



Analyse morphométrique et modélisation d'épines des dendrites basales de neurones pyramidaux des couches 2-3 du cortex somato-sensoriel : une étude en microscopie corrélative optique-électronique

Olivier Gemin

► To cite this version:

Olivier Gemin. Analyse morphométrique et modélisation d'épines des dendrites basales de neurones pyramidaux des couches 2-3 du cortex somato-sensoriel : une étude en microscopie corrélative optique-électronique. Neurosciences. Université Paris sciences et lettres, 2019. Français. NNT : 2019PSLEE039 . tel-02942738

HAL Id: tel-02942738

<https://theses.hal.science/tel-02942738>

Submitted on 18 Sep 2020

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

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



THÈSE DE DOCTORAT
DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure

**Analyse morphométrique et modélisation d'épines
des dendrites basales de neurones pyramidaux
des couches 2-3 du cortex somato-sensoriel :
étude en microscopie corrélative optique-électronique**

Soutenue par

Olivier GEMIN

Le 20 décembre 2019

Ecole doctorale n° 158

**Cerveau-Cognition-
Comportement**

Spécialité

Neurosciences

Composition du jury :

Valentin NÄGERL Professeur, IINS	<i>Président et Rapporteur</i>
Lydia DANGLLOT Chargée de recherche, IPNP	<i>Rapporteur</i>
Rosa COSSART Directrice de recherche, Inmed	<i>Examinatrice</i>
Anna SARTORI-RUPP Ingénieure de recherche, Institut Pasteur	<i>Examinatrice</i>
Graham KNOTT Maître de recherche, EPFL	<i>Examineur</i>
Antoine TRILLER Directeur de recherche, IBENS	<i>Directeur de thèse</i>
Cécile CHARRIER Chargée de recherche, IBENS	<i>Invitée</i>

Aux Oiseaux,
Aux souvenirs Nantais,

*« Qui ne sait se borner ne sut jamais écrire »
Nicolas Boileau (1636-1711)*

REMERCIEMENTS

Merci à Antoine Triller de m'avoir accueilli dans son laboratoire, et d'avoir dirigé ma thèse. J'ai la ferme intention de porter ta passion pour la microscopie électronique de par le monde, aussi vaste et petit soit-il. Tes enseignements de rigueur intellectuelle sont venus tempérer à point nommé ma candeur indéboulonnable. Merci pour nos précieux exergues de partage littéraire et musical, et pour le sel de tes récits.

Merci à Cécile Charrier — pour ton soutien sans faille au cours de mes cinq ans à l'IBENS. Merci de m'avoir accueilli, formé et réformé, malgré ma rétivité malade à toute espèce de concision. Je resterai toujours profondément admiratif de tes efforts démesurés et de ton infinie patience.

Remercierai-je assez Philippe Rostaing de m'avoir tant transmis, au quotidien ? Des arcanes de l'EM aux mystères de la plomberie, et les leçons d'humanité. Un immense merci de m'avoir accueilli : être ton apprenti m'a fourni une belle raison d'être et de travailler. Je souhaite ta retraite enchantée, au chaud dans ta manipe qui marche, chéri par les enfants qui poussent, ou par les routes, à dos de bolide.

Je remercie chaleureusement Lydia Danglot et Valentin Nägerl pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci à Rosa Cossart, Anna Sartori-Rupp et Graham Knott pour m'avoir fait l'honneur de participer au jury de thèse.

Je remercie Serge Marty et Xavier Heiligenstein pour leur suivi, leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma thèse.

Je remercie NIKON France d'avoir financé ces travaux pendant trois ans dans le cadre d'une convention CIFRE, et le labex MemoLife pour la quatrième année.

Merci à Philippe Rideau pour m'avoir tout simplement permis de commencer cette thèse. Merci pour ta confiance, ton soutien et tes encouragements. Merci à Christel Brongnart pour son soutien constant.

Merci à Rémi Leborgne et Jean-Marc Verbavatz pour m'avoir accordé leur confiance, et laissé toute latitude à mon travail lors de mes séjours à l'Institut Jacques Monod. Échanger avec vous était aussi fructueux qu'enrichissant. Je garderai de très bons souvenirs de ces moments à l'IJM.

Merci à Liesbeth Hekkings pour ses précieux conseils techniques.

Merci, Fée de Sol,
D'illuminer de tes ors
L'issue des tunnels.

Merci du fond du cœur au labo Triller ! Notre quotidien remuant était une belle épopée.

Dear lab, I love you all so much ! Our time together is an important part of me, now — a sixth, at least..?
I will always think dearly of it. Thanks for your infinite kindness and your Lust for knowledge.

Thanks Juan and Thanks Nora : we've started our days in the lab together, and we have trusted, aided, supported each other since the very beginning. I will undoubtedly miss you, so let us plan trips together as soon as can be !
(...who said "cave" ?)

Obrigadiiiiinhoooo Maria-la-microglia !!!!! Merci de déborder d'une joie inaltérable. J'admire ta bienveillance excessive, ton goût de vivre tel que rien ne t'égratine, et encore des tas d'autres choses. Un mot pour ton carnet de poche : Chapeau bas !

Un merci vibrant à Pablo : le dialogue stimulant de l'amitié sincère et du sobre travail a été si enrichissant que j'en reviens à peine. Merci pour nos fructueuses περιπατητικός et nos charmantes transitions de phases ; j'ai hâte de savoir ce que tu feras des années qui viennent.

ありがとうございました、Fumihiro ! I enjoyed each time we conversed together. I must say that I find very true what the lab song says about you. Let's keep in touch !

Merci à Astou pour ton professionnalisme hors pair, ton humeur au beau fixe
— que dis-je, un beau fixe ?... c'est une canicule ! Keep it up, et merci de tout cœur.

Merci à Stephanie, Joseph, Valentin, Jeanne, Amu, Matteo, Sabrina, Xavierzinho, Yasmine, Angela et Seba, Anastasia, Audric et Laura, celles et ceux qui sont passés par le 3ème étage, dont Lani pour la musique et Alex pour la danse. Merci à SPIBENS d'être rené de ses cendres pour nouer des liens translabos. Merci à Idriss et Auriane pour être exceptionnels. Merci à Jon pour les pizzas et le flegme.

Merci à Andréa, Alain et Christian, pour être charmants et bosseurs.

Merci à Sarah pour savoir faire toucher terre aux rêveurs les plus doux avec légèreté.

Merci à Bertrand Ducos et à Davis Stroebel pour ces discussions aussi plaisantes qu'inopinées. Merci à Nadège pour être indispensable. Merci à Hervé pour s'être fait poète avec une telle ferveur. Merci à tout le personnel de l'IBENS, et à ces collègues anonymes mais néanmoins souriants qui fabriquent les sciences, dans nos belles institutions. Merci aux belles institutions.

Une pensée pour Sylvie qui nous a quittés tôt.

Merci au Quatuor-Trio-Duo-Quatuor Charpak. La chaleur de nos liens m'émerveille.

À nous qui nous soutenûmes pendant toutes nos thèses ! Nuages de colophane.

Didine et Auguste, nos envols intérieurs vers le Beau, l'Ailleurs.

Merci aux Rouges-Gorges et aux Lardons, qui font germer, pousser, éclore la beauté nue d'être en vie. Merci à Tour-à-Tour, à Chouchouuuuuu!!, au COGE et aux cogistes, au Chemical Klezmer, au Funk130, pour toutes nos jubilations vibratoires. Merci aux amis. Merci aux PC1 de tous poils et plumages.

Merci à ma famille, que l'horizon, seul, sépare : Sylvie, Claude, Cécile, Enora, Estelle et Camille, Pierre, Paul et Florian, Nicolas, Vincent. Olivier. ... J'aime à voir nos noms ensemble !

Pensées pour mes trois grands-parents résidents des élans et des cœurs.

RÉSUMÉ

Les épines dendritiques sont des structures micrométriques qui couvrent les dendrites des neurones corticaux pyramidaux et reçoivent la grande majorité des contacts synaptiques excitateurs. La morphologie des épines régit la compartimentation des signaux synaptiques, module l'intégration dendritique et influence la fonction neuronale. En retour, l'ultrastructure des épines est régulée par l'activité neuronale en fonction de l'identité des partenaires synaptiques. La réorganisation des membranes post-synaptiques et de la morphologie des épines dendritiques au cours de la plasticité structurale est associée au stockage de l'information dans les circuits neuronaux. Par conséquent, caractériser l'influence de la morphologie ultrastructurale d'épines identifiées sur l'intégration dendritique représente un enjeu majeur.

La microscopie optique (LM) permet de décrire la distribution subcellulaire des synapses et de caractériser leur composition moléculaire dans des cellules identifiées *in vivo*, mais l'impossibilité de combiner un grand nombre de sondes moléculaires fluorescentes différentes au sein d'un même échantillon, et la résolution limitée des méthodes de LM font obstacle à la description précise du nano-environnement synaptique. La microscopie électronique donne accès à l'ultrastructure des épines, mais permet rarement d'identifier le type cellulaire et la localisation subcellulaire des objets observés. Combiner ces deux approches en une méthode de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM) est nécessaire pour caractériser les structures qui sous-tendent l'intégration des signaux synaptiques. Cependant, malgré le développement récent de protocoles de CLEM 3D adaptés à l'étude de dendrites ciblées *in vivo*, quantifier les paramètres ultrastructuraux et la composition moléculaire d'épines identifiées demeure un défi technique. Dans ce contexte, l'objectif de mon travail de thèse a été de développer une approche de CLEM 3D pour réaliser l'analyse morphométrique des épines des dendrites basales des neurones pyramidaux des couches 2/3 du cortex somato-sensoriel de souris adultes.

Certaines de ces épines, dites doublement innervées (DiS), reçoivent un contact inhibiteur dont la fonction demeure inconnue. Nous avons utilisé les mesures réalisées en CLEM pour modéliser l'intégration de signaux synaptiques excitateurs et inhibiteurs en tenant compte des paramètres morphologiques exacts des épines étudiées, et suivant la localisation, spinale ou dendritique, du contact inhibiteur. Ces résultats nous ont permis d'une part de déterminer le degré de compartimentation des signaux électriques par des populations d'épines caractérisées *in vivo* et, d'autre part, de proposer un mécanisme par lequel un signal inhibiteur peut atténuer l'influx calcique produit dans l'épine par un signal excitateur sans amortir sa composante électrique, en fonction de l'intervalle entre ces deux signaux synaptiques. Ce mécanisme inédit de découplage voltage-calcium peut influencer la plasticité structurale.

RÉSUMÉ COURT

Les épines dendritiques reçoivent la majorité des contacts synaptiques excitateurs dans le cortex, et leur morphologie module la compartimentation des signaux synaptiques. L'objectif de ma thèse a été de développer une approche de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM) qui permette de quantifier les paramètres morphologiques d'épines dendritiques identifiées *in vivo*. J'ai utilisé la CLEM pour caractériser l'ultrastructure d'épines portées par les dendrites basales de neurones identifiés. Les mesures ont été utilisées pour paramétrer un modèle de l'intégration dendritique qui prenne en compte la diversité morphologique des épines. Ce modèle nous a permis de quantifier la proportion d'épines qui compartimentent effectivement les signaux électriques, et d'aborder la fonction des épines dites doublement innervées, qui reçoivent un contact inhibiteur dont le rôle demeure inconnu. Notre modèle fournit un mécanisme de signalisation spécifique des épines doublement innervées, où le signal inhibiteur atténue l'influx calcique produit dans l'épine par le signal excitateur sans amortir sa composante électrique, en fonction de l'intervalle entre ces deux signaux synaptiques, ce qui peut influencer la plasticité synaptique.

SHORT ABSTRACT

Dendritic spines receive most excitatory synaptic contacts in the cortex, and spine morphology shapes the compartmentalization of synaptic signals. The aim of my thesis has been to develop a correlative light-electron microscopy (CLEM) approach in order to quantify the morphological parameters of identified dendritic spines in intact cortical circuits. I used CLEM to characterize spine ultrastructure along basal dendrites of identified neurons. These measurements were used to constrain a model of dendritic integration. Our model enabled quantifying which proportion of reconstructed spines effectively compartmentalized electrical signals, and we used it to approach the function of a subset of spines that harbour a supernumerary inhibitory contact, the role of which is yet unknown. Our modeling effort unveils a signaling mechanism, prominent in dually-innervated spines, by which an inhibitory signal can attenuate the calcium influx generated in the spine head by an excitatory signal, while depolarization amplitude is unabated, which potentially impacts synaptic plasticity.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	17
Chapitre I. Bases de l'organisation des circuits corticaux	23
1. Neurones pyramidaux (PNs)	23
1.1. Morphologie des PNs	23
1.2. Organisation de l'innervation des PNs	25
2. Organisation des synapses	27
2.1. Bouton pré-synaptique	27
2.2. Fente synaptique	29
2.3. Membranes post-synaptiques	29
Chapitre II. Épines dendritiques et compartimentation des signaux synaptiques	34
1. Épines dendritiques	34
1.1. Anatomie des épines	34
1.2. Variabilité morphologique des épines	35
1.3. Plasticité structurale et fonctionnelle	37
2. Compartimentation biochimique	38
2.1. Signalisations enzymatiques	38
2.2. Diffusion moléculaire au travers des cous d'épines dendritiques	39
3. Compartimentation électrique dans les épines dendritiques	40
3.1. Éléments de modélisation électrique des neurones	41
3.2. Circuit équivalent à une épine dendritique	42
3.3. Controverse liée à l'ajustement du transfert du courant synaptique au soma	45
3.4. Régulation dynamique de la compartimentation électrique par les cous d'épine	47
4. Intégration dendritique	48
4.1. Propriétés passives et actives des dendrites	48
4.2. Inhibition axo-dendritique	49
4.3. Inhibition axo-spinale	49
4.3.1. Morphologie des épines doublement innervées (DiS)	49
4.3.2. Comportement dynamique des DiS	51
4.3.3. Fonctions supposées des DiS	51
Chapitre III. Apports de la microscopie corrélative optique-électronique	55
1. Approches de microscopie électronique	56
1.1. Formation d'image	56
1.2. Possibilités d'observation 3D	57
1.2.1. Tomographie électronique	57
1.2.2. Imagerie sériée	59

2. Approches de microscopie optique et super-résolutive	60
3. Protocoles de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM)	63
3.1. Protocoles de type "LM post-inclusion"	65
3.1.1. Cryo-microscopie	65
3.1.2. Préserver l'antigénicité ou la fluorescence lors de l'inclusion	66
3.2. Protocoles de type "LM pré-inclusion"	68
3.2.1. Cas des échantillons 2D	68
3.2.2. Cas des échantillons 3D — problème du repérage	69
3.2.2.1. Marquages à base de diaminobenzidine (DAB)	70
3.2.2.2. Introduction de repères fiduciaires extrinsèques	71
3.2.2.3. Repères fiduciaires intrinsèques	72
4. Corrélation d'image en CLEM	73
5. Développements technologiques nécessaires pour l'étude quantitative de synapses in vivo	75
RESULTATS	77
Chapitre I. Protocole "LM post-inclusion" : combiner LM plein champ et TEM en coupes sériées	78
1. Élaboration du protocole	78
1.1. Choix de la méthode de congélation haute pression (HPF)	78
1.2. Conséquences pratiques de la fixation par HPF	78
1.3. Choix de la modalité d'EM 3D	79
1.4. Ré-inclusion de coupes semi-fines observées en LM	80
2. Mise en œuvre et verrous techniques	80
3. Conclusions	83
Chapitre II. Protocole "LM pré-inclusion" : combiner microscopie confocale et SBEM	84
1. Élaboration du protocole	84
1.1. Stratégie de marquage fluorescent in vivo	84
1.2. Établissement du protocole CLEM "LM pré-inclusion"	86
2. Mise en œuvre et optimisation du protocole CLEM	88
2.1. Compatibilité LM/EM	88
2.2. Nano-repérage DAB	90
2.2.1. Motivations des développements réalisés	90
2.2.2. Capsule de confinement des coupes	90
2.2.3. Acquisitions LM multi-échelle	92
2.2.4. Calibration du marquage DAB	92
2.3. Recoupe chirale sub-millimétrique avant l'inclusion	95
2.4. Facilitation du protocole d'inclusion OTO	95
2.5. Coplanarité des plans d'observation LM et EM	96
2.6. Optimisation de la qualité d'acquisition SBEM	98
2.6.1. Optimisation des paramètres d'acquisition SEM	99
2.6.2. Inclusion minimale	101
2.7. Repérage de la ROI en SBEM grâce à l'acquisition LM	103

2.8. Programmation des ROI	106
2.9. Analyse des données SBEM	106
2.9.1. Retrouver la ROI dans le volume de données acquises	106
2.9.2. Segmentation et reconstruction 3D	108
2.9.3. Mesures morphométriques	109
2.10. Modélisation électrochimique à partir des données morphologiques	112
Chapitre III. Mise en oeuvre : étude de la signalisation électrique dans des DiS identifiées	114
1. Résumé de l'article	114
1.1. Problématique	114
1.2. Méthodologie	115
1.3. Résultats	115
1.4. Discussion	116
2. Conclusion	117
3. Épreuve d'article — «Morphologically constrained modeling of axo-spinous inhibition in the somato-sensory cortex ». Manuscrit en préparation. Gemin, O. et al.	117
DISCUSSION	179
I. Facilitation des protocoles de CLEM	181
II. Quantifications sub-synaptiques en CLEM super-résolutive	183
1. Super-CLEM en circuits intacts	183
1.1. Adaptation de la stratégie de marquage in vivo	183
1.2. Choix des marqueurs cytosoliques	184
2. Nano-domaines synaptiques	186
III. Lier l'ultrastructure aux fonctions biologiques	187
BIBLIOGRAPHIE	191
ANNEXES	217
ANNEXE 1 — Extrait de l'article : « Correlative light electron microscopy: Connecting synaptic structure and function. » Begemann, I., & Galic, M. (2016). FrontSynNsci.	218
ANNEXE 2 — Article : «Trans-synaptic signaling through the glutamate receptor delta-1 mediates inhibitory synapse formation in cortical pyramidal neurons.» Fossati, M., et al. (2019). Neuron	224
ANNEXE 3 — Poster : «Glycine receptor copy numbers and packing density at spinal cord synapses revealed by quantitative dual-colour super-CLEM.» Maynard, S. A. et al. (2019)	248

INTRODUCTION

Introduction

Les neurones sont des cellules excitables, polarisées et organisées en réseaux, qui reçoivent des milliers de contacts synaptiques excitateurs et inhibiteurs distribués le long de leur arborisation dendritique. La structure de l'arborisation dendritique gouverne l'intégration des signaux synaptiques pour contrôler la génération des potentiels d'action, qui se propagent dans l'axone et véhiculent l'information aux cellules ciblées par le neurone (Stuart & Spruston, 2015). Dans le cortex, la grande majorité des synapses excitatrices contacte des épines dendritiques, qui sont des protrusions dendritiques micrométriques spécialisées (Ramon y Cajal, 1899; Hersch & White, 1981; Harris & Weinberg, 2012) qui compartimentent les signaux synaptiques (Harvey et al., 2008; Yuste, 2013; Bailey et al., 2015; Yasuda, 2017). La morphologie des épines et la composition moléculaire des contacts synaptiques varient continuellement au cours du développement (Bhatt et al., 2009; Berry & Nedivi, 2017), en fonction de l'activité neuronale (Harvey & Svoboda, 2007; Bourne & Harris, 2011; Bell et al., 2014), et selon la région cérébrale et le type cellulaire. Par exemple, les épines des cellules de Purkinje, dans le cervelet, présentent typiquement des têtes sphériques et des cous étroits (Harris & Weinberg, 2012) tandis que les épines portées par les cellules granulaires du gyrus denté, dans l'hippocampe (Bosch et al., 2015), ou par les neurones pyramidaux (PNs), dans le cortex (Knott et al., 2006) ont des formes très diverses. De plus, la morphologie des épines est régulée différemment selon leur localisation subcellulaire dans les différents domaines de l'arborisation dendritique (Globus et al., 1973; Feldmeyer et al., 2006; Rajkovich et al., 2017) et au sein de dendrites particulières (Katz et al., 2009) en fonction de l'expression de protéines synaptiques, comme des complexes d'adhésion cellulaire cadhérine/caténine (Bian et al., 2015) ou certaines sous-unités des récepteurs glutamatergiques AMPA (Andrásfalvy et al., 2003; Shipman et al., 2013). En conséquence, pour comprendre l'intégration des signaux synaptiques, il est nécessaire de déterminer les paramètres morphologiques d'épines identifiées *in vivo*, et de composition moléculaire caractérisée.

La microscopie optique (LM) permet simultanément de décrire la distribution des synapses le long de dendrites ciblées de cellules identifiées génétiquement (Chen et al., 2012; Fossati et al., 2016), et de caractériser la composition synaptique à l'aide de sondes moléculaires fluorescentes (Dani et al., 2010; Tønnesen & Nägerl, 2013; Patrizio & Specht, 2016; Yang & Specht, 2019). La LM présente cependant des limites : d'une part, la résolution limitée des approches de LM ne permet pas de distinguer les complexes moléculaires, dont la taille varie souvent entre 0,1 et 10nm, et le diamètre des cous des épines est à la limite de résolution des approches d'optique super-résolutives (Huang et al., 2009). D'autre part, seul un petit nombre de sondes moléculaires différentes peuvent être combinées au sein d'un même échantillon, ce qui limite l'interprétation des résultats de LM monomodale (De Boer et al., 2015). De façon complémentaire, la microscopie électronique (EM) permet de décrire l'ultrastructure synaptique et dendritique (Rostaing et al., 2006; Knott et al., 2008; Burette et al., 2012; Harris & Weinberg, 2012; Tao et al., 2018; Chirillo et al., 2019), mais le faible champ de vue permet rarement

d'acquérir la localisation subcellulaire en EM monomodale (Begemann & Galic, 2016). L'identification du type cellulaire en EM requiert un marquage immunocytochimique (Knott et al., 2009; Bosch et al., 2015) ou un marquage intracellulaire à la diaminobenzidine (DAB) qui masque le détail ultrastructural des cellules observées (Martell et al., 2017). Comprendre les mécanismes d'intégration synaptique, requiert donc de combiner ces deux modalités d'imagerie dans une approche de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM), afin de conjuguer la spécificité cellulaire et la résolution subcellulaire de la LM à la résolution nanométrique de l'EM (Müller-Reichert & Verkade, 2014, 2017; Luckner et al., 2018). De nombreuses approches de CLEM ont été développées ces vingt dernières années pour faciliter l'observation de dendrites ciblées *in vivo* en CLEM (Begemann & Galic, 2016; Karreman, Hyenne, et al., 2016), mais quantifier de façon exhaustive les paramètres ultrastructuraux d'un grand nombre d'épines dendritiques identifiées dans des circuits corticaux intacts nécessite le développement et l'optimisation d'un protocole robuste dédié.

La première partie de mon travail de thèse a consisté à rendre possible l'utilisation combinée de la microscopie confocale et de l'EM volumétrique sur des tranches de cerveau de souris transfectées, afin d'acquérir la morphométrie d'épines dendritiques ciblées au sein de réseaux corticaux intacts. Cet effort de développement a permis d'atteindre plusieurs objectifs :

- Adapter les protocoles standards de préparation d'échantillon pour l'EM et la LM de manière à pouvoir visualiser l'ultrastructure d'épines identifiées dans des tranches de tissu cortical,
- Développer une méthode de repérage robuste afin de retrouver, en EM 3D, au sein d'un volume de tissu cortical, une région d'intérêt (ROI) observée en LM,
- Mettre en place un protocole d'analyse rigoureux pour segmenter et reconstruire chaque épine des dendrites ciblées, puis mesurer précisément leurs paramètres morphologiques.

La seconde partie de mon travail de thèse a consisté à mettre en œuvre l'approche CLEM optimisée pour acquérir la morphométrie et l'ultrastructure d'épines localisées sur les dendrites basales de neurones pyramidaux ciblés. Ces observations ont permis d'emblée de quantifier les particularités morphologiques des épines doublement innervées (i.e. contactées par une deuxième synapse, toujours identifiée comme inhibitrice) et/ou d'un appareil épineux — une spécialisation spinale du réticulum endoplasmique. Ensuite, j'ai travaillé en collaboration avec le Dr. Pablo Serna, post-doctorant affilié au Laboratoire de Physique de l'ENS, pour implémenter mes mesures dans un modèle de l'intégration dendritique afin de simuler le comportement électrique des épines au plus près des conditions *in vivo*. D'une part, acquérir la distribution statistique de la résistance électrique des épines reconstruites, encore inaccessible par mesure électrophysiologique directe (Bloodgood & Sabatini, 2005; Harnett et al., 2012; Tønnesen et al., 2014; Popovic et al., 2015; Beaulieu-Laroche & Harnett, 2018), nous a permis

Introduction

de déterminer l'ampleur de la compartimentation des signaux électriques le long des dendrites étudiées. D'autre part, nous avons simulé l'intégration de signaux synaptiques excitateurs et inhibiteurs suivant la localisation — spinale ou dendritique — du contact inhibiteur, afin d'aborder la fonction des synapses inhibitrices qui contactent des épines doublement innervées (DiS ; Fífková et al., 1992; Knott et al., 2002; Kubota et al., 2007, 2015; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Chiu et al., 2013; Villa et al., 2016) et dont le rôle est mal caractérisé (Higley, 2014). Ces résultats suggèrent un mécanisme de signalisation inédit par lequel les signaux électriques et biochimiques induits dans les DiS par une stimulation excitatrice sont découplés par une stimulation inhibitrice, en fonction de l'intervalle entre ces stimulations, avec des conséquences potentielles sur la plasticité synaptique.

Afin de situer ces travaux dans le contexte scientifique actuel, nous introduirons successivement les notions de biologie nécessaires pour présenter notre étude, puis l'état de l'art des approches de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM) pour l'étude des tissus nerveux.

Dans le premier chapitre de l'introduction, nous décrirons l'organisation élémentaire des circuits neuronaux dans le cortex, en insistant sur les objets étudiés au cours de nos travaux : les neurones pyramidaux (PNs), connectés en réseaux par des synapses, qui sont les points de transfert de l'information entre les neurones. Nous décrirons brièvement les différences de structure, de composition et de fonctionnement qui distinguent les synapses excitatrices des synapses inhibitrices.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons les épines dendritiques, qui reçoivent la majorité des synapses excitatrices, jouent un rôle essentiel dans la régulation du transfert des signaux synaptiques aux dendrites et au soma, et sous-tendent la compartimentation des composantes biochimiques et électriques des signaux synaptiques. Nous examinerons l'influence des mécanismes de plasticité structurelle sur l'intégration des signaux synaptiques à l'échelle du neurone entier, dans les dendrites porteuses de conductances actives, c'est-à-dire sensibles au potentiel membranaire. Nous aborderons la fonction des synapses inhibitrices, qui modèlent activement la propagation des signaux excitateurs, et conclurons en présentant le cas des épines doublement innervées, qui reçoivent simultanément un contact synaptique excitateur et un contact synaptique inhibiteur. Leur petit nombre les rend difficile à étudier, et leur fonction demeure énigmatique, faute d'une approche dédiée pour quantifier leurs paramètres structuraux dans des circuits neuronaux intacts.

Dans le troisième chapitre de cette introduction, nous présenterons les approches de microscopie électronique et optique qui permettent d'accéder aux paramètres morfo-fonctionnels des synapses. Nous résumerons les différentes méthodes déjà mises en œuvre pour combiner ces deux types d'imagerie, avant de préciser les développements nécessaires à l'étude quantitative de synapses identifiées *in vivo*.

Chapitre I. Bases de l'organisation des circuits corticaux

1. Neurones pyramidaux (PNs)

Le cortex comporte une grande diversité de neurones et de cellules gliales, et nous présenterons ici principalement des objets de notre étude, qui sont les neurones pyramidaux (PNs) des couches II/III (L2/3) du cortex somato-sensoriel (SSC).

1.1. Morphologie des PNs

Les principaux neurones des circuits corticaux sont des neurones excitateurs pyramidaux glutamatergiques, c'est-à-dire qu'ils utilisent le glutamate pour neurotransmetteur (DeFelipe, 2011). Ces cellules excitables se différencient au cours du développement pour adopter une morphologie polarisée qui détermine le sens principal du transfert de l'information dans les réseaux neuronaux : des axones aux dendrites *via* les synapses (Stuart & Spruston, 2015). Les neurones pyramidaux (PNs) présentent une arborisation dendritique ramifiée qui reçoit des milliers, voire des centaines de milliers de contacts synaptiques qui s'étagent à des niveaux plus ou moins distaux de l'arbre dendritique (DeFelipe & Fariñas, 1992; Megias et al., 2001). Les composantes électriques des signaux synaptiques se propagent le long des dendrites, et sont intégrées sur plusieurs échelles spatiales : au niveau des synapses, des dendrites, puis du corps cellulaire (Spruston, 2008). Les signaux synaptiques peuvent se sommer au niveau du segment initial de l'axone et, lorsque le potentiel électrique membranaire local dépasse une valeur seuil, déclencher l'émission d'un potentiel d'action (AP ; Stuart & Spruston, 2015). La propagation de l'AP déclenche l'exocytose de vésicules synaptiques contenus dans les boutons pré-synaptiques situés le long de l'axone, et libère des neurotransmetteurs aux synapses formées avec les cellules contactées par l'axone, ce qui sous-tend le transfert de l'information synaptique (Südhof, 2013). Les propriétés morphologiques de l'arborisation dendritique gouvernent l'intégration des signaux synaptiques et conditionnent l'émission d'APs (Kath, 2005). Les arborisations dendritiques des PNs situés dans les différentes couches cellulaires du cortex présentent une organisation canonique en deux domaines distincts : les dendrites basales et les dendrites apicales. Les PNs présentent généralement plusieurs dendrites basales courtes (100-200µm de long) et de petit diamètre (0,7µm) issues de la base du corps cellulaire pyramidal. Une dendrite apicale unique saillit de la pointe du soma et s'étend vers la surface piaie du cortex. Son diamètre, relativement large dans sa partie proximale (~2µm), diminue à mesure qu'elle s'éloigne du soma. La dendrite apicale se ramifie souvent en dendrites obliques, et son extrémité distale peut se différencier en une canopée de dendrites fines qui s'étendent latéralement et forment la touffe apicale des PNs (Fig. 1A). Le branchement des dendrites en segments distincts — primaires, intermédiaires et terminaux — rend compte de l'amincissement progressif des dendrites, qui modifie l'impédance électrique aux synapses, influence la propagation dendritique des signaux

Introduction

électriques et module l'efficacité du transfert des signaux synaptiques au soma (Fig. 1B ; Spruston, 2008; Harnett et al., 2012).

Malgré cette organisation commune, des différences considérables en terme de morphologie dendritique, de connectivité, de composition protéique et d'activité électrique mènent à distinguer différents types de PNc corticaux (Fig. 2 ; Feldmeyer, 2012; K. D. Harris & Shepherd, 2015; Oberlaender et al., 2012; Tasic et al., 2018; Tasic & Nicovich, 2018).

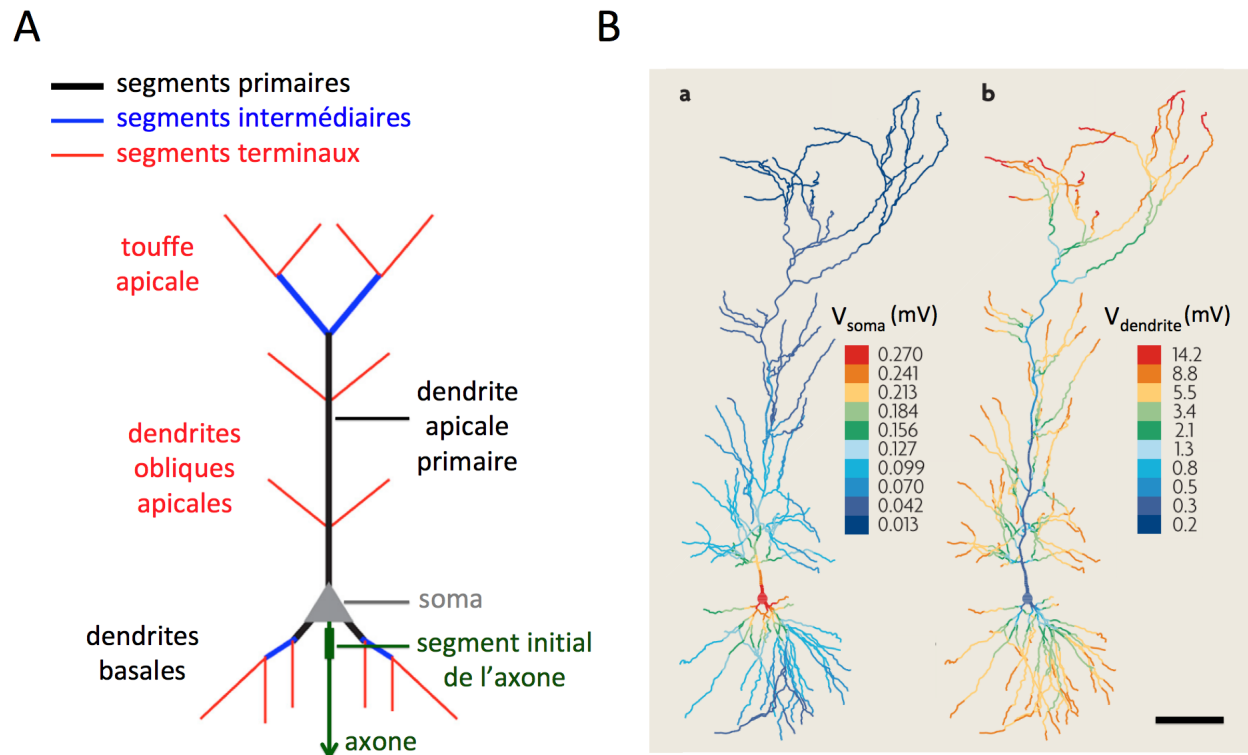


Figure 1 : Structure des neurones corticaux pyramidaux

(A) Schéma d'une arborisation dendritique discrétisée en segments individuels. Les dendrites basales se ramifient à partir de la base du corps cellulaire, et la dendrite apicale principale, de sa pointe. Les dendrites obliques divergent de la dendrite apicale primaire, qui se ramifie en une touffe de dendrites fines à son extrémité distale. Les branches dendritiques sont nommées : dendrites primaires, intermédiaires et terminales, des plus proximales aux plus distales. L'axone se ramifie à partir de la base du soma, près duquel se situe le segment initial de l'axone (B) Modèles électriques de neurones pyramidaux. En a, le code couleur représente l'amplitude résultant au soma d'une dépolarisation générée par une conductance locale de 0.3nS, qui modélise une synapse excitatrice. La propension des synapses proximales à dépolariser le soma est supérieure à celle des synapses distales car la résistance électrique entre synapse et soma, dite "résistance d'entrée", croît avec la distance au soma. En b, le code couleur représente l'amplitude locale de la dépolarisation générée par une conductance de 0.3nS. Les synapses distales génèrent une plus forte dépolarisation locale que les synapses proximales du fait de leur plus grande résistance d'entrée. Le rétrécissement des dendrites avec la distance au soma induit l'accroissement non linéaire de la résistance d'entrée, et donc de la dépolarisation locale. Calibration : 100 μm . A : adapté de Bloss et al., 2016. B : adapté de Spruston, 2008.

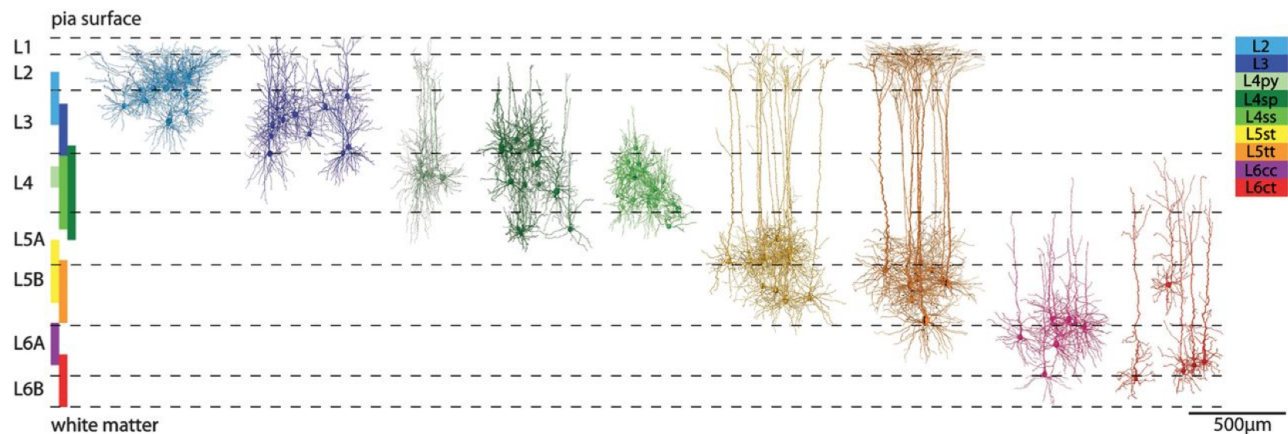


Figure 2 : Diversité des morphologies dendritiques des neurones corticaux pyramidaux

Exemples de différents types de neurones pyramidaux (PNs) reconstruits par microscopie optique dans les couches I à VI du cortex de souris. Les longueurs de dendrites et leur distribution spatiale varient à la fois d'un type de PN à l'autre et, dans une moindre mesure, entre cellules d'un même type. Adapté de Oberlaender et al., 2012.

1.2. Organisation de l'innervation des PNs

Les PNs reçoivent en majorité des contacts synaptiques sur les dendrites, mais aussi sur le soma et sur le segment initial de l'axone. Les contacts formés sur le soma et l'axone proviennent exclusivement de neurones inhibiteurs, non-pyramidaux et pour la plupart GABAergiques, c'est-à-dire qu'ils utilisent pour neurotransmetteur l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Les contacts formés sur les dendrites proviennent de différentes populations de neurones excitateurs et inhibiteurs (Spruston, 2008; Feldmeyer, 2012; Oberlaender et al., 2012), et la distribution des afférences synaptiques le long des différents types de dendrites est inhomogène (Bloss et al., 2016).

Les contacts excitateurs formés sur les dendrites proximales des PNs des L2/3 du cortex somato-sensoriel proviennent en grande partie d'afférences cortico-corticales (Spruston, 2008) issues de PNs voisins des couches 2/3, 4 et 5 (Feldmeyer et al., 2006; Feldmeyer, 2012). La touffe apicale des PNs des L2/3 est contactée principalement par des afférences excitatrices provenant de régions corticales contra-latérales (Rajkovich et al., 2017). Certains noyaux thalamiques, qui transmettent les influx sensoriels au SSC (Kubota et al., 2015), contactent différents domaines dendritiques des PNs des L2/3 : les dendrites proximales peuvent recevoir des afférences thalamo-corticales lemniscales, et la touffe apicale reçoit des afférences para-lemniscals (Feldmeyer, 2012). Déterminer plus précisément les domaines d'innervation préférentiels des nombreux types d'afférences qui contactent les PNs du cortex constitue l'un des défis actuels de la connectomique (Oberlaender et al., 2012).

De nombreux types de neurones inhibiteurs GABAergiques forment des contacts sur l'ensemble des PNs, et contrôlent leur activité avec une grande résolution spatio-temporelle (Chiu et al., 2013, 2019;

Introduction

Chen et al., 2015). Les différents types d'interneurones innervent préférentiellement des domaines précis de l'arborisation dendritique des neurones qu'ils ciblent. De manière générale et non exhaustive, les neurones inhibiteurs qui expriment la somatostatine innervent principalement les segments distaux de l'arborisation dendritique des PN. Les neurones inhibiteurs qui expriment la parvalbumine innervent quant à eux de manière préférentielle les régions proximales des dendrites basales des PN. D'autres types d'interneurones innervent préférentiellement l'axone ou le soma (Fig. 3A ; Fishell & Kepecs, 2020).

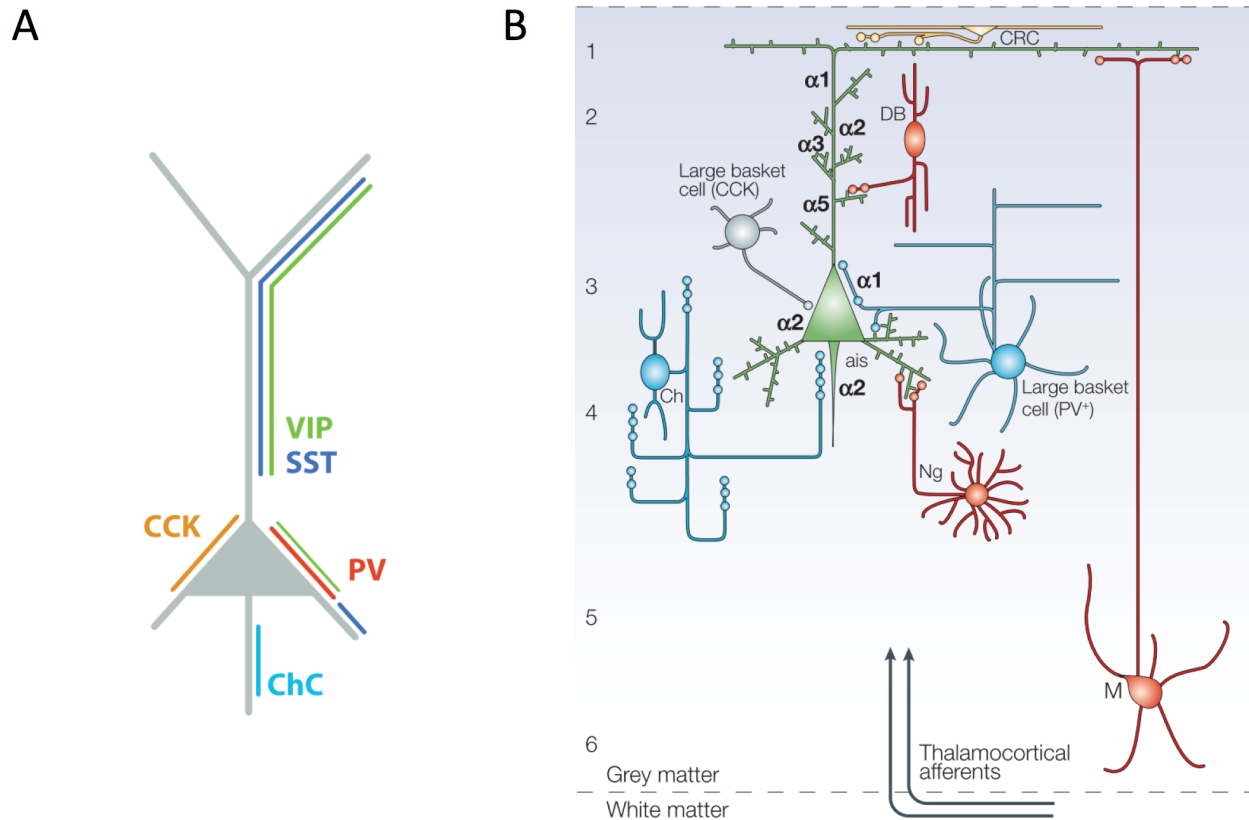


Figure 3 : Diversité de connectivité et de composition moléculaire des synapses inhibitrices

(A) Schéma représentant les régions de l'arborisation dendritique des PN qui sont préférentiellement contactées par différents sous-types d'interneurones (INs). Les INs exprimant la cholécystokinine (CCK) et la parvalbumine (PV) innervent en général le soma et les dendrites basales proximales. Les INs exprimant la somatostatine (SST) contactent les dendrites, et les INs exprimant le peptide vaso-actif intestinal (VIP) ciblent les INs exprimant SST et, dans une moindre mesure, PV. Les cellules "chandelier" (ChC) innervent spécifiquement le segment initial de l'axone des PN (B) Les neurones corticaux pyramidaux (en vert) reçoivent des afférences excitatrices thalamocorticales (flèches noires au bas du schéma), et des afférences inhibitrices provenant d'INs qui diffèrent en terme de morphologie, de connectivité, et d'expression protéique. Des contacts de types distincts sont enrichis en protéines spécifiques qui modifient leurs propriétés fonctionnelles. Différents segments dendritiques, enrichis en différentes sous-unités α des récepteurs GABA_A ($\alpha 1$ à 5), sont représentés sur le schéma. Abréviations : ais, segment initial de l'axone ; CRC, cellule de Cajal-Retzius ; DB, cellule en double bouquet ; M, neurone de Martinotti ; N, neurone neurogliaforme. A : adapté de Fishell & Kepecs, 2020. B : adapté de Hensch, 2005.

La diversité des afférences neuronales est liée à la diversité de composition moléculaire des synapses (Fig. 3B ; Hensch, 2005), qui module la cinétique de transmission du signal aux différentes connexions synaptiques.

2. Organisation des synapses

La synapse constitue le point de transmission de l'information entre un neurone et ses cibles à travers la fente synaptique. L'existence de la synapse a été proposée par Santiago Ramón y Cajal en 1893. Elle a été nommée par Charles Scott Sherrington en 1897 et observée pour la première fois en microscopie électronique (EM) dans les années 1950 (Estable et al., 1953; Robertson, 1953; Sjöstrand, 1953). Ces études pionnières ont montré la discontinuité des éléments pré- et post-synaptiques, et poussé à comprendre la mise en place, le fonctionnement et la régulation des appareils synaptiques.

Il existe deux grandes catégories de synapses entre neurones : les synapses électriques, dites jonctions *gap* (Pereda, 2014), dont nous ne traiterons pas dans le cadre de ces travaux, et les synapses chimiques. Les synapses chimiques sont des machineries multi-moléculaires qui reposent sur l'interaction transitoire entre des centaines d'espèces moléculaires différentes (Sheng & Hoogenraad, 2007a). Elles connectent le plus souvent un axone à une dendrite et sont formées de deux différenciations membranaires apposées, séparées par un espace synaptique intermembranaire : la fente synaptique. En première approximation, le transfert de l'information par la synapse chimique est uni-directionnel (de l'axone à la dendrite *via* la synapse), ce qui incite à distinguer le bouton pré-synaptique de la membrane post-synaptique. Ces deux structures présentent des caractères morphologiques et fonctionnels très différents (Fig. 4 ; Burette et al., 2012).

2.1. Bouton pré-synaptique

Dans le cortex, les boutons pré-synaptiques forment le long de l'axone des varicosités qui hébergent des machineries moléculaires complexes. Ils sont le lieu de la synthèse des neurotransmetteurs, et de leur encapsulation dans des dizaines de vésicules synaptique (SVs ; Siksou et al., 2009; Rowley et al., 2012), qui mesurent typiquement 40-60nm de diamètre et présentent un contenu clair en microscopie électronique (De Robertis & Bennett, 1954; Palade & Palay, 1954). Les SVs interagissent de façon complexe avec les différentes protéines du cytosquelette, et certains SVs sont apposés, ou "dockés", au niveau de la zone active (AZ). Cette différenciation membranaire, apposée à la fente synaptique, contient des canaux ioniques transmembranaires, notamment calciques, et des complexes macromoléculaires qui régulent les fonctions d'exocytose/endocytose du bouton pré-synaptique (Südhof, 2004, 2013).

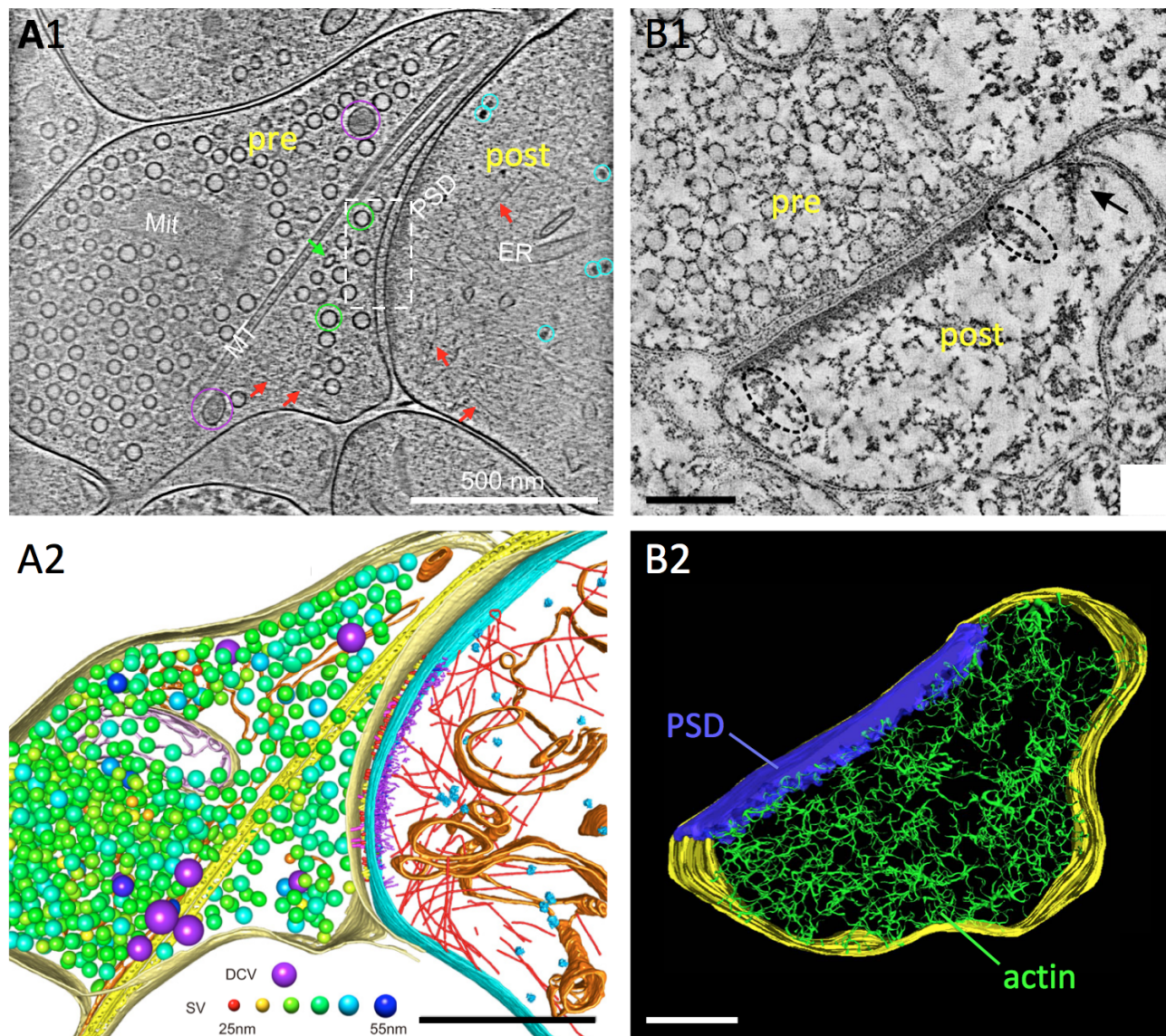


Figure 4 : Appareils synaptiques visualisés en tomographie électronique

(A1) Visualisation en tomographie électronique (ET) d'une synapse excitatrice vitrifiée par cryo-fixation. Le bouton pré-synaptique (pre) présente une importante concentration de vésicules. Le bouton pré-synaptique est apposé au terminal post-synaptique (post) dont il est séparé par la fente synaptique. La concentration de protéines qui forme la densité post-synaptique (PSD) génère un contraste fort en microscopie électronique. D'autres organelles sont visibles sur l'image : mitochondries (Mit), microtubules (MT) et réticulum endoplasmique (ER) (A2) Reconstruction 3D de la synapse en A1. Les sphères de couleur représentent des vésicules synaptiques (SV) de différentes tailles et des vésicules à cœur dense (DCV). La PSD présente une forte concentration de complexes protéiques (B1) Tomogramme d'une synapse axo-spinale fixée chimiquement. Le bouton pré-synaptique contacte le terminal post-synaptique via la synapse. Les filaments d'actine qui forment le cytosquelette du terminal post-synaptique sont très contrastés sur cette image. Des densités de protéines péri-synaptiques sont entourées en pointillés noirs (B2) Reconstruction du terminal post-synaptique en B1. Le cytosquelette d'actine (en vert) qui assure l'intégrité structurelle du terminal post-synaptique. Calibrations : (A) 500nm (B) 100nm. A : adapté de Tao et al., 2018. B : adapté de Burette et al., 2012.

La dépolarisation de la membrane du bouton pré-synaptique lors de l'AP provoque un influx d'ions calcium (Ca^{2+}) dans le bouton pré-synaptique. En réponse l'influx calcique, les SVs les plus proches de l'AZ fusionnent très rapidement (en un temps inférieur à 1ms) avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu en neurotransmetteurs dans la fente synaptique (Heuser & Reese, 1981; Sabatini & Regehr, 1996; Nusser et al., 1997; Lisman et al., 2007; Pulido et al., 2015). Les influx calciques régulent également les mécanismes d'endocytose, qui compensent d'une part l'effet de exocytose des SVs sur la surface membranaire totale du bouton, et assurent d'autre part le recyclage des neurotransmetteurs (Südhof, 2004; Wu et al., 2007; Balaji et al., 2008).

2.2. Fente synaptique

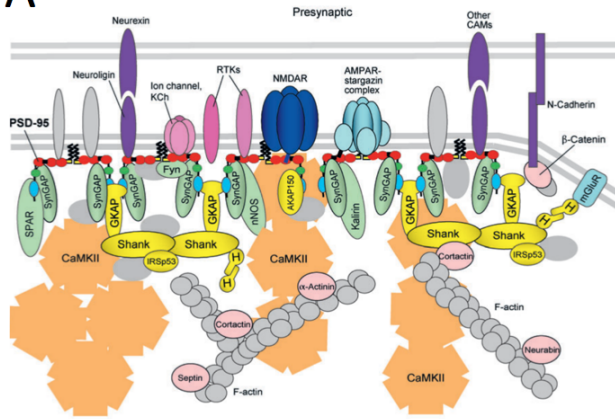
La fente synaptique est l'espace étroit (15-30nm) qui sépare le bouton pré-synaptique du terminal post-synaptique. La fente synaptique est une jonction adhésive hautement spécialisée (Harris & Weinberg, 2012) qui comporte une densité importante de molécules de matrice extra-cellulaire et de protéines d'échafaudage extra-cellulaires, dont des intégrines et des cadhérines (Shapiro et al., 2007) qui assurent l'étroitesse de la fente synaptique et l'adhérence trans-synaptique (Lučić et al., 2005; Zuber et al., 2005; Linsalata et al., 2014; High et al., 2015). De plus, des protéines d'adhésion cellulaire, comme les complexes neuroligines/neurexines, sous-tendent des régulations trans-synaptiques bidirectionnelles lors de la formation, de la maturation et de la plasticité des synapses (Shapiro et al., 2007). Le détail mécanistique des communications trans-synaptiques commence à peine à être compris (Yuzaki, 2018; Fossati et al., 2019).

2.3. Membranes post-synaptiques

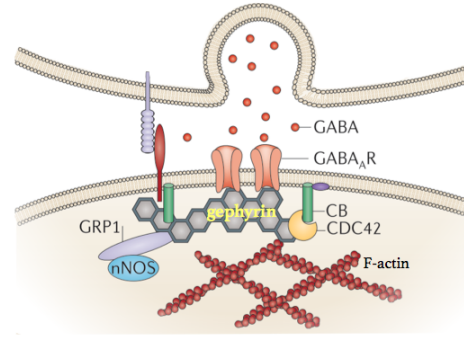
Au cours de la transmission synaptique, les neurotransmetteurs excitateurs ou inhibiteurs libérés dans la fente synaptique se lient de façon sélective aux récepteurs transmembranaires qui sont stabilisés de façon transitoire dans la membrane post-synaptique par interaction avec les protéines de la densité post-synaptique (PSD). La PSD comporte un réseau dense de complexes macro-moléculaires associés à la surface intracellulaire de la membrane post-synaptique (Okabe, 2007), dont des récepteurs ionotropiques ou métabotropiques aux neurotransmetteurs, des molécules d'adhésion cellulaire, des protéines d'échafaudage, des enzymes de signalisation, des protéines du cytosquelette et des protéines impliquées dans le transport de matériel synaptique dans et hors de la synapse (Sheng & Hoogenraad, 2007b). Les PSDs des synapses excitatrices et inhibitrices suivent le même plan d'organisation, mais sont composées d'ensembles de types protéiques exclusifs (Fig. 5A) et présentent des différences structurales importantes (Fig. 5B&C).

Introduction

A



Synapse excitatrice



Synapse inhibitrice

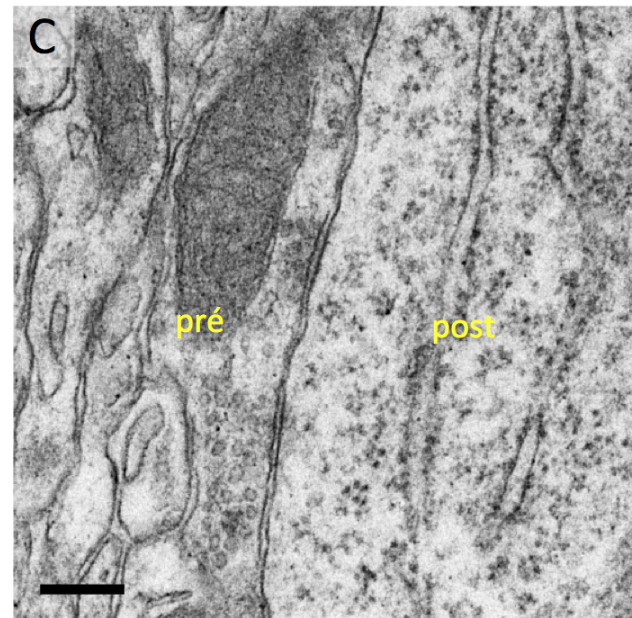
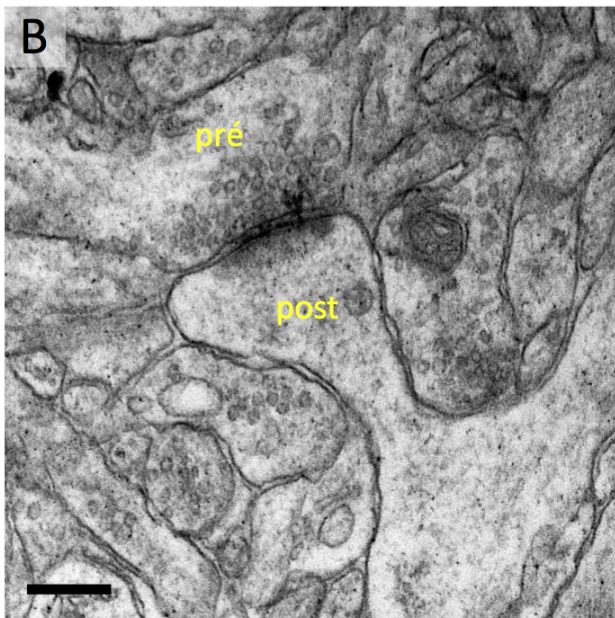


Figure 5 : Différences de composition et de structure des PSDs excitatrices et inhibitrices

(A) Plusieurs familles de protéines sous-tendent l'organisation des membranes post-synaptiques : des protéines d'échafaudage, des enzymes de signalisation, des protéines d'adhésion au terminal pré-synaptique et des molécules qui interagissent avec le squelette d'actine. Les types protéiques présents aux synapses excitatrices et inhibitrices sont globalement exclusifs, mais remplissent des fonctions analogues. Pour ne détailler que le cas des protéines d'échafaudage, PSD-95, Homer, Shank, GKAP et de nombreux interacteurs assurent l'intégrité structurelle des PSDs excitatrices, là où la géphyrine joue le rôle de protéine d'échafaudage principale pour la majorité des synapses inhibitrices. (B) Image en microscopie électronique à transmission (TEM) d'une synapse asymétrique, dite de type 1, dans les couches L2/3 du SSC d'une souris adulte. Le contact synaptique se forme entre un bouton pré-synaptique, a priori glutamatergique, et une épine dendritique au centre de l'image. Le bouton pré-synaptique contient des vésicules synaptiques rondes, et l'épaississement membranaire est plus large du côté post-synaptique. (C) Image en TEM d'une synapse symétrique, dite de type 2, dans la même région cérébrale. Le contact se forme entre un bouton pré-synaptique, a priori GABAergique, au centre, et un corps cellulaire à droite de l'image. Le bouton pré-synaptique contient des vésicules synaptiques pléomorphes, et les épaississements membranaires sont de même taille des côtés deux côtés de la fente synaptique. Calibration : 200nm. A : adapté de Sheng & Hoogenraad, 2007b et Tyagarajan & Fritschy, 2014.

Historiquement, les différences structurales entre PSDs excitatrices et inhibitrices ont été mises en évidence en microscopie électronique (EM ; Gray, 1959; Colonnier, 1968). La classification établie par Gray en 1959, basée sur l'observation en EM de tissu nerveux traité avec des solutions d'aldéhydes puis de tetroxyde d'osmium (procédé de fixation dite "chimique"), continue d'être utilisée après des décennies de progrès technique en imagerie ultrastructurale (Tao et al., 2018). En EM, les synapses de type 1, dites asymétriques, présentent un épaississement postsynaptique plus marqué que l'épaississement présynaptique, et la fente qui les sépare mesure 20-30nm (Fig. 5B). Les synapses de type 2, dites symétriques, présentent des épaississements pré- et post-synaptiques symétriques, et une fente synaptique plus fine, d'environ 15nm de large (Fig. 5C ; Gray, 1959; Colonnier, 1968). Les travaux initiés par Uchizono et coll. ont établi une corrélation entre les terminaisons synaptiques à neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA et glycine) et les synapses de type 2, tandis que les synapses de type 1 sont associées à des neurotransmetteurs excitateurs (Uchizono, 1965). Cependant, les seuls critères de morphologie ultrastructurale ne permettent pas l'identification certaine du type excitateur ou inhibiteur d'une synapse (Tritsch et al., 1998). Identifier le type synaptique de façon univoque nécessite de valider les indices ultrastructuraux fournis par l'EM au moyen de sondes moléculaires spécifiques des synapses excitatrices ou inhibitrices.

Nous ne présenterons que très brièvement les composants moléculaires des synapses, en insistant sur les objets de notre étude : les récepteurs aux neurotransmetteurs et les protéines d'échafaudage. Aux synapses excitatrices, dans le cortex, l'exocytose rapide du glutamate dans la fente synaptique (Südhof, 2013) active différents types de récepteurs ionotropiques glutamatergiques AMPA (Diering & Huganir, 2018) et NMDA (Paoletti et al., 2013) et génère des conductances cationiques transitoires (<10ms), notamment d'ions sodium et calcium. Une entrée d'ions calcium dans le terminal post-synaptique peut être détectée par les machineries biosynthétiques locales pour activer une cascade de protéines de signalisation impliquées dans la plasticité synaptique (Nakahata & Yasuda, 2018). Aux contacts synaptiques inhibiteurs, dans le cortex, l'activation des récepteurs ionotropiques sensibles au GABA, et perméables aux anions (Cl^- et HCO_3^-), provoque un influx anionique qui tend à contrer les effets d'un courant cationique sur l'évolution du potentiel de membrane (Paulus & Rothwell, 2016). Dans tous les types de synapses, les protéines d'échafaudage interagissent d'une part avec le cytosquelette d'actine pour réguler la structure des membranes post-synaptiques (Honkura et al., 2008), et d'autre part avec les récepteurs transmembranaires pour générer des sites où les récepteurs s'accumulent de façon métastable, face à l'AZ pré-synaptique (Choquet & Triller, 2013; Crosby et al., 2019). Ces interactions physiques sous-tendent le maintien aux synapses d'un nombre défini de récepteurs aux neurotransmetteurs (Charrier et al., 2006) et assurent la vitesse et la fiabilité de la transmission synaptique (Branco & Staras, 2009; Choquet & Triller, 2013). Dans le cortex, les PSDs excitatrices

Introduction

présentent de nombreux types de protéines d'échafaudage, dont PSD-95, GKAP, Shank et Homer, qui assurent la cohésion et l'interaction des récepteurs membranaires, des enzymes de signalisation et du cytosquelette (Sheng & Hoogenraad, 2007b). Les PSDs inhibitrices du cortex présentent une protéine d'échafaudage principale, la géphyrine, qui interagit avec les principales molécules synaptiques (Tyagarajan & Fritschy, 2014; Krueger-Burg et al., 2017), assure le maintien des récepteurs au GABA en face de l'AZ (Crosby et al., 2019) et interagit notamment avec des protéines d'adhésion extra-cellulaires, dont neuroligin-2, pour sous-tendre des communications trans-synaptiques *via* les neurexines pré-synaptiques (Südhof, 2008; Bembien et al., 2015). Au delà de leurs différences de fonctionnement, les synapses excitatrices et inhibitrices sont distribuées de façon remarquablement différentes dans le cortex : la quasi-totalité des contacts synaptiques excitateurs formés sur les PNs sont portés par des structures particulières, les épines dendritiques (Bailey et al., 2015), tandis que les contacts inhibiteurs se forment en proportions diverses sur les corps cellulaires, les axones, les troncs dendritiques et les épines dendritiques (~20-70% ; Kubota et al., 2016).

Chapitre II. Épines dendritiques et compartimentation des signaux synaptiques

1. Épines dendritiques

1.1. Anatomie des épines

Les épines dendritiques sont des protrusions membranaires micrométriques riches en actine, qui couvrent les dendrites de la grande majorité des PNs, et reçoivent la majorité des PSDs (Alvarez & Sabatini, 2007; Harris & Weinberg, 2012; DeFelipe, 2015). L'abondance des épines suggère qu'elles jouent un rôle primordial dans le traitement des signaux synaptiques. Plus précisément, les épines dendritiques se composent le plus souvent d'une tête en forme de bulbe, dont le volume peut varier de 0.01 à 1.5 μm^3 , et d'un cou fin, d'une longueur inférieure à 3 μm et d'un diamètre minimal compris entre 20 et 500nm, qui connecte la tête au tronc dendritique. (Harris & Weinberg, 2012; Stuart et al., 2016). Le cou étroit des épines constitue une barrière de diffusion qui contraint les échanges moléculaires et influence la propagation des signaux synaptiques et leur intégration au sein des dendrites (Guthrie et al., 1991; Müller & Connor, 1991; Svoboda et al., 1996; Majewska et al., 2000; Tønnesen & Nägerl, 2016; Adrian et al., 2017). Mesurer la morphologie des épines de façon précise est primordial pour comprendre la plasticité synaptique (Yuste et al., 2000).

Les organelles présentes dans les épines dendritiques, telles que le réticulum endoplasmique, les ribosomes, les endosomes, et les vésicules, couvertes ou non de clathrine, permettent le recyclage des récepteurs aux neurotransmetteurs et soutiennent la synthèse et la dégradation locales des protéines synaptiques (Bailey et al., 2015; Chirillo et al., 2019). Une proportion d'épines dendritiques, variable en fonction des régions cérébrales, contient une forme spécialisée de réticulum endoplasmique lisse (SER): l'appareil épineux (SA ; Vlachos, 2011; Kennedy & Hanus, 2019). Le SA est associé aux épines volumineuses, et se compose de replis membranaires complexes qui emmagasinent activement les ions Ca^{2+} (Segal & Korkotian, 2014) et sont impliqués dans la sécrétion et le transport de protéines synaptiques (Kennedy & Hanus, 2019). Des études *live* menées *in vivo* et *in vitro* suggèrent que le SA se forme de façon transitoire par différenciation du SER, lequel entre et sort continuellement des épines dendritiques (Holbro et al., 2009; Ng et al., 2014; Chirillo et al., 2019; Kennedy & Hanus, 2019). La formation du SA et dépend directement de l'expression d'une protéine qui s'associe au cytosquelette d'actine, la synaptopodine (SP ; Deller et al., 2000). Les souris KO n'exprimant pas la synaptopodine présentent des altérations de la plasticité synaptique dans l'hippocampe, et leurs performances à des tâches reposant sur la mémoire spatiale et l'apprentissage sont amoindries (Deller et al., 2003; Jedlicka et al., 2008; Vlachos et al., 2009). Cependant, l'influence du SA sur la morphologie dendritique et sur les signalisations synaptiques est mal caractérisée, et l'implication du SA dans les processus de plasticité synaptique demeurent mal compris.

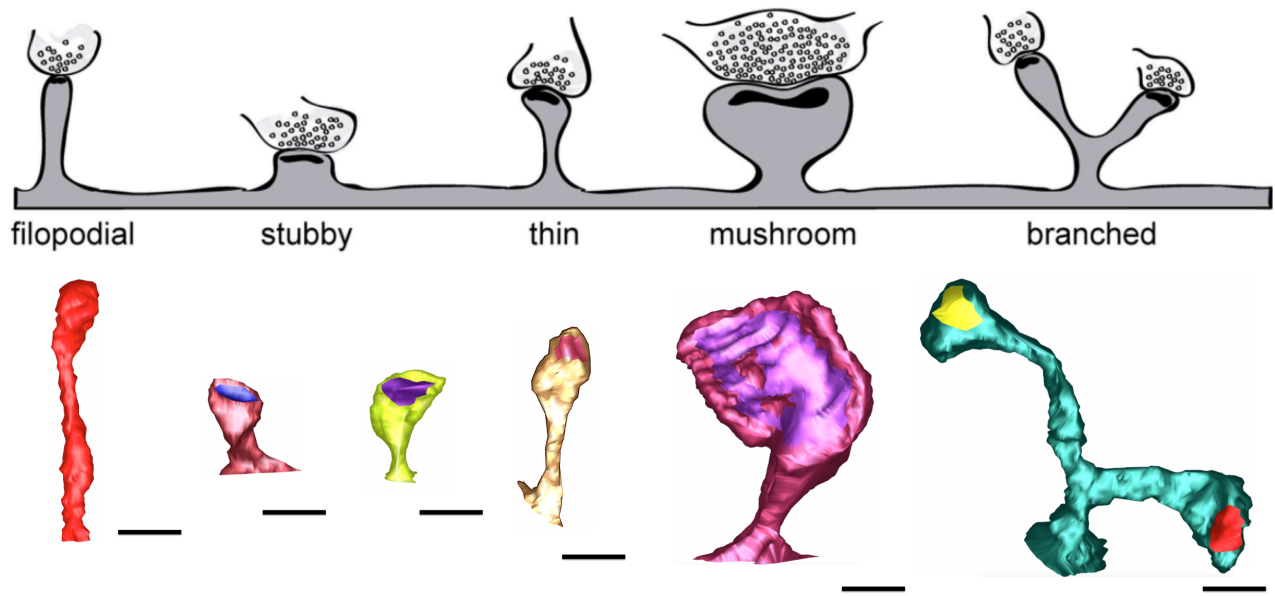


Figure 6 : Variabilité morphologique des épines dendritiques

Reconstructions d'épines des dendrites basales des PN des couches 2/3 du cortex somato-sensoriel de souris adultes, à partir d'acquisitions d'EM 3D. On retrouve les quatre types d'épines proposés par Peters et Kaiserman-Abramof, ainsi que des épines à plusieurs têtes, et des épines intermédiaires, difficiles à classer. Les contacts synaptiques sont représentés comme des surfaces courbes de couleur aléatoire. Aucun filopode observé dans ce set de données ne présentait de contact synaptique. Calibrations : 1 μ m. Dessin adapté de Bosch 2016.

1.2. Variabilité morphologique des épines

Les épines sont des structures dynamiques dont la morphologie est fonction à la fois de processus développementaux, de régulations liées à l'activité synaptique, et des propriétés cyto-architecturales des dendrites qui les portent. Pour décrire la morphologie instantanée des épines dendritiques, la classification en quatre catégories proposée par Peters et Kaiserman-Abramof en 1970 (Peters & Kaiserman-Abramof, 1970) est souvent utilisée : épines "en forme de champignon", épines fines, épines dépourvues de cou, ou épines en formes de filopodes (Fig. 6). Cependant, cette description statique ne rend pas compte du comportement dynamique des épines dendritiques *in vivo*. Historiquement, la description ultrastructurale des épines dendritiques en microscopie électronique a révélé que la forme des épines est modulable *in vivo* par stimulation électrique directe de cerveaux de souris (Fifková & Anderson, 1981). Aujourd'hui, les approches d'EM 3D, et de LM *in vivo* permettent d'aborder l'effet de la fonction synaptique sur la structure de l'épine (Bourne & Harris, 2012). La microscopie bi-photonique *in vivo* a permis d'établir que les épines dendritiques apparaissent et disparaissent continuellement, au cours du développement et chez l'adulte (Alvarez & Sabatini, 2007). Le taux de formation d'épines est relativement stable tout au long de la vie des souris (5-15% de P14 à 5 mois selon la région observée ; Holtmaat et al., 2005; Zuo et al., 2005) et le taux d'élimination des épines est

régulé au cours du développement (25-45% à 1-2 mois, contre 10-20% à 5mois selon la région cérébrale ; Alvarez & Sabatini, 2007). Les épines nouvellement formées prennent souvent la forme de filopodes allongés, très fins, dépourvus de tête et, souvent, de contact synaptique identifiable (Arellano et al., 2007). L'abondance des filopodes au cours du développement, et leur rareté relative dans le cerveau adulte incite à les considérer comme des épines immatures, ou en cours d'élimination (Stuart et al., 2016). Un filopode qui se maintient pendant 4 jours acquiert le plus souvent un contact synaptique excitateur, et se déforme pour devenir une épine fine, qui perdure en général pendant plusieurs mois (Holtmaat et al., 2005; Cane et al., 2014). Sous l'effet de l'activité neuronale et de la plasticité structurale, les épines fines peuvent acquérir une forme de champignon, souvent associée à un stade mature de l'épine — ou au contraire, rétrécir et disparaître, en adoptant des conformations transitoires : filopodes, ou épines dépourvues de cou (Berry & Nedivi, 2017). Le taux d'élimination des épines change au cours du développement : d'abord élevé pour permettre le raffinement des circuits neuronaux (*synaptic pruning*), ce taux diminue chez l'adulte pour provoquer la stabilisation des circuits matures, (Alvarez & Sabatini, 2007; Holtmaat & Svoboda, 2009).

La morphologie des épines dendritiques varie aussi en fonction des régions cérébrales et des types cellulaires (Harris & Weinberg, 2012). Par exemple, dans le cortex et l'hippocampe, en moyenne >65% des épines sont "fines", et les épines "champignon", qui représentent 25% du total, sont plus abondantes dans les PN de l'hippocampe que dans ceux du cortex, au même âge (Stuart et al., 2016; Berry & Nedivi, 2017). De plus, les épines sont régulées différemment sur différents types de dendrites au sein d'un même neurone (Globus et al., 1973; Feldmeyer et al., 2006; Bian et al., 2015). Par exemple, dans les PN des L2/3 du SSC, la délétion du facteur de transcription MEF2C, dont l'expression est régulée, en conditions basales, par l'activité synaptique, provoque l'élimination spécifique des épines des dendrites basales sans modifier la densité d'épines dans les domaines apicaux des mêmes (Rajkovich et al., 2017). Les auteurs proposent que cet effet, spécifique des dendrites basales, est lié à la connectivité différente des domaines apicaux et basaux des PN étudiés. La morphologie des épines peut aussi être régulée de façon inhomogène au sein des mêmes dendrites : dans les dendrites obliques des PN de la région CA1 de l'hippocampe de souris adultes, la taille des épines dendritiques diminue avec la distance de l'épine au soma (Katz et al., 2009), sous contrôle de l'expression des sous-unités GluA1, GluA2, ou de la sous-unité accessoire CNIH-2 des récepteurs glutamatergiques AMPA (Andrásfalvy et al., 2003; Shipman et al., 2013). Dès lors, modéliser l'intégration des signaux synaptiques requiert de quantifier la variabilité morphologique des épines au sein de dendrites ciblées, où la régulation des épines s'effectue de façon comparable.

1.3. Plasticité structurale et fonctionnelle

La régulation du volume, de la longueur et de la largeur des têtes et des cous d'épines est une partie intégrante des mécanismes de plasticité synaptique, qui caractérisent la réponse dynamique des synapses aux variations d'activité dans les circuits neuronaux (Alvarez & Sabatini, 2007). Les différents types de plasticité synaptique (Lisman, 2017) reposent sur deux mécanismes fondamentaux : la potentiation ou la dépression synaptique, qui se traduisent par des changements de structure et de composition moléculaire aux niveaux pré- et post-synaptiques (Matsuzaki et al., 2004; Castillo et al., 2011; Bailey et al., 2015; Nicoll, 2017), et sont liés aux mécanismes d'apprentissage de formation de la mémoire (Alvarez & Sabatini, 2007; Kasai et al., 2010; Nabavi et al., 2014; Hayashi-Takagi et al., 2015; Segal, 2017). Au niveau pré-synaptique, la plasticité synaptique régule les cinétiques d'exocytose, la composition des SVs et le nombre de SVs arrimés à la zone active (Branco & Staras, 2009; Holderith et al., 2012) pour moduler la force et la cinétique de transmission signal biochimique à la cellule cible (Pulido et al., 2015). Au niveau post-synaptique, la potentiation à long terme (LTP) des contacts synaptiques excitateurs provoque l'accroissement du volume de la tête de l'épine, l'élargissement de la PSD et une augmentation de l'amplitude du courant post-synaptique (Nusser et al., 1997, 1998; Matsuzaki et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Harvey & Svoboda, 2007; Bourne & Harris, 2011; Bell et al., 2014) qui impliquent le recrutement de récepteurs aux neurotransmetteurs par exocytose et diffusion latérale (Choquet & Triller, 2013; Kneussel et al., 2014), et de nombreuses modifications post-translationnelles (Fukata & Fukata, 2010; Fukata et al., 2013, 2015; Diering & Huganir, 2018). Des expériences de stimulation d'épines uniques par "décageage" (*uncaging*) de glutamate en microscopie bi-photon ont permis d'établir que le réarrangement du cytosquelette d'actine provoque en quelques secondes l'élargissement de l'épine (Matsuzaki et al., 2001, 2004; Honkura et al., 2008; Kasai et al., 2010) tandis que l'agrandissement de la PSD nécessite la synthèse *de novo* de protéines synaptiques, et s'effectue sur des dizaines de minutes (Bosch et al., 2014; Segal, 2017). L'induction de la dépression à long-terme (LTD) mène au rétrécissement des têtes d'épines et à l'augmentation de leur taux d'élimination, quelle que soit la méthode d'induction de la LTD : par stimulation électrique (Nägerl et al., 2004; Zhou et al., 2004), par décageage de neurotransmetteurs (Hayama et al., 2013) ou par stimulation optogénétique (Wiegert & Oertner, 2013). Le devenir des épines est donc intrinsèquement lié à celui des synapses qu'elles portent. L'étude précise des liens entre les différents types de plasticité synaptique et la réorganisation morphologique des épines dendritiques constitue un champ d'investigation très actif aujourd'hui en biologie moléculaire (Segal, 2017). En particulier, comprendre comment l'activation d'une épine facilite la plasticité structurale des épines voisines (Harvey et al., 2008) nécessite de connaître l'influence d'une épine unique sur les signaux électrochimiques générés par l'activation synaptique.

2. Compartimentation biochimique

Les signaux synaptiques ont deux composantes principales. D'une part, une composante électrique qui se propage dans l'arborisation dendritique depuis la membrane post-synaptique, et déclenche l'ouverture de conductances ioniques sensibles au potentiel membranaire (Stuart & Spruston, 2015). D'autre part, une composante biochimique, qui repose sur la diffusion locale d'espèces moléculaires activées en cascades (Nakahata & Yasuda, 2018). Ces deux composantes sont influencées par la morphologie des arborisations dendritique en général, et par la morphologie des épines dendritiques en particulier (Yuste et al., 2000; Higley & Sabatini, 2012; Yuste, 2013).

2.1. Signalisations enzymatiques

L'activation des récepteurs glutamatergiques dans les épines dendritiques génère une élévation transitoire de la concentration locale en ions calcium $[Ca^{2+}]$ d'un facteur 10 à 100 dans le terminal post-synaptique (Yasuda, 2017). Ce courant d'ions Ca^{2+} active en quelques millisecondes une série de protéines de signalisation qui émettent des signaux biochimiques pouvant durer jusqu'à plusieurs heures. Les premiers effecteurs de ces cascades biochimiques sont des protéines qui se lient spécifiquement aux ions Ca^{2+} , comme la calmoduline (CaM), une enzyme qui joue un rôle central au cours de la plasticité synaptique (Yasuda, 2017). Certaines kinases ciblées par la CaM, dont la calcineurine et la kinase CaM-dépendante II (CaMKII) réagissent avec de nombreux substrats (Nakahata & Yasuda, 2018) et gouvernent la potentiation ou la dépression synaptique selon leurs niveaux d'activation respectifs (Graupner & Brunel, 2012; Higley, 2014).

Dans les épines dendritiques, de taille micrométrique, la diffusion moléculaire sous-tend la propagation du signal biochimique (Yasuda, 2017). La distance caractéristique de diffusion des signaux biochimiques est définie intrinsèquement par le taux de diffusion de l'espèce moléculaire activée porteuse du signal et par le temps de vie de cet état activé. Les progrès récents des méthodes d'imagerie qui permettent de visualiser en direct l'activation et l'association des complexes protéiques, comme le FRET (*Förster Resonance Energy Transfer* ; Lerner et al., 2018) et le FLIM (*Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy* ; Sankaran et al., 2018), ont permis d'élucider l'ordre et la portée des événements biochimiques résultant de l'activation synaptique (Chen & Sabatini, 2012; Yasuda, 2017). Dès l'ouverture des canaux calciques, les ions calcium sont captés par la CaM (Guthrie et al., 1991; Müller & Connor, 1991; Bloodgood & Sabatini, 2007), elle-même inactivée par ses substrats abondants, notamment CaMKII (Sheng & Hoogenraad, 2007a). Les ions Ca^{2+} , CaM et CaMKII ne franchissent pas la barrière de diffusion que constitue le cou de l'épine dendritique. Les enzymes activées en aval de CaMKII, comme les GTPases RhoA, Rac1 et Cdc42, ou les kinases PKA et ERK, restent activées sur des temps plus longs, et propagent le signal biochimique sur des distances plus grandes — jusqu'aux synapses adjacentes, voire jusqu'au soma (Fig. 7 ; Harvey et al., 2008; Yasuda, 2017).

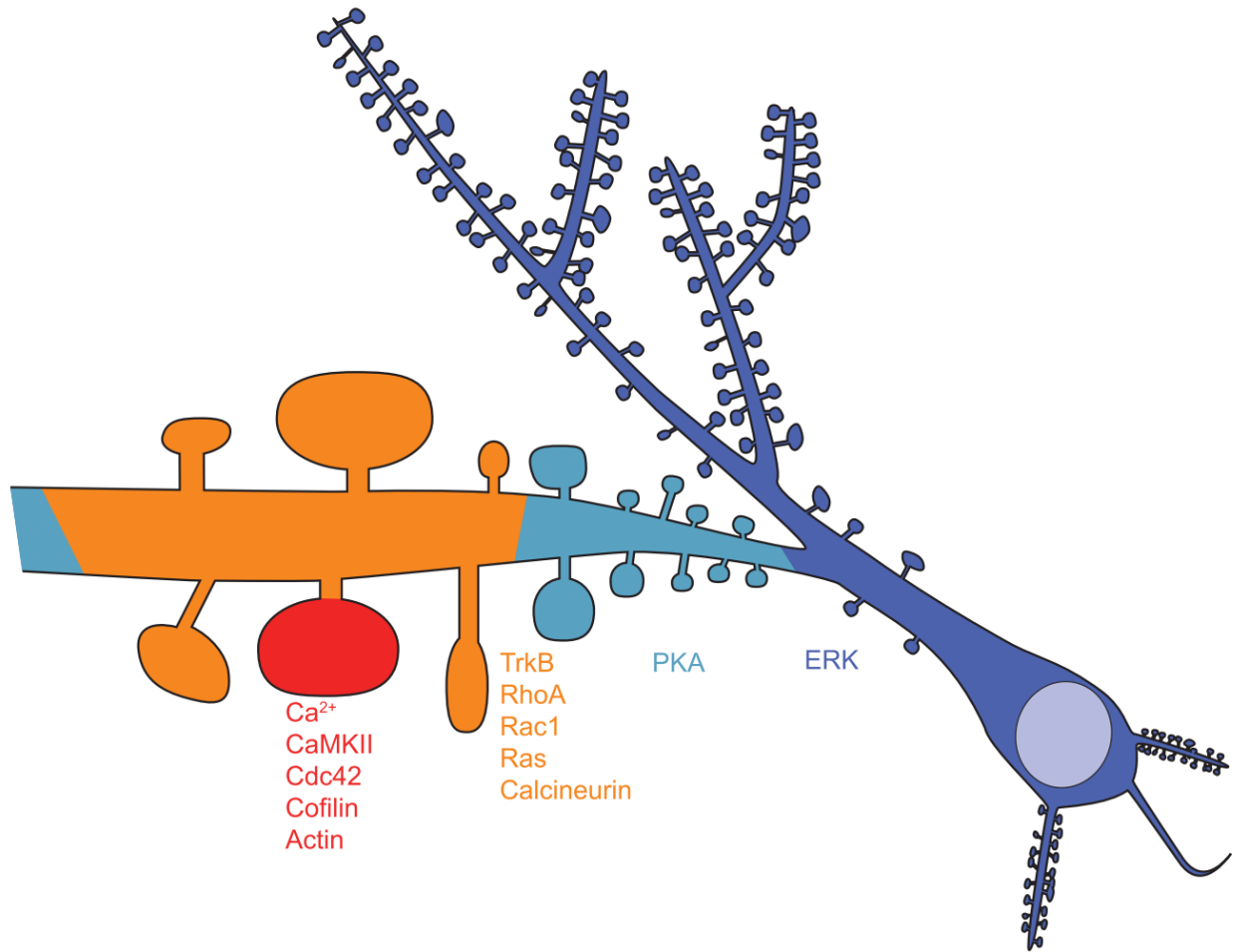


Figure 7 : Diffusion des signaux biochimiques générés par la stimulation d'une épine

Schéma représentant la diffusion des espèces moléculaires activées par une stimulation synaptique excitatrice et impliquées dans la plasticité structurale. Certaines protéines activées restent confinées à la tête de l'épine stimulée (en rouge). Les molécules situées en aval dans les cascades de signalisation biochimique diffusent sur de plus grandes distances : jusqu'à 15 μm en orange, et sur des dizaines de microns, voire jusqu'au soma, en bleu. Le voisinage de l'épine stimulée est agrandi intentionnellement. Adapté de Yasuda, 2017.

2.2. Diffusion moléculaire au travers des cous d'épines dendritiques

Les cous d'épine n'influencent pas tous la diffusion moléculaire de façon identique (Guthrie et al., 1991; Alvarez & Sabatini, 2007). L'équilibre diffusionnel s'établit de part et d'autre du cou d'épine au bout d'un temps caractéristique τ qui s'écrit, pour une espèce moléculaire donnée :

$$\tau = \frac{V W_{neck}}{D}$$

Introduction

où V est le volume de la tête de l'épine, W_{neck} représente le couplage diffusionnel entre la tête de l'épine et le tronc dendritique et D est la constante de diffusion 3D de l'espèce moléculaire considérée, dans le cou de l'épine (Svoboda et al., 1996).

En approximant le cou de l'épine à un cylindre de hauteur L et de section A constante, on écrit :

$$W_{neck} = \int \frac{dl}{A(l)} \sim \frac{L}{A} \quad \text{d'où} \quad \tau \sim \frac{VL}{DA}$$

τ dépend donc directement des paramètres géométriques de l'épine.

Des mesures de diffusion moléculaire basées sur la technique de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) ont permis d'aborder ce phénomène de façon quantitative *in vitro* (Svoboda et al., 1996; Majewska et al., 2000; Tønnesen & Nägerl, 2016). Ces études montrent que τ prend des valeurs très variables, pour une même espèce moléculaire, dans différentes épines : de ~ 100 ms à plusieurs secondes pour une molécule de la taille de la GFP selon l'épine sondée et l'activité synaptique (Majewska et al., 2000; Bloodgood & Sabatini, 2005; Bosch et al., 2014; Tønnesen et al., 2014). D'autres facteurs, comme la densité des réseaux d'actine, peuvent contribuer à diminuer D (Korobova & Svitkina, 2010) pour favoriser le confinement moléculaire dans les têtes d'épines et influencer le déroulement de la plasticité synaptique (Majewska et al., 2000; Korkotian et al., 2014; Tønnesen & Nägerl, 2016). Les épines sont donc inégales du point de vue de la compartimentation des espèces moléculaires activées par la transmission synaptique. En amont des dynamiques de signalisation enzymatique, l'ouverture des canaux calciques dépend directement de l'évolution du voltage membranaire dans les têtes d'épines dendritiques, donc de la composante électrique du signal reçu par l'épine (HigleySabatini2012).

3. Compartimentation électrique dans les épines dendritiques

Le cou des épines agit aussi comme une barrière de diffusion pour les espèces ioniques qui diffusent les dépolarisations membranaires des épines aux dendrites, jusqu'au soma. La morphologie des épines influence donc la propagation du courant synaptique, mais les dimensions sub-micrométriques des épines empêchent d'utiliser les techniques conventionnelles de patch-clamp pour mesurer directement le voltage membranaire dans la tête d'une épine dendritique (se référer toutefois à Jayant et al., 2017). Déterminer le degré de compartimentation électrique imposé par le cou des épines nécessite par conséquent d'utiliser des méthodes indirectes, qui se basent sur les connaissances théoriques de la conduction électrique dans les dendrites (Gulledge et al., 2012; Yuste, 2013; Tønnesen & Nägerl, 2016). Dans la partie qui suit, nous allons brièvement introduire les notions nécessaires à la modélisation du comportement électrique des épines dendritiques.

3.1. Eléments de modélisation électrique des neurones

Les études pionnières d'électrophysiologie menées par Alan Hodgkin et Andrew Huxley en 1952 sur l'axone géant du calmar ont montré que les neurites, dendrites incluses, sont analogues à des câbles électriques. La membrane plasmique des dendrites, qui forme une gaine imparfaitement isolante remplie d'une solution électrolytique et plongée dans une seconde solution électrolytique, est analogue à un câble unidimensionnel de résistance linéaire membranaire r_m , de capacitance linéaire membranaire c_m et de résistance linéaire interne r_l . L'équation de Poisson-Nernst-Planck permet de modéliser l'évolution locale de la tension électrique membranaire V selon :

$$\frac{r_m}{r_l} \frac{\partial^2 V}{\partial x^2} = c_m r_m \frac{\partial V}{\partial t} + V(x, t) \quad (1)$$

où le terme source, $V(x, t)$ est fonction des courants électriques imposés, notamment par les synapses, le long de la dendrite.

Depuis les travaux de Fourier au XIXème siècle, il est établi que les équations dites "de diffusion", qui présentent le formalisme mathématique de l'équation (1), peuvent être résolues par segments, dans des compartiments homogènes placés en série. Ici, chacun de ces compartiments est modélisé par un circuit électrique qui représente l'équation (1) (Fig. 8). Les travaux de Hodgkin et Huxley, puis Wilfrid Rall (Hodgkin & Huxley, 1952; Rall, 1964) et leurs successeurs, ont établi que les modèles compartimentés permettent de simuler numériquement $V(x, t)$ en tout point d'une arborisation dendritique ramifiée, dont les propriétés de conduction sont inhomogènes, et soumise à courants synaptiques variables (HinesCarnevale1997).

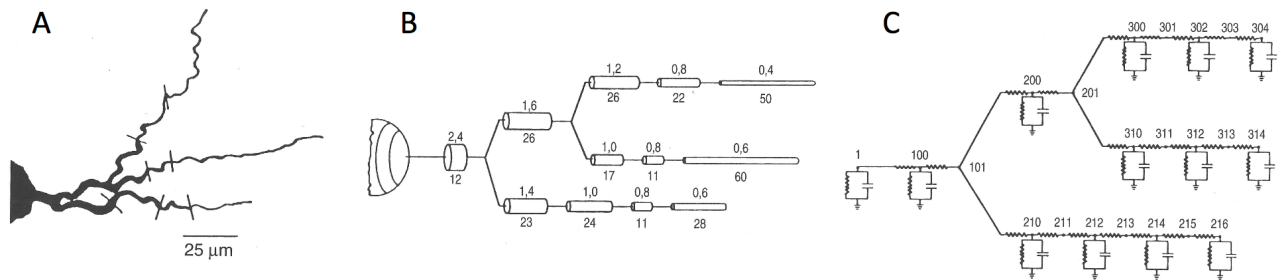


Figure 8 : Exemple de discrétisation d'une architecture dendritique en circuits RC équivalents

(A) Projection en 2D d'un fragment de soma et d'un bras dendritique dont on cherche à modéliser le comportement électrique. Les traits indiquent les limites des sections considérées comme des régions dendritiques homogènes (B) Représentation du même bras dendritique en une série de segments cylindriques de longueur et de diamètre fixé (en μm, au dessus et au dessous de chaque segment, respectivement) (C) Circuit électrique équivalent. Chaque cellule RC possède des propriétés données par les caractéristiques géométriques du segment dendritique correspondant. Les nombres représentent une possibilité de nomenclature pour repérer les différents éléments du modèle. Adapté de Tritsch et al., 1998.

3.2. Circuit équivalent à une épine dendritique

De même que les dendrites, les épines dendritiques peuvent être modélisées comme des câbles électriques, en tenant compte de leurs dimensions micrométriques, pour comprendre la façon dont elles compartimentent les signaux électriques. L'épine est analogue à trois circuits en série, équivalant respectivement à la tête de l'épine, au cou d'épine et au segment dendritique porteur de l'épine, et dotés d'une conductance membranaire (g_{head} , g_{neck} et $g_{dendrite}$) et d'une capacitance (C_{head} , C_{neck} et $C_{dendrite}$) déterminées par la surface membranaire de chaque compartiment. (Fig. 9 A et B ; Gullledge et al., 2012). Les conductances membranaires sont placées en série d'un potentiel fixe E_{rest} qui représente le potentiel de repos de la membrane plasmique et vaut généralement -70mV.

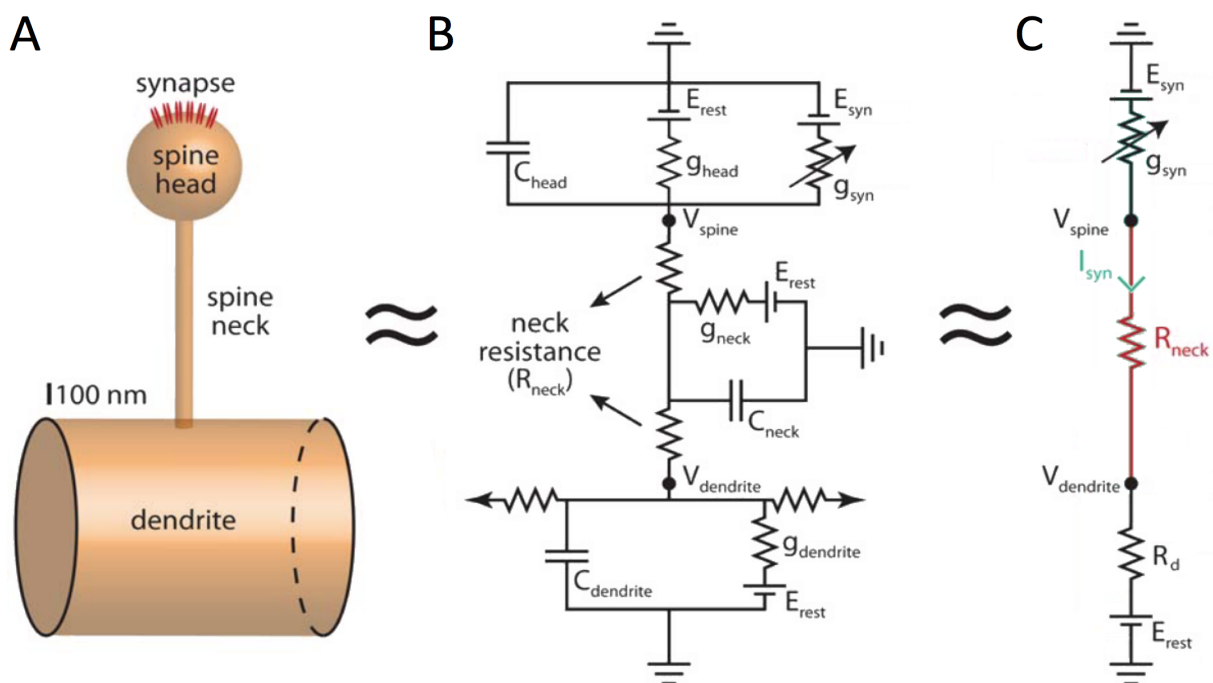


Figure 9 : Modélisation électrique de l'épine

(A) Schéma d'une épine modèle. Le cou long et fin connecte la tête en forme de bulbe au tronc dendritique considéré cylindrique. La synapse est modélisée par une conductance ionique (B) Circuit électrique équivalent à l'épine en A. E_{rest} : potentiel de repos ; C_{head} , C_{neck} et $C_{dendrite}$: capacités membranaires, négligeables à l'état stationnaire ; g_{head} , g_{neck} et $g_{dendrite}$: conductances membranaires. g_{neck} peut être négligée du fait de la faible surface membranaire du cou. g_{syn} et E_{syn} représentent la conductance et le potentiel d'inversion des différents types de canaux ioniques (K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) présents sur la tête des épines considérées (C) Circuit très simplifié de l'épine dans l'hypothèse d'un état stationnaire. Cette hypothèse forte permet de négliger les capacités membranaires. R_d représente la résistance équivalente à l'ensemble de l'arborisation dendritique. R_{neck} représente la résistance du cou de l'épine. À R_{neck} fixée, faire varier la conductance synaptique g_{syn} permet d'estimer les différents régimes de fonctionnement électrique des synapses. Adapté de Gullledge et al., 2012.

Les canaux ioniques sont modélisés par des conductance variable $g_{syn}(t)$ placées en série avec un potentiel E_{syn} qui représente le potentiel d'équilibre électrochimique (potentiel de Nernst) de l'ion considéré. De façon générale, on peut modéliser $g_{syn}(t)$ comme suit :

$$g_{syn}(t) = g_{syn,max}(e^{-t/T_1} - e^{-t/T_2})$$

où $g_{syn,max} \sim N_{syn} \gamma_{syn}$ représente la conductance maximale générée par N_{syn} canaux synaptiques de conductance unitaire γ_{syn} . T_1 et T_2 sont des constantes cinétiques propres aux canaux ioniques considérés, et déterminent le temps de croissance et de décroissance du potentiel évoqué (Dayan & Abbott, 2001; Harnett et al., 2012).

D'après la loi d'Ohm, lors de l'activation des canaux synaptiques, le courant synaptique s'écrit :

$$I_{syn}(t) = g_{syn}(t) [V_{spine}(t) - E_{syn}]$$

où $V_{spine}(t)$ est le potentiel de membrane à l'instant t (Segev & Rall, 1988).

Pour explorer les différents régimes de fonctionnement des épines dendritiques selon la valeur de R_{neck} , nous opérons plusieurs simplifications du modèle (Koch & Zador, 1993):

- nous négligeons l'activité des milliers d'autres synapses présentes sur une arborisation dendritique typique pour nous focaliser sur la réponse électrique d'une seule épine.
- nous négligeons les effets résistifs et capacitifs dans le cou et la tête de l'épine, du fait de leur faible surface membranaire.
- nous utilisons un modèle à l'état stationnaire, qui ne tient compte ni de l'évolution temporelle de $g_{syn}(t)$ ou de E_{syn} , ni des effets capacitifs, qui dépendent du temps.

Ces hypothèses permettent de simplifier beaucoup le circuit équivalent à l'épine (Fig. 9C) en approximant l'impédance de l'arborisation dendritique à une résistance d'entrée R_d , qui relie la base de l'épine à la masse électrique, i.e. le soma.

En l'absence d'épine ($R_{neck} = 0$), $V_{spine} = V_{dendrite}$, et les potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSPs) sont fonction de R_d , qui dépend de la distance au soma. À l'inverse, une résistance électrique forte dans le cou de l'épine $R_{neck} \gg R_{dendrite}$ réduit la dépendance du potentiel post-synaptique excitateur (EPSP) à la distance au soma et standardise l'activation des récepteurs NMDA et des canaux calciques actifs situés dans la tête de l'épine. Par ailleurs, augmenter R_{neck} renforce la dépolarisation dans la tête de l'épine et amplifie la réponse des récepteurs actifs par rapport au synapses formées sur des dendrites lisses (Yuste, 2013). Ces données suggèrent que réguler R_{neck} permet de moduler les caractéristiques électriques de la tête de l'épine, et d'ajuster par conséquent le filtrage des signaux synaptiques.

Introduction

Pour comprendre les effets électriques de la résistance du cou de l'épine, nous nous intéressons au cas où $R_{neck} \neq 0$. L'application de la loi d'Ohm à chaque segment du circuit électrique simplifié (Fig. 9C) permet d'écrire :

$$I_{syn} = g_{syn} (V_{spine} - E_{syn}) \quad (1)$$

$$V_{spine} - V_{dendrite} = R_{neck} I_{syn} \quad (2)$$

$$V_{dendrite} - E_{rest} = R_d I_{syn} \quad (3)$$

On définit $R_{syn} = R_d + R_{neck}$ pour écrire la dépolarisation générée dans la tête de l'épine :

$$\Delta V_{spine} = V_{spine} - E_{rest} = R_{syn} g_{syn} (V_{spine} - E_{syn}) \quad (4)$$

D'où :

$$\Delta V_{spine} = R_{syn} g_{syn} \frac{E_{syn} - E_{rest}}{1 + R_{syn} g_{syn}} \quad (5)$$

De même, la dépolarisation générée dans le tronc dendritique peut s'écrire :

$$\Delta V_{dendrite} = V_{dendrite} - E_{rest} = R_d g_{syn} \frac{E_{syn} - E_{rest}}{1 + R_{syn} g_{syn}} \quad (6)$$

Pour une épine donnée de position et de morphologie fixée, soit à R_{syn} fixée, on fait varier g_{syn} pour étudier les différents régimes limites de fonctionnement de l'épine.

- Dans la limite des courants synaptiques faibles, lorsque $R_{syn} g_{syn} \ll 1$, l'amplitude de l'EPSP dans la tête de l'épine et dans le tronc dendritiques peuvent respectivement s'écrire :

$$\Delta V_{spine} = R_{syn} g_{syn} (E_{syn} - E_{rest}) \propto R_{syn} \quad (7)$$

et

$$\Delta V_{dendrite} = R_d g_{syn} (E_{syn} - E_{rest}) \propto R_d \quad (8)$$

Pour de faibles courants synaptiques, l'amplitude de l'EPSP dans le tronc dendritique ne dépend donc pas de R_{neck} mais uniquement de R_d : le cou de l'épine n'a pas d'influence sur le transfert du courant synaptique au soma.

- Dans la limite des courants synaptiques forts, lorsque $R_{syn} g_{syn} \gg 1$, l'amplitude de l'EPSP dans la tête de l'épine et dans le tronc dendritiques tendent respectivement vers :

$$\Delta V_{spine} = (E_{syn} - E_{rest}) \quad (9)$$

et

$$\Delta V_{dendrite} = \frac{R_d}{R_{syn}} (E_{syn} - E_{rest}) \propto \frac{R_d}{R_{syn}} \quad (10)$$

Dans ce régime, V_{spine} sature et tend vers $E_{syn} = 0\text{mV}$ et $\Delta V_{dendrite}$ est proportionnelle à $\frac{R_d}{R_{syn}}$.

Dans le régime des courants synaptiques forts, R_{neck} influence donc le potentiel dendritique et la résultante somatique de l'EPSP, et la modulation de R_{neck} par déformation du cou de l'épine est en mesure d'ajuster le filtrage des signaux synaptiques (Koch & Zador, 1993; Tønnesen & Nägerl, 2016).

Déterminer le mode de fonctionnement d'épines dendritiques données nécessite de connaître R_d , R_{neck} et g_{syn} .

3.3. Controverse liée à l'ajustement du transfert du courant synaptique au soma

D'après la littérature, g_{syn} est de l'ordre de $\sim 100\text{pS}$ pour une synapse excitatrice faiblement dépolarisée — où seuls les récepteurs AMPA s'ouvrent, et de l'ordre de $\sim 1\text{nS}$ lorsque les récepteurs NMDA s'activent (Rhodes, 2006). R_d dépend de la distance à la masse électrique : différentes études indiquent que R_d peut valoir de 5 à 20 $\text{M}\Omega$ pour une distance de $10\mu\text{m}$ à $100\mu\text{m}$ le long de la dendrite apicale primaire de PNs de CA1 (Harnett et al., 2012) ou de PNs corticaux en couche 5 (Jayant et al., 2017), et atteindre plusieurs centaines de $\text{M}\Omega$ pour les synapses les plus distales (Spruston, 2008; Harnett et al., 2012). Différentes méthodes indirectes ont été proposées pour estimer R_{neck} :

- *Mesures de diffusion moléculaire*

Le cytoplasme contenu dans le cou de l'épine oppose une résistance $R_{neck} = \rho W_{neck}$ au passage d'un courant électrique, où ρ représente la résistivité cytoplasmique et W_{neck} représente le couplage diffusionnel entre la tête de l'épine et le tronc dendritique (Svoboda et al., 1996). La technique de FRAP permet de mesurer $\tau = \frac{V W_{neck}}{D}$ dans un cou d'épine donné, donc de déduire $R_{neck} = \frac{\rho D \tau}{V}$ où V est le volume de la tête de l'épine, et D est la constante de diffusion, dans le cou de l'épine, de l'espèce moléculaire utilisée pour la mesure de FRAP. Cependant, ρ doit être mesuré séparément, ce qui rend cette méthode de mesure indirecte. Les mesures de FRAP réalisées *in vitro* en LM conventionnelle puis super-résolutive (Svoboda et al., 1996; Bloodgood & Sabatini, 2005; Tønnesen et al., 2014) ont permis d'estimer que R_{neck} pouvait varier de 4 à 1200 $\text{M}\Omega$ au sein de tranches organotypiques d'hippocampe de souris adultes (Tønnesen & Nägerl, 2016), avec des valeurs de ρ choisies en général entre 100 et 300 $\Omega\cdot\text{cm}$ (Miceli et al., 2017).

- *Mesures de $[\text{Ca}^{2+}]$*

Les méthodes d'imagerie calcique peuvent aussi de fournir des estimations indirectes de R_{neck} , puisque $[\text{Ca}^{2+}]$ dépend de façon non-linéaire de l'élévation du potentiel électrique dans la tête de l'épine (Higley & Sabatini, 2012). En enregistrant simultanément le potentiel électrique dans le tronc dendritique et la variation de $[\text{Ca}^{2+}]$ dans l'épine, il est possible d'estimer R_{neck} (Harnett et al., 2012).

Introduction

Cependant, le faible rapport signal-sur-bruit (RSB) de l'imagerie calcique favorise l'enregistrement d'épines où la variation de $[Ca^{2+}]$ est maximale, ce qui correspond aux plus fortes dépolarisations, et donc aux épines de plus forte résistance électrique (Segev & Rall, 1988; Gullledge et al., 2012). Ces estimations de R_{neck} constituent de fait une limite haute pour les valeurs physiologiques de R_{neck} : entre 400 et 1200 M Ω (Grunditz et al., 2008; Harnett et al., 2012).

- *Mesures de V_{spine}*

L'utilisation de senseurs fluorescents du voltage intracellulaire fournit quant à elle des estimations très basses de R_{neck} . Une étude pionnière dans l'utilisation de ces senseurs rapporte une valeur moyenne $R_{neck} \sim 27M\Omega$ (Popovic et al., 2015), mais la calibration très délicate des senseurs de voltage rend ces estimations controversées.

- *Mesures de morphologie ultrastructurale*

La quatrième méthode repose sur la mesure du couplage diffusionnel W_{neck} par modélisation 3D des cou d'épine pour estimer R_{neck} selon la relation :

$$R_{neck} = \rho W_{neck} = \rho \int \frac{dl}{A(l)} \sim \frac{\rho L}{A}$$

où $A(l)$ représente la section du cou à l'abscisse l le long de l'axe du cou. Là encore, ρ provient de mesures indépendantes, ce qui rend cette méthode indirecte. Une étude menée en STED fournit des valeurs de R_{neck} comprises entre 1-600M Ω (Tønnesen & Nägerl, 2016), et une étude menée en EM 3D propose l'intervalle 1-400M Ω (Harris & Stevens, 1989), avec $\rho = 100 \Omega.cm$ dans les deux cas. L'un des principaux avantages de l'utilisation de la 3D-EM pour réaliser ce type de mesure est la possibilité de visualiser les organelles intracellulaires (par exemple, l'appareil épineux) qui peuvent modifier le volume résistif du cou de l'épine, et potentiellement influencer R_{neck} (Bourne & Harris, 2008; Lagache, Jayant, et al., 2018; Kennedy & Hanus, 2019).

En résumé, les valeurs possibles de R_{neck} se situent dans l'intervalle 0-1200 M Ω , ce qui nous permet d'estimer les différents régimes de fonctionnement électrique des épines dendritiques dans deux cas particuliers :

Dans un cas où seuls les récepteurs AMPA s'activent, soit $g_{AMPA} \sim 10pS$ et où la résistance du cou est élevée : $R_{syn} \sim 1000M\Omega$. Alors $R_{syn}g_{syn} \sim 0.01 \ll 1$

En tenant compte des simplifications radicales effectuées pour établir notre modèle électrique, le cou de l'épine a très peu d'effet sur le transfert du courant synaptique jusqu'au soma, dans ces conditions.

Dans le cas où les récepteurs NMDA s'ouvrent et la conductance $g_{syn} \geq 1000pS$, pour une résistance $R_{syn} \sim 1000M\Omega$, on obtient : $R_{syn}g_{syn} \geq 1$

R_{neck} influence alors l'amplitude de la dépolarisation dendritique de façon non-négligeable.

En pratique, R_{neck} couvre 4 ordres de grandeur, et g_{syn} en couvre 3, sans proportionnalité *a priori* entre les deux grandeurs (Arellano, 2007). Ainsi, $R_{syn}g_{syn}$ varie autour de 1, et le régime de fonctionnement des épines dendritiques varie en conséquence. La morphologie des épines et la composition synaptique contrôlent donc simultanément la dépolarisation dans la tête de l'épine et le transfert des signaux synaptiques au soma (Yuste, 2013). Mesurer précisément la distribution de R_{neck} le long de dendrites identifiées permet d'évaluer la proportion d'épines qui compartimentent effectivement la composante électrique des signaux synaptiques.

3.4. Régulation dynamique de la compartimentation électrique par les cous d'épine

La régulation dynamique de R_{neck} peut-elle moduler l'efficacité du transfert des signaux synaptiques aux dendrites et au soma ? Cette idée n'est pas nouvelle (Chang, 1952; Rall, 1970) et a incité très tôt à modéliser l'effet théorique de la variation de R_{neck} sur les résultantes dendritique et somatique du signal synaptique (Koch & Zador, 1993). Le modèle proposé par Koch et Zador en 1993 met en doute la capacité des cous d'épine à moduler la résultante somatique des EPSPs dans la majorité des épines des PNs de CA1 du fait de valeurs basales de R_{neck} et g_{syn} supposées très basses ($R_{neck} < 50\text{M}\Omega$ et $g_{syn} < 0.5\text{nS}$). Ce modèle ne fournit pas de réponse, cependant, quant à l'effet des variations de R_{neck} sur la dépolarisation dans la tête de l'épine activée, ni sur l'effet résultant dans les épines voisines.

Depuis, de nombreuses études *in vitro* ont établi les corrélations entre plasticité structurale et modulation du rapport $\frac{V_{dendrite}}{V_{spine}}$ (Grunditz et al., 2008; Yuste, 2013; Tønnesen & Nägerl, 2016).

Récemment, Araya et coll. ont montré que la combinaison du décageage de glutamate et de la stimulation électrique du neurone post-synaptique provoque simultanément le raccourcissement du cou de l'épine stimulée d'environ 50% de sa longueur totale et une augmentation immédiate de la réponse synaptique de l'ordre de 20%. (Araya et al., 2014). La modification initiale de R_{neck} par raccourcissement de l'épine pourrait expliquer l'augmentation de $\frac{V_{dendrite}}{V_{spine}}$ pendant la phase initiale de la LTP. Cependant, selon le modèle développé par Gullledge et coll. pour déterminer *in silico* la fonction des épines dendritiques, passer virtuellement de $R_{neck} \sim 500\text{M}\Omega$ à $R_{neck} = 0\Omega$, à g_{syn} fixée, ne permettrait pas d'atteindre 20% d'augmentation de la résultante somatique des EPSPs (Gullledge et al., 2012). Le fait qu'un changement aussi brutal et non physiologique de R_{neck} soit insuffisant pour reproduire en théorie la potentiation observée par Araya et coll. suggère que d'autres mécanismes régulent l'amplitude des EPSPs, comme la diffusion latérale rapide ($\sim 1\text{min}$) de récepteurs supplémentaires jusqu'à la PSD potentiée (Matsuzaki et al., 2004; Choquet & Triller, 2013). Quantifier à

la fois le nombre de neurorécepteurs présents aux synapses potentiées, l'aire de leur PSD et la morphométrie des épines qui les portent permettrait d'estimer avec quelle précision R_{neck} et g_{syn} sont co-régulés au sein des épines.

4. Intégration dendritique

Nous avons détaillé jusqu'ici les raisons de la compartimentation des signaux excitateurs au niveau de l'épine, et un saut d'échelle est maintenant nécessaire pour relier ces notions à la fonction neuronale. Dans cette partie, nous décrirons brièvement les mécanismes d'intégration des signaux synaptiques au sein de l'arborisation dendritique (Stuart & Spruston, 2015) afin d'aborder le rôle et la compartimentation des signaux inhibiteurs, selon la formule de Sir John C. Eccles (1977) : *"I always think that inhibition is a sculpturing process. The inhibition, as it were, chisels away at the [...] mass of excitatory action and gives a more specific form to the neuronal performance at every stage of synaptic relay."*

4.1. Propriétés passives et actives des dendrites

Les dendrites ont été d'abord considérées comme des câbles électriques ramifiés qui captent passivement l'information synaptique (Rall, 1970). En général, les dendrites filtrent et atténuent les potentiels synaptiques à mesure qu'ils se propagent, ce qui donne *a priori* un rôle prépondérant aux synapses proximales pour contrôler l'émission d'AP (Stuart & Spruston, 2015). Cependant, les dendrites traitent aussi l'information synaptique de façon active (Palmer, 2014). Des approches combinées d'imagerie calcique et d'électrophysiologie ont établi que l'activation des canaux ioniques actifs insérés dans les membranes dendritiques peut produire un pic de dépolarisation local, dit "dendritique" (Spruston, 2008). Le seuil d'activation de ces canaux (~ -35 mV d'après Sarid et al., 2015) est généralement plus élevé que le seuil d'activation des canaux sodium localisés dans le segment initial de l'axone (~ -55 mV en général), ce qui conditionne l'émission de pics dendritiques à une activité excitatrice locale, intense et synchrone (Segev & Rall, 1988; Hausser et al., 2000). Ce phénomène permet l'intégration supra-linéaire d'influx synaptiques excitateurs coïncidents et localisés sur un même segment dendritique, et fournit aux contacts excitateurs les plus distaux un moyen d'influencer l'émission d'AP (Koch & Segev, 2000; Poirazi et al., 2003; Jarsky et al., 2005; Stuart & Spruston, 2015). La localisation précise des synapses influence directement la probabilité d'émission des pics dendritiques, et joue un rôle clé pour l'établissement de la fonction neuronale (Boivin & Nedivi, 2018). Quant à elles, les synapses inhibitrices peuvent moduler localement l'excitabilité dendritique, et réduire à la fois la propension des synapses adjacentes à générer des AP et des pics dendritiques (Gidon & Segev, 2012). Pour comprendre l'influence de la signalisation inhibitrice sur la fonction des PNs, il

faut connaître le mode d'action des synapses inhibitrices, et leur distribution précise le long de l'arbre dendritique.

4.2. Inhibition axo-dendritique

Dans les circuits neuronaux matures, l'ouverture des récepteurs GABA_A provoque en général une augmentation nette de la conductance membranaire, qui limite la capacité des courants synaptiques excitateurs à modifier le potentiel de membrane (Paulus & Rothwell, 2016). Cet effet, nommé inhibition de shunt (*shunting inhibition*), constitue le mode d'action principal des récepteurs GABA_A lorsque la membrane est proche de son potentiel de repos (Isaacson & Scanziani, 2011). Plusieurs études montrent que l'inhibition du tronc dendritique peut bloquer la propagation des signaux excitateurs (Hao et al., 2009; Gidon & Segev, 2012). Du point de vue du soma, une synapse inhibitrice proximale peut ainsi faire temporairement écran à toutes les afférences excitatrices situées dans des segments plus distaux de l'arbre dendritique (Boivin & Nedivi, 2018). Des contacts inhibiteurs synchronisés peuvent aussi fonctionner en réseau pour moduler l'excitabilité dendritique à l'échelle du neurone entier (Gidon & Segev, 2012; Müllner et al., 2015). Ces données suggèrent que les synapses inhibitrices sont localisées de façon stratégique le long de l'arbre dendritique, de sorte que la réorganisation d'un petit nombre de synapses inhibitrices influence considérablement le fonctionnement de pans entiers de l'arborisation dendritique (Poirazi & Mel, 2001; Chklovskii et al., 2004). Cependant, les modèles utilisés pour émettre ces hypothèses ne prennent pas ou peu en compte l'existence de synapses inhibitrices localisées sur les épines dendritiques. Ces épines dendritiques particulières, qui reçoivent un contact inhibiteur en plus de leur contact excitateur sont dites "doublement innervées" (DiS, pour Dually-innervated Spines ; Fig. 10A&B ; Jones & Powell, 1969) et jouent un rôle encore inconnu au sein des processus d'intégration dendritique (Chiu et al., 2013; Kubota et al., 2016).

4.3. Inhibition axo-spinale

4.3.1. Morphologie des épines doublement innervées (DiS)

Dans les circuits corticaux, les PSDs inhibitrices (iPSDs) portées par les DiS (DiS-iPSDs) constituent à la fois une proportion importante des contacts formés par les interneurones, et une proportion importante des contacts inhibiteurs reçus par les PN. Du point de vue pré-synaptique, plus de 30% des synapses inhibitrices contactent des épines dendritiques plutôt que les troncs dendritiques (Kubota et al., 2015; Villa et al., 2016). Du point de vue post-synaptique, une proportion variable des contacts inhibiteurs des PN est portée par des DiS plutôt que par les troncs dendritiques : environ 30% sur les dendrites obliques des PN des L2/3 du SSC de jeunes souris (âgées de 21 jours ; Fossati et al., 2016) et 14% dans le cortex visuel primaire de souris adultes (>40 jours ; Chen et al., 2012).

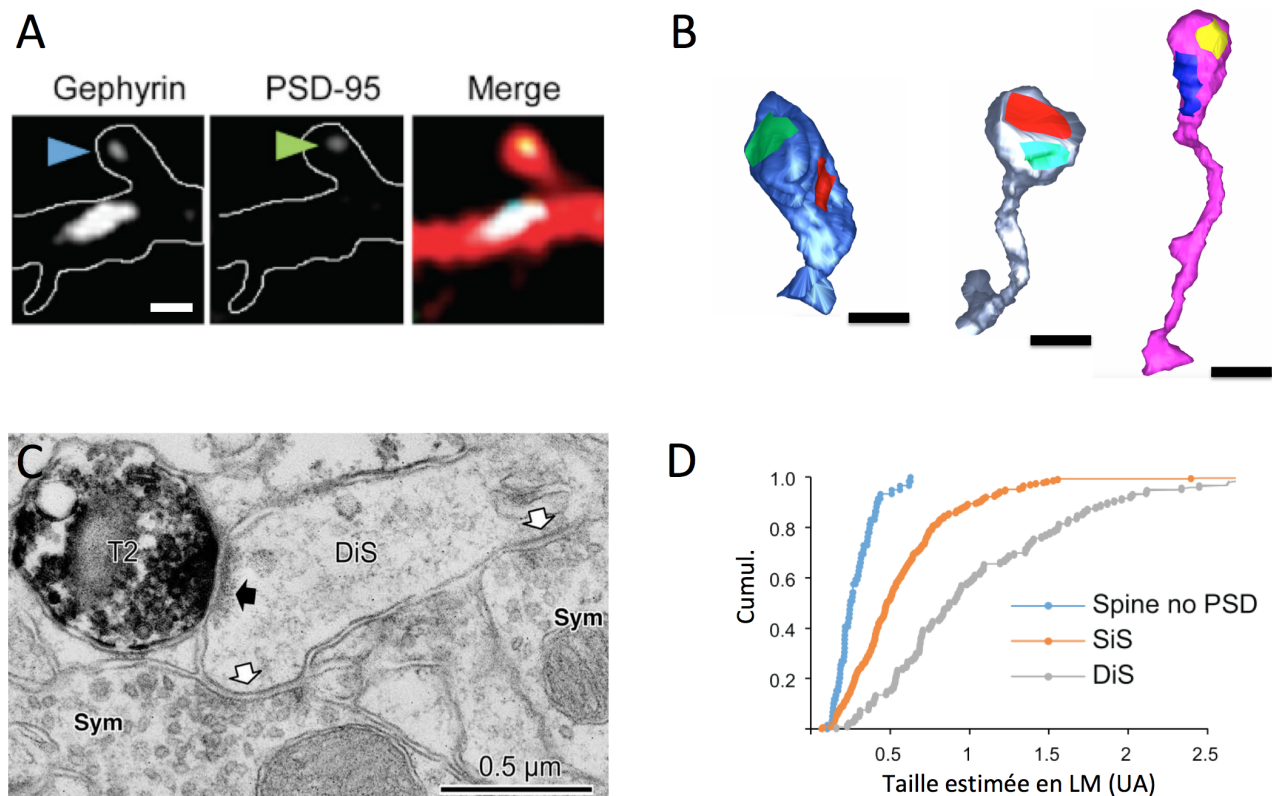


Figure 10 : Morphologie des épines doublement innervées

(A) Visualisation en microscopie bi-photon *in vivo* d'une épine dendritique contenant à la fois PSD-95 (tête de flèche verte) et géphyrine (tête de flèche bleue), ce qui suggère qu'elle reçoit à la fois un contact exciteur et un contact inhibiteur (B) Reconstitutions d'épines doublement innervées (DiS) à partir d'acquisitions d'EM 3D. Les deux contacts synaptiques distincts sont représentés par des surfaces de couleurs différentes (C) Image en TEM d'une DiS corticale. Le transporteur vésiculaire du glutamate VGLUT2 (T2) est marqué par coloration immunocytochimique à la diaminobenzidine (DAB) afin de visualiser les afférences excitatrices thalamo-corticales. Le bouton marqué en DAB forme une synapse excitatrice avec la DiS (flèche noire). Deux synapses symétriques (flèches blanches) sont identifiées comme inhibitrices (D) Mesures de tailles d'épines en fonction du nombre de contacts synaptiques qu'elles portent, réalisées en microscopie bi-photon *in vivo*. Les épines sans PSD sont en général plus petites que les épines simplement innervées (SiS), elles-même plus petites que les DiS. Calibrations : 500nm. A & D : adaptés de Villa et al., 2016. C : adapté de Kubota et al., 2015.

Une étude d'immunocytochimie menée en EM montre que les DiS reçoivent spécifiquement des afférences thalamo-corticales, dans le cortex somato-sensoriel (SSC) du rat (Fig nC ; Kubota et al., 2007). Kubota et coll. ont mesuré la diminution du taux de double innervation au sein du neuropil, à mesure que la profondeur des couches corticales augmente : la proportion de DiS décroît de <10% dans la couche L1 à <1% dans la couche L6 (Kubota et al., 2016). Cette rareté rend freine l'étude des DiS en EM, mais la microscopie de fluorescence a montré que les DiS étaient plus globalement volumineuses que les autres épines dendritiques (Fig. 10D), et permis d'étudier leur implication *in vivo* dans les

phénomènes de plasticité sensorielle, au sein des réseaux thalamo-corticaux (Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Fossati et al., 2016).

4.3.2. Comportement dynamique des DiS

In vivo, les synapses portées, ou non, par des DiS ont des comportements distincts. Une proportion importante des synapses inhibitrices qui contactent une DiS (DiS-iPSD) apparaît et disparaît fréquemment au même *locus* au fil des jours (DiS-iPSDs récurrentes ; Fig. 11A ; Villa et al., 2016) alors que les contacts excitateurs portés par les DiS (DiS-ePSD) sont plus stables que les ePSDs portées par des SiS (Fig. 11B-ePSDs). Par ailleurs, les DiS-iPSDs sont plus dynamiques que les iPSDs portées par les troncs dendritiques (Fig. 11B-iPSDs). Le comportement dynamique des DiS se distingue aussi dans un contexte de plasticité sensorielle : la stimulation intense et prolongée (24h) de vibrisses de souris *wild-type* provoque une augmentation de la densité des DiS dans les régions du SSC correspondant aux vibrisses stimulées (Fig. 11C ; Knott et al., 2002). Depuis cette étude pionnière, plusieurs travaux ont décrit le comportement des DiS au cours de protocoles de déprivation monoculaire (MD ; occultation d'un œil), qui provoque en général une perte globale de synapses inhibitrices dans le cortex visuel binoculaire, à la fois sur les épines et sur les troncs dendritiques (Fig. 11D ; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012). Plus en détail, la proportion de DiS-iPSDs récurrentes augmente au cours de la plasticité, mais leur fréquence de réapparition diminue, ce qui sous-tend la désinhibition globale des circuits corticaux impliqués au cours de la MD (Villa et al., 2016). Les mécanismes de signalisation qui sous-tendent ces propriétés dynamiques uniques sont encore inconnus.

4.3.3. Fonctions supposées des DiS

Les interactions électriques et biochimiques exactes entre une DiS-iPSD et la DiS-ePSD adjacente ne sont que partiellement caractérisées : des expériences pionnières de décageage combiné de glutamate et de GABA *in vitro* montrent que les DiS-iPSDs peuvent au moins atténuer les dépolarisations membranaires évoquées par la DiS-ePSD adjacente (Chiu2013). Dans l'hypothèse de signaux inhibiteurs forts synchronisés avec des signaux excitateurs faibles générés dans les mêmes DiS, la DiS-iPSD pourrait filtrer de façon binaire des connexions excitatrices ciblées, à l'échelle de l'épine unique (*synaptic gating* ; Kubota et al., 2015). Une autre hypothèse suggère que les DiS-iPSDs ajustent le potentiel membranaire dans la tête de l'épine pour moduler l'ouverture des canaux calciques, afin de contrôler les processus de plasticité structurale (Higley, 2014). Plus précisément, en limitant l'amplitude des courants calciques, la DiS-iPSD pourrait favoriser la dépression structurale de l'épine (Higley, 2014; Yasuda, 2017), mais il manque une description quantitative des communications

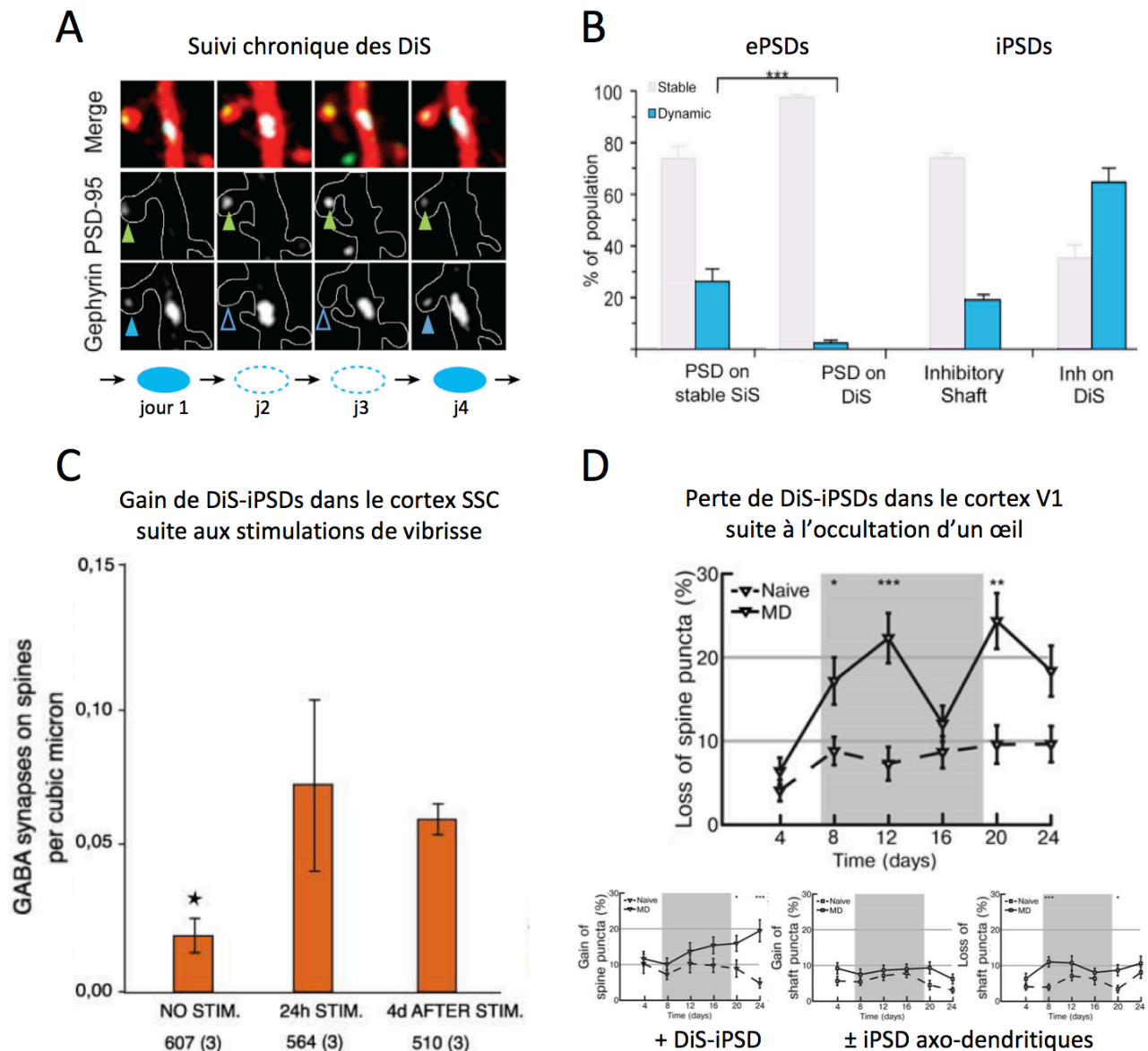


Figure 11 : Propriétés dynamiques des DiS-iPSDs

(A) Visualisation en microscopie bi-photon *in vivo* d'une épine doublement innervée (DiS) en conditions basales, pendant quatre jours consécutifs. La présence continue de PSD-95 (tête de flèche verte) indique que la PSD excitatrice (ePSD) est restée stable pendant l'observation. La présence discontinue de la géphyrine (tête de flèche bleue) suggère que l'iPSD apparaît et disparaît de manière répétée au même *locus* au fil des jours (B) Proportions de PSDs renouvelées au cours de 8 jours d'observation *in vivo* consécutifs. Les DiS-ePSDs sont plus stables que les SiS-ePSDs. Les DiS-iPSDs sont plus dynamiques que les iPSDs portées par les troncs dendritiques (C) Quantification en EM de l'augmentation de la densité de DiS dans le cortex SSC de rats suite à la stimulation d'une vibrisse pendant 24h. Le gain de DiS se maintient plusieurs jours après la stimulation (D) Quantification en microscopie bi-photon *in vivo* de l'apparition et de la disparition d'iPSDs portées par les DiS ou les troncs dendritiques dans le cortex visuel primaire (V1), en conditions basales (lignes pointillées) ou suite à l'occultation d'un oeil (lignes continues). L'augmentation du taux d'élimination des DiS-iPSDs provoque une désinhibition globale dans V1. A & B : adaptés de Villa et al., 2016. C : adapté de Knott et al., 2002. D : adapté de van Versendaal et al., 2012.

synaptiques au sein des DiS pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Aborder cette question nécessite de décrire à la fois les contenus moléculaires et le potentiel membranaire de DiS identifiées, mais la petitesse et la rareté des DiS les rend difficiles à étudier *in vivo* avec les approches standard. Le chapitre suivant dresse un état de l'art des méthodes d'imagerie, qui permettent soit d'identifier des DiS en circuits intacts et de mesurer les densités des molécules les constituent, soit de quantifier leurs paramètres morphologiques. Combiner ces données permettra de modéliser *in silico* l'interaction de signaux synaptiques excitateurs et inhibiteurs au sein de DiS corticales.

Chapitre III. Apports de la microscopie corrélative optique-électronique

La taille nanoscopique des constituants synaptiques impose d'utiliser des méthodes d'imagerie avancées pour comprendre leurs interactions, et les fonctions qui en émergent. La microscopie électronique (EM) et la microscopie optique (LM) ont joué un rôle fondamental dans le développement des neurosciences. D'une part, l'EM a permis de décrire l'ultrastructure de l'appareil synaptique (De Robertis & Bennett, 1954; Gray, 1959; Heuser & Reese, 1981; Zuber et al., 2005; High et al., 2015; Tao et al., 2018). D'autre part, le développement de sondes fluorescentes "sur mesure" (Rodriguez et al., 2017) a permis d'aborder les fonctions synaptiques en LM dans des échantillons vivants. Cependant, les limites des méthodes de LM conventionnelles ont été atteintes :

- il est impossible de combiner suffisamment de marqueurs fluorescents au sein d'un même échantillon pour décrire le contexte cellulaire. Les molécules marquées ne représentent qu'une petite fraction des molécules en présence, et leur observation peut être difficile à interpréter (De Boer et al., 2015).
- la résolution de la LM est limitée à ~300nm pour les méthodes d'imagerie optique conventionnelles, et à ~10nm pour les microscopies super-résolutives (SRM) mises au point ces dernières décennies (Huang et al., 2009; Yang & Specht, 2019). La LM ne permet donc pas de résoudre le détail des complexes moléculaires, dont la taille varie souvent entre 0,1 et 10nm.

A contrario, la microscopie électronique (ME) permet de détailler avec une résolution subnanométrique le contexte ultrastructural dans lequel s'intègrent les biomolécules d'intérêt, mais présente trois contraintes intrinsèques majeures :

- les molécules individuelles sont pratiquement impossibles à distinguer les unes des autres sur les images en nuances de gris fournies par la ME,
- les échantillons biologiques doivent être fixés avant l'observation ce qui limite l'étude des processus dynamiques,
- les structures biologiques rares (e.g. les épines doublement innervées) sont extrêmement difficiles à repérer en EM volumétrique (3D), sans stratégie de marquage *ad hoc*.

Les limites des techniques d'imagerie monomodales incitent à développer de nouvelles approches pour faire progresser notre connaissance du système nerveux (Begemann & Galic, 2016) : la microscopie corrélative optique-électronique (CLEM) permet de combiner les informations fournies par les deux types d'imagerie en contournant leurs limites respectives, pour analyser la distribution de molécules ciblées dans des structures biologiques rares tout en conservant l'information de contexte biologique et de morphologie ultrastructurale (De Boer et al., 2015). Pour définir les modalités d'imagerie qui conviennent à notre étude, nous présenterons brièvement les différents types d'imagerie LM et EM, avant d'aborder les approches CLEM qui permettent d'étudier les circuits corticaux.

1. Approches de microscopie électronique

L'EM repose sur l'irradiation d'un échantillon avec un faisceau d'électrons, et la détection des électrons transmis à travers, ou diffusés par l'échantillon.

1.1. Formation d'image

Il existe deux paradigmes de formation d'image en EM : microscopie à transmission (TEM) et microscopie à balayage (SEM). En TEM, l'échantillon à observer est placé entre la source d'électrons et le détecteur (Fig. 12A). L'échantillon doit être suffisamment fin pour que le faisceau d'électrons le traverse et forme une image sur le détecteur.

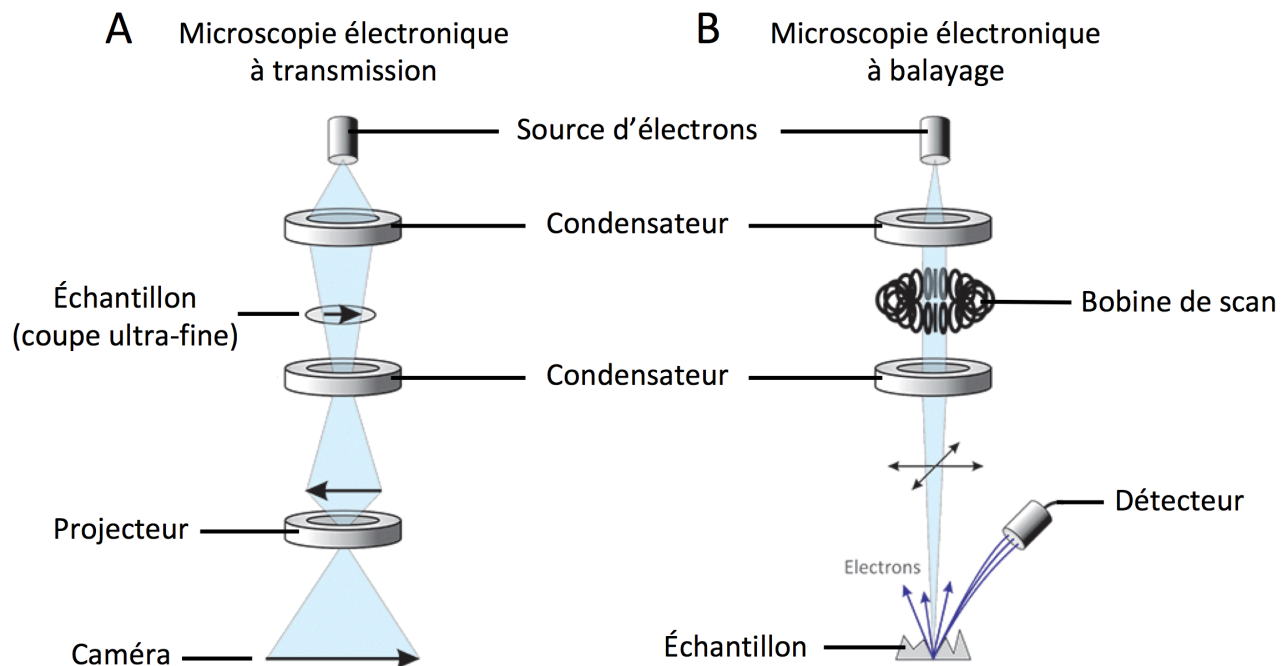


Figure 12 : Principaux paradigmes de formation d'image en EM

(A) Géométrie standard d'un microscope électronique à transmission (TEM). Le faisceau d'électrons est accéléré par une tension d'environ 100kV, et concentré par des lentilles électromagnétiques (condensateurs et projecteur) avant de traverser l'échantillon, qui disperse une partie des électrons incidents. En sortie de l'échantillon, le faisceau d'électrons contient des informations sur l'ultrastructure de l'échantillon, et forme une image sur une caméra qui enregistre le flux d'électrons transmis (B) Géométrie standard d'un microscope électronique à balayage (SEM). Le faisceau, accéléré par une tension plus faible qu'en TEM (1-5kV), est focalisé sur l'échantillon. L'interaction des électrons incidents avec la matière en surface de l'échantillon génère des électrons diffusés qui parviennent au détecteur, placé du même côté que la source par rapport à l'échantillon. Pour former l'image, on enregistre le signal fourni par le détecteur, en déplaçant le point focal du faisceau d'électrons à la surface de l'échantillon grâce à la bobine électromagnétique de scan.

Le contraste de l'image en TEM repose sur l'interaction du faisceau d'électrons avec les structures observées, qui dévient les électrons incidents et projettent une ombre sur le détecteur. Pour assurer la transmission du faisceau d'électrons, il est nécessaire de recueillir des coupes "ultrafines", d'une épaisseur de 30–100nm, des échantillons biologiques à observer, et de les "colorer" au moyen de sels de métaux lourds pour en augmenter le contraste. Une préparation d'échantillon complexe est nécessaire pour y parvenir : fixation (physique ou chimique), déshydratation, et inclusion dans une résine plastique avant la coupe et l'observation (Tizro et al., 2019). L'ultrastructure des objets ainsi préparés peut être observée en TEM avec une résolution radiale subnanométrique, qui fait de la TEM la méthode d'imagerie la plus résolutive en biologie (Harris, 2015).

La SEM repose également sur l'interaction électron-matière, mais le détecteur est situé du même côté que la source d'électrons, et collecte les électrons diffusés par l'échantillon (Fig. 12B). En pratique, le point focal du faisceau d'électrons est déplacé par lignes successives à la surface de l'échantillon, et les électrons diffusés jusqu'au détecteur sont enregistrés à chaque position du faisceau pour former l'image. La SEM offre une résolution nanométrique et fournit typiquement des données :

- soit sur la topologie de surface d'échantillons recouverts de particules conductrices (Skepper, 2000)
- soit sur l'ultrastructure d'échantillons fixés, "colorés en bloc", et abrasés pour en exposer la structure interne (Briggman & Bock, 2012; Shah et al., 2019).

1.2. Possibilités d'observation 3D

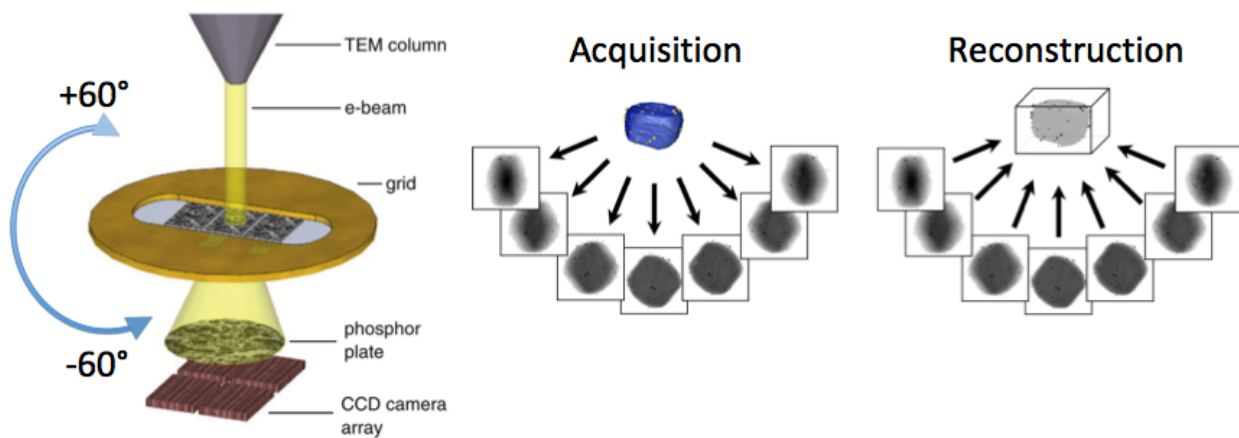
Les approches standard de TEM et de SEM permettent de décrire l'ultrastructure d'un plan en coupe des échantillons biologiques. Plusieurs stratégies d'acquisition 3D ont été mises en place pour aborder la configuration en trois dimensions des échantillons biologiques.

1.2.1. Tomographie électronique

La tomographie électronique (ET) repose sur l'acquisition, sous différents angles d'illumination, d'une série d'images TEM d'un même échantillon. La série d'images inclinées permet de reconstruire une série d'images coaxiales et alignées, le "tomogramme" après transformation mathématique (Fig. 13A). En biologie structurale, l'ET permet de résoudre la structure de complexes protéiques inabordables avec les techniques conventionnelles de cristallographie aux rayons X (Raunser, 2017). En biologie cellulaire, l'ET permet de décrire l'ultrastructure de sections d'environ 100nm d'épaisseur, avec une résolution proche de 0.1nm (Rostaing et al., 2006; Kukulski, Schorb, Welsch, et al., 2012). Combiner l'ET avec les méthodes de vitrification d'échantillon permet de résoudre des complexes moléculaires *in situ* par exemple dans la fente synaptique de neurones hippocampaux (Chen et al., 2008; Linsalata et al., 2014; High et al., 2015) ou dans des organismes multicellulaires (Mahamid et al., 2015). Cependant, l'ET offre des possibilités limitées en terme de volume total observable, de l'ordre de $10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$ (Weber et al., 2014).

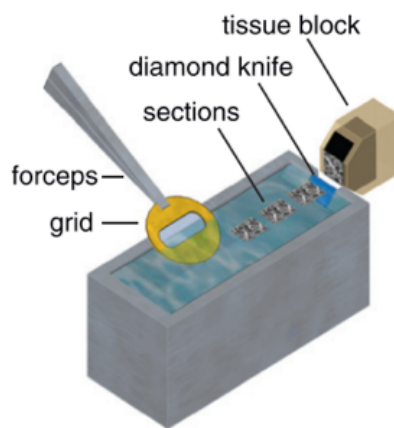
A

Tomographie électronique (ET)

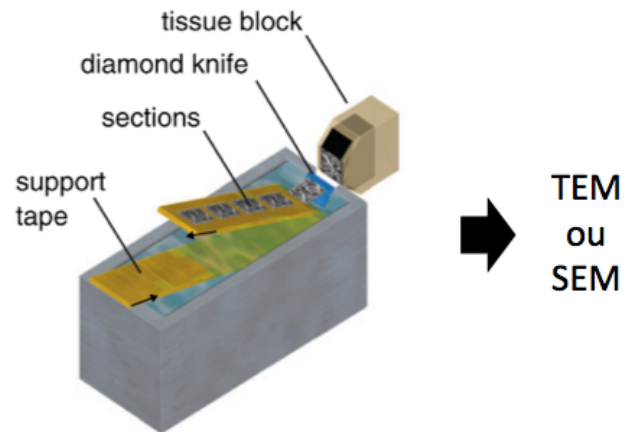


B

Sections sériées

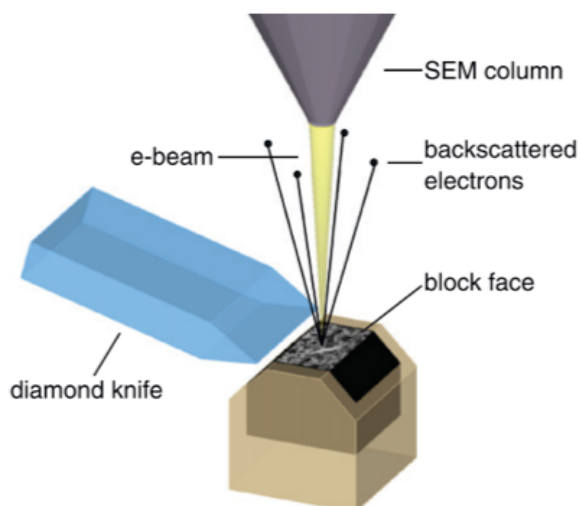


ATUM

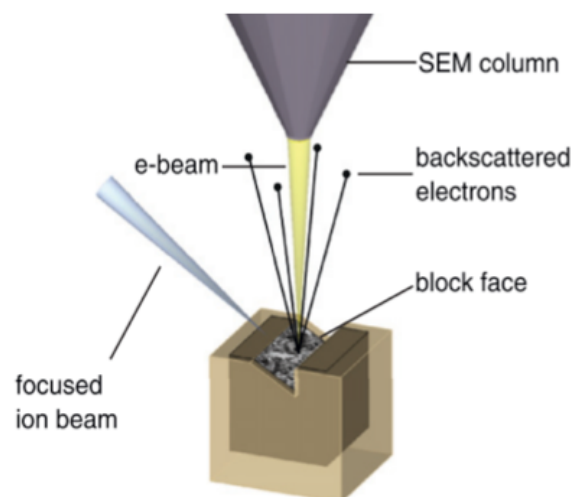


C

SBEM



FIB-SEM



1.2.2. Imagerie sériée

Combiner directement une série d'images consécutives de sections de l'échantillon permet de construire un modèle 3D d'une structure biologique sans transformation mathématique des images. Une première approche consiste à recueillir des sections ultra-fines successives, dites "sériées" pour les observer séquentiellement en TEM ou en SEM. La collecte des coupes sériées peut être réalisée de façon manuelle ou automatique (ATUM ; *Automated Tape-collecting UltraMicrotome*) et permet d'analyser en 3D l'ultrastructure de nombreux types d'échantillons (Fig. 13B ; Zito et al., 1999; Knott et al., 2006; Nägerl et al., 2007; Hayworth et al., 2014). Cependant, les étapes d'acquisition et d'alignement des images avant la reconstruction 3D sont délicates et fastidieuses, et limitent le volume total observable (Begemann & Galic, 2016), à défaut de développer de nouveaux protocoles automatisés (Schorb et al., 2019).

Une approche alternative d'EM 3D sériée consiste à colorer "en bloc" le volume total de l'échantillon avant de l'inclure, pour l'abraser et l'observer directement dans la chambre à vide d'un SEM. L'acquisition d'image, réalisée entre chaque étape d'abrasion, fournit des séquences d'images pré-alignées qui permettent de réaliser des reconstructions 3D avec un traitement d'image minimal. L'abrasion de l'échantillon est typiquement réalisée soit avec un ultramicrotome en SBEM (*Serial Block-face Electron Microscopy* ; Denk & Horstmann, 2004), soit avec un faisceau d'ions focalisé en FIB-SEM (*Focused Ion Beam SEM*; Knott et al., 2008) (Fig. 13C).

Figure 13 : Modalités d'observation en EM 3D

(A) Schéma de principe de la tomographie électronique (ET). L'acquisition consiste à obtenir, en TEM, une série d'images d'un même échantillon sous différentes inclinaisons. Une opération mathématique permet de restituer un modèle 3D de l'échantillon observé à partir des d'images collectées, et de reconstruire une série d'images alignées de l'échantillon en coupe, avec une résolution axiale inégalée ($\sim 0.1\text{nm}$) (B) Principe de la coupe sériée, qui permet de recueillir des coupes successives ultra-fines ($z < 100\text{nm}$) d'un échantillon biologique. Les échantillons, durcis par inclusion dans une résine plastique, sont coupés en rubans de sections ultra-fines avec un couteau de diamant monté sur un bac d'eau. Les rubans de coupes flottent à la surface de l'eau et sont recueillis, soit manuellement, sur des grilles recouvertes d'un film plastique, soit automatiquement, sur une bande transparente aux électrons (*Automated Tape-collecting UltraMicrotomy*). Les rubans peuvent ensuite être observés en TEM ou en SEM pour reconstruire en 3D l'ultrastructure de l'échantillon (C) Principe des deux approches dédiées à l'EM 3D : le SBEM (*Serial Block-face Electron Microscopy*) et FIB-SEM (*Focused Ion Beam SEM*). Ces méthodes reposent sur l'abrasion et l'observation séquentielle d'un échantillon coloré "en bloc", afin d'acquérir des images pré-alignées de l'ultrastructure de l'échantillon. L'abrasion est réalisée avec un couteau de diamant dans le cas du SBEM et avec un faisceau d'ions lourds — souvent des ions gallium — dans le cas du FIB-SEM, pour réaliser des coupes d'une épaisseur minimale de 25nm et 5nm, respectivement. Adapté de Briggman & Bock, 2012.

	ET	ssTEM	ATUM-SEM	SBEM	FIB-SEM
Champ de vue moyen (FOV ; μm^2)	20x20	20x20	60x60	40x40	20x20
Temps d'acquisition moyen d'un FOV (s)	60	1	30	20	40
Résolution radiale (Δx ; nm)	1	4	4	10	5
Résolution axiale (Δz ; nm)	5	50	40	30	5
Volume observable (μm^3)	10^3	10^5	10^7	10^8	10^3

Table 1 : Ordres de grandeur des caractéristiques d'acquisition en EM 3D

Cette table indique les valeurs courantes des caractéristiques d'acquisition pour : la tomographie électronique (ET), la TEM sur coupes sériées (ssTEM), l'imagerie SEM de coupes sériées collectées par ATUM (ATUM-SEM), la *Serial Block-face scanning EM* (SBEM) et le *Focused Ion Beam - Scanning EM* (FIB-SEM).

En terme de résolution radiale, $ET > ssTEM \sim ATUM-SEM > FIB-SEM > SBEM$

En terme de volume observable, $SBEM > ATUM-SEM \gg ssTEM \gg ET \sim FIB-SEM$

Les approches de SBEM et de FIB-SEM présentent chacune des avantages et des inconvénients : la résolution axiale en FIB-SEM atteint le nanomètre contre des dizaines de nanomètres en SBEM, mais le volume total observable se limite à quelques centaines de μm^3 en FIB-SEM alors qu'il tend vers 1cm^3 en SBEM (Hua et al., 2015).

Le principal compromis à réaliser pour une analyse d'EM 3D concerne la résolution d'image et la taille du volume à observer (Table 1).

2. Approches de microscopie optique et super-résolutive

Les microscopies optiques (LM) et super-résolutives (SRM) occupent une place de première importance dans le domaine des neurosciences du fait, notamment, de la polyvalence des sondes fluorescentes. Le nombre croissant de marqueurs protéiques spécifiques, de sondes biophysiques fluorescentes et d'actuateurs moléculaires photo-activables constitue une formidable boîte à outils pour l'étude des comportements cellulaires (Rodriguez et al., 2017). Il est notamment possible de visualiser des cellules identifiées au sein de réseaux neuronaux intacts en LM grâce à des protéines fluorescentes.

Plusieurs approches permettent d'observer une distribution de molécules fluorescentes dans des tranches de tissu biologique. Au delà de la microscopie d'épifluorescence plein champ, qui n'offre qu'un faible rapport signal-sur-bruit (RSB) et une profondeur de pénétration limitée dans le tissu biologique diffusant ($\sim 10\mu\text{m}$), les méthodes utilisées le plus souvent en CLEM sont la microscopie confocale (Minsky, 1987; Gregor & Enderlein, 2019), la microscopie à feuille de lumière (*light sheet* ; Keller & Stelzer, 2008) et la microscopie bi-photon (Denk et al., 1990). Ces méthodes permettent de réaliser des coupes optiques virtuelles de l'échantillon en contrôlant soit l'illumination, soit la position du plan d'observation. Ces trois méthodes améliorent simultanément la résolution axiale, le RSB et l'épaisseur de tissu observable par rapport à la LM plein-champ, mais leur résolution reste limitée à environ $\sim 300\text{nm}$ par la diffraction de la lumière. Plusieurs méthodes de microscopie super-résolutive (SRM) ont été développées récemment pour surmonter la limite de résolution des méthodes LM conventionnelles (Huang et al., 2009; Tønnesen & Nägerl, 2013).

Trois modalités de SRM sont utilisées pour étudier l'organisation des tissus biologiques, et notamment des tissus nerveux. L'une de ces méthodes repose sur l'illumination structurée (SIM), et consiste à éclairer l'échantillon avec un motif périodique, sous différentes orientations, puis à reconstruire, à partir de la série d'images obtenue, une image dotée de fréquences spatiales plus élevées qu'en LM standard (Fig. 14A ; Sigal et al., 2018). La SIM offre en général une résolution doublée par rapport à la LM standard (Fig. 14B) et a pu être utilisée en CLEM (Al Jord et al., 2014), mais ne permet pas de visualiser la distribution nanoscopique des molécules synaptiques, à l'inverse des deux autres méthodes de SRM :

La première méthode, dite STED (*STimulated Emission Depletion* ; Hell, 2009; Vicidomini et al., 2018), se base sur la microscopie optique à balayage, où le laser d'excitation focalisé illumine l'échantillon pixel par pixel. En STED, le laser d'excitation est couplé à un deuxième laser dont la longueur d'onde, plus grande que la longueur d'onde d'émission de fluorescence, permet de forcer désexcitation des fluorophores par émission stimulée. La fonction d'éclairement de ce deuxième laser est structurée en forme d'anneau autour du point focal du laser d'excitation afin de réduire la taille effective de la source de photons de fluorescence. Ainsi, la fonction effective d'étalement du point (PSF) du laser d'excitation devient inférieure à la limite théorique de résolution en LM (Fig. 14C ; Hell, 2009). La STED a permis d'étudier la morphologie d'épines dendritiques dans des tranches organotypiques de tissu cérébral avec une précision inédite en LM (Fig. 14D1&2) .

La deuxième méthode, dite microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM), repose sur l'excitation stochastique et séquentielle de sondes fluorescentes photo-activables (Betzig et al., 2006; Hess et al., 2006; Giannone et al., 2010). Au cours de l'acquisition, des distributions clairsemées de fluorophores photo-activés émettent séquentiellement des photons de fluorescence. Sur chaque image de la série acquise, il est possible de localiser les molécules émettrices au centre de leur PSF, en tant

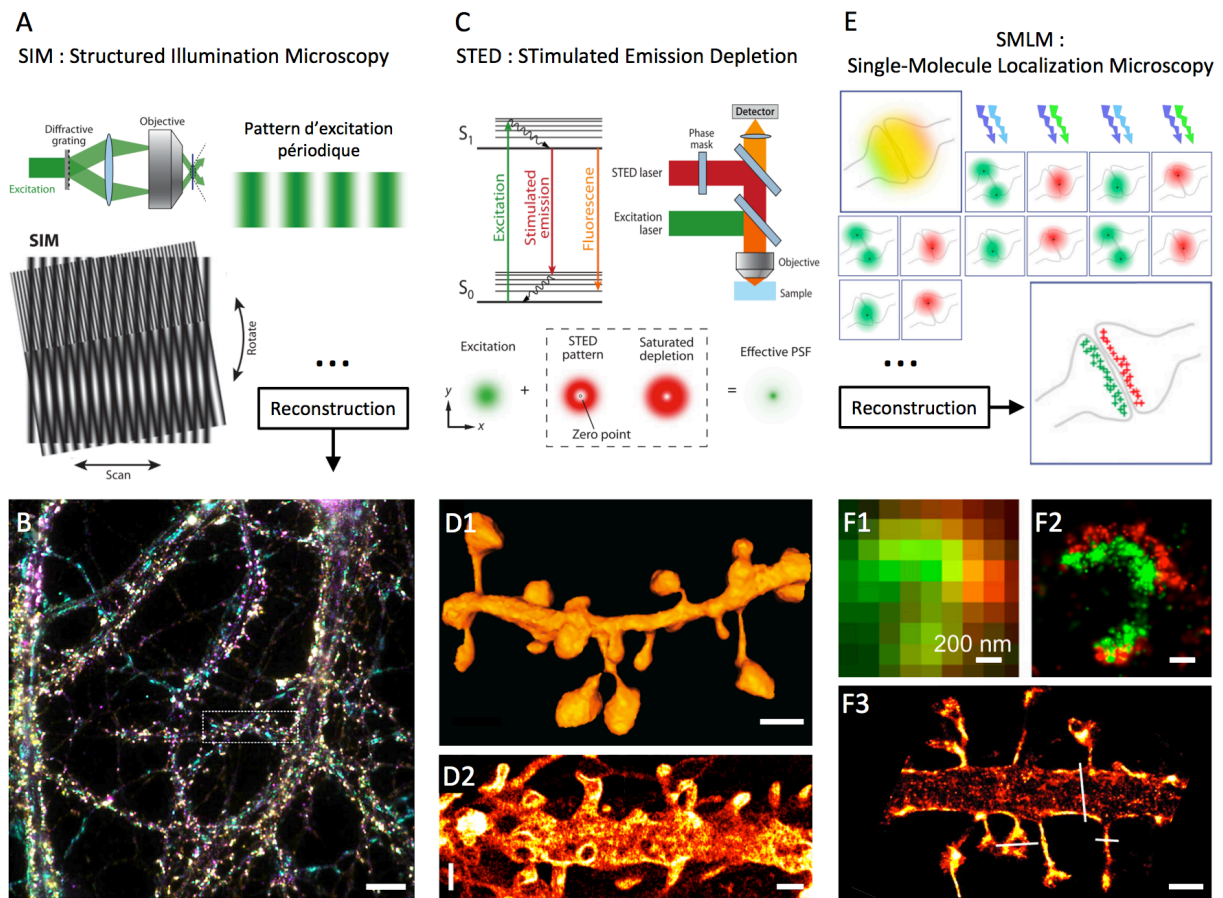


Figure 14 : Principales approches de microscopie optique super-résolutive (SRM)

(A) Principe du SIM. Un pattern lumineux sinusoïdal généré par interférences excite l'échantillon et convolve le signal de fluorescence au pattern périodique. Acquérir une série d'images pour différentes positions du pattern d'illumination permet de reconstruire mathématiquement le signal de fluorescence avec une résolution doublée par rapport à la LM conventionnelle (B) Triple immunomarquage Homer - Synapsin - PSD95 observé en SIM sur des neurones en culture (C) Principe du STED. La fonction d'éclairement du faisceau STED, de longueur d'onde est choisie pour forcer la désexcitation par émission stimulée des fluorophores présents dans l'échantillon, forme un anneau autour du point focal du laser d'excitation afin de restreindre la taille effective de sa fonction d'étalement du point (PSF) au delà de la barrière de diffraction. L'image super-résolue est formée en microscopie à balayage (D1&D2) Neurones hippocampaux observés en STED, en tranches organotypiques ou en culture primaire, respectivement (E) Principe de la SMLM "deux couleurs". Les fluorophores sont excités pour émettre de façon stochastique des photons de longueur d'onde propre à leur état photo-activé, au cours d'une acquisition de plusieurs centaines d'images. Les fluorophores sont ensuite pointés individuellement sur chaque image, et la structure ciblée est reconstruite *in silico* avec une précision de localisation $>10\text{nm}$. Combiner plusieurs sondes SMLM permet de reconstruire la distribution d'espèces moléculaires distinctes (F1) Image en LM conventionnelle d'une synapse immunomarkée marquée par deux fluorophores photo-activables pour repérer la protéine pré-synaptique Bassoon (en rouge) et la protéine post-synaptique Homer (en vert) (F2) Même champ de vue en SMLM (F3) Image en SMLM d'un neurone d'hippocampe de rat en culture primaire, exprimant la protéine photo-activable ABP-tdEosFP, qui se lie aux filaments d'actine. Calibrations : (B) $10\mu\text{m}$ (D1, D2 & F3) $1\mu\text{m}$. A & C : adaptés de Huang et al., 2009. B : adapté de Lagache et al., 2018. D1 : adapté de Tønnesen & Nägerl, 2016. D2 : adapté de Lauterbach et al., 2016. E, F1 & F2 : adaptés de Dani et al., 2010. F3 : adapté de Izeddin et al., 2011.

que sources lumineuses ponctuelles. Pour enregistrer le signal de l'ensemble des fluorophores présents dans la région d'intérêt, ~1000 à 10000 images sont enregistrées par acquisition (Fig. 14E). Au prix de la résolution temporelle, l'analyse de ces séquences d'images permet :

- de reconstruire la distribution des sondes fluorescentes avec une précision de localisation $\geq 10\text{nm}$ (Fig. 14F1-3 ; Yang & Specht, 2019),
- de mesurer le nombre absolu des fluorophores excités, en tenant compte des propriétés photophysiques des sondes utilisées (Patrizio & Specht, 2016). De fait, la SMLM est la seule méthode de SRM qui permette la mesure quantitative du nombre de protéines ciblées au sein d'une structure biologique d'intérêt (Nair et al., 2013).

Ces dix dernières années, la SRM a permis de décrire l'hétérogénéité et la complexité des assemblages macro-moléculaires aux synapses. Les acquisitions SMLM ont montré que les protéines d'échafaudage excitatrices PSD-95 sont réparties en sous-domaines aux PSDs, et régulent l'accumulation des récepteurs AMPA (MacGillavry et al., 2013; Nair et al., 2013). L'existence de ces sous-domaines a été confirmée en STED *in vitro* et *in vivo* (Broadhead et al., 2016; Dzyubenko et al., 2016; Hruska et al., 2018; Masch et al., 2018; Wegner et al., 2018). Parallèlement, les domaines sub-synaptiques de géphyrine ont été décrits, et impliqués dans les mécanismes de plasticité des synapses GABAergiques (Pennacchiotti et al., 2017; Crosby et al., 2019). Au niveau pré-synaptique, les microscopies SMLM et STED ont prouvé l'accumulation sub-synaptique de protéines de la zone active, et de protéines d'adhésion trans-synaptiques (Chamma, Letellier, et al., 2016; Chamma, Levet, et al., 2016; Tang et al., 2016; Glebov et al., 2017; Haas et al., 2018). La technique de STORM 3D multi-couleur a permis de montrer l'alignement trans-synaptique de domaines subsynaptiques de RIM1/2 et de PSD-95, qui mènent à penser l'organisation de la synapse sous forme de nano-colonnes trans-synaptiques (Haas et al., 2018). Combiner la SMLM à l'étude en EM 3D de l'ultrastructure synaptique devrait permettre des mesures quantitatives de densités de molécules synaptiques dans des épines dendritiques caractérisées, et d'observer l'ultrastructure des nano-colonnes trans-synaptiques (Yang & Specht, 2019).

3. Protocoles de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM)

Combiner la LM et l'EM pour observer une même structure biologique permet de tirer parti à la fois du potentiel immense des sondes fluorescentes et de la résolution exceptionnelle des méthodes d'EM. De nombreuses méthodologies ont été mises en œuvre ces vingt dernières années pour combiner les différentes modalités de LM et d'EM (Fig. 15) afin d'étudier des échantillons très divers.

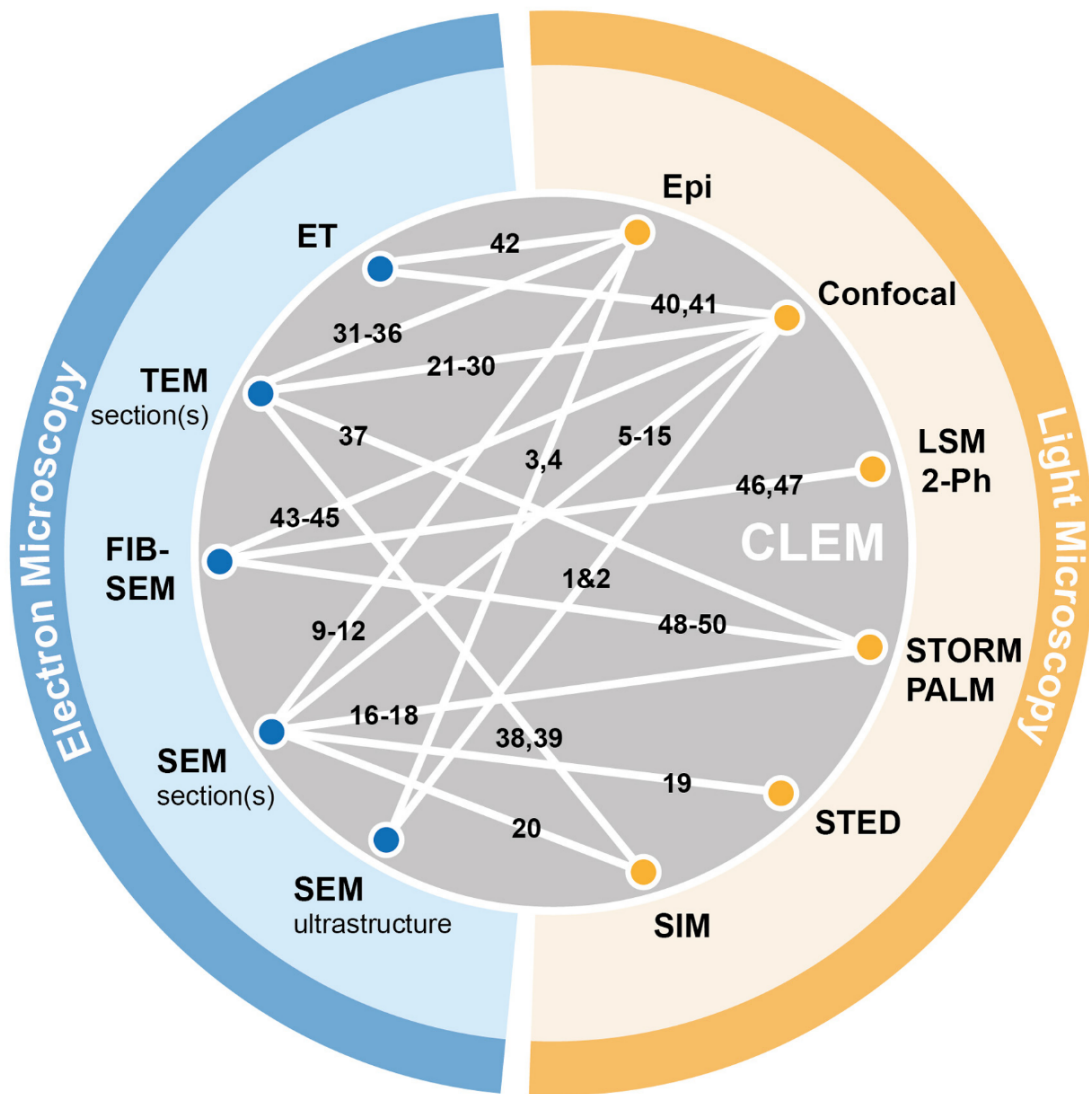


Figure 15 : Schéma représentant différents types de CLEM utilisés dans la littérature

Schéma représentant les principales méthodes d'EM (en bleu) et de LM (en orange), et les approches CLEM qui ont permis de les combiner (lignes blanches). Les numéros correspondent aux références de publications qui utilisent ces approches CLEM, et sont référencées dans l'annexe 1. Abréviations : Epi : épi-fluorescence ; LSM : Laser Scanning Microscopy ; 2-Ph : microscopie bi-photon ; STORM : *STochastic Optical Reconstruction Microscopy* ; PALM : *PhotoActivated Localization Microscopy* ; SIM : *Structured Illumination Microscopy* ; SEM : *Scanning Electron Microscopy* ; FIB : *Focused Ion Beam* ; TEM : *Transmission Electron Microscopy* ; ET : *Electron Tomography*. Adapté de Begemann & Galic, 2016.

La corrélation des microscopies optique et électronique (CLEM) permet d'analyser les propriétés ultrastructurales qui sous-tendent les phénotypes cellulaires observables en LM, mais pose des défis techniques considérables (Müller-Reichert & Verkade, 2014, 2017). D'une part, les protocoles de préparation d'échantillons biologiques pour l'EM comportent typiquement des étapes qui détruisent la

fluorescence et l'antigénicité des tissus (Loussert Fonta & Humbel, 2015). D'autre part, les traitements de perméabilisation des membranes souvent nécessaires aux marquages immunocytochimiques et couramment utilisés en LM détériorent la morphologie ultrastructurale. Pour combiner des données de LM aux données d'EM, il faut intégrer au protocole d'EM des étapes de marquage et d'observation LM, en limitant les dégâts ultrastructuraux associés, et deux types d'approches CLEM sont développés pour y parvenir (De Boer et al., 2015) :

- 1/ soit la préparation d'échantillon est adaptée pour trouver un compromis satisfaisant entre préservation ultrastructurale et maintien du signal de fluorescence et/ou de l'antigénicité, puis des coupes ultra-fines de l'échantillon sont observées successivement en LM et en EM ("LM post-inclusion")
- 2/ soit les échantillons sont analysés en LM avant la préparation pour l'EM ("LM pré-inclusion").

3.1. Protocoles de type "LM post-inclusion"

3.1.1. Cryo-microscopie

Une première solution pour préserver la morphologie ultrastructurale tout en supprimant les étapes d'osmification, de déshydratation et d'inclusion, qui sont responsables de la perte de fluorescence, consiste à utiliser la fixation par le froid, ou cryo-fixation. Les propriétés de fluorescence sont conservées dans les échantillons cryo-fixés (Sartori et al., 2007), ce qui permet notamment d'observer des cultures cellulaires en cryo-CLEM (Wolff et al., 2016). Brièvement, le procédé de cryo-fixation repose sur la vitrification par le froid des échantillons biologiques hydratés, qui permet de figer les constituants moléculaires dans un état structurellement proche de l'état naturel. Cependant, les échantillons biologiques sont souvent constitués en majeure partie d'eau, qui peut cristalliser lors de la congélation. L'expansion volumique qui accompagne la transformation de l'eau liquide en glace cristalline dénature l'ultrastructure cellulaire. À l'inverse, la transformation isochore de l'eau liquide en glace vitreuse n'altère pas la morphologie. Pour favoriser la vitrification de l'eau liquide plutôt que sa cristallisation, la température de l'échantillon doit être abaissée de façon suffisamment rapide par immersion dans un liquide cryogénique (e.g. l'éthane liquide), ou par congélation haute pression (HPF) (Milne et al., 2013). Dans les échantillons 2D (e.g. cellules en culture), le contact direct de l'échantillon avec le matériau cryogénique assure une bonne vitesse de congélation. Cependant, lors de la congélation d'échantillons plus épais, comme une tranche de tissu, la surface de l'échantillon, vitrifiée très rapidement par contact direct avec le matériau cryogénique, isole thermiquement le centre de l'échantillon du fait de la faible conductivité thermique de la glace vitreuse. En conséquence, les conditions de vitrification ne sont plus remplies dans l'épaisseur du tissu, où des cristaux de glace se forment et dénaturent la morphologie ultrastructurale (Rostaing et al., 2006; Korogod et al., 2015). Cet effet limite le volume de tissu observable en cryo-EM aux couches superficielles des échantillons

congelés ($\leq 10\mu\text{m}$ de profondeur) et freine le développement de méthodes de cryo-CLEM 3D adaptées à l'étude de circuits neuronaux intacts.

3.1.2. Préserver l'antigénicité ou la fluorescence lors de l'inclusion

Une deuxième solution pour combiner LM et EM sur l'échantillon inclus consiste à préserver l'antigénicité et/ou la fluorescence des échantillons en utilisant des résines acryliques, compatibles avec l'acquisition LM post-inclusion. Certaines sondes ont été développées spécifiquement pour conserver des propriétés de fluorescences après déshydratation et inclusion en résine acrylique (Fig. 16A ; Cheng et al., 2017). Conserver les propriétés photophysiques de sondes photoactivables pour réaliser des mesures de SMLM post-inclusion est plus complexe, car la photo-activabilité est une caractéristique plus sensible au micro-environnement que la simple émission de fluorescence (Paez-Segala et al., 2015). Plusieurs études récentes montrent néanmoins la faisabilité d'acquisitions en SMLM post-inclusion, suivies d'acquisitions corrélatives en TEM ou en SEM à température ambiante (Fig. 16B&C ; Watanabe et al., 2011; Paez-Segala et al., 2015).

Les résines acryliques conservent aussi en partie l'antigénicité des tissus inclus, ce qui permet de réaliser des marquages moléculaires, au moyen d'anticorps couplés à des sondes fluorescentes, sur des sections ultrafines d'échantillon inclus, puis de les observer successivement en LM et en EM. La tomographie matricielle (*Array Tomography*, ou AT) se base sur ce principe, et consiste à recueillir des centaines de coupes sériées afin de les observer en CLEM (Micheva & Smith, 2007; Collman et al., 2015). L'AT a permis de cartographier les connexions synaptiques de neurones pyramidaux de la région CA1 de l'hippocampe (Bloss et al., 2016) ou des neurones pyramidaux en couche V du SSC (Rah et al., 2013) en LM conventionnelle. Watanabe et coll. ont combiné l'AT avec la SRM et le SEM pour visualiser des constituants synaptiques, dans le *Caenorhabditis Elegans* (C. Elegans), avec une résolution radiale de l'ordre de quelques dizaines de nm (Watanabe et al., 2011). Cependant, les étapes d'acquisition et de corrélation des images entre la SRM et l'EM sont fastidieuses, et limitent en pratique le volume des reconstructions 3D finales (Micheva & Smith, 2007; Collman et al., 2015).

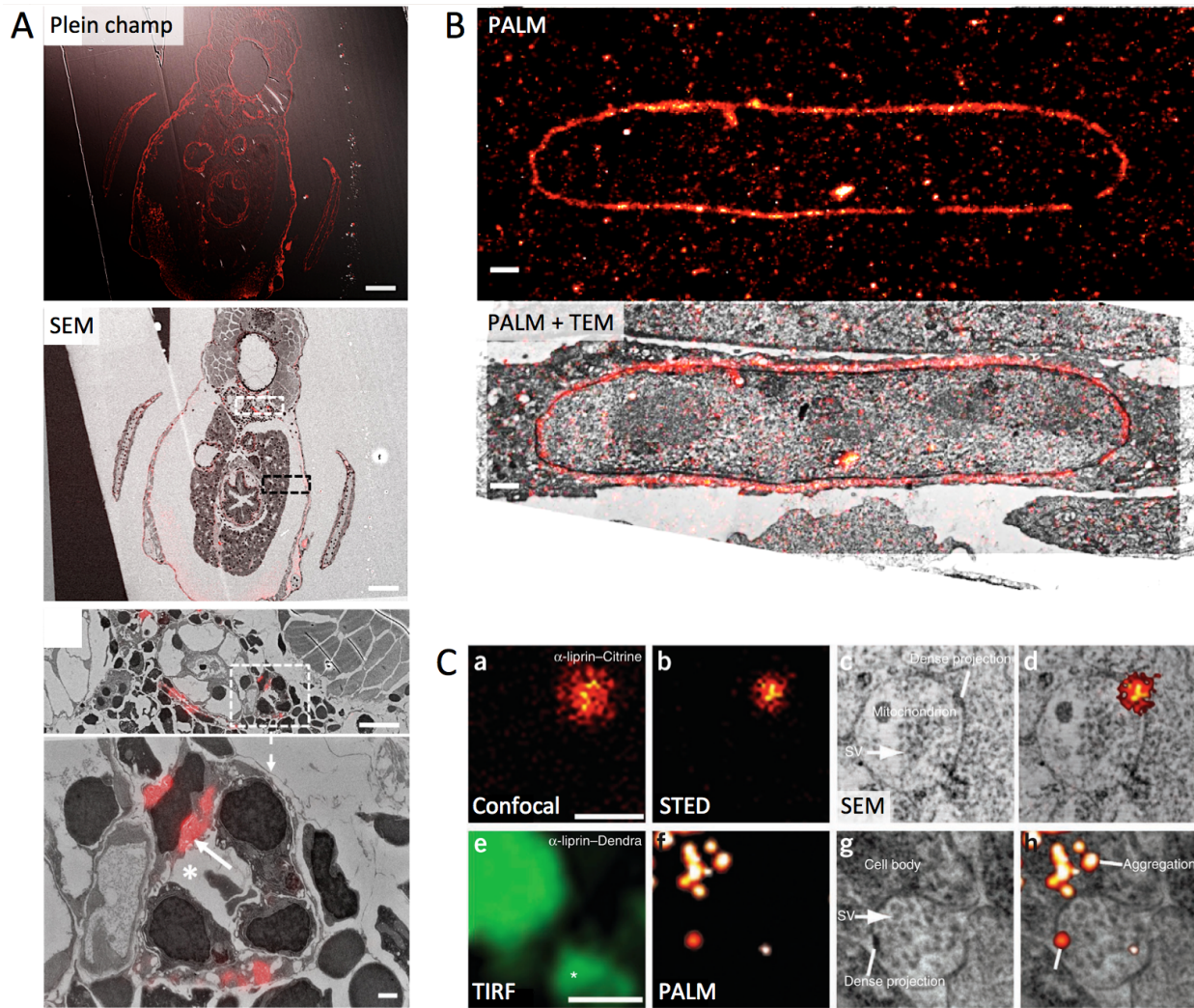


Figure 16 : Exemples de CLEM “LM post-inclusion”

(A) Images en microscopie optique plein-champ (haut), puis en SEM (panneaux suivants : combinaison des deux images) d'une tranche ultra-fine (90nm) de larve de poisson-zèbre, après injection intraveineuse de BSA-TxRed, et inclusion en résine acrylique “LR White”. La corrélation LM-SEM indique que BSA-TxRed se loge dans le rein (encadré blanc agrandi dans les panneaux inférieurs). L'image CLEM à haute résolution (bas) montre BSA-TxRed dans l'endothélium des capillaires sanguins du rein. L'astérisque repère la lumière du vaisseau sanguin. Calibrations : 50;50;10;1 μ m, de haut en bas. (B) Images successives d'une cellule 3T3 exprimant mEos4b-lamin A et incluse en résine acrylique “GMA”. L'image du haut correspond à une section semi-fine (500nm) observée en PALM. L'image du bas est un montage manuel entre l'image PALM et trois images TEM d'une section adjacente ultra-fine (60nm). Calibrations : 500nm (C) Ligne du haut : images confocale, STED, SEM, et montage STED-SEM d'une tranche ultra-fine (70nm) d'un *C. Elegans* exprimant α -liprin-Citrine, dont le signal LM est co-localisé avec la zone active d'un bouton pré-synaptique, visualisée en EM. Ligne du bas : images TIRF, PALM, SEM, et montage PALM-SEM d'une tranche ultra-fine (70nm) d'un *C. Elegans* exprimant α -liprin-Dendra, dont un cluster est également co-localisé également avec la zone active d'un bouton pré-synaptique (coin inférieur gauche de l'image de droite). Calibrations : 500nm. A : adapté de Cheng et al., 2017. B : adapté de Paez-Segala et al., 2015. C : adapté de Watanabe et al., 2011.

3.2. Protocoles de type “LM pré-inclusion”

Dans le cas où la préparation d'échantillon pour l'EM est réalisée après l'acquisition en LM, il n'est plus nécessaire de conserver la fluorescence lors du transfert physique de l'échantillon entre les différents microscopes (Begemann & Galic, 2016). Ce transfert présente deux avantages :

- moins de contraintes s'appliquent au choix de la modalité LM
- les protocoles de marquage et de coloration d'échantillon classiques en EM peuvent être utilisés pour accroître le contraste aux électrons après l'étape de LM.

Cependant, les nombreuses manipulations nécessaires pour passer de l'observation LM à l'observation EM posent des difficultés majeures pour retrouver les régions d'intérêt (ROI) analysées en LM afin de les observer en EM. L'étape de repérage de la ROI est cruciale en CLEM (Cheng et al., 2017), et s'effectue le plus souvent en deux temps :

- 1/ une étape obligatoire de recadrage du champ d'observation EM sur la zone d'acquisition LM, puis
- 2/ une étape facultative de superposition à haute résolution des images acquises, selon le type d'analyse à réaliser.

3.2.1. Cas des échantillons 2D

Dans le cas d'échantillons 2D — par exemple, des monocouches cellulaires — des lamelles de verre gravées d'un repère alphanumérique (Fig. 17 ; *finder grids*) permettent de recadrer les zones d'observation entre la LM et l'EM (Russell et al., 2017). Par exemple, une étude récente conduite à l'IBENS utilise la vidéo-microscopie optique pour suivre une cellule d'intérêt cultivée sur une *finder grid* avant de la fixer, d'utiliser ses coordonnées alphanumériques la retrouver en EM après inclusion, et de décrire l'ultrastructure de ses centrioles (Mercey et al., 2019).

Par ailleurs, dans des systèmes morphologiquement simples (e.g. des cultures de levures), une stratégie astucieuse permet de reconstituer le déroulement temporel d'un évènement stéréotypique, en observant un grand nombre de spécimens fixés à différents instants du processus biologique d'intérêt. Cette approche a été illustrée par Kukulski et coll. pour décrire l'évolution de la courbure membranaire lors de l'endocytose dans des levures en culture (Kukulski et al., 2011; Kukulski, Schorb, Welsch, et al., 2012). Plus en détail, l'utilisation de paires de sondes fluorescentes pour marquer les différents acteurs moléculaires du processus stéréotypique d'endocytose a permis à Kukulski et coll. de repérer les lieux d'endocytose pour les observer en CLEM, et de reconstruire *a posteriori* la séquence d'évènements moléculaires pour obtenir une vision intégrée du processus étudié (Kukulski, Schorb, Kaksonen, et al., 2012).

Les possibilités d'étude des échantillons 2D en CLEM se déclinent à l'infini (van Rijnsoever et al., 2008) et présentent moins de difficultés techniques pour le repérage de la ROI en CLEM que les tissus 3D (Hodgson et al., 2014).

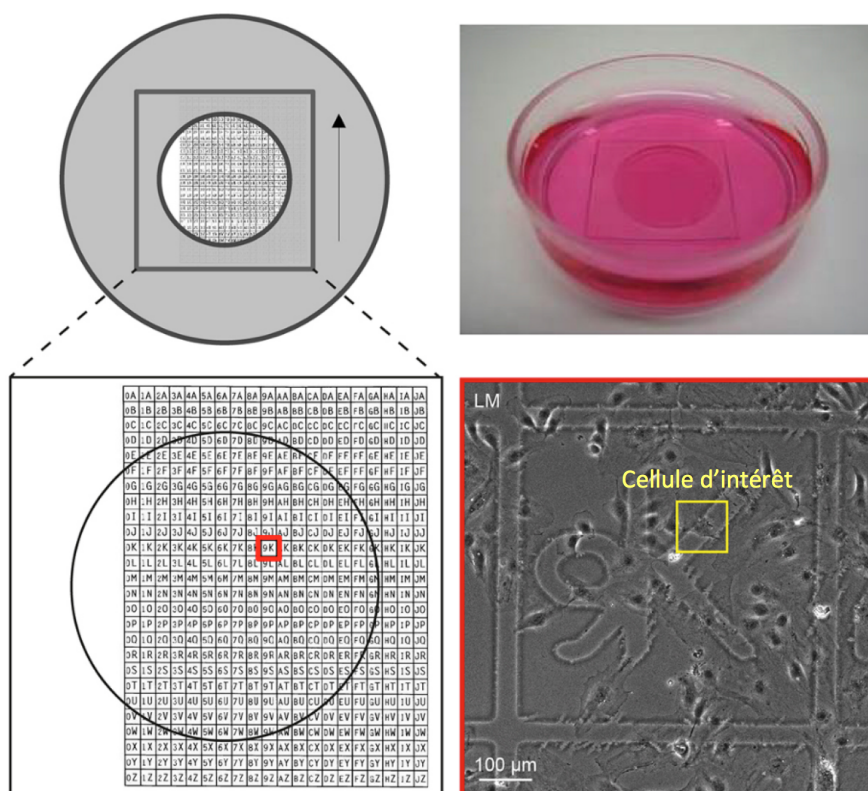


Figure 17 : Principe des lamelles de verre gravées d'un repère alphanumérique (*finder grids*)

À gauche: Schéma d'une boîte de culture cellulaire dont la lamelle est gravée d'un repère alphanumérique (MatTek Corp. # P35G-2-14-CGRD). La position d'une cellule d'intérêt est encadrée en rouge. À droite : boîte MatTek contenant des cellules en culture (en haut) et image en lumière transmise de la cellule d'intérêt (encadré jaune) aux coordonnées 9K. Adapté de Russell et al., 2017.

3.2.2. Cas des échantillons 3D — problème du repérage

Retrouver en EM 3D la ROI observée en LM est la difficulté majeure des protocoles de CLEM 3D (Luckner et al., 2018; Maclachlan et al., 2018). L'impossibilité d'utiliser un système de coordonnées similaire aux *finder grids* pour retrouver la ROI entre LM et EM complique l'approche 3D (Begemann & Galic, 2016). Pour localiser l'acquisition LM sur le champ de vue EM dans le tissu cérébral dense, plusieurs solutions ont été envisagées (Karreman, Mercier, et al., 2016) :

- le marquage de protéines ciblées, voire de cellules entières, par précipitation enzymatique ou photocatalytique de diaminobenzidine (DAB ; Meißlitzer-Ruppitsch et al., 2009).
- l'introduction de marques artificielles par dissection laser (Bishop et al., 2011).
- l'utilisation de repères fiduciaires intrinsèques, comme les capillaires sanguins (Karreman, Mercier, et al., 2016; Luckner et al., 2018).

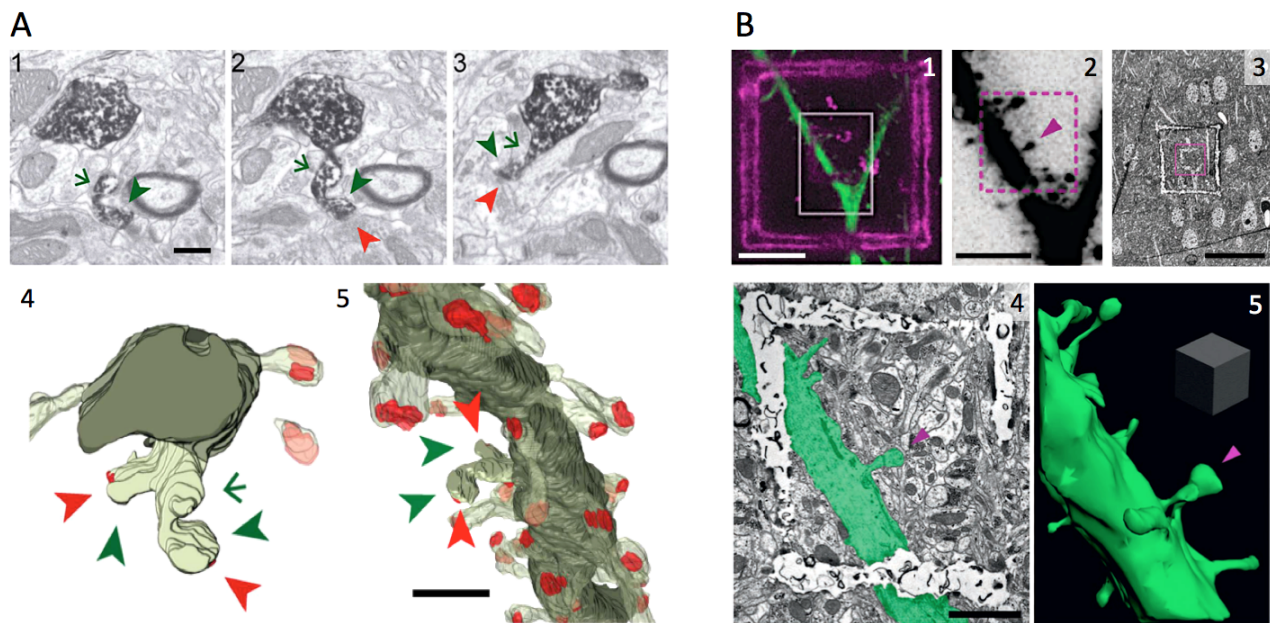


Figure 18 : Méthodes de repérage corrélatif en LM pré-inclusion

(A) (1-3) Images sériées en FIB-SEM d'une épine branchée d'une cellule géniculée exprimant une GFP cytosolique, marquée par photo-oxydation de DAB. Les repères sur l'image sont les suivants : têtes d'épine (têtes de flèche vertes), PSD (têtes de flèches rouges), cou de l'épine (flèche verte) (4-5) Vues orthogonales de l'épine en (1-3) après reconstruction 3D. Calibrations : (1) 500nm (5) 1µm (B) Le repérage par gravure infra-rouge (NIRB) permet d'identifier des épines dendritiques rétrospectivement en EM 3D. (1) Projection d'images confocales de dendrites apicales d'une tranche vibratome de cortex de souris Thy1-GFP après gravure de deux marques NIRB (tracé magenta). L'encart blanc est agrandi en (2), en contraste inversé. La marque NIRB intérieure est figurée par une ligne pointillée magenta et mesure 6.5µm de côté (3) Image en FIB-SEM de la ROI après l'approche de la marque NIRB extérieure, clairement visible au centre de l'image. La marque NIRB intérieure est encadrée en magenta. (4) Section ultrafine de l'épine ciblée, cadrée par la marque NIRB intérieure (5) Reconstruction 3D de la portion dendritique ciblée. Calibrations : (1) 10µm (2) 5µm (3) 25µm (4) 2µm (5) 1x1x1µm³. A : adapté de Bosch et al., 2015. B : adapté de Bishop et al., 2011.

3.2.2.1. Marquages à base de diaminobenzidine (DAB)

La DAB est un composé osmiophile et qui traverse les membranes plasmiques, utilisé comme agent de contraste dans de nombreuses approches d'EM (Sosinsky et al., 2007; Hodgson et al., 2014). Après traitement au tetroxyde d'osmium, les polymères de DAB produisent un contraste fort à la fois en TEM et en SEM, et deux procédés permettent d'utiliser des polymères de DAB afin de marquer des structures cellulaires ciblées.

La première repose sur la photo-oxydation de la DAB (Grabenbauer et al., 2005; Meißlitz-Ruppitsch et al., 2009). L'excitation lumineuse intense de fluorophores contenus dans l'échantillon génère, en présence d'oxygène dissous, des radicaux libres $O\bullet$, très réactifs, qui oxydent la DAB monomérique. La

DAB oxydée s'oligomériser avec d'autres monomères de DAB pour former localement un réseau insoluble dans l'eau ou dans l'alcool. Les précipités de DAB résistent à la préparation d'échantillon pour l'EM et fournissent un contraste fort sous le faisceau d'électrons après traitement au tetroxyde d'osmium (Fig. 18A). La photo-oxydation permet donc d'induire la précipitation de DAB sous contrôle optique, et d'enregistrer en EM la distribution subcellulaire de molécules marquées par fluorescence (Malatesta et al., 2013; De Boer et al., 2015).

La deuxième méthode pour polymériser la DAB *in situ* repose sur l'activité enzymatique des peroxydases — par exemple, la HRP (*HorseRadish Peroxidase*), qui catalyse la polymérisation de la DAB en présence de H₂O₂ pour former un précipité local de DAB (Sosinsky et al., 2007). La HRP a été couplée à des anticorps pour marquer des neurones identifiés, exprimant une GFP cytosolique (Knott et al., 2009). La HRP a également servi de base au développement de tags génétiques intracellulaires, comme APEX2 (Lam et al., 2014), qui permettent d'utiliser la DAB comme marqueur protéique en EM (Joesch et al., 2016; Martell et al., 2017). Cependant, l'oxydation nécessaire à la polymérisation de la DAB provoque localement des dommages ultrastructuraux et le contraste de la DAB osmiée masque le détail des structures sous-jacentes (Meißlitz-Ruppitsch et al., 2009).

3.2.2.2. Introduction de repères fiduciaires extrinsèques

Pour améliorer la précision de repérage, et disposer d'un repère façonné par l'opérateur, il est possible de graver artificiellement des repères fiduciaires dans un échantillon de tissu au moyen d'un laser infrarouge (Fig. 18B ; NIRB pour *Near InfraRed Branding*) lors de l'étape d'observation LM (Fig. nB ; Bishop et al., 2011; Lees et al., 2017). Les marques imprimées à différentes profondeurs dans le tissu permettent de guider l'approche d'EM et facilitent le repérage des ROIs (Fig. 19). Ce type d'approche est particulièrement adapté après des observations *in vivo* en microscopie bi-photon à travers une fenêtre crânienne (Chen et al., 2011; Grillo et al., 2013; Mostany et al., 2013; Sonomura et al., 2013; Cane et al., 2014; Blazquez-Llorca et al., 2015) où il permet :

- de repérer les coordonnées (x,y) de la ROI sur la surface piale pour guider la biopsie,
- de guider l'approche en z de la ROI à l'ultramicrotome (approche ultramicrotomique) en inscrivant plusieurs marques successives repérables lors de la phase d'approche (Fig. 19 ; Bishop et al., 2011).

Cette approche a déjà été utilisée pour reconstruire des dendrites apicales de neurones pyramidaux des couches 2/3 du cortex exprimant une PSD-95-EGFP (Cane et al., 2014) et observés *in vivo* pendant plusieurs jours par microscopie bi-photon après craniectomie, afin d'apporter une preuve directe de l'influence positive du maintien de la PSD excitatrice sur le renouvellement des épines.

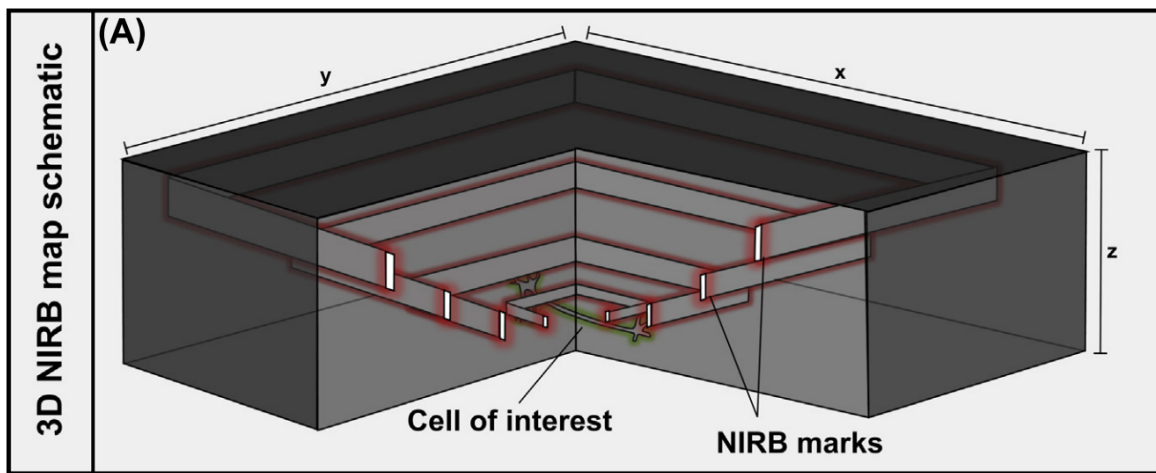


Figure 19 : Exemple d'une stratégie de repérage NIRB

Schéma d'une tranche de tissu en coupe, marquée en 3D par NIRB. Les repères NIRB sont introduits à des pas réguliers en z depuis la surface de la tranche selon un motif concentrique pour guider l'approche ultramicrotomique. Adapté de Lees et al., 2017.

Les limites principales de cette technique de repérage sont la nécessité d'adapter un laser infra-rouge au poste de microscopie utilisé, la limitation de la profondeur de marquage par la diffusion lumineuse, les dégâts causés par le laser au tissu étudié (Luckner et al., 2018) et la difficulté de repérer les marques NIRB au cours de l'approche ultramicrotomique (Karreman, Hyenne, et al., 2016). Ces marques peuvent être colorées par photo-oxydation de DAB pour faciliter la re-localisation de la ROI, mais cela rend le protocole plus long et peut de générer du bruit de fond en EM (Maco et al., 2013).

3.2.2.3. Repères fiduciaires intrinsèques

Dans des échantillons de tissu nerveux, les vaisseaux sanguins, les axones myélinisés et les somas des cellules entourant la ROI peuvent servir de repères intrinsèques entre la LM et l'EM. Certaines approches ont été mises en place récemment pour retrouver la ROI en FIB-SEM en utilisant ces repères et des marquages fluorescents supplémentaires —DAPI, DRQ5 ou un marquage endogène (Luckner et al., 2018; Maclachlan et al., 2018). Cependant, ces approches requièrent une solide expertise du FIB-SEM et une analyse en 3D *in silico* des positions respectives des repères anatomiques avant l'EM pour guider efficacement l'approche ultramicrotomique. Une autre approche repose sur l'acquisition en imagerie aux rayons X (RX) de l'architecture 3D des capillaires sanguins après l'acquisition LM et le traitement de l'échantillon pour l'EM, afin de localiser la ROI avant de programmer une acquisition en SBEM ou en FIB-SEM (Fig 20 ; Karreman, Mercier, et al., 2016). Cette technique d'avant-garde promet des avancées considérables pour l'analyse des comportements de cellules uniques identifiées *in vivo* (Karreman et al., 2017), mais sa mise en œuvre complexe requiert une expertise dédiée, et l'équipement approprié.

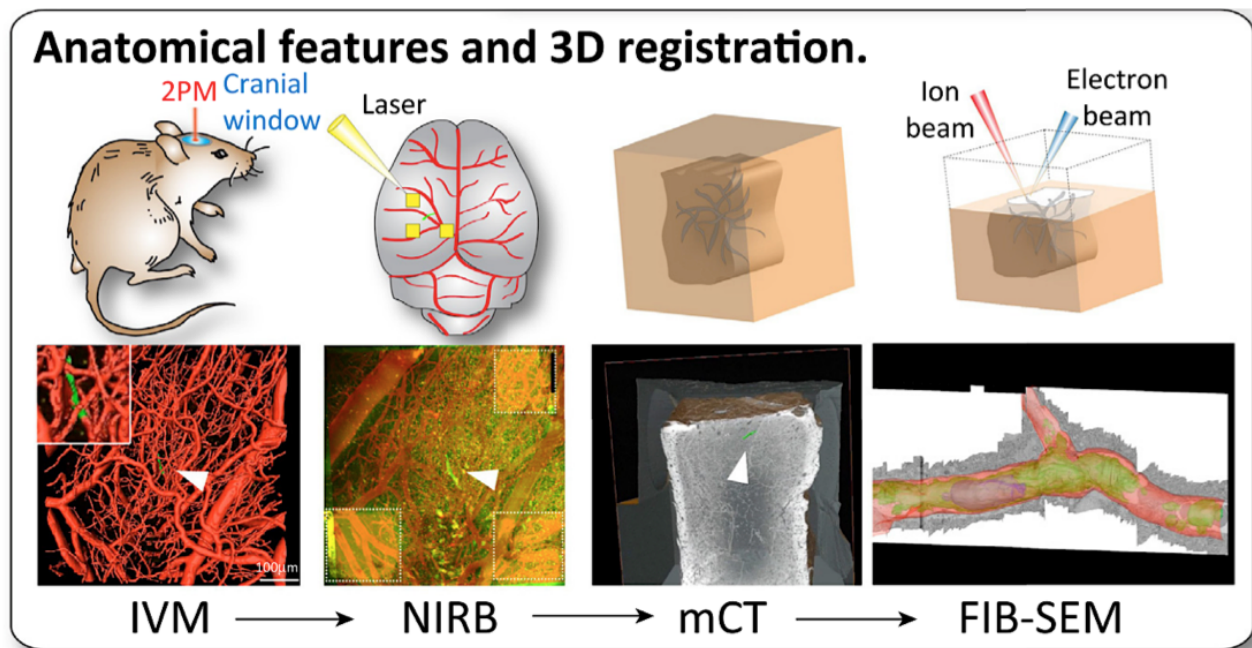


Figure 20 : Exemple de protocole multi-modal pour corrélérer LM *in vivo* et FIB-SEM

Schéma représentant un protocole visant à observer en FIB-SEM une cellule tumorale observée en LM *in vivo*. Acquérir l'angiographie 3D du tissu étudié en LM intra-vitale (IVM), puis en microscopie RX (mCT) après préparation de l'échantillon pour l'EM permet de repérer précisément la ROI en 3D afin d'acquérir l'ultrastructure de la cellule ciblée en FIB-SEM. Adapté de Karreman, Hyenne, et al., 2016.

Malgré ces développements essentiels, la relocalisation de la ROI reste une étape limitante des protocoles de CLEM 3D (Cheng et al., 2017). Il manque une approche efficace et peu coûteuse pour faciliter cette étape, afin de simplifier l'étude de structures ciblées dans les tissus biologiques en CLEM. Les travaux que nous avons réalisés nous permettent de proposer une solution de repérage efficace à moindre coût, qui facilite la CLEM tissulaire.

4. Corrélation d'image en CLEM

Après l'observation en LM et en EM d'une même structure d'intérêt, il peut être nécessaire, ou non, de superposer les deux images pour obtenir l'information pertinente (Loussert Fonta & Humbel, 2015).

Lorsque l'ultrastructure de l'objet marqué en LM est inconnue, il est nécessaire d'aligner les images de LM et d'EM avec une précision de l'ordre de la taille de l'objet étudié (Kukulski, Schorb, Welsch, et al., 2012). Pour des contacts membranaires entre organelles, par exemple, la précision d'alignement nécessaire est plus grande que la limite de résolution conventionnelle en LM, d'environ $0,5\mu\text{m}$ (Fermie et al., 2018). L'étape d'alignement précis des images LM et EM nécessite dans ce cas d'utiliser des marqueurs fiduciaux particuliers visibles dans les deux modalités, comme des nanoparticules, des boîtes quantiques (*Quantum Dots*) ou des billes de polymère (Kukulski et al., 2011; Hodgson et al.,

2014). Cependant, dans les tranches de tissu, il est difficile d'introduire une dispersion de particules fiduciaires dans l'échantillon, ce qui limite les possibilités de corrélation d'images en CLEM 3D (Müller-Reichert & Verkade, 2014, 2017; Paul-Gilloteaux et al., 2017).

Dans le cadre de l'étude *in tissulo* des dendrites et des épines dendritiques, il est possible d'identifier individuellement chaque épine grâce à la morphologie dendritique complexe (Chen et al., 2012). Les caractères particuliers des épines distribuées le long de dendrites marquées permettent de reconnaître rétrospectivement chaque épine de façon univoque entre les images en LM et les modèles d'EM 3D (Maco et al., 2013). La taille des PSDs est de l'ordre de 0,5µm, à la limite de résolution de la LM, ce qui nécessite de mettre au point des stratégies d'analyse robustes pour identifier de façon univoque les PSDs les plus petites en CLEM 3D (Cane et al., 2014).

5. Développements technologiques nécessaires pour l'étude quantitative de synapses *in vivo*

En résumé, acquérir la morphométrie fine d'épines dendritiques identifiées au sein de circuits corticaux nécessite de développer :

- un protocole optimisé pour combiner l'EM et la LM afin d'observer des épines dendritiques identifiées en tissu intact. Rendre ce protocole compatible avec des acquisitions de SMLM permettra de quantifier le contenu moléculaire des synapses observées.
- une stratégie de repérage fiable et efficace pour retrouver en EM une région d'intérêt observée en LM, au sein d'un volume de tissu.
- des protocoles d'analyse rigoureux pour segmenter et reconstruire en 3D des épines identifiées en LM et visualisées en EM, mais aussi pour différencier les types fonctionnels des synapses reconstruites, et quantifier leurs paramètres ultrastructuraux.

La première partie de mon travail de thèse a consisté à développer des approches de CLEM pour combiner nos savoir-faire en LM et en EM afin de remplir ces objectifs. Ce travail de développement fait l'objet des deux premiers chapitres de la partie Résultats.

Dans le premier chapitre sont exposés des verrous technologiques inédits qui freinent le développement de protocoles de type "LM post-inclusion" pour l'étude de tranches de tissu cérébral cryo-fixé.

Le deuxième chapitre détaille mon travail de mise au point et d'optimisation d'un protocole de CLEM qui permet d'allier microscopie optique confocale et SBEM pour mesurer les paramètres morphologiques d'épines identifiées *in vivo*. Appliquer cette approche au cas des dendrites basales des PN des couches 2/3 du cortex somato-sensoriel de souris adultes a permis de :

- Quantifier la variabilité morphologique constitutive des épines localisées sur ces dendrites,
- Mesurer les particularités morphologiques des épines porteuses d'un appareil épineux et/ou d'un contact inhibiteur axo-spinal,
- Modéliser la proportion d'épines qui compartimentent effectivement les signaux électriques le long des dendrites étudiées,
- Aborder le rôle des épines doublement innervées, et l'influence de la morphologie des épines sur l'intégration dendritique des signaux excitateurs et inhibiteurs.

Ces résultats seront proposés pour publication avant la fin de l'année, et l'épreuve de l'article fait l'objet du troisième chapitre.

RÉSULTATS

Chapitre I. Protocole “LM post-inclusion” : combiner LM plein champ et TEM en coupes sériees

Pour aborder l’ultrastructure *in vivo* d’épines identifiées, nous avons d’abord cherché à acquérir des images d’échantillons conservés dans un état cryo-fixé, aussi proche que possible de l’état natif.

1. Élaboration du protocole

1.1. Choix de la méthode de congélation haute pression (HPF)

La qualité de préservation ultrastructurale est au cœur des travaux de notre équipe depuis longtemps (Rostaing et al., 2004). Des études pionnières menées au sein du laboratoire ont permis le développement de méthodes de congélation haute pression (HPF) adaptées au tissu nerveux (Siksou et al., 2007) et des avancées majeures dans la description des complexes synaptiques (Siksou et al., 2009, 2011). Ces travaux ont mis au jour les effets délétères de la fixation aldéhydrique sur l’ultrastructure synaptique (Rostaing et al., 2004, 2006), et il est désormais établi que la fixation chimique affecte la morphologie des tissus nerveux dans son ensemble (Korogod et al., 2015). De fait, pour satisfaire à nos exigences en terme de préservation ultrastructurale, nous avons travaillé d’emblée au développement d’un protocole de CLEM qui permette l’étude de tranches corticales vitrifiées par HPF.

1.2. Conséquences pratiques de la fixation par HPF

La vitrification d’échantillons de tissu cortical en HPF nécessite de recueillir des tranches aiguës du cortex de l’animal sacrifié, et de les transférer rapidement dans l’appareil de congélation haute pression pour une vitrification immédiate (Rostaing et al., 2006). Après HPF, la température des coupes doit être maintenue à un niveau cryogénique jusqu’à l’inclusion. Observer en LM la tranche vivante pour visualiser le signal de fluorescence avant inclusion risque de détériorer la morphologie ultrastructurale pour plusieurs raisons : d’une part, le maintien des conditions physiologiques dans l’enceinte du microscope n’est pas assuré, et d’autre part, les acquisitions longues de microscopie confocale ou de SMLM posent des problèmes de photo-toxicité (Laissue et al., 2017). Dans le cadre de notre étude, l’utilisation de la HPF en CLEM tissulaire impose donc de programmer l’acquisition LM après l’inclusion des échantillons.

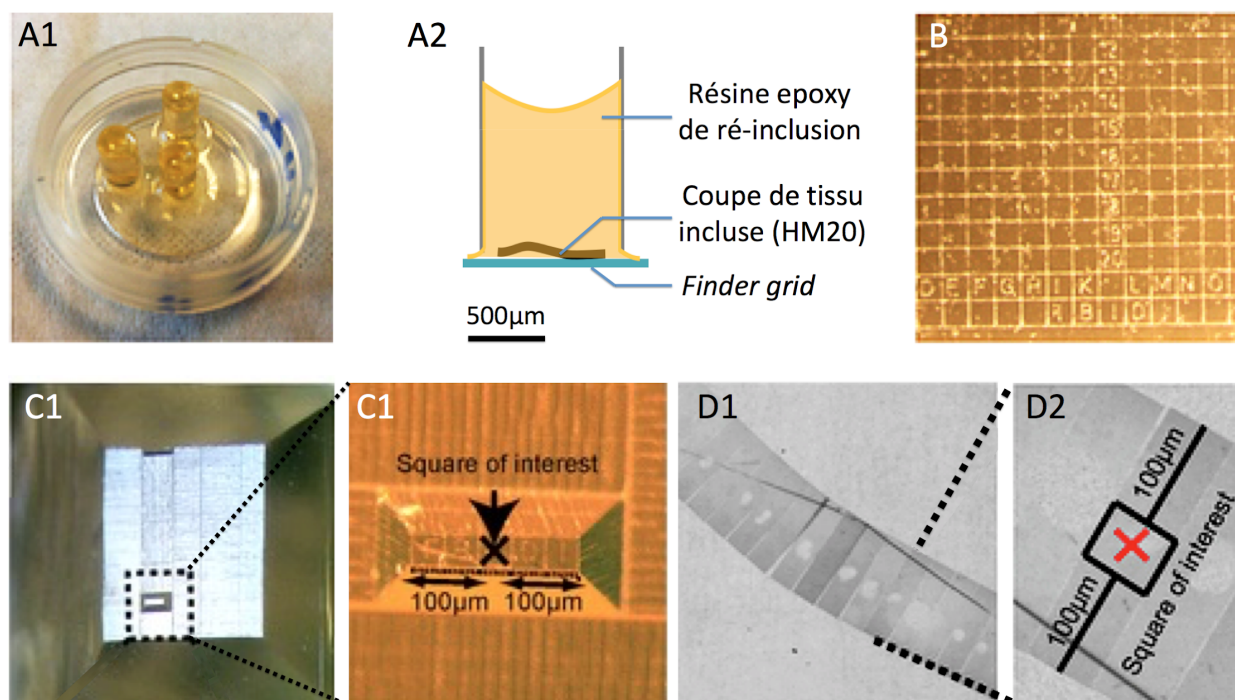


Figure 21 : Protocole de repérage d'une ROI au sein d'une coupe semi-fine pour observation en TEM après ré-inclusion en résine epoxy

(A1) Blocs de résine de ré-inclusion polymérisés sur finder grid (A2) Détail des blocs de ré-inclusion, avant polymérisation (B) Surface du bloc de réinclusion après décollage de la finder grid. Le quadrillage et les caractères alphanumériques de repérage s'impriment en surface du bloc et permettent l'approche à 50µm près (C1) Vue du bloc après taille de la "pyramide" qui permet de cadrer l'approche ultramicrotomique (C2) Détail de la pyramide centrée sur la ROI grâce au quadrillage de la finder grid. On prélève des sections ultra-fines en surface du bloc pour les colorer aux sels de métaux lourds, puis les observer en TEM (D1) Coupes sériées de la ROI (D2) L'espace correspondant au carreau d'intérêt se situe au centre de chaque coupe. A1 & B-D2 : adaptés de Al Jord et al., 2014.

1.3. Choix de la modalité d'EM 3D

Pour réaliser des mesures précises des volumes des cous d'épines, il est indispensable de reconstruire les épines entières en 3D avec une résolution axiale inférieure à 100nm, propre à l'EM. L'observation de dendrites entières, longues d'au moins 100µm, nécessite d'acquérir l'ultrastructure de larges volumes de tissu (environ $100 \times 50 \times 100 \mu\text{m}^3 > 10^5 \mu\text{m}^3$), ce qui incite à choisir le Serial Block-face EM (SBEM) comme modalité d'EM. Cependant, la préparation d'échantillon en SBEM nécessite de traiter l'échantillon en solutions aqueuses de métaux lourds avant l'inclusion, ce qui n'est pas encore compatible avec la HPF. Pour ces raisons, nous avons d'abord cherché à mettre au point un protocole combinant la LM à l'EM à transmission sur coupes ultra-fines sériées (ssTEM).

1.4. Ré-inclusion de coupes semi-fines observées en LM

Pour observer des épines dendritiques, de taille micrométrique, dans leur intégralité en LM post-inclusion, il faut prélever des coupes de tissu cortical d'au moins 2µm d'épaisseur, dites "semi-fines", de l'échantillon inclus. Pour observer ces mêmes épines en EM, il faut prélever des sections ultra-fines d'environ 70nm d'épaisseur des coupes semi-fines observées en LM. Cela nécessite d'une part de décoller la coupe semi-fine de la lamelle d'observation LM, et d'autre part, de la monter sur l'ultramicrotome afin d'en recueillir des sections ultra-fines. Ré-inclure la coupe semi-fine après observation LM dans un nouveau bloc de résine (Fig. 21 A1) permet de décoller et de manipuler la coupe semi-fine.

Pour retrouver la ROI observée en LM après ré-inclusion, il faut inclure un repère physique extrinsèque avec la coupe (Fig. 21A2). Les *finder grids*, qui sont des lamelles de verre gravées d'un quadrillage repéré par des caractères alphanumériques, permettent à la fois de repérer les coordonnées d'acquisition LM et d'imprimer le quadrillage de repérage à la surface du bloc de ré-inclusion (Fig. 21B). En cadrant la zone de coupe ultramicrotomique sur le carreau qui contient la ROI (Fig. 21C1&C2), il est possible de recueillir des coupes ultra-fines sériées qui contiennent les structures d'intérêt (Fig. 21D1&D2).

2. Mise en œuvre et verrous techniques

En vue de baser notre approche CLEM sur la méthode de ré-inclusion, nous avons vérifié la faisabilité de l'observation de coupes semi-fines ré-incluses en ssTEM avec le protocole suivant (Fig. 22).

1. Des tranches coronales aiguës de 200µm d'épaisseur de cerveau de souris sont prélevées au vibratome. Le cortex somatosensoriel (SSC) est taillé au scalpel pour intégrer une capsule de congélation en aluminium, puis fixé par HPF et recueilli dans l'azote liquide.
2. Les tranches vitrifiées sont déshydratées à froid par *freeze substitution* dans l'acétone puis incluses dans une résine acrylique (HM20).
3. Des coupes semi-fines de 2µm d'épaisseur de tissu cortical sont prélevées en surface de l'échantillon puis déposées sur une *finder grid*. Une région d'intérêt (ROI), choisie arbitrairement dans le cadre de ce protocole préliminaire, est repérée par le quadrillage de la *finder grid*.
4. La coupe est ré-incluse dans un bloc de résine époxy. Après polymérisation 48h à 60°C de la résine, le bloc est décollé de la *finder grid* par une série d'immersions rapides dans l'azote liquide. La ROI est repérée à 50µm près grâce au quadrillage imprimé en surface de l'échantillon.
5. Des sections ultra-fines sont prélevées pour être observées en TEM. La corrélation des images LM et EM est réalisée ultérieurement.

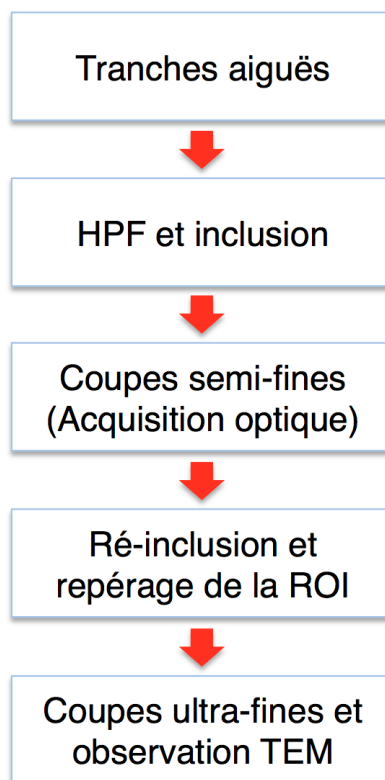


Figure 22 : Protocole préliminaire combinant HPF, LM et ssTEM

Schéma du protocole visant à combiner LM sur tissu vitrifié inclus et ssTEM après ré-inclusion.

Nous avons mis en œuvre ce protocole, mais une difficulté technique inattendue empêche de tirer parti des coupes ultra-fines : lors de la ré-inclusion des tranches observées en LM dans une résine époxy, les contraintes mécaniques liées à la polymérisation de la résine époxy froissent les tranches de tissu ré-inclus (Fig. 23A). Ce phénomène rend la corrélation entre LM et EM pratiquement impossible (Fig. 23B&C). Pour renforcer l'adhésion des coupes aux *finder grids* avant la ré-inclusion, et augmenter les chances qu'elles restent planes, nous avons essayé de couvrir les *finder grids* d'une membrane de polyornithine ou de formwar avant d'y déposer la coupe, mais ces précautions n'ont eu aucun effet.

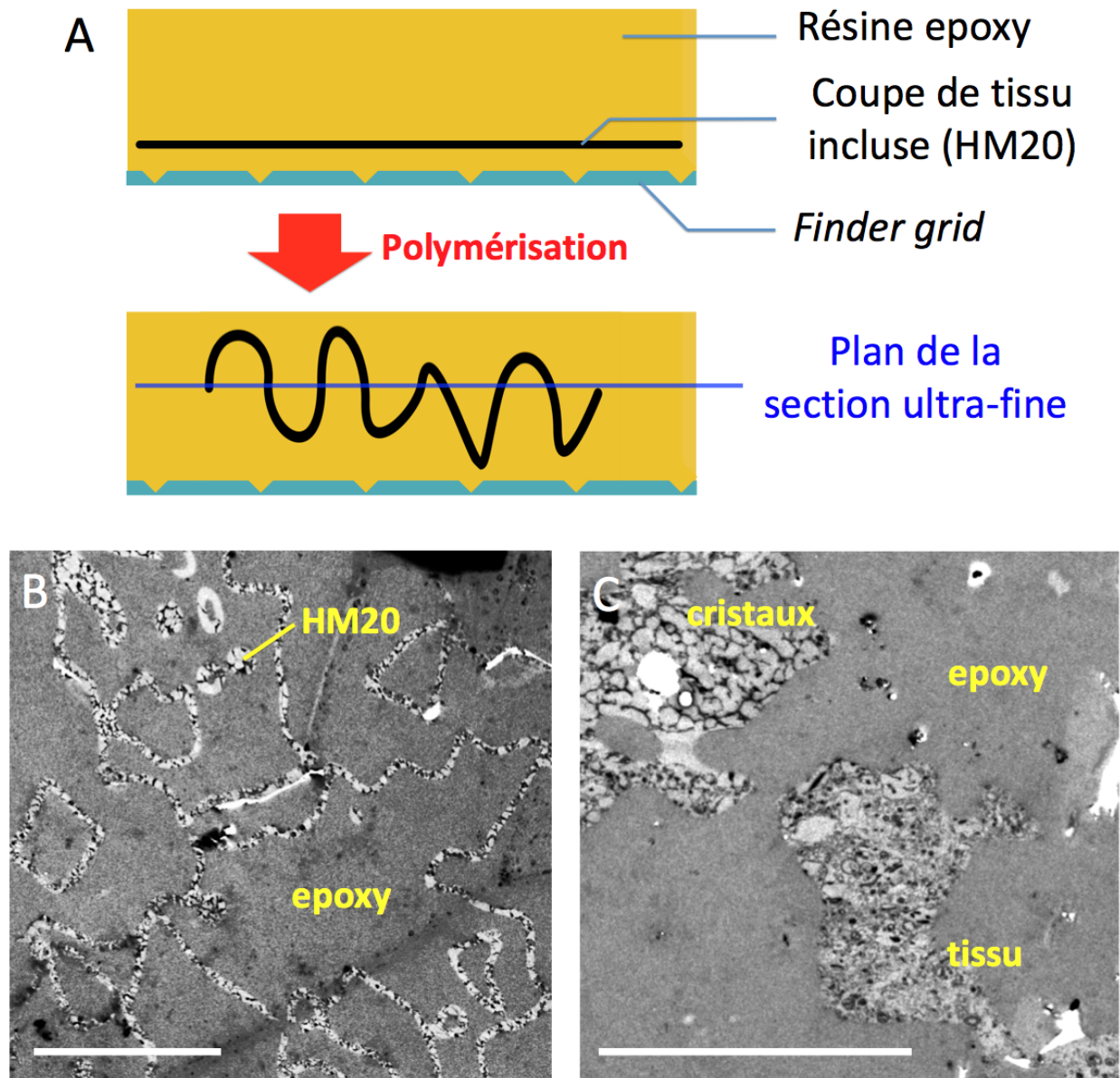


Figure 23 : Ré-inclusion en résine epoxy de coupes semi-fines incluses en résine HM20

(A) Schéma de l'effet manifeste de la polymérisation sur la forme des coupes ré-incluses. La coupe froissée fournit des images inexploitable en ssTEM (B) Image TEM d'une coupe ultra-fine de tissu ré-inclus froissé. Les deux résines, HM20 et epoxy, présentent des aspects différents sous le faisceau d'électron. (C) Détail d'une coupe ultra-fine de tissu ré-inclus froissé. Une portion de tissu vitrifié ré-inclus est visible au centre de l'image. Dans le coin supérieur gauche, des cristaux de glace signalent une congélation lente du tissu, en profondeur. Le froissage des coupes empêche de repérer des structures d'intérêt dans le tissu. Calibration : 20µm

3. Conclusions

La ré-inclusion de coupes de tissu incluses avant l'étape d'observation LM est un verrou technique pour ce protocole CLEM. Par extension, la HPF n'est pas compatible avec notre étude. Cependant, cet effort de développement a eu des retombées positives.

D'une part, l'acquisition de ces résultats préliminaires, même négatifs, a contribué à ma formation aux méthodes de microscopie électronique, au même titre que les expériences de doubles marquages immunocytochimiques que j'ai pu réaliser dans le cadre de l'étude suivante : "Trans-synaptic signaling through the glutamate receptor delta-1 mediates inhibitory synapse formation in cortical pyramidal neurons", publiée dans la revue *Neuron* et insérée en annexe (Annexe 2).

D'autre part, nous avons levé le verrou technique de la ré-inclusion des coupes en utilisant des coupes dites "Tokuyasu", dans le cadre d'une autre étude menée au laboratoire. La méthode proposée par Kiyoteru Tokuyasu consiste à fixer les échantillons avec des aldéhydes, à les imprégner de cryo-protectant (sucrose concentré), à les congeler dans l'azote liquide, puis à en prélever des coupes semi-fines, voire des sections ultra-fines. Les coupes Tokuyasu peuvent être recueillies sur des *finder grids* pour être observées en LM. Ces coupes, non-incluses, adhèrent mieux au verre des *finder grids* que les coupes incluses, et peuvent être ré-incluses sans se froisser dans un bloc de résine epoxy (résultats non publiés). Nous avons tiré parti de ces propriétés pour mettre au point une approche de CLEM super-résolutive qui fait l'objet d'une publication en cours de préparation, intitulée "Glycine receptor numbers and packing density at spinal cord synapses revealed by quantitative dual-colour super-CLEM". Ces travaux sont présentés brièvement en annexe (Annexe 3).

Le protocole Tokuyasu nécessite de fixer les tissus avec des solutions d'aldéhydes avant de congeler les tissus, ce qui n'est pas optimal pour notre étude. Quitte à employer la fixation chimique, nous avons décidé d'utiliser l'imagerie SBEM, plus adéquate que la ssTEM pour réaliser nos mesures morphométriques 3D sur des dendrites entières.

Chapitre II. Protocole “LM pré-inclusion” : combiner microscopie confocale et SBEM

En première partie, nous avons démontré la trop grande difficulté technique d'utiliser une approche CLEM de type “LM post-inclusion” pour réaliser notre étude. En réponse, nous avons développé un protocole “LM pré-inclusion” qui permette de combiner microscopie confocale et SBEM sur des neurones identifiés, dans des circuits corticaux intacts. Nous avons appliqué cette approche à l'étude des épines dendritiques portées par les dendrites basales neurones pyramidaux (PNs) des couches L2/3 du cortex somato-sensoriel (SSC) de souris adultes. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux épines dites “doublement innervées” (DiS), qui reçoivent à la fois un contact excitateur et un contact inhibiteur. Les données de CLEM nous ont permis de modéliser de façon quantitative le comportement électrochimique des épines étudiées, et d'aborder les liens entre l'ultrastructure des épines et l'intégration des signaux synaptiques excitateurs et inhibiteurs. Ces travaux sont sanctionnés par un article scientifique en cours de publication, présenté au chapitre III.

Dans ce chapitre-ci, nous expliquons en détail les travaux de développement qui nous ont permis de réaliser cette étude.

1. Élaboration du protocole

1.1. Stratégie de marquage fluorescent *in vivo*

Pour repérer les DiS le long de l'arborisation dendritique de neurones de type cellulaire spécifique, nous avons besoin de co-transfecter les cellules ciblées avec deux types de sondes fluorescentes : d'une part, une protéine fluorescente cytosolique pour visualiser la morphologie de l'arborisation dendritique d'un petit nombre de neurones transfectés, et d'autre part, une sonde fluorescente fusionnée avec une protéine recrutée aux PSDs inhibitrices, telle que la géphyrine. Nous avons utilisé TdTomato comme fluorophore cytosolique, et EGFP-géphyrine pour repérer les synapses inhibitrices afin de mettre au point notre approche CLEM.

Pour manipuler l'expression génique *in vivo* de types cellulaires ciblés à des positions précises dans le cerveau, nous avons utilisé l'approche d'électroporation *in utero* (IUE ; Dal Maschio et al. 2012; Kolk, de Mooij-Malsen, and Martens 2011; Lo Turco, Manent, and Sidiqi 2009), déjà maîtrisée au laboratoire (Fossati et al., 2016). L'IUE repose sur la transfection ciblée de progéniteurs neuronaux situés à une position précise le long de la paroi épithéliale des ventricules cérébraux, à un moment précis du développement embryonnaire. Les neurones formés par les progéniteurs transfectés migrent au cours du développement et forment une petite population de neurones transfectés de type cellulaire homogène. En résumé, l'IUE permet d'éditer de façon parcimonieuse l'expression génique de populations spécifiques de neurones corticaux.

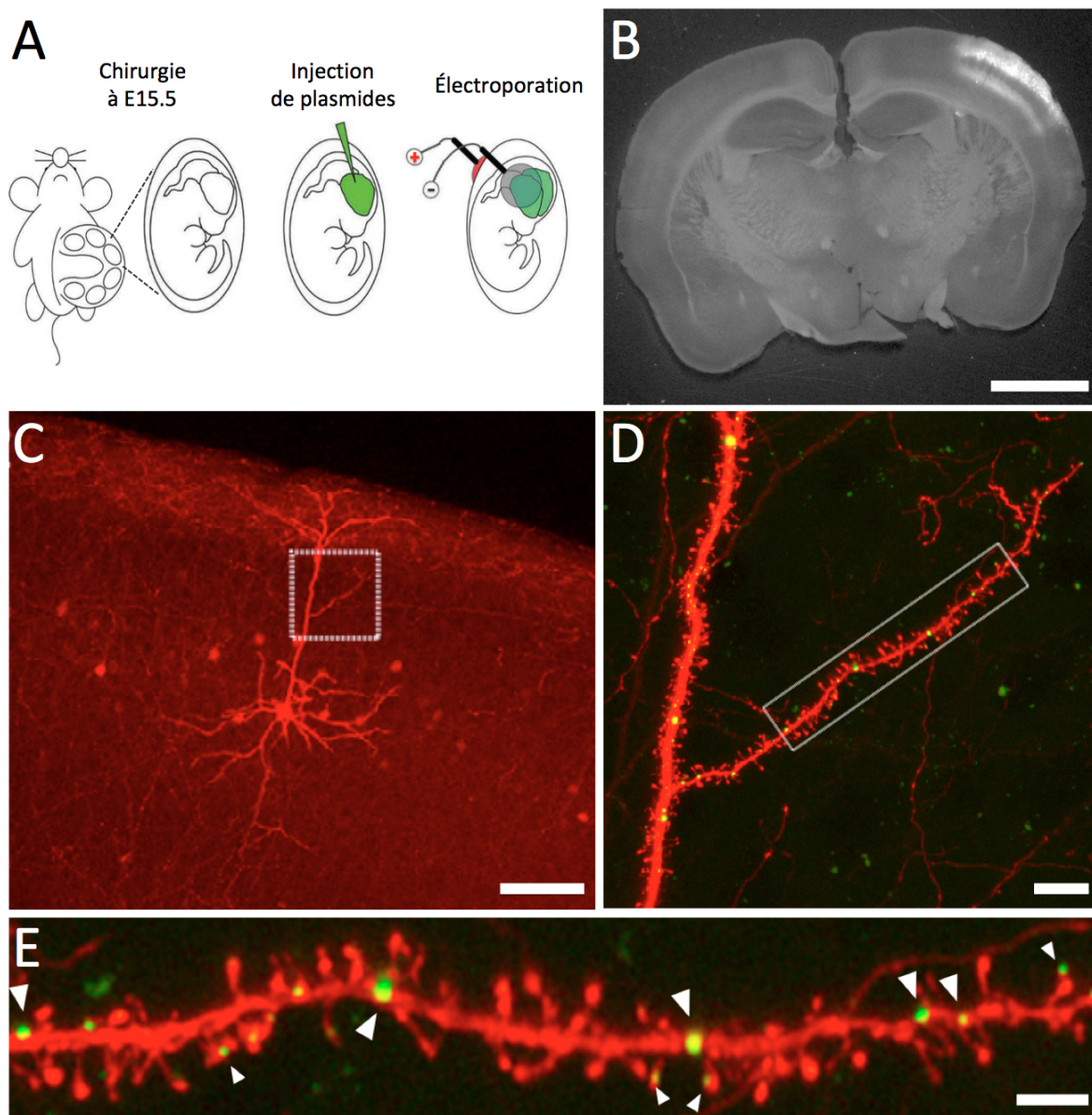


Figure 24 : Marquage spécifique d'un petit nombre de neurones par électroporation *in utero*

(A) Schéma de la procédure d'électroporation *in utero* (IUE). Les embryons d'une souris gestante sont exposés, par chirurgie, au 15^{ème} jour du développement embryonnaire. Les plasmides d'intérêt sont injectés dans la lumière des ventricules cérébraux, puis des chocs électriques sont appliqués aux tissus neurogéniques ciblés pour transfecter les cellules progénitrices des neurones d'intérêt. (B) Image en épi-fluorescence de neurones pyramidaux marqués par IUE dans le cortex somato-sensoriel (SSC) d'une souris adulte (âgée de trois mois). Les neurones du SSC exprimant une TdTomato cytosolique sont visibles dans le coin supérieur gauche de l'image (C) Image en microscopie confocale d'un neurone électroporé isolé (D) Zoom sur les dendrites apicales du neurone en (C). TdTomato cytosolique (en rouge) permet de visualiser la morphologie dendritique, et EGFP-GPHN (en vert) marque les contacts synaptiques inhibiteurs (E) Zoom sur la dendrite oblique de l'encart en (D). Les synapses inhibitrices sont localisées sur le tronc dendritique (flèches larges) ou sur les têtes d'épines dendritiques doublement innervées (DiS). Calibrations : (B) 2mm (C) 100µm (D) 10µm (E) 3µm. A : adapté de DalMaschio2012. C-E : adapté de Fossati2016.

La transfection des progéniteurs neuronaux de la région cérébrale ciblée est réalisée en deux étapes : la micro-injection d'une solution de plasmides d'ADN dans la lumière du système ventriculaire est suivie de l'application de chocs électriques dirigés manuellement au travers des tissus neurogéniques d'intérêt. Les chocs électriques sont appliqués au moyen d'une pince d'électrodes qui permet de contrôler mécaniquement la position de l'embryon pendant l'électroporation (Fig. 24A). Les chocs électriques appliqués déstabilisent la structure des membranes cellulaires, et provoquent l'ouverture transitoire de pores membranaires. Simultanément, les plasmides d'ADN, chargés négativement, migrent vers l'anode selon les lignes de champ électrique, et pénètrent dans le cytoplasme des cellules électroporées. L'expression génique induite dans les neurones issus des progéniteurs électroporés persiste à des temps post-nataux longs : l'IUE de gènes codant pour des protéines fluorescentes permet de visualiser les cellules électroporées tout au long du développement et jusque chez l'adulte (Chen et al., 2012; Dal Maschio et al., 2012; Fossati et al., 2016; Villa et al., 2016).

Nous avons électroporé une TdTomato cytosolique et EGFP-géphyrine spécifiquement dans les neurones pyramidaux (PNs) des couches L2/3 du cortex somato-sensoriel (SSC ; Fig. 24B-D) afin de localiser précisément les PSDs inhibitrices le long de ces neurones (Fig. 24E).

1.2. Établissement du protocole CLEM "LM pré-inclusion"

Pour fixer les tissus cérébraux des souris électroporées adultes, nous utilisons la perfusion intracardiaque d'une solution d'aldéhydes. Cette méthode de fixation, classique en EM, fournit une belle morphologie ultrastructurale, selon les critères du tissu fixé chimiquement. La fixation chimique permet d'observer les échantillons en LM avant l'inclusion en résine, nécessaire à l'EM.

Nous utilisons la microscopie confocale comme modalité LM pour caractériser en 3D la distribution des PSDs inhibitrices (iPSDs) des neurones marqués. L'acquisition 3D permet d'enregistrer précisément la morphologie de l'arborisation dendritique et l'organisation des épines dendritiques, ce qui facilite à la fois le repérage de la ROI en EM, et la reconnaissance rétrospective en EM des épines observées en LM.

Pour limiter le volume de tissu à explorer en EM 3D, nous utilisons les tranches de tissu fixées les plus fines possibles. Les vibratomes permettent de réaliser des tranches corticales d'une épaisseur minimale de 20-30µm, à température ambiante. Il est possible de réaliser des tranches plus fines au cryostat, mais les nombreuses manipulations d'échantillon nécessaires à la préparation d'échantillon pour l'EM disloquent des coupes de moins de 30µm d'épaisseur. Cette épaisseur de tissu constitue un volume trop important pour envisager d'utiliser la ssTEM pour une analyse en volume — cela nécessiterait de recueillir environ 450 sections ultra-fines sans en perdre une — et confirme le choix du SBEM. Pour réaliser nos acquisitions SBEM, nous avons utilisé le TeneoVS (ThermoFisherScientific) installé sur la plateforme ImagoSeine à l'Institut Jacques Monod.

Ces choix nous ont conduits à définir le protocole suivant pour réaliser nos mesures (Fig. 25).

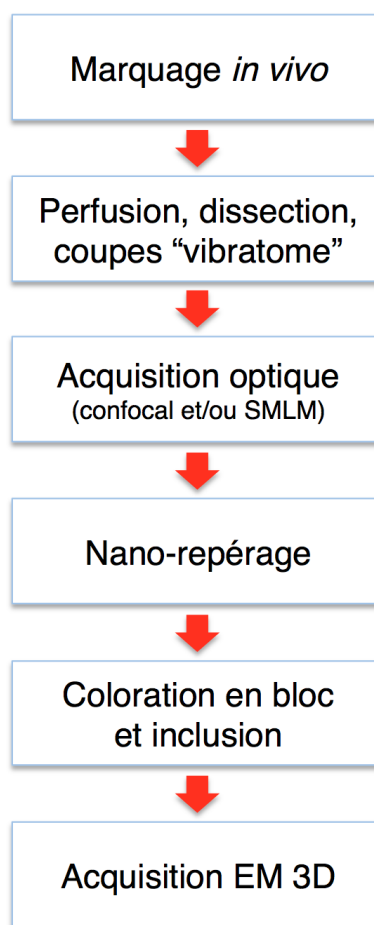


Figure 25 : Protocole de l’approche CLEM de type “LM pré-inclusion”

Schéma de principe du protocole permettant de combiner microscopie confocale et/ou SMLM, et SBEM sur des épines identifiées dans des circuits neuronaux intacts.

Notre approche comprend plusieurs étapes successives :

1. Les neurones ciblés sont transfectés par IUE pour exprimer *in vivo* les sondes fluorescentes sélectionnées.
2. Les souris transfectées, âgées de trois mois, sont perfusées avec une solution de fixateurs aldéhydiques. Les cerveaux sont prélevés, et des tranches coronales sont recueillies au vibratome.
3. Les coupes sont observées en LM : les dendrites ciblées de certains neurones électroporés forment la région d’intérêt (ROI).
4. Pour faciliter le repérage de la ROI en EM, des repères extrinsèques sont imprimés dans le tissu lors d’une l’étape de nano-repérage. Nous expliquerons ce procédé dans la partie 2.2.
5. Les tranches observées sont “colorées en bloc” dans des solutions de sels de métaux lourds, puis déshydratées et incluses en résine epoxy. Les tranches incluses sont montées sur des portoirs, ou *pins*, pour l’observation au SBEM.

6. Les tranches sont introduites dans la chambre à vide du SEM après une approche préliminaire de l'ultramicrotome intégré au SBEM. Les repères extrinsèques introduits en surface de l'échantillon guident la programmation des zones d'acquisition. Dès la stabilisation du vide dans le microscope, les volumes programmés sont imagés au cours de séquences répétées de coupe ultramicrotomique et d'imagerie SEM.

Nous avons dû répondre au cahier des charges suivant pour mettre au point cette approche :

- Maximiser conjointement le signal de fluorescence et la qualité de préservation ultrastructurale
- Concevoir un procédé qui permette de générer des repères fiduciaires extrinsèques en surface de l'échantillon, afin de retrouver au SBEM la ROI imagée en LM.
- Optimiser la préparation d'échantillon pour faciliter le cadrage des zones d'acquisition SBEM.
- Maximiser la qualité des images de SBEM.
- Extraire les paramètres quantitatifs pertinents de la masse de données acquises en SBEM.

2. Mise en œuvre et optimisation du protocole CLEM

2.1. Compatibilité LM/EM

Pour tirer parti de la CLEM, il est important de maximiser conjointement la qualité d'image LM et EM. Pour obtenir une belle morphologie ultrastructurale en EM, il est courant d'utiliser de fortes concentrations de glutaraldéhyde (GA) lors de l'étape de fixation. Cependant, la GA est une substance autofluorescente qui peut détériorer le signal de fluorescence. À l'inverse, une fixation trop légère détériore la morphologie ultrastructurale. Nous avons utilisé une concentration de GA qui fournit à la fois un bon rapport signal-sur-bruit (RSB) sur les images de microscopie confocale (Fig. 26A & B), et une bonne morphologie en EM (Fig. 26C & D). Nous avons constaté que la fine épaisseur de nos tranches de tissu (30µm) limite la quantité de photons d'autofluorescence qui proviennent de l'épaisseur du tissu dans des échantillons plus épais (Fossati et al., 2016).

Nous avons établi qu'une solution de perfusion contenant 4% de paraformaldéhyde et 0.5% de GA fournit de très bons résultats en terme de préservation ultrastructurale, à la fois en SBEM et en TEM, sans diminuer le RSB en LM, pour nos échantillons.

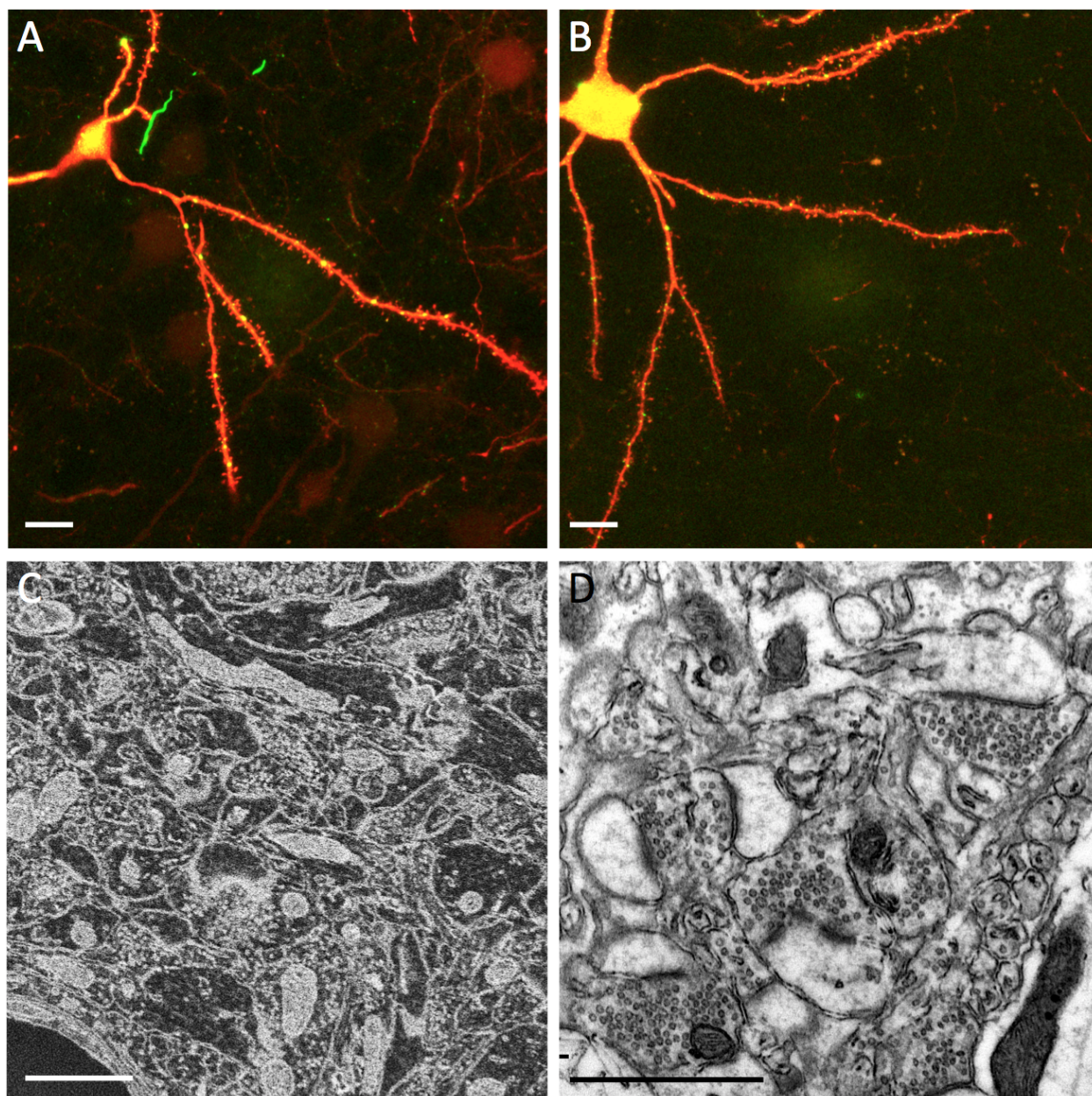


Figure 26 : Compatibilité LM/EM : peu d'autofluorescence et bonne morphologie ultrastructurale

(A&B) Projections d'images confocales représentant le soma, et certaines dendrites basales, de neurones exprimant TdTomato cytosolique et GFP-géphyrine. L'autofluorescence est négligeable sur ces images malgré une fixation avec 4% PFA et 0,5% GA. (C) Image en SBEM de tissu cortical fixé dans les mêmes conditions. Les éléments synaptiques sont bien visibles. Le contraste SEM est inversé par rapport au contraste TEM (D) Image en TEM de tissu cortical fixé avec la même solution de fixateur. La morphologie est bien préservée à ce grandissement. Calibrations : A & B : 10 μ m ; C & D : 1 μ m.

2.2. Nano-repérage DAB

2.2.1. Motivations des développements réalisés

L'une des difficultés majeures de la CLEM 3D en "LM pré-inclusion" est de retrouver la ROI entre les étapes d'acquisition LM et EM. L'absence de repères intrinsèques micrométriques et naturellement visibles à la fois en LM et en EM rend difficile l'approche 3D des ROIs acquises en LM (De Boer et al., 2015).

Les techniques proposées dans la littérature pour insérer des repères artificiels sont contraignantes et requièrent soit :

- un laser infra-rouge pour graver des marques repérables dans le tissu
- un scanner RX pour visualiser l'architecture vasculaire de l'échantillon
- le marquage direct des structures d'intérêt avec des polymères de DAB, qui masque le détail ultrastructural sous-jacent.

Aucune de ces trois techniques de nano-repérage ne convient à notre étude. D'une part, notre poste de SMLM ne peut pas accueillir de laser infra-rouge, alors que nous cherchons à maintenir la compatibilité du protocole avec l'acquisition SMLM. D'autre part, nous ne disposons pas de scanner aux rayons X. Enfin, le dépôt de DAB dans le cytosol des neurones électroporés provoquerait des dommages ultrastructuraux, masquerait les appareils épineux (SA) et affecterait certains paramètres morphologiques, comme la taille des PSDs ou le volume des épines.

Pour ces raisons, nous avons mis au point une nouvelle technique de nano-repérage. Nous avons découvert qu'en illuminant une tranche de tissu cortical imprégnée de DAB monomérique avec un laser UV focalisé, il était possible de générer un précipité de DAB au point focal du laser, à n'importe quel endroit du tissu. Cet effet peut être reproduit très facilement avec des lasers UV courants — typiquement, des lasers de microscopie confocale. Ce procédé nous a permis d'imprimer à volonté des matrices 3D de marqueurs fiduciaires visibles à la fois en LM et en EM dans les échantillons de tissu. En particulier, nous avons utilisé cette méthode pour marquer des neurones ciblés sans obscurcir leur cytosol, et les retrouver en EM. Nous avons réalisé plusieurs développements pour mettre cette approche au point.

2.2.2. Capsule de confinement des coupes

Le nano-repérage DAB nécessite d'immerger la coupe à observer dans une solution de DAB monomérique. Comme aucun système ne permettait de changer facilement le milieu d'immersion de la coupe sans la retirer du microscope confocal, nous avons conçu et développé une capsule de confinement d'échantillon à usage unique qui remplit à moindre coût les objectifs suivants :

- Maintenir les tranches de tissu à plat contre les lamelles de verre pour faciliter l'observation
- Permettre l'immersion des tranches dans différentes solutions au cours de l'acquisition LM

- N'avoir aucune influence sur le signal LM
- Confiner les solutions employées à une enceinte jetable, car si la DAB se dépose le long des parois d'une chambre ré-utilisable, elle risque de souiller le milieu d'immersion utilisé pour d'autres expériences

Nous avons tiré parti de la géométrie "inversée" de nos microscopes (i.e. illumination et collection de la fluorescence du même côté du plan d'observation), qui permet un accès facilité aux échantillons observés pour concevoir des capsules de confinement de dimensions petites mais macroscopiques. Ces capsules sont constituées d'inserts de culture cellulaire scellés directement à la lamelle d'observation. Le procédé de fabrication que nous avons mis au point est simple, efficace et peu coûteux (Fig. 27).

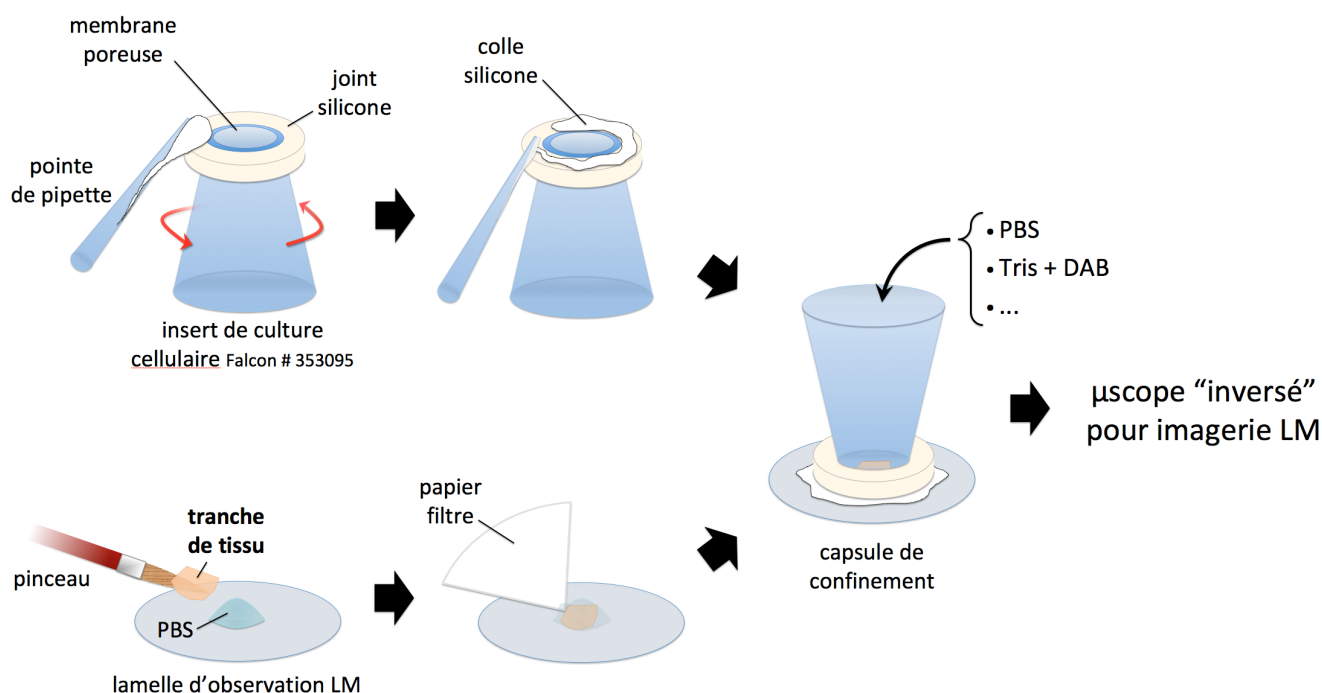


Figure 27 : Confection d'une capsule de confinement

Deux éléments sont nécessaires pour confectionner la capsule : une lamelle de verre sur laquelle repose la tranche de tissu à observer, et un insert de culture cellulaire prêt à être collé. Les deux éléments sont confectionnés simultanément pour que ni la tranche, ni la colle ne sèchent prématurément. Faire glisser un joint silicone torique autour de l'insert afin qu'il affleure au niveau de la membrane de l'insert. Étaler sans excès de la colle silicone sur tout le joint torique. Faire tourner l'insert contre un pic (e.g. une pointe de pipette 100µL) enduit de colle silicone aide à l'étaler de façon homogène. Pour préparer la lamelle, déposer la coupe sur une goutte de solution tampon puis sécher avec un coin de papier filtre. Presser l'insert contre la lamelle sans endommager la coupe, puis remplir l'insert de solution tampon et presser la capsule pour chasser les bulles d'air qui risquent de sécher la coupe. Laisser la colle se solidifier ~1h avant d'observer la tranche sur un microscope LM inversé.

Résultats

Le diamètre des pores de la membrane de l'insert influence à la fois sa perméabilité et sa rigidité. Avec des pores de $\varnothing 0.1\mu\text{m}$, la rigidité de la membrane permet de plaquer les tranches de $30\mu\text{m}$ d'épaisseur contre la lamelle pour éviter qu'elles ne se froissent. Dans le cas de pores de $\varnothing 4\mu\text{m}$, la rigidité de la membrane est trop faible.

En revanche, les membranes $\varnothing 0.1\mu\text{m}$ ne permettent pas de changer rapidement le milieu d'immersion des tranches. Pour pallier ce problème, nous perçons des trous macroscopiques avec une aiguille dans les membranes d'inserts de $\varnothing 0.1\mu\text{m}$ (Dutscher, ref. 353095) avant de monter la chambre. Cette étape permet le passage rapide des solutions d'immersion tout en conservant la rigidité de la membrane.

Les dimensions de l'insert imposent que, pour tenir dans la capsule, les tranches à observer soient taillées (au scalpel) autour du neurone ciblé, pour mesurer environ $5\text{-}10\text{mm}^2$. Les tranches, redimensionnées sous une loupe binoculaire encapsulées puis observées en LM.

2.2.3. Acquisitions LM multi-échelle

Une acquisition LM judicieuse permet de faire le lien entre les échelles millimétriques et submicrométriques, ce qui facilite grandement la suite de l'approche CLEM. L'acquisition LM comprend les deux opérations suivantes :

- Une étape de sélection de ROI, essentielle pour maximiser la qualité des images : à l'objectif "10x", on visualise l'organisation spatiale des neurones électroporés dans le tissu pour repérer les cellules les plus brillantes et les plus isolées, qui fourniront le meilleur RSB. Dans l'arborisation des neurones sélectionnés, on cible prioritairement les dendrites basales situées en surface de la coupe : elles offrent la meilleure qualité d'image.
- Une étape d'acquisition : à l'objectif "100x", on enregistre l'organisation spatiale de la majorité des épines des dendrites basales électroporées, avec une résolution limitée par la diffraction de la lumière. Ces informations sont cruciales pour la corrélation avec l'EM en fin de protocole.

Après l'acquisition des stacks LM 3D, on change le milieu d'encapsulation pour la solution de DAB monomérique afin de réaliser le nano-repérage.

2.2.4. Calibration du marquage DAB

Dès que l'acquisition confocale est terminée, on remplace le milieu d'immersion de la coupe par une solution tampon Tris contenant 1g/L de DAB monomérique (Fig. 28A). Le nano-repérage DAB est basé sur le principe suivant.

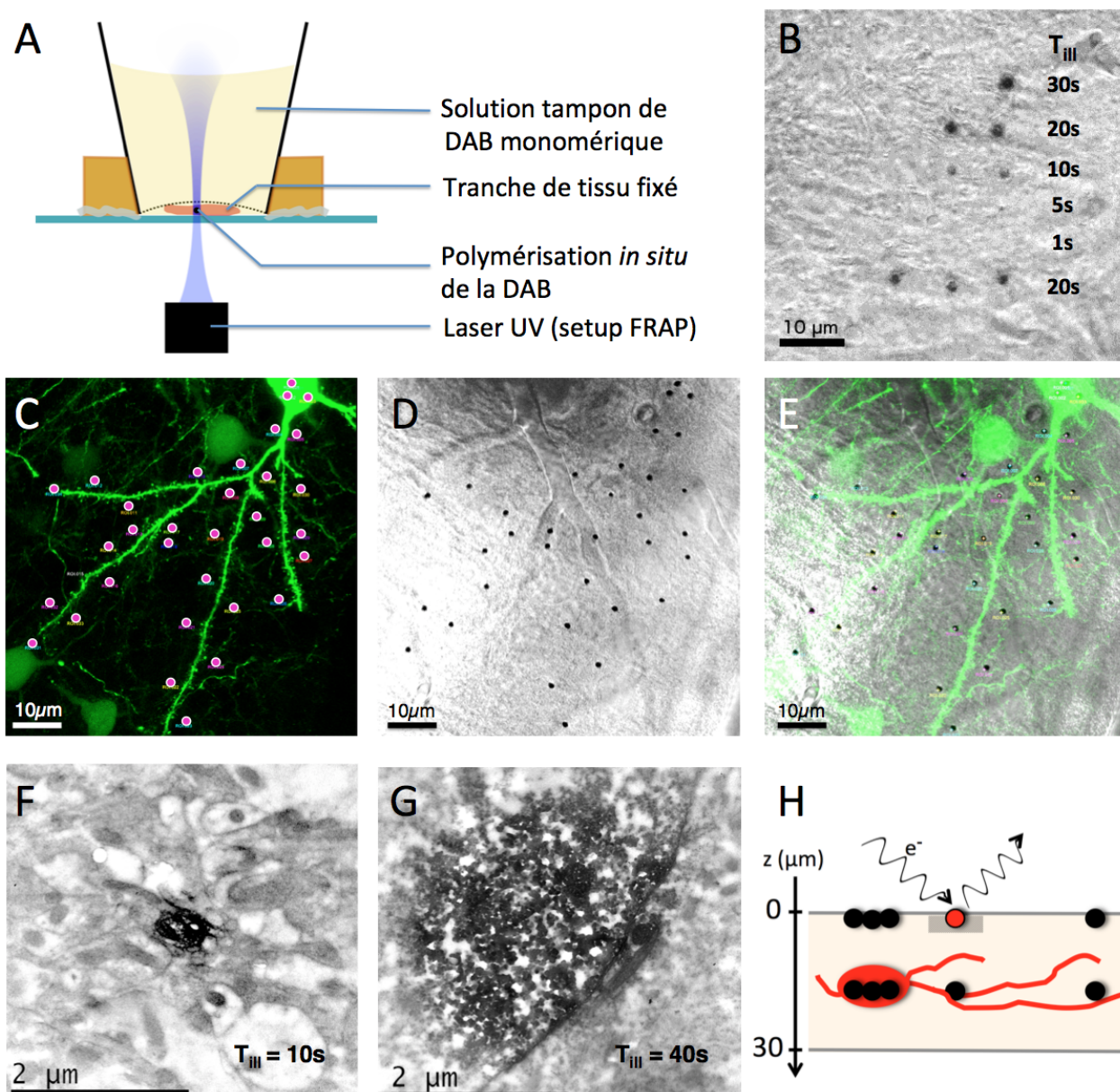


Figure 28 : Principe et calibration du nano-repérage par photo-précipitation de DAB

(A) Schéma du procédé de photo-précipitation de DAB. La tranche observée est immergée dans une solution de DAB monomérique à l'intérieur du microscope grâce à la capsule de confinement. Focaliser un laser UV dans la tranche provoque la précipitation locale de DAB (B) Image en transmission lumineuse d'une tranche de tissu cortical marquée avec des précipités de DAB générés pour différents temps d'illumination UV, à puissance d'illumination fixée. La taille du point de DAB augmente avec le temps d'illumination. (C) Exemple de pattern de photo-précipitation DAB visualisé au microscope confocal. Le laser UV est focalisé pendant 40s à chaque position indiquée par un point magenta (D) Image en transmission lumineuse de la tranche après photo-précipitation. L'arrangement des marqueurs DAB (points noirs) est précisément le même que le pattern de focalisation UV. (E) Superposition des deux images précédentes. La photo-précipitation de DAB permet de repérer les dendrites ciblées de neurones électroporés. (F,G) Images en TEM de marqueurs DAB après osmification. Les deux précipités ont été obtenus avec des temps d'illumination respectifs de 10s et 40s, à puissance identique. Le contraste de la

Résultats

Focaliser un laser UV à haute énergie dans une tranche de tissu imprégnée de DAB provoque la précipitation locale de polymères de DAB. Le détail physique de cet événement n'est pas connu, mais on peut avancer plusieurs hypothèses : soit la DAB absorbe l'UV et amorce seule sa polymérisation, soit le rayonnement UV génère localement des radicaux libres dans le tissu, qui oxydent la DAB et provoquent son oligomérisation (Meißlitzer-Ruppitsch et al., 2009). Quelque soit le mécanisme à l'œuvre, le rayonnement UV focalisé provoque le dépôt de DAB au point focal, et la taille du point de DAB correspond au temps d'illumination UV (Fig. 28B). Le taux de réussite de la photo-précipitation est de 100% dans le tissu cortical et de 0% dans la lumière des vaisseaux sanguins.

L'utilisation d'un laser UV programmable permet de le focaliser à différentes coordonnées (x,y,z) dans la coupe. Il est ainsi possible de générer des précipités de DAB à volonté dans le volume de tissu (Fig. 28C&D). En décorant l'arborisation dendritique d'un neurone électroporé, on peut le marquer de façon univoque grâce à des précipités de DAB (Fig. 28E). Après osmification et traitement de l'échantillon pour l'observation en EM, les précipités de DAB osmiée produisent un contraste fort et impossible à confondre avec une structure biologique native (Fig. 28F&G).

Nous avons mis au point une stratégie de nano-repérage adaptée pour le SBEM, basée sur la photo-précipitation de la DAB sur deux niveaux dans la tranche (Fig. 28H). Pour repérer un neurone unique dans l'échantillon, nous générons un premier pattern de DAB en surface de l'échantillon, visible en SEM et qui renseigne sur les coordonnées (x,y) de la ROI avant de lancer l'acquisition SBEM. Le même pattern DAB est imprimé en profondeur, au niveau du soma du neurone à repérer, pour le marquer de façon univoque. Ce pattern de DAB permet de s'assurer *a posteriori* de l'identité du neurone ciblé, dans le volume d'images acquises en SBEM. Pour assurer l'identification du soma, nous "photo-précipitons" trois marqueurs DAB côte-à-côte dans le noyau du neurone ciblé. Cette marque particulière est très évidente, et facilite grandement l'identification du neurone ciblé.

DAB est impossible à confondre avec les structures biologiques environnantes (H) Schéma de la stratégie de nano-repérage pour le SBEM. Une dispersion de marqueurs DAB (points noirs) est photo-précipitée de façon contrôlée en surface de la coupe. Le même pattern est imprimé à la profondeur du soma du neurone d'intérêt (en rouge) afin de le repérer de façon univoque. Une fois osmiés, les marqueurs DAB interagissent fortement avec un faisceau d'électrons (e-), ce qui permet leur détection en SEM.

2.3. Recoupe chirale sub-millimétrique avant l'inclusion

Après l'étape de nano-repérage, il faut préparer l'échantillon pour l'observation SBEM. Nous avons basé notre protocole de préparation d'échantillon sur le protocole "OTO" proposé par Thomas Deerinck et coll. (Deerinck et al., 2010), qui fournit un bon contraste SEM au sein de blocs de tissus volumineux. Le protocole "OTO", qui signifie "osmium-thicarbohydrazide-osmium", repose sur la double osmification à 0°C de l'échantillon, entrecoupée d'un traitement au thicarbohydrazide (TCH) en solution aqueuse, qui augmente la quantité d'osmium adsorbé aux membranes cellulaires. L'échantillon est ensuite coloré "en bloc" à l'aspartate de plomb et à l'acétate d'uranyle, déshydraté, puis inclus dans une résine epoxy "Durcupan" qui durcit lors d'une étape de polymérisation. Les tranches incluses sont ensuite montées sur des portoirs métalliques, ou *pins*, avec une colle conductrice pour l'observation au SBEM.

De façon caractéristique, le protocole OTO noircit complètement même les échantillons les plus fins. Les coupes de 30µm d'épaisseur préparées de cette façon deviennent opaques dès la déshydratation, ce qui présente un inconvénient majeur pour notre protocole CLEM : il est impossible de visualiser le marquage DAB à l'œil nu dans l'échantillon inclus pour retrouver la ROI avant de monter l'échantillon dans la chambre à vide du SBEM. En conséquence :

- Il devient très difficile de cadrer la "pyramide" d'approche ultramicrotomique sur la ROI marquée en DAB pour réduire la région à scanner au SEM
- Il y a une chance sur deux de monter l'échantillon à l'envers sur le *pin* d'observation SBEM.

Pour contourner ces problèmes, nous recoupons les échantillons selon une forme chirale, cadrée très serré (~200nm) autour de la ROI, tout de suite après l'étape de nano-repérage DAB. Ceci est possible car la fluorescence résiduelle de l'échantillon est encore visible à ce stade (Fig. 29). La recoupe de la tranche peut être réalisée manuellement au scalpel avec une grande dextérité, sous une loupe binoculaire. La taille optimale de coupe est de quelques centaines de µm de côté : cela limite le champ de vue nécessaire au SBEM, sans augmenter la difficulté de manipulation des coupes lors des différentes étapes du protocole OTO. Par ailleurs, acquérir la fluorescence résiduelle de la coupe recoupée (Fig. 29A2&B2) est très utile pour cadrer l'acquisition SBEM sur la ROI.

2.4. Facilitation du protocole d'inclusion OTO

Les coupes chirales sub-millimétriques sont quasiment invisibles à l'œil nu avant l'osmification. Manipuler des coupes si petites devient difficile avec un pinceau, même fin. Une alternative consiste à manipuler ces coupes dans de petits paniers dont les pores ne dépassent pas la centaine de µm. Transférer ces paniers macroscopiques d'une solution à l'autre une autre au fur et à mesure des rinçages et du protocole OTO limite à la fois le besoin de manipuler directement les coupes et les risques de perte d'échantillon.

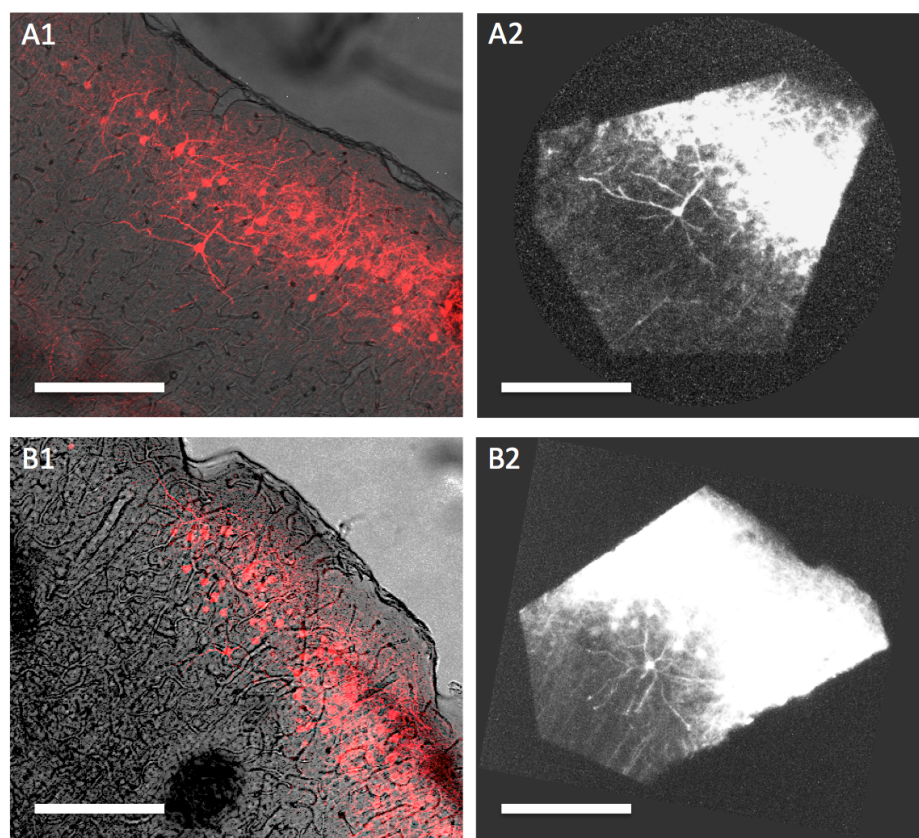


Figure 29 : Recoupe de forme chirale - exemples

(A1) Image confocale à l'objectif 10x d'une tranche corticale électroporée. Cette étape de repérage vise à cibler un neurone brillant et isolé, propice à l'acquisition à l'objectif 100x. (A2) Tranche recoupée au scalpel une fois l'acquisition confocale terminée. Cette étape permet de limiter l'aire du tissu à observer en SBEM. (B1 & B2) Idem pour un autre échantillon. Calibration : 200µm.

2.5. Coplanarité des plans d'observation LM et EM

Après inclusion et montage de l'échantillon, l'approche ultramicrotomique est généralement une étape délicate — à plus forte raison, en CLEM, où l'alignement des plans d'observation LM et EM est crucial pour visualiser le pattern DAB et cadrer l'acquisition SBEM sur la ROI. Si le plan de coupe forme un angle important avec le plan d'observation LM, les différents points du pattern DAB apparaissent successivement au fil des coupes, ce qui complique l'approche à plusieurs titres :

- Le temps d'approche devient extrêmement long car il faut multiplier les acquisitions d'images préliminaires pour visualiser les marqueurs DAB
- Le pattern DAB complet est difficile à déduire de l'observation de marqueurs DAB isolés
- L'abrasion de l'échantillon lors de l'étape de repérage expose au risque de couper la ROI avant d'avoir lancé l'acquisition
- L'angle de coupe par rapport à l'échantillon (*tilt*) fait que les zones d'acquisition programmées au SBEM dérivent progressivement par rapport à la ROI au cours de l'acquisition.

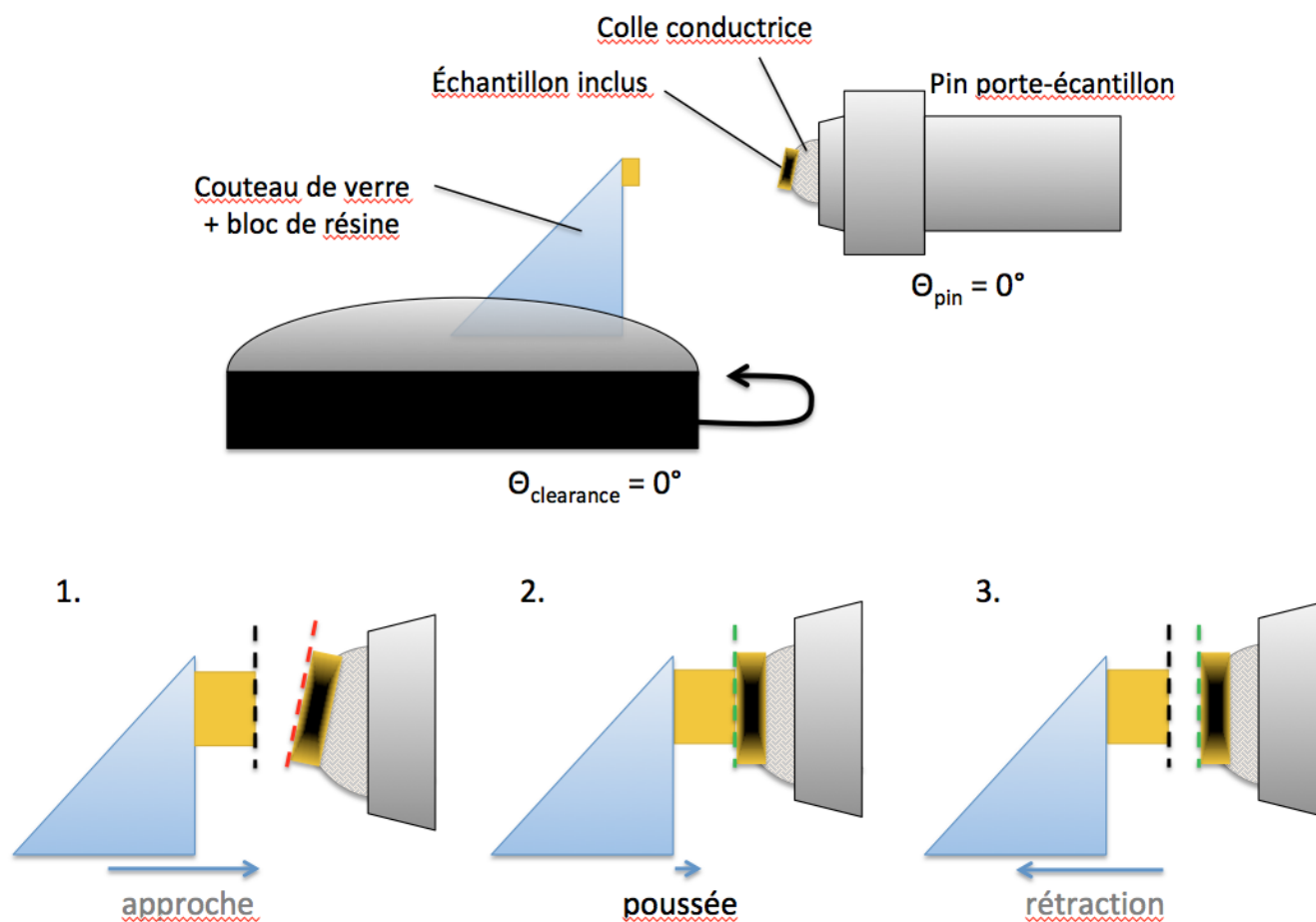


Figure 30 : Montage de la coupe sur le *pin* porte-échantillon adapté au SBEM

Schéma d'une procédure de montage d'échantillon qui permet de minimiser l'angle entre les plans d'observation en LM et en SBEM. Coller un petit morceau de résine (par exemple, un cube de 0.5mm de côté) à un couteau de verre monté sur un ultramicrotome standard avec un angle de dégagement (clearance) de 0°. Monter le pin SBEM, comportant l'échantillon collé de biais sur une goutte de colle conductrice, avec un angle de montage de 0°. (1) Approcher le couteau de verre pour amener le bloc de résine au contact de l'échantillon. (2) Appliquer une force modérée sur l'échantillon en avançant le couteau de verre afin d'enfoncer légèrement l'échantillon dans la colle, avec un angle de 0°. La colle, visqueuse, se réarrange autour de l'échantillon en quelques secondes. (3) Une fois la colle immobile, retirer le couteau de verre puis laisse sécher la colle à 60°C avant de monter le pin dans le SBEM.

À l'inverse, si les plans d'observation LM et EM sont coplanaires, le pattern DAB en surface de la coupe peut être visualisé en quelques coupes ultra-fines pour déduire les coordonnées (x,y) de la ROI.

Puisque la position du couteau intégré au SBEM ne peut pas être contrôlée, il est nécessaire d'orienter l'échantillon par rapport au couteau pour les rendre coplanaires. Nous avons mis au point une procédure simple et efficace pour favoriser l'alignement des plans LM et EM lors du montage de la coupe (Fig. 30).

Après insertion du *pin* dans la chambre à vide du SBEM et approche initiale, réalisée à l'air libre, du couteau de diamant intégré au SBEM, il est recommandé de laisser le vide s'établir pendant une nuit avant de lancer l'acquisition pour limiter la dérive du microscope en début d'acquisition.

2.6. Optimisation de la qualité d'acquisition SBEM

Avant d'expliquer le cadrage des zones d'acquisition SBEM, nous allons présenter brièvement les ajustements qui nous ont permis de maximiser la qualité d'image SBEM.

En SEM, l'image est formée grâce à un faisceau d'électrons incidents (IE) balayé à la surface de l'échantillon, et à un détecteur qui capte les électrons de haute énergie "rétro-diffusés" par l'échantillon (Fig. 31 ; BSE pour Back-Scattered Electrons). Les BSE pénètrent dans l'échantillon à une profondeur qui dépend d'une part de la composition atomique de l'échantillon, et d'autre part de l'énergie du faisceau incident, définie par l'intensité du courant qui traverse la source d'électrons, i , et par la tension d'accélération des électrons incidents, V .

Le défi technique majeur, en imagerie SEM, est de limiter l'accumulation, sur l'échantillon, de charges de surface qui proviennent principalement l'interaction inélastique des IE avec les nuages électroniques des atomes en surface de l'échantillon irradié (Smith & Starborg, 2019). Ces interactions génèrent des électrons secondaires (SE) qui peuvent être générés plus vite qu'ils ne sont évacués par conduction électrique, au cours du balayage du faisceau incident sur l'échantillon, avec deux effets principaux. D'une part, les SE génèrent des champs électromagnétiques locaux qui provoquent la distorsion et la dégradation de l'image (Fig. 32A1&A2). D'autre part, l'accumulation des SE peut endommager la structure moléculaire de l'échantillon, détériorer ses propriétés mécaniques et perturber la coupe au cours de l'acquisition SBEM, ce qui limite la résolution axiale effective (Smith & Starborg, 2019).

Ces charges s'accumulent facilement à la surface des échantillons isolants : les volumes de résine epoxy pure présents dans les vaisseaux sanguins des tissus inclus, ou les noyaux cellulaires, qui sont peu marqués par l'osmium, présentent rapidement des zones brillantes, artéfactuelles, liées à l'apparition de charges à leur surface (Fig. 32B1). Les méthodes les plus simples pour limiter la charge des échantillons consistent d'une part à diminuer l'énergie des IE en abaissant i et V , et d'autre part à diminuer le temps de résidence du faisceau par unité de surface : $T_{px}/\Delta x_{px}$, où T_{px} est le temps de résidence par pixel, et Δx_{px} est la taille du pixel. Ces quatre caractéristiques d'acquisition doivent être optimisées pour maximiser la qualité des images de SBEM.

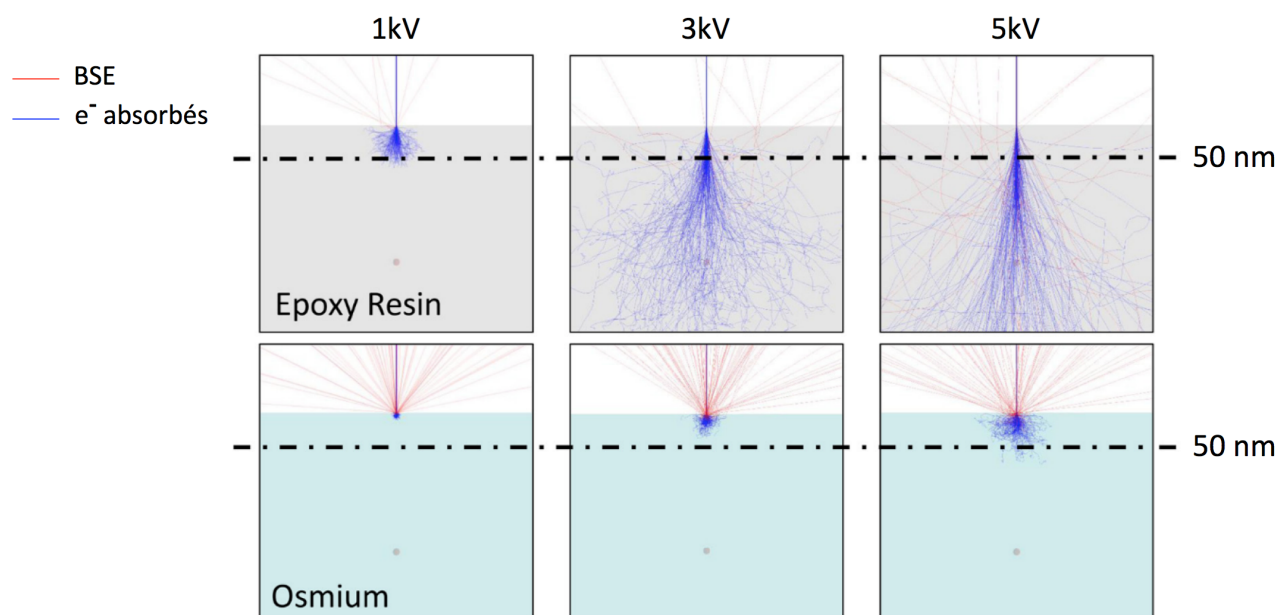


Figure 31 : Pénétration d'un faisceau d'électrons en fonction de sa tension d'accélération

Simulations, selon la méthode de Monte-Carlo, du trajet d'électrons accélérés respectivement à 1, 3 et 5kV et focalisés sur un bloc de résine epoxy ou d'osmium massif. Les trajectoires en bleu représentent les électrons ré-absorbés par le matériau. Les trajectoires en rouge représentent les électrons "rétro-diffusés" (BSE), qui ressortent de l'échantillon par le plan d'incidence après un ou plusieurs évènements de diffraction. Les BSE peuvent être utilisés pour former une image. Dans le cas de la résine époxy, la majorité des électrons sont absorbés : la résine apparaît noire au SEM. Par ailleurs, les électrons incidents (IE) sont absorbés à différentes profondeurs en fonction de V . Selon cette simulation, pour une tension d'1kV, les IE irradient uniquement la couche superficielle de l'échantillon ($\sim 50\text{nm}$ de profondeur), mais irradient des profondeurs plus grandes à V plus élevée. Dans le cas de l'osmium, la quantité de BSE est beaucoup plus importante : l'osmium apparaît brillant au SEM. Ici, la diffusion des IE, et les dommages liés à l'irradiation, restent confinés à la surface de l'échantillon observé. Adapté de Smith 2019.

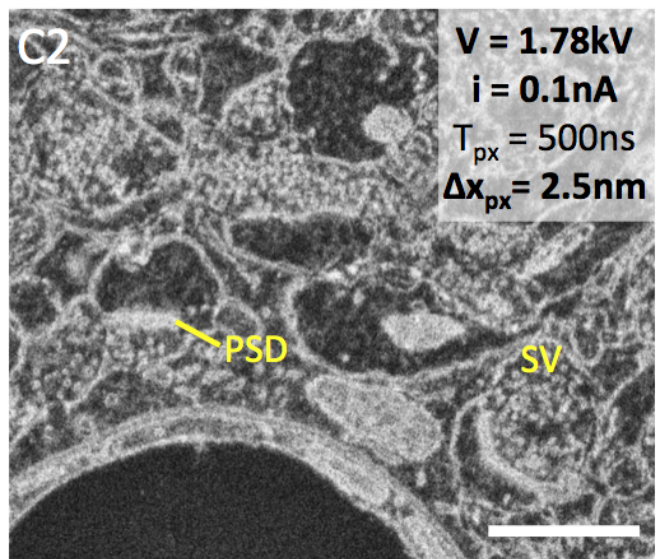
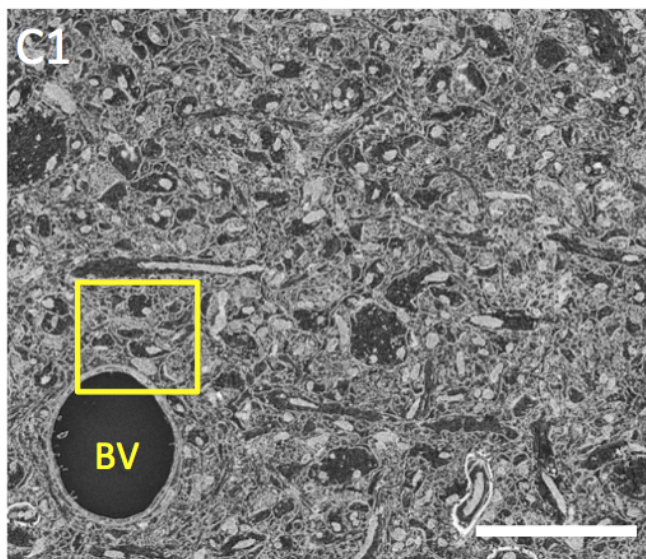
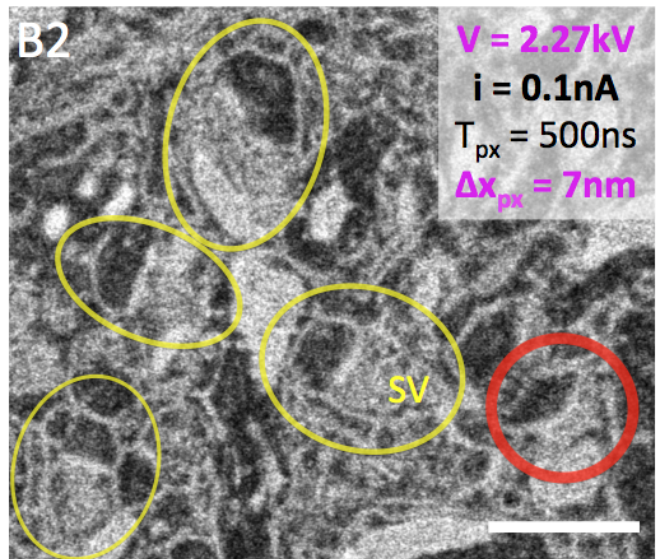
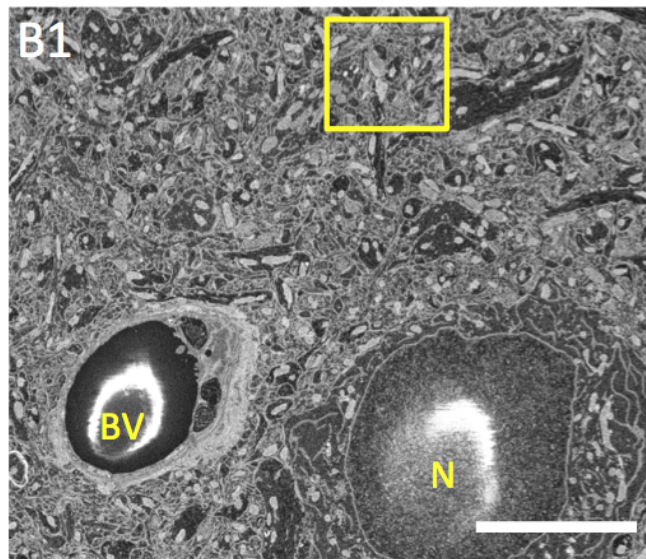
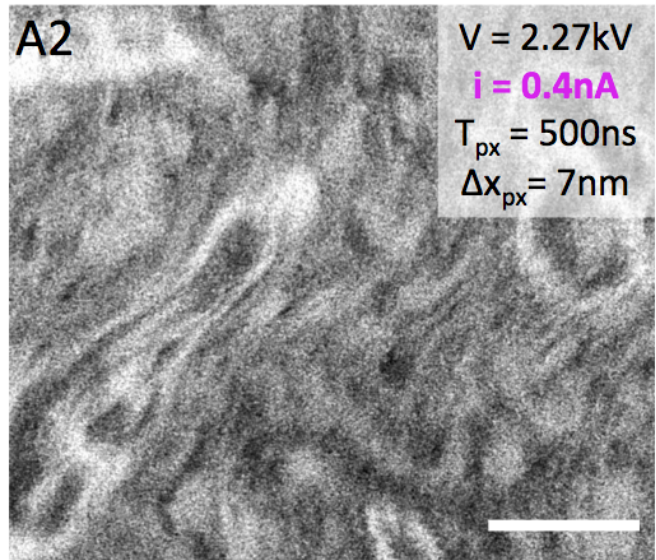
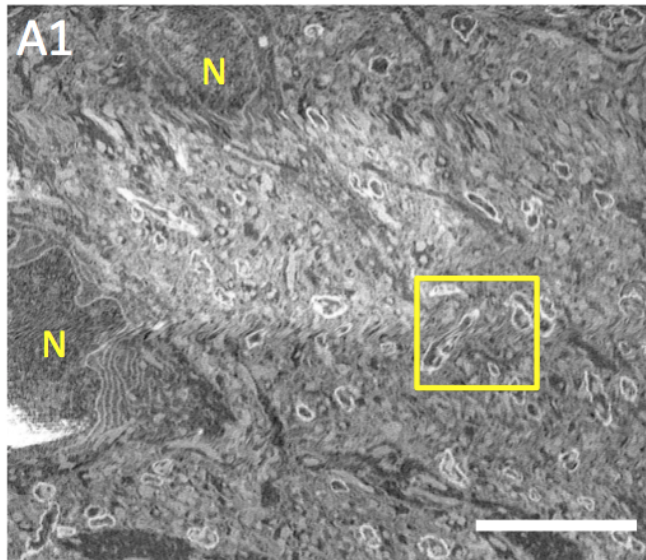
2.6.1. Optimisation des paramètres d'acquisition SEM

Pour observer nos échantillons de tissu cortical osmié, nous avons utilisé dans un premier temps des valeurs de $\{i, V, T_{px} \text{ et } \Delta x_{px}\}$ conseillées par le constructeur, pour des coupes de 40nm d'épaisseur :

$$V = 2.27\text{kV} \quad i = 0.1\text{nA} \quad T_{px} = 500\text{ns} \quad \Delta x_{px} = 7\text{nm}.$$

À $V = 2.27\text{ kV}$ pour $i = 0.1\text{nA}$, les électrons diffusent théoriquement à une profondeur proche de 40nm, ce qui permet de sonder la totalité des coupes avant leur abrasion.

$\Delta x_{px} = 7\text{nm}$ est proche de la limite de résolution théorique du SEM.



Avec ces paramètres, nous observons des artéfacts de charge résiduels dans l'échantillon (Fig. 32B1). De plus, le détail ultrastructural des synapses n'est pas clairement visible : il est possible de repérer les PSDs, qui fournissent un contraste fort, mais les synapses les plus petites sont difficiles à identifier (ellipse rouge sur la Fig. 32B2) et les SV apparaissent comme une masse indistincte.

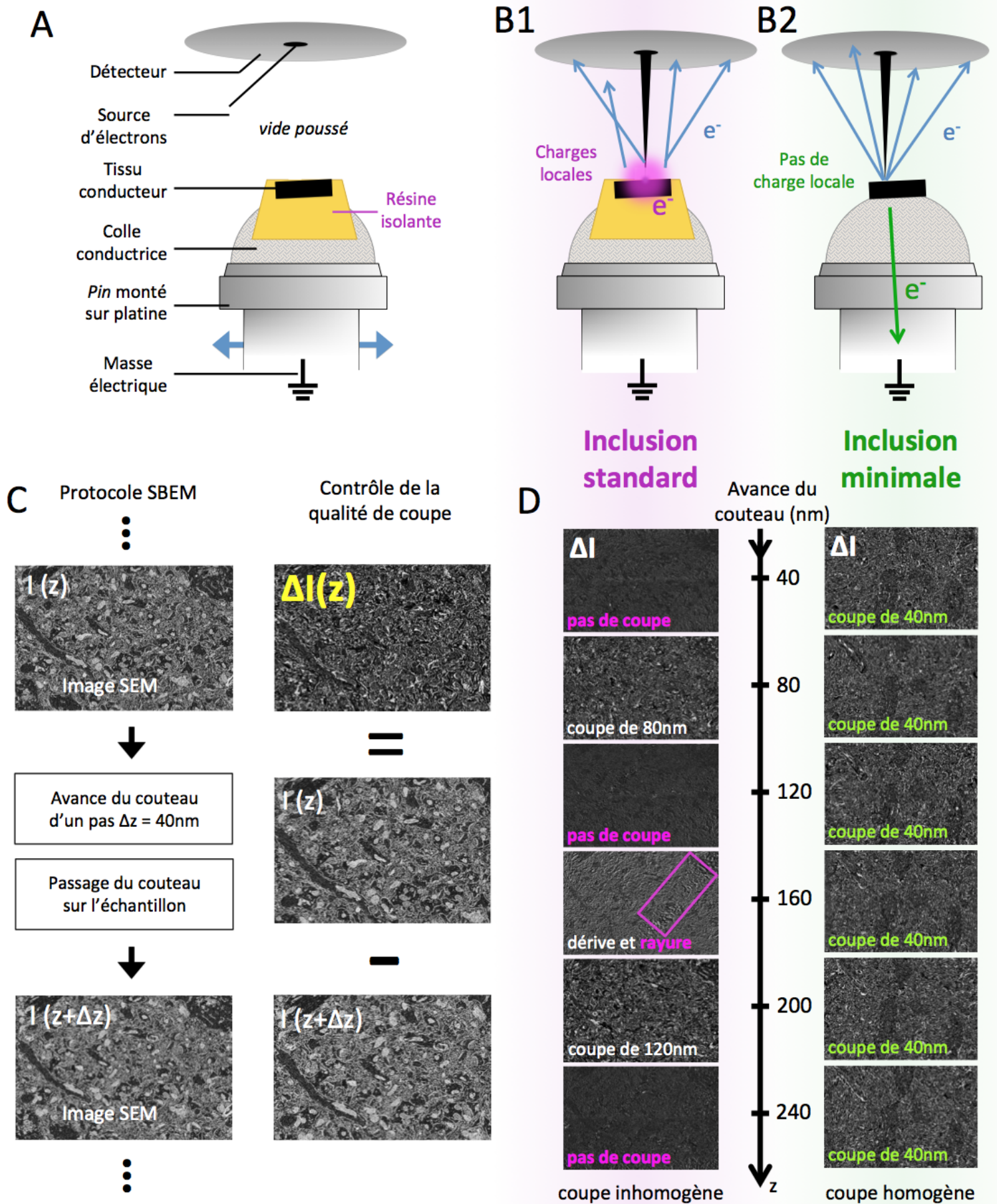
Pour optimiser la qualité des images, nous avons diminué la taille du pixel au delà de la résolution théorique du SEM : $\Delta x_{px} = 2.5\text{nm}$, mais gardé $T_{px} = 500\text{ns}$ pour conserver un bon contraste, ce qui augmente la dose d'électrons par unité de surface et génère des artéfacts de charge. Pour compenser ces artéfacts, nous avons abaissé $V = 1.78\text{ kV}$ et optimisé la conductivité de l'échantillon (explications au paragraphe suivant). Ces ajustements nous ont permis d'éliminer les artéfacts de charge (Fig. 32C1) et de résoudre les SV individuelles pour assurer l'identification des appareils synaptiques (Fig. 32C2).

2.6.2. Inclusion minimale

Une tranche de tissu osmié, conductrice mais incluse à plat (*flat embedding*) dans un bloc de résine isolante, constitue un échantillon globalement isolant (Fig. 33A). Lors de l'acquisition SEM, les charges s'accumulent à sa surface (Fig. 33B1) alors qu'elles diffusent rapidement dans le porte-échantillon métallique dans le cas d'un échantillon conducteur (Fig. 33B2). Pour augmenter la conductivité globale de nos échantillons en favorisant le contact direct du tissu osmié avec la colle conductrice, nous incluons les coupes dans un minimum de résine (procédé d'inclusion dite "minimale").

Figure 32 : Optimisation des paramètres d'acquisition SEM

(A1) Image SEM d'un échantillon de cortex préparé selon le protocole OTO standard. Sur cette image, le faisceau est trop énergétique ($i = 0.4\text{nA}$), ce qui provoque la distorsion de l'image (A2) Zoom sur l'insert en A1. La distorsion est évidente et empêche l'analyse ultrastructurale (B1) Image SEM du même échantillon avec une intensité plus faible ($i = 0.1\text{nA}$). L'image est nette, mais les charges s'accumulent dans les vaisseaux sanguins (BV) et les noyaux cellulaires (N) (B2) Zoom sur l'insert en B1. Les PSDs produisent un contraste fort qui permet de repérer la majorité des synapses (ellipses jaunes). En revanche, malgré un réglage fin de la position du plan focal et la correction des astigmatismes, les vésicules synaptiques (SV) ne peuvent pas être distinguées les unes des autres, et certaines synapses sont difficiles à identifier (ellipse rouge) (C1) Image SEM d'un échantillon de cortex inclus dans un minimum de résine, avec $V = 1.78\text{kV}$ et $\Delta x_{px} = 2.5\text{nm}$. Les charges ne s'accumulent pas dans les vaisseaux sanguins (BV) (C2) Zoom sur l'insert en C1. Les PSDs sont évidentes et les SV peuvent être résolues individuellement. Calibrations : (A-C1) $5\mu\text{m}$ (A-C2) $1\mu\text{m}$.



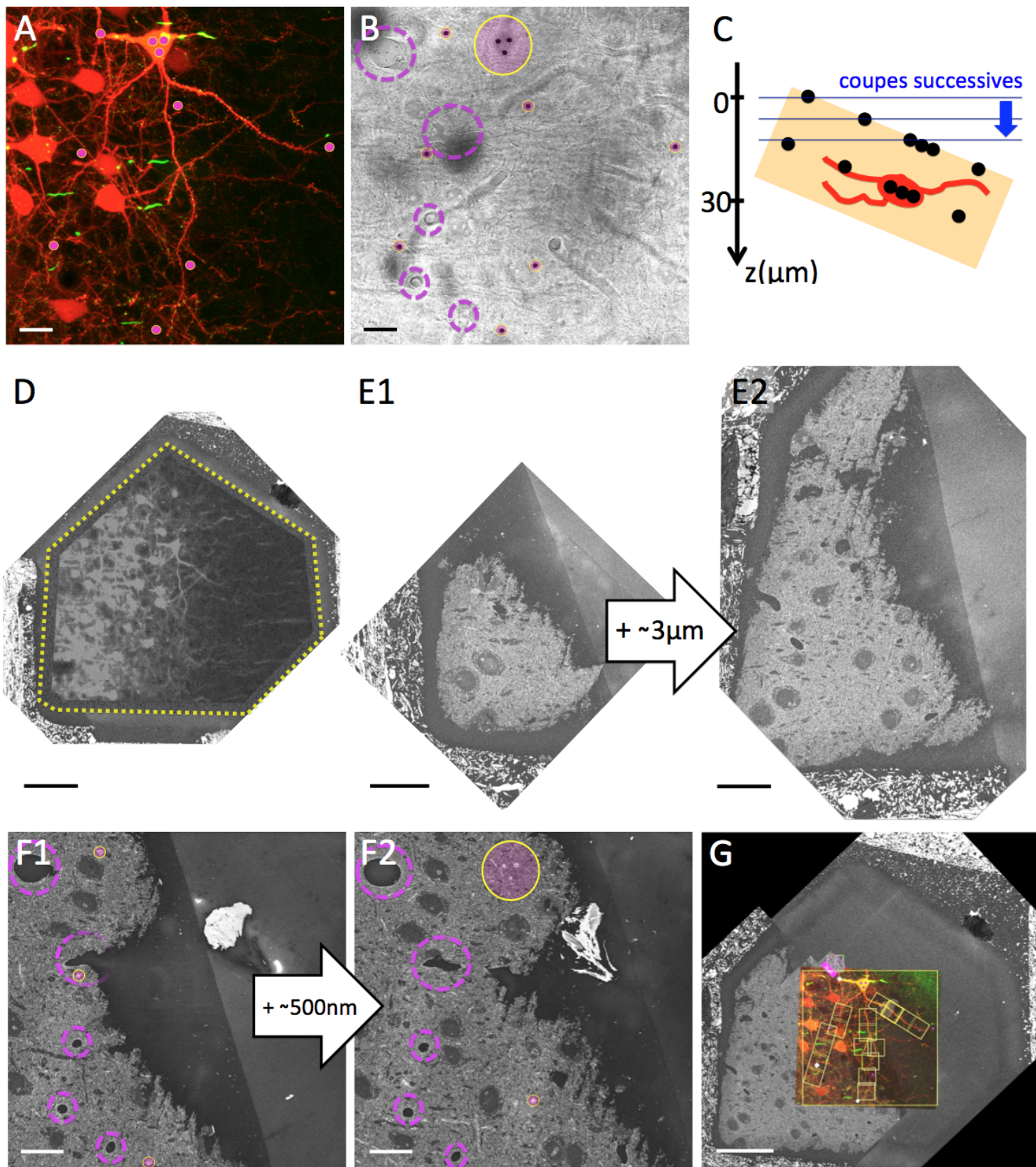
En plus d'accroître la résolution radiale des images SEM (Fig 32C2), l'inclusion minimale permet de limiter les dommages structuraux liés à l'irradiation, et d'améliorer la qualité de coupe de l'échantillon. Nous contrôlons la qualité de coupe en observant la différence entre deux images acquises successivement ($\Delta I(z)$; Fig. 33C). Si la différence $\Delta I(z)$ est une image nulle (i.e., du bruit de fond), c'est que la même surface a été observée deux fois de suite, donc que la coupe n'a pas eu lieu. Les échantillons inclus dans un volume minimal de résine présentent des ΔI non nulles tout au long de l'acquisition, à l'inverse des échantillons inclus dans un grand volume de résine isolante (Fig. 33D), ce qui signifie que le procédé d'inclusion minimale maximise la qualité de coupe.

2.7. Repérage de la ROI en SBEM grâce à l'acquisition LM

À ce stade du protocole CLEM, nous disposons d'une carte de l'organisation des dendrites du neurone ciblé, acquise en LM, et de la position (x,y) des marqueurs fiduciaires DAB imprimés dans le tissu (Fig. 34A). Parallèlement à l'acquisition LM, nous avons acquis des images en lumière transmise pour repérer l'organisation vasculaire dans le tissu (Fig. 34B). Ces repères intrinsèques permettent de contrôler la profondeur de coupe lors de l'approche et de l'acquisition 3D.

Figure 33 : Optimisation de la résolution axiale par inclusion minimale

(A) Schéma de l'échantillon monté dans la chambre à vide du SBEM. Le pin porte-échantillon est monté sur une platine mobile qui permet de scanner la surface de l'échantillon avec le faisceau d'électrons issu de la source. Le détecteur d'électrons rétro-diffusés (BSE) forme un anneau autour de la source d'électrons et quantifie le flux de BSE ré-émis par chaque pixel. De façon standard, l'échantillon conducteur est inclus dans une résine qui l'isole de la masse électrique. (B1) Les électrons (e-) du faisceau incident qui réagissent avec les nuages électroniques en surface de l'échantillon génèrent des électrons dits "secondaires" (SE) qui tendent à s'accumuler à la surface des échantillons de faible conductivité. Les SE génèrent un champ électro-magnétique qui perturbe la formation de l'image SEM (halo magenta). (B2) Le contact direct de l'échantillon conducteur avec la masse électrique limite à la fois l'accumulation des SE et les dommages structuraux liés aux fortes doses d'électrons. (C) Pour estimer l'ampleur des dommages structuraux et mesurer la résolution axiale effective des acquisitions SBEM, il faut contrôler la capacité du couteau de diamant à couper l'échantillon tout au long de l'acquisition. Lorsque le couteau progresse d'un pas Δz et passe sur l'échantillon entre deux images, la coupe n'est pas garantie. La soustraction $\Delta I(z)$ de deux images SEM successives $I(z) - I(z+\Delta z)$ permet de contrôler la qualité de la coupe : $\Delta I(z)$ nulle signifie l'échec de la coupe, et $\Delta I(z)$ d'aspect variable au cours de l'acquisition signifie que la qualité de coupe est variable. (D) Série d'images soustraites $\Delta I(z)$ pour deux échantillons préparés et observés dans les mêmes conditions, mais inclus respectivement dans un volume standard et dans un volume minimal de résine epoxy. $\Delta I(z)$ est très hétérogène d'une coupe à l'autre pour l'inclusion à plat standard, et très homogène pour l'inclusion minimale, signe de la bonne préservation de l'état de surface de l'échantillon, et de la constance de l'épaisseur des coupes. Paramètres d'observation : $V = 1.78\text{kV}$, $i = 0.1\text{nA}$, $T_{px} = 500\text{ns}$, $\Delta x_{px} = 2.5\text{nm}$. Toutes les images mesurent $10\mu\text{m} \times 15\mu\text{m}$.



Cadrer l'acquisition SBEM sur les ROIs ciblées nécessite de superposer la carte LM au champ de vue du SEM en utilisant au minimum trois marqueurs DAB comme repères fiduciaires. Si la surface de l'échantillon est parfaitement coplanaire avec le plan de coupe, les marqueurs DAB affleurent dès les premières coupes ultra-fines. En pratique, malgré les précautions de montage (cf. paragraphe 2.5.), il existe le plus souvent un angle entre ces plans (Fig. 34C) et les marqueurs DAB transitoirement au cours de la coupe et il faut noter leurs coordonnées pour déduire la position de la ROI.

Pour réaliser un premier repérage approximatif de la ROI, il est possible de tirer parti de la forme chirale de la coupe, visualisée en SEM, afin de superposer la carte LM acquise juste après la recoupe chirale (Fig. 34D). Ce premier repère permet d'estimer à l'avance les zones où les marques DAB apparaîtront en cours de coupe. Une étape initiale d'abrasion rapide de l'échantillon (*sample polishing*), permet d'éliminer le tissu autour de la ROI pour faire affleurer les premières marques DAB (Fig. 34E1-E2). Aux abords de la ROI, les repères intrinsèques et extrinsèques deviennent visibles en SEM (Fig. 34F1-F2) et permettent de superposer précisément la carte LM au champ de vue du SEM (Fig. 34G).

Figure 34 : Approche ultramicrotomique préalable à la programmation du SBEM

(A) Projection d'images confocales du neurone ciblé. Les positions (x,y) des marqueurs DAB sont pointées en rose
(B) Image de la ROI en lumière transmise. Les marqueurs DAB (points noirs) sont pointés en rose. Les repères intrinsèques (vaisseaux sanguins) qui guideront l'approche ultramicrotomique sont entourés en pointillés violets.
(C) Schéma représentant l'échantillon de tissu tel qu'il se présente à l'ultramicrotome. Au fur et à mesure des coupes (plans bleus), les marqueurs DAB (points noirs) affleurent à la surface de l'échantillon, et peuvent être détectés en SEM. Pour visualiser au moins trois marqueurs DAB, il faut abraser l'échantillon de façon répétée, au risque de sectionner le neurone ciblé (en rouge) avant d'avoir cadré les zones d'acquisition. (D) Superposition de l'image LM de l'échantillon obtenue juste après la coupe chirale, et du champ de vue en SEM, avant l'approche. La forme de la tranche vue en SEM (pointillés jaunes) permet de superposer sommairement les deux images pour guider l'approche ultramicrotomique (E1) Image SEM du premier affleurement de tissu au cours de l'approche. Cette image correspond au coin inférieur gauche de l'image en (D), et se situe relativement loin de la ROI. Pour faire affleurer, et observer, le marquage DAB, on abrase rapidement l'échantillon en séries de 10 coupes de 100nm. (E2) Image SEM de l'échantillon après abrasion de 3 x 10 x 100nm. Les stries affleurant sur la droite du tissu sont provoquées par la coupe vibratome en début de protocole. La ROI est proche ; pour repérer un maximum de marqueurs DAB, on diminue à la fois le pas des coupes (40nm) et l'intervalle entre les observations SEM (F1) Image SEM cadrée sur la ROI. Trois marqueurs DAB (points blancs) sont visibles et pointés en rose. Les repères intrinsèques correspondant à l'image en B sont visibles (pointillés violets) et confirment l'identification de la ROI (F2) Même champ de vue après une série de 12 coupes de 40nm. Quatre marqueurs DAB sont visibles sur l'image, dont les trois points qui repèrent les coordonnées (x,y) du soma ciblé (G) Les repères fiduciaires pointés sur (F1&F2) permettent de superposer précisément la carte LM en (A) sur le champ de vue SEM pour programmer l'acquisition SBEM (rectangles jaunes). Calibrations : (A & B) 10µm (D) 50µm (E-F1-2) 20µm (G) 50µm.

Il est judicieux d'imprimer des marqueurs DAB espacés de plus de 100µm pour augmenter la précision de la superposition LM/EM. Il est aussi pratique d'imprimer un motif de marqueurs DAB très proches pour faciliter l'identification des structures marquées — ici, le soma du neurone ciblé est marqué de trois points aisément identifiables (Fig. 34A,B&F2). Si le tissu est déformé par la préparation d'échantillon, ou monté avec un angle, la carte LM est tournée, dilatée et/ou déformée en conséquence pour s'adapter au champ de vue SEM avant de programmer l'acquisition SBEM.

2.8. Programmation des ROI

Nous cherchons à visualiser l'ultrastructure à haute résolution des dendrites ciblées en LM au sein de l'échantillon. Acquérir l'ultrastructure de toute la tranche produit un volume de données énorme (plusieurs téra-octets par tranche) et requiert un temps d'acquisition prohibitif (plusieurs semaines), sans compter le temps nécessaire pour retrouver les dendrites d'intérêt au sein du volume des données acquises. Nous avons défini une stratégie d'acquisition SBEM parcimonieuse, qui permet de minimiser le temps d'acquisition (trois jours) et le volume de données produites à chaque acquisition (~300 giga-octets par neurone). En détail, nous programmons les champs d'acquisition suivants entre chaque coupe ultramicrotomique :

- un stack à large champ qui procure une vue d'ensemble de la ROI tout au long de l'acquisition (Fig. 35A ; fenêtre rectangulaire ; $\Delta x_{px} = 25\text{nm}$)
- plusieurs fenêtres à haute résolution (Fig. n35A ; fenêtres carrées ; $\Delta x_{px} = 2.5\text{nm}$) centrées sur les structures ciblées afin d'observer leur ultrastructure.

Pour être à même de reconstruire intégralement les segments dendritiques ciblés, nous programmons un petit recouvrement entre les champs d'acquisition à haute résolution. Cependant, les zones de recouvrement sont irradiées deux fois et peuvent présenter des dommages structuraux en conséquence, ce qui incite à limiter la surface de recouvrement des champs d'acquisition.

2.9. Analyse des données SBEM

2.9.1. Retrouver la ROI dans le volume de données acquises

Pour distinguer les dendrites d'intérêt dans l'environnement dense du neuropil, nous retraçons la provenance des dendrites d'intérêt depuis le soma, au sein des images SBEM. La première étape consiste à identifier le soma du neurone électroporé grâce aux marqueurs DAB imprimés dans son soma (Fig. 35C). À partir du soma, il est possible de naviguer dans la pile d'images de champ large pour suivre ses dendrites principales et intermédiaires au sein de la coupe. Les dendrites terminales sont trop fines pour être suivies à cette résolution, mais les images de champ large fournissent les

coordonnées en z des dendrites ciblées pour pouvoir les retrouver au sein des stacks à haute résolution ($\Delta x_{px} = 2.5\text{nm}$; Fig. 35D).

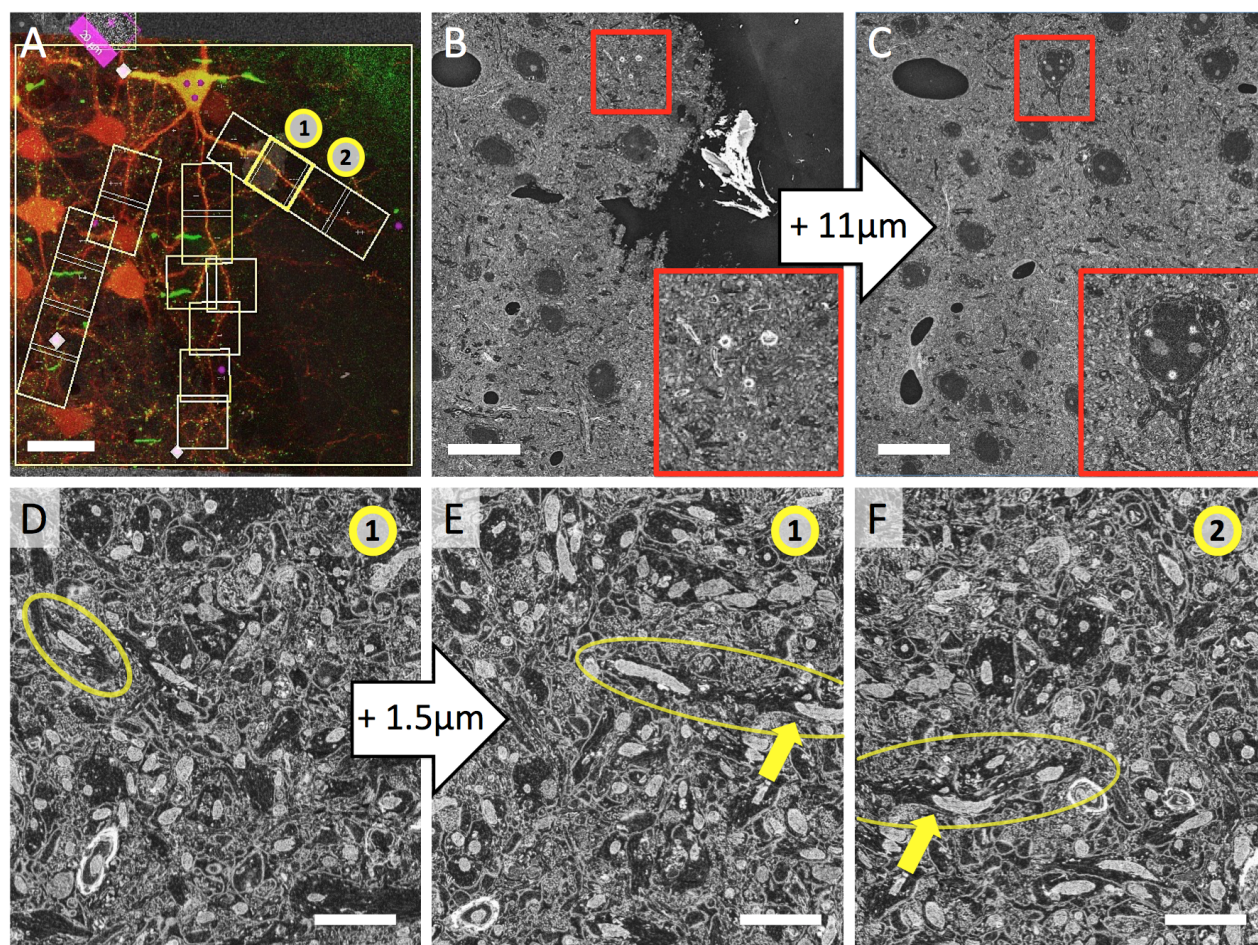


Figure 35 : Programmation SBEM et suivi des dendrites d'intérêt

(A) Superposition de la carte LM et des zones d'acquisition SEM programmées entre chaque coupe. La grande fenêtre rectangulaire représente l'acquisition de champ large, d'une résolution $\Delta x_{px} = 25\text{nm}$. Les fenêtres carrées représentent les acquisitions à haute résolution ($\Delta x_{px} = 2.5\text{nm}$) centrées sur les dendrites d'intérêt, dont les deux zones d'acquisitions marquées "1" et "2" (B) Image SEM cadrée sur la ROI en surface de la coupe. Les trois marqueurs DAB rapprochés indiquent les coordonnées (x,y) du soma du neurone ciblé (C) Image SEM extraite de la pile d'images de champ large, 275 coupes de 40nm après l'image en (B). Le soma du neurone ciblé est identifié par les trois marqueurs DAB imprimés dans son noyau (D) Image SEM extraite de la pile d'images à haute résolution annotée d'un "1" en A. La dendrite d'intérêt est entourée en jaune (E) Image SEM extraite de la même pile d'images, à 37 coupes d'écart. La dendrite ciblée (entourée en jaune) peut être suivie de proche en proche sur chaque image (F) Image SEM extraite de la pile d'images à haute résolution adjacente, annotée d'un "2" en A. L'image se situe à la même profondeur que l'image en (E). Les structures identiques (flèches jaunes en E et F) observées dans la zone de recouvrement entre les champs d'acquisition permettent de suivre les dendrites d'un champ à l'autre. Calibrations : (A,B,C) 20 μm ; (D,E,F) 2 μm .

Résultats

Naviguer au sein des stacks à haute résolution permet de visualiser l'ultrastructure des dendrites les plus fines (Fig. 35E) et le recouvrement des zones d'acquisition permet de passer aisément d'un stack à l'autre (Fig. 35F).

Pour limiter le volume de données à traiter sans risquer de tronquer les épines des dendrites à segmenter, nous extrayons des piles d'images à haute résolution un volume dont les limites se situent environ $3\mu\text{m}$ de chaque côté des dendrites ciblées, en x, en y et en z.

2.9.2. Segmentation et reconstruction 3D

À ce stade du protocole, nous disposons de volumes d'images SEM à analyser. Notre objectif est de mesurer les paramètres morphologiques de la totalité des épines portées par les segments dendritiques ciblés, à savoir :

L'abscisse de l'épine le long de la dendrite par rapport au soma : x_{spine}

Les volumes de la tête et du cou de l'épine : V_{head} et V_{neck}

La surface membranaire de la tête et du cou de l'épine : A_{head} et A_{neck}

La longueur du cou : L_{neck}

Les diamètres optimaux de la tête et du cou : $D_{head,max}$ et $D_{neck,min}$

La présence ou l'absence d'un appareil épineux

Le nombre de contacts synaptiques portés par la tête de l'épine : N_{syn}

L'aire des PSDs des contacts synaptiques : $A_{syn,1}$ et, le cas échéant, $A_{syn,2}$

Quantifier ces paramètres requiert de segmenter toutes les épines portées par la dendrite ciblée, et de les reconstruire en 3D. Nous avons envisagé d'automatiser cette étape. Cependant, d'une part, segmenter une dendrite unique au sein d'un volume d'images d'EM est difficile pour les algorithmes de segmentation automatique actuels sans marquage DAB intégral de la dendrite ciblée (Joesch et al., 2016), et d'autre part, segmenter la totalité du volume acquis pour n'utiliser qu'une petite partie des informations qu'ils comportent serait à la fois chronophage et difficile à mettre en œuvre (Wanner et al., 2015). Puisque seul un petit nombre de dendrites identifiées portent les informations désirées dans nos volumes d'images, nous avons entrepris la segmentation manuelle des ROIs pour extraire les paramètres morphologiques de chaque épine.

Plusieurs logiciels sont adaptés pour réaliser la segmentation 3D, dont le logiciel MIB (*Microscopy Image Browser* ; Belevich et al. 2016) qui permet :

- l'alignement des images par "cross-correlation",
- la segmentation manuelle (au "pinceau") ou semi-automatique (Watershed & *SLIC*) de plusieurs "objets" distincts
- la conversion des images brutes et des modèles segmentés dans des formats compatibles avec le programme IMOD (Kremer, Mastronarde, and McIntosh 1996 ; <http://bio3d.colorado.edu/imod/>) pour réaliser l'analyse morphométrique quantitative (Fig. 36A1).

Le logiciel IMOD permet quant à lui de nombreuses opérations de segmentation, de visualisation, et de quantification sur les modèles 3D (Fig. 36A2).

2.9.3. Mesures morphométriques

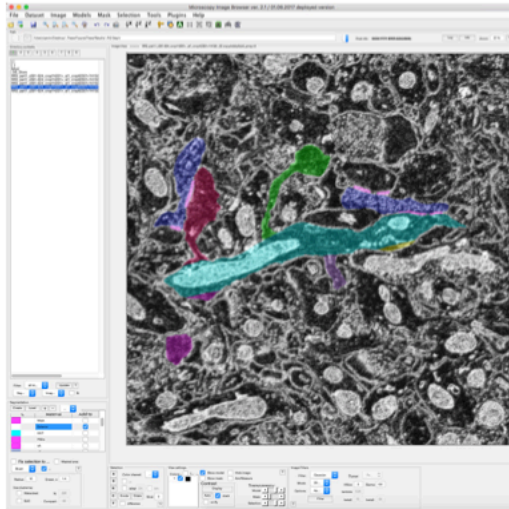
Sous IMOD, nous avons modélisé les troncs et les épines dendritiques comme des surfaces "fermées", qui connectent une série de contours fermés dans des plans consécutifs en z (Fig. 36B&C).

Pour extraire les distances x_{spine} et les longueurs L_{neck} , il est possible de définir en 3D des lignes brisées qui représentent respectivement l'axe du tronc dendritique, et les axes des cous des épines segmentées.

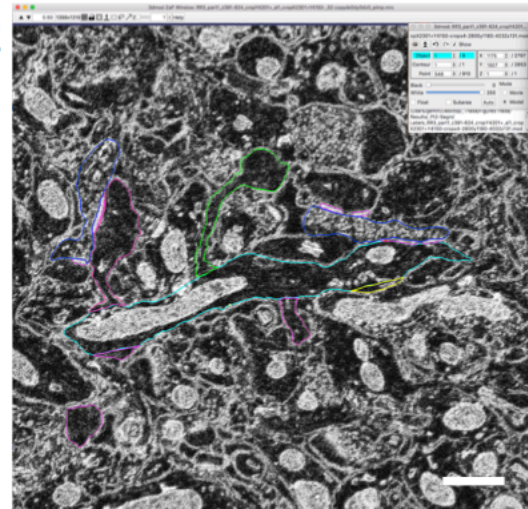
L'axe dendritique passe par les barycentres des sections orthogonales du tronc dendritique, et ses sommets repèrent la base des différentes épines (Fig. 36D ; ligne verte). Pour obtenir la distance de l'épine au soma, on somme les abscisses mesurées au fil des volumes segmentés, et l'on utilise l'acquisition de champ large pour mesurer la distance qui sépare l'épine segmentée la plus proximale à la base de la dendrite principale.

L'axe du cou de chaque épine relie la base du cou à la base de la tête en passant par les barycentres des sections orthogonales du cou (Fig. 36D ; lignes rouges). Pour définir la base de la tête et du cou des épines, nous utilisons des plans virtuels (*clipping planes*) afin de fragmenter le volume de l'épine. Un plan tangent au tronc dendritique définit la base de l'épine, et un plan positionné arbitrairement à la base du renflement qui forme la tête de l'épine définit la séparation entre tête et cou (Fig. 36E). Les volumes fragmentés sont mesurés pour extraire V_{head} et V_{neck} .

A1



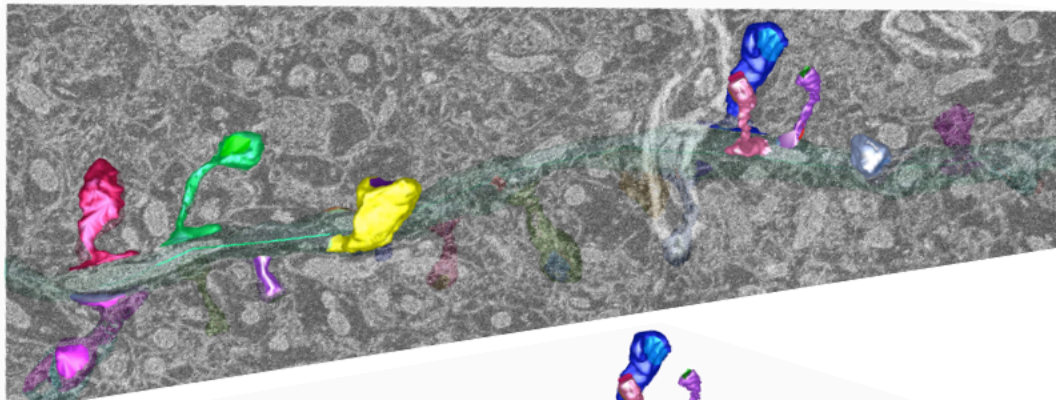
A2



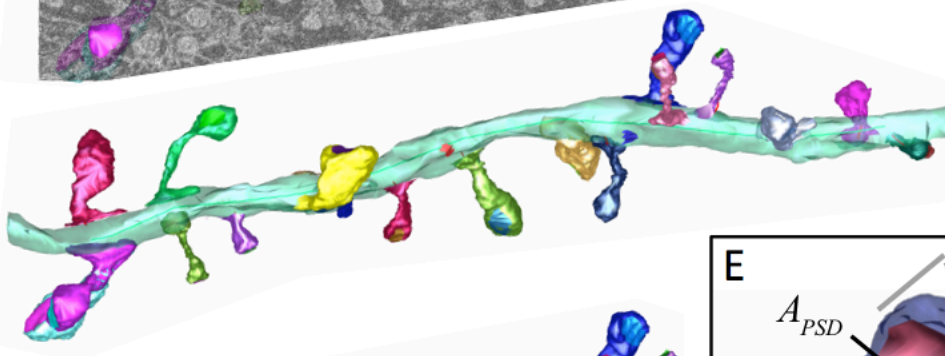
Avec MIB :
Cadrage des volumes analysés
Alignement des images
Segmentation "pinceau"
Conversion des images pour IMOD

Avec IMOD :
Lissage des volumes
Définition de surfaces (A_{PSD}) et de
lignes brisées 3D (L_{neck} , x_{spine})
Modélisation et analyse 3D

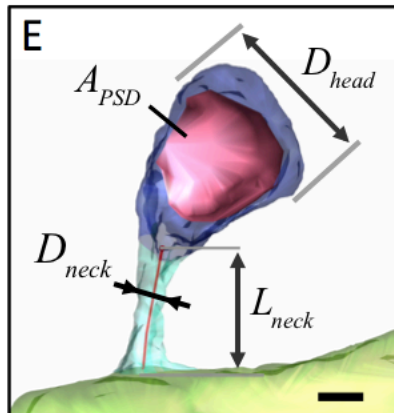
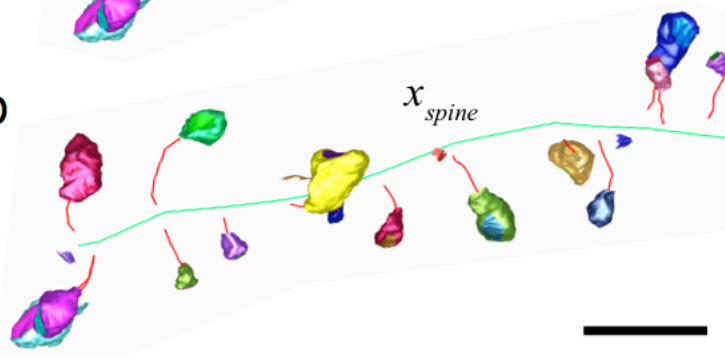
B



C



D



Ensuite, les PSDs sont modélisées comme des surfaces “ouvertes”, qui connectent une série de contours ouverts dans des plans consécutifs en z. Mesurer l’aire de ces surfaces permet d’extraire A_{PSD} pour des PSDs continues ou perforées.

Pour mesurer précisément les diamètres et les résistances électriques des cous et des têtes d’épines (V_{neck} et R_{neck} ; D_{head} et R_{head}), nous avons exporté nos modèles 3D sous le logiciel Blender (www.blender.org) pour une analyse géométrique plus précise. Brièvement, nous avons affiné virtuellement le pas des lignes brisées qui modélisent l’axe de chaque épine, et mesuré l’aire et les diamètres des sections orthogonales des objets 3D segmentés. D’une part, ces mesures nous ont permis de mesurer de façon reproductible le diamètre orthogonal minimal du cou et le diamètre orthogonal maximal de la tête. D’autre part, ces mesures nous ont permis de quantifier l’évolution de la section de chaque objet le long de son axe afin d’estimer la résistance électrique théorique de ces objets, selon :

$R = \rho \int \frac{dl}{A(l)}$, où l est l’abscisse le long de l’axe de l’objet, $A(l)$ est la section de l’objet, et $\rho=250 \Omega.cm$ est la résistivité supposée constante du cytoplasme dans les dendrites étudiées (Miceli et al., 2017). Ces mesures nous ont permis de paramétrer un modèle des signalisations synaptiques dans les dendrites reconstruites.

Figure 36 : Segmentation et reconstruction 3D d’épines

(A) Programmes utilisés pour la segmentation des dendrites d’intérêt dans le volume de 3DEM acquis. (A1) Microscopy Image Browser (MIB) permet de lire des volumes massifs de données (>50Go) pour en extraire les sous-volumes d’intérêt. Les volumes d’images sont alignés par corrélation croisée (cross-correlation). Les éléments d’intérêt sont segmentés manuellement avec l’outil “pinceau” (paintbrush), puis les images et le modèle segmenté sont exportés pour une analyse sous IMOD (A2) IMOD permet de définir des surfaces courbes et des volumes 3D afin de mesurer leurs paramètres morphologiques. IMOD permet également de lisser les objets segmentés pour mieux estimer leur surface. (B) Modèle 3D généré sous IMOD. L’image segmentée en A1-2 est le plan de coupe représenté sur l’image. Les épines sont segmentées individuellement et colorées de manière aléatoire (C) Rendu 3D de la même portion dendritique (D) Rendu 3D après squelettisation (skeletonizing) du tronc dendritique (ligne verte) et des cous d’épines (lignes rouges). Cette étape permet d’extraire la longueur des cous d’épine (L_{neck}) et la position exacte de chaque épine le long de la dendrite (x_{spine}) (E) Rendu 3D d’une épine fragmentée. Les têtes d’épines sont segmentées pour mesurer leur volume V_{head} . Les PSDs sont modélisées comme des surfaces courbes pour mesurer leur aire, A_{PSD} . Les cous et les têtes d’épines sont re-segmentées sous le logiciel Blender (www.blender.org) pour quantifier leurs diamètres D_{head} et D_{neck} . Calibrations : (A1 & A2) $1\mu m$ (B-D) $2\mu m$.

2.10. Modélisation électrochimique à partir des données morphologiques

Pour associer ces mesures morphométriques à un modèle électrophysiologique, j'ai collaboré avec le Dr. Pablo Serna, post-doctorant affilié au laboratoire de Physique de l'Ecole Normale Supérieure. Nous avons mis au point un modèle compartimenté de la signalisation synaptique dans les dendrites étudiées. Plus précisément, nous avons simulé le comportement électrochimique d'un axe épine -> dendrite -> soma, dans un modèle qui tient compte de la morphologie des épines activées (Hines & Carnevale, 2001). Le travail réalisé par le Dr. Serna nous a permis de quantifier la proportion d'épines qui compartimentent effectivement les signaux électriques, et d'aborder l'influence de la morphologie des épines sur l'intégration de signaux excitateurs et inhibiteurs unitaires le long des dendrites étudiées. En première analyse, le rapport des amplitudes entre les potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs (EPSP et IPSP), et le délai entre ces signaux, semblent définir l'influence d'un IPSP sur un EPSP. Nous avons modélisé des situations simples, où une synapse excitatrice positionnée à une abscisse x le long de la dendrite est activée à $t = 0$, et, le cas échéant, une synapse inhibitrice positionnée à une abscisse $x + \Delta x$ est activée à $t = \Delta t$. Ce modèle élémentaire nous a permis d'estimer l'influence d'un IPSP unique sur un EPSP unique, dans des conditions morphologiques proches de l'état natif. Les conclusions tirées de ce modèle sont présentées dans l'épreuve d'article au chapitre suivant.

Chapitre III. Mise en oeuvre :

étude de la signalisation électrique dans des DiS identifiées

Grâce à l'approche de CLEM 3D mise au point pendant la première partie de ma thèse, j'ai réalisé l'analyse morphométrique d'épines identifiées *in vivo*. Ces données inédites permettent d'aborder l'influence de l'ultrastructure des épines sur l'intégration dendritique dans un contexte cellulaire caractérisé. L'article qui rend compte de ces travaux est en cours d'écriture, et je soumettrai ce manuscrit pour publication d'ici la fin de l'année. Le chapitre présent contient un résumé de cet article, et sa version la plus aboutie, en l'état actuel du processus d'écriture. J'accueillerai tous les retours concernant le fond et la forme de ce texte avec l'intérêt le plus vif.

1. Résumé de l'article

1.1. Problématique

Dans le cortex, la majorité des contacts excitateurs se forme sur les épines dendritiques, qui sont des protrusions dendritiques micrométriques spécialisées (Ramon y Cajal, 1899; Hersch & White, 1981; Harris & Weinberg, 2012; Bailey et al., 2015; DeFelipe, 2015). La taille des épines est proportionnelle à la force des synapses qu'elles portent et à la taille de leur PSD (Fifková & Anderson, 1981; Nusser et al., 1997, 1998; Matsuzaki et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Bourne & Harris, 2011; Holderith et al., 2012; Pulido et al., 2015). Le cou de épines impose une barrière de diffusion qui compartimente les composantes biochimique et électrique des signaux synaptiques (Alvarez & Sabatini, 2007; Grunditz et al., 2008; Higley & Sabatini, 2008; Chiu et al., 2013; Yuste, 2013; Tønnesen et al., 2014; Tønnesen & Nägerl, 2016; Adrian et al., 2017; Yasuda, 2017). L'EM a permis de révéler la présence, dans certaines épines, d'un appareil épineux, qui est une spécialisation du réticulum endoplasmique potentiellement impliquée dans la compartimentation des signaux synaptiques (Bourne & Harris, 2008; Korkotian et al., 2014; Segal & Korkotian, 2014; Lagache, Jayant, et al., 2018; Kennedy & Hanus, 2019). L'activité synaptique régule la morphologie et la composition des épines via des mécanismes de plasticité structurale (Matsuzaki et al., 2004; Honkura et al., 2008; Araya et al., 2014), qui jouent un rôle important pour le stockage de l'information dans les circuits neuronaux (Alvarez & Sabatini, 2007; Nabavi et al., 2014; Hayashi-Takagi et al., 2015; Segal, 2017). Ces données suggèrent que la variabilité morphologique des épines est importante pour l'intégration synaptique, mais les modèles actuels de l'intégration dendritique prennent rarement en compte la variabilité morphologique des épines, et ne permettent pas de caractériser son influence sur les processus d'intégration dendritique (Lefort et al., 2009; Avermann et al., 2012; Constantinople & Bruno, 2013; Sarid et al., 2015). Par ailleurs, certaines épines particulières possèdent un contact inhibiteur axo-spinal en plus de leur contact excitateur (Knott et al., 2002; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Kubota et al., 2015; Villa et al., 2016),

lequel provient spécifiquement d'afférences thalamo-corticales (Kubota et al., 2007). La rareté de ces épines doublement innervées (DiS) les rend difficiles à étudier au niveau ultrastructural, alors qu'elles présentent un comportement *in vivo* unique et inexpliqué (Knott et al., 2002; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Villa et al., 2016).

1.2. Méthodologie

Pour quantifier les paramètres anatomiques d'épines dendritiques identifiées en circuits intacts, nous avons développé l'approche de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM) présentée au chapitre II. Nous associons ces mesures à des simulations numériques du comportement électrique des épines dendritiques pour modéliser d'une part l'ampleur de la compartimentation des signaux électriques le long des dendrites étudiées, et d'autre part l'intégration des signaux excitateurs et inhibiteurs (E/I) dans un contexte incluant les DiS.

1.3. Résultats

L'approche CLEM que nous avons développée nous a permis de mesurer des différences morphologiques significatives, d'une part entre les épines simplement et doublement innervées, et d'autre part entre les épines munies ou non d'un appareil épineux (SA), le long des dendrites ciblés. Nous avons estimé la résistance électrique de 375 épines sur la base de leur ultrastructure, et paramétré un modèle théorique avec ces données expérimentales pour quantifier la compartimentation des signaux électriques et calciques dans les épines reconstruites. Nos résultats suggèrent que la majorité des coups d'épines dendritiques atténuent de façon non-négligeable la résultante dendritique des potentiels post-synaptiques excitateurs (EPSPs), à une hauteur de 10 à 80%.

Ensuite, pour comprendre la fonction des contacts inhibiteurs axo-spinaux, nous avons simulé l'interaction de potentiels post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs (EPSPs et IPSPs) unitaires le long de dendrites réalistes, en modulant la position, dendritique ou spinale, des synapses modélisées. Ces simulations nous ont permis de remettre en question l'hypothèse du contrôle binaire exercé par le contact inhibiteur d'une DiS (DiS-iPSD) sur son contact exciteur (DiS-ePSD). Plus précisément, nos données montrent que des IPSPs uniques générés dans les DiS n'atténuent jamais complètement ni la dépolarisation, ni le courant calcique résultant de l'émission d'EPSPs synchrones dans la même DiS. Notre modèle montre aussi que l'efficacité locale d'atténuation des dépolarisations membranaires par les IPSPs est diminuée de moitié pour chaque cou d'épine traversé par l'IPSP, ce qui souligne le degré de compartimentation des IPSPs générés dans les DiS.

Enfin, nous avons étudié l'effet produit sur l'intégration synaptique par le décalage temporel des signaux excitateurs et inhibiteurs. Un décalage d'environ 1-10ms entre l'activation d'une DiS-ePSD, puis de la DiS-iPSD adjacente, résulte en un courant calcique atténué mais une dépolarisation somatique

d'amplitude inchangée. Cet effet de découplage des composantes électriques et calciques des signaux synaptiques à l'échelle de l'épine unique est inédit, et influence potentiellement la plasticité structurale au sein des DiS.

1.4. Discussion

En fin d'article, nous résumons les conclusions principales tirées de nos travaux, puis nous développons plusieurs idées connexes. D'abord, nous précisons l'applicabilité de notre protocole CLEM à la caractérisation ultrastructurale de tous types de dendrites. Ces mesures pourront être associées aux données structurales issues de la connectomique pour d'aborder de façon quantitative le fonctionnement des circuits corticaux.

Ensuite, nous traitons des limites imposées à notre protocole CLEM par la fixation chimique, qui altère l'ultrastructure tissulaire de façon inhomogène (Rostaing et al., 2006; Korogod et al., 2015). Pour quantifier la déformation des épines lors de la fixation chimique, nous avons comparé la distribution des tailles de têtes d'épines et de leurs PSDs dans des tissus fixés soit par perfusion aldéhydrique, soit par congélation haute pression. Ces données confirment l'anisotropie des effets morphologiques de la fixation chimique, puisque les têtes d'épines sont rétrécies, mais pas leurs PSDs. Nous soulignons le besoin de développer des cryo-méthodes adaptées à l'étude en volume des tissus nerveux, afin de s'affranchir des artéfacts de fixation.

En troisième lieu, nous exposons les ordres de grandeur de la compartimentation spatiale des signaux inhibiteurs, obtenus avec notre modèle. Nous comparons l'amplitude et la portée de l'inhibition axo-dendritique et de l'inhibition axo-spinale sur la composante électrique des signaux excitateurs, soit dans le soma, soit dans la tête des épines stimulées. Nous précisons l'influence des différents types d'inhibition sur l'amplitude des influx calciques au sein des têtes d'épines stimulées.

Enfin, nous envisageons l'influence du découplage voltage-calcium dans le contexte des circuits thalamo-corticaux (TC), qui intègrent la quasi-totalité des DiS du cortex (Kubota et al., 2007). Les afférences TC forment des circuits inhibiteurs à propagation avant (*feed-forward inhibition*), dans lesquels une même afférence TC contacte à la fois un interneurone cortical et sa cible (Gabernet et al., 2005). Le délai typique entre les signaux E/I en sortie des circuits de *feed-forward inhibition* est de 1 à 3ms (Sarid et al., 2015), ce qui correspond à la fenêtre temporelle de découplage voltage-calcium dans les DiS. Les afférences TC qui contactent simultanément une DiS et l'interneurone qui innerve cette DiS pourraient ainsi véhiculer des signaux électriques et calciques découplés. Nous proposons ce mécanisme comme explication possible aux comportements dynamiques des DiS observé au cours des expériences de plasticité sensorielle menées par différents groupes (Knott et al., 2002; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Villa et al., 2016). Nos prédictions pourront être confrontées à des données neurophysiologiques provenant d'expériences complémentaires *in vivo*.

2. Conclusion

Ces travaux de morphométrie et de modélisation nous ont permis d'aborder l'interaction de signaux synaptiques excitateurs et inhibiteurs dans des épines identifiées, dont des DiS, au sein de neurones identifiés. Un modèle électrochimique paramétré par ces mesures nous a permis de proposer un mécanisme inédit pour interpréter le comportement des DiS au cours de la plasticité sensorielle.

Nos mesures fournissent des estimations de R_{neck} comprises dans l'intervalle 1-400M Ω , en adéquation avec des mesures réalisées précédemment sur la base de la morphologie ultrastructurale des épines de l'hippocampe (respectivement 1-400M Ω et 1-600M Ω dans Harris & Stevens, 1989 et Tønnesen & Nägerl, 2016). Implémenter ces valeurs dans notre modèle nous permet d'avancer que, le long des dendrites reconstruites, la majorité des épines compartimente effectivement les signaux électriques, à des degrés divers. A fortiori, dans un contexte de plasticité structurale, la variabilité de compartimentation électrique dans les épines influence la probabilité d'émission d'APs et de pics dendritiques au sein de neurones connectés en réseaux. Réaliser un saut d'échelle et modéliser l'évolution, suivant l'activité neuronale, de R_{neck} et de g_{syn} dans des épines distribuées le long d'arborisations dendritiques complètes permettrait d'aborder de façon quantitative les mécanismes de stockage de l'information dans les circuits corticaux (Poirazi & Mel, 2001; Chklovskii et al., 2004; Kastellakis et al., 2015). Cependant, construire un modèle aussi complexe de façon réaliste nécessite de maîtriser un grand nombre de paramètres, comme la distribution subcellulaire des canaux actifs, ou la statistique des paramètres ultrastructuraux des différentes populations d'épines dendritiques. À l'heure actuelle, les modèles de l'intégration dendritique contournent la complexité des épines en calibrant les conductances synaptiques et leurs résistances d'entrée pour reproduire des mesures électrophysiologiques, afin d'explorer le comportement électrique de circuits neuronaux (Poirazi & Mel, 2001; Lefort et al., 2009; Avermann et al., 2012; Constantinople & Bruno, 2013; Markram et al., 2015). De rares modèles simulent le comportement des épines à l'échelle dendritique, soit pour modéliser le comportement biophysique des épines (Koch & Zador, 1993; Gullledge et al., 2012; Araya et al., 2014), soit pour simuler de façon phénoménologique l'influence de la densité d'épines, qui sont modélisées comme des surfaces additionnelles de membrane plasmique (Sarid et al., 2007, 2015). Construire des modèles connectomiques raisonnés, qui tiennent à la fois compte de la connectivité neuronale, de la morphologie dendritique, et de la compartimentation transitoire des signaux synaptiques nécessite d'étendre de quantification ultrastructurale que j'ai entrepris pendant ma thèse à de nombreux types dendritiques identifiés pour paramétrer de façon réaliste des modèles multi-échelle de l'intégration dendritique.

Morphologically constrained modeling of axo-spinous inhibition in the somato-sensory cortex

Olivier Gemin^{1,†}, Pablo Serna^{1,2,†*}, Nora Assendorp¹, Matteo Fossati^{1,3}, Philippe Rostaing¹,
Cécile Charrier^{1,‡*}, Antoine Triller^{1,‡}

¹ Institut de Biologie de l'Ecole normale supérieure (IBENS), Ecole Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL Research University, 75005 Paris, France

² Laboratoire de Physique de l'Ecole Normale Supérieure, ENS Université PSL, CNRS, Sorbonne Université, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France 75005

³ Present address : CNR-Humanitas Research Hospital, Milano, Italy

† : Contributed equally to this work

‡ : Co-senior authors

* : Corresponding authors

Correspondance to : serna@biologie.ens.fr & cecile.charrier@ens.fr

Abstract

Pyramidal neurons receive information *via* thousands of synaptic contacts on dendritic spines that decorate their dendrites. Dendritic spines harbor a great diversity of morphology and molecular composition, which shapes synaptic transmission, signal compartmentalization and neuronal function. It is therefore critical to have a precise description of spine ultrastructure along identified dendrites from specific subtypes of neurons when modeling synaptic integration. Here, we developed a 3D correlative light-electron microscopy (3D-CLEM) approach to quantify spine morphometry along the basal dendrites of layer 2/3 pyramidal neurons within intact circuits of the somatosensory cortex. About 52% of spines contained a spine apparatus and 9% of spines also received direct synaptic inhibition, corresponding to 36% of inhibitory synaptic contacts along these dendrites. We used the data to constrain a model of synaptic signaling, address the functional consequences of spine heterogeneity and understand the impact of local inhibition in spines versus dendritic inhibition. Our results suggest that compartmentalization is very variable among cortical spines and that axo-spinous inhibition can decouple voltage and calcium signaling in dually-innervated spines, potentially affecting synaptic plasticity.

Introduction

In the mammalian cortex, the dendrites of pyramidal neurons are covered with dendritic spines, which are small membrane protrusions that receive the vast majority of excitatory synaptic inputs (Ramon y Cajal, 1899; Hersch & White, 1981; Bailey et al., 2015; DeFelipe, 2015). Dendritic spines are composed of a bulbous head, whose volume typically varies between 0.01 and 1.5 μm^3 , connected to the dendritic shaft by a narrow neck (Harris & Weinberg, 2012). Neck length varies between 0.5 μm and 3 μm , and minimal neck diameter varies between 20 and 500nm (Bailey et al., 2015; Stuart et al., 2016). The head typically harbors one excitatory post-synaptic density (PSD) that contains neurotransmitter receptors, scaffolding proteins, and a complex machinery of proteins undertaking the transduction of synaptic signals. The size of the spine head correlates with the size of the PSD (Fifková & Anderson, 1981; Bourne & Harris, 2011) and the strength of synaptic transmission (Nusser et al., 1997, 1998; Matsuzaki et al., 2004; Tanaka et al., 2005; Holderith et al., 2012; Pulido et al., 2015). Spines can also contain polyribosomes that mediate local protein synthesis, and endosomal compartments, involved in local recycling of receptors, and membrane management during development and structural plasticity (Bailey et al., 2015; Chirillo et al., 2019). The neck isolates the spine head from its parent dendrite by acting as a diffusional barrier (Alvarez & Sabatini, 2007; Higley & Sabatini, 2008; Chiu et al., 2013; Tønnesen et al., 2014; Tønnesen & Nägerl, 2016; Adrian et al., 2017; Yasuda, 2017) and by filtering electrical signals (Grunditz et al., 2008; Yuste, 2013; Tønnesen & Nägerl, 2016 but see Svoboda et al., 1996; Takasaki & Sabatini, 2014; Popovic et al., 2015). In a subset of spines, the neck also contains a specialized form of smooth endoplasmic reticulum, the spine apparatus (SA), which contributes to calcium signaling and affects synaptic compartmentalization (Bourne & Harris, 2008; Korkotian et al., 2014; Segal & Korkotian, 2014; Lagache, Jayant, et al., 2018; Chirillo et al., 2019; Kennedy & Hanus, 2019). Dendritic spines exist in a variety of sizes and shapes (Arellano, 2007; Harris & Weinberg, 2012), and both the spine head and the spine neck are remodelled depending on neuronal activity (Matsuzaki et al., 2004; Honkura et al., 2008; Araya et al., 2014). The structural plasticity of dendritic spines is considered to be important for the storage of information in neuronal circuits and for memory formation (Alvarez & Sabatini, 2007; Nabavi et al., 2014; Hayashi-Takagi et al., 2015; Segal, 2017). However, how the diversity of spine morphology influences synaptic signals is less clear and this diversity is rarely taken into account when modelling dendritic integration (Sarid et al., 2015).

While dendritic spines are mostly studied as the postsynaptic compartment of excitatory synapses, some spines also harbor an inhibitory PSD (iPSD) in addition to their excitatory PSD (ePSD). These spines are specifically contacted by thalamocortical, VGLUT2-positive, excitatory inputs and are

referred to as dually-innervated spines, and are very sensitive to sensory experiences (DiS ; Knott et al., 2002; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Kubota et al., 2015; Villa et al., 2016). While DiS represent only 1-10% of spines in the cortex, they receive about 25-30% of all inhibitory contacts on the apical/basal dendrites of upper layer cortical pyramidal neurons (PNs) . *In vivo*, whereas the spine structure and ePSDs are stable over weeks, iPSDs on DiS exhibit daily turnover (Villa et al., 2016). Their number is regulated by sensory experience, being increased in response to stimulation, or decreased in response to deprivation (Knott et al., 2002; Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Villa et al., 2016), suggesting their importance in synaptic integration and sensory processing. Uncaging experiments have shown that inhibitory contacts on DiS can directly shunt local excitation (Chiu et al., 2013). However, it is still unclear whether the function of axo-spinous inhibition is to veto excitatory post-synaptic potentials (EPSPs) at the single spine level (Kubota et al., 2015), or if it has a more subtle effect on the compartmentalization of postsynaptic signaling within individual spines (Higley, 2014).

Here, we have developed a correlative light-electron microscopy (CLEM) workflow combining confocal light microscopy (LM) with serial block-face scanning EM (SBF-SEM) in order to reconstruct dendritic segments from identified neurons, and quantify the ultrastructure of specific populations of dendritic spines in intact cortical circuits. We focused on dendritic spines in the basal dendrites of PN in layers 2/3 of the somatosensory cortex (SSC) of adult mice. We quantify spine shape variability and report important structural differences, both between singly- and dually-innervated spines (SiS and DiS), and between spines harboring one or no SA. Using 3D-EM reconstructions, we estimate the resistance of the neck of dendritic spines (R_{neck}) depending on their ultrastructure. We used R_{neck} estimations and our morphological measurements to constrain a multi-compartment Hodgkin-Huxley model of synaptic signaling. We first simulated the depolarization time-course of modeled compartments (spine heads, dendritic shaft sections, and soma) when eliciting an EPSP at any excitatory synapse, and estimated that intrinsic EPSP attenuation by the spine neck ranges from 10 to 80% in 90% of modeled spines. Then, to understand voltage and calcium compartmentalization in SiS and DiS, we simulated calcium influx in spine heads using Goldman–Hodgkin–Katz equations to model active calcium conductances, enabling us to investigate the effects of individual IPSPs on individual EPSPs, depending on iPSD location (i.e. on the spine head or on the dendritic shaft), and respective input timing. Our results challenge the view that axo-spinous IPSPs strictly veto EPSPs, and propose that timed inhibition can de-couple voltage and calcium signaling at the single spine level, with possible consequences on structural plasticity within thalamocortical microcircuits.

Results

Combining light & electron microscopy to describe the ultrastructure of identified dendritic spines

Dendritic spines have different morphologies (Stuart & Spruston, 2015) depending on brain area and cell type (Katz et al., 2009; Harris & Weinberg, 2012; Bosch et al., 2015). They are also differently regulated depending on their location within dendritic trees — e.g. basal or apical dendrites (Globus et al., 1973; Feldmeyer et al., 2006; Bian et al., 2015; Rajkovich et al., 2017). Therefore, it is critical to take into account the cellular and subcellular context to understand how spine ultrastructure impacts synaptic function. We developed a 3D correlative light-electron microscopy (CLEM) workflow allowing ultrastructural characterization of specific populations of dendritic spines in intact cortical circuits. Several correlative approaches (De Boer et al., 2015; Loussert Fonta & Humbel, 2015; Begemann & Galic, 2016; Karreman, Hyenne, et al., 2016; Müller-Reichert & Verkade, 2017) have previously been used to image, with EM, genetically identified dendrites characterize specific features of targeted dendrites in genetically identified neurons labeled selectively with diaminobenzidine (DAB) (Knott et al., 2006, 2009; Nägerl et al., 2007; Chen et al., 2012; Bosch et al., 2015; Joesch et al., 2016). However, DAB oxidation damages ultrastructure, and osmiated DAB obscures synapses and subcellular organelles (Meißlitzer-Ruppitsch et al., 2009). CLEM, or “retrospective EM”, has also been performed using only intrinsic landmarks within the tissue (Luckner et al., 2018; Maclachlan et al., 2018), but this minimalist approach is time-consuming and provides low throughput. Alternatively, an infra-red laser has been used to imprint correlative landmarks in the tissue and make ROI relocation in EM easier (NIRB for Near InfraRed Branding ; Bishop et al., 2011; Maco et al., 2013; Cane et al., 2014; Blazquez-Llorca et al., 2015; Lees et al., 2017). However, NIRB scars can also damage the ultrastructure (Luckner et al., 2018) and they can be difficult to detect as they do not readily produce positive, contrasted signals in EM (Karreman, Hyenne, et al., 2016; Lees et al., 2017). Moreover, few confocal imaging setups are equipped with infra-red lasers. Hence, to facilitate ultrastructural measurements in non-obscured, identified dendrites, we developed a CLEM workflow featuring a novel strategy for ROI relocation based on patterned photo-oxydation of DAB landmarks using a standard scanning UV laser.

In order to label specific subtypes of neurons, we used cortex-directed in utero electroporation (IUE) in mice. Neuronal progenitors generating layer 2/3 cortical pyramidal neurons were electroporated at embryonic day E15.5 with a plasmid expressing the cytosolic fluorescent filler

TdTomato to visualize neuronal morphology and dendritic spines (Fossati et al., 2016). Three months after IUE, when mice had reached adulthood, they were perfused with aldehyde fixatives and 30- μ m-thick vibratome sections of the electroporated brain regions were collected. To facilitate sample handling between LM imaging, region of interest (ROI) landmarking and sample preparation for EM, we built custom-made chambers allowing both confocal imaging while immersing the sections sequentially in saline then DAB monomer solution, and sample recovery. 10-20 mm² fragments of brain sections were positioned into the chamber (Suppl. Fig.), and images of the basal dendrites of bright electroporated neurons were acquired with confocal microscopy (Fig. 1A). To introduce correlative landmarks, we took advantage of the photo-oxidability of diaminobenzidine (DAB) to generate 3D patterns of DAB puncta with micrometer precision around the neuron and dendrites of interest (Fig. 1A). In detail, we found that applying focalized UV light to a sample tissue section immersed in a DAB solution enables DAB performing photo-oxidation at user-defined locations to generate dark osmiophilic precipitates of user-defined size, with micrometer precision (Fig. 1B). The fragments of brain sections were then processed for serial block-face SEM (SBF-SEM) following Deerinck's OTO protocol (Deerinck et al., 2010), and embedded in minimal amounts of epoxy resin to enhance sample conductivity and SEM image quality. As DAB precipitates provided high contrast in SBF-SEM (Fig. 1-C1), we used these extrinsic fiducial landmarks, as well as intrinsic landmarks such as blood vessels (Fig. 1B & 1-C1), to recover ROIs within the complex environment of brain tissues in 3D-EM stacks (Fig. 1-C2&C3). After manual segmentation and reconstruction (Fig. 1-1D) of basal dendrites imaged in LM previously, whole portions of dendrites were relocated in LM and EM, and each dendritic spine was identified unequivocally, using neighboring spines as dependable topographic landmarks. (Fig. 1-D2 and 1-D3). At this step, we noticed that CLEM-based 3D-reconstruction yielded more accurate measurements of the density of dendritic spines than monomodal quantifications. On the one hand, the limited axial resolution of LM prevents the identification of axially oriented spines, while they are easily detected in 3D-EM. On the other hand, spines with the longest and thinnest necks are conspicuous in LM stacks, but they are difficult to find in 3D-EM datasets without the cues provided by LM (see examples on figure 1-D3). The proportion of spines recovered with CLEM versus LM alone could amount to up to 30% depending on the ROI, and 5% in EM alone. As a result, our CLEM workflow enabled the characterization of the ultrastructure of every single spine in reconstructed portions of dendrites, and provided access to morphological diversity within identified spine populations.

Spine ultrastructure along basal dendrites of L2/3 PNs in the SSC of adult mice

We used our CLEM workflow to measure both the density and the ultrastructural features of dendritic spines on basal dendrites of L2/3 PNs in the SSC of adult mice. We exhaustively segmented 230µm of basal dendrites in the dendritic arbors of four different neurons, from three different adult mice to reconstruct a total of 375 individual spines. Spine distance to the soma spanned from 20 to 140µm in this dataset. As the longest basal dendrites we observed were ~150µm-long, in line with previous reports (Ballesteros-Yáñez et al., 2006; Chen et al., 2012; Kubota et al., 2015; Sarid et al., 2015; Fossati et al., 2016), we considered that our dataset sampled the whole spine population on these dendrites. The average linear density of dendritic spines was 1.6 ± 0.1 spines.µm⁻¹, in line with LM measurements performed on basal dendrites of L2/3 PNs in the cortex of 2-months-old C57BL/6 mice (Ballesteros-Yáñez et al., 2006). We then quantified the following shape parameters for each spine: neck length, neck diameter, head volume, head longitudinal diameter (referred to as “head length”), head orthogonal diameter (referred to as “head diameter”), number of PSDs, and PSD area (Fig. 2A). SEM images enabled the distinction of dendritic spines contacted by one or two distinct presynaptic boutons (referred to as single innervated spines or SiS and dually-innervated spines or DiS, respectively) as exemplified in Fig. 2B1 and 2B2. DiS represented $9.1\% \pm 0.1\%$ of all spines in these dendrites (Fig. 2C). SiS and DiS had similar neck length and diameter (Suppl.). However, the head of DiS was larger than in SiS (Fig. 2D), consistently with previous reports (Kubota et al., 2007). Across the whole population, we found no correlation between the position of the spine, or the inter-spine distance, and any of the morphological parameters we measured (Suppl. Fig. “No correlation”. & “parameter distributions”), in line with previous ultrastructural studies (Arellano, 2007). We also found that there was no correlation between the length or the diameter of the neck and the morphometry of the spine head or PSD, which is consistent with reports from EM studies of both basal and apical dendrites of PNs in cortical L2/3 (Ballesteros-Yáñez et al., 2006; Arellano, 2007, but see Noguchi et al., 2005) for different conclusion in other brain areas). By contrast, we observed three main relationships between spine morphological parameters. First, we observed a correlation between the length of the spine neck and its diameter, in both SiS and DiS populations (Fig. 2E), although short necks could still be thin. Second, we found that, in spines with long necks, spine heads were always stretched longitudinally with respect to the neck (i.e. prolate) whereas they could also be stretched orthogonally (i.e. oblate) in shorter spines (Fig. 2F). In the context of femto-liter sized spine heads, where ion concentrations have been hypothesized to vary across spines depending on transmembrane ionic currents, these morphological features could reflect the dynamic response of

highly compartmentalized, long-necked spines to strong electric field gradients, and hint at the link between spine morphology and nanoscale electrical properties (Lagache et al., 2019). Third, PSD areas correlated linearly with spine head volume (Fig. 2G), in agreement with previous results obtained in both basal and apical dendrites in mouse cortical and hippocampal neurons (Matsuzaki et al., 2001; Knott et al., 2006; Arellano, 2007; Bourne & Harris, 2011; Noguchi et al., 2011; Bell et al., 2014). In DiS, only the size of largest PSD was correlated with the volume of the head (Suppl. Figure A2=f(Vh) non-linear).

Excitatory and inhibitory synapses in dually-innervated spines (DiS)

To further characterize the excitatory or inhibitory nature of the two PSDs in DiS, we co-expressed tdTomato with *small amounts of GFP-tagged version of gephyrin (GFP-GPHN)*, a core component of inhibitory postsynaptic scaffolds (Tyagarajan & Fritschy, 2014; Krueger-Burg et al., 2017). *This approach enables the identification inhibitory PSDs (iPSDs) in CLEM (Fig. 3A), without affecting synaptic maturation nor inhibitory neurotransmission* (Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012; Fossati et al., 2016). We measured, in CLEM, an average density of 4.1 ± 0.4 inhibitory synapses per 10 μm of basal dendrite in L2/3 PNs in the SSC of adult mice. In detail, 2.7 ± 0.3 inhibitory synapses per 10 μm were located on the dendritic shaft and 1.5 ± 0.3 per 10 μm of dendrite on spines, indicating that $\sim 35\%$ of inhibitory contacts occur in spines in these dendrites, which is in the range or slightly higher than previously estimated with LM (Chen et al., 2012; Iascone et al., 2018). Spines harboring a gephyrin cluster in LM were identified as putative DiS (Fig. 3B) and dual-innervation was subsequently ascertained in EM after linking spine identity between LM and SBF-SEM acquisitions. To do so, we orientated 3D-reconstructed portions of dendrites according to LM images (Fig. 3C), then matched individual spines in both modalities (lettered in Fig. 3B and 3C) and identified iPSDs on reconstructed DiS based on GFP-GPHN cluster position in LM images (asterisk label on Fig. 3B and 3C). DiS contained a second PSD that most often correlated with an absence of GFP-GPHN in LM, suggesting its excitatory nature. However, E/I identification was ambiguous in 12% cases (4/34 DiS) due to the coarse axial resolution of LM imaging. To solve these ambiguities, we reconstructed the two axons innervating the DiS, and determined their functional type based on their other targets in the neuropil. As the vast majority of excitatory axons avoid forming contacts on the dendritic shaft of cortical PNs whereas inhibitory axons can contact somas, dendritic shafts and dendritic spines (Hersch & White, 1981; Isaacson & Scanziani, 2011; Boivin & Nedivi, 2018), locating an axo-somatic or an axo-dendritic synapse along a DiS-contacting axon demonstrated that it was inhibitory (Fig. 3D). As a result, we could unequivocally determine the E/I type of each synaptic contact on targeted neurons within our $\sim 10^3 \mu\text{m}^3$ 3D-EM acquisition volume. Remarkably,

we found that 100% DiS identified in EM exhibited a GFP-GPHN cluster in LM. Conversely, 92% (34/37) spines exhibiting a GFP-GPHN cluster in LM were dually innervated, which strongly supports that all DiS in the cortex are contacted by both an excitatory and an inhibitory axon (Kubota et al., 2007; van Versendaal et al., 2012; Higley, 2014).

We further investigated the ultrastructure of DiS. We observed that the iPSDs of DiS were always smaller than the ePSDs (DiS-iPSD area is $53\% \pm 16\%$ of ePSD area of the same DiS; Fig. 3E). They were also smaller than iPSDs on dendritic shaft (DiS-iPSD area is 55% of shaft iPSD on shaft, in average; Fig. 3F). Furthermore, ePSDs on DiS were larger than ePSDs on SiS (DiS-ePSD area is 174% of SiS-ePSD, in average; Fig. 3F), with DiS and SiS of comparable head volume exhibiting comparable ratios between ePSD and head membrane areas (Suppl. Figure bigSiS vs DiS). These results are compatible with the recent observation that DiS contain more stable ePSD than SiS and that their iPSD is more labile than iPSDs along dendritic shaft (Villa et al., 2016).

Abundance of spine apparatus in cortical spines

The spine apparatus (SA) is a complex stacked-membrane specialization of the smooth endoplasmic reticulum (SER) which is enriched in large spines (Bailey et al., 2015), and that is implicated in calcium regulation (Korkotian et al., 2014) and local secretory trafficking (Kennedy & Hanus, 2019). As targeted spines were not obscured with osmiated compounds in our protocol, we quantified the presence or absence of SA in spines (Fig. 4A). We observed that SA-containing (SA+) spines were distributed randomly along the dendrites, and amounted to 52% of all spines (Fig. 4B), which is substantially higher than previous reports in the mature hippocampus (less than 10% of spines in the CA1 region *in vivo*; Chirillo et al., 2019). SER was often detected at the stem of SA-free spines (25%; Fig 4B), but these spines did not differ in their morphology from other SA-free spines. (Fig. Suppl. "Stem ER"). We computed the probability of containing a SA, $p(\text{SA}+)$, depending on spine head volume (Fig. 4C) and observed that $p(\text{SA}+)$ was non-linearly correlated to spine head volume. We found that $p(\text{SA}+)$ could be precisely fit by a sigmoid model :

$$p(\text{SA}+)_{fit} = 1 - (1 + e^{\frac{V_{head} - V_{1/2}}{V_0}})^{-1} \text{ with } V_{1/2} = 0.063\mu\text{m}^3 \text{ and } V_0 = 0.02\mu\text{m}^3.$$

$p(\text{SA}+)$ saturated at 100% above $V_{head} > 0.15\mu\text{m}^3$, as all of the largest spines contained a SA. Besides, 81,3% DiS contained a SA, compared to only 51% SA+ SiS (Fig. 4D). We observed that SA+ spines had larger heads (Fig. 4E), larger ePSDs (Fig. 4F) and larger necks than SA-free spines (Fig. 4G), consistent with previous morphological studies of CA1 PNs (Spacek & Harris, 1997; Bailey et al., 2015; Chirillo et al., 2019). As SA is often considered an electrically insulating organelle plugging the spine neck and influencing the electrical resistance of the neck (R_{neck}) (Bourne & Harris, 2008; Lagache, Jayant, et al.,

2018; Kennedy & Hanus, 2019), we estimated R_{neck} based on spine morphology to study how R_{neck} variability compared to the presence or absence of SA. To compute R_{neck} in SA- spines, we sampled the orthogonal cross-section of the neck, $A(l)$, at the abscissa l along the principal axis of the neck, with 100 values of l spanning from the base of the neck to the base of the spine head. We then integrated $R_{neck} = \rho \int \frac{dl}{A(l)}$, where ρ is the cytosolic resistivity, along the length of the neck, and we refer to this value as the “geometrical resistance” of the neck. To estimate R_{neck} for SA+ spines, we considered SA insulating, and subtracted SA cross-section from $A(l)$ before computing R_{neck} . This analysis does not take into account possible capacitive and dynamic effects of the SA, as we could not access them. Using this morphometry-based approach to estimate R_{neck} , we found neck resistances ranging from 1 to 400M Ω , with median values of 96M Ω for SA- spines, 43M Ω for SA+ spines and 62M Ω overall (Fig. 4H). Our estimates are in line with comparable computations: EM-based reconstructions yielded R_{neck} values between 1-400M Ω (Harris & Stevens, 1989), and reconstructions performed using super-resolutive STED microscopy yielded R_{neck} values between 1-600M Ω and centered around 56M Ω (Tønnesen & Nägerl, 2016). Interestingly, even after correcting R_{neck} estimation for SA volume, SA+ spines still exhibited lower neck resistance than other spines. This result suggests that spine electrical compartmentalization is comparatively lower in SA+ than in SA- spines, implicating higher spine-shaft and spine-soma coupling, and lower input impedance, therefore lower spine head depolarization in SA+ spines electrical stimulation. These properties suggest that highly labile SER could modulate R_{neck} *in vivo* and participate actively in dendritic integration by forming SA transiently in subsets of spines (Holbro et al., 2009; Ng et al., 2014; Chirillo et al., 2019; Kennedy & Hanus, 2019).

Morphologically constrained model of synaptic signaling

To assess the functional implications of spine diversity in identified dendrites, we used a computational approach based on a multi-compartment model of the neuronal membrane (Rall 1959, Gullledge2012). We focused our model on spines and synaptic inputs to evaluate local interactions of synaptic signals on their way to the soma. To that end, we used the NEURON framework (Carnevale & Hines, 2006) to build a “ball-and-stick” model of a pyramidal neuron, with an isopotential soma harboring two dendritic compartments, that represent respectively the spiny dendrite in which we modeled synaptic signaling, and the remainder of the dendritic tree. The model is structured as an equivalent electrical circuit comprising unitary compartments that feature parallel RC circuits and optional conductances, including excitatory and inhibitory synapses (Fig. 5-A1). It enables simulating the electrical and diffusional forces that drive ion flows through

transmembrane pumps and pores (Dayan & Abbott, 2001; Stuart et al., 2016). We employed it to simulate synaptic signaling in spines and their parent dendrite, under the constraint of experimentally measured morphological parameters.

Excitatory and inhibitory post-synaptic potentials (EPSPs and IPSPs) were modeled as conductances varying as bi-exponential functions of time with kinetics tuned to different receptor types: AMPA and NMDA receptors at ePSDs, and GABA_A receptors at iPSDs (Fig. 5A2, magenta and green curves, respectively; see Methods). All synaptic conductances were scaled proportionally to PSD areas (Nusser et al., 1997, 1998; Matsuzaki et al., 2001, 2004; Noguchi et al., 2011). Active calcium channels in dendritic spine heads using Goldman-Hodgkin-Katz equations (Dayan & Abbott, 2001). As we focused the interaction of single EPSPs with single IPSPs, probability of eliciting dendritic spikes is negligible (Hausser et al., 2000; Stuart & Spruston, 2015), so we did not include spike-inducing voltage-gated channels in the dendritic shaft.

Before constraining morphological parameters of the model, the CLEM data was corrected for the mechanical deformations induced by chemical fixation, as it reportedly causes membranous structures to shrink (Korogod et al., 2015). To estimate tissue shrinkage coefficients, we used TEM to compare spine ultrastructure in adult L2/3 SSC sections that were either chemically fixed with aldehydes, or vitrified with high-pressure freezing (Fig. Suppl-Shrinkage-A1-2; see Suppl. Methods). Spine head cross-section areas were 36% smaller in chemically fixed tissue compared to vitrified tissue, implying spine head volume shrinkage of 49% in average upon chemical fixation (Fig. Suppl-Shrinkage-C). The length of sectioned PSDs was measured on the same images (Fig. Suppl-Shrinkage-E) but displayed no change in size, suggesting that PSDs were not significantly deformed by chemical fixation, whereas the surrounding membrane substantially shrank. Single-section TEM was not suited to quantify spine neck shrinkage, but we reasoned that as spine necks are packed with rigid bundles of linear and circular F-actin (Bär et al., 2016; Miermans et al., 2017), they should be minimally sensitive to mechanical shrinkage. As for dendrites, we considered that their volume was reduced by 25%, as reported by Korogod and colleagues (Korogod et al., 2015), and corrected our measurements accordingly before constraining the model.

The remaining free parameters of the model were set in two steps. First, channel kinetics and biophysical parameters were extracted from selected literature (see Methods). Then, we simulated a glutamate release in each modeled spine, and scaled the membrane time constant, and the average amplitude of both synaptic currents and somatic depolarizations to fit published electrophysiological measurements (Feldmeyer et al., 2006; Frick et al., 2008; Lefort et al., 2009; Scala et al., 2018 ; procedure details in Methods). To validate our simulations, we first assessed whether EPSP attenuation along dendrites conformed to electrophysiological measurements by simulating EPSPs in each spine, and monitoring voltage transients in three different compartments:

excited spine head, dendritic shaft and soma (Fig. 5B; blue, orange and green curves respectively). Average depolarization amplitude was attenuated 1.5 times between the dendritic shaft and the head of the excited spine (Fig. 5B, orange curves), which compares to ratiometric measurements performed by Popovic and colleagues in basal dendrites of L5 cortical PNs using voltage dyes and glutamate uncaging (Popovic et al., 2015). 10-fold attenuation between spine head and soma (Fig. 5B, green curves) compared to previous measurements carried out in basal dendrites of L5 cortical PNs (Acker et al., 2016), and other systems (Williams & Stuart, 2002, 2003; Nevian et al., 2007; Larkum, 2009). Then, we verified that excitatory synaptic currents in DiS were comparable to experimental values for thalamo-cortical excitatory inputs (Hull et al., 2009; Ji et al., 2016 ; suppl. mat.). We concluded that our model could reliably predict the propagation of postsynaptic potentials, and went on to characterize the functional impact of spine shape variability.

First of all, spine diversity was reflected in the high variability of simulated EPSP time-courses, as the standard deviation of modeled EPSPs across different spine morphologies equaled their mean (shaded areas in Fig. 5B). Notably, depolarization transients elicited in DiS lay in the higher quartile of the EPSP distribution (dashed red line in Fig. 5B), reflecting the greater synaptic weight of DiS ePSDs over SiS ePSDs. Then, we used a general linear model (GLM; Pedregosa et al., 2011) to quantify the contribution of each morphological parameter in shaping depolarization amplitude. We observed that ePSD area accounted for 80% of the variance of the depolarization amplitude ΔV_{max} in the spine head, and 90% of ΔV_{max} in the dendrite and soma, in line with the linear correlation of ΔV_{max} with ePSD area all along the dendrite (Fig. 5C). The dendritic impedance (Z_{dend}) contributed to 54% of the remaining variance of ΔV_{max} in the soma once ePSD area contribution was removed, and the contribution of R_{neck} was negligible, indicating that R_{neck} might play a minimal role in setting the amplitude of the somatic depolarization. By contrast, R_{neck} accounted for 44% of the variance of ΔV_{max} in the spine head once ePSD area contribution was removed, and R_{neck} was the prominent factor driving EPSP attenuation between spine head and dendritic shaft, accounting for 30% of the variance of the ratio $\frac{\Delta V_{max,shaft}}{\Delta V_{max,spine}}$ (Fig. 5D). Quantitatively, 90% of spine necks attenuated spine voltage non-negligibly between spine head and shaft, with attenuation values centered on 28%, an interquartile range of [19%; 61%] and a maximum attenuation of 80%. These results suggest that most spine necks constitutively compartmentalize electrical signals in the head of spines.

We then estimated the elevation of calcium ion concentration, $[Ca^{2+}]$ within the excited spine head over time, as a result of both NMDA receptors (NMDAR) and voltage-dependent calcium channels (VDCC) responding to the EPSP (see Methods). ePSD area accounted for 72% of the variance of amplitude of evoked calcium transients $[Ca^{2+}]_{max}$, in line with their linear correlation (Fig. 5E).

Interestingly, calcium transients showed similar amplitudes in both SiS and DiS, indicating that the larger head volume of DiS might compensate their larger calcium conductance.

To address the spatial organization of excitatory synaptic strength along PN basal dendrites, we plotted the amplitude of somatic depolarizations following stimulation of in SiS or DiS ePSDs (Fig. 5F, blue and red dots respectively), as a function of the distance between soma and spine but these variables were not correlated. We performed similar computations with the iPSDs in our dataset while setting chloride reversal potential to 0mV, in order to quantify inhibitory synaptic strength with depolarizing IPSPs. Resulting depolarization amplitudes were also independent of iPSD distance to the soma, whether stimulating iPSDs on shafts or spines (Fig. 5G, green and red dots respectively). These results suggest that subcellular organization of synaptic strength along PN basal dendrites is dominated by morphology-based variability of EPSP and IPSP amplitude.

Spatial interplay of excitatory and inhibitory signals

In live conditions, spatio-temporally distributed EPSPs and IPSPs sum non-linearly on complex dendritic arbors to adjust local membrane potential within milliseconds between hyperpolarized, resting or depolarized states (Higley & Contreras, 2006). To understand how dendritic ultrastructure, spine diversity and iPSD location on spine or shaft shape dendritic integration, we studied the elementary event consisting of one EPSP interacting with one IPSP in morphologically accurate model dendrites.

Importantly, assessing the extent to which spine heterogeneity impacted PSP interaction required running our model in a large number of instances ($N \geq 1000$), using realistic morphological parameters in each individual case. To do so, we used a bootstrapping technique (Efron & Tibshirani, 1994) to resample our dataset of 375 reconstructed spines, and extended it to a virtually infinite number of morphologically comparable spines. We included small ($< 10\%$) Gaussian noise on each parameter (see Methods section), causing the bootstrapped spines to share all features and correlations with the reconstructed set of spines. We also bootstrapped axo-dendritic synapses based on the 34 reconstructed shaft iPSDs. Bootstrapped sets of singly- and dually-innervated spines, referred to as “bSiS” and “bDiS”, were used to simulate interfering EPSPs and IPSPs in genuine morphological contexts.

First, we assessed the impact of inhibition on an EPSP elicited in a closely neighboring spine. In detail, we placed a random bDiS (spine A), and a bootstrapped shaft iPSD together at a random location along the dendrite, and added a random bootstrapped spine (spine B), at a signed inter-spine distance x away from spine A on the same dendrite. We first fixed $\Delta x = +0.7\mu\text{m}$, which is the average inter-spine distance extracted from our experimental data, to approach inter-spine

signaling in a standard situation. EPSP-IPSP pairs were elicited in four different configurations per iteration of the model, combining EPSP elicitation either in spine A or B, with IPSP elicitation either in spine A, or in the shaft iPSD. We monitored the depolarization resulting in both the soma and the excited spine head, in those four cases (Fig. 6A1). We iterated this procedure for a large number ($N \geq 25000$) of bootstrapped morphologies in order to measure the variability of integrated signals, on a case-by-case basis. In detail, at the recording location “y” (i.e. soma or excited spine head), we compared the amplitude of summed signals $V_{max}(y)$ to the amplitude of uninhibited responses, $V_{max,\infty}(y)$ to compute the normalized attenuation: $S_V(\Delta x, y) = 1 - \frac{V_{max}(y)}{V_{max,\infty}(y)}$.

We expected 1/ axo-spinous inhibition to have a stronger effect on EPSPs elicited in the selfsame spine than on EPSPs elicited in neighboring spines, 2/ axo-dendritic inhibition to affect EPSPs non-specifically in all neighbouring spines and 3/ inhibitory signals elicited in an iPSD located between the excited ePSD and the recording location (i.e. on-path inhibition) to shunt the excitatory signal independently of inter-PSD distance (Hao et al., 2009; Gidon & Segev, 2012; Boivin & Nedivi, 2018). We tested the two first hypotheses for a fixed spine-to-spine distance by computing S_V both in the soma (Fig. 6B) and in the head of the excited spine (Fig. 6C). Noticeably, inhibition never completely terminated excitation, as at least 40% of the uninhibited depolarization reached the soma in inhibited cases ($S_V < 60\%$; Fig. 6B), in line with somatic recordings following glutamate uncaging experiments (Chiu et al., 2013). As expected, the axo-dendritic inhibition of EPSPs elicited in either spine A or B resulted in identical attenuation of the somatic depolarizations (Fig. 6B, cases 1 and 2, respectively). Distinctively, axo-spinous inhibition in spine A produced a stronger effect on EPSPs elicited in spine A than in spine B, despite the short distance between the two spines (Fig. 6B, cases 3 and 4, respectively). Quantitatively, exciting and inhibiting neighbouring spines (case 4) caused a reduction of the somatic S_V of -23% compared to the situation where both EPSP and IPSP were elicited in the same spine (case 3), maximally reaching -65% in some iterations of the model. Additionally, S_V in the soma was noticeably higher for axo-dendritic inhibition than for axo-spinous inhibition of the excited spine (Fig. 6B, cases 1 and 3, respectively): the median effect of axo-dendritic inhibition was +21% stronger in case 1 compared to case 3, maximally reaching +77% in some iterations of the model. These results suggest a prominent role for axo-dendritic inhibition in shunting EPSPs as they propagate to the soma.

To address the local effect of synaptic inhibition, we then considered S_V in the head of spines receiving an EPSP. Expectedly, measuring S_V in the head of spine B when inhibiting the head of DiS A yielded weaker attenuation than when inhibiting the shaft (Fig. 6C, cases 4 and 2, respectively; median effect: -42%). In contrast, measuring S_V in the head of DiS A while inhibiting it yielded doubled EPSP attenuation compared to dendritic shaft inhibition (Fig. 6C, cases 3 and 1,

respectively; median effect: +98%). These results indicate that, despite smaller PSD dimensions, axo-spinous inhibitory synapses have a stronger inhibitory effect in the spine head than they contact, compared to axo-dendritic inhibition. These results suggest that axo-spinous inhibition could specifically shunt excitatory inputs at the single spine level, underlying a mechanism for gating synaptic inputs (Bhatia et al., 2019).

Next, we studied the dependence of inhibition efficacy on Δx , i.e. the signed distance between the dendritic coordinates of the modeled excitatory and inhibitory synapses. We focused on cases that involved two different spines (cases 2 and 4), and simulated the evolution of S_V in both the soma and the excited spine (i.e. spine B) when varying Δx (Fig. 6D). Here, inhibition was located either proximally to the excited synapse for $\Delta x > 0$ (i.e. on-path inhibition, from the standpoint of the soma) or distally, for $\Delta x < 0$ (i.e. off-path inhibition). In the soma, S_V was maximal when inhibition was located on-path, whereas it decreased exponentially with Δx when inhibition was located off-path (Fig. 6E). The constitutive on-path/off-path asymmetry highlights the increased ability of inhibitory synapses to attenuate distal synaptic inputs rather than proximal synaptic inputs on their way to the soma, as pointed out in previous studies describing the somatic outcome of dendritic integration (Hao et al., 2009; Gidon & Segev, 2012). We observed this behavior for both axo-dendritic and axo-spinous inhibition (Fig. 6E, red and green curves, respectively). We observed that the somatic effect of axo-dendritic inhibition was higher than axo-spinous inhibition, as a result of both electrical compartmentalization in spines, and constitutively larger iPSDs in dendritic shafts. Remarkably, both curves in Fig. 6E decayed on the off-path side with comparable characteristic lengths: $L_{S, \text{soma, off}} = 30 \mu\text{m}$. We conclude from these results that the spread of inhibitory signals in dendrites is smaller than that of excitatory signals, which propagate over hundreds of μm (Williams & Stuart, 2003).

When computed in the excited spine head, S_V exhibited milder on-path/off-path asymmetry (Fig. 6F). For both axo-dendritic and axo-spinous inhibition, S_V decayed exponentially with Δx , with the decaying lengths $L_{S, \text{on}} = 30 \mu\text{m}$ and $L_{S, \text{off}} = 11 \mu\text{m}$ for on-path and off-path attenuation respectively. Decaying lengths depended on the dendritic cross-section (*suppl. Fig. Impact of varying ϕ_{dendrite}*). In L2/3 PN basal dendrites, the spread of spine head inhibition was localized in small, 40 μm -wide regions around iPSDs, whether axo-spinous or axo-dendritic. These results indicate that both axo-dendritic and axo-spinous inhibition spread similarly along dendrites, despite different morphological features.

Temporal interplay of excitatory and inhibitory signals

The effect of inhibition depends on the depolarization state of the cell membrane at IPSP arrival time. Therefore, in the case of correlated EPSPs and IPSPs, inhibition efficacy depends on the respective timing between inhibitory and excitatory inputs (Koch et al., 1983; Segev & Rall, 1988; Hao et al., 2009; Doron et al., 2017). To address this effect, we simulated the interaction of timed excitatory and inhibitory inputs in two different situations, and monitored both local and somatic outcome. In the first case, we sampled the distribution of bDiS, featuring axo-spinous inhibition (Fig. 7A1, left). In the second case, we sampled all bootstrapped spines, and paired them to a shaft inhibitory synapse located at a distance of $1.4\mu\text{m}$ (Fig. 7A1, right), which is the average distance to a shaft inhibitory synapse that we measured in PN basal dendrites. Over such a short distance, the propagation delay of both E/I signals between the modeled synapses is negligible, compared to their rise time and duration (Koch et al., 1983). In both situations, we activated the excitatory synapse at $t=0$ and the inhibitory synapse at the signed time interval $t = \Delta t$ (Fig. 7A2, magenta and green, respectively). We subsequently quantified the impact of timed inhibition on both the amplitude and kinetics of the simulated depolarization. We illustrate two possible outcomes of the simulation in figures 7B1 and 7B2, showing the distribution of depolarization time-courses in the head of all bDiSs, both with and without inhibition (black and magenta curves, respectively) for $\Delta t = -5\text{ms}$ or $\Delta t = +5\text{ms}$ (Fig. 7B1 and 7B2, respectively). When inhibition comes first, the GABAergic current shunts the membrane, which partly attenuates the voltage increase induced by the ensuing EPSP (Fig. 7B1). In contrast, when inhibition comes second, the IPSP has no effect on the voltage peak amplitude ΔV_{max} , but mostly attenuates the decaying part of the EPSP (Fig. 7B2) (Koch et al., 1983). We quantified EPSP attenuation with $S_V(\Delta t, y) = 1 - \frac{V_{\text{max}}(y)}{V_{\text{max},\infty}(y)}$ calculated in the dendritic shaft or in the excited spine head. We also quantified the change of depolarization kinetics using the 80-to-20% decay time (τ) of the integrated signals (Fig. 7B2).

We observed that $S_V(\Delta t)$ curves were asymmetrical, as predicted in seminal modeling studies (Koch et al 1983, Segev and Rall 1988). In all iterations, $S_V(\Delta t)$ was maximal for $\Delta t \sim -1\text{ms}$, *which corresponds approximately to the rise time of the GABAergic currents*. In more detail, the shunting effect of axo-spinous and axo-dendritic inhibition reached similar values in the dendritic shaft (Fig. 7C; median attenuation: 22%), whereas, in the head of the excited spine, axo-spinous inhibition had a stronger effect than axo-dendritic inhibition (Fig. 7D, orange and blue curves, respectively; median attenuation: 19% and 9%). These results indicate that the synaptic gating effect of axo-spinous inhibition persists for asynchronous E/I inputs. Furthermore, we used a GLM to estimate that the area of the activated iPSD contributed to 74% of the variance of the maximal EPSP

attenuation when located in the spine head of DiS, and to 64% when located in the shaft, suggesting that iPSD area is the main source of variability for EPSP attenuation.

We then quantified how timed IPSPs reduced the duration of evoked depolarizations. Figure 7E features the normalized decay time of summed EPSP+IPSP, as a function of Δt . The resulting curve was asymmetric and peaked at $\Delta t = +2\text{ms}$ for all modeled situations. On average, IPSPs caused EPSPs to decay up to 35% faster in the context of DiS and up to 45% for shaft iPSD. This decrease in depolarization latency could be instrumental for regulating neuronal excitability at high frequency and modulating the integration window of excitatory inputs (Gabernet et al., 2005). We also measured that iPSD area explained 62% of the variance of the decaying time, highlighting iPSD area as the main factor influencing IPSP efficacy, in terms of both voltage amplitude attenuation and change in depolarization kinetics.

Finally, we approached the effect of timed inhibition on calcium signaling in the spine head, for both cases of axo-spinous and axo-dendritic inhibition. We quantified the attenuation of $[Ca^{2+}]$ transients using $S_{[Ca^{2+}]}(\Delta t, y) = 1 - \frac{[Ca^{2+}]_{max}(y)}{[Ca^{2+}]_{max,\infty}(y)}$ (Fig.7F). We observed substantial decrease of $[Ca^{2+}]$ amplitude compared to the uninhibited case in both conditions. More precisely, calcium transient amplitude was impacted about three (2.8) times more by axo-spinous inhibition than by axo-dendritic inhibition (median attenuation of 9% and 3% respectively, with maximal values reached up to 50%). These results suggest that axo-spinous inhibition could selectively tune calcium signaling in DiS. Furthermore, we observed that the calcium attenuation was an asymmetrical function of Δt and that the relatively slow kinetics of calcium entry through NMDARs led IPSPs to affect calcium signaling for $\Delta t > 0$ without affecting depolarization amplitude. As a result, timed IPSPs could allow excitatory electrical inputs to reach the soma unabated, while modifying the outcome of local calcium-dependent signaling cascades. This original result may underlie an effective mechanism for decoupling synaptic activity from calcium-driven structural plasticity (Yasuda, 2017; Nakahata & Yasuda, 2018) in dually-innervated spines.

Discussion

In the present study, we propose an original approach combining *in vivo* cell-type-specific genetic labeling, ultrastructural morphometry and electrophysiological modeling to estimate the functional consequences of spine heterogeneity in identified neocortical dendrites. We developed a 3D-CLEM approach using a novel alternative to NIRB (Bishop et al., 2011) for ROI relocation, in order to quantify the ultrastructure of specific spines on the basal dendrites of cortical L2/3 PNs in the SSC of adult mice. We report the abundance and morphological effects of the spine apparatus (SA), and provide quantitative criteria to predict SA presence depending on spine size. We used the morphological data to constrain a model of dendritic signaling. We highlight PSD area and spine neck resistance as the main sources of variability for synaptic signaling in spines. We characterize the spatial integration of excitatory and inhibitory inputs evoked in neighboring singly- and dually-innervated spines. Finally, we specify how timed inhibitory inputs can control voltage and calcium levels differentially in spines, with a possible impact on calcium-dependent signaling cascades driving synaptic plasticity.

Modeling approaches require to fit a large number of free parameters, and our genuine morphological measurements enabled to constrain a considerable number of parameters. Still, we had to select some physiological parameters from the existing literature — e.g. cytosolic resistivity, channel conductances and activation timescales — but measurements from the basal tree of SSC L2/3 PNs were not always available. Dendritic-type-specific measurement is not yet the standard, although biophysical properties of spines and synapses are reportedly inhomogeneous along and across dendrites (Losonczy et al., 2008; Stuart & Spruston, 2015). Our modeling effort stresses the need for better resolved biophysical quantification, and the CLEM workflow we propose enables performing dendritic-type-specific measurement in any type of dendrites. Our method paves the way to mapping dendritic, spinous and synaptic morphology at the sub-micrometric scale in intact brain circuits, providing high-end data to increase model prediction accuracy at the circuit level. For instance, our data could be used to refine the description of synaptic signaling at the interface between L2/3 and L4 in the SSC that has been proposed by Sarid and colleagues (Sarid et al., 2015). The authors report that, in their model, "the area of each dendritic spine was assumed to be $1\mu\text{m}^2$, and the spine density was 0.97 spine per micrometer of dendritic length" (Sarid et al., 2007), which differs from our ultrastructural measurements ($1\text{-}10\mu\text{m}^2$ spine membrane area and 1.63 ± 0.08 spine per μm) with potential impacts on prediction accuracy. Other models do not take spines into account at all, and would benefit from Combining CLEM-based morphometry with quantitative super-resolution optical imaging in further studies will enable measuring molecular densities in

identified subcellular structures (Patrizio & Specht, 2016) to improve model constraining, and to increase the accuracy of neuronal circuit modeling. Associating these measurements with connectomics data will allow modeling a large number of synapses within accurately wired cortical circuits in order to approach their behavior *in vivo* with genuine nano-scale data.

One limit of our CLEM-based approach is that it requires chemical fixation of the sample tissue, which distorts tissue morphology compared to the natural state. The mechanical strains imposed on cellular membranes by hyper-osmotic chemical fixatives cause cellular structures to shrink and extracellular volumes to collapse (Korogod et al., 2015). Alternatively, cryo-fixation methods such as high-pressure freezing (HPF) enable recording close-to-native ultrastructure. To quantify certain aspects of tissue shrinkage, we compared spine head ultrastructure in TEM for both chemically fixed and physically fixed cortical slices. Our results confirmed that chemically fixed tissue morphology does not reliably depict *in vivo* situations (Fig. Suppl-Shrinkage-C). As a result, we advise caution when employing morphometric values from chemically fixed tissue for modeling purposes. As current 3D cryo-methods still require prior chemical fixation (Tsang et al., 2018), developing cryo-CLEM methods to allow 3D-imaging of targeted dendrites in vitrified brain tissue would enable measuring the ultrastructure of identified neuronal circuits in their natural state. Alternatively, we controlled cautiously for tissue shrinkage at the micrometer scale to correct our morphological measurements and model synaptic signaling in close-to-native identified dendrites. Our measurements enable to draw quantitative features of the spatial compartmentalization of inhibitory signals. iPSDs located on DiS (DiS-iPSDs) are systematically smaller than ePSDs located on the same DiS (DiS-ePSDs ; Fig. 3F), and also smaller than all shaft iPSDs (Fig. 3G). Inputting this data in our model enabled to describe how precisely inhibitory innervation structures excitatory signaling. First, considering depolarization amplitude attenuation, results differed depending on voltage monitoring location, with maximal attenuation reaching respectively 60% and 35% in the soma and in the spine heads (Fig. 6B and 6C). While monitoring voltage in the soma, shaft iPSDs could inhibit EPSPs elicited either distally or in proximal spines within 10 μ m (i.e. $\sim$ 32 spines ; Fig. 6D) to a stronger extent than DiS-iPSDs inhibited EPSPs elicited in the same DiS (median $S_V \geq 25\%$; Fig. 6B). While monitoring voltage in the head of excited spines, axo-spinous inhibition was stronger than axo-dendritic inhibition (median $S_V = 18\%$ compared to 8%, respectively ; Fig. 6C), but axo-dendritic inhibition spread farther: shaft iPSDs inhibited all spines within 15 μ m (i.e. $\sim$ 50 spines) to a stronger extent than DiS-iPSDs inhibited their nearest neighboring spine (Fig. 6E). Second, considering calcium signaling in spines, our results indicate that axo-spinous inhibition can attenuate intracellular calcium responses by at most 50%. We also describe that IPSPs occurring within milliseconds after an EPSP in DiS can locally decouple voltage and calcium signaling (Fig. 7D and 7F). These results corroborate the view that spine-targeting inhibition fine-tunes the

electrochemical output of glutamatergic excitation instead of nullifying it, letting EPSPs reach the soma while adjusting calcium levels in spines (Chiu et al., 2013). Previous studies have proposed that a small reduction of calcium transient amplitude can limit the potentiation of excited spines, or even cause the spine to shrink (Hayama et al., 2013; Higley, 2014; Yasuda, 2017; Nakahata & Yasuda, 2018; Chiu et al., 2019). In this context, our data suggests that SiS and DiS may follow different plasticity rules, as axo-spinous inhibition can foster long-term depression in DiS without affecting the depolarization amplitude of the EPSP. These results highlight the high-resolution of axo-spinous inhibition, in line with recent studies emphasizing the precision of synaptic inhibition in sculpting neuronal activity (Chiu et al., 2013, 2019; Boivin & Nedivi, 2018).

At the circuit level, DiS in the SSC are specifically contacted by excitatory thalamo-cortical afferences (Kubota et al., 2007), that exert feed-forward inhibition on cortical neurons *via* fast-spiking (FS) interneurons (Gabernet et al., 2005). As FS interneurons reportedly contact basal DiS up to 110 μ m away from the soma (Kubota et al., 2015), it is therefore possible that DiS in cortical PNs receive time-correlated monosynaptic excitation and disynaptic inhibition from individual thalamocortical fibers. The delay between E/I inputs in feed-forward inhibition typically varies between +1ms and +3ms (Gabernet et al., 2005), well within the 10ms time-window for voltage-calcium decoupling in DiS. The decoupling mechanism could therefore allow thalamo-cortical inputs to elicit uninhibited depolarizations in DiS while attenuating the amplitude of local calcium transients in order to limit, and potentially revert local LTP (Higley, 2014). Feed-forward inhibition circuits impinging on individual DiS could allow sensory-motor inputs to depolarize target PNs efficiently without potentiating excited spines, possibly to preserve network stability. Describing whether E/I afferences on DiS genuinely form feed-forward inhibition microcircuits is crucial to validate this hypothesis. In that case, our findings would provide insights on the mechanisms underlying the remodeling of thalamocortical circuits during sensory plasticity experiments. First, in barrel cortex L4, whisker stimulation durably increases the proportion of axo-spinous inhibitory contacts (Knott et al., 2002). The addition of DiS-iPSDs could prevent excessive potentiation of spines that receive sustained inputs from the stimulated whisker, and preserve synaptic weight patterns along over-stimulated dendrites. Second, in binocular visual cortex L2/3, monocular deprivation transiently increases the elimination rate of spine and shaft inhibitory synapses (Chen et al., 2012; van Versendaal et al., 2012). Suppressing DiS-iPSDs could foster DiS potentiation, perhaps to strengthen inputs from the non-deprived eye (Frenkel et al., 2006), and play an active role in sensory plasticity.

Together, our results suggest that local plasticity properties are precisely structured along PN dendrites by discrete ensembles of dissimilar inhibitory synapses. Combining dendritic-type-specific ultrastructural quantitations with novel methods for monitoring voltage (Popovic et al.,

2015; Jayant et al., 2017; Bar-Elli et al., 2018) and calcium (Chen et al., 2013; Thestrup et al., 2014) in highly confined spine heads during live experiments will soon enable deciphering the processes underlying dendritic integration.

Acknowledgements

We offer special thanks to Vincent Hakim for his useful comments and feedback. OG thanks IJM EM platform for SBF-SEM experiments & ThermoFisher Scientific for fruitful support on SBF-SEM. We thank Christian Specht for useful comments. We thank all Triller lab members for the great work environment. We acknowledge grants: NikonCIFRE, Memolife, HBP, ERC/ENS/CNRS.

Materials and methods

Animals

All animals were handled according to protocols approved by French authorities. Timed-pregnant female mice were maintained in a 12 hr light/ dark cycle and obtained by overnight breeding with males of the same strain. For timed-pregnant mating, noon after mating is considered E0.5. Adults correspond to mice between P84 and P129. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

In utero cortical electroporation

In utero cortical electroporation was performed at E15.5 on timed pregnant RjOrl:SWISS females (Janvier Labs, France). The previously described protocol for in utero cortical electroporation (Hand and Polleux, 2011) was modified as follows. We used timed pregnant RjOrl:SWISS females. Endotoxin-free DNA was injected using a glass pipette into one ventricle of the mouse embryos. The volume of injected DNA was adjusted depending on the experiments. Electroporation was performed at E15.5 using a square wave electroporator (ECM 830, BTX) and gold paddles. The electroporation settings were: 4 pulses of 40 V for 50 ms with 500 ms interval.

Constructs

EGFP-GPHN (clone P1) was obtained from H. Cline (TSRI, La Jolla, USA) and subcloned into pCIG2 (Hand et al., 2005) between Xma1 and Not1 by replacing the IRES-GFP fragment. Plasmids were used at the following concentrations : TdTomato cell fill: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$; EGFP-GPHN: 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Cortical slice preparation

Animals at the indicated age were anesthetized with ketamin 100mg/kg and xylazin 10mg/kg, and intracardiacally perfused with 0.1mL of heparin (5000U.I/mL, SANOFI), then an aqueous solution

containing 4% w/v paraformaldehyde (PFA, Clinisciences) and 0.5% glutaraldehyde (Clinisciences) in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS). The solution was made fresh before the experiment started and kept at ice-cold temperature throughout the perfusion. Gravity was used to drive perfusion, resulting in a flow rate of about 0.2 ml/s, and a perfused volume of 100 ml per animal. The brains were collected and post-fixed overnight at 4°C in a 4% PFA solution. 30 µm-thick coronal brain sections were obtained using a vibrating microtome (Leica VT1200S).

Fluorescence microscopy of fixed tissue

Slices containing sparse and bright electroporated neurons were trimmed to small (5-10mm²) pieces centered on the targeted neurons, then mounted on #1.5 glass coverslips. The mounting procedure consisted in enclosing the slices between the glass coverslip and the bottom of a cell culture insert (Falcon, ref. 353095), adapted to the flat surface with a silicon O-ring gasket (Leica) and fixed with fast-curing silicon glue. Confocal volumes of GFP and tdTomato signals were acquired in 1024x1024, 12bits mode using a Leica TCS SP8 confocal laser scanning platform controlled by the LAF AS software and using a tunable white laser (fournisseur?) and a hybrid detector (Leica Microsystems). We used the following objective lenses: 10XPlanApo, NA 0.45 (identification of the electroporated neurons) and 100X HC-PL APO, NA 1.44 CORR CS (Leica) (higher magnification images). GFP-GPHN puncta with a peak signal intensity of at least four times above shot noise background levels were considered for CLEM.

Nanolabeling

Subsequent to confocal imaging, slices were immersed in a 1mg/mL 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma Aldrich) solution in Tris buffer 0.05M pH7.4. LAS X FRAP plug-in (Leica) was used to drive the pulsed white confocal laser to illuminate definite patterns of 10-20 focal points in the tissue, using 30s-60s per point with 100% power in 4 wavelengths (470 to 494nm) at 3 different depths : farthest slice surface, z_{soma}, and closest slice surface. DAB precipitates were visible subsequent to laser illumination. Slices were then rinsed in 2xTris buffer then 2x double distilled water (ddH₂O) before preparation for electron microscopy.

Tissue preparation for Serial Block-Face - Scanning Electron Microscopy (SBF-SEM)

Imaged tissue slices were cut to ~1mm² pieces of tissue centered on the ROI using a scalpel blade under a M165FC stereomicroscope (Leica), and kept in plastic baskets (Leica) throughout the osmification and dehydration steps. Sample blocks were prepared for SBEM using an osmium bridging technique adapted from the NCMIR protocol. (Deerinck et al., 2010) Samples were washed 3 times in double-distilled water (ddH₂O) and immersed for 1 hour in a reduced osmium solution containing 2% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferrocyanide in ddH₂O. Samples were then

immersed for 20 minutes in a 1% thiocarbohydrazide (TCH) solution prepared in ddH₂O at room temperature. Then, samples were post-fixed with 2% OsO₄ in ddH₂O for 30 minutes at room temperature, followed by *en bloc* coloration with 1% aqueous uranyl acetate at 4 °C during 12 hours. The samples were then subjected to Walton's *en bloc* lead aspartate staining (Walton, 1979) and placed in a 60 °C oven for 30 minutes. After dehydration in graded concentrations of ice-cold anhydrous ethanol, lasting 5 minutes per step, the samples were placed in anhydrous ice-cold acetone at room temperature for 10 minutes. Samples were infiltrated with graded concentrations of Durcupan prepared without plastifier (components A, B, C only) (Electron Microscopy Science). In detail, blocks were infiltrated with 25% Durcupan for 30 minutes, 50% Durcupan for 30 minutes, 75% Durcupan for 2 hours, 100% Durcupan overnight, and 100% fresh Durcupan for 2 hours before being polymerized in a minimal amount of resin, in a flat orientation within a sandwich of ACLAR® 33C Films (Electron Microscopy Science) at 60 °C for 48 hours.

Samples were mounted onto aluminum pins using silver conductive glue (refs? EMS). Before curing of the glue, tissue blocks were pressed parallel to the pin surface using an ultramicrotome, to minimize the angular mismatch between LM and SEM imaging planes. Pins were subsequently let to cure overnight at 60°C. Pins were then trimmed around the ROI, with the help of fluorescent overviews of ROI location as a guide for trimming. Minimal surfacing ensured that superficial DAB spots would be detectable at the SBEM.

SBF-SEM Acquisition

SBF-SEM imaging was performed on a Teneo VS microscope (FEI, The Netherlands) in Institut Jacques Monod Paris. Acquisition parameters were: 1,7830 kV, 500ns/px, 100pA, 40 nm-thick sectioning and 8200x8200 resolution with either 2.5nm or 25nm pixel size for high- and low-magnification images. Placing an electromagnetic trap above the diamond knife to catch discarded tissue sections during each cutting episode was instrumental to achieve uneventful volume acquisitions.

Image segmentation

Dendrites were segmented from SBF-SEM stacks using Microscopy Image Browser (MIB). (Belevich et al., 2016) 3D reconstruction was performed with the software IMOD (Kremer et al., 1996). Spine models were imported in the software Blender (www.blender.org) for subsampling and quantifying spine section areas along their main axis, using home-made python scripts. Quantitative measurements were performed using IMOD and home-made python scripts.

Multicompartment electric model

All simulations were implemented in Python using NEURON libraries (Hines & Carnevale, 2001; Carnevale & Hines, 2006) and with in-house scripts. Ordinary differential equations were solved with NEURON-default backward Euler method, with $\Delta t = 0.05$ ms. The scripts are available in a GitHub repository <https://github.com/pabloserna/SpineModel>.

Biophysical constants were extracted from the literature:

- Synaptic conductivity inputs were modeled as bi-exponential functions $g(t) = Ag_{max}(e^{-t/t_2} - e^{-t/t_1})$ where A is a normalizing constant and t_1 and t_2 define the kinetics of the synapses: GABA-ergic conductance $(t_1, t_2) = (0.5, 15)$ ms, AMPAR-dependent conductance $(t_1, t_2) = (0.1, 1.8)$ ms, NMDAR-dependent conductance $(t_1, t_2) = (0.5, 17.0)$ ms (refs).
- Membrane capacitance $c_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$.
- Cytosolic resistivity = 250 Ohms cm (Miceli et al 2017).

Calcium channel dynamics, including R, Q, and S type channels, were obtained from modeldb. The magnesium block of NMDA receptors was modeled by a voltage-dependent factor (Jahr & Stevens, 1990). Finally, the set of the remainder free parameters was used to fit electrophysiology experiments published in previous works and it comprised: leaking conductivity or equivalently membrane time constant (g_m, τ_m) ; the peak synaptic conductance per area: $g_{\text{AMPA}}, g_{\text{NMDA}}, g_{\text{GABA}}$; the amount of remaining dendritic membrane included in the second dendritic compartment; and the conductance of VDCCs. These constant parameters were adjusted to fit electrophysiological recordings extracted from the literature (Feldmeyer et al., 2006; Kobayashi et al., 2008; Hull et al., 2009; Avermann et al., 2012; Scala et al., 2018).

Statistics

We used Mann–Whitney U test for statistical analyses except when comparing the probability of harboring SA for SiS and DiS, for which we used Pearson's χ^2 test.

Supplementary methods

High-pressure freezing of acute brain slices

Two three-month-old RjOrl:SWISS female mice (Janvier Labs, France) were used for HPF. They were decapitated and their brains were rapidly removed. The brains were transferred to ice-cold dissection medium, containing (in mM): sucrose, 210; KCl, 2.5; NaHCO₃, 25; NaH₂PO₄, 1; MgSO₄, 8; glucose, 10; pH 7.4 (Fiala et al., 2003). For 1h before use, 95% O₂/5% CO₂ was bubbled through the medium. 300- μ m-thick coronal brain sections were obtained using a vibrating microtome (Leica VT1200S). Small portions of the somatosensory cortex (SSC) were trimmed to fit in an aluminum support and frozen using an HPM 100 (Leica) under a pressure of 2100 bar. After freezing, the sample were rapidly transferred to liquid nitrogen for storage. One SSC field was dissected and frozen per animal, allowing an interval of about 7 min between removal of the brain and freezing.

Cryosubstitution, embedding & sectioning

Cryosubstitution and embedding of tissue after HPF were performed in a Reichert AFS apparatus (Leica, Vienna, Austria). Cryosubstitution was performed in acetone with 0.1% tannic acid at -90°C for 4 days with one change of solution, and in acetone with 2% osmium during the last 7h. The slices were thawed slowly (5°C/h) to -20°C and incubated for 16 additional hours, before being warmed (10°C/h) to 4°C. At 4°C the slices were immediately washed in acetone. Samples were rinsed several times in acetone, then warmed to room temperature and incubated in 50% acetone-50% araldite for 1h, followed by 10% acetone-90% araldite for 2h. Samples were then incubated twice in araldite for 2h, before embedding 48h in an oven at 60°C.

Ultrathin sections were cut perpendicular to the axis of pyramidal cell apical dendrites, starting in L2/3 of the SSC, 200-300 μ m from the pial surface. Thin (pale yellow) sections were cut using a Leica Ultracut UCT. Sections were collected on nickel slot grids coated with formvar. The sections were counterstained by incubation with 5% uranyl acetate in 70% methanol for 10 min, followed by washing in ddH₂O and air drying.

Shrinkage correction

Ultra-thin sections of both HPF-frozen tissue and tissue prepared for SBF-SEM were observed using a Philips TECNAI 12 (FEI). Compartments contacted by a vesicle-containing pre-synaptic bouton and exhibiting a visible electron-dense PSD but no mitochondrion were identified as dendritic spine heads. Cross-section areas of random spine heads, and the curvilinear lengths of their PSD were quantified in both conditions. N = 324 spine head cross-sections were segmented in HPF-frozen cortical slices from 2 different RjOrl:SWISS female mice, and N = 346 spine head cross-sections

were segmented in OTO-prepared samples from one electroporated mouse. Chi-square minimization was used between spine head cross-section area distributions in HPF or OTO conditions to compute average volume shrinkage.

References

- Acker, C. D., Hoyos, E., & Loew, L. M. (2016). EPSPs Measured in Proximal Dendritic Spines of Cortical Pyramidal Neurons. *ENeuro*, 3(2), 1–13. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0050-15.2016>
- Adrian, M., Kusters, R., Storm, C., Hoogenraad, C. C., & Kapitein, L. C. (2017). Probing the Interplay between Dendritic Spine Morphology and Membrane-Bound Diffusion. *Biophysical Journal*, 113(10), 2261–2270. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.048>
- Alvarez, V. A., & Sabatini, B. L. (2007). Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 79–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094222>
- Araya, R., Vogels, T. P., & Yuste, R. (2014). Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1321869111>
- Arellano, J. I. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.010.2007>
- Avermann, M., Tamm, C., Mateo, C., Gerstner, W., & Petersen, C. C. H. (2012). Microcircuits of excitatory and inhibitory neurons in layer 2/3 of mouse barrel cortex. *Journal of Neurophysiology*, 107(11), 3116–3134. <https://doi.org/10.1152/jn.00917.2011>
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–29. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021758>
- Ballesteros-Yáñez, I., Benavides-Piccione, R., Elston, G. N., Yuste, R., & DeFelipe, J. (2006). Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*, 138(2), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.038>
- Bar-Elli, O., Steinitz, D., Yang, G., Tenne, R., Ludwig, A., Kuo, Y., ... Oron, D. (2018). Rapid Voltage Sensing with Single Nanorods via the Quantum Confined Stark Effect. *ACS Photonics*, 5(7), 2860–2867. <https://doi.org/10.1021/acsp Photonics.8b00206>
- Bär, J., Kobler, O., Van Bommel, B., & Mikhaylova, M. (2016). Periodic F-actin structures shape the neck of dendritic spines. *Scientific Reports*, 6(November), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep37136>
- Begemann, I., & Galic, M. (2016). Correlative light electron microscopy: Connecting synaptic structure and function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00028>
- Belevich, I., Joensuu, M., Kumar, D., Vihinen, H., & Jokitalo, E. (2016). Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets. *PLoS Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002340>
- Bell, M. E., Bourne, J. N., Chirillo, M. A., Mendenhall, J. M., Kuwajima, M., & Harris, K. M. (2014). Dynamics of nascent and active zone ultrastructure as synapses enlarge during long-term potentiation in mature hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 522(17), 3861–3884. <https://doi.org/10.1002/cne.23646>
- Bhatia, A., Moza, S., & Bhalla, U. S. (2019). Precise excitation-inhibition balance controls gain and timing in the hippocampus. *ELife*, 8, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.43415>
- Bian, W. J., Miao, W. Y., He, S. J., Qiu, Z., & Yu, X. (2015). Coordinated Spine Pruning and Maturation Mediated by Inter-Spine Competition for Cadherin/Catenin Complexes. *Cell*, 162(4), 808–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.018>
- Bishop, D., Nikić, I., Brinkoetter, M., Knecht, S., Potz, S., Kerschensteiner, M., & Misgeld, T. (2011). Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy. *Nature Methods*, 8(7), 568–572. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1622>
- Blazquez-Llorca, L., Hummel, E., Zimmerman, H., Zou, C., Burgold, S., Rietdorf, J., & Herms, J. (2015). Correlation of two-photon in vivo imaging and FIB/SEM microscopy. *Journal of Microscopy*, 259(2), 129–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95849-1_8
- Boivin, J. R., & Nedivi, E. (2018). Functional implications of inhibitory synapse placement on signal processing in pyramidal neuron dendrites. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.013>
- Bosch, C., Martínez, A., Masachs, N., Teixeira, C. M., Fernaud, I., Ulloa, F., ... Soriano, E. (2015). FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00100>
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 47–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646>

- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2011). Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced. *Hippocampus*, 21(4), 354–373. <https://doi.org/10.1002/hipo.20768>.COORDINATION
- Cane, M., Maco, B., Knott, G., & Holtmaat, A. (2014). The relationship between PSD-95 clustering and spine stability In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 34(6), 2075–2086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3353-13.2014>
- Carnevale, N. T., & Hines, M. L. (2006). *The NEURON Book*. In Cambridge University Press.
- Chen, J. L., Villa, K. L., Cha, J. W., So, P. T. C., Kubota, Y., & Nedivi, E. (2012). Clustered Dynamics of Inhibitory Synapses and Dendritic Spines in the Adult Neocortex. *Neuron*, 74(2), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.030>
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., ... Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chirillo, M. A., Waters, M. S., Lindsey, L. F., Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2019). Local resources of polyribosomes and SER promote synapse enlargement and spine clustering after long-term potentiation in adult rat hippocampus. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40520-x>
- Chiu, C. Q., Barberis, A., & Higley, M. J. (2019). Preserving the balance: diverse forms of long-term GABAergic synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(5), 272–281. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0141-5>
- Chiu, C. Q., Lur, G., Morse, T. M., Carnevale, N. T., Ellis-Davies, G. C. R., & Higley, M. J. (2013). Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science*, 340(6133), 759–762. <https://doi.org/10.1126/science.1234274>
- Dayan, P., & Abbott, L. F. (2001). *Theoretical Neuroscience: Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems*. In MIT Press.
- De Boer, P., Hoogenboom, J. P., & Giepmans, B. N. G. (2015). Correlated light and electron microscopy: Ultrastructure lights up! *Nature Methods*, 12(6), 503–513. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3400>
- Deerinck, T. J., Bushong, E. A., Thor, A., & Ellisman, M. H. (2010). NCMIR Methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Nat. Center Microsc. Imag. Res.*, 6.
- DeFelipe, J. (2015). The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(March), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00014>
- Doron, M., Chindemi, G., Muller, E., Markram, H., & Segev, I. (2017). Timed Synaptic Inhibition Shapes NMDA Spikes, Influencing Local Dendritic Processing and Global I/O Properties of Cortical Neurons. *Cell Reports*, 21(6), 1550–1561. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.035>
- Efron, B., & Tibshirani, R. J. (1994). *An Introduction to the Bootstrap*. In CRC Press.
- Feldmeyer, D., Lübke, J., & Sakmann, B. (2006). Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats. *Journal of Physiology*, 575(2), 583–602. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.105106>
- Fifková, E., & Anderson, C. L. (1981). Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Experimental Neurology*, 74(2), 621–627. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(81\)90197-7](https://doi.org/10.1016/0014-4886(81)90197-7)
- Fossati, M., Pizzarelli, R., Schmidt, E. R., Kupferman, J. V., Stroebel, D., Polleux, F., & Charrier, C. (2016). SRGAP2 and Its Human-Specific Paralog Co-Regulate the Development of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Neuron*, 91(2), 356–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.013>
- Frenkel, M. Y., Sawtell, N. B., Diogo, A. C. M., Yoon, B., Neve, R. L., & Bear, M. F. (2006). Instructive Effect of Visual Experience in Mouse Visual Cortex. *Neuron*, 51(3), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.026>
- Frick, A., Feldmeyer, D., Helmstaedter, M., & Sakmann, B. (2008). Monosynaptic connections between pairs of L5A pyramidal neurons in columns of juvenile rat somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*, 18(2), 397–406. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm074>
- Gabernet, L., Jadhav, S. P., Feldman, D. E., Carandini, M., & Scanziani, M. (2005). Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*, 48(2), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.022>
- Gidon, A., & Segev, I. (2012). Principles Governing the Operation of Synaptic Inhibition in Dendrites. *Neuron*, 75(2), 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.015>
- Globus, A., Rosenzweig, M., Bennett, E., & Diamond, M. (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *Comp Physiol Psychol.*, 82(Feb), 175–181.
- Grunditz, A., Holbro, N., Tian, L., Zuo, Y., & Oertner, T. G. (2008). Spine Neck Plasticity Controls Postsynaptic Calcium Signals through Electrical Compartmentalization. *Journal of Neuroscience*,

- 28(50), 13457–13466.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.2702-08.2008>
- Hao, J., Wang, X. D., Dan, Y., Poo, M. M., & Zhang, X. H. (2009). An arithmetic rule for spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21906–21911.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0912022106>
- Harris, K. M., & Stevens, J. K. (1989). Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat hippocampus: Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *Journal of Neuroscience*, 9(8), 2982–2997.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-08-02982.1989>
- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain Ultrastructure of Synapses in the. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>
- Hausser, M., Spruston, N., & Stuart, G. J. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*, 290(5492), 739–744.
<https://doi.org/10.1126/science.290.5492.739>
- Hayama, T., Noguchi, J., Watanabe, S., Takahashi, N., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C. R., ... Kasai, H. (2013). GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nature Neuroscience*, 16(10), 1409–1416.
<https://doi.org/10.1038/nn.3496>
- Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y. I., Loshbaugh, A. L., ... Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature*, 525(7569), 333–338.
<https://doi.org/10.1038/nature15257>
- Hersch, S. M., & White, E. L. (1981). Quantification of synapses formed with apical dendrites of golgi-impregnated pyramidal cells: Variability in thalamocortical inputs, but consistency in the ratios of asymmetrical to symmetrical synapses. *Neuroscience*, 6(6). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90069-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90069-5)
- Higley, M. J. (2014). Localized GABAergic inhibition of dendritic Ca²⁺ signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 567–572.
<https://doi.org/10.1038/nrn3803>
- Higley, M. J., & Contreras, D. (2006). Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *Journal of Neuroscience*, 26(2), 448–457.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-05.2006>
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2008). Calcium Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron*, 59(6), 902–913.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.020>
- Hines, M. L., & Carnevale, N. T. (2001). NEURON: A tool for neuroscientists. *Neuroscientist*, 7(2), 123–135.
<https://doi.org/10.1177/107385840100700207>
- Holbro, N., Grunditz, Å., & Oertner, T. G. (2009). Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 15055–15060.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905110106>
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., & Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature Neuroscience*, 15(7), 988–997.
<https://doi.org/10.1038/nn.3137>
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 57(5), 719–729.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013>
- Hull, C., Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2009). Postsynaptic Mechanisms Govern the Differential Excitation of Cortical Neurons by Thalamic Inputs. *Journal of Neuroscience*, 29(28), 9127–9136.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5971-08.2009>
- Iascone, D. M., Li, Y., Sumbul, U., Doron, M., Chen, H., Andreu, V., ... Polleux, F. (2018). Whole-neuron synaptic mapping reveals local balance between excitatory and inhibitory synapse organization. *BioRxiv*, 395384. <https://doi.org/10.1101/395384>
- Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2011). How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72(2), 231–243.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.027>
- Jahr, C. E., & Stevens, C. F. (1990). A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior. *Journal of Neuroscience*, 10(6), 1830–1837. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-06-01830.1990>
- Jayant, K., Hirtz, J. J., Plante, I. J. La, Tsai, D. M., De Boer, W. D. A. M., Semonche, A., ... Yuste, R. (2017). Targeted intracellular voltage recordings from dendritic spines using quantum-dot-coated nanopipettes. *Nature Nanotechnology*, 12(4), 335–342. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.268>
- Ji, X. Y., Zingg, B., Mesik, L., Xiao, Z., Zhang, L. I., & Tao, H. W. (2016). Thalamocortical Innervation Pattern in Mouse Auditory and Visual Cortex: Laminar and Cell-Type Specificity. *Cerebral Cortex*, 26(6), 2612–2625.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhv099>
- Joesch, M., Mankus, D., Yamagata, M., Shahbazi, A.,

- Schalek, R., Suissa-Peleg, A., ... Sanes, J. R. (2016). Reconstruction of genetically identified neurons imaged by serial-section electron microscopy. *ELife*, 5(2016JULY), 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.15015>
- Karreman, M. A., Hyenne, V., Schwab, Y., & Goetz, J. G. (2016). Intravital Correlative Microscopy: Imaging Life at the Nanoscale. *Trends in Cell Biology*, 26(11), 848–863. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.003>
- Katz, Y., Menon, V., Nicholson, D. A., Geinisman, Y., Kath, W. L., & Spruston, N. (2009). Synapse Distribution Suggests a Two-Stage Model of Dendritic Integration in CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*, 63(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.023>
- Kennedy, M. J., & Hanus, C. (2019). Architecture and Dynamics of the Neuronal Secretory Network. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35(1), 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125418>
- Knott, G. W., Holtmaat, A., Trachtenberg, J. T., Svoboda, K., & Welker, E. (2009). A protocol for preparing GFP-labeled neurons previously imaged in vivo and in slice preparations for light and electron microscopic analysis. *Nature Protocols*, 4(8), 1145–1156. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.114>
- Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., & Svoboda, K. (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature Neuroscience*, 9(9), 1117–1124. <https://doi.org/10.1038/nn1747>
- Knott, G. W., Quairiaux, C., Genoud, C., & Welker, E. (2002). Formation of Dendritic Spines with GABAergic Synapses Induced by Whisker Stimulation in Adult Mice. *Neuron*, 34, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00663-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00663-3)
- Kobayashi, M., Hamada, T., Kogo, M., Yanagawa, Y., Obata, K., & Kang, Y. (2008). Developmental profile of GABAA-mediated synaptic transmission in pyramidal cells of the somatosensory cortex. *European Journal of Neuroscience*, 28(5), 849–861. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06401.x>
- Koch, C., Poggio, T., & Torre, V. (1983). Nonlinear interactions in a dendritic tree: localization, timing, and role in information processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(9), 2799–2802. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.9.2799>
- Korkotian, E., Frotscher, M., & Segal, M. (2014). Synaptopodin regulates spine plasticity: Mediation by calcium stores. *Journal of Neuroscience*, 34(35), 11641–11651. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0381-14.2014>
- Korogod, N., Petersen, C. C. H., & Knott, G. W. (2015). Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. *ELife*, 4(AUGUST2015), 1–17. <https://doi.org/10.7554/eLife.05793>
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., & McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology*, 116(1), 71–76. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0013>
- Krueger-Burg, D., Papadopoulos, T., & Brose, N. (2017). Organizers of inhibitory synapses come of age. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.04.003>
- Kubota, Y., Kondo, S., Nomura, M., Hatada, S., Yamaguchi, N., Mohamed, A. A., ... Kawaguchi, Y. (2015). Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *ELife*, 4(July 2015), 1–27. <https://doi.org/10.7554/eLife.07919>
- Kubota, Y., van Rijnsoever, C., Kondo, S., Karube, F., & Kawaguchi, Y. (2007). Neocortical Inhibitory Terminals Innervate Dendritic Spines Targeted by Thalamocortical Afferents. *Journal of Neuroscience*, 27(5), 1139–1150. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3846-06.2007>
- Lagache, T., Jayant, K., & Yuste, R. (2018). Electrodifusion model of synaptic potentials in dendritic spines. *BioRxiv*, (i), 274373. <https://doi.org/10.1101/274373>
- Lagache, T., Jayant, K., & Yuste, R. (2019). Electrodifusion models of synaptic potentials in dendritic spines. *Journal of Computational Neuroscience*, 47(1), 77–89.
- Larkum, M. E. (2009). Synaptic Integration in Tuft Dendrites. *Science*, 325(2009), 756–761. <https://doi.org/10.1126/science.1171958>
- Lees, R. M., Peddie, C. J., Collinson, L. M., Ashby, M. C., & Verkade, P. (2017). Correlative two-photon and serial block face scanning electron microscopy in neuronal tissue using 3D near-infrared branding maps. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 140). <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.03.007>
- Lefort, S., Tómm, C., Floyd Sarria, J. C., & Petersen, C. C. H. (2009). The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron*, 61(2), 301–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.020>
- Losonczy, A., Makara, J. K., & Magee, J. C. (2008). Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature*, 452(7186), 436–441. <https://doi.org/10.1038/nature06725>
- Loussert Fonta, C., & Humbel, B. M. (2015). Correlative microscopy. *Archives of Biochemistry and*

- Biophysics, 581, 98–110.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.05.017>
- Luckner, M., Burgold, S., Filser, S., Scheungrab, M., Niyaz, Y., Hummel, E., ... Herms, J. (2018). Label-free 3D-CLEM Using Endogenous Tissue Landmarks. *IScience*, 6, 92–101.
<https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.012>
- MacIachlan, C., Sahlender, D. A., Hayashi, S., Molnár, Z., & Knott, G. (2018). Block Face Scanning Electron Microscopy of Fluorescently Labeled Axons Without Using Near Infra-Red Branding. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12(November), 1–8.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00088>
- Maco, B., Holtmaat, A., Cantoni, M., Kreshuk, A., Straehle, C. N., Hamprecht, F. A., & Knott, G. W. (2013). Correlative In Vivo 2 Photon and Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy of Cortical Neurons. *PLoS ONE*, 8(2), 1–7.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057405>
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092.
<https://doi.org/10.1038/nn736>
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761–766.
<https://doi.org/10.1038/255243a0>
- Meißlitz-Ruppitsch, C., Röhrl, C., Neumüller, J., Pavelka, M., & Ellinger, A. (2009). Photooxidation technology for correlated light and electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 235(3), 322–335.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03220.x>
- Miermans, C. A., Kusters, R. P. T., Hoogenraad, C. C., & Storm, C. (2017). Biophysical model of the role of actin remodeling on dendritic spine morphology. *PLoS ONE*, 12(2), 1–14.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170113>
- Müller-Reichert, T., & Verkade, P. (2017). Correlative Light and Electron Microscopy III. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 140).
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511(7509), 348–352.
<https://doi.org/10.1038/nature13294>
- Nägerl, U. V., Köstinger, G., Anderson, J. C., Martin, K. A. C., & Bonhoeffer, T. (2007). Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(30), 8149–8156.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-07.2007>
- Nakahata, Y., & Yasuda, R. (2018). Plasticity of spine structure: Local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(AUG), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00029>
- Nevian, T., Larkum, M. E., Polsky, A., & Schiller, J. (2007). Properties of basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons: A direct patch-clamp recording study. *Nature Neuroscience*, 10(2), 206–214.
<https://doi.org/10.1038/nn1826>
- Ng, A. N., Doherty, A. J., Lombroso, P. J., Emptage, N. J., & Collingridge, G. L. (2014). Rapid regulation of endoplasmic reticulum dynamics in dendritic spines by NMDA receptor activation. *Molecular Brain*, 7(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1186/s13041-014-0060-3>
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*, 46(4), 609–622.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.015>
- Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C. R., Kitamura, K., Kano, M., ... Kasai, H. (2011). In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *The Journal of Physiology*, 589(10), 2447–2457.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.207100>
- Nusser, Z., Cull-Candy, S., & Farrant, M. (1997). Differences in synaptic GABAA receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron*, 19, 697–709.
- Nusser, Z., Hájos, N., Somogyi, P., & Mody, I. (1998). Increased number of synaptic GABAA receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*, 395, 172–177.
- Patrizio, A., & Specht, C. G. (2016). Counting numbers of synaptic proteins: absolute quantification and single molecule imaging techniques. *Neurophotonics*, 3(4), 041805.
<https://doi.org/10.1117/1.nph.3.4.041805>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... Duchesnay, É. (2011). Scikit-Learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12(Oct), 2825–2830.
- Popovic, M. A., Carnevale, N., Rozsa, B., & Zecevic, D. (2015). Electrical behaviour of dendritic spines as revealed by voltage imaging. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9436>
- Pulido, C., Trigo, F. F., Llano, I., & Marty, A. (2015). Vesicular Release Statistics and Unitary Postsynaptic Current at Single GABAergic Synapses. *Neuron*, 85(1), 159–172.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.006>
- Rajkovich, K. E., Loerwald, K. W., Hale, C. F., Hess, C. T.,

- Gibson, J. R., & Huber, K. M. (2017). Experience-Dependent and Differential Regulation of Local and Long-Range Excitatory Neocortical Circuits by Postsynaptic Mef2c. *Neuron*, 93(1), 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.022>
- Ramon y Cajal, S. (1899). *Regias y consejos sobre investigacion biologica*. Madrid Imprenta de Fontanet.
- Sarid, L., Bruno, R., Sakmann, B., Segev, I., & Feldmeyer, D. (2007). Modeling a layer 4-to-layer 2/3 module of a single column in rat neocortex: Interweaving in vitro and in vivo experimental observations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), 16353–16358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707853104>
- Sarid, L., Feldmeyer, D., Gidon, A., Sakmann, B., & Segev, I. (2015). Contribution of intracolumnar layer 2/3-to-Layer 2/3 excitatory connections in shaping the response to whisker deflection in rat barrel cortex. *Cerebral Cortex*, 25(4), 849–858. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht268>
- Scala, F., Kobak, D., Shan, S., Bernaerts, Y., LTURNUS, S., Cadwell, C. R., ... TOLIAS, A. S. (2018). Neocortical layer 4 in adult mouse differs in major cell types and circuit organization between primary sensory areas. *BioRxiv*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1101/507293>
- Segal, M. (2017). Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.007>
- Segal, M., & Korkotian, E. (2014). Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(JULY), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00064>
- Segev, I., & Rall, W. (1988). Computational Study of an Excitable Dendritic Spine. In *Journal of Neurophysiology* (Vol. 60). Retrieved from <http://jn.physiology.org/>
- Spacek, J., & Harris, K. M. (1997). Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 190–203. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-01-00190.1997>
- Stuart, G., & Spruston, N. (2015). Dendritic integration: 60 years of progress. *Nature Neuroscience*, 18(12), 1713–1721. <https://doi.org/10.1038/nn.4157>
- Stuart, G., Spruston, N., & Häusser, M. (2016). *Dendrites*. In Oxford University Press.
- Svoboda, K., Tank, D. W., & Denk, W. (1996). Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science*, 272(5262), 716–719. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.716>
- Takasaki, K., & Sabatini, B. L. (2014). Super-resolution 2-photon microscopy reveals that the morphology of each dendritic spine correlates with diffusive but not synaptic properties. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00029>
- Tanaka, J., Matsuzaki, M., Tarusawa, E., Momiyama, A., Molnar, E., Kasai, H., & Shigemoto, R. (2005). Number and Density of AMPA Receptors in Single Synapses in Immature Cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 25(4), 799–807. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4256-04.2005>
- Thestrup, T., Litzlbauer, J., Bartholomäus, I., Mues, M., Russo, L., Dana, H., ... Griesbeck, O. (2014). Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nature Methods*, 11(2), 175–182. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2773>
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678–685. <https://doi.org/10.1038/nn.3682>
- Tønnesen, J., & Nägerl, U. V. (2016). Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals. *Frontiers in Psychiatry*, 7(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00101>
- Tsang, T. K., Bushong, E. A., Boassa, D., Hu, J., Romoli, B., Phan, S., ... Ellisman, M. H. (2018). High-quality ultrastructural preservation using cryofixation for 3d electron microscopy of genetically labeled tissues. *ELife*, 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.35524>
- Tyagarajan, S. K., & Fritschy, J. M. (2014). Gephyrin: A master regulator of neuronal function? *Nature Reviews Neuroscience*, 15(3), 141–156. <https://doi.org/10.1038/nn.3670>
- van Versendaal, D., Rajendran, R., Saiepour, H. M., Klooster, J., Smit-Rigter, L., Sommeijer, J. P., ... Levelt, C. N. (2012). Elimination of Inhibitory Synapses Is a Major Component of Adult Ocular Dominance Plasticity. *Neuron*, 74(2), 374–383. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.015>
- Villa, K. L., Berry, K. P., Subramanian, J., Cha, J. W., Oh, W. C., Kwon, H. B., ... Nedivi, E. (2016). Inhibitory Synapses Are Repeatedly Assembled and Removed at Persistent Sites In Vivo. *Neuron*, 89(4), 756–769. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.010>
- Walton, J. (1979). *Lead an en Bloc Contrast Stain Particularly Ultrastructural Enzymology ' Useful for. Health* (San Francisco).
- Williams, S. R., & Stuart, G. J. (2002). Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical

- pyramidal neurons. *Science*, 295(5561), 1907–1910.
<https://doi.org/10.1126/science.1067903>
- Williams, S. R., & Stuart, G. J. (2003). Role of dendritic synapse location in the control of action potential output. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 147–154.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00035-3)
- Yasuda, R. (2017). Biophysics of Biochemical Signaling in Dendritic Spines: Implications in Synaptic Plasticity. *Biophysical Journal*, 113(10), 2152–2159.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.029>
- Yuste, R. (2013). Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 36(1), 429–449. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150455>

Figures

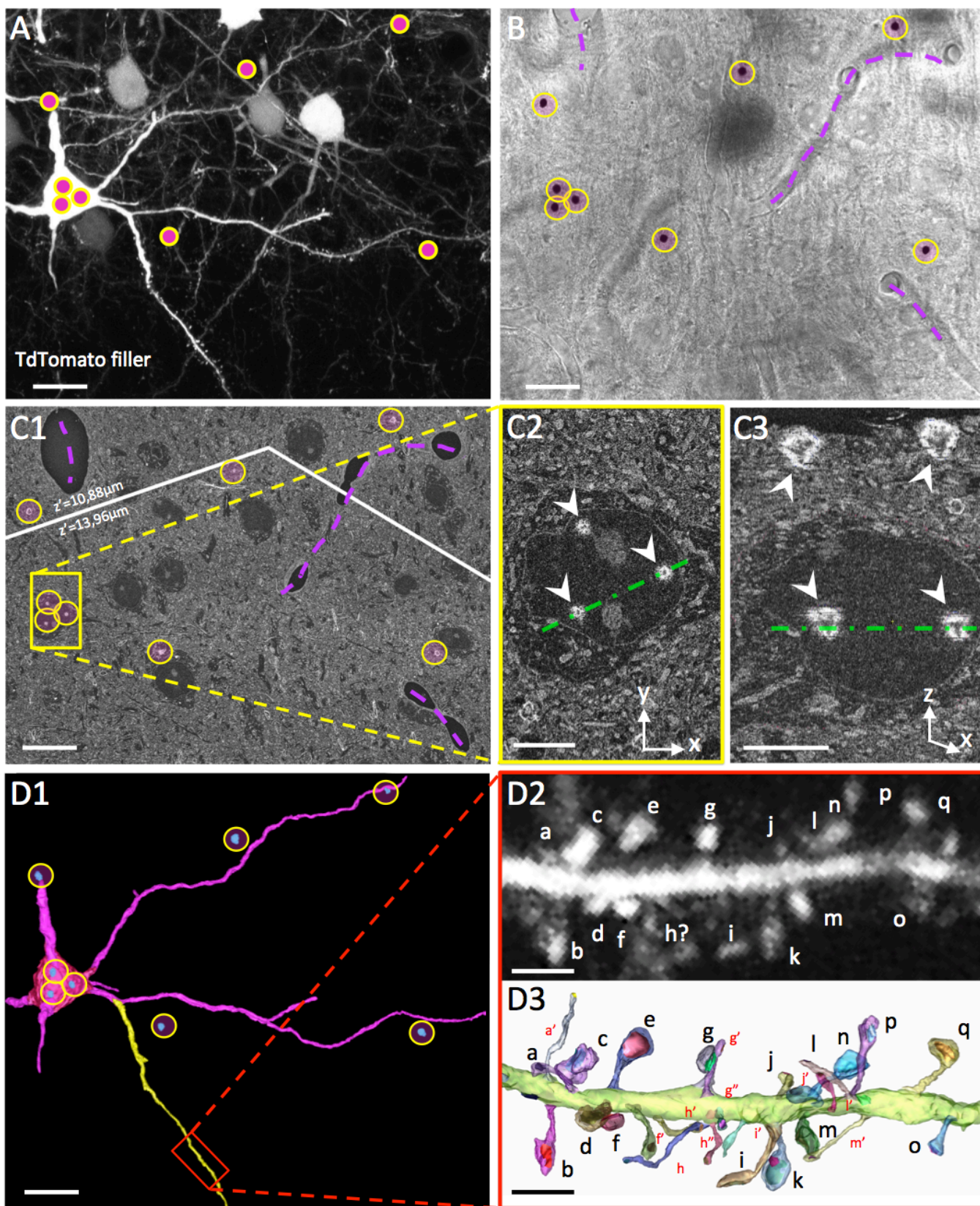


Figure 1 – CLEM imaging of identified spines within intact cortical circuits.

(A) Visualization of basal dendrites of a pyramidal neuron expressing cytosolic TdTomato, in layers 2/3 (L2/3) of adult mouse somatosensory cortex. Pink dots indicate coordinates at which diaminobenzidine (DAB) was photo-precipitated using focused UV light.

(B) Transmitted light image of the same field of view (FOV) after DAB photo-precipitation. Black landmarks highlighted in pink correspond to the DAB precipitates in A. Intrinsic landmarks (blood vessels) are outlined with purple dashed lines.

(C1) Composite Scanning EM (SEM) revealing DAB patterning at the depth of the neuron of interest (outlined in pink). Slight angular mismatch between LM and SEM observation planes resulted in DAB landmarks appearing in different z-planes : white line represents stitching boundaries between assembled images. Blood vessels are outlined in purple. Landmarks are arranged as in B.

(C2) Close-up on the soma of the electroporated neuron, labeled with three DAB landmarks (arrowheads).

(C3) Orthogonal (x,z) view of the SEM stack along the green dashed line in C2. DAB landmarks from both superficial and deeper layers of the 3D-labeling pattern are marked with white arrowheads. Superficial DAB layer enabled targeting the ROI, and the deeper layer enabled identifying the target neuron retrospectively.

(D1) 3D-reconstruction of the dendrites of interest, from the large-field SEM stack. DAB landmarks are segmented in blue and highlighted in yellow, and the targeted dendrite is colored in yellow. The red rectangle outlines the portion of dendrite represented in D2 and D3.

(D2) Z-projection of the confocal stack corresponding to the portion of dendrite reconstructed in D3. Letters identify individual spines.

(D3) 3D-EM reconstruction. Individual dendritic spines are manually segmented and randomly colored. Spines that were detected in EM but not in LM have red labels.

Scale bars : (A, B, C1, D1) 10 μ m (C2, C3) 5 μ m (D2, D3) 2 μ m.

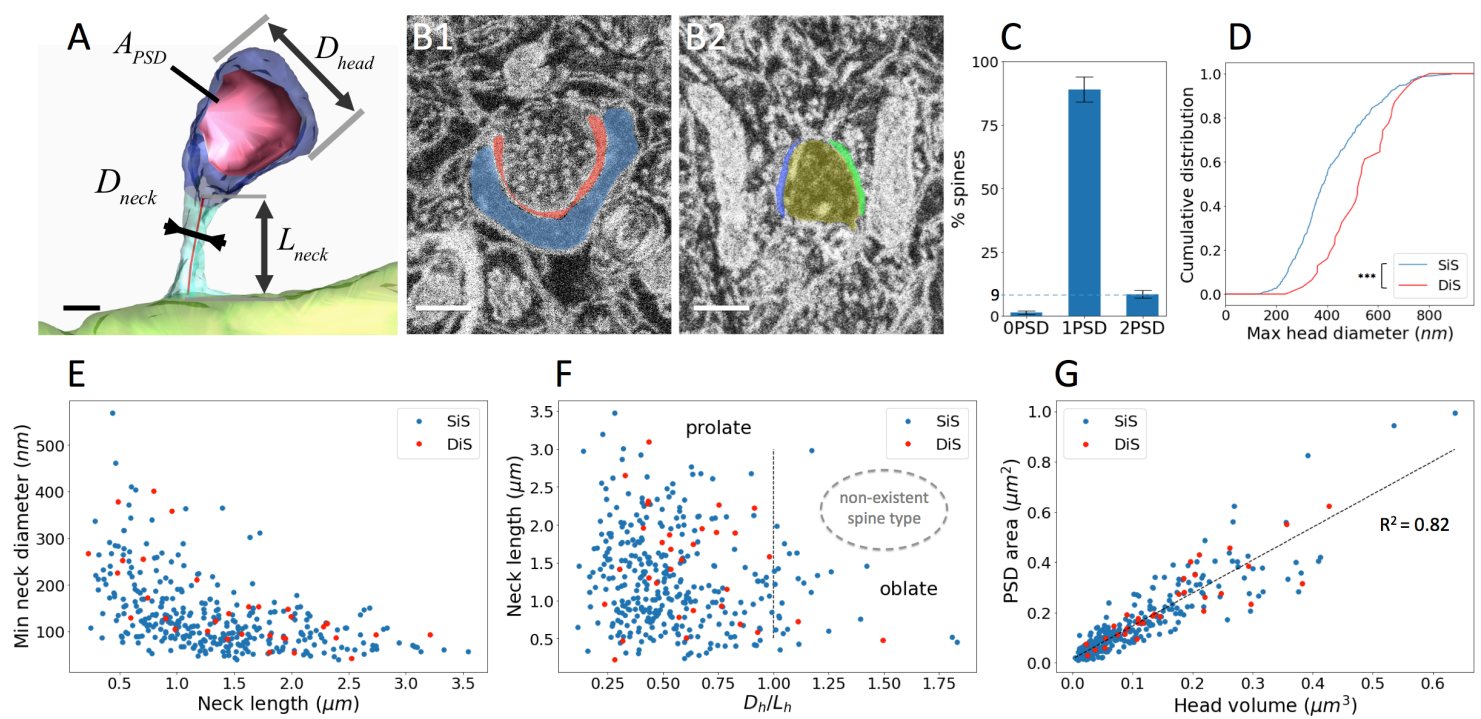


Figure 2 – Spine morphometry along basal dendrites.

(A) Example of a dendritic spine reconstructed in 3D from a SEM stack. Dendritic shaft is segmented in light green, spine neck in turquoise, spine head in blue and PSD surface in red. The following morphological parameters were measured : PSD area, head diameter, neck diameter and neck length.

(B) Examples of spines visualized in SEM by one (B1, singly-innervated spine, or SiS) or two presynaptic terminals (B1, dually-innervated spine, or DiS). In B1 : Spine head is segmented in blue and PSD in red. In B2 : Spine head is segmented in yellow and individual PSDs in blue and green.

(C) Proportion of spines harboring 0, 1 or 2 synaptic contacts that were visualized in EM.

(D) Quantification of maximal spine head diameter for SiS and DiS. $N=337$ and 34 , respectively. $p < 10^{-4}$ following Mann-Whitney test.

(E) Plot of the minimal spine neck diameter, and spine neck length. Spearman correlation coefficient is -0.58 . SiS and DiS are represented in blue and red, respectively. Note that long spines (neck length $> 2 \mu\text{m}$) always have thin necks (neck diameter $< 0.2 \mu\text{m}$)

(F) Neck length as a function of spine head orientation, as quantified by the ratio of spine head diameter (D_h) over its length (L_h). $D_h/L_h < 1$ corresponds to a prolate spine head, which shape is stretched longitudinally with respect to its neck. $D_h/L_h > 1$ characterizes an oblate spine head, oriented orthogonally to its neck. Dashed line corresponds to $D_h/L_h = 1$. We did not observe any oblate spine with a long neck.

(G) Linear correlation of PSD area and spine head volume ($R^2=0.82$). Blue : SiS. Red : largest PSD on DiS.

Scale bars : (A, B1, B2) 300nm .

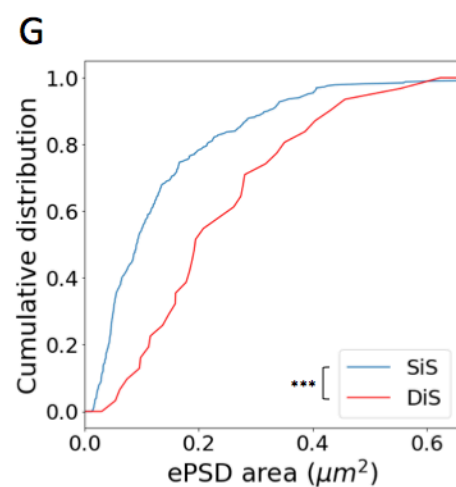
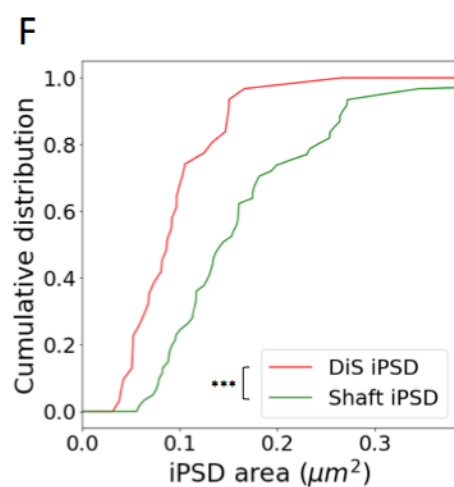
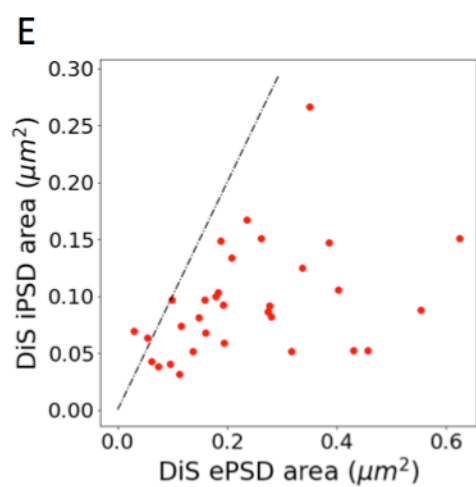
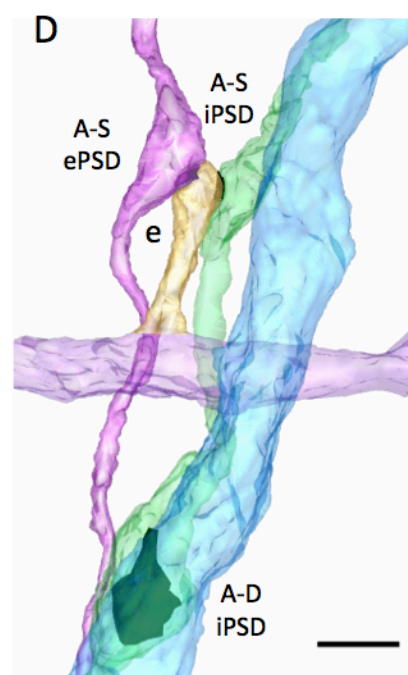
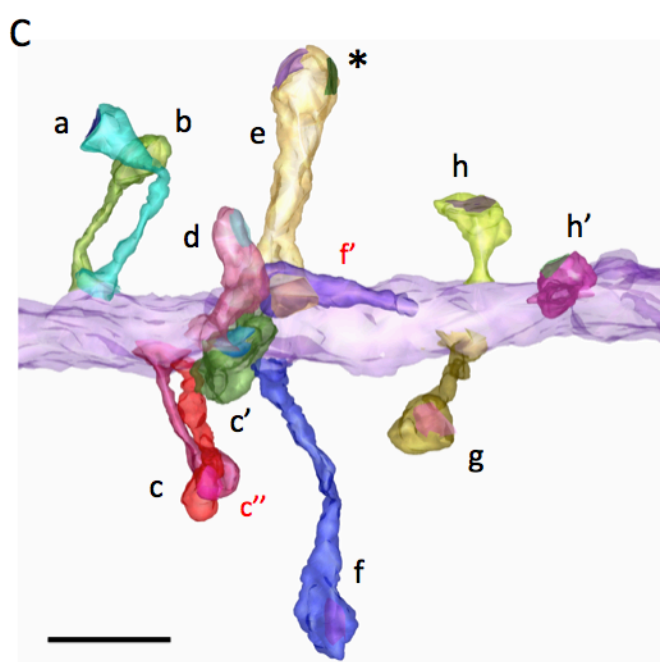
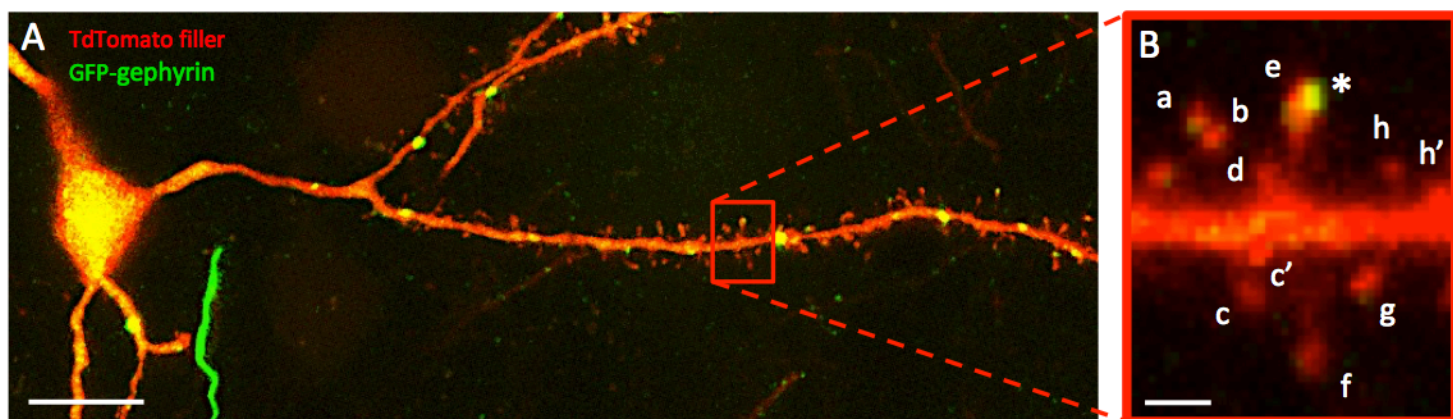


Figure 3 – Identification of synaptic types on DiS using CLEM.

(A) Confocal image of basal dendrites of a cortical L2/3 PN, electroporated with both cytosolic TdTomato and GFP-GPHN to label inhibitory synapses. The red rectangle is enlarged in B.

(B) Portion of dendrite harboring a dendritic spine (spine labeled «e» and marked with an asterisk) containing a cluster of gephyrin, and corresponding to a putative DiS contacted by both an excitatory and an inhibitory presynaptic terminal.

(C) 3D-EM reconstruction of the fragment of dendrite in B. Dendritic shaft is colored in purple; individual spines and PSDs are randomly colored. Spines visible in EM but not in LM are labeled in red. As the GFP-GPHN cluster is located on the right side of the head of spine «e» in B, the PSD colored in green in C can be identified as an inhibitory PSD (iPSD). The lack of GFP-GPHN on the opposite side indicates an excitatory PSD (ePSD), colored in magenta in C.

(D) Sparse 3D-SEM reconstruction of spine «e» with its presynaptic partners. Axons forming axo-spinous (A-S) contacts on spine «e» are reconstructed in magenta and green. The «green» axon forms an axo-dendritic (A-D) synaptic contact with a neighboring dendrite (reconstructed in blue), indicating that the axon is inhibitory.

(E) Plot of iPSD area as a function of ePSD area in individual DiS. N=34. The dashed line ($y = x$) highlights that ePSDs are larger than iPSDs for most DiS. N=34

(F) Quantification of the area of DiS iPSDs and shaft iPSDs. N=34 and 61, respectively. $p < 10^{-6}$ Mann-Whitney test.

(G) Quantification of ePSD area in SiS and DiS. $p < 10^{-5}$ Mann-Whitney test.

Scale bars: (A) 10 μ m (B, C, D) 1 μ m.

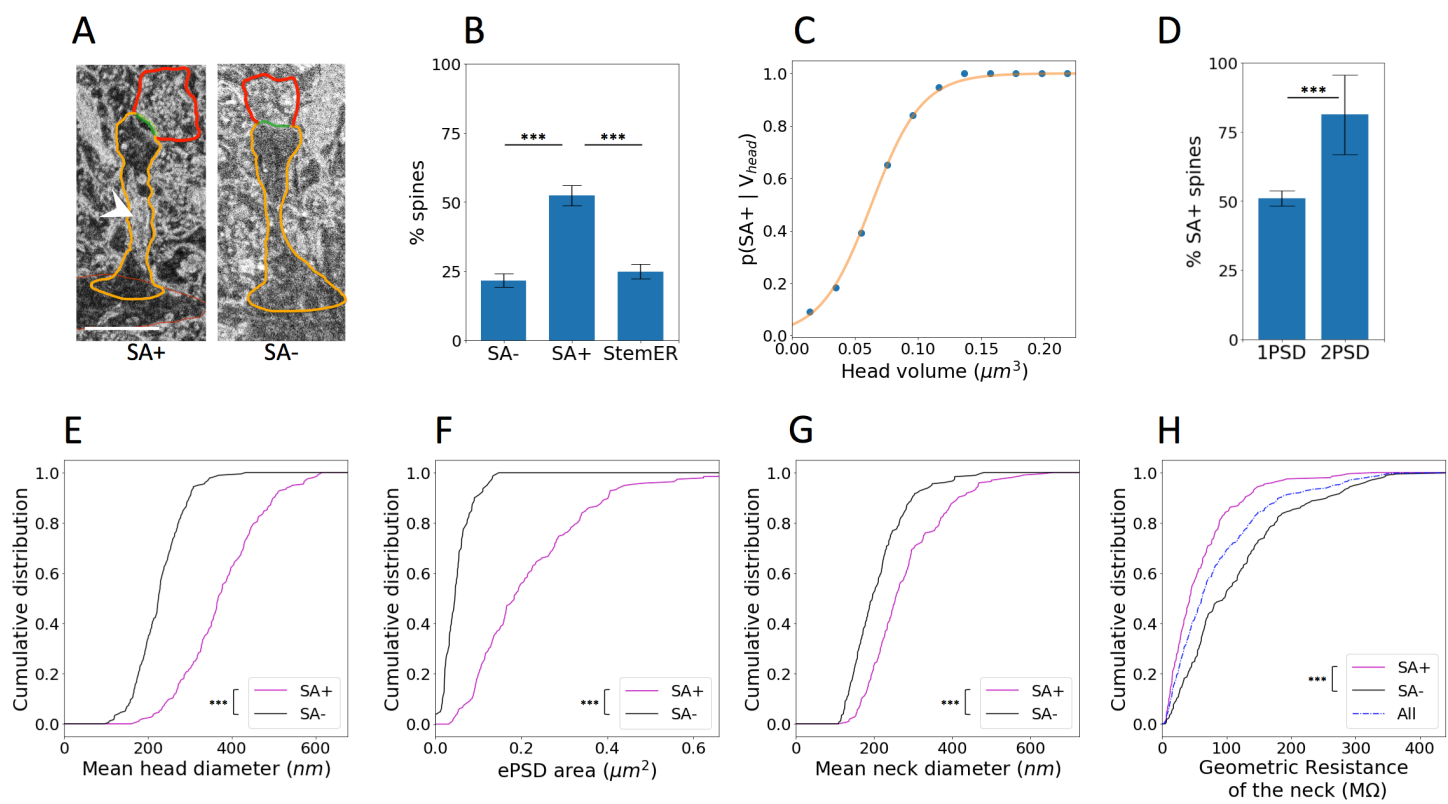


Figure 4 – Ultrastructural characterization of spines with or without spine apparatus.

(A) SEM images of spines with (SA+, left) or without (SA-, right) spine apparatuses. Orange line : contour of the spine. Red line : contour of the presynaptic bouton. Arrowhead : spine apparatus. Scale bar: 1 μ m.

(B) Proportion of SA- spines, SA+ spines, and spines associated with smooth ER at the junction between the dendritic shaft and the spine neck (StemER).

(C) Quantification of mean neck diameter for SA- and SA+ spines. N=81 and 196, respectively. $p < 10^{-12}$ Mann-Whitney test.

(D) Quantification of the electrical resistance of the spine neck, as calculated in silico based on neck morphology. $p < 10^{-5}$ Mann-Whitney

(E) Quantification of mean head diameter. $p < 10^{-38}$ Mann-Whitney

(F) Quantification of ePSD area. $p < 10^{-40}$ Mann-Whitney

(G) Probability of harboring a SA as a function of spine head volume. Raw data in blue and sigmoid fit in orange.

(H) Probability of harboring a SA for SiS and DiS. N=337 and 34, respectively. $p < 10^{-10}$ using Pearson's χ^2 test.

Histograms in B and D represent mean $\pm$ SEM.

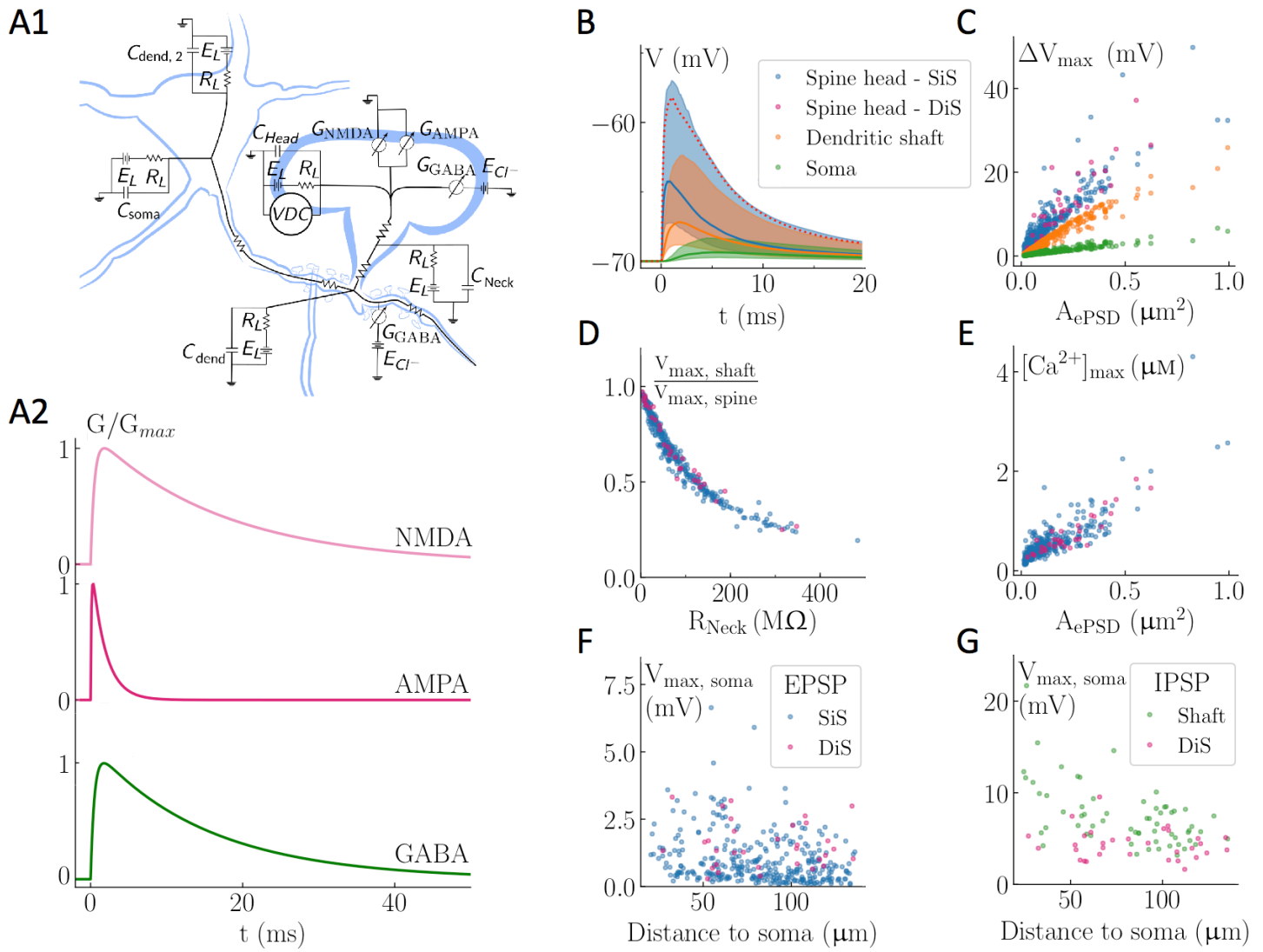


Figure 5. Morphologically-constrained model of synaptic signaling.

(A1) Sketch of the circuit model. All compartments include passive resistor-capacitor circuits to model cell membrane properties and, optionally, active conductances to model voltage-dependent currents (VDC) of calcium, sodium and potassium ions. Spines feature an excitatory synapse comprising AMPA and NMDA currents. Spines and dendritic compartments can also harbor GABAergic synapses to model iPSDs either on DiS or on the shaft.

(A2) Representative time-courses of synaptic inputs. In the model, activation of an excitatory synapse corresponds to summed AMPA and NMDA input conductances (magenta curves). Activation of an inhibitory synapse corresponds to the GABA input conductance (green). AMPA, NMDA and GABA conductances were scaled to PSD area, and defined using typical receptor kinetics (see Methods).

(B) Simulation of membrane depolarization time-course following the activation of an excitatory synapse, taking into account measured spine diversity based on morphological measurements including R_{neck} , R_{head} , ePSD area and distance to soma. Colors code for the location of recording as follows : excited spine head in blue proximal dendritic compartment in orange and soma in green. The median voltage transient simulated in DiS is plot as a dashed magenta line. Solid lines represent medians of the distributions. Shaded areas represent 68% confidence intervals and span approximately one standard deviation to the mean.

(C) Amplitude of the depolarization in excited spine head (blue), excited DiS (magenta), proximal dendritic compartment (orange) and soma (green) as a function of ePSD area.

(D) Ratio of depolarization amplitude in spine heads over parent dendritic shaft, as a function of neck geometrical resistance.

(E) Amplitude of estimated calcium influx through NMDA receptors and VDCs as a function of ePSD area.

(F) Depolarization amplitude calculated in the soma as a function of the distance between soma and spine.

(G) Depolarization amplitude calculated in the soma, as a function of PSD distance to soma, when setting the chloride reversal potential to 0mV and activating inhibitory synapses located either on dendritic shafts (green) or in DiS (magenta). $N= 61$ and 34 , respectively.

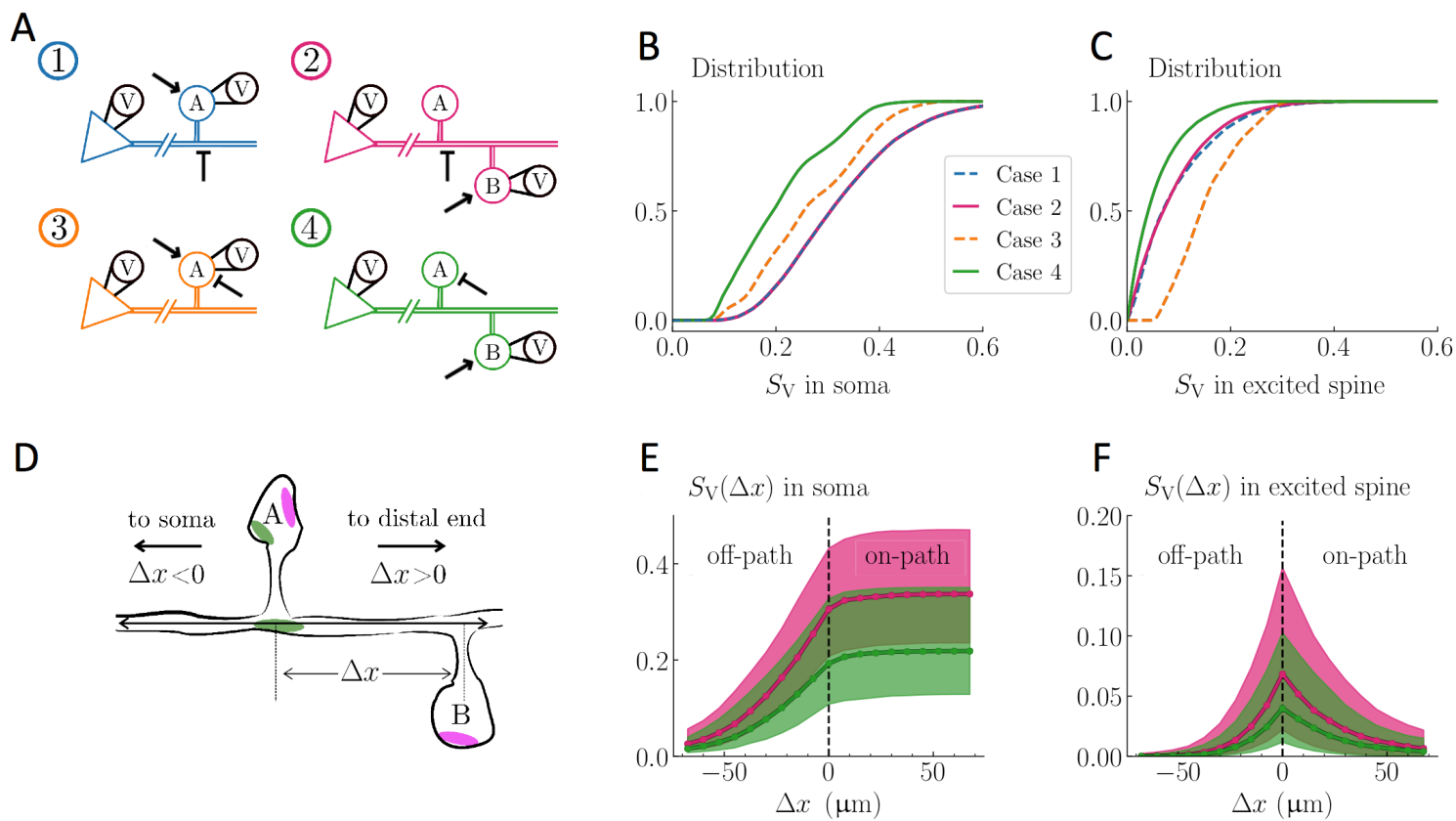


Figure 6. Effect of PSD locations on the integration of paired EPSPs and IPSPs.

(A) Sketch of the main situations for local integration of a pair of coincident EPSP and IPSP. In the simulations, one DiS (spine A) and one iPSD were placed at a random dendritic location. A second spine (spine B) was placed $\Delta x = 0.7\mu m$ distally to spine A. Coincident EPSP and IPSP were elicited, with EPSP either in spine A or B (arrow) and IPSP either in spine A or in the dendritic shaft ($\top$ symbol). We examined four combinations : 1) EPSP in A and IPSP in shaft (blue); 2) EPSP in B and IPSP in shaft (magenta); 3) EPSP in A and IPSP in A (orange); 4) EPSP in B and IPSP in A (green). Simulated depolarizations were monitored in both the soma and the excited spine head (black round symbols).

(B-C) Cumulative distribution of the depolarization amplitude attenuation level between uninhibited and inhibited cases, S_V , calculated in the soma (B) or in the stimulated spine head (C).

(D) Sketch of the protocol for simulating the effect of interspine distance on dendritic integration. Cases number 2 and 4 from panel A were simulated with a varying distance Δx between spines A and B.

(E-F) Voltage attenuation level S_V calculated in the soma (E) or in the stimulated spine head (F), as a function of Δx , in cases 2 (EPSP in B and IPSP in shaft; magenta) and 4 (EPSP in B and IPSP in A; green).

Solid lines represent medians. Shaded areas represent 68% confidence intervals.

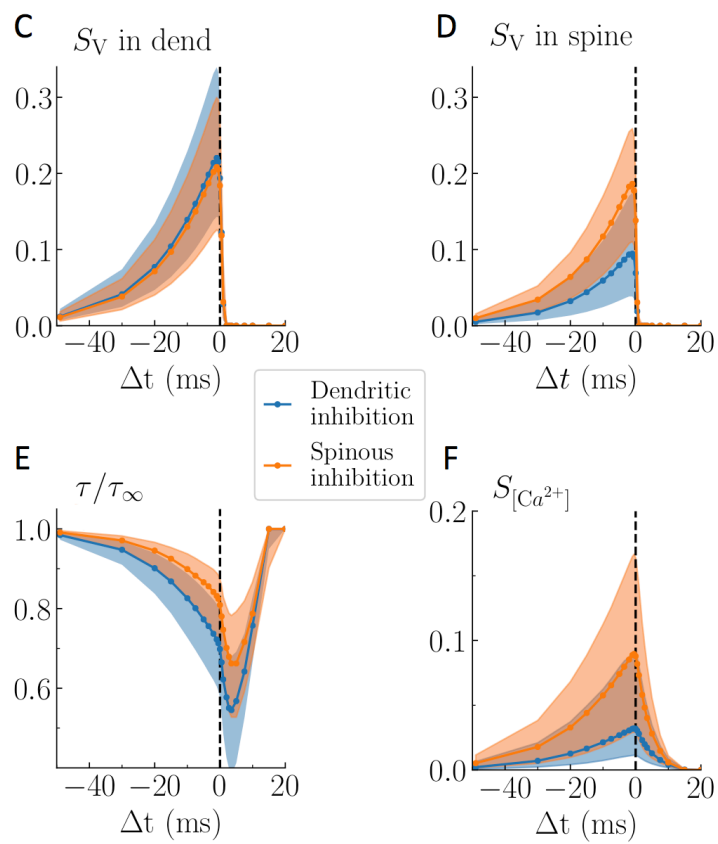
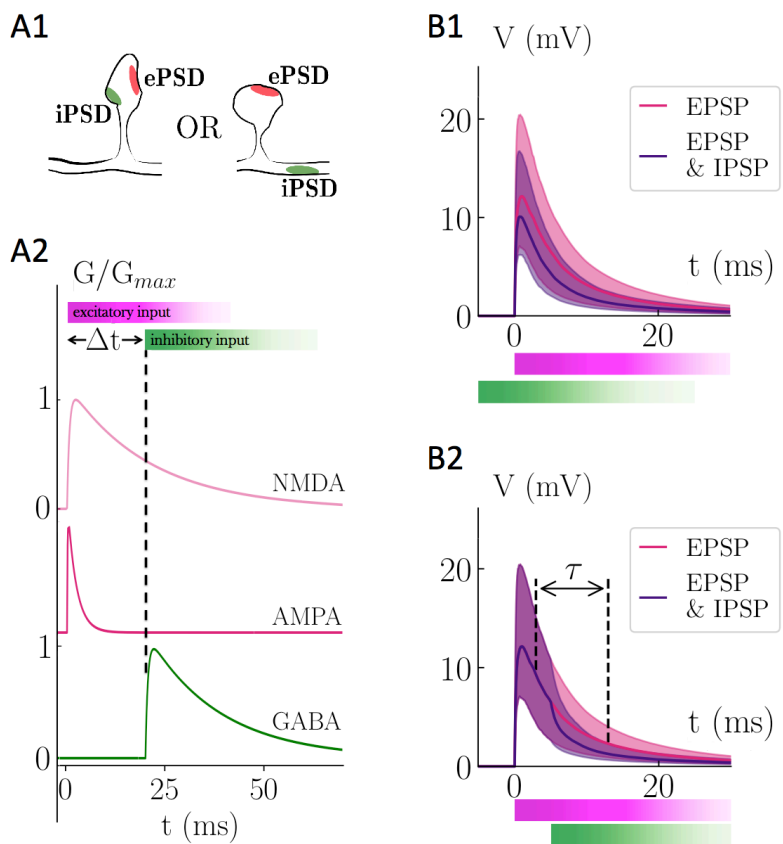


Figure 7. Effect of input timing on the integration of paired EPSPs and IPSPs.

(A) Sketch of the simulation protocol.

(A1) We consider either one DiS (left), or one SiS paired to a shaft inhibitory synapse located $1.4\mu\text{m}$ away from the spine stem (right).

(A2) Delayed input conductance time-courses. In both cases represented in (A1), the excitatory synapse is activated $t=0$, activating both NMDA and AMPA receptors (magenta curves). After a signed time interval Δt , GABA release occurs at the inhibitory synapse and activates GABAA receptors (green curve). The sign of Δt specifies the order of excitatory and inhibitory inputs. Fading color bars above the input conductance time-courses represent fading excitatory and inhibitory inputs (magenta and green, respectively).

(B1-B2) Examples of spine head depolarization time-courses in bDiS with $\Delta t = \pm 5 \text{ ms}$ (black curves) or no inhibition (magenta curves). Solid lines represent medians of the distributions. Shaded areas represent the 68% central region interval of the distributions. Input kinetics are displayed as color bars below each curve, as in (A2). 80-to-20% decay time of the uninhibited transient is represented in black dashed lines in (B2).

(C-D) Comparison of voltage attenuation level S_V induced by dendritic (orange) or spinous (blue) inhibition calculated in the parent dendritic shaft (C) or in the excited spine (D), as a function of Δt .

(E) Comparison of 80-to-20% decay time of attenuated depolarizations in the excited spine head, τ , normalized to that of uninhibited cases, τ_∞ , as a function of Δt , for dendritic (orange) or spinous (blue) inhibitory inputs.

(F) Calcium transient attenuation level $S_{[\text{Ca}^{2+}]}$ in the excited spine head, as a function of Δt , for dendritic (orange) or spinous (blue) inhibitory inputs.

Supplementary Figures

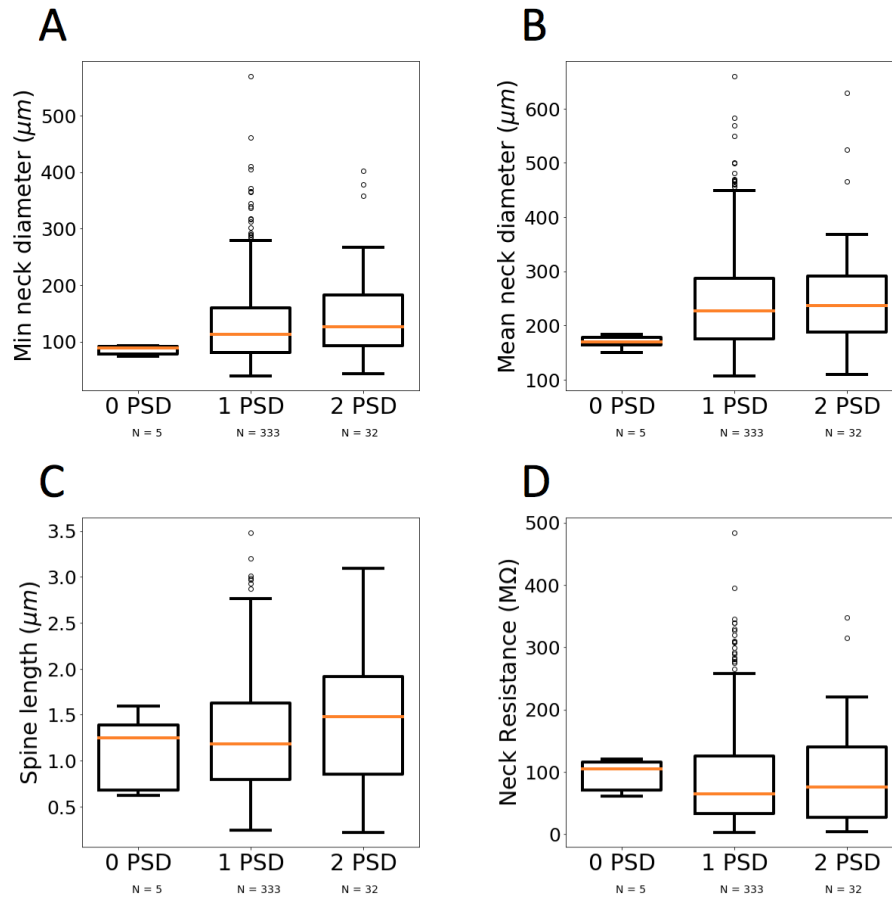


Figure S1. Neck parameters are not statistically different between SiS and DiS.

Comparison of spine neck parameters between spines harboring no, one or two synaptic contacts. (A) Minimal neck diameter (B) Mean neck diameter (C) Neck length (D) Neck resistance. $p > 0.1$ when comparing spines harboring 1 or 2 synapses for all four parameters. $N = 5 ; 333 ; 32$ respectively.

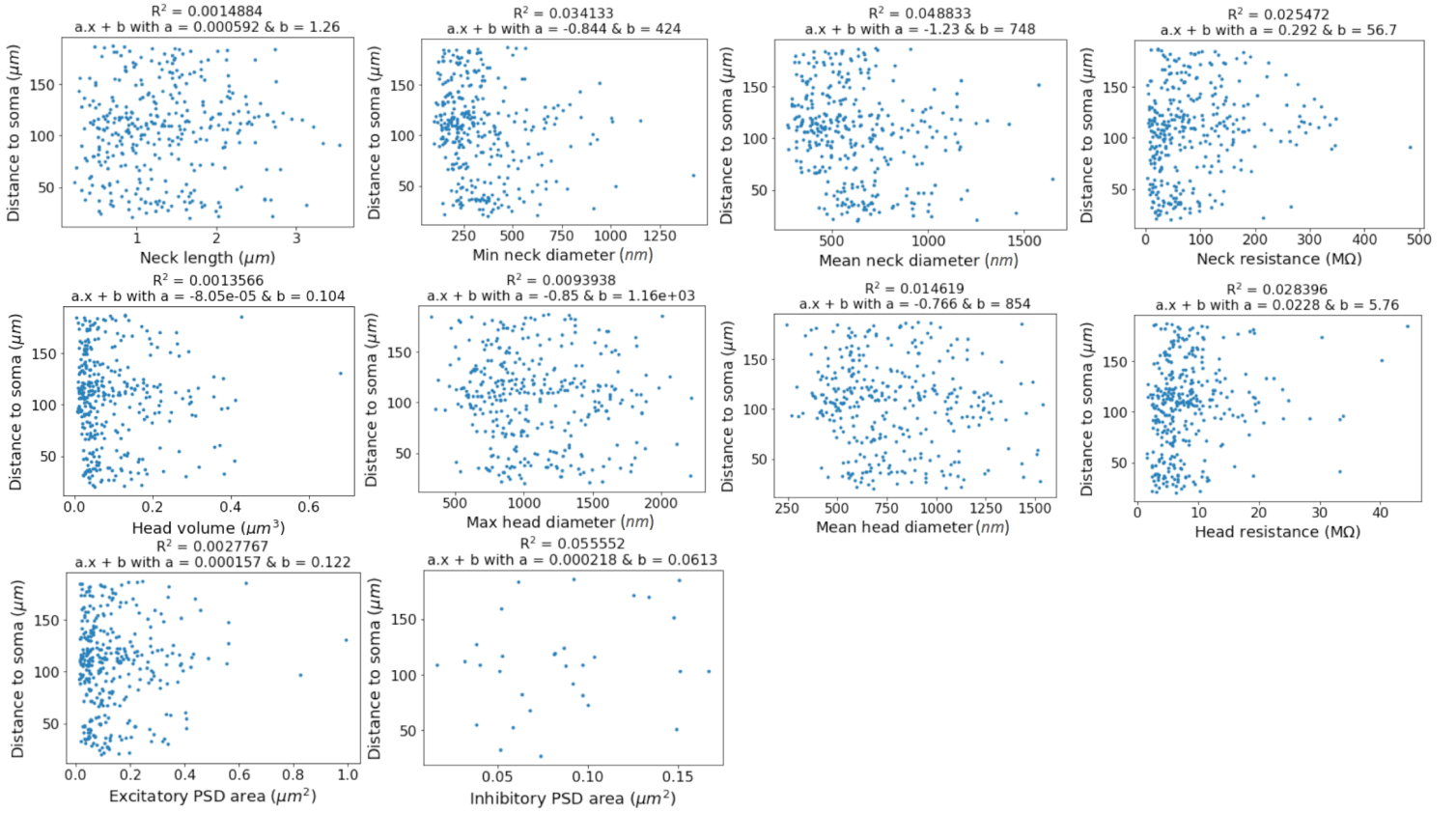


Figure S2. Distance between spine and soma does not correlate with measured parameters.

Distance between spine and soma plotted against all measured morphological parameters for the 375 segmented spines. No parameter exhibit linear correlation with the distance between spine and soma.

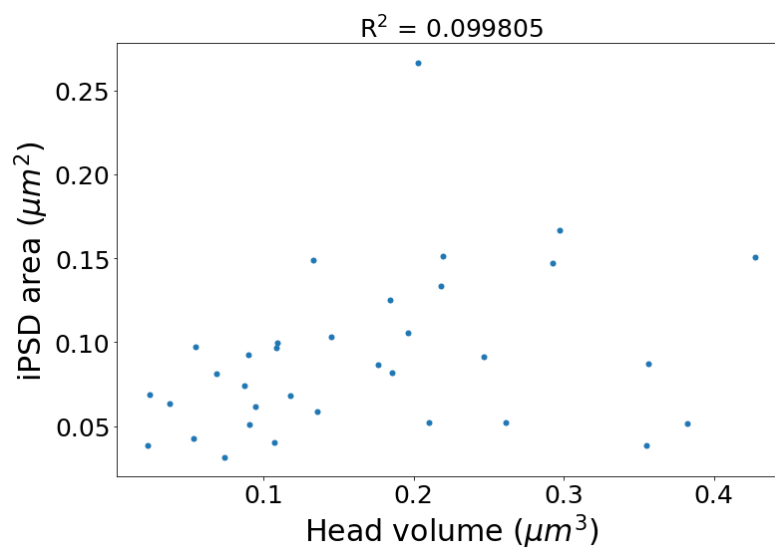


Figure S3. Inhibitory PSD area does not correlate with DiS head volume.

Plot of inhibitory PSD area as a function of spine head volume for $n=34$ DiS. Linear regression : $R^2 < 0.1$

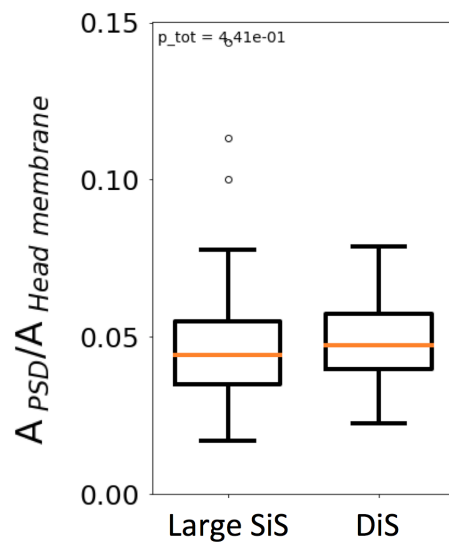


Figure S4. Large SiS harbor as large ePSDs as DiS.

Comparison of PSD area over spine head membrane area for SiS with a head larger than the 10% smaller DiS, and DiS. $p > 0.1$.

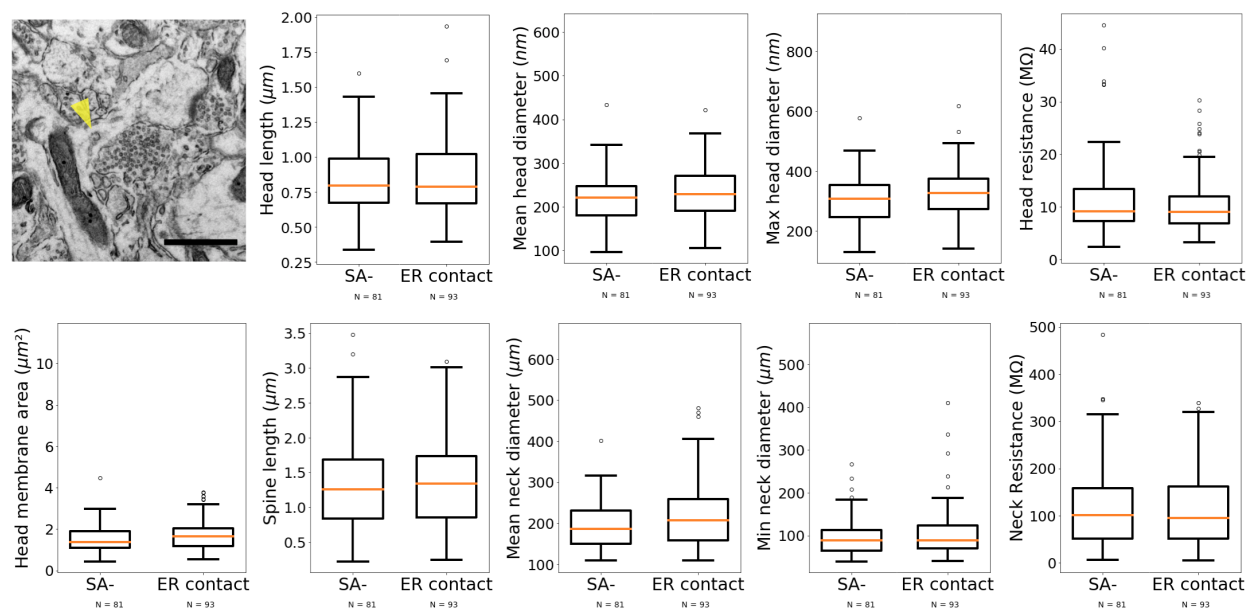


Figure S5. ER-contacted spines are morphologically equivalent to spine with no SA.

(Top left) TEM image of a spine contacted by ER (arrowhead) but exhibiting no spine apparatus. Scale bar : 1 μm (Other panels) Morphological parameters for spines with no SA, contacted or not by ER. None of the differences is significant. $p > 0.1$.

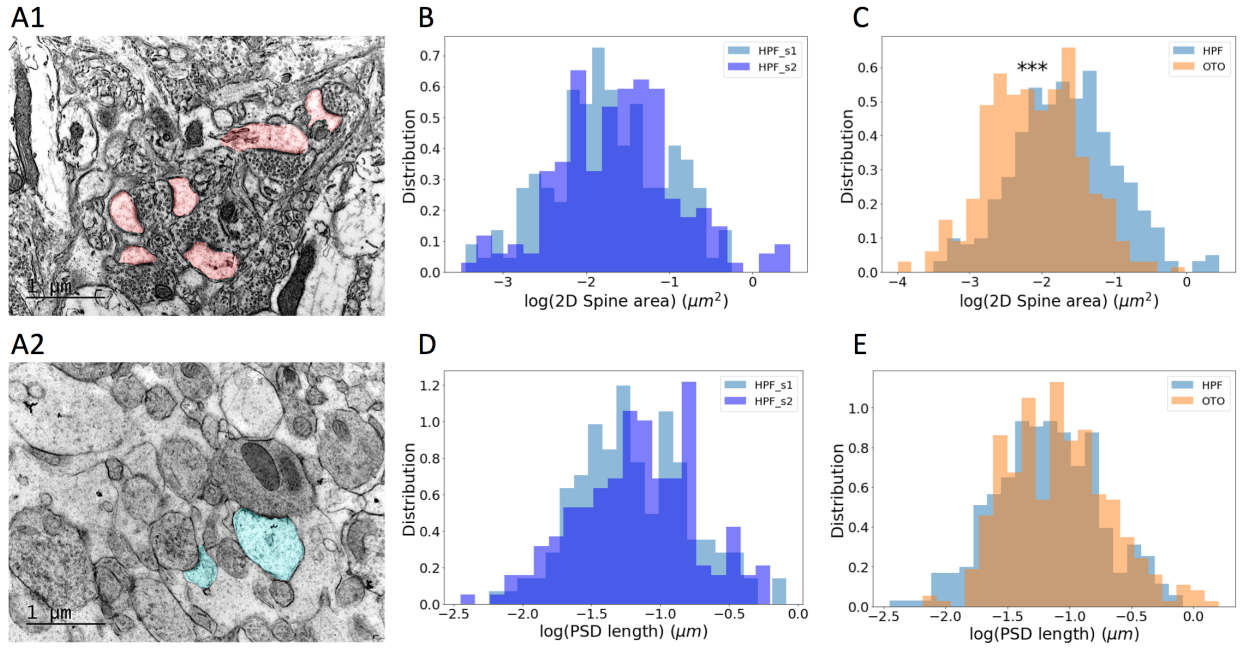


Figure S6. Fixation-induced shrinkage of spine head volume, but not PSD area.

(A1-A2) TEM images of OTO-prepared (A1) of HPF-frozen (A2) L2/3 SSC tissue. Spine head sections and the length of their PSD were segmented out for quantification (red and blue respectively). (B) Spine head cross-section area distribution for each HPF-frozen sample ($N = 145$ & 179 respectively) Mann-Whitney test: $p > 0.05$. (C) Spine head cross-section area distribution for pooled HPF-frozen samples against OTO-prepared sample ($N=346$) Mann-Whitney test: $p < 10^{-15}$. (D) PSD section length distribution for each HPF-frozen sample. Mann-Whitney test: $p > 0.5$. (E) Spine head cross-section area distribution for pooled HPF-frozen samples against OTO-prepared sample. Mann-Whitney test: $p > 0.01$.

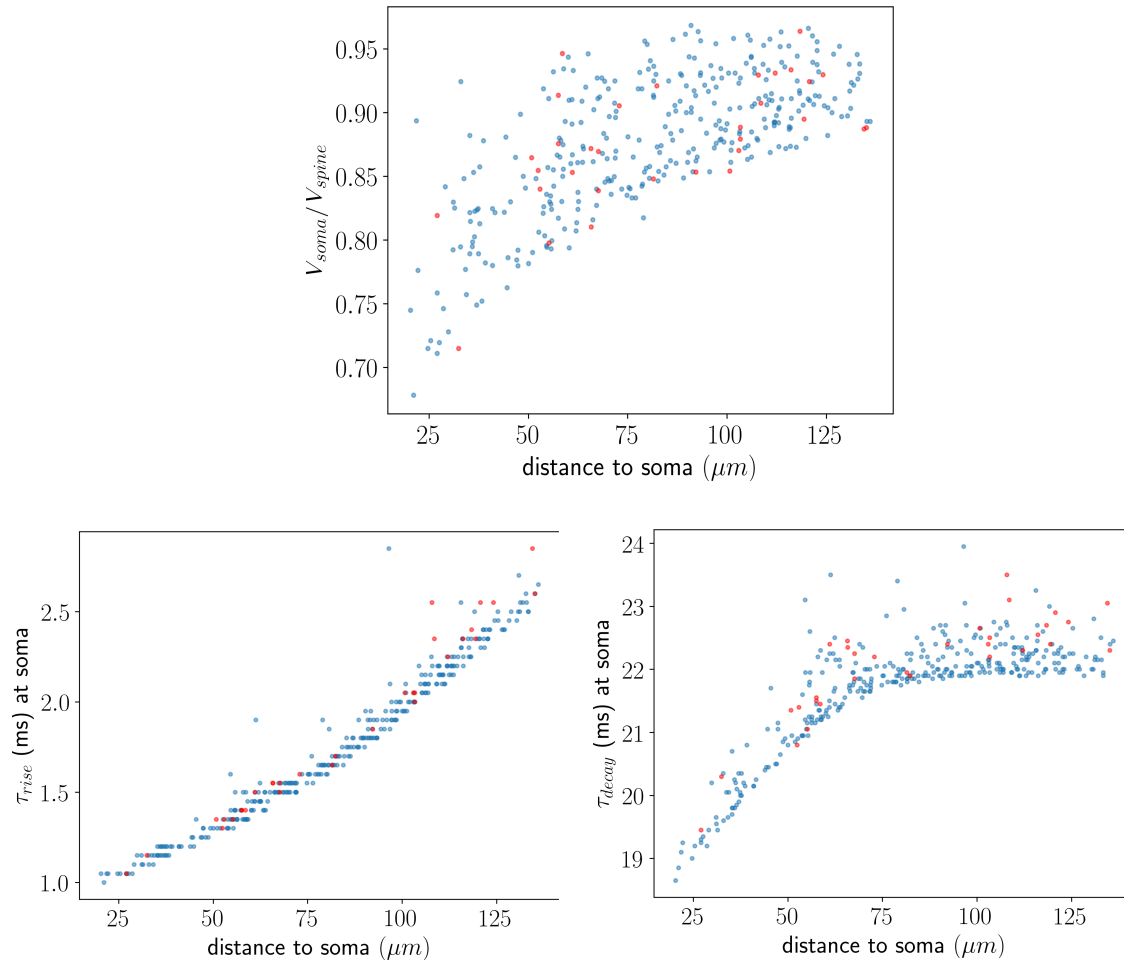


Figure S7. Model validation.

(Upper panel) Modeled $\frac{\Delta V_{max,soma}}{\Delta V_{max,spine}}$ as a function of the linear distance to the soma, for the 375

segmented spines. SiS in blue & DiS in red in all panels. (Lower panels) Rise (left) and decay (right) time of somatic depolarization following EPSP elicitation in the 375 segmented spines.

Ranges are in line with published results

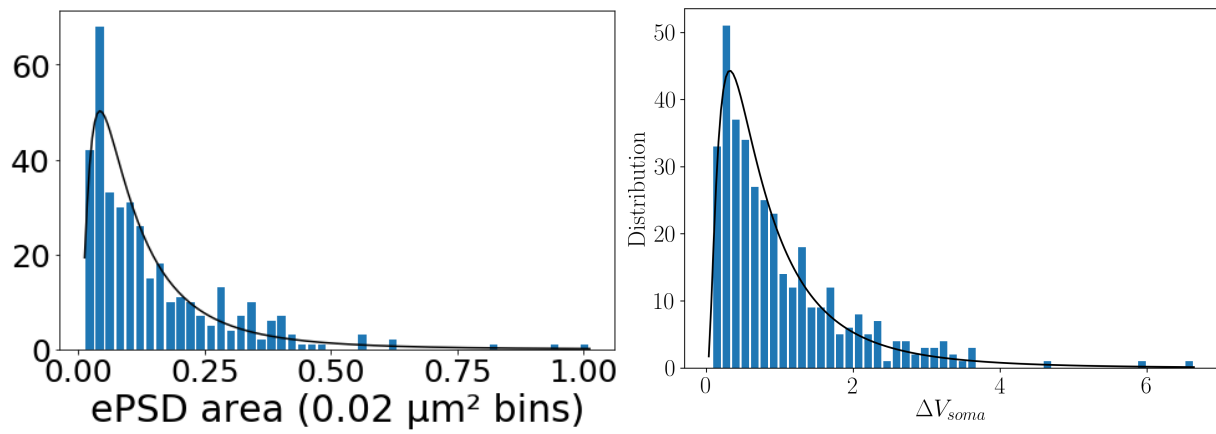


Figure S8. Log-normal shape of A_{ePSD} is transferred to ΔV_{max} .

(A) Distribution of measured ePSD areas. (B) Distribution of measured ΔV_{max} in the soma following the activation of an excitatory synapse.

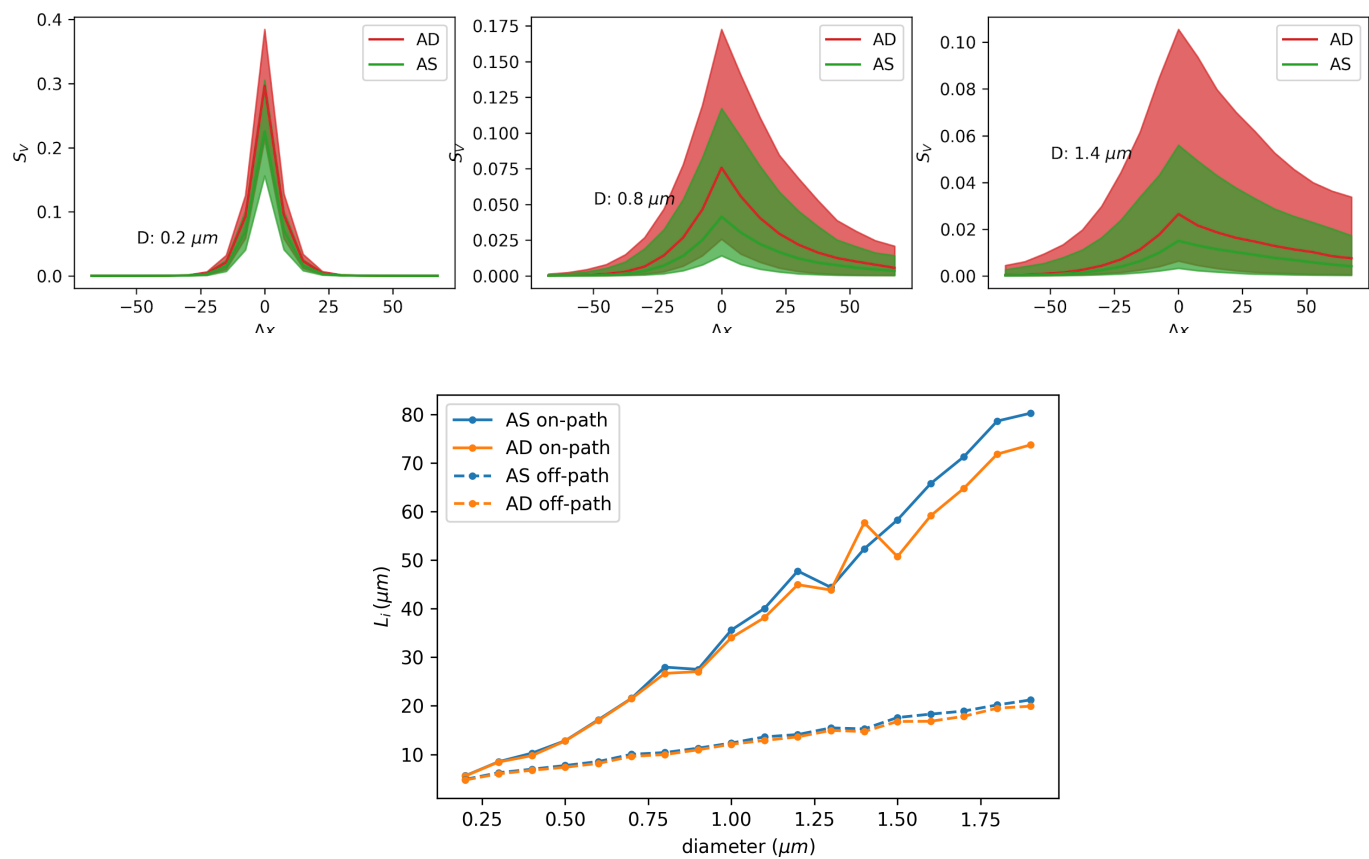


Figure S9. Impact of varying dendritic diameter on electrotonic lengths.

(A-C) Spatial decaying effect of inhibition (D) Decaying length of exponential fits for different dendritic diameters.

DISCUSSION

Au cours de ma thèse, j'ai mis au point un procédé de microscopie corrélative optique-électronique 3D (CLEM 3D) combinant microscopie confocale et SBEM pour reconstruire l'architecture 3D d'épines dendritiques identifiées *in vivo*. Les travaux de développement réalisés en première partie de thèse ont permis de surmonter :

- L'incompatibilité intrinsèque des protocoles standards de préparation d'échantillon en LM et en EM,
- La difficulté de retrouver, en EM, une ROI micrométrique observée en LM au sein d'un volume de tissu,
- L'absence de méthodologie prête à l'emploi pour quantifier les paramètres morphologiques 3D d'épines observées en SBEM.

J'ai appliqué ce protocole CLEM 3D aux dendrites basales de neurones pyramidaux ciblés dans les réseaux neuronaux du cortex somato-sensoriel (SSC) de souris adultes afin de :

- réaliser la morphométrie d'épines ciblées dans un contexte cellulaire et subcellulaire caractérisé,
- quantifier les particularités morphologiques d'épines porteuses d'un appareil épineux et/ou d'un contact inhibiteur axo-spinal,
- paramétrer d'un modèle électrochimique de l'intégration synaptique pour quantifier, d'une part, la compartimentation des signaux électriques par les épines reconstruites, et pour aborder, d'autre part, le rôle des contacts inhibiteurs axo-spinaux.

L'ensemble de ces résultats permet de discuter différents points concernant le développement des approches de CLEM 3D, la possibilité de combiner SBEM et SMLM dans du tissu cérébral pour comprendre la nano-organisation synaptique et, plus généralement, les possibilités offertes par la CLEM pour faire le lien entre l'organisation nanoscopique et les fonctions macroscopiques de systèmes biologiques très divers, en conditions basales et pathologiques.

I. Facilitation des protocoles de CLEM

L'une des limitations majeures au rendement des approches de CLEM 3D provient de leur difficulté de mise en œuvre (Bishop et al., 2014). Les protocoles requièrent jusqu'à plusieurs semaines, et certaines étapes posent de véritables défis techniques aux microscopistes les plus expérimentés, comme en témoigne le nombre restreint d'études qui recourent à la CLEM 3D pour observer l'ultrastructure de dendrites ciblées (Genoud et al., 2006; Knott et al., 2006; Chen et al., 2011, 2012; Maco et al., 2013; Mostany et al., 2013; Sonomura et al., 2013; Grillo et al., 2013; Bishop et al., 2014; Cane et al., 2014; Blazquez-Llorca et al., 2015; Bosch et al., 2015; Maclachlan et al., 2018; Luckner et al., 2018). Mener à bien une approche ultramicrotomique basée sur des repères extrinsèques micrométriques nécessite encore un savoir-faire de spécialiste. Rendre la CLEM accessible à un plus grand nombre d'équipes de recherche nécessite de faciliter et d'automatiser au maximum toutes les étapes du protocole (Hayworth et al., 2014; Collman et al., 2015; Karreman et al., 2017; Schorb et al., 2019).

Un développement élémentaire à même d'augmenter le rendement de la CLEM 3D consiste à améliorer le logiciel d'acquisition des SBEM et des FIB-SEM pour être en mesure de programmer parcimonieusement les volumes d'acquisition, en tenant compte des coordonnées 3D des ROIs, accessibles en LM avec une précision souvent micrométrique. Pour réaliser un masque d'acquisition 3D ajusté à une ROI, il est nécessaire aujourd'hui d'enclencher et de stopper manuellement l'acquisition de champs de vue 2D aux coordonnées souhaitées en z. Programmer ces plages d'acquisition à l'avance permettrait d'économiser à la fois du temps et de l'espace de stockage de données, dans un contexte de volumes de données à traiter toujours croissant.

D'un point de vue méthodologique, la technique de photo-précipitation de DAB que j'ai mise au point au cours de cette thèse facilite aussi l'emploi de la CLEM. Ce procédé constitue une alternative efficace et peu coûteuse au marquage NIRB pour introduire des marqueurs fiduciaires extrinsèques dans les échantillons 3D fixés. La photo-précipitation de DAB permet de réaliser le nano-repérage sur les postes de LM qui ne sont pas équipés d'un laser infra-rouge, inflige des dommages ultrastructuraux plus limités que les marques NIRB (Luckner et al., 2018) et fournit un contraste positif, plus facilement repérable en EM. Cette dernière propriété rend la photo-précipitation de DAB complémentaire du NIRB dans le cadre d'applications sophistiquées, comme l'étude, entreprise par Matthia Karreman et coll., des événements subcellulaires qui permettent l'extravasation de cellules tumorales uniques *in vivo* (Karreman et al., 2014). Ces événements sont trop rares pour être abordés en EM monomodale, et de taille trop petite pour la résolution de la LM. De plus, acquérir l'ultrastructure de la cellule ciblée dans

son intégralité alors que sa taille peut atteindre 50-80µm, nécessite de repérer ses coordonnées au sein d'une biopsie d'environ 1mm³ et de réaliser manuellement l'approche ultramicrotomique, car la coupe vibratome risquerait de fragmenter la cellule d'intérêt. Pour retrouver la cellule ciblée en EM, Karreman et coll. utilisent l'angiographie par imagerie aux rayons X (Karreman, Mercier, et al., 2016), mais cette approche ne fonctionne pas dans le cas de tissus faiblement vascularisés (communication personnelle de Yannick Schwab). L'insertion de repères extrinsèques qui fournissent un contraste aux rayons X en devient nécessaire pour réaliser cette étude, et c'est le cas des marques DAB osmiées (Perez et al., 2014), à l'inverse des marques NIRB. Par conséquent, le nano-repérage DAB permettrait de cadrer la ROI en EM dans ces échantillons atypiques, afin d'étudier l'ultrastructure de cellules tumorales en cours d'extravasation.

Cet exemple d'application illustre le fait que la CLEM 3D n'est pas réservée à l'étude du tissu cérébral : faciliter cette approche permettrait de compléter les données fonctionnelles acquises *in vivo* en LM dans de nombreux systèmes avec les descriptions ultrastructurales qui manquent pour aborder le détail fin des mécanismes biologiques (Lees et al., 2017).

II. Quantifications sub-synaptiques en CLEM super-résolutive

Dans le cadre de l'étude intégrée des régulations synaptiques, mon travail de thèse permet à présent de mettre en place des protocoles de CLEM super-résolutive (sCLEM ou super-CLEM) pour quantifier conjointement la composition moléculaire et les paramètres ultrastructuraux de synapses identifiées *in vivo*, avec plusieurs applications directes envisagées au sein du laboratoire.

1. Super-CLEM en circuits intacts

Disséquer le détail submicrométrique des régulations synaptiques permet de comprendre les mécanismes de la plasticité synaptique. La sCLEM permet de résoudre la nano-organisation synaptique *in vivo* de façon quantitative car elle permet de compter, en SMLM, le nombre exact des composants moléculaires de synapses caractérisées en EM au niveau ultrastructural. Par exemple, comparer l'évolution conjointe de la distribution des récepteurs synaptiques et de l'ultrastructure de la PSD permettrait de comprendre les variations de la conductance synaptique au cours de la plasticité structurale.

Mes travaux actuels visent à adapter mon protocole CLEM pour observer des synapses identifiées en SBEM et en SMLM. Cependant, l'acquisition SMLM en tranches corticales impose certaines contraintes techniques supplémentaires :

- La SMLM nécessite d'utiliser des sondes photo-activables, qui sont plus difficiles à intégrer dans une stratégie de marquage *in vivo* que des fluorophores standard.
- La quantification moléculaire en SMLM requiert un grand nombre de photons de fluorescence alors le RSB est typiquement faible en SMLM dans les tissus diffusants.
- L'information 3D, accessible en microscopie confocale, fait défaut en SMLM standard.

J'ai entrepris des travaux préliminaires pour lever ces verrous technologiques.

1.1. Adaptation de la stratégie de marquage *in vivo*

L'acquisition SMLM nécessite d'utiliser des sondes moléculaires photo-activables, qui peuvent être classées en deux catégories : des protéines fluorescentes pour les acquisitions PALM (*Photo-Activated Localization Microscopy*), ou des fluorophores synthétiques, souvent introduits par immunomarquage, pour les acquisitions de type STORM (*STochastic Optical Reconstruction Microscopy*). Afin de conserver une stratégie de marquage *in vivo* par IUE, et pour limiter les dommages ultrastructuraux causés par l'immunomarquage de tranches de tissu, nous avons choisi d'utiliser les protéines fluorescentes photo-activables, qui sont de deux types principaux. Les sondes photo-commutables, comme la protéine

Dronpa, passent en général d'un état fondamental éteint à un état excité fluorescent (off/on) par stimulation lumineuse. Ces sondes ne sont visibles qu'après photoactivation, ce qui complique l'observation de protéines dont on ne connaît pas *a priori* la distribution dans l'échantillon. Les protéines photo-convertibles transitent quant à elles entre deux états fluorescents, et sont donc repérables avant la photo-activation. Cependant, leurs spectres d'émission et d'absorption sont dédoublés, ce qui limite le nombre et le type de sondes supplémentaires qu'il est possible de combiner dans un même échantillon sans recouvrement spectral entre les différentes sondes.

Nous avons cherché à définir quel type de sonde conviendrait le mieux à notre stratégie de marquage, où des neurones marqués par IUE expriment un marqueur cytosolique et une sonde synaptique photo-activable. Si la sonde est photo-commutable et recrutée par les synapses excitatrices, elle est présente dans la quasi-totalité des épines dendritiques des neurones d'intérêt, et il est aisé de cadrer l'acquisition PALM : n'importe quelle épine dendritique électroporée contient *a priori* la sonde. En revanche, si la sonde photo-commutable est recrutée par les synapses inhibitrices, ou distribuée de façon inconnue *a priori*, l'acquisition en PALM est suboptimale car elle requiert d'observer des champs de vue au hasard et de retrouver les ROIs rétrospectivement. À l'inverse, les sondes photo-convertibles sont visibles dans les deux cas considérés : elles permettent d'étudier à la fois les synapses excitatrices et inhibitrices, au prix d'une plus grande occupation du spectre visible. Nous avons choisi d'utiliser mEos4b, qui est la sonde PALM photo-convertible de plus forte brillance disponible aujourd'hui.

1.2. Choix des marqueurs cytosoliques

Visualiser la morphologie dendritique sans occulter le signal mEos4b, nécessite d'utiliser un marqueur cytosolique qui émette à des longueurs d'onde distinctes de celles de mEos4b et de son état excité mEos4b*, c'est-à-dire dans le bleu ou dans le proche infra-rouge (Fig. 37). Dans un premier temps, nous avons utilisé une version cytosolique de TagBFP, la plus brillante des protéines bleues référencées sur fpbases.org, pour visualiser les dendrites électroporées et acquérir des images préliminaires de PALM dans des tranches vibratome de tissu fixé (Fig. 38). Cependant, l'utilisation combinée de TagBFP et de mEos4b n'a pas été satisfaisante : la faible brillance de TagBFP nécessite d'utiliser une forte puissance d'illumination UV pour visualiser les épines dendritiques avec un RSB satisfaisant, ce qui provoque la photo-activation prématurée de mEos4b, détériore la qualité de l'image PALM, et empêche de compter le nombre exact des sondes synaptiques.

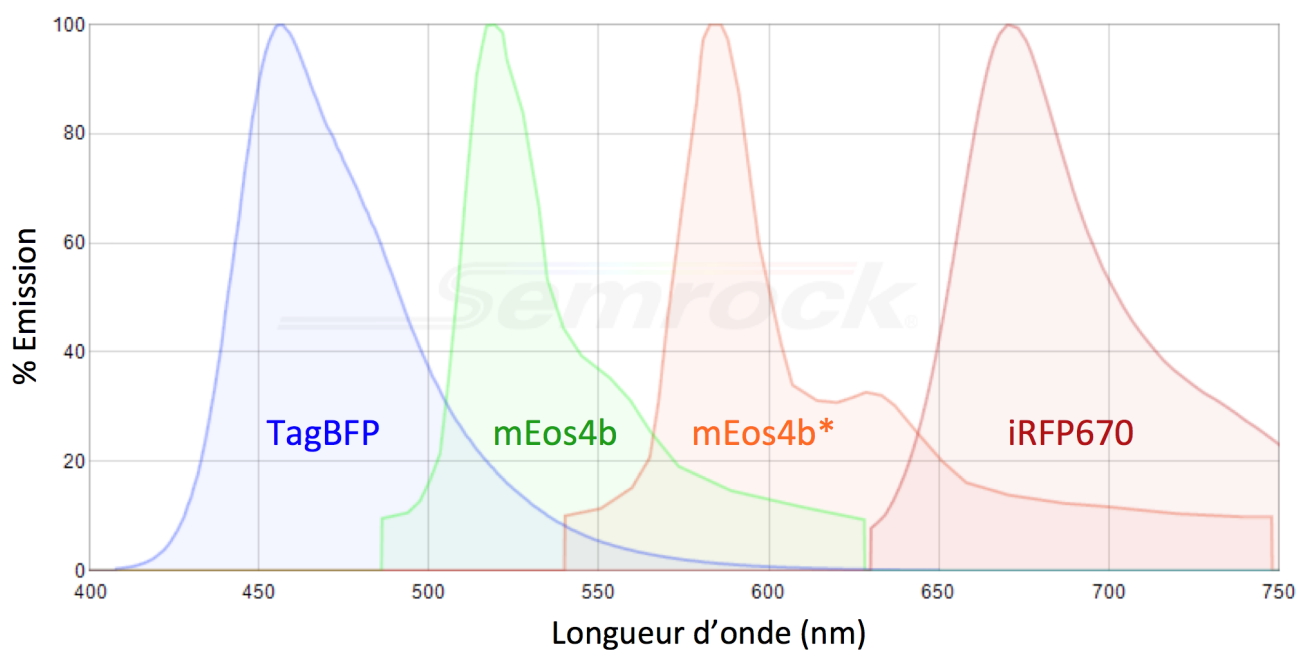


Figure 37 : Spectres d'émission des protéines fluorescentes retenues

Spectres normalisés d'émission de fluorescence pour les protéines suivantes : TagBFP, mEos4b dans ses états fondamental et activé (mEos4b*), et iRFP670. Les spectres se recouvrent peu, ce qui permet de résoudre en fréquence les signaux des différentes sondes, avec un minimum de bruit provenant des autres sondes.

En réponse, nous avons adapté iRFP670 et iRFP720, les plus brillantes des protéines cytosoliques infra-rouges référencées sur fpbase.org, pour les utiliser comme marqueurs cytosoliques. Nous avons transfecté des neurones en culture, puis *in utero*, avec iRFP670 et iRFP720, mais ces protéines fournissent un RSB à peine suffisant *in vitro* pour visualiser les dendrites proximales de neurones en culture, et un RSB insuffisant *ex vivo* pour repérer la région corticale marquée, après perfusion et prélèvement des cerveaux électroporés. Cette stratégie de marquage nécessite le développement de sondes infra-rouges plus brillantes, non encore disponibles.

Cette étude préliminaire montre que la sonde mEos4b impose un recouvrement spectral avec la fluorescence du marqueur cytosolique, dans le cadre de notre stratégie de marquage *in vivo*. Nous avons décidé d'utiliser un marqueur cytosolique vert, comme EGFP, qui masque la fluorescence de l'état fondamental de mEos4b : cette situation correspond à l'utilisation d'une sonde photo-commutable, et permet l'étude en PALM des synapses excitatrices et des épines dendritiques. Nous utiliserons cette stratégie pour mieux comprendre l'ultrastructure et la nano-organisation de synapses excitatrices localisées sur des dendrites identifiées de neurones corticaux *in vivo*.

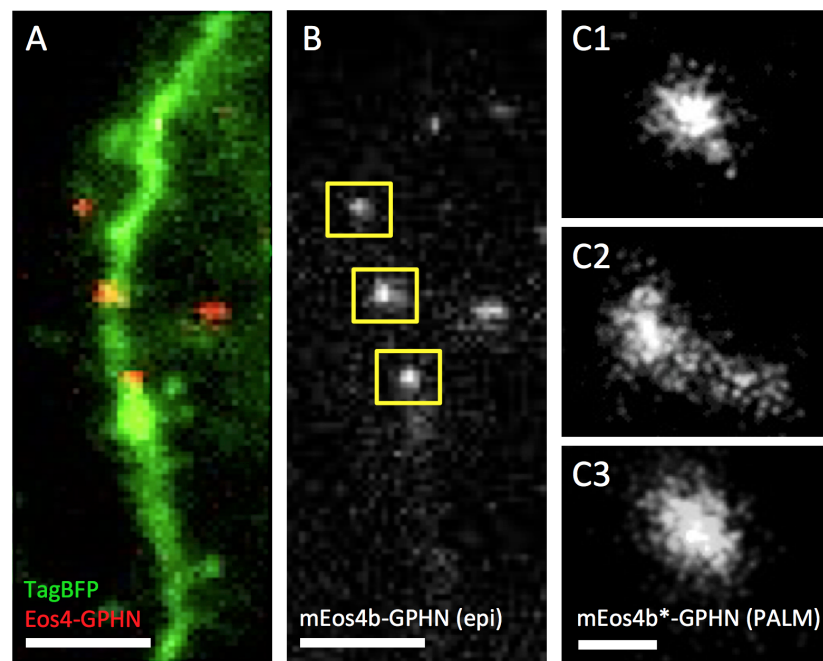


Figure 38 : Résultats préliminaires en PALM sur tranches de tissu cortical

(A) Image en microscopie d'épi-fluorescence plein champ au sein d'une tranche de tissu cortical, d'une dendrite isolée exprimant TagBFP comme marqueur cytosolique et mEos4b-géphyrine (B) Visualisation de mEos4b-géphyrine dans l'état fondamental, sur le champ de vue présenté en (A) (C1-3) Reconstitutions PALM des PSDs inhibitrices repérées en (B ; cadres jaunes). Calibrations : (A,B) 2 μ m (C1-3) 300nm.

2. Nano-domaines synaptiques

Le protocole de ré-inclusion sur *finder grids*, que j'ai pratiqué en début de thèse (cf. la partie I. des Résultats) permet l'étude de synapses identifiées en PALM/STORM et en TEM (ssTEM ou tomographie électronique) dans des tranches Tokuyasu de tissu nerveux. Au sein du laboratoire, nous mettons ce protocole en œuvre pour caractériser de façon quantitative la distribution sub-synaptique de sous-unités du récepteur de la glycine (GlyR) marquées de façon endogène par mEos4 dans des tranches de moelle cervicale (Annexe 3). Ces mesures permettront de quantifier pour la première fois le degré d'occupation des sites de liaison de la géphyrine par les GlyR dans différents noyaux des cornes ventrales et dorsales de la moelle épinière (Specht, 2019), à différents stades du développement. Par ailleurs, combiner cette approche avec la tomographie électronique nous permettra de questionner l'arrangement en nano-colonnes des complexes trans-synaptiques formés à ces synapses (Crosby et al., 2019; Yang & Specht, 2019).

III. Lier l'ultrastructure aux fonctions biologiques

Les travaux de morphométrie et de modélisation réalisés au cours de ma thèse ont permis d'aborder l'intégration des signaux synaptiques dans des dendrites identifiées en conditions basales. De façon plus générale, l'approche que j'ai mise au point est applicable pour décrire l'ultrastructure d'objets marqués par fluorescence de façon parcimonieuse dans tous types de tissus biologiques, et dans le cadre de d'expériences *in vivo* plus sophistiquées. Je propose ici des exemples d'études réalisables en CLEM dans différentes régions cérébrales de la souris, pour faire le lien entre l'ultrastructure synaptique et la fonction neuronale.

Pour acquérir la morphométrie d'épines dendritiques identifiées dans le contexte de circuits corticaux, la CLEM peut être combinée avec les diverses approches d'édition génétique, par transgénèse ou transfection, pour réaliser un traçage génétique des afférences pré-synaptiques (*tracing* ; Angelakos & Abel, 2015; Nassi et al., 2015; Tang et al., 2015). La stratégie la plus simple consiste à marquer deux types neuronaux différents pour repérer en LM le lieu des contacts synaptiques supposés avant de les reconstruire en EM 3D. Pour relier les mesures ultrastructurales aux fonctions neuronales, il est possible de combiner la CLEM à des approches comportementales — expériences sensorielles ou apprentissage — et d'imagerie longitudinale *in vivo* (Knott et al., 2006; Chen et al., 2011, 2012; Grillo et al., 2013; Maco et al., 2013; Cane et al., 2014; Blazquez-Llorca et al., 2015). Conditionner la synthèse des protéines fluorescentes à l'expression d'un gène de réponse précoce (*Immediate Early Gene*) comme *c-fos* ou *c-myc*, sous le contrôle d'un système Tet-On ou Tet-Off régulé par la doxycycline, ou d'un système CreER-loxP régulé par le tamoxifène, permet de visualiser les neurones activés au cours de la tâche comportementale (Mayford & Reijmers, 2015) avant d'en étudier l'ultrastructure en CLEM. Cette approche permet de quantifier les modifications morphologiques qui sous-tendent les mécanismes d'apprentissage (Bailey et al., 2015; Segal, 2017). D'autre part, la CLEM peut être combinée avec des méthodes d'optogénétique (Nabavi et al., 2014; Hayashi-Takagi et al., 2015; Paoletti et al., 2019) ou de chémogénétique (Roth, 2016; Dobrzanski & Kossut, 2017; Gomez et al., 2017) afin d'aborder les changements structuraux induits par la modulation artificielle de l'activité de circuits neuronaux identifiés.

D'autre part, il est possible de modifier le profil d'expression génique de cellules observées en CLEM grâce aux différentes stratégies d'édition du génome (lignées transgéniques, ARN interférents ou système CRISPR/Cas9, par exemple) afin d'étudier comment des mutations génétiques impliquées dans certaines pathologies nerveuses affectent l'ultrastructure dendritique et l'intégration des signaux synaptiques. Par exemple, les synaptopathies sont associées à des altérations de la forme, de la densité et des contenus des épines (Fiala et al., 2002; Nimchinsky et al., 2002; Villalba & Smith, 2010, 2011a,

2011b; Chidambaram et al., 2019), et se manifestent par des troubles cérébraux majeurs, comme le syndrome de l’X fragile — lié au gène *Fmr1* (Irwin et al., 2001; Holtmaat & Svoboda, 2009; Auerbach et al., 2011; Tsai et al., 2012; Barnes et al., 2015), le syndrome de Rett — lié au gène *MECP2* (Chapleau et al., 2009; Jiang et al., 2013) et certaines formes d’autisme ou de retard mental — liés par exemple aux gènes *SynGAP* (Carlisle et al., 2008; Barnes et al., 2015) et *Tsc2* (Tavazoie et al., 2005; Orlova & Crino, 2010; Auerbach et al., 2011). D’une part, la CLEM permettra de comprendre, *via* l’édition génétique de cellules uniques identifiées, les fonctions des protéines impliquées dans l’émergence des synaptopathies, afin d’aborder les liens entre altérations ultrastructurales et dérèglement des communications synaptiques (Burke & Barnes, 2010; Grillo et al., 2013; Mostany et al., 2013; Calì et al., 2018). D’autre part, la CLEM permettra de caractériser les dysfonctionnements de circuits neuronaux ciblés au sein de modèles animaux qui reproduisent l’évolution *in vivo* des pathologies cérébrales, en tenant compte à la fois de facteurs de progression des neuropathies, comme l’hyperexcitabilité neuronale (Burke & Barnes, 2010; Grillo et al., 2013) ou de l’instabilité des épines chez les souris âgées (Grillo et al., 2013), et des mécanismes de compensation mis en place par l’organisme en conditions pathologiques (Chidambaram et al., 2019).

En conclusion, le développement contemporain des approches de CLEM super-résolutive permet dès à présent la caractérisation ultrastructurale intégrée des régulations synaptiques. La mise en œuvre de ces approches multi-échelle permet de déchiffrer l’organisation du système nerveux central en associant les données de la biophysique et de la biologie moléculaire à l’étude des circuits neuronaux en activité, pour comprendre l’émergence et le déclin des fonctions cérébrales. Plus généralement, la méthode que j’ai mise au point pendant ma thèse permet de faire le lien entre régulations nanoscopiques et fonctions macroscopiques, dans tous types de tissus biologiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Acker, C. D., Hoyos, E., & Loew, L. M. (2016). EPSPs Measured in Proximal Dendritic Spines of Cortical Pyramidal Neurons. *ENeuro*, 3(2), 1–13. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0050-15.2016>
- Adrian, M., Kusters, R., Storm, C., Hoogenraad, C. C., & Kapitein, L. C. (2017). Probing the Interplay between Dendritic Spine Morphology and Membrane-Bound Diffusion. *Biophysical Journal*, 113(10), 2261–2270. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.06.048>
- Al Jord, A., Lemaître, A. I., Delgehyr, N., Faucourt, M., Spassky, N., & Meunier, A. (2014). Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells. *Nature*, 516(7529), 104–107. <https://doi.org/10.1038/nature13770>
- Alvarez, V. A., & Sabatini, B. L. (2007). Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 79–97. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094222>
- Andrásfalvy, B. K., Smith, M. A., Borchardt, T., Sprengel, R., & Magee, J. C. (2003). Impaired regulation of synaptic strength in hippocampal neurons from GluR1-deficient mice. *Journal of Physiology*, 552(1), 35–45. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.045575>
- Angelakos, C. C., & Abel, T. (2015). Molecular genetic strategies in the study of corticohippocampal circuits. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021725>
- Araya, R., Vogels, T. P., & Yuste, R. (2014). Activity-dependent dendritic spine neck changes are correlated with synaptic strength. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1321869111>
- Arellano, J. I. (2007). Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Frontiers in Neuroscience*, 1(1), 131–143. <https://doi.org/10.3389/neuro.01.1.1.0102007>
- Arellano, J. I., Espinosa, A., Fairén, A., Yuste, R., & DeFelipe, J. (2007). Non-synaptic dendritic spines in neocortex. *Neuroscience*, 145(2), 464–469. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.015>
- Auerbach, B. D., Osterweil, E. K., & Bear, M. F. (2011). Mutations causing syndromic autism define an axis of synaptic pathophysiology. *Nature*, 480(7375), 63–68. <https://doi.org/10.1038/nature10658>
- Avermann, M., Tömm, C., Mateo, C., Gerstner, W., & Petersen, C. C. H. (2012). Microcircuits of excitatory and inhibitory neurons in layer 2/3 of mouse barrel cortex. *Journal of Neurophysiology*, 107(11), 3116–3134. <https://doi.org/10.1152/jn.00917.2011>
- Bailey, C. H., Kandel, E. R., & Harris, K. M. (2015). Structural components of synaptic plasticity and memory consolidation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–29. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021758>
- Balaji, J., Armbruster, M., & Ryan, T. A. (2008). Calcium control of endocytic capacity at a CNS synapse. *Journal of Neuroscience*, 28(26), 6742–6749. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1082-08.2008>
- Ballesteros-Yáñez, I., Benavides-Piccione, R., Elston, G. N., Yuste, R., & DeFelipe, J. (2006). Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*, 138(2), 403–409. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.11.038>
- Bar-Elli, O., Steinitz, D., Yang, G., Tenne, R., Ludwig, A., Kuo, Y., ... Oron, D. (2018). Rapid Voltage Sensing with Single Nanorods via the Quantum Confined Stark Effect. *ACS Photonics*, 5(7), 2860–2867. <https://doi.org/10.1021/acsphotonics.8b00206>

- Bär, J., Kobler, O., Van Bommel, B., & Mikhaylova, M. (2016). Periodic F-actin structures shape the neck of dendritic spines. *Scientific Reports*, 6(November), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep37136>
- Barnes, S. A., Wijetunge, L. S., Jackson, A. D., Katsanevaki, D., Osterweil, E. K., Komiyama, N. H., ... Wyllie, D. J. A. (2015). Convergence of hippocampal pathophysiology in syngap +/- and fmr 1-/y mice. *Journal of Neuroscience*, 35(45), 15073–15081. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1087-15.2015>
- Beaulieu-Laroche, L., & Harnett, M. T. (2018). Dendritic Spines Prevent Synaptic Voltage Clamp. *Neuron*, 97(1), 75–82.e3. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.11.016>
- Begemann, I., & Galic, M. (2016). Correlative light electron microscopy: Connecting synaptic structure and function. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 8(AUG), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00028>
- Belevich, I., Joensuu, M., Kumar, D., Vihinen, H., & Jokitalo, E. (2016). Microscopy Image Browser: A Platform for Segmentation and Analysis of Multidimensional Datasets. *PLoS Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002340>
- Bell, M. E., Bourne, J. N., Chirillo, M. A., Mendenhall, J. M., Kuwajima, M., & Harris, K. M. (2014). Dynamics of nascent and active zone ultrastructure as synapses enlarge during long-term potentiation in mature hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 522(17), 3861–3884. <https://doi.org/10.1002/cne.23646>
- Bemben, M. A., Shipman, S. L., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2015). The cellular and molecular landscape of neuroligins. *Trends in Neurosciences*, 38(8), 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2015.06.004>
- Berry, K. P., & Nedivi, E. (2017). Spine Dynamics: Are They All the Same? *Neuron*, 96(1), 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.08.008>
- Betzig, E., Patterson, G. H., Sougrat, R., Lindwasser, O. W., Olenych, S., Bonifacino, J. S., ... Hess, H. F. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793), 1642–1645. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>
- Bhatia, A., Moza, S., & Bhalla, U. S. (2019). Precise excitation-inhibition balance controls gain and timing in the hippocampus. *eLife*, 8, 1–29. <https://doi.org/10.7554/eLife.43415>
- Bhatt, D. H., Zhang, S., & Gan, W.-B. (2009). Dendritic Spine Dynamics. *Annual Review of Physiology*, 71(1), 261–282. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163140>
- Bian, W. J., Miao, W. Y., He, S. J., Qiu, Z., & Yu, X. (2015). Coordinated Spine Pruning and Maturation Mediated by Inter-Spine Competition for Cadherin/Catenin Complexes. *Cell*, 162(4), 808–822. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.018>
- Bishop, D., Nikić, I., Brinkoetter, M., Knecht, S., Potz, S., Kerschensteiner, M., & Misgeld, T. (2011). Near-infrared branding efficiently correlates light and electron microscopy. *Nature Methods*, 8(7), 568–572. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1622>
- Bishop, D., Nikic, I., Kerschensteiner, M., & Misgeld, T. (2014). The use of a laser for correlating light and electron microscopic images in thick tissue specimens. In *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 124). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801075-4.00015-X>
- Blazquez-Llorca, L., Hummel, E., Zimmerman, H., Zou, C., Burgold, S., Rietdorf, J., & Herms, J. (2015). Correlation of two-photon in vivo imaging and FIB/SEM microscopy. *Journal of Microscopy*, 259(2), 129–136. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95849-1_8
- Bloodgood, B. L., & Sabatini, B. L. (2005). Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. *Science*, 310(5749), 866–869. <https://doi.org/10.1126/science.1114816>

- Bloodgood, B. L., & Sabatini, B. L. (2007). Ca(2+) signaling in dendritic spines. *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.04.003>
- Bloss, E. B., Cembrowski, M. S., Karsh, B., Colonell, J., Fetter, R. D., & Spruston, N. (2016). Structured Dendritic Inhibition Supports Branch-Selective Integration in CA1 Pyramidal Cells. *Neuron*, 89(5), 1016–1030. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.029>
- Boivin, J. R., & Nedivi, E. (2018). Functional implications of inhibitory synapse placement on signal processing in pyramidal neuron dendrites. *Current Opinion in Neurobiology*, 51, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.01.013>
- Bosch, C., Martínez, A., Masachs, N., Teixeira, C. M., Feraud, I., Ulloa, F., ... Soriano, E. (2015). FIB/SEM technology and high-throughput 3D reconstruction of dendritic spines and synapses in GFP-labeled adult-generated neurons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00100>
- 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(2), 444–459. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.021>
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2008). Balancing Structure and Function at Hippocampal Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 47–67. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125646>
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2011). Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced. *Hippocampus*, 21(4), 354–373. <https://doi.org/10.1002/hipo.20768>
- Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2012). Nanoscale analysis of structural synaptic plasticity. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 372–382. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.019>
- Branco, T., & Staras, K. (2009). The probability of neurotransmitter release: Variability and feedback control at single synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(5), 373–383. <https://doi.org/10.1038/nrn2634>
- Briggman, K. L., & Bock, D. D. (2012). Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(1), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.10.022>
- Broadhead, M. J., Horrocks, M. H., Zhu, F., Muresan, L., Benavides-Piccione, R., DeFelipe, J., ... Grant, S. G. N. (2016). PSD95 nanoclusters are postsynaptic building blocks in hippocampus circuits. *Scientific Reports*, 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep24626>
- Burette, A. C., Lesperance, T., Crum, J., Martone, M., Volkman, N., Ellisman, M. H., & Weinberg, R. J. (2012). Electron tomographic analysis of synaptic ultrastructure. *Journal of Comparative Neurology*, 520(12), 2697–2711. <https://doi.org/10.1002/cne.23067>
- Burke, S. N., & Barnes, C. A. (2010). Senescent synapses and hippocampal circuit dynamics. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.12.003>
- Calì, C., Wawrzyniak, M., Becker, C., Maco, B., Cantoni, M., Jorstad, A., ... Knott, G. W. (2018). The effects of aging on neuropil structure in mouse somatosensory cortex—A 3D electron microscopy analysis of layer 1. *PLoS ONE*, 13(7), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198131>
- Cane, M., Maco, B., Knott, G., & Holtmaat, A. (2014). The relationship between PSD-95 clustering and spine stability In Vivo. *Journal of Neuroscience*, 34(6), 2075–2086. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3353-13.2014>

- Carlisle, H. J., Manzerra, P., Marcora, E., & Kennedy, M. B. (2008). SynGAP regulates steady-state and activity-dependent phosphorylation of cofilin. *Journal of Neuroscience*, 28(50), 13673–13683. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4695-08.2008>
- Carnevale, N. T., & Hines, M. L. (2006). The NEURON Book. In *Cambridge University Press*.
- Castillo, P. E., Chiu, C. Q., & Carroll, R. C. (2011). Long-term plasticity at inhibitory synapses. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 328–338. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.01.006>
- Chamma, I., Letellier, M., Butler, C., Tessier, B., Lim, K. H., Gauthereau, I., ... Thoumine, O. (2016). Mapping the dynamics and nanoscale organization of synaptic adhesion proteins using monomeric streptavidin. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms10773>
- Chamma, I., Levet, F., Sibarita, J.-B., Sainlos, M., & Thoumine, O. (2016). Nanoscale organization of synaptic adhesion proteins revealed by single-molecule localization microscopy. *Neurophotonics*, 3(4), 041810. <https://doi.org/10.1117/1.nph.3.4.041810>
- Chang, H. T. (1952). Cortical neurons with particular reference to the apical dendrites. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 17, 189–202.
- Chapleau, C. A., Calfa, G. D., Lane, M. C., Albertson, A. J., Larimore, J. L., Kudo, S., ... Pozzo-Miller, L. (2009). Dendritic spine pathologies in hippocampal pyramidal neurons from Rett syndrome brain and after expression of Rett-associated MECP2 mutations. *Neurobiology of Disease*, 35(2), 219–233. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.05.001>
- Charrier, C., Ehrensperger, M. V., Dahan, M., Lévi, S., & Triller, A. (2006). Cytoskeleton regulation of glycine receptor number at synapses and diffusion in the plasma membrane. *Journal of Neuroscience*, 26(33), 8502–8511. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1758-06.2006>
- Chen, J. L., Lin, W. C., Cha, J. W., So, P. T., Kubota, Y., & Nedivi, E. (2011). Structural basis for the role of inhibition in facilitating adult brain plasticity. *Nature Neuroscience*, 14(5), 587–596. <https://doi.org/10.1038/nn.2799>
- Chen, J. L., Villa, K. L., Cha, J. W., So, P. T. C., Kubota, Y., & Nedivi, E. (2012). Clustered Dynamics of Inhibitory Synapses and Dendritic Spines in the Adult Neocortex. *Neuron*, 74(2), 361–373. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.02.030>
- Chen, S. X., Kim, A. N., Peters, A. J., & Komiyama, T. (2015). Subtype-specific plasticity of inhibitory circuits in motor cortex during motor learning. *Nature Neuroscience*, 18(8), 1109–1115. <https://doi.org/10.1038/nn.4049>
- Chen, T. W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., ... Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chen, X., Winters, C. A., & Reese, T. S. (2008). Life inside a thin section: Tomography. *Journal of Neuroscience*, 28(38), 9321–9327. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2992-08.2008>
- Chen, Y., & Sabatini, B. L. (2012). Signaling in dendritic spines and spine microdomains. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(3), 389–396. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.03.003>
- Cheng, D., Shami, G., Morsch, M., Huynh, M., Trimby, P., & Braet, F. (2017). Relocation is the key to successful correlative fluorescence and scanning electron microscopy. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 140). <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.03.013>
- Chidambaram, S. B., Rathipriya, A. G., Bolla, S. R., Bhat, A., Ray, B., Mahalakshmi, A. M., ... Sakharkar, M. K. (2019). Dendritic spines:

- Revisiting the physiological role. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 92(July 2018), 161–193.
<https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2019.01.005>
- Chirillo, M. A., Waters, M. S., Lindsey, L. F., Bourne, J. N., & Harris, K. M. (2019). Local resources of polyribosomes and SER promote synapse enlargement and spine clustering after long-term potentiation in adult rat hippocampus. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-40520-x>
- Chiu, C. Q., Barberis, A., & Higley, M. J. (2019). Preserving the balance: diverse forms of long-term GABAergic synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(5), 272–281. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0141-5>
- Chiu, C. Q., Lur, G., Morse, T. M., Carnevale, N. T., Ellis-Davies, G. C. R., & Higley, M. J. (2013). Compartmentalization of GABAergic inhibition by dendritic spines. *Science*, 340(6133), 759–762.
<https://doi.org/10.1126/science.1234274>
- Chklovskii, D. B., Mel, B. W., & Svoboda, K. (2004). Cortical rewiring and information storage. *Nature*, 431(October), 782–788.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-28617-2_15
- Choquet, D., & Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron*, 80(3), 691–703.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.013>
- Collman, F., Buchanan, J., Phend, K. D., Micheva, K. D., Weinberg, R. J., & Smith, S. J. (2015). Mapping Synapses by Conjugate Light-Electron Array Tomography. *Journal of Neuroscience*, 35(14), 5792–5807.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4274-14.2015>
- Colonnier, M. (1968). Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Research*, 9(2), 268–287. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(68\)90234-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(68)90234-5)
- Constantinople, C. M., & Bruno, R. M. (2013). Deep Cortical Layers are Activated Directly by Thalamus. *Science*, 340(June), 1591–1594.
<https://doi.org/10.1126/science.1236425>
- Crosby, K. C., Gookin, S. E., Garcia, J. D., Hahm, K. M., Dell’Acqua, M. L., & Smith, K. R. (2019). Nanoscale Subsynaptic Domains Underlie the Organization of the Inhibitory Synapse. *Cell Reports*, 26(12), 3284–3297.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.070>
- Dal Maschio, M., Ghezzi, D., Bony, G., Alabastri, A., Deidda, G., Brondi, M., ... Cancedda, L. (2012). High-performance and site-directed in utero electroporation by a triple-electrode probe. *Nature Communications*, 3.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1961>
- Dani, A., Huang, B., Bergan, J., Dulac, C., & Zhuang, X. (2010). Superresolution Imaging of Chemical Synapses in the Brain. *Neuron*, 68(5), 843–856.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.11.021>
- Dayan, P., & Abbott, L. F. (2001). Theoretical Neuroscience : Computational and Mathematical Modeling of Neural Systems. In MIT Press.
- De Boer, P., Hoogenboom, J. P., & Giepmans, B. N. G. (2015). Correlated light and electron microscopy: Ultrastructure lights up! *Nature Methods*, 12(6), 503–513.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3400>
- De Robertis, E., & Bennett, H. S. (1954). Submicroscopic vesicular component in the synapse. *Fed. Proc.*, 13, 35. Retrieved from <https://www.comulis.eu/>
- Deerinck, T. J., Bushong, E. A., Thor, A., & Ellisman, M. H. (2010). NCMIR Methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Nat. Center Microsc. Imag. Res.*, 6.
- DeFelipe, J. (2011). The Evolution of the Brain, the Human Nature of Cortical Circuits, and Intellectual Creativity. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5(May), 1–17.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00029>
- DeFelipe, J. (2015). The dendritic spine story:

- an intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(March), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00014>
- DeFelipe, J., & Fariñas, I. (1992). The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in Neurobiology*, 39.
- Deller, T., Korte, M., Chabanis, S., Drakew, A., Schwegler, H., Stefani, G. G., ... Mundel, P. (2003). Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10494–10499.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1832384100>
- Deller, T., Mundel, P., & Frotscher, M. (2000). Potential role of synaptopodin in spine motility by coupling actin to the spine apparatus. *Hippocampus*, 10(5), 569–581.
[https://doi.org/10.1002/1098-1063\(2000\)10:5<569::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/1098-1063(2000)10:5<569::AID-HIPO7>3.0.CO;2-M)
- Denk, W., & Horstmann, H. (2004). Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biology*, 2(11).
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020329>
- Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. (1990). Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951), 73–76.
<https://doi.org/10.1126/science.2321027>
- Diering, G. H., & Hugarir, R. L. (2018). The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron*, 100(2), 314–329.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.10.018>
- Dobrzanski, G., & Kossut, M. (2017). Application of the DREADD technique in biomedical brain research. *Pharmacological Reports*, 69(2), 213–221.
<https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.10.015>
- Doron, M., Chindemi, G., Muller, E., Markram, H., & Segev, I. (2017). Timed Synaptic Inhibition Shapes NMDA Spikes, Influencing Local Dendritic Processing and Global I/O Properties of Cortical Neurons. *Cell Reports*, 21(6), 1550–1561.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.035>
- Dzyubenko, E., Rozenberg, A., Hermann, D. M., & Faissner, A. (2016). Colocalization of synapse marker proteins evaluated by STED-microscopy reveals patterns of neuronal synapse distribution in vitro. *Journal of Neuroscience Methods*, 273, 149–159.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.09.001>
- Efron, B., & Tibshirani, R. J. (1994). An Introduction to the Bootstrap. In *CRC Press*.
- Estable, C., Reissig, M., & De Robertis, E. (1953). The microscopic and submicroscopic structure of the synapsis in the ventral ganglion of the acoustic nerve. *J. Appl. Phys.*, 24, 1421–1422.
- Feldmeyer, D. (2012). Excitatory neuronal connectivity in the barrel cortex. *Frontiers in Neuroanatomy*, 6(July), 1–22.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2012.00024>
- Feldmeyer, D., Lübke, J., & Sakmann, B. (2006). Efficacy and connectivity of intracolumnar pairs of layer 2/3 pyramidal cells in the barrel cortex of juvenile rats. *Journal of Physiology*, 575(2), 583–602.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.105106>
- Fermie, J., Liv, N., ten Brink, C., van Donselaar, E. G., Müller, W. H., Schieber, N. L., ... Klumperman, J. (2018). Single organelle dynamics linked to 3D structure by correlative live-cell imaging and 3D electron microscopy. *Traffic*, 19(5), 354–369. <https://doi.org/10.1111/tra.12557>
- Fiala, J. C., Spacek, J., & Harris, K. M. (2002). Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders? *Brain Research Reviews*, 39(1), 29–54.
[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(02\)00158-3](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(02)00158-3)
- Fifková, E., & Anderson, C. L. (1981). Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in

- the dentate molecular layer. *Experimental Neurology*, 74(2), 621–627.
[https://doi.org/10.1016/0014-4886\(81\)90197-7](https://doi.org/10.1016/0014-4886(81)90197-7)
- Fifková, E., Eason, H., & Schaner, P. (1992). Inhibitory contacts on dendritic spines of the dentate fascia. *Brain Research*, 577(2), 331–336. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90293-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90293-1)
- Fishell, G., & Kepecs, A. (2020). Interneuron Types as Attractors and Controllers. *Annual Review of Neuroscience*, 43(1), annurev-neuro-070918-050421. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050421>
- Fossati, M., Assendorp, N., Gemin, O., Colasse, S., Dingli, F., Arras, G., ... Charrier, C. (2019). Trans-synaptic signaling through the glutamate receptor delta-1 mediates inhibitory synapse formation in cortical pyramidal neurons. *Neuron*, in press, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.027>
- Fossati, M., Pizzarelli, R., Schmidt, E. R., Kupferman, J. V., Stroebel, D., Polleux, F., & Charrier, C. (2016). SRGAP2 and Its Human-Specific Paralog Co-Regulate the Development of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Neuron*, 91(2), 356–369. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.06.013>
- Frenkel, M. Y., Sawtell, N. B., Diogo, A. C. M., Yoon, B., Neve, R. L., & Bear, M. F. (2006). Instructive Effect of Visual Experience in Mouse Visual Cortex. *Neuron*, 51(3), 339–349. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.06.026>
- Frick, A., Feldmeyer, D., Helmstaedter, M., & Sakmann, B. (2008). Monosynaptic connections between pairs of L5A pyramidal neurons in columns of juvenile rat somatosensory cortex. *Cerebral Cortex*, 18(2), 397–406. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhm074>
- Fukata, M., Sekiya, A., Murakami, T., Yokoi, N., & Fukata, Y. (2015). Postsynaptic nanodomains generated by local palmitoylation cycles. *Biochemical Society Transactions*, 43, 199–204. <https://doi.org/10.1042/BST20140238>
- Fukata, Y., Dimitrov, A., Boncompain, G., Vielemeyer, O., Perez, F., & Fukata, M. (2013). Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains. *Journal of Cell Biology*, 202(1), 145–161. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302071>
- Fukata, Y., & Fukata, M. (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(3), 161–175. <https://doi.org/10.1038/nrn2788>
- Gabernet, L., Jadhav, S. P., Feldman, D. E., Carandini, M., & Scanziani, M. (2005). Somatosensory integration controlled by dynamic thalamocortical feed-forward inhibition. *Neuron*, 48(2), 315–327. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.09.022>
- Genoud, C., Quairiaux, C., Steiner, P., Hirling, H., Welker, E., & Knott, G. W. (2006). Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS Biology*, 4(11), 2057–2064. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040343>
- Giannone, G., Hosy, E., Levet, F., Constals, A., Schulze, K., Sobolevsky, A. I., ... Cognet, L. (2010). Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical Journal*, 99(4), 1303–1310. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.06.005>
- Gidon, A., & Segev, I. (2012). Principles Governing the Operation of Synaptic Inhibition in Dendrites. *Neuron*, 75(2), 330–341. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.015>
- Glebov, O. O., Jackson, R. E., Winterflood, C. M., Owen, D. M., Barker, E. A., Doherty, P., ... Burrone, J. (2017). Nanoscale Structural Plasticity of the Active Zone Matrix Modulates Presynaptic Function. *Cell Reports*, 18(11), 2715–2728. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.064>
- Globus, A., Rosenzweig, M., Bennett, E., &

- Diamond, M. (1973). Effects of differential experience on dendritic spine counts in rat cerebral cortex. *Comp Physiol Psychol.*, 82(Feb), 175–181.
- Gomez, J. L., Bonaventura, J., Lesniak, W., Mathews, W. B., Sysa-Shah, P., Rodriguez, L. A., ... Michaelides, M. (2017). Chemogenetics revealed: DREADD occupancy and activation via converted clozapine. *Science*, 357(6350), 503–507. <https://doi.org/10.1126/science.aan2475>
- Grabenbauer, M., Geerts, W. J. C., Fernandez-Rodriguez, J., Hoenger, A., Koster, A. J., & Nilsson, T. (2005). Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation. *Nature Methods*, 2(11), 857–862. <https://doi.org/10.1016/j.parco.2017.06.003>
- Graupner, M., & Brunel, N. (2012). Calcium-based plasticity model explains sensitivity of synaptic changes to spike pattern, rate, and dendritic location. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(10), 3991–3996. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109359109>
- Gray, E. G. (1959). Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex. *Journal of Anatomy*, 93(Pt 4), 420–433.
- Gregor, I., & Enderlein, J. (2019). Image scanning microscopy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 51, 74–83. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.05.011>
- Grillo, F. W., Song, S., Teles-Grilo Ruivo, L. M., Huang, L., Gao, G., Knott, G. W., ... De Paola, V. (2013). Increased axonal bouton dynamics in the aging mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.1218731110>
- Grunditz, A., Holbro, N., Tian, L., Zuo, Y., & Oertner, T. G. (2008). Spine Neck Plasticity Controls Postsynaptic Calcium Signals through Electrical Compartmentalization. *Journal of Neuroscience*, 28(50), 13457–13466. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2702-08.2008>
- Gulledge, A. T., Carnevale, N. T., & Stuart, G. J. (2012). Electrical advantages of dendritic spines. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036007>
- Guthrie, P. B., Segal, M., & Kater, S. B. (1991). Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines. *Nature*, 354(November), 76–80.
- Haas, K. T., Compans, B., Letellier, M., Bartol, T. M., Grillo-Bosch, D., Sejnowski, T. J., ... Hosy, E. (2018). Pre-post synaptic alignment through neuroligin-1 tunes synaptic transmission efficiency. *ELife*, 7, 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.31755>
- Hao, J., Wang, X. D., Dan, Y., Poo, M. M., & Zhang, X. H. (2009). An arithmetic rule for spatial summation of excitatory and inhibitory inputs in pyramidal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51), 21906–21911. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912022106>
- Harnett, M. T., Makara, J. K., Spruston, N., Kath, W. L., & Magee, J. C. (2012). Synaptic amplification by dendritic spines enhances input cooperativity. *Nature*, 491(7425), 599–602. <https://doi.org/10.1038/nature11554>
- Harris, J. R. (2015). Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey Dedication: This article is dedicated to the memory and scientific contribution of the late Robert (Bob) W. Horne, Milan V. Nermut and Marc Adrian, three exceptional han. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 581, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.11.011>
- Harris, K. D., & Shepherd, G. M. G. (2015). The neocortical circuit: Themes and variations. *Nature Neuroscience*, 18(2), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nn.3917>
- Harris, K. M., & Stevens, J. K. (1989). Dendritic spines of CA1 pyramidal cells in the rat

- hippocampus: Serial electron microscopy with reference to their biophysical characteristics. *Journal of Neuroscience*, 9(8), 2982–2997.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-08-02982.1989>
- Harris, K. M., & Weinberg, R. J. (2012). Ultrastructure of Synapses in the Mammalian Brain Ultrastructure of Synapses in the. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005587>
- Harvey, C. D., & Svoboda, K. (2007). Locally dynamic synaptic learning rules in pyramidal neuron dendrites. *Nature*, 450(7173), 1195–1200.
<https://doi.org/10.1038/nature06416>
- Harvey, C. D., Yasuda, R., Zhong, H., & Svoboda, K. (2008). The spread of Ras activity triggered by activation of a single dendritic spine. *Science*, 321(5885), 136–140.
<https://doi.org/10.1126/science.1159675>
- Hausser, M., Spruston, N., & Stuart, G. J. (2000). Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science*, 290(5492), 739–744.
<https://doi.org/10.1126/science.290.5492.739>
- Hayama, T., Noguchi, J., Watanabe, S., Takahashi, N., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C. R., ... Kasai, H. (2013). GABA promotes the competitive selection of dendritic spines by controlling local Ca²⁺ signaling. *Nature Neuroscience*, 16(10), 1409–1416.
<https://doi.org/10.1038/nn.3496>
- Hayashi-Takagi, A., Yagishita, S., Nakamura, M., Shirai, F., Wu, Y. I., Loshbaugh, A. L., ... Kasai, H. (2015). Labelling and optical erasure of synaptic memory traces in the motor cortex. *Nature*, 525(7569), 333–338.
<https://doi.org/10.1038/nature15257>
- Hayworth, K. J., Morgan, J. L., Schalek, R., Berger, D. R., Hildebrand, D. G. C., & Lichtman, J. W. (2014). Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: A multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. *Frontiers in Neural Circuits*, 8(JUNE), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00068>
- Hell, S. W. (2009). Microscopy and its focal switch. *Nature Methods*, 6(1), 24–32.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1291>
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 877–888.
<https://doi.org/10.1038/nrn1787>
- Hersch, S. M., & White, E. L. (1981). Quantification of synapses formed with apical dendrites of golgi-impregnated pyramidal cells: Variability in thalamocortical inputs, but consistency in the ratios of asymmetrical to symmetrical synapses. *Neuroscience*, 6(6).
[https://doi.org/10.1016/0306-4522\(81\)90069-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(81)90069-5)
- Hess, S. T., Girirajan, T. P. K., & Mason, M. D. (2006). Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11), 4258–4272.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>
- Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1981). Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Journal of Cell Biology*, 88(3), 564–580.
<https://doi.org/10.1083/jcb.88.3.564>
- High, B., Cole, A. A., Chen, X., & Reese, T. S. (2015). Electron microscopic tomography reveals discrete transclef elements at excitatory and inhibitory synapses. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 7(JUN), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fnsyn.2015.00009>
- Higley, M. J. (2014). Localized GABAergic inhibition of dendritic Ca²⁺ signalling. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 567–572. <https://doi.org/10.1038/nrn3803>
- Higley, M. J., & Contreras, D. (2006). Balanced excitation and inhibition determine spike timing during frequency adaptation. *Journal of Neuroscience*, 26(2), 448–457.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3506-05.2006>
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2008). Calcium

- Signaling in Dendrites and Spines: Practical and Functional Considerations. *Neuron*, 59(6), 902–913.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.08.020>
- Higley, M. J., & Sabatini, B. L. (2012). Calcium signaling in dendritic spines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(4).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005686>
- Hines, M. L., & Carnevale, N. T. (2001). NEURON: A tool for neuroscientists. *Neuroscientist*, 7(2), 123–135.
<https://doi.org/10.1177/107385840100700207>
- Hodgkin, A. L., & Huxley, A. F. (1952). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol. (London)*, 117, 500–544.
<https://doi.org/10.1109/ICCCT2.2017.7972284>
- Hodgson, L., Nam, D., Mantell, J., Achim, A., & Verkade, P. (2014). Retracing in correlative light electron microscopy: Where is my object of interest? In *Methods in Cell Biology* (1st ed., Vol. 124).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801075-4.00001-X>
- Holbro, N., Grunditz, Å., & Oertner, T. G. (2009). Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(35), 15055–15060.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0905110106>
- Holderith, N., Lorincz, A., Katona, G., Rózsa, B., Kulik, A., Watanabe, M., & Nusser, Z. (2012). Release probability of hippocampal glutamatergic terminals scales with the size of the active zone. *Nature Neuroscience*, 15(7), 988–997.
<https://doi.org/10.1038/nn.3137>
- Holtmaat, A. J. G. D., Trachtenberg, J. T., Wilbrecht, L., Shepherd, G. M., Zhang, X., Knott, G. W., & Svoboda, K. (2005). Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron*, 45(2), 279–291.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.003>
- Holtmaat, A., & Svoboda, K. (2009). Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 647–658.
<https://doi.org/10.1038/nrn2699>
- Honkura, N., Matsuzaki, M., Noguchi, J., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2008). The Subspine Organization of Actin Fibers Regulates the Structure and Plasticity of Dendritic Spines. *Neuron*, 57(5), 719–729.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.013>
- Hruska, M., Henderson, N., Le Marchand, S. J., Jafri, H., & Dalva, M. B. (2018). Synaptic nanomodules underlie the organization and plasticity of spine synapses. *Nature Neuroscience*, 21(5), 671–682.
<https://doi.org/10.1038/s41593-018-0138-9>
- Hua, Y., Laserstein, P., & Helmstaedter, M. (2015). Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics. *Nature Communications*, 6, 1–7.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8923>
- Huang, B., Bates, M., & Zhuang, X. (2009). Super-Resolution Fluorescence Microscopy. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 993–1016.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.061906.092014>
- Hull, C., Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2009). Postsynaptic Mechanisms Govern the Differential Excitation of Cortical Neurons by Thalamic Inputs. *Journal of Neuroscience*, 29(28), 9127–9136.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.5971-08.2009>
- Iascone, D. M., Li, Y., Sumbul, U., Doron, M., Chen, H., Andreu, V., ... Polleux, F. (2018). Whole-neuron synaptic mapping reveals local balance between excitatory and inhibitory synapse organization. *BioRxiv*, 395384. <https://doi.org/10.1101/395384>
- Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., ... Greenough, W. T. (2001). Abnormal dendritic spine characteristics in the

- temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: A quantitative examination. *American Journal of Medical Genetics*, 98(2), 161–167.
[https://doi.org/10.1002/1096-8628\(20010115\)98:2<161::AID-AJMG1025>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1096-8628(20010115)98:2<161::AID-AJMG1025>3.0.CO;2-B)
- Isaacson, J. S., & Scanziani, M. (2011). How inhibition shapes cortical activity. *Neuron*, 72(2), 231–243.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.09.027>
- Izeddin, I., Specht, C. G., Lelek, M., Darzacq, X., Triller, A., Zimmer, C., & Dahan, M. (2011). Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PLoS ONE*, 6(1).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015611>
- Jahr, C. E., & Stevens, C. F. (1990). A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior. *Journal of Neuroscience*, 10(6), 1830–1837.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.10-06-01830.1990>
- Jarsky, T., Roxin, A., Kath, W. L., & Spruston, N. (2005). Conditional dendritic spike propagation following distal synaptic activation of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 8(12), 1667–1676.
<https://doi.org/10.1038/nn1599>
- Jayant, K., Hirtz, J. J., Plante, I. J. La, Tsai, D. M., De Boer, W. D. A. M., Semonche, A., ... Yuste, R. (2017). Targeted intracellular voltage recordings from dendritic spines using quantum-dot-coated nanopipettes. *Nature Nanotechnology*, 12(4), 335–342.
<https://doi.org/10.1038/nnano.2016.268>
- Jedlicka, P., Vlachos, A., Schwarzscher, S. W., & Deller, T. (2008). A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behavioural Brain Research*, 192(1), 12–19.
<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.033>
- Ji, X. Y., Zingg, B., Mesik, L., Xiao, Z., Zhang, L. I., & Tao, H. W. (2016). Thalamocortical Innervation Pattern in Mouse Auditory and Visual Cortex: Laminar and Cell-Type Specificity. *Cerebral Cortex*, 26(6), 2612–2625.
<https://doi.org/10.1093/cercor/bhv099>
- Jiang, M., Ash, R. T., Baker, S. A., Suter, B., Ferguson, A., Park, J., ... Smirnakis, S. M. (2013). Dendritic arborization and spine dynamics are abnormal in the mouse model of MECP2 duplication syndrome. *Journal of Neuroscience*, 33(50), 19518–19533.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1745-13.2013>
- Joesch, M., Mankus, D., Yamagata, M., Shahbazi, A., Schalek, R., Suissa-Peleg, A., ... Sanes, J. R. (2016). Reconstruction of genetically identified neurons imaged by serial-section electron microscopy. *ELife*, 5(2016JULY), 1–13.
<https://doi.org/10.7554/eLife.15015>
- Jones, E. G., & Powell, T. P. (1969). Morphological variations in the dendritic spines of the neocortex. *Journal of Cell Science*, 5(2), 509–529. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5362339>
- Karreman, M. A., Hyenne, V., Schwab, Y., & Goetz, J. G. (2016). Intravital Correlative Microscopy: Imaging Life at the Nanoscale. *Trends in Cell Biology*, 26(11), 848–863.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.07.003>
- Karreman, M. A., Mercier, L., Schieber, N. L., Shibue, T., Schwab, Y., & Goetz, J. G. (2014). Correlating intravital multi-photon microscopy to 3D electron microscopy of invading tumor cells using anatomical reference points. *PLoS ONE*, 9(12), 1–23.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114448>
- Karreman, M. A., Mercier, L., Schieber, N. L., Solecki, G., Allio, G., Winkler, F., ... Schwab, Y. (2016). Fast and precise targeting of single tumor cells in vivo by multimodal correlative microscopy. *Journal of Cell Science*, 129(2), 444–456.
<https://doi.org/10.1242/jcs.181842>
- Karreman, M. A., Ruthensteiner, B., Mercier, L., Schieber, N. L., Solecki, G., Winkler, F., ... Schwab, Y. (2017). Find your way with X-

- Ray: Using microCT to correlate in vivo imaging with 3D electron microscopy. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 140). <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.03.006>
- Kasai, H., Fukuda, M., Watanabe, S., Hayashi-Takagi, A., & Noguchi, J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. *Trends in Neurosciences*, 33(3), 121–129. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.01.001>
- Kastellakis, G., Cai, D. J., Mednick, S. C., Silva, A. J., & Poirazi, P. (2015). Synaptic clustering within dendrites: An emerging theory of memory formation. *Progress in Neurobiology*, 126, 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.12.002>
- Kath, W. L. (2005). Computational modeling of dendrites. *Journal of Neurobiology*, 64(1), 91–99. <https://doi.org/10.1002/neu.20154>
- Katz, Y., Menon, V., Nicholson, D. A., Geinisman, Y., Kath, W. L., & Spruston, N. (2009). Synapse Distribution Suggests a Two-Stage Model of Dendritic Integration in CA1 Pyramidal Neurons. *Neuron*, 63(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.023>
- Keller, P. J., & Stelzer, E. H. (2008). Quantitative in vivo imaging of entire embryos with Digital Scanned Laser Light Sheet Fluorescence Microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(6), 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.03.008>
- Kennedy, M. J., & Hanus, C. (2019). Architecture and Dynamics of the Neuronal Secretory Network. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35(1), 1–24. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100818-125418>
- Kneussel, M., Triller, A., & Choquet, D. (2014). SnapShot: Receptor dynamics at plastic synapses. *Cell*, 157(7), 1738–1738.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.002>
- Knott, G., Marchman, H., Wall, D., & Lich, B. (2008). Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *Journal of Neuroscience*, 28(12), 2959–2964. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3189-07.2008>
- Knott, G. W., Holtmaat, A., Trachtenberg, J. T., Svoboda, K., & Welker, E. (2009). A protocol for preparing GFP-labeled neurons previously imaged in vivo and in slice preparations for light and electron microscopic analysis. *Nature Protocols*, 4(8), 1145–1156. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.114>
- Knott, G. W., Holtmaat, A., Wilbrecht, L., Welker, E., & Svoboda, K. (2006). Spine growth precedes synapse formation in the adult neocortex in vivo. *Nature Neuroscience*, 9(9), 1117–1124. <https://doi.org/10.1038/nn1747>
- Knott, G. W., Quairiaux, C., Genoud, C., & Welker, E. (2002). Formation of Dendritic Spines with GABAergic Synapses Induced by Whisker Stimulation in Adult Mice. *Neuron*, 34, 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00663-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00663-3)
- Kobayashi, M., Hamada, T., Kogo, M., Yanagawa, Y., Obata, K., & Kang, Y. (2008). Developmental profile of GABAA-mediated synaptic transmission in pyramidal cells of the somatosensory cortex. *European Journal of Neuroscience*, 28(5), 849–861. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06401.x>
- Koch, C., Poggio, T., & Torre, V. (1983). Nonlinear interactions in a dendritic tree: localization, timing, and role in information processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(9), 2799–2802. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.9.2799>
- Koch, C., & Segev, I. (2000). The role of single neurons in information processing. *Nature Neuroscience*, 3(11s), 1171–1177. <https://doi.org/10.1038/81444>
- Koch, C., & Zador, A. (1993). The Function of Dendritic Spines: Devices Rather Than Electrical Compartmentalization. *The Journal of Neuroscience*, 13(February).

- Kolk, S. M., de Mooij-Malsen, A. J., & Martens, G. J. M. (2011). Spatiotemporal Molecular Approach of in utero Electroporation to Functionally Decipher Endophenotypes in Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4(November), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00037>
- Korkotian, E., Frotscher, M., & Segal, M. (2014). Synaptopodin regulates spine plasticity: Mediation by calcium stores. *Journal of Neuroscience*, 34(35), 11641–11651.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0381-14.2014>
- Korobova, F., & Svitkina, T. (2010). Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 165–176.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Korogod, N., Petersen, C. C. H., & Knott, G. W. (2015). Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation. *ELife*, 4(AUGUST2015), 1–17.
<https://doi.org/10.7554/eLife.05793>
- Kremer, J. R., Mastronarde, D. N., & McIntosh, J. R. (1996). Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *Journal of Structural Biology*, 116(1), 71–76.
<https://doi.org/10.1006/jsbi.1996.0013>
- Krueger-Burg, D., Papadopoulos, T., & Brose, N. (2017). Organizers of inhibitory synapses come of age. *Current Opinion in Neurobiology*, 45, 66–77.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.04.003>
- Kubota, Y., Karube, F., Nomura, M., & Kawaguchi, Y. (2016). The Diversity of Cortical Inhibitory Synapses. *Frontiers in Neural Circuits*, 10(April), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2016.00027>
- Kubota, Y., Kondo, S., Nomura, M., Hatada, S., Yamaguchi, N., Mohamed, A. A., ... Kawaguchi, Y. (2015). Functional effects of distinct innervation styles of pyramidal cells by fast spiking cortical interneurons. *ELife*, 4(July 2015), 1–27.
<https://doi.org/10.7554/eLife.07919>
- Kubota, Y., van Rijnsoever, C., Kondo, S., Karube, F., & Kawaguchi, Y. (2007). Neocortical Inhibitory Terminals Innervate Dendritic Spines Targeted by Thalamocortical Afferents. *Journal of Neuroscience*, 27(5), 1139–1150.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3846-06.2007>
- Kukulski, W., Schorb, M., Kaksonen, M., & Briggs, J. A. G. (2012). Plasma membrane reshaping during endocytosis is revealed by time-resolved electron tomography. *Cell*, 150(3), 508–520.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.046>
- Kukulski, W., Schorb, M., Welsch, S., Picco, A., Kaksonen, M., & Briggs, J. A. G. (2011). Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision. *Journal of Cell Biology*, 192(1), 111–119.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201009037>
- Kukulski, W., Schorb, M., Welsch, S., Picco, A., Kaksonen, M., & Briggs, J. A. G. (2012). Precise, Correlated Fluorescence Microscopy and Electron Tomography of Lowicryl Sections Using Fluorescent Fiducial Markers. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 111).
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416026-2.00013-3>
- Lagache, T., Grassart, A., Dallongeville, S., Faklaris, O., Sauvonnet, N., Dufour, A., ... Olivo-Marin, J. C. (2018). Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. *Nature Communications*, 9(1), 102–108.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03053-x>
- Lagache, T., Jayant, K., & Yuste, R. (2018). Electrodiffusion model of synaptic potentials in dendritic spines. *BioRxiv*, (i), 274373. <https://doi.org/10.1101/274373>
- Lagache, T., Jayant, K., & Yuste, R. (2019). Electrodiffusion models of synaptic potentials in dendritic spines. *Journal of*

- Computational Neuroscience*, 47(1), 77–89.
- Laissue, P. P., Alghamdi, R. A., Tomancak, P., Reynaud, E. G., & Shroff, H. (2017). Assessing phototoxicity in live fluorescence imaging. *Nature Methods*, 14(7), 657–661. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4344>
- Lam, S. S., Martell, J. D., Kamer, K. J., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Mootha, V. K., & Ting, A. Y. (2014). Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature Methods*, 12(1), 51–54. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3179>
- Larkum, M. E. (2009). Synaptic Integration in Tuft Dendrites. *Science*, 325(2009), 756–761. <https://doi.org/10.1126/science.1171958>
- Lauterbach, M. A., Guillon, M., Desnos, C., Khamsing, D., Jaffal, Z., Darchen, F., & Emiliani, V. (2016). Superresolving dendritic spine morphology with STED microscopy under holographic photostimulation. *Neurophotonics*, 3(4), 041806. <https://doi.org/10.1117/1.nph.3.4.041806>
- Lees, R. M., Peddie, C. J., Collinson, L. M., Ashby, M. C., & Verkade, P. (2017). Correlative two-photon and serial block face scanning electron microscopy in neuronal tissue using 3D near-infrared branding maps. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 140). <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2017.03.007>
- Lefort, S., Tómm, C., Floyd Sarria, J. C., & Petersen, C. C. H. (2009). The Excitatory Neuronal Network of the C2 Barrel Column in Mouse Primary Somatosensory Cortex. *Neuron*, 61(2), 301–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.12.020>
- Lerner, E., Cordes, T., Ingargiola, A., Alhadid, Y., Chung, S. Y., Michalet, X., & Weiss, S. (2018). Toward dynamic structural biology: Two decades of single-molecule Förster resonance energy transfer. *Science*, 359(6373). <https://doi.org/10.1126/science.aan1133>
- Linsalata, A. E., Chen, X., Winters, C. A., & Reese, T. S. (2014). Electron tomography on γ -aminobutyric acid-ergic synapses reveals a discontinuous postsynaptic network of filaments. *Journal of Comparative Neurology*, 522(4), 921–936. <https://doi.org/10.1002/cne.23453>
- Lisman, J. E. (2017). Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: Long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1715). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0260>
- Lisman, J. E., Raghavachari, S., & Tsien, R. W. (2007). The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(8), 597–609. <https://doi.org/10.1038/nrn2191>
- Lo Turco, J., Manent, J. B., & Sidiqi, F. (2009). New and improved tools for in utero electroporation studies of developing cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 19(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/cercor/bhp033>
- Losonczy, A., Makara, J. K., & Magee, J. C. (2008). Compartmentalized dendritic plasticity and input feature storage in neurons. *Nature*, 452(7186), 436–441. <https://doi.org/10.1038/nature06725>
- Loussert Fonta, C., & Humbel, B. M. (2015). Correlative microscopy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 581, 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.05.017>
- Lučić, V., Yang, T., Schweikert, G., Förster, F., & Baumeister, W. (2005). Morphological characterization of molecular complexes present in the synaptic cleft. *Structure*, 13(3), 423–434. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.02.005>
- Luckner, M., Burgold, S., Filser, S., Scheungrab, M., Niyaz, Y., Hummel, E., ... Herms, J. (2018). Label-free 3D-CLEM Using Endogenous Tissue Landmarks. *iScience*, 6, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.07.012>
- MacGillavry, H. D., Song, Y., Raghavachari, S., &

- Blanpied, T. A. (2013). Nanoscale scaffolding domains within the postsynaptic density concentrate synaptic ampa receptors. *Neuron*, 78(4), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.03.009>
- MacLachlan, C., Sahlender, D. A., Hayashi, S., Molnár, Z., & Knott, G. (2018). Block Face Scanning Electron Microscopy of Fluorescently Labeled Axons Without Using Near Infra-Red Branding. *Frontiers in Neuroanatomy*, 12(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2018.00088>
- Maco, B., Holtmaat, A., Cantoni, M., Kreshuk, A., Straehle, C. N., Hamprecht, F. A., & Knott, G. W. (2013). Correlative In Vivo 2 Photon and Focused Ion Beam Scanning Electron Microscopy of Cortical Neurons. *PLoS ONE*, 8(2), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057405>
- Mahamid, J., Schampers, R., Persoon, H., Hyman, A. A., Baumeister, W., & Plitzko, J. M. (2015). A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms. *Journal of Structural Biology*, 192(2), 262–269. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.012>
- Majewska, A., Tashiro, A., & Yuste, R. (2000). Regulation of spine calcium dynamics by rapid spine motility. *Journal of Neuroscience*, 20(22), 8262–8268.
- Malatesta, M., Zancanaro, C., Costanzo, M., Cisterna, B., & Pellicciari, C. (2013). Simultaneous ultrastructural analysis of fluorochrome-photoconverted diaminobenzidine and gold immunolabelling in cultured cells. *European Journal of Histochemistry*, 57(3), 168–171. <https://doi.org/10.4081/ejh.2013.e26>
- Markram, H., Muller, E., Ramaswamy, S., Reimann, M. W., Abdellah, M., Sanchez, C. A., ... Schürmann, F. (2015). Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell*, 163(2), 456–492. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.029>
- Martell, J. D., Deerinck, T. J., Lam, S. S., Ellisman, M. H., & Ting, A. Y. (2017). Electron microscopy using the genetically encoded APEX2 tag in cultured mammalian cells. *Nature Protocols*, 12(9), 1792–1816. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.065>
- Masch, J. M., Steffens, H., Fischer, J., Engelhardt, J., Hubrich, J., Keller-Findeisen, J., ... Hell, S. W. (2018). Robust nanoscopy of a synaptic protein in living mice by organic-fluorophore labeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(34), E8047–E8056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1807104115>
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092. <https://doi.org/10.1038/nn736>
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429, 761–766. <https://doi.org/10.1038/255243a0>
- Mayford, M., & Reijmers, L. (2015). Exploring memory representations with activity-based genetics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3), 1–18. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021832>
- Megias, M., Emri, Z., Freund, T., & Gulyas, I. (2001). Total Number and Distribution of Inhibitory and Excitatory. *Neuroscience*, 102(3), 527–540. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10561>
- Meißlitzer-Ruppitsch, C., Röhr, C., Neumüller, J., Pavelka, M., & Ellinger, A. (2009). Photooxidation technology for correlated light and electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 235(3), 322–335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03220.x>
- Mercey, O., Al Jord, A., Rostaing, P., Mahuzier, A., Fortoul, A., Boudjema, A.-R., ... Meunier, A.

- (2019). Dynamics of centriole amplification in centrosome-depleted brain multiciliated progenitors. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49416-2>
- Miceli, S., Ness, T. V., Einevoll, G. T., & Schubert, D. (2017). Impedance Spectrum in Cortical Tissue: Implications for Propagation of LFP Signals on the Microscopic Level. *Eneuro*, 4(1), ENEURO.0291-16.2016. <https://doi.org/10.1523/eneuro.0291-16.2016>
- Micheva, K. D., & Smith, S. J. (2007). Array Tomography: A New Tool for Imaging the Molecular Architecture and Ultrastructure of Neural Circuits. *Neuron*, 55(1), 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.014>
- Miermans, C. A., Kusters, R. P. T., Hoogenraad, C. C., & Storm, C. (2017). Biophysical model of the role of actin remodeling on dendritic spine morphology. *PLoS ONE*, 12(2), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170113>
- Milne, J. L. S., Borgnia, M. J., Bartesaghi, A., Tran, E. E. H., Earl, L. A., Schauder, D. M., ... Subramaniam, S. (2013). Cryo-electron microscopy - A primer for the non-microscopist. *FEBS Journal*, 280(1), 28–45. <https://doi.org/10.1111/febs.12078>
- Minsky, M. (1987). Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope. *Scanning*, 10(1 988), 128–138.
- Mostany, R., Anstey, J. E., Crump, K. L., Maco, B., Knott, G., & Portera-Cailliau, C. (2013). Altered synaptic dynamics during normal brain aging. *Journal of Neuroscience*, 33(9), 4094–4104. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4825-12.2013>
- Müller-Reichert, T., & Verkade, P. (2014). Correlative Light and Electron Microscopy II. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 124).
- Müller-Reichert, T., & Verkade, P. (2017). Correlative Light and Electron Microscopy III. In *Methods in Cell Biology* (Vol. 140).
- Müller, W., & Connor, J. A. (1991). Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses. *Nature*, 354(6348), 73–76. <https://doi.org/10.1038/354073a0>
- Müllner, F. E., Wierenga, C. J., & Bonhoeffer, T. (2015). Precision of Inhibition: Dendritic Inhibition by Individual GABAergic Synapses on Hippocampal Pyramidal Cells Is Confined in Space and Time. *Neuron*, 87(3), 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.07.003>
- Nabavi, S., Fox, R., Proulx, C. D., Lin, J. Y., Tsien, R. Y., & Malinow, R. (2014). Engineering a memory with LTD and LTP. *Nature*, 511(7509), 348–352. <https://doi.org/10.1038/nature13294>
- Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., & Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*, 44(5), 759–767. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.016>
- Nägerl, U. V., Köstinger, G., Anderson, J. C., Martin, K. A. C., & Bonhoeffer, T. (2007). Protracted synaptogenesis after activity-dependent spinogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(30), 8149–8156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0511-07.2007>
- Nair, D., Hosy, E., Petersen, J. D., Constals, A., Giannone, G., Choquet, D., & Sibarita, J.-B. (2013). Super-Resolution Imaging Reveals That AMPA Receptors Inside Synapses Are Dynamically Organized in Nanodomains Regulated by PSD95. *Journal of Neuroscience*, 33(32), 13204–13224. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2381-12.2013>
- Nakahata, Y., & Yasuda, R. (2018). Plasticity of spine structure: Local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 10(AUG), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2018.00029>
- Nassi, J. J., Cepko, C. L., Born, R. T., & Beier, K. T. (2015). Neuroanatomy goes viral! *Frontiers in Neuroanatomy*, 9(July), 1–24.

- <https://doi.org/10.3389/fnana.2015.00080>
- Nevian, T., Larkum, M. E., Polsky, A., & Schiller, J. (2007). Properties of basal dendrites of layer 5 pyramidal neurons: A direct patch-clamp recording study. *Nature Neuroscience*, 10(2), 206–214. <https://doi.org/10.1038/nn1826>
- Ng, A. N., Doherty, A. J., Lombroso, P. J., Emptage, N. J., & Collingridge, G. L. (2014). Rapid regulation of endoplasmic reticulum dynamics in dendritic spines by NMDA receptor activation. *Molecular Brain*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13041-014-0060-3>
- Nicoll, R. A. (2017). A Brief History of Long-Term Potentiation. *Neuron*, 93(2), 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.015>
- Nimchinsky, E. A., Sabatini, B. L., & Svoboda, K. (2002). Structure and Function of Dendritic Spines. *Annual Review of Physiology*, 64(1), 313–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.160008>
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. (2005). Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. *Neuron*, 46(4), 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.03.015>
- Noguchi, J., Nagaoka, A., Watanabe, S., Ellis-Davies, G. C. R., Kitamura, K., Kano, M., ... Kasai, H. (2011). *In vivo* two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *The Journal of Physiology*, 589(10), 2447–2457. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.207100>
- Nusser, Z., Cull-Candy, S., & Farrant, M. (1997). Differences in synaptic GABA_A receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron*, 19, 697–709.
- Nusser, Z., Hájos, N., Somogyi, P., & Mody, I. (1998). Increased number of synaptic GABA_A receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature*, 395, 172–177.
- Oberlaender, M., De Kock, C. P. J., Bruno, R. M., Ramirez, A., Meyer, H. S., Dercksen, V. J., ... Sakmann, B. (2012). Cell type-specific three-dimensional structure of thalamocortical circuits in a column of rat vibrissa cortex. *Cerebral Cortex*, 22(10), 2375–2391. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhr317>
- Okabe, S. (2007). Molecular anatomy of the postsynaptic density. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 34(4), 503–518. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.01.006>
- Orlova, K., & Crino, P. B. (2010). The tuberous sclerosis complex. *Ann N Y Acad Sci.*, (1184), 87–105. https://doi.org/10.1007/978-1-4471-6765-5_120
- Paez-Segala, M. G., Sun, M. G., Shtengel, G., Viswanathan, S., Baird, M. A., Macklin, J. J., ... Looger, L. L. (2015). Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM. *Nature Methods*, 12(3), 215–218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3225>
- Palade, G. E., & Palay, S. L. (1954). Electron microscope observations of interneuronal and neuromuscular synapses. *Anat. Rec.*, 118, 335–336.
- Palmer, L. M. (2014). Dendritic integration in pyramidal neurons during network activity and disease. *Brain Research Bulletin*, 103, 2–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2013.09.010>
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383–400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>
- Paoletti, P., Ellis-Davies, G. C. R., & Mouroto, A. (2019). Optical control of neuronal ion channels and receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(September). <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0197-2>
- Patrizio, A., & Specht, C. G. (2016). Counting numbers of synaptic proteins: absolute

- quantification and single molecule imaging techniques. *Neurophotonics*, 3(4), 041805.
<https://doi.org/10.1117/1.nph.3.4.041805>
- Paul-Gilloteaux, P., Heiligenstein, X., Belle, M., Domart, M. C., Larijani, B., Collinson, L., ... Salamero, J. (2017). EC-CLEM: Flexible multidimensional registration software for correlative microscopies. *Nature Methods*, 14(2), 102–103.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4170>
- Paulus, W., & Rothwell, J. C. (2016). Membrane resistance and shunting inhibition: Where biophysics meets state-dependent human neurophysiology. *Journal of Physiology*, 594(10), 2719–2728.
<https://doi.org/10.1113/JP271452>
- Pedregosa, F., Varoquaux, G., Gramfort, A., Michel, V., Thirion, B., Grisel, O., ... Duchesnay, É. (2011). Scikit-Learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research*, 12(Oct), 2825–2830.
- Pennacchietti, F., Vascon, S., Nieuws, T., Rosillo, C., Das, S., Tyagarajan, S. K., ... Zancacchi, F. C. (2017). Nanoscale molecular reorganization of the inhibitory postsynaptic density is a determinant of gabaergic synaptic potentiation. *Journal of Neuroscience*, 37(7), 1747–1756.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0514-16.2016>
- Pereda, A. E. (2014). Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(4), 250–263.
<https://doi.org/10.1038/nrn3708>
- Perez, A. J., Seyedhosseini, M., Deerinck, T. J., Bushong, E. A., Panda, S., Tasdizen, T., & Ellisman, M. H. (2014). A workflow for the automatic segmentation of organelles in electron microscopy image stacks. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(November), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00126>
- Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. (1970). The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat*, 127(4), 321–355.
Retrieved from <https://genius.com/La-la-land-cast-another-day-of-sun-annotated>
- Poirazi, P., Brannon, T., & Mel, B. W. (2003). Pyramidal neuron as two-layer neural network. *Neuron*, 37(6), 989–999.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00149-1)
- Poirazi, P., & Mel, B. W. (2001). Impact of active dendrites and structural plasticity on the memory capacity of neural tissue. *Neuron*, 29(3), 779–796.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(01\)00252-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(01)00252-5)
- Popovic, M. A., Carnevale, N., Rozsa, B., & Zecevic, D. (2015). Electrical behaviour of dendritic spines as revealed by voltage imaging. *Nature Communications*.
<https://doi.org/10.1038/ncomms9436>
- Pulido, C., Trigo, F. F., Llano, I., & Marty, A. (2015). Vesicular Release Statistics and Unitary Postsynaptic Current at Single GABAergic Synapses. *Neuron*, 85(1), 159–172.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.12.006>
- Rah, J. C., Bas, E., Colonell, J., Mishchenko, Y., Karsh, B., Fetter, R. D., ... Isaac, J. T. R. (2013). Thalamocortical input onto layer 5 pyramidal neurons measured using quantitative large-scale array tomography. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(NOV), 1–16.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00177>
- Rajkovich, K. E., Loerwald, K. W., Hale, C. F., Hess, C. T., Gibson, J. R., & Huber, K. M. (2017). Experience-Dependent and Differential Regulation of Local and Long-Range Excitatory Neocortical Circuits by Postsynaptic Mef2c. *Neuron*, 93(1), 48–56.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.11.022>
- Rall, W. (1964). Theoretical significance of dendritic trees for neuronal input-output relations. *Neural Theory and Modeling*, 73–97.
- Rall, W. (1970). Cable properties of dendrites and effects of synaptic location. *Excitatory Synaptic Mechanisms*, 175–187.
- Ramon y Cajal, S. (1899). Regias y consejos

- sobre investigacion biologica. *Madrid Imprenta de Fontanet*.
- Raunser, S. (2017). Cryo-EM Revolutionizes the Structure Determination of Biomolecules. *Angewandte Chemie - International Edition*, 56(52), 16450–16452. <https://doi.org/10.1002/anie.201710679>
- Rhodes, P. (2006). The Properties and Implications of NMDA Spikes in Neocortical Pyramidal Cells. *Journal of Neuroscience*, 26(25), 6704–6715. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3791-05.2006>
- Robertson, J. D. (1953). Ultrastructure of two invertebrate synapses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82, 219–223.
- Rodriguez, E. A., Campbell, R. E., Lin, J. Y., Lin, M. Z., Miyawaki, A., Palmer, A. E., ... Tsien, R. Y. (2017). The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 42(2), 111–129. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.09.010>
- Rostaing, P., Real, E., Siksou, L., Lechaire, J. P., Boudier, T., Boeckers, T. M., ... Marty, S. (2006). Analysis of synaptic ultrastructure without fixative using high-pressure freezing and tomography. *European Journal of Neuroscience*, 24(12), 3463–3474. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05234.x>
- Rostaing, P., Weimer, R. M., Jorgensen, E. M., Triller, A., & Bessereau, J. L. (2004). Preservation of Immunoreactivity and Fine Structure of Adult *C. elegans* Tissues Using High-pressure Freezing. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52(4), 555. <https://doi.org/10.1177/002215540405200101>
- Roth, B. L. (2016). DREADDs for Neuroscientists. *Neuron*, 89(4), 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.040>
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A., & White, H. S. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International*, 61(4), 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.02.013>
- Russell, M. R. G., Lerner, T. R., Burden, J. J., Nkwe, D. O., Pelchen-Matthews, A., Domart, M.-C., ... Collinson, L. M. (2017). 3D correlative light and electron microscopy of cultured cells using serial blockface scanning electron microscopy. *Journal of Cell Science*, 130(1), 278–291. <https://doi.org/10.1242/jcs.188433>
- Sabatini, B. L., & Regehr, W. G. (1996). Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature*, 384(6605), 170–172. <https://doi.org/10.1038/384170a0>
- Sankaran, J., Karampatzakis, A., Rice, S. A., & Wohland, T. (2018). Quantitative imaging and spectroscopic technologies for microbiology. *FEMS Microbiology Letters*, 365(9), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsle/fny075>
- Sarid, L., Bruno, R., Sakmann, B., Segev, I., & Feldmeyer, D. (2007). Modeling a layer 4-to-layer 2/3 module of a single column in rat neocortex: Interweaving in vitro and in vivo experimental observations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), 16353–16358. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707853104>
- Sarid, L., Feldmeyer, D., Gidon, A., Sakmann, B., & Segev, I. (2015). Contribution of intracolumnar layer 2/3-to-Layer 2/3 excitatory connections in shaping the response to whisker deflection in rat barrel cortex. *Cerebral Cortex*, 25(4), 849–858. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht268>
- Sartori, A., Gatz, R., Beck, F., Rigort, A., Baumeister, W., & Plitzko, J. M. (2007). Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *Journal of Structural Biology*, 160(2), 135–145. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.07.011>
- Scala, F., Kobak, D., Shan, S., Bernaerts, Y., Laturnus, S., Cadwell, C. R., ... Tolias, A. S. (2018). Neocortical layer 4 in adult mouse

- differs in major cell types and circuit organization between primary sensory areas. *BioRxiv*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1101/507293>
- Schorb, M., Haberbosch, I., Hagen, W. J. H., Schwab, Y., & Mastronarde, D. N. (2019). Software tools for automated transmission electron microscopy. *Nature Methods*, 16(6), 471–477.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0396-9>
- Segal, M. (2017). Dendritic spines: Morphological building blocks of memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, 138, 3–9.
<https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.06.007>
- Segal, M., & Korkotian, E. (2014). Endoplasmic reticulum calcium stores in dendritic spines. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(JULY), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00064>
- Segev, I., & Rall, W. (1988). Computational Study of an Excitable Dendritic Spine. In *Journal of Neurophysiology* (Vol. 60). Retrieved from <http://jn.physiology.org/>
- Shah, F. A., Ruscsák, K., & Palmquist, A. (2019). 50 Years of Scanning Electron Microscopy of Bone—a Comprehensive Overview of the Important Discoveries Made and Insights Gained Into Bone Material Properties in Health, Disease, and Taphonomy. *Bone Research*, 7(1), 1–15.
<https://doi.org/10.1038/s41413-019-0053-z>
- Shapiro, L., Love, J., & Colman, D. R. (2007). Adhesion Molecules in the Nervous System: Structural Insights into Function and Diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 30(1), 451–474.
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113034>
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007a). The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 823–847.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. (2007b). The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 823–847.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.060805.160029>
- Shipman, S. L., Herring, B. E., Suh, Y. H., Roche, K. W., & Nicoll, R. A. (2013). Distance-dependent scaling of AMPARs is cell-autonomous and GluA2 dependent. *Journal of Neuroscience*, 33(33), 13312–13319.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0678-13.2013>
- Sigal, Y. M., Zhou, R., & Zhuang, X. (2018). Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science*, 361(6405), 880–887.
<https://doi.org/10.1126/science.aau1044>
- Siksou, L., Rostaing, P., Lechaire, J.-P., Boudier, T., Ohtsuka, T., Fejtová, A., ... Marty, S. (2007). Three-Dimensional Architecture of Presynaptic Terminal Cytomatrix. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 6868–6877.
- Siksou, L., Triller, A., & Marty, S. (2009). An emerging view of presynaptic structure from electron microscopic studies. *Journal of Neurochemistry*, 108(6), 1336–1342.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05888.x>
- Siksou, L., Triller, A., & Marty, S. (2011). Ultrastructural organization of presynaptic terminals. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(2), 261–268.
<https://doi.org/10.1016/j.conb.2010.12.003>
- Sjöstrand, S. F. (1953). The ultrastructure of the retinal rod synapses of the guinea pig eye. *J. Appl. Phys.*, 24, 1422.
- Skepper, J. N. (2000). Immunocytochemical strategies for electron microscopy: Choice or compromise. *Journal of Microscopy*, 199(1), 1–36.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00704.x>
- Smith, D., & Starborg, T. (2019). Serial block face scanning electron microscopy in cell

- biology: Applications and technology. *Tissue and Cell*, 57(May 2018), 111–122. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2018.08.011>
- Sonomura, T., Furuta, T., Nakatani, I., Yamamoto, Y., Unzai, T., Matsuda, W., ... Kaneko, T. (2013). Correlative analysis of immunoreactivity in confocal laser-scanning microscopy and scanning electron microscopy with focused ion beam milling. *Frontiers in Neural Circuits*, 7(FEBRUARY 2013), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00026>
- Sosinsky, G. E., Giepmans, B. N. G., Deerinck, T. J., Gaietta, G. M., & Ellisman, M. H. (2007). Markers for Correlated Light and Electron Microscopy. *Methods in Cell Biology*, 2007(79), 575–591. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(06\)79023-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(06)79023-9)
- Spacek, J., & Harris, K. M. (1997). Three-dimensional organization of smooth endoplasmic reticulum in hippocampal CA1 dendrites and dendritic spines of the immature and mature rat. *Journal of Neuroscience*, 17(1), 190–203. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.17-01-00190.1997>
- Specht, C. G. (2019). Fractional occupancy of synaptic binding sites and the molecular plasticity of inhibitory synapses. *Neuropharmacology*, (December 2018), 107493. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.01.008>
- Spruston, N. (2008). Pyramidal neurons: dendritic structure and synaptic integration. *Nature Reviews*, 9, 206–221. <https://doi.org/10.1038/nrn2286>
- Stuart, G., & Spruston, N. (2015). Dendritic integration: 60 years of progress. *Nature Neuroscience*, 18(12), 1713–1721. <https://doi.org/10.1038/nn.4157>
- Stuart, G., Spruston, N., & Häusser, M. (2016). Dendrites. In *Oxford University Press*.
- Südhof, T. C. (2004). the Synaptic Vesicle Cycle. *Annual Review of Neuroscience*, 27(1), 509–547. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412>
- Südhof, T. C. (2008). Neuroligins and neuroligins link synaptic function to cognitive disease. *Nature*, 455(7215), 903–911. <https://doi.org/10.1038/nature07456>
- Südhof, T. C. (2013). Neurotransmitter release: The last millisecond in the life of a synaptic vesicle. *Neuron*, 80(3), 675–690. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.022>
- Svoboda, K., Tank, D. W., & Denk, W. (1996). Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science*, 272(5262), 716–719. <https://doi.org/10.1126/science.272.5262.716>
- Takasaki, K., & Sabatini, B. L. (2014). Super-resolution 2-photon microscopy reveals that the morphology of each dendritic spine correlates with diffusive but not synaptic properties. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8(May), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00029>
- Tanaka, J., Matsuzaki, M., Tarusawa, E., Momiyama, A., Molnar, E., Kasai, H., & Shigemoto, R. (2005). Number and Density of AMPA Receptors in Single Synapses in Immature Cerebellum. *Journal of Neuroscience*, 25(4), 799–807. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4256-04.2005>
- Tang, A. H., Chen, H., Li, T. P., Metzbower, S. R., MacGillavry, H. D., & Blanpied, T. A. (2016). A trans-synaptic nanocolumn aligns neurotransmitter release to receptors. *Nature*, 536(7615), 210–214. <https://doi.org/10.1038/nature19058>
- Tang, J. C. Y., Rudolph, S., Dhande, O. S., Abaira, V. E., Choi, S., Lapan, S. W., ... Cepko, C. L. (2015). Cell type-specific manipulation with GFP-dependent Cre recombinase. *Nature Neuroscience*, 18(9), 1334–1341. <https://doi.org/10.1038/nn.4081>
- Tao, C.-L., Liu, Y.-T., Sun, R., Zhang, B., Qi, L., Shivakoti, S., ... Bi, G.-Q. (2018). Differentiation and Characterization of Excitatory and Inhibitory Synapses by Cryo-electron Tomography and Correlative Microscopy. *The Journal of*

- Neuroscience*, 38(6), 1493–1510.
<https://doi.org/10.1523/jneurosci.1548-17.2017>
- Tasic, B., & Nicovich, P. R. (2018). Cell types behaving in their natural habitat. *Science*, 362(6416), 749–750.
<https://doi.org/10.1126/science.aav4841>
- Tasic, B., Yao, Z., Graybuck, L. T., Smith, K. A., Nguyen, T. N., Bertagnolli, D., ... Zeng, H. (2018). Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas. *Nature*, 563(7729), 72–78.
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0654-5>
- Tavazoie, S. F., Alvarez, V. A., Ridenour, D. A., Kwiatkowski, D. J., & Sabatini, B. L. (2005). Regulation of neuronal morphology and function by the tumor suppressors Tsc1 and Tsc2. *Nature Neuroscience*, 8(12), 1727–1734.
<https://doi.org/10.1038/nn1566>
- Thestrup, T., Litzlbauer, J., Bartholomäus, I., Mues, M., Russo, L., Dana, H., ... Griesbeck, O. (2014). Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nature Methods*, 11(2), 175–182.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2773>
- Tizro, P., Choi, C., & Khanlou, N. (2019). Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy. In *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, New York, NY (Vol. 1897).
- Tønnesen, J., Katona, G., Rózsa, B., & Nägerl, U. V. (2014). Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nature Neuroscience*, 17(5), 678–685.
<https://doi.org/10.1038/nn.3682>
- Tønnesen, J., & Nägerl, U. V. (2013). Superresolution imaging for neuroscience. *Experimental Neurology*, 242, 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.004>
- Tønnesen, J., & Nägerl, U. V. (2016). Dendritic spines as tunable regulators of synaptic signals. *Frontiers in Psychiatry*, 7(JUN).
<https://doi.org/10.3389/fpsy.2016.00101>
- Tritsch, D., Chesnoy-Marchais, D., & Feltz, A. (1998). Physiologie du neurone. In *Doin Paris*.
<https://doi.org/10.15178/va.2001.28.44-52>
- Tsai, N. P., Wilkerson, J. R., Guo, W., Maksimova, M. A., Demartino, G. N., Cowan, C. W., & Huber, K. M. (2012). Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95. *Cell*, 151(7), 1581–1594.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.040>
- Tsang, T. K., Bushong, E. A., Boassa, D., Hu, J., Romoli, B., Phan, S., ... Ellisman, M. H. (2018). High-quality ultrastructural preservation using cryofixation for 3d electron microscopy of genetically labeled tissues. *ELife*, 7, 1–23.
<https://doi.org/10.7554/eLife.35524>
- Tyagarajan, S. K., & Fritschy, J. M. (2014). Gephyrin: A master regulator of neuronal function? *Nature Reviews Neuroscience*, 15(3), 141–156.
<https://doi.org/10.1038/nrn3670>
- Uchizono, K. (1965). Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature*, 207(997), 642–643.
- van Rijnsoever, C., Oorschot, V., & Klumperman, J. (2008). Correlative light-electron microscopy (CLEM) combining live-cell imaging and immunolabeling of ultrathin cryosections. *Nature Methods*, 5(11), 973–980.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1263>
- van Versendaal, D., Rajendran, R., Saiepour, H. M., Klooster, J., Smit-Rigter, L., Sommeijer, J. P., ... Levelt, C. N. (2012). Elimination of Inhibitory Synapses Is a Major Component of Adult Ocular Dominance Plasticity. *Neuron*, 74(2), 374–383.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.03.015>
- Vicidomini, G., Bianchini, P., & Diaspro, A. (2018). STED super-resolved microscopy. *Nature Methods*, 15(3), 173–182.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4593>
- Villa, K. L., Berry, K. P., Subramanian, J., Cha, J. W., Oh, W. C., Kwon, H. B., ... Nedivi, E. (2016). Inhibitory Synapses Are Repeatedly Assembled and Removed at Persistent Sites In Vivo. *Neuron*, 89(4),

- 756–769.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.01.010>
- Villalba, R. M., & Smith, Y. (2010). Striatal spine plasticity in Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroanatomy*, 4(DEC), 1–7.
<https://doi.org/10.3389/fnana.2010.00133>
- Villalba, R. M., & Smith, Y. (2011a). Differential structural plasticity of corticostriatal and thalamostriatal axo-spinous synapses in MPTP-treated parkinsonian monkeys. *Journal of Comparative Neurology*, 519(5), 989–1005.
<https://doi.org/10.1002/cne.22563>
- Villalba, R. M., & Smith, Y. (2011b). Neuroglial plasticity at striatal glutamatergic synapses in Parkinson's disease. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5(AUGUST 2011), 1–9.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2011.00068>
- Vlachos, A. (2011). Synaptopodin and the spine apparatus organelle-Regulators of different forms of synaptic plasticity? *Annals of Anatomy*, 194(4), 317–320.
<https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.10.014>
- Vlachos, A., Korkotian, E., Schonfeld, E., Copanaki, E., Deller, T., & Segal, M. (2009). Synaptopodin Regulates Plasticity of Dendritic Spines in Hippocampal Neurons. *Journal of Neuroscience*, 29(4), 1017–1033.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5528-08.2009>
- Walton, J. (1979). Lead an en Bloc Contrast Stain Particularly Ultrastructural Enzymology ' Useful for. *Health (San Francisco)*.
- Wanner, A. A., Kirschmann, M. A., & Genoud, C. (2015). Challenges of microtome-based serial block-face scanning electron microscopy in neuroscience. *Journal of Microscopy*, 259(2), 137–142.
<https://doi.org/10.1111/jmi.12244>
- Watanabe, S., Punge, A., Hollopeter, G., Willig, K. I., Hobson, R. J., Davis, M. W., ... Jorgensen, E. M. (2011). Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nature Methods*, 8(1), 80–84.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1537>
- Weber, B., Tranfield, E. M., Höög, J. L., Baum, D., Antony, C., Hyman, T., ... Prohaska, S. (2014). Automated stitching of microtubule centerlines across serial electron tomograms. *PLoS ONE*, 9(12), 1–36.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113222>
- Wegner, W., Mott, A. C., Grant, S. G. N., Steffens, H., & Willig, K. I. (2018). In vivo STED microscopy visualizes PSD95 sub-structures and morphological changes over several hours in the mouse visual cortex. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-18640-z>
- Wiegert, J. S., & Oertner, T. G. (2013). Long-Term depression triggers the selective elimination of weakly integrated synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47).
<https://doi.org/10.1073/pnas.1315926110>
- Williams, S. R., & Stuart, G. J. (2002). Dependence of EPSP efficacy on synapse location in neocortical pyramidal neurons. *Science*, 295(5561), 1907–1910.
<https://doi.org/10.1126/science.1067903>
- Williams, S. R., & Stuart, G. J. (2003). Role of dendritic synapse location in the control of action potential output. *Trends in Neurosciences*, 26(3), 147–154.
[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(03\)00035-3](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00035-3)
- Wolff, G., Hagen, C., Grünewald, K., & Kaufmann, R. (2016). Towards correlative super-resolution fluorescence and electron cryo-microscopy. *Biology of the Cell*, 108(9), 245–258.
<https://doi.org/10.1111/boc.201600008>
- Wu, L. G., Ryan, T. A., & Lagnado, L. (2007). Modes of vesicle retrieval at ribbon synapses, calyx-type synapses, and small central synapses. *Journal of Neuroscience*, 27(44), 11793–11802.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3471-07.2007>

- Yang, X., & Specht, C. G. (2019). Subsynaptic domains in super-resolution microscopy: The treachery of images. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(July).
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00161>
- Yasuda, R. (2017). Biophysics of Biochemical Signaling in Dendritic Spines: Implications in Synaptic Plasticity. *Biophysical Journal*, 113(10), 2152–2159.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.07.029>
- Yuste, R. (2013). Electrical Compartmentalization in Dendritic Spines. *Annual Review of Neuroscience*, 36(1), 429–449.
<https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-062111-150455>
- Yuste, R., Majewska, A., & Holthoff, K. (2000). From form to function: Calcium compartmentalization in dendritic spines. *Nature Neuroscience*, 3(7), 653–659.
<https://doi.org/10.1038/76609>
- Yuzaki, M. (2018). Two Classes of Secreted Synaptic Organizers in the Central Nervous System. *Annual Review of Physiology*, 80(1), 243–262.
<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021317-121322>
- Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. M. (2004). Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*, 44(5), 749–757.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.011>
- Zito, K., Parnas, D., Fetter, R. D., Isacoff, E. Y., & Goodman, C. S. (1999). Watching a synapse grow: Noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*, 22(4), 719–729.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80731-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80731-X)
- Zuber, B., Nikonenko, I., Klauser, P., Müller, D., & Dubochet, J. (2005). The mammalian central nervous synaptic cleft contains a high density of periodically organized complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), 19192–19197.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0509527102>
- Zuo, Y., Lin, A., Chang, P., & Gan, W. B. (2005). Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron*, 46(2), 181–189.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.001>

ANNEXES

ANNEXE 1

Supplemental Table 1

**Correlative Light Electron Microscopy: Connecting Synaptic
Structure and Function**

Isabell Begemann^{1,2}, Milos Galic^{1,2,*}

¹ DFG Cluster of Excellence ‘Cells in Motion’, (EXC 1003), University of Muenster
Waldeyerstrasse 15, 48149 Muenster, Germany

² Institute of Medical Physics and Biophysics, University of Muenster
Robert Koch Strasse 31, 48149 Muenster, Germany

Supplemental Table 1: References for Figure 3

	#	Reference
SEM (ultrastruct.)- Confocal	1	Begemann, I., A. Viplav, C. Rasch and M. Galic (2015). "Stochastic Micro-Pattern for Automated Correlative Fluorescence - Scanning Electron Microscopy." <i>Sci Rep</i> 5 : 17973.
	2	Galic, M., F. C. Tsai, S. R. Collins, M. Matis, S. Bandara and T. Meyer (2014). "Dynamic recruitment of the curvature-sensitive protein ArhGAP44 to nanoscale membrane deformations limits exploratory filopodia initiation in neurons." <i>Elife</i> 3 .
SEM (ultrastruct.) - EPI	3	Begemann, I., A. Viplav, C. Rasch and M. Galic (2015). "Stochastic Micro-Pattern for Automated Correlative Fluorescence - Scanning Electron Microscopy." <i>Sci Rep</i> 5 : 17973.
	4	Liv, N., A. C. Zonneville, A. C. Narvaez, A. P. Effting, P. W. Voorneveld, M. S. Lucas, J. C. Hardwick, R. A. Wepf, P. Kruit and J. P. Hoogenboom (2013). "Simultaneous correlative scanning electron and high-NA fluorescence microscopy." <i>PLoS One</i> 8 (2): e55707.
SEM (sections) - Confocal	5	Micheva, K. D. and S. J. Smith (2007). "Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits." <i>Neuron</i> 55 (1): 25-36.
	6	Shu, X., V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien (2011). "A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms." <i>PLoS Biol</i> 9 (4): e1001041.
	7	Watanabe, S., A. Punge, G. Hollopeter, K. I. Willig, R. J. Hobson, M. W. Davis, S. W. Hell and E. M. Jorgensen (2011). "Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy." <i>Nature Methods</i> 8 (1): 80-U117.
	8	Urwyler, O., A. Izadifar, D. Dascenco, M. Petrovic, H. H. He, D. Ayaz, A. Kremer, S. Lippens, P. Baatsen, C. J. Guerin and D. Schmucker (2015). "Investigating CNS synaptogenesis at single-synapse resolution by combining reverse genetics with correlative light and electron microscopy." <i>Development</i> 142 (2): 394-405.
SEM (sections) - EPI	9	Collman, F., J. Buchanan, K. D. Phend, K. D. Micheva, R. J. Weinberg and S. J. Smith (2015). "Mapping Synapses by Conjugate Light-Electron Array Tomography." <i>Journal of Neuroscience</i> 35 (14): 5792-5807.
	10	Micheva, K. D. and S. J. Smith (2007). "Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits." <i>Neuron</i> 55 (1): 25-36.
	11	Liv, N., A. C. Zonneville, A. C. Narvaez, A. P. Effting, P. W. Voorneveld, M. S. Lucas, J. C. Hardwick, R. A. Wepf, P. Kruit and J. P. Hoogenboom (2013). "Simultaneous correlative scanning electron and high-NA fluorescence microscopy." <i>PLoS One</i> 8 (2): e55707.
	12	Peddie, C. J., K. Blight, E. Wilson, C. Melia, J. Marrison, R. Carzaniga, M. C. Domart, P. O'Toole, B. Larijani and L. M. Collinson (2014). "Correlative and integrated light and electron microscopy of in-resin GFP fluorescence, used to localise diacylglycerol in mammalian cells." <i>Ultramicroscopy</i> 143 : 3-14.
SEM (sections) - AT	13	Collman, F., J. Buchanan, K. D. Phend, K. D. Micheva, R. J. Weinberg and S. J. Smith (2015). "Mapping Synapses by Conjugate Light-Electron Array Tomography." <i>Journal of Neuroscience</i> 35 (14): 5792-5807.
	14	Micheva, K. D. and S. J. Smith (2007). "Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits." <i>Neuron</i> 55 (1): 25-36.
	15	Shu, X., V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien (2011). "A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms." <i>PLoS Biol</i> 9 (4): e1001041.

SEM (sections) – PALM/STORM	16	Kopek, B. G., G. Shtengel, J. B. Grimm, D. A. Clayton and H. F. Hess (2013). "Correlative photoactivated localization and scanning electron microscopy." <u>PLoS One</u> 8 (10): e77209.
	17	Paez-Segala, M. G., M. G. Sun, G. Shtengel, S. Viswanathan, M. A. Baird, J. J. Macklin, R. Patel, J. R. Allen, E. S. Howe, G. Piszczek, H. F. Hess, M. W. Davidson, Y. Wang and L. L. Looger (2015). "Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM." <u>Nat Methods</u> 12 (3): 215-218, 214 p following 218.
	18	Watanabe, S., A. Punge, G. Hollopeter, K. I. Willig, R. J. Hobson, M. W. Davis, S. W. Hell and E. M. Jorgensen (2011). "Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy." <u>Nature Methods</u> 8 (1): 80-U117.
SEM (sections) – STED	19	Watanabe, S., A. Punge, G. Hollopeter, K. I. Willig, R. J. Hobson, M. W. Davis, S. W. Hell and E. M. Jorgensen (2011). "Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy." <u>Nature Methods</u> 8 (1): 80-U117.
SEM (sections) – SIM	20	Wanner, G., E. Schroeder-Reiter, W. Ma, A. Houben and V. Schubert (2015). "The ultrastructure of mono- and holocentric plant centromeres: an immunological investigation by structured illumination microscopy and scanning electron microscopy." <u>Chromosoma</u> 124 (4): 503-517.
TEM – Confocal	21	Ligeon, L. A., N. Barois, E. Werkmeister, A. Bongiovanni and F. Lafont (2015). "Structured illumination microscopy and correlative microscopy to study autophagy." <u>Methods</u> 75 : 61-68.
	22	Deerinck, T. J., M. E. Martone, V. Levram, D. P. L. Green, R. Y. Tsien, D. L. Spector, S. Huang and M. H. Ellisman (1994). "Fluorescence Photooxidation with Eosin - a Method for High-Resolution Immunolocalization and in-Situ Hybridization Detection for Light and Electron-Microscopy." <u>Journal of Cell Biology</u> 126 (4): 901-910.
	23	Giepmans, B. N., T. J. Deerinck, B. L. Smarr, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman (2005). "Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots." <u>Nat Methods</u> 2 (10): 743-749.
	24	Hohensee, S., W. Bleiss and C. Duch (2008). "Correlative electron and confocal microscopy assessment of synapse localization in the central nervous system of an insect." <u>J Neurosci Methods</u> 168 (1): 64-70.
	25	Modla, S., J. Mendonca, K. J. Czymmek and R. E. Akins (2010). "Identification of neuromuscular junctions by correlative confocal and transmission electron microscopy." <u>J Neurosci Methods</u> 191 (2): 158-165.
	26	Martell, J. D., Deerinck, T. J., Sancak, Y., Poulos, T. L., Mootha, V. K., Sosinsky, G. E., Ellisman, M. H. and Ting, A. Y. (2012). "Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy". <u>Nat Biotechnol</u> 30 (11): 1143-8.
	27	Shu, X., V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien (2011). "A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms." <u>PLoS Biol</u> 9 (4): e1001041.
	28	Urwiler, O., A. Izadifar, D. Dascenco, M. Petrovic, H. H. He, D. Ayaz, A. Kremer, S. Lippens, P. Baatsen, C. J. Guerin and D. Schmucker (2015). "Investigating CNS synaptogenesis at single-synapse resolution by combining reverse genetics with correlative light and electron microscopy." <u>Development</u> 142 (2): 394-405.
	29	Vicidomini, G., M. C. Gagliani, K. Cortese, J. Krieger, P. Buescher, P. Bianchini, P. Boccacci, C. Tacchetti and A. Diaspro (2010). "A novel approach for correlative light electron microscopy analysis." <u>Microsc Res Tech</u> 73 (3): 215-224.

TEM - AT	30	Collman, F., J. Buchanan, K. D. Phend, K. D. Micheva, R. J. Weinberg and S. J. Smith (2015). "Mapping Synapses by Conjugate Light-Electron Array Tomography." <u>Journal of Neuroscience</u> 35 (14): 5792-5807.
TEM - EPI	31	Collman, F., J. Buchanan, K. D. Phend, K. D. Micheva, R. J. Weinberg and S. J. Smith (2015). "Mapping Synapses by Conjugate Light-Electron Array Tomography." <u>Journal of Neuroscience</u> 35 (14): 5792-5807.
	32	Deerinck, T. J., M. E. Martone, V. Levram, D. P. L. Green, R. Y. Tsien, D. L. Spector, S. Huang and M. H. Ellisman (1994). "Fluorescence Photooxidation with Eosin - a Method for High-Resolution Immunolocalization and in-Situ Hybridization Detection for Light and Electron-Microscopy." <u>Journal of Cell Biology</u> 126 (4): 901-910.
	33	Giepmans, B. N., T. J. Deerinck, B. L. Smarr, Y. Z. Jones and M. H. Ellisman (2005). "Correlated light and electron microscopic imaging of multiple endogenous proteins using Quantum dots." <u>Nat Methods</u> 2 (10): 743-749.
	34	Kandela, I. K., R. Bleher and R. M. Albrecht (2007). "Multiple correlative immunolabeling for light and electron microscopy using fluorophores and colloidal metal particles." <u>J Histochem Cytochem</u> 55 (10): 983-990.
	35	Korobova, F. and T. Svitkina (2010). "Molecular Architecture of Synaptic Actin Cytoskeleton in Hippocampal Neurons Reveals a Mechanism of Dendritic Spine Morphogenesis." <u>Molecular Biology of the Cell</u> 21 (1): 165-176.
	36	Peddie, C. J., K. Blight, E. Wilson, C. Melia, J. Marrison, R. Carzaniga, M. C. Domart, P. O'Toole, B. Larijani and L. M. Collinson (2014). "Correlative and integrated light and electron microscopy of in-resin GFP fluorescence, used to localise diacylglycerol in mammalian cells." <u>Ultramicroscopy</u> 143 : 3-14.
TEM - STORM/ PALM	37	Paez-Segala, M. G., M. G. Sun, G. Shtengel, S. Viswanathan, M. A. Baird, J. J. Macklin, R. Patel, J. R. Allen, E. S. Howe, G. Piszczek, H. F. Hess, M. W. Davidson, Y. Wang and L. L. Looger (2015). "Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM." <u>Nat Methods</u> 12 (3): 215-218, 214 p following 218.
TEM - SIM	38	Al Jord, A., A. I. Lemaitre, N. Delgehyr, M. Faucourt, N. Spassky and A. Meunier (2014). "Centriole amplification by mother and daughter centrioles differs in multiciliated cells." <u>Nature</u> 516 (7529): 104-107.
	39	Ligeon, L. A., N. Barois, E. Werkmeister, A. Bongiovanni and F. Lafont (2015). "Structured illumination microscopy and correlative microscopy to study autophagy." <u>Methods</u> 75 : 61-68.
ET - Confocal	40	Shu, X., V. Lev-Ram, T. J. Deerinck, Y. Qi, E. B. Ramko, M. W. Davidson, Y. Jin, M. H. Ellisman and R. Y. Tsien (2011). "A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms." <u>PLoS Biol</u> 9 (4): e1001041.
	41	Vicidomini, G., M. C. Gagliani, K. Cortese, J. Krieger, P. Buescher, P. Bianchini, P. Boccacci, C. Tacchetti and A. Diaspro (2010). "A novel approach for correlative light electron microscopy analysis." <u>Microsc Res Tech</u> 73 (3): 215-224.
ET - EPI	42	Grabenbauer, M., W. J. C. Geerts, J. Fernandez-Rodriguez, A. Hoenger, A. J. Koster and T. Nilsson (2005). "Correlative microscopy and electron tomography of GFP through photooxidation." <u>Nature Methods</u> 2 (11): 857-862.
FIB-SEM - Confocal	43	Sonomura, T., T. Furuta, I. Nakatani, Y. Yamamoto, S. Honma and T. Kaneko (2014). "Attempt of correlative observation of morphological synaptic connectivity by combining confocal laser-scanning microscope and FIB-SEM for immunohistochemical staining technique." <u>Microscopy (Oxf)</u> 63 Suppl 1 : i8.

	44	Kopek, B. G., G. Shtengel, J. B. Grimm, D. A. Clayton and H. F. Hess (2013). "Correlative photoactivated localization and scanning electron microscopy." <u>PLoS One</u> 8 (10): e77209.
	45	Canty, A. J., L. Huang, J. S. Jackson, G. E. Little, G. Knott, B. Maco and V. De Paola (2013). "In-vivo single neuron axotomy triggers axon regeneration to restore synaptic density in specific cortical circuits." <u>Nat Commun</u> 4 : 2038.
FIB-SEM – PALM/STORM	46	Kopek, B. G., G. Shtengel, C. S. Xu, D. A. Clayton and H. F. Hess (2012). "Correlative 3D superresolution fluorescence and electron microscopy reveal the relationship of mitochondrial nucleoids to membranes." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 109 (16): 6136-6141.
	47	Wanner, G., E. Schroeder-Reiter, W. Ma, A. Houben and V. Schubert (2015). "The ultrastructure of mono- and holocentric plant centromeres: an immunological investigation by structured illumination microscopy and scanning electron microscopy." <u>Chromosoma</u> 124 (4): 503-517.
FIB-SEM – 2 Photon/LSM	48	Blazquez-Llorca, L., E. Hummel, H. Zimmerman, C. Zou, S. Burgold, J. Rietdorf and J. Herms (2015). "Correlation of two-photon in vivo imaging and FIB/SEM microscopy." <u>J Microsc</u> 259 (2): 129-136.
	49	Maco, B., Cantoni, M., Holtmaat, A., Kreshuk, A., Hamprecht, F. A., and Knott, G. W. (2014). Semiautomated correlative 3D electron microscopy of <i>in vivo</i> -imaged axons and dendrites. <i>Nat. Protoc.</i> 9 :1354–1366. doi: 10.1038/nprot.2014.101
	50	Canty, A. J., L. Huang, J. S. Jackson, G. E. Little, G. Knott, B. Maco and V. De Paola (2013). "In-vivo single neuron axotomy triggers axon regeneration to restore synaptic density in specific cortical circuits." <u>Nat Commun</u> 4 : 2038.

ANNEXE 2

***Trans*-Synaptic Signaling through the Glutamate Receptor Delta-1 Mediates Inhibitory Synapse Formation in Cortical Pyramidal Neurons**

Highlights

- GluD1 mediates the formation and specification of inhibitory synapses in the cortex
- GluD1 forms *trans*-synaptic interactions via Cbln4, a protein secreted by SST⁺ INs
- GluD1 elicits agonist-dependent postsynaptic signaling via ARHGEF12 and PPP1R12A
- GluD1 is a maverick iGluR operating through non-ionotropic mechanisms

Authors

Matteo Fossati, Nora Assendorp, Olivier Gemin, ..., Guillaume Arras, Damarys Loew, Cécile Charrier

Correspondence

cecile.charrier@ens.fr

In Brief

Fossati et al. show that, in stark contrast to other iGluRs, the glutamate receptor delta-1 (GluD1) operates at inhibitory, rather than excitatory, synapses in the cortex. GluD1 mediates *trans*-synaptic signaling governing the formation of synapses between specific interneurons and pyramidal neurons.

Trans-Synaptic Signaling through the Glutamate Receptor Delta-1 Mediates Inhibitory Synapse Formation in Cortical Pyramidal Neurons

Matteo Fossati,^{1,3,4} Nora Assendorp,¹ Olivier Gemin,¹ Sabrina Colasse,¹ Florent Dingli,² Guillaume Arras,² Damarys Loew,² and Cécile Charrier^{1,5,*}

¹Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), Ecole Normale Supérieure, CNRS, INSERM, PSL Research University, 75005 Paris, France

²Institut Curie, PSL Research University, Centre de Recherche, Laboratoire de Spectrométrie de Masse Protéomique, 75248 Paris Cedex 05, France

³Present address: CNR – Institute of Neuroscience, 20129 Milano, Italy

⁴Present address: Humanitas Clinical and Research Center, 20089 Rozzano MI, Italy

⁵Lead Contact

*Correspondence: cecile.charrier@ens.fr

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.027>

SUMMARY

Fine orchestration of excitatory and inhibitory synaptic development is required for normal brain function, and alterations may cause neurodevelopmental disorders. Using sparse molecular manipulations in intact brain circuits, we show that the glutamate receptor delta-1 (GluD1), a member of ionotropic glutamate receptors (iGluRs), is a postsynaptic organizer of inhibitory synapses in cortical pyramidal neurons. GluD1 is selectively required for the formation of inhibitory synapses and regulates GABAergic synaptic transmission accordingly. At inhibitory synapses, GluD1 interacts with cerebellin-4, an extracellular scaffolding protein secreted by somatostatin-expressing interneurons, which bridges postsynaptic GluD1 and presynaptic neurexins. When binding to its agonist glycine or D-serine, GluD1 elicits non-ionotropic postsynaptic signaling involving the guanine nucleotide exchange factor ARHGEF12 and the regulatory subunit of protein phosphatase 1 PPP1R12A. Thus, GluD1 defines a *trans*-synaptic interaction regulating postsynaptic signaling pathways for the proper establishment of cortical inhibitory connectivity and challenges the dichotomy between iGluRs and inhibitory synaptic molecules.

INTRODUCTION

Synapses constitute the elementary functional units of the brain. They convey excitatory or inhibitory signals that need to be coordinated in space and time for optimal brain function (Mullins et al., 2016; Nelson and Valakh, 2015). Excitatory and inhibitory synapses in the mammalian brain mainly use glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) as a neurotransmitter, respectively. They are multi-molecular nanomachines

composed of almost exclusive sets of proteins (Krueger-Burg et al., 2017; Sheng and Kim, 2011; Tyagarajan and Fritschy, 2014). Yet they share the same basic organization, which ensures the efficacy and fine-tuning of synaptic transmission. The organization of synapses relies on transient, highly regulated interactions between various categories of proteins (neurotransmitter receptors, scaffolding proteins, adhesion proteins, signaling molecules, and cytoskeleton elements) and accommodates a great level of molecular diversity (Choquet and Triller, 2013; Emes and Grant, 2012; Sheng and Hoogenraad, 2007; Tyagarajan and Fritschy, 2014; Ziv and Fisher-Lavie, 2014). The molecular diversity of synapses enables the establishment of complex neuronal networks: it specifies their functional properties and shapes the transfer of information between neurons throughout the brain. Hence, synaptic dysfunctions cause a wide range of neurodevelopmental and psychiatric disorders, such as epilepsy, autism, or schizophrenia (Bourgeron, 2015; Mullins et al., 2016; Nelson and Valakh, 2015; Ting et al., 2015; Zoghbi and Bear, 2012). *Trans*-synaptic molecular interactions critically contribute to both the development and diversification of synaptic connections. They instruct the formation of synapses following initial contact (McAllister, 2007; Missler et al., 2012), match pre- and post-synaptic neurons (Berns et al., 2018; de Wit and Ghosh, 2016), control the recruitment of neurotransmitter receptors and postsynaptic scaffolding proteins (Aoto et al., 2013; Bemben et al., 2015; Fukata et al., 2006; Lovero et al., 2015; Mondin et al., 2011; Nam and Chen, 2005; Pouloupoulos et al., 2009), and regulate synaptic plasticity (Bemben et al., 2015; Jang et al., 2017; Tai et al., 2008; Yuzaki and Aricescu, 2017). Nonetheless, frequent discrepancies between *in vitro* and *in vivo* studies have made the role of some *trans*-synaptic molecular interactions difficult to precisely delineate. Furthermore, the scarcity of information on how *trans*-synaptic signals are transduced in the post-synaptic neuron stymies our understanding of the molecular logic governing the assembly of synaptic connections.

Individual synaptic proteins may operate through a diversity of modalities. Recently, it has emerged that ionotropic glutamate receptors (iGluRs), which are the main excitatory

neurotransmitter receptors in the CNS, do not solely operate through ionotropic mechanisms (Dore et al., 2015; Rodríguez-Moreno and Sihra, 2007; Yuzaki and Aricescu, 2017). At least some iGluRs engage in *trans*-synaptic interactions along with conventional cell adhesion molecules (CAMs) (Matsuda et al., 2010, 2016; Uemura et al., 2010) or mediate non-ionotropic signaling critical for synaptic development and plasticity (Babiec et al., 2014; Carter and Jahr, 2016; Dore et al., 2015; Grabauskas et al., 2007; Hayashi et al., 1999; Kakegawa et al., 2011; Lerma and Marques, 2013; Nabavi et al., 2013; Saglietti et al., 2007; Stein et al., 2015). Alternative functions of iGluRs are best characterized for the glutamate receptor delta-2 (GluD2), an iGluR of the delta subfamily (comprising GluD1 and GluD2 receptor subunits, encoded by the genes *grid1* and *grid2*) predominantly expressed in the cerebellum (Araki et al., 1993). GluD2 is confined in the postsynaptic membrane of excitatory synapses between parallel fibers (PFs) and Purkinje cells (PCs). It contributes to synaptic adhesion by interacting with presynaptic neuroligins containing an insert in the splice site 4 through the extracellular scaffolding proteins cerebellins (Cblns), presynaptically secreted molecules that belong to the C1q family of the classical complement pathway (Südhof, 2017; Uemura et al., 2010; Yuzaki, 2017, 2018). This *trans*-synaptic interaction controls the specification and maintenance of PF-PC synapses. In addition, activation of GluD2 by its agonist initiates signaling cascades regulating the local accumulation of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors and long-term depression (Kakegawa et al., 2011; Yuzaki and Aricescu, 2017). GluD1 can also form triads with Cblns and neuroligins (Yasumura et al., 2012; Yuzaki and Aricescu, 2017). It is widely expressed in the neocortex, hippocampus, striatum, and cerebellum, where its expression is strongly upregulated during the period of synaptogenesis and remains high in adults (Hepp et al., 2015; Konno et al., 2014). GluD1 has been implicated in the formation of excitatory synapses in the cerebellum (Konno et al., 2014) and hippocampus (Tao et al., 2018) and in pruning in the hippocampus and medial prefrontal cortex (Gupta et al., 2015). Other studies have suggested a role in the firing of dopaminergic neurons or at inhibitory synapses (Benamer et al., 2018; Ryu et al., 2012; Yasumura et al., 2012). Notwithstanding, GluD1 function remains poorly understood.

In the present study, we have investigated the role of GluD1 in the development of excitatory and inhibitory synapses in the somato-sensory cortex. By depleting GluD1 *in vivo* in a few layer 2/3 cortical pyramidal neurons (CPNs) using sparse *in utero* electroporation (IUE), we demonstrate that GluD1 regulates the formation of inhibitory synapses in dendrites as well as inhibitory synaptic transmission. In contrast, GluD1 is dispensable for the formation and maintenance of excitatory synapses in CPNs. Using an *in vivo* structure/function analysis, we demonstrate that the regulation of inhibitory synapses by GluD1 requires *trans*-synaptic interaction via Cbln4, an extracellular scaffolding protein secreted by somatostatin-expressing (SST⁺) interneurons (INs) (Favuzzi et al., 2019), activation of the receptor by its endogenous agonists glycine and D-Serine, and post-synaptic signaling via the intracellular C-terminal tail of the receptor. Using mass spectrometry, we characterize GluD1 interactome in developing synapses. We show that GluD1 serves as a hub for

molecules implicated in inhibitory synaptogenesis, and we identify two major partners of GluD1, the signaling molecules rho guanine nucleotide exchange factor 12 (ARHGEF12) and protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (PPP1R12A), as critical regulators of inhibitory synapse formation in CPNs. Together, our results define a *trans*-synaptic signaling pathway centered on an atypical iGluR for the formation and specification of cortical inhibitory circuits.

RESULTS

GluD1 Is Selectively Required for the Formation of Inhibitory Synapses

In order to assess the role of GluD1 in synaptic development, we used cortex-directed IUE at embryonic day (E)15.5. IUE at E15.5 allows the sparse and specific modification of layer 2/3 CPNs in their intact environment and the dissection of cell autonomous mechanisms operating at synapses *in vivo* (Figure 1A). We analyzed the consequences of GluD1 depletion or overexpression on excitatory and inhibitory synapses formed on oblique apical dendrites of layer 2/3 CPNs of the somato-sensory cortex using a morphometric approach (Figure 1A). We first used dendritic spines, the postsynaptic site of the majority of excitatory synaptic inputs in the brain (Bourne and Harris, 2008; Yuste, 2013), and clusters of PSD-95, a major scaffolding protein of excitatory synapses (Sheng and Hoogenraad, 2007), as a proxy for excitatory synapses (Figure 1B). We found that GluD1 depletion using short hairpin RNAs (shRNAs) (shGluD1; Figure S1A) did not affect the density of dendritic spines in juvenile (postnatal day [P]20–22) or adult (P > 69) mice (102% $\pm$ 3% and 105% $\pm$ 5% of control in juvenile and adult neurons respectively; Figures 1B–1D) or the density of endogenous PSD-95 clusters visualized using EGFP-tagged fibronectin intrabodies generated with mRNA display (FingR) (Gross et al., 2013) (94% $\pm$ 5% of control; Figures 1E and 1F). GluD1 overexpression, however, decreased spine density to 75% $\pm$ 4% of the control value (Figures 1B and 1C). These results suggest that GluD1 is not necessary for the formation or maintenance of excitatory synapses in layer 2/3 CPNs, though GluD1 may constrain their number if upregulated.

We then assessed the role of GluD1 at inhibitory synapses. To that aim, we expressed small amounts of fluorescent (EGFP-tagged) gephyrin (Figure 1A), the core component of inhibitory postsynaptic scaffolds (Krueger-Burg et al., 2017; Tyagarajan and Fritschy, 2014). This approach has been shown to reliably label inhibitory synaptic contacts without affecting synaptic development or inhibitory neurotransmission (Chen et al., 2012; Fossati et al., 2016; van Versendaal et al., 2012). In juvenile mice, GluD1 knockdown (KD) using shRNAs decreased the density of gephyrin clusters compared to control neurons (77% $\pm$ 4% of control; Figures 1G and 1H; Figure S2). Normal gephyrin cluster density was rescued by co-electroporating shGluD1 with a KD-resistant GluD1 construct (GluD1⁺; Figures 1G and 1H; Figure S1A). Remarkably, the decrease in gephyrin cluster density induced by GluD1 KD was maintained in adults (79% $\pm$ 4% of control; Figure 1I), indicating that the loss of inhibitory synapses was not compensated over time. To further substantiate the role of GluD1 at inhibitory synapses, we knocked out *grid1* in single cells using the CRISPR-Cas9 system. We expressed

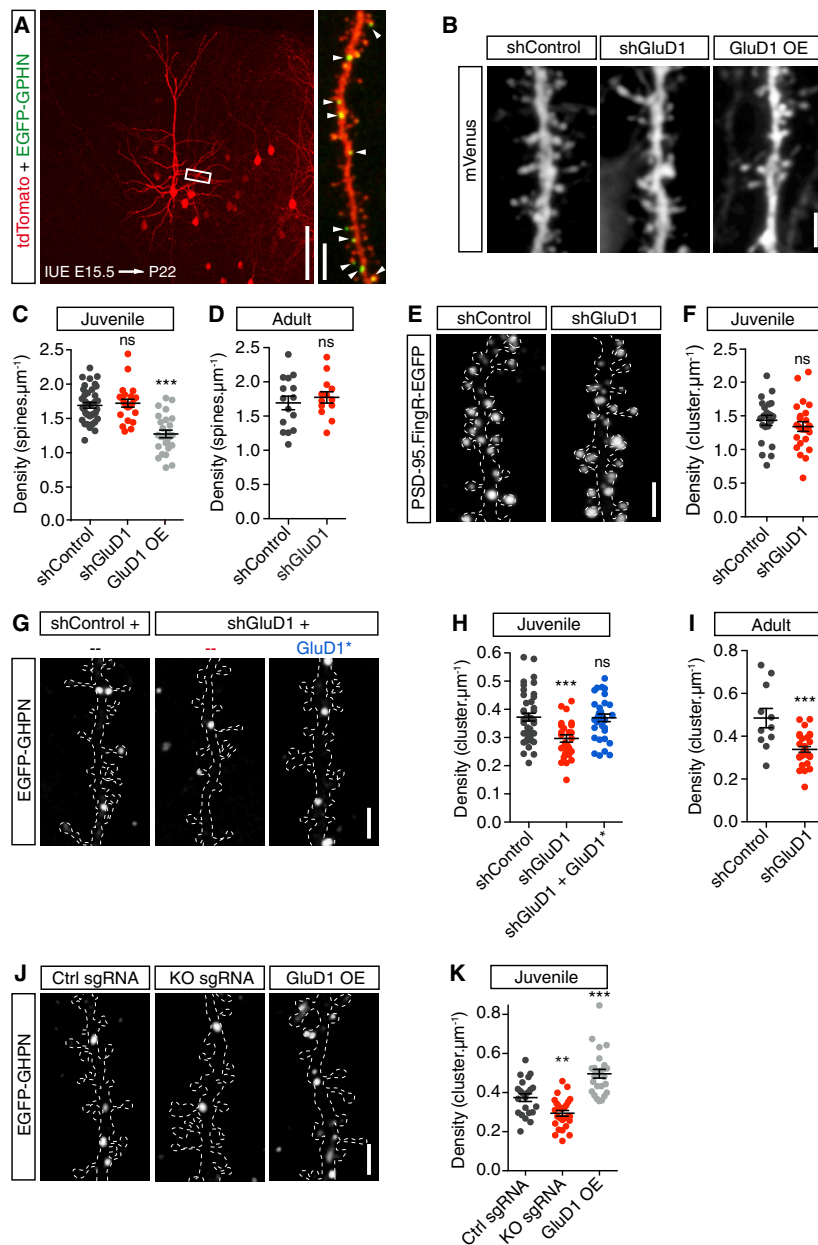


Figure 1. Selective Control of Inhibitory Synapse Density by GluD1 in CPNs

(A) Sparse labeling of layer 2/3 CPNs after *in utero* electroporation (IUE) with soluble tdTomato (red) and EGFP-gephyrin (EGFP-GPHN, green). Arrowheads in the enlarged area highlight inhibitory synapses in oblique apical dendrites. E15.5, embryonic day 15.5; P22: postnatal day 22. Scale bars: 100 μ m (left) and 5 μ m (right).

(B) Segments of dendrites expressing shControl or shGluD1 or overexpressing (OE) GluD1 along with mVenus to visualize dendritic spines in juvenile mice. Scale bar: 2 μ m.

(C and D) Quantification of dendritic spine density in juvenile (C) and adult mice (D). Juveniles: $n_{\text{shControl}} = 38$, $n_{\text{shGluD1}} = 22$, $n_{\text{GluD1 OE}} = 26$. Adults: $n_{\text{shControl}} = 15$, $n_{\text{shGluD1}} = 13$.

(E) Segments of dendrites expressing shControl or shGluD1 along with PSD95::FingR-EGFP in juvenile mice. Dashed lines define the contours of tdTomato fluorescence. Scale bar: 2 μ m.

(F) Quantification of PSD-95 cluster density. $n_{\text{shControl}} = 21$, $n_{\text{shGluD1}} = 24$.

(G) EGFP-gephyrin clusters in representative segments of dendrites expressing shControl, shGluD1, or shGluD1 together with shGluD1-resistant GluD1* in juvenile mice. Scale bar: 2 μ m.

(H and I) Quantifications of gephyrin cluster density in juvenile (H) and adult mice (I). Juveniles: $n_{\text{shControl}} = 41$, $n_{\text{shGluD1}} = 30$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1}^*} = 32$. Adults: $n_{\text{shControl}} = 11$, $n_{\text{shGluD1}} = 30$.

(J) Segments of dendrites illustrating the effects of Crispr-mediated *Grid1* knockout (KO) and GluD1 OE on gephyrin cluster density. Ctrl sgRNA, control sgRNA; KO sgRNA, *Grid1*-targeting sgRNAs. Scale bar: 2 μ m.

(K) Quantification of gephyrin cluster density in the conditions described above. $n_{\text{Ctrl sgRNA}} = 22$, $n_{\text{KO sgRNA}} = 27$, and $n_{\text{GluD1 OE}} = 26$.

Statistics: bars indicate mean $\pm$ SEM, ns: $p > 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. One-way ANOVA test followed by Tukey's post test in (C) and (H); unpaired t test in (D), (F), and (K); and Mann-Whitney test for the comparison of GluD1 OE in K with corresponding control (shControl) in (H).

the enhanced specificity espCas9(1.1) (Slaymaker et al., 2016) and a combination of two guide RNAs (gRNAs) using IUE. In *grid1* knockout (KO) neurons, the density of gephyrin clusters was decreased by $22\% \pm 5\%$ compared to control neurons expressing espCas9(1.1) with mismatched gRNAs (Figures 1J and 1K), which is consistent with GluD1 KD experiments with shRNAs. In line with these results, GluD1 overexpression increased the density of gephyrin clusters along dendrites by $33\% \pm 4\%$ (Figures 1J and 1K).

To test the physiological consequences of GluD1 inactivation on synaptic transmission, we performed whole-

cell patch-clamp recording in electroporated GluD1-depleted neurons and in neighboring non-electroporated control neurons (Figure 2A). We compared miniature excitatory and inhibitory postsynaptic currents (mEPSCs and mIPSCs, respectively) in brain slices from juvenile mice (Figure 2B). In line with the morphological data, GluD1 KD did not affect the amplitude or the frequency of mEPSCs ($98\% \pm 8\%$ and $100\% \pm 4\%$ of control, respectively) (Figures 2B–2D). In contrast, GluD1 KD slightly increased the amplitude of mIPSCs and decreased their frequency by $\approx 35\%$ (Figures 2B, 2E, and 2F), which is consistent with the reduced gephyrin cluster density observed in the oblique dendrites of GluD1 KD and KO neurons. We conclude that GluD1 in CPNs is selectively required for the formation of inhibitory synapses. It regulates both the

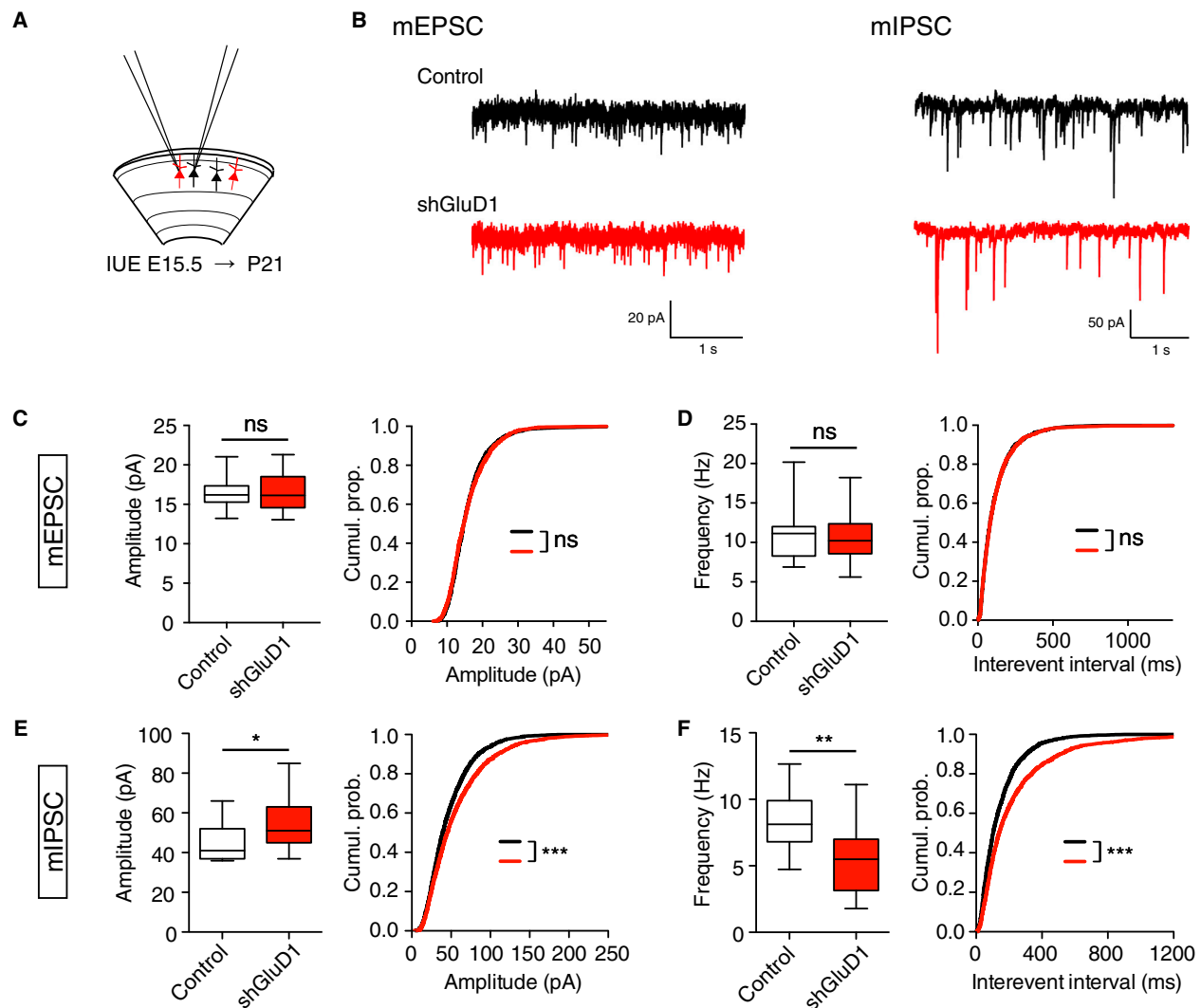


Figure 2. GluD1 Regulates Inhibitory Synaptic Transmission

(A) Schematic: recording of electroporated layer 2/3 CPN expressing shGluD1 with tdTomato (red) and neighboring control neuron (black) from juvenile mouse brain slice.

(B) Representative traces of mEPSCs and mIPSCs in control and shGluD1-electroporated neurons.

(C and D) Quantification of mEPSC amplitude (C) and frequency (D). Boxplots (left) show the distribution of the mean value per cell. $n = 14$ in both conditions. Cumulative distributions (right) of the amplitudes and interevent intervals of the first 200 events of each cell.

(E and F) Same as (C) and (D) for mIPSCs. $n = 15$ in both conditions.

Statistics: ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney test.

assembly of the gephyrin-based postsynaptic scaffold and inhibitory synaptic transmission.

GluD1 Localizes to Inhibitory Postsynaptic Sites

It is unexpected for a member of the iGluR family to control the formation of inhibitory synapses. Therefore, we asked whether GluD1 accumulates at inhibitory synapses. To answer this question, we performed immunohistochemistry in brain slices from juvenile mice. GluD1 fluorescent puncta were frequently associated with gephyrin clusters in the upper layers of the so-

mato-sensory cortex (Figure 3A). To determine the precise subcellular localization of GluD1, we employed immuno-electron microscopy (EM). In cortical layer 2/3, inhibitory synapses represent only 10% of the total number of synapses, and they are “symmetrical” when observed in EM, meaning that they do not show the electron-dense post-synaptic differentiation facilitating the detection of excitatory synapses. To unambiguously identify inhibitory synapses, we performed double immunostaining of the vesicular GABA transporter (VGAT) and GluD1 (Figure 3B). We used diaminobenzidine (DAB) to reveal

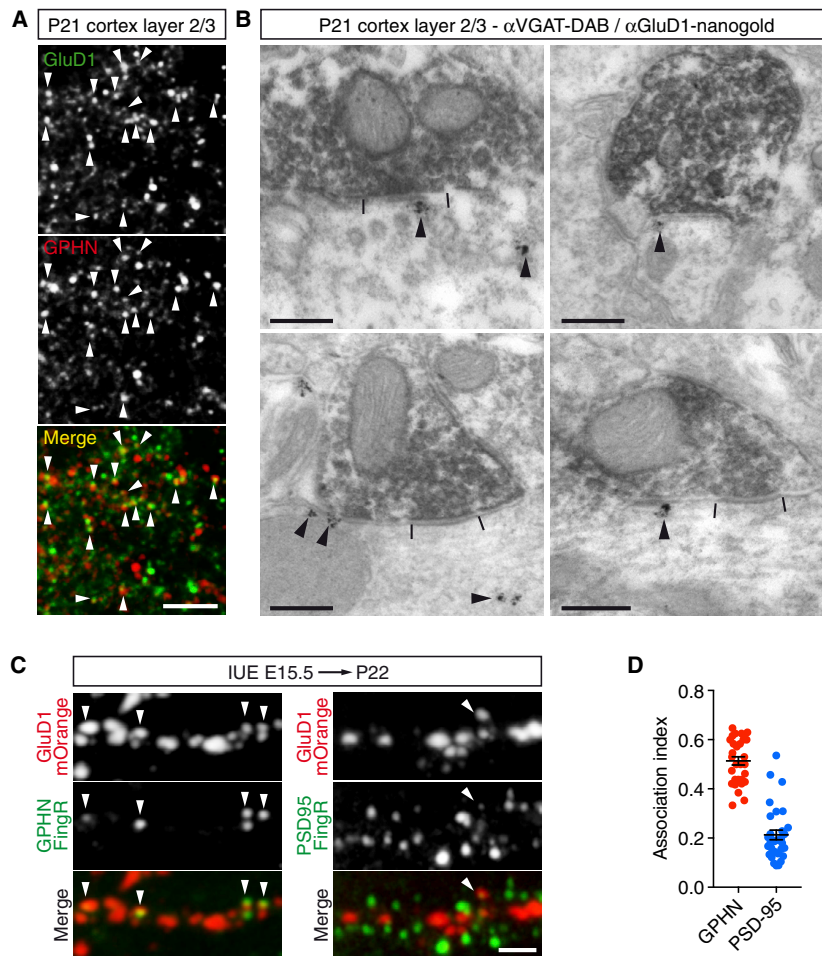


Figure 3. GluD1 Localizes to Inhibitory Synapses

(A) Representative immunofluorescence image of P21 cortical slices stained with anti-GluD1 (green) and anti-gephyrin (red) antibodies. Arrowheads indicate the association between GluD1- and GPHN-positive clusters. Scale bar: 5 μ m. (B) Electron micrographs showing GluD1 (stained using nanogold particles and silver enhancement) and VGAT (revealed with diaminobenzidine-positive) immunoreactivity in P21 layer 2/3 cortices. As indicated by the arrowheads, GluD1 was detected in front of inhibitory presynaptic terminals (top left image), or lateral to the active zone (delimited by two bars, other images) and in intracellular compartments (left images). Scale bars: 250 nm. (C) Segments of oblique apical dendrites from P22 neurons *in utero* electroporated with GluD1-mOrange and GPHN.FingR-EGFP or PSD95.FingR-EGFP. Arrowheads display the association between GluD1 and indicated synaptic markers. Scale bar: 2 μ m. (D) Scatterplot showing the fraction of gephyrin and PSD-95 clusters associated with GluD1-mOrange puncta (association index). Gephyrin, $n = 31$; PSD-95, $n = 30$. Bars indicate mean $\pm$ SEM.

VGAT. DAB oxidation forms electron-dense precipitates that largely stained VGAT-positive inhibitory presynaptic terminals. To visualize and precisely localize GluD1 in cortical tissue, we used nanogold particles and silver enhancement. Nanogold particles corresponding to GluD1 were detected in front of VGAT-positive presynaptic terminals and in intracellular compartments in dendrites (Figure 3B). Within synapses, GluD1 was frequently observed in postsynaptic membrane domains located at the edge or in the periphery of the active zone, which is consistent with the distribution profile of other synaptic adhesion molecules (Triller and Choquet, 2003; Uchida et al., 1996). To quantify the proportion of synapses containing GluD1, we electroporated mOrange-tagged GluD1 together with EGFP-tagged GPHN or PSD95 FingRs and a soluble blue fluorescent protein to visualize neuronal morphology (Figure 3C, blue filler not shown). In oblique apical dendrites of layer 2/3 CPNs, $\approx 50\%$ of inhibitory synapses contained GluD1 (Figure 3D). In contrast, GluD1 was rarely associated with excitatory synapses ($21\% \pm 2\%$) (Figure 3D). Collectively, these results demonstrate the presence of GluD1 at inhibitory synapses and indicate that GluD1 directly operates at inhibitory synapses.

Inhibitory Synapse Formation Requires GluD1 Binding to Cbln and Activation by Glycine or D-Serine

To determine the molecular basis for GluD1-mediated regulation of inhibitory synapses, we took advantage of the recent crystallographic analysis of the interactions between GluD, Cbln, and neuroligin and the abundant literature on the structure/function of GluD2

(Cheng et al., 2016; Elegheert et al., 2016; Kakegawa et al., 2007, 2009; Kuroyanagi and Hirano, 2010; Yuzaki and Aricescu, 2017). GluDs, as all members of the iGluR family, are tetrameric receptors (Traynelis et al., 2010). Each subunit has a modular architecture. The extracellular region contains a distal N-terminal domain (NTD), followed by an agonist-binding domain (ABD). The NTD of the GluD receptor interacts with the extracellular scaffolding protein Cbln (Matsuda et al., 2010; Uemura et al., 2010), and their ABD binds to glycine and D-serine (but not glutamate) (Naur et al., 2007), as in some N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits (Paoletti et al., 2013). The transmembrane domain (TMD) lines the pore of the ion channel. Finally, GluDs contain a C-terminal cytoplasmic domain (CTD) regulating their trafficking and intracellular interactions (Kakegawa et al., 2008; Kohda et al., 2013). To assay the functional importance of known domains or molecular interactions, we generated key mutant forms of GluD1 (Figure 4B). We then used an *in utero* gene replacement strategy to inactivate endogenous *grid1* with shRNAs and replace it with individual mutant forms *in vivo* and throughout development (Fossati et al., 2016). This strategy prevents the formation of heteromers between wild-type and mutant subunits of GluD1, which could mask or attenuate

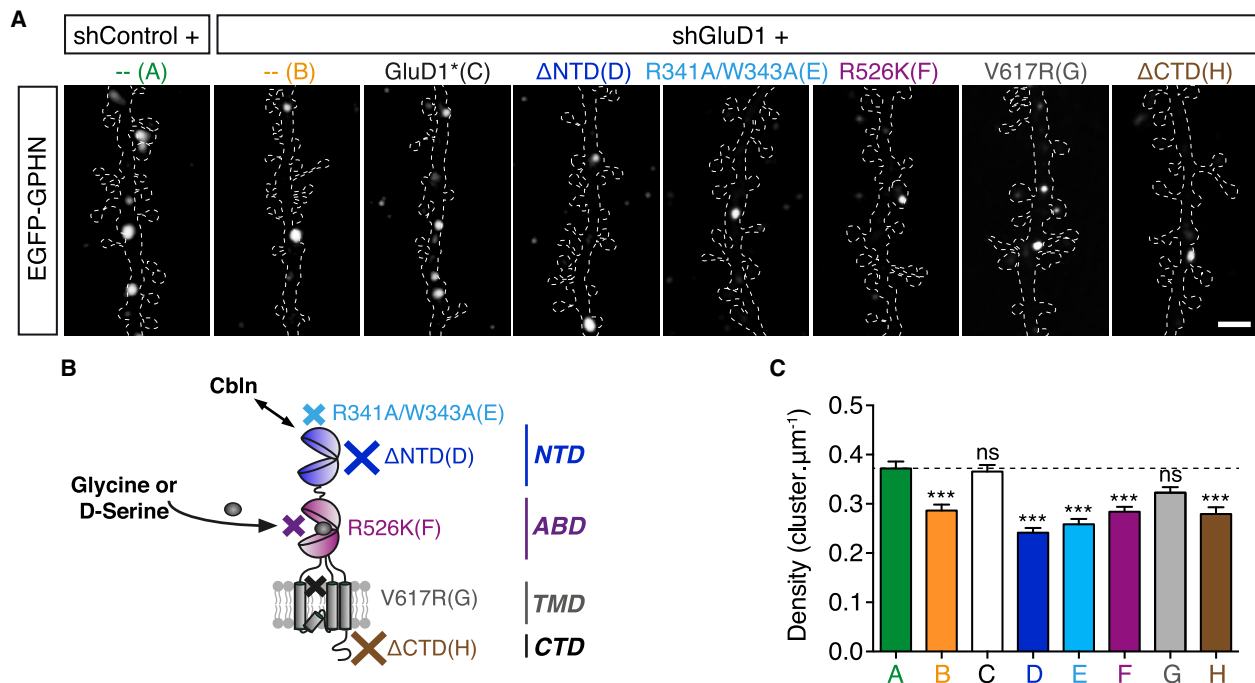


Figure 4. In Vivo Structure-Function Analysis of GluD1 Function at Inhibitory Synapses

(A) EGFP-gephyrin clusters in representative segments of oblique dendrites in control condition (shControl) or after *in utero* replacement of endogenous GluD1 with indicated mutants in P20–22 mice. Dashed lines, dendritic contours based on tdTomato fluorescence. Scale bar: 2 μm .

(B) Schematic of a GluD1 subunit and localization of the indicated mutations. GluD1 receptors interact with Cbln bound to presynaptic neuroligin via their NTD and use glycine or D-serine as agonists. NTD, N-terminal domain; ABD, agonist-binding domain; TMD, transmembrane domain; CTD, C-terminal domain.

(C) Quantification of GPHN cluster density in conditions represented in (A).

Histogram represents means $\pm$ SEM. Data corresponding to shControl, shGluD1, and shGluD1 + GluD1* are the same as in Figure 1G. $n_{\text{shControl}} = 41$, $n_{\text{shGluD1}} = 30$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1}^*} = 32$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1} \Delta\text{NTD}} = 30$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1} \text{R341A/W343A}} = 32$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1} \text{R526K}} = 30$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1} \text{V617R}} = 29$, $n_{\text{shGluD1} + \text{GluD1} \Delta\text{CTD}} = 28$. ns $p > 0.05$, *** $p < 0.001$, determined by one-way ANOVA test followed by Tukey's post test.

some phenotypes. Importantly, all mutants were properly trafficked to the cell surface (Figure S3A).

We first examined whether GluD1 function involves *trans*-synaptic interaction via Cbln. To that aim, we replaced endogenous GluD1 with a Δ NTD mutant lacking the whole NTD. In juvenile mice, gephyrin cluster density in neurons expressing this mutant was lower than in control ($65\% \pm 4\%$ of control), suggesting that the NTD is critical for GluD1 function (Figures 4A and 4C). We then specifically disrupted GluD1 interaction with Cbln by introducing two point mutations in the NTD (R341A/W343A, Figure S3B; residues corresponding to R345 and W347 in GluD2; Elegheert et al., 2016). Replacement of GluD1 with the R341A/W343A mutant also led to a lower density of gephyrin clusters ($69\% \pm 4\%$ of control; Figures 4A and 4C), indicating that GluD1 interaction with the extracellular scaffolding protein Cbln is required for inhibitory synapse formation. Next, we tested whether the regulation of inhibitory synapses requires GluD1 gating by glycine/D-serine, ion-flux through GluD1 channel, and signaling via the CTD of the receptor. Replacement of GluD1 with a mutant containing an arginine to lysine substitution at position 526, which abolishes the affinity for glycine or D-serine (R526K mutant corresponding to position 530 in GluD2) (Kakegawa et al., 2009, 2011; Naur et al., 2007), decreased the

density of gephyrin clusters ($71\% \pm 4\%$ of control; Figures 4A and 4C), as observed after GluD1 KD. A similar effect was found with a mutant lacking the intracellular CTD ($75\% \pm 5\%$ of control; Figures 4A and 4C). In contrast, preventing ion flux through the pore with a single point mutation (V617R) (Ady et al., 2014; Kakegawa et al., 2007; Robert et al., 2002) did not interfere with the formation of inhibitory synapses (Figures 4A and 4C). Collectively, these results demonstrate that the control of inhibitory synapse formation by GluD1 in CPNs requires *trans*-synaptic interactions via Cbln and glycine/D-serine-dependent non-ionic postsynaptic mechanisms involving intracellular interactions via the C-terminal tail of the receptor.

GluD1 Specifies Synapses between SST⁺ INs and Layer 2/3 CPNs

We wondered if GluD1 mediates the formation of inhibitory synapses between layer 2/3 CPNs and specific classes of INs. In the cortex, distinct subtypes of INs express distinct isoforms of Cblns, with SST⁺ INs in upper cortical layers expressing Cbln4 and vasoactive intestinal peptide-positive (VIP⁺) INs expressing Cbln2 (Paul et al., 2017; Tasic et al., 2016). Therefore, we tested if Cbln2 and Cbln4 regulate the density of inhibitory synapses. To that end, adeno-associated viral vectors (AAVs) carrying an

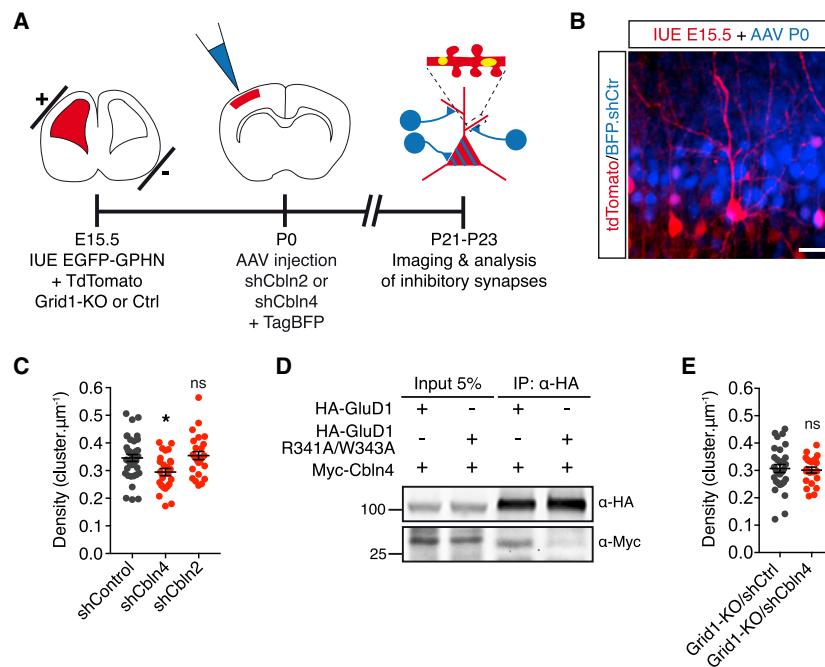


Figure 5. GluD1 Regulates Inhibitory Synaptogenesis via Cerebellin-4

(A) Schematic of the experimental workflow: neurons and inhibitory synapses were labeled using IUE at E15.5, which also allowed *grid1* knockout with Crispr. The lateral ventricle corresponding to the electroporated hemisphere was then injected with AAVs at P0 to knock down Cbln2 or Cbln4 with shRNAs. Inhibitory synapses were analyzed in juvenile mice.

(B) Representative image of a cortical slice derived from a juvenile mouse. Electroporated layer 2/3 CPNs are labeled with tdTomato. Infected neurons are labeled with TagBFP. Scale bar: 20 μm.

(C and E) Quantification of GPHN cluster density in neurons in the indicated conditions. $n_{\text{shControl}} = 37$, $n_{\text{shCbln4}} = 25$, $n_{\text{shCbln2}} = 26$, $n_{\text{Grid1-KO/shCtrl}} = 30$, $n_{\text{Grid1-KO/shCbln4}} = 22$. Bars indicate mean $\pm$ SEM. ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$, determined by one-way ANOVA test followed by Tukey's post test (C) or unpaired t test (E).

(D) Coimmunoprecipitation (coIP) in HEK cells of Myc-Cbln4 with wild-type HA-GluD1 or HA-GluD1 containing R341A/W343A mutation in the Cbln binding site.

shRNA directed against Cbln4, Cbln2, or a control shRNA (Figure S1D) were injected *in vivo* in the lateral ventricles of newborn pups previously electroporated *in utero* with EGFP-GPHN and tdTomato (Figures 5A and 5B). We then quantified the density of gephyrin clusters in sparse electroporated neurons surrounded by numerous infected cells (Figure 5B). In juvenile mice, Cbln4, but not Cbln2, inactivation significantly decreased the density of inhibitory synapses ($85\% \pm 4\%$ of control for shCbln4 and $102\% \pm 4\%$ for shCbln2; Figure 5C). GluD1 interacted with Cbln4 (Figure 5D), and Cbln4 KD did not further decrease the density of gephyrin clusters in *grid1* KO neurons ($98\% \pm 5\%$ of Grid1-KO/shCtrl neurons; Figure 5E), indicating that Cbln4 operates via GluD1. The role of Cbln4 at inhibitory synapses between SST⁺ INs and CPNs has recently been characterized in more detail by Favuzzi et al. (2019). Taken together, these results indicate that GluD1 specifies inhibitory cortical connectivity by mediating synaptogenesis between Cbln4-expressing SST⁺ INs and CPNs. This is compatible with the partial colocalization of GluD1 and gephyrin (Figures 3C and 3D) in oblique apical dendrites, which are also contacted by other classes of interneurons (Fishell and Kepecs, 2019).

Postsynaptic Signaling Controlling Inhibitory Synapse Formation

To determine the postsynaptic mechanisms through which GluD1 regulates the formation of inhibitory synaptic machineries, we performed an unbiased proteomic screen aimed at identifying GluD1 interacting partners at synapses. We employed subcellular fractionations from P15 mouse brains to enrich our samples in proteins associated with synaptic membranes and efficiently immunoprecipitate GluD1 (Figure 6A). The proteins co-immunoprecipitated with GluD1 (gene name *Grid1*) were separated by liquid chromatography and identified using tandem

mass spectrometry (LC-MS/MS) (Figures 6A and 6B; Table S1). We focused on the proteins that were the most represented in terms of the number of detections in LC-MS/MS biological triplicates relative to their molecular weight. GluD1 was strongly associated with regulators of GTPases (e.g., ARHGEF12 and SRGAP3) and regulators of protein phosphorylation (e.g., the serine/threonine phosphatase 1 regulatory subunit PPP1R12A and the serine/threonine protein kinase MRCK α , encoded *cdc42bpa*), pointing out the involvement of signaling pathways.

To determine the contribution of these proteins to the development of inhibitory synapses, we manipulated their expression *in vivo* using IUE. We first investigated the role of ARHGEF12 (also referred to as LARG), a guanine nucleotide exchange factor for RhoA (Chen et al., 1999). We generated an shRNA against *arhgef12* (shArhgef12) and an shRNA-resistant construct (ARHGEF12*; Figure S1B). In juvenile mice, sparse *arhgef12* KD decreased the density of gephyrin clusters to $79\% \pm 3\%$ of the control value (Figure 6C). Normal gephyrin cluster density was rescued by ARHGEF12* ($94\% \pm 3\%$). These data identify ARHGEF12 as a new determinant of inhibitory synapse formation in the dendrites of CPNs. We next considered the role of Slit-Robo Rho GTPase-activating proteins (SRGAPs). In LC-MS/MS, GluD1 was associated not only with SRGAP3, but also with SRGAP1 and SRGAP2 (Table S1). SRGAP3 and SRGAP2 have previously been shown to interact with gephyrin and regulate the development of inhibitory synapses in the hippocampus and the cortex, respectively (Fossati et al., 2016; Okada et al., 2011). We found that SRGAP2 inactivation decreases the cell surface expression of GluD1 in young (15 days *in vitro*), but not older (22–23 days *in vitro*), neurons (Figure S4), suggesting a developmental regulation of GluD1 trafficking.

We then assayed the role of MRCK α and PPP1R12A, two proteins likely to modulate the phosphorylation state of proteins

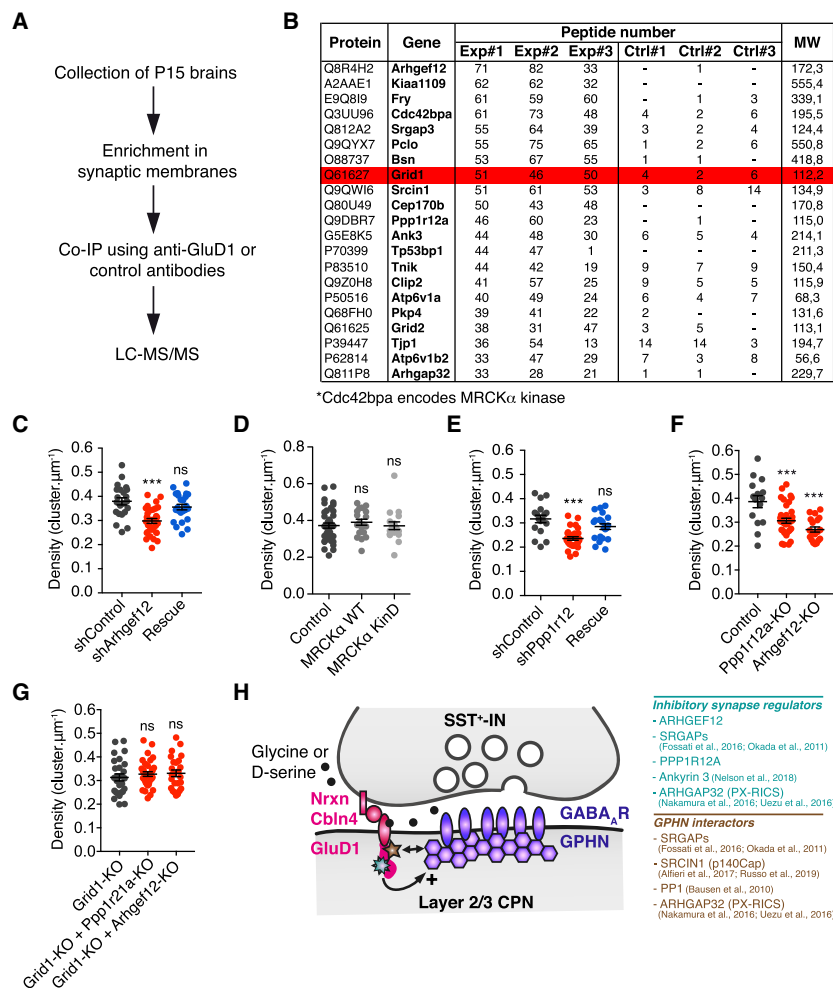


Figure 6. Signaling Pathways Regulated by GluD1 at Inhibitory Synapses

(A) Schematic of the experimental workflow used for mass spectrometry analysis. CoIP, co-immunoprecipitation; LC-MS/MS, liquid chromatography followed by tandem mass spectrometry. (B) Table displaying the 20 most abundant GluD1-interacting proteins. Exp#1–#3 represent independent coIP replicates with anti-GluD1 antibody; Ctrl#1–#3 corresponds to the control coIPs with total rabbit IgG. Only proteins enriched at least three times in GluD1 coIPs are indicated. GluD1 (encoded by the gene *grid1*) is highlighted in red. (C–G) Quantification of GPHN cluster density in oblique dendrites of layer 2/3 CPNs *in utero* electroporated in the indicated conditions (juvenile stage). MRCK α KinD, MRCK α kinase-dead mutant; MRCK α WT, wild-type MRCK α . $n_{shControl}$ (C) = 22, $n_{shArhgef12}$ = 32, n_{Rescue} (C) = 24, $n_{Control}$ (D) = 41, $n_{MRCK\alpha\ WT}$ = 20, $n_{MRCK\alpha\ KinD}$ = 18, $n_{shControl}$ (E) = 17, $n_{shPpp1r12a}$ = 30, n_{Rescue} (E) = 21, $n_{Control}$ (F) = 15, $n_{Ppp1r12a-KO}$ = 38, $n_{Arhgef12-KO}$ = 19, $n_{Grid1-KO}$ (G) = 27, $n_{Grid1-KO + Ppp1r12a-KO}$ = 34, $n_{Grid1-KO + Arhgef12-KO}$ = 25. Statistics: bars indicate mean $\pm$ SEM, ns $p > 0.05$, *** $p < 0.001$ determined by one-way ANOVA test followed by Tukey's post test in (D–G) and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's post test in (C). (H) Schematic illustrating GluD1 *trans*-synaptic signaling regulating inhibitory synapse development. See text for details.

(Figure 6F), we found that neither *grid1/arhgef12* double KO nor *grid1/ppp1r12a* double KO further reduced the density of inhibitory synapses compared to single *grid1* KO (104% $\pm$ 3% of Grid1-KO for Grid1-KO + Ppp1r12a-KO and 105% $\pm$ 4% of Grid1-KO for Grid1-KO + Arhgef12-KO; Figure 6G), indicating that GluD1 requires ARHGEF12 and PPP1R12A to operate at inhibitory synapses. Interestingly, other major partners of GluD1 (Figure 6B), such as the Rho GTPase-activating protein 32 (ARHGAP32/PX-RICS) (Nakamura et al., 2016; Uezu et al., 2016), SRCIN1 (p140cap) (Alfieri et al., 2017; Russo et al., 2019), and Ankyrin 3 (Ankyrin G) (Nelson et al., 2018), have been shown to interact with gephyrin and/or regulate inhibitory synaptogenesis. This supports the notion that GluD1 serves as a signaling hub for the formation and specification of inhibitory synapses (Figure 6H), and that the regulation of inhibitory synaptogenesis is a major function of GluD1 in the neocortex.

DISCUSSION

In the present study, we employed sparse *in vivo* molecular manipulations and proteomic approaches to characterize the role of GluD1 in synaptic development in layer 2/3 pyramidal neurons of the somato-sensory cortex. We demonstrate that GluD1 is a maverick among iGluRs, operating at inhibitory synapses rather than excitatory synapses. GluD1 is necessary for

implicated in building up inhibitory synapses. Neither the overexpression of a kinase-dead dominant-negative mutant of MRCK α (MRCK α KinD, with K106A substitution) (Leung et al., 1998) nor that of wild-type MRCK α (MRCK α WT) affected the density of gephyrin clusters (Figure 6D) in juvenile mice, indicating that MRCK α is not critical for the formation of inhibitory synapses. In contrast, depletion of PPP1R12A (also referred to as MYPT1), a targeting subunit of PP1, with shRNAs decreased the density of gephyrin clusters (74% $\pm$ 3% of the control), and normal gephyrin cluster density was rescued with the shRNA-resistant mutant PPP1R12A* (Figure 6E; Figure S1C), demonstrating that PPP1R12A is required for the formation of inhibitory synapses in dendrites. These data are in line with a previous study indicating that PP1 physically interacts with gephyrin and regulates the density of gephyrin clusters (Bausen et al., 2010).

Since both ARHGEF12 and PPP1R12A inactivation mimic GluD1 loss of function, our data suggest that GluD1 might signal through these two proteins to mediate the formation of inhibitory synapses. Using the CRISPR-Cas9 system combined with IUE to inactivate *grid1* (Figures 1J and 1K), *ppp1r12a*, and *arhgef12*

the formation of specific inhibitory synapses along dendrites and regulates GABAergic synaptic transmission accordingly. In the upper layers of the cortex, GluD1 is enriched in the postsynaptic membrane of inhibitory synapses, lateral to the active zone, where it establishes *trans*-synaptic interactions via Cbln4, an extracellular scaffolding protein secreted by SST⁺ INs (Favuzzi et al., 2019), which, in turn, binds to presynaptic neuroligins (Yuzaki, 2017; Zhong et al., 2017). When interacting with Cbln4 and binding to glycine or D-serine, GluD1 activates postsynaptic signaling pathways that do not depend on ion flux through its channel, but it involves intracellular interactions via its C-terminal tail, organizing the assembly of inhibitory postsynaptic machineries at contact sites with SST⁺ INs. These interactions involve ARHGEF12 and PPP1R12A, two molecules required for GluD1 function at inhibitory synapses and probably other molecules implicated at GABAergic synapses.

Region-Specific Function of GluD1 at Inhibitory Synapses

Although the repertoire of inhibitory synaptic proteins has recently expanded (Krueger-Burg et al., 2017), the molecular diversity of inhibitory synapses and the difficulty of investigating their biochemistry and their cell biology *in vivo* has obscured the mechanistic understanding of inhibitory synaptogenesis. Hence, few CAMs and signaling molecules have been shown to selectively control inhibitory synapse assembly (Krueger-Burg et al., 2017; Tyagarajan and Fritschy, 2014). These molecules show domain-specific functions at perisomatic (Früh et al., 2016; Pouloupoulos et al., 2009), dendritic (Li et al., 2017), or axo-axonic synapses (Panzanelli et al., 2011). Their function also varies depending on brain areas. In particular, extensive studies of neuroligin 2 and collybistin (ARHGEF9), two proteins present in virtually all inhibitory synapses in the CNS, have highlighted fundamental differences between the cell biology of hippocampal and cortical inhibitory synapses (Gibson et al., 2009; Pouloupoulos et al., 2009; Papadopoulos et al., 2007). Since the mechanisms of synaptogenesis in the forebrain are predominantly studied in hippocampal neurons, the molecular underpinning of inhibitory synapse formation in the cortex has remained enigmatic.

Previous *in vitro* hemi-synapse formation assays suggested a synaptogenic activity of GluD1 in cortical neurons (Ryu et al., 2012; Yasumura et al., 2012). However, it was unclear whether the synaptogenic activity was selective for inhibitory synapses (Yasumura et al., 2012) or common to excitatory and inhibitory synapses (Ryu et al., 2012), and the role of endogenous GluD1 in cortical neurons *in vivo* remained unclear (Gupta et al., 2015). Here, we used *in vivo* single cell approaches based on sparse IUE to manipulate GluD1 expression and function in isolated layer 2/3 CPNs in the intact brain. Targeting a specific cell type allowed us to investigate a relatively homogeneous population of neurons and dissect cell-autonomous mechanisms with a subcellular resolution in spatially identified synapses along the dendritic tree. Moreover, sparse *in vivo* manipulations help avoid compensatory and adaptive changes at the network level, which might occur in KO mouse models. Our results provide direct evidence that GluD1 is necessary for the formation of specific cortical inhibitory synapses *in vivo*. While we do not exclude

that GluD1 could regulate some properties of excitatory synapses in the cortex, we clearly show that GluD1 is not required for their formation, which is consistent with a previous study (Gupta et al., 2015). Therefore, GluD1 function in CPNs starkly contrasts with GluD1 function in cerebellar INs (Konno et al., 2014) and hippocampal pyramidal neurons (Tao et al., 2018), where GluD1 is required for the formation of excitatory synapses. This raises fundamental questions on the molecular basis underlying the region-specific function of GluD1 at excitatory or inhibitory synapses and the synaptic dysfunction associated with GluD1 mutations in brain disorders (Cooper et al., 2011; Fallin et al., 2005; Glessner et al., 2009; Guo et al., 2007; Treutlein et al., 2009).

An iGluR-Dependent Signaling Pathway at Inhibitory Synapses

It is unconventional for a member of the iGluR family to locate and operate at inhibitory synapses. We show that *trans*-synaptically engaged GluD1 binding to glycine or D-serine initiates postsynaptic signaling via non-ionotropic mechanisms, probably through conformational changes that are transmitted through the TMD, and controls intracellular interactions (Elegheert et al., 2016). Whether GluD1 binds to glycine or D-serine in CPNs is unknown, but both glycine and D-serine may contribute to the regulation of inhibitory synapse formation. Glycine is present in the extracellular space, where it activates extrasynaptic NMDA receptors (Papouin et al., 2012) and mediates tonic inhibition in layer 2/3 CPNs (McCracken et al., 2017; Salling and Harrison, 2014). In the brainstem and spinal cord, where glycine is a major inhibitory neurotransmitter and GluD1 is highly expressed (<https://www.gtexportal.org/home/gene/GRID1>), presynaptic release of glycine may directly regulate the formation and maintenance of inhibitory synapses. D-serine is also present in the extracellular environment. It is synthesized through conversion of L-serine by serine racemase and released at least by the neuronal alanine-serine-cysteine transporter 1 (Asc-1) (Rosenberg et al., 2013). Ambient D-serine level is regulated by excitatory glutamatergic activity (Van Horn et al., 2017; Ma et al., 2014), and low D-serine levels are associated with epilepsy (Klatte et al., 2013) and schizophrenia-like behaviors (Ma et al., 2013), consistent with defects in synaptic inhibition and GluD1 function. So far, in the forebrain, the role of D-serine and, to some extent, glycine has been envisioned through the activation of NMDA receptors (Oliet and Mothet, 2009). The role of GluD1 in establishing the equilibrium between excitation and inhibition and the requirement of GluD1 activation by glycine/D-serine suggests that some functions initially attributed to NMDA receptors might instead depend on GluD1 signaling.

Proteomic and functional analyses of GluD1 interactome allowed us to identify signaling pathways controlling the postsynaptic organization of inhibitory machineries. We found that two major partners of GluD1, ARHGEF12 and PPP1R12A, are necessary for inhibitory synapse formation in layer 2/3 CPNs. Double inactivation experiments showed that ARHGEF12 and PPP1R12A operate in the same pathway as GluD1 and therefore also contribute to the specification of inhibitory connectivity between SST⁺ INs and layer 2/3 CPNs. ARHGEF12 contains a Dbl-homology (DH) domain mediating guanosine diphosphate

(GDP)/guanosine triphosphate (GTP) exchange activity and a pleckstrin-homology (PH) domain, which binds phosphoinositides and regulates its membrane targeting (Hyvönen et al., 1995). ARHGEF12 also contains an N-terminal PDZ domain, which may interact with the C-terminal PDZ-binding motif of GluD1, and a regulator of G-protein signaling-like (RGSL) domain. Although further experiments are needed to determine how ARHGEF12 contributes to inhibitory synaptic development, one possibility is that ARHGEF12 links *trans*-synaptic interaction with phosphoinositide and G-protein signaling to mediate inhibitory synaptogenesis. Furthermore, our data on PPP1R12A suggest that targeting PP1 to GluD1-mediated contact sites between INs and pyramidal neurons and locally regulating the post-translational state of inhibitory synaptic components is critical to initiate or promote postsynaptic assembly. This is congruent with previous studies showing that PP1 associates with gephyrin and the beta-3 subunit of GABA_A receptors (GABA_ARs) (Bausen et al., 2010; Pribram and Stellwagen, 2013) and that pharmacological inhibition of PP1 induces a loss of gephyrin clusters (Bausen et al., 2010). Among the most represented interactors of GluD1 we identify here, Ankyrin 3, ARHGAP32/PX-RICS, SRCIN1/p140Cap, and SRGAPs were previously implicated at inhibitory synapses. Ankyrin 3 interacts with GABA_AR-associated protein (GABARAP) and contributes to stabilization of GABA_ARs in the postsynaptic membrane (Nelson et al., 2018). ARHGAP32 interacts with gephyrin, and its inactivation impairs GABA_AR trafficking at synapses (Nakamura et al., 2016; Uezu et al., 2016). SRCIN1, SRGAP3, and SRGAP2 also associate with gephyrin and regulate GABAergic synaptogenesis (Alfieri et al., 2017; Fossati et al., 2016; Okada et al., 2011; Russo et al., 2019). Therefore, GluD1 *trans*-synaptic signaling provides local regulation of protein phosphorylation and GTPase activity and allows the recruitment of synaptic molecules for the assembly of inhibitory postsynaptic machineries in an input-specific and agonist-dependent manner. Interestingly, in young neurons, GluD1 expression at the cell surface was decreased by SRGAP2 inactivation. SRGAP2, and by homology SRGAP3, is inhibited by the human-specific protein SRGAP2C (Charrier et al., 2012; Coutinho-Budd et al., 2012). This regulation could contribute to the delay of the development of inhibitory synapses in human neurons (Fossati et al., 2016) and modify inhibitory circuitry to accommodate a greater diversity of IN subtypes (Defelipe, 2011). Understanding the diversity of *trans*-synaptic interactions and signaling pathways coordinating the establishment of neocortical inhibitory circuitry, their interplay, their evolution in human, and their dysregulations in brain disorders will be a fertile area for future research.

STAR★METHODS

Detailed methods are provided in the online version of this paper and include the following:

- **KEY RESOURCES TABLE**
- **LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY**
- **EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS**
 - Animals
 - Primary cultures of mouse cortical neurons
 - HEK293T cells

● METHOD DETAILS

- Plasmids for protein expression
- shRNA and Crispr constructs and shRNA validation
- Lentivirus production and infection
- In utero electroporation, AAV injection and slice preparation
- Immunohistochemistry for confocal microscopy
- Confocal image acquisition
- Electron microscopy
- Electrophysiology
- Transfection and western blotting
- Cell surface biotinylation
- Subcellular fractionation
- Immunoprecipitation
- Proteomics

● QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

- Confocal image analysis
- mEPSC and mIPSC analysis
- Proteomic analysis
- Statistics

● DATA AND CODE AVAILABILITY

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.09.027>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank members of A. Triller's laboratory (IBENS, Paris, France), D. Stoeber, P. Paoletti, M. Casado, F. Selimi, and F. Polleux, for helpful discussions and comments on the manuscript; P. Rostaing for his help with electron microscopy; L. Tricoire for kindly providing anti-GluD1 antibody and HA-GluD1 plasmid; M. Bünemann for ARHGEF12 plasmid; and B. Roska, D.B. Arnold, and F. Zhang for plasmids available through Addgene. This work was supported by INSERM, the Agence Nationale de la Recherche (ANR-13-PDOC-0003 and ANR-17-ERC3-0009 to C.C.), the European Research Council (ERC starting grant 803704 to C.C.), the Fyssen Foundation (to C.C.), the Région Ile-de-France (to D.L.), and the Fondation pour la Recherche Médicale (to D.L.). We are grateful to the IBENS Imaging Facility (France Biolmaging, supported by ANR-10-INBS-04, ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE, and ANR-11-IDEX-000-02 PSL* Research University, "Investments for the future"; NERF 2011-45; FRM DGE 20111123023; and FRC Rotary International France), the IBENS acute transgenesis facility, and the imaging unit of the Humanitas Clinical and Research Center.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.F., C.C., N.A., O.G., and S.C. performed experiments and analyzed data. F.D. carried out the MS experimental work, G.A. analyzed MS data, and D. L. supervised MS and data analysis. M.F. and C.C. designed the study, interpreted the results, prepared the figures, and wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

Received: July 30, 2018

Revised: August 11, 2019

Accepted: September 17, 2019

Published: November 5, 2019

REFERENCES

- Ady, V., Perroy, J., Tricoire, L., Piochon, C., Dadak, S., Chen, X., Dusart, I., Fagni, L., Lambolez, B., and Levenes, C. (2014). Type 1 metabotropic glutamate receptors (mGlu1) trigger the gating of GluR2 delta glutamate receptors. *EMBO Rep.* 15, 103–109.
- Alfieri, A., Sorokina, O., Adrait, A., Angelini, C., Russo, I., Morellato, A., Matteoli, M., Menna, E., Boeri Erba, E., McLean, C., et al. (2017). Synaptic Interactome Mining Reveals p140Cap as a New Hub for PSD Proteins Involved in Psychiatric and Neurological Disorders. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 212.
- Aoto, J., Martinelli, D.C., Malenka, R.C., Tabuchi, K., and Südhof, T.C. (2013). Presynaptic neuroligin-3 alternative splicing trans-synaptically controls postsynaptic AMPA receptor trafficking. *Cell* 154, 75–88.
- Araki, K., Meguro, H., Kushiya, E., Takayama, C., Inoue, Y., and Mishina, M. (1993). Selective expression of the glutamate receptor channel $\delta 2$ subunit in cerebellar Purkinje cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197, 1267–1276.
- Babiec, W.E., Guglietta, R., Jami, S.A., Morishita, W., Malenka, R.C., and O'Dell, T.J. (2014). Ionotropic NMDA receptor signaling is required for the induction of long-term depression in the mouse hippocampal CA1 region. *J. Neurosci.* 34, 5285–5290.
- Bausen, M., Weltzien, F., Betz, H., and O'Sullivan, G.A. (2010). Regulation of postsynaptic gephyrin cluster size by protein phosphatase 1. *Mol. Cell. Neurosci.* 44, 201–209.
- Bemben, M.A., Shipman, S.L., Nicoll, R.A., and Roche, K.W. (2015). The cellular and molecular landscape of neuroligins. *Trends Neurosci.* 38, 496–505.
- Benamer, N., Marti, F., Lujan, R., Hepp, R., Aubier, T.G., Dupin, A.A.M., Frébourg, G., Pons, S., Maskos, U., Faure, P., et al. (2018). GluR1, linked to schizophrenia, controls the burst firing of dopamine neurons. *Mol. Psychiatry* 23, 691–700.
- Berns, D.S., DeNardo, L.A., Pederick, D.T., and Luo, L. (2018). Teneurin-3 controls topographic circuit assembly in the hippocampus. *Nature* 554, 328–333.
- Bodmann, E.L., Krett, A.L., and Bünemann, M. (2017). Potentiation of receptor responses induced by prolonged binding of $G\alpha_{13}$ and leukemia-associated RhoGEF. *FASEB J.* 31, 3663–3676.
- Bourgeron, T. (2015). From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 551–563.
- Bourne, J.N., and Harris, K.M. (2008). Balancing structure and function at hippocampal dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* 31, 47–67.
- Carter, B.C., and Jahr, C.E. (2016). Postsynaptic, not presynaptic NMDA receptors are required for spike-timing-dependent LTD induction. *Nat. Neurosci.* 19, 1218–1224.
- Charrier, C., Joshi, K., Coutinho-Budd, J., Kim, J.-E., Lambert, N., de Marchena, J., Jin, W.-L., Vanderhaeghen, P., Ghosh, A., Sassa, T., and Polleux, F. (2012). Inhibition of SRGAP2 function by its human-specific paralogs induces neurogenesis during spine maturation. *Cell* 149, 923–935.
- Chen, X.-Q., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1999). The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 274, 19901–19905.
- Chen, J.L., Villa, K.L., Cha, J.W., So, P.T.C., Kubota, Y., and Nedivi, E. (2012). Clustered dynamics of inhibitory synapses and dendritic spines in the adult neocortex. *Neuron* 74, 361–373.
- Cheng, S., Seven, A.B., Wang, J., Skiniotis, G., and Özkan, E. (2016). Conformational Plasticity in the Transsynaptic Neuroligin-Cerebellin-Glutamate Receptor Adhesion Complex. *Structure* 24, 2163–2173.
- Choquet, D., and Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron* 80, 691–703.
- Cooper, G.M., Coe, B.P., Girirajan, S., Rosenfeld, J.A., Vu, T.H., Baker, C., Williams, C., Stalker, H., Hamid, R., Hannig, V., et al. (2011). A copy number variation morbidity map of developmental delay. *Nat. Genet.* 43, 838–846.
- Coutinho-Budd, J., Ghukasyan, V., Zylka, M.J., and Polleux, F. (2012). The F-BAR domains from srGAP1, srGAP2 and srGAP3 regulate membrane deformation differently. *J. Cell Sci.* 125, 3390–3401.
- de Wit, J., and Ghosh, A. (2016). Specification of synaptic connectivity by cell surface interactions. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 22–35.
- Defelipe, J. (2011). The evolution of the brain, the human nature of cortical circuits, and intellectual creativity. *Front. Neuroanat.* 5, 29.
- Dore, K., Aow, J., and Malinow, R. (2015). Agonist binding to the NMDA receptor drives movement of its cytoplasmic domain without ion flow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, 14705–14710.
- Elegheert, J., Kakegawa, W., Clay, J.E., Shanks, N.F., Behiels, E., Matsuda, K., Kohda, K., Miura, E., Rossmann, M., Mitakidis, N., et al. (2016). Structural basis for integration of GluR receptors within synaptic organizer complexes. *Science* 353, 295–299.
- Emes, R.D., and Grant, S.G.N. (2012). Evolution of synapse complexity and diversity. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 111–131.
- Fallin, M.D., Lasseter, V.K., Avramopoulos, D., Nicodemus, K.K., Wolyniec, P.S., McGrath, J.A., Steel, G., Nestadt, G., Liang, K.Y., Hagan, R.L., et al. (2005). Bipolar I disorder and schizophrenia: a 440-single-nucleotide polymorphism screen of 64 candidate genes among Ashkenazi Jewish case-parent trios. *Am. J. Hum. Genet.* 77, 918–936.
- Favuzzi, E., Deogracias, R., Marques-Smith, A., Maeso, P., Jezequel, J., Exposito-Alonso, D., Balia, M., Kroon, T., Hinojosa, A.J., Maraver, E.F., and Rico, B. (2019). Distinct molecular programs regulate synapse specificity in cortical inhibitory circuits. *Science* 363, 413–417.
- Fishell, G., and Kepecs, A. (2019). Interneuron Types as Attractors and Controllers. *Annu. Rev. Neurosci.* Published online July 12, 2019. 10.1146/annurev-neuro-070918-050421.
- Fossati, M., Pizzarelli, R., Schmidt, E.R., Kupferman, J.V., Stroebel, D., Polleux, F., and Charrier, C. (2016). SRGAP2 and Its Human-Specific Paralog Co-Regulate the Development of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Neuron* 91, 356–369.
- Früh, S., Romanos, J., Panzanelli, P., Bürgisser, D., Tyagarajan, S.K., Campbell, K.P., Santello, M., and Fritschy, J.-M. (2016). Neuronal Dystroglycan Is Necessary for Formation and Maintenance of Functional CCK-Positive Basket Cell Terminals on Pyramidal Cells. *J. Neurosci.* 36, 10296–10313.
- Fukata, Y., Adesnik, H., Iwanaga, T., Bredt, D.S., Nicoll, R.A., and Fukata, M. (2006). Epilepsy-related ligand/receptor complex LGI1 and ADAM22 regulate synaptic transmission. *Science* 313, 1792–1795.
- Gibson, J.R., Huber, K.M., and Südhof, T.C. (2009). Neuroligin-2 deletion selectively decreases inhibitory synaptic transmission originating from fast-spiking but not from somatostatin-positive interneurons. *J. Neurosci.* 29, 13883–13897.
- Glessner, J.T., Wang, K., Cai, G., Korvatska, O., Kim, C.E., Wood, S., Zhang, H., Estes, A., Brune, C.W., Bradfield, J.P., et al. (2009). Autism genome-wide copy number variation reveals ubiquitin and neuronal genes. *Nature* 459, 569–573.
- Grabauskas, G., Lancaster, B., O'Connor, V., and Wheal, H.V. (2007). Protein kinase signalling requirements for metabotropic action of kainate receptors in rat CA1 pyramidal neurones. *J. Physiol.* 579, 363–373.
- Gross, G.G., Junge, J.A., Mora, R.J., Kwon, H.-B., Olson, C.A., Takahashi, T.T., Liman, E.R., Ellis-Davies, G.C.R., McGee, A.W., Sabatini, B.L., et al. (2013). Recombinant probes for visualizing endogenous synaptic proteins in living neurons. *Neuron* 78, 971–985.
- Guo, S.Z., Huang, K., Shi, Y.Y., Tang, W., Zhou, J., Feng, G.Y., Zhu, S.M., Liu, H.J., Chen, Y., Sun, X.D., and He, L. (2007). A case-control association study between the GRID1 gene and schizophrenia in the Chinese Northern Han population. *Schizophr. Res.* 93, 385–390.
- Gupta, S.C., Yadav, R., Pavuluri, R., Morley, B.J., Stairs, D.J., and Dravid, S.M. (2015). Essential role of GluR1 in dendritic spine development and GluN2B to GluN2A NMDAR subunit switch in the cortex and hippocampus reveals ability of GluN2B inhibition in correcting hyperconnectivity. *Neuropharmacology* 93, 274–284.

- Hayashi, T., Umemori, H., Mishina, M., and Yamamoto, T. (1999). The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* 397, 72–76.
- Hepp, R., Hay, Y.A., Aguado, C., Lujan, R., Dauphinot, L., Potier, M.C., Nomura, S., Poirel, O., El Mestikawy, S., Lambolez, B., and Tricoire, L. (2015). Glutamate receptors of the delta family are widely expressed in the adult brain. *Brain Struct. Funct.* 220, 2797–2815.
- Hyvönen, M., Macias, M.J., Nilges, M., Oschkinat, H., Saraste, M., and Wilmanns, M. (1995). Structure of the binding site for inositol phosphates in a PH domain. *EMBO J.* 14, 4676–4685.
- Jang, S., Lee, H., and Kim, E. (2017). Synaptic adhesion molecules and excitatory synaptic transmission. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 45–50.
- Kakegawa, W., Kohda, K., and Yuzaki, M. (2007). The $\delta 2$ 'ionotropic' glutamate receptor functions as a non-ionotropic receptor to control cerebellar synaptic plasticity. *J. Physiol.* 584, 89–96.
- Kakegawa, W., Miyazaki, T., Emi, K., Matsuda, K., Kohda, K., Motohashi, J., Mishina, M., Kawahara, S., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2008). Differential regulation of synaptic plasticity and cerebellar motor learning by the C-terminal PDZ-binding motif of GluRdelta2. *J. Neurosci.* 28, 1460–1468.
- Kakegawa, W., Miyazaki, T., Kohda, K., Matsuda, K., Emi, K., Motohashi, J., Watanabe, M., and Yuzaki, M. (2009). The N-terminal domain of GluR2 (GluRdelta2) recruits presynaptic terminals and regulates synaptogenesis in the cerebellum in vivo. *J. Neurosci.* 29, 5738–5748.
- Kakegawa, W., Miyoshi, Y., Hamase, K., Matsuda, S., Matsuda, K., Kohda, K., Emi, K., Motohashi, J., Konno, R., Zaitzu, K., and Yuzaki, M. (2011). D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the $\delta 2$ glutamate receptor. *Nat. Neurosci.* 14, 603–611.
- Klatte, K., Kirschstein, T., Otte, D., Pothmann, L., Müller, L., Tokay, T., Kober, M., Uebachs, M., Zimmer, A., and Beck, H. (2013). Impaired D-serine-mediated cotransmission mediates cognitive dysfunction in epilepsy. *J. Neurosci.* 33, 13066–13080.
- Kohda, K., Kakegawa, W., Matsuda, S., Yamamoto, T., Hirano, H., and Yuzaki, M. (2013). The $\delta 2$ glutamate receptor gates long-term depression by coordinating interactions between two AMPA receptor phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E948–E957.
- Konno, K., Matsuda, K., Nakamoto, C., Uchigashima, M., Miyazaki, T., Yamasaki, M., Sakimura, K., Yuzaki, M., and Watanabe, M. (2014). Enriched expression of GluR1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum. *J. Neurosci.* 34, 7412–7424.
- Krueger-Burg, D., Papadopoulos, T., and Brose, N. (2017). Organizers of inhibitory synapses come of age. *Curr. Opin. Neurobiol.* 45, 66–77.
- Kuroyanagi, T., and Hirano, T. (2010). Flap loop of GluR2 binds to Cbln1 and induces presynaptic differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 537–541.
- Leira, J., and Marques, J.M. (2013). Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80, 292–311.
- Leung, T., Chen, X.Q., Tan, I., Manser, E., and Lim, L. (1998). Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase acts as a Cdc42 effector in promoting cytoskeletal reorganization. *Mol. Cell. Biol.* 18, 130–140.
- Li, J., Han, W., Pelkey, K.A., Duan, J., Mao, X., Wang, Y.-X., Craig, M.T., Dong, L., Petralia, R.S., McBain, C.J., and Lu, W. (2017). Molecular Dissection of Neuroligin 2 and Slitrk3 Reveals an Essential Framework for GABAergic Synapse Development. *Neuron* 96, 808–826.e8.
- Lovero, K.L., Fukata, Y., Granger, A.J., Fukata, M., and Nicoll, R.A. (2015). The LGI1-ADAM22 protein complex directs synapse maturation through regulation of PSD-95 function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112, E4129–E4137.
- Ma, T.M., Abazyan, S., Abazyan, B., Nomura, J., Yang, C., Seshadri, S., Sawa, A., Snyder, S.H., and Pletnikov, M.V. (2013). Pathogenic disruption of DISC1-serine racemase binding elicits schizophrenia-like behavior via D-serine depletion. *Mol. Psychiatry* 18, 557–567.
- Ma, T.M., Paul, B.D., Fu, C., Hu, S., Zhu, H., Blackshaw, S., Wolosker, H., and Snyder, S.H. (2014). Serine racemase regulated by binding to stargazin and PSD-95: potential N-methyl-D-aspartate- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (NMDA-AMPA) glutamate neurotransmission cross-talk. *J. Biol. Chem.* 289, 29631–29641.
- Matsuda, K., Miura, E., Miyazaki, T., Kakegawa, W., Emi, K., Narumi, S., Fukazawa, Y., Ito-Ishida, A., Kondo, T., Shigemoto, R., et al. (2010). Cbln1 is a ligand for an Orphan Glutamate Receptor 2, a Bidirectional Synapse Organizer. *Science* 328, 363–368.
- Matsuda, K., Budisantoso, T., Mitakidis, N., Sugaya, Y., Miura, E., Kakegawa, W., Yamasaki, M., Konno, K., Uchigashima, M., Abe, M., et al. (2016). Transsynaptic Modulation of Kainate Receptor Functions by C1q-like Proteins. *Neuron* 90, 752–767.
- McAllister, A.K. (2007). Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 425–450.
- McCracken, L.M., Lowes, D.C., Salling, M.C., Carreau-Vollmer, C., Odean, N.N., Blednov, Y.A., Betz, H., Harris, R.A., and Harrison, N.L. (2017). Glycine receptor $\alpha 3$ and $\alpha 2$ subunits mediate tonic and exogenous agonist-induced currents in forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, E7179–E7186.
- Missler, M., Südhof, T.C., and Biederer, T. (2012). Synaptic cell adhesion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a005694–a005694.
- Mondin, M., Labrousse, V., Hosy, E., Heine, M., Tessier, B., Levot, F., Poujol, C., Blanchet, C., Choquet, D., and Thoumine, O. (2011). Neurexin-neuroligin adhesions capture surface-diffusing AMPA receptors through PSD-95 scaffolds. *J. Neurosci.* 31, 13500–13515.
- Mullins, C., Fishell, G., and Tsien, R.W. (2016). Unifying Views of Autism Spectrum Disorders: A Consideration of Autoregulatory Feedback Loops. *Neuron* 89, 1131–1156.
- Nabavi, S., Kessels, H.W., Alfonso, S., Aow, J., Fox, R., and Malinow, R. (2013). Metabotropic NMDA receptor function is required for NMDA receptor-dependent long-term depression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 4027–4032.
- Nakamura, T., Arima-Yoshida, F., Sakaue, F., Nasu-Nishimura, Y., Takeda, Y., Matsuura, K., Akshoomoff, N., Mattson, S.N., Grossfeld, P.D., Manabe, T., and Akiyama, T. (2016). PX-RICS-deficient mice mimic autism spectrum disorder in Jacobsen syndrome through impaired GABAA receptor trafficking. *Nat. Commun.* 7, 10861.
- Nam, C.I., and Chen, L. (2005). Postsynaptic assembly induced by neurexin-neuroligin interaction and neurotransmitter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6137–6142.
- Naur, P., Hansen, K.B., Kristensen, A.S., Dravid, S.M., Pickering, D.S., Olsen, L., Vestergaard, B., Egebjerg, J., Gajhede, M., Traynelis, S.F., and Kastrup, J.S. (2007). Ionotropic glutamate-like receptor delta2 binds D-serine and glycine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14116–14121.
- Nelson, S.B., and Valakh, V. (2015). Excitatory/Inhibitory Balance and Circuit Homeostasis in Autism Spectrum Disorders. *Neuron* 87, 684–698.
- Nelson, A.D., Caballero-Florán, R.N., Rodríguez Díaz, J.C., Hull, J.M., Yuan, Y., Li, J., Chen, K., Walder, K.K., Lopez-Santiago, L.F., Bennett, V., et al. (2018). Ankyrin-G regulates forebrain connectivity and network synchronization via interaction with GABARAP. *Mol. Psychiatry*. Published online November 30, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0308-x>.
- Okada, H., Uezu, A., Mason, F.M., Soderblom, E.J., Moseley, M.A., 3rd, and Soderling, S.H. (2011). SH3 domain-based phototrapping in living cells reveals Rho family GAP signaling complexes. *Sci. Signal.* 4, rs13–rs13.
- Oliet, S.H.R., and Mothet, J.-P. (2009). Regulation of N-methyl-D-aspartate receptors by astrocytic D-serine. *Neuroscience* 158, 275–283.
- Panzanelli, P., Gunn, B.G., Schlatter, M.C., Benke, D., Tyagarajan, S.K., Scheiffele, P., Belelli, D., Lambert, J.J., Rudolph, U., and Fritschy, J.-M. (2011). Distinct mechanisms regulate GABAA receptor and gephyrin clustering at perisomatic and axo-axonic synapses on CA1 pyramidal cells. *J. Physiol.* 589, 4959–4980.

- 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.
- Papadopoulos, T., Korte, M., Eulenburg, V., Kubota, H., Retiounskaia, M., Harvey, R.J., Harvey, K., O'Sullivan, G.A., Laube, B., Hülsmann, S., et al. (2007). Impaired GABAergic transmission and altered hippocampal synaptic plasticity in collybistin-deficient mice. *EMBO J.* 26, 3888–3899.
- Papouin, T., Ladépêche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.P., and Oliet, S.H.R. (2012). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150, 633–646.
- Paul, A., Crow, M., Raudales, R., He, M., Gillis, J., and Huang, Z.J. (2017). Transcriptional Architecture of Synaptic Communication Delineates GABAergic Neuron Identity. *Cell* 171, 522–539.e20.
- Poulet, P., Carpentier, S., and Barillot, E. (2007). myProMS, a web server for management and validation of mass spectrometry-based proteomic data. *Proteomics* 7, 2553–2556.
- Pouloupoulos, A., Aramuni, G., Meyer, G., Soykan, T., Hoon, M., Papadopoulos, T., Zhang, M., Paarmann, I., Fuchs, C., Harvey, K., et al. (2009). Neuroligin 2 drives postsynaptic assembly at perisomatic inhibitory synapses through gephyrin and collybistin. *Neuron* 63, 628–642.
- Pribrig, H., and Stellwagen, D. (2013). TNF- α downregulates inhibitory neurotransmission through protein phosphatase 1-dependent trafficking of GABA(A) receptors. *J. Neurosci.* 33, 15879–15893.
- Robert, A., Hyde, R., Hughes, T.E., and Howe, J.R. (2002). The expression of dominant-negative subunits selectively suppresses neuronal AMPA and kainate receptors. *Neuroscience* 115, 1199–1210.
- Rodríguez-Moreno, A., and Sihra, T.S. (2007). Kainate receptors with a metabolic modus operandi. *Trends Neurosci.* 30, 630–637.
- Rosenberg, D., Artoul, S., Segal, A.C., Kolodney, G., Radzishevsky, I., Dikopoltsev, E., Foltyn, V.N., Inoue, R., Mori, H., Billard, J.-M., and Wolosker, H. (2013). Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J. Neurosci.* 33, 3533–3544.
- Russo, I., Gavello, D., Menna, E., Vandael, D., Veglia, C., Morello, N., Corradini, I., Focchi, E., Alfieri, A., Angelini, C., et al. (2019). P140CAP regulates GABAergic synaptogenesis and development of hippocampal inhibitory circuits. *Cereb. Cortex* 29, 91–105.
- Ryu, K., Yokoyama, M., Yamashita, M., and Hirano, T. (2012). Induction of excitatory and inhibitory presynaptic differentiation by GluD1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 417, 157–161.
- Saglietti, L., Dequidt, C., Kamieniarz, K., Rousset, M.-C., Valnegri, P., Thoumine, O., Beretta, F., Fagni, L., Choquet, D., Sala, C., et al. (2007). Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation. *Neuron* 54, 461–477.
- Salling, M.C., and Harrison, N.L. (2014). Strychnine-sensitive glycine receptors on pyramidal neurons in layers II/III of the mouse prefrontal cortex are tonically activated. *J. Neurophysiol.* 112, 1169–1178.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods.* 9, 676–682.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 823–847.
- Sheng, M., and Kim, E. (2011). The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a005678–a005678.
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X., and Zhang, F. (2016). Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351, 84–88.
- Stein, I.S., Gray, J.A., and Zito, K. (2015). Non-Ionotropic NMDA Receptor Signaling Drives Activity-Induced Dendritic Spine Shrinkage. *J. Neurosci.* 35, 12303–12308.
- Südhof, T.C. (2017). Synaptic Neurexin Complexes: A Molecular Code for the Logic of Neural Circuits. *Cell* 171, 745–769.
- Tai, C.-Y., Kim, S.A., and Schuman, E.M. (2008). Cadherins and synaptic plasticity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 567–575.
- Tao, W., Díaz-Alonso, J., Sheng, N., and Nicoll, R.A. (2018). Postsynaptic $\delta 1$ glutamate receptor assembles and maintains hippocampal synapses via Cbln2 and neurexin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115, E5373–E5381.
- Tasic, B., Menon, V., Nguyen, T.N., Kim, T.K., Jarsky, T., Yao, Z., Levi, B., Gray, L.T., Sorensen, S.A., Dolbeare, T., et al. (2016). Adult mouse cortical cell taxonomy revealed by single cell transcriptomics. *Nat. Neurosci.* 19, 335–346.
- Ting, J.T., Peça, J., and Feng, G. (2012). Functional consequences of mutations in postsynaptic scaffolding proteins and relevance to psychiatric disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* 35, 49–71.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–496.
- Trembleau, A., Morales, M., and Bloom, F.E. (1994). Aggregation of vasopressin mRNA in a subset of axonal swellings of the median eminence and posterior pituitary: light and electron microscopic evidence. *J. Neurosci.* 14, 39–53.
- Treutlein, J., Mühleisen, T.W., Frank, J., Mattheisen, M., Herms, S., Ludwig, K.U., Treutlein, T., Schmael, C., Strohmaier, J., Bösschen, K.V., et al. (2009). Dissection of phenotype reveals possible association between schizophrenia and Glutamate Receptor Delta 1 (GRID1) gene promoter. *Schizophr. Res.* 111, 123–130.
- Triller, A., and Choquet, D. (2003). Synaptic structure and diffusion dynamics of synaptic receptors. *Biol. Cell* 95, 465–476.
- Tyagarajan, S.K., and Fritschy, J.-M. (2014). Gephyrin: a master regulator of neuronal function? *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 141–156.
- Uchida, N., Honjo, Y., Johnson, K.R., Wheelock, M.J., and Takeichi, M. (1996). The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* 135, 767–779.
- Uemura, T., Lee, S.-J., Yasumura, M., Takeuchi, T., Yoshida, T., Ra, M., Taguchi, R., Sakimura, K., and Mishina, M. (2010). Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum. *Cell* 141, 1068–1079.
- Uezu, A., Kanak, D.J., Bradshaw, T.W.A., Soderblom, E.J., Catavero, C.M., Burette, A.C., Weinberg, R.J., and Soderling, S.H. (2016). Identification of an elaborate complex mediating postsynaptic inhibition. *Science* 353, 1123–1129.
- Van Horn, M.R., Strasser, A., Miraucourt, L.S., Pollegioni, L., and Ruthazer, E.S. (2017). The Gliotransmitter d-Serine Promotes Synapse Maturation and Axonal Stabilization *In Vivo*. *J. Neurosci.* 37, 6277–6288.
- van Versendaal, D., Rajendran, R., Saiepour, M.H., Klooster, J., Smit-Rigter, L., Sommeijer, J.P., De Zeeuw, C.I., Hofer, S.B., Heimel, J.A., and Levelt, C.N. (2012). Elimination of inhibitory synapses is a major component of adult ocular dominance plasticity. *Neuron* 74, 374–383.
- Vizcaíno, J.A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dienes, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., et al. (2016). 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D447–D456.
- Wertz, A., Trenholm, S., Yonehara, K., Hillier, D., Raics, Z., Leinweber, M., Szalay, G., Ghanem, A., Keller, G., Rozsa, B., Conzelmann, K.K., and Roska, B. (2015). Single-cell-initiated monosynaptic tracing reveals layer-specific cortical network modules. *Science* 349, 70–74.
- Yasumura, M., Yoshida, T., Lee, S.-J., Uemura, T., Joo, J.-Y., and Mishina, M. (2012). Glutamate receptor $\delta 1$ induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation of cortical neurons by interacting with neurexins through cerebellin precursor protein subtypes. *J. Neurochem.* 121, 705–716.

- Yuste, R. (2013). Electrical compartmentalization in dendritic spines. *Annu. Rev. Neurosci.* *36*, 429–449.
- Yuzaki, M. (2017). The C1q complement family of synaptic organizers: not just complementary. *Curr. Opin. Neurobiol.* *45*, 9–15.
- Yuzaki, M. (2018). Two Classes of Secreted Synaptic Organizers in the Central Nervous System. *Annu. Rev. Physiol.* *80*, 243–262.
- Yuzaki, M., and Aricescu, A.R. (2017). A GluD Coming-Of-Age Story. *Trends Neurosci.* *40*, 138–150.
- Zhong, C., Shen, J., Zhang, H., Li, G., Shen, S., Wang, F., Hu, K., Cao, L., He, Y., and Ding, J. (2017). Cbln1 and Cbln4 Are Structurally Similar but Differ in GluD2 Binding Interactions. *Cell Rep.* *20*, 2328–2340.
- Ziv, N.E., and Fisher-Lavie, A. (2014). Presynaptic and postsynaptic scaffolds: dynamics fast and slow. *Neuroscientist* *20*, 439–452.
- Zoghbi, H.Y., and Bear, M.F. (2012). Synaptic dysfunction in neurodevelopmental disorders associated with autism and intellectual disabilities. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a009886–a009886.

STAR★METHODS

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Mouse anti-HA	Covance	Cat# MMS-101P; RRID:AB_2314672
Rabbit anti-GFP	Thermo Fisher Scientific	Cat# A-6455; RRID:AB_221570
Rabbit anti-Myc	Cell Signaling Technology	Cat# 2272; RRID:AB_10692100
Mouse anti-Myc	Cell Signaling Technology	Cat# 2276; RRID:AB_331783
Rabbit anti-GluD1	Hepp et al., 2015	N/A
Mouse anti-gephyrin	Synaptic Systems	Cat# 147 011; RRID:AB_887717
Rabbit anti-Arhgef12	Thermo Fisher Scientific	Cat# PA5-39418; RRID:AB_2556008
Rabbit anti-Ppp1r12a	Thermo Fisher Scientific	Cat# PA5-17164; RRID:AB_10978517
Rabbit anti-RFP	Rockland	Cat# 600-401-379; RRID:AB_2209751
Rabbit anti-Srgap2	Charrier et al., 2012	N/A
Rabbit anti-GAPDH	Synaptic Systems	Cat# 247 002; RRID:AB_10804053
Mouse anti-VGAT	Synaptic Systems	Cat# 131 011; RRID:AB_887872
Goat anti-mouse HRP	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat# 115-035-003; RRID:AB_10015289
Goat anti-rabbit HRP	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat# 111-035-144; RRID:AB_2307391
Goat anti-rabbit Alexa 488	Thermo Fisher Scientific	Cat# A27034; RRID:AB_2536097
Goat anti-mouse Cy3	Jackson ImmunoResearch Labs	Cat# 115-165-003; RRID:AB_2338680
Goat biotinylated anti-mouse	Vector Laboratories	Cat# BA-9200; RRID:AB_2336171
Nanogold goat anti-rabbit	Nanoprobes	Cat# 2003; RRID:AB_2687591
Bacterial and Virus Strains		
AAV2/1 H1-shControl.Syn-TagBFP	This paper	N/A
AAV2/1 H1-shCbln2.Syn-TagBFP	This paper	N/A
AAV2/1 H1-shCbln4.Syn-TagBFP	This paper	N/A
Lentivirus H1-shControl.Syn-EGFP	This paper	N/A
Lentivirus H1-shGluD1.Syn-EGFP	This paper	N/A
Lentivirus H1-shPpp1r12a.Syn-EGFP	This paper	N/A
Lentivirus H1-shPpp1r12a.Syn-EGFP	This paper	N/A
Lentivirus H1-shSrgap2.Syn-EGFP	This paper	N/A
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Tetrodotoxin	Abcam	Cat# ab120055
NBQX	Abcam	Cat# ab120046
D-AP5	Abcam	Cat# ab120003
Gabazine	Abcam	Cat# ab120042
Experimental Models: Cell Lines		
HEK293T	ATCC	Cat# CRL-1573; RRID:CVCL_0045
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: Swiss/CD-1	Janvier Labs	N/A
Mouse: C57BL/6J	Janvier Labs	N/A
Oligonucleotides		
shRNA oligos, see methods detail	This paper	N/A
gRNA oligos, see methods detail	This paper	N/A
Recombinant DNA		
pCAG HA-GluD1	This paper	N/A
pCAG HA-GluD1-mOrange	This paper	N/A

(Continued on next page)

Continued

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
pCAG_PSD95.FingR-EGFP-CCR5TC	Gross et al., 2013	RRID:Addgene_46295
pCAG_GPHN.FingR-EGFPCCR5TC	Gross et al., 2013	RRID:Addgene_46296
Mouse Ppp1r12a cDNA	Dharmacon	Cat# MMM1013-211691718
Human MRCK α cDNA	Dharmacon	Cat# MHS6278-213663984
pCDNA3 mRFP-ARHGEF12	Bodmann et al., 2017	N/A
Mouse Cbln2 cDNA	Dharmacon	Cat# MMM1013-202798518
Mouse Cbln4 cDNA	Dharmacon	Cat# MMM1013-202798044
pCAG 3xMyc-MRCK α	This paper	N/A
pCAG 3xMyc-Ppp1r12a	This paper	N/A
pCAG ARHGEF12	This paper	N/A
pCAG Myc-Cbln2	This paper	N/A
pCAG Myc-Cbln4	This paper	N/A
pH1SCV2 vectors	Charrier et al., 2012	N/A
pH1SCTdT2 vectors	Fossati et al., 2016	N/A
Lenti H1-shRNA.Syn-EGFP vectors	This paper	N/A
pAAV H1-shRNA.Syn-TagBFP vectors	This paper	N/A
eSpCas9(1.1) vectors	Slaymaker et al., 2016	RRID:Addgene_71814
Software and Algorithms		
GPP sgRNA Designer	Broad Institute	https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgma-design
myProMS v3.6	Poulet et al., 2007	http://bioinfo-out.curie.fr/myproms/proms.html
Fiji	Schindelin et al., 2012	https://fiji.sc/ ; RRID:SCR_002285
pCLAMP10	Molecular Devices	RRID:SCR_011323
Prism 7	GraphPad	RRID:SCR_002798

LEAD CONTACT AND MATERIALS AVAILABILITY

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Cécile Charrier (cecile.charrier@ens.fr).

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Animals

All animals were handled according to French and EU regulations (APAFIS#1530-2015082611508691v3). In utero electroporations were performed on pregnant Swiss females at E14.5–15.5 (Janvier labs). For viral injections in the lateral ventricles, newborn pups (P0) of undetermined sex were used. Primary cultures were prepared from timed pregnant C57BL/6J mice at E18.5 (Janvier labs). Juveniles correspond to mice between P20 and P22. Adults correspond to mice between P69 and P75. Mice were maintained in a 12 hr light/dark cycle with unlimited access to food and water.

Primary cultures of mouse cortical neurons

Primary cultures were performed as described previously ([Charrier et al., 2012](#)) with few modifications. After dissection and dissociation of mouse cortices from E18.5 embryos, neurons were plated on glass coverslips coated with poly-D-ornithine (80 μ g/ml, Sigma) in MEM supplemented with sodium pyruvate, L-glutamine and 10% horse serum. Medium was changed 2–3 h after plating with Neurobasal supplemented with L-glutamine (2 mM), B27 (1X) and penicillin (2.5 units/ml) - streptomycin (2.5 μ g/ml). Then, one third of the medium was changed every 5 days. Unless otherwise indicated, all products were from Life Technologies. Cells were maintained at 37°C in 5% CO₂ until use.

HEK293T cells

HEK293T (CRL-1573 from ATCC) cells were cultured according to suggested protocols. Briefly, cells were maintained in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) and 1% Penicillin- Streptomycin (GIBCO) at 37°C, 5% CO₂, and passaged by trypsin/EDTA digestion (GIBCO) upon reaching confluency.

METHOD DETAILS

Plasmids for protein expression

EGFP-GPHN was previously described (Fossati et al., 2016) and it was used to visualize inhibitory synapses. HA-tagged mouse *grid1* (gift from Ludovic Tricoire, IBPS, Paris, France) was inserted into pCAG vector by PCR between XhoI and BsrGI to obtain pCAHA GluD1 or between XhoI and KpnI to obtain pCAHA GluD1-EGFP. EGFP was then replaced by mOrange between KpnI and NotI to generate pCAHA GluD1-mOrange. pCAG_PSD95.FingR-EGFP-CCR5TC and pCAG_GPHN.FingR-EGFP-CCR5TC were purchased from Addgene (plasmids #46295 and #46296, respectively). Mouse *ppp1r12a* (GenBank: BC125381, cDNA clone MGC:159084 IMAGE:40129896) and human *CDC42BPA* (encoding MRCK α , GenBank: BC136333, cDNA clone MGC:167943 IMAGE:9020320) cDNAs were obtained from Dharmacon and subcloned by PCR into pCAG vector between AgeI and BsrGI or AgeI and NotI, respectively. Both constructs were Myc-tagged by inserting a DNA cassette containing a start codon and 3x-Myc between AgeI and KpnI. Human *ARHGEF12* (gift from Moritz Bünemann, Marburg University, Germany) was inserted into pCAG vector by PCR between AgeI and BsrGI. Indicated mutations were introduced in *grid1*, *CDC42BPA*, *ppp1r12a*, and *ARHGEF12* using the QuickChange mutagenesis kit (Agilent). Mouse *cbln2* (GenBank: BC055682, cDNA clone MGC:66500 IMAGE:6412317) and *cbln4* (GenBank: BC094540, cDNA clone MGC:106619 IMAGE:5708067) cDNAs were obtained from Dharmacon and subcloned by PCR into pCAG vector between AgeI and NotI. The three constructs were Myc-tagged at the N terminus by inserting a DNA cassette containing a start codon, the signal sequence of Cbln1 (for Cbln2) or of Cbln4 (for Cbln4) and one Myc tag between EcoRI and AgeI.

shRNA and Crispr constructs and shRNA validation

For in utero knockdown experiments with shRNAs, we used the previously described pH1SCV2 and pH1SCTdT2 vectors (Charrier et al., 2012; Fossati et al., 2016). An H1 promoter drives the expression of the shRNA and a CAG promoter that of myristoylated Venus (mVenus) or TdTomato, respectively. The vector pH1SCV2 was used for dendritic spine analysis, pH1SCTdT2 was co-expressed with EGFP-GPHN to analyze inhibitory synapses. For shRNA validation on endogenous mouse *grid1*, *arhgef12* and *ppp1r12a*, we used a lentiviral vector carrying the H1 promoter to drive shRNA expression and the synapsin promoter to drive EGFP expression (Fossati et al., 2016). For AAV-mediated *in vivo* knockdown of *cbln2* and *cbln4* the plasmid pAAV-eIF1 α -tdTomato-WPRE-pGHpA (Addgene, plasmid #67527; Wertz et al., 2015) was modified as follows: a DNA cassette containing the shRNA with the H1 promoter and EGFP with the synapsin promoter was amplified by PCR from the lentiviral vector described above and inserted into pAAV-eIF1 α -tdTomato-WPRE-pGHpA between MluI and EcoRI. EGFP was then replaced by TagBFP between EcoRI and NheI. AAVs (serotype 2/1) were produced by the Centre of vector production of INSERM (CPV, UMR1089, Nantes, France). Control shRNA (shControl) was described previously (Charrier et al., 2012). The following shRNAs targeted the corresponding seed sequences: shGluD1: 5'-GAAGATAGCTCAAATCCTTAT-3'; shARHGEF12: 5'-GCAGCTGTTTCCAGAGCATTG-3'; shPpp1r12a: 5'-GCTGAAATCAGTGCCTCTAAA-3'; shCbln2: 5'-GCTTAATGCAGAATGGCTACC-3'; shCbln4: 5'-GCCGTTCTGCTGATTCTAGTG-3'. ShRNAs were validated as previously described (Charrier et al., 2012). Briefly, HEK293T cells were co-transfected with mouse HA-GluD1, Myc-Ppp1r12a, Myc-Cbln2, Myc-Cbln4 or human RFP-ARHGEF12 together with the corresponding shRNA at 1:2 ratio. Two days after transfection, cells were collected and lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, Sigma-Aldrich) and further processed for western blot analysis of the relative protein expression levels. The knockdown of endogenous *grid1*, *arhgef12* and *ppp1r12a* was further validated in primary cultures of cortical neurons infected with lentiviral vectors. Neurons infected at DIV (days *in vitro*) 4 were harvested at DIV21 and lysed in RIPA buffer under agitation for 1 h at 4°C. 20 μ g of total proteins for neurons infected with shGluD1 and shArhgef12 or 40 μ g of total proteins for neurons infected with shPpp1r12a were separated by SDS-PAGE and further processed for western blot analysis. For rescue experiments, four point silent mutations were introduced in *grid1* (c1193t_t1194a_c1195_g_a1196c), *ppp1r12a* (c1355t_a1356t_g1357c_t1358a) and *ARHGEF12* (g1119a_a1120t_g1121c_c1122a) to resist to shRNA-mediated knockdown (mutants named GluD1*, Ppp1r12a* and ARHGEF12*, respectively). To knock out *grid1*, *arhgef12* and *ppp1r12a* with Crispr, we used an engineered spCas9 with enhanced specificity (espCas9(1.1), Addgene plasmid #71814) (Slaymaker et al., 2016). gRNAs were designed using the prediction software: <https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgRNA-design>. Each gene was knocked-out using two gRNAs that were encoded by the same plasmid together with the espCas9(1.1). A DNA cassette containing the U6 promoter and one gRNA was inserted between XbaI and KpnI into espCas9(1.1) plasmid carrying a second gRNA. *grid1*: 5'-GGCCAATAATCCGTTCCAGG-3' (targets exon 2) and 5'-GAACTCCATAACCCCTGTG-3' (targets exon 8); *arhgef12*: 5'-GTCTACTATCACGGACAGGT-3' (targets exon 1) and 5'-GGCATCACCTAATGGCCTGG-3' (targets exon 11); *ppp1r12a*: 5'-GGTGAAGCGCCAGAAGACCA-3' (targets exon 1) and 5'-GTGTTGATATAGAAGCGGCT-3' (targets exon 4).

Lentivirus production and infection

48 h after transfection of HEK293T cells, the viral supernatant was collected, centrifuged at 3,000 g for 5 min at 4°C to remove cell debris, and ultracentrifuged at 25,000 g for 2 h on a 20% sucrose cushion. Viral pellets were resuspended in sterile PBS, aliquoted and stored at -80°C. When indicated, cortical neurons were infected 4 days after plating with concentrated lentiviruses driving the expression of shRNA and EGFP.

In utero electroporation, AAV injection and slice preparation

In utero electroporation was performed as previously described (Fossati et al., 2016). Pregnant Swiss females at E14.5–15.5 (Janvier labs) were anesthetized with isoflurane (3.5% for induction and 2% during the surgery) and subcutaneously injected with 0.1 mg/kg of buprenorphine for analgesia. The uterine horns were exposed after laparotomy. Electroporation was performed using a square wave electroporator (ECM 830, BTX) and tweezer-type platinum disc electrodes (5mm-diameter, Sonidel). The electroporation settings were: 4 pulses of 40 V for 50 ms with 500 ms interval. Endotoxin-free DNA was injected using a glass pipette into one ventricle of the mouse embryos. The volume of injected DNA was adjusted depending on the experiments. Plasmids were used at the following concentrations: shRNA vectors: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (adults) or 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (juveniles); GluD1, ARHGEF12, MRCK α and Ppp1r12a constructs: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, except the shRNA-resistant Ppp1r12a mutant (Ppp1r12a*) and GluD1-mOrange which were used 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; EGFP-GPHN: 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Crispr knock out plasmids: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. pCAG dsRed: 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, pCAG TagBFP: 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, GPHN.FingR-EGFP and PSD95.FingR-EGFP: 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. AAV injection was performed at P0 on newborn pups previously in utero electroporated at E14.5–15.5. Upon hypothermia-induced anesthesia (avoiding direct contact of the animal with the ice), pups were injected in the lateral ventricle corresponding to the electroporated side using a graduated glass pipette. The volume corresponding to 3×10^{10} vg (viral genome) was used. Injected pups were then rapidly warmed up and kept on a heating pad set at 37°C until complete recovery. Animals were sacrificed at the indicated age by terminal perfusion of 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) in PBS. Unless otherwise indicated, 100 μm coronal brain sections were obtained using a vibrating microtome (Leica VT1200S, Leica Microsystems). Sections were mounted on slides in Vectashield.

Immunohistochemistry for confocal microscopy

Animals at postnatal day 21 were intracardially perfused with PBS and 4% paraformaldehyde (see above). After post-fixation, dissected brains were cryoprotected in 20% sucrose at 4°C for at least 16 h and then frozen at -80°C . 20 μm coronal sections were obtained using a cryostat and further processed for immunohistochemistry. Briefly, slices were incubated in 0.1% Triton X-100 and 0.25% fish gelatin (Sigma-Aldrich) in PBS to permeabilize and block unspecific staining. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C and secondary antibodies for 3 h at room temperature under gentle agitation. Both primary and secondary antibodies were diluted in 0.1% Triton X-100 and 0.125% fish gelatin in PBS. Coverslips were mounted on slides in Vectashield (Vector Laboratories). Mouse anti-Gephyrin (Synaptic Systems Clone 7a, 1:400) and rabbit anti-GluD1 (kind gift from L. Tricoire, IBPS, Paris, France) (Benamer et al., 2018; Hepp et al., 2015) were used as primary antibodies. All secondary antibodies Alexa- (Invitrogen) or Cyanin-conjugated (Jackson ImmunoResearch) were diluted 1:500.

Confocal image acquisition

Confocal images were acquired in 1024x1024 mode using Leica TCS SP8 confocal laser scanning platforms controlled by the LAF AS software and equipped with a tunable white laser and hybrid detectors (Leica Microsystems) or, for slices infected with AAVs expressing TagBFP, in 512x512 mode using an inverted microscope (Nikon Ti PSF) equipped with a CSUX1-A1 Yokogawa spinning disc and an EMCCD camera and controlled by the Metamorph software (Molecular Devices). We used the following objective lenses: 10X PlanApo, NA 0.45 (identification of electroporated neurons and low magnification images) and 100X HC-PL APO, NA 1.44 CORR CS (Leica) or 100 X HC-PlanApo, NA 1.4 (Nikon) (images of spines, gephyrin and PSD-95 clusters and association between GluD1, immunostained gephyrin and PS-D95 or Gephyrin.FingRs). Images were blindly acquired and analyzed. Z stacks of images were acquired with spacing of 150 nm.

Electron microscopy

Anesthetized P21 mice were intracardially perfused with 2% paraformaldehyde (PFA) and 0.1% glutaraldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and post-fixed overnight at 4°C in 2% PFA. Coronal sections (200 μm) were obtained using a vibratome (see above) and cryoprotected overnight in 20% glycerol and 20% sucrose under gentle agitation at 4°C. They were permeabilized with 3 freeze-thawing cycles performed by floating them on liquid nitrogen in an aluminum cup. They were then extensively rinsed in PBS, and immersed for 20 min in 50 mM ammonium chloride and for 30 min in PBS with 0.1% gelatin (PBSg). For double detection of VGAT and GluD1, GluD1 labeling was performed first. Coronal sections were incubated for 60 h at 4°C with a rabbit anti-GluD1 antibody (1:1,000 dilution, see immunohistochemistry). Sections were rinsed extensively in PBSg and then incubated 6h at room temperature with a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with nanogold particules (Nanoprobe, 1:100). Gold particles were intensified for 5 min at 20°C with HQ silver kit (Nanoprobe) in a dark room. Gold toning (Trembleau et al., 1994) was performed on the sections. They were then rinsed extensively in PBS and PBSg. For the detection of VGAT, sections were incubated for 48 h at 4°C with anti-VGAT mouse monoclonal antibody (Synaptic Systems, 1:100), rinsed extensively in PBSg and then incubated 4 h at room temperature with a biotinylated goat anti-mouse antibody (Vector Laboratories, 1:100). Detection of the biotinylated antibody was carried by the avidin-biotin complex method (Elite Vectastain kit, Vector; and Sigma fast DAB, Sigma-Aldrich). Antigen-antibody complexes were stabilized by dipping the sections for 5 min in 1% glutaraldehyde in PBS. Sections were then post-fixed for 1 h in 2% OsO₄ in PBS at 4°C in the dark, dehydrated in graded ethanol and flat-embedded in epoxy resin (Araldite, Polysciences). Embedded sections were mounted orthogonally on a resin block and cut tangentially to the pial surface. To reach cortical layers 2/3, 200 sections

of 1 μm thickness of tissue were removed from the onset of layer 1 using an UC6 ultramicrotome (Leica Microsystems). Ultrathin sections (70 nm, pale yellow) were contrasted with uranyl acetate and Reynolds lead citrate. Observations were performed with a TECNAI 12 electron microscope (Philips).

Electrophysiology

Acute coronal brain slices (300 μm thick) were obtained from juvenile (postnatal day 16–19) Swiss mice electroporated in utero with shGluD1 in pH1SCTdT2. Whole-cell patch-clamp recordings were performed in layer 2/3 cortical pyramidal neurons of the somatosensory cortex. Briefly, after decapitation the brain was quickly removed from the skull and placed in ice-cold (4°C) ‘cutting solution’ containing (in mM): 85 NaCl, 64 sucrose, 25 glucose, 2.5 KCl, 1.2 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , 0.5 CaCl_2 , and 7 MgCl_2 , saturated with 95% O_2 and 5% CO_2 (pH 7.3–7.4). Slices were cut using the 7000 smz-2 tissue slicer (Campden Instrument). Slices recovered in oxygenated artificial cerebrospinal fluid (ACSF) containing (in mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2 CaCl_2 , 1 MgCl_2 , 1.2 NaH_2PO_4 , 24 NaHCO_3 , and 25 glucose (pH 7.4), at 35°C for 10 min and then at room temperature for at least 45 min. For electrophysiological recordings, slices were transferred to a submerged recording chamber and continuously perfused at $33\text{--}34^{\circ}\text{C}$ with oxygenated ACSF at a rate of 4–5 ml/min. Inhibitory and excitatory miniature post-synaptic miniature currents (mIPSCs and mEPSCs, respectively) were recorded at a holding potential of -60 mV in the presence of 0.5 μM TTX. mIPSCs were isolated by adding NBQX (10 μM) and D-AP5 (50 μM) to the ACSF. mEPSCs were isolated using gabazine (10 μM). mIPSCs were recorded using an intracellular solution containing (in mM): 150 KCl, 1.5 MgCl_2 , 10 HEPES 10, 1 EGTA, 2 NaATP, 0.5 NaGTP (pH adjusted to ~ 7.3 with KOH). mEPSCs were recorded using an intracellular solution containing (in mM): 144 K-gluconate, 7 KCl, 10 HEPES, 1 EGTA, 1.5 MgCl_2 , 2 NaATP, 0.5 NaGTP, (pH adjusted to ~ 7.3 with KOH). Access and input resistance were monitored by applying 5 mV hyperpolarizing steps of current. All drugs were obtained from Abcam.

Transfection and western blotting

Transfection was performed using Jet-Prime (Polyplus Transfection) according to the manufacturer protocol. Western blotting was performed using the following primary antibodies: mouse anti-HA (HA.11 Clone 16B12 Monoclonal Antibody, Covance, 1:1,000), rabbit anti-GFP (Life Technologies, 1:2,000), rabbit anti-Myc (Cell Signaling Technology, 1:1,000), rabbit anti-GluD1 (gift from L. Tricoire, 1:1000), rabbit anti-Arhgef12 (ThermoFisher Scientific, 1:1,000), rabbit anti-Ppp1r12a (ThermoFisher Scientific, 1:1,000), rabbit anti-RFP (Rockland Immunochemicals, 1:1,000), rabbit anti-SRGAP2 (1:2,000; [Charrier et al., 2012](#); [Fossati et al., 2016](#)), rabbit anti-GAPDH (Synaptic Systems, 1:1,000). All HRP-conjugated secondary antibodies were used at 1:30,000 dilution (Jackson ImmunoResearch). Protein visualization was performed by chemiluminescence using LumiLight western blotting (Roche) or Clarity Western ECL (Biorad) substrates and ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) or Chemidoc (Biorad) imagers.

Cell surface biotinylation

Transfected HEK cells or primary cultures of cortical neurons at 15 or 22–23 days *in vitro* (DIV) were washed 3 times in ice-cold PBS supplemented with 0.8 mM CaCl_2 and 0.5 mM MgCl_2 (PBS^{2+}) and then incubated for 12 min at room temperature followed by further 12 min at 4°C with 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin (ThermoFisher Scientific) in PBS^{2+} . After rinsing in ice-cold PBS^{2+} , biotin was quenched in 50 mM glycine in PBS^{2+} for 10 min. Cells were scraped in NaCl-Tris buffer supplemented with protease inhibitory cocktail (Roche) and then lysed (150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 2% Triton X-100, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail) for 1 h at 4°C . Biotinylated proteins were pulled down by incubating cell lysates with neutravidin agarose beads (ThermoFisher Scientific) for 2 h at 4°C . After extensive washes, beads were resuspended in gel loading buffer (Sigma-Aldrich) and bound proteins were eluted with boiling. Relative cell surface expression levels were analyzed by western blotting. Inputs correspond to 20% of the cell surface fraction.

Subcellular fractionation

Subcellular fractionation was performed from Swiss P15 mouse brains. All steps were performed at 4°C . Briefly, brains were homogenized in ice-cold HEPES-buffered sucrose (0.32 M sucrose, 4 mM HEPES pH 7.4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, protease inhibitor cocktail, from Sigma) using a motor driven glass-teflon homogenizer. The homogenate was centrifuged at 3,000 g for 15 min. The resulting supernatant was centrifuged at 38,400 g for 15 min, yielding the crude synaptosomal pellet. The pellet was then subjected to hypo-osmotic shock and centrifuged at 38,400 g for 20 min. The resulting pellet was lysed for 1 h using HEPES-buffered NaCl (100 mM NaCl, 4 mM HEPES pH 7.4, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, protease inhibitor cocktail) supplemented with 1% CHAPS (Sigma) and centrifuged at 100,000 g for 1 h. The corresponding supernatant is referred to as synaptic fraction or synaptic membranes. Protein concentration was measured and protein samples were subjected to immunoprecipitation.

Immunoprecipitation

For HEK cells, 1 mg of total protein from each sample was diluted in NP-40 buffer (1% Igepal, 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail) and incubated overnight at 4°C , with either 5 μg of mouse anti-HA antibody (HA.11 Clone 16B12 Monoclonal Antibody, Covance) or 5 μg of mouse anti-Myc antibody (clone 9B11 Monoclonal Antibody, Cell Signaling Technology) and 5 μg of mouse IgG as negative control. Protein G-agarose beads (Thermo Fisher Scientific) were then added for 2 h at 4°C . After extensive washes (1% Igepal, 50 mM Tris pH 7.4, 200 mM NaCl, 2 mM EDTA, protease inhibitor cocktail), the beads were resuspended

in gel-loading buffer and bound proteins were released with boiling. Inputs correspond to 50 μ g of proteins. Samples were subjected to western blot analysis. For brain samples and mass spectrometry analysis, the immunoprecipitations were performed using antibodies covalently cross-linked to protein G magnetic beads (Pierce). 36 μ g of rabbit anti-GluD1 antibody, or total rabbit IgG in control condition, were incubated 1 h at room temperature and cross-linked with 20 mM DMP (dimethylpimelimidate, Pierce) in 0.2 M Sodium Borate pH 9. After 30 min, the reaction was blocked for 1 h with 0.2 M Ethanolamine pH 8. Eventual unbound antibody molecules were washed out by incubating beads for 5 min in 0.1 M glycine pH 3. The efficiency of cross-linking was checked by running samples on polyacrylamide 4%–15% gradient gels (Biorad) followed by Coomassie Blue staining. 1 mg of total proteins from purified synaptic membranes were diluted in a HEPES-NaCl buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, protease inhibitor cocktail) supplemented with 1% CHAPS and incubated overnight at 4°C with 36 μ g of rabbit anti-GluD1 antibody, or total rabbit IgG in control condition, covalently cross-linked to protein G magnetic beads. The beads were rinsed 3 times using HEPES-NaCl buffer supplemented with 0.1% CHAPS and further washed 3 times in a buffer containing 20 mM HEPES pH 7.4 and 150 mM NaCl. The samples were then subjected to mass spectrometry analysis (see below). GluD1-immunoprecipitation from brain extracts was repeated three times.

Proteomics

Proteins on magnetic beads were washed twice with 100 μ L of 25 mM NH_4HCO_3 and we performed on-beads digestion with 0.2 μ g of trypsin/LysC (Promega) for 1 h in 100 μ L of 25 mM NH_4HCO_3 . Samples were then loaded onto a homemade C18 StageTips for desalting (principle by stacking one 3M Empore SPE Extraction Disk Octadecyl (C18) and beads from SepPak C18 Cartridge Waters into a 200 μ L micropipette tip). Peptides were eluted using 40/60 MeCN/ H_2O + 0.1% formic acid and vacuum concentrated to dryness.

Online chromatography was performed with an RSLCnano system (Ultimate 3000, Thermo Scientific) coupled online to an Orbitrap Fusion Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific). Peptides were trapped on a C18 column (75 μ m inner diameter $\times$ 2 cm; nanoViper Acclaim PepMap 100, Thermo Scientific) with buffer A (2/98 MeCN/ H_2O in 0.1% formic acid) at a flow rate of 4.0 μ L/min over 4 min. Separation was performed on a 50 cm $\times$ 75 μ m C18 column (nanoViper Acclaim PepMap RSLC, 2 μ m, 100Å, Thermo Scientific) regulated to a temperature of 55°C with a linear gradient of 5% to 25% buffer B (100% MeCN in 0.1% formic acid) at a flow rate of 300 nL/min over 100 min. Full-scan MS was acquired in the Orbitrap analyzer with a resolution set to 120,000 and ions from each full scan were HCD fragmented and analyzed in the linear ion trap.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

Confocal image analysis

Gephyrin and PSD-95 clusters, dendritic spines and the association of GluD1 with Gephyrin and PSD95 were quantified in the proximal part of oblique dendrites directly originating from the apical trunk using Fiji (Schindelin et al., 2012; <https://fiji.sc/>). Only dendrites that were largely parallel to the plane of the slice and acquired from sections of comparable rostro-caudal position were analyzed (usually no more than 1 dendrite per neuron). The density of dendritic spines and gephyrin clusters along dendrites was calculated as described (Charrier et al., 2012; Fossati et al., 2016). Gephyrin and PSD-95 clusters were quantified over a dendrite of a minimal length of 60 μ m. The length of the dendritic segment was measured on the z projection. The fraction of gephyrin and PSD-95 clusters associated with GluD1 (association index) was manually determined on individual dendrites. A gephyrin or PSD-95 cluster labeled with EGFP-tagged FingRs was considered associated with GluD1 if it overlapped with a GluD1-mOrange puncta.

mEPSC and mIPSC analysis

Data were sampled at 10 kHz and filtered at 2 kHz. Miniature currents were analyzed over 1 min periods using pClamp 10.0 (Molecular Devices). Cells showing > 20% change in access and input resistance upon application of 5 mV hyperpolarizing steps of current were excluded from the analysis. Overlapping events were excluded from amplitude analysis. Cumulative probability graphs were obtained by taking the first 200 events within the analyzed time window of each recorded cell.

Proteomic analysis

For protein identification, data were searched against the *Mus musculus* (Mouse) UniProt database using Sequest HF through proteome discoverer (version 2.1). Enzyme specificity was set to trypsin and a maximum of two missed cleavage site were allowed. Oxidized methionine, N-terminal acetylation, and carbamidomethyl cysteine were set as variable modifications. Maximum allowed mass deviation was set to 10 ppm for monoisotopic precursor ions and 0.6 Da for MS/MS peaks. The resulting files were further processed using myProMS (Poulet et al., 2007) v3.6 (work in progress). FDR calculation used Percolator and was set to 1% at the peptide level for the whole study.

Statistics

Data are a minimum of three independent experiments. For in utero electroporations and AAV injections, data were obtained from at least three experiments or three animals from two independent litters.

For statistical analysis, we first checked the normality of the distributions using the D'Agostino-Pearson normality test. In case of normal distributions, we used unpaired Student's t test or one-way analysis of variance followed by Tukey's post test. Non-normal

distributions were assessed using the non-parametric Mann-Whitney test or the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test. A test was considered significant when $p < 0.05$. Data represent the distribution (or the mean) of the mean value per cell in the main figures. The whiskers of the boxplots in [Figure 2](#) are the minimal and maximal values. Statistical analyses were performed with Prism (GraphPad Software).

DATA AND CODE AVAILABILITY

The mass spectrometry dataset generated in this study has been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE ([Vizcaino et al., 2016](#)) partner repository with the dataset identifier PXD010373.

ANNEXE 3

Glycine receptor copy numbers and packing density at spinal cord synapses revealed by quantitative dual-colour super-CLEM

Stephanie A Maynard¹, Olivier Gemin¹, Philippe Rostaing¹, Antoine Triller¹, Christian G Specht¹

¹École Normale Supérieure, PSL Research University, CNRS, Inserm, IBENS, Paris 75005, France

Email: christian.specht@inserm.fr

The strength of synaptic transmission depends on the number and distribution of neurotransmitter receptors at synapses [1]. At inhibitory synapses in the spinal cord, direct interactions between glycine receptors (GlyRs) and the synaptic scaffold protein gephyrin regulate receptor diffusion and trapping [2]. To quantitatively characterise the sub-synaptic distribution of GlyRs in the spinal cord, we implemented single molecule counting in knock-in animals expressing endogenous mEos4-tagged GlyRs. Dual-colour super-resolution images of GlyRs and gephyrin are correlated with electron microscopic images (super-CLEM) to relate copy numbers to structural features of identified synapses. Serial sectioning further reveals the 3D orientation of the synapse as well as the exact size of the postsynaptic domain, from which we can derive absolute receptor densities at glycinergic synapses in different neuronal populations [3]. Our data suggest that the receptors are clustered at a density of about 1000 GlyR complexes/ μm^2 in the dorsal horn and 1500/ μm^2 in the ventral horn, pointing to striking differences in the occupancy of receptor binding sites. Ongoing analyses address the open question whether GlyRs are heterogeneously distributed within the synaptic domain [4].

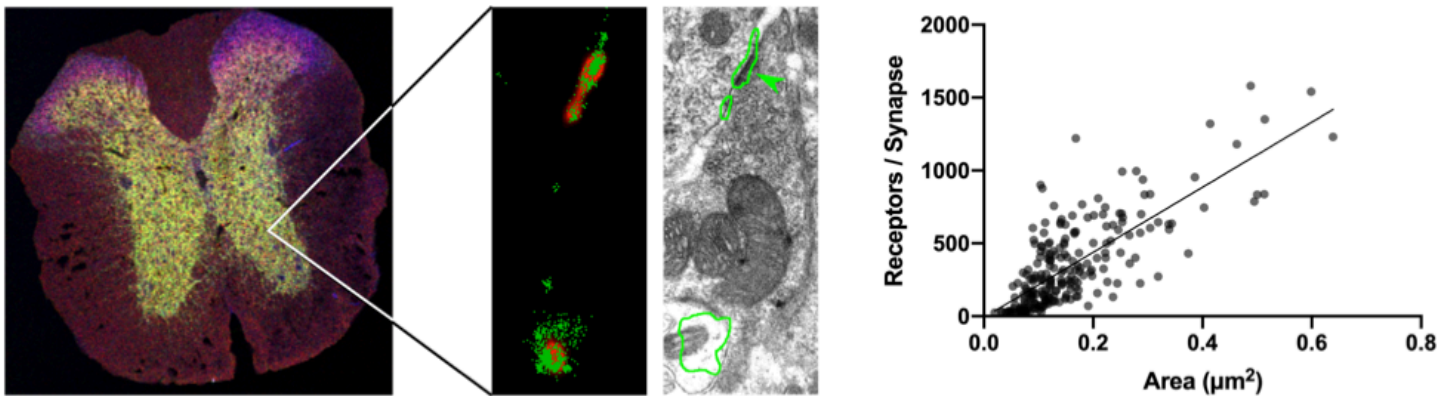


Fig. Left: endogenous mEos4-tagged GlyRs (green) in spinal cord tissue. Middle: Dual-colour super-resolution imaging of synaptic GlyRs (green, arrowhead) and gephyrin (red) overlaid with an electron micrograph. Image size: 1 x 2.5 μm . Right: Absolute GlyR densities at synapses.

[1] Nusser et al. (1997). Differences in synaptic GABA(A) receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19:697-709.

[2] Choquet & Triller (2013). The dynamic synapse. *Neuron* 80:691-703.

[3] unpublished data

[4] Yang & Specht (2019). Subsynaptic domains in super-resolution microscopy: The treachery of images. *Front Mol Neurosci* 12:161. doi: 10.3389/fnmol.2019.00161

RÉSUMÉ

Les épines dendritiques reçoivent la majorité des contacts synaptiques excitateurs dans le cortex, et leur morphologie module la compartimentation des signaux synaptiques. L'objectif de ma thèse a été de développer une approche de microscopie corrélative optique-électronique (CLEM) qui permette de quantifier les paramètres morphologiques d'épines dendritiques identifiées in vivo. J'ai utilisé la CLEM pour caractériser l'ultrastructure d'épines portées par les dendrites basales de neurones identifiés. Les mesures ont été utilisées pour paramétrer un modèle de l'intégration dendritique qui prenne en compte la diversité morphologique des épines. Ce modèle nous a permis de quantifier la proportion d'épines qui compartimentent effectivement les signaux électriques, et d'aborder la fonction des épines dites doublement innervées, qui reçoivent un contact inhibiteur dont le rôle demeure incompris. Notre modèle fournit un mécanisme de signalisation spécifique des épines doublement innervées, où le signal inhibiteur atténue l'influx calcique produit dans l'épine par le signal excitateur sans amortir sa composante électrique, en fonction de l'intervalle entre ces deux signaux synaptiques, ce qui peut influencer la plasticité synaptique.

MOTS CLÉS

CLEM 3D ; Épines dendritiques ; Circuits intact ; Compartimentation ;
Épines doublement innervées ; Photo-précipitation DAB

ABSTRACT

Dendritic spines receive most excitatory synaptic contacts in the cortex, and spine morphology shapes the compartmentalization of synaptic signals. The aim of my thesis has been to develop a correlative light-electron microscopy (CLEM) approach in order to quantify the morphological parameters of identified dendritic spines in intact cortical circuits. I used CLEM to characterize spine ultrastructure along basal dendrites of identified neurons. These measurements were used to constrain a model of dendritic integration. Our model enabled quantifying which proportion of reconstructed spines effectively compartmentalized electrical signals, and we used it to approach the function of a subset of spines that harbour a supernumerary inhibitory contact, the role of which is yet unknown. Our modeling effort unveils a signaling mechanism, prominent in dually-innervated spines, by which an inhibitory signal can attenuate the calcium influx generated in the spine head by an excitatory signal, while depolarization amplitude is unabated, which potentially impacts synaptic plasticity.

KEYWORDS

3D-CLEM; Dendritic spines; Intact circuits; Compartmentalization;
Dually-innervated spines; DAB photo-precipitation