, the sections were incubated overnight at 4°C with the primary antibody in PBS containing 10% FCS (v/v) and 0.5% Triton X-100. On *day 2*, sections were rinsed three times for 10 min in TBS (or PBS for c-Fos) and incubated for 90

min at RT in TBS (or PBS for c-Fos) with the following secondary antibodies: goat anti-rabbit Cy3-conjugated (1:500; GE Healthcare, Piscataway, NJ), goat anti-mouse Cy3-conjugated (1/500; GE Healthcare) or goat anti-chicken Alexa 488 (1/500; Invitrogen, Carlsbad, CA). For double labeling experiments, goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:500; Invitrogen) and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) antibodies were used. After three rinses in TBS (or PBS for c-Fos), sections were incubated for 5 min with Hoechst (Invitrogen) to achieve counterstaining of nuclei. Sections were rinsed three times for 10 min in TBS (or PBS for c-Fos) and three times for 10 min in Tris Buffer (0.25 M Tris) before mounting in Vectashield (Vector Laboratories).

Primary Striatal Cell Cultures

Cultures were obtained from striata dissected out from 14 day old Swiss mice embryos (Janvier). Cells were resuspended in Neurobasal medium supplemented with B27 (Invitrogen), 500 nM L-Glutamine, 60 µg/ml penicillin G and 25 µM β-mercaptoethanol (Sigma Aldrich) and plated at a density of 1,000 cells per mm² into Nunc 4-well plates (Dutscher, Brumath, France; for immunocytochemistry) or 8-µwell plates (Biovalley; for live videomicroscopy) coated with 50 µg/ml poly-D-lysine (Sigma Aldrich). Cultured media were changed at day in vitro (DIV) 7 and pharmacological treatments were performed at DIV8 by introducing compounds directly to the medium and placing the cells at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO₂ for the appropriate time. Stimulations of striatal neurons were performed by adding L-glutamic acid (Calbiochem, San Diego, CA).

Plasmids and Transfection

Arc-pEGFP-C1 plasmid (referred to as Arc-GFP) was generated by PCR from pEGFP-C1 plasmid (referred to as GFP) (GenBank Accession number U55763) using 5'-

GGGCTCGAGCCATGGAGCTGGACCATATGACC-3' and 5'-GGGGGAATTCCTATTCAGGCTGGGTCCTGT-3' primers. The coding sequence of mouse Arc was subcloned between the Xho1 and EcoR1 sites in C-terminal end of GFP. Transient transfections of Arc-GFP or GFP plasmids were performed by using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Cells (600/mm²) were transfected at DIV 7 with 1 µg of DNA for 3 h. Neurons were then rinsed with fresh culture medium and put back to 37°C for 24 h before pharmacological treatments.

Immunocytochemistry

At the indicated time after pharmacological treatments (see *figure legends*), the medium was removed and replaced by 4% PFA complemented with 4% sucrose for 20 min before permeabilization in a methanol/acetone (50/50) solution at 4°C for 10 min. After three rinses in PBS, plates were incubated with blocking buffer (10% fetal calf serum (FCS; v/v), 1% BSA (w/v) in PBS) for 2 h at RT for pH3 and for 1 h with 10% normal goat serum (NGS; v/v) in PBS for other markers. After three rinses in PBS, cells were incubated overnight at 4°C with the anti-pH3 antibody in PBS containing 1% FCS and 0.01% Tween-20 (Sigma-Aldrich) or PBS containing 1% NGS for other primary antibodies. Plates were rinsed in PBS three times and incubated for 90 min at RT in PBS with following secondary antibodies: goat anti-rabbit Cy3-conjugated antibody (1:500; GE Healthcare) or goat anti-mouse Cy3-conjugated antibody (1:500; GE Healthcare). For double labeling experiments goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:500; Invitrogen) and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) were used. After three rinses in PBS, cells were incubated 5 min with Hoechst (Invitrogen) for counterstaining of nuclei and mounted under coverslips using Mowiol.

Primary Antibodies

Arc expression was detected by using a mouse monoclonal antibody raised against Arc (1/30; Santa Cruz, Arc C-7) for classic immunohistochemistry procedures and a polyclonal rabbit antibody raised against Arc (1/500; Synaptic System, 156 003) when immunohistochemistry was coupled to the diolistic labeling of dendrites. Polyclonal antibody against phospho-Ser-10-H3 [(pH3) (1/500; Millipore, Billerica, MA; reference 06570)], diphospho-Thr-202/Tyr-204-ERK1/2 (1/400; Cell Signaling Technology, Ipswich, MA; reference: 4370), phospho-Thr-581-MSK-1 (1/750; Cell Signaling Technology, 9595) were used. Phosphorylated form of RNA Polymerase II was detected with using a rabbit polyclonal antibody raised against phospho-S2-CTD repeat of RNA-PolII (1/10000; Abcam, Cambridge, MA, 5095). Expression of the immediate early gene c-fos was analyzed using rabbit polyclonal antibody (1/10000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; reference sc-52). Expression of GFP was visualized by using a chicken polyclonal anti-GFP antibody (1/1000; Aves Lab, Tigard, Oregon USA, reference 1020).

Image Acquisition and Analysis

Entire hemisphere reconstruction: Arc expression was visualized in entire hemispheres on frontal sections. Images were collected from ten adjacent sections spaced with 120 μm at various bregma coordinates (3) along the rostro-caudal axis. Images were acquired with a macroscope (ApoTome.2, Zeiss) Entire hemisphere image (8100 μm X 6044 μm) was reconstructed from 256 images (506.25 μm X 377.75 μm) stitched using ImageJ analyzer software.

Quantification of immunoreactive cells (immunohistochemistry): Immunoreactive cells were quantified for each marker in the dorso-medial striatum (DM) and nucleus accumbens shell (ShNAcc) as indicated by white rectangles on mouse coronal sections at various bregma

coordinates along the rostro-caudal axis (see **Fig. S1B**) in a total of 12 different images (387.5 μm x 387.5 μm) per animal (i.e.: 1 image per structure, bilaterally, on three adjacent sections). Images were acquired bilaterally in a 16-bits range using a confocal laser scanning microscope (SP5, Leica) with a 40X oil immersion objective, Zoom 1, pixel size: $x = 0.38 \mu\text{m}$, $y = 0.38 \mu\text{m}$. Quantifications were performed using ImageJ analyzer software taking into account the cells with immunofluorescence above a fixed threshold.

Nucleus vs neuropil fluorescence intensity assessment: Images were acquired with the same criteria and parameters described in the previous section. All image analyses were performed in ImageJ with custom-built procedures. Nuclei were segmented by a binarization of Hoechst signal using a user-defined threshold. Touching nuclei were separated by watershed and spots with an area inferior to 15 μm^2 or superior to 120 μm^2 were erased in order to avoid non-neuronal nuclei and segmentation of artifacts. The fluorescence was measured inside and outside the nuclei masks in order to discriminate proteins levels in neuropile or in the nucleus. The percent of positive nuclei was determined as the percent of nuclei upon a threshold defined by user relative to the total number of nuclei.

Quantification of immunoreactive cells (immunocytochemistry): Images were acquired using a fluorescent microscope (Zeiss, Axioskop2) with a 20X objective, Zoom 1. Ten images were taken per condition and each condition was performed in duplicate. Quantifications were performed using ImageJ analyzer software taking into account the percent of transfected cells above a fixed threshold.

Time-lapse imaging of cultured striatal neurons: For live imaging, cultures were obtained from striata dissected out from P0 newborn Swiss mice processed with the same protocol as described above (see *Primary striatal cell cultures* section). Time-lapse sequences were collected using a Leica DM16000 inverted microscope (Leica) equipped with a Yokowaga CSU-X1 spinning disc confocal head (Roper Scientific) and a 100 mW 491 nm laser

controlled by MetaMorph (Molecular Devices). The setup was enclosed in a thermal incubator set to 36°C. Images were collected with a 40X oil immersion objective. Acquisitions were performed every minute for 15 min before and 45 min after the addition of L-glutamic acid directly introduced in the medium.

Dendritic Detection of Arc

Cartridge preparation and diolistic labeling were performed as described previously (4). Brain sections were transferred to glass surface, and the beads were delivered using a gene-gun device (Bio-Rad) through a 3 µm pore-sized filter (Millipore), using helium gas pressure (120–150 psi). Slices were kept in buffer at RT for at least 2 h before being processed for immunohistochemistry. For Arc detection, the protocol was slightly adapted from classic immunohistochemistry procedure as follows. On day 1, sections were rinsed three times for 10 min in TBS followed by a quick and gentle permeabilization step 3 min in 0.1 % Triton X-100 in TBS. After three rinses in TBS, sections were incubated with a blocking buffer (3% BSA (w/v) in TBS). Sections were rinsed three times in TBS and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies in TBS containing 1% BSA (w/v). On day 2, sections were rinsed three times for 10 min in TBS and incubated for 90 min at RT in TBS with goat anti-rabbit Alexa fluor 488 (1:500; Invitrogen). Sections were rinsed three times for 10 min in TBS and three times for 10 min in Tris Buffer (0.25 M Tris) before mounting in Mowiol. Images were acquired bilaterally in DM in a 16-bits range using a confocal laser scanning microscope (SP5, Leica). Images were taken with a 63X oil immersion objective, Zoom 4, pixel size: $x = 0.06\text{ }\mu\text{m}$, $y = 0.06\text{ }\mu\text{m}$, $z = 0.21\text{ }\mu\text{m}$. For all images, deconvolution was performed with Huygens 3.6 Software (Scientific Volume Imaging) as previously described (4). Dendrites are segmented and only the Arc signal inside the mask is analyzed.

Striatal Tissue Collection and RNA Isolation

At the indicated time after treatments (see *figure legends*), mice were sacrificed by decapitation and striata were dissected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA isolation. Striata were homogenized in 500 µl of Qiazol reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) using pestle. RNA extraction was performed with RNeasy Lipid Tissue Midi Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA concentration and quality were measured on nanovue spectrophotometer (GE Healthcare). Reverse transcription was performed with Maxima First Strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (Fermentas, Saint-Rémy-lès-Chevreuse, France) at 37°C for 30 min. Quantitative real-time PCR reactions were performed using LightCycler 480 SYBR Green I Master according to the manufacturer's protocol and run on LightCycler 480 device (Roche Diagnostics, Meylan, France). For each reaction, ~ 20 ng of cDNA from individual animal were used. To minimize the contribution of contaminating genomic DNA, primers were designed to span exon junctions. Amplification efficiency for each assay was determined by running a standard dilution curve. Expression of hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1 (*Hprt1*) transcript was used to normalize the cDNA amounts. The cycle threshold values were calculated automatically by LightCycler 480 SW 1.5 software with default parameters. All primers were designed using the NCBI primer tool arc (Forward: AATGCAGCTGAAGCAGCAGACCTG; Reverse: TCTCAGCAGCCTTGAGACCTGGTGT), *hprt1* (Forward: TTGCTCGAGATGTCATGAAGGA; Reverse: AGCAGGTCAGCAAAGAACTTATAG), *GluA1* (Forward: TCCTGAAGAACTCCTTAGTG; Reverse: ATCATGTCCTCATACACAGC).

Locomotor Activity and Psychomotor Sensitization

Locomotor activity was measured by using a circular corridor located in a soundproof testing room (Immetronic, Pessac, France). Locomotor activity was counted as the number of interruptions by the mice of two adjacent beams in a circular corridor containing four infrared beams placed at every 90° and expressed as the number of 1/4 turns/60 min. For spontaneous activity experiments, locomotor activity was recorded for 180 min during the first exposition of animals to the circular corridor. In cocaine sensitization experiments, mice were placed in the activity box for 120 min after injection of a saline solution during 3 consecutive days for habituation before the actual experiments were performed. The protocol of psychomotor sensitization consisted of two sessions of 120 min separated by one week, called day 1 and day 8. During the day 1 session, spontaneous activity was recorded for 60 min before cocaine injection at the indicated dose (see *figure legends*) and locomotor activity recorded for 1 h. One week later, on day 8, a second session was performed as described for day 1. Locomotor sensitization was evaluated as the recording of locomotor activity during the 60 min after cocaine injection on day 1 and day 8.

Conditioned Place Preference

The conditioned place preference (CPP) was evaluated in a Plexiglas Y-shaped apparatus (Imetronic) located in a soundproof testing room with low luminosity. Apparatus consists of two compartments distinguished by different patterns on floors and walls, separated by a small neutral area. The device is connected to an electronic interface for data collection. Time spent in each chamber was measured during the experiment. The CPP protocol included three different phases. 1) During pre-conditioning, the mice were placed in the neutral area and allowed to explore both chambers. The time spent in each compartment was measured during 18 min (1080 sec). 2) In the conditioning phase, the treatments were counterbalanced

between chambers to use an unbiased procedure. Mice were treated for 6 days consecutively with alternate injections of cocaine (2.5 mg/kg) or saline. After injections, mice were confined to a given chamber for a period of 20 min. Cocaine was administered on days 2, 4 and 6. Control saline received saline every day. 3) The post-conditioning (test) phase was conducted exactly as the pre-conditioning phase with free access to both chambers. The time spent in each chamber was measured during 18 min (1080 sec). Data were expressed as the difference between cocaine-paired chamber minus vehicle-paired chamber during pre-conditioning and post-conditioning, as well as the time spent in each chamber during pre-conditioning and post-conditioning. CPP score was calculated as the difference between time spent in cocaine paired chamber during post-conditioning minus pre-conditioning. For the control group, it corresponds to the difference between the time spent in the saline-paired chamber during post-conditioning minus pre-conditioning.

Statistics

All data are displayed as mean $\pm$ SEM. The percentage of nuclear colocalization was expressed as a ratio of colocalized nuclear spots over the total number of nuclear spots for each protein and analyzed with unpaired Student's *t*-test. Immunohistochemistry and real-time qPCR performed for pharmacological studies were analyzed using one-way ANOVA between subjects followed by the post-hoc Newman-Keuls comparisons test. Nuclear Hoechst puncta were expressed as a ratio of Wt Saline and analyzed using one-way ANOVA followed by the by the post-hoc Bonferroni comparisons. Immunohistochemistry and qPCR performed for time course experiments as well as immunocytochemistry were analyzed with a mixed factor two-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). For Behavioral studies, a two-way ANOVA repeated-measure for matching data was performed followed by the post-hoc Bonferroni comparisons.

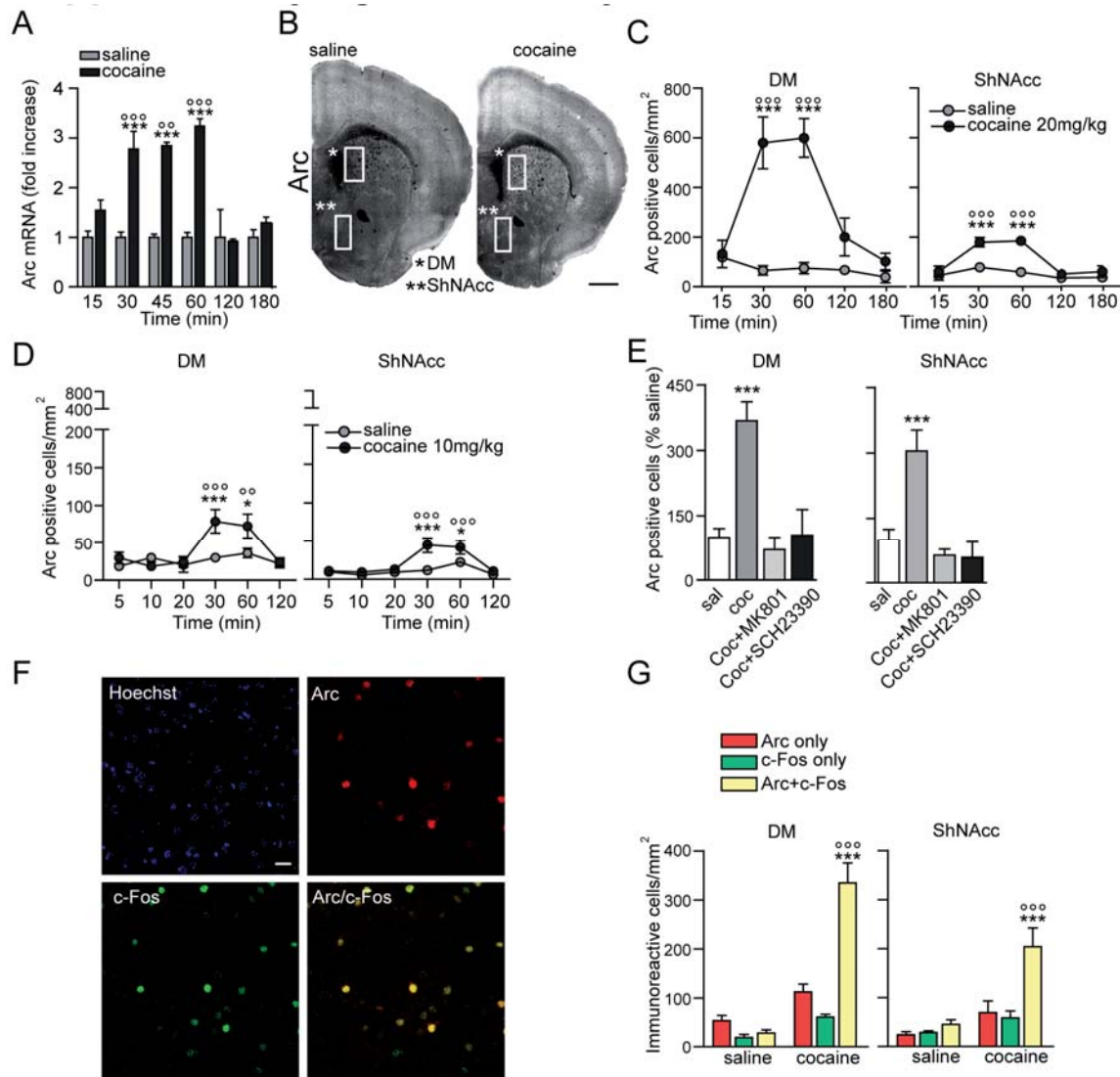


Figure S1: Kinetics of Arc mRNA and protein induction in the striatum in response to different doses of cocaine. (A) Striatal Arc mRNA levels were measured at the indicated time points after saline (grey) or cocaine (20 mg/kg; black) injections. Results are expressed as fold increase normalized to saline levels for each time point. $n = 3-4$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and time, $F_{(5,24)} = 8.96$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,24)} = 66.68$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,24)} = 8.96$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < 0.001$, cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$, °° $p < 0.01$, each time point vs 15' group. (B) Representative images of the Arc immunofluorescent staining from brain slices prepared from mice sacrificed 1h after saline (left) or cocaine (right) administration. The chosen areas to acquire higher magnification pictures and perform quantifications in the dorso-medial striatum (DM) and nucleus accumbens shell (ShNAcc) are indicated by white rectangles and asterisks (scale bar: 500 µm). (C) Quantifications of the number of Arc positive cells per mm² at the indicated time points after saline (grey) or cocaine (black) injection in the DM (left) and ShNAcc (right). $n = 4-8$ mice per group; two-way ANOVA in the DM: interaction between treatment and time, $F_{(4,49)} = 10.45$, $p < 0.001$; effect of treatment, $F_{(1,49)} = 49.46$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(4,49)} = 10.75$, $p < 0.001$ and in the ShNAcc: interaction between treatment and time, $F_{(5,55)} = 7.23$, p

< 0.001 ; effect of treatment, $F_{(1,55)} = 26.67$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,55)} = 18.03$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < 0.001$ cocaine group vs saline group; °°° $p < 0.001$, each time point vs 15' group. **(D)** Quantifications of the number of Arc positive cells per mm^2 at the indicated time points after saline (grey) or cocaine at 10 mg/kg (black) injection in the DM (left) and ShNAcc (right). $n = 5$ mice per group; two-way ANOVA in the DM: interaction between treatment and time, $F_{(5,56)} = 3.87$, $p < 0.01$, effect of treatment, $F_{(1,56)} = 9.88$, $p < 0.01$; effect of time, $F_{(5,56)} = 7.28$, $p < 0.001$, and in the ShNAcc: interaction between treatment and time, $F_{(5,56)} = 4.18$, $p < 0.01$, effect of treatment, $F_{(1,56)} = 17.34$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(5,56)} = 11.60$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$, cocaine group vs saline group ; °°° $p < 0.001$; °° $p < 0.01$, each time point vs 5 min group. **(E)** Effect of a pre-treatment with MK801 (0.1 mg/kg) or SCH23390 (0.2 mg/kg) on the induction of Arc protein 1h after cocaine administration. $n = 4-6$ mice per group; one-way ANOVA in the DM: $F_{(3,16)} = 12.12$, $p < 0.001$ and in the ShNAcc: $F_{(3,16)} = 12.12$, $p < 0.001$, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). *** $p < 0.001$, saline, MK801 or SCH23390 pre-treated cocaine groups vs saline pre-treated saline group. **(F)** Co-labeling of Arc (red) and c-Fos (green) from a striatal slice obtained 1h after a single injection of cocaine at 20 mg/kg. Nuclei are counterstained with Hoechst (blue) and the merge of Arc and c-Fos signals is shown on the right panel (scale bar: 30 μm). **(G)** The numbers of cells per mm^2 that are immunopositive only for Arc (red), only for c-Fos (green), or for both Arc and c-Fos (yellow) have been quantified in the DM (bottom left) and ShNAcc (bottom right). $n = 4$ mice per group were analyzed in the DM and the ShNAcc using unpaired t-test. *** $p < 0.001$, cocaine group vs saline group. (Scale bar: 30 μm)

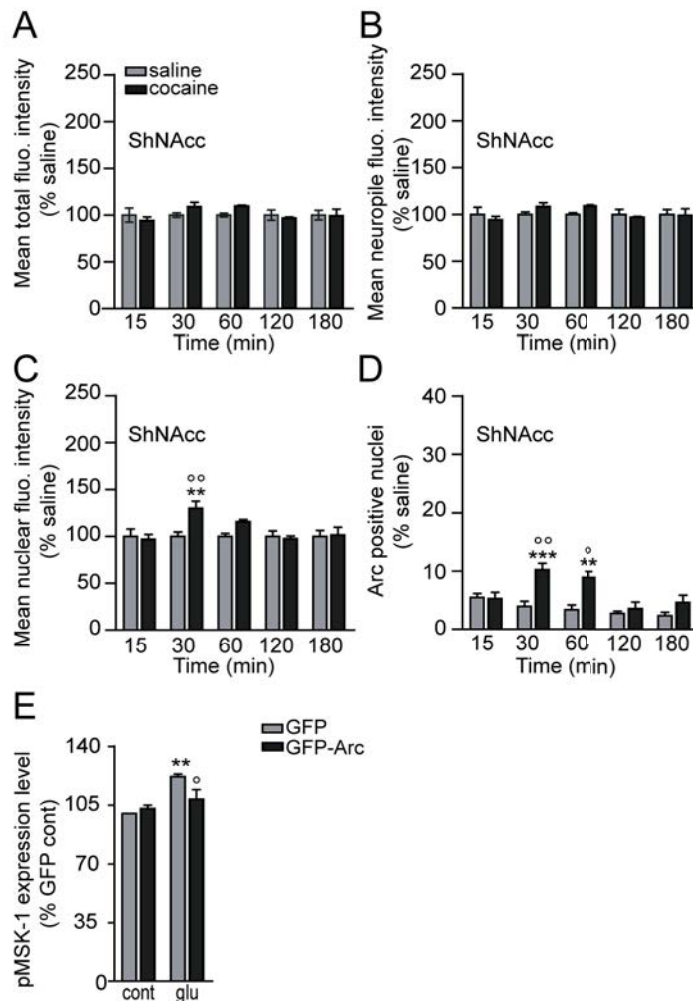


Figure S2: Cocaine-induced Arc expression and sub-cellular distribution in the ShNAcc *in vivo* and impact of Arc overexpression on MSK-1 phosphorylation *in vitro*. Based on the computer-based routine described in Fig. 2C the mean intensity of the total (**A**), the non-nuclear (neuropile; **B**) and the nuclear (nuclei; **C**) Arc signals were measured in the ShNAcc and expressed as percentage of increase relative to the corresponding saline condition at each time point. $n = 6-8$ mice per group; two-way ANOVA: for total Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(4,39)} = 0.92$, not significant (ns); effect of treatment, $F_{(1,39)} = 0.38$, ns; effect of time, $F_{(4,39)} = 0.92$, ns; for non-nuclear Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(4,39)} = 0.86$, ns; effect of treatment, $F_{(1,39)} = 0.25$, ns; effect of time, $F_{(4,39)} = 0.86$, ns; for nuclear Arc signal: interaction between treatment and time, $F_{(4,39)} = 2.48$, ns; effect of treatment, $F_{(1,39)} = 4.22$, $p < 0.05$; effect of time, $F_{(4,39)} = 2.48$, ns, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). ** $p < 0.01$, cocaine group vs saline group; °° $p < 0.01$, each time point vs 15' group. (**D**) The percentage of Arc-positive nuclei (i.e. above a fixed intensity threshold) has been calculated at each time point after saline or cocaine administration. $n = 6-8$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and time $F_{(4,38)} = 3.90$, $p < 0.01$; effect of treatment, $F_{(1,38)} = 20.49$, $p < 0.001$; effect of time, $F_{(4,38)} = 5.71$, $p < 0.01$ followed by post-hoc Bonferroni comparisons. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$, cocaine group vs saline group; °° $p < 0.01$; ° $p < 0.05$, each time point vs 15' group. (**E**) Cultured striatal neurons were transfected with GFP (grey) or GFP-Arc (dark) and treated with glutamate 10 μ M (glu) for 20 minutes to induce phosphorylation of the nuclear kinase

MSK-1 (pMSK-1). The intensity of the pMSK-1 labeling was measured in transfected cells stimulated or not with glutamate. Results are expressed as % increase when compared to control neurons transfected with GFP. $n = 3$ independent experiments per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and transfection, $F_{(1,8)} = 6.83$, $p < 0.05$, effect of treatment, $F_{(1,8)} = 19.04$, $p < 0.01$; effect of transfection, $F_{(1,8)} = 2.73$, NS, followed by post-hoc comparisons (Bonferroni). $**p < 0.01$, control group (cont) vs glutamate group (glu); $^{\circ}p < 0.05$ GFP vs GFP-Arc plasmid.

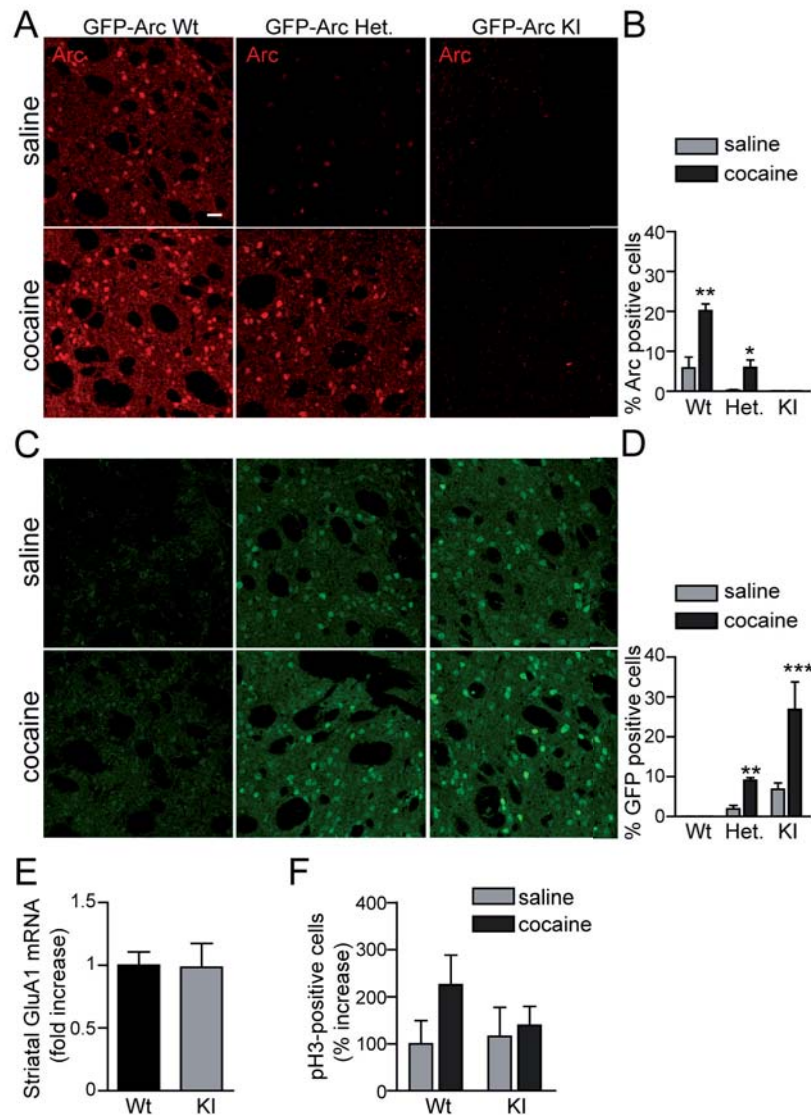


Figure S3: Cocaine-induced Arc and GFP induction in GFP-Arc mice. Homozygous knock-in GFP-Arc (GFP-Arc KI) and corresponding wild type littermate (GFP-Arc Wt) were treated with saline or cocaine (20 mg/kg) for 1 h and sacrificed to perform immunolabeling of Arc (A) or GFP (C) on distinct brain slices of the same animal. Shown are representative confocal images of Arc (red; top panels) GFP (green; bottom panels) labeling in the DM (scale bar: 30 μ m). Quantifications of Arc (B) or GFP (D)-positive cells were performed. Because there is no GFP positive and Arc positive cells in Wt and KI mice, respectively, only the number of Arc positive cells in Wt mice and GFP-positive cells in KI was analyzed between saline and cocaine treated animals. $n = 3$ mice per group; unpaired t-test, Arc positive-cells in Wt mice: ** $p < 0.01$, saline vs cocaine-treated group; GFP-positive cells in KI mice: *** $p < 0.001$, saline vs cocaine-treated group. (E) RT-qPCR experiments performed from striatal extracts (dorsal and ventral part of the striatum) show no difference in levels of mRNA encoding for the GluA1 subunit of AMPAR between Wt and KI mice. $n = 5$ mice per group; unpaired t-test, results are expressed as fold increase normalized to Wt levels: n.s, Wt vs KI mice. (F) GFP-Arc KI and corresponding Wt littermates were injected with a saline or cocaine solution and sacrificed 30 minutes later. The number of pH3 positive-cells (fold induction relative to saline treated Wt mice) was evaluated by

immunohistochemistry in the striatum. Data expressed as percent of the mean of the Wt saline group. $n=5$ mice per group; two-way ANOVA: interaction between treatment and genotype, $F_{(1,14)} = 0.74$, NS; effect of treatment, $F_{(1,14)} = 1.64$, NS; effect of genotype, $F_{(1,14)} = 0.37$, NS.

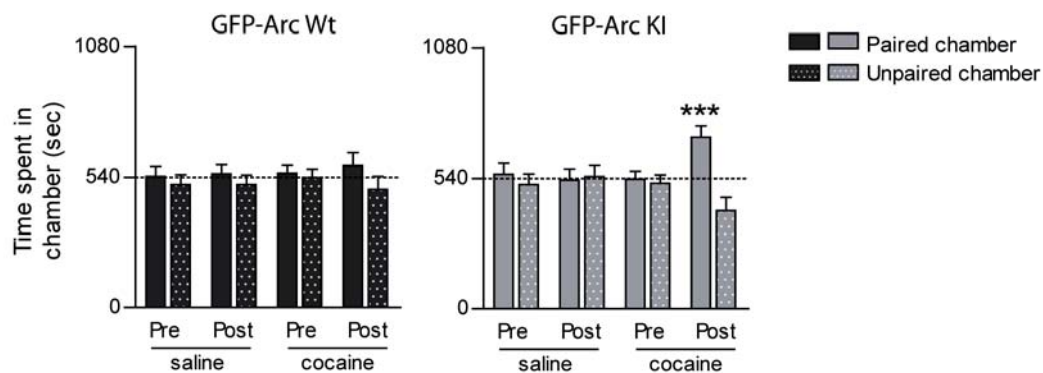


Figure S4: Time spent in all chambers during CPP protocol for GFP-Arc KI mice and Wt littermates. CPP induced by cocaine ($n=11$ mice per group) was performed from Wt or homozygous KI mice in a three-pairing CPP paradigm. Analysis of time spent in saline or cocaine-paired chamber compared to unpaired chamber before conditioning (pre) and during the test, after conditioning (post) for each genotypes. $n = 11-12$ mice per group; paired Student t -test for all groups, *** $p < 0.001$, cocaine-paired chamber vs unpaired chamber. Line represents equal time spent in each chamber.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

1. Wang KH, Majewska A, Schummers J, Farley B, Hu C, Sur M, *et al.* (2006) In vivo two-photon reveals a role of arc in enhancing orientation specificity in visual cortex. *Cell* 126:389-402.
2. Besnard A, Bouveyron N, Kappès V, Pascoli V, Pagès C, Heck N, *et al.* (2011) Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci* 31:14296-14307
3. Paxinos G and Franklin KBJ (2001) The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego
4. Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines, application to a mouse model of Huntington's disease, *Brain Struct Funct* 217:421-34.

RESEARCH ARTICLE

Improving Axial Resolution in Confocal Microscopy with New High Refractive Index Mounting Media

Coralie Fouquet^{1,2,3‡}, Jean-François Gilles^{1,2‡}, Nicolas Heck^{1,2,3}, Marc Dos Santos^{1,2,3}, Richard Schwartzmann^{1,2}, Vidjeacoumary Cannaya^{1,2,3}, Marie-Pierre Morel^{1,2,3}, Robert Stephen Davidson⁴, Alain Trembleau^{1,2,3‡}, Susanne Bolte^{1,2‡*}

1 Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, F-75005, Paris, France, **2** Institut de Biologie Paris-Seine, CNRS FR3631, F-75005, Paris, France, **3** CNRS, UMR8246, INSERM, U1130, Neuroscience Paris Seine, F-75005, Paris, France, **4** Citifluor Ltd, 18, Enfield Coisters, Fanshaw Street, London, N1 6LD, United Kingdom

‡ CF and JFG contributed equally to this work. AT and SB also contributed equally to this work.

* susanne.bolte@upmc.fr



OPEN ACCESS

Citation: Fouquet C, Gilles JF, Heck N, Dos Santos M, Schwartzmann R, Cannaya V, et al. (2015) Improving Axial Resolution in Confocal Microscopy with New High Refractive Index Mounting Media. PLoS ONE 10(3): e0121096. doi:10.1371/journal.pone.0121096

Academic Editor: Tom Waigh, University of Manchester, UNITED KINGDOM

Received: October 30, 2014

Accepted: February 9, 2015

Published: March 30, 2015

Copyright: © 2015 Fouquet et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: Citifluor Ltd provided support in the form of salaries for author RS Davidson, but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section. RS Davidson is the holder of UK patent 2419427 entitled "Mountant solution" which embraces the description of CFM3. The solution is marketed by Citifluor Ltd. of which RS Davidson is Managing director. Institute of

Abstract

Resolution, high signal intensity and elevated signal to noise ratio (SNR) are key issues for biologists who aim at studying the localisation of biological structures at the cellular and sub-cellular levels using confocal microscopy. The resolution required to separate sub-cellular biological structures is often near to the resolving power of the microscope. When optimally used, confocal microscopes may reach resolutions of 180 nm laterally and 500 nm axially, however, axial resolution in depth is often impaired by spherical aberration that may occur due to refractive index mismatches. Spherical aberration results in broadening of the point-spread function (PSF), a decrease in peak signal intensity when imaging in depth and a focal shift that leads to the distortion of the image along the z-axis and thus in a scaling error. In this study, we use the novel mounting medium CFM3 (Citifluor Ltd., UK) with a refractive index of 1.518 to minimize the effects of spherical aberration. This mounting medium is compatible with most common fluorochromes and fluorescent proteins. We compare its performance with established mounting media, harbouring refractive indices below 1.500, by estimating lateral and axial resolution with sub-resolution fluorescent beads. We show furthermore that the use of the high refractive index media renders the tissue transparent and improves considerably the axial resolution and imaging depth in immuno-labelled or fluorescent protein labelled fixed mouse brain tissue. We thus propose to use those novel high refractive index mounting media, whenever optimal axial resolution is required.

Introduction

Imaging biological structures at the cellular and subcellular levels using confocal microscopy is often desired, but loss of resolution and decrease in fluorescence intensity in the depth of the

Biology Paris-Seine Imaging Facility did not receive any financial support from Citifluor Ltd.

Competing Interests: RS Davidson is the holder of UK patent 2419427 entitled "Mountant solution" which embraces the description of CFM3. The solution is marketed by Citifluor Ltd. of which RS Davidson is Managing director. The authors confirm hereby that this fact does not alter their adherence to all PLOS ONE policies on sharing data and materials.

sample are two important limiting factors. Imaging is particularly challenging in brain tissues, characterized by complex neural networks interconnected by synapses. To be in position of analysing the 3D organization of neural networks at the cellular level, neuroscientists usually work on relatively thick (e.g. 50 μm) vibratome sections and proper detection is required throughout the whole thickness of the section [1]. The resolution required for separating densely packed biological structures such as axons (the thinnest of them being 200 nm in diameter) and synaptic elements such as dendritic spines and synaptic boutons, which constitute neuronal connections is in the range of the resolving power of the confocal microscope. Theoretically, the lateral and axial resolutions that can be reached using confocal microscopes, when optimally used, are around 180 nm and 500 nm, respectively [2].

In optical microscopy, resolution is the shortest distance between two distinct points that can still be distinguished as distinct objects. The resolution of optical devices depends on two factors: the wavelength, and the numerical aperture of the objective lens, which is defined as the product of the sinus of the half-angle of the maximum cone of light that can enter or exit the lens and the refractive index (n) of the medium. While the lateral resolution increases linearly with its numerical aperture, along the optical axis (z) the increase is quadratic.

In confocal microscopy, high numerical aperture oil-immersion lenses have become the standard for high-resolution imaging. They are designed and optimised to work with a glass coverslip that has to be introduced between the lens and the sample and a particular immersion medium that is oil. The refractive index of the glass-oil immersion system is close to 1.518 and offers a well-matched and optically homogeneous system with its focal point exclusively limited by diffraction. Optimally, the sample and mounting medium should have a matching refractive index.

However, this is rarely the case. Firstly, most biological samples contain water and may thus have a refractive index far from the oil-immersion objective. It has been stated though that alcohol or aldehyde fixation raises the refractive index of cells from approximately 1.350 to >1.500 [3]. Secondly, most standard sample preparation protocols for fixed samples like cultured cells, tissue sections of thick specimen as well as whole mount embryos include the embedding of the fixed biological material into mounting solutions mostly based on mixtures of glycerol or polyvinyl alcohol with water and various chemicals, i.e. antifading and preservation substances. According to information provided by the manufacturers, these media have refractive indices varying from $n = 1.450$ to 1.490 and furthermore, some hardening media may even change their refractive index upon curing and reach at best a refractive index of 1.490 .

It has been reported previously that the refractive index mismatch between the mounting medium and glass-oil immersion system results in a considerable loss of axial resolution in confocal microscopy due to spherical aberration [4, 5, 6]. Three phenomena can be observed: i) the point-spread function (PSF) broadens, ii) the peak signal intensity of the PSF decreases with penetration depth into the medium-sample system, iii) a focal shift leads to the distortion of the image along the z -axis and thus in a scaling error.

The use of adaptive optics has been proposed to counteract system and sample induced aberrations in confocal microscopy [7]. However, adaptive optics are not yet available on commercial confocal setups.

A nearby possibility to decrease spherical aberrations would be to use mounting media with a refractive index matching the glass-oil immersion system. This has been proposed by [8] who used 2,2'-Thiodiethanol, a water-soluble mounting medium with tuneable refractive index up to 1.520 for high-resolution optical microscopy. This study shows that the use of high refractive index media in combination with high numerical aperture objectives improves considerably axial resolution. New mounting media such as the glycerol-based CFM3 (Citifluor Ltd, UK) with refractive indices above 1.500 have been commercialized since then. Still they meet with little response, since many biologists use media with refractive indices below 1.500 for

mounting fixed samples for immunocytochemistry. This might be a matter of habits or due to the reason that these mounting media are part of well-established immunocytochemistry protocols and that most of them have been experienced to work for a plethora of fluorochromes.

We aimed at testing those new mounting media with high refractive indices and therefore carried out a comparative study between conventional mounting media ($ri < 1.500$) and high refractive index media ($ri =$ or above 1.500). We measured the actual refractive indices, and studied their influence on lateral and axial resolution, determined with submicron fluorescent beads and in immuno-labelled mouse olfactory bulb. Furthermore, we used fixed brain sections from VGLUT1^{Venus} knock-in mice, in which synaptic vesicles are labelled with Venus [9] to determine maximal imaging depth in the different mounting media.

We demonstrated that while all mounting media tested performed well at the coverslip level, mounting media with a refractive index above 1.500 and matching exactly the glass-oil system resulted in a superior axial resolution, when looking at beads at a distance from the coverslip. We further observed that fixed mouse brain sections become immediately transparent when submerged into high refractive index mounting media, indicating that these mounting media match the refractive index of this fixed biological material. Interestingly, in contrast to conventional mounting media, the axial resolution measured within mouse brain slices incubated with high refractive index media remained constant throughout depth. When used for immunocytochemistry, these high refractive index mounting media greatly improved the axial resolution of immuno-labelled axons in the olfactory bulb of the mouse brain. Finally, these media displayed higher performance in imaging VGLUT1^{Venus} labelled synaptic boutons throughout the working distance of the objective. We thus propose to use these high refractive index mounting media whenever optimal axial resolution is required.

Results

We investigated the influence of mounting media with refractive indices below and above 1.500 on the lateral and axial resolution of the confocal microscope, using a high numerical aperture lens (63x, NA 1.4, oil immersion).

To this end we determined the PSF, which is the impulse response of the focused optical system and which gives information about the lateral and axial resolution of the optical system. The PSF was measured by imaging 3D stacks of 170 nm fluorescent beads at different depths (Fig. 1) and characterised by its intensity profile. The lateral and axial resolutions were estimated from the full-width at half-maximum (FWHM) of the intensity profile of the PSF.

1. Lateral and axial resolution close to the coverslip

We first aimed at comparing seven commercially available mounting media with refractive indices ranging from 1.518 to 1.390 , and determined the PSFs close to the coverslip. We imaged green fluorescent sub-resolution beads that were mounted directly on the coverslip, i. e. close to the objective lens (Fig. 2A, 2B). We determined a mean value of 255 nm for lateral and 523 nm for axial resolution with all tested mounting media observed. This set of data corroborated previous findings that close to the coverslip, a refractive index mismatch does not impair lateral and axial resolution in the media tested.

2. Lateral and axial resolution at a distance from the coverslip

We next analysed how the refractive index mismatch impairs resolution when looking at beads at a distance from the coverslip. We restricted our work on the comparison of the high refractive index mounting medium CFM3 ($ri = 1.518$) and the widely used Vectashield ($ri = 1.454$). We built a sandwich by mounting green fluorescent sub-resolution beads on slides

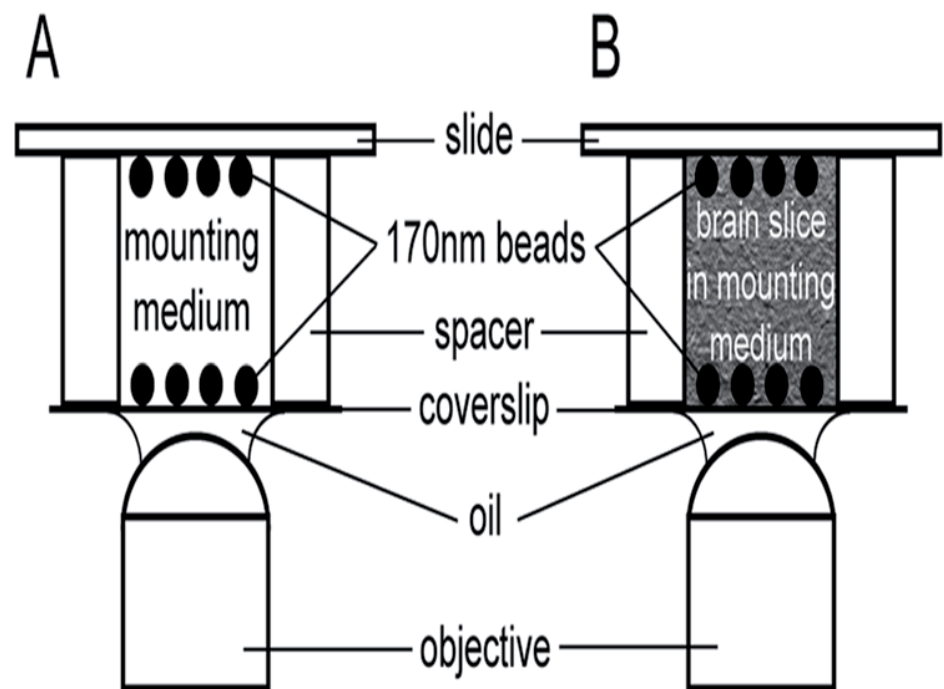


Fig 1. Experimental setup for evaluating axial resolution at different focusing depth with sub-resolution beads. (A, B) 170 nm green or red fluorescent beads have been immobilised on the coverslip and slide surface prior to mounting. One or two spacers of scotch tape (58 μm thick) have been introduced to obtain different depths. Coverslips have been assembled with mounting medium (A) or with brain slices incubated in mounting medium (B) and imaged with a 63x, 1.4 NA objective at 488 nm or 561 nm respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0121096.g001

and coverslips that were separated by one or two spacers of 58 μm (3.1A). We determined the lateral and axial resolutions of beads mounted in CFM3 and Vectashield at the level of the coverslip and at 58 μm and 116 μm depth. Using CFM3, the lateral and axial resolution remained constant throughout depth (mean values $x,y = 224 \text{ nm}$ and $z = 538 \text{ nm}$). This means that spherical aberration is minimized when using CFM3 medium, and our observation corroborated previous findings of Hell and co-workers for a perfectly matched system [4, 5, 6]. Lateral resolution in depth is not impaired in a mismatched system [4] and we indeed observed a lateral resolution of 220–240 nm for beads mounted in Vectashield up to a depth of 112 μm . However, axial resolution was doubled to $> 1.2 \mu\text{m}$ (depth = 58 μm) and tripled to 1.8 μm (depth = 112 μm) when using Vectashield. Furthermore, we observed a considerable loss of peak intensity at a depth of 60 and 112 μm and had to adjust the laser power accordingly in order to exploit the full dynamic range of the image. These results confirm previous theoretical and experimental data for glycerol ($n_i = 1.480$), showing that spherical aberrations occur because of refractive index mismatches in the depth of the sample [4, 5].

3. Influence of the penetration depth on the axial resolution in mouse brain vibratome sections

We next aimed at performing a comparative study of different mounting media on a biological tissue. We carried out 100 μm thick vibratome sections of fixed mouse brains and mounted them in CFM3, Vectashield or the hardening mounting medium Mowiol. Images were taken with an Axiozoomer V16 equipped with a 1x objective in relief contrast mode (Fig. 3A–3C).

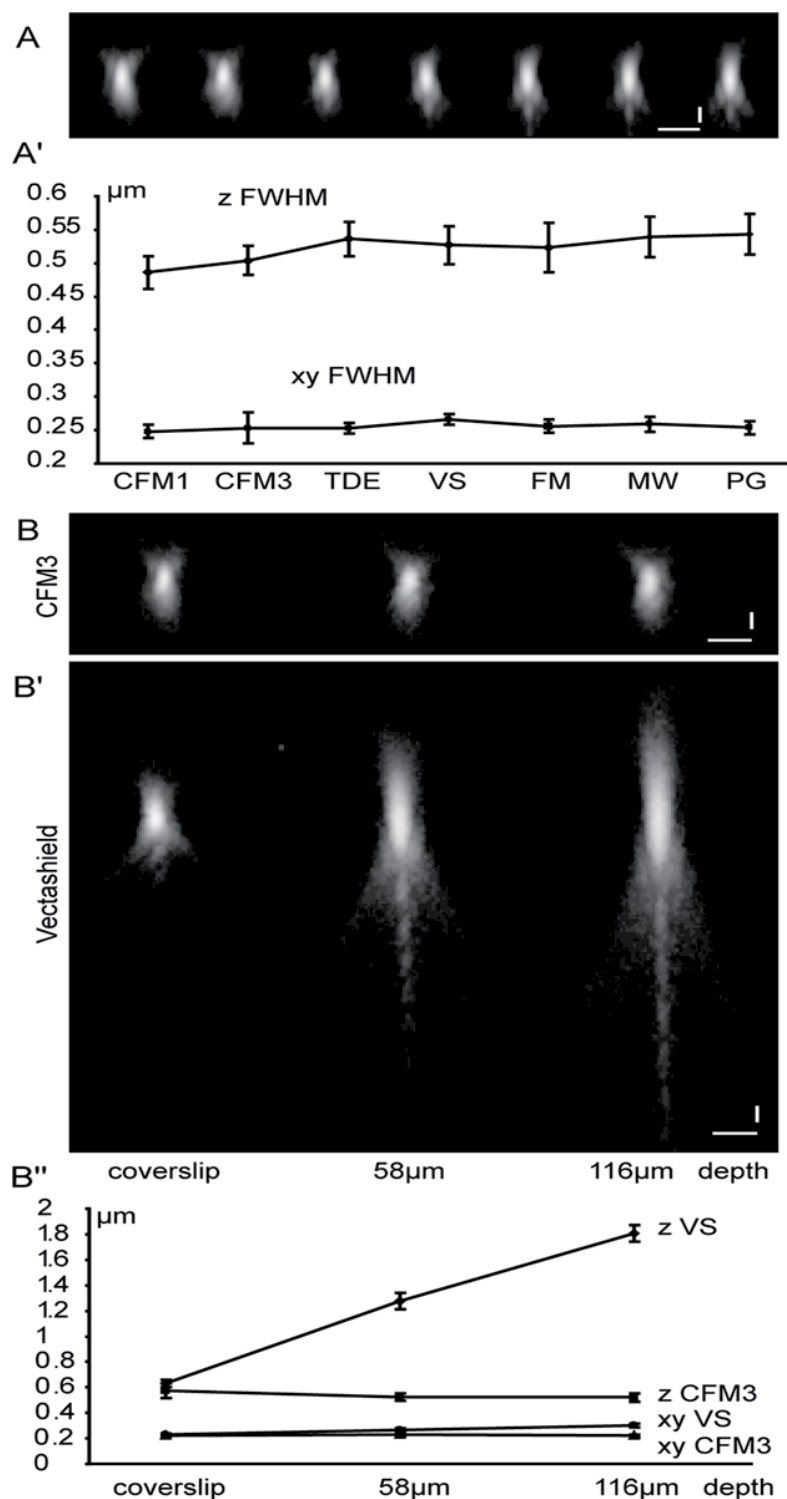


Fig 2. Lateral and axial resolution as a function of the mounting medium and focusing depth. 170 nm green beads have been mounted in CFM1, CFM3, 2'-Thiodiethanol (TDE), Vectashield (VS), Fluoromount (FM), Mowiol (MW) or Prolong Gold (PG) mounting media as described in Fig. 1A, and measured directly at the coverslips (A, A', B, B') or in depth (B, B', B''). Imaging was carried out with the 488 nm laser line collecting green emission. (A, A') X, Z-projections of fluorescent beads are shown in A. Similar beads have been used

to measure the lateral (dots) and axial (rhombus) resolution of the confocal microscope. Beads located at the coverslip show no significant difference in lateral (A' , mean value = 255 nm) and axial (A' , mean value = 523 nm) resolution through the different mounting media. Scale bar = 1 μm . (B, B', B'') X, Z-projection of 170 nm beads mounted in CFM3 (B) or in Vectashield (B') at the level of the coverslip, or at 58 μm or 116 μm depth. Axial resolution in high refractive index medium CFM3 (B'', triangles) remains constant with focussing depth, whereas axial resolution of beads increased with increasing focusing depth in Vectashield (B'', squares). Note that the lateral resolution remains unaffected in the two mounting media (B'', squares = CFM3 and circles = VS).

doi:10.1371/journal.pone.0121096.g002

This technique is based on Hoffman modulation contrast, which converts phase gradients into variations in light intensity [10]. We observed a reduction of phase contrast right after immersing brain sections in CFM3, which rendered the mouse brain almost completely transparent (Fig. 3A, 3A'). Instead, brain sections mounted in Vectashield or Mowiol remained quite contrasted (Fig. 3B, 3B', 3C, 3C'). These differences appeared particularly striking in brain areas in which myelinated axon bundles are present, i.e. the corpus callosum, and the striatum (Fig. 3A-3I).

We aimed to be sure that the transparency of mouse brain sections when mounted into CFM3 is due to refractive index matching of the fixed brain tissue with the medium and not to mounting medium components. We therefore used CFM3-variants (thereafter labelled CFM3-1 to CFM3-4) with refractive indices tuned to 1.390, 1.399, 1.515 and 1.522 by varying the amounts of glycerol and water to the CFM3 solution. Furthermore, we used a glycerol/water solution ($n_i = 1.390$) to mount brain sections. We observed that glycerol ($n_i = 1.390$), CFM3-1 ($n_i = 1.390$) and CFM3-2 ($n_i = 1.399$) resulted in comparable images of the brain sections (Fig. 3D-3F). Striatal fibres and corpus callosum were very contrasted. Fine-tuning of the refractive index of CFM3 showed that with the original CFM3 ($n_i = 1.518$) the contrast is completely lost, whereas CFM3-variants with n_i -values differing only slightly by 0.003 ± 0.001 from CFM3 increase notably the contrast (Fig. 3G, 3I). This set of data clearly demonstrates that the transparency observed with CFM3 is due to refractive index match of the fixed brain section with the medium.

Mouse brain vibratome sections of 60 μm thickness were then introduced between slides and coverslips prepared with orange fluorescent beads on both sample directed sides (Fig. 1B). PSF-measurements were subsequently carried out in three positions, at the level of the coverslip, in a depth of 60 μm adjacent to the brain slice, and in a depth of 60 μm beneath the cortical region of the brain (Fig. 3J, 3J'). In the refractive index matched systems with CFM3 mounting medium, the axial resolution remained constant (mean value 635 nm) between the coverslip, and in depth adjacent and beneath the brain section. When using Vectashield as a mounting medium, refractive index mismatch between the oil-glass interface and between the mounting medium-sample interfaces occurs. This mismatch leads to a two-fold reduction in axial resolution at 60 μm sample thickness adjacently and beneath the brain section. These results further demonstrate that the refractive index of fixed brain sections and CFM3 matches perfectly, and that under these conditions spherical aberrations are absent.

When performing immuno-labelling of mouse brain sections, antibody labelling penetrates rarely deeper than 30 μm into the sample. We thus wanted to know if our findings were consistent in sample depths relevant to immuno-labelling. We therefore investigated the axial resolution at sample thicknesses of 20, 30 and 60 μm using Vectashield as a mounting medium. In this medium, we observed a resolution loss of 30% already in a depth of 20 μm (Fig. 3K, 3K').

4. Improvement of axial resolution in immunofluorescence

We aimed at assessing the ability of our new protocol, involving CFM3 as a mounting medium, to provide higher axial resolution than conventional media like Vectashield in

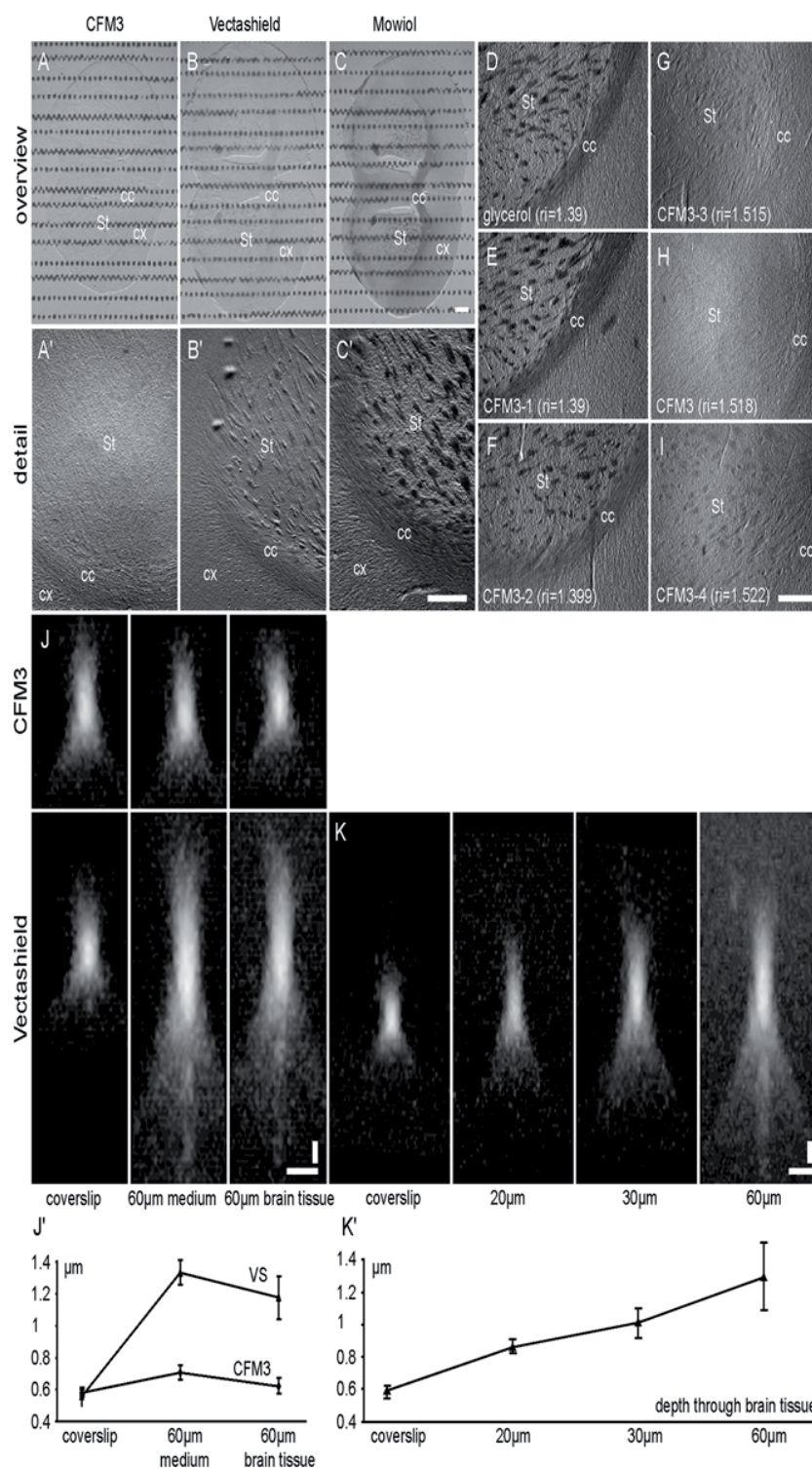


Fig 3. Axial resolution as a function of the mounting medium and focusing depth under brain sections. (A-I) 100 μm vibratome brain sections were mounted in different mounting media and bright field images were taken in relief-contrast mode at equal light levels with a 1.0 objective (Zeiss Axiozoomer). Overview image, taken with black and white pattern as background (A-C) and zoomed images (A'-C', D-I) were carried out to visualise contrast changes in the striatum (S), corpus callosum (CC) and cortex (C).

Sections were mounted in CFM3 (A, A', H), $n_i = 1.518$, Vectashield (B, B', $n_i = 1.458$), Mowiol (C, C'), glycerol (D, $n_i = 1.390$), and CFM3-variants with tuned refractive indices, such as CFM3-1 (E, $n_i = 1.390$), CFM3-2 (F, $n_i = 1.399$), CFM3-3 (G, $n_i = 1.515$) and CFM3-4 (I, $n_i = 1.522$). Note that with fine-tuning of the refractive index to a value of 1.518, contrast of the brain section is very low. Scale bars = 500 μm . (J, J') 170 nm red fluorescent beads were mounted in CFM3 ($n_i = 1.518$) and Vectashield (VS), as described in Fig. 1B. Imaging was carried out with the 561 nm laser line collecting red emission. X, Z-projections (J) and axial resolution (J') were assessed directly at the coverslip level (left), or at 60 μm depth, adjacent to brain sections (middle) and under the cortical region of the brain section (right). For beads mounted in CFM3 little variations in axial resolution were observed (J, upper panel, J' circles, $n_i = 1.518$). However, for beads mounted in Vectashield (J, lower panel, J' triangles, $n_i = 1.454$) a two-fold loss of resolution at 60 μm was observed. Scale bar = 1 μm . (K, K') Red fluorescent beads were mounted in Vectashield (VS), as described in Fig. 1B. X, Z-projections (K) and axial resolution (K') was measured directly at the coverslip level (left) and below the cortical region of brain sections, at 20 μm , 30 μm and 60 μm depth. Note that a considerable loss of axial resolution is already observed at 20 μm depth. Scale bar = 1 μm .

doi:10.1371/journal.pone.0121096.g003

immunofluorescence labelling. We therefore decided to use the olfactory sensory axons of the mouse as a test system. These axons, originating from the olfactory epithelium lying in the nasal cavity, project to the brain at the level of the olfactory bulb. On their way towards their targets in the glomerular layer, these axons rearrange in the most peripheral layer of the bulb, called the olfactory nerve layer [11]. In this layer, olfactory axons are highly numerous and packed at a very high density, making them extremely difficult to resolve by light microscopy. To label olfactory axons, we used transgenic $\text{G}\gamma 8\text{-TTA} \times \text{TetO-M2iresGFP}$ mice [12, 13] expressing GFP in all immature olfactory sensory neurons, through the use of a $\text{G}\gamma 8$ promoter. To test whether our protocol would be suitable for co-localization studies, immunofluorescence against GFP and peripherin was performed. Peripherin is an intermediate filament known to be expressed in olfactory axons, and previously described to be expressed with a distinct spatiotemporal pattern in these axons [14, 15]. We document in Fig. 4 the difference, in terms of quality of imaging (in depth sensitivity and axial resolution) between Vectashield and CFM3 used as mounting media. All images were taken from the olfactory nerve layer of the olfactory bulb that contains essentially fascicles of olfactory axons en route towards their targets. As seen on Fig. 4A,B, CFM3-mounted sections allow the detection of the labels throughout the thickness of the section for both markers, whereas Vectashield-mounted sections allows the visualization of the labels only in superficial zones of the sections close to the coverslip. Immunolabelling was carried out in a floating manner and labelling should thus be observed throughout the section even in Vectashield mounted preparations. Correct labelling of the opposite site was verified by turning the section (unpublished data). As shown in orthogonal views (Fig. 4C, 4D), while Vectashield-mounted sections display a poor resolution of the labelling, as observations are made deeper in the section, this is not the case with CFM3-mounted sections, which clearly display a very high resolution of labelling, with excellent and homogeneous sensitivity, throughout the thickness of the sections. Indeed, only CFM3 allows a satisfactory visualization of the thin (200 nm diameter) densely packed axons in both longitudinal and orthogonal views (Fig. 4A, 4C). A maximum intensity projection of 8 sections illustrates the high quality of images obtained from CFM3-mounted sections in which individual axons can be delineated (Fig. 4E). In contrast, Vectashield-mounted sections retrieved satisfactory resolution only in the few first μm of tissue depth (Fig. 4F). Since Peripherin localizes in the olfactory nerve layer with a distinct spatiotemporal pattern, with differential localization along these axons in the outer and inner olfactory nerve layer [15], and since in the transgenic mice GFP is expressed only in a subset of olfactory axons [12, 13], we expected to observe individual axon profiles expressing either marker, and some both. Using CFM3, regardless of the small diameter of olfactory axons, close to the limit of resolution of light microscopy, we can clearly resolve 3

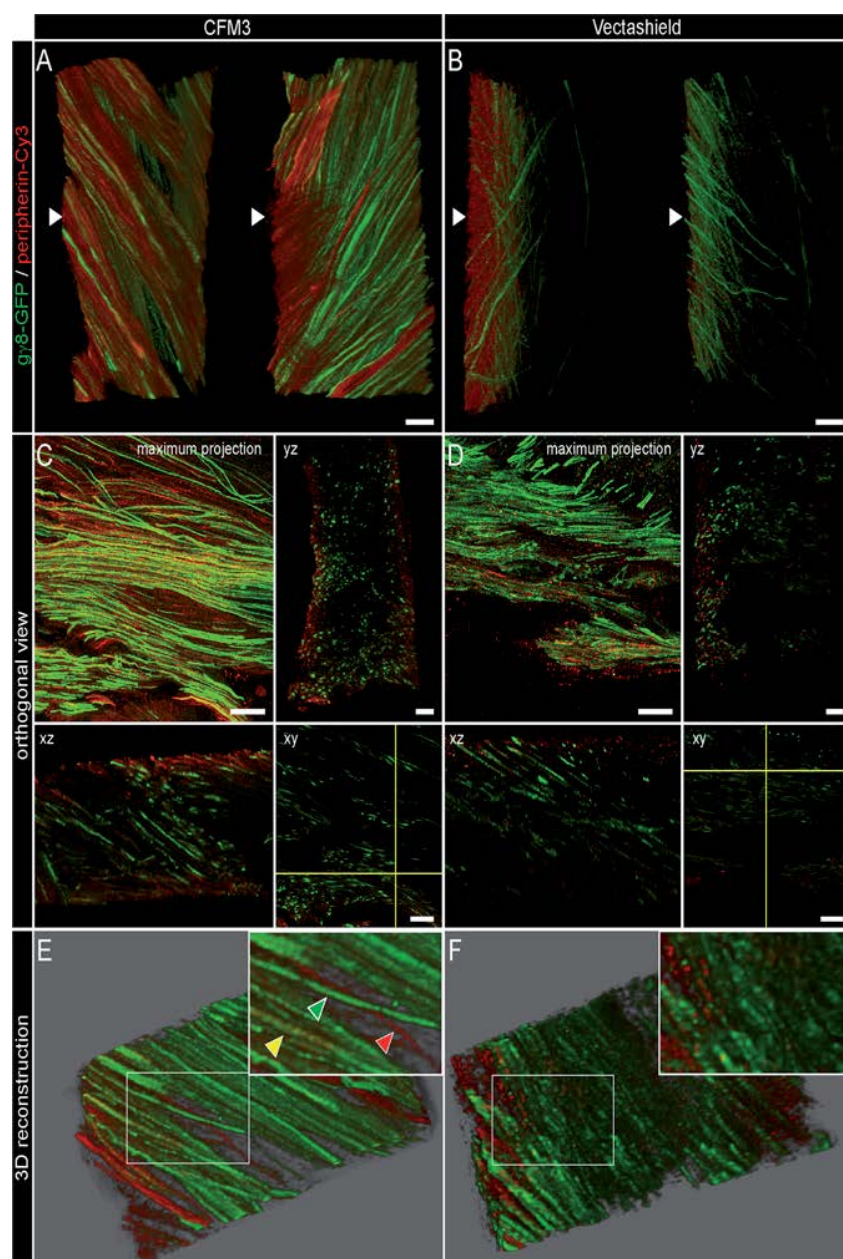


Fig 4. Improvement of axial resolution in fixed mouse olfactory bulbs. Fifty-micron thick vibratome sections of olfactory bulb from adult transgenic mice (Gg8-TTA x TetO^{M72iresGFP}) were processed for double immunofluorescence detection of GFP (green) and Peripherin (red) and mounted subsequently with CFM3 (A, C, E) or Vectashield (B, D, F). Confocal datasets were deconvolved. (A, B) 3D-reconstruction side view of characteristic z-stacks of brain sections mounted in CFM3 (A) or Vectashield (B) with the coverslip position on the left (arrowhead). (C, D) Orthogonal slices of z-stacks taken from sections mounted in CFM3 (C) or Vectashield (D) to demonstrate axial resolution and signal intensity throughout a single section (x, y-view, x, z-view and y, z-view) and in a maximum projection of 20 images (maximum projection). (E, F) 3D maximum projection of 8 confocal sections through olfactory bulb slices mounted in CFM3 (E) or Vectashield (F), with the insert showing a zoomed view. Note that in brain sections mounted in CFM3, 3 categories of axons can be easily distinguished: GFP+/peripherin- axons (green arrowhead), GFP-/peripherin+ axons (red arrowhead), and GFP+/peripherin+ axons (yellow arrowhead). The images obtained using Vectashield do not allow such a clear distinction between these differently labelled subpopulations of axons. Scale bars = 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0121096.g004

categories of axons: GFP+/peripherin- (green) axons, GFP-/peripherin+ (red) axons, and GFP +/peripherin+ (yellow) axons (Fig. 4E).

Our results clearly show that only CFM3-mounted sections allow excellent in depth imaging (Fig. 4A), and optimal and constant axial resolution throughout the entire thickness of the 50 μm sections (Fig. 4C, 4E). In addition, CFM3 demonstrated its full suitability for co-localization purposes, even at this 200 nm scale, throughout the entire thickness of the sections (Fig. 4E, inset).

5. Improvement of axial resolution when imaging a fluorescent protein

In order to estimate the loss of intensity at different depths of the tissue, sections with homogeneous distribution of fluorescence are required. We thus used cortical sections from VGLUT1-*venus* knock-in mice, in which the gene coding synaptic marker VGLUT1 is fused with gene coding fluorescent protein Venus, so all presynaptic boutons expressing VGLUT1 are fluorescent [9]. Since the density of VGLUT1-positive synapses within a layer of the neocortex is homogenous [16], we could estimate the signal intensity profile through section depth. We imaged z-stacks of 100 μm sections of fixed brain, mounted in CFM3, Vectashield and Mowiol (Fig. 5). VGLUT1 positive presynaptic boutons are blobs of 300 to 900 nm diameter and are evenly distributed through the depth of the section. Subsequent 3D-reconstructions show that depth penetration is best in CFM3 mounted sections, where well resolved synaptic boutons are observed throughout the section until a depth of 80 μm (Fig. 5A). In Vectashield mounted sections synaptic boutons are observed until a depth of 50 μm , and in Mowiol mounted sections

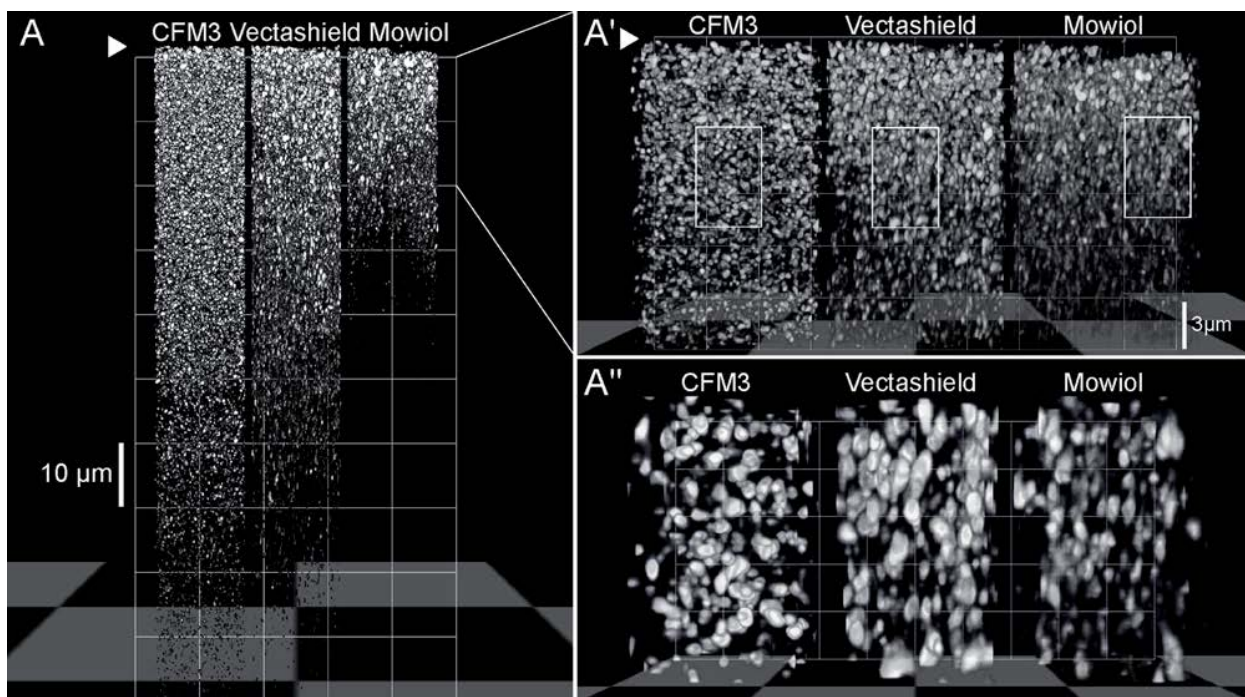


Fig 5. Depth penetration and resolution improvement in VGLUT1-Venus mouse brain slices. 100 μm vibratome sections of brain of adult transgenic mice (VGLUT1^{Venus}) were mounted in CFM3, Vectashield or Mowiol and imaged using the 514 nm laser line. Imaging was carried out using an optimal z-section. 3D-reconstructions of the entire z-stack (A) with the coverslip position at the top (arrowhead) and the first 20 μm (A') of VGLUT1^{Venus}-labelled synaptic boutons were carried out to demonstrate depth penetration in the different media. (A'') is a magnified view of the insert in (B) showing synaptic boutons in a depth of 5–15 μm . Note that the boutons mounted in Vectashield appear elongated in comparison to CFM3 mounted sections. Scalebars are 10 and 3 μm .

doi:10.1371/journal.pone.0121096.g005

depth penetration does not exceed 30 μm . We then monitored synaptic bouton shape throughout the first 30 μm of the sections (Fig. 5A') where we observe that in CFM3-mounted sections the shape of the boutons is well preserved along the z-axis and that the boutons are well resolved. In Vectashield and Mowiol mounted sections boutons appear elongated already in a depth of 5–15 μm (Fig. 5A', 5A'') and they appear to be less well resolved.

Discussion

Using CFM3, a commercially available mounting medium with a refractive index of 1.518, which matches exactly the refractive index of the glass-oil immersion system, we report a considerable improvement of axial resolution when imaging fixed samples in depth with confocal microscopy.

It has been shown that the axial PSF broadens and that its intensity profile decreases drastically with penetration depth when a mismatch between the glass-oil immersion system and the mounting medium and sample occurs, whereas lateral resolution remains unaffected [4, 5, 6]. In those studies, comparisons between a perfectly matched systems (immersion oil) and mismatched systems with air, glycerol ($n = 1.480$), or water ($n = 1.330$) have been carried out. It has been shown that aberrations can be avoided and fluorescence collection optimised only when refractive indices are matched correctly.

Staudt and co-workers have proposed the use of 2,2'-Thiodiethanol (TDE), a water-miscible and tunable mounting medium to obtain an optimally matched system to mount cells [8]. Although excellent results can be achieved with TDE, it should be noted that its preparation requires pH adjustment and its hygroscopic property renders it instable unless stored in controlled water-free environment [8]. On the other hand, the ready-to-use, stable CFM-3 ensures reproducible results. One important property a mounting medium should fulfill is a full compatibility with all fluorochromes. TDE is based on sulfides, while CFM is based on sulfoxides. It is known that unlike sulphides, sulfoxides show little tendency to quench excited singlet (and hence fluorescence) and triplet states because of their higher oxidation potential [17]. Thus, while the use of TDE is restricted [8], CFM-3 is compatible with most fluorochromes.

We compared the impulse response of the confocal system by measuring the PSF with fluorescent sub-resolution beads mounted in CFM3, with a high refractive index equal to glass ($n = 1.518$) and other commercially available mounting media with refractive indices below 1.500, such as Vectashield ($n = 1.458$). We observed indeed, that in the perfectly matched system (CFM3) the axial resolution remains invariant over the complete working distance of the objective. However, in our experimental situation, we observe a decrease in resolution by a factor 2 in a depth of 58 μm for the mismatched system using Vectashield and a 1.4 NA objective. It has been assumed, based on theoretical results, that the axial resolution decreases by a factor 1.2 per 10 μm when using a 1.3 NA objective and supposing a refractive index of 1.470 [4]. This would lead to 1.8 μm axial resolution at 60 μm depth and thus to an overall threefold decrease in axial resolution when using 170 nm fluorescent beads, which is in a comparable range as our experimental results.

We observed that fixed mouse brain sections become immediately transparent when plunged into CFM3-mounting medium, having a refractive index of 1.518. However, when using CFM3 variants with a refractive index varying by 3 or 4 in the last decimal point, brain sections remained slightly opaque and image contrast was preserved, when using Hoffmann contrast mode. Refractive index tuning was carried out by adjusting the concentrations of water and glycerol in order to exclude that other components of the mounting medium have an effect on transparency. One of the mechanisms responsible for the observed loss of contrast might thus be the matching of the refractive indices between the medium, which replaces the

water, and cellular components such as macromolecular complexes as it has been described for some optical clearing agents [18]. The refractive index of fresh mouse brain has been studied by various methods and lies between 1.355 and 1.400 [19, 20, 21]. To our knowledge, no refractive index data is available for the fixed mouse brain. In flow cytometry, an increase in refractive index upon fixation is used to improve light scattering measurements helping to discriminate between cell types [22]. Furthermore, it has been shown by near field penetrating optical microscopy, that alcohol or aldehyde fixation raises the refractive index of cells from 1.350 to over 1.520 [3]. In addition, optical clearing protocols relying on refractive index matching for the mouse brain are based on high refractive index substances such as urea or fructose [23, 24]. Finally, we observed that the axial resolution measured with beads in CFM3-embedded mouse brain sections remained constant until 60 μm imaging depth. However, a considerable loss of resolution in the mismatched system (Vectashield) occurred already in a depth of 20 μm . Spatial invariance of the PSF in the matched system hints to the absence of spherical aberration and corroborates our suggestion that CFM3 ($n_i = 1.518$) is very close to the refractive index of the macromolecular components of the fixed mouse brain.

We then compared the performance of CFM3 and Vectashield media on 50 μm thick, fixed, immuno-labelled mouse brain vibratome sections. We demonstrate that we can image densely packed, thin axons with a diameter of 200 nm with excellent resolution in all three dimensions when using CFM3-medium. This was achievable throughout the entire thickness of the 50 μm thick vibratome sections used here, making it now possible to assess molecular and organizational features of these axons that were hardly accessible without the use of electron microscopy at the light microscope level before [11]. In Vectashield mounted samples, a sufficient and neat immuno-fluorescence signal of the brain sections can be observed until a depth of 25 μm , however, further depth penetration seems to be impaired due to spherical aberration.

We performed confocal microscopy on thick brain sections (100 μm) densely labelled with VGLUT1^{venus}. VGLUT1-boutons were properly imaged up to a depth of 80 μm . However, we observed a slight reduction in the intensity of the fluorescence signal along the z-axis. This may

Table 1. Comparison of mounting media.

Mounting medium	Manufacturer	Refractive index	pH	Base compound	Fluorophore compatibility*
2,2'-Thiodiethanol	Sigma-Aldrich, France	1.518	6.5	2,2'-Thiodiethanol	most organic dyes and fluorochromes, RFP, however causes strong GFP quenching (8)
CFM-1	Citifluor Ltd., UK	1.515	7.5	glycerol-PBS-based	nd
CFM-3	Citifluor Ltd., UK	1.518	6.5	glycerol-based	DAPI, Hoechst, Alexa and Cyanine dyes, Venus, GFP [#] , Tomato, mCherry
Vectashield H-1000	Vector Laboratories Ltd., UK	1.454	nd	glycerol-based	fluorescein, rhodamine, Texas Red, AMCA, DyLight fluorescent dyes and other fluorescent reagents such as Cy3, Cy5, Alexa Fluor 488, and Alexa Fluor 594. GFP, RFP, YFP
Prolong Gold	ProLong Gold	1.390–1.460 depending on curing time	nd	glycerol-based	most organic dyes, however, fluorescent proteins less well preserved
Fluoromount-G	Southern Biotechnology	1.400	7.4	acrylate-PBS	most organic dyes
Mowiol Tris MWL 4–88	Citifluor Ltd., UK	1.410–1.490	9.5	polyvinyl alcohol	most organic dyes

*fluorochrome compatibility was experimentally evaluated only for CFM3, data for other mounting media were taken out of the manufacturers datasheets.

[#] GFP shows enhanced photobleaching in CFM3

doi:10.1371/journal.pone.0121096.t001

be due to two phenomena: Firstly, brain is a strongly scattering tissue and furthermore the labelling density of VGLUT1 is very high. This may lead to light scattering of the fluorescent signal in the volume and thus to less photons that reach the detector. Secondly, Venus fluorescent protein seems to be slightly more sensitive to photo bleaching in CFM3 mounting medium compared to Vectashield or Mowiol mounting medium (data not shown). Increased photo bleaching of fluorescent proteins has been already observed for other high refractive index mounting media [8] as well as for Prolong Gold (Table 1). However, although photo-bleaching was less pronounced in Vectashield or Mowiol mounted sections, depth penetration was already impaired at 50 and 30 μm , respectively, and axial resolution of the synaptic boutons was only appropriate in the first 20 μm and decreased rapidly afterwards.

Conclusions/Perspectives

CFM3-mounting medium provides an important benefit to confocal imaging of fixed samples with a high numerical aperture lens because it matches exactly the refractive index of the glass-oil system. Here, we show that CFM3 matches the refractive index of fixed mouse brain sections, which become completely transparent when mounted into this medium. Refractive index matching is particular important to avoid spherical aberration and thus improve axial resolution and signal strength of the confocal system in depth. Furthermore, spatial invariance of the PSF in depth is also crucial to improve deconvolution, since axial shift invariance is assumed in most algorithms [25].

CFM3 is compatible with various organic fluorochromes and the fluorescent protein Venus. Preliminary results show that a variety of other fluorescent proteins are also compatible with this mounting medium, even though photo bleaching may occur especially with GFP (Table 1). We are currently investigating new variants of CFM-media and their compatibility with various fluorescent proteins.

Materials and Methods

Mounting media

We compared seven mounting media with refractive indices below and above $n_i = 1.500$, to test different refractive index mismatch conditions. Refractive indices for non-hardening mounting media were verified at 21°C using a refractometer (Pal-RI, Cat.-number: 3850, ATAGO, Japan) (Table 1).

Mounting solutions below $n_i = 1.500$ were Vectashield (Vector laboratories) with a measured refractive index of $n_i = 1.454$, Fluoromount-G (Southern Biotech Assoc, $n_i = 1.389$), Prolong Gold (Life Technologies), Mowiol (Tris-MWL 4–88, Citifluor) and a glycerol/water-mixture ($n_i = 1.390$). Following manufacturer's recommendation, curing of the Prolong was carried out at room temperature for 48h so its refractive index increases and stabilizes around $n_i = 1.440$. The refractive index of Tris-MWL 4–88, a mixture of Mowiol, Tris and glycerol/water seems to range between 1.410 and 1.490. The refractive index of many sulfoxides such as methyl phenyl sulfoxide is quite high ($n_i = 1.5775$). The use of these and related compounds has been explored in an attempt to produce a widely applicable mounting medium (R S Davidson UK Patent 2006 GB2419427). Two of those mounting media above $n_i = 1.500$ were glycerol-based CFM1 (Citifluor, $n_i = 1.515$) and CFM3 (Citifluor, $n_i = 1.518$) containing propylgallate as an antifadent. Furthermore, 2,2'-Thiodiethanol (Sigma) has been prepared as described in [8] to reach a refractive index of $n_i = 1.518$. CFM3-variants with refractive indices tuned from 1.390–1.522 were produced by varying the amount of water and glycerol.

Preparation of Sub-resolution fluorescent beads and Experimental setup for evaluating the axial resolution in depth

Fluorescent beads (PS-Speck, Lifetechnologies), of a diameter of 170 nm, and loaded with yellow-green and orange fluorescent dye, were diluted in water (1/800 v/v). Drops of the water-diluted sample were put on the surface of the coverslip (Menzel Glaeser #1.5, Agar scientific) or slide and air-dried. Beads were then mounted with a drop of mounting medium. Two experimental setups for evaluating axial resolution in depth were designed. First, fluorescent beads were mounted on coverslips and slides that were separated by one or two layers of adhesive tape (Scotch, 3M) with a nominal thickness of 58 μm and the volume filled with a drop of the respective mounting medium (Fig. 1A). Secondly, orange fluorescent beads were mounted on coverslips and slides, and mouse brain slices of different thickness (15, 30, 60 μm) incubated in CFM3 or Vectashield were inserted in between (Fig. 1B).

Confocal laser scanning microscopy

8-bit Images were collected using a Leica 63x oil immersion objective (HCX Plan APO CS, NA 1.4, working distance 0.14 mm) with an inverted Leica laser-scanning confocal microscope TCS SP5 II (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) equipped with a GaAsP hybrid detection system at a sampling rate of 60 nm in x,y and 200 nm in z-direction. Fluorochromes were detected using laser lines 488 nm and 514 nm. Imaging was performed in a temperature-controlled room at 21°C.

Image acquisition of beads

Bead images were obtained as in [26] with the following modifications. GaAsP gain was set to 16% and the laser power adjusted so that the signal occupied the full dynamic range of the detector, but saturated voxels were carefully avoided. Beads were imaged starting and finishing the stack at least 5 μm below and above the bead centre. Beads were visually checked and improper stacks were discarded before determining the microscope PSF. At least eight imaged beads were registered and averaged in order to increase the SNR for deconvolution. Measured PSFs presented in Figs. 2 and 3 show representative beads displayed on the same logarithmic scale so that the low intensity detail characteristics of diffraction patterns was enhanced.

Data analysis

Determination of the lateral and axial resolution was carried out with the ImageJ-based MetroloJ plugin for ImageJ [27, 28]. The plugin generates maximum intensity projections of the stack along the x, y and z-axis resulting in 1D intensity profiles. The (x, y) coordinates of the maximum intensity pixel (mip) are then collected. A x,z cross-section is generated along a line passing through the previously determined 2D mip. From this image, the z coordinate of the mip is defined. The z slice is set to the z mip coordinate. The x profile and y profile are collected along the line passing through the mip. The z profile is collected on the x,z view, along the line passing through the mip. All three profiles are fitted to a Gaussian curve, using ImageJ's built-in curve fitting function. The full width at half maximum (FWHM) of the gauss curve is calculated for each profile, based on the parameters retrieved from the fitting.

Deconvolution and image treatment

Confocal images of biological data of Figs. 4 and 5 were deconvolved with the Huygens 3.7 software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) using a measured PSF (see above) and the Classical Maximum Likelihood Estimation algorithm with 100 iterations. Signal-to-

noise ratios (SNR) lower than 20 or up to 50 are recommended by the manufacturer for noisy confocal images or low noise wide-field images. Since we used a confocal microscope with a low noise detector, we tested signal to noise ratios (SNR) of 15, 17, 19, 21 and 25 and visually inspected the results. A signal to noise ratio of 19 gave best results after visual inspection of the raw versus the deconvolved images. In images of Fig. 4 brightness and contrast were adjusted equally for all images after deconvolution and before 3D reconstruction, orthogonal slicing and volume rendering using ImageJ [27].

Preparation of mouse brain sections

Adult Gg8-TTA x TetO-M72iresGFP mice [10, 11] and VGLUT1^{venus} mice [9] were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) and fixed by intracardiac perfusion of 4% paraformaldehyde in 0.12 M phosphate-buffer saline (PBS), pH 7.4. The brain was removed, then postfixed for 3 h in the same fixative and kept in PBS at 4°C until vibratome sectioning. The olfactory bulbs of Gg8-TTA x TetO-M72iresGFP mice were cut in the frontal plane, and processed for immunolabeling. Frontal sections of VGLUT1^{venus} mice were directly observed since these mice express synaptic marker VGLUT1 fused to the fluorescent protein Venus. Sections of various thicknesses were collected serially in PBS. For their mounting, sections were incubated for 5 minutes in the respective mounting medium and mounted directly on the coverslip. Coverslips were then mounted on slides and exceeding mounting medium was squeezed out by tapping onto the coverslip. Confocal x,z-scans were performed to make sure that the brain sections were positioned directly adjacent to the coverslip.

Animal care was conducted in accordance with standard ethical guidelines (NIH publication no. 85–23, revised 1985 and European Committee Guidelines on the Care and Use of Laboratory Animals 86/609/EEC), and the experiments were approved by the local ethic committee “Comité d’Ethique en Expérimentation Animale Charles Darwin C2EA–05” (Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, Paris, France).

Immunocytochemistry

Sections were blocked for 1 h in PBS containing 0.25% Triton-X, 0.2% gelatine, 0.1% sodium azide and lysine (0.1 M) before applying primary antibody in PBS containing 0.25% Triton-X100, 0.2% gelatin, 0.1% sodium azide overnight on floating sections. Primary antibodies were chicken anti GFP (1/500, Aveslab) and rabbit anti-Peripherin (1/100, Charles Greer’s gift).

Sections were washed in PBS containing 0.25% Triton-X, and then incubated for 2 h with species-specific secondary antibodies, donkey anti-chicken linked to Alexa-488 (1/400; Invitrogen) and donkey anti-rabbit linked to Cy3 (1/200, Jackson) in PBS containing 0.25% Triton-X100, 0.2% gelatine, 0.1% sodium-azide. The sections were thereafter washed several times in PBS and mounted in CFM3 or Vectashield.

Acknowledgments

This work was supported by ANR (AxonGuidOR, #2010-BLAN-1401-01) and NIH (#1RO1DC012441) Grants to AT. The group of A. Trembleau is affiliated with the Bio-Psy Laboratory of Excellence. The authors thank Drs. M. Nguyen and N. Ryba for generously providing the mouse lines, Dr. C.A. Greer for providing the anti-Peripherin antibody and Dr. E. Beaurepaire for helpful discussions. Confocal work was carried out at the Institute of Biology Paris-Seine Imaging Facility that is strongly supported by the “Conseil Régional Ile-de France”, the French national research council (CNRS) and Sorbonne University, UPMC Univ Paris 06.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SB AT. Performed the experiments: CF JFG NH MDS RS VC MPM. Analyzed the data: JFG SB. Contributed reagents/materials/analysis tools: RSD. Wrote the paper: SB AT.

References

1. Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, et al. (2007) Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*. 1; 450 (7166):56–62. PMID: [17972876](#)
2. Schermelleh L, Heintzmann R, Leonhardt H (2010) A guide to super-resolution fluorescence microscopy, *J Cell Biol*, 190, pp. 165–175 doi: [10.1083/jcb.201002018](#) PMID: [20643879](#)
3. Strasser SD, Shekhawat G, Rogers JD, Dravid VP, Taflove A, et al. (2012) Near-field penetrating optical microscopy: a live cell nanoscale refractive index measurement technique for quantification of internal macromolecular density. *Opt Lett*. 37(4): 506–8. doi: [10.1364/OL.37.000506](#) PMID: [22344088](#)
4. Hell S, Reiner G, Cremer C, Stelzer K (1993) Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index. *J Microscopy*. 169, Pt 3, pp391–405
5. Diaspro A, Federici F, Robello M (2002) Influence of refractive index mismatch in high-resolution three-dimensional confocal microscopy. *Appl Opt*. 41 (4): 685–90. PMID: [11993914](#)
6. Egner A, Hell SW (2006) Aberrations in confocal and Multi-photon Fluorescence Microscopy induced by refractive index mismatch. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, third edition, Springer, New York, Pages 404–412
7. Booth MJ, Neil MA, Juskaitis R, Wilson T (2002) Adaptive aberration correction in a confocal microscope. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 (9): 5788–92. PMID: [11959908](#)
8. Staudt T, Lang MC, Medda R, Engelhardt J, Hell SW (2007) 2,2'-thiodiethanol: a new water-soluble mounting medium for high-resolution optical microscopy. *Microsc Res Tech*. 70 (1): 1–9. PMID: [17131355](#)
9. Herzog E, Nadrigny F, Silm K, Biesemann C, Helling I et al. (2011) In vivo imaging of intersynaptic vesicle exchange using VGLUT1 Venus knock-in mice. *J Neurosci*. 31 (43): 15544–59. doi: [10.1523/JNEUROSCI.2073-11.2011](#) PMID: [22031900](#)
10. Hoffman R, Gross L (1975) Modulation Contrast Microscope. *Applied Optics*, Vol. 14, Issue 5, pp. 1169–1176 doi: [10.1364/AO.14.001169](#) PMID: [20154791](#)
11. Treloar HB, Feinstein P, Mombaerts P, Greer CA (2002) Specificity of glomerular targeting by olfactory sensory axons. *J Neurosci*. 22 (7): 2469–77. PMID: [11923411](#)
12. Nguyen MQ, Zhou Z, Marks CA, Ryba NJ, Belluscio L (2007) Prominent roles for odorant receptor coding sequences in allelic exclusion. *Cell*. 131(5): 1009–17. PMID: [18045541](#)
13. Nguyen MQ, Marks CA, Belluscio L, Ryba NJ (2010) Early expression of odorant receptors distorts the olfactory circuitry. *J Neurosci*. 30 (27): 9271–9. doi: [10.1523/JNEUROSCI.1502-10.2010](#) PMID: [20610762](#)
14. Gorham JD, Ziff EB, Baker H (1991) Differential spatial and temporal expression of two type III intermediate filament proteins in olfactory receptor neurons. *Neuron*. 7 (3): 485–97. PMID: [1910790](#)
15. Akins MR, Greer CA (2006) Axon behaviour in the olfactory nerve reflects the involvement of catenin-cadherin mediated adhesion. *J Comp Neurol*. 20 499(6): 979–89. PMID: [17072833](#)
16. Fremeau RT Jr, Voglmaier S, Seal RP, Edwards RH. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *Trends Neurosci*. 27(2):98–103. PMID: [15102489](#)
17. Beecroft RA, Davidson RS, Goodwin D, Pratt JE (1983) "Quenching of singlet and triplet excited aromatic hydrocarbons by sulphides" *Tetrahedron* 40 (21), 4487–4496
18. Zhu D, Larin KV, Luo Q, Tuchin VV (2013) Recent progress in tissue optical clearing. *Laser Photon Rev*. 7 (5): 732–757. PMID: [24348874](#)
19. Lue N, Choi W, Popescu G, Yaqoob Z, Badizadegan K, et al. (2009) Live cell refractometry using Hilbert phase microscopy and confocal reflectance microscopy. *J Phys Chem A*. 113 (47): 13327–30. doi: [10.1021/jp904746r](#) PMID: [19803506](#)
20. Binding J, Ben Arous J, Léger JF, Gigan S, Boccara C, et al. (2011) Brain refractive index measured in vivo with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy. *Opt Express*. 19 (6): 4833–47. doi: [10.1364/OE.19.004833](#) PMID: [21445119](#)

21. Sun J, Lee SJ, Wu L, Samtinoranont M, Xie H (2012) Refractive index measurement of acute rat brain tissue slices using optical coherence tomography. *Opt Express*. 20 (2): 1084–95. doi: [10.1364/OE.20.001084](https://doi.org/10.1364/OE.20.001084) PMID: [22274454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22274454/)
22. Shapiro HM (2005) Practical flow cytometry 4th edition, chapter 7, John Wiley & Sons, page 303
23. Hama H, Kurokawa H, Kawano H, Ando R, Shimogori T, et al. (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci*. 14 (11): 1481–8. doi: [10.1038/nn.2928](https://doi.org/10.1038/nn.2928) PMID: [21878933](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21878933/)
24. Ke MT, Fujimoto S, Imai T (2013) SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci*. 16(8): 1154–61. doi: [10.1038/nn.3447](https://doi.org/10.1038/nn.3447) PMID: [23792946](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792946/)
25. Sibarita JP (2005) Deconvolution microscopy, *Adv. Biochem. Engin./Biotechnol.* 95: 201–243
26. Heck N, Betuing S, Vanhoutte P, Caboche J (2012) A deconvolution method to improve automated 3D-analysis of dendritic spines: application to a mouse model of Huntington's disease. *Brain Struct Funct*. 217 (2): 421–34. doi: [10.1007/s00429-011-0340-y](https://doi.org/10.1007/s00429-011-0340-y) PMID: [21822732](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21822732/)
27. Collins TJ (2007) ImageJ for microscopy. *Biotechniques*. 43 (1 Suppl): 25–30. PMID: [17936939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17936939/)
28. Matthews C, Cordelieres FP (2010) MetroloJ: an ImageJ plugin to help monitor microscopes health. *ImageJ User & Developer Conference proceedings 2010*